

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miha ŽITNIK

**IDENTIFIKACIJA PRITRJENIH IN
PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH VRST V
DOLOMITNEM VODONOSNIKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miha ŽITNIK

**IDENTIFIKACIJA PRITRJENIH IN PLANKTONSKIH
BAKTERIJSKIH VRST V DOLOMITNEM VODONOSNIKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF ATTACHED AND UNATTACHED
BACTERIAL SPECIES IN DOLOMITE AQUIFER**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. V njem opisano eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Inštituta za fizikalno biologijo d.o.o. v Ljubljani, pod vodstvom dr. Aleša Lapanje.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 9. 6. 2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorja dr. Aleša Lapanjeta in za recenzenta doc. dr. Blaža Stresa.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentor: dr. Aleš Lapanje

Recenzent: doc. dr. Blaž Stres

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Aleš Lapanje

Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o., Ljubljana

Član: doc. dr. Blaž Stres

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Miha Žitnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26 + 579.68: 556.33:577.2.08 (043) = 163.6
KG	mikrobne združbe/ biološka raznovrstnost/ vodonosniki/ dolomitni vodonosnik/ pritrjene bakterije/ planktonske bakterije/ klonske knjižnice/ identifikacija bakterij/molekularne tehnike
AV	ŽITNIK, Miha
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica) / LAPANJE, Aleš (somentor) / STRES, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	IDENTIFIKACIJA PRITRJENIH IN PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH VRST V DOLOMITNEM VODONOSNIKU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 70 str., 5 pregl., 21 sl., 73 vir.
IJ	Sl
JI	Sl/en
AI	Vodonosniki so glavni vir pitne vode, za oskrbovanje prebivalstva, ter edini možen vir mineralne vode za pripravo ustekleničene pitne vode v Sloveniji. Zagotavljati morajo neoporečno in kvalitetno vodo. Kvaliteta vode v vodonosniku je odvisna od mnogih dejavnikov, med drugim tudi od primarne sestave mikrobnih populacij in njihove dinamike ob vzpostavitvi črpalne infrastrukture in uvedbi črpalnega režima. Da bi predvideli morebitne spremembe v kvaliteti vode iz vodonosnika, ki bi lahko nastale kot posledica delovanja mikrobnih populacij, je potrebno poznavanje sestave primarnih mikrobnih populacij. V naši raziskavi smo za identifikacijo pritrjenih in planktonskih bakterij uporabili molekularne in klasične mikrobiološke metode. V različnih globinah novonastajajoče vrtine smo vzorčili vodo in kamnino z vrtanjem v kamnite plasti dolomitnega vodonosnika, ter iz vzorcev na izbranih globinah izolirali DNK. S PCR smo z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili odseke gena za bakterijsko 16S rRNK in pripravili klonske knjižnice. Analiza sekvenc je pokazala, da je sestava pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb različna in se spreminja po globini. V vodonosniku prevladujejo bakterije iz razredov <i>Betaproteobacteria</i> in <i>Gammaproteobacteria</i> . Med pritrjenimi bakterijami ima večji delež še razred <i>Actinobacteria</i> , med planktonskimi pa razred <i>Clostridia</i> in nerazvrščene bakterije. Ocenjena vrstna raznolikost je večja pri planktonski populaciji. Izkazalo se je, da je razporeditev planktonskih in pritrjenih mikrobnih združb po globini vrtine neodvisna od vrste kamnine. Po enem letu uporabe vrtine smo ponovno analizirali sestavo bakterijskih razredov na dveh globinah in ugotovili, da se je sestava spremenila. To pripisujemo stresnim pogojem v vodonosniku, ki so se vzpostavili zaradi izkoriščanja vodonosnika. Zaradi večje koncentracije železa v vodi smo pričakovali prisotnost železo oksidirajočih bakterij. Te smo zaznali s klonskimi knjižnicami, z gojitvenimi tehnikami pa ne. S klonskimi knjižnicami smo zaznali potencialno patogene bakterije za živali in ljudi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.26 + 579.68: 556.33:577.2.08 (043) = 163.6
 CX microbial communities / biodiversity/ aquifers/ dolomite aquifer/ attached bacteria/ unattached bacteria/ clone libraries/ bacterial identification/ /molecular techniques
 AU ŽITNIK, Miha
 AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor) / LAPANJE, Aleš (co-advisor) / STRES, Blaž (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2011
 TI IDENTIFICATION OF ATTACHED AND UNATTACHED BACTERIAL SPECIES IN DOLOMITE AQUIFER
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO IX, 70 p., 5 tab., 21 fig., 73 ref.
 LA SI
 AL SI/en
 AB Aquifers represent the main sources of drinking water in Slovenia, providing water for population as well as for mineral water bottling industry. Suitable aquifers provide unpolluted and impeccable water. Quality of the water is dependent on several factors, among which are also the primary structure of microbial population and its dynamics in response to establishment of pumping infrastructure and pumping regime. In order to correctly forecast possible influences of the microbial population on the quality of water from the aquifer, it is necessary to know the composition of primary microbial population. Molecular and classical microbiological methods were used to identify attached and planktonic bacteria. Water and rock were sampled during the drilling process, and DNA was extracted from samples across depth. Bacterial 16S rRNA genes regions were amplified with PCR using universal primers. From amplified products the clone libraries were constructed. Analysis of the gene sequences showed, that the composition of attached and planktonic bacterial populations differs and changes across depth. Bacteria from the classes *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* predominate in the aquifer. Notable is also the presence of the class *Actinobacteria* among the attached bacteria, while the class *Clostridia* along with some unclassified bacteria are present in the planktonic population. Estimated species diversity is greater for the planktonic population. Depth distribution of planktonic and attached bacterial populations is independent of bedrock porosity. Structure of planktonic bacterial classes changed after one year pumping. The change in the population is attributed to the increased stress on the population due to pumping. The presence of iron-oxidizing bacteria in clone libraries, expected due to higher concentration of iron in the water, was confirmed, while culturing methods gave negative results. Clone libraries also revealed the presence of some potential animal and human pathogens.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.2 BAKTERIJSKA RAST V VODONOSNIKIH	5
2.3 MIKROBNE KONTAMINANTE V VODONOSNIKIH	6
2.4 PRITRJENE IN PLANKTONSKE BAKTERIJE V VODONOSNIKIH	8
2.4.1 Prednosti pritrjenega življenjskega cikla bakterij	10
2.4.2 Slabosti pritrjenega življenjskega cikla bakterij	11
2.5 BAKTERIJSKA RAZNOLIKOST V VODONOSNIKIH	12
2.5.1 Oligotrofna okolja	12
2.5.2 Vpliv bakterij na obraščanje in korozijo cevitve v vodonosniku	17
2.5.3 Dejavniki, ki vplivajo na bakterijsko raznolikost v vodonosnikih	19
2.6 METODE ZA UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB	19
3 MATERIALI IN METODE DELA	22
3.1 VZORČENJE VODE IN KAMNINE	22
3.2 ELEKTROKEMIJSKE MERITVE VODE	22
3.3 IZOLACIJA DNK	22
3.3.1 Izolacija DNK iz vodnih vzorcev	22
3.3.2 Izolacija DNK iz kamninskih vzorcev	23
3.4 POMNOŽEVANJE GENA ZA 16S rRNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)	23
3.4.1 Pomnoževanje gena 16S rDNK iz DNK, izolirane direktno iz vzorcev vrtine, v verižni reakciji s polimerazo	23
3.4.2 Pomnoževanje gena 16S rDNK iz klonov (Colony PCR) in iz plazmidov, izoliranih iz klonov, v verižni reakciji s polimerazo	24
3.5 KLONIRANJE	25
3.5.1 Gojišče LB Ap X-Gal	26
3.5.2 Gojišče LB Ap	26
3.5.3 Kloniranje	26

3.6	PLAZMIDNA IZOLACIJA	27
3.6.1	Raztopina I.....	27
3.6.2	Raztopina II	27
3.6.3	Raztopina III.....	27
3.6.4	Gojišče LB Ap.....	28
3.6.5	Plazmidna izolacija	28
3.7	ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ GENA ZA 16S rRNK.....	28
3.8	IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VODE	29
3.8.1	Gojišče Ferrous sulfide agar (Atlas, 2004).....	29
3.8.2	Tekoče gojišče <i>Leptothrix strains</i> meduim (Atlas, 2004).....	30
3.8.3	Trdno gojišče <i>Leptothrix strains</i> medium (Atlas, 2004).....	30
3.8.4	Gojišče Fe-EDTA (Atlas, 2004).....	30
3.9	IZOLACIJA DNK IZ IZOLATOV	31
3.10	POMNOŽEVANJE GENOV ZA 16S rRNK IZ DNK, IZOLIRANIH IZ ČISTIH BAKTERIJSKIH KULTUR, V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO	31
3.10.1	Analiza 16S rDNK nukleotidnih zaporedij.....	31
3.11	ANALIZA ZAPOREDIJ KLONSKIH KNJIŽIC.....	31
3.11.1	Deleži bakterijskih razredov po globinah in porazdelitev pritrjenih in planktonskih zaporedij po posameznih globinah	31
3.11.2	Ocena diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic	32
4	REZULTATI.....	33
4.1	FIZIKALNO KEMIJSKI PARAMETRI VRTINE	33
4.1.1	Kamnina.....	33
4.1.2	Fizikalno kemijski parametri.....	34
4.3	OCENA DIVERZITETE IN REPREZENTATIVNOST KLONSKIH KNJIŽNIC	37
4.3.1	Pritrjene klonske knjižnice.....	32
4.3.2	Planktonske klonske knjižnice	39
4.4	ZASTOPANOST TAKSONOMSKIH RAZREDOV V VODNI VRTINI	40
4.5	PORAZDELITEV PRITRJENIH IN PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH GENOV ZA 16S rRNK PO POSAMEZNIH GLOBINAH V VODNI VRTINI...	42
4.6	SESTAVA KLONSKIH KNJIŽNIC PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZAPOREDIJ NA GLOBINAH 76 IN 200 METROV V ČASU VRTANJA IN PO ENEM LETU	45
4.7	VRSTNA RAZNOLIKOST PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZAPOREDIJ NA GLOBINI 80 IN 200 METROV OB ČASU VRTANJA IN PO ENEM LETU UPORABE VODONOSNIKA	47
4.8	BAKTERIJE IZOLIRANE Z GOJITVENIMI TEHNIKAMI	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	50
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI	63

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Program PCR za pomnoževanje genov za 16S rDNK iz DNK, izolirane iz vodnih in kamninskih vzorcev dolomitnega vodonosnika	24
Preglednica 2: Program PCR za pomnoževanje genov za 16S rDNK iz klonov (Colony PCR)	25
Preglednica 3: Program PCR M13 za pomnoževanje genov za 16Sr RNK iz plazmidov	25
Preglednica 4: Ocene diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic pritrjenih bakterij	38
Preglednica 5: Ocene diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic planktonskih bakterij	39

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Poroznost vodonosnikov (Brenčič, 2008)	4
Slika 2: Filogenetsko drevo proteobakterij odkritih v podzemnih vodnih okoljih (Griebler in Lueders, 2009)	15
Slika 3: Filogenetsko drevo bakterijskih debel odkritih v podzemnih vodnih okoljih (Griebler in Lueders, 2009)	16
Slika 4: Profil vodne vrtine	33
Slika 5: pH vrednosti v vodni vrtini	34
Slika 6: Redoks potencial in prevodnost v vodni vrtini	34
Slika 7: Kemijski parametri v vodni vrtini	35
Slika 8: Koncentracija Fe (II) in Fe (III) po globini vodonosnika	36
Slika 9: Chao1 ocena vrstne diverzitete klonskih knjižnic pritrjenih bakterij po globini vrtine	38
Slika 10: Chao1 ocena vrstne diverzitete klonskih knjižnic planktonskih bakterij po globini vrtine	39
Slika 11: Bakterijski razredi na globinah 56m in 76m	40
Slika 12: Bakterijski razredi na globinah 96m, 118m, 132m	40
Slika 13: Bakterijski razredi na globinah 148m, 180m, 200m	40
Slika 14: Porazdelitev pritrjenih in planktonskih zaporedij po posameznih globinah v vodni vrtini	42
Slika 15: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih sekvenc po razredih, na globini 76 metrov v času vrtanja vrtine	45
Slika 16: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih sekvenc po razredih, na globini 80 metrov po enem letu	45
Slika 17: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih sekvenc po razredih, na globini 200 metrov v času vrtanja vrtine	46
Slika 18: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih sekvenc po razredih, na globini 200 metrov po enem letu	46
Slika 19: Ocena vrstne raznolikosti na globini 80 metrov ob vrtanju in po enem letu uporabe vodonosnika.	47
Slika 20: Ocena vrstne raznolikosti na globini 200 metrov ob vrtanju in po enem letu uporabe vodonosnika.	47
Slika 21: Bakterijski rodovi zrasli na gojišču Fe-EDTA in na LSM gojišču	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Chao1	izračunano število ocenjenih vrst v vzorcu s programom Mothur
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
Eh	elektrokemijski potencial
Fe	železo
Ma	miliamper
Mg	magnezij
MPN	metoda najbolj verjetnega števila bakterij (angl. most probable number)
Mn	mangan
mV	milivolt
mL	mililiter
μL	mikroliter
μS	mikrosiemens
OTU	operativna taksonomska enota (angl. operational taxonomic unit)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polimerase chain reaction)
RNK	ribonukleinska kislina
rDNK	ribosomska deoksiribonukleinska kislina
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
Sobs	število izračunanih operativnih taksonomskih enot v programu Mothur (angl. Species observed)
TOC	celokupni organski ogljik (angl. Total organic carbon)
V	volt
Zn	cink

1 UVOD

Vodonosniki so glavni vir pitne vode v Sloveniji, saj zagotavljajo več kot 95 % oskrbe s pitno vodo. Podzemna voda v vodonosnikih je najkvalitetnejši vir pitne vode, saj je kemijsko, temperaturno in količinsko stabilna, ima ugodne bakteriološke lastnosti, obenem pa je poceni. Podzemno vodo lahko izkoriščamo direktno iz izvirov ali prek vodne vrtine ali vodnjaka (Brenčič, 2008). Za vrtanje vodne vrtine se uporabljajo hidrogeološke metode, pri katerih je najprej potrebno vrtanje opazovalne vrtine, preko katere dobimo informacijo o globini vodonosnika, nihanju vodnega stolpca, pretoku vode in litološki profil. Iz pridobljenih podatkov se nato načrtuje gradnja in uporaba vodne vrtine. Na vzorcu podzemne vode iz opazovalne vrtine pa se določijo fizikalno kemijski ter mikrobiološki parametri vode (Brenčič in sod., 2004). Iz teh podatkov dobimo le informacijo o primernosti podzemne vode za uporabo v gospodinjstvih, ne dobimo pa nobene informacije o prisotnosti mikrobnih združb, ki bi lahko dolgoročno negativno vplivale na vodno vrtino, na distribucijski sistem in posledično na kakovost vode v vodonosniku. Z vrtanjem v vodonosnik porušimo prvotne razmere v vodonosniku, vnesemo bakterije s površja in premešamo oziroma prerazporedimo mikrobne združbe iz nižjih v globlje dele vodonosnika in obratno. Prav tako porušimo prvotne razmere v vodonosniku, ko črpamo vodo iz vodonosnika, s čimer vzpostavimo stresne pogoje, na katere se različne bakterijske vrste različno odzivajo. Zato je poznavanje sestave in dinamike mikrobnih populacij v okolju zelo pomembno, saj morajo biti vodni viri stabilni, neonesnaženi in čim manj obremenjeni z mikrobnimi populacijami.

Med mikroorganizmi v vodonosnikih imajo najpomembnejšo vlogo bakterije, saj so v več kot 80 % primerih, bakterije in biofilmi s svojimi produkti, vzrok za spremembe v vodonosnikih in posledično oporečnost vode (Schneiders, 2003). Za pridobitev informacij o mikrobnih populacijah v okolju je potrebna njihova analiza, s katero pridobimo podatke o obremenjenosti vode z mikrobnimi populacijami, o prisotnosti in vrstah mikrobnih populacij, o njihovi vertikalni razporeditvi in transportu ter o prisotnosti biofilmov. Na podlagi teh podatkov lahko poleg ocene ustreznosti vodnega vira za uporabo tudi predvidimo možne spremembe v okolju, ki bi lahko nastale kot posledica mikrobnega delovanja. Tako lahko predvidimo obrabo distribucijskega sistema, načina cevitve in s tem

posledične korozije ali obraščanje z biofilmi, kar je posledica delovanja mikrobnih populacij in z njimi povezanih kemijskih in biokemijskih procesov (Schneiders, 2003). Prav tako lahko ugotavljamo in sledimo, kako kemijski in ostali okoljski dejavniki vplivajo na raznolikost mikrobnih populacij. S temi informacijami lahko predvidimo možne spremembe v vodonosnikih in načrtujemo režim uporabe in vzdrževanja vodne vrtine ter distribucijskega sistema.

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je s pomočjo molekularnih in klasičnih mikrobioloških metod identificirati in primerjati pritrjene in planktonske bakterijske populacije po globini vodonosnika. Ocenili bomo vpliv poroznosti kamnine, globine vodonosnika, cevitve vodonosnika in črpanja vode, na prisotne mikrobne združbe. Na podlagi kemijsko fizikalnih parametrov vode ter prisotnih mikrobnih združb želimo oceniti primernost vodonosnika za uporabo. Z identifikacijo planktonskih mikrobnih združb po enem letu obratovanja vodne vrtine pa bomo ugotavljali vpliv črpanja vode na prisotne bakterijske populacije v vodonosniku.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V dolomitnem vodonosniku je v različnih globinah pričakovati različno poroznost kamnine, kjer se skozi te razpoke vodonosnik napaja s podzemno vodo. Na teh globinah pričakujemo drugačne koncentracije hranil in drugih snovi, zato predvidevamo, da so na teh mestih prisotne drugačne pritrjene in planktonske mikrobne združbe, kot na globinah z nerazpokano kamnino (Lehman in sod., 2001b; Schneiders, 2003). V začetnih globinah vodonosnika pričakujemo vpliv površinskih dejavnikov in večjo koncentracijo organskih snovi, zato predvidevamo, da so v začetnih delih prisotne drugačne bakterijske populacije, kot v globljih delih vodonosnika. S črpanjem vode iz vodonosnika se poveča pretok vode v vodonosniku, zato se vzpostavijo drugačni pogoji, kot so to bili pred tem posegom v vodonosniku in katerim so izpostavljene bakterijske združbe (Schneiders, 2003). Pričakujemo, da se časovno tekom uporabe vodne vrtine, spreminja raznolikost bakterijskih populacij v vodonosniku.

Na podlagi teh predvidevanj smo oblikovali naslednje hipoteze:

- vrstna sestava planktonskih bakterijskih združb se razlikuje od vrstne sestave pritrjenih mikrobnih združb,
- v odvisnosti od globine, s katero se spreminjajo kemijsko - fizikalni parametri vode, se spreminja sestava planktonskih mikrobnih združb,
- v odvisnosti od globine, s katero se spreminjajo kemijsko - fizikalni parametri vode, se spreminja sestava pritrjenih mikrobnih združb,
- raznolikost mikrobnih združb je odvisna od poroznosti kamnine in se večja s poroznostjo kamnine,
- raznolikost mikrobnih združb se tekom uporabe vrtine spreminja.

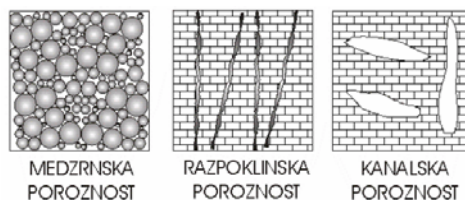
2 PREGLED OBJAV

Vodonosnik je območje v poroznem sedimentu ali kamnini, ki je napolnjeno z vodo. Voda v vodonosniku je podtalnica ali podzemna voda. Vodonosniki se med seboj razlikujejo glede na poroznost, prepustnost in shranjevanje vode. Poroznost pomeni prisotnost por, v katere lahko vstopi voda in izpodrine prisotne pline, prepustnost pa omogoča pretakanje vode v vodonosniku in s tem posledično zadrževalni čas vode v vodonosniku. Sposobnost shranjevanja vode je odvisna od velikosti vodonosnika, njegovih dimenzij in velikosti por. Lastnosti vodonosnikov so odvisne od tal in kamnine, v katerih je prisoten določen vodonosnik (Bear, 1988).

Vodonosnik nastane, ko voda potuje navzdol skozi prepustne plasti tal in se ustavi, ko pride do neprepustne plasti. Na tistem mestu se voda začne akumulirati in oblikujejo se posamezna območja z različno vsebnostjo vode. Velikost teh območij je odvisna od vrste tal in kamnin. Definiramo lahko nasičeno območje, območje aeracije in območje kapilarnega dviga. Nasičeno območje je prostor, ki je 100 % napolnjen z vodo. Nad nasičenim območjem je območje kapilarnega dviga vode. Nad njim je območje aeracije ali nenasičeno območje, ki ima v prostorih plin, vodno paro ali vodo. Območji se ločita z mejo, ki ji pravimo gladina podtalnice ali vodni stolpec. Gladina podtalnice se spreminja v odvisnosti od napajanja in črpanja ali odtokanja vode iz vodonosnika. Tako se nasičeno in nenasičeno območje neprestano spreminja (Bear, 1988).

Vodonosniki se med seboj razlikujejo po vrsti kamnine in po omejenosti. Glede na vrsto kamnine ločimo:

- peščeno prodnate oziroma medzrnske vodonosnike,
- razpoklinske vodonosnike,
- kraške oziroma kanalske vodonosnike.



Slika 1: Poroznost vodonosnikov (Brenčič, 2008)

Peščeno prodnatih vodonosnikov je največ. Sestavljajo jih različni delci peska, gramoza, peščenjaka in konglomeratov. Razpoklinski vodonosniki nastanejo zaradi razpok v kamninah, ki so posledica delovanja različnih geoloških, kemijskih in bioloških dejavnikov. Kraški oziroma kanalski vodonosniki pa nastanejo v prepletenih sistemih podzemnih rogov in jam, po katerih se pretaka voda.

Glede na omejenost pa vodonosnike delimo na:

- omejene vodonosnike,
- neomejene vodonosnike,
- zaprte vodonosnike,
- arteške vodonosnike.

Vodonosnike omejujejo nepropustne plasti tal. Vsi vodonosniki so spodaj omejeni z nepropustno plastjo tal. Neomejeni vodonosniki so bočno zelo razprostranjeni, omejeni vodonosniki pa so bočno omejeni z nepropustnimi plastmi. Zaprte vodonosniki so omejeni navzgor in se lahko napajajo le bočno. Arteški vodonosniki pa so zaprti z vseh strani. V njih je voda pod pritiskom. Če v tak vodonosnik zvrtaemo vodnjak, podzemna voda sama priteče na površje, tako da ni potrebno črpanje vode (Bear, 1988).

2.2 BAKTERIJSKA RAST V VODONOSNIKIH

V vodonosniku je bakterijska rast odvisna od okoljskih pogojev. Med temi pogoji sta zelo pomembna kamninska osnova in hidravlična prevodnost (Schneiders, 2003). Hidravlična prevodnost je lastnost kamnine, da prepušča vodo skozi hidravlične gradiente v tleh (Bear, 1988). Hidravlična prevodnost je pomembna za gibanje vode v vodonosniku in posledično za bakterijsko rast. Tako je v zelo prevodnih področjih vodonosnika večja bakterijska rast, saj voda prinaša potrebne snovi za bakterijsko rast in odnaša metabolne produkte. V manj prevodnih področjih vodonosnika pa je veliko manjša bakterijska rast (Schneiders, 2003).

Kamninska osnova je pomemben faktor, ki spodbuja ali zavira bakterijsko rast. Vodonosniki, sestavljeni iz sedimentnih nanosov, peska ali gramoza, nudijo bakterijam številne površine, na katere se lahko pritrdijo in naredijo biofilme. V takšnih vodonosnikih je tudi dokaj hiter pretok vode, tako da imajo biofilmi stalen dotok hranil in odtok metabolnih produktov. Biofilmi tudi čistijo vodo v vodonosniku, saj prestrezajo različne

kontaminante in druge kemijske snovi. Ti biofilmi ohranjajo svojo konstitucijo dokler v vodonosnikih niso prisotne kompetitivne bakterije ali pa praživali, ki se prehranjujejo s temi bakterijami (Schneiders, 2003). Prav tako je pomembna tudi mineralna sestava kamnine, ki omogoča rast različnim bakterijskim vrstam (Boyd in sod., 2007). Najbolj preučene so železo reducirajoče bakterije, ki se pritrjajo na kamnine z veliko vsebnostjo železa (Caccavo in Das, 2002). Rogers in sodelavci (1998) pa so dokazali, da se v vodonosnikih, katerih kamninska osnova vsebuje fosfor in dušik, pritrja signifikantno več bakterij, kot v vodonosnikih, katerih kamninska osnova ne vsebuje fosforja in dušika.

Trdne kamnine so pogosto razpokane, razpoke pa omogočajo gibanje vode. Voda v takih kamninah potuje veliko hitreje, tako da imajo različne kemijske ter biološke kontaminante, ki vstopajo v tak tip vodonosnika, precej manj časa za interakcijo z biofilmi ali za absorpcijo na površine. Taki vodonosniki se lahko zelo hitro onesnažijo in se tudi težko očistijo. Biofilmi se začnejo pojavljati ob različnih malih razpokah, kjer se voda giblje počasneje. Tam se bakterije lažje pritrdijo na površino in dobijo hranila, ki so prisotna v vodi ter adsorbirana na površini kamnin. V kraških tleh, kjer z raztapljanjem apnenca nastajajo velika odprta področja, so zelo ugodni pogoji za nastanek biofilmov, ki se lahko razrastejo okoli vodnih virov. Vodonosniki v kraških tleh so zaradi kraških pojavov, ki povzročajo veliko prepustnost, bolj dovzetni za kontaminacijo in onesnaženje voda, ker na številnih delih komunicirajo s površino. Podzemna voda v kraških vodonosnikih ima zaradi številnih komunikacij s površino kratek zadrževalni čas. Vsaka dodatna komunikacija s površino pa hkrati poveča verjetnost vstopa onesnaževal v takšen vodonosnik (Schneiders, 2003).

2.3 MIKROBNE KONTAMINANTE V VODONOSNIKIH

Kontaminante v vodonosnikih so organizmi ali kemijske snovi, ki so alohtone, kar pomeni, da niso že naravno prisotne v vodonosnikih, ter vplivajo na pogoje v vodonosniku in posledično na kakovost vode v njem. Veliko število mikroorganizmov je avtohtonih in so že naravno prisotni v vodonosniku, zato med kontaminante štejemo tiste, ki so nevarne za zdravje ljudi (Schneiders, 2003). To so patogeni organizmi, med katere štejemo bakterije, viruse in protozoje. Najštevilčnejše od teh so bakterije, ki so v večini primerov glavni vzrok za težave v vodonosnikih in oporečnost vode.

V Sloveniji je s Pravilnikom o pitni vodi (2004) določeno, da je pitna voda z mikrobiološkega stališča zdravstveno ustrezna, kadar v njej ni prisotnih mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v takšnem številu, ki bi ogrozilo zdravje ljudi. Na podlagi Pravilnika o pitni vodi (2004) je tako določeno izvajanje mikrobioloških testov, ki pa ne preverjajo prisotnosti specifičnih patogenov, ampak le njihove indikatorje. Tako se preverja prisotnost bakterije *Escherichia coli* in enterokokov, ki se jih s predpisano metodo ne sme zaznati. Spremlja se število kolonij zraslih pri 22 °C, katerih število ne sme presegati 100 kolonij na mililiter in število kolonij pri 37 °C, katerih število ne sme presegati 20 kolonij na mililiter.

Dinamika bakterijske združbe je odvisna tudi od interakcije bakterij s protozoji in virusi. Lokacija teh mikroorganizmov v vodonosnikih je odvisna od pogojev v določenih delih vodonosnika. V bolj aerobnih delih prevladujejo aerobni mikroorganizmi ter protozoji, v anaerobnih pa anaerobne bakterije. Večjo gostoto morebitno prisotnih virusov lahko pričakujemo v okolici biofilmov. Fakultativni anaerobi so prisotni na mejnih področjih, med anaerobnim in aerobnim okoljem. Pomembni pa so tudi simbiotski odnosi med bakterijami, ki omogočajo preživetje v vodonosnikih tudi alohtonim bakterijam, ki niso prilagojene na takšne razmere (Schneiders, 2003).

Do onesnaženja vodonosnikov s kemijskimi in biološkimi kontaminantami lahko pride ob naravnih nesrečah, namernih ali nenamernih dejanjih ali nesrečah, ali zaradi naravnih pogojev v tleh. Največkrat je za onesnaženje vodonosnikov kriva industrija, kmetijstvo, promet in odplake iz urbanih območij (Schneiders, 2003). Do vnosa kemijskih in bioloških kontaminant pa pride tudi med vrtanjem vodne vrtine, vzorčenjem kamnine in vode, vzpostavljanjem distribucijskega sistema in drugih posegih v vodni vrtini (Pedersen in sod., 1997; Boivin-Jahns in sod., 1996; Stroes-Gascoyne in sod., 2007). Najverjetnejši viri kontaminant so oprema za vrtanje in vzorčenje, voda za spiranje in hlajenje opreme, zrak, ki ga vpihavajo v vrtino med vrtanjem in vstavljanje ter čiščenje cevi za črpanje vode iz vodonosnika (Stroes-Gascoyne in sod., 2007). Bakterije s produkti metabolizma lahko spremenijo razmere v vodonosnikih, predvsem pH in Eh. Med produkti bakterijskega metabolizma so pomembni predvsem plini, kot so CO₂, CH₄, H₂, H₂S, organske kisline in kelatorske molekule (Stroes-Gascoyne in sod., 2007). Številni produkti aktivnih bakterij povzročajo biokorozijo (Dinh in sod., 2004), kar poškoduje kovinske dele v vodni vrtini,

jim skrajšajo življenjsko dobo, višajo stroške uporabe in slabšajo kvaliteto vode. Poleg tega pa bakterije s svojim metabolizmom tudi pospešijo preperevanje kamnine, kar pospešuje obrabo vodonosnika (Kostka in sod., 1999).

2.4 PRITRJE NE IN PLANKTONSKE BAKTERIJE V VODONOSNIKI H

V naravnih okoljih bakterije preživijo del, nekatere pa cel življenjski cikel, pritrjene na površino (Marshall, 1976). Pritrjen in planktonski način življenja pa imata vsak svoje prednosti ter pomanjkljivosti.

Planktonske bakterije prosto plavajo ali lebdi jo v vodi, ob prisotnosti vodnega toka pa se premikajo z njim. Na ta način lahko hitro prepotujejo velike razdalje. Posamezne bakterije se v vodi obnašajo kot koloidni delci, tako da težijo k temu, da ostanejo v vodi. Če se bakterije pritrdijo na delce v vodi ali pa se združijo v skupke, se prične sedimentacija. (Marshall, 1976).

Ko planktonske bakterije prispejo v okolje s prisotnimi površinami, ki jim omogočajo pritrditev, se tam lahko pritrdijo in tako postanejo pritrjene bakterije. Predvsem na mejnih plasteh, ob stikih dveh površin se pogosto ustvarijo gradienti hranil, ki v bakterijah povzročijo kemotaktične in fiziološke spremembe, zaradi katerih se pritrdijo na površine (Donlan, 2002). Nekatere bakterije se hitro ireverzibilno vežejo na površine (Fletcher, 1980), druge pa potrebujejo daljši čas za prilagoditev na tak način življenja (Marshall in sod., 1971). Celice s svojimi zunajceličnimi polisaharidi, proteini ali glikoproteini, ustvarijo povezave s površino. Te so lahko hidrofobne interakcije, dipolne interakcije (dipol-dipol, dipol-induciran dipol, ion-dipol), kemijske vezi (elektrostatične, kovalentne, vodikove) ali Van der Waalsove vezi (Rutter in Vincent, 1980).

Pritrjanje bakterij na površine je odvisno od različnih dejavnikov, ki so odvisni od:

- lastnosti površine na katero se pritrjajo bakterije (hrapavost in hidrofobnost),
- adsorbiranih molekul na površini,
- hidrodinamike vodnega medija (hitrost vodnega toka),
- lastnosti vodnega medija (pH, temperatura, hranila, ionska moč),
- lastnosti celičnih površin (naboj, hidrofobnost, hidrofilnost, prisotnost bičkov ali fimbrij in drugih površinskih komponent) (Donlan, 2002).

Pomembni lastnosti površin, na katere se pritrjajo bakterije sta hrapavost in hidrofobnost. Pri bolj hrapavih površinah je na voljo večja površina za pritrjanje bakterij kot na gladkih. Prav tako je zaradi hrapavosti površine prisotnih manj strižnih sil, zato se nanje pritrja več bakterij kot na gladke površine (Characklis in sod., 1990). Več bakterij se pritrja na hidrofobne kot na hidrofilne površine (Donlan, 2002). Pri pritrjanju ima vlogo tudi hidrodinamika vode oziroma medija, v katerem so bakterije. Na stiku med površino in vodo se vzpostavi mejno območje, v katerem je manjša hitrost toka. Debelina tega območja je odvisna od hitrosti pretoka vode. Hitrejši, kot je pretok vode, tanjše je mejno območje in obratno. Zaradi nižje hitrosti toka, v tej plasti ni prisotne turbulence in strižnih sil, zato se bakterije lažje pritrjajo na površino (Rijnaarts in sod., 1993).

Za pritrjanje bakterij na površine so pomembne tudi lastnosti vodnega medija. Te so pH, koncentracije hranil, ionska moč, temperatura (Li in Logan, 2004; Donlan, 2002). To se lahko opazi kot sezonsko pritrjanje bakterij in formiranje biofilmov v vodnih sistemih (Donlan in sod., 1994). Convan in sodelavci (1991) so ugotovili, da s povečano koncentracijo hranil pride tudi do povečanega pritrjanja bakterij. Prav tako povečana koncentracija kationov (kalcija, natrija, železa), privede do intenzivnejšega pritrjanja bakterij *Pseudomonas fluorescens* (Fletcher, 1988; Li in Logan, 2004).

Pomembno vlogo pri pritrjanju bakterij na površine imajo lastnosti celic oziroma lastnosti celične površine. Večina bakterij ima na površini negativen naboj, kljub temu pa imajo hidrofobne komponente na celični površini, kar jim omogoča pritrjanje na nepolarne površine (Donlan, 2002). Hidrofobnost celične površine zagotavljajo fimbrije, saj vsebujejo velik delež hidrofobnih aminokislinskih ostankov. Tako fimbrije pripomorejo k premagovanju elektrostatskega odboja, če ta obstaja med bakterijsko celico in površino (Bullitt in Makowski, 1995). Podobno vlogo kot fimbrije, imajo tudi bički. Korber in sodelavci (1989), so dokazali vlogo bičkov v začetni fazi pritrjanja celic na površine in formiranju biofilmov, saj se negibljivi sevi *P. fluorescens* na površino ne vežejo tako hitro in številčno, kot gibljivi sevi. Negibljivi sevi počasneje tvorijo biofilme. Williams in Fletcher (1996) sta dokazala, da ima komponenta lipopolisaharidnega sloja (LPS) antigen O pri gram negativnih bakterijah hidrofilne lastnosti, ker se mutante *Pseudomonas fluorescens* brez antigena O številčneje vežejo na hidrofobne površine. Vse površinske celične strukture od proteinov, polisaharidov, tudi eksopolimerni sloj (EPS), dajejo

površinam celic določene lastnosti, katere omogočajo celicam pritrjanje na različne površine. Bički so bolj pomembni v začetni fazi pritrjanja, fimbrije in nekatere komponente na površinah pa dajejo celicam nepolarne značilnosti in jim omogočajo pritrjanje na hidrofobne površine. EPS in polisaharidi imajo bolj hidrofilen značaj in omogočajo pritrditev na hidrofilne površine. Zato je vezava celic na površine nespecifična in se lahko vežejo na skoraj vse površine, tako na žive, kot na nežive (Donlan, 2002). Specifično vezavo pa imajo večinoma le patogene bakterije, ki se vežejo na točno določene gostiteljske celice (Marshall, 2006). V večini primerov bakterije ostanejo pritrjene na površino dokler so sposobne rasti in reprodukcije (Lawrence in Caldwell, 1987; Szewzyk in Schink, 1988).

Zgodnje raziskave so pokazale, da se v vodnih okoljih začnejo na površine najprej pritrjati gram negativne bakterije vrst *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, v podzemnih vodah pa gram pozitivne bakterije (Marshall, 2006). Število organizmov, količina biomase in diverziteta pritrjenih organizmov pa se spreminjajo s časom ter z lastnostmi površine, na katero so pritrjeni. Prav tako se spreminjajo tudi lastnosti materiala in lastnosti površine, na katero so pritrjene bakterije (Dempsey, 1981).

Planktonske bakterije, ki za rast potrebujejo visoke koncentracije hranil, so v oligotrofnih okoljih v fazi stradanja. Te bakterije se pogosto veliko hitreje in v večjem številu pritrjajo na površine, kot aktivne celice (Dawson in sod., 1981; Marshall, 2006). To jim omogoča, da pridejo do hranil, ki so adsorbirane na površinah (Szewzyk in Schinck, 1988; Kjelberg in sod., 1982; Donlan, 2002). Pritrjene bakterije sproščajo svoje hčerinske celice v planktonski obliki v vodo. Lahko pa se tudi same reverzibilno vežejo na površine, kar jim omogoča vrnitev v planktonsko obliko, predvsem po tem, ko postanejo pogoji na površini neugodni, oziroma kadar zmanjka hranil (Marshall, 2006).

2.4.1 Prednosti pritrjenega življenjskega cikla bakterij

Na površine se vežejo različne molekule, ki predstavljajo hranila za bakterije. Bakterije pa s pritrditvijo na površino dobijo dostop do njih (Donlan, 2002). To je še posebej pomembno v oligotrofnih okoljih. Pritrjene bakterije v biofilmih so bolj odporne proti škodljivim dejavnikom okolja, kot so protimikrobna sredstva (antibiotiki, klor, težke kovine). Ti faktorji bolj vplivajo na zunajcelični matriks in celice v zunanjih slojih

biofilma, ki tako nudijo zaščito notranjim celicam. Celice znotraj biofilma so tudi bolj zaščitene pred njihovimi plenilci, protozoji in metazoji, ki se pasejo na biofilmih (Marshall, 2006).

V biofilmih so prisotne bakterije različnih vrst, ki zapolnijo prisotne ekološke niše. Tako prihaja tudi do izmenjave genetskega materiala in se ustvarijo idealni pogoji za nastanek novih patogenov, za prenose rezistenc na antibiotike, virulentnih faktorjev in drugih horizontalnih prenosov. Tako si bakterije povečajo zmožnosti preživetja v okolju. Prav tako lahko v biofilmih prisotni zunajcelični polisaharidi bakterijskega matriksa predstavljajo vir hranil za bakterije v obdobjih, ko v okolju primanjkuje hranil (Watnick in Kolter, 2000).

Pritrjanje bakterij na površine poteka v več stopnjah. Najprej se planktonske bakterije približajo površini. V mejni plasti med površino in tekočino je tok zelo upočasnen zaradi trenja. Tam bakterije vzpostavijo reverzibilne povezave s površino ali bakterijami, ki so že pritrjene na površino. Reverzibilna vezava jim omogoča izbiro ugodnega okolja za pritrnitev, saj se v primeru neustreznega okolja odcepijo. V ugodnem okolju se vzpostavijo ireverzibilne povezave s površino. Začetne interakcije s površino se vzpostavijo s pili in bički, s katerimi se lahko tudi gibljejo po površini in iščejo ustrezen prostor. Sledi rast in razmnoževanje bakterij, pritrjanje novih vrst bakterij in razvoj biofilma. Občasno se bakterije iz biofilma sprostijo v okolico in so ponovno v planktonski obliki. Tako lahko potujejo s tokom in se naselijo v drugem okolju. (O'tole in Kolter, 1998; Watnick in Kolter, 2000).

V naravi se bakterije v biofilmih razporedijo tako, da si poiščejo najbolj optimalne pogoje za rast v določenih delih mikrookolja in glede na simbiotske odnose, ki jih imajo z drugimi vrstami bakterij. V biofilmu poteka hitra medcelična komunikacija, zato se bakterije dobro organizirajo, da lahko kar najboljše izkoristijo pogoje in zadovoljijo potrebe vsake vrste (Moller in sod., 1998; Donlan, 2002).

2.4.2 Slabosti pritrjenega življenjskega cikla bakterij

Težavo za pritrjene bakterije predstavlja sedimentacija. Bakterije se lahko pritrdijo na detritne ali druge delce, ki počasi tonejo v vodnem stolpcu. Če te bakterije nimajo

mehanizmov za odcepitev iz biofilma, oziroma so vezane ireverzibilno, lahko potonejo na dno do sedimentov, kjer se na njih nalaga vedno več materiala in propadejo. Tako ne morejo več kolonizirati novih površin. Sedimentacija je prav tako težava za bakterije, ki so v najnižjih plasteh biofilmov, saj se z obraščanjem nanje nalaga vedno več biomase, produktov in materiala, kar zelo spremeni razmere v mikrookolju (Donlan, 2002; Schneiders, 2003). Na drugi strani pa bakterije lahko tudi razgradijo površino na katero so pritrjene, kar predstavlja dodatno težavo, na katero se morajo prilagoditi (Marshall, 2006).

Biofilmi privabljajo organizme, ki se prehranjujejo z bakterijami. Zooplankton, protozoji, metazoji, organizmi, ki se prehranjujejo z detritom. Na ta način lahko protozoji tudi uravnavajo število biofilmov in ohranjajo biofilme v eksponentni fazi rasti (Marshall, 2006; Donlan, 2002).

V biofilmu se sčasoma vzpostavijo gradienti hranil, plinov in drugih snovi, kar povzroči spremembo okolja (Donlan, 2002). Z globino biofilma se znižuje pH in koncentracija kisika. Gradienti nastanejo zaradi počasne difuzije snovi, saj bakterije v zunanjih slojih biofilma, porabijo večino kisika in hranil. Tako aerobni organizmi v zunanjih slojih biofilmov aktivno rastejo in ustvarjajo anoksične razmere v notranjosti biofilma. Zato morajo organizmi v globljih delih biofilma uporabljati alternativne prejemnike elektronov, če hočejo preživeti. Po drugi strani pa se tako ustvari ugodno okolje za anaerobne in fermentorske organizme. Nekatere bakterije pa lahko ob neugodnih pogojih, z zunajceličnimi encimi polisaharidnimi liazami, razgradijo zunajcelični matriks, ki obdaja celice v biofilmu in se tako sprostijo v okolje (Marshall, 2006).

Biofilmi so večinoma neželeni, saj ustvarjajo škodo na ladjah, distribucijskih omrežjih in drugih sistemih v katerih kroži voda, vodnih zajetjih, naftnih ploščadih, plavajoči vodni opremi. V okolju pa so koristni predvsem pri obdelavi odpadnih vod in pri fermentacijah.

2.5 BAKTERIJSKA RAZNOLIKOST V VODONOSNIKIH

2.5.1 Oligotrofna okolja

Podzemni ekosistemi so zelo specifična okolja, katera naseljujejo bakterije, ki so prilagojene na tamkajšnje pogoje. Vodonosniki se med seboj razlikujejo hidrološko,

kemijsko in geološko, zato je vsak vodonosnik edinstven ekosistem, ki je lahko bolj ali manj kompleksen. Pogoji v vodonosnikih so v primerjavi s površino relativno konstantni, saj ni svetlobe, primanjkuje lahko dostopnega organskega ogljika in ostalih hranil, konstantno nizke so tudi temperature. Takšna okolja se imenujejo oligotrofna okolja. Bakterije v vodonosnikih so zato dobro prilagojene na takšne pogoje in kakršnakoli nihanja le-teh v okolju zanje predstavljajo stres (Griebler in Lueders, 2009).

Do sedaj opravljene raziskave vodonosnikov med seboj niso primerljive, saj so med vodonosniki precejšnje razlike v zgradbi tal, litološkem profilu, vrsti kamnine, pritokih vode v vodonosnike, koncentraciji hranil in drugih bioloških in kemijskih snovi v vodi, načinih vzorčenja, metodah preučevanja vzorcev, različnih vrstah analiz in načinih podajanja rezultatov (Lehman in sod., 2001b).

V podzemnih vodnih sistemih so bili odkriti predstavniki bakterij, arhej, protozojev in nekaterih gliv. V vodonosnikih je večina mikroorganizmov pritrjenih na kamnite površine, sedimentne delce in druge, kjer tvorijo mikrokolonije in biofilme (Hazen in sod., 1991; Griebler in sod., 2002). Pritrjen način življenja ima prednosti predvsem v oligotrofnih okoljih, saj so sedimentne in tudi druge površine bolj geokemijsko raznolike, zato imajo več ekoloških niš kot podzemna voda. Številčno razmerje med pritrjenimi in planktonskimi bakterijami pa je odvisno predvsem od raztopljenega organskega ogljika in drugih hranil, ki se nahajajo v vodi (Lehman in sod., 2001b).

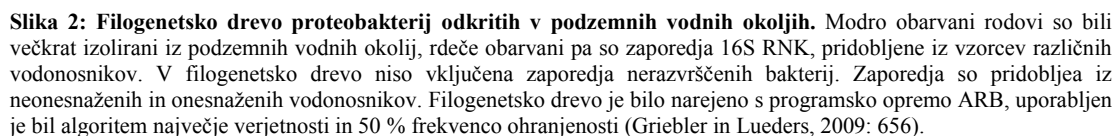
Za zgodnje raziskave mikrobnih populacij v vodonosnikih so raziskovalci uporabljali večinoma gojitvene tehnike in metode najbolj verjetnega števila (MPN). Največ so se osredotočali na štetje celic in primerjali število pritrjenih in planktonskih celic ter bakterijsko aktivnost v vodonosnikih. Kasneje, z uveljavitvijo molekularnih tehnik, se je pokazalo, da s klasičnimi tehnikami ne dobimo popolne informacije o bakterijski raznolikosti. V novejših raziskavah, so z uporabo molekularnih tehnik odkrili veliko večjo bakterijsko raznolikost v vodonosnikih, kar je prikazano na slikah 2 in 3. Tako so bili najdeni številni predstavniki debel *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (Griebler in Lueders, 2009).

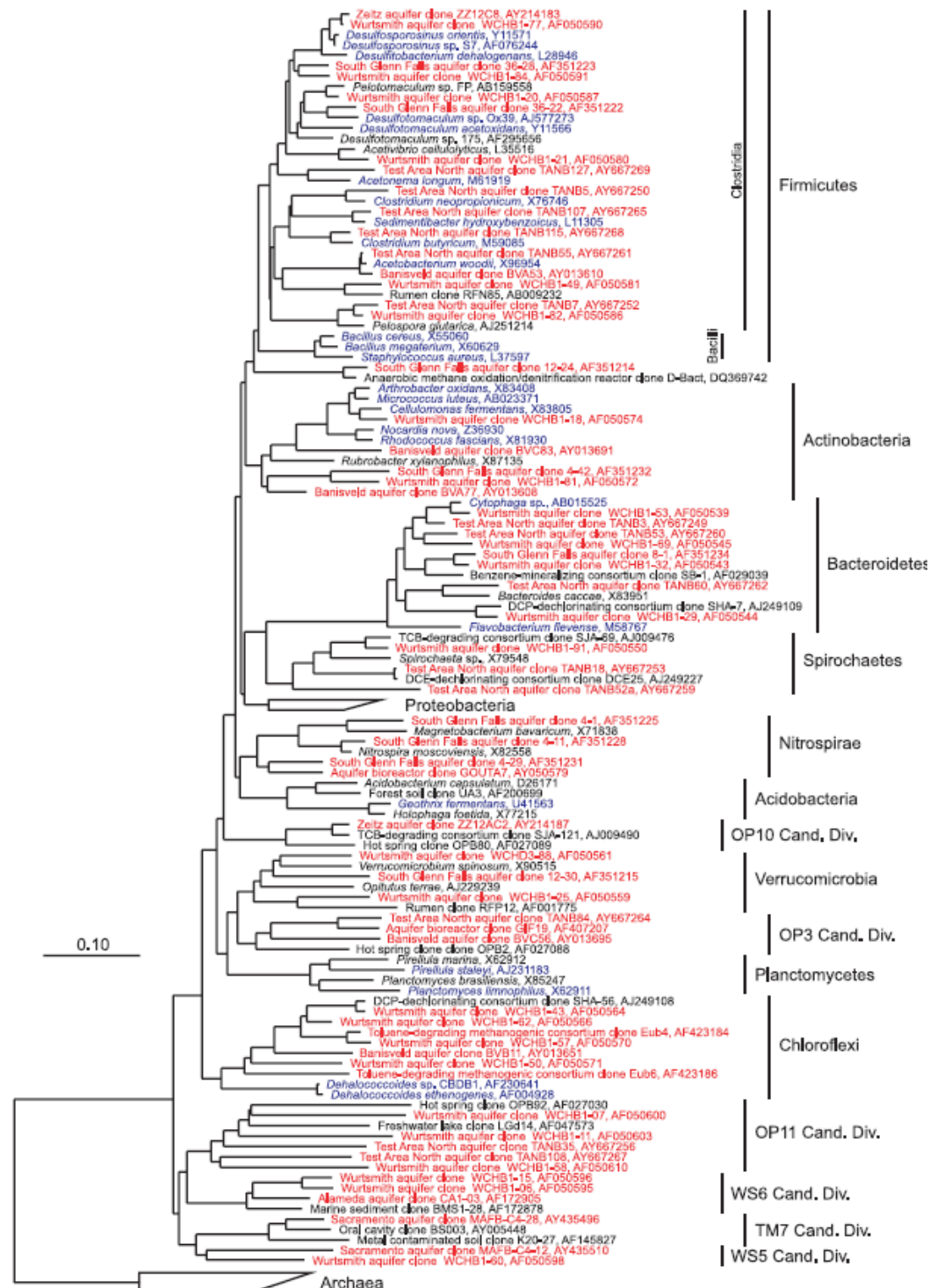
Veliko raziskav je pokazalo, da so pritrjene bakterije številčnejše, kot planktonske (Bekins in sod., 1999; Harvey in sod., 1984; Hazen in sod., 1991). Zato so predvidevali, da so

pritrjene bakterije bolj reprezentativen pokazatelj mikroflore, kot planktonske (Lehman in sod., 2001b). Število planktonskih bakterij se zelo poveča ob izvorih organskih snovi v vodonosnikih, ki so prisotne predvsem ob onesnaženjih. Ugotovili so tudi razlike v sestavi pritrdjenih in planktonskih mikrobnih združb, pri čemer so pritrjene združbe veliko bolj raznolike kot planktonske (Bekins in sod., 1999; Harvey in sod., 1984; Hazen in sod., 1999; Lehman in sod., 2001a). Večjo gostoto pritrdjenih bakterij navajajo študije, v katerih so preučevali peščeno prodnate vodonosnike. V takšnih vodonosnikih je bila prisotna tudi večja koncentracija organske snovi, ki se adsorbira na površino in tako nudi ugodne pogoje za pritrdjanje bakterij. Nasprotno pa so v razpoklinskih vodonosnikih zabeležili večjo gostoto planktonskih bakterij, kar je posledica nižje koncentracije organske snovi (Lehman in sod., 2001b).

Najmanj raziskav je bilo narejenih na razpoklinskih in kraških vodonosnikih, čeprav so takšni vodonosniki zelo pomemben vir pitne vode. Farnleiter in sodelavci (2005) so spremljali sezonske spremembe bakterijskih združb iz dveh izvirov alpskih kraških vodonosnikov. Ugotovili so, da je v apnenčastem kraškem vodonosniku večja bakterijska gostota kot v dolomitnem kraškem vodonosniku.

Največ predstavnikov je bilo iz debel *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* in *Nitrospirae*. Ugotovili so, da se sestava bakterijskih združb sezonsko ne spreminja in sklepali, da so v kraških vodonosnikih zelo stabilne populacije avtohtonih bakterijskih združb. Sezonska nihanja mikrobnih združb pa so prisotna na hiporeičnih območjih. To so območja med površinskimi vodami in podzemnimi vodnimi sistemi, ki so pod velikim vplivom površinskih vod in je tudi zato v njih prisotna večja raznolikost bakterijskih združb (Griebler in Lueders, 2009).





Slika 3: Filogenetsko drevo bakterijskih debel odkritih v podzemnih vodnih okoljih. Proteobakterije so prikazane na sliki 1. Modro obarvani rodovi so bili večkrat izolirani iz podzemnih vodnih okolij, rdeče obarvani pa so zaporedja 16S RNK, pridobljena iz vzorcev različnih vodonosnikov. Zaporedja so pridobljena iz neonesnaženih in onesnaženih vodonosnikov. Filogenetsko drevo je bilo narejeno s programsko opremo ARB, uporabljen je bil algoritem največje verjetnosti in 50 % frekvenco ohranjenosti (Griebler in Lueders, 2009: 657).

Z raziskavami, pri katerih so uporabili gojitvene tehnike za preučevanje bakterijske raznolikosti v vodonosnikih, so najpogosteje identificirali različne bakterijske vrste iz debel *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* in *Bacteroidetes*. Z molekularnimi tehnikami pa so poleg naštetih največkrat identificirali še negojene vrste iz debel *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* in *Nitrospirae* (Griebler in Lueders, 2009).

2.5.2 Vpliv bakterij na obraščanje in korozijo cevitve v vodonosniku

Schneiders (2003) je bakterije, ki povzročajo obraščanje vodonosnika, korozijo in poslabšajo kvaliteto vode, razdelil v tri skupine. V prvo skupino uvršča bakterije, ki proizvajajo sluz, v drugi so železo oksidirajoče bakterije, v tretji pa so anaerobi, med katerimi so najbolj pomembni sulfatni reducenti.

Med bakterije, ki proizvajajo sluz, spadajo predstavniki vseh bakterijskih družin, za katere je značilno, da so sposobni produkcije eksopolimerov oziroma sluzi. Med te uvršča tudi koliformne bakterije in večino okoljsko aktivnih organizmov, kot so predstavniki *Pseudomonas*, *Flavobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* in podobni. V vodonosnikih pogosto naselijo površine okoli vodne vrtine in tako zagotovijo podlago, iz katere se razrastejo biofilmi. Prisotni so lahko v aerobnih in v anaerobnih okoljih, saj so bakterije, ki proizvajajo sluz, aerobne ali fakultativno anaerobne. Ta skupina bakterij se zelo hitro odziva na spremembe v okolju. Na vsako povečanje toka, večjo koncentracijo hranil ali kisika, prisotnosti različnih kemikalij, antibiotikov in drugih stresnih dejavnikov, se odzovejo s še hitrejšo rastjo biofilma. Hitrejša rast biofilma se pojavi tudi ob prisotnosti vsaj dveh različnih bakterijskih populacij. Biofilmi, ki so sestavljeni iz različnih bakterijskih populacij, imajo prisotne različne vrste metabolizma in lahko uporabljajo različne vrste hranil, zato se lažje prilagajajo na spremembe v okolju.

V drugo skupino Schneiders (2003) uvršča bakterije, ki so sposobne oksidacije železa. Te so sposobne oksidacije Fe^{2+} do Fe^{3+} . Ta pa naprej z vodo reagira do železovega hidroksida $\text{Fe}(\text{OH})_3$, ki ga bakterije lahko shranijo v celičnih ovojih, ali ga nalagajo v okolje. *Gallionella ferruginea* je najbolj pogost predstavnik teh železo oksidirajočih bakterij v vodonosnikih. Ta vrsta nalaga oksidirano železo v zavite paličice, ki jih sprosti v okolico. *Crenothrix* in *Leptothrix* pa oksidirano železo nalagata okoli celic v plašču podobne oblike. Tako se med bakterijami ustvari matriks, ki sčasoma vsebuje vedno več železovega

hidroksida. Ta postaja vedno trši in ga je vedno težje odstraniti. Takšna akumulacija lahko povzroči zamašitev filtrov distribucijskih sistemov. Poleg tega je železov hidroksid slabo topen v vodi in dispergiran, zato obarva vodo rdečkasto rjavo (Madigan in Martinko, 2006).

Anaerobne bakterije so prisotne v globljih plasteh vodonosnika, kjer ni kisika. Lahko naredijo dokaj goste biofilme, da preprečijo vstop kisiku, zato povzročajo zamašitve v spodnjih delih vodonosnikov. Poleg tega imajo večinoma plinaste produkte metabolizma, ki povzročijo spremembe pH, korozijo, oporečnost vode in druge spremembe. Najbolj številčni predstavniki so sulfat reducirajoče bakterije. Sulfat reducirajoče bakterije z redukcijo sulfata proizvajajo vodikov sulfid. Odvisne so od fermentativnih bakterij, saj oksidirajo produkte anaerobnih fermentativnih bakterij, ki so maščobne kisline, alkoholi, aromatske kisline, vodik (Schneiders, 2003). V vodonosnikih so najpogostejše vrste *Desulfotomaculum* spp., *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* in *Desulfobulus* spp. (Griebler in Lueders, 2009). V globljih delih vodonosnikov in v anaerobnih vodonosnikih so pogoste tudi metanogene arheje, ki proizvajajo metan. V vodonosnikih so zasledili organizme podobne vrsti *Methanosarcina*, *Methanohalophilus* sp. in *Methanobacterium* sp. (Kotelnikova in Pedersen, 1997). V onesnaženih vodonosnikih pa še *Methanosaeta* sp. in *Methanospirillum* sp. (Griebler in Lueders, 2009). Sulfat reducirajoče bakterije in metanogene bakterije so zadnji korak pri razgradnji organskega materiala v anaerobnem okolju vodonosnikov (Schneiders, 2003).

Vodikov sulfid je plin in ker je lažji od vode potuje navzgor po vodnem stolpcu. Ob stiku s kovinskimi cevmi distribucijskega sistema povzroči korozijo, saj se tvori železov sulfid. V aerobnem okolju pa ob stiku s kisikom takoj oksidira do žvepla, kar povzroči nastanek žvepljenih mehurjastih tvorb na površinah. Žveplo reducirajoče bakterije so prvi pokazatelj prisotnosti anaerobne bakterijske populacije v vodonosnikih. Vodikov sulfid pa povzroči tudi rast sulfat oksidirajočih bakterij, ki ga oksidirajo do sulfata (Schneiders, 2003).

Tudi v anaerobnih delih vodonosnikov povzročajo težave bakterije, ki so vključene v proces mikrobne mineralizacije. Mikrobna mineralizacija skupaj z obraščanjem biofilmov prispeva k nalaganju materiala na stenah vodonosnikov, vodnjakov in distribucijskih sistemov, kar vodi do ožanja in zamašitve sistemov (Schneiders, 2003).

2.5.3 Dejavniki, ki vplivajo na bakterijsko raznolikost v vodonosnikih

Na bakterijsko diverziteto v vodonosnikih direktno ali posredno vpliva veliko abiotičnih in biotičnih dejavnikov. Eden takih dejavnikov je evolucija. Bakterijske populacije so sestavljene iz veliko genetsko različnih klonov, na katere deluje naravna selekcija. Zaradi kratkega generacijskega časa poteka evolucija pri bakterijah veliko hitreje, kot pri drugih organizmih. Ker so v vodonosnikih konstantni pogoji in manj aktivne bakterijske populacije, se predvideva, da evolucija poteka počasneje, kot v drugih okoljih. Drug dejavnik je okolje in okoljski pogoji, ki vplivajo na speciacijo, porazdelitev in propad bakterijskih populacij. V vsakem okolju so drugačni pogoji, ki bolj ustrezajo eni vrsti bakterij, kot drugi. Tako lahko v okolju, ki ustreza neki bakterijski vrsti, ta postane prevladujoča, neka druga prisotna bakterijska vrsta pa lahko propade, saj ni prilagojena na to okolje. Prostorska heterogenost s fizičnimi, kemijskimi, prostorskimi, geološkimi in hidrološkimi lastnostmi tako pomembno vpliva na prisotno bakterijsko populacijo (Griebler in Lueders, 2009).

Več raziskav je bilo narejenih na onesnaženih vodonosnikih. Večinoma se je pokazalo, da se z vnosom organskih snovi v oligotrofne vodonosnike, poveča bakterijska raznolikost in bakterijska aktivnost. Vendar je zaznano povečanje raznolikosti lahko tudi posledica vnosa velikega števila bakterij skupaj z ostalimi onesnažili. V primeru, da se vodonosnik onesnaži s toksičnimi snovmi, pa je bolj verjetno zmanjšanje bakterijske raznolikosti in samega števila bakterij v vodonosniku (Griebler in Lueders, 2009).

Bakterije pa tudi same s svojimi metabolnimi produkti, obraščanjem biofilmov, mineralizacijo in drugimi dejavniki, ki so posledica njihove prisotnosti v okolju, pomembno vplivajo na bakterijsko raznolikost. Ti dejavniki pomembno spremenijo okolje in tako omogočijo naselitev simbiotskih in drugih bakterijskih vrst, ki jim takšno okolje ustreza, po drugi strani pa povzročijo propad nekaterih bakterijskih vrst, ki jim takšno okolje ne ustreza (Griebler in Lueders, 2009).

2.6 METODE ZA UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB

Prve metode za preučevanje mikroorganizmov so temeljile na mikroskopiji in gojitvenih tehnikah (Amann in sod., 1995; Marshall in sod., 2006). Kasneje so ugotovili, da s temi

metodami ne zaznamo vseh prisotnih bakterijskih vrst. Tako naj bi iz okoljskih vzorcev s klasičnimi metodami pridobili informacije o prisotnosti manj kot 1 % vseh prisotnih bakterijskih vrst. Tako ne moremo zaznati že poznanih bakterijskih vrst, katerim ne moremo zagotoviti ustreznih pogojev ali ustreznega gojišča za rast teh organizmov, ki so pod stresom ali so poškodovani. Takšne bakterije potrebujejo posebne pogoje, da bi postale kultivabilne. Prav tako ne moremo zaznati bakterij, ki živijo v simbiozah, katerih ne moremo zagotoviti na gojišču in do sedaj neznanih bakterijskih vrst, ki jih še nikoli niso uspeli gojiti zaradi neustrezne metodologije. Prav tako imamo težave s hitro rastočimi, bolj agresivnimi vrstami organizmov, pa tudi z bolj občutljivimi, ki lahko prerastejo počasneje rastoče in jim porabijo vsa hranila ter spremenijo gojišče (Amann in sod., 1995; Brauns in sod., 1991; Marshall, 2006). Da bi se izognili težavam klasičnih tehnik, uporabljamo novejša molekularna tehnika.

Molekularna tehnika preučevanja strukture mikrobnih združb ne zahtevajo gojenja mikroorganizmov na gojiščih, ampak temeljijo na zaznavanju in karakterizaciji nekaterih molekul, ki sestavljajo mikroorganizme. To so nukleinske kisline, proteini in maščobne kisline. (Malik in sod., 2008)

Najbolj so uveljavljene tehnike za analizo nukleinskih kislin. Te so TGGE (temperaturna gradientna gelska elektroforeza), DGGE (denaturacijska gradientna gelska elektroforeza), ARDRA (analiza restrikcijskih fragmentov pomnožene rDNK), T-RFLP (polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov), RISA (polimorfizem dolžin regij DNK med geni za 16S in 23S rRNK) in klonske knjižnice (Malik in sod., 2008). Naštete tehnike imajo v osnovi skupne prve korake, kjer je potrebno najprej izolirati DNK ali RNK, pomnožiti gen za 16S rRNK in analizirati pomnožene produkte.

Za identifikacijo mikroorganizmov in proučevanje sorodstvenih vezi med njimi se je najbolj uveljavil gen za 16S rRNK. Prednosti tega gena so v tem, da je prisoten pri vseh mikroorganizmih, konservativne regije so zelo ohranjene ter niso podvržene genskim prenosom in spremembam, zato lahko izdelamo različne začetne oligonukleotide, ki lahko nalebajo na različne taksonomske skupine (od kraljestva do rodov), poleg tega so sekvence 16S rRNK dovolj raznolike, da omogočajo filogenetske primerjave med mikrobnimi

združbami (Woese, 1987). Velika prednost je tudi velika baza sekvenc genov 16S rRNK, ki so lahko dostopni prek medmrežja.

Za spremljanje pritrditve, rasti, razvoj biofilmov, odcepljanje pritrjenih mikroorganizmov in njihovih struktur obstaja kar nekaj direktnih in posrednih metod, vendar ima vsaka svoje prednosti in slabosti. Za vsako površino in za vsak ekosistem se uporabljajo drugačne tehnike. Ena najosnovnejših tehnik je mikroskopija, tako svetlobna kot elektronska in epifluorescentna (Marshall, 2006). Pri novejših metodah se večinoma uporabljajo računalniške analize in obdelave slik.

Tudi pri molekularnih tehnikah se pojavljajo težave, na katere moramo biti pozorni. Te se lahko pojavijo pri vsakem koraku v postopku, od izolacije DNK, verižne reakcije s polimerazo, do sekvenciranja in analize zaporedij. Za izolacijo DNK obstaja veliko različnih metod. Izbira metode je odvisna od vzorca, iz katerega želimo izolirati DNK. Z izbiro neustrezne metode prihaja do neželenih izgub DNK. Največ napak se pojavlja pri verižni reakciji s polimerazo, kjer se pojavljajo napake DNK polimeraze, heterodupleksi in himerne sekvence (Acinas in sod., 2005). Da čim bolj omejimo napake, je potrebno pripraviti ustrezno reakcijsko mešanico, izbrati moramo ustrezne začetne oligonukleotide, ki ne tvorijo dimerov in morajo dobro nalegati na želeno zaporedja ter izbrati optimalen program pomnoževanja. Upoštevati moramo tudi število kopij genov v organizmih, saj je npr. število genov za 16S rRNK pri različnih organizmih različno in med njimi so lahko tudi razlike v nukleotidnih zaporedjih. Do izgub DNK lahko prihaja tudi pri gelski elektroforezi, še posebej pri čiščenju DNK iz gela ter pri sekvenciranju (Head in sod., 1998).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 VZORČENJE VODE IN KAMNINE

Vzorčenje je opravilo podjetje Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o. Na vsake 4 metre globine (+/- 1 m) od 36 do 200 metrov, so iz dolomitnega vodonosnika odvzeli po 10 litrov vode. Vodo, ki je med vrtnjem zaradi pritiska pritekala na površino, so lovili v plastično posodo, ki so jo prej temeljito sprali z vodo iz določene globine, nato pa so jo prelili v sterilne plastične vzorčevalne posode. Na enakih globinah so zajeli tudi približno 0,5 kg kamnine. Vzorci so bili shranjeni na temperaturi 5-10 °C, kar je za približno 3 °C nižje od temperature v vodonosniku. Po osmih urah so bili poslani v nadaljnjo obdelavo.

3.2 ELEKTROKEMIJSKE MERITVE VODE

Meritve so opravili na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije v Ljubljani in Inštitutu za fizikalno biologijo. Na vseh globinah so izvedli meritve koncentracij TOC, NO₃, Mn, Zn, Fe³⁺, Fe²⁺ ter temperature, redoks potenciala in prevodnosti. Na globinah 112 in 148 metrov pa so opravili še meritve koncentracij karbonatov, Mg, PO₄, SO₄, K, Ni, Ca, na globinah 98 in 132 metrov pa še koncentracije NO₂ in amonijevih ionov. Meritve so bile opravljene po akreditiranih standardih.

3.3 IZOLACIJA DNK

Izolacijo DNK iz vodnih in kamninskih vzorcev je opravilo podjetje Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.

3.3.1 Izolacija DNK iz vodnih vzorcev

2 do 5 litrov vsakega vodnega vzorca smo prefiltrirali skozi 0,22 µm sterilni filter (TPP, Švica). Filtre smo sterilno razrezali na manjše koščke in zložili v 2 mililitrske mikrocentrifugirke. Ekstrakcijo DNK smo izvedli s kompletom Smarthelex™ DNA Extraction Kit (IFB d.o.o., Slovenija). Nadaljnji potek izolacije je potekal po navodilih proizvajalca.

3.3.2 Izolacija DNK iz kamninskih vzorcev

V sterilno 0,5 l erlenmajerico (Brand, Nemčija) smo zatehtali 250 g kamnine in dodali 100 ml sterilne deionizirane vode (Simplicity UV, Milipore, ZDA). Erlenmajerice smo stresali pri 20 °C in 80 obratih na minuto (ES-20, Biosan, Latvija) čez noč, nato smo vodo prefiltrirali skozi 0,22 µm filter (TPP, Švica) in vse skupaj še dvakrat sprali s 100 ml sterilne deionizirane vode (Simplicity UV, Milipore, ZDA). Nadaljnji potek je enak kot pri točki 3.3.1.

3.4 POMNOŽEVANJE GENA ZA 16S rRNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)

Delali smo tri različne verižne reakcije s polimerazo, pri katerih smo pomnoževali gen, ki nosi zapis za 16S rRNK. Gen za 16S rRNK smo pomnoževali iz DNK, izolirane direktno iz vzorcev vrtine, iz plazmidov, ki smo jih izolirali iz klonov in iz samih klonov (colony PCR).

3.4.1 Pomnoževanje gena 16S rDNK iz DNK, izolirane direktno iz vzorcev vrtine, v verižni reakciji s polimerazo

Priprava reakcijske mešanice je potekala v sterilni komori (DNA/RNA UV-cleaner box, Biosan, Latvija). V 200-mikrolitrskih PCR-tubicah (Brand, Nemčija) smo pripravili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, ZDA); 1x PCR-pufer II (Applied Biosystems, ZDA); 7,5 µM mešanico deoksinukleotid trifosfatov (dNTP MIX, Applied Biosystems, ZDA); 7,5 µM začetnega oligonukleotida L1401 (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC, Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 5' smeri kodirajoče verige in 7,5 µM začetnega oligonukleotida U968 (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3', Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 3' smeri kodirajoče verige predela in vključuje V6 in V8 regijo 16S r RNK; 0,03 U/µl rekombinantne DNK-polimeraze iz organizma *Thermus aquaticus* (AmpliTaq) (5 U/µl; Applied Biosystems, ZDA); ultra čisto vodo (nuclease free water, Fermentas, Litva) in 1µl matrične DNK. Za vzorce iz globin 14 in 200 metrov smo uporabili enake koncentracije začetnih oligonukleotidov 1495r (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3', Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 5' smeri kodirajoče verige in 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 3' smeri kodirajoče verige. Pomnoževanje je potekalo v napravah za ciklično pomnoževanje

nukleinskih kislin TProfessional basic thermocycler (Biometra, Nemčija) in TPersonal thermocycler (Biometra, Nemčija). Program pomnoževanja je prikazan v preglednici 1. Prisotnost PCR produktov smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu v 0,5 % TBE pufu.

Preglednica 1: Program PCR za pomnoževanje genov za 16S rDNK iz DNK, izolirane iz vodnih in kamninskih vzorcev dolomitnega vodonosnika

Oznaka	Temperatura (°C)	čas
začetna denaturacija	95	2 min
denaturacija	95	30 s
naleganje začetnih oligonukleotidov	54	30 s
podaljševanje	68	1 min
zaključno podaljševanje	72	7 min
vzdrževanje	4	∞

} 35 X

3.4.2 Pomnoževanje gena 16S rDNK iz klonov (Colony PCR) in iz plazmidov, izoliranih iz klonov, v verižni reakciji s polimerazo

Priprava reakcijske mešanice je potekala v komori (DNA/RNA UV-cleaner box, Biosan, Latvija). V 200-mikrolitrskih mikrocentrifugirkah (Brand, Nemčija) smo pripravili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 1x PCR-pufer (Taq buffer with (NH₄)₂SO₄, Fermentas, Litva), 0,4 mM mešanico deoksinukleotid trifosfatov (dNTP Mix, Fermentas, Litva), 0,2 µM začetnega oligonukleotida M13f (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3', Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 3' smeri kodirajoče verige in 0,2 µM začetnega oligonukleotida M13r (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3', Jena Bioscience, Nemčija), ki nalega v 5' smeri kodirajoče verige, 0,03 U/µl rekombinantne DNK-polimeraze iz organizma *Thermus aquaticus* (Taq DNK Polymerase 5U/ µl; Fermentas, Litva) in sterilno deionizirano vodo (Simplicity UV, Milipore, ZDA). V reakcijsko mešanico za pomnoževanje gena 16S rRNK iz klonov, smo dodali 1 kolonijo posameznega klona, v reakcijsko mešanico za pomnoževanje tega gena iz plazmidov, pa smo dodali 1 µl plazmidne DNK. Pomnoževanje je potekalo v napravah za toplotno pomnoževanje nukleinskih kislin TProfessional basic thermocycler (Biometra, Nemčija) in TPersonal thermocycler (Biometra, Nemčija). Program pomnoževanja gena za 16S rRNK iz klonov je prikazan v preglednici 2, program pomnoževanja gena za 16S rRNK iz plazmidov pa v preglednici 3.

Preglednica 2: Program PCR za pomnoževanje genov za 16S rDNK iz klonov (Colony PCR)

oznaka	Temperatura °C	čas
začetna denaturacija	92	5 min
denaturacija	95	45 s
naleganje začetnih oligonukleotidov	46	45 s
podaljševanje	68	1 min 30 s
zaključno podaljševanje	72	5 min
vzdrževanje	4	∞

} 34 X

Preglednica 3: Program PCR M13 za pomnoževanje genov za 16Sr RNK iz plazmidov

oznaka	Temperatura °C	čas
začetna denaturacija	95	2 min
denaturacija	95	45s
naleganje začetnih oligonukleotidov	46	45s
podaljševanje	68	40s
zaključno podaljševanje	72	5 min
vzdrževanje	4	∞

} 34 X

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo preverili na 1 % agarozni gelski elektroforezi, ki je potekala v 0,5X TBE pufru pri 40 mV. Za določitev velikosti fragmentov smo uporabili velikostno lestvico 100 bp in λ /Pst (Fermentas, Litva). DNA produkte smo obarvali s pomočjo SybrGreen barvila. Po elektroforezi smo gele pregledali v transiluminatorju (BioDoc Analyze, Biometra, Nemčija) in jih obdelali s programsko opremo BioDoc Analyze 2.1 (Biometra, Nemčija). Pomnožene produkte smo iz gelske elektroforeze očistili s pomočjo kompleta Wizzard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Eluate smo spravili na - 20 °C.

3.5 KOLONIRANJE

Pred kloniranjem smo preverili koncentracijo pomnožene DNK s pomočjo QBIT fluorometra. Za kloniranje smo uporabili komplet TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pred začetkom kloniranja smo morali pripraviti gojišča za nacepljanje klonov, selekcijo klonov in za modro-beli test oziroma α -komplementacijo.

3.5.1 Gojišče LB Ap X-Gal

Za selekcijo med transformiranimi in netransformiranimi celicami ter za detekcijo med celicami, ki vsebujejo rekombinantno DNK in celicami, ki ne vsebujejo rekombinantne DNK, smo pripravili gojišče LB Ap X-Gal. V 500 ml erlenmajerico (Brand, Nemčija) smo zamešali 250 ml destilirane vode, 8,75 g LB Agarja (Sigma-Aldrich, Nemčija), dodali magnet ter avtoklavirali 15 minut na 121°C. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili in med mešanjem na magnetnem mešalu (Hanna Instruments, ZDA) dodali 250 µl ampicilina (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 1 ml X-Gal (Sigma-Aldrich, Nemčija). Po 15-20 ml gojišča smo sterilno razlili v sterilne petrijevke (Brand, Nemčija) in počakali, da se je gojišče strdilo.

3.5.2 Gojišče LB Ap

Gojišče LB Ap smo pripravili za precepljanje klonov in za transport klonov za sekvenciranje. Postopek priprave gojišča je enak, kot pri točki 3.8.1, le da nismo dodali X-Gal. Po 100 µl gojišča smo z mulitkanalno pipeto (Brand, Nemčija) odpipetirali v jamice mikrotitrne plošče (Brand, Nemčija) in počakali, da se je gojišče strdilo.

3.5.3 Kloniranje

Klonirali smo s kompletom TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. V mikrocentrifugirko (Brand, Nemčija) smo odpipetirali 4,5 µl produktov verižne reakcije s polimerazo, 1 µl razredčene raztopine soli (Salt solution; Invitrogen, ZDA) in 0,5 µl vektorja pCR2.1-TOPO (Invitrogen, ZDA), hitro zvorteksirali, kratko centrifugirali in inkubirali 20 minut na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo 2 µl mešanice prenesli v elektrokompetentne celice *E. coli* (One Shot[®] TOP10 electrocompetent *E. coli*; Invitrogen, ZDA), nežno premešali s tipsom in prenesli mešanico v 0,1 cm kiveto (Invitrogen, ZDA). Kiveto smo vstavili v elektroporator (electroporator 2510; Eppendorf, Nemčija), ki smo ga prej nastavili na 1700 V in elektroporirali. Nato smo v kiveto dodali 250 µl medija S.O.C. (S.O.C. Medium; Invitrogen, ZDA) in vsebino kivete prenesli v centrifugirko (Brand, Nemčija) ter inkubirali na 37 °C v stresalniku (Memmert, Nemčija). Po enourni inkubaciji smo različne volumne od 10 µl do 50 µl nacepili na selektivno gojišče LB Ap X-Gal in prekonočno inkubirali na 37 °C. Po inkubaciji smo bele kolonije

precepili na mikrotitrne plošče (Brand, Nemčija) z gojiščem LB Ap, eno kolonijo v eno jamico.

3.6 PLAZMIDNA IZOLACIJA

Plazmidno izolacijo smo delali le pri tistih klonih, iz katerih smo pri sekvenciranju gena za 16S rRNK direktno iz klonov dobili slab rezultat. Zato smo iz izoliranih plazmidov še enkrat pomnožili vstavljen gen za 16S rRNK. Izolacijo plazmidov iz klonov smo delali po protokolu alkalne lize (Sambrook in sod., 1989). Pred izolacijo smo si pripravili raztopino I, raztopino II in raztopino III in gojišče LB Ap.

3.6.1 Raztopina I

Raztopino I smo pripravili v merilnem valju, v katerega smo dodali 100 ml destilirane vode in magnetno mešalo. Med nenehnim mešanjem smo dodali 0,9 g glukoze (α -D-Glucose; Sigma-Aldrich), 0,303 g tris baze (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,292 g EDTA (Sigma-Aldrich, Nemčija). Po potrebi smo dodali še HCl (Sigma-Aldrich, Nemčija) ali NaOH (Sigma-Aldrich, Nemčija) do pH 8. Raztopino smo sterilno filtrirali in shranili na 4 °C do uporabe.

3.6.2 Raztopina II

Raztopino II smo pripravili v 100 mililitrski flaški (Roth, Nemčija). V 100 ml destilirane vode smo zamešali 1 g SDS (Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,8 g NaOH (Sigma-Aldrich, Nemčija) in avtoklavirali 15 minut na 121 °C. Po avtoklaviranju smo raztopino shranili na sobni temperaturi do uporabe.

3.6.3 Raztopina III

Raztopino III smo pripravili v merilnem valju (Roth, Nemčija). V 40 ml destilirane vode smo zamešali 5,75 ml CH₃COOH (Sigma-Aldrich, Nemčija), 14,7 g CH₃COOK (Sigma-Aldrich, Nemčija) in dolili destilirano vodo do 50 ml. Raztopino smo sterilno filtrirali in shranili na 4 °C do uporabe.

3.6.4 Gojišče LB Ap

V 250 ml destilirane vode smo zamešali 8,75 g LB Broth (Sigma-Aldrich, Nemčija) in avtoklavirali 15 minut na 121 °C. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili in dodali 250 µl ampicilina (Sigma-Aldrich, Nemčija), do končne koncentracije 100 µg/ml.

3.6.5 Plazmidna izolacija

V 1,5 ml mikrocentrifugirke (Brand, Nemčija) smo odpipetirali 1,4 ml gojišča LB Ap, vanj nacepili klone in inkubirali na 37 °C preko noči. Po inkubaciji smo kulturo centrifugirali pri 14000 obratih na minuto, 6 minut (Sigma 2-16K; Sigma Centrifuges, Nemčija), odstranili supernatant, pelet resuspendirali v 100 µl ledeno hladne raztopine I, zvorteksirali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 200 µl raztopine II, premešali z rahlim obračanjem in ponovno inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Nato smo dodali 150 µl raztopine III, premešali in inkubirali v hladilniku 5 minut. Potem smo centrifugirali 7 minut pri 14000 obratih na minuto (Sigma 2-16K; Sigma Centrifuges, Nemčija) in supernatant prestavili v novo mikrocentrifugirko (Brand, Nemčija) ter dodali 2x volumen ledeno hladnega 96 % etanola in pustili precipitirati na sobni temperaturi 2 minuti. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 14000 obratih na minuto (Sigma 2-16K; Sigma Centrifuges, Nemčija). Nato smo odlili supernatant in dodali 750 µl ledenohladnega 70% etanola ter ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto (Sigma 2-16K; Sigma Centrifuges, Nemčija). Odstranili smo supernatant in osušili pelet ob plinskem gorilniku. Pelet smo raztopili v 30 µl sterilne deionizirane vode (Simplicity UV, Milipore, ZDA).

Uspešnost izolacije plazmidov in koncentracijo izolirane DNK smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo po postopku, ki je opisan pri točki 3.5 in z merjenjem koncentracije izolirane DNK po postopku, ki je opisan pri točki 3.6.

3.7 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ GENA ZA 16S rRNK

Sekvenciranje genov za 16S rRNK je opravilo podjetje Macrogen iz Južne Koreje. Za transport smo vzorce pripravili na različne načine, ki so opisani pod točko 3.10.1. Dobljena zaporedja smo taksonomsko uvrstili z orodjem Seqmatch v bazi podatkov RDP 10

(Ribosomal Database Project). Za vsako zaporedje smo poiskali še od 3 do 5 sorodnih zaporedij, jih shranili in vse sekvence obdelali s programom Bioedit (Hall, 1999).

3.8 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VODE

Izolacijo gojljivih bakterij iz vode je opravil Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o. Po 1 liter vzorcev iz določenih globin so prefiltrirali skozi 0,22 µm sterilni filter (TPP, Švica) in cel filter položili v tekoči gojišči *Leptothrix strains* medium in *Gallionella* medium oziroma ferrous sulfide agar. Iz gojišč, kjer je bila prisotna bakterijska rast, so vzorce nacepili na trdni gojišči *Leptothrix strains* medium in Fe-EDTA gojišče in jih 3 mesece inkubirali na sobni temperaturi. Nato so posamezne kolonije še enkrat precepili na trdni gojišči *Leptothrix strains* medium in Fe-EDTA.

3.8.1 Gojišče Ferrous sulfide agar (Atlas, 2004)

Za gojišče sta potrebna dva različna sloja. Najprej smo pripravili trdni sloj z agarjem, nato pa nanj prelili tekoči sloj gojišča.

Za pripravo 1 litra trdnega sloja smo v erlenmajerico (Brand, Nemčija) zamešali 500 ml destilirane vode in 30 gramov agarja (Sigma-Aldrich, Nemčija) in počasi segrevali do vrelišča. Raztopino smo avtoklavirali pri 121 °C 15 minut in jo ohladili na približno 45 °C. Nato smo segreli 500 ml suspenzije spranih precipitativ FeS na približno 45 °C, jo premešali in jo aseptično zamešali v agar z enako temperaturo.

Za pripravo 500 ml suspenzije spranih precipitativ FeS smo v stekleno flaško (Brand, Nemčija) nalili 500 ml destilirane vode in jo segrevali do vrelišča. Nato smo vanjo zamešali 78,4 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 15,6 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija). Počakali smo, da so se precipitati posedli, nato pa smo jih štirikrat sprali s supernatantom, ki smo ga vsakič nadomestili s 500 ml vrele destilirane vode.

Tekoči del gojišča smo si pripravili v 500 ml erlenmajerici (Brand, Nemčija), kamor smo nalili 200 ml destilirane vode in vanjo zamešali 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,1 g K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,04 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,02 g CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Nemčija). Raztopino smo avtoklavirali 15 minut

na 121 °C in jo ohladili na 25 °C. Nato smo jo 15 sekund aseptično prepihavali s 100% CO₂.

Po 10 ml staljenega trdnega dela gojišča z agarjem smo aseptično nalili v epruvete (Brand, Nemčija) in jih postavili v poševno lego, da se je agarski del gojišča ohladil. Nato smo v vsak poševnik dodali po 2 ml sterilnega tekočega dela gojišča.

3.8.2 Tekoče gojišče *Leptothrix strains meduim* (Atlas, 2004)

V merlini valj (Brand, Nemčija) z magnetom smo zatehtali 5 g peptona (Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,2 g MgSO₄ x 7H₂O (Magnesium sulfate heptahydrate, Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,15 g železov amonijev citrat (Ammonium iron(III) citrate, Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,05 g CaCl₂ (Calcium chloride, Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,01 g FeCl₃ x 6H₂O (Iron (III) chloride hexahydrate, Sigma-Aldrich, Nemčija), 0,01 g MnSO₄ x H₂O (Manganese (III) sulfate monohydrate, Sigma-Aldrich, Nemčija) in dolili destilirano vodo do 250 ml. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo gojišče sterilno razlili v petrijevke (Brand, Nemčija) in ohladili.

3.8.3 Trdno gojišče *Leptothrix strains medium* (Atlas, 2004)

Postopek priprave gojišča je enak, kot pri točki 3.11.2, le da smo dodali še 12 g agarja (Sigma-Aldrich, Nemčija).

3.8.4 Gojišče Fe-EDTA (Atlas, 2004)

Najprej smo naredili založno raztopino 100 x Fe (II). V 45 ml destilirane vode smo zamešali 278 mg Na₂EDTA (Sigma-Aldrich, Nemčija) in segrevali do vretja. Nato smo v 45 ml destilirane vode zamešali 337 mg FeSO₄ x 7H₂O (Sigma-Aldrich, Nemčija) in dodali še vrelo raztopino Na₂EDTA. Vse skupaj smo kuhali na vrelišču še 1 uro, ohladili na sobno temperaturo in dolili MiliQ vodo do 100 ml. Raztopino smo sterilno filtrirali in shranili na 4 °C do uporabe.

Za oligotrofno gojišče smo v 250 ml vodovodne vode zamešali 0,07 g hranilnega agarja (Nutrient agar, Sigma-aldrich, Nemčija) in 3,15 g agarja (Sigma-Aldrich, Nemčija) ter

avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili, mu dodali 2,5 ml založne raztopine 100 x Fe (II) EDTA in prelili v petrijevke.

3.9 IZOLACIJA DNK IZ IZOLATOV

Iz izolatov smo izolirali DNK s pomočjo kita EZExtract (IFB d.o.o., Slovenija). V pripravljene mikrocentrifugirke smo dodali po eno ezo čiste bakterijske kulture in segrevali na 100 °C 15 minut. Po kuhanju smo vzorce ohladili v hladilniku, centrifugirali na 10000 obratih na minuto pri 22 °C 10 minut (Sigma 2-16K, Sigma centrifuges, Nemčija), supernatant z izoliranimi nukleinskimi kislinami odpipetirali v nove mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija) in shranili na - 20 °C do nadaljnje analize.

3.10 POMNOŽEVANJE GENOV ZA 16S rRNK IZ DNK, IZOLIRANIH IZ ČISTIH BAKTERIJSKIH KULTUR, V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO

Postopek pomnoževanja genov je enak, kot pri točki 3.4.1.

3.10.1 Analiza 16S rDNK nukleotidnih zaporedij

Sekvenciranje 16S rDNK genov je opravilo podjetje Macrogen iz Južne Koreje. Dobljena zaporedja 16S rDNK smo taksonomsko uvrstili z orodjem Seqmatch v bazi podatkov RDP 10 (Cole in sod., 2009) s privzetimi nastavitvami programa. Identificirane kolonije smo nacepili v mikrotitrsko ploščico (Brand, Nemčija) z gojiščem LB s 50 % glicerolom in jih shranili na - 80 °C.

3.11 ANALIZA ZAPOREDIJ KLONSKIH KNJIŽIC

Vsa nukleotidna zaporedja genov 16S rDNK smo najprej pregledali v programu FinchTV (Geospiza Inc., ZDA) in jim odstranili vektorska zaporedja ter slabe odseke, če so bili ti prisotni. Poravnave zaporedij smo naredili s programom BioEdit (Hall, 1999).

3.11.1 Deleži bakterijskih razredov po globinah in porazdelitev pritrjenih in planktonskih zaporedij po posameznih globinah

Deleže pritrjenih in planktonskih razredov po posameznih globinah smo določili s programskim paketom Ribosomal Database Project II (Cole in sod., 2009). Klonske

knjižnice pritrjenih in planktonskih zaporedij iz posamezne globine, smo primerjali med seboj z orodjem Library Compare (<http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp>). Uporabili smo prednastavljene parametre in izbrali 70 % prag zaupanja. Program je taksonomsko uvrstil vsa zaporedja iz klonskih knjižnic in medsebojno primerjal taksonomsko sestavo. Podatke o družini, rodu in deležu prisotnih zaporedij na posamezni globini smo vnesli v tabelo, ki je prikazana na sliki 16. S tem programom smo dobili tudi informacijo o signifikantno različni porazdelitvi ($p < 0,05$) bakterijskih rodov med planktonskimi in pritrjenimi zaporedji. Pri tem smo združili vse klonske knjižnice pritrjenih zaporedij in vse klonske knjižnice planktonskih zaporedij ter jih primerjali med seboj.

Z orodjem Library Compare smo primerjali tudi klonske knjižnice planktonskih sekvenc iz 200 in 80 metrov, katerih vzorce smo vzeli v času vrtanja in po enem letu.

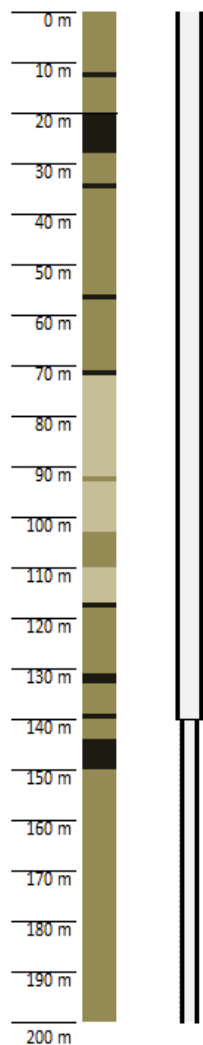
3.11.2 Ocena diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic

Za oceno diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic smo uporabili programa Phylip 3.6 (Felsenstein, 2005) in Mothur (Schloss, 2008). Z orodjem dnadist smo na podlagi kimurinega dvoparametričnega modela za vsako klonsko knjižnico posebej izračunali distančno matriko. Distančno matriko smo v programu Mothur (Schloss, 2008) razvrstili v operativne taksonomske skupine (OTU), z mejno vrednostjo 0,03. Pri predpostavki, da sekvence spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %, nam je program izračunal vrednosti za Sobs, Chao1 in 95 % interval zaupanja za vrednost Chao1. Sobs (species observed) nam pove število izračunanih operativnih taksonomskih enot pri nastavljenih parametrih. Chao1 pa nam glede na raznolikost zaporedij iz klonske knjižnice oceni dejansko diverzitetu vzorca. Pri tem predvideva, da pri vzorčenju nismo zajeli celotne populacije in s tem raznolikosti, ampak le del te populacije. Chao1 vrednost nam tako omogoči določiti učinkovitost vzorčenja oziroma pokritost raznolikosti v vzorcu. Slednje smo izračunali tako, da smo delili število OTU z vrednostjo Chao1. Izračunane vrednosti so prikazane v preglednicah 4 in 5.

4 REZULTATI

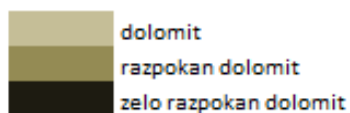
4.1 FIZIKALNO KEMIJSKI PARAMETRI VRTINE

4.1.1 Kamnina



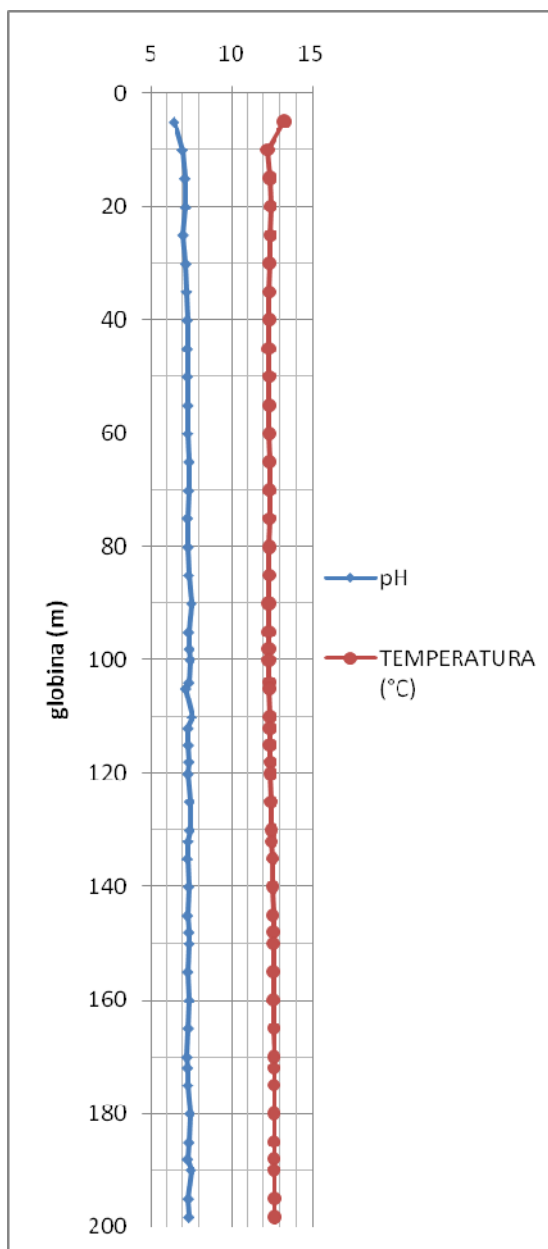
Vodna vrtina sega do globine 200 metrov. Distribucijska cev je perforirana od globine 100 metrov dalje. Vzorci vode in kamnine so bili vzeti iz globin 56 m, 76 m, 96 m, 118 m, 132 m, 148 m, 180 m in 200 m. Po enem letu uporabe vrtine sta bila ponovno odvzeta vzorca vode iz globine 80 m in 200 m. Napaka vzorčenja je ± 1 meter.

Vodonosnik sestavlja kamnina dolomit, razpokan dolomit in zelo razpokan dolomit, kot je prikazano na sliki 4.

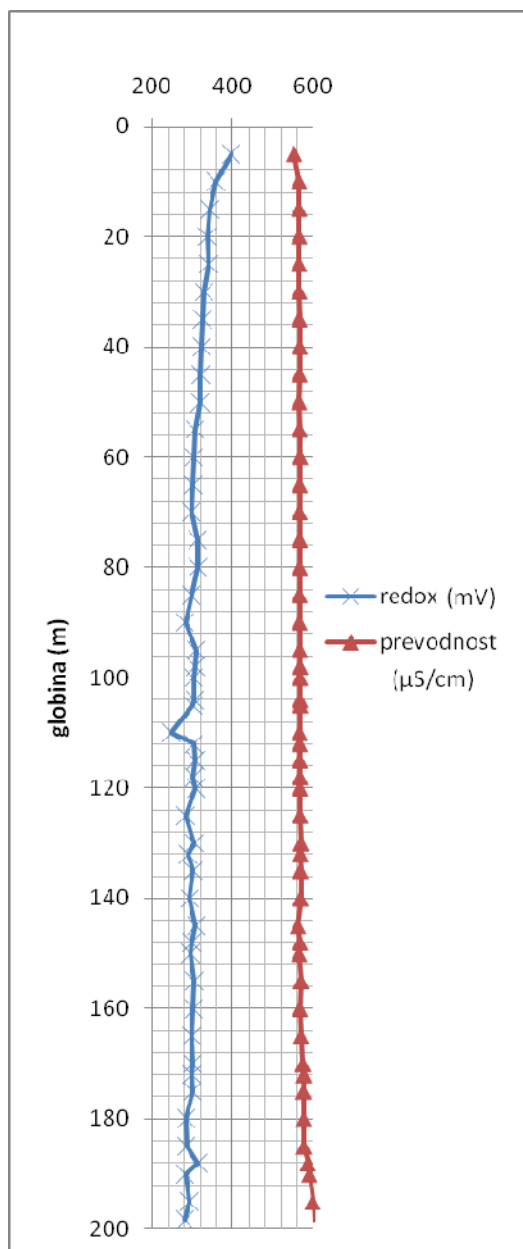


Slika 4: Profil vodne vrtine

4.1.2 Fizikalno kemijski parametri

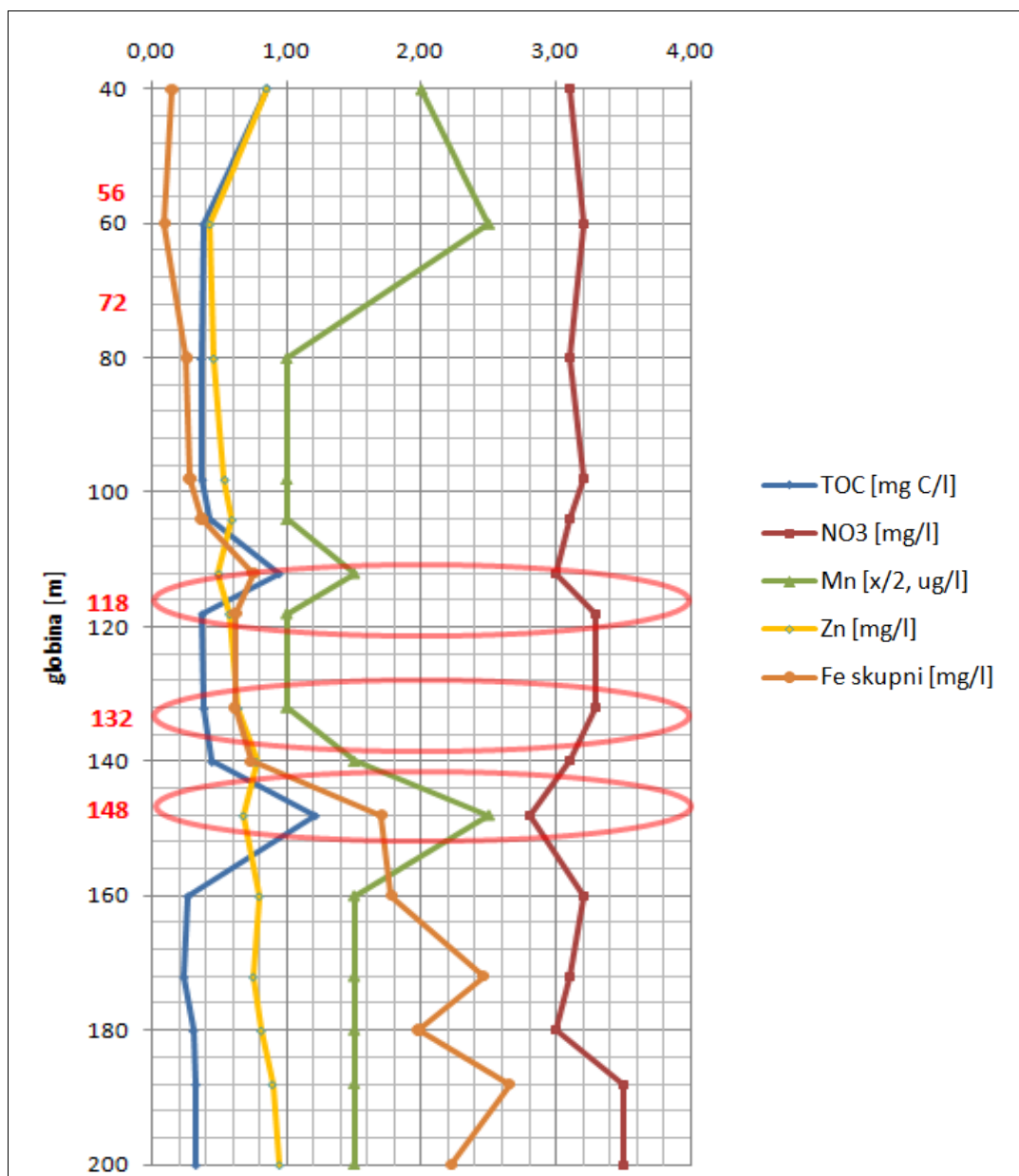


Slika 5: pH vrednosti v vodni vrtini

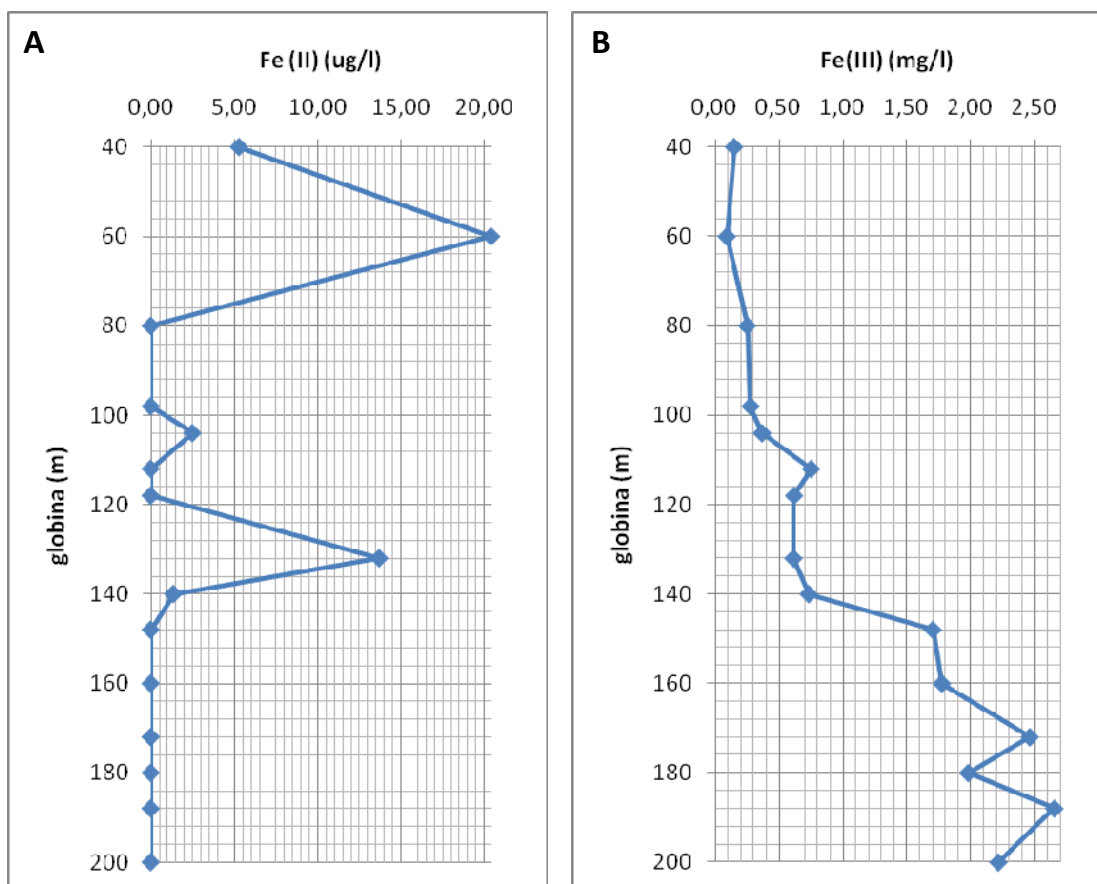


Slika 6: Redoks potencial in prevodnost v vodni vrtini

Temperatura in pH sta po celi globini konstantna. Temperatura se giblje med 12 °C in 13 °C, pH pa med 6,5 in 7,5. Redoks potencial je po celi globini pozitiven in rahlo pada z globino od 400 mV do 300 mV. Le na globini 110 metrov je 250 mV. Prevodnost rahlo narašča od 550 do 603 μS/cm.



Slika 7: Kemijski parametri v vodni vrtini. Prikazane so koncentracije celotnega organskega ogljika (TOC), nitratov, mangana, cinka in železa. Koncentracija Mn je zaradi preglednosti grafa prikazana kot polovična vrednost. Rdeče številke prikazujejo globine, na katerih se nahaja zelo razpokan dolomit. Z rdečo so označene globine na katerih se vodonosnik polni z vodo in nutrienti.



Slika 8: Koncentracija Fe (II) in Fe (III) po globini vodonosnika. A: koncentracija Fe (II) v µg/l, po globini vodonosnika. B: koncentracija Fe (III) v mg/l, po globini vodonosnika.

Koncentracija celokupnega organskega ogljika je povečana na globini 40 metrov, kjer je 0,85 mg/l, na 112 metrih znaša 0,94 mg/l, ter na 148 metrih, kjer je 1,21 mg/l. Na drugih globinah je manjša in se giblje med 0,30 mg/l in 0,44 mg/l.

Koncentracija nitratov se do globine 100 metrov od 3,0 mg/l do 3,20 mg/l, nižje pa bolj niha. Največja je na globinah 188 in 200 metrih globine, kjer je 3,50 mg/l, nekoliko večja je še na 118, 132 in 160 metrov, kjer je 3,30 mg/l. Najnižja pa je na globini 148 metrov, kjer je 2,80 mg/l.

Celokupna koncentracija mangana zelo niha. Tudi koncentracija mangana je največja na globini 148 in 60 metrov, 5 µg/l, najnižja pa je od 80 do 104 metrov, kjer je 2 µg/l.

Koncentracija cinka se z globino povečuje. Najnižja je na 60 metrih globine, kjer je 420,0 µg/l. nato se povečuje do 200 metrov globine, kjer je 950 µg/l.

Koncentracija železa 3+ (Fe^{3+}) je večja od koncentracije železa 2+ (Fe^{2+}). Koncentracija Fe^{3+} je najnižja na globini 60 metrov 0,09 mg/l, največja pa na 188 m, kjer je 2,66 mg/l. Koncentracija Fe^{2+} je na globini 40 m 5,30 $\mu\text{g/l}$, največja je na 60 metrih globine, kjer je 20,39 $\mu\text{g/l}$. Povečana je še na 132 m, 13,69 $\mu\text{g/l}$. Na ostalih globinah pa je pod mejo detekcije.

Koncentracije parametrov Mg, P, SO_4 , K, Ni, Ca in karbonatov so bile izmerjene le na globinah 112 in 148 metrov in so za Mg 36,0 in 34,8 mg/l, za PO_4 manj kot 0,015 mg/l na obeh globinah, za SO_4 14,9 in 15,0 mg/l, za K 1,1 in 1,2 mg/l, za Ni manj kot 3 $\mu\text{g/l}$, za Ca 68,1 in 70,1 mg/l. Koncentracija CO_3 je bila na obeh globinah 354 mg/l. Koncentracije NO_2 in amonijskih ionov pa na globinah 98 in 132 metrov in sta za NO_2 manj kot 4 $\mu\text{g/l}$ na obeh globinah in za amonijske ione manj kot 20 $\mu\text{g/l}$ na obeh globinah. Izmerjene koncentracije teh parametrov se minimalno razlikujejo na obeh globinah, zato smo predvidevali, da poroznost kamnine nima vpliva na te parametre.

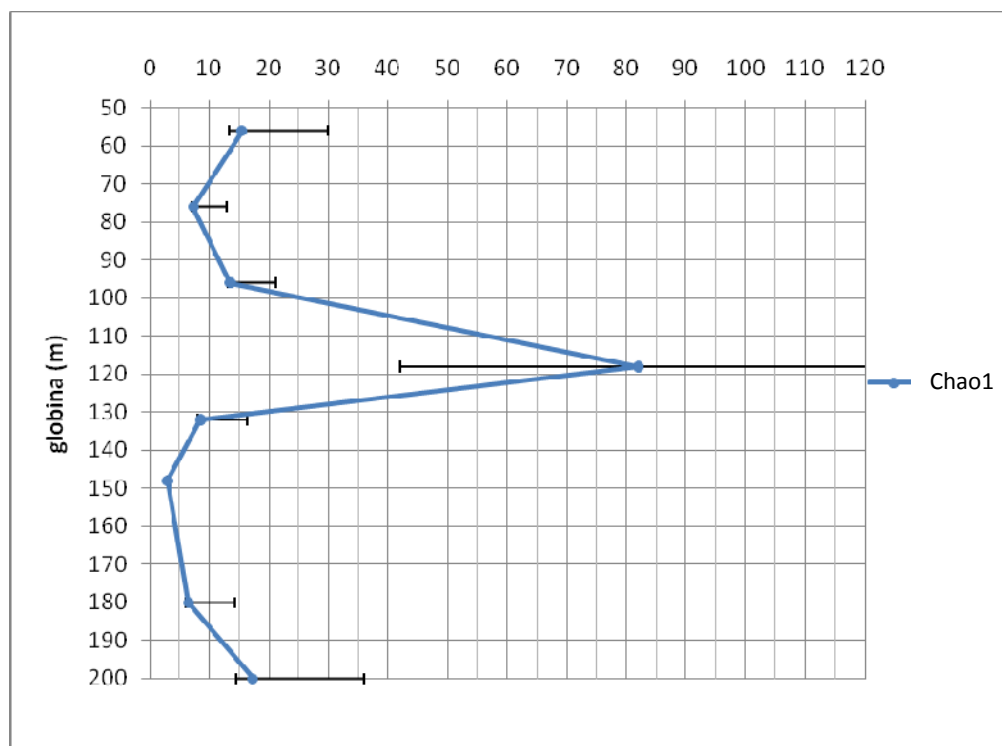
4.3 OCENA DIVERZITETE IN REPREZENTATIVNOST KLONSKIH KNJIŽNIC

4.3.1 Pritrjene klonske knjižnice

Za pritrjene klonske knjižnice je izračunana pokritost na vseh globinah nad 80 %, razen na globini 118 metrov, kjer je 30 %. Tam je 49 zaporedij 16S rDNK razvrščenih v 25 operativnih taksonomskih enot, vrednost chao1 pa je 82. Prav tako je na tej globini največja diverziteta pritrjenih klonskih knjižnic, najmanjša pa je na 148 metrih. Največja pokritost pa je na globini 148 metrov, kjer je 11 genov za 16S rDNK razvrščenih v 3 operativne taksonomske enote.

Preglednica 4: Ocene diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic pritrjenih bakterij. Sobs je število izračunanih operativnih taksonomskih enot iz pritrjenih vzorcev vodonosnika, Chao1 pa število ocenjenih pritrjenih vrst v vodonosniku. Oba parametra smo izračunali s programom Mothur (Schloss, 2008). Zaporedja iz pritrjenih klonskih knjižnic smo razvrstili v operativne taksonomske skupine in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.

globina (m)	Sobs	Chao1	pokritost (%)	število klonov
56	13	15.5	84	35
76	7	7.3	95	41
96	13	13.5	96	64
118	25	82	30	49
132	8	8.5	94	27
148	3	3	100	11
180	6	6.5	92	103
200	14	17.3	81	39



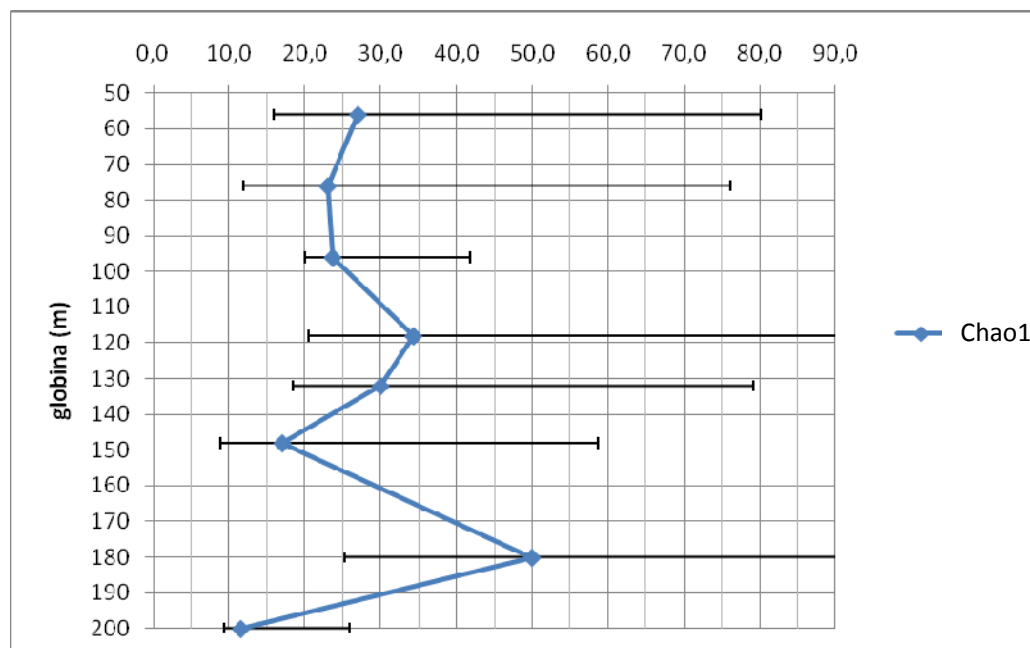
Slika 9: Chao1 ocena vrstne diverzitete klonskih knjižnic pritrjenih bakterij po globini vrtine. Na sliki so prikazani tudi 95 % intervali zaupanja za vrednost chao1. Za izračune smo uporabili program Mothur (Schloss, 2008), zaporedja iz klonskih knjižnic smo razvrstili v operativne taksonomske skupine in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.

4.3.2 Planktonske klonske knjižnice

Za planktonske klonske knjižnice je največja pokritost na globini 96 metrov, kjer je 56 zaporedij 16S rDNK razvrščenih v 19 operativnih taksonomskih enot, chao1 vrednost pa je 23,7. Najmanjša pokritost pa je na globini 180 metrov, kjer je 67 sekvenc razvrščenih v 17 operativnih taksonomskih enot, chao1 vrednost pa je 50. Na 180 metrih je izračunana največja bakterijska diverzitet, najmanjša pa na 200 metrih globine.

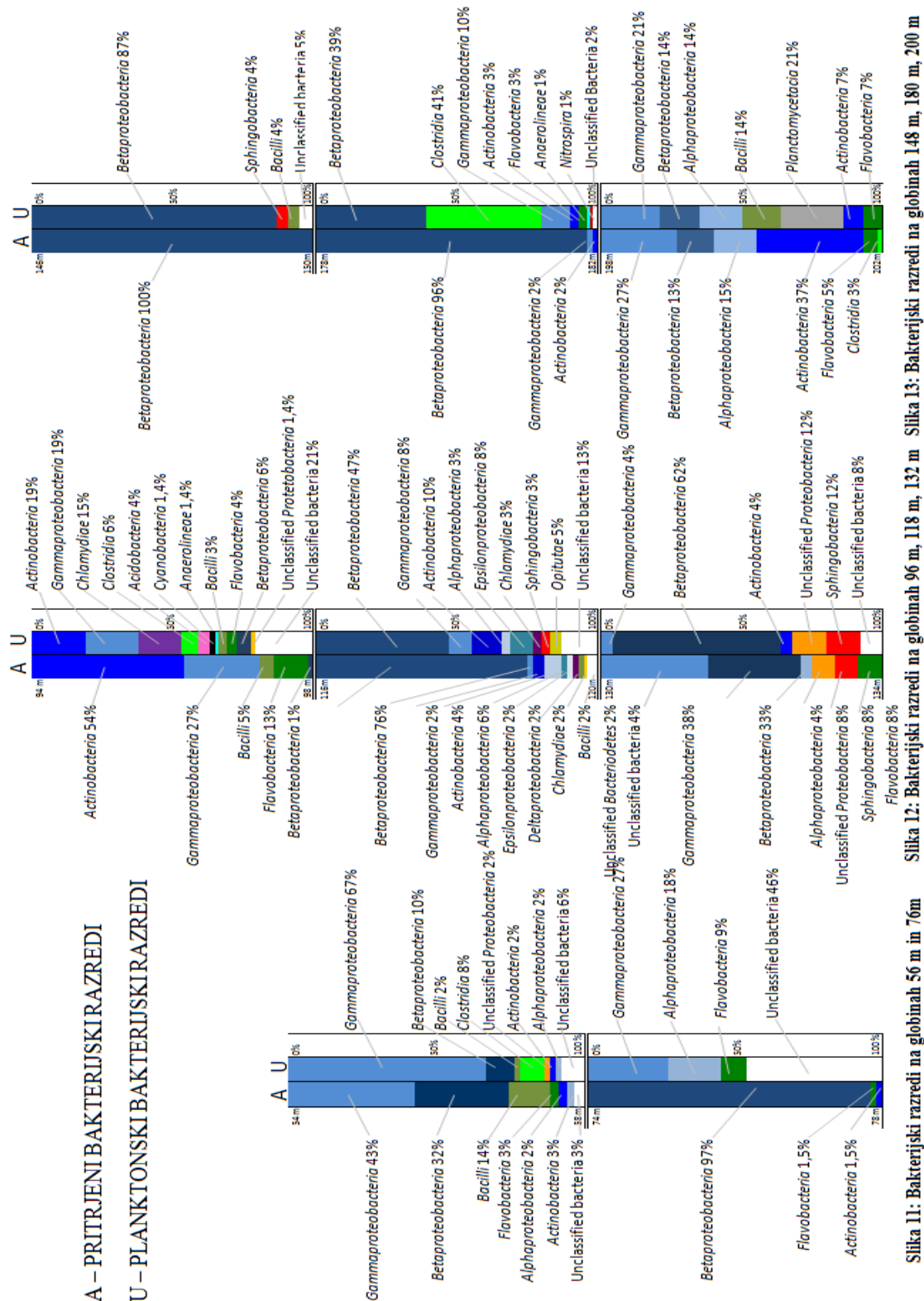
Preglednica 5: Ocene diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic planktonskih bakterij. Sobs je število izračunanih operativnih taksonomskih enot iz pritrjenih vzorcev vodonosnika, Chao1 pa število ocenjenih pritrjenih vrst v vodonosniku. Oba parametra smo izračunali s programom Mothur (Schloss, 2008). Zaporedja iz pritrjenih klonskih knjižnic smo razvrstili v operativne taksonomske skupine in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.

globina (m)	Sobs	Chao1	pokritost (%)	število klonov
56	13	27.0	48	42
76	9	23.0	39	10
96	19	23.7	80	56
118	16	34.3	47	32
132	15	30.0	50	23
148	7	17.0	41	23
180	17	50.0	34	67
200	9	11.5	78	14



Slika 10: Chao1 ocena vrstne diverzitete klonskih knjižnic planktonskih bakterij po globini vrtnice. Na sliki so prikazani tudi 95 % intervali zaupanja za vrednost chao1. Za izračune smo uporabili program Mothur (Schloss, 2008), zaporedja iz klonskih knjižnic smo razvrstili v operativne taksonomske skupine in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.

4.4 ZASTOPANOST TAKSONOMSKIH RAZREDOV V VODNI VRTINI



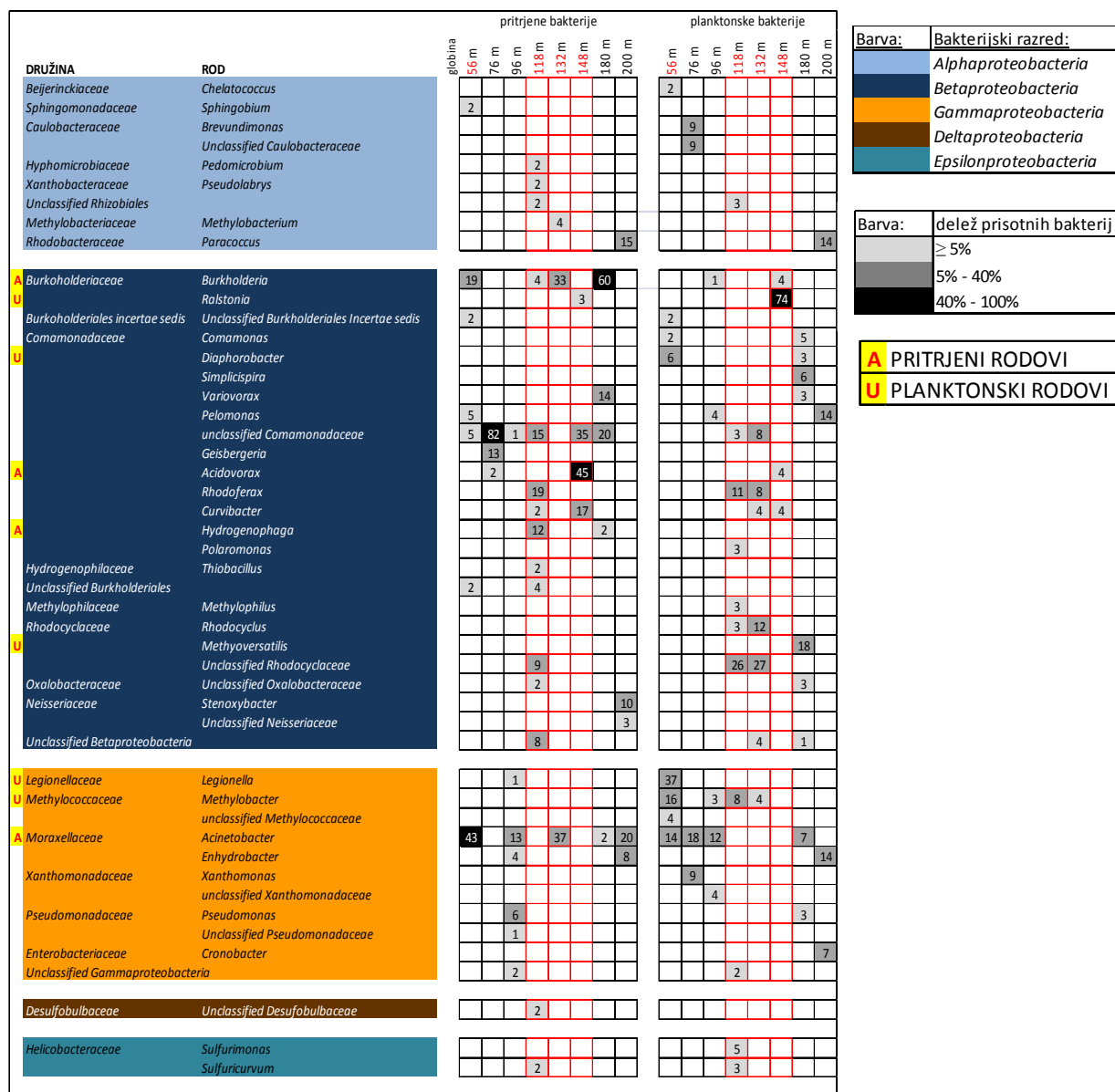
Slika 12: Bakterijski razredi na globinah 96 m, 118 m, 132 m

Slika 11: Bakterijski razredi na globinah 56 m in 76m

Slika 13: Bakterijski razredi na globinah 148 m, 180 m, 200 m

V vodni vrtini na vseh globinah prevladujejo bakterije iz debla *Proteobacteria*. Med njimi so najbolj zastopani razredi *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*. Bakterije iz razreda *Betaproteobacteria* so prevladujoče med pritrjenimi bakterijskimi razredi na globinah 76 metrov, 118 metrov, 148 in 180 metrov, med planktonskimi pa na globinah 118, 132 in 148 metrov. Na globini 56 metrov prevladuje razred *Gammaproteobacteria*, poleg njih pa je poleg razreda *Betaproteobacteria* med pritrjenimi tudi večji delež razreda *Bacilli*, med planktonskimi pa tudi razred *Clostridia*. Na globini 76 in 96 metrov imajo med planktonskimi razredi največji delež nerazvrščene bakterije, prisotni pa so tudi razredi *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* in *Flavobacteria*. Razred *Actinobacteria* ima največji delež med pritrjenimi bakterijskimi razredi na globini 96 in 148 metrov, med planktonskimi razredi pa ima manjši delež. Na globini 96 metrov je med planktonskimi razredi prisoten razred *Chlamydia*, na 200 metrih pa ima razmeroma velik delež tudi razred *Planctomycetacia*. Bakterije iz razreda *Clostridia* pa so v največjem deležu prisotne med planktonskimi razredi na globini 180 metrov. Bakterije iz ostalih taksonomskih razredov pa so prisotne v manjših deležih, kot je prikazano na slikah 11, 12 in 13.

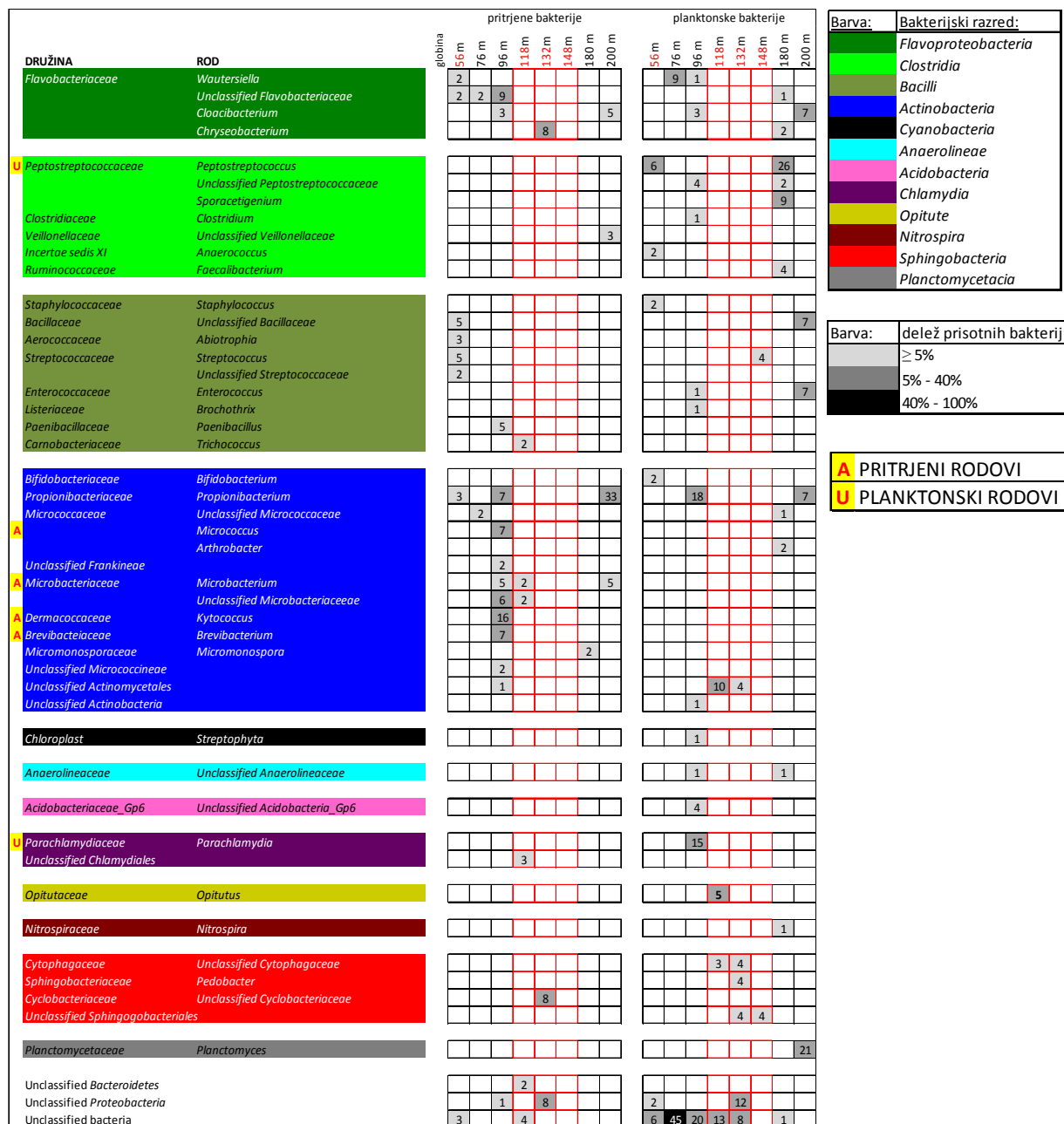
4.5 PORAZDELITEV PRITRJENIH IN PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH GENOV ZA 16S rRNK PO POSAMEZNIH GLOBINAH V VODNI VRTINI



Slika 14: Porazdelitev pritrjenih in planktonskih zaporedij po posameznih globinah v vodni vrtini. Na sliki so prikazana proteobakterijska zaporedja. Taksonomsko uvrstitev smo naredili s programom RDP (Cole in sod., 2009), s pragom zaupanja 70 %. Signifikantno različno ($p > 0,05$) porazdelitev med pritrjenimi (A) in planktonskimi (U) bakterijskimi rodovi smo določili z orodjem Library Compare, s katerim smo primerjali združena 16S rRNK zaporedja pritrjenih klonov iz knjižnic z združenimi 16S rRNK zaporedji planktonskih klonov iz knjižnic. Na sliki prikazanim bakterijskim rodov smo določili tudi njihov odstotek na posamezni globini, kjer se nahajajo. Rdeče označene številke so globine, na katerih je zelo razpokan dolomit. Rdeči stolpci predstavljajo globine, na katerih se vodonosnik polni z vodo in nutrienti.

Se nadaljuje

nadaljevanje slike 14



Slika 14: Porazdelitev pritrjenih in planktonskih zaporedij po posameznih globinah v vodni vrtini. Na sliki so prikazana vsa zaporedja, razen proteobakterijskih. Taksonomsko uvrstitev smo naredili s programom RDP (Cole in sod., 2009), s pragom zaupanja 70 %. Signifikantno različno ($p > 0,05$) porazdelitev med pritrjenimi (A) in planktonskimi (U) bakterijskimi rodovi smo določili z orodjem Library Compare, s katerim smo primerjali združena 16S rRNK zaporedja pritrjenih klonskih knjižnic z združenimi 16S rRNK zaporedji planktonskih klonskih knjižnic. Na sliki prikazanim bakterijskim rodov smo določili tudi njihov odstotek na posamezni globini, kjer se nahajajo. Rdeče označene številke so globine, na katerih je zelo razpokan dolomit. Rdeči stolpci predstavljajo globine, na katerih se vodonosnik polni z vodo in nutrienti.

Med značilno pritrjenimi bakterijskimi rodovi jih je največ različnih v razredu *Betaproteobacteria*. Med njimi je *Burkholderia*, ki je v največjem deležu prisotna na globini 180 metrov, v manjšem deležu pa tudi med planktonskimi bakterijami. *Acidovorax* ima največji delež na globini 148 metrov, *Hydrogenophaga* pa je prisotna na globinah 118 in 180 metrih. Rod *Variovorax* je prisoten le na globini 180 metrov, rod *Geisbergia* pa na globini 76 metrov. Značilno planktonski predstavniki razreda *Betaproteobacteria* pa so *Ralstonia* na 148 metrih, *Methyloversatilis* na 180 metrih globine in *Diaphorobacter* na 56 in 180 metrih.

Predstavniki razreda *Alphaproteobacteria* imajo zelo nizke deleže v vodonosniku. Predstavniki vseh identificiranih rodov, se pojavljajo v vodnih, oligotrofnih okoljih. Med njimi je pomemben rod *Pedomicrobium*, ki se nahaja na 118 metrih globine med pritrjenimi bakterijami.

V razredu *Gammaproteobacteria* so v večjih deležih prisotni rodovi *Legionella*, *Methylobacter*, ki sta signifikantno planktonska, in *Acinetobacter*, ki je značilno pritrjen bakterijski rod. Ta ima največji delež med pritrjenimi bakterijami na globini 56 metrov. V razredu *Deltaproteobacteria* pa smo identificirali le nerazvrščene predstavnike družine *Desulfobulbaceae*. Te so prisotne le na globini 118 m.

Bakterije iz razreda *Clostridia* smo identificirali med planktonskimi bakterijami. Med njimi je značilno planktonski rod *Peptostreptococcus*, ki je prisoten na globini 56 in 18 metrov.

Največ predstavnikov razreda *Actinobacteria* je med pritrjenimi bakterijskimi rodovi, na globini 96 metrov. Med njimi so značilno pritrjeni rodovi *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* in *Kytococcus*.

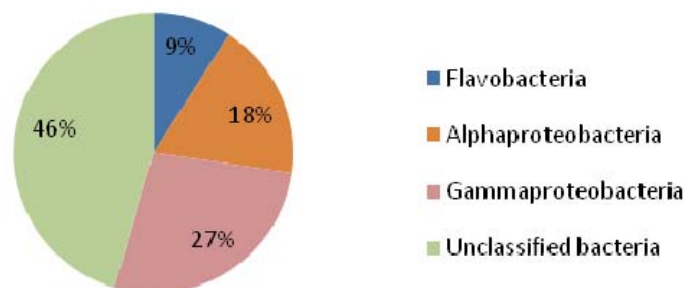
Predstavniki bakterijskega razreda *Flavobacteria* so v večini prisotni le med planktonskimi bakterijami. Prav tako so planktonski skoraj vsi predstavniki bakterijskega razreda *Clostridia*. Med njimi ima največji delež rod *Peptostreptococcus*. Prav tako so v zelo nizkih deležih prisotni rodovi bakterijskega razreda *Bacilli*.

Na 96 metrih globine je med planktonskimi bakterijami prisoten tudi rod *Parachlamydia*. Bakterijski rod *Opitutus*, ki je v nizkem deležu med planktonskimi bakterijami prisoten na

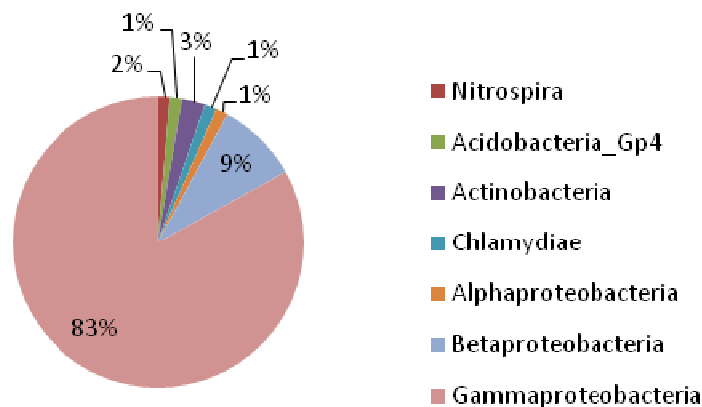
globini 118 metrov, je značilen za anaerobna okolja. Na 200 metrih globine smo identificirali še rod *Planctomyces*.

Deleži prisotnih bakterijskih rodov so neodvisni od vrste kamnine v vodonosniku, saj na globinah, na katerih je prisoten zelo razpokan dolomit in kjer se vodonosnik napaja z vodo ter nutrienti, ni večjega deleža posameznih bakterijskih rodov. Na globinah, kjer se nahaja zelo razpokan dolomit, imajo največje deleže bakterije iz razreda *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*, katerih predstavniki imajo večje deleže tudi na ostalih globinah, kjer se nahaja nerazpokan dolomit.

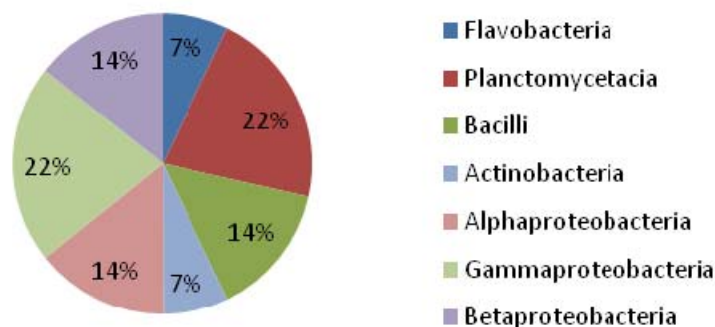
4.6 SESTAVA KLONSKIH KNJIŽNIC PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZAPOREDIJ NA GLOBINAH 76 IN 200 METROV V ČASU VRTANJA IN PO ENEM LETU



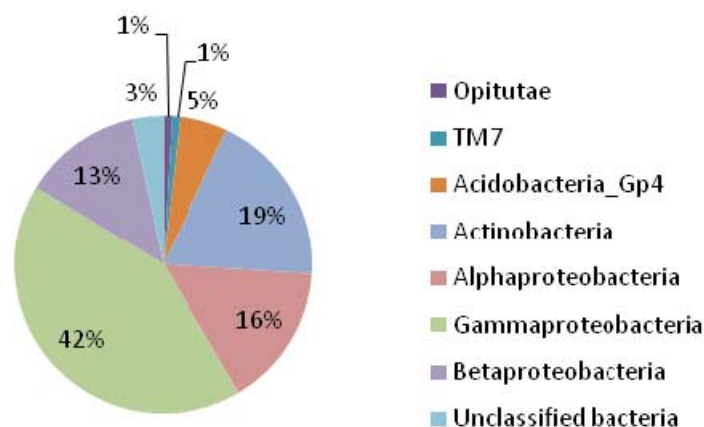
Slika 15: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih zaporedij po razredih, na globini 76 metrov v času vrtanja vrtine.



Slika 16: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih zaporedij po razredih, na globini 80 metrov po enem letu.



Slika 17: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih zaporedij po razredih, na globini 200 metrov v času vrtanja vrtine.

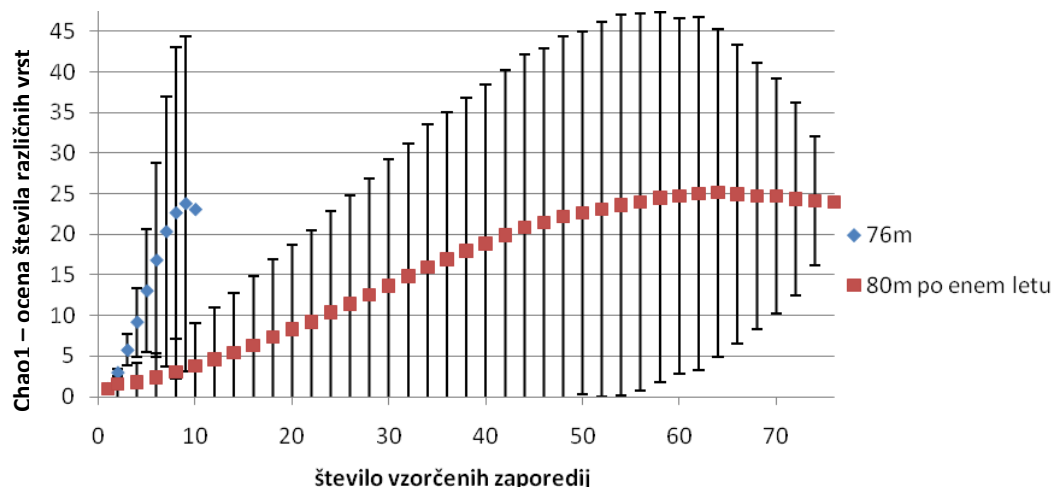


Slika 18: Taksonomska sestava klonske knjižnice planktonskih bakterijskih zaporedij po razredih, na globini 200 metrov po enem letu.

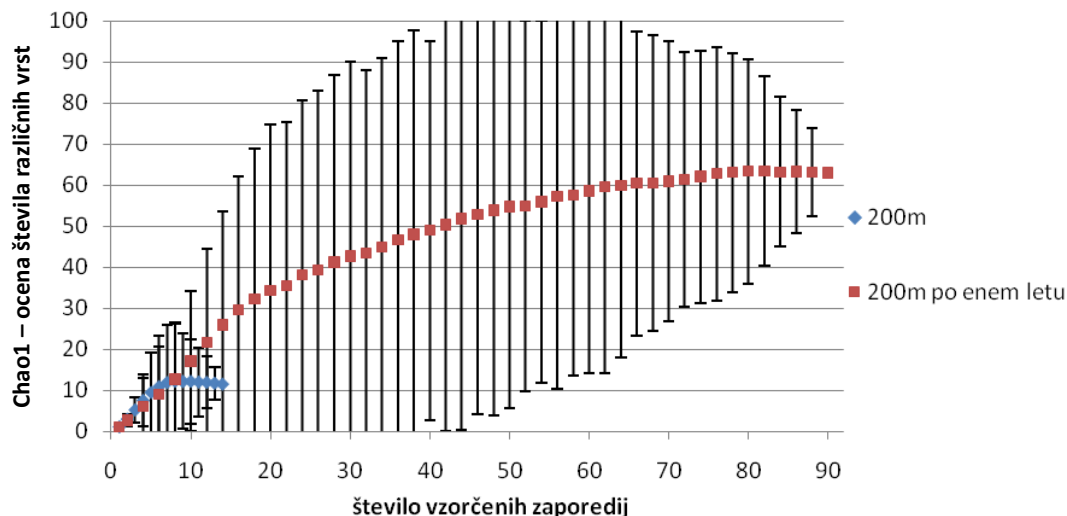
Na globini 76 metrov je bilo v času vrtanja skoraj polovica nerazvrščenih bakterij. Identificirane so bile tudi bakterije iz razreda *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* in *Flavobacteria*. Po enem letu izkoriščanja vodonosnika pa so bile najbolj zastopane bakterije iz razreda *Gamaproteobacteria*, ostalih predstavnikov posameznih razredov pa je veliko manj.

Na globini 200 metrov je bilo v času vrtanja identificiranih 22 % bakterij iz razreda *Planctomycetacia* in *Gammaproteobacteria*, 14 % pripadnikov razreda *Bacilli*, *Alphaproteobacteria* in *Betaproteobacteria* ter po 7 % *Flavobacteria* in *Actinobacteria*. Po enem letu pa je prevladoval razred *Gammaproteobacteria*. Identificirane so tudi *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* in *Betaproteobacteria*. Predstavnikov ostalih razredov je manj kot 5 %.

4.7 VRSTNA RAZNOLIKOST PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZAPOREDIJ NA GLOBINI 80 IN 200 METROV OB ČASU VRTANJA IN PO ENEM LETU UPORABE VODONOSNIKA



Slika 19: Ocena vrstne raznolikosti planktonskih zaporedij na globini 80 metrov, ob vrtanju in po enem letu uporabe vodonosnika. Na sliki so prikazani tudi 95 % intervali zaupanja za vrednost Chao1. Za izračune smo uporabili program Mothur (Schloss, 2008), zaporedja iz klonskih knjižnic smo razvrstili v operative taksonomske skupine z mejno vrednostjo 0,05 in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.



Slika 20: Ocena vrstne raznolikosti planktonskih zaporedij na globini 200 metrov, ob vrtanju in po enem letu uporabe vodonosnika. Na sliki so prikazani tudi 95 % intervali zaupanja za vrednost Chao1. Za izračune smo uporabili program Mothur (Schloss, 2008), zaporedja iz klonskih knjižnic smo razvrstili v operative taksonomske skupine z mejno vrednostjo 0,05 in predpostavili, da zaporedja spadajo v različno taksonomsko vrsto, če se razlikujejo za več kot 3 %.

Na globini 76 metrov je v času vrtanja vodne vrtine ocenjena vrstna raznolikost planktonskih bakterij 23. Po enem letu izkoriščanja vodonosnika pa je ocenjeno število različnih bakterijskih vrst na globini 80 metrov 25. Izračunani 95 % intervali zaupanja so zelo široki, od Chao1 vrednosti 47 do 5 in so približno enaki pri obeh izračunih.

Na globini 200 metrov je v času vrtanja vodne vrtine ocenjena vrstna raznolikost planktonskih bakterijskih vrst 12. Po enem letu izkoriščanja vodonosnika pa je ocena vrstne raznolikosti višja in je 63. Izračunani 95 % intervali zaupanja so v času vrtanja vodne vrtine od 4 do 26, po enem letu pa so veliko večji, od 0 do 105, kar je posledica večje klonske knjižnice po enem letu.

4.8 BAKTERIJE IZOLIRANE Z GOJITVENIMI TEHNIKAMI

globina [m]	rod	najbližji sorodnik iz baze RDP (Ribosomal database project)	GenebankID	podobnost
44 - 46	<i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium	DQ264528	1,000
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	0.996
	<i>Brevundimonas</i>	<i>glacier bacterium FX13</i>	AY315163	0.986
	<i>Brevundimonas</i>	Uncultured <i>Brevundimonas</i> sp.	GU233823	0.986
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ391497	0.962
72 - 74	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D86002	0.998
	<i>Aeromonas</i>	uncultured gamma proteobacterium	FJ535204	0.961
	<i>Afipia</i>	<i>Afipia birgiae</i>	AF288304	0.994
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	DQ177489	1.000
	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>	FJ527451	0.989
	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>	FJ527452	0.989
	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i> sp.	AJ292035	0.957
	<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i> sp.	FJ687971	1.000
80 - 82	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Pectinolytica</i>	AF134065	0.930
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	AY512616	0.990
	<i>Pseudomonas</i>	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	EF683134	0.992
	<i>Janthinobacterium</i>	uncultured bacterium	AY959103	0.998
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	EU086818	0.995
92 - 94	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	AJ717367	0.697
	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	AB020186	0.990
	<i>Delftia</i>	uncultured bacterium	EU537780	0.994
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i>	X60407	0.955
96 - 98	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	EU330448	0.998
	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i> sp.	EF451632	1,000
	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i> sp.	EU303275	0.956
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	1,000
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas intermedia</i>	AJ227786	0.944
	<i>Marmoricola</i>	<i>Marmoricola</i> sp.	GQ339906	0.965
	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	AM110076	1.000
	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	EU580699	0.962
1 - 104	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	EU119195	0.971
132	<i>Acidovorax</i>	uncultured bacterium	AY050592	0.995
	<i>Malikia</i>	<i>Malikia spinosa</i>	AB077038	0.990
	<i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter</i> sp.	AJ227764	0.985
	<i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium	DQ264528	0.994
172	<i>Brevundimonas</i>	<i>Mycoplana bullata</i>	FM213398	0.993
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas bullata</i>	AB023428	1.000
200	<i>Acidovorax</i>	uncultured bacterium	AY050592	0.964
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D86002	0.986
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY653221	1.000
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas mediterranea</i>	AJ244706	1,000
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	AJ300773	1.000
	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	AJ300773	0.944

Slika 21: Bakterijski rodovi zrasli na gojišču Fe-EDTA (črno obarvani) in na LSM gojišču (beli). Zaporedja 16S rDNA smo taksonomsko uvrstili z orodjem Seqmatch v bazi podatkov RDP 10 (Cole in sod., 2009) s privzetimi nastavitvami programa.

Bakterije izolirane iz oligotrofnega gojišča Fe-EDTA so prisotne na globinah 44-46 metrov, 72-74 metrov in 96-98 metrov. Ostali bakterijski rodovi so bili izolirani z heterotrofnim gojiščem LSM. Največ izoliranih bakterij je predstavnikov rodu *Brevundimonas* in *Pseudomonas*, ostalih rodov je manj.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Na mestih, kjer se nahaja zelo razpokan dolomit, se vodonosnik polni z vodo. To nam potrjujejo meritve organskega ogljika, mangana in železa (slika 7), kateri so izmerjeni v višjih koncentracijah na mestih, kjer je večja poroznost kamnine. Pričakovali smo, da bomo na teh mestih identificirali drugačne bakterijske vrste, predvsem pa več različnih planktonskih in pritrjenih bakterijskih vrst, kot na mestih z nerazpokanim dolomitom. Zaradi večjih koncentracij hranil na teh mestih, smo pričakovali tudi večjo količino DNK iz planktonskih in pritrjenih vzorcev. Rezultati (slike 11, 12, 13 in 14) pa nam ne kažejo povezav med razporeditvijo pritrjenih in planktonskih mikrobnih združb in poroznostjo kamnine, posledično pa tudi ne kažejo povezave med razporeditvijo bakterijskih združb in prisotnimi hranili. Ti rezultati so nekoliko nepričakovani, saj so v dosedanjih raziskavah ob izvorih hranil v vodonosnikih odkrili večjo bakterijsko raznolikost in večjo gostoto bakterijskih celic (Griebler in Lueders, 2009; Lehman in sod., 2001b; Schneiders, 2003). Vzrok temu so lahko zelo nizke koncentracije kemijskih parametrov, predvsem organskega ogljika. Poleg tega lahko sklepamo, da se v vodonosniku na globinah kjer doteka voda, sploh ne ustvarijo gradienti hranil, zaradi katerih bi se na teh mestih namnožile, zadrževale in pritrjale bakterije. Prav tako ne poznamo gibanja tokov in vode v vodonosniku, ki lahko pomembno vpliva na vzpostavitev gradientov hranil in razporeditev bakterijskih populacij.

Pretok vode je v našem primeru zelo velik. Na to kažejo tudi meritve redoks potenciala (slika 6), ki je po vsej globini vodonosnika pozitiven. Ponavadi se redoks potencial niža z globino vodonosnikov, predvsem v zaprtih sistemih, saj prisotne aerobne bakterije hitro porabijo prisoten kisik. Zato morajo bakterije v globljih delih vodonosnikov, kjer je redoks potencial negativen, uporabljati alternativne končne prejemnike elektronov (Schneiders, 2003, Madigan in Martinko, 2006). V našem primeru je pozitiven redoks potencial najverjetneje posledica velike prezračenosti vodonosnika, ki nastane zaradi velikega pretoka vode. To pomeni, da je v našem vodonosniku večji vnos kisika, kot je njegova poraba s strani mikroorganizmov. Najbolj aktivna bakterijska rast in največje formiranje biofilmov poteka pri redoks potencialu od 50 do 150 mV (Schneiders, 2003). V našem primeru pa se vrednost redoks potenciala giblje od 400 do 300 mV.

Zaradi velikega pretoka, prezračenosti in konstantnih fizikalnih pogojev v vodonosniku, tudi globina vodonosnika ne vpliva na prisotne mikrobne združbe in njihovo razporeditev.

Poleg konstantnega redoks potenciala sta po globini vodonosnika konstantni tudi temperatura, električna prevodnost vode in pH (sliki 5 in 6), ki bi pri drugačnih vrednostih lahko vplivali na strukturo in razporeditev bakterijskih združb. Konstantna temperatura je pričakovana, saj je znano, da so fizikalni pogoji v vodonosnikih bolj ali manj konstantni in da temperatura ne presega več kot 20 °C, razen v geotermalnih vodonosnikih (Schneiders, 2003). pH vrednost v vodonosnikih v večini primerov bolj niha (Lehman in sod., 2001a; Schneiders, 2003). V našem primeru pa lahko sklepamo enako, kot za redoks potencial, da je tudi konstanten pH posledica velikega pretoka vode. Električna prevodnost vode je odvisna od temperature in prisotnih ionov v vodi ter njihovih lastnosti. Mejna vrednost za pitno vodo je 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pri 20 °C (pravilnik o pitni vodi, 2004). V vodonosniku je izmerjena vrednost prevodnosti vode od 550 do 603 $\mu\text{S}/\text{cm}$, kar dodatno kaže na prisotne nizke koncentracije kalcijevih, magnezijevih, natrijevih, kalijevih, hidrogenkarbonatnih, sulfatnih in kloridnih ionov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se z globino in poroznostjo v vodonosniku kemijsko - fizikalni parametri ne spreminjajo do take mere, da bi imeli vpliv na sestavo in razporeditev pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb.

Kemijsko fizikalni pogoji (slike 5, 6, 7, 8) v vodonosniku omogočajo naselitev dveh izmed treh skupin bakterij, ki jih Schneiders (2003) uvršča med problematične bakterije v vodonosniku in povzročajo obraščanje vodonosnika ter korozijo cevitve v vodonosniku. V prvi skupini so predstavniki bakterijskih družin, ki producirajo eksopolimere oziroma sluzi. V vodonosnikih naselijo površine in omogočajo hitro rast biofilmov. Iz te skupine smo identificirali najbolj značilne predstavnike bakterijskih rodov *Pseudomonas*, *Flavobacter* in *Acinetobacter* (slika 14 in 21). Predstavniki iz te skupine so zelo občutljivi na okoljske spremembe, saj se na vsako spremembo oziroma na vsak stresni dejavnik odzovejo s še intenzivnejšim izločanjem sluzi in hitrejšim formiranjem biofilmov (Schneiders, 2003). V našem primeru se te spremembe pojavijo z samim vrtanjem vodne vrtine, vzpostavitvijo distribucijskega sistema vodonosnika in črpanjem vode iz vodonosnika. To pomeni, da sčasoma lahko pričakujemo pritrditev teh bakterijskih predstavnikov na vse prisotne površine v vodonosniku ter obraščanje distribucijske cevi in filtrov. V biofilmih se postopoma ustvarijo anaerobne razmere, zniža se pH in redoks potencial (Marshall, 2006; Schneiders, 2003). Tako se lahko ustvarijo dobri pogoji za rast anaerobnih bakterij, ki lahko privedejo do korozije distribucijskega sistema in poslabšanje organoleptičnih lastnosti vode.

Zaradi velike vsebnosti železa v vodonosniku (sliki 7 in 8) pa smo v vodonosniku pričakovali tudi oksidatorje železa, ki jih Schneiders (2003) uvršča v drugo skupino problematičnih bakterij v vodonosniku. Schneiders (2003) kot tipične predstavnika železo oksidirajočih bakterij v vodonosnikih navaja rodova *Gallionella* in *Leptothrix*, zato smo na gojišča *Leptothrix* strains medium in Fe-EDTA nacepili vzorce vode iz posameznih globin vodne vrtine. *Leptothrix* strains medium je heterotrofno gojišče, Fe-EDTA pa oligotrofno. Na oligotrofnih gojiščih so zrastle le bakterije iz globin 44, 72, 96 in 200 metrov, na heterotrofnih gojiščih pa so zrastle bakterije iz vseh vzorčenih globin (slika 21). Železo oksidirajočih bakterij nismo identificirali, odkrili pa smo tipične predstavnike podzemnih voda, med katerimi prevladuje rod *Pseudomonas* in *Brevundimonas*. Rezultati zaporedij klonskih knjižnic pa so med pritrjenimi rodovi pokazali prisotnost rodu *Pedomicrobium* v katerega spadajo bakterijske vrste, ki oksidirajo mangan ter železo in ga nalagajo v celicah. Prisotnost železovih oksidov je posledica velike prisotnosti železa v geološki sestavi vodonosnika, lahko pa tudi železo oksidirajočih bakterij v biofilmih vodonosnika. Sčasoma bi te bakterije lahko povzročale težave na distribucijskem sistemu, korozijo, obraščanje, zamašitve cevi in filtrov in tako povzročale dodatne stroške pri vzdrževanju. Koncentracija Fe^{3+} po globini narašča, kar je posledica usedanja železovih oksidov, ki tonejo v vodnem stolpcu vodonosnika.

Kvaliteta vode v vodonosniku je za zdaj po vseh kemijskih in mikrobioloških parametrih neoporečna, vendar bi lahko ob prisotnosti železovih bakterij koncentracija železa zelo narasla in poslabšala kakovost vode.

V vodonosniku identificirane bakterije spadajo v taksonomske skupine, v katere sta Griebler in Lueders (2009) razvrstila do sedaj največkrat odkrite bakterije v podzemnih vodnih sistemih (sliki 2 in 3). V vodonosniku prevladujejo bakterije iz taksonomske skupine *Betaproteobacteria* (slike 11, 12, 13). Edina razlika v primerjavi z Griebler in Lueders-ovo (2009) razvrstitvijo, je v razredu *Chlamydiae*, ki smo ga identificirali med planktonskimi bakterijami na globini 96 metrov (slika 12). Poleg tega razreda pa smo na isti globini našli še enega predstavnika razreda *Cyanobacteria*, ki je najverjetneje posledica kontaminacije, saj v vodonosniku ni svetlobe, ki jo za rast potrebujejo cianobakterije.

V vodonosniku smo med planktonskimi in pritrjenimi vzorci identificirali predstavnike istih bakterijskih razredov. Razlike so le v taksonomskih razredih *Acidobacteria* (deblo

Acidobacteria), *Cyanobacteria* (deblo *Cyanobacteria*), *Anaerolineae* (deblo *Chloroflexi*) in *Opitutae* (deblo *Verrucomicrobia*), ki so v majhnih deležih prisotne med planktonskimi razredi, med pritrjenimi bakterijskimi razredi pa jih nismo identificirali.

Nukleotidna zaporedja iz klonskih knjižnic smo uvrstili še v taksonomske družine in rodove, kar je prikazano na sliki 14. Ugotovili smo, da je vrstna sestava pritrjenih in planktonskih bakterij različna. V razredu *Alphaproteobacteria* smo identificirali 9 različnih bakterijskih rodov, ki imajo zelo majhen delež po posameznih globinah. Večina predstavnikov teh rodov je prilagojenih na oligotrofne razmere v okolju (Schneiders, 2003; Hirsch in Gebers, 2005; Van Spanning in sod., 2005). Med njimi so za vodonosnik najbolj pomembne bakterije iz rodu *Pedomicrobium*, ki se nahaja na 118 metrih globine med pritrjenimi bakterijami. Te kopičijo oksidirano železo in mangan v hifah (Hirsch in Gebers, 2005). Tako bi s časoma z obraščanjem biofilma in nalaganjem železovih in manganovih oksidov povzročale težave v vodni vrtini in distribucijski cevi. Med pritrjenimi in planktonskimi bakterijami smo na globini 200 metrov identificirali rod *Paracoccus*. Ta ima 15 odstotni delež med bakterijami na tej globini. Predstavnike najpogosteje zasledimo v zemlji kot denitrifikatorje, nekateri predstavniki tega rodu pa so prilagojeni tudi na oligotrofne razmere v vodonosniku (Van Spanning in sod., 2005).

Najbolj zastopan razred v vodonosniku je razred *Betaproteobacteria*. Identificirali smo 25 različnih rodov, ki so uvrščeni v 10 taksonomskih družin. Med njimi trije rodovi prevladujejo med pritrjenimi, trije pa med planktonskimi bakterijami. Iz družine *Burkholderiaceae* smo določili rodova *Burkholderia* in *Ralstonia*. Za bakterije iz rodu *Burkholderia* je značilno, da se pritrjajo. Največ bakterij iz tega rodu je med pritrjenimi rodovi na globini 56, 132 in 180 metrov, med planktonskimi predstavniki pa smo našli zelo nizke odstotke. So zelo pogoste v oligotrofnih okoljih, največkrat so jih identificirali v podzemnih vodah in zemlji. V vodonosnikih in zemlji so zelo pomembni ob morebitnih onesnaženjih, saj razgrajujejo pesticide, aromatske spojine in halogene, nekatere vrste pa so sposobne fiksacije dušika. Več kot polovica znanih vrst je patogenih za rastline, živali in ljudi, vendar so te vrste prisotne v toplejših delih planeta, v tropskem pasu. Proizvajajo siderofore in druge kelatorje kovin, nekatere vrste pa tudi bakteriocine in protiglivične snovi (Palleroni, 2005a).

Rod *Ralstonia* pa je planktonski in ima večinski delež med planktonskimi rodovi na globini 148 metrov. V rod *Ralstonia* prav tako kot v rod *Burkholderia* spadajo aerobne bakterije, nekatere so sposobne redukcije nitrata, prisotne so v zemlji in vodi ter so dobro prilagojene na oligotrofne pogoje. Prav tako vključuje rastlinske in živalske patogene. Nekatere vrste so sposobne produkcije vodika. Njihova značilnost je da imajo rjav vodotopen pigment, ki lahko obarva vodo. So odporne na težke kovine in zmanjšajo njihov učinek na okolje (Yabuuchi in sod., 2005). Te bakterije bi v večjih koncentracijah poslabšale organoleptične lastnosti vode, v biofilmih bi se lahko namnožile patogene vrste bakterij, kar bi pomembno vplivalo na poslabšanje oporečnosti vode.

V razredu *Betaproteobacteria* je najbolj zastopana družina *Comamonadaceae*. Identificirane rodove najdemo v vodnih okoljih in zemlji, živijo v aerobnih razmerah, večina rodov je sposobna redukcije nitrata, nekateri pa lahko oksidirajo vodik in so sposobni denitrifikacije. V našem primeru je rod *Diaphorobacter* značilno planktonski, med pritrjenimi rodovi pa imata veliko predstavnikov rodova *Acidovorax* in *Hydrogenophaga*. Bakterijski rodovi iz družine *Comamonadaceae* imajo zelo pomembno vlogo v naravnih ekosistemih, predvsem ob onesnaženjih, saj lahko razgrajujejo kompleksne kemikalije, policiklične aromatske ogljikovodike, herbicide ter zmanjšajo škodljiv učinek težkih kovin in tako prispevajo k bioremediaciji. Predstavniki rodu *Comamonas* v oligotrofnih vodnih okoljih tvorijo flokule. Ob prisotnosti kroma med metabolizmom nastaja kromov oksid, ki se nalaga na stenah vodonosnika ali distribucijskega sistema in pripomore k zamašitvi cevi. Nekateri predstavniki rodu *Acidovorax* pa lahko razgrajujejo sintetične polimere, njihovi biofilmi pa prispevajo k raztapljanju bakra. Enako velja za rod *Variovorax*, ki v onesnaženih okoljih razgrajuje kompleksne kemikalije (Willems in Gillis, 2005). Bakterijski rod *Thiobacillus*, ki spada v družino *Hydrogenophaga*, pa prispeva k akumulaciji žvepla in žveplovih spojin. Našli so jih v okoljih, kjer so prisotne žveplove spojine, ki jih lahko oksidirajo (Kelly D. in sod, 2005).

V razredu *Gammaproteobacteria* so v večjih deležih prisotni rodovi *Legionella*, *Methylobacter*, ki imata večji delež med planktonskimi bakterijami, in *Acinetobacter*, ki je v večjem deležu prisoten med pritrjenimi bakterijami. Vsi predstavniki razreda *Gammaproteobacteria* so prilagojeni na vodna okolja ter oligotrofne razmere, in so že bili identificirani v podzemnih vodah. Rod *Legionella* je prisoten le na globini 56 metrov. Rod

Methylobacter pa so večinoma identificirali v okoljih z metanom, saj je zanj značilna oksidacija metana in oksidacija trikloroetilen, zato je zanimiv za uporabo v bioremediaciji. Metan je lahko posledica metanogeneze ali drugih ogljikovodikov v vodonosniku (Bowman, 2005). Bakterijski rod *Acinetobacter* ima največji delež med pritrjenimi bakterijami na 56 metrih globine. Pogosto so prisotni tudi na koži. Nekateri predstavniki rodov *Legionella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* in *Cronobacter* so oportunistični patogeni. Rodova *Pseudomonas* in *Acinetobacter* sta tudi pomembna v onesnaženih okoljih, saj razgrajujeta aromatske spojine (Towner, 2006; Palleroni, 2005b).

Največ rodov iz razreda *Clostridia* je na globini 180 metrov med planktonskimi združbami. Sklepamo, da je na tej globini prisotnega najmanj kisika, saj je za vse rodove značilna aerotoleranca ali pa striktna anaerobioza. Delež bakterijskih rodov je zelo nizek. Nekatere vrste so pogoste tudi na koži in v s fekalijami onesnaženih okoljih. Nekatere pa so patogene (Madigan in Martinko, 2006). Prav tako je zelo malo zastopan razred *Bacilli*, med katerimi noben rod ne prevladuje med pritrjenimi ali planktonskimi bakterijami. V njem so predvsem fakultativni anaerobi, ki proizvajajo mlečno kislino (Madigan in Martinko, 2006).

Razred *Actinobacteria* ima največ predstavnikov med pritrjenimi bakterijskimi rodovi na globini 96 metrov. Med pritrjeni rodovi imajo večje deleže *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Kytococcus* in *Brevibacterium*. Med identificiranimi bakterijskimi rodovi je veliko takšnih, ki so prisotni tudi v ali na ljudeh, večino teh pa najdemo tudi v zemlji in vodah. Rodova *Arthrobacter* in *Micrococcus* razgrajujeta pesticide in kemikalije ter organske onesnaževalce v okolju, tako da sta v primerih onesnaženja vodonosnika, poleg rodov *Pedobacter* in *Nitrospira* pomembna za bioremediacijo (Eutushenko in Takeuchi, 2006). Nekateri predstavniki rodov *Propionibacterium*, *Brevibacterium* in *Micromonospora* pa v določenih pogojih izločajo protimikrobne in protiglivične snovi (Collins M. D., 2006).

Med ostalimi rodovi je potrebno omeniti še rod *Parachlamydia*, ki smo ga identificirali med planktonskimi rodovi. Predstavniki tega rodu so predatorji mikrobov, predvsem ameb in tako lahko kontrolirajo njihovo število v vodonosniku. Poleg tega so patogeni tudi za živali in ljudi (Everet in sod., 1999).

Za vodonosnik pa so pomembne še bakterije iz rodu *Planctomyces*, ki smo jih identificirali na 200 metrih globine med planktonskimi bakterijskimi rodovi. Te se združujejo v rozete,

kamor nalagajo tudi oksidirano železo ali mangan in zato potonejo na dno (Ward in sod., 2006). Zaradi nalaganja oksidiranega železa v celice in formiranja bakterij v skupke lahko povzročajo zamašitve filtrov distribucijskega sistema.

Na 118 metrih globine smo med planktonskimi bakterijami identificirali tudi rod *Opitutus*, ki je prisoten v anaerobnih okoljih, zato sklepamo, da je del biofilma. Končna produkta fermentacij pa sta acetat in vodik, ki sta pomembna za metanogene arheje (Chin in Janssen, 2002). Poleg metanogenih arhej, katerih prisotnosti v vodonosniku nismo preverjali, lahko acetat porabijo tudi druge bakterije, predvsem iz rodu *Brevundimonas* (Vancanneyt in sod., 2005), katere smo identificirali na globini 76 metrov.

Večina izoliranih zaporedij je sorodna z bakterijskimi rodovi, ki so naravno prisotni v vodi, zemlji, nekatere tudi v rastlinah. Identificirali smo tudi nekaj bakterij, ki so patogene ali oportunistično patogene za ljudi, vendar imajo zelo nizek delež. Večina naštetih rodov je pomembna v primeru onesnaženja vodonosnika, saj razgrajuje različne snovi in kemikalije ter sodelujejo v procesih bioremediacije. Taksonomski razredi med pritrjenimi in planktonskimi klonскими knjižnicami so po globini različno zastopani, kar je prikazano na slikah 11, 12 in 13. Iz porazdelitve bakterijskih rodov po globinah v vodonosniku (slika 14) vidimo, da se po globini sestava pritrjenih in planktonskih razredov spreminja. Razlike so tudi med pritrjenimi in planktonskimi rodovi, saj smo nekatere bakterijske rodove identificirali samo med planktonskimi bakterijami, nekateri so prisotni samo med pritrjenimi bakterijami, veliko rodov pa smo identificirali med pritrjenimi in tudi med planktonskimi rodovi (slike 11, 12, 13). Razlike med planktonskimi in pritrjenimi bakterijskimi združbami so pričakovane. Znano je, da se v oligotrofnih okoljih bakterije pritrjajo na podlago, formirajo biofilme, se razmnožujejo in odcepljajo od podlage (Marshall, 2006; Schneiders, 2003). Zato predvidevamo, da so tisti bakterijski rodovi, ki smo jih identificirali med pritrjenimi in planktonskimi rodovi, v aktivni fazi rasti in se tudi odcepljajo od podlage. Za rodove, ki smo jih identificirali le med pritrjenimi bakterijami, lahko sklepamo, da se ne odcepljajo od podlage in so manj aktivni. Bakterijski rodovi, ki so prisotni samo med planktonskimi bakterijami, pa bi lahko prišli s tokom podzemne vode v vodonosniku.

Ocena diverzitete in reprezentativnosti klonских knjižnic nam kažejo, da je v vodonosniku prisotnih še več bakterijskih vrst, kot smo jih identificirali mi (slike 9, 10). Velika

odstopanja so predvsem pri oceni vrstne diverzitete planktonskih bakterijskih vrst (slika 10), manjša odstopanja pa so pri oceni vrstne diverzitete pritrjenih bakterijskih vrst (slika 9). To pomeni, da smo naredili premajhno klonsko knjižnico, glede na to, da smo identificirali tako veliko število različnih bakterijskih vrst. Kljub temu pa predvidevamo, da bi dobili podobne rezultate tudi, če bi naredili večjo klonsko knjižnico.

Po enem letu smo ponovno vzorčili in identificirali planktonske bakterije iz globin 80 in 200 metrov. Rezultati so pokazali, da se je sestava planktonskih bakterijskih razredov zelo spremenila (slike 15, 16, 17, 18). Na globini 76 metrov smo v času vrtanja vodne vrtine identificirali 3 različne bakterijske razrede *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Flavobacteria* in nerazvrščene bakterije, po enem letu, pa smo na isti globini identificirali 7 različnih bakterijskih razredov (slika 15, 16). Med temi so v večini predstavniki bakterijskega razreda *Gammaproteobacteria*, nekaj odstotkov pa je tudi bakterij iz razreda *Betaproteobacteria*. Prav tako se je na globini 200 metrov povečal delež bakterij iz razreda *Gammaproteobacteria*, deleža razredov *Alphaproteobacteria* in *Betaproteobacteria* pa sta ostala enaka. Na globini 200 metrov je po enem letu ocenjena tudi večja vrstna raznolikost, na globini 76 metrov pa je ta ostala nespremenjena.

Spremembe bakterijskih združb po enem letu izkoriščanja vodonosnika so pričakovane. V vodonosniku je nameščena distribucijska cev do globine 200 metrov, ki je do globine 100 metrov zaprta, od 100 do 200 metrov pa je perforirana. Zato voda v cev vstopa le od globine 100 metrov navzdol. S cevitvijo in izkoriščanjem vodonosnika se je povečal pretok vode skozi vodonosnik, prisotne pa so tudi nove površine in materiali, kamor se lahko pritrjajo bakterije. Te spremembe pomenijo stresne pogoje in nove izzive za bakterije v vodonosniku, povzročijo tudi nastanek novih niš v vodonosniku, kar privede do hitrejši rasti biofilmov (Schneiders, 2003). Predvidevamo, da so se zelo spremenile tudi pritrjene bakterijske združbe v vodonosniku, saj smo na cevi opazili tanko spolzko plast biofilma. Očitno se je v vodonosniku povečalo število bakterij, ki proizvajajo sluz in se zato hitreje ter v večjem številu pritrjajo na površine. Te sčasoma postanejo problematične, saj lahko obrastejo vse površine v vodonosniku, kar skrajša življenjsko dobo predvsem distribucijskemu sistemu, s tvorbo biofilmov spremenijo pogoje v vodonosniku, omogočijo naselitev tudi drugih neželenih bakterij in poslabšajo kakovost vode. Vpliv kontaminant, ki so v vodonosnik prišle med vrtanjem in z vstavitvijo črpalke, ter distribucijske cevi, naj bi bil zanemarljiv, saj so Pedersen in sodelavci (1997) ugotovili, da kontaminante ne vplivajo

na avtohtone bakterijske združbe in sčasoma propadejo. Da bi dobili bolj natančne podatke, v katero smer se spreminjajo mikrobnе populacije v vodonosniku, bi bilo potrebno vzorčenje na več globinah, vzorčiti pa bi morali tudi pritrjene bakterije in v daljšem časovnem obdobju.

V vodonosniku smo odkrili različne bakterijske rodove, ki so naravno prisotni v vodi, zemlji in rastlinah. Med njimi so prisotne tudi vrste, ki lahko vplivajo na organoleptične lastnosti vode, druge lahko povzročajo težave na distribucijskem sistemu, nekatere vrste so oportunistično patogene, nekaj je patogenih. V času vrtanja vodne vrtine so te vrste imele majhen delež. Spremenjeni in stresni pogoji pa bi lahko povečali njihov delež, kar bi poslabšalo kvaliteto vode in povzročilo dodatne težave na distribucijskem sistemu. Enake težave bi nastale v primerih onesnaženja vodonosnika z industrijskimi, kmetijskimi ali komunalnimi odplakami. V takem primeru bi se poleg zgoraj omenjenih bakterij povečal tudi delež bakterij, ki so vključene v bioremediacijo in smo jih odkrili v različnih taksonomskih razredih. Te bakterije, pa bi pomembno pripomogle k razgradnji neželenih snovi, ki bi prišle z onesnaženjem. Da bi pravočasno ugotovili morebitne spremembe, je potrebno redno spremljanje kemijskega in mikrobiološkega stanja vode. Zakonodaja predpisuje redno pregledovanje vod z uporabo gojitvenih tehnik, s katerimi pa ne moremo potrditi prisotnosti vseh patogenih in drugih bakterij, ki bi lahko povzročile oporečnost vode in težave v vodonosniku. Zato bi bilo v prihodnosti potrebno uporabljati tudi molekularne metode, ki bi to omogočile.

Rezultati so pokazali, da lahko potrdimo vse začetne hipoteze razen četrte, saj v našem primeru ne moremo sklepati, da poroznost kamnine vpliva na raznolikost mikrobnih združb.

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- vrstna sestava planktonskih bakterijskih združb se razlikuje od vrstne sestave pritrjenih bakterijskih združb,
- v odvisnosti od globine, s katero se spreminjajo kemijsko fizikalni parametri vode, se spreminja sestava planktonskih mikrobnih združb,
- v odvisnosti od globine, s katero se spreminjajo kemijsko fizikalni parametri vode, se spreminja sestava pritrjenih mikrobnih združb,
- raznolikost mikrobnih združb ni odvisna od poroznosti kamnine,

- raznolikost mikrobnih združb se tekom uporabe vodne vtine spreminja.

Prisotne mikrobne združbe v vodonosniku bodo tekom uporabe zagotovo povzročile obraščanje površin v vodonosniku, predvsem jeklenih cevi, kar lahko privede tudi do korozije in zamažitve filtrov distribucijskega sistema. Posledično se lahko poslabša kakovost vode, predvsem organoleptične lastnosti in mikrobiološka kakovost vode. Da bi ohranili čim bolj stabilne pogoje v vodonosniku, podaljšali življenjsko dobo in tako znižali stroške vzdrževanja, bi morali prilagoditi hitrost črpanja vode iz vodonosnika in pogosteje preverjati ter čistiti distribucijski sistem v vodonosniku.

6 POVZETEK

Podzemna voda je najkvalitetnejši vir pitne vode, saj je kemijsko, temperaturno in količinsko stabilna, ima ugodne bakteriološke lastnosti, obenem pa je poceni. Podzemno vodo najpogosteje izkoriščamo iz vodonosnikov, do katerih je potrebno zvrtni vodno vrtino. Z vrtnjem se v vodonosniku spremenijo prvotne razmere, saj se vnesejo nove bakterije, obstoječe bakterijske združbe pa se prerazporedijo. S cevitvijo vodonosnika bakterije pridobijo nove materiale in površine za pritrditve, s črpanjem vode iz vodonosnika pa se še dodatno vzpostavijo stresni pogoji za bakterije, ki se nanje različno odzovejo. Najpomembnejšo vlogo med mikroorganizmi v vodonosniku imajo bakterije, saj so v večini primerov ravno bakterije in biofilmi vzrok za spremembe in posledično oporečnost vode. Zato je poznavanje sestave in dinamike v vodonosniku zelo pomembno, saj morajo biti vodni viri stabilni, neonesnaženi in čim manj obremenjeni z mikrobnimi populacijami.

Trenutni predpisi določajo meritev fizikalno - kemijskih in mikrobioloških parametrov vode, iz katerih dobimo informacijo o primernosti vode za uporabo v gospodinjstvih. S temi informacijami ne dobimo podatkov o prisotnosti mikrobnih združb, ki lahko dolgoročno negativno vplivajo na vodno vrtino, distribucijski sistem in na kakovost vode v vodonosniku. Da bi dobili te podatke, je potrebna analiza mikrobnih populacij, ki nam pove, kakšna je obremenjenost vode z mikrobnimi populacijami, katere vrste mikrobnih populacij so prisotne, kakšna je njihova razporeditev in transport v vodonosniku ter ali so prisotni biofilmi. Na podlagi teh informacij lahko poleg ocene ustreznosti vodnega vira za uporabo predvidimo še možne spremembe, ki bi nastale kot posledica mikrobnega delovanja, predvidimo obrabo distribucijskega sistema, predvsem obraščanje z biofilmi in korozijo cevitve. Rezultati takšnih analiz nam omogočajo, da lahko predvidimo, kdaj in kako je potrebno čistiti vodno vrtino in s tem podaljšati njeno uporabo.

V naši raziskavi smo se osredotočili na identifikacijo pritrdjenih in planktonskih mikrobnih združb na posameznih globinah dolomitnega vodonosnika na Dolenjskem. Zanimala nas je taksonomska sestava pritrdjenih in planktonskih bakterijskih združb, njihova razporeditev po globinah, vpliv poroznosti kamnine na razporeditev bakterijskih združb in ali se z izkoriščanjem vodonosnika bakterijska diverzitet spreminja. Analizo mikrobnih združb smo naredili s klonskimi knjižnicami. Zaradi povečane koncentracije železa v vodonosniku

pa smo na gojiščih *Leptothrix* strains medium in Fe-EDTA agar preverjali tudi prisotnost železo oksidirajočih bakterij.

Rezultati so na mestih z večjo poroznostjo kamnine pokazali nekoliko večje koncentracije kemijskih parametrov, ki pa v nasprotju z našimi pričakovanji ne vplivajo na razporeditev mikrobnih združb v vodonosniku. Vzrok temu so lahko nizke koncentracije prisotnih snovi, pa tudi velik pretok vode v vodonosniku. Na velik pretok kažejo tudi konstantne vrednosti pH in redoks potenciala po celi globini vodonosnika.

Analiza sekvenc je pokazala, da se z globino spreminja sestava planktonskih in pritrjenih bakterijskih združb. Prav tako se vrstna sestava planktonskih bakterijskih združb razlikuje od vrstne sestave pritrjenih bakterijskih združb. V vodonosniku prevladujejo bakterije iz razredov *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*. Med pritrjenimi bakterijami ima večji delež še razred *Actinobacteria*, med planktonskimi pa razred *Clostridia* in nerazvrščene bakterije. Ostali bakterijski razredi imajo veliko manjši delež. Večina izoliranih zaporedij je sorodna sekvencam bakterij, ki so naravno prisotne v vodi, zemlji, nekatere tudi v rastlinah. Identificirali smo tudi nekaj bakterij, ki so patogene ali oportunistično patogene za ljudi, vendar imajo zelo nizek delež. Večina naštetih rodov je pomembna v primeru onesnaženja vodonosnika, saj razgrajuje različne snovi in kemikalije ter sodelujejo v procesih bioremediacije. Kljub veliki vsebnosti železa v vodonosniku železo oksidirajočih bakterij z gojitvenimi metodami nismo identificirali. Z molekularnimi metodami pa smo med pritrjenimi bakterijami identificirali rod *Pedomicrobium*, v katerega spadajo železo in mangan oksidirajoče vrste.

Ocena diverzitete in reprezentativnosti klonskih knjižnic nam kažejo, da je v vodonosniku prisotnih še več bakterijskih vrst, kot smo jih identificirali mi. To pomeni, da bi morali narediti večjo klonsko knjižnico, glede veliko število različnih identificiranih bakterijskih vrst.

Večina identificiranih rodov v vodonosniku ima predstavnike, ki so sposobni izdelave sluzi, kar jim omogoča pritrjanje na površine in formiranje biofilmov. Takšne bakterijske skupine so zelo občutljive na okoljske spremembe, saj se na vsako spremembo oziroma na vsak stresni dejavnik odzovejo s še intenzivnejšim izločanjem sluzi in hitrejšim formiranjem biofilmov. Stresni pogoji se pojavijo s samim vrtanjem vodne vrtine, vzpostavitvijo distribucijskega sistema vodonosnika in črpanjem vode iz vodonosnika, kar

sčasoma lahko privede do pritrditve teh bakterijskih predstavnikov na vse prisotne površine v vodonosniku ter obraščanje distribucijske cevi in filtrov. V biofilmih se postopoma ustvarijo anaerobne razmere, zniža se pH ter redoks potencial in nastanejo pogoji za rast anaerobnih bakterij, ki lahko privedejo do korozije distribucijskega sistema in poslabšanje organoleptičnih lastnosti vode.

Po enem letu izkoriščanja vodonosnika se je združba planktonskih bakterij na globini 80 in 200 m zelo spremenila. Najbolj se je povečal delež bakterij iz razreda *Gammaproteobacteria*, za nekaj odstotkov pa je več tudi bakterij iz razreda *Betaproteobacteria*. Na globini 200 metrov je po enem letu ocenjena tudi večja vrstna raznolikost, na globini 76 metrov pa je ta ostala nespremenjena. S cevitvijo in izkoriščanjem vodonosnika se je povečal pretok vode skozi vodonosnik, prisotne pa so tudi nove površine in materiali, kamor se lahko pritrdijo bakterije. Te spremembe so povzročile tudi hitrejšo rast biofilmov, kar smo opazili na cevi, kjer je bila tanka spolzka plast biofilma. V vodonosniku so se spremenile tudi pritrdjene bakterijske združbe v vodonosniku, saj se je povečalo število bakterij, ki proizvajajo sluz in se zato hitreje ter v večjem številu pritrdijo na površine. Te sčasoma postanejo problematične, saj lahko obrastejo vse površine v vodonosniku, kar skrajša življenjsko dobo predvsem distribucijskemu sistemu, s tvorbo biofilmov spremenijo pogoje v vodonosniku, omogočijo naselitev tudi drugih neželenih bakterij in poslabšajo kakovost vode.

Voda v vodonosniku je neoporečna in primerna za uporabo. Potrebno pa je redno spremljanje parametrov v vodonosniku, saj bodo prisotne mikrobne združbe zagotovo povzročile obraščanje površin v vodonosniku, predvsem jeklenih cevi, kar lahko privede tudi do korozije in zamažitve filtrov distribucijskega sistema. Posledično se lahko poslabša kakovost vode, predvsem organoleptične lastnosti in mikrobiološka kakovost vode. Da bi ohranili čim bolj stabilne pogoje v vodonosniku, podaljšali življenjsko dobo in tako znižali stroške vzdrževanja, bi morali prilagoditi hitrost črpanja vode iz vodonosnika in pogosto preverjati ter čistiti distribucijski sistem v vodonosniku. Poleg tega se je ponovno izkazala potreba po dopolnitvi zakonodaje z uveljavitvijo molekularnih metod pri načrtovanju vodonosnikov in spremljanju mikrobiološkega stanja voda.

7 VIRI

- Acinas S. G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V., Polz M. F. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias: Insight from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8966 – 8969.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169.
- Atlas M. R. 2004. Handbook of microbiological media. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 663 - 918.
- Bear J. 1988. Dynamics of fluids in porous media. New York, Dover Publications: 1-8.
- Bekins B.A., Godsy E.M., Warren E. 1999. Distribution of microbial physiologic types in an aquifer contaminated by crude oil. *Microbial Ecology*, 34: 263-275.
- Boivin-Jahns V., Ruimy R., Bianchi A., Daumas S., Christen R. 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 9: 3405 – 3412.
- Boyd E. S., Cummings D. E., Geesey G. G. 2007. Mineralogy influences structure and diversity of bacterial communities associated with geological substrata in a pristine aquifer. *Microbial Ecology*, 54: 170-182.
- Bowman J. P. 2005. Order VII, *Methylococcales* V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 248 - 270.
- Brauns L. A., Hudson M. C., Oliver J. D. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 9: 2651-2655.
- Brenčič M. 2008. Podzemna voda, kot vir pitne vode. Seminar: Graditev objektov na vodovarstvenih območjih. Ljubljana, Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za hidrogeologijo: 20 str.
http://www.e-net-okolje.si/eno/GVVO_Brencic_Podzemna%20voda.pdf (10. 12. 2010).
- Brenčič M., Matoz T., Ratej J. 2004. Hidrogeološko poročilo o izdelavi raziskovalno kaptažne vrtine žih-2 (Žihlava) v občini Sveti Jurij ob Ščavnici. Ljubljana, Geološki zavod Slovenije: 5-16.
- Bullitt R., Makowski L. 1995. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature*, 373: 164-167.

- Caccavo F., Das A. 2002. Adhesion of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria to Fe(III) minerals. *Geomicrobiology Journal*, 19: 161-177.
- Characklis W. G., McFeters G. A., Marshall K. C. 1990. Physiological ecology in biofilm systems. V: *Biofilms*. Characklis W. G., Marshall K. C. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 341–394.
- Chin K., Janssen P. H. 2002. Propionate formation by *Opitutus terrae* in pure culture and in mixed culture with a hydrogenotrophic methanogen and implications for carbon fluxes in anoxic rice paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2089-2092.
- Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37, Database issue: D141-D145.
- Collins M. D. 2006. The genus *Brevibacterium*. V: *The prokaryotes*. Vol. 3. 3rd ed. Dworkin M., Stanley F., Schleifer K., Stackebrandt E., Rosenberg E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media LLC: 1013 – 1019.
- Conwan M. M., Warren T. M., Fletcher M. 1991. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling*, 3: 23–34.
- Dawson P. M., Humprey A. B., Marshall K. C. 1981. Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Current Microbiology*, 6, 4: 195-199.
- Dempsey M. J. 1981. Marine bacterial fouling: a scanning electron microscope study. *Marine Biology*, 61: 305-315.
- Dinh T. H., Kuever J., Mussman M., Hassel A. W., Stratmann M., Widdel F. 2004. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature*, 427: 829-832.
- Donlan R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9: 1-10.
- Donlan R. M., Pipes W. O., Yohe T. L. 1994. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water Research*, 28, 6: 1497-1503.
- Eutushenko L. I., Takeuchi M., 2006. The family *Microbacteriaceae*. V: *The prokaryotes*. Vol. 3. 3rd ed. Dworkin M., Stanley F., Schleifer K., Stackebrandt E., Rosenberg E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media LLC: 1020 – 1098.

- Everet K., Bush R., Andersen A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 415 - 440.
- Farnleitner A. H., Wilhartitz I., Ryzinska G., Kirschner A. K., Stadler H., Burtscher M. M., Hornek R., Szewzyk U., Herndl G., Mach R. L. 2005. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, 7: 1248 -1259.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.6. Seattle, Department of Genome Sciences, University of Washington: software www.phylip.com (14.9.2010)
- Fletcher M. 1980. The question of passive versus active attachment mechanisms in non specific bacterial adhesion. V: *Microbial adhesion to surfaces*. Berkeley W., Lynch J. M., Melling J., Rutter P. R., Vincent B. (eds.). Chichester, Ellis Horwood: 197-210.
- Fletcher M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170: 2027-2030.
- Griebler C., Lueders T. 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54: 649-667.
- Griebler C., Mindl B., Slezak D., Geiger-Kaiser M. 2002. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with *in situ* sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 117-129.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Harvey R. W., Smith R. L., George L. 1984. Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 6: 1197-1202.
- Hazen T. C., Jimenez L., de Victoria G. L., Fliermans C. B. 1991. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microbial Ecology*, 16: 293-304.

- Head I. M., Saunders J. R., Pickup R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35: 1-21.
- Hirsch P., Gebers R. 2005. Genus XIV *Pedomicrobium*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.), New York, Springer-Verlag: 527-539.
- Kelly D., Wood A. P., Stackebrandt E. 2005. Genus II *Thiobacillus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 764-769.
- Kjellberg S., Beverley T. H., Marshall K. C. 1982. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 5: 1166-1172.
- Korber D.R., Lawrence J. R., Sutton B., Caldwell D. E. 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microbial Ecology*, 18: 1-19.
- Kostka J. E., Haeferle E., Viehweger R., Stucki J. W. 1999. Respiration and dissolution of iron(III)-containing clay minerals by bacteria. *Environmental Science Technology*, 33: 3127-3133.
- Kotelnikova S., Pedersen K. 1997. Evidence for methanogenic *Archaea* and homoacetogenic bacteria in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiology Reviews*, 20: 339-349.
- Lawrence J. R., Caldwell E. D. 1987. Behavior of bacterial stream populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial Ecology*, 14: 15-27.
- Lehman M. R., Colwell F. S., Bala G, A. 2001a. Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 2799-2809.
- Lehman M. R., Roberto F. F., Earley D., Bruhn D. F., Brink S. E., O'Connel S. P., Delwiche M. E., Colwell F. S. 2001b. Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5: 2095-2106.
- Li B., Logan B. L. 2004. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36: 81-90.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 553-555.

- Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34: 265-276.
- Marshall K. C., Stouth R., Mitchell R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68: 337-348.
- Marshall K. C. 1976. *Interfaces in microbial ecology*. Cambridge, Harvard University Press: 156 str.
- Marshall K. C. 2006. Planktonic versus sessile life of prokaryotes. V: *The prokaryotes*. Vol. 2. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media LLC: 3-15.
- Moller S., Sternberg C., Andersen J. B., Christensen B. B., Ramos J. L., Givskov M., Molin S. 1998. *In situ* gene expression in mixed-culture biofilms: Evidence of metabolic interactions between community members. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2: 721-732.
- O'toole G. A., Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30: 259-304.
- Palleroni N. 2005a. Genus I. *Burkholderia*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 575-600.
- Palleroni N. J. 2005b. Genus I, *Pseudomonas*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 323-442.
- Pedersen K., Hallbeck L., Arlinger J., Erlandson A. C., Jahromi N. 1997. Investigation of the potential for microbial contamination of deep granitic aquifers during drilling using 16S rRNA gene sequencing and culturing methods. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 179-192.
- Pravilnik o pitni vodi 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 19: 2155 – 2166.
- Rijnaarts H. H., Norde W., Bouwer E. J., Lyklema J., Zehnder A. 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 10: 3255–3265.

- Rogers J. R., Bennet P. C., Choi W. J. 1998. Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogist*, 83: 1532–1540.
- Rutter P. R., Vincent B. 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. V: *Microbial adhesion to surfaces*. Berkeley R. C. W., Lynch J. M., Melling J., Rutter P. R., Vincent B. (eds.). Chichester, Ellis Horwood: 79-93.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 50-68.
- Schloss P. 2008. Mothur. Ann Arbor, Department of microbiology and imunology, University of Michigan: software
www.mothur.org (14.9.2010).
- Schneiders J. H. 2003. Chemical cleaning disinfection and decontamination of water wells. Saint Paul, Johnson Screens: 227 str.
- Stroes-Gascoyne S., Schippers A., Schwyn B., Poulain S., Sergeant C., Simonoff M., Le Marrec C., Altmann S., Nagaoka T., Maucclair L., McKenzie J., Daumas S., Vinsot A., Beaucaire C., Matray J.-M. 2007. Microbial community analysis of Opalinus Clay drill core samples from the Mont Terri underground research laboratory, Switzerland. *Geomicrobiology Journal*, 24: 1-17.
- Szevzyk U., Schink B. 1988. Surface colonization by and life cycle of *Pelobacter acidigallici* studied in a continuous flow microchamber. *Journal of General Microbiology*, 134: 183-190.
- Towner K. 2006. The Genus *Acinetobacter*. V: *The prokaryotes*. Vol. 6. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media, LLC: 746 – 758.
- Vancanneyt M., Segers P., Abraham W. De Vos P. 2005. Genus III *Brevundimonas*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 527-539.
- Van Spanning R., Stouthamer A. H., Baker S. C., Van Verseveld H. W. 2005. Genus XII *Paracoccus*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 197-204.
- Watnick P., Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 10: 2675-2679.
- Ward N., Staley J., Fuerst J., Giovanoni S., Schlesner H., Stackebrand E. 2006. The order *Planctomycetales*. V: *The prokaryotes*, vol. 7. 3rd ed. Dworkin M., Stanley F., Schleifer

K., Stackebrandt E., Rosenberg E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media LLC: 757 – 793.

Willems A., Gillis M. 2005. Genus I, *Comamonas*, Genus II, *Acidovorax*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 689-703.

Williams V., Fletcher M. 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1004-1009.

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51, 2: 221-271.

Yabuuchi E., Kawamura Y., Ezaki T. 2005. Genus VII *Ralstonia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D. J., Krieg N. R., Holt J. G. (eds.). New York, Springer-Verlag: 609 - 620.

ZAHVALA

Inštitutu za fizikalno biologijo d.o.o., ki mi je omogočil izdelavo te naloge.

Roku Kopinču, ki me je strokovno in potrpežljivo vodil skozi praktično delo.

Dr. Alešu Lapanje za usmeritve pri pisanju diplomske naloge.

Fani Oven za vso pomoč in nasvete, ki so mi zelo olajšali laboratorijsko delo.

Doc. Dr. Blažu Stresu za strokovno in hitro recenzijo diplomske naloge.

Prof. Dr. Romani Marinšek Logar za svobodo pri izbiri teme diplomske naloge.

Moji družini za vso podporo v času mojega študija.

Vsem kolegom in kolegicam za vse lepe, zabavne, spodbudne trenutke, brez katerih bi bila študentska leta bolj dolgočasna.