

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Luka LIPOGLAVŠEK

**MOLEKULARNO BIOLOŠKI OPIS SESTAVE BAKTERIJSKEGA
DELA MIKROBNE ZDRUŽBE TAL VISOKE HIMALAJE V
OBMOČJU LEDENIKA KANCHENJUNGA IN VPLIV DEJAVNIKOV
OKOLJA NA NJENO SESTAVO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DESCRIPTION OF BACTERIAL COMMUNITY IN CENTRAL
HIMALAYA SOIL FROM KANCHENJUNGA GLACIER AREA WITH
MOLECULAR TOOLS AND ENVIROMENTAL FACTORS
INFLUENCING ITS COMPOSITION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 24.6.2008 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin

Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo in Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin

Član: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Član: prof. dr. David Stopar

Datum zagovora: 14.3. 2013

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Luka Lipoglavšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 579:577.(043.3)=163.6
KG mikrobiologija/tla/Himalaja/bakterije/podnebnne spremembe/molekularna biologija/metode/TRFLP/16S rRNA
KK AGRIS P01
AV LIPOGLAVŠEK, Luka, univ. dipl. mikrobiol., mag. znanosti
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine, področje mikrobiologije
LI 2012
IN MOLEKULARNO BIOLOŠKI OPIS SESTAVE BAKTERIJSKEGA DELA MIKROBNE ZDRUŽBE TAL VISOKE HIMALAJE V OBMOČJU LEDENIKA KANCHENJUNGA IN VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA NJENO SESTAVO
TD Doktorska disertacija
OP XI, 133 str., 5 pregl., 39 sl., 2 pril., 156 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Opisali smo mikrobno združbo himalajskih tal s pobočja nad ledenikom Kanchenjunga z nadmorske višine med 5000 in 6000 m. Uporabili smo molekularno biološke metode, ki ne vključujejo gojenja. Vzorci tal so bili odvzeti na različnih višinah in v različnih časih. Iz vzorcev tal smo osamili DNA in s PCR pomnožili odsek genov za 16S rRNA. Pregled strukture mikrobne združbe smo izvedli z metodo polimorfizma dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (TRFLP). Primerjali smo učinkovitost treh restrikcijskih endonukleaz in dveh odsekov 16S rRNA pri odkrivanju razlik v strukturi mikrobne združbe Z multivariatnimi statističnimi metodami smo iskali dejavnike okolja, ki vplivajo na sestavo mikrobne združbe. V dveh vzorcih tal smo mikrobno združbo podrobneje opisali še s klonskima knjižnicama 16S rRNA in ju primerjali z drugimi objavljenimi knjižnicami hladnih talnih okolij. Iz obeh odsekov 16S rRNA smo z analizo TRFLP dobili podobno informacijo o razlikah v strukturi mikrobne združbe. Prav tako smo podobne razlike ugotovili z različnimi endonukleazami. Združeni rezultat treh restrikcij daljšega odseka je pokazal, da so mikrobne združbe na različnih nadmorskih višinah različne in da razlika v strukturi mikrobne združbe narašča z razliko v nadmorski višini. Združba na površini ledenika se oblikuje na drugačen način kot v tleh na pobočju. Poleg nadmorske višine na sestavo značilno vplivata še pH tal in količina skupnega dušika v tleh. V času se je združba na 5200 m bolj spreminjala, kot združba na 6000 m. Klonski knjižnici s teh dveh višin sta različni, v grobi filogenetski sestavi pa podobni drugim knjižnicam iz tal. Večjih podobnosti z drugimi hladnimi talnimi okolji nismo odkrili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579:577.(043.3)=163.6
CX microbiology/soil/Himalaya/bacteria/climate changes/molecular biology/methods/TRFLP/16S rRNA
CC AGRIS P01
AU LIPOGLAVŠEK, Luka
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University Postgraduate Study Programme in Biomedicine, Field: Microbiology
PY 2012
TI DESCRIPTION OF BACTERIAL COMMUNITY IN CENTRAL HIMALAYA SOIL FROM KANCHENJUNGA GLACIER AREA WITH MOLECULAR TOOLS AND ENVIROMENTAL FACTORS INFLUENCING ITS COMPOSITION
DT Doctoral Dissertation
NO XI, 133 p., 5 tab., 39 fig., 2 ann., 156 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the present work the microbial communities in soils from Himalayan soils obtained from the slope above the Kanchenjunga glacier at the altitudes between 5000 and 6000 m are described. The molecular biology methods that do not involve cultivation were used in this study. Soil samples from different altitudes and at different time intervals were sampled. The DNA was isolated from the soil samples and the 16S rRNA genes were amplified with PCR. To study the composition of microbial communities the terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) was used. In search for the differences in microbial communities the efficiency of three restriction endonucleases and two sections of the 16S rRNA were compared. In order to identify the environmental factors that influence the composition of microbial communities the multivariate statistical methods were used. Microbial communities from two samples of soil were described in detail also by 16S rRNA gene libraries and compared with other published libraries of cold soil environments. Both sections of 16S rRNA analyzed with TRFLP gave similar information about the differences in microbial communities, with more information gained from a longer segment. All three endonucleases also gave similar results. The overall result of three restrictions of the longer section showed that the communities at different altitudes are different. Furthermore, the difference in the microbial communities is larger with increasing altitude difference. Community on the surface of the glacier is formed in a different way than in the soil on the slope. In addition to the elevation impact, microbial community is significantly influenced by soil pH and total nitrogen. Microbial community structure at 5200 m varied more than at the higher altitude (6000 m) in different time periods. Gene libraries from these two heights are different although the rough phylogenetic composition is similar to other libraries from the soil. However, high similarity with other cold environments was not detected.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROBNA ZDRUŽBA GOLIH TAL V VISOKOGORJU	3
2.2 DRUGA VISOKOGORSKA TALNA OKOLJA V HIMALAJI	6
2.3 MIKROBNA ZDRUŽBA V TLEH ANTARKTIČNIH SUHIH DOLIN	7
2.4 MIKROBNA ZDRUŽBA TAL OB UMIKAJOČIH LEDENIKIH	9
2.5 MIKROBNA ZDRUŽBA VISOKOGORSKIH, ARKTIČNIH IN ANTARKTIČNIH TAL PORASLIH Z VEGETACIJO	10
2.6 OBSEŽNEJŠE RAZISKAVE MIKROBNE ZDRUŽBE TAL V ZMERNIH PODNEBNIH RAZMERAH	13
2.7 METODA TRFLP	17
3 MATERIAL IN METODE	28
3.1 OPIS KRAJA IN NAČINA VZORČENJA	28
3.2 IZDELAVA MOLEKULARNO BIOLOŠKEGA ODTISA MIKROBNE ZDRUŽBE Z METODO TRFLP	29
3.2.1 Shema laboratorijske obdelave vzorcev	29
3.2.2 Osamitev mikrobne DNA iz tal	30
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	30
3.2.4 Cepitev produktov PCR z restrikcijskimi endonukleazami in kapilarna elektroforeza	31
3.2.5 Obdelava rezultatov kapilarne elektroforeze in predstavitev razlik med vzorci	32
3.3 PRIMERJAVA TRFLP ZAČETNEGA DELA GENA ZA 16S rRNA S TRFLP VARIABILNE REGIJE 4 (V4)	32
3.4 VPLIV OKOLJA NA MIKROBNO ZDRUŽBO	33
3.4.1 Fizikalne in kemijske analize tal	33
3.4.2 Obdelava podatkov TRFLP in statistična analiza	34
3.5 GENSKI KNJIŽNICI	35
3.5.1 Obdelava sekvenc 16S rRNA	35
3.5.2 Filogenetska uvrstitev sekvenc in mikrobna pestrost	36
3.5.3 Primerjava pridobljenih knjižnic s knjižnicami, ki so vključevale podobne sekvence in knjižnicami iz podobnih okolij	37

4	REZULTATI	38
4.1	MOLEKULARNO BIOLOŠKI PROFIL MIKROBNE ZDRUŽBE PREUČEVANIH TAL	38
4.1.1	Mikrobna združba višinskega profila pobočja	38
4.1.2	Spremembe mikrobne združbe skozi čas	56
4.2	PRIMERJAVA PROFILOV TRFLP PRIDOBLENJIH IZ RAZLIČNIH ODSEKOV GENA ZA 16S rRNA	63
4.3	VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA OBLIKOVANJE MIKROBNE ZDRUŽBE	74
4.4	KLONSKI KNJIŽNICI GENOV ZA 16S rRNA	81
4.5	PRIMERJAVA KLONSKIH KNJIŽNIC IZ HIMALAJE S PODOBNIMI KNJIŽNICAMI	84
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	90
5.1	RAZPRAVA	90
5.1.1	Osamitev DNA in pomnoževanje gena za 16S rRNA	90
5.1.2	Restriksijska cepitev, kapilarna elektroforeza, obdelava podatkov in način predstavitve	94
5.1.2.1	Obdelava podatkov in način predstavitve	95
5.1.2.2	Metodologija iskanja vplivov okolja na mikrobno združbo	96
5.1.3	Ali informacija v variabilni regiji 4 gena za 16S rRNA (V4) odraža razlike v mikrobni združbi opažene z analizo začetnega dela gena, ki vsebuje variabilne regije 1, 2, in 3 ?	97
5.1.4	Kako ekstremna je mikrobna združba na ekstremni nadmorski višini?	99
5.1.4.1	Pregled sestave mikrobne združbe v vzorcih tal z nadmorske višine 5200 in 6000 m ugotovljene s klonskimi knjižnicami genov za 16S rRNA	99
5.1.4.2	Vpliv dejavnikov okolja na mikrobno združbo in primerjava s podobnimi knjižnicami	104
5.1.4.3	Kakšen delež mikrobne združbe smo spoznali	110
5.1.5	Spreminjanje združb v času	111
5.2	SKLEPI	114
6	POVZETEK (SUMMARY)	116
6.1	POVZETEK	116
6.2	SUMMARY	120
7	VIRI	124
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje dveh delov gena za 16S rRNA	31
Preglednica 2: Izmerjeni dejavniki okolja s standardnim odklonom (trimeritve)	75
Preglednica 3: Vrednosti indeksov mikrobne pestrosti za klonski knjižnici s 5200 m in 6000 m nm.	84
Preglednica 4: Objave v katerih so opisane klonske knjižnice, ki smo jih primerjali s himalajskima knjižnicama.	86
Preglednica 5: Klonske knjižnice gena za 16S rRNA, ki so najbolj podobne himalajskim knjižnicam in smo jih prikazali na slikah 38 in 39.	87

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Agarozna gelska elektroforeza DNA osamljene iz osmih vzorcev himalajskih tal iz leta 2002	39
Slika 2: Vzorci tal v postopku osamitve DNA	40
Slika 3: Količina in čistost DNA, ki smo jo osamili iz talnih himalajskih vzorcev	41
Slika 4: 916bp dolg produkt pomnoževanja začetnega dela gena za 16S rRNA iz skupne mikrobne DNA	42
Slika 5: Pomnoževanje 916bp gena za 16S rRNA iz skupne mikrobne DNA s prilagojeno koncentracijo DNA (2-10 krat razredčena)	43
Slika 6: Cepitev produktov PCR z restriksijsko endonukleazo <i>MspI</i> .	44
Slika 7: Analizirani elektroforegrami kapilarne elektroforeze (Peak Scanner Software, AB) treh naključnih profilov TRFLP	45
Slika 8: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/ <i>BsuRI</i> vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.	46
Slika 9: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/ <i>HhaI</i> vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm	48
Slika 10: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/ <i>MspI</i> vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm	49
Slika 11: Dendrogram profilov TRFLP vseh treh cepitev mikrobne združbe vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.	52
Slika 12: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/ <i>BsuRI</i>	53
Slika 13: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/ <i>HhaI</i>	54
Slika 14: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/ <i>MspI</i>	54
Slika 15: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP in vzorci vertikalnega profila iz leta 2002.	55
Slika 16: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/ <i>BsuRI</i> na 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006	58
Slika 17: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/ <i>HhaI</i> na 5200 in 6000m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006	59
Slika 18: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/ <i>MspI</i> na 5200 in 6000m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006	60
Slika 19: Dendrogram profilov TRFLP mikrobne združbe vseh treh cepitev vzorcev s 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006	61
Slika 20: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh TRFLP eksperimentov z vzorci z dveh nadmorskih višin iz let 2002, 2005 in 2006	62
Slika 21: 240bp dolg produkt pomnoževanja regije V4 gena za 16S rRNA	64
Slika 22: Cepitev produktov PCR regije V4 16S rRNA z restriksijskimi endonukleazami <i>BsuRI</i> , <i>HhaI</i> in <i>MspI</i>	65

	str.
Slika 23: Analizirani elektroferogrami kapilarne elektroforeze (Peak Scanner Software, AB) treh naključno izbranih profilov TRFLP variabilne regije 4	66
Slika 24: Dendrogram TRFLP začetnega, 918bp dolgega dela gena za 16S rRNA vzorcev s 6000 m nm odvzetih v letih 2002, 2005 in 2006 in dveh nehimalajskih vzorcev	67
Slika 25: Dendrogram TRFLP 240bp dolgega dela gena 16S rRNA vzorcev s 6000m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006	68
Slika 26: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP z začetnim, 918bp dolgim delom gena za 16S rRNA.	69
Slika 27: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP z 240bp dolgo regijo V4 gena za 16S rRNA	69
Slika 28: Matrika skladnosti (Congruence) posameznih in združenih TRFLP eksperimentov ter pripadajoč dendrogram UPGMA	70
Slika 29: Skladnost eksperimenta 918bp_ <i>Bsu</i> RI in povprečja treh eksperimentov 918bp.	71
Slika 30: Skladnost eksperimentov 240bp_ <i>Hha</i> I in 240bp_ <i>Bsu</i> RI	72
Slika 31: Skladnost eksperimentov 918bp_ <i>Bsu</i> RI in 240bp_ <i>Bsu</i> RI.	73
Slika 32: Skladnost združenih eksperimentov 918bp in 240bp	74
Slika 33: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh TRFLP eksperimentov z vzorci vertikalnega profila iz leta 2002	77
Slika 34: Kanonična korespondenčna analiza (CCA) mikrobne združbe med 5200 m in 6000 m nm	79
Slika 35: Kanonična korespondenčna analiza (CCA) mikrobne združbe med 5200 in 6000 m nm, z zaporedno vključenimi statistično značilni prispevki izmerjenih dejavnikov okolja	80
Slika 36: Uvrstitev sekvenc 16S rRNA v veljavna in kandidatna filogenetska debla s filogenetskimi drevesi	82
Slika 37: Krivulje rarefakcije obeh knjižnic	83
Slika 38: Knjižnice iz literature, ki so najbolj podobne knjižnici s 5200 m nm	88
Slika 39: Knjižnice iz literature, ki so najbolj podobne knjižnici s 6000 m nm	89

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Shema opravljenih eksperimentov
- Priloga B: Filogenetsko drevo vseh pridobljenih sekvenc

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNA	molekula rRNA, ki se nahaja v manjši podenoti ribosoma
A_{xyz}	absorbanca pri izbrani valovni dolžini xyz nm
b	baza
bp	bazni par
CCA	kanonična korespondenčna analiza
DGGE	gelska elektroforeza v gradientu denaturanta
DNA	deoksiribonukleinska kislina
kb	kilo baza
OTU	operacijska taksonomska enota, filotip
PCO	analiza glavnih koordinat
PCR	verižna reakcija s polimerazo DNA
PKK	Pearsonov koeficient korelacije
RDP	spletni servis in baza sekvenc 16S rRNA (Ribosomal Database Project)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
S	Svedbergov koeficient sedimentacije
TRFLP	polimorfizem dolžine končnih restrikcijskih fragmentov
UPGMA	metoda neutežene aritmetične sredine

1 UVOD

Zgornja plast tal je heterogen ekosistem, ki zaradi velike površine delcev na enoto prostornine predstavlja velik potencial za naselitev mikroorganizmov. Pestrost mikrobnega dela tega ekosistema sodi po ocenah raziskovalcev med največje na Zemlji. Mikrobi v tleh imajo pomembno funkcijo v globalnem kroženju hranil. Še poseben interes za raziskovanje talnega ekosistema se je pojavil v zadnjih letih zaradi višanja atmosferskih koncentracij toplogrednih plinov in globalnega segrevanja ter vpliva teh dveh dejavnikov na procese v tleh, v prvi vrsti na kroženje ogljika. Najbolj očitne spremembe ob globalnem segrevanju so vidne prav v hladnih okoljih na Zemlji. Zaradi precejšnjih količin deponiranega organskega ogljika v hladnih talnih okoljih, vpliva razumevanje dogajanja v tleh tudi na napovedi globalnega segrevanja in sprememb na Zemlji v prihodnje.

Gram tal lahko vsebuje do 10^{10} mikrobnih celic. Ugotavljanje sestave mikrobnih združb, ki tla naseljujejo, pa še vedno predstavlja znanstveni izziv. S klasičnim mikrobiološkim gojitvenim pristopom smo sposobni iz grama tal osamiti le nekaj 10 vrst. Na podlagi zbranih molekularno bioloških podatkov danes predpostavljamo, da je v vsakem gramu tal od nekaj 1000 do nekaj 10000 bakterijskih vrst. Nekatere projekcije predpostavljajo, da je v gramu tal do 10^7 različnih bakterijskih genomov.

Čeprav so raziskovalci opisali že vrsto težav, ki spremljajo uporabo molekularno biološkega pristopa, je ta odprl nov pogled v mikrobno pestrost. Zaradi evolucijske ohranjenosti in hkratne vsebnosti variabilnih regij je postala molekula RNA manjše podenote ribosoma (16S rRNA) najpomembnejši molekularni označevalec. Preučevanje velikega števila mikrobnih združb z ugotavljanjem in primerjalno analizo sekvenc 16S rRNA v vzorcu je bilo v času snovanja in izvedbe te raziskave časovno ali stroškovno nedosegljivo. Za spremljanje sprememb v mikrobnih združbah, še posebej pa za spremljanje vpliva okolja na mikrobne združbe, je ključna sposobnost analize velikega števila vzorcev, kar omogoča tudi statistično analizo. Raziskovalci so v ta namen razvili več metod za izdelavo odtisa mikrobne združbe (angl: fingerprinting). Ena takih je

polimorfizem dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (TRFLP), ki lahko združi lastnosti 16S rRNA in relativno enostavne in ponovljive obdelave večjega števila vzorcev.

Okolje, kjer pričakujemo večje spremembe v tleh ob ogrevanju ozračja je tudi Himalaja. Himalaja je najvišje kopno na Zemlji z vrhovi preko 8000 m in s tem v marsičem edinstveno okolje. Razprostira se v dolžini 2400 km v smeri vzhod-zahod in je široko med 150 in 400 km. Gorstvo je sestavljeno iz treh gorskih verig, najbolj severna od teh je znana kot notranja, osrednja ali Velika Himalaja. Območje vzorčenja za potrebe tega dela, se nahaja na skrajnem vzhodnem delu Nepala, v območju ledenika Kanchenjunga (zapisano lahko tudi Kangčengdzenga), zahodno od istoimenskega vrha (8586 m), znotraj naravnega rezervata. Raziskovalci so na tem območju v zadnjih letih dokumentirali spremembe v zaledenosti in vegetaciji. Okolje je specifično tudi zato, ker zaradi bližine Bengalskega zaliva poletni monsun tu povzroči več padavin kot drugje v Himalaji. Predvidevamo, da direktnega vpliva ljudi na tem območju ni, zaradi oddaljenosti najbližjih naselij pa predvidevamo, da je lokalni vpliv človeka preko atmosfere zelo majhen in je zato večina sprememb v obliki spremenjenega vnosa hranil za mikrobe in polutantov globalne narave.

Te raziskave smo se lotili zaradi kombinacije svojevrstnega, še neraziskanega in neokrnjenega okolja, obsega vzorčenja, ki zajema vertikalne in horizontalne preseke terena in hkrati še časovno komponento. V vzorcih smo pričakovali relativno enostavne gradientne okoljskih dejavnikov in z njimi povezane spremembe mikrobne združbe. Vzorci so tako služili tudi kot modelni ekosistem za ugotavljanje metodoloških zmožnosti in omejitev pri raziskavah mikrobne združbe v okolju. Že na tem mestu bi se rad zahvalil doc.dr. Blažu Stresu, ki je prispeval opisane vzorce, odvzete na več alpinističnih odpravah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROBNA ZDRUŽBA GOLIH TAL V VISOKOGORJU

Območje nad mejo kjer še uspevajo rastline in pod mejo celoletnega snega je slabo raziskano. Dolgo je veljalo prepričanje, da tam ni življenja, oziroma je vse zaznana organska snov tja prinesena z vetrom iz nižjih nadmorskih višin. V zadnjih letih smo priča prvim študijam, ki kažejo da tudi v tem okolju uspeva pestra mikrobna združba (Costello in sod., 2009). Še posebno ekstremna okolja predstavljajo visoka gorstva v suhih območjih blizu tropov (Andi, Himalaja), kjer meji vegetacije in večnega snega segata visoko in so ta območja med 4500 m in 6000 m nadmorske višine. V Nepalju zavzemajo okoli 6% vsega ozemlja. V Skalnem gorovju (ZDA) in Alpah, ki sta dlje od ekvatorja in kjer je padavin več, so ta območja na nižjih nadmorskih višinah. Podobno ekstremno okolje predstavljajo še puščave na Antarktiki. Tla v hladnih okoljih in visokih nadmorskih višinah so predmet raziskav tudi v povezavi z nastajanjem tal za umikajočimi ledeniki. Območje vzorčenja za to delo je segalo od najvišjih golih tal do območja, ki ga naseljujejo prve rastline. Visokogorski travniki so bolj raziskani zlasti v bolj dostopnih območjih Alp in Skalnega gorovja, medtem ko so bili prvi podatki o mikrobni pestrosti v golih tleh najvišjih gorstev, objavljeni v času ko je potekala naša raziskava.

King in sod. (2008) so preučevali mikrobno aktivnost golih tal v Andih in Skalnem gorovju. Našli so več mikrobne biomase, kot predhodne raziskave v podobnem okolju (Ley in sod., 2004), vendar še vedno manj kot jo je v z rastlinami poraslih tleh. Na različnih lokacijah so pokazali, da je količina mikrobne biomase sorazmerna s količino vode v tleh. Hkrati pa so tudi ugotovili, da je v višjih in bolj suhih tleh v Peruju več mikrobne biomase kot v Skalnem gorovju.

Costello in sod. (2009) so opisali pestrost tal na pobočju vulkana v Peruju med 5200 m in 5800 m nad morjem. Mesto vzorčenja na 5200 m je glede na lego pod grebenom podobno mestu vzorčenja s 6000 m iz našega dela. Najvišje so vzorčili tla na višini 5800 m v bližini fumarole. V vzorcu z grebena so pridobili 120 sekvenc klonske knjižnice 16S rRNA. Predvidevajo, da je vsebnost vode v tem vzorcu nižja od meje, ki še omogoča fotosintezo.

Prevladujejo sekvence bakterij iz debla *Actinobacteria* s 33%, sledijo pa *Acidobacteria* 23%, *Bacteroidetes* 15%, *Verrucomicrobia* 13% in *Chloroflexi* 5%. Predvidevali so, da so gonilo te združbe vetrni nanosi. Iz vzorca s 5800 m v bližini fumarole, kjer pa ni bilo več mikrobne prevleke, kot v neposredni bližini fumarole, so pridobili 105 sekvenc, največ je bilo iz bakterijskih debel *Acidobacteria* 28%, *Cyanobacteria* 11% , *Chloroflexi* 9% in razreda *Alphaproteobacteria* 13%. Ta tla vsebujejo več vode in organske snovi in avtorji predvidevajo da prihaja do fotoavtotrofije.

Freeman in sod. (2009) so preučevali fotoavtotrofe v golih tleh nad 3600 m v Skalnem gorovju. Zaznali so odvzem CO₂ iz atmosfere in našli združbo mikrobnih fotoavtotrofov, tako prokariontskih kot evkariontskih. Med bakterijskimi so se osredotočili na tiste iz debel *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi* in *Proteobacteria*. Na treh lokacijah so vzorčili sloj tal do globine 2 cm in sloj od 2 cm do 4 cm. Sekvenc 16S rRNA fototrofnih proteobakterij v skupnem naboru več kot tisoč sekvenc niso zaznali, zaznali so le eno sekvenco klorobijev. Prevladovale so sekvence cianobakterij in kloroflekov. Cianobakterije so prevladovale v vrhnji plasti, medtem ko so bile sekvence kloroflekov enakomerneje zastopane v obeh globinah. Iz ocenjene količine z vetrom prinesenega ogljika in izmerjene fotoavtotrofije so sklepali, da vetrni nanosi niso glavni vir ogljika. Predvidevali so, da večino privzema CO₂ opravijo cianobakterije in alge. Čeprav so bile nekatere gruče kloroflekov bolj zastopane v vrhnji plasti, njihova vloga ni povsem jasna, zaradi zelo velike fiziološke pestrosti kloroflekov. Med cianobakterijami so lahko največ sekvenc uvrstili v filamentozna rodova *Microcoleus* in *Phormidium*, ki sta značilna za biološke skorje tal v najrazličnejših okoljih.

Schmidt in sod. (2009) so preučevali gola tla na višini med 5000 in 5400 m v Andih (Peru). Na najvišji lokaciji so opisali bakterijski združbo z 78 sekvencami. Kar 72% so jih spoznali kot cianobakterijske sekvence, 12% je bilo betaproteobakterijskih in 8% bakteroidetskih. Večino cianobakterij sta tvorili dve gruči, ena iz redu *Chroococcales* in druga iz redu *Nostocales*. Predvsem iz sestave združbe so sklepali, da gre za aktivno bakterijsko združbo, katere glavna posebnost mora biti prilagoditev na velika dnevna nihanja temperature. Predvidevali so, da je hitrost ohlajanja pod temperaturo 0°C glavna omejitev za preživetje mikrobov. Z izmerjeno hitrostjo ohlajanja 1,8°C/h so ta tla ena

najbolj izpostavljenih do sedaj opisanih tal. V tleh s hitrostjo ohlajanja nad 1,4°C/h so pokazali (Lipson in sod., 2000), da je preživetje mikrobov močno zmanjšano.

King in sod. (2010) so opisali visokogorska (med 4800 m in 5400 m nm) gola in porasla tla v dveh regijah vzhodneje od območja Kanchenjunge (Anapurna in Everest). Našli so nižje vrednosti mikrobne ogeljike kot v do tedaj opisanih tleh. Vzorčili so jeseni, ko je klima suha, ni vpliva lokalnih padavin in snežna meja višje. Izmerili so dnevna nihanja temperature, ki se je na površini gibala med -7°C in 30°C, na globini štirih centimetrov pa med -3°C in 17°C. Vzorčili so na dveh različnih kamninskih podlagah, granitu in skrilavcu. Ugotovili so, da je mikrobna biomasa povezana s kapaciteto zadrževanja vode, višja kapaciteta in mikrobna biomasa pa sta predvsem posledica naselitve rastlin. Glede kamninske podlage so ugotovili drugačen trend kot v Andih in Skalnem gorovju, kjer je bila biomasa večja v tleh na skrilavcu, v Himalaji pa je bilo več biomase na granitnih tleh. V območju z granitno podlago je bilo tudi več padavin, medtem ko se kapaciteti zadrževanja vode nista značilno razlikovali.

Schmidt in sod. (2011) so raziskali sestavo fototrofne mikrobne združbe v suhih dolinah v Himalaji. Vzorčili so nad mejo vegetacije na nadmorski višini med 5400 in 5600 m nm v območju Anapurne in Daulagirija. Predvsem jih je zanimala filogenetska povezanost Himalajskih fototrofov in fototrofov iz Antarktičnih suhih dolin. Količina mikrobne biomase je bila malo nižja kot količina mikrobne biomase v tleh suhih antarktičnih dolin. Količina vode v tleh je bila med 1% in 1,5%, kar je zelo podobno kot na Antarktiki. Pestrost so opisali s klonsko knjižnico s 137 sekvencami cianobakterij. Kar 54% vseh cianobakterijskih sekvenc so uvrstili v skupino *Microcoleus vaginatus*, ki so jo kot številno, odkrili tudi že v golih tleh v Andih in v Skalnem gorovju, pa tudi v drugih hladnih okoljih v gorah, na Arktiki in Antarktiki. Odkrili so večjo genetsko podobnost med sekvencami geografsko bližjih vzorcev kot med sekvencami iz geografsko oddaljenih vzorcev. Vendar je bila ta razlika v genetski razdalji mnogo manjša, kot pri najštevilčnejši skupini evkariontskih alg. Predvidevajo, da zaradi razširjenosti cianobakterije *M. vaginatus*, ki je prisotna tudi v toplih puščavah, ne prihaja do take osamitve z razdaljo kot v primeru alg, ki so vezane samo na hladno okolje.

2.2 DRUGA VISOKOGORSKA TALNA OKOLJA V HIMALAJI

Raziskovalci so opisali bakterijsko združbo tal iz okolice ledeniškega jezera v vzhodni Himalaji na nadmorski višini 5029 m (Pradhan in sod., 2010). Vzorčili so tla na dveh mestih v neposredni bližini (1 m) jezera, ki je približno 100 m od konice ledenika in s površine ledenika. Vrhnjega centimetra tal niso vključili v vzorec. Iz vzorcev so pridobili 302, 311 in 185 sekvenc 16S rRNA, ki so jih na podlagi kriterija 97% podobnosti uvrstili v 171, 183 in 3 filotipe. V talnih vzorcih iz okolice jezera so največ sekvenc uvrstili v naslednja filogenetska debla: *Proteobacteria* (42,7% in 23,2%), *Actinobacteria* (10,6% in 32,8%), *Acidobacteria* (17,2% in 13,0%), *Chloroflexi* (8,6% in 12,2%) in *Bacteroidetes* (10,6% in 6,4%). Na površini ledenika pa so zaznali le dve debli in sicer *Actinobacteria* (86,5%) in *Firmicutes* (13,5%).

Rehakova in sod. (2011) so opisali fototrofno združbo v tleh na nadmorski višini med 3700 in 5970 m v Indiji, na severovzhodnem delu province Ladak. Mikroskopsko so identificirali cianobakterije in enocelične alge ter iskali dejavnike okolja, ki vplivajo na njihovo prisotnost v tleh. Vzorčili so na štirih lokacijah, na vsaki so vzorčili tla v višinskem gradientu, ki je pokrival okolja od step in polpuščav, visokogorskih travnikov, melišč do golih podledeniških tal. Fototrofe so našli v vseh vzorcih, njihova koncentracija pa je nihala med 10^3 in 10^7 celic/g. Cianobakterije se prevladovale in so zavzemale med 70,9% in 98,6% volumna fototrofov. Prevladujoč delež cianobakterij med fototrofi so pripisali predvsem visokemu pH v tleh (8,1 do 8,9), zaščiti pred UV sevanjem in zmožnosti uporabe HCO_3^- kot vira ogljika. Opredelili so 14 različnih morfotipov. V tleh z nižjih nadmorskih višin je prevladoval red *Oscillatiriales*, višje pa red *Nostocales*. Opazen delež volumna je predstavljal še red *Chroococcales*, predvsem tam, kjer je prevladoval red *Nostocales*. Na nižjih nadmorskih višinah, kjer je večino volumna predstavljal red *Oscillatiriales* so prevladovale cianobakterije iz vrste *Microcoleus vaginatus* in rodu *Phormidium*. *M. vaginatus* je predstavljal največji delež v tleh travnikov, višje pa je bil skoraj odsoten. Volumen te cianobakterijske vrste je pozitivno koreliral s količino prisotne organske snovi. Na preučevano združbo fototrofov so najbolj vplivali: geografska lokacija, nadmorska višina in vegetacija, ki so skupaj pojasnili 36% variabilnosti.

2.3 MIKROBNA ZDRUŽBA V TLEH ANTARKTIČNIH SUHIH DOLIN

Rezultate mikrobioloških raziskav antarktičnih puščav so povzeli Cary in sod. (2010). Suhe antarktične doline niso pokrite z ledom, ker jih gore ločijo od antarktičnega ledenega pokrova. Poleg mineralnih tal se v teh dolinah nahajajo jezera in potoki talečega ledu. Območje je osvetljeno pol leta, povprečna letna temperatura zraka je med -15°C in -30°C , stalno pihajo močni vetrovi, padavin pa je manj kot 100 mm na leto, večinoma v obliki snega. Ta večinoma sublimira in voda ne doseže tal. Majhna relativna vlažnost vetrov povzroča veliko evaporacijo. Do 75 dni na leto se temperature dvignejo nad 0°C , najvišje do 26°C in tla lahko doživijo več ciklov zamrzovanja v enem dnevu. Na temperaturo tal vplivajo osončenost, naklon, nadmorska višina in drugi topografski dejavniki. Povprečna vsebnost vode v tleh je nižja od dveh odstotkov. Pod to suho plastjo, v kateri je vsebnost vode podobna vsebnosti vode v tleh najbolj vročih puščav, je plast ledu ali pa z ledom nasičenega permafrosta. Mikrobna aktivnost je mogoča zaradi tankega filma vode na mineralnih površinah oziroma direktnega prevzema vlage iz plinaste faze. Dostopnost vode se poleti zaradi taljenja podpovršinskega ledu poveča, s čimer se poveča tudi mikrobna aktivnost. Posebnost je tudi nenavadno razmerje soli, saj je preperevanje kamenine zelo počasno, zaradi starosti tal pa predstavljajo vetrni nanosi pomemben vir soli. Prehranska veriga je sestavljena skoraj izključno iz mikroorganizmov in zelo redkih nematodov. Vir ogljika, ki vstopa v prehransko verigo je lahko zelo različen. Prisoten je organski ogljik, ki je nastal v jezerih, ko so ta prekrivala mnogo večje površine med zadnjo večjo poledenitvijo, ogljik cianobakterijskih preprog iz okolice jezer in ogljik iz obmorskih območij. Koliko ogljika se fiksira v samih tleh še ni povsem jasno. Na nekaterih območjih je vidna prisotnost alg, cianobakterij, lišajev in mahov.

Bakterijska združba je sestavljena iz predstavnikov vsaj 14 debel, najštevilčnejše bakterije so tiste iz debel *Acidobacteria*, *Actinobacteria* in *Bacteroidetes*. Taka združba, z nizkim deležem proteobakterij, ni značilna ne za obmorska antarktična in subantarktična območja, vroče puščave, niti za tla zmernih območji, kar kaže da gre v antarktičnih suhih dolinah za edinstveno mikrobno združbo. Med raziskovalci prevladuje mnenje, da gre za delujoče združbe z enostavno prehransko verigo, sestavljeno iz mikrobnih primarnih producentov in

heterotrofov. Od zaznanih cianobakterij so tudi takšne, ki se sicer ne pojavljajo v okoliških habitatih (Cary in sod., 2010).

Tudi Stomeo in sod. (2012) so preiskovali pestrost mikrobne združbe v tleh antarktičnih puščav. Preučevali so dve lokaciji in več globin. Vpliv okolja na mikrobno združbo so ugotavljali s profiliranjem združbe z metodo polimorfizma končnih restriksijskih fragmentov (TRFLP). Na podlagi hipotetične identifikacije končnih fragmentov so ugotovili, da so na vseh globinah prevladujoča debela po zastopanosti proteobakterije, aktinobakterije in firmikuti. Sestavo mikrobne združbe v plasti tik nad permafrostom so dodatno opisali z nekaj deset sekvencami klonske knjižnice 16s rRNA in kot najštevilčnejše zaznali pripadnike debel acidobakterij, aktinobakterij, bakteroidet in gamaproteobakterij. Dejavnika okolja, ki sta najbolj vplivala na mikrobno združbo sta bila količina ogljika in kalija. Čeprav naj bi bila voda glavno gonilo mikrobne aktivnosti v hladnih puščavah, niso odkrili povezave med količino dostopne vode in biološko aktivnostjo. Vsebnost vode je največja v najglobljih plasteh in pada proti površini. Padavine so majhen vir vode in predvidevajo da pride večina vode v vrhnje plasti iz permafrosta z izhlapevanjem. Največ mikrobne biomase pa so zaznali v zgornjih, bolj suhih plasteh. Čeprav so tako v klonskih knjižnicah kot v profilih TRFLP zaznali podpise cianobakterij v vzorcih pod površino, ni jasno ali je njihov izvor vrhnja plast ali nanosi iz drugih okolij. Značilnega vpliva lokacije ali globine na mikrobno združbo statistično niso pokazali, so pa iz dendrogramov profilov TRFLP in gelske elektroforeze v gradientu denaturanta (DGGE) opazili, da so si bolj podobni vzorci s površine, vzorci vmesne aktivne plasti in vzorci plasti nad permafrostom pa so ločeni v drugi gruči.

Bahl in sod. (2011) so preučevali genetsko pestrost na sušo prilagojenih cianobakterij iz rodu *Chroococcidiopsis* v vročih in hladnih puščavah. Ugotovili so, da obstajajo različice značilne za tople puščave in različice značilne za hladne puščave. Filogenetske razlike niso odvisne od geografske razdalje. Časovno umerjena filogenetska analiza je pokazala, da ni prišlo do medregijske izmenjave genov od ločitve kontinentov. To kaže da globalna prisotnost teh cianobakterij ni posledica neprestanega širjenja po planetu ampak davne evolucijske zapuščine.

2.4 MIKROBNA ZDRUŽBA TAL OB UMIKAJOČIH LEDENIKIH

Mikrobno združbo v golih tleh za umikajočim ledenikom na ekstremni nadmorski višini (5000 m) v Peruju so opisali Nemergut in sod. (2007). Vzorčili so na treh lokacijah v razmaku 500 m, ki so predstavljale približno 20 let razlike v poledenosti. Iz vsakega vzorca so pripravili dve klonski knjižnici ribosomskih genov iz katerih so pridobili 59 do 77 sekvenc. Filogenetska pestrost, enakomernost zastopanosti filotipov in število filotipov so narasli s starostjo tal. V najmlajših tleh so prevladovale betaproteobakterije iz družine *Comamonadaceae*, ki jih niso zaznali v najstarejših tleh, v starejših pa je bilo več bakterij, ki so tudi sicer bolj pogoste v tleh. Znatno delež v vseh knjižnicah so predstavljale cianobakterije, katerih sestava, ne pa zastopanost, se je spreminjala s starostjo tal. Večina sekvenc je najbolj podobna še negojenim cianobakterijam, kažejo pa daljno sorodnost s cianobakterijami, ki fiksirajo dušik.

Še podrobneje so razvoj cianobakterijske združbe v prvih letih po umiku istega ledenika opisali Schmidt in sod. (2008). Prisotnost cianobakterij v tleh so opazili že v istem letu po umiku ledenika. S časom izpostavljenosti tal se pestrost združbe močno poveča. Združba v najmlajših tleh je bolj podobna združbi v ledu in kriokonitnih luknjah, v štirih letih pa se je vzpostavila združba, ki je bolj podobna talnim bioloških skorjam. Nekatere izmed zaznanih cianobakterij v starejših tleh so sorodne znanim fiksatorjem dušika (*Anabaena*, *Nostoc*), druge pa so značilni predstavnik puščavskih bioloških skorij (*Microcoleus vaginatus*). S pestrostjo cianobakterij in količino fotosintetskih pigmentov se je povečala tudi stabilnost tal. Cianobakterije z izločanjem polisaharidov in s svojimi filamenti povečajo zlepljenost delcev tal, tako se je strižna trdnost od najmlajših do najstarejših tal skoraj podvojila, kar zmanjšuje erozijo tal. Do četrtega leta se je tudi močno povečala raven fiksacije dušika. Skupaj z rezultati encimskih aktivnosti in analize bioloških označevalcev z masno spektroskopijo pirolitičnih produktov raziskovalci predpostavljajo, da glavni vir ogljika predstavlja cianobakterijska fotosinteza, vetrni nanosi peloda in starodavna organska snov v teh tleh pa predstavljata le zanemarljiv vir ogljika.

Lazzaro in sod. (2009) so preučevali dejavnike okolja, ki vplivajo na profil mikrobne združbe tal za umikajočimi ledeniki v Alpah. Za šestimi ledeniki so na dveh oddaljenostih

od konca ledenika, kar predstavlja približno 10 in 70 let stara tla, opisali mikrobno združbo s profilom TRFLP. S kanonično korespondenčno analizo (CCA) so ugotavljali vpliv kamninske podlage (silikatna ali karbonatna) ter fizikalnih in kemijskih dejavnikov na strukturo mikrobne združbe. Ugotovili so, da kamninska podlaga nima vpliva na mikrobno združbo. V vzorcih deset let starih tal so lahko pripisali statistično značilen vpliv količini padavin, nadmorski višini in količini sončnega obsevanja. V starejših tleh so imeli večjo vlogo pri oblikovanju združbe kemijski dejavniki, predvsem koncentracija sulfatnega in fosfatnega iona.

Razvoj mikrobne združbe tal za umikajočimi ledeniki so opazovali tudi v Arktiki. Na Aljaski (Sattin in sod., 2009) so spremljali mikrobno združbo do 8 let starih tal, katerih posebnost je hitra naselitev rastlin. Predvsem je raziskovalce zanimalo ali se spremembe v kroženju hranil odražajo na strukturi mikrobne združbe. Pripravili so po dve klonski knjižnici ribosomskih genov iz nedavno izpostavljenih tal in tal izpostavljenih osem let in skupaj pridobili 480 sekvenc. Čeprav so zaznali razlike v aktivnosti, razlik v strukturi mikrobne združbe niso odkrili. V vseh knjižnicah so prevladovala betaproteobakterije, katerih delež je nižji v starejših tleh. Za razliko od drugih podobnih okolij, kjer so našli praviloma sekvence iz družine *Comamonadaceae*, večine teh sekvenc niso mogli uvrstiti v znane družine reda *Burkholderiales*. Cianobakterij v najmlajših tleh ni bilo, v osem let starih tleh pa so našli majhen delež sekvenc sorodnih znanim fiksatorjem dušika iz redov *Nostocales* in *Oscillatoriales*. Pri tem je potrebno omeniti, da so bila preučevana tla na pogled zelo heterogena in so se raziskovalci pri vzorčenju zavestno izogibali predelom z vidno biološko skorjo. Sklepajo, da prva štiri leta mikrobno združbo vzdržuje starodavni organski ogljik, ko tega zmanjka, pa se vzpostavi združba fototrofov in fiksatorjev dušika.

2.5 MIKROBNA ZDRUŽBA VISOKOGORSKIH, ARKTIČNIH IN ANTARKTIČNIH TAL PORASLIH Z VEGETACIJO

Nekateri vzorci iz tega dela so bili odvzeli v območju poraščenem z vegetacijo. Obsežnejših raziskav mikrobne združbe na tako ekstremnih nadmorskih višinah doslej še ni bilo, lahko pa iščemo vzporednice z raziskavami visokogorskih, arktičnih in antarktičnih

suih travnikov in tundre. Najbolj raziskano visokogorsko območje predstavljajo talni ekosistemi v Skalnem gorovju v Koloradu na nadmorski višini med 3000 in 4000 m. To okolje definira izrazito sezonsko nihanje v temperaturi in debelini snežne odeje. Lipson in Schmidt (2004) sta preučevala sezonske spremembe v združbi tal suhega travnika. Pozimi, spomladi in poleti sta vzorčila tri prostorsko ločena tla in iz vsakih pridobila 22 do 26 sekvenc, skupaj 217 sekvenc. V vseh letnih časih so prevladovali sekvence acidobakterij, alfa-proteobakterij in verukomikrobijev. Najvišji delež acidobakterij sta odkrila v vzorcih, ki so bili odvzeti spomladi. Delež aktinobakterij in bakteroidet je bil najvišji pozimi, verukomikrobijev in beta-proteobakterij pa poleti. Dinamika mikrobne združbe je skladna z opažanji predhodnih študij. Pozimi uspevajo bakteroidete, med katere sodijo znani razgrajevalci kompleksnejših substratov, ki so odporni na nizke temperature. Spomladi in poleti se pojavijo sekvence podobne sekvencam gojenim fotoavtotrofov in kemoavtotrofov iz skupine škrlatnih nežveplovih bakterij (*Proteobacteria*) in debela *Chloroflexi*. To se sklada s predpostavko, da do pomladi se porabijo substrati rastlinskih ostankov iz prejšnje rastne sezone. Naraste tudi delež acidobakterij. Izolati te skupine so organotrofni fakultativni ali obligatni anaerobi. Njihovo pojavljanje bi lahko bilo posledica topljenja snega, ki poveča količino anaerobnih niš. Predvidevajo, da delež verukomikrobijev poleti naraste zaradi povečane količine koreninskih izločkov.

V istem geografskem območju so raziskovalci opisali tudi visokogorsko tundro (Costello in sod., 2006). Dostopnost vode tu ni omejena z izsuševanjem, ampak samo z zmrzovanjem. Globlje v tleh je temperatura bolj konstantna in tla so zmrznjena manjši del leta. S tehniko TRFLP so spremljali profil mikrobne združbe v različnih globinah. Profil združbe se je spreminjal skupaj s spreminjanjem biokemijskih procesov v tleh. Meja med aerobnimi in anaerobnimi razmerami je bila na približno dveh centimetrih globine. Več DNA so osamili iz globljih plasti, prav tako so tam zaznali večjo pestrost združbe. To je v nasprotju s splošnim prepričanjem, da je mikrobna aktivnost največja na površini, kjer je dovolj kisika in organskega materiala rastlin. Možno je tudi, da je opaženo stanje posledica akumulacije in boljše ohranitve DNA v globljih plasteh. Pripravili so tudi bakterijsko knjižnico 16S rRNA s 136 sekvencami iz različnih globin tal, odvzetih po spomladanski odjugi, ki predstavlja še posebej dinamično obdobje. Največji delež sekvenc so predstavljale sekvence acidobakterij (26%), sledile so proteobakterije (24%), tretji po

zastopanosti pa so bili nekoliko presenetljivo klorofleksi (16%). Kar trinajst odstotkov celotne knjižnice so predstavljale še neopredeljene evolucijske veje klorofleksov. Njihova vloga in dinamika v tem okolju še nista znani, so pa značilni za zelo specifično nišo, saj knjižnice okoliških suhih travnikov teh sekvenc niso vsebovale.

Arktično tundro so preučevali Wallenstein in sod. (2007). V tem okolju dolgim zimam sledi le kratko obdobje, ko tla niso zmrznjena in v katerem je pričakovati večino mikrobne aktivnosti. Osredotočili so se na razlike v mikrobni združbi v mineralnih in organskih tleh poraslih z grmičjem, travinjem, in območji med travinjem. Hkrati so primerjali še združbo po končani rastni sezoni in po odmrznitvi tal naslednje leto. Iz vzorcev so pridobili 116 do 220 sekvenc 16S rRNA. Združbe so se razlikovale skladno s tipom vegetacije, čeprav na ravni filogenetskih debel niso odkrili velikih razlik med vzorci tal poraslih s travinjem in vmesnimi neporaslimi tlemi. V teh dveh vzorcih so prevladovali sekvence acidobakterij, po zastopanosti pa so sledile sekvence proteobakterij, firmikut in bakteroidet. Tako v mineralnih kot organskih tleh so prevladovali proteobakterije, acidobakterij je bilo značilno manj, kot v tleh s travinjem. S časom se mikrobne združbe niso spreminjale na ravni filogenetskih debel in razredov, na nižjih ravneh pa so se spreminjale. Primerjava knjižnic z metodo Unifrac je pokazala, da se mikrobna združba spreminja z letnimi časi, vpliv vegetacije na združbo pa je bolj pomemben kot letni čas. Predvidevajo, da so razlike posledica drugačnih substratov, ki jih različne rastline nudijo mikrobom, tako v obliki koreninskih izločkov, odmrlih korenin in odmrlih nadzemnih delov, ki se predvsem razlikujejo v količini deleža lignoceluloze. Poleg tega je vpliv rastlin tudi fizikalen. Z različno strukturo korenin se spreminja struktura tal, grmičje pa spreminja tudi mikroklimo z zaustavljanjem snega, kar vpliva na izolativnost snežne odeje.

Veliko hladnih talnih habitatov od Falklandskih otokov do Antarktike so opisali Yergeau in sod. (2007). Na dvanajstih lokacijah so vzorčili gosto poraščena in manj poraščena tla, pripravili knjižnice 16S rRNA in analizirali približno 200 sekvenc iz vsakega vzorca. Rastline v tem okolju zmanjšajo ekstremnost klimatskih pogojev, saj zadržujejo toploto in vlago ter s tem znižajo nihanja temperature in vlage v tleh. V manj poraščenih tleh so opazili povezavo med bakterijsko pestrostjo in geografsko širino. V vzorcih bližje polu je bila pestrost nižja, medtem ko v poraščenih tleh tako značilnega vzorca niso opazili.

Geografska oddaljenost in poraščenost tal značilno vplivata na mikrobno združbo. V nekaterih vzorcih so ugotovili nenavadno prevlado sekvenc določenih skupin. Tako so sekvence alfa proteobakterijskega rodu *Methylobacterium* v enem od vzorcev predstavljale 81,7% v drugem pa 52,7% vseh sekvenc. V enem od vzorcev so močno prevladale sekvence iz reda bakteroidet *Sphingobacteria* (41,7%). V drugih so odkrili za tla običajno zastopanost sekvenc posameznih filogenetski debel. Najštevilčnejše so bile proteobakterije, med njimi je bilo največ alfa proteobakterij, sledile so aktinobakterije, acidobakterije in bakteroidete. Velikega deleža sekvenc z izbrano metodo (RDP Classifier, Wang in sod., 2007) niso uspeli uvrstiti v znane bakterijske skupine. Pri z vegetacijo bolj poraslih tleh je bilo takšnih 13% do 25% in 24% do 63% v manj poraslih tleh. Samo pri acidobakterijah so odkrili statistično značilno negativno korelacijo zastopanosti in geografske širine, medtem ko so pri cianobakterijah odkrili pozitivno korelacijo z geografsko širino. Korelacije združbe na ravni družin z dejavniki okolja (organska snov, skupni dušik, pH) niso odkrili. V drugi objavi (Yergeau in sod., 2007b) so v istih vzorcih iskali vpliv dejavnikov okolja na strukturo mikrobne združbe z metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturanta (DGGE) in na številčnost bakterij s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). Tudi v tem primeru so prišli do podobnih zaključkov. Na bakterijsko združbo je najbolj vplivala prisotnost rastlin in klimatski dejavniki, ki so povezani tudi z geografsko širino. Sama temperatura pa ni neposredno povezana s količino bakterij v tleh.

2.6 OBSEŽNEJŠE RAZISKAVE MIKROBNE ZDRUŽBE TAL V ZMERNIH PODNEBNIH RAZMERAH

S težje dostopnimi vzorci iz ekstremnih okolij raziskovalci praviloma raziskav ne zastavijo tako obsežno kot z bolj dostopnimi vzorci. Za primerjavo bomo zato v tem poglavju opisali nekaj nedavnih, obsežnih in metodološko poglobljenih raziskav mikrobne združbe tal iz neekstremnih podnebnih področij.

V raziskavi, ki je zajela največ kloniranih 16S rRNA sekvenc iz enega vzorca tal so raziskovalci opisali agronomsko tla raziskovalnega centra v osrednjem Michiganu, ZDA (Morales in sod., 2009). Poleg same sestave bakterijske združbe so jih zanimali različni

vidiki omenjenega raziskovalnega pristopa, v prvi vrsti vpliv velikosti knjižnice na različne ocene pestrosti. Da bi v analizo zajeli čim večji del mikrobne združbe so DNA najprej ločili glede na vsebnost parov GC v sekvenci. Sestavljeno knjižnico, pripravljeno iz ločenih frakcij DNA so primerjali s knjižnico pripravljeno iz skupne DNA. Glede na sestavo na ravni debel ali rodov niso zaznali večjih razlik med knjižnicami. Ko pa so primerjali t.i. krivulje rarefakcije, t.j. krivulje, ki opišejo hitrost zaznavanja novih filotipov v odvisnosti od števila pregledanih sekvenc, so opazili, da nove filotipe po kriteriju 97% podobnosti, hitreje pridobivajo v sestavljeni knjižnici iz frakcionirane DNA. Prav tako so bili v tej knjižnici višji Shannon–Weaverjev indeks pestrosti, ocenjevalec bogatosti Chao1, enakomernost zastopanosti filotipov (angl: evenness) in tudi samo število filotipov (OTU) je bilo višje.

Ker so v tej raziskavi pridobili sekvence dolžine okoli 400bp, jih je zanimalo tudi kakšni bi bili zaključki, če bi pridobili celotne oziroma skoraj celotne sekvence. Iz baz podatkov so ustvarili nabor sekvenc, ki je služil kot nadomestek njihove knjižnice. Primerjali so tvorbo filotipov iz nabora celotnih sekvenc in nabora s sekvencami v preučevanem obsegu 400bp. Iz 1184 sekvenc so v prvem primeru ustvarili 1031, v drugem pa 911 filotipov. Največjo razliko med naborom celotnih sekvenc in naborom krajših sekvenc so opazili pri vrednosti ocenjevalca bogatosti Chao1, ki je bila pri celotnih sekvencah še enkrat višja kot pri krajših. Primerjali so tudi filogenetsko umestitev celotnih in krajših sekvenc in le v 16 primerih (1,5%) zaznali umestitev v drugo filogenetsko deblo. Analize na finejši filogenetski ravni niso opravili, priporočili pa so, da se za potrebe natančnejše filogenetske uvrstitve pridobi sekvence daljše od 400bp (Morales in sod., 2009).

Vpliv velikosti knjižnice so spremljali z naključnim vzorčenjem različno velikih naborov sekvenc (500, 2000, 3390 in 5000) v združeni knjižnici vseh frakcij GC. Filotipe so ustvarili po kriteriju 97% podobnosti (Morales in sod., 2009). Od najmanjšega do največjega nabora sekvenc so opazili 5,1 kratno povečanje števila filotipov in 3,5 kratno povečanje vrednosti ocenjevalca bogatosti Chao1. Nasprotno je enakomernost zastopanosti filotipov padla iz 0,966 na 0,906. Predlagajo, da je potrebno za smiselno oceno pestrosti, ki bi lahko služila tudi za primerjave med študijami različnih tal analizirati vsaj 2000 sekvenc.

Primerjali so tudi dve pogosti metodi določanja taksonomske uvrstitve sekvenc (Morales in sod., 2009). Najprej so sekvence taksonomsko uvrstili z orodjema servisa RDP, Classifier (Wang in sod., 2007) in SeqMatch (Cole in sod., 2009), kjer so za uspešno uvrščene opredelili sekvence, ki so bile obakrat enako uvrščene. Na ta način so uvrstili 66% vseh sekvenc v 17 filogenetskih debel. Druga metoda je vključevala izdelavo filogenetskega drevesa skupaj z 51,024 že uvrščenimi sekvencami z orodjem ARB. Na ta način so uvrstili 50% več sekvenc, oziroma 99% vseh sekvenc v 25 filogenetskih skupin. Uspešnost uvrščanja z obema metodama je bila pri nekaterih filogenetskih skupinah zelo podobna. Večino razlik med metodama je nastalo pri uvrščanju sekvenc bakterijskih skupin z manjšim številom sekvenc v bazah (kandidatna debla in debla *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Thermomicrobia*, *Fibrobacteres*).

Ob upoštevanju rezultatov sestavljene knjižnice iz frakcij GC in uvrstitve v debla s pomočjo filogenetskih dreves je bila sestava združbe na nivoju debel z več kot desetimi sekvencami taka: *Proteobacteria* 35%, *Acidobacteria* 20%, *Actinobacteria* 10%, *Bacteroidetes* 9%, *Thermomicrobia* 7%, *Gemmatimonadetes* 5%, *Planctomycetes* 5%, *Verrucomicrobia* 2,1%, *Nitrospira* 1,2%, *Armatimonadetes* 0,9%, *Chloroflexi* 0,6%, *Chlorobi* 0,4%, *Firmicutes* 0,3%, *Cyanobacteria* 0,2% *Fibrobacteres* 0,2% in kandidatna debla OD1 1,4%, WS3 0,7%, TM7 0,3% OP11 0,3% in OP3 0,2% (Morales in sod., 2009).

Novejša metoda analize sekvenc 16S rRNA ne vključuje kloniranja in sekvenciranja po Sangerju ampak direktno pridobivanje kratkih sekvence 16S rRNA s pirosekvenciranjem. Roesch in sod. (2007) so na ta način preučili štiri vzorce tal iz različnih koncev sveta. Iz vsakega so pridobili med 26.140 in 53.533 bakterijskih sekvenc s povprečno dolžino 103 nukleotidov. Analizirali so tri agronomska tla iz Brazilije, Floride in Ilioina ter gozdna tla iz Kanade. Najbolj jih je zanimala pestrost tal pri različnih ravneh podobnosti med sekvencami. Agronomska in gozdna tla so se v tem pogledu razlikovala. Na ravni vrst so agronomska tla kazala večjo pestrost, medtem ko je na ravni debel pestrost večja v gozdnih tleh. V agronomskih tleh so ob približno 30.000 sekvencah pridobili približno 6000 unikatnih sekvenc. Pri tem krivulja rarefakcije ni kazala približevanja k asimptoti oziroma ni dosegla platoja. Podobno število unikatnih sekvenc so pridobili iz gozdnih tal, le da je bila v tem primeru ob 54.000 pridobljenih sekvencah krivulja rarefakcije že blizu

asimptote. Pri tej ravni oddaljenosti so parametrične in neparametrične projekcije bogatosti predvidele do 52.000 filotipov. Pri oddaljenosti, ki se največkrat uporablja za arbitrarno merilo števila vrst (3%), je bilo število filotipov med 3.500 in 20.000, pri čemer so z večjo bogatostjo izstopala gozdna tla. Tako kot Morales in sod. (2009) so tudi raziskovalci v tej objavi pokazali velik vpliv velikosti vzorca (števila sekvenc) na ocene bogatosti, ki so višje, pri večjemu številu pregledanih sekvenc. Podali so tudi ocene števila sekvenc, ki bi jih bilo potrebno pridobiti za 95% pokritost vzorčenja. Za analizo na ravni oddaljenost 3% se te gibljejo med 127.000 v tleh iz Floride in 1.600.000 v gozdnih tleh Kanade (Roesch in sod., 2007).

Filogenetsko so uspeli uvrstiti med 88% in 94% sekvenc iz posameznega vzorca z orodjem NAST spletnega servisa Greengenes. V vseh vzorcih so s preko 40% zastopanostjo prevladovali sekvence proteobakterij. Drugo deblo po zastopanosti so bile bakteroidete s 15% do 25% zastopanostjo. Sledile so acidobakterije, aktinobakterije in firmikuti (Roesch in sod., 2007).

S podobnim načinom ugotavljanja sestave mikrobne združbe so Lauber in sod. (2009) iskali dejavnike okolja, ki oblikujejo mikrobno združbo v tleh Severne in Južne Amerike. Na račun večjega števila vzorcev tal so zmanjšali globino analize posameznega vzorca. Iz 88 vzorcev tal so s pirosekvenciranjem v povprečju pridobili 1501 sekvenco 16S rRNA. Sekvenc krajših od 200 nukleotidov niso vključili v analizo. Povprečna dolžina sekvence vključene v analizo je tako znašala 232 nukleotidov. Potrdili so ugotovitve raziskave, v kateri so na istih vzorcih z metodo TRFLP odkrili vpliv pH na bakterijsko pestrost (Fierer in Jackson 2006), hkrati pa so ugotovili, da od spremljanih dejavnikov okolja, pH najbolj vpliva na sestavo mikrobne združbe. Najbolj značilni so bili vplivi na sekvence iz debel acidobakterij, aktinobakterij in bakteroidet. V celotnem naboru sekvenc so bile prisotne sekvence iz 25 filogenetskih debel. Najštevilčnejše so bile proteobakterije (alfa, beta in gama), aktinobakterije, bakteroidete in firmikuti, ki so skupaj v vsaki knjižnici predstavljale vsaj 90% sekvenc. Za najštevilčnejša debela so opravili tudi analizo rarefakcije in ugotovili, da se tudi pri 20.000 sekvencah posameznega debela, krivulje še ne približujejo asimptoti.

2.7 METODA TRFLP

Metodo profiliranja mikrobne združbe imenovano polimorfizem dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (angl. Terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP) so raziskovalci vpeljali v analizo mikrobne združbe ob koncu devetdesetih let prejšnjega stoletja (Liu in sod., 1997; Clement in sod., 1998; Avaniss-Aghajani in sod., 1994). Predstavlja nadgradnjo metode RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) oziroma njene izpeljanke ARDRA (angl. Amplified ribosomal DNA restriction analysis), ki so jo pred tem uporabljali za pripravo enostavnih profilov mikrobnih združb. Osnova je pomnožitev specifičnega odseka skupne mikrobne DNA iz vzorca s PCR. Zamišljena je bila kot poenostavljena analiza molekule 16S rRNA, ki bi poleg samega profila mikrobne združbe vsebovala tudi specifično filogenetsko informacijo o sestavi združbe. Pomnoženi odsek DNA cepimo z izbrano restrikcijsko endonukleazo, za razliko od metode RFLP, pa pri TRFLP ne analiziramo vseh cepljenih odsekov, ampak nas zanimajo le končni (terminalni) odseki (fragmenti). Zaznamo jih zaradi označenih, običajno s fluorescentnim barvilom, začetnih oligonukleotidov. Dolžino končnega odseka, lahko teoretično povežemo z znanimi sekvencami 16S rRNA. Molekula 16S rRNA je še vedno največkrat uporabljena za TRFLP, so pa raziskovalci razširili uporabo tudi na druge gene (Bruce, 1997). Z uporabo TRFLP v raziskavah so se pokazale tudi omejitve pri povezavi zaznanih končnih fragmentov s sekvenco 16S rRNA, tako da večina raziskovalcev uporablja metodo le za profiliranje mikrobne združbe.

Liu in sod. (1997) so najprej opredelili teoretične zmožnosti metode. Takraten nabor znanih celotnih sekvenc 16S rRNA je obsegal le 1102 sekvenci. S štirimi pari začetnih oligonukleotidov so iskali par, ki bi teoretično pomnožil največji delež sekvenc iz te baze, hkrati pa so v naboru desetih restrikcijskih endonukleaz iskali restrikcijske endonukleaze, ki bi ob cepitvi naredile kar največ različno dolgih končnih fragmentov. Kot najuspešnejši par začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje so opisali par 341f-926r (84,5% pomnoženih sekvenc), vendar je ta odsek po razrezu z vsemi encimi omogočil nastanek le majhnega števila različno dolgih končnih fragmentov. Kot najboljšo kombinacijo so prepoznali kombinacijo para začetnih oligonukleotidov 8f-926r in encima *MspI* s 686 pomnoženimi sekvencami in 221 unikatnimi 5' končnimi fragmenti. Veliko število različno

dolгих odsekov je posledica večkratnih delecij in insercij ter pravega polimorfizma restrikcijskih mest. S sočasno uporabo dveh encimov so teoretično število unikatnih končnih fragmentov s 5' konca dvignili na 233. Poleg restrikcijske endonukleaze *MspI* so kot učinkovito izpostavili še endonukleazo *HhaI*. Praktično so metodo testirali v definirani združbi sestavljeni iz šestih bakterijskih sevov. Uspešno so zaznali 12 končnih restrikcijskih fragmentov z obeh strani (5' in 3') produkta PCR, vendar se dolžina dveh ni ujemala s pričakovano dolžino. Pri ostalih fragmentih se je v območju med 37bp in 600bp izmerjena dolžina razlikovala od teoretične za največ dva bazna para. Metodo so uporabili tudi za analizo kompleksne mikrobne združbe. V štirih različnih združbah so tako našli 21, do 36 različnih končnih fragmentov. Najmanjši zaznan fragment je predstavljal 0,4% skupne fluorescence vzorca. Demonstrirali so tudi uporabo koeficientov podobnosti TRFLP profilov, ki temeljijo na primerjavi prisotnosti in količine posameznih fragmentov.

Podoben način profiliranja mikrobne združbe so si zamislili Clement in sod. (1998), le da so za zaznavanje končnih fragmentov uporabili avtomatski sekvenator. Kot najustreznejšo so identificirali regijo molekule 16S rRNA od mesta 8 do mesta 536 (štetje po *E.coli*) in testirali štiri restrikcijske endonukleaze, *Sau3A*, *HaeIII*, *MspI* in *HhaI*. Njihova definirana mikrobna združba je vsebovala 11 bakterijskih sevov, analizirali pa so le končne fragmente s 5' konca. Ko so ločeno analizirali posamezne seve so opazili, da se skoraj vedno poleg teoretično predvidenega fragmenta pojavi še delno razcepljen ali nerazcepljen fragment. Pojava nekaterih fragmentov niso znali pojasniti, so pa bili profili TRFLP ponovljivi in konsistentni. Dolžina zaznanih »pravih« fragmentov je od teoretične odstopala za največ 5 bp. Pri analizi združbe so opazili velik vpliv temperature naleganja začetnih oligonukleotidov na število zaznanih končnih fragmentov. Nižanje temperature naleganja do 48,5°C je povečalo število zaznanih pravih fragmentov na 10, dodatno nižanje temperature pa ni imelo vpliva. Enega seva torej že v enostavni združbi niso uspeli zaznati. Ugotovili so tudi, da količina zaznanega fragmenta ne odraža deleža bakterijskega seva v združbi, poleg tega pa je odvisna od temperature naleganja začetnih oligonukleotidov. Pri analizi kompleksne združbe so se omejili le na prisotnost vrhov elektroferogramov, niso pa upoštevali površine vrhov. V petih kompleksnih mikrobnih vzorcih so zaznali 25 do 60 vrhov. Za primerjavo združb so uporabili multivariatno statistično metodo. Ob upoštevanju

rezultatov treh ločenih restrikcij so dobili sliko, ki se je skladala s pričakovano podobnostjo med združbami.

Marsh (1999) je primerjal teoretično dolžino končnih fragmentov dveh restrikcijskih endonukleaz nastalih iz nabora poznanih sekvenc 16S rRNA in izpostavi možnost izbire restrikcijske endonukleaze glede na potrebe raziskovalca. Primerjal je endonukleazo *HhaI*, ki omogoča nastanek velikega števila različno dolgih fragmentov z dokaj enakomerno zastopanostjo v bazi (Liu in sod., 1997) in *CviJI* pri kateri en fragment prevladuje, kar je priročno kadar nas zanimajo filogenetske skupine, ki nimajo tega prevladujočega restrikcijskega mesta. Zaključil je, da je metoda hitra in občutljiva in da se bo z izboljšanjem tehnologije ločevanja fragmentov in povečevanja števila dostopnih sekvenc njena uporabnost še povečala.

Več dejavnikov, ki vplivajo na analizo mikrobne združbe s TRFLP so preiskali Osborn in sod. (2000). Predvsem jih je zanimala variabilnost med profili istega vzorca pri ponovljenih osamitvah DNA, ponovitvah reakcij PCR, ponovitvah encimskih cepitev in pri analizi gelov z istim vzorcem. Opazovali so še vpliv koncentracije tarčne DNA v PCR, temperature naleganja začetnih oligonukleotidov, števila ciklov PCR, različnih polimeraz *Taq* in koncentracije restrikcijskih endonukleaz. Teoretično so kot najboljši par začetnih oligonukleotidov spoznali par 63F in 1387R. Izmed devetih preiskanih restrikcijskih endonukleaz s prepoznavnim mestom štirih baznih parov so prav tako teoretično izpostavili dve, *AluI* in *HhaI*, ki omogočata nastanek največjega števila različnih končnih fragmentov in sta hkrati cenovno dostopna. Pri delu s kompleksnimi vzorci so opazili, da so končni fragmenti s 5' konca bolj pestri kot končni fragmenti s 3' konca, kar je verjetno posledica večje heterogenosti v dolžini gena znotraj variabilnih regij 1, 2 in 3. Izpostavili so tudi vpliv izbire algoritma določanja dolžine fragmentov. Izbira pravega algoritma, glede na eksperimentalne pogoje, naj bi omogočala določitev velikosti fragmenta do baznega para natančno.

V isti objavi so preverili variabilnost treh ponovitev istega vzorca na enem gelu (Osborn in sod., 2000). Petindvajset vrhov (končnih fragmentov) je bilo enakih pri vseh treh ponovitvah, pri eni se je pojavil en, pri drugi pa dva dodatna nizka vrhova. Primerjali so

tudi relativen delež posameznih vrhov v profilu med ponovitvami na istem in na drugem gelu. V obeh primerih so za večino vrhov zaznali nihanja do 11%, delež krajših fragmentov pa niha nekoliko več. Vpliv osamitve DNA, reakcije PCR in cepitve je bil minimalen in na ravni variabilnosti ponovitev istega vzorca. Predlagali so celo, da združevanje osamitev DNA in reakcij PCR ni potrebno in je bolje z istim vložkom analizirati večji nabor vzorcev. Zniževanje količine tarčne DNA v reakciji PCR in zniževanje števila ciklov povzročita zniževanje višine vrhov in tudi izginjanje vrhov, deleži preostalih vrhov pa ostajajo enaki. S polimerazama *Taq* različnih proizvajalcev so v istem vzorcu zaznali 41 in 27 vrhov, kar je največja variabilnost v tej raziskavi in poudarja pomembnost uporabe enakih reagentov znotraj raziskave. Navidez presenetljivo so več vrhov zaznali pri višji temperaturi naleganja začetnih oligonukleotidov (60°C oziroma 55°C). Predvidevali so, da se pri nižji temperaturi pomnožuje več različnih matric, vendar se pomnožijo v manjših količinah in zato ostanejo pod mejo detekcije. Prav tako vpliva na profil mikrobne združbe tudi količina restrikcijske endonukleaze. Kljub izobilju encima, se lahko v profilu pojavijo nerazgrajeni ali deloma razgrajeni pomnožki, ki jih lahko odkrijemo s spreminjanjem količine uporabljenega encima.

Raziskovalci so zmožnosti metode TRFLP primerjali z zahtevnejšo analizo sekvenc iz klonskih knjižnic 16S rRNA (Dunbar in sod., 2000). S TRFLP so uspeli razbrati enake podobnosti oziroma razlike med mikrobnimi združbami štirih vzorcev tal, kot so jih ugotovili z analizo knjižnic. Uporabili so preprosto mero podobnosti na osnovi prisotnosti oziroma odsotnosti elektroforetskih vrhov. Spoznali pa so, da metoda TRFLP ni primerna za ugotavljanje mikrobne bogatosti in enakomernosti zastopanosti predstavnikov mikrobne združbe v kompleksnih vzorcih. Kasneje (Blackwood in sod., 2007) so z obsežno teoretično analizo raziskovalci potrdili, da indeksi pestrosti, ki jih lahko ugotovimo z metodo TRFLP ne odražajo prave pestrosti. Preverili so tudi občutljivost metode in zaključili, da lahko zaznamo predstavnike združbe, ki predstavljajo več kot 0,1% - 1% celotne združbe (Dunbar in sod., 2000), kar je podobno, kot pri profiliranju mikrobne združbe z metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturanta (DGGE). Kot prvi so več pozornosti posvetili normalizaciji količine analizirane DNA. Najprej so iz več ponovitev profila izračunali povprečne relativne deleže posameznih vrhov in sestavili »povprečni profil« vzorca. Za normalizacijo analizirane količine fragmentov so sešteli skupno višino

vrhov, kar so obravnavali kot skupno fluorescenco vzorca in prilagodili višine vrhov posameznih elektroferogramov glede na najmanjšo skupno fluorescenco. Tako so na koncu primerjali profile z enako skupno fluorescenco oziroma količino DNA.

Raziskovalci so razvili tudi orodja za *in silico* analizo TRFLP (Marsh in sod., 2000). V predstavitvi orodja TAP- TRFLP so 1663 sekvenc 16S rRNA v bazi RDP teoretično pomnožili z začetnim oligonukleotidom 27F in cepili z restrikcijsko endonukleazo *TspEI*. Med 1200 pomnožki je bilo 349 unikatnih oziroma 29% takrat poznanih sekvenc. Avtorji so izpostavili, da ni možno filogenetsko identificirati terminalnih fragmentov neposredno, hkrati pa so prikazali, da vsebujejo končni fragmenti do neke mere tudi filogenetsko informacijo. Orodje je predvsem namenjeno raziskovalcem, da izberejo najprimernejše encime za analizo specifičnih filogenetskih skupin.

Teoretične in praktične metodološke vidike so predstavili tudi Dunbar in sod. (2001). Predlagali so standardizacijo analize, ki bi privedla do bolj zanesljivih primerjav različnih mikrobnih združb. Baza sekvenc na katerih temelji njihova analiza je zajemala 3906 sekvenc 16S rRNA iz debela proteobakterij in debela gram pozitivnih bakterij. Za razliko od dotedanjih objav, v katerih so raziskovalci analizirali dokaj neinformativne mere filogenetske ločljivosti restrikcijskih endonukleaz, so tokrat definirali dve kategoriji specifičnosti terminalnega fragmenta. Fragmente, ki so bili značilni za tri vrste ali manj so uvrstili kot vrstno specifične, fragmente, ki so bili značilni za dva roda ali manj pa kot rodovno specifične. Analizirali so dve filogenetski skupini posebej in združeno bazo sekvenc obeh skupin. Ugotovili so, da je delež specifičnih fragmentov večji, kadar obravnavamo le eno skupino kot v primeru skupne baze sekvenc. V mikrobni združbi, ki vsebuje 10 in več filogenetskih skupin (angl.: divisions) je lahko specifičnost tako majhna, da taka analiza ne privede do smiselnih rezultatov. Združevanje več restrikcijskih endonukleaz v sočasni cepitvi ne izboljša filogenetske specifičnosti. Združevanje rezultatov več ločenih cepitev je bolj informativno. Nastanek največ vrstno in rodovno specifičnih fragmentov omogoča cepitev z *RsaI* (nad 70%). *MspI*, *HhaI* in *BstUI* so malo manj učinkoviti (večinoma med 60% in 70%), od predstavljenih encimov pa predvsem v skupni bazi obeh skupin omogoča nastanek najmanjšega števila specifičnih fragmentov cepitev s *HaeIII* (46% vrstno specifičnih in 50% rodovno specifičnih). V praksi bo zaradi

netočnega ugotavljanja dolžine fragmentov z elektroforezo filogenetska resolucija še manjša. Zmanjšala pa se bo tudi z naraščajočim številom sekvenc v bazi. Povezava TRFLP s filogenetsko informacijo je torej mogoča le z uporabo začetnih oligonukleotidov specifičnih za ožje filogenetske skupine.

V nasprotju z dotedanjimi rezultati (Osborn in sod., 2000), so Dunbar in sod. (2001) odkrili veliko variabilnost TRFLP pri ponovitvah istega vzorca. V devetih ponovitvah istega vzorca so tako zaznali 169 vrhov, kar 85% se jih ni pojavilo v vseh ponovitvah. Kot najpomembnejši razlog za to razliko so spoznali nizek prag detekcije v njihovi analizi. Povišanje praga na višjo vrednost (Osborn in sod., 2000) je število neponovljivih vrhov zmanjšalo iz 169 na 13, vendar je hkrati iz analize izključilo 4 od 24 ponovljivih vrhov. Zato raziskovalci predlagajo uporabo nižjega praga skupaj s postopkom analize, ki omeji količino neponovljivih vrhov. Ta vključuje poravnavo vrhov (dolžine fragmentov) znotraj nabora ponovitev, standardizacijo količine analizirane DNA med ponovitvami, oblikovanje konsenznega profila vzorca samo s ponovljivimi vrhovi, standardizacijo količine analizirane DNA med vzorci, poravnavo vrhov standardiziranih konsenznih profilov vzorcev in na koncu primerjavo binarnih profilov vzorcev (prisotnost, odsotnost).

Naslednji pregled metode TRFLP (Kitts, 2001) je povzel ugotovitve 35 novih objav in izpostavil skoraj vse vidike metode. Omeniti velja dve področji. Avtor predlaga uporabo skupne površine elektroforetskih vrhov za mero skupne količine DNA pri standardizaciji količine analizirane DNA (Kaplan in sod., 2001) in ne višine vrhov (Dunbar in sod., 2000; Dunbar in sod., 2001). Drugo večje obravnavano področje je identifikacija vrhov s sekvencami v bazah sekvenc. Zaradi razlik med teoretičnimi in realnimi dolžinami fragmentov, ki se z naraščajočo dolžino fragmenta večajo, je potrebno pri iskanju v bazah okno zaznane dolžine primerno povečati za nekaj nukleotidov. Skupaj z že omenjeno nizko specifičnostjo restriktijskih encimov (Dunbar in sod., 2001), to močno oteži iskanje organizma, ki mu pripada elektroforetski vrh, tudi če poznamo točno dolžino fragmenta. Tudi z uporabo več encimov ali analize klonskih knjižnic izvora vrha še vedno ne moremo zanesljivo potrditi. Kot enega od najperspektivnejših vidikov uporabe TRFLP je avtor izpostavil iskanje korelacij med spremembami v profilih TRFLP in dejavniki okolja iz katerega izhaja mikrobna združba.

Razliko med teoretično in izmerjeno dolžino končnih fragmentov sta natančneje raziskala Kaplan in Kitts (2003). Kot že raziskovalci pred njima sta ugotovila, da prihaja do najmanjšega zamika z uporabo metode določanja vrhov »local southern«, povprečni zamik pa znaša -3bp. Največji delež zamika je posledica uporabe različnih fluorescentnih oznak standarda in začetnega oligonukleotida. Ta zamik je možno odpraviti z uporabo kompenzacije za različna barvila. Dodatno pa se tudi pri teoretično enako dolgih fragmentih pojavlja različen zamik. Razliko sta avtorja pripisala molekularni teži fragmenta oziroma količini purinskih baz v sekvenci. Relativno velike razlike med ponovitvami (do 5 bp) sta pripisala spreminjajoči temperaturi zraka v laboratoriju. Kljub minimizaciji zamika, je pri identifikaciji vrhov še vedno potrebno okno +/- 2bp, v novejših napravah pa predvidevata, da bi se dalo to okno zmanjšati na +/- 1bp.

Dodatno nejasnost povzročajo končni fragmenti, ki povsem odstopajo od pričakovane dolžine. Egert in Friedrich (2003) sta jih poimenovala pseudo-TRF. Ugotovila sta, da kar polovica klonov iz bakterijske knjižnice 16S rRNA poleg pričakovanega fragmenta tvori še nek drug fragment. Uporaba nukleaze, ki cepi enoverižno DNA (ssDNA), je popolnoma odpravila pojav pseudo-TRF. Cepitev z različnimi restrikcijskimi endonukleazami je pokazala, da so vzrok za pseudo-TRF pomnožki, si so delno enoverižni. Ti enoverižni deli tvorijo sekundarne strukture, zaradi katerih postane tudi ssDNA substrat za restrikcijske endonukleaze. Ugotovila sta tudi, da delež pseudo-TRF v profilu TRFLP narašča z naraščajočim številom ciklov PCR. Kljub številnim poizkusom pa nista uspela spremeniti reakcije PCR tako, da bi ob istem številu ciklov privedla do manjše količine pseudo-TRF.

Blackwood in sod. (2003) so pregledali več načinov primerjave združb z različno obdelavo profilov TRFLP. Učinkovitost statistične metode so ocenjevali predvsem v sposobnosti ne spregledati razlik med združbami tam, kjer razlike obstajajo (napaka tipa II). Analiza je temeljila na štirih skupinah mikrobnih vzorcev in tehničnih ponovitvah. Ugotovili so, da večjih razlik med različnimi pristopi primerjav ni in da je učinkovitost zelo odvisna od tipa vzorcev. Izmed mer podobnosti so primerjali evklidsko razdaljo, ki temelji na surovih višinah vrhov ali relativnih višinah vrhov, Hellingerjevo razdaljo, ki uporabi kvadratni koren relativne višine vrhov ali Jaccardovo razdaljo, ki temelji le na prisotnosti/odsotnosti vrhov. Analiza relativne višine vrhov in Hellingerjeva razdalja sta se pri analizi tehničnih

ponovitev izkazali bolje od analize surove višine vrhov. Jaccardova razdalja se je pokazala za enako učinkovito ali še boljše, če je bila skupna višina vrhov nad 10.000 enotami fluorescence. Poleg mer podobnosti so primerjali še tri statistične metode razporejanja vzorcev. Primerjali so analizo gruč z metodo neutežene aritmetične sredine (UPGMA), analizo gruč po Wardu in analizo redundance. Metoda po Wardu je nekoliko manj natančna, vendar je bolj učinkovita pri iskanju glavnih gruč kot metoda UPGMA. Metoda UPGMA bolje ponazarja razdalje med vzorci in bolje izloča vzorce, ki izstopajo. Analiza redundance s Hellingerjevo razdaljo je najbolj občutljiva metoda za ločevanje skupin vzorcev, kadar lahko vnaprej postavimo hipotezo. S spremljanjem ponovitev istega vzorca so opazili, da približno pol napak pri uvrščanju v gruče nastane zaradi naključnih dogodkov v PCR reakciji, pol pa zaradi razlik, ki nastanejo pri elektroforezi.

Ponovno so teoretične zmožnosti različnih restrikcijskih endonukleaz preverjali, ko je baza znanih sekvenc 16S rRNA vsebovala 14.870 sekvenc (Engebretson in Moyer, 2003). Z začetnima oligonukleotidoma 68F in 1510R sta teoretično pomnožila 4603 sekvence, ki so služile za analizo učinkovitosti vseh enostavno dostopnih restrikcijskih endonukleaz s štiri mestnim prepoznavnim motivom. Pri merjenju učinkovitosti, sta razčlenila dve omejitvi endonukleaz. To sta količina sekvenc, ki jih lahko razločimo s posamezno endonukleazo in število unikatnih fragmentov, ki jih lahko zajamemo v območju merjenja (50bp-500bp). Slednje se je izkazalo za bolj pomembno pri oceni učinkovitosti restrikcijskih endonukleaz. Največ končnih fragmentov v tem območju je nastalo pri uporabi *Bst*UI (4353). Največ različno dolgih fragmentov v tem območju pa so omogočile restrikcijske endonukleaze *Msp*I, *Hpy*188III, *Tsp*509I in *Hpy*188I (322, 320 295 in 283 fragmentov). Avtorja sta nato iz baze 4603 sekvenc oblikovala po 100 modelnih združb z bogatostjo 1,5,10, 50 in 100 in spremljala delež uspešno ločenih sekvenc s posamezno endonukleazo. Pri bogatosti 1 se je najbolje izkazala endonukleaza *Bst*UI z 98% učinkovitostjo cepitve sekvenc v opazovanem območju. *Bst*UI je bila najučinkovitejša še pri bogatosti 5 in 10. Pri bogatosti 50 je učinkovitost najuspešnejše endonukleaze padla na 71%, podobno učinkovitih pa je bilo sedem endonukleaz: *Bst*UI, *Dde*I, *Sau*98I, *Msp*I, *Hinf*I, *Hae*III in *Bs*II. Pri bogatosti 100 so se vse izkazale kot neučinkovite, še najbolje pa se je izkazala *Msp*I z 58%. Nadalje sta modelne združbe zaporedno cepila z več naključnimi endonukleazami. Pri bogatosti 1 je bila učinkovitost 100% po uporabi petih endonukleaz, pri bogatosti 100 pa je po 18

endonukleazah učinkovitost narasla na 60%. Če sta pri združbah z indeksom bogatosti 10 zaporedoma uporabila le 4 najbolj učinkovite endonukleaze, je bila učinkovitost ločevanja sekvenc 94%.

Sait in sod. (2003) so predlagali nov način določitve praga zaznave vrhov. Opazili so, da je število vrhov v posameznem profilu odvisno od skupne količine fluorescence (površine vseh vrhov) tega profila. Prag v obliki deleža površine vseh vrhov so postopoma dvigovali, dokler niso prišli do najnižje vrednosti, pri kateri opisana odvisnost ni bila več očitna. Isto vrednost praga v obliki deleža celotne površine so uporabili za ves nabor profilov. Pri njihovem naboru profilov so tako prišli do vrednosti praga 5%, s čimer so v povprečju obdržali 78% celotne površine profila. Kasneje so to metodo poimenovali prag konstantnih deležev (Osborne in sod., 2006).

Rees in sod. (2004) so uporabili multivariatne statistične metode ordinacije in testiranje statistične značilnosti v povezavi s TRFLP. Kot mero podobnosti med vzorci so predlagali koeficient Bray-Curtis, medtem ko po njihovem mnenju evklidska razdalja ni primerna za analizo TRFLP, ker napačno interpretira odsotnost vrhov v vzorcih, ki jih primerja. Za predstavitev razdalj med vzorci so predlagali uporabo nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (NM-MDS). Največkrat uporabljena analiza gruč zaradi svoje dihrotomne narave omejuje pogled na prave odnose med skupinami vzorcev. Analiza glavnih komponent (PCA), ki jo raziskovalci tudi večkrat uporabljajo, po njihovem mnenju tudi ni primerna, saj je njena predpostavka normalna razporeditev. Najbolj znan neželen pojav pri taki ordinaciji je razporeditev v obliki podkve, ki lahko zabriše prave odnose med vzorci. Za testiranje značilnosti ugotovljenih skupin vzorcev so predlagali uporabo statistične metode ANOSIM.

Osborne in sod. (2006) so se lotili racionalizacije postavitve praga detekcije, ki še vedno ni standardiziran. Hkrati so iskali metodo s katero bi ocenili zanesljivost zaznanih podobnosti med vzorci. Primerjali so že opisani metodi standardizacije na najmanjšo skupno fluorescenco (Dunbar in sod., 2001), metodo praga konstantnih deležev (Sait in sod., 2003) in metodo praga variabilnih deležev, ki so jo opisali v tej objavi in združuje lastnosti prvih dveh. Po njihovi metodi najprej ugotovimo vrednost, ki je skupna vsem profilom, s katero

moramo deliti površine vrhov, da te niso več odvisne od začetne skupne fluorescence profila. Nato izračunamo optimalni prag za vsak profil posebej, tako da skupno fluorescenco profila delimo s to vrednostjo. Metode so primerjali na naboru 17 vzorcev, ki je vključeval tri vzorcev v dveh ponovitvah. Ko so sestavljali dendrograme po metodi najmanjših kvadratov Fitch-Mergoliash se je njihova metoda postavljanja praga najbolj izkazala pri združevanju ponovitev istega vzorca. Pri sestavljanju dendrogramov z metodo združevanja sosedov (Neighbor Joining) so bili rezultati drugačni in se je več metod izkazalo enako dobro. Učinkovitosti načinov postavljanja spodnje meje analize (praga) so primerjali tudi s primerjavo dendrogramov, ki so jih pridobili po uporabi šestih različnih restrikcijskih endonukleaz. Pri tem so predpostavili, da je enako vozlišče pri različnih endonukleazah odraz uspešnosti metode. Rezultati so zelo podobni zgoraj opisanim ugotovitvam s ponovitvami vzorcev, torej nekonsistentni za različne metode sestavljanja dendrogramov. Predlagali so tudi, da bi s številom skupnih vozlišč različnih endonukleaz ocenjevali zanesljivost ugotovljenih razlik med mikrobnimi združbami s TRFLP.

Četrto metodo določanja praga, konceptualno precej drugačno od že opisanih, so opisali Abdo in sod. (2006). V postopku določitve meje med vrhovi, ki predstavljajo šum in vrhovi mikrobne združbe predpostavimo, da je prava vrednost šuma enaka 0. Postopoma iz profila izločamo vrhove, ki odstopajo od te predpostavke na osnovi pravila treh standardnih deviacij. Končni profil mikrobne združbe je bil torej sestavljen iz vseh vrhov, ki so jih izločili iz profila šuma. Metodo so predstavili kot uspešno na simuliranem naboru vzorcev.

Raziskovalce je zanimalo tudi kako razmerja v količini vrhov odražajo številčna razmerja v preprostih simuliranih združbah sestavljenih iz petih bakterijskih sevov (Frey in sod., 2006). Ugotovili so, da se vrhovi pridobljeni iz sevov katerih celice so bolj občutljive na lizo, v profilu pojavijo v večjem deležu. Prav tako pravih razmerij niso uspeli ugotoviti kadar so uporabili mešanice genomskih DNA, tudi če so upoštevali velikost genoma in število rRNA operonov. Pojav je tako kompleksen, da na podlagi eksperimentov niso uspeli določiti korekcijskih faktorjev za posamezne seve. Zaključili so, da je metoda zelo omejena, kar se tiče informativnosti o deležu posameznih pripadnikov mikrobne združbe.

Obsežen pregled metode so naredili Schutte in sod. (2008). Ugotovili so, da se je TRFLP največkrat uporablja v povezavi s 16S rRNA. Pregledali so posamezne stopnje v izdelavi profila mikrobne združbe. Analizirali so največkrat uporabljene začetne oligonukleotide in ugotovili, da noben ne zajame vseh sekvenc. Pogosto uporabljen začetni oligonukleotid, ki nalega na mesta 8-27 (številčenje po *E. coli*), tako naprimer brez neujemanj baz pokrije 76% takratne baze sekvenc, z dvema neujemanjema baz pa 98%, podobni deleži pa veljajo tudi za ostale pogosto uporabljene začetne oligonukleotide (od 60% do 99%). Predlagali so tudi, da je kljub orodjem za teoretično najprimernejšo izbiro začetnih oligonukleotidov in restrikcijskih endonukleaz, potrebno zmožnosti izbranih orodij preizkusiti v praksi. Tako so naprimer Osborne in sod. (2005) opazili vrhove, ki predstavljajo artefakte pri TRFLP z začetnima oligonukleotidoma 27f in 1492r. Ugotovili so tudi, da ni enotnih pristopov pri analizi podatkov, od določanja praga detekcije, razvrščanja vrhov v kategorije, izbire mere podobnosti, izbire metode analize in predstavitve podobnosti ter povezave razlik združbe z razlikami v okolju (Schutte in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS KRAJA IN NAČINA VZORČENJA

Vzorci tal je odvezel Blaž Stres s sodelavci v okviru odprav na območje osrednje Himalaje. Vzorčili so južno pobočje jugovzhodnega grebena vrha Drohmo (6980 m nm) nad ledenikom Kanchenjunga (27°48'00" N, 88°07'01" E). V oktobru leta 2002 so vzorčili na šestih nadmorskih višinah med 5000 m nm in 6000 m nm, vsakih 200 višinskih metrov. Pri vseh vzorčenjih so na vsaki horizontalni ravni v širini 200 m odvzeli štiri prostorsko ločene, enakomerno razmaknjene vzorce. Vsak izmed njih je bil sestavljen iz 20 sredic premera 3 cm, ki so v globino segale do zamrznjene ali kameninske podlage. Na 5000 m so pobrali peščen material s površne ledenika. Na 5200 m je bilo na položni ledeniški moreni približno 10 cm tal pokritih z vegetacijo, v kateri prevladujejo vrste šašev in trav iz rodov *Kobresia* in *Poa*. Trave in mahovi so uspevali tudi na 5400 m, kjer je bila plast tal globoka približno 5 cm, naklon pobočja pa je narasel na približno 25°. Na 5600 m so bile na plitvi podlagi prisotne le še zaplate mahov med večjimi skalami. Vegetacija je bila popolnoma odsotna na nadmorski višini 5800 m, kjer so vzorčili peščeno podlago, ki je bila pomešana z večjim kamenjem. Naklon pobočja je narasel na 40°. Na vrhu pobočja, 6000 m nm, so bila območja golih tal le v zavetrju večjih skal. V novembru 2005 in marcu 2006 so še enkrat vzorčili isto pobočje, tokrat le na dveh nadmorskih višinah in sicer na 5200 m in 6000 m nm. Povprečna letna temperatura v obdobju 1998 – 2001 v neposredni bližini mesta vzorčenja (27°48'16" N, 88°06'03" E) je bila -7,1°C (Ishikawa in sod., 2001). Nadmorska višina je bila izmerjena z GPS napravo Magellan Meridian Gold (Magellan, Santa Clara, CA, ZDA) Mesto vzorčenja so s fotografijami predstavili Stres in sod. (2010). Dele vzorcev namenjene biološkim in kemijskim analizam so zamrznili na mestu vzorčenja in nato v laboratoriju hranili do obdelave pri -20°C, dele namenjene fizikalnim analizam pa so do analize hranili pri +4°C. Predvsem za kontrolo tehničnega dela molekularno bioloških analiz smo vzporedno s himalajskimi vzorci obdelovali tudi dva popolnoma nepovezana vzorca tal iz zmernege podnebnega pasu, enega pridobljenega na osušenih tleh Ljubljanskega barja, drugega pa na mineralnih tleh v agronomski rabi. Podrobneje so omenjena vzorca opisali Stres in sod. (2010).

3.2 IZDELAVA MOLEKULARNO BIOLOŠKEGA ODTISA MIKROBNE ZDRUŽBE Z METODO TRFLP

Iz vzorcev tal smo osamili DNA. Mikrobna DNA je služila kot matrica za pomnoževanje dela bakterijskega gena za 16S rRNA v verižni reakciji s polimerazo. Produkt te reakcije smo v ločenih reakcijah cepili s tremi restrikcijскими endonukleazami in končne (terminalne) dele (fragmente), ki so vsebovali s fluorescentnim barvilom označen začetni oligonukleotid, zaznali s kapilarno elektroforezo. Tako smo prišli do profila končnih fragmentov bakterijskih genov za 16S rRNA (TRFLP - polimorfizem dolžin končnih restrikcijских fragmentov, angl: terminal restriction fragment length polymorphism) za posamezen vzorec tal.

3.2.1 Shema laboratorijske obdelave vzorcev

Iz vsakega od 24 vzorcev tal odvzetega v letu 2002 smo osamili DNA v treh ponovitvah s čimer smo dobili 72 vzorcev DNA, ki smo jih nato obravnavali popolnoma neodvisno do izdelave profilov TRFLP. Da bi zmanjšali vpliv naključij na reakcijo PCR, smo vsak vzorec DNA uporabili kot matrico v treh ločenih verižnih reakcijah s polimerazo s popolnoma enakimi reakcijskimi mešanici in pogoji pomnoževanja. Produkta teh treh reakcij smo združili in jih uporabili v treh ločenih restrikcijских reakcijah z različnimi restrikcijскими endonukleazami. Iz vsakega vzorca tal smo tako pridobili devet profilov TRFLP. V nadaljevanju smo se na podlagi analize rezultatov vzorcev iz leta 2002 odločili za delno spremenjen sistem analize vzorcev. Pri vzorcih iz let 2005 in 2006 smo iz enega vzorca tal pridobili le en vzorec DNA, ki pa je služila kot matrica v štirih verižnih reakcijah s polimerazo. Produkta dveh reakcij smo združili in v ločenih reakcijah izpostavili trem restrikcijским endonukleazam. Iz enega vzorca tal smo tako pridobili šest profilov TRFLP.

3.2.2 Osamitev mikrobne DNA iz tal

DNA smo iz vzorcev osamili s pripravljenim kompletom za osamitev mikrobne DNA iz tal (MOBIO UltraClean Soil DNA Isolation Kit) po navodilih proizvajalca (MO BIO Laboratories, Carlsbad, ZDA). V posamezni osamitvi smo uporabili 1g vzorca tal, oziroma 0,5g, kadar osamitev iz enega grama ni bila uspešna. Metoda vključuje kombinacijo mehanske in kemijske lize celic, obarjanje huminskih kislin in proteinov, vezavo DNA na silikatno membrano in čiščenje z etanolno raztopino. Za večji izkoristek smo izbrali različico metode, ki vključuje uporabo večjega volumna nanašalnega pufra. Prisotnost DNA v vzorcu smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Koncentracijo DNA v raztopini smo izmerili spektrofotometrično z napravo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). DNA smo shranili v elucijskem pufu pri -20°C do nadaljnje uporabe.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižne reakcije s polimerazo smo izvajali v končnem volumnu 20 μl na napravi GeneAmp 2700 (Applied Biosystems). Uporabili smo začetni oligonukleotid 27F (Weisburg in sod., 1991) s fluorescentno oznako FAM in neoznačen začetni oligonukleotid 926R (Watanabe in sod., 2001). Reakcija je vsebovala: eno enoto polimeraze DNA Taq, pufer za PCR s KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP (vse Fermentas) 0,4 mg/ml BSA (NEB), 1% formamida (Applied Biosystems), 1 mM vsakega od začetnih oligonukleotidov in raztopino DNA. Matrično DNA smo zaradi različne koncentracije DNA osamljene iz vzorcev tal in različne stopnje inhibicije PCR redčili od 2 do 10 krat, tako da smo iz vseh vzorcev pomnožili približno enako količino produkta PCR. V reakcijah PCR smo uporabili približno 5 ng skupne mikrobne DNA. Začetni pet minutni denaturaciji DNA pri 94°C je sledilo 26 ciklov s tremi enominutnimi koraki pri 94°C , 53°C in 72°C ter končnih 5 minut pri 72°C . Prisotnost produkta PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Količino nastalega produkta smo ocenili preko znane količine velikostnega in količinskega standarda Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) nanesenega skupaj z vzorci na agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 1: Oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje dveh delov gena za 16S rRNA
Table 1: Oligonucleotides used for 16S rRNA PCR

Ime	Nukleotidno zaporedje 5' ---> 3'	5' prileganje (po <i>E. coli</i>)	Fluorescentna oznaka
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8	FAM
926R	CCG TCA ATT TTR AGT TT	926	-
V4F	AYT GGG YDT AAA GVG	554	JOE
V4R	TAC NVG GGT ATC TAA TCC	793	-

3.2.4 Cepitev produktov PCR z restrikcijskimi endonukleazami in kapilarna elektroforeza

Produkte PCR smo ločeno cepili s tremi restrikcijskimi endonukleazami, s čimer smo povečali ločitveno moč metode TRFLP. Izbrali smo pogosto uporabljene restrikcijske endonukleaze *BsuRI*, *HhaI* in *MspI*. V reakciji smo uporabili približno 150 ng produkta PCR in 10 enot restrikcije endonukleaze v ustreznem pufru (Fermentas). Reakcijo smo dopolnili do 30 µl z deionizirano vodo. Cepitev je potekala 16 ur pri 37°C. Ustavili smo jo z 20 minutno inkubacijo pri 80°C.

Produkte cepitve smo pred kapilarno elektroforezo razsolili. Oborili smo jih z dodatkom ene desetine volumna 3 M Na-acetata, dveh volumnov ohlajenega absolutnega etanola (-20°C) in 30 minutno inkubacijo na ledu. Vzorce smo centrifugirali 30 min pri 0°C in 15000g, jih sprali s 70% etanolom, posušili na zraku in shranili pri -20°C.

Za kapilarno elektroforezo smo vzorce pripravili z resuspendiranjem peleta v 12 µl formamida Hi-Di (Applied Biosystems), ki smo mu dodali 0,4 µl/vzorec standarda za kapilarno elektroforezo GeneScan 500 ROX. Nukleinske kisline smo denaturirali 3 minute pri 95°C in jih nato na hitro ohladili na ledu. Kapilarna elektroforeza je potekala na aparaturi Abi Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) pri 60°C in napetosti 15 kV na polimeru POP-4.

3.2.5 Obdelava rezultatov kapilarne elektroforeze in predstavitev razlik med vzorci

Posamezen elektroferogram smo omejili na dolžino 50 do 500 b s programom GeneScan 3.1 (Applied Biosystems) in ga vnesli v program Bionumerics (Applied Maths NV, Belgija). S programskim filtrom Abiconv smo iz rezultatov kapilarne elektroforeze oblikovali sliko gela, v kateri smo posamezne vzorce normalizirali z internimi standardi GeneScan 500. Iz normaliziranih elektroferogramov smo za vsak par izračunali Pearsonov koeficient korelacije pri optimizaciji 0,05%. Z metodo neutožene aritmetične sredine (UPGMA) smo iz matrike podobnosti ustvarili dendrogram v katerem smo iskali gruče vzorcev (angl. Cluster analysis). Razlike med vzorci smo prikazali tudi z metodo analize glavnih koordinat (angl. Principal coordinates analysis, PCO). Zaradi preglednosti predstavitev smo pri tem prikazu rezultatov tri osamitve DNA istega vzorca obravnavali kot ponovitve istega vzorca, izračunali povprečje treh matrik ter nastalo matriko vnesli v biostatistični program Canoco 4.5 (Microcomputer Power, ZDA) s katerim smo izvedli analizo v skladu z navodili (poglavje 3.12.). Rezultate smo grafično predstavili s programom CanoDraw, ki je del istega programskega paketa.

3.3 PRIMERJAVA REZULTATOV TRFLP ZAČETNEGA DELA GENA ZA 16S rRNA S TRFLP VARIABILNE REGIJE 4 (V4)

Rezultate TRFLP opisane v zgornjih poglavjih smo želeli izkoristiti kot izhodišče za podrobnejši opis mikrobne združbe. Ena od možnosti nadaljnega opisa je bilo tudi pirosekvenciranje variabilne regije 4 gena za 16S rRNA (V4), s katerim bi pridobili nekaj tisoč delnih sekvenc bakterijskih genov 16S rRNA iz posameznega vzorca. Najprej pa smo želeli preveriti možnost razlikovanja med vzorci z različico metode TRFLP, ki temelji na analizi regije V4 in primerjati rezultate obeh preučevanih regij ribosomskih genov. Za primerjavo obeh pristopov TRFLP smo se omejili na vzorce iz treh zaporednih vzorčenj tal na nadmorski višini 6000 m in dveh nehimalajskih vzorcev. Spet smo ločeno uporabil tri restrikcijske endonukleaze, združevali smo po tri reakcije PCR, iz vsakega vzorca tal smo dvakrat osamili DNA in vsak vzorec DNA smo uporabili za izdelavo enega

elektroferograma za vsako restrikcijsko endonukleazo. Torej smo iz enega vzorca tal pridobili šest elektroferogramov.

Najprej smo pomnožili del gena za 16S rRNA, ki obsega variabilno regijo 4. Uporabili smo začetne oligonukleotide (V4F, V4R, preglednica 1; Sul in sod., 2011) za pomnoževanje 240bp dolgega dela gena za 16S rRNA, ki zajema celotno variabilno regijo 4 in del prilegajočih ohranjenih regij. Reakcija je vsebovala: eno enoto polimeraze DNA Taq, pufer za PCR s KCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP (vse Fermentas) 0,4 mg/ml BSA (NEB), 0,5 mM vsakega od začetnih oligonukleotidov in raztopino DNA. Uporabili smo enake količine DNA kot za pomnoževanje začetnega dela gena za 16S rRNA. Začetni triminutni denaturaciji DNA pri 95°C je sledilo 30 ciklov s tremi koraki: 20 sekund pri 95°C, 30 sekund pri 48°C in 25 sekund pri 72°C. Pomnoževanje smo zaključili z dvominutnim korakom pri 72°C. S pomnožki smo nato postopali enako kot smo opisali v poglavju 3.2.4 za začetno regijo 16S rRNA. Prav tako smo na enak način analizirali rezultate kapilarne elektroforeze (3.2.5), s to razliko, da smo tokrat elektroferograme omejili na dolžino od 40 do 225 bp.

V programu Bionumerics smo preverili skladnost (angl. Congruance) vseh šestih posameznih eksperimentov TRFLP (2 pomnožka 16S rRNA in 3 restrikcijske endonukleaze), kot tudi združenih eksperimentov posameznega pomnožka. Izrisali smo dendrogram na podlagi matrike medsebojne skladnosti eksperimentov. Z grafi podobnosti (angl. Similarity plot) smo primerjali rezultate vseh eksperimentov na ravni podobnosti posameznih parov elektroferogramov v dveh eksperimentih.

3.4 VPLIV OKOLJA NA MIKROBNO ZDRUŽBO

3.4.1 Fizikalne in kemijske analize tal

Delež organskega ogljika in skupnega dušika v tleh smo ugotovili po metodi, ki sta jo opisala Hedges in Stern (1984) z analizatorjem elementov Carlo Erba 1108 (Nacionalni inštitut za Biologijo, Morska biološka postaja Piran). Vzorce tal smo v terilnici zmleli v

prah in jih posušili. Karbonate smo odstranili z 1M HCl. Sežig je potekal pri 1020°C. Meritve smo izvedli v treh ponovitvah. V statističnih analizah vpliva okolja na mikrobno združbo smo uporabili utežni delež posameznega elementa v vzorcu. Teksturo tal smo preučevali s standardno sedimentacijsko metodo s pipetiranjem (Alef in Nannipieri, 1995). Na kratko, vzorce tal smo najprej presejali skozi 2 mm sito in zavrgli večje delce. Nato smo vzorce presejali skozi 0,2 mm sito. Na situ je ostal grobi pesek, kar je prešlo sito pa s stresanjem spravili v suspenzijo v 2% KCl. Tež smo v natančno določenih časovnih intervalih odvezali frakcije z določene globine, katerim smo po sušenju določili maso. Tako smo pridobili še podatke za deleže finega peska, grobega in finega melja ter glin, ki smo jih nato uporabili v multivariatni statistični analizi. Za meritev pH tal (aktivna kislost) smo 5 g tal zmešali z 12 ml deionizirane vode. Po eni uri z rahlim mešanjem, smo izmerili pH prefiltrirane suspenzije s pH metrom Orion 520A (Orion Research, ZDA).

3.4.2 Obdelava podatkov TRFLP in statistična analiza

Iz gelov v programu Bionumerics smo izvozili podatke o velikosti (bp) in relativni fluorescenci začetnih fragmentov v posameznem vzorcu, ki so predstavljali več kot 1% fluorescence posameznega vzorca. S programom T-Align smo poiskali skupne fragmente v naboru vseh podatkov z intervalom zaupanja 0,5. V programu Excel (Microsoft) smo iz treh ponovitev ustvarili konsenzni profil vsakega vzorca tal za vsako endonukleazo posebej, pri čemer smo izračunali povprečje prisotnosti v posameznem vzorcu, če se je fragment pojavil vsaj v dveh od treh profilov. Tabela velikosti fragmentov DNA in njihove relativne zastopanosti v konsenznem profilu smo uporabili kot preglednico vrst (angl. species table) v programu Canoco 4.5. Podatke o kemijskih in fizikalnih lastnostih tal smo uporabili kot preglednico okolja (angl. environmental table). Kjer ni omenjeno drugače, smo vse analize opravili po navodilih za uporabo, ki so priložena programu (CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide). Osredotočili smo se predvsem na kanonično korespondenčno analizo (angl. Canonical Correspondence analysis, CCA) in analizo redundance (angl. Redundancy Analysis, RDA). Najprej smo pregledali vpliv dejavnikov z avtomatskim izborom (angl. auto forward selection), nato pa pri ročni izbiri in pojasnjevanju vpliva posameznega dejavnika okolja (angl. manual

forward selection) poleg vrednosti λ in F upoštevali še statistično značilnost s permutacijskim testom Monte Carlo, ki je na voljo v okviru programskega paketa Canoco (Microcomputer Power, ZDA). Tako smo izmed vseh izmerjenih dejavnikov okolja izluščili najbolj verjetne dejavnike okolja, ki vplivajo na strukturo mikrobne združbe in opredelili njihov vpliv.

3.5 KLONSKI KNJIŽNICI

Pripravili smo dve klonski knjižnici genov za 16S rRNA. Na podlagi rezultatov TRFLP smo se odločili za pripravo klonske knjižnice iz enega vzorca tal iz nadmorske višine 5200 m in enega vzorca iz nadmorske višine 6000 m. Za vsako knjižnico smo združili DNA treh osamitev DNA iz 1g tal. Pomnožke PCR smo pripravili z začetnima oligonukleotidoma 27F in 926R na enak način kot za profiliranje mikrobne združbe s TRFLP (opisano v poglavju 3.2.3). Združili smo produkte petih ločenih reakcij PCR in jih očistili z izrezom produkta PCR iz gela (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Z očiščenim produktom PCR smo transformirali kompetentne celice *E.coli* Dh5 α s pripravljenim kompletom za kloniranje CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). Uporabili smo različico kloniranja v vektor pJET1.2/blunt z lepljivimi konci. Selekcija klonov temelji na odpornosti na ampicilin in prisotnosti smrtnega gena, ki ga vstavljeni del DNA onespobi. Uspešnost kloniranja smo preverili s PCR na osnovi analize dvajsetih naključnih klonov vsake knjižnice. Sekvenciranje 192 klonov iz vsake knjižnice so po naročilu opravili v družbi Macrogen (Seul, J. Koreja) z metodo po Sangerju.

3.5.1 Obdelava sekvenc 16S rRNA

Rezultate avtomatskega sekvenciranja smo najprej vnesli v program Codon Code Aligner 3.0.2 (CodonCode Corporation, ZDA). Izločili smo dele sekvenc, ki so vsebovali sekvenco vektorja in dele sekvenc, ki niso zadostili standardom kvalitete, torej tiste, ki so imeli več kot 5 baz s kvaliteto sekvenciranja pod phred 20 v oknu 25 baz. Na koncu smo izločili vse sekvence, ki niso vsebovale vsaj 250 baz s kvaliteto nad phred 20. Z orodjem

spletnega servisa Ribosomal Database Project (RDP release 10, Cole in sod., 2009) smo vse sekvence orientirali v isto smer in izvozili v formatu fasta. Vse lokalne manipulacije knjižnic smo nato opravljali s programom Bioedit (Hall, 1999). Sekvence smo pregledali s spletnim programom Chimera Check v okviru spletnega mesta RDP (release 8, Cole in sod., 2005) in programom Bellerophon, ki deluje v okviru spletnega servisa Greengenes (DeSantis in sod., 2006). Sekvencam smo poiskali tudi podobne sekvence s programom Megablast v okviru spletnih servisov NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) in preverili stopnjo ujemanja z različnimi deli sekvenc. Na podlagi teh treh analiz smo izločili potencialne himerne sekvence.

3.5.2 Filogenetska uvrstitev sekvenc in mikrobná pestrost

Uvrstitev sekvenc na nivoju filogenetskih debel smo najprej opravili z orodjem RDP Classifier v okviru spletnega servisa RDP release 10 (RDP Naive Bayesian rRNA Classifier, verzija 2.2, marec 2010, Cole in sod., 2009). Stopnjo zaupanja smo pustili na prednastavljeni vrednosti 80%. Filogenetske analize smo opravili s sekvencami, ki smo jih poravnali z algoritmom NAST spletnega servisa Greengenes (DeSantis in sod., 2006) s konstantno dolžino poravnave ali algoritmom SINA, ki deluje v okviru spletne baze Silva (Pruesse in sod., 2007). Drevo prikazano v prilogi je narejeno iz sekvenc, ki smo jih pridobili v tem delu in nepodvojenih dveh najbolj podobnih sekvenc iz baze Silva, vse skupaj poravnane z algoritmom SINA. Sekvence iz baze so predstavljene v skladu s taksonomijo projekta Silva. Filogenetsko drevo smo ukoreninili s sekvencami bakterij iz debela *Thermotogae*. Uporabili smo algoritem Maximum likelihood programa Treefinder (Jobb in sod., 2004), z enim nivojem iskanja najbolj verjetnega drevesa in modelom evolucije GTR (Empirical/Optimum). Vsa programska orodja so bila uporabljena po navodilih avtorjev.

Analizo pestrosti knjižnic smo opravili s programom MOTHUR (Schloss in sod., 2009) Filogenetsko oddaljenost sekvenc smo izračunali s programom DNADist 3.6 (Felsenstein, 1985) ob upoštevanju modela evlucijskih sprememb Jukes-Cantor iz sekvenc, ki smo jih poravnali z algoritmom SINA (Pruesse in sod., 2007). S programom MOTHUR smo z

algoritmom povprečno oddaljenega soseda (angl. Average neighbor) preko matrike oddaljenosti ugotovili število operacijskih taksonomskih enot (OTU) za posamezne taksonomsko zanimive stopnje oddaljenosti. S programom MOTHUR smo pripravili tudi krivulje rarefakcije za različne stopnje oddaljenosti in izračunali indekse pestrosti pri oddaljenosti OTU 0,03.

3.5.3 Primerjava pridobljenih knjižnic s knjižnicami, ki so vključevale podobne sekvence in knjižnicami iz podobnih okolij

Iz podatkovne baze RDP smo pridobili vse klonske knjižnice 16S rRNA iz hladnih talnih okolij, ki smo jih uspeli najti v literaturi. Dodali pa smo še nekaj knjižnic iz drugih hladnih okolij (ledu in snega) ter nekaj knjižnic iz različnih okolij, v katerih smo našli več sekvenc z veliko podobnostjo s himalajskimi sekvencami. V analizo smo vključili še nekaj obsežnejših objavljenih knjižnic iz vzorcev tal. Vse pridobljene knjižnice smo poravnali z algoritmom NAST na spletnem servisu Greengenes (DeSantis in sod., 2006). Objavljene knjižnice smo združevali v nabore sekvenc velikosti od 1200 do 5000 sekvenc skupaj s himalajskima knjižnicama in iz njih tvorili filogenetska drevesa z Maximum likelihood algoritmom programa Treefinder (Jobb in sod., 2004), z enim nivojem iskanja najbolj verjetnega drevesa in modelom evolucije GTR (Empirical/Optimum). Filogenetska drevesa smo skupaj z datoteko, v kateri smo definirali pripadnost vsake sekvence posamezni knjižnici, vnašali v spletni program UniFrac (Lozupone in sod., 2006). Z njim smo na podlagi skupne in edinstvene filogenetske poti sekvenc posamezne knjižnice oblikovali distančne matrike knjižnic, iz katerih smo razbrali katere knjižnice so najbolj podobne knjižnicam iz Himalaje. Na koncu smo sestavili dva nabora knjižnic s približno 5000 sekvencami, enega s knjižnicami najbolj podobnimi knjižnici s 5200 m nm in drug nabor s knjižnicami najbližje knjižnici s 6000 m nm. Distančne matrike smo predstavili z analizo glavnih koordinat (PCO) s programoma Canoco in CanoDraw (Microcomputer Power, ZDA).

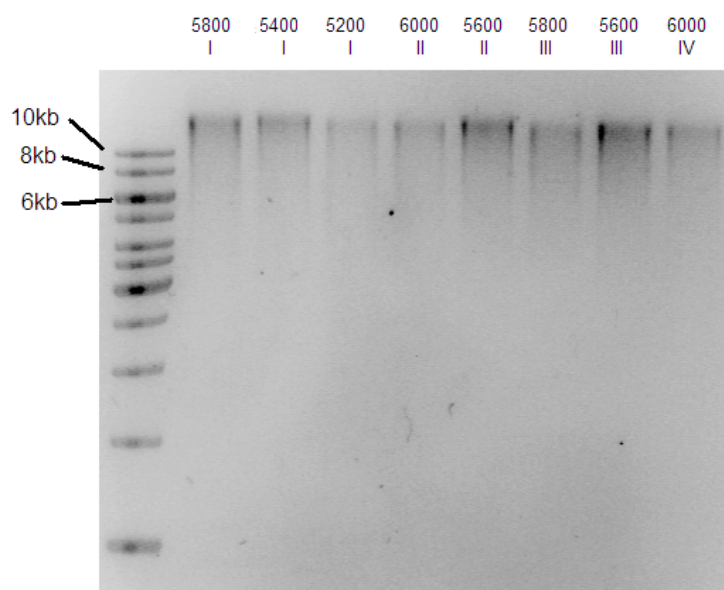
4 REZULTATI

4.1 MOLEKULARNO BIOLOŠKI PROFIL MIKROBNE ZDRUŽBE PREUČEVANIH TAL

Za višinski profil tal pobočja v osrednji Himalaji med 5000 in 6000 m nadmorske višine, z višinskim razmakom 200 m smo pripravili molekularno biološki profil mikrobne združbe z metodo TRFLP. Vzorce smo odvzeli v oktobru 2002 in sicer na vsaki nadmorski višini na štirih lokacijah v razmaku 200 m. Vzorce z iste nadmorske višine smo označili z rimskimi številkami (I, II, III in IV). Na nadmorski višini 5200 in 6000 m smo vzorce odvzeli še v novembru 2005 in marcu 2006, s čimer smo dobili vpogled v mikrobno združbo v treh časovnih točkah.

4.1.1 Mikrobna združba višinskega profila pobočja

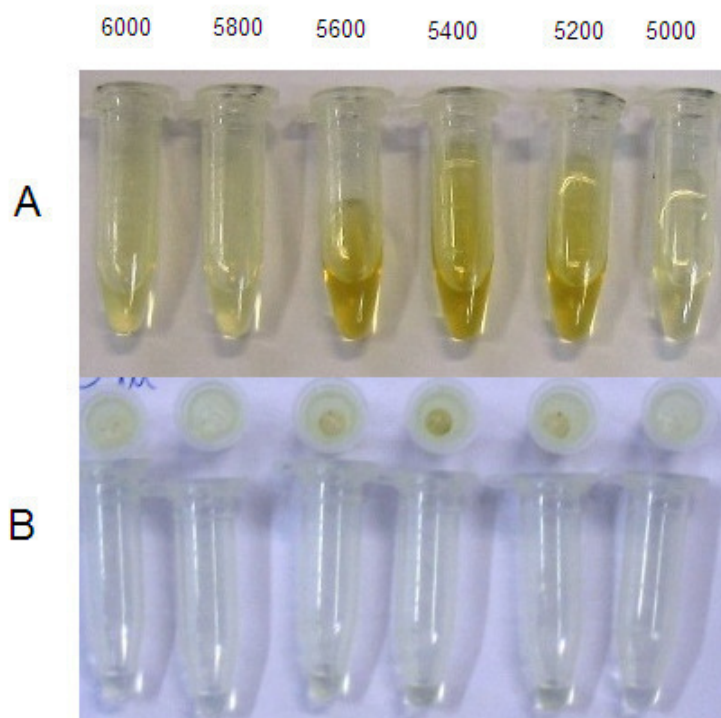
Izdelavo profila smo pričeli z osamitvijo DNA iz enega grama vzorca tal s komercialnim paketom za osamitev DNA iz tal. Rezultat osamitve je bila suspenzija DNA v 50 μ l elucijskega pufra. Uspešnost osamitve DNA smo preverili z gelsko agarozno elektroforezo petih mikrolitrov suspenzije. Prisotnost DNA smo potrdili v vseh vzorcih z izjemo vzorcev ene izmed štirih lokacij s 5000 m. V vseh vzorcih, kjer smo lahko opazili DNA, je bila ta strukturno dokaj ohranjena, saj je bila večina DNA v delih večjih od 10 kb. Po pričakovanjih smo iz različnih vzorcev osamili različne količine DNA. Količina DNA se je razlikovala tudi med ponovitvami osamitve DNA istega vzorca, razlika je bila večja med ločenimi vzorci z iste nadmorske višine. Med vzorci iz različnih nadmorskih višin pa je bila razlika pričakovano največja. Iz agaroznega gela ocenjena količina DNA iz vzorcev odvzetih na 5000 m je bila tako približno petdesetkrat manjša od tiste iz vzorcev s 5600 m. Ocenili smo, da smo iz grama tal osamili od 20 ng do 1 μ g DNA. Gel agarozne elektroforeze z osamljeno DNA iz 8 naključnih vzorcev je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Agarozna gelska elektroforeza DNA osamljene iz osmih vzorcev himalajskih tal iz leta 2002. Levo velikostna lestvica Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Figure 1: Agarose gel electrophoresis of DNA from eight samples of himalayan soil retrieved in year 2002. Left lane Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Razlike med vzorci, ki smo jih odvzeli na različnih nadmorskih višinah, smo opazili že med postopkom osamitve DNA. Na sliki 2 (A) so prikazane raztopine DNA enega vertikalnega profila med postopkom osamitve DNA, pred nanosom na silikatno kolono. Razliko v barvi raztopine smo opazi tudi v elucijskem pufra, ki pa je slabše vidna (B). Kljub uporabi različice protokola osamitve, ki je namenjena pridobivanju boljše očiščene DNA (uporaba več korakov spiranja in večje količine etanolne raztopine za spiranje) smo v končni suspenziji DNA zaznali prisotnost različne količine neznanih obarvanih primesi.

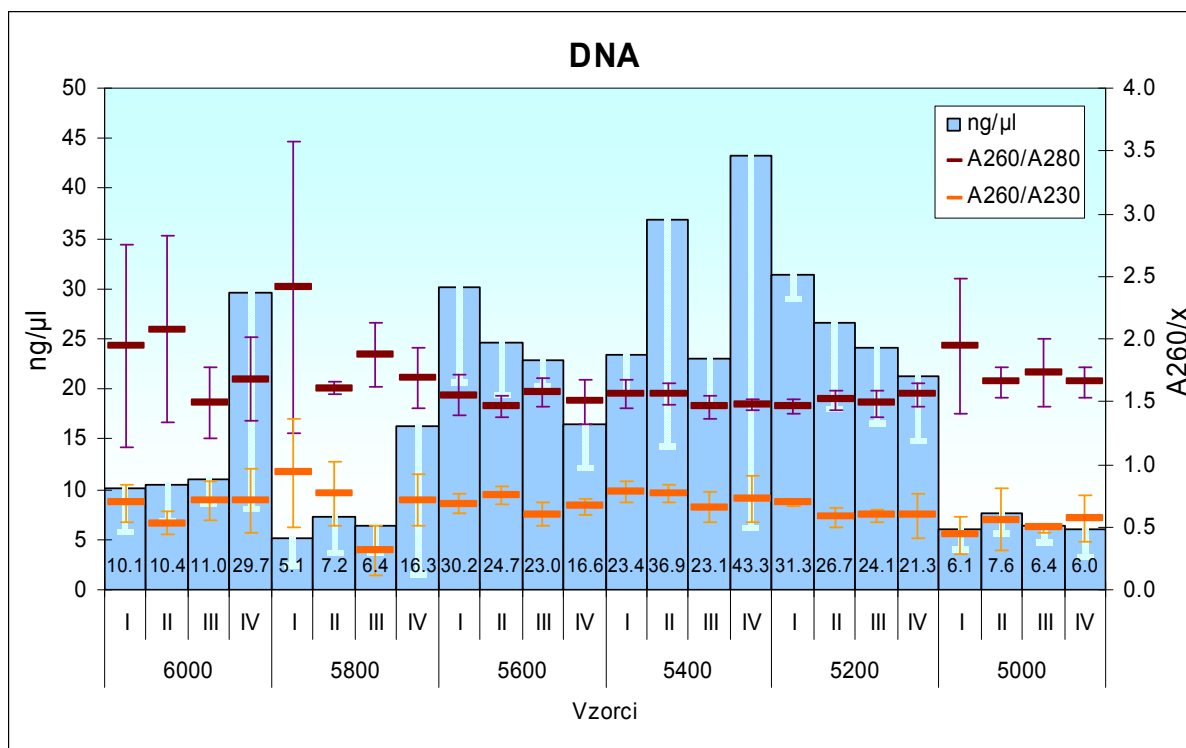


Slika 2: Vzorci tal v postopku osamitve DNA. Zgoraj (A) raztopine DNA pred nanosom na silikatno kolono. Z leve proti desni si sledijo vzorci od 6000 m do 5000 m. Spodaj (B) DNA v elucijskem pufru ter nosilec s silikatno kolono.

Figure 2: Soil samples in the process of DNA isolation. Solution of DNA prior to kit silica column application (A). From left to right 6000 m towards 5000 m samples. DNA in elution buffer and kit silica column after elution.

Količino in čistost DNA smo preverili tudi spektrofotometrično z napravo Nanodrop. Izmerjena količina DNA je med ponovitvami istega vzorca nihala mnogo bolj, kot smo ocenili z elektroforezo. Pri vzorcih s 5200, 5400 in 5600 m smo v povprečju treh osamitev izmerili koncentracijo med 17 in 43 ng/ μ l oziroma med 0,85 in 2,15 μ g/g tal (slika 3). Primarni indikator čistosti DNA, to je razmerje A_{260}/A_{280} , je bilo pri teh vzorcih bolj konstantno kot pri drugih vzorcih in je bilo med 1,5 in 1,6. To je sicer nižje od vrednosti 1,8, ki velja za čisto DNA in kaže na prisotnost spojin z absorbanco pri 280 nm, ponavadi so to proteini. V vzorcih s 5000, 5800 in 6000 m smo izmerili nižje koncentracije DNA, med 6 in 8 ng/ μ l v vzorcih s 5000 m, tudi v vzorcu, kjer z elektroforezo nismo zaznali DNA, med 5 in 16 ng/ μ l v vzorcih s 5800 m in med 10 in 30 ng/ μ l v vzorcih s 6000 m nm. Vzorcem v katerih je povprečje izmerjene koncentracije DNA nižje je skupno mnogo večje nihanje razmerja A_{260}/A_{280} , tako med ponovitvami kot tudi med vzorci. Vsem vzorcem pa je skupno zelo nizko razmerje A_{260}/A_{230} , ki je v večini vzorcev med 0,5 in 1 kar kaže na

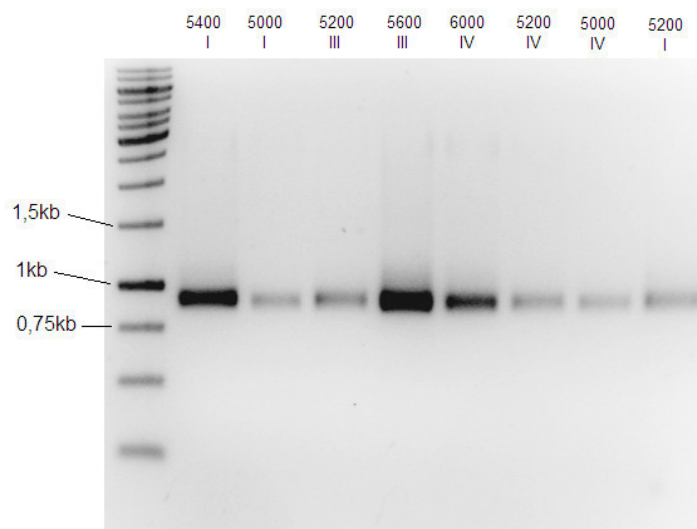
prisotnost snovi z absorbanco pri 230 nm, najverjetneje huminskih kislin. Nihanja v večkratnih zaporednih meritvah istega vzorca kažejo, da so merjene koncentracije DNA na robu občutljivosti metode. Za nadaljnje čiščenje DNA se nismo odločili zaradi zelo nizkih koncentracij osamljene DNA in zaradi izgub DNA, ki jih lahko pričakujemo pri čiščenju. To raztopino skupne mikrobne DNA smo v nadaljevanju uporabili za pomnoževanje dela gena za 16S rRNA.



Slika 3: Količina in čistost DNA, ki smo jo osamili iz talnih himalajskih vzorcev. Odkloni predstavljajo standardno deviacijo treh ponovitev osamitve. Modri stolpci predstavljajo povprečno koncentracijo osamljene DNA, vijolične ploščice povprečno razmerje A_{260}/A_{280} in oranžne povprečno razmerje A_{260}/A_{230} .

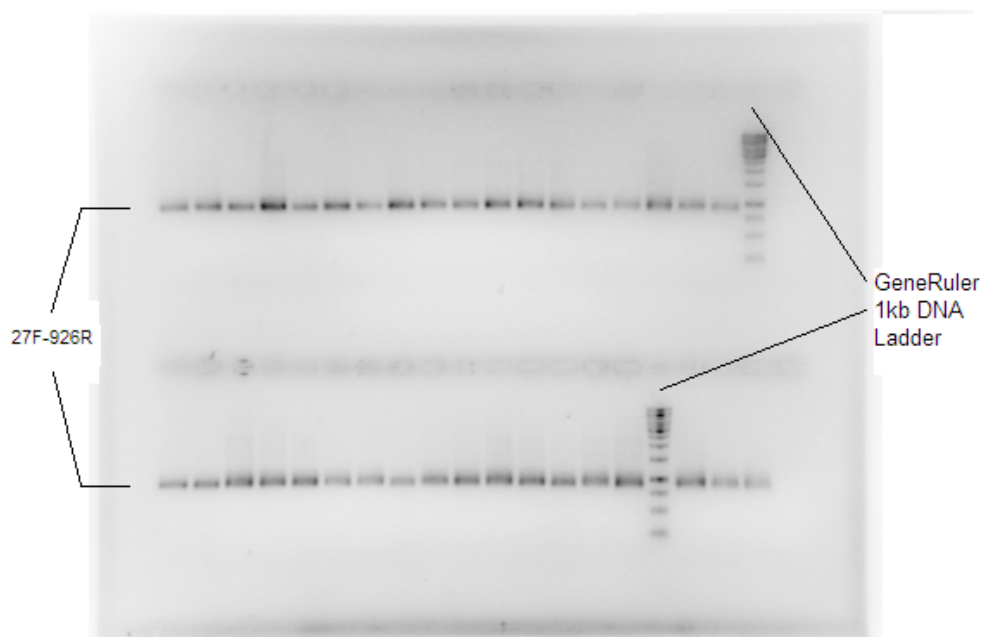
Figure 3: DNA quantity and purity of Himalayan soils samples. Standard deviation from three replicates is shown. Blue columns represent DNA concentration, purple bars are A_{260}/A_{280} ratio and orange bars A_{260}/A_{230} ratio.

Za zmanjšanje vpliva inhibitorjev PCR, ki smo jih pričakovali v raztopini osamljene DNA, smo v reakcijo PCR vključili BSA (Kreader, 1996) ter formamid za povečanje specifičnosti in učinkovitosti reakcije (Sarkar in sod., 1990). Kljub temu v nekaterih vzorcih s 5200, 5400 in 5600 m nm neposredno z raztopino DNA nismo uspeli pomnožiti dela gena za 16S rRNA z začetnimi oligonukleotidi 27F-926R, produkt pa je nastal, če smo v reakciji uporabili vsaj petkrat redčeno raztopino DNA. Za te vzorce smo poiskali optimalno redčitev DNA, redčitev ostalih vzorcev pa prilagodili tako, da smo v vseh vzorcih pridobili podobno količino produkta. V 26. ciklih pomnoževanja smo pridobili približno 500 ng produkta. Za vsakega izmed 72 vzorcev DNA smo pripravili 3 ločene reakcije PCR, ki smo jih nato združili in tako zmanjšali vpliv naključij na reakcijo PCR (angl. PCR bias).



Slika 4: 916bp dolg produkt pomnoževanja začetnega dela gena za 16S rRNA iz skupne mikrobne DNA. Prikazani so naključno izbrani vzorci himalajskih tal z enako redčitvijo DNA (10x). Levo velikostna lestvica Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

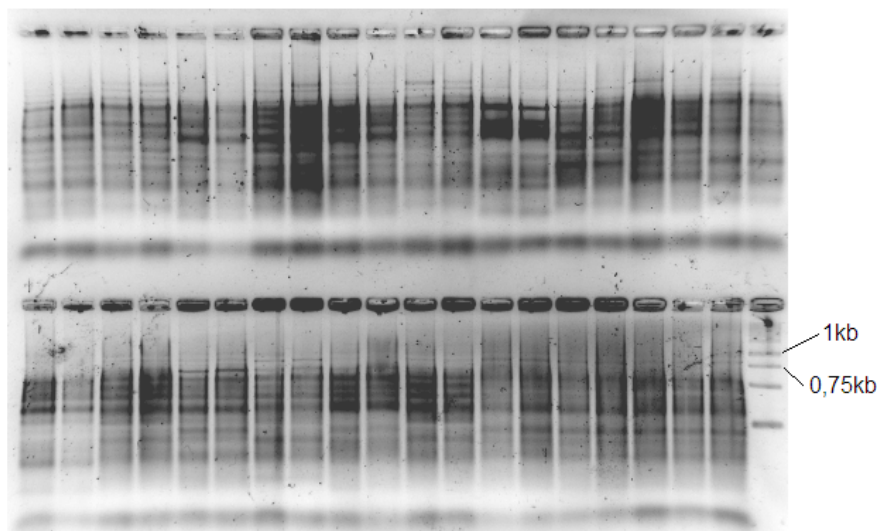
Figure 4: 916bp long PCR product of the 16S rRNA gene amplified from microbial DNA. Random samples with same DNA dilution (10x) isolated from Himalayan soil are shown. Left lane Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).



Slika 5: Pomnoževanje 916bp gena za 16S rRNA iz skupne mikrobne DNA s prilagojeno koncentracijo DNA (2-10 krat razredčena). Prikazani so naključno izbrani vzorci, ki odražajo razpon pridobljenih količin produkta PCR v celotnem naboru vzorcev.

Figure 5: 916bp long PCR product of 16S rRNA gene amplified from microbial DNA with adjusted DNA concentration (2-10 fold dilution). Random samples that represent the range of obtained PCR product quantity in all samples are shown.

Tako pripravljeno mešanico produktov PCR smo uporabili za profiliranje mikrobne združbe z metodo ugotavljanja polimorfizma dolžine končnih restrikcijskih fragmentov (TRFLP). Produkt PCR smo v treh ločenih reakcijah izpostavili delovanju restrikcijskih endonukleaz *BsuRI*, *HhaI* in *MspI*. Uspešnost cepitve smo z delom vzorca preverili z agarozno elektroforezo (slika 6). V vseh vzorcih smo z vsemi encimi uspeli razcepiti večino produkta PCR, le v nekaterih vzorcih smo lahko opazili necepljen del 916bp velikega produkta.

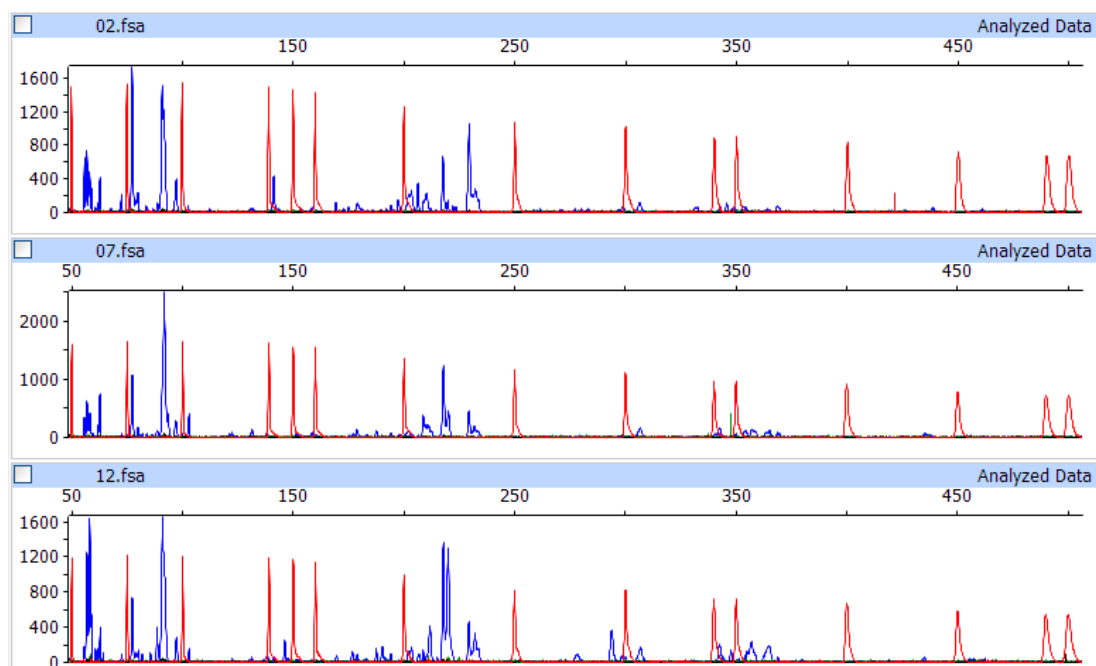


Slika 6: Cepitev produktov PCR z restriksijsko endonukleazo *MspI*. Prikazani so naključno izbrani vzorci. Desno spodaj velikostna lestvica Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Figure 6: Digestion of PCR products with restriction endonuclease *MspI*. Random samples are shown. Bottom right lane Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

V preostalem delu vzorca, smo končne fragmente cepljenega produkta PCR, katerega začetni oligonukleotid 27F je bil fluorescentno označen, zaznali s kapilarno elektroforezo (slika 7).

Analizirane rezultate kapilarne elektroforeze, t.i. elektroferograme smo omejili na isto velikostno območje s pomočjo velikostnega standarda in jih uvozili v biostatistični program Bionumerics. Tu smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije elektroferogramov, ki smo ga uporabili kot primarno mero podobnosti med mikrobnimi združbami vzorcev tal. Iz matrike podobnosti vzorcev smo tvorili dendrograme z metodo neutžene aritmetične sredine (UPGMA).



Slika 7: Analizirani elektroferogrami kapilarne elektroforeze (Peak Scanner Software, AB) treh naključno izbranih profilov TRFLP. Rdeča linija predstavlja interni standard Genescan 500 (AB), modra pa končne fragmente gena za 16S rRNA. Os x predstavlja velikosti fragmentov v bazah, os y pa intenziteto fluorescenco.

Figure 7: Capillary electrophoresis results shown in Peak Scanner Software, AB. Three random TRFLP electrophoregrams are shown. Red line represents internal standard Genescan 500 (AB) and blue line represents terminal restriction fragments. Axis x shows fragment size in base pairs whereas y axis represents fluorescence intensity.

Tri cepitve z restrikcijskimi endonukleazami smo obravnavali kot tri ločene TRFLP eksperimente, jih primerjali, na koncu pa podatke vseh treh združili v eno primerjavo vzorcev. Prav tako smo tri osamitve DNA istega vzorca obravnavali kot ločene vzorce in tako iz 24 vzorcev tal prišli do 72 TRFLP profilov za vsako restrikcijsko endonukleazo. Predvsem za tehnično kontrolo posameznih restrikcijskih cepitev in primerjavo med njimi smo v dendrograme vključili vzorca dveh nehimalajskih tal, Ljubljanskega barja (vzorec barje) in mineralnih agronomskih tal (vzorec agro). S tema vzorcema smo postopali enako kot z vzorci tal iz Himalaje, le da smo DNA osamili v dveh ponovitvah, vsako izmed DNA pa nato uporabili za 2 ločena vzorca za pripravo profila TRFLP. Tako smo prišli pri vsaki restrikcijski endonukleazi do štirih profilov TRFLP za posamezen vzorec.

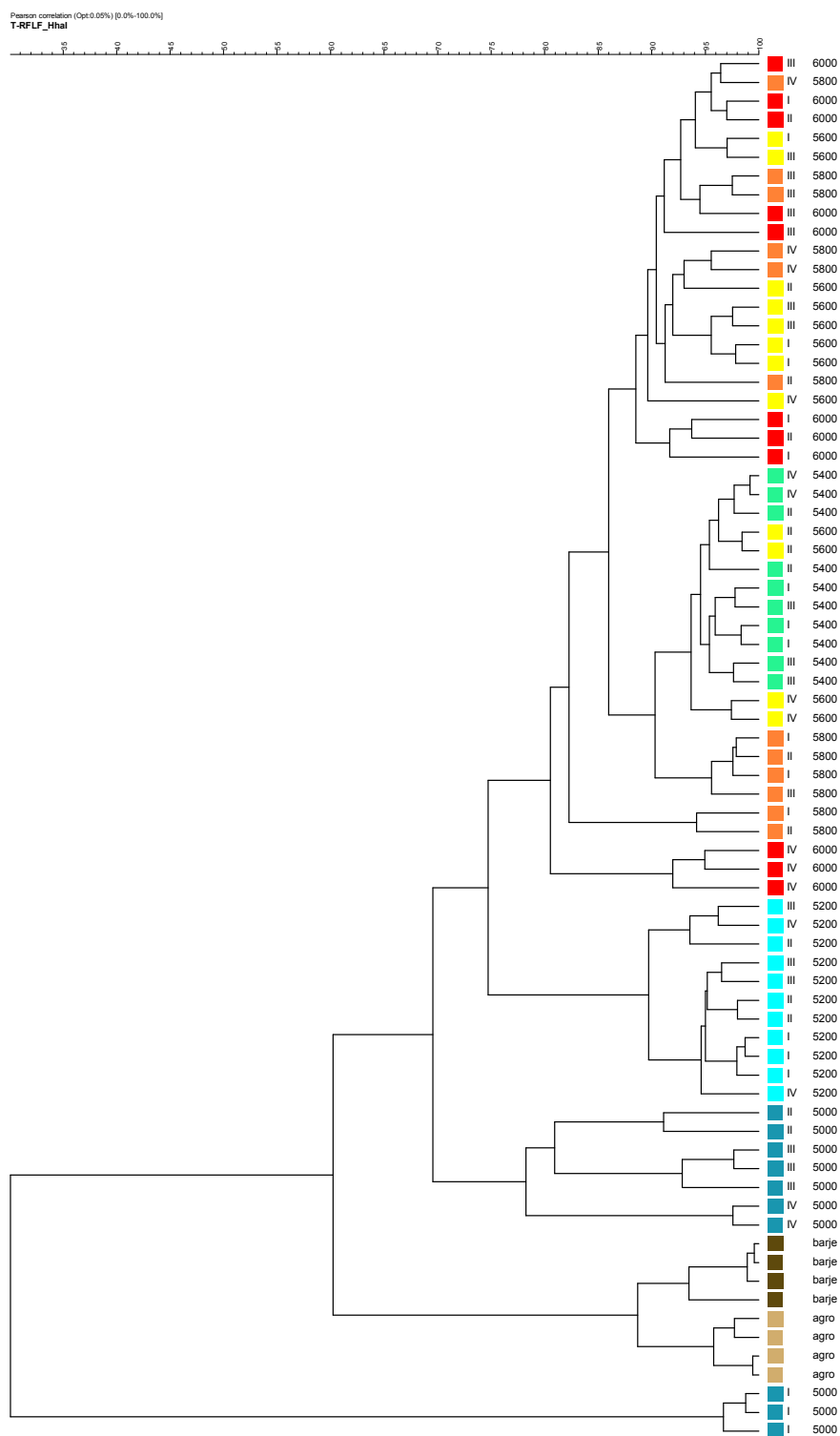


Slika 8: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/*Bsu*RI vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.

Figure 8: Dendrogram of *Bsu*RI TRFLP profiles of soil microbial community from vertical gradient between 5000 m and 6000 m above sea level (asl).

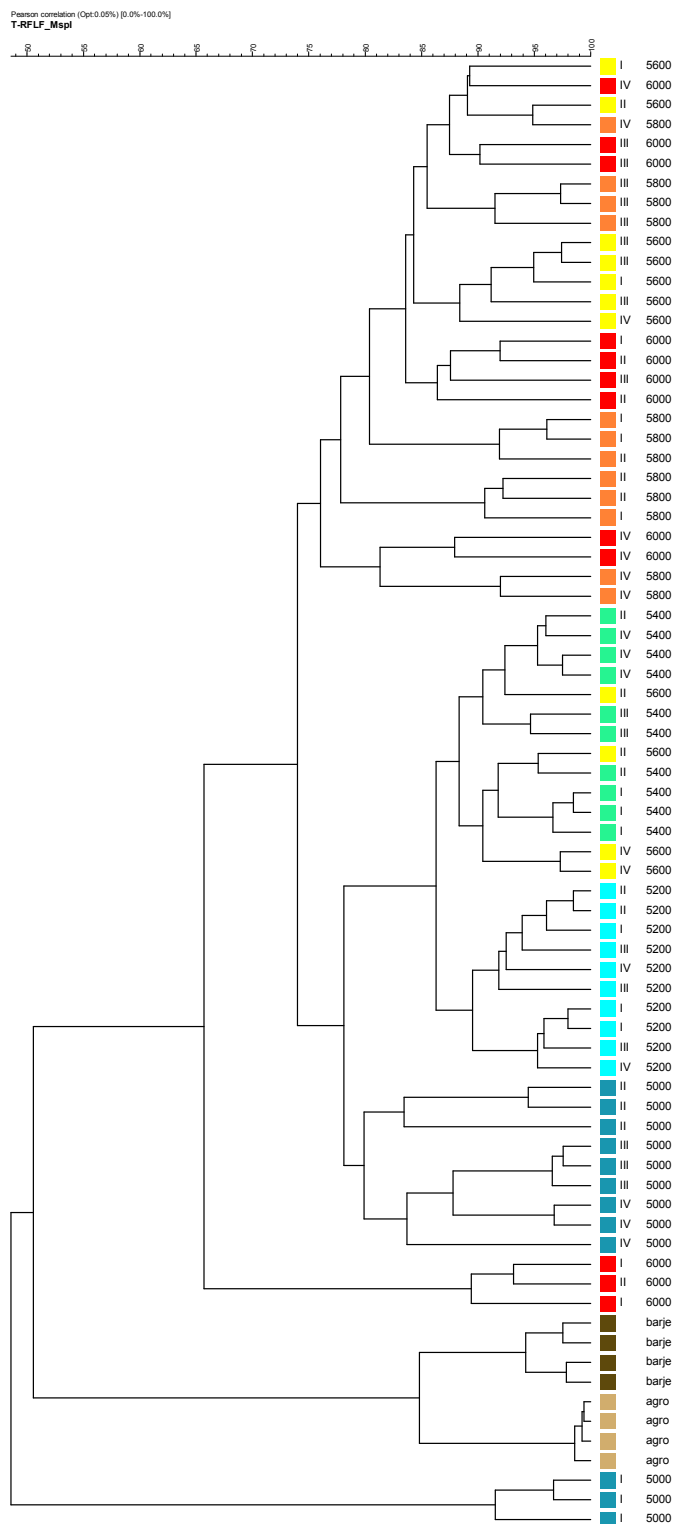
V dendrogramu TRFLP s cepitvijo z *Bsu*RI (slika 8) vzorca tal barja in mineralnih tal tvorita gručo, ločeno od himalajskih tal s približno 45% povprečno podobnostjo. Med seboj sta gruči posameznega vzorca približno 80% podobni. Od večine himalajskih vzorcev izstopajo vzorci s štirih lokacij s 5000 m nm. Tri lokacije (II, III in IV) tvorijo gručo s povprečno 70% podobnostjo z večino himalajskih vzorcev. Lokacija I tvori povsem ločeno gručo, ki je še manj podobna ostalim himalajskim vzorcem. Trije elektroferogrami istega vzorca tal v vseh štirih primerih tvorijo lastne gruče, med profili z iste lokacije pa je 90 do 98% podobnosti. Vzorci med 5200 in 6000 m nm tvorijo dve gruči. V eni so vsi vzorci s 5200 in 5400 m in nekateri s 5600 in 5800 m. V drugi pa so vsi s 6000 m in preostali s 5800 in 5600 m nm. V teh dveh gručah trije elektroferogrami istega vzorca le v dveh primerih tvorijo svojo gručo (I/5200, III/5600)

Dendrogram vzorcev cepljenih s *Hha*I (slika 9) je v grobem podoben dendrogramu profilov ustvarjenih s cepitvijo z *Bsu*RI. Elektroferogrami dveh nehimalajskih vzorcev znova tvorijo lastni gruči znotraj gruče nehimalajskih vzorcev, povprečna oddaljenost med vzorcema je tokrat 89% (80% pri *Bsu*RI). Vzorci z lokacij II, III in IV s 5000 m nm tudi tu tvorijo gručo s povprečno 70% podobnostjo z večino himalajskih vzorcev. Izstopa pa vzorec I/5000 z le 30% podobnostjo z drugimi vzorci. Pri vzorcih odvzetih na višinah med 5200 in 6000 m je slika rahlo drugačna kot pri cepitvi z *Bsu*RI. Vzorci s 5200 m pri cepitvi s *Hha*I tvorijo homogeno gručo (90%), precej oddaljeno od drugih vzorcev (75%). V skupni gruči so še vzorci s 5400 m, skupaj z nekaterimi vzorci iz 5600 m, medtem ko so vzorci s 6000, 5800 in 5600 m nm raztreseni po dendrogramu. Tudi ob cepitvi s *Hha*I pri vzorcih med 5200 in 6000 m nm elektroferogrami iz iste lokacije praviloma ne tvorijo koherentnih gruč (izjemi I/5200, IV/6000).



Slika 9: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/*HhaI* vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.

Figure 9: Dendrogram of *HhaI* TRFLP profiles of soil microbial community from vertical gradient between 5000 and 6000 m asl.



Slika 10: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal ustvarjenih z metodo TRFLP/*MspI* vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.

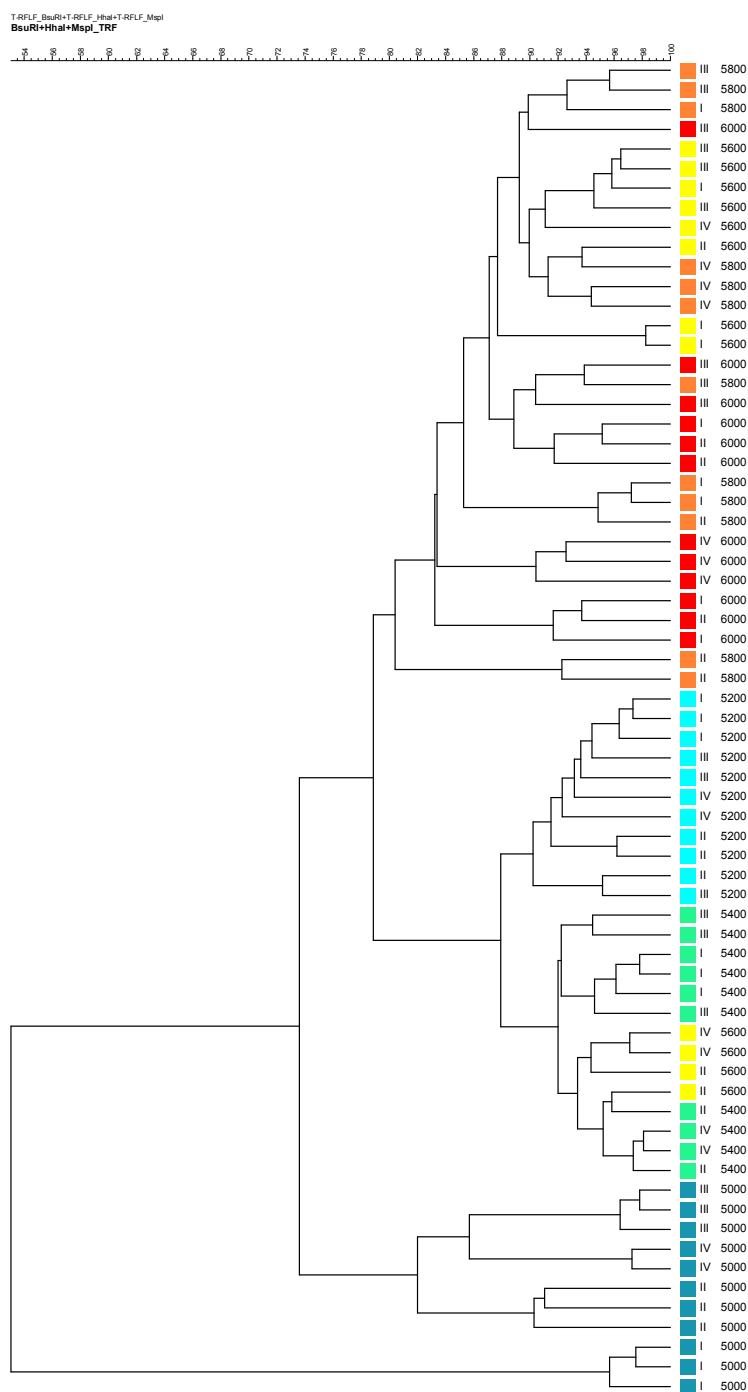
Figure 10: Dendrogram of *MspI* TRFLP profiles of soil microbial community from vertical gradient between 5000 and 6000 m asl.

Tudi dendrogram profilov TRFLP mikrobnih združb tal pripravljen s tretjim restrikcijskim encimom *MspI* (slika 10) kaže podobno sliko kot prejšnja dva. Nehimalajski gruči vzorcev agronomskih in barjanskih tal sta podobni 85%, podobnost z gručo večine himalajskih vzorcev pa je 51%. Še malo bolj je oddaljena gruča I/5000. Preostali vzorci s 5000 m nm tvorijo lastno gručo, ki je tokrat bolj podobna vzorcem s 5200 m, ki tako kot v primeru cepitve s *HhaI* tvorijo najbolj koherentno gručo himalajskih vzorcev. Vzorci s 5200 m so tokrat, kot pri cepitvi z *BsuRI*, najbližje vzorcem s 5400 m, ki tvorijo gručo z nekaterimi vzorci s 5600 m nm. Preostali vzorci s 5600 m tvorijo gručo z vzorci s 5800 m in večino vzorcev s 6000 m nm. Presenetljivo oddaljeni od večine himalajskih vzorcev so trije vzorci s 6000 m (66%).

Iz teh primerjav smo zaključili, da je razlika med profili TRFLP vzorcev iz iste lokacije do 10%, praviloma okoli 5%. Tako so se vzorci z iste lokacije povezovali v gruče le takrat, ko je bila razlika med vzorci večja od 10%, kar v primeru himalajskih vzorcev drži le za vzorce s 5000 m nm. Pri nehimalajskih vzorcih smo opazili manjše razlike med profili TRFLP iz istega vzorca. Ker smo pri teh vzorcih iz iste osamitve DNA izdelali dva profila TRFLP, smo lahko opazovali razlike med profili TRFLP, ki so bili pripravljene iz iste osamitve DNA in profili, ki so bili pripravljene iz različnih osamitev DNA istega vzorca. Domnevamo da postopek osamitve DNA ni ključen dejavnik pri nastanku razlike med profili istega vzorca, saj si profili TRFLP pripravljene iz iste osamitve DNA niso bolj podobni kot so podobni profilom TRFLP iz druge osamitve DNA istega vzorca tal (ni prikazano). Ker je z združenimi tremi reakcijami PCR zmanjšan vpliv naključij v tem koraku, pripisujemo večino ugotovljenih razlik med ponovitvami istega vzorca obdelavi vzorca po PCR, torej cepitvi z endonukleazami, razsoljevanju in kapilarni elektroforezi.

Dendrogram združenih rezultatov treh eksperimentov TRFLP je prikazan na sliki 11. Tokrat smo se osredotočili le na odnose med himalajskimi vzorci. Za izris dendrograma smo uporabili matriko podobnosti, ki smo jo izračunali kot povprečje podobnosti elektroferogramov iz posameznih eksperimentov oziroma posameznih cepitev z restrikcijskimi endonukleazami. Vzorci z lokacije I/5000 se pričakovano najbolj razlikujejo od drugih vzorcev. Ostale tri lokacije s 5000 m nm tvorijo gručo, ki pa je dokaj raznolika. Podobnosti znotraj gruče so na ravni podobnosti znotraj razdrobljene gruče vzorcev s

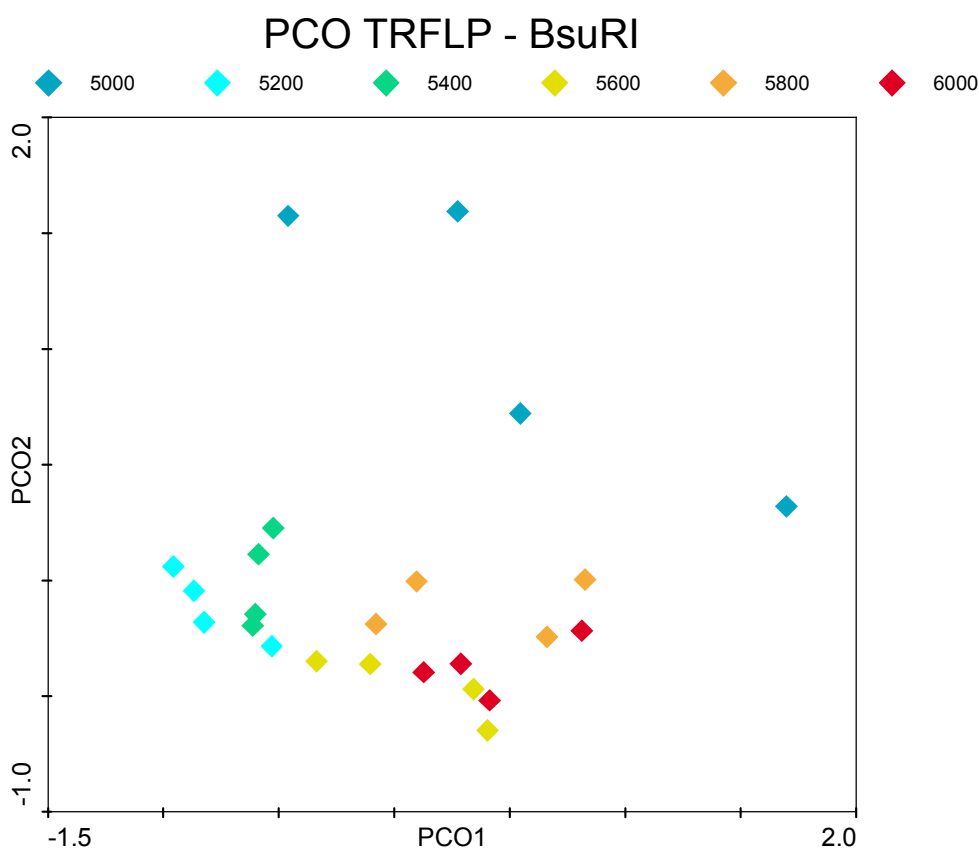
6000, 5800 in nekaterih vzorcev s 5600 m nm. Izrazito gručo pa tvorijo preostali vzorci s 5600 m nm in vzorci s 5200 in 5400 m nm. Znotraj te gruče se oblikujeta dve precej tesni gruči vzorcev, gruča vzorcev iz 5200 m ter gruča vzorcev iz 5400 in 5600 m nm. Tudi v povprečju treh eksperimentov vzorci DNA iz istega vzorca tal večinoma ne tvorijo gruč. Najbolj ekstremen primer so ponovitve iz vzorcev II/5600 in IV/5600, ki so tako v gruči 5200/5400 kot v gruči 5800/6000.



Slika 11: Dendrogram profilov TRFLP vseh treh cepitev mikrobne združbe vertikalnega profila pobočja med 5000 in 6000 m nm.

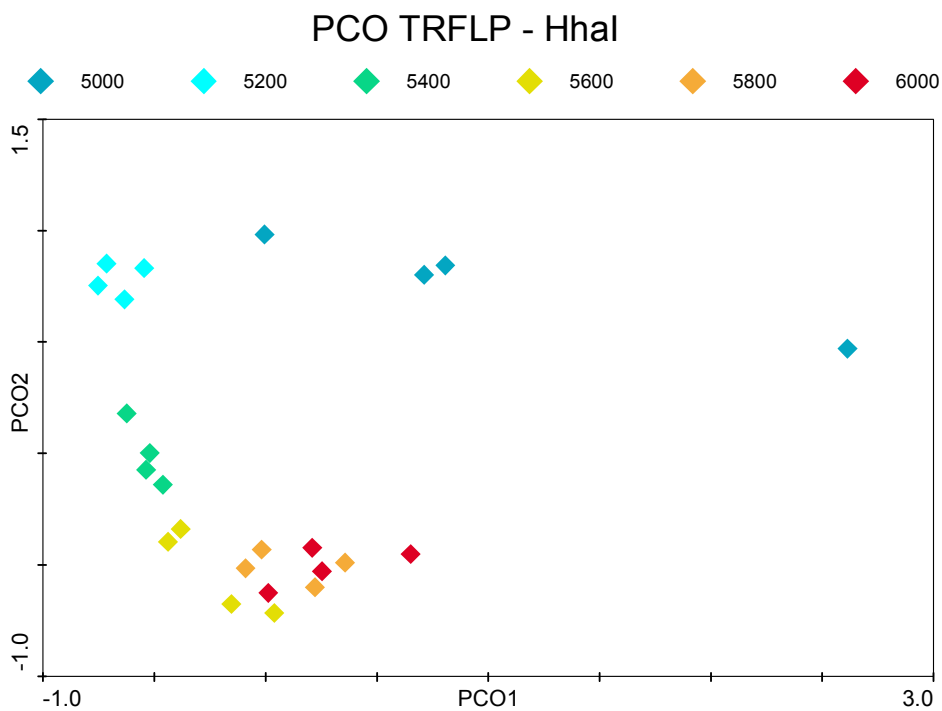
Figure 11: Dendrogram of all three TRFLP profiles from vertical gradient between 5000 m and 6000 m asl.

Pearsonov koeficient korelacije elektroferogramov TRFLP smo uporabili tudi pri primerjavi vzorcev s statistično metodo analize glavnih koordinat (angl. Principal coordinates analysis PCO), ki omogoča predstavitev podobnosti med vzorci v večdimenzionalnem prostoru. Osamitve DNA iz istega vzorca smo tokrat obravnavali kot tri ponovitve istega vzorca, iz katerih smo izračunali povprečne vrednosti podobnosti. Vzorci nehimalajskih tal so na slikah izstopali, tako da odnosi med himalajskimi vzorci niso bili vidni. Zato jih nismo vključili v prikaz. Na diagramih prvih dveh dimenzij PCO so tako prikazani profili mikrobne združbe 24 vzorcev himalajskih tal iz šestih nadmorskih višin in štirih lokacij na vsaki nadmorski višini. Za prikaz smo uporabili enako barvno kodiranje vzorcev kot pri analizi gruč, zaradi preglednosti diagrama pa smo v prikaz vključili le podatke o nadmorski višini vzorca. Podatke vsake cepitve smo prikazali samostojno (slike 12, 13 in 14), na koncu pa smo podatke treh cepitev spet združili (slika 15).

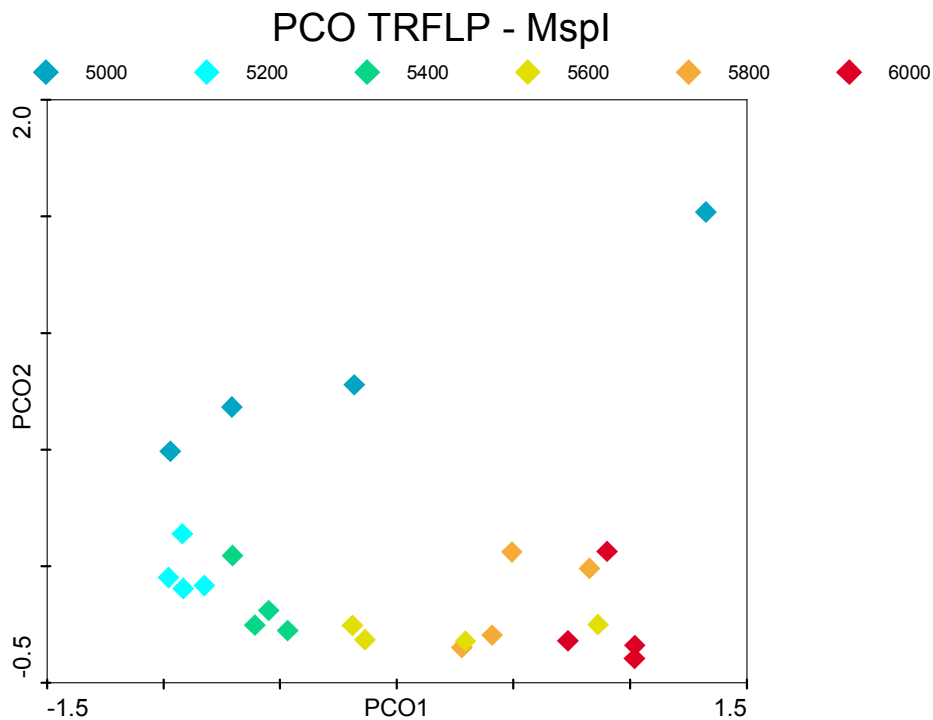


Slika 12: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/*BsuRI*

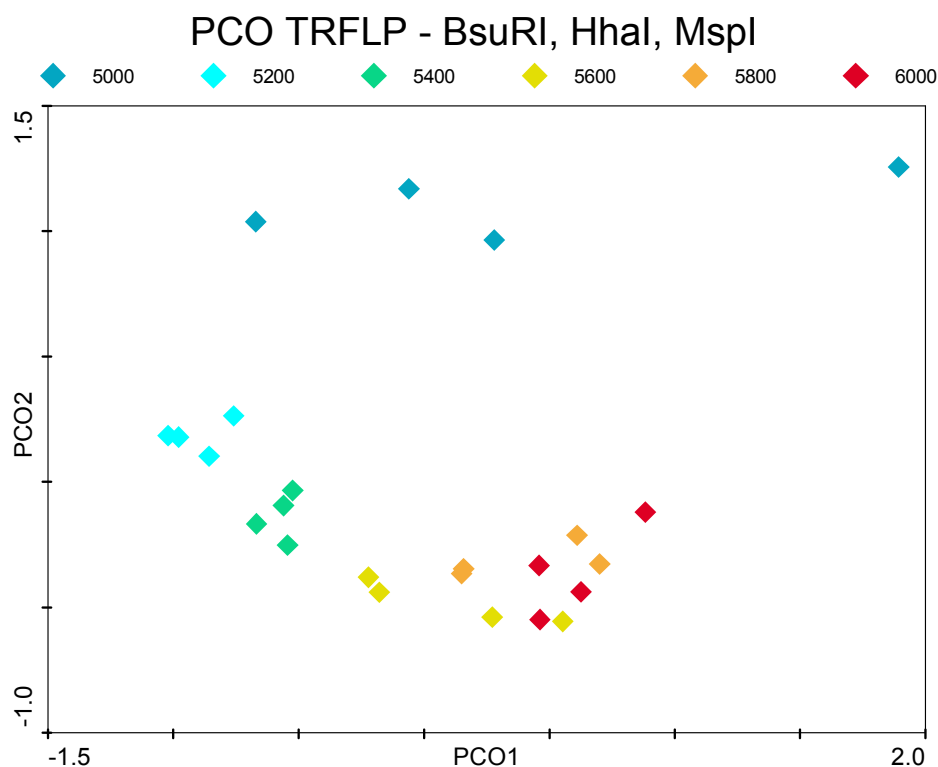
Figure 12: Principal coordinates analysis from *BsuRI* TRFLP profiles



Slika 13: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/*HhaI*
Figure 13: Principal coordinates analysis from *HhaI* TRFLP profiles



Slika 14: Analiza glavnih koordinat (PCO) TRFLP/*MspI*
Figure 14: Principal coordinates analysis from *MspI* TRFLP profiles



Slika 15: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP in vzorci vertikalnega profila iz leta 2002.

Figure 15: Principal coordinates analysis from all three TRFLP profiles from vertical gradient between 5000 m and 6000 m asl

Iz analize PCO smo lahko razbrali podobne ugotovitve kot iz analize gruč. Vzorci s 5000 m nm so najbolj oddaljeni od ostalih vzorcev, pri cepitvi z *MspI* in *HhaI* je še posebej izstopal vzorec I/5000. Morda še bolj očitno kot pri analizi gruč lahko vidimo večjo medsebojno oddaljenost posameznih vzorcev s 5000 m v primerjavi z vzorci z drugih nadmorskih višin. Kot pri analizi gruč lahko vidimo povezovanje vzorcev s 5200 in 5400 m v ločene skupine, pri vzorcih s 5600, 5800 in 6000 m nm pa ni jasne ločitve. Pri vseh treh encimih, še posebej pa pri cepitvi z *MspI* je za vzorce od 5200 do 6000 m nm opazna razporeditev od najnižje do najvišje nadmorske višine v eni dimenziji in zelo malo razlik med vzorci v drugi dimenziji. V PCO združenih treh eksperimentov TRFLP (slika 15) lahko vidimo zelo jasno definirani skupini vzorcev s 5200 in 5400, ki sta bolj homogeni kot pri posameznih eksperimentih. Dva vzorca iz 5600 m nm (II/5600 in IV/5600), ki izstopata tudi pri posameznih eksperimentih, tvorita samostojno skupino s približno tako oddaljenostjo od ostalih vzorcev kot skupini 5200 in 5400. Ostali vzorci s 5600 m ter

vzorci s 5800 in 6000 m nm tvorijo nehomogeno skupino iz katere rahlo izstopata zelo podobna vzorca I/5800 in III/5800 na eni strani in IV/6000 na drugi.

Med posameznimi mikrolokacijami na pobočju gore v osrednji Himalaji smo torej opazili jasne razlike v strukturi mikrobne združbe. Na nekaterih nadmorskih višinah smo opazili večje podobnosti med združbami z iste višine kot med združbami z različnih nadmorskih višin, na drugih pa ne. Vzorci s 5000 m izstopajo od ostalih vzorcev, kar je bilo pričakovano, saj gre za drugačen tip vzorca. Vzorci s 5000 m predstavljajo namreč nanos na ledeniški površini, medtem ko gre pri ostalih vzorcih za material v stiku s kameninsko podlago. Podlaga na 5200 m in 5400 m, je enotna in prekrita z vegetacijo, vzorci odvzeti s teh višin tvorijo jasni gruči. Vzorci iz 5800 in 6000 m so odvzeti iz tal, ki niso pokrita z vegetacijo, podlaga ni strnjena, saj je pretrgana s skalnatimi področji. Na 5600 m je podlaga peščena in kamnita, s posameznimi zaplatami mahov. Ta neenotnost talne podlage na višjih mestih vzorčenja, z vmesnimi skalnatimi območji, se odraža tudi v strukturi mikrobne združbe, saj se mikrobne združbe na eni višini bolj razlikujejo med seboj, kot pri vzorcih s 5200 in 5400 m nm. Za vzorce s pobočja (5200 m in višje) lahko rečemo, da se razlike v mikrobni združbi večajo z večanjem razlike v nadmorski višini.

4.1.2 Spremembe mikrobne združbe skozi čas

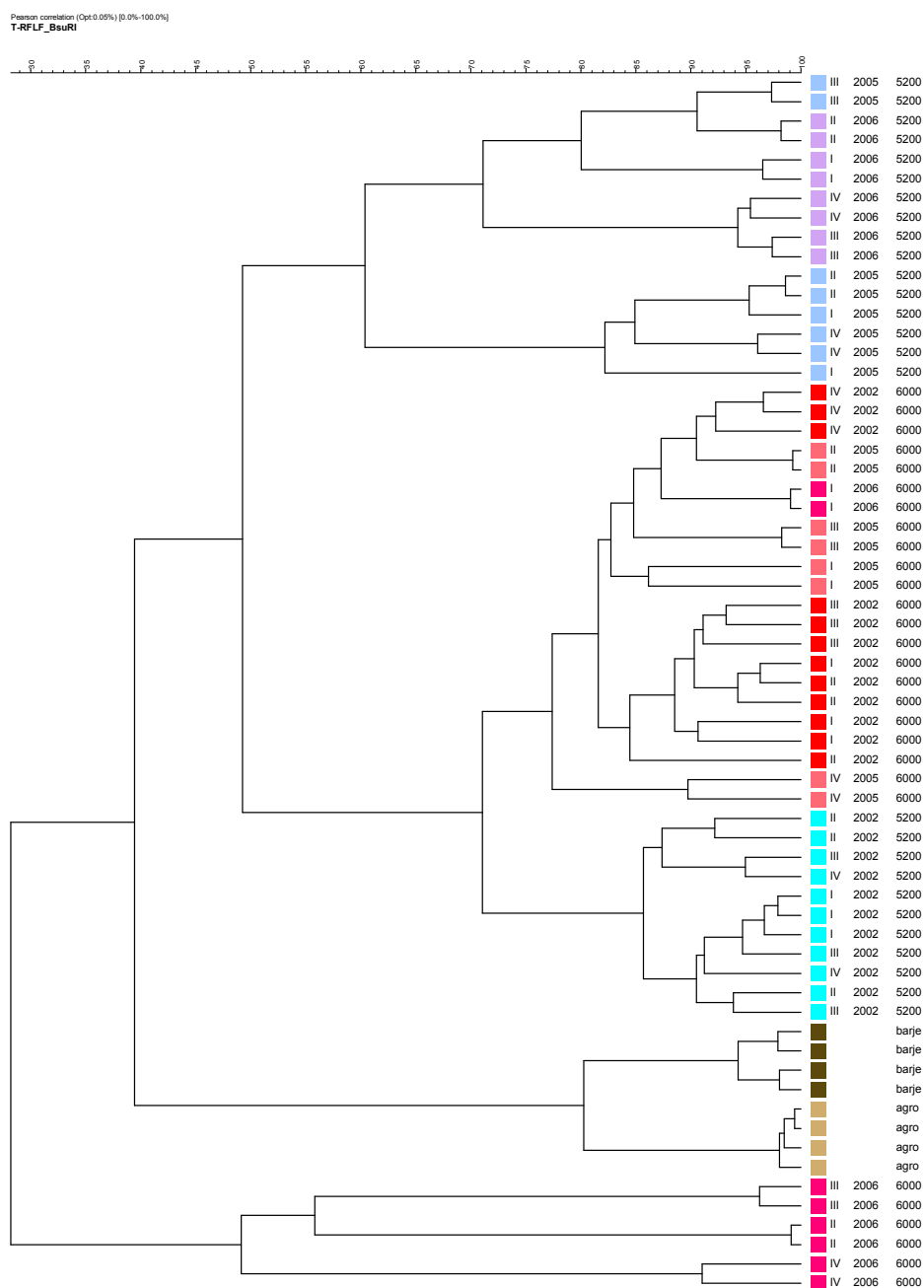
Poleg zgoraj opisanih razlik, ki smo jih ugotovili s profiliranjem mikrobnih združb v tleh vertikalnega profila pobočja v oktobru 2002, smo sledili spremembam strukture mikrobnih združb v času z naknadnimi vzorčenji v oktobru 2005 in marcu 2006 na dveh nadmorskih višinah (5200 in 6000 m). Na osnovi izkušenj z vzorci iz leta 2002, smo se pri teh vzorcih odločili za rahlo spremenjen načrt eksperimenta s samo eno osamitvijo DNA iz vsakega vzorca tal in nato dveh ločenih cepitev z istim encimom za vsak vzorec tal. Za vsako cepitev smo produkt PCR pripravili z dvema reakcijama PCR. Iz vsakega vzorca tal smo tako pridobili dva namesto treh elektroferogramov za posamezno cepitev z restrikcijsko endonukleazo. Sicer smo vzorce iz let 2005 in 2006 pripravili enako kot vzorce iz leta 2002 in jih med seboj primerjali na enak način (opisano v poglavju 4.1.1). Majhna sprememba v protokolu je bila še pri vzorcih z višine 5200 m, ki so bili odvzeti leta 2005,

pri katerih smo količino vzorca tal za osamitev DNA preplovali (0,5g), saj je bila osamitev iz enega grama neuspešna. Predvidevamo, da je 1g tal preveč zapolnil epruveto namenjeno osamitvi DNA in ob stresanju ni omogočal ustreznega premikanja delcev v epruveti, ki so namenjeni mehanskim poškodbam celic.

Iz rezultatov cepjenja z restrikcijsko endonukleazo *Bsu*RI (slika 16) je razvidno predvsem globoko vejanje treh vzorcev 2006/6000. Tako kot pri analizi višinskega profila z dendrogramom združenih rezultatov treh cepitev, vzorci 2002/5200 tvorijo homogeno gručo. Vzorci 2002/6000 tvorijo gručo skupaj s preostalimi vzorci s 6000 m, torej z vzorci 2005/6000 in enim vzorcem 2006/6000. Gruča 2002/5200 je mnogo bolj podobna zgoraj omenjeni gruči, ki vsebuje večino vzorcev s 6000 m (71%), kot drugim vzorcem z višine 5200 m. Ti tvorijo nehomogeno gručo (60%) v kateri so vzorci iz obeh let pomešani, podobnost med gručama 2005-2006/5200 in 2002/5200+6000 pa je le 49%.

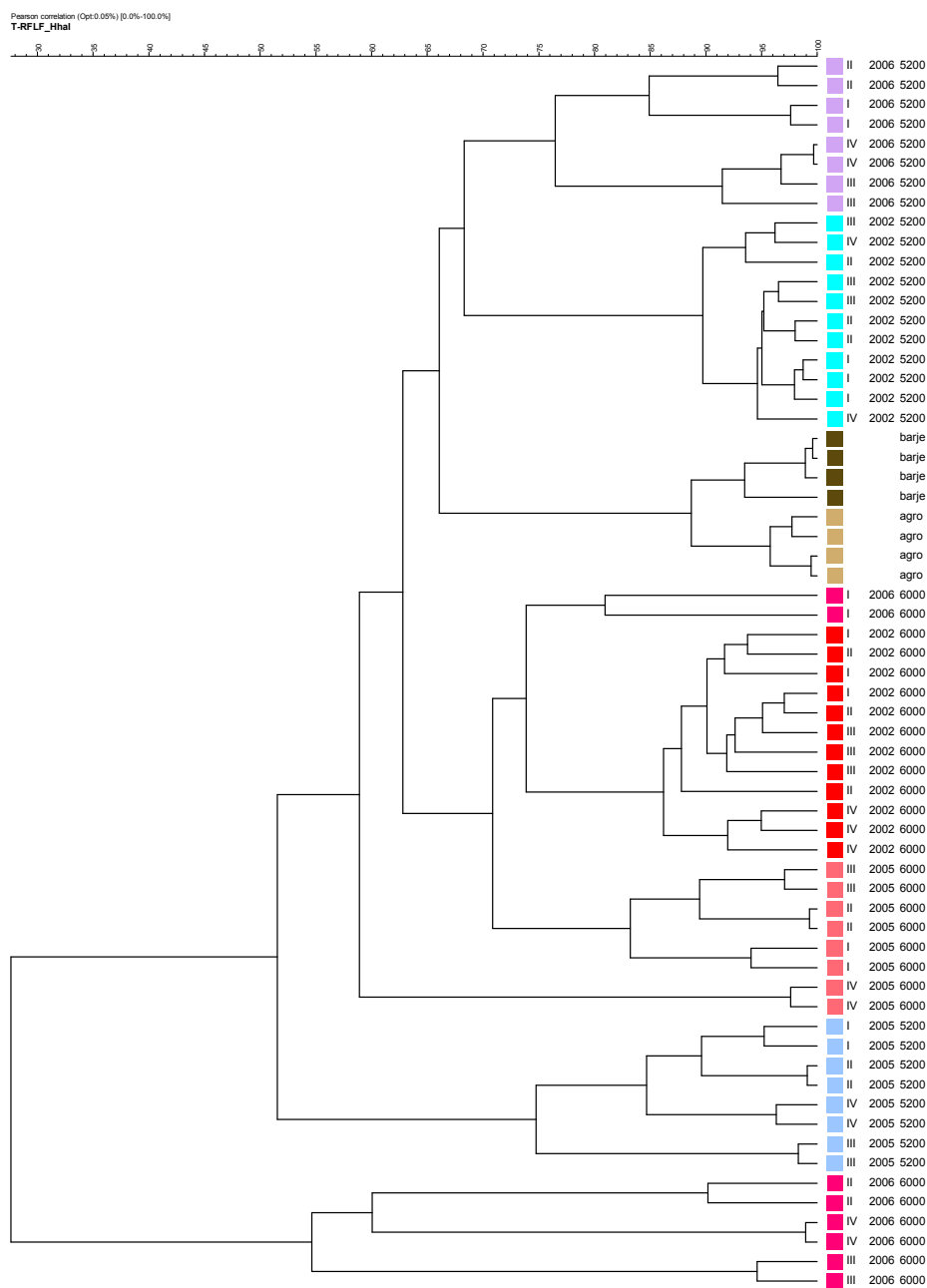
Vzorci II, III in IV 2006/6000 so najmanj podobni ostalim vzorcem tudi na podlagi rezultatov TRFLP pri cepitvi z restrikcijsko endonukleazo *Hha*I (slika 17). Vse ostale skupine vzorcev iz iste nadmorske skupine in istega leta vzorčenja tokrat tvorijo lastne gruče v dendrogramu. Pri vzorcih odvzetih na 5200 m tokrat gručo tvorijo vzorci 2002/5200 in 2006/5200 (68%), medtem ko so vzorci 2005/5200 precej oddaljeni. Večino vzorcev odvzetih na 6000 m spet tvori lastno gručo. Presenetljiva je pozicija skupine nehimalajskih vzorcev, ki je na podlagi te analize najbližje gruči 2002-2006/5200.

Dendrogram cepitve z *Msp*I (slika 18) je glede raztresenosti skupin vzorcev po gručah bolj podoben dendrogramu cepitve z *Bsu*RI, saj samo vzorci 2002/5200 tvorijo izrazito gručo. Glede podobnosti med vzorci pa je bolj podoben dendrogramu cepitve s *Hha*I. Od vzorcev s 5200 m nm so si tako bližje tisti iz let 2002 in 2006, vzorci odvzeti v letu 2005 pa so ob vzorcih 2006/6000 II, III in IV, ki vedno izstopajo, najmanj podobni drugim himalajskim vzorcem. Iz gruče večine vzorcev s 6000 m, ki je skupna vsem trem eksperimentom, sta se tokrat ločila oba profila vzorca 2006/6000 IV in se pomešala v gručo 2002-2006/5200.



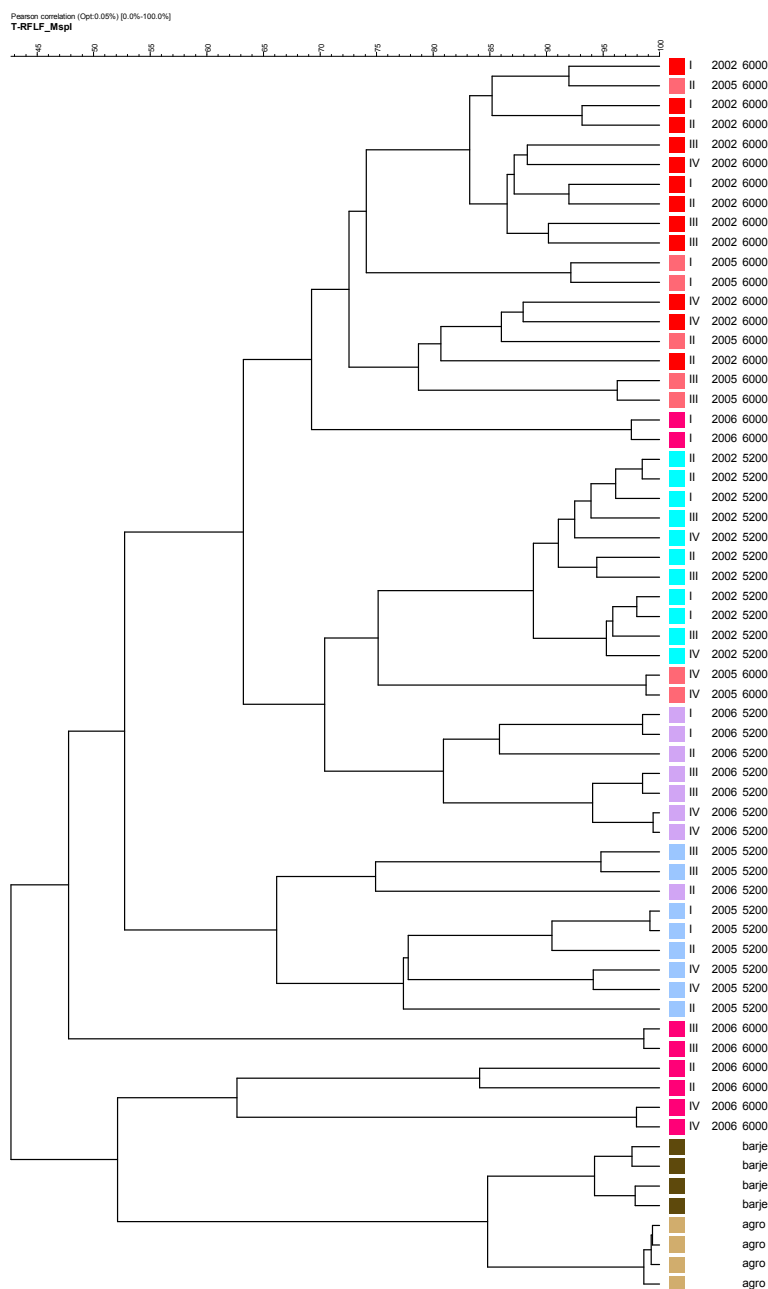
Slika 16: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/*BsuRI* na 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006.

Figure 16: Dendrogram of *BsuRI* TRFLP profiles of microbial community from 5200 m and 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006.



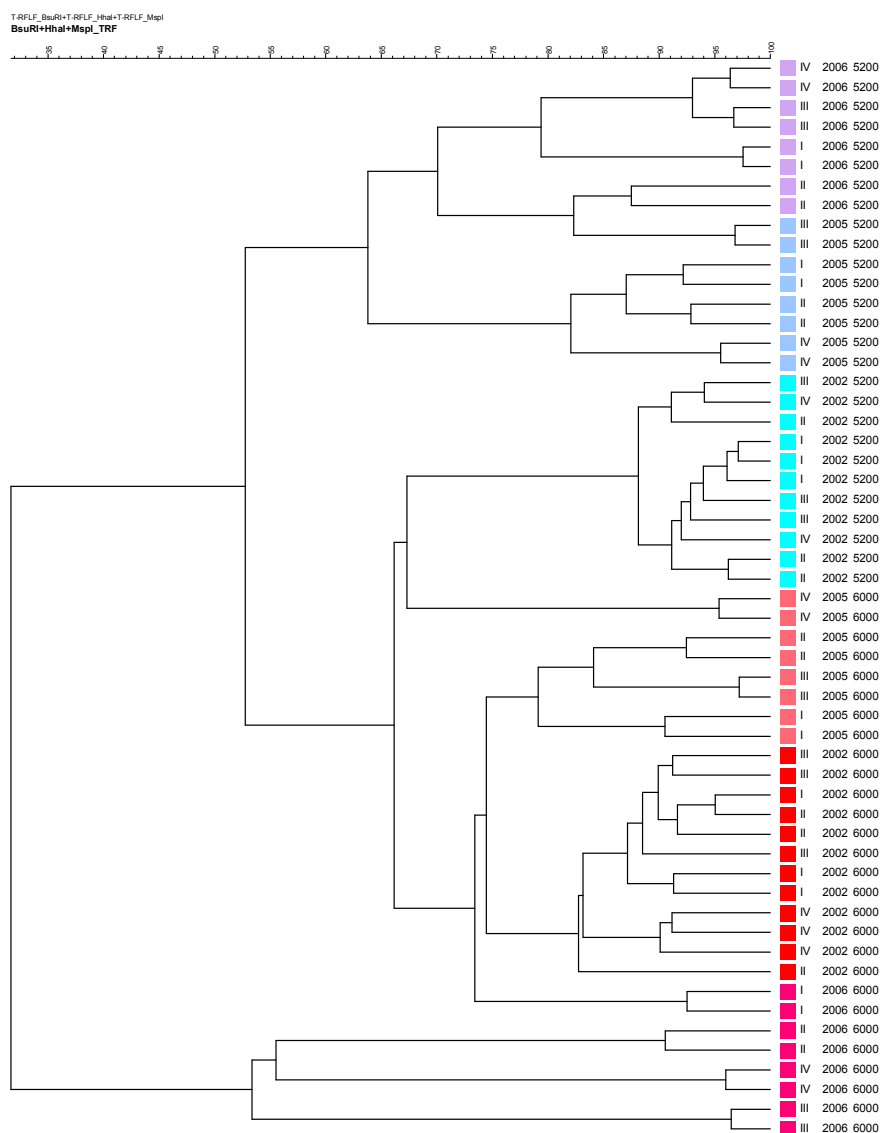
Slika 17: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/*HhaI* na 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006.

Figure 17: Dendrogram of *HhaI* TRFLP profiles of microbial community from 5200 m and 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006.



Slika 18: Dendrogram profilov mikrobne združbe tal TRFLP/*MspI* na 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006.

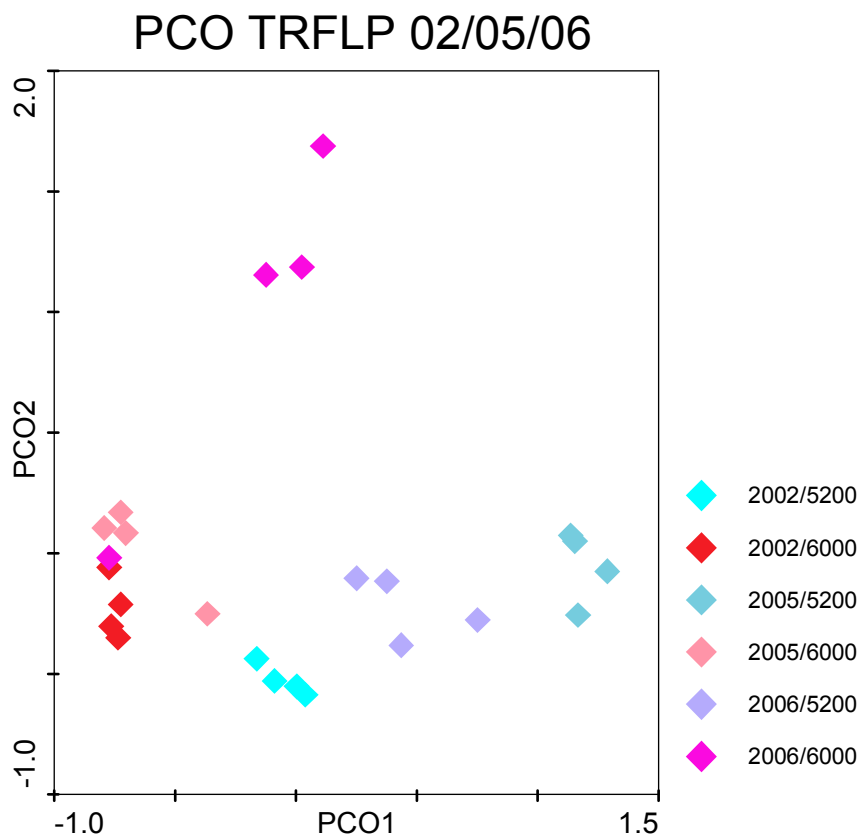
Figure 18: Dendrogram of *MspI* TRFLP profiles of microbial community from 5200 m and 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006.



Slika 19: Dendrogram profilov TRFLP mikrobne združbe vseh treh cepitev vzorcev s 5200 in 6000 m nm vzorčenih v letih 2002, 2005 in 2006.

Figure 19: Dendrogram of all three TRFLP profiles of microbial community from 5200 m and 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006.

Tudi v dendrogramu združenih rezultatov vseh treh eksperimentov (slika 19) jasno vidimo veliko oddaljenost treh vzorcev 2006/6000 od ostalih vzorcev. Lastni gruči tvorijo vzorci 2002/5200 in 2002/6000. Izrazitejša je še delitev na gruči vzorcev z višine 5200 m, odvzetih v letih 2005 in 2006 ter skupno gručo vzorcev odvzetih v letu 2002 in preostalih vzorcev s 6000 m nm.



Slika 20: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh TRFLP eksperimentov z vzorci z dveh nadmorskih višin iz let 2002, 2005 in 2006.

Figure 20: Principal coordinates analysis from all three TRFLP profiles from 5200 m and 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006.

Analiza glavnih koordinat (PCO) posameznih eksperimentov TRFLP je pokazala zelo podobno sliko kot analiza gruč, tako da rezultatov posameznih cepitev z restrikcijскими endonukleazami nismo predstavili. Iste podatke kot v sliki 19, torej združene podatke treh cepitev, smo predstavili s PCO v sliki 20. Nekateri zaključki analize PCO so enaki ugotovitvam, ki smo jih razbrali iz dendrograma združenih eksperimentov. Najbolj je očitna oddaljenost treh vzorcev 2006/6000 od ostalih vzorcev. Drugi vzorci s 6000 m so z izjemo enega iz leta 2005, ki pa tudi ni daleč, v tesno povezani skupini. Malo drugačni kot pri analizi gruč so lahko zaključki PCO o mikrobni združbi tal, ki smo je odvezemali na nadmorski višini 5200 m. Vzorci s 5200 m se jasno ločijo na skupine glede na leto vzorčenja. Tako kot v dendrogramu so vzorci iz leta 2002 najbolj podobni vzorcem s 6000

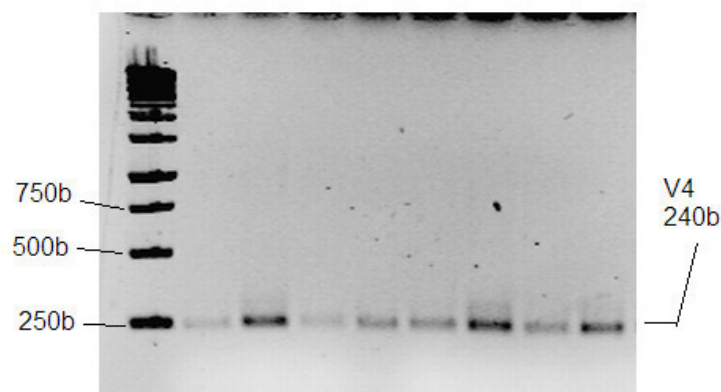
m, vendar vzorci iz leta 2006 niso bolj podobni vzorcem iz leta 2005, kot vzorcem iz leta 2002, kar lahko zaključimo iz dendrograma, ampak so približno enako podobni obema skupinama vzorcev.

Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da se mikrobna združba tal skozi čas spreminja, vendar ne enako na obeh preučevanih nadmorskih višinah. Na 6000 m je mikrobna združba načeloma manj spremenljiva, lahko pa pride do velikih sprememb, ki so posledica dogodkov vezanih na posamezno mikrolokacijo, verjetno zaradi večje razdrobljenosti terena. Mikrolokacije se lahko na primer razlikujejo v osončenosti, trajanju in debelini snežne odeje zaradi različnih učinkov vetra ipd. Nasprotno, spremembe skozi čas v mikrobni združbi himalajskih tal na 5200 m zajemajo vse štiri mikrolokacije, spremembe pa ne kažejo neke smeri, saj so vzorci iz 2002 bolj podobni vzorcem iz 2006, kot vzorcem iz leta 2005.

4.2 PRIMERJAVA PROFILOV TRFLP PRIDOBLENIH IZ RAZLIČNIH ODSEKOV GENA ZA 16S rRNA

Poleg samega profiliranja mikrobne združbe nas je zanimalo koliko informacije za razlikovanje vzorcev himalajskih tal, nosi variabilna regija 4 (V4) gena za 16S rRNA. Regijo V4 namreč vedno pogosteje uporabljajo za sekvenciranje v okviru projektov obsežnega sekvenciranja 16S rRNA na osnovi novih tehnologij (pirosekvenciranje). Rezultate uveljavljene analize TRFLP začetnega dela gena za 16S rRNA, ki smo jih predstavili v poglavju 4.1, smo zato primerjali s TRFLP regije V4 gena za 16S rRNA. Pomnožili smo 240bp dolg del (V4) gena za 16S rRNA, izvedli cepitev in kapilarno elektroforezo kot v primeru začetnega, 918bp dolgega dela gena za 16S rRNA in rezultate šestih TRFLP eksperimentov primerjali med seboj. Za primerjavo smo uporabili vzorce tal odvzete na 6000 m nm v treh različnih časih in dva nehimalajska vzorca. Iz dveh vzorcev DNA iz vsake vzorčene lokacije smo pripravili en TRFLP profil za vsako od treh endonukleaz.

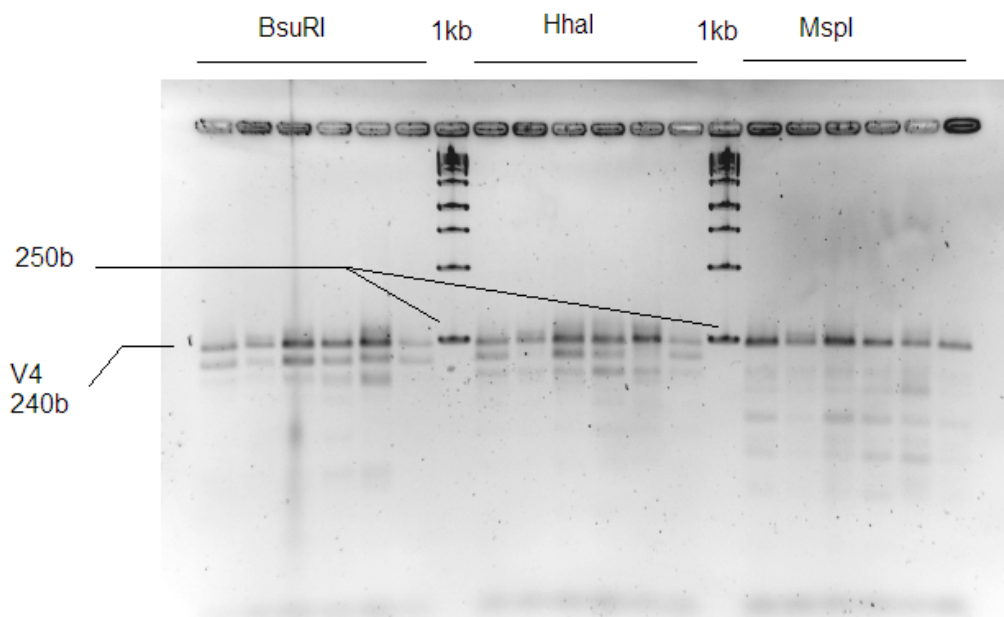
Prav tako kot pri profiliranju mikrobne združbe z daljšim odsekom gena za 16S rRNA smo sprva preverili uspešnost reakcije PCR (slika 21) in cepitve z restrikcijскими endonukleazami (slika 22).



Slika 21: 240bp dolg produkt pomnoževanja regije V4 gena za 16S rRNA. Prikazani so naključno izbrani vzorci z isto redčitvijo DNA (10x). Levo velikostna lestvica Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Figure 21: 240bp long PCR product of 16S rRNA V4 region. Random samples with same DNA dilution (10x) are shown. Left lane Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

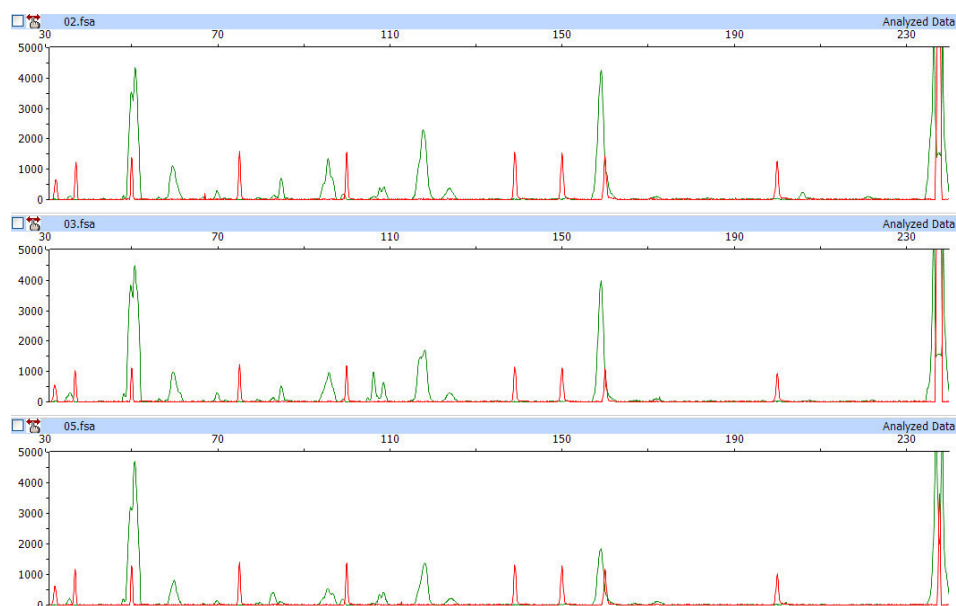
Ugotovili smo, da je nastal pričakovan produkt PCR ustrezne dolžine, koncentracije DNA, ki smo jih uporabili za pomnoževanje začetnega, 918b dolgega dela gena za 16S rRNA, pa so bile primerne tudi za pomnoževanje regije V4. Pri cepitvi z restrikcijскими endonukleazami smo ugotovili, da je velik del produkta PCR ostal nerazcepljen.



Slika 22: Cepitev produktov PCR regije V4 16S rRNA z restrikcijскими endonukleazami *BsuRI*, *HhaI* in *MspI*. Prikazani so naključno izbrani vzorci. Liniji 7 in 14: velikostna lestvica Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) z označenim velikostnim standardom 250b.

Figure 2: Digestion of V4 16S rRNA PCR products with restriction endonucleases *BsuRI*, *HhaI* and *MspI*. Random samples are shown. Arrows point to 250bp size standard from Generuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

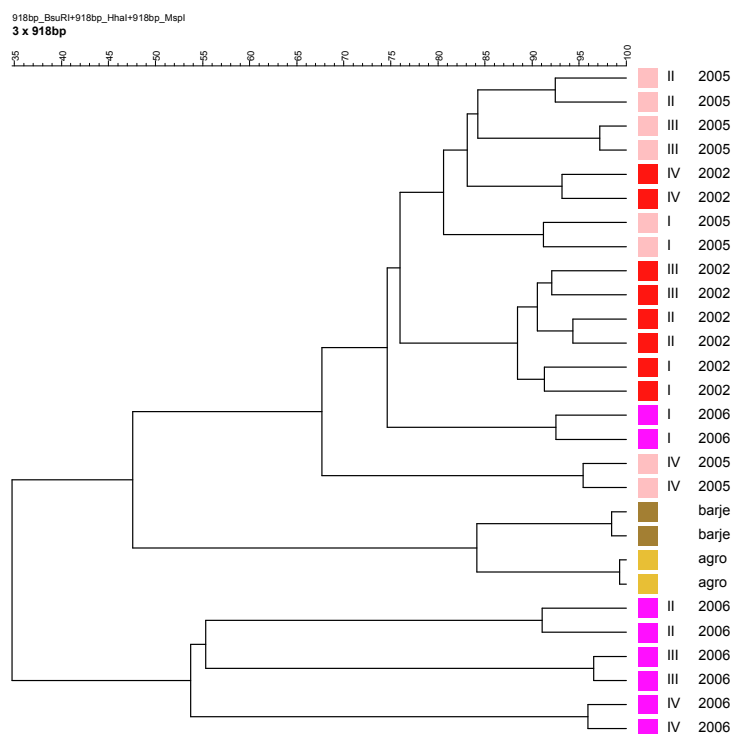
Po preverjanju aktivnosti encimov smo zaključili, da je nerazcepljenost posledica odsotnosti specifičnih mest cepitve v regiji V4 genov za 16S rRNA. S kapilarno elektroforezo smo ugotovili, da predstavlja nerazcepljeni produkt največji delež vseh končnih fragmentov. Pri količini vzorca nanesenega v elektroforezo, ki je omogočala zaznavo drugih končnih fragmentov, je nerazcepljeni produkt v vseh vzorcih prebil zgornjo mejo detekcije kapilarne elektroforeze (slika 23). Elektroferograme smo primerjali v velikostnem razponu od 40bp do 225bp.



Slika 23: Analizirani elektroferogrami kapilarne elektroforeze (Peak Scanner Software, AB) treh naključno izbranih profilov TRFLP variabilne regije 4. Rdeča linija predstavlja interni standard Genescan 500 (AB) do velikostnega standarda 200bp, zelena končne fragmente gena za 16S rRNA. Os x predstavlja velikosti fragmentov v bazah, os y pa intenziteto fluorescence.

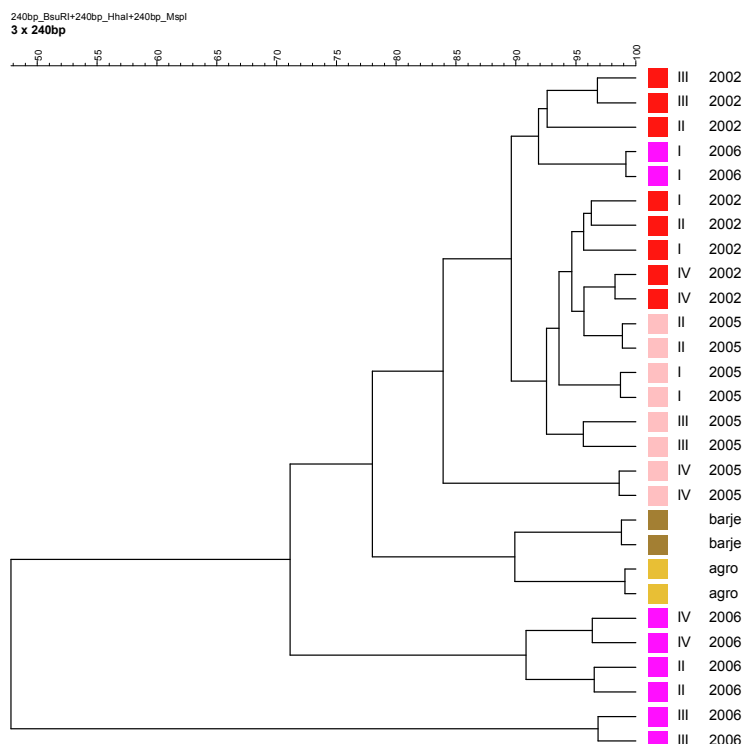
Figure 23: Capillary electrophoresis results shown in Peak Scanner Software, AB. Three random TRFLP electropherograms of V4 region are shown. Red line is internal standard Genescan 500 (AB) and green line represents terminal restriction fragments. Axis x shows fragment size in base pairs and y axis is fluorescence.

Ko smo primerjali združene rezultate treh profilov TRFLP 918bp in 240bp dolgega dela gena za 16S rRNA z analizo gruč (sliki 24 in 25), smo ugotovili, da smo z analizo obeh delov gena za 16S rRNA odkrili podobne gruče, v podrobnostih pa so se rezultati razlikovali. Tako kot v primeru profilov TRFLP začetnega, 918bp dolgega dela gena, so najbolj oddaljeni vzorci II, III in IV iz leta 2006. V prvem primeru tvorijo gručo s 35% podobnostjo z ostalimi vzorci, medtem ko so v primeru analize regije V4 v dveh gručah. Podobnost vzorca III/2006 z drugimi vzorci je 49%, gruče II-IV/2006 pa 71%. Zmanjšanje razlikovanja med vzorci pri krajšem delu gena za 16S rRNA, smo opazili tudi v primeru nehimalajskih vzorcev, katerih podobnost je pri 918bp TRFLP 84%, pri 240bp TRFLP pa 90%. Razlike med vzorci so manjše tudi znotraj gruče preostalih vzorcev.



Slika 24: Dendrogram TRFLP začetnega, 918bp dolgega dela gena za 16S rRNA vzorcev s 6000 m nm odvzetih v letih 2002, 2005 in 2006 in dveh nehimalajskih vzorcev. Združeni so podatki vseh treh cepitev.

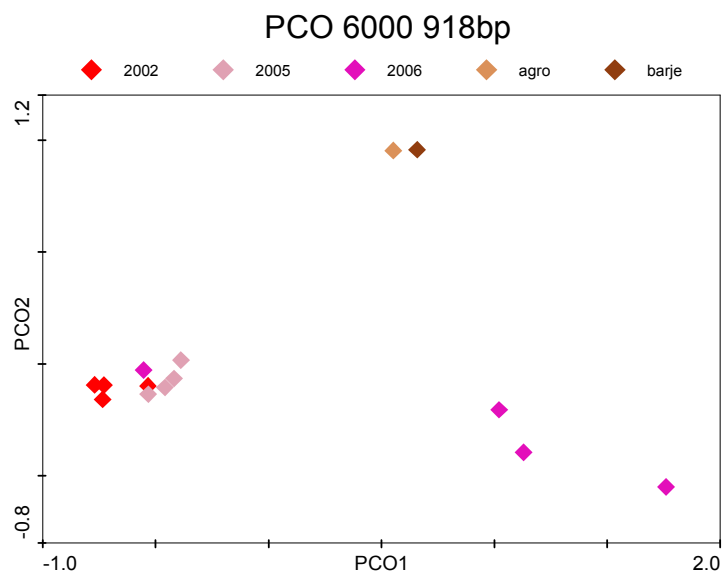
Figure 24: Dendrogram of TRFLP from initial 918bp fragment of 16S rRNA gene. Samples from 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006 with all tree digestions are shown. Two unrelated soil samples are also included.



Slika 25: Dendrogram TRFLP 240bp dolge regije V4 gena za 16S rRNA vzorcev s 6000 m nm odvzetih v letih 2002, 2005 in 2006 in dveh nehimalajskih vzorcev. Združeni so podatki vseh treh cepitev.

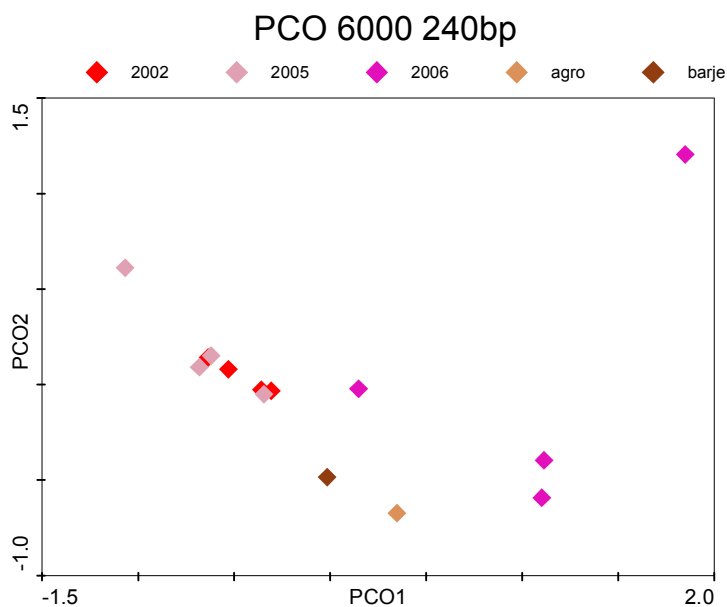
Figure 25: Dendrogram of TRFLP from 240bp fragment with 16S rRNA V4 gene region. Samples from 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006 with all tree digestions are shown. Two unrelated soil samples are also included.

Pri primerjavi analize glavnih koordinat rezultatov TRFLP iz različnih delov gena za 16S rRNA, je bila razlika med obema eksperimentoma bolj očitna (sliki 26 in 27). Pri TRFLP začetnega, 918bp velikega dela gena za 16S rRNA smo ponovno opazili homogeno skupino vzorcev iz let 2002 in 2005 ter enega iz 2006, ter precej oddaljene vzorce II III in IV iz leta 2006. Od vseh himalajskih sta oddaljena tudi nehimalajska vzorca, ki pa sta zelo skupaj. Pri TRFLP 240bp dolge regije V4 gena za 16S rRNA ni tako izrazitih skupin vzorcev. Vzorca II in IV/2006 sta bližje večini ostalih vzorcev, vmes pa sta nehimalajska vzorca.



Slika 26: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP z začetnim, 918bp dolgim delom gena za 16S rRNA. Vključeni so vzorci z nadmorske višine 6000 m iz let 2002, 2005 in 2006 in dva nehimalajska vzorca.

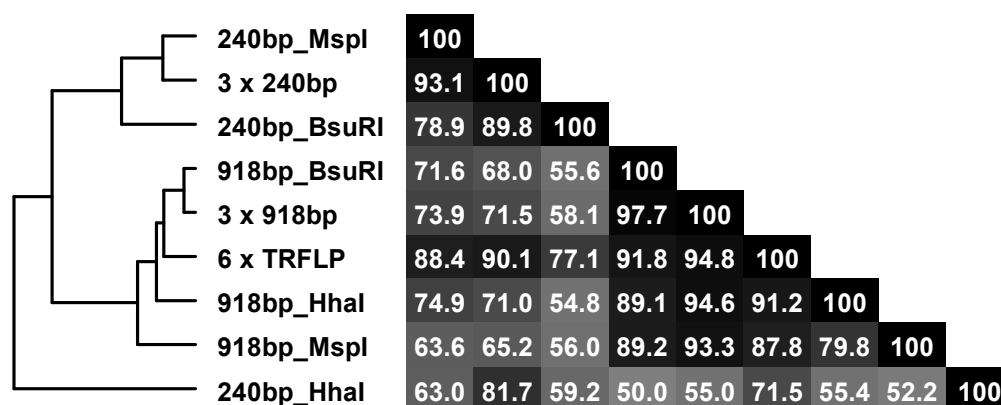
Figure 26: Principal coordinates analysis from all three TRFLP profiles from initial 918bp fragment of 16S rRNA gene. Samples from 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006 with all tree digestions are shown. Two unrelated soil samples are also included.



Slika 27: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh eksperimentov TRFLP z 240bp dolgo regijo V4 gena za 16S rRNA. Vključeni so vzorci z nadmorske višine 6000 m iz let 2002, 2005 in 2006 in dva nehimalajska vzorca.

Figure 27: Principal coordinates analysis from all three TRFLP profiles from 240bp fragment with 16S rRNA V4 gene region. Samples from 6000 m asl sampled in years 2002, 2005 and 2006 with all tree digestions are shown. Two unrelated soil samples are also included.

V programu Bionumerics smo skladnost (angl. Congruence) posameznih TRFLP eksperimentov in združenih eksperimentov primerjali s Pearsonovo korelacijo. Na sliki 28 je prikazana matrika skladnosti eksperimentov in pripadajoč UPGMA dendrogram.

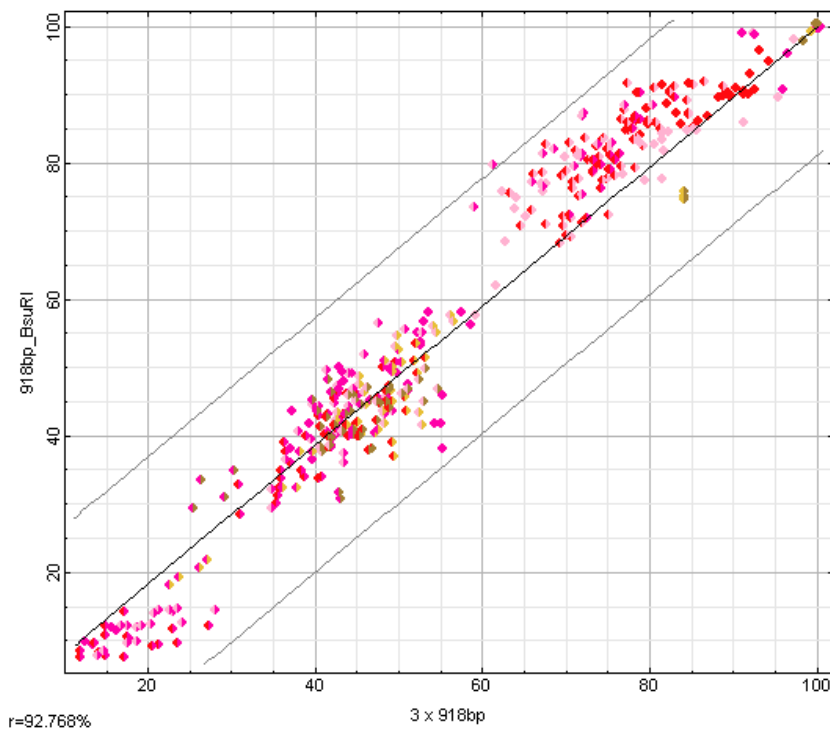


Slika 28: Matrika skladnosti (Congruence) posameznih in združenih TRFLP eksperimentov ter pripadajoč dendrogram UPGMA.

Figure 28: Congruence of experiments matrix from single and composite experiments and corresponding UPGMA dendrogram.

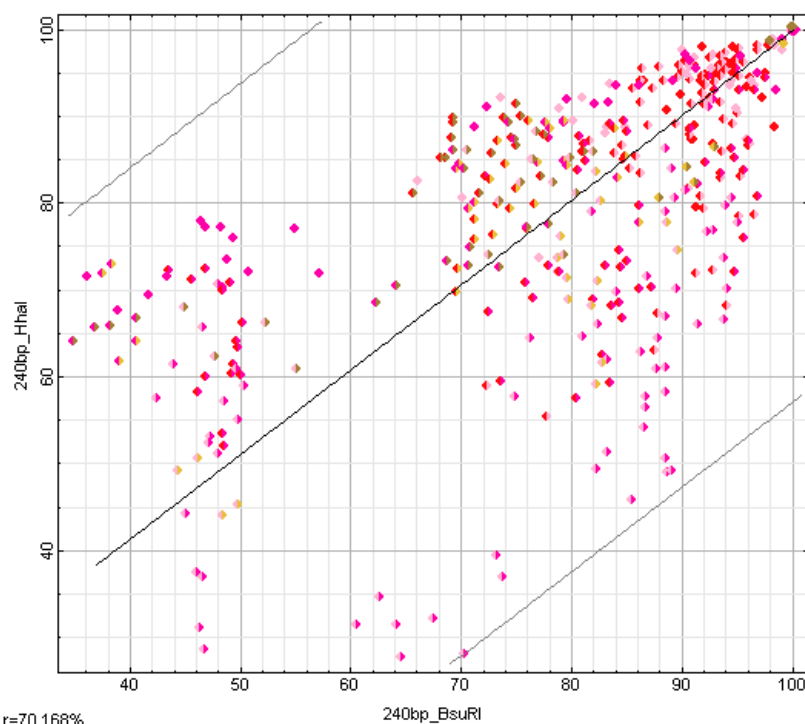
Eksperimenti TRFLP, ki temeljijo na začetnem 918bp velikem produktu PCR tvorijo tesno gručo. Skladnost med posameznimi eksperimenti je med 79,8% in 99,1%. V tej gruči sta tudi združen eksperiment treh 918bp TRFLP eksperimentov in združen eksperiment vseh šestih posameznih eksperimentov. Svojo gručo tvorijo tudi eksperimenti 240bp_MspI in 240bp_BsuRI in združen eksperiment treh 240bp TRFLP eksperimentov. Eksperiment 240bp_HhaI je najmanj skladen z ostalimi, najbližje je eksperimentu 240bp_MspI s 63,0% skladnostjo.

Pri odnosu posameznih eksperimentov do združenih eksperimentov istega produkta PCR je v primeru začetnega, 918bp dolgega produkta najbližje povprečju cepitev z BsuRI, s kar 97,7% skladnostjo (slika 28). Na grafu oddaljenosti posameznih parov pri obeh eksperimentih, lahko vidimo, da ima trendna linija naklon zelo blizu 1 in da se točke sipljejo v bližini premice (slika 29). Pri cepitvah 240bp velikega produkta PCR je najbližje povprečju, cepitev z MspI s 93,1% skladnostjo (slika 28).



Slika 29: Skladnost eksperimenta 918bp_*Bsu*RI in povprečja treh eksperimentov 918bp. Koordinate vsake točke predstavljajo Pearsonov koeficient korelacije med dvema elektroferogramoma v obeh eksperimentih (x, y). Barve predstavljajo izvor elektroferogramov kot so predstavljeni na sliki 24.

Figure 29: Congruence of experiment 918bp_*Bsu*RI and composite experiment of all three 918bp experiments. Coordinates of each dot represent Pearson correlation coefficient value of two samples in each of the two experiments (axis x and y). Samples are color coded as in figure 24.



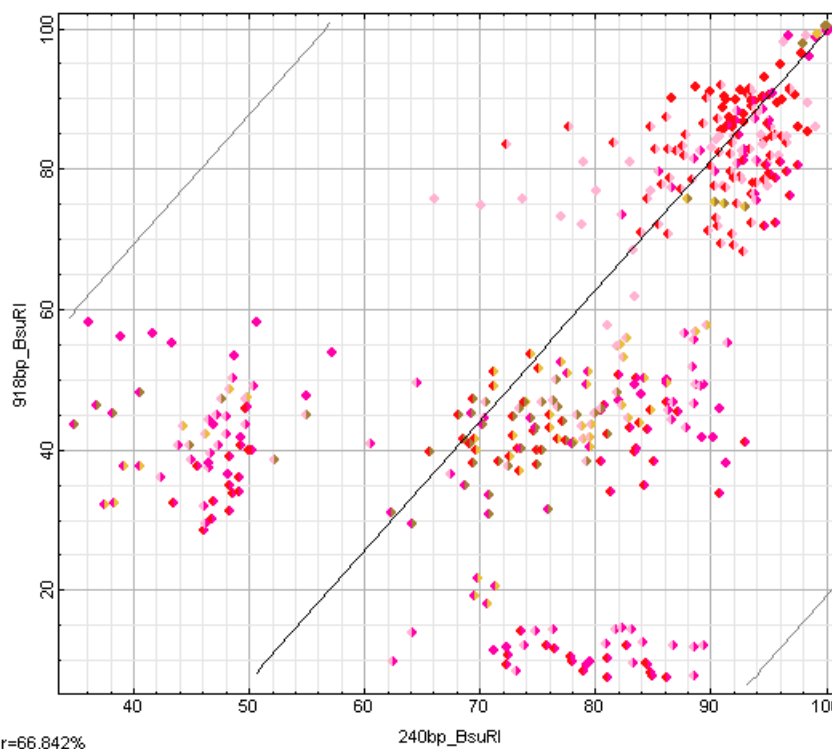
Slika 30: Skladnost eksperimentov 240bp_HhaI in 240bp_BsuRI. Koordinate vsake točke predstavljajo Pearsonov koeficient korelacije med dvema elektroferogramoma v obeh eksperimentih (x, y). Barve predstavljajo izvor elektroferogramov kot na sliki 24.

Figure 30: Congruence of experiment 240bp_HhaI and 240bp_BsuRI. Coordinates of each dot represent Pearson correlation coefficient value of two samples in each of the two experiments (axis x and y). Samples are color coded as in figure 24.

Kot nasprotje primera, v katerem je bila skladnost eksperimentov velika (slika 29), je na sliki 30 prikazan graf dveh neskladnih (59,2%) eksperimentov istega produkta PCR, 240bp_HhaI in 240bp_BsuRI. Premica ima tudi tu naklon okoli 1, vendar se točke sipljejo v mnogo širšem pasu.

Če pa primerjamo dva neskladna eksperimenta iz različnih produktov PCR, 918bp_BsuRI in 240bp_BsuRI (55,6%), naklon trendne linije ni več blizu 1 (slika 31, skali x in y nista simetrični). Kot smo ugotovili že pri primerjavi dendrogramov, ima večina parov elektroferogramov v primeru daljšega produkta PCR nižji Pearsonov koeficient korelacije (PKK). Vzorci se tudi razporedijo v več gruč. V levem delu grafikona leži gruča, kjer smo v obeh eksperimentih ugotovili podobno razliko med vzorci (med 30% in 50% PKK). V spodnjem desnem kotu grafikonu pa je gruča pri kateri smo v eksperimentu 918bp_BsuRI ugotovili podobnost med vzorci pod 15%, v eksperimentu 240bp_BsuRI pa med 70% in 90%.

Ugotovili smo tudi, da v primeru uporabljenih delov gena za 16S rRNA, eksperimenti različnih produktov PCR, ki so bili cepljeni z isto restriksijsko endonukleazo, niso bolj skladni, kot tisti, ki so bili cepljeni z različnimi endonukleazami, kar lahko vidimo v matriki na sliki 28. Eksperiment 918_ *Bsu*RI je tako naprimer 55,6% skladen z eksperimentom 240_ *Bsu*RI ter 71,6% in 50,0% z eksperimentoma 240_ *Hha*I in 240_ *Msp*I.



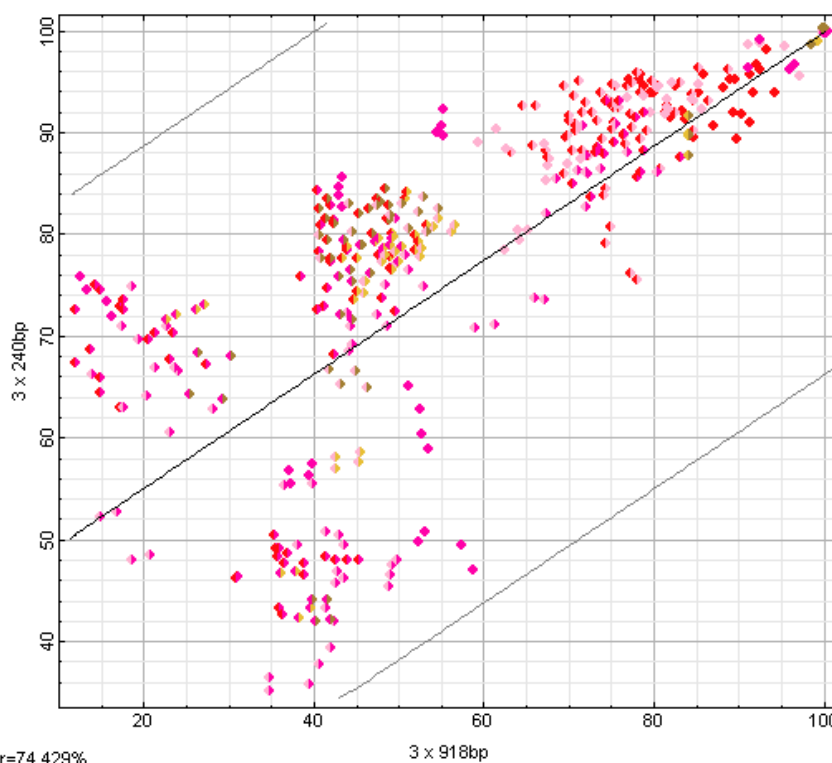
Slika 31: Skladnost eksperimentov 918bp_ *Bsu*RI in 240bp_ *Bsu*RI. Koordinate vsake točke predstavljajo Pearsonov koeficient korelacije med dvema elektroferogramoma v obeh eksperimentih (x, y). Barve predstavljajo izvor elektroferogramov kot na sliki 24.

Figure 31: Congruence of experiment 918bp_ *Bsu*RI and 240bp_ *Bsu*RI. Coordinates of each dot represent Pearson correlation coefficient value of two samples in each of the two experiments (axis x and y). Samples are color coded as in figure 24.

Podobno sliko kot na sliki 31 lahko vidimo, če primerjamo združena eksperimenta obeh produktov PCR (slika 32).

Zaključimo lahko, da ima krajši, 240bp dolg del gena za 16S rRNA občutno manjšo moč razlikovanja, kar lahko onemogoča ločevanje podobnih vzorcev. Posamezni restriksijski encimi tvorijo manj skladne rezultate, povprečje treh eksperimentov pa omogoča, vsaj pri manj podobnih gručah vzorcev razlikovanje, ki je podobno kot pri analizi daljšega, 918bp

dolgega produkta PCR. Rezultati tudi kažejo, da v primeru preučevanih himalajskih vzorcev tal, regija V4 gena za 16S rRNA vsebuje informacijo, na podlagi katere bi lahko s podrobnejšo analizo mikrobne združbe najverjetneje našli razlike v strukturi mikrobne združbe in bi zato bila zanimiva za nadaljnje raziskave s pirosekvenciranjem.



Slika 32: Skladnost združenih eksperimentov 918bp in 240bp. Koordinate vsake točke predstavljajo Pearsonov koeficient korelacije med dvema elektroferogramoma v obeh eksperimentih (x, y). Barve predstavljajo izvor elektroferogramov kot na sliki 24.

Figure 32: Congruence of composite experiments 918bp and 240bp. Coordinates of each dot represent Pearson correlation coefficient value of two samples in each of the two experiments (axis x and y). Samples are color coded as in figure 24.

4.3 VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA OBLIKOVANJE MIKROBNE ZDRUŽBE

Želeli smo opredeliti tudi glavne dejavnike okolja, ki vplivajo na strukturo mikrobne združbe. Uporabili smo podatke o mikrobni združbi na šestih nadmorskih višinah med 5000 in 6000 m nm. Kot pokazatelja sprememb v strukturi mikrobne združbe smo uporabili rezultate TRFLP začetnega, 918bp dolgega dela gena za 16S rRNA. Dejavniki okolja, ki smo jih izmerili so bili: tekstura tal, količina organskega ogljika in skupnega

dušika v tleh ter pH tal (preglednica 2). Kot dejavnik okolja smo upoštevali tudi nadmorsko višino.

Vsi vzorci tal so bili peščeni, z od 80% do 95% peska. Delež peska na nobeni nadmorski višini ni veliko odstopal, povprečje na posamezni nadmorski višini je bilo 84% do 90%. Največji delež grobega peska je bil v vzorcih odvzetih na 5000 m, 5800 m in 5600 m nm s povprečjem 64%, 54% in 53%, najmanjši pa na 5200 m nm s povprečjem 33%. Melja je bilo od 4% do 19%, s povprečji na posamezni nadmorski višini med 9% (5800 m) in 14% (5600 m, 5400 m). Razmerje med grobim in finim meljem je bilo najvišje na 6000 m, kjer je imelo vrednost 1,60, najnižje pa na 5800 m z vrednostjo 0,71. Delež gline je odstopal na 5800 m, s povprečjem 1,0%, na ostalih nadmorskih višinah pa je bil med 1,8% in 2,1% (5000 m, 5600 m in 6000 m nm).

Preglednica 2: Izmerjeni dejavniki okolja s standardnim odklonom (tri meritve)
Table 2: Measured environmental variables with standard deviation (triplicates)

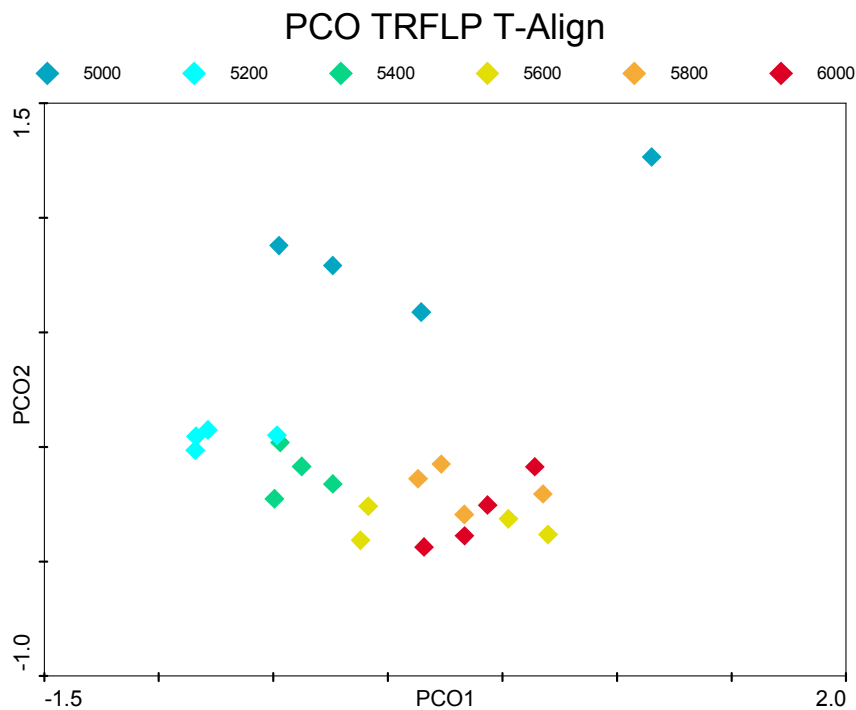
Vzorec	Nad.viš. (m)	Grobi pesek (%)	Fini pesek (%)	Grobi melj (%)	Fini melj (%)	Glina (%)	Organski ogljik (%)	Skupni dušik (%)	pH
I/5000	5000	65,2 ± 2,8	22,9 ± 3,8	4,0 ± 1,1	5,8 ± 0,4	2,1 ± 0,5	0,62 ± 0,16	0,01 ± 0,02	4,9 ± 0,1
II/5000		60,2 ± 6,3	21,6 ± 3,5	8,1 ± 1,2	8,2 ± 3,8	1,9 ± 0,6	0,58 ± 0,08	0,02 ± 0,02	4,8 ± 0,1
III/5000		64,0 ± 4,6	27,3 ± 4,1	3,7 ± 0,5	3,0 ± 1,3	2,0 ± 1,2	0,37 ± 0,09	0,01 ± 0,01	4,8 ± 0,1
IV/5000		66,5 ± 4,7	22,5 ± 3,2	3,5 ± 0,6	5,0 ± 1,5	2,5 ± 0,2	0,46 ± 0,17	0,03 ± 0,01	4,9 ± 0,2
I/5200	5200	31,3 ± 4,2	54,6 ± 4,4	6,0 ± 1,3	6,4 ± 1,3	1,7 ± 0,3	2,92 ± 0,33	0,18 ± 0,09	5,0 ± 0,1
II/5200		35,3 ± 3,4	50,4 ± 3,6	6,8 ± 1,9	5,3 ± 3,3	2,2 ± 1,2	1,67 ± 0,24	0,07 ± 0,02	5,0 ± 0,0
III/5200		36,0 ± 4,5	51,7 ± 3,0	3,9 ± 2,6	6,7 ± 1,6	1,7 ± 0,3	1,46 ± 0,15	0,07 ± 0,01	5,0 ± 0,1
IV/5200		31,0 ± 6,7	57,2 ± 6,3	4,9 ± 1,0	4,9 ± 0,8	2,0 ± 0,2	2,25 ± 0,16	0,11 ± 0,01	5,0 ± 0,1
I/5400	5400	43,2 ± 3,3	41,5 ± 6,5	7,4 ± 0,9	5,8 ± 3,5	2,1 ± 0,4	1,63 ± 0,22	0,15 ± 0,07	5,3 ± 0,1
II/5400		48,5 ± 4,3	38,3 ± 4,1	5,8 ± 0,8	5,4 ± 0,2	2,0 ± 0,4	2,07 ± 0,42	0,18 ± 0,10	5,3 ± 0,0
III/5400		40,2 ± 2,7	45,0 ± 3,0	6,9 ± 0,4	6,2 ± 0,8	1,7 ± 0,3	1,97 ± 0,30	0,20 ± 0,08	5,3 ± 0,1
IV/5400		33,7 ± 5,8	46,2 ± 4,4	11,6 ± 1,4	7,1 ± 1,2	1,4 ± 0,6	1,96 ± 0,32	0,16 ± 0,04	5,3 ± 0,0
I/5600	5600	44,0 ± 7,0	36,0 ± 4,1	10,2 ± 2,6	7,1 ± 1,1	2,7 ± 0,7	1,96 ± 0,24	0,11 ± 0,01	5,3 ± 0,1
II/5600		57,5 ± 1,2	26,4 ± 3,9	5,6 ± 2,2	8,4 ± 2,2	2,1 ± 0,6	2,52 ± 0,11	0,15 ± 0,03	5,4 ± 0,1
III/5600		60,5 ± 3,5	26,5 ± 1,3	5,3 ± 0,7	5,8 ± 2,7	1,9 ± 0,3	1,37 ± 0,05	0,11 ± 0,01	5,4 ± 0,2
IV/5600		50,4 ± 5,9	33,5 ± 4,5	7,7 ± 1,5	6,8 ± 0,8	1,6 ± 0,9	2,04 ± 0,40	0,13 ± 0,03	5,4 ± 0,1
I/5800	5800	53,3 ± 5,8	32,2 ± 4,3	6,2 ± 1,7	6,6 ± 1,3	1,7 ± 0,8	0,64 ± 0,18	0,02 ± 0,01	5,3 ± 0,0
II/5800		58,8 ± 3,4	33,0 ± 3,4	3,7 ± 1,4	3,8 ± 1,0	0,7 ± 0,3	0,48 ± 0,16	0,01 ± 0,00	5,3 ± 0,1
III/5800		47,3 ± 3,6	47,4 ± 3,3	0,7 ± 0,9	3,6 ± 0,5	1,0 ± 0,3	0,63 ± 0,17	0,02 ± 0,01	5,3 ± 0,1
IV/5800		57,6 ± 4,2	30,6 ± 5,5	4,8 ± 1,1	6,4 ± 2,6	0,6 ± 0,2	0,74 ± 0,16	0,02 ± 0,01	5,3 ± 0,1
I/6000	6000	42,1 ± 3,3	46,9 ± 3,6	5,5 ± 1,0	3,6 ± 0,5	1,9 ± 0,9	1,92 ± 0,09	0,14 ± 0,03	5,1 ± 0,2
II/6000		31,8 ± 2,7	53,8 ± 3,8	7,5 ± 2,6	4,7 ± 1,2	2,2 ± 0,4	1,56 ± 0,14	0,11 ± 0,03	5,2 ± 0,1
III/6000		37,9 ± 3,7	47,9 ± 2,7	6,6 ± 0,9	5,4 ± 0,4	2,2 ± 0,5	1,29 ± 0,19	0,10 ± 0,02	5,2 ± 0,1
IV/6000		42,6 ± 5,1	44,4 ± 5,5	7,4 ± 0,6	3,6 ± 0,6	2,0 ± 0,4	1,27 ± 0,05	0,07 ± 0,02	5,3 ± 0,1

Delež organskega ogljika je bil največji v tleh na višinah 5200, 5600 in 5400 m v povprečju med 2,1% in 1,9%, na višini 5800 m je bil delež nižji, 0,6%, na 6000 pa je bil delež 1,5%, torej višji kot na 5800 m. Najmanjši je bil delež na višini 5000 m, 0,5%. Podobno je nihal tudi delež dušika. Razmerje C:N je bilo največje na 5000 in 5800 m, najmanjše pa na 5400 m. Vrednosti pH so bile med 4,8 in 5,4. Najvišji je bil pH na višini 5600 m in je padal proti 5000 m (4,8) in proti 6000 m (5,2).

Iz elektroferogramov, ki smo jih analizirali v programu Bionumerics smo izvozili podatke o dolžini končnih fragmentov in njihovi relativni fluorescenci glede na celotno fluorescenco vzorca. Obravnavali smo vse tri ponovitve istega vzorca in ločeno vse tri cepitve z restrikcijskimi endonukleazami. S programom T-Align smo iz celotnega nabora podatkov za posamezen encim določili meje posameznega fragmenta. Rezultate avtomatske analize smo za encim *BsuRI* primerjali tudi z ročnim urejanjem in potrdili skladnost obeh analiz. Nato smo iz treh profilov istega vzorca tal ustvarili t.i. konsenzni profil vzorca tal. Konsenzni profil smo vključili v t.i. tabelo vrst (angl. species table), ki je bila osnova za multivariatno statistično analizo s statističnim programom prirejenim za ekologijo (Canoco 4.5).

Z v zgornjem odstavku opisanim pristopom smo pri cepitvi z restrikcijsko endonukleazo *BsuRI* v celotnem naboru vzorcev identificirali 72 fragmentov, pri *HhaI* 74 in pri *MspI* 88 fragmentov. Povprečno število fragmentov v posameznem vzorcu za posamezen encim je bilo 21,5 za *BsuRI*, 22,4 za *HhaI* in 27,5 fragmenta za *MspI*. Najprej nas je zanimalo kakšno informacijo lahko izluščimo z analizo posameznih fragmentov v primerjavi z analizo celotnih elektroferogramov, ki smo jo opisali v poglavju 4.1. Tabelo vrst smo s programom PrCoord iz paketa Canoco spremenili v matriko podobnosti med vzorci in s to matriko izvedli analizo glavnih koordinat (slika 33). Po primerjavi z analizo izvedeno na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacije elektroferogramov (slika 15) smo ugotovili, da je slika obeh analiz zelo podobna. Vzorci odvzeti na 5200 in 5400 m nm ne tvorijo tako homogenih skupin in vsi vzorci so tudi bolj skupaj, torej pri tem načinu analize so bolj podobni. Vseeno pa smo tudi pri analizi strukture mikrobne združbe preko posameznih

fragmentov TRFLP opazili razporeditev vzorcev od 5200 m proti 6000 m nm v prvi dimenziji PCO.

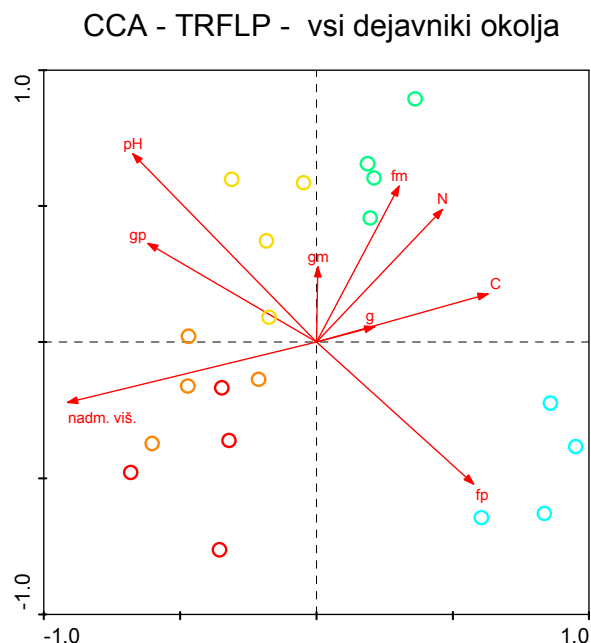


Slika 33: Analiza glavnih koordinat (PCO) z združenimi podatki vseh treh TRFLP eksperimentov z vzorci vertikalnega profila iz leta 2002. Razlike med posameznimi vzorci so izluščene preko analize posameznih fragmentov TRFLP s programom T-Align.

Figure 33: Principal coordinates analysis of composite experiment 918bp with vertical gradient samples from 2002. This time data are obtained through TRFLP peak tables with T-Align software.

Nato smo podatke vsake restrikcijske endonukleaze posebej analizirali z dvema multivariatnima statističnima metodama. Kanonična korespondenčna analiza (angl. Canonical Correspondence analysis, CCA) in analiza redundance (angl. Redundancy Analysis, RDA) se osredotočata na unimodalni (CCA) oziroma linearni (RDA) odziv združbe na dejavnike okolja. Obe analizi sta dali zelo podobne rezultate, odločili pa smo se, da predstavimo rezultate CCA, ki je v vseh primerih pojasnila več variance. Opazili smo tudi, da uspemo pojasniti več variance, če iz analize izvzamemo vzorce odvzete na 5000 m, tako smo se omejili le na vpliv dejavnikov na mikrobno združbo v tleh pobočja, medtem ko smo izključili vzorce s površine ledenika. Rezultati posameznih cepitev so razložili 0,607 (*Bsu*RI), 0,624 (*Hha*I) in 0,739 (*Msp*I) skupne variance, če smo dejavnike

okolja obravnavali neodvisno. V vseh treh primerih je največ variance (λ) pojasnila nadmorska višina vzorčenja, 0,191 do 0,204, z vrednostjo F med 3,05 in 3,22. Sledil je pH tal z 0,152 do 0,159 pojasnjene variance in vrednostjo F med 2,19 in 2,55. Na naslednjih štirih mestih glede na količino pojasnjene variance, so se pri različnih restriksijskih endonukleazah izmenjevali odstotek grobega peska, odstotek finega peska, količina organskega ogljika in količina skupnega dušika z 0,116 do 0,138 pojasnjene variance in vrednostjo F med 1,62 in 2,02. Ostali dejavniki okolja so pojasnili med 0,049 in 0,094 variance z vrednostjo F pod 1,35. Ker smo ugotovili, da analize vseh treh posameznih cepitev prikazujejo zelo podobne rezultate, smo se za grafično predstavitev in končno interpretacijo odločili združiti podatke vseh cepitev. Na sliki 34 so predstavljeni dejavniki okolja in vzorci kot rezultat analize CCA z neodvisnimi prispevki dejavnikov okolja. Dolžina puščice predstavlja pojasnjeno varianco, pravokotna projekcija vzorca na premico dejavnika okolja pa najboljši približek vrednosti dejavnika okolja za vzorec. Uporabljeno je enako barvno kodiranje vzorcev kot na sliki 33.

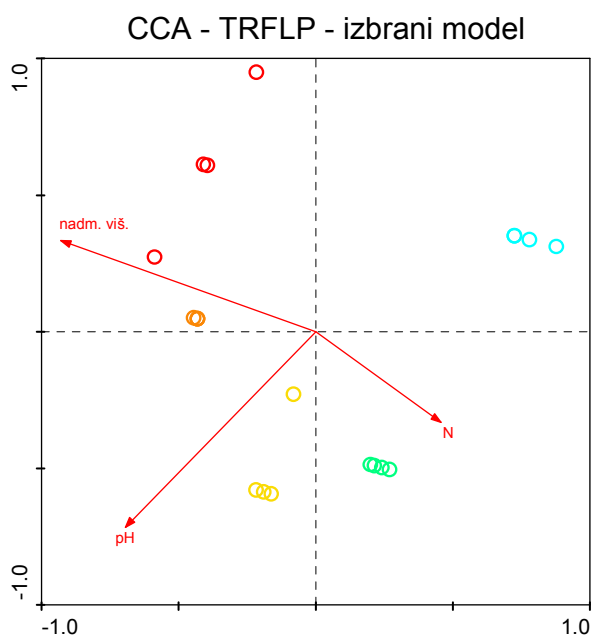


Slika 34: Kanonična korespondenčna analiza (CCA) mikrobne združbe med 5200 m in 6000 m nm. Vključeni so neodvisni prispevki vseh izmerjenih dejavnikov okolja. Vzorci: rdeča – 6000 m, oranžna - 5800 m, rumena – 5600 m, zelena – 5400 m, modra – 5200 m. Dejavniki okolja: gp - grobi pesek, fp - fini pesek, gm – grobi melj, fm – fini melj, g – glina, C – organski ogljik, N – skupni dušik.

Figure 34: Canonical correspondent analysis (CCA) of the microbial community between 5200 m and 6000 m. Independent contributions of all measured environmental factors are included. Samples: red – 6000 m, Orange – 5800 m, Yellow – 5600 m, Green – 5400 m, blue – 5200 m. Environmental variables: gp - coarse sand, fp - fine sand, gm - coarse silt, fm - fine silt, g – clay, C – organic carbon, N – total nitrogen, nadm. viš.- altitude

Vplive posameznih dejavnikov okolja smo nato zaporedno vključevali v model v različnem vrstnem redu in spremljali statistično značilnost (P) prispevka posameznega dejavnika in skupno pojasnjeno varianco vseh statistično značilnih dejavnikov. Pri posameznih cepitvah, kot tudi pri združenem TRFLP profilu, smo s statistično značilnimi prispevki ($P < 0,05$) največ variance pojasnili, kadar smo dejavnike okolja vključili v naslednjem vrstnem redu: nadmorska višina vzorčenja, pH tal, skupni dušik. Vpliv naslednjih vključenih dejavnikov okolja ni bil statistično značilen. Tak model vpliva okoljskih dejavnikov na mikrobno združbo je pri posameznih cepitvah pojasnil od 0,37 do 0,45 variance, z združenimi podatki treh cepitev pa 0,40. Z združenimi podatki treh cepitev

in postopnim vključevanjem dejavnikov okolja nadmorska višina pojasni 0,20 variance (F=3,13), pH tal 0,11 (F=1,92) in skupni dušik 0,09 (F=1,61).



Slika 35: Kanonična korespondenčna analiza (CCA) mikrobne združbe med 5200 in 6000 m nm, z zaporedno vključenimi statistično značilni prispevki izmerjenih dejavnikov okolja. Vzorci: rdeča – 6000 m, oranžna - 5800 m, rumena – 5600 m, zelena – 5400 m, modra – 5200 m. Dejavniki okolja: gp - grobi pesek, fp - fini pesek, gm – grobi melj, fm – fini melj, g – glina.

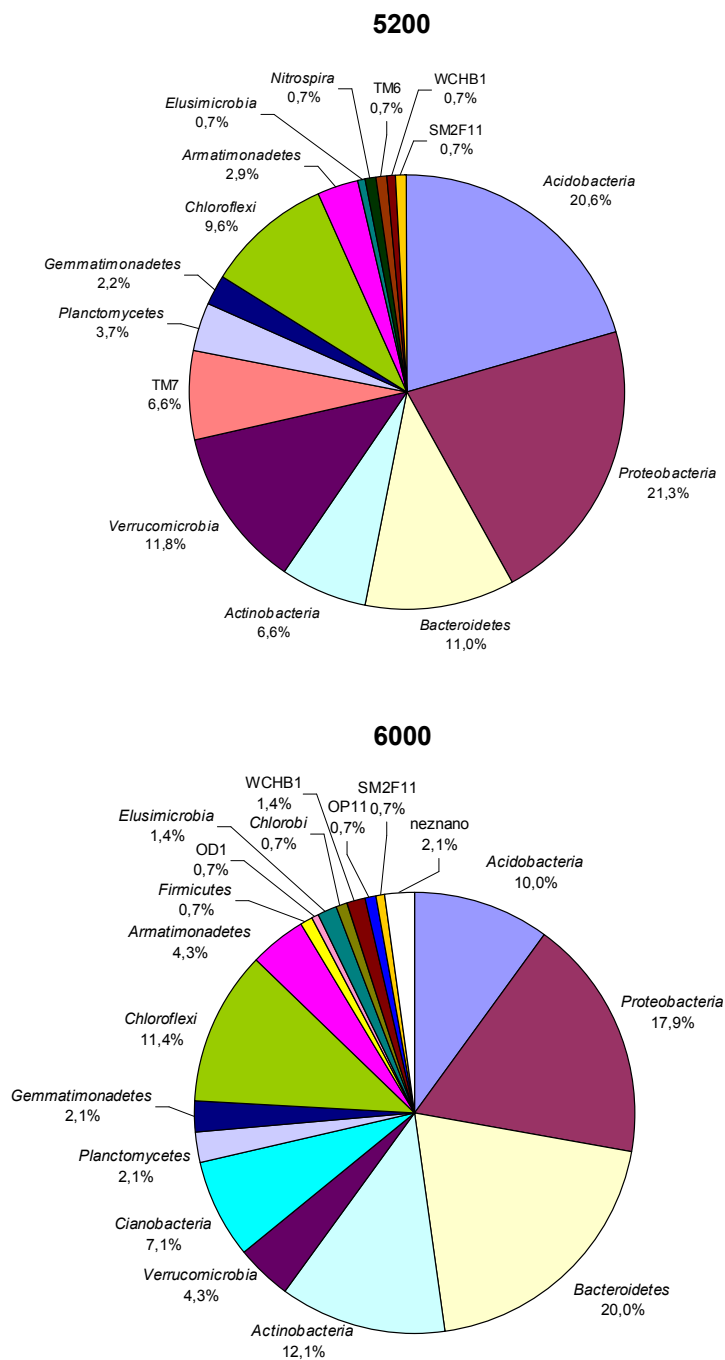
Figure 35: Canonical correspondent analysis (CCA) of the microbial community between 5200 m and 6000 m. Only significant environmental factors are included. Samples: red – 6000 m, Orange – 5800 m, Yellow – 5600 m, Green – 5400 m, blue – 5200 m. Environmental variables: N – total nitrogen, nadm. viš.- altitude

Zaključili smo, da na mikrobno združbo tal himalajskega pobočja med 5200 m in 6000 m najbolj vpliva okoljski dejavnik povezan z nadmorsko višino, v manjši meri pa imata značilen vpliv še pH tal in količina dušika v tleh. Več kot polovice variance nismo uspeli pojasniti.

4.4 KLONSKI KNJIŽNICI GENOV ZA 16S rRNA

Iz dveh vzorcev, ki sta bila odvzeta leta 2002 smo pripravili tudi klonski knjižnici genov za 16S rRNA. Na podlagi rezultatov profiliranja mikrobne združbe s TRFLP, smo se odločili za pripravo knjižnice iz enega vzorca iz nadmorske višine 5200 m in enega iz 6000 m, katerih profila TRFLP sta si najmanj podobna, hkrati pa je združba na teh mestih vzorčenja dokaj homogena. Po odstranitvi himernih sekvenc, smo pridobili 137 delnih sekvenc gena za 16S rRNA iz vzorca s 5200 m in 140 sekvenc iz vzorca s 6000 m s povprečno dolžino 631bp.

Sekvence smo najprej filogenetsko uvrstili s spletnim orodjem RDP Classifier. V obeh primerih približno dve tretjini predstavljajo sekvence organizmov, ki smo jih lahko uvrstili v pet filogenetskih debel: *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* in *Verrucomicrobia*. V knjižnici s 5200 m prevladujejo acidobakterije in proteobakterije z 21% oziroma 20%, v knjižnici s 6000 m pa bakteroidete in proteobakterije z 20% oziroma 18%. Bakteroidete na 5200 m in acidobakterije na 6000 m so zastopane z 11% in 10% sekvenc. Debeli *Verrucomicrobia* in *Actinobacteria* sta zastopani z 11% in 7% v knjižnici s 5200 m in 4% in 12% v tisti s 6000 m. V vsaki knjižnici smo zaznali po eno filogenetsko deblo, ki je bilo značilno samo za eno izmed knjižnic, hkrati pa je predstavljalo znaten delež vseh sekvenc. Na 5200 m je to kandidatno deblo TM7 z 7% zastopanostjo, na 6000 m pa cianobakterije z 10% vseh sekvenc v knjižnici. V obeh knjižnicah se pojavijo še sekvence iz debel *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* in *Chloroflexi* z zastopanostjo 2,9%, 2,2% in 0,7% na 5200 m ter 2,1%, 2,1% in 1,4% na 6000 m. Po 2,9% in 1,4% sekvenc se je uvrstilo v takson v preoblikovanju *Bacteria incertae sedis*, 12% oziroma 18% pa jih orodje RDP Classifier ni razvrstilo. Po podrobnejši analizi sekvenc smo ugotovili, da obstajajo v spletnih bazah sekvenc, sekvence zelo podobne sekvencam, ki jih z orodjem RDP Classifier nismo uspeli razvrstiti v filogenetska debela. Med njimi pa ni sekvenc bakterij, ki bi jih raziskovalci že osamili iz okolja in natančneje filogenetsko definirali.

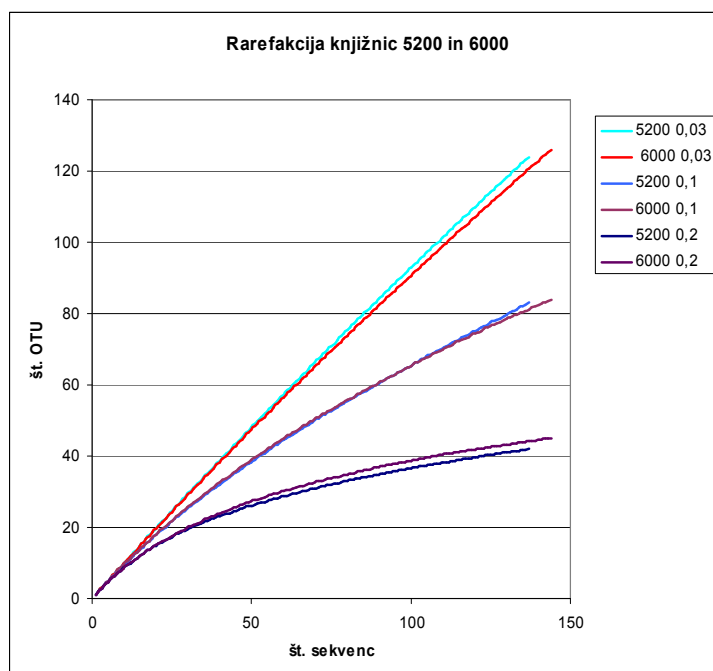


Slika 36: Uvrstitev sekvenc 16S rRNA v veljavna in kandidatna filogenetska debla s filogenetskimi drevesi. Klonski knjižnici vzorcev tal odvzetih na 5200 m (zgoraj) in 6000 m (spodaj).

Figure 36: Affiliation of 16S rRNA sequences with recognized and candidate bacterial phyla. Clone libraries from 5200 m asl (top) and 6000 m asl (bottom).

Iz sekvenc himalajskih knjižnic in podobnih sekvenc iz baz podatkov smo zato izrisali več filogenetskih dreves. Na podlagi taksonomske uvrstitve podobnih sekvenc iz baz smo ugotovili tudi najverjetnejšo identiteto vseh sekvenc. Tortni prikaz porazdelitve sekvenc v filogenetska debla s takim načinom uvrščanja sekvenc je prikazan na sliki 36. Filogenetsko drevo himalajskih sekvenc z dodanima dvema najbolj podobnima sekvencama iz baze Silva za vsako himalajsko sekvenco je prikazano v prilogi B. Sekvencam iz baze je pripisana taksonomija projekta Silva.

Iz matrike dvostranske oddaljenosti sekvenc smo s programom MOTHUR izračunali število operacijskih taksonomskih enot (OTU) pri različni oddaljenosti sekvenc. V knjižnici s 5200 m je bilo unikatnih vseh 137 sekvenc, v knjižnici s 6000 m pa 136 od 140. Pri oddaljenosti 0,03 tvorijo sekvence 124 in 122 operacijskih taksonomskih enot (OTU), pri oddaljenosti 0,05 111 oziroma 112 in pri 0,2 37 oziroma 42 OTU. V skupni bazi sekvenc obeh knjižnic je za zgoraj omenjene oddaljenosti sekvenc število skupnih OTU 10(0,03), 16(0,05) in 21(0,20). Na sliki 37 je prikazana krivulja rarefakcije obeh knjižnic za oddaljenosti 0,03, 0,1 in 0,2.



Slika 37: Krivulje rarefakcije obeh knjižnic. Prikazano je število OTU pri treh različnih definicijah OTU z oddaljenostjo med sekvencami 0,03, 0,1 in 0,2

Figure 37: Rarefaction curves with different sequence distances (0.03, 0.1 and 0.2) from both clone libraries.

Vrednosti indeksov mikrobne bogatosti (Chao1, ACE) in pestrosti (Shannon) za obe knjižnici so predstavljene v preglednici 3. V obeh knjižnicah smo torej zaznali zelo pestro mikrobno združbo, pri čemer knjižnica s 5200 m kaže rahlo večjo mikrobno pestrost pri bolj sorodnih sekvencah, knjižnica s 6000 m pa pri bolj oddaljenih.

Preglednica 3: Vrednosti indeksov mikrobne pestrosti za klonski knjižnici s 5200 m in 6000 m nm.
Table 3: Microbial richness and diversity indexes for clone libraries from 5200 m asl and 6000 m asl

	5200	6000
Chao1	757	604
ACE	798	757
Shannon	4.78	4.78

4.5 PRIMERJAVA KLONSKIH KNJIŽNIC IZ HIMALAJE S PODOBNIMI KNJIŽNICAMI

Klonski knjižnici iz himalajskih tal smo želeli primerjati s knjižnicami iz podobnih okolij. Iz podatkovne baze RDP smo pridobili vse v znanstvenih revijah objavljene in dostopne 16S rRNA knjižnice iz hladnih talnih okolij, dodali pa smo še nekaj obsežnejših knjižnic iz zmernih talnih okolij, ledu, snega in nekaj knjižnic iz drugih okolij, v katerih smo našli več sekvenc z veliko podobnostjo s himalajskimi sekvencami.

Sekvence knjižnic smo v različnih kombinacijah vključevali v filogenetska drevesa in s programom Unifrac ugotavljali sekvence katerih knjižnic imajo največ skupne filogenetske poti s himalajskima knjižnicama. Ob tem smo tudi potrdili, da sta himalajski knjižnici statistično različni in da imata tudi vsaka svoj nabor najbolj podobnih knjižnic. Za knjižnici s 5200 m in 6000 m smo tako pripravili nabor približno tridesetih najbolj podobnih knjižnic in opazovali rezultate metode Unifrac v matriki oddaljenosti knjižnic in položaj naših knjižnic z metodo PCO.

Eno prvih opažanj je bilo, da so nekatere knjižnice iz baze sekvenc bolj podobne eni od himalajskih knjižnic, kot ji je podobna druga himalajska knjižnica. Kar 12 knjižnic je bilo bolj podobnih knjižnici s 5200 m, kot ji je podobna knjižnica s 6000 m. Knjižnici s 6000 m pa so bile bolj podobne kot knjižnica s 5200 m štiri knjižnice iz baze sekvenc. Mera različnosti, t.i. unfrac razdalja, knjižnice, ki je bila najbolj podobna knjižnici s 5200 m, je bila 0,703, knjižnice, ki je bila najbolj podobna knjižnici s 6000 m pa 0,731. Tudi v povprečju, so bile knjižnice iz baz bolj podobne knjižnici s 5200 m kot knjižnici s 6000 m. Tako smo v končni nabor knjižnic, ki so bile najbolj podobne knjižnici s 5200 m vključili knjižnice do unfrac razdalje 0,813, v nabor knjižnic najbolj podobnih knjižnici s 6000 m pa do razdalje 0,837. Med najbolj podobne knjižnice se naprimer niso uvrstile knjižnice iz permafrosta, ledu in snega. Razen ene, katere izvor je talni horizont C, so vse ostale najbolj podobne knjižnice iz površinske talne plasti. Ker analiza PCO ni najbolje prikazala nekaterih razdalj med knjižnicami, smo v sliko PCO vključili še podatek o unfrac razdalji knjižnic od himalajske knjižnice. Knjižnice smo tako razdelili v štiri enako velike razrede unfrac razdalj (5200 m: B1-B4, 6000 m: C1-C4), ki smo jih predstavili z barvami, hkrati pa smo z obliko znaka predstavili izvor knjižnice. Izvor smo razdelili v štiri kategorije. Tri so predstavljale knjižnice hladnih talnih okolij, ena pa knjižnice zmernih okolij (O, krog). Knjižnice iz hladnih okolij smo razdelili na knjižnice iz arktičnega področja (R, zgornji trikotnik), knjižnice iz antarktičnega področja (N, spodnji trikotnik) in knjižnice iz visokogorskih okolij (V, kvadrat). Himalajsko knjižnico smo predstavili z votlim kvadratom.

Na sliki 38, ki predstavlja analizo PCO knjižnic najbolj podobnih knjižnici s 5200 m smo opazili združevanje knjižnic istega izvora. Knjižnice visokogorskih okolij so tako naprimer levo zgoraj, knjižnice antarktičnega področja pa desno spodaj. Knjižnice zmernih območij tvorijo dve skupini, ne sredini levo in desno zgoraj. Obe himalajski knjižnici (z oznakami 23 in 24) imata centralno lego brez jasnega povezovanja s katero izmed prej omenjenih skupin. Če pogledamo knjižnice glede na unfrac razdaljo vidimo, da so najbližje knjižnici s 5200 m (rdeče), dve knjižnici iz tal zmerne okolja in ena iz visokogorskega. Ostale tri kategorije unfrac razdalj (oranžna, zelena in modra) so precej enakomerno porazdeljene po vseh kategorijah izvora knjižnic.

Preglednica 4: Objave v katerih so opisane klonske knjižnice, ki smo jih primerjali s himalajskima knjižnicama.

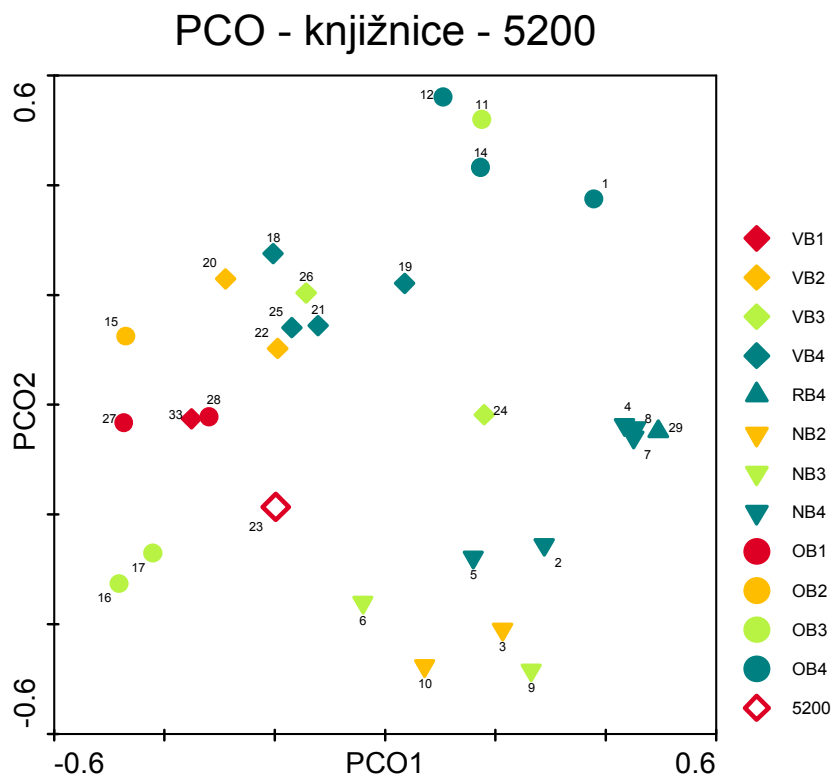
Table 4: Publications with description of clone libraries included in our comparison.

Naslov objave	Prvi avtor	Leto objave
Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation	Borneman	1997
Prokaryotic diversity of arctic ice shelf microbial mats	Bottos	2008
16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China	Chan	2006
Vegetation cover of forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP analysis	Chan	2008
Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier	Cheng	2007
Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment	Costello	2006
A fumarole-supported island of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape, Socompa Volcano, Puna de Atacama, Andes	Costello	2009
Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland	Cruz-Martinez	2009
Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils	Dunbar	2002
Novelty and Uniqueness Patterns of Rare Members of the Soil Biosphere	Elshahed	2009
Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages	Gomez	2007
Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils	Hackl	2004
Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile	Hansel	2008
Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway	Hansen	2007
High similarity between bacterioneuston and airborne bacterial community compositions in a high mountain lake area	Hervas	2009
Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh	Kraigher	2006
Elevated atmospheric CO ₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen	Lesaulnier	2008
Seasonal Changes in an Alpine Soil Bacterial Community in the Colorado Rocky Mountains	Lipson	2004
Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil	Nemergut	2007
The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling	Nemergut	2008
Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica	Niederberger	2008
Toward a Census of Bacteria in Soil	Schloss	2006
Comparison of Microbial Community Compositions of Two Subglacial Environments Reveals a Possible Role for Microbes in Chemical Weathering Processes	Skidmore	2005
Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods	Steven	2007
Microbial diversity and activity through a permafrost/ground ice core profile from the Canadian high Arctic	Steven	2008
The occupant as a source of house dust bacteria	Taubel	2009
Comparative Metagenomics of Microbial Communities	Tringe	2005
Phylogenetic Composition of Rocky Mountain Endolithic Microbial Ecosystems	Walker	2007
Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils	Wallenstein	2007
Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats	Yergeau	2007
Seasonal variation of snow microbial community structure in the East Rongbuk glacier, Mt. Everest	YongQin	2006
Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers	YongQin	2009

Preglednica 5: Klonske knjižnice gena za 16S rRNA, ki so najbolj podobne himalajskim knjižnicam in smo jih prikazali na slikah 38 in 39.

Table 5: List of 16S rRNA clone libraries most similar to Himalayan libraries that are included in figures 38 and 39.

Prvi avtor	Leto objave	Mesto vzorčenja	Opis mesta vzorčenja	Čas vzorčenja	Oznaka	
					5200	6000
Chan	2006	Ailaoshan, Junan, Kitajska	zimzeleni gozd, humus	julij 2004	22	
Costello	2006	Niwot Ridge, Kolorado, ZDA	alpska tundra, moker travnik	junij 2001	33	28
Costello	2009	Socompa, Argentina	hladna fumarola, brez vegetacije	april 2005	25	18
		Socompa, Argentina	greben, brez vegetacije	april 2005		19
		Socompa, Argentina	topla fumarola, brez vegetacije	april 2005		20
		Socompa, Argentina	moker travnik	april 2005	26	21
Cruz-Martinez	2009	Mendocino, Kalifornija, ZDA	travnik	maj 2006	27	
		Mendocino, Kalifornija, ZDA	travnik pomladni dodatek vode	december 2005	28	
		Mendocino, Kalifornija, ZDA	travnik	december 2005		22
Dunbar	2002	Cosnino, Arizona, ZDA	rhizosfera posameznih dreves	1994	11	
		Cosnino, Arizona, ZDA	med drevesi	1994	12	7
		Sunset Crater, Arizona, ZDA	rhizosfera posameznih dreves	1994	14	
Hansel	2008	Oak Ridge, Tennessee, ZDA	z vodo nenasičen horizont C		15	
Kraigher	2006	Ljubljansko barje, Slovenija	nekdanje barje, osušen travnik	2003	1	1
Lesaulnier	2008	Rhineland, Wisconsin, ZDA	nasad trepetlike	junij 2002	16	8
		Rhineland, Wisconsin, ZDA	nasad trepetlike, povišan CO ₂	junij 2002	17	9
Lipson	2004	Niwot Ridge, Kolorado, ZDA	suh visokogorski travnik, spomladi	junij 1999	18	10
		Niwot Ridge, Kolorado, ZDA	suh visokogorski travnik, pozimi	marec 1999	19	
Nemergut	2007	Puca, Cordillera Vilcanota, Peru	100m od umikajočega ledenika	avgust 2003		13
		Puca, Cordillera Vilcanota, Peru	500m od umikajočega ledenika	avgust 2003		14
		Puca, Cordillera Vilcanota, Peru	500m od umikajočega ledenika	avgust 2003		15
Nemergut	2008	Niwot Ridge, Kolorado, ZDA	suh visokogorski travnik	oktober 2003	20	11
		Niwot Ridge, Kolorado, ZDA	suh vis. travnik obogaten z dušikom	oktober 2003	21	12
Niederberger	2008	Northern Victoria Land, Antarktika	brez vegetacije			23
Wallenstein	2007	Toolik, Aljaska, ZDA	grmičevje, mineralna tla	avgust 2004	29	24
		Toolik, Aljaska, ZDA	grmičevje, mineralna tla	junij 2005		25
		Toolik, Aljaska, ZDA	grmičevje, humusna tla	junij 2005		26
		Toolik, Aljaska, ZDA	šopasta trava	avgust 2004		27
Yergeau	2007	Anchorage Island, Antarktika	brez vegetacije	februar 2005	2	2
		Anchorage Island, Antarktika	tla z vegetacijo	februar 2005	3	3
		Ellsworth Mountains, Antarktika	brez vegetacije	december 2005	4	4
		Mars Oasis, Antarktika	brez vegetacije	januar 2003		5
		Falklandski otoki	brez vegetacije	oktober 2004	5	
		Falklandski otoki	tla z vegetacijo	oktober 2004	6	
		South Georgia	tla z vegetacijo	april 2003	7	
		South Georgia	brez vegetacije	april 2003	8	6
		Signey Island, Antarktika	brez vegetacije	januar 2005	9	
		Signey Island, Antarktika	tla z vegetacijo	januar 2005	10	
To delo	2010	Drohmo Peak, Himalaja, Nepal	travnik	oktober 2002	23	16
		Drohmo Peak, Himalaja, Nepal	brez vegetacije	oktober 2002	24	17

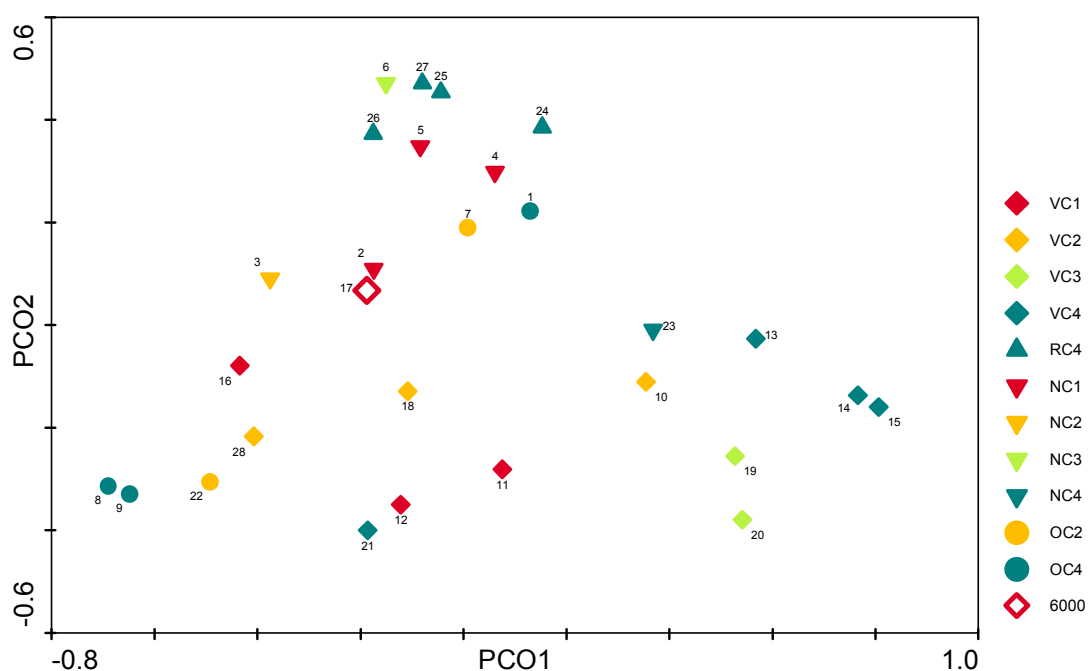


Slika 38: Knjižnice iz literature, ki so najbolj podobne knjižnici s 5200 m nm. Z barvo je predstavljena oddaljenost knjižnic od knjižnice s 5200 m po metodi UniFrac, rdeča – 0,700-0,724, oranžna – 0,725-0,749, zelena 0,750-0,774 in modra nad 0,775. Okolja so predstavljena z obliko znaka: kvadrat – visokogorska, zgornji trikotnik – arktična, spodnji trikotnik – antarktična, krog – zmerna geografska širina in nadmorska višina. Kratak opis posameznih knjižnic je v preglednici 5. Figure 38: Libraries from the literature that are most similar to our 5200 m asl library. The color represents UniFrac distance of libraries from our 5200 m library. Red 0.700 to 0.724, orange 0.725 to 0.749, green 0.750 to 0.774 and blue over 0.775. Environments are presented in the form of a sign: tilted square - mountain, the upper triangle - the Arctic, the lower triangle - Antarctic, round - moderate latitude and altitude. Short description of individual libraries is in Table 5

Na sliki PCO knjižnic, ki so najbolj podobne knjižnici s 6000 m (slika 39) je združevanje knjižnic podobnega izvora manj izrazito, so pa naprimer arktične in antarktične knjižnice na zgornji polovici slike, visokogorske pa na spodnji. V kategoriji najbolj podobnih knjižnic so tri iz visokogorskih travniških tal in tri iz področja Antarktike, vse tri iz podlag brez vegetacije. Na splošno je bližje več knjižnic iz ekstremnih nadmorskih višin (13, 14, 15, 19, 20) in ekstremnih geografskih širin (5). Prav tako pa je v drugi kategoriji oddaljenosti prisotna knjižnica iz tal nižinskega okolja z mediteranskim podnebjem (22).

Z uporabljenimi metodologijami smo torej zaznali knjižnice iz drugih talnih okolij, ki so filogenetsko precej podobne knjižnicam iz himalajskih tal. Izvor teh knjižnic pa so tako ekstremna kot neekstremna talna okolja. Pri knjižnici s 5200 m smo zaznali nekaj več knjižnic travniških visokogorskih okolij in malo več knjižnic zmernih okolij, pri knjižnici s 6000 m pa nekaj več knjižnic iz tal brez vegetacije. Analiza PCO ne kaže na splošno ločevanje knjižnic po kriteriju prisotnosti oziroma odsotnosti vegetacije.

PCO - knjižnice - 6000



Slika 39: Knjižnice iz literature, ki so najbolj podobne knjižnici s 6000 m nm. Z barvo je predstavljena oddaljenost knjižnic od knjižnice s 6000 m po metodi Unifrac, rdeča 0,731-0,755, oranžna 0,766-0,780, zelena 0,781-0,805 in modra nad 0,806. Okolja so predstavljena z obliko znaka: kvadrat – visokogorska, zgornji trikotnik – arktična, spodnji trikotnik – antarktična, krog – zmerna geografska širina in nadmorska višina. Opis posameznih knjižnic je v preglednici 5.

Figure 39: Libraries from the literature that are most similar to our 6000 m asl library. The color represents Unifrac distance of libraries from our 6000 m library. Red 0.731 to 0.755, orange 0.766 to 0.780, green 0.781 to 0.805 and blue over 0.806. Environments are presented in the form of a sign: tilted square - mountain, the upper triangle - the Arctic, the lower triangle - Antarctic, round - moderate latitude and altitude. Short description of individual libraries is in Table 5

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Preučevanja mikrobnih združb tal so se pričela na začetku dvajsetega stoletja z iznajdbo tehnik osamitve in gojenja bakterij v in vitro razmerah. Že zelo kmalu pa so raziskovalci opazili, da obstaja neskladje med številom bakterij kot so ga ugotovili z direktnimi števničnimi tehnikami in številom bakterij, ki zrastejo na gojiščih (Janssen, 2006). Z razvojem molekularno bioloških tehnik v devetdesetih letih 20. stoletja se je to neskladje potrdilo in prišlo v zavest raziskovalcev. Na podlagi danes znanih podatkov raziskovalci sklepajo, da uspemo gojiti le 0,1% do 10% bakterij iz tal (Torsvik in sod., 1990; Nannipieri in sod., 2003). Hkrati z razvojem novih tehnik je raslo spoznanje o kompleksnosti mikrobnih združb, pa tudi o omejitvah molekularno biološkega pristopa k opisu mikrobnih združb (Forney in sod., 2004; Wintzingerode in sod., 1997). Za opis bakterijske združbe tal osrednje Himalaje smo izbrali že nekaj časa razširjen molekularno biološki pristop, ki ne vključuje gojenja mikroorganizmov - analizo gena za 16S rRNA (Woese in Fox, 1977; Amann in sod., 1995; Kirk in sod., 2004).

5.1.1 Osamitev DNA in pomnoževanje gena za 16S rRNA

Izhodišče raziskave je predstavljala DNA, ki smo jo osamili iz vzorcev tal. Osamitev DNA predstavlja tudi prvi korak, ki lahko prispeva k izkrivljanju pogleda na mikrobne združbe (angl. bias) (Feinstein in sod., 2009; Martin-Laurent in sod., 2001; Carrigg in sod., 2007; Frey in sod., 2006; Frostegard in sod., 1999; Delmont in sod., 2011; LaMontagne in sod., 2002). Izbira protokola osamitve DNA je kompromis med učinkovitostjo osamitve, poškodovanjem DNA, ki se odraža v velikosti osamljenih fragmentov mikrobne DNA, prisotnostjo drugih spojin in praktičnostjo izvedbe. Omenjene lastnosti se pri posamezni metodi osamitve lahko razlikujejo, glede na to iz kakšnega tipa tal želimo osamiti DNA. (Krsek in Wellington, 1999; Burgmann in sod., 2001). Naš cilj je seveda bil iz vsakega vzorca tal osamiti kar najbolj reprezentativen vzorec DNA, ki bo omogočal pomnoževanje delov gena za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Za primerjavo med vzorci

pa je bilo še posebej pomembno, da je metoda ponovljiva. Izbrali smo osamitev s komercialnim kompletom za osamitev DNA iz tal, predvsem zaradi omejene količine vzorcev tal, ki ni omogočala obsežnejše predhodne raziskave v kateri bi poizkusili prilagoditi metodo osamitve DNA vzorcem iz Himalaje in ker se je metoda že izkazala za uspešno v velikem številu raziskav. Metoda združuje kemijsko lizo celic z detergentom in mehansko lizo s stresanjem.

V primerjavi z večino raziskav talne mikrobiote, v katerih so najpogosteje osamili med 10 μ g in 100 μ g DNA/g tal, smo osamili manj DNA, čeprav so Stres in sod. (2010) ugotovili, da je v vzorcih prisotna bakterijska združba, katere številčnost je primerljiva z drugimi talnimi okolji. Podobno nizke količine DNA so raziskovalci osamili iz vzorcev tal pod nedavno umaknjanim ledenikom v Alpah (Philippot in sod., 2011). Možno je, da so mikrobne celice zaradi prilagojenosti na ekstremna temperaturna nihanja in povečano količino UV svetlobe bolj odporne tudi na mehansko in kemijsko lizo. Nedavni primerjalni študiji različnih načinov osamitve iz različnih agronomskih tal sta pokazali, da je metoda ki smo jo uporabili v tem delu relativno neučinkovita v primerjavi z nekaterimi drugimi (Inceoglu in sod., 2010, Terrat in sod., 2012). Kljub majhnemu izplenu osamitve DNA pa to še ne pomeni, da smo osamili manj reprezentativen vzorec DNA, kot bi ga ob večjem izplenu DNA. Metode osamitve se namreč razlikujejo tudi po učinkovitosti osamitve DNA posameznih skupin bakterij, njihova učinkovitost pa je odvisna tudi od tipa tal. Nenavadno majhno število (ena) odkritih sekvenc bakterij iz debla *Firmicutes* v obeh knjižnicah, bi lahko bilo posledica izbrane metode osamitve DNA (Terrat in sod., 2012). Glede na izbrano globino analize mikrobne pestrosti in zaznano pestrost v knjižnicah pa kljub vsemu lahko zaključimo, da količina osamljene DNA ni omejila raziskave. V prihodnje pa predvsem zaradi težnje k povečevanju globine analize mikrobne združbe, priporočamo uporabo novejših kompletov za osamitev DNA, oziroma metod, ki omogočajo ponovljivo osamitev z večjim izkoristkom.

Razmerje absorbance raztopine DNA A_{260}/A_{280} , ki se uporablja kot primarno merilo za čistost osamljene DNA je pri DNA, ki so jo osamili iz tal pogosto nižje od vrednosti 1,8, ki velja za čisto DNA, velikokrat prav okoli vrednosti 1,5 (Yeates in sod., 1998; LaMontagne in sod., 2002). Nižje razmerje A_{260}/A_{280} velja za indikator prisotnosti beljakovin. Nižje

vrednosti so lahko tudi posledica pH raztopine, saj spektrofotometrična analiza kislih raztopin kaže 0,2 do 0,3 nižje vrednosti razmerja A_{260}/A_{280} kot analiza pri nevtralnem pH (Nanodrop manual, 2007). Drugo merilo, ki ga uporabljamo za preverjanje čistosti raztopine DNA, je razmerje A_{260}/A_{230} . Za tega velja, da je v čisti raztopini DNA praviloma nad 2, nižje vrednosti pa nakazujejo prisotnost primesi, najpogosteje huminskih kislin. Zelo nizke vrednosti med 0,5 in 1, ki smo jih izmerili, nakazujejo prisotnost huminskih kislin v relativno visoki koncentraciji (glede na koncentracijo DNA). Nizko razmerje A_{260}/A_{230} smo izmerili tudi v vzorcih, ki so bili odvzeti na 5800 ter 5000 m nm in imajo nižjo vsebnost organskih snovi kot drugi vzorci (preglednica 2, organski ogljik). Smo pa iz teh vzorcev osamili tudi manj DNA, zaradi česar je lahko razmerje med huminskimi in nukleinskimi kislinami nespremenjeno. Velika količina huminskih kislin bi lahko bila kriva tudi za nizke izkoristke osamitve DNA zaradi kompeticije za vezavna mesta z nukleinskimi kislinami na silikatnem filtru, ki je del uporabljenega kompleta za osamitev DNA. Velika nihanja v meritvah tako koncentracije, predvsem pa nihanja v razmerjih absorbance pri različnih valovnih dolžinah kažejo, da tudi metoda Nanodrop, ki načeloma omogoča meritve v tem razponu koncentracij DNA, za analizo koncentracije in čistosti raztopine DNA iz himalajskih tal ni najbolj primerna. Na vsebnost huminskih kislin oziroma primesi, ki inhibirajo verižno reakcijo s polimerazo (PCR), kažejo tudi opažanja ob izvajanju PCR, ki jih bomo opisali v nadaljevanju.

Za pomnoževanje dela gena za 16S rRNA smo izbrali začetni oligonukleotid 27F specifičen za bakterije (preglednica 1), ki je en najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za 16S rRNA in je pogosta izbira raziskovalcev za profiliranje bakterijske združbe s TRFLP. V literaturi se pojavlja tudi z imenom 8f, cilja pa na mesta 8 do 26 gena za 16S rRNA (štetje po *E.coli*). Ta začetni oligonukleotid smo označili s fluorescentnim označevalcem, ki je služil za zaznavanje končnih fragmentov gena za 16S rRNA s kapilarno elektroforezo po cepitvi z restrikcijskimi endonukleazami (TRFLP). Uporabili smo ga v paru z neoznačenim začetnim oligonukleotidom 926R (910 do 926 po *E. coli*), katerega specifičnost je širša (Baker in sod., 2003). Zavedamo se, da noben par začetnih oligonukleotidov ne omogoča enakomernega pomnoževanja genov za 16S rRNA iz celotne združbe (Polz in Cavanaugh, 1998; Suzuki in sod., 1998; Lueders in Friedrich, 2003; Sipos in sod., 2007), kar pa tudi ni nujno za uspešno profiliranje mikrobne

združbe. Moramo pa imeti pri ocenjevanju mikrobne pestrosti in primerjavi z raziskavami, v katerih so uporabili drugačne pare oligonukleotidov v mislih tudi to dejstvo.

Inhibicija pri pomnoževanju DNA, ki smo jo osamili iz tal, s PCR, je pogost pojav (Wilson, 1997) in raziskovalci se lotevajo reševanja težave na različne načine. Najbolj očitna možnost je seveda čiščenje, vendar je izvor inhibicije lahko tudi DNA, ki ni tarča naše reakcije (Tebbe in Vahjen, 1993). V našem primeru bi bila to lahko evkariontska DNA gliv, alg, ostankov rastlin in živali, ki so bodisi prisotni v tleh bodisi posledica vetrnih nanosov. Manj verjetno je, da bi inhibicijo povzročala arhejska DNA, ki je v večini raziskav predstavljal le minimalni delež mikrobne DNA v tleh. Netarčne DNA pa se s čiščenjem ne moremo znebiti. Zaradi nizkih izmerjenih koncentracij osamljene DNA iz himalajskih tal, se nismo odločili za nadaljnje čiščenje DNA, ki bi predstavljalo dodatne izgube DNA. Poleg tega iz ocenjenih koncentracij DNA in njene čistosti ne moremo direktno sklepati o zmožnosti pomnoževanja DNA s PCR (Carigg in sod., 2007). Za uspešno se je izkazala metoda, ki naj bi povečala specifičnost in učinkovitost pomnoževanja z dodatkom beljakovine (BSA) za stabilizacijo polimeraze (Kreader, 1996; LaMontagne in sod., 2002) in denaturanta (formamid), v povezavi z redčenjem raztopine DNA (Reysenbach in sod., 1992; Sarkar in sod., 1990). Redčenje smo hkrati uporabili še za prilagajanje količine nastalega produkta. Število ciklov pomnoževanja smo zmanjšali na minimum, ki je še zagotavljal zadostno količino produkta PCR za nadaljnjo analizo s kapilarno elektroforezo. S tem smo želeli omejiti popačenje slike strukture mikrobne združbe (neproporcionalno pomnoževanje manj številnih tarč, himere), ki je lahko posledica dogodkov v poznih ciklih PCR (Suzuki in Giovannoni, 1996; Kanagava, 2003; Kurata in sod., 2004; Acinas in sod., 2005).

5.1.2 Restriksijska cepitev, kapilarna elektroforeza, obdelava podatkov in način predstavitve

Izbira restriksijskih encimov je temeljila na pregledu literature, na podlagi katere smo izbrali štiri največkrat uporabljene restriksijske endonukleaze s prepoznavnim mestom dolžine štirih nukleotidov (Dunbar in sod., 2001; Frey in sod., 2006; Szekely in sod., 2009). Od teh štirih smo nato izbrali tri, *BsuRI*, *HhaI* in *MspI*, ki so po preliminarnih raziskavah omogočile nastanek najbolj pestrih profilov. Restrikcijo smo izvedli v standardnih pufrih proizvajalca z večkratnim pribitkom restriktaze (10 enot), kar je količina, ki so jo v podobnih raziskavah pogosto uporabili za TRFLP. Manjši delež nerazcepljenega produkta PCR smo pripisali odsotnosti restriksijskih mest v majhnem delu sekvenc bakterijske združbe oziroma nedostopnosti mest za restriktaze.

Z restriksijskimi encimi razcepljene produkte PCR smo oborili, sprali, resuspendirali v formamidu in analizirali s kapilarno elektroforezo. Glede na to, da smo proces obdelave vzorcev v laboratoriju zastavili precej na široko, to je za vsak vzorec tal tri osamitve DNA, iz vsake DNA tri reakcije PCR, ki smo jih združili in nato iz te mešanice pripravili tri ločene restriksijske reakcije, smo lahko opazovali tudi vpliv posameznih korakov na končno združevanje profilov v gruče. Najprej smo pri kontrolnih vzorcih (barje in agronomska tla), pri katerih so profili istega vzorca tal vedno tvorili samostojno gručo opazili, da profili ki so bili pripravljene iz iste osamitve DNA niso tvorili parov v dendrogramu, ampak so se naključno združevali v pare s profili drugih osamitev DNA iz istega vzorca tal. Osamitev DNA torej ne prispeva ključne razlike k variabilnosti profilov istega vzorca. Če bi bil ključni dejavnik variabilnosti profilov istega vzorca tal PCR, bi pričakovali, da se bodo pri različnih restriksijskih endonukleazah profili istega vzorca tal združevali v podobne gruče, česar tudi nismo opazili. Profile vseh treh endonukleaz smo namreč pripravili iz iste mešanice PCR reakcij. Velika večina opažene variabilnosti profilov TRFLP istega vzorca tal je torej zelo verjetno posledica zadnjih korakov pri analizi, od restriksijske cepitve do kapilarne elektroforeze, ki jih omenjamo tudi na začetku tega poglavja. Predvidevamo, da je večina variabilnosti posledica razsoljevanja vzorca pred kapilarno elektroforezo, bodisi zaradi različne količine cepljenega PCR produkta, ki ga uspemo zadržati med postopkom obarjanja in spiranja bodisi uspešnosti razsoljevanja,

ki se nato odrazi na različni količini cepljenih produktov PCR iniciranih v kapilare. V prihodnosti bi bilo smiselno preveriti vpliv različnih načinov razsoljevanja na variabilnost profilov istega vzorca.

5.1.2.1 Obdelava podatkov in način predstavitve

Veliko variabilnost med profili TRFLP istega vzorca so opazili tudi nekateri drugi raziskovalci (Dunbar in sod., 2001). Variabilnost se pojavlja tako pri količini bolj zastopanih fragmentov, predvsem pa pri prisotnosti oziroma odsotnosti najmanj zastopanih fragmentov. V devetih ponovitvah istega vzorca so tako odkrili skupaj 169 različnih fragmentov in samo 15 odstotkov se jih je pojavilo v vseh devetih profilih. To variabilnost so pripisali predvsem nizkemu pragu detekcije. Osborn in sod. (2000) so namreč ob višje postavljenemu pragu zaznali mnogo manj variabilnosti med profili istega vzorca. Način primerjave profilov s Pearsonovim koeficientom korelacije, ki smo ga uporabili v tem delu, ne vključuje določanja spodnje meje detekcije ampak primerjavo celotnega profila. Ta način primerjave smo izbrali, ker smo v preliminarnih poskusih z metodami primerjave profilov, ki temeljijo na razčlenitvi profila na posamezne fragmente, zaznali večjo variabilnost med profili istega vzorca. Naše primerjave metod, ki jih omogoča programsko okolje Bionumerics kažejo, da je Pearsonov koeficient korelacije manj občutljiv na razlike v zaznani količini končnih restrikcijskih fragmentov kot metode, ki temeljijo na razčlenitvi profila. Zaradi te variabilnosti je ugotavljanje gruč z dendrogrami nezanesljivo, če so razlike med vzorci manjše od razlik v profilih istega vzorca. Po našem mnenju smo uspešneje razlike v strukturi mikrobne združbe med vzorci himalajskih tal predstavili z metodo ugotavljanja glavnih koordinat (angl: Principal coordinates analysis, PCO), kjer smo vzorce predstavili kot povprečje treh elektroforetskih profilov istega vzorca.

Rezultati ločenih cepitve gena za 16S rRNA s tremi restrikcijskimi endonukleazami so pokazali podobne odnose med mikrobnimi združbami v himalajskih tleh. Pri vseh treh cepitvah smo naprimer ugotovili, da je mikrobna združba v materialu s površine ledenika drugačna kot na pobočju in tudi zelo različna na izbranih štirih lokacijah. Najbolje viden rezultat združevanja vseh treh restrikcij je homogenost skupin vzorcev s 5200 m in 5400 m

in hkrati jasna ločitev obeh skupin. Uporaba treh restrikcij je torej povzročila dodatno zmanjšanje analitske variabilnosti in združila bolj podobne vzorce ter z dodatno informacijo, ki jo prinese vsaka od restrikcij, pripomogla k razlikovanju vzorcev, ki vsebujejo drugačno mikrobno združbo. Hkrati pa so rezultati uporabljenih restriktaz tako pri analizi s PCO, kot tudi pri analizi skladnosti, ki se je gibala med 80% in 90%, precej skladne, torej veliko dodatne informacije o strukturi mikrobne združbe vsaka naslednja uporabljena restrikcijska endonukleaza ne prinese.

5.1.2.2 Metodologija iskanja vplivov okolja na mikrobno združbo

Za analizo vpliva dejavnikov okolja na strukturo mikrobne združbe smo elektroforegrame razčlenili na posamezne končne fragmente in ugotovili njihov relativni delež v vzorcu. Že opisano variabilnost profilov istega vzorca tal (Dunbar in sod., 2001) smo zmanjšali z združevanjem informacij posameznih profilov. Oblikovali smo t.i. konsenzni profil v katerega smo vključili fragmente, ki se pojavijo vsaj v dveh od treh profilov z upoštevanjem povprečja njihove zastopanosti v posameznem profilu. Matriko podobnosti teh profilov smo analizirali s PCO in primerjali s PCO, ki temelji na matriki podobnosti ugotovljeni s Pearsonovim koeficientom korelacije (sliki 33 in 15). Oba prikaza razlik med vzorci sta podobna. Izvor informacije je seveda skupen, tako da to tudi ni presenetljivo, kaže pa, da noben od izbranih pristopov obdelave podatkov bistveno ne izkrivlja pogleda na strukturo mikrobne združbe. Je pa pri PCO, ki smo jo izračunali iz preglednice fragmentov konsenznih profilov razvidno, da so vzorci s pobočja bolj skupaj in gruči vzorcev s 5200 m in 5400 m slabše ločeni, kar verjetno pomeni, da s tako obdelavo podatkov izgubimo del informacije. Manj verjetno se zdi, da bi s Pearsonovim koeficientom korelacije umetno povečali razlike med vzorci. Zgoraj omenjeni ugotovitvi, da z metodo obdelave nismo bistveno izkrivili slike mikrobne združbe in da smo uporabili nabor podatkov, ki vsebuje rahlo okrnjeno informacijo o razlikah v mikrobi združbi med vzorci, dajeta dodatno težo ugotovljenim vplivom dejavnikov okolja na strukturo mikrobne združbe. Predpostavljamo namreč, da bi lahko z neokrnjeno informacijo o razlikah v strukturi mikrobnih združb z dejavniki okolja pojasnili več variance TRFLP.

Najpogostejši način obdelave rezultatov TRFLP s katerim raziskovalci zmanjšajo variabilnost zaradi različne količine analiziranega vzorca, vsebuje korak normalizacije na najnižjo skupno intenziteto fluorescence elektroferograma (Dunbar in sod., 2000). Kadar se količine skupne fluorescence med elektroferogrami občutno razlikujejo, lahko na ta način izgubimo velik del informacije. Pri vzorcih, za katere pričakujemo majhne razlike v mikrobni združbi se tako zdi primernejši način kontrole variabilnosti z izdelavo več profilov za vsak vzorec. Programsko orodje Bionumerics omogoča pregledno delo z velikim številom količino profilov mikrobnih združb, vendar pa se moramo že pred začetkom oblikovanja podatkovne baze odločiti ali bomo spremljali razlike med profili istega vzorca ali pa nas zanima le njihovo povprečje. Iz naših izkušenj predlagamo, da je bolj smiselno oblikovati bazo v kateri ponovitve istega vzorca obravnavamo kot ločene eksperimente, kar omogoča enostavno izdelavo konsenznega dendrograma in matrike podobnosti. Preveč izstopajoče profile istega vzorca lahko izločimo iz analize na podlagi vizualnega pregleda profilov oziroma pregleda dendrogramov posameznih eksperimentov. Orodje Bionumerics žal ne omogoča že omenjene ali kake druge metode normalizacije skupne intenzitete fluorescence posameznega elektroferograma pred primerjavami vzorcev z merami podobnosti, ki temeljijo na razčlenitvi profila na posamezne fragmente, zaradi česar je uporabnost tega orodja močno zmanjšana. Na osnovi naših rezultatov pa lahko sklepamo, da je Pearsonov koeficient korelacije v programskem okolju Bionumerics dobra alternativna metoda primerjave profilov mikrobnih združb, njena prednost je predvsem enostavnost in preglednost dela z velikim številom profilov. O ugotovljenih vplivih okolja na mikrobno združbo bomo pisali v naslednjih poglavjih (5.1.4.2).

5.1.3 Ali informacija v variabilni regiji 4 gena za 16S rRNA (V4) odraža razlike v mikrobni združbi opažene z analizo začetnega dela gena, ki vsebuje variabilne regije 1, 2, in 3 ?

Danes že zelo pogosto uporabljena metoda analize strukture mikrobne združbe je sekvenciranje velikega števila kratkih odsekov 16S rRNA. Klasično sekvenciranje po metodi, ki jo je opisal Sanger, temelji na terminaciji pomnoževanja ter analizi dolžine nastalih produktov in danes omogoča branje sekvence dolgih do 1kb v eni reakciji. Nove

tehnologije sekvenciranja temeljijo na vzporednem pirosekvenciranju velikega števila sekvenc. Resna slabost te metode pregleda mikrobne združbe je dolžina tako pridobljene sekvence in s tem količina informacije s katero lahko tako sekvenco filogenetsko opredelimo. Zato je izbira regije gena za 16S rRNA, ki jo nameravamo analizirati pomembna. Raziskovalci so analizirali že različne odseke variabilnih regij 16S rRNA (Roesch in sod., 2007; Liu in sod., 2007; Huse in sod., 2008; Hamp in sod., 2009; Schloss, 2010). Ena od zanimivih regij je variabilna regija 4 (V4), ki so jo nekateri raziskovalci prepoznali kot najprimernejšo za hitro in zanesljivo filogenetsko opredelitev kratkih sekvenc (Wang in sod., 2007; Sul in sod., 2011). Zanimalo nas je ali lahko razlike v mikrobni združbi himalajskih vzorcev tal zaznamo tudi s TRFLP te regije. Na omejenem naboru vzorcev (6000 m) smo primerjali TRFLP regije V4 s TRFLP daljšega odseka gena za 16S rRNA. Namen ni bil primerjati informativnosti regij V1 in V4 za TRFLP, zato analize nismo omejili na enako dolga odseka gena za 16S rRNA. Pričakovano je daljši odsek vseboval več informacije in zato smo lahko ugotovili večje razlike v strukturi mikrobne združbe, kar vidimo iz slik 26 in 27. V grobem pa je razporeditev vzorcev enaka, vzorci iz let 2002 in 2005 so si zelo podobni, vzorci iz leta 2006 pa so oddaljeni od skupine 2002/2005 in hkrati so med seboj manj podobni. Iz grafikonov skladnosti lahko še vidimo, da najbolj podobni pari vzorcev z izmerjeno podobnostjo nad 90%, ohranjajo to podobnost ne glede na način profiliranja (odsek 16S rRNA, restriktaza). Na sliki 32, primerjamo povprečne podobnosti profilov mikrobnih združb v obliki podobnosti vseh parov vzorcev (po vseh treh restrikcijah) pri obeh odsekih 16S rRNA. Pari vzorcev so se razporedili v štiri skupine. Poleg skupine parov z veliko podobnostjo (desno zgoraj) lahko vidimo, da smo na obeh odsekih 16S rRNA podobne razlike med vzorci zaznali še za manjšo skupino vzorcev v spodnji polovici grafikona (med 35% in 50%). Pri drugih dveh skupinah parov pa smo s krajšim odsekom 16S rRNA zaznali mnogo manjšo razliko. Podobnost vzorcev skupine, ki jo vidimo na sredini, je pri TRFLP daljšega odseka približno 50%, pri TRFLP krajšega odseka pa približno 80%, podobnost vzorcev skupine na levi je pri daljšem odseku približno 20%, pri krajšem pa 70%. Če natančneje primerjamo samo podobnosti teh dveh skupin parov vzorcev na tej sliki (32) in na sliki 31, kjer primerjamo rezultate ene restrikcije (*Bsu*RI) posameznega odseka 16S rRNA vidimo, da sta v primeru ene restrikcije na krajšem odseku (240bp, os x) glavnini obeh skupin parov enakomerno razporejeni med 70% in 90% podobnosti. Pri sliki povprečja treh restriktaz pa ima skupina, ki ima

najmanjše podobnosti pri daljšem odseku tudi nižje podobnosti parov vzorcev (60% do 76%) od skupine parov vzorcev, katerih podobnost je ob združitvi treh restrikcij le malo nižja. Iz tega lahko sklepamo, da informacija o razlikah med vzorci v regiji V4 gena za 16S rRNA obstaja, vendar je ta bolj skrita za metodo TRFLP. Učinek vsake naslednje uporabljene restrikcijske endonukleaze na ločevanje vzorcev je torej v primeru krajšega odseka bolj očiten, kot v primeru daljšega odseka 16S rRNA. Sposobnost razločevanja med mikrobnimi združbami s TRFLP temelji na razlikah v kratkih odsekih sekvenc s prepoznavnim mestom za restrikcijsko endonukleazo. Predvidevamo, da bi s sekvenciranjem, ki bi razkrilo vse razlike v sekvencah regije V4 gena za 16S rRNA odkrili zanimive razlike v strukturi mikrobne združbe.

5.1.4 Kako ekstremna je mikrobna združba na ekstremni nadmorski višini?

5.1.4.1 Pregled sestave mikrobne združbe v vzorcih tal z nadmorske višine 5200 in 6000 m ugotovljene s klonskimi knjižnicami genov za 16S rRNA

Janssen (2006) je pregledal objavljene klonske knjižnice genov za 16S rRNA iz različnih vrst tal in predstavil povprečje zastopanosti posameznih taksonov na osnovi do tedaj objavljenih 2920 sekvenc v 21 knjižnicah. Do nivoja rodu je uspel z orodjem RDP Classifier razvrstiti le 17% sekvenc. Obsežnejši in bolj zanimiv je pregled deležev sekvenc po posameznih filogenetskih deblih. Sekvence iz devetih debel, v vrstnem redu po zastopanosti so to debela, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* in *Firmicutes* predstavljajo v povprečju 92% vseh sekvenc iz posameznih knjižnic.

Rezultate uvrstitve sekvenc knjižnic iz Himalaje v filogenetska debela smo na kratko opisali v poglavju 4.4 in predstavili na sliki 36. Natančnejša uvrstitev sekvenc, ki jo uporabljamo v diskusiji temelji na analizi filogenetskega drevesa, ki je prikazano v prilogi B. Deblo *Proteobacteria* je predstavljalo največ sekvenc v obeh knjižnicah iz Himalaje, skupaj malo pod dvajsetimi odstotki, oziroma 54 sekvenc. V knjižnici s 5200 m so predstavljale proteobakterije 21%, v knjižnici s 6000 m pa 17% vseh sekvenc, medtem ko je Janssen v

različnih knjižnicah ugotovil razpon 10 do 77% s povprečjem vseh knjižnic 39%. Sekvence vseh štirih številčno zastopanih razredov proteobakterij v tleh, to so *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* in *Deltaproteobacteria*, so bile prisotne tudi v himalajskih vzorcih in razmerje med posameznimi razredi je bilo prav tako podobno drugim knjižnicam (Janssen, 2006). Prevladoval je razred *Alfaproteobacteria*, z malo več kot desetimi odstotki vseh sekvenc v obeh knjižnicah. Večino sekvenc alfaproteobakterij smo uvrstili v tri redove, najštevilčnejši je red *Sphingomonadales*. Med sekvencami bakterij, ki smo jih uvrstili v red *Rhizobiales* prevladujejo sekvence s 5200 m, kar ni presenetljivo, saj so predstavniki redu znani koreninski simbionti. Red *Rhodospirillales*, ki so ga raziskovalci spoznali kot najštevilčnejšo skupino v visokogorskih tleh Kolorada (King in sod., 2010) in za katerega predpostavljajo da zavzema fototrofno nišo tal brez vegetacije, je v himalajskih tleh zastopan s tremi sekvencami na 6000 m in eno na 5200 m. Razred *Betaproteobacteria* je bil drugi po številčnosti z malo pod petimi odstotki sekvenc v obeh knjižnicah. Veliko sekvenc smo težko zanesljivo uvrstili v taksone pod ravnijo razreda, nekaj pa jih lahko uvrstimo v redova *Burkholderiales* in *Nitrosomonadales*. Sekvence iz obeh knjižnic so enakomerno razporejene po filogenetskih vejah razreda *Betaproteobacteria*. Skupaj je razred *Gammaproteobacteria* zastopan z malo pod tremi odstotki sekvenc, v knjižnici s 5200 m mu pripada sedem sekvenc (5,1%), v knjižnici s 6000 m pa le ena (0,7%), večino pripada redu *Xanthomonadales*. V razred *Deltaproteobacteria* smo uvrstili dve sekvenci s 5200 m (1,5%) in tri s 6000 m (2,1%).

Acidobacteria so drugo filogenetsko deblo po deležu sekvenc v knjižnicah tal s povprečnim deležem 20% (Janssen, 2006). V himalajskih knjižnicah, so si drugo mesto delile z deblom *Bacteroidetes*. Skupaj smo pridobili 42 sekvenc, oziroma 15 odstotkov vseh sekvenc, 20% iz knjižnice s 5200 m in 10% s 6000 m. Obe knjižnici sta se razlikovali tudi po sestavi združbe acidobakterij. Ker klasična taksonomija debela še ni razdelana, smo upoštevali taksonomijo projekta RDP (Cole in sod., 2009). Največ sekvenc je vsebovala skupina Gp3, 15, devet jih je bilo v knjižnici s 5200 m in šest v knjižnici s 6000 m. V knjižnici s 6000 m je bil delež sekvenc skupine Gp4 občutno večji kot na 5200 m, kar polovico vseh acidobakterij v tem vzorcu (7 sekvenc) smo uvrstili v to skupino, ki je bila druga po zastopanosti. Tretja skupina po zastopanosti sekvenc je bila skupina acidobakterij

Gp1 z osmimi sekvencami (7 in 1), skupini Gp2 in Gp6 pa sta se pojavili le v knjižnici vzorca tal s 5200 m, vsaka s po tremi sekvencami.

Število sekvenc, ki smo jih uvrstili v deblo *Bacteroidetes* odstopa od povprečja 5% v drugih knjižnicah (Janssen, 2006). Še posebej odstopa 20% bakteroidet v knjižnici s 6000 m, kar je na zgornjem robu intervala, ki ga je zaznal Janssen (0-18%). V obeh knjižnicah prevladujejo sekvence, ki smo jih uvrstili v red *Sphingobacteriales* in nadalje v družini *Chitinophagaceae* (25 sekvenc) in *Sphingobacteriaceae* (9 sekvenc). Šest sekvenc iz vzorca s 6000 m smo uvrstili v red *Cytophagaceae*. Med bakteroidetami smo lahko do ravni rodu uvrstili največji delež sekvenc, najštevilčnejši rodovi so (število sekvenc): *Mucilaginibacter* (9), *Segetibacter* (5) in *Ferruginibacter* (4).

Na četrtem in petem mestu po zastopanosti sta bili debli *Actinobacteria* in *Chloroflexi*, vsako s po devetimi odstotki vseh sekvenc. Deblo *Actinobacteria* v povprečju zajema 13% sekvenc v podobnih knjižnicah (Janssen, 2006). V knjižnicah iz Himalaje smo višji delež aktinobakterij našli v vzorcu s 6000 m, 12%, šest odstotkov jih je bilo na 5200 m. Sekvence lahko uvrstimo v za tla običajne tri podrazrede, *Actinobacteridae* (16 sekvenc), *Acidimicrobidae* (5, samo na 6000 m) in *Rubrobacteridae* (5).

Deblo *Chloroflexi* je filogenetsko najobsežnejše deblo med zaznanimi debli. Ko smo tvorili operacijske taksonomske enote (OTU) iz matrike podobnosti vseh himalajskih sekvenc pri oddaljenosti sekvenc 0,20, smo kar 13 od skupaj 58 OTU uvrstili v deblo *Chloroflexi*. Hkrati pa je najslabše definirano deblo in z orodjem RDP Classifier smo v to deblo uvrstili le tri odstotke sekvenc. V filogenetskem drevesu, ki smo ga prikazali v prilogi, je v filogenetskih vejah deblo klorofleksov enajst odstotkov vseh sekvenc. Obe himalajski knjižnici vsebujeta približno enak delež sekvenc klorofleksov in pokrivata podobno filogenetsko širino. V podobnih knjižnicah (Janssen, 2006) je zajemalo to deblo v povprečju tri odstotke sekvenc, z območjem v posameznih knjižnicah med 0 in 16% in je bilo na šestem mestu po zastopanosti. Večji delež bakterij iz debela *Chloroflexi* so raziskovalci zaznali tudi v tleh visokogorske tundre (Costello in sod., 2006) in hladne puščave Antarktike (Pointing in sod., 2009).

Dvanajst odstotkov sekvenc klonske knjižnice gena za 16S rRNA, ki smo jo pripravili iz vzorca tal odvzetega na 5200 m in štiri odstotke knjižnice s 6000 m je predstavljalo deblo *Verrucomicrobia*, kar uvršča deblo na tretje oziroma sedmo mesto po zastopanosti sekvenc v posamezni knjižnici. Povprečje (Janssen, 2006) je sedem odstotkov in četrto mesto. Osemnajst himalajskih sekvenc pripada razredu *Spartobacteria*, štiri sekvence pa tvorijo svoje globoke filogenetske veje skupaj s sekvencami katerih podrobnejša taksonomska razvrstitev še ni jasna.

Od prvih devetih debel po Janssnu so se v obeh himalajskih knjižnicah z deleži med dvema in tremi odstotki pojavile še sekvence iz debel *Planctomycetes* in *Gemmatimonadetes*. Sedem od devetih sekvenc planktomicet smo uvrstili v razred *Planctomycetacia*. Gemmatimonadete predstavljajo dokaj konstanten delež sekvenc v knjižnicah iz tal s povprečno zastopanostjo dva odstotka in območjem med nič in štirimi odstotki (Janssen, 2006). Za zelo ubikvitarne predstavnike bakterij v tleh so se gemmatimonadete izkazale tudi v obeh Himalajskih knjižnicah s po tremi sekvencami.

V obeh himalajskih knjižnicah sta bili na šestem mestu po zastopanosti sekvenc debli (drugo deblo v vsaki knjižnici), ki ju sicer ne odkrijejo med najbolj zastopanimi debli v večini knjižnic (Janssen, 2006). Hkrati sekvenc debela, katerega sekvence so bile prisotne v eni knjižnici, nismo odkrili v drugi himalajski knjižnici. Na 5200 m je to kandidatno deblo TM7 s sedmimi odstotki, na 6000 m pa deblo *Cyanobacteria* s prav tako sedem odstotno zastopanostjo. Sekvence cianobakterij se pogosto pojavljajo v knjižnicah tal v nizkih odstotkih (Lauber in sod., 2009), v nekaterih knjižnicah iz visokogorskih tal (Nemergut in sod., 2007) in tal polarnih območjih (Smith in sod., 2006) pa včasih predstavljajo pretežni del mikrobne združbe. Od 14 sekvenc, ki jih orodje RDP Classifier uvrsti kot cianobakterije, štiri pripadajo kloroplastom. Ostale sekvence lahko uvrstimo v red *Oscillatoriaceae* (Tomitani in sod., 2006), ki sovпада s podskupino III (Bergey's manual, Garrity in sod. 2004). Pet jih po kriteriju 97 odstotne podobnosti tvori najštevilčnejši filotip skupnega nabora sekvenc obeh knjižnic in ga lahko uvrstimo v vrsto *Microcoleus vaginatus*. Ta cianobakterija je pogosta v vročih in hladnih puščavah in je strukturni del bioloških skorij, ki se tvorijo na površini tal. Našli so jo tudi v hladnih tleh Kolorada, Peruja, Antarktike in nedavno tudi Himalaje (Schmidt in sod., 2011). Preostalih pet

sekvenc nismo uspeli natančneje opredeliti, saj med sekvencami v bazah podatkov nismo našli podobnih sekvenc, katerih izvor bi bile bakterije osamljene iz okolja.

V deveto deblo po zastopanosti sekvenc knjižnic iz tal (Janssen, 2006), t.j. deblo *Firmicutes*, smo lahko uvrstili le eno sekvenco knjižnice iz vzorca s 6000 m. V obeh knjižnicah smo zaznali še sekvence iz debela *Armatimonadetes*, ki je bilo do nedavnega poznano kot kandidatno deblo OP10, s štirimi sekvencami na 5200 m in petimi na 6000 m. Ostala zaznana debela, *Elusimicrobia*, *Nitrospira*, *Chlorobi* in kandidatna debela WCHB1, SM2F11, OP11, OD1 in TM6 so zastopana z največ dvema sekvencama v posamezni knjižnici.

Največja klonska knjižnica genov za 16S rRNA ustvarjena iz vzorca tal (Morales in sod., 2009) ima tudi zelo podobno sestavo na ravni debel, kot že opisano povprečje več knjižnic (Janssen, 2006). Največ je proteobakterij (35%) in acidobakterij (20%), sledijo aktinobakterije in bakteroidete s približno desetimi odstotki. Neznačilno močno je zastopano deblo *Thermomicrobia* (7%), sledijo pa gematimonadete in planktomicete s petimi odstotki. Manj od povprečja je sekvenc iz debel *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* in še zlasti debela *Firmicutes*.

Tudi raziskave z analizo krajših odsekov 16S rRNA, ki omogočajo več analiziranih sekvenc iz posameznega vzorca kažejo, da je v različnih tleh porazdelitev sekvenc na ravni debel dokaj konstantna. Prva štiri debela po zastopanosti v knjižnicah te študije so ista, kot so jih zaznali Roesch in sod. (2007) s t.i. globokim sekvenciranjem variabilne regije 9 v štirih geografsko zelo oddaljenih vzorcih tal (med 26.140 in 54.533 sekvenc na knjižnico). Podobno sliko so dobili tudi Holmsgaard in sod. (2011) z analizo variabilnih regij 4 do 6 v agronomskih tleh in Nacke in sod. (2011) v travniških in gozdnih tleh s 23.515 do 39.259 sekvencami variabilne regije 2 in 3. Ta relativna konstantnost razporeditve sekvenc med debli je še bolj presenetljiva če vemo, da so ti podatki pridobljeni z različnimi postopki osamitve DNA, pomnoževanja gena za 16S rRNA, sekvenciranja in identifikacije sekvenc, ki lahko vsi popačijo naš pogled na strukturo mikrobne združbe.

Obratno pa lahko na ravni vrst (po kriteriju 97% podobnosti primerjanih sekvenc) zaznamo izredno raznolikost tudi pri vzorcih, ki so bili analizirani po enakem postopku. Lauber in sod. (2009) so s sekvenciranjem kratkih odsekov gena za 16S rRNA pridobili 152359 sekvenc iz 88 vzorcev tal. Na podlagi kriterija 97% podobnosti so jih razvrstili v 49944 operacijskih taksonomskih enot, ki jih imenujejo filotipi. Kar 65% vseh filotipov je vsebovalo le eno sekvenco, 75% vseh filotipov pa je bilo prisotnih samo v enem vzorcu. Najobsežnejši filotip je vseboval 531 sekvenc oziroma 0,34% vseh sekvenc. V himalajskih knjižnicah smo iz 277 sekvenc oblikovali 236 operacijskih taksonomskih enot (OTU), 87% jih zastopa le ena sekvenca in 96% jih je prisotno samo v eni knjižnici. Največja OTU vsebuje 1,8% vseh sekvenc in samo osem OTU vsebuje tri ali več sekvenc.

5.1.4.2 Vpliv dejavnikov okolja na mikrobno združbo in primerjava s podobnimi knjižnicami

Fierer in Jackson (2006) sta objavila prvo obsežno študijo o vplivih dejavnikov okolja na mikrobno združbo v tleh. Iz 88 vzorcev tal odvzetih na dveh kontinentih sta ustvarila profil mikrobne združbe s TRFLP genov za 16S rRNA in ugotovila, da temperatura in geografska širina statistično značilno ne vplivata na mikrobno združbo v tleh in izpostavila pH tal kot najpomembnejši dejavnik pri oblikovanju mikrobne združbe na globalni ravni. Na istih vzorcih so te ugotovitve kasneje Lauber in sod. (2009) potrdili z analizo klonskih knjižnic, ki so vsebovale v povprečju 1500 sekvenc genov za 16S rRNA. Chu in sod. (2010) so nato primerjali mikrobno združbo 28 vzorcev tal iz kanadske in evropske Arktike z zgoraj omenjenimi 88 vzorci in ugotovili, da se združbe iz Arktike ne razlikujejo od mikrobnih združb tal iz najrazličnejših geografskih širin.

Ali to velja tudi za obe himalajski knjižnici, smo preverjali z metodo Unifrac, ki meri filogenetsko podobnost knjižnic na celotnem filogenetskem razponu, ne le na ravni debel ali operacijskih taksonomskih enot s 97% podobnostjo sekvenc. Vključili smo sicer le knjižnice, ki so bile pripravljene s kloniranjem in objavljene do leta 2009. Rezultati potrjujejo že opaženo dejstvo (Lauber in sod., 2009), da so knjižnice površinskih tal filogenetsko med seboj bolj podobne, kot so podobne knjižnicam iz drugih okolij, naprimer

permafrosta, kamenin, ledu, snega ali hišnega prahu. Večje podobnosti himalajskih knjižnic s knjižnicami tal iz hladnih okolij kot s knjižnicami iz tal zmernih podnebij nismo odkrili. Glede na to, da smo se osredotočili na preučevanje tal iz hladnih okolij, smo v primerjavo knjižnic vključili več knjižnic iz takih tal. Tako je tudi večina knjižnic, ki so najbolj podobne himalajskima knjižnicama iz tal hladnih okolij. Vendar pa so knjižnice iz tal zmernega podnebjja med najbolj podobnimi knjižnicami zastopane v približno enakem razmerju, kot je bilo razmerje knjižnic zmernega in hladnega okolja, ki smo jih vključili v raziskavo. Glede na vse doslej objavljene raziskave, bi podobnosti mikrobnih združb geografsko bližnjih tal, ki smo jih opazili, lahko razložili tudi kot posledico metodoloških podobnosti pri pripravi knjižnic iz podobnega okolja v okviru iste raziskave.

Po pregledu filogenetskega drevesa sekvenc himalajskih knjižnic smo odkrili le malo globljih filogenetskih vej, ki so zastopane le s sekvencami ene knjižnice in lahko na osnovi tega dejstva knjižnici opredelimo kot filogenetsko podobni. V pregledu podobnih knjižnic z metodo Unifrac, pa smo našli precej knjižnic, ki so himalajskima knjižnicama filogenetsko bolj podobne. Zato, lahko zaključimo, da tudi v visokogorskih tleh na ekstremni nadmorski višini geografska oddaljenost tal nima pomembnega vpliva na filogenetsko podobnost mikrobnih združb. Pomen prostorske oddaljenosti tal pri oblikovanju mikrobne združbe v tleh, so raziskovalci nedavno opisali na primeru visokogorskega pobočja v Koloradu (King in sod., 2010). S pirosekvenciranjem 85 vzorcev tal odvzetih na oddaljenosti od 2 do 2000 m in skupno pridobljenimi 16.894 sekvencami povprečne dolžine 230 nukleotidov ter primerjavo združb z metodo Unifrac so ugotovili, da so si bolj od povprečja podobne le knjižnice, ki so med seboj oddaljene do 240 m in da na to podobnost vplivajo le nekatere filogenetske skupine. Odkrili so tudi močne korelacije med biogeokemijskimi dejavniki okolja in filogenetskimi skupinami, s katerimi so lahko uspešno napovedali zastopanost teh skupin v drugih visokogorskih tleh po planetu.

Dejavnike okolja, ki vplivajo na mikrobno združbo smo z multivariatno statistično analizo iskali tudi v tej študiji. Spremembe strukture mikrobne združbe smo zajeli s tremi profiliranji združbe, ki je pri vsakem profiliranju zajelo okoli 80 različnih končnih fragmentov ali ribotipov mikrobne združbe, oziroma 30 v posameznem vzorcu.

Predpostavljamo, da ti ribotipi predstavljajo številčnejše populacije bakterijske združbe v tleh. Kot najpomembnejši dejavnik pri oblikovanju združbe v preučevanih tleh smo spoznali nadmorsko višino na kateri se nahaja mikrobna združba tal. V relativno majhnem naboru izmerjenih biogeokemijskih dejavnikov smo statistično značilen vpliv pokazali še za pH tal in količino skupnega dušika v tleh. Ker ne moremo zanesljivo povezati ribotipa s sekvenco 16S rRNA v bazah sekvenc (Kaplan in Kitts, 2003; Hackl in sod., 2004) oziroma odkriti organizma iz katerega ribotip izvira, nismo analizirali vpliva izmerjenih biogeokemijskih dejavnikov na posamezne ribotipe.

Raziskovalci so nedavno opazili vlogo pH tal pri oblikovanju mikrobne združbe tako na globalni kot mikro ravni. Že omenjeni raziskavi (Fierer in Jackson, 2006; Lauber in sod., 2009) sta pokazali vpliv pH na pestrost in strukturo mikrobne združbe v tleh Severne in Južne Amerike. Največja pestrost je pri nevtralnem pH in se zmanjšuje pri odklonu pH od nevtralnega, tako v smeri bolj kislih kot bolj alkalnih tal. Rousk in sod. (2010) so zelo podoben filogenetski razpon združb in vpliv pH na mikrobno združbo opazili na 180 m pasu tal, ki pokriva enako območje pH vrednosti kot tla dveh kontinentov. Območje izmerjenih pH vrednosti v tej študiji je bilo zelo ozko, med 5,0 in 5,4, vendar smo vseeno lahko opazili vpliv pH na strukturo mikrobne združbe. Vpliv pH v majhnem razponu so opazili tudi že Baker in sod. (2009). Poleg že omenjenega vpliva pH, ki smo ga zaznali s profiliranjem mikrobne združbe s TRFLP, smo nekatere v literaturi opisane vplive pH na združbo opazili tudi pri primerjavi klonskih knjižnic gena za 16S rRNA pripravljenih iz vzorcev odvzetih na nadmorski višini 5200 m (pH 5,0) in 6000 m (pH 5,3).

Medtem ko je precej nedavnih raziskav pokazalo podoben vpliv pH na mikrobno združbo, je glede vpliva nadmorske višine še več nejasnosti. Bryant in sod. (2008) so se omejili le na preučevanje vpliva dejavnikov okolja na bakterije iz debla *Acidobacteria*. Tla so vzorčili v višinskem razponu 1000 m, na nadmorskih višinah med 2400 m in 3400 m ter geografski oddaljenosti do 39km v Koloradu. Opazili so linearen padec pestrosti in bogatosti acidobakterij z rastočo nadmorsko višino. Združbe acidobakterij na posamezni višini so filogenetsko bolj sorodne, kot bi bile v primeru naključne filogenetske razporeditve. Filogenetska podobnost združb pada z naraščanjem višinske razlike in to bolj, kot bi bilo pričakovati glede na razlike v količini skupnih filotipov. To pomeni, da

filogenetske veje niso naključno razporejene po različnih nadmorskih višinah. Temperatura, pH in skupni dušik so najbolj pojasnili spremembe v sestavi filotipov in filogenetski pestrosti. Če so upoštevali vpliv teh dejavnikov pa je bil značilen tudi vpliv geografske oddaljenosti.

Fierer in sod. (2011) so opisali tla na višinah od 200 do 3400 m nm v Andih (Peru), ločeno za površinska (organska, do 5cm) in mineralna tla (5-10cm). Povezave med nadmorsko višino in številom filotipov oziroma filogenetsko pestrostjo bakterij niso našli. Tudi če so posebej obravnavali debli proteobakterij in acidobakterij, ki sta bili najštevilčnejši v vseh vzorcih, niso našli povezave med pestrostjo preučevanih bakterijskih skupin in nadmorsko višino. Knjižnice z različnih nadmorskih višin so bile filogenetsko značilno različne (Unifrac). Za mineralna tla so opazili korelacijo med višinsko razliko in filogenetsko podobnostjo združb, v organskem delu tal pa te povezave niso odkrili. V tleh vključenih v to raziskavo je bil pH relativno konstanten, hkrati pa niso zaznali njegovega vpliva na mikrobno združbo. Prav tako pri mineralnih tleh niso opazili večjih razlik v zastopanosti posameznih filogenetskih debel na različnih nadmorskih višinah. Čeprav je ta raziskava zajela zelo širok višinski gradient, se od podobnih raziskav razlikuje v tem, da tudi vzorci z najvišje nadmorske višine niso predstavljali tipičnega visokogorskega okolja, tako po temperaturah kot po vegetaciji, ki tudi na najvišji nadmorski višini tvori strnjene drevesne krošnje.

Tretja raziskava, ki se je osredotočila na preučevanje vpliv višinskega gradienta na strukturo mikrobne združbe tal, je raziskava pobočja gore Fuji med 1000 in 3700 m nm (Singh in sod., 2012). V tem primeru so odkrili zvonasto obliko povezave nadmorske višine in skupne mikrobne pestrosti, z največjo pestrostjo na nadmorski višini 2500 m in padanju pestrosti proti nižjim in višjim nadmorskimi višinam. Najmanjšo pestrost so odkrili na najvišji točki vzorčenja. Pri preučevanju posameznih številčnih skupin bakterij so zvonasto obliko povezave med nadmorsko višino in mikrobno pestrostjo našli še pri proteobakterijah in bakteroidetah, medtem ko pestrost acidobakterij linearno pada z višino, podobno kot v Koloradu (Bryant in sod., 2008). Za aktinobakterije niso odkrili jasne povezave med pestrostjo in nadmorsko višino. Filogenetska struktura (Unifrac) je bila značilna za posamezno nadmorsko višino. Od dejavnikov okolja je samo nadmorska višina

korelirala z bakterijsko pestrostjo merjeno z indeksi pestrosti ali z bogatostjo filotipov. Vpliv pH tal se je v tej raziskavi pokazal kot značilen le v obliki linearnega odnosa pH in indeksa pestrosti filotipov (Faith's PD). Zanimiva je bila opazna rast zastopanosti kategorije »drugi«, v katero so uvrstili sekvence, ki ji niso razvrstili v prvih devet debel po zastopanosti v različnih knjižnicah tal (Janssen, 2006), z naraščajočo nadmorsko višino. To so razložili s specifičnostjo niše, ki jo zaradi nekompetitivnosti pogostejših filogenetskih skupin v teh razmerah, zapolnijo manj pogoste filogenetske skupine.

Zaključimo lahko, da rezultati te študije v povezavi z rezultati objav drugih raziskovalcev kaže, da se vpliva nadmorske višine in pH prepletata in je verjetno od opazovanega razpona pH in razpona nadmorske višine ter izbrane metodologije odvisno, kateri dejavnik zaznamo kot najpomembnejši. Možno sicer je, da ne obstajajo univerzalne zakonitosti vpliva dejavnikov okolja na mikrobne združbe, glede na trenutno dostopne podatke pa kaže, da sta to dejavnika, ki najbolj značilno oblikujeta visokogorsko talno mikrobo združbo, tako na globalni kot lokalni ravni.

Raziskava opisana v tem delu je zajela višinski gradient na višji nadmorski višini od že omenjenih raziskav. S klonskimi knjižnicami genov za 16S rRNA sicer nismo zajeli celotnega višinskega razpona, le najnižjo in najvišjo točko, lahko pa smo opazili še nekaj podobnosti s primerljivimi raziskavami višinskih gradientov. Na gori Fuji (Singh in sod., 2012) je zastopanost bakteroidet v knjižnicah rasla z nadmorsko višino, z izjemo najvišjega vzorca. V Himalaji je bil na 6000 m delež bakteroidet skoraj še enkrat višji kot na 5200 m. Podobno velja za aktinobakterije, deleži v vzorcih na višji nadmorski višini so bili največji, obratno pa velja za gamaproteobakterije, katerih delež je bil večji na nižjih nadmorskih višinah. Zastopanost acidobakterij je bila v obeh raziskavah prav tako višja na nižji nadmorski višini. Hkrati je bil v obeh raziskavah podoben tudi gradient pH, ki je nižji na nižji nadmorski višini. Za acidobakterije pa so raziskovalci pokazali, da sta tako njihov delež v združbi kot pestrost odvisna od pH tal (Jones in sod., 2009; Rousk in sod., 2010). Možno je tudi, da je bil opisan padec pestrosti acidobakterij z naraščajočo nadmorsko višino v Koloradu (Bryant in sod., 2008) posledica naraščanja pH z nadmorsko višino.

Analiza acidobakterij v že omenjenem naboru vzorcev tal iz Severne in Južne Amerike (Fierer in Jackson, 2006) je pokazala, da acidobakterije predstavljajo večji delež sekvenc v tleh z nižjim pH (Jones in sod., 2009). V celotnem naboru sekvenc so najštevilčnejše skupine (klasifikacija po RDP, Cole in sod., 2009) 4, 1 in 3, v himalajskih knjižnicah pa je vrstni red skupin po zastopanosti sekvenc: 3, 4 in 1 (Jones in sod., 2009). Pri teh skupinah so za skupini 1 in 3 ugotovili negativno korelacijo s pH, za skupino 4 pa pozitivno korelacijo. V himalajskih knjižnicah smo našli približno enak delež sekvenc skupine 3 v obeh knjižnicah, za skupini 1 in 4 pa smo odkrili enak trend, kot so ga ugotovili na globalni ravni.

Raziskava, ki se sicer ni osredotočila na gradient nadmorske višine (King in sod., 2010), je pa zelo natančno vzorčila visokogorsko pobočje v Skalnem gorovju med 3600 in 4000 m nm, je odkrila filogenetske skupine, ki so odgovorne za korelacijo prostorske oddaljenosti in filogenetske podobnosti knjižnic, hkrati pa so korelirane z biogeokemijskimi dejavniki okolja. To so skupina 4 acidobakterij, redova alfaproteobakterij *Rhizobiales* in *Rhodospirales* ter red bakteriodet *Saprospirales*. Dejavniki, ki je koreliran z vsemi skupinami in hkrati zelo neodvisen od drugih dejavnikov je pH, druga dva z velikim vplivom pa sta še prisotnost rastlin in višina snega, ki pa sta povezana med seboj. Zastopanost skupine 4 acidobakterij je bila tako kot na globalni ravni (Jones in sod., 2009) tudi tu najbolj korelirana s pH. Zastopanost redov *Rhizobiales* in *Rhodospirales* je bila korelirana s prisotnostjo rastlin, prvega pozitivno in drugega negativno. Podobno je bilo tudi v himalajskih knjižnicah. V knjižnici iz tal na katerih uspevajo rastline (5200 m) smo odkrili 6 in 2 sekvenci posameznega reda in knjižnici iz tal brez vegetacije (6000 m), 1 in 3 sekvenci. Ob upoštevanju korelacij z drugimi dejavniki okolja so zaključili, da so v visokogorskih tleh predstavniki reda *Rhodospirales* prilagojeni na ekstremno oligotrofno okolje. Njihova zastopanost v mikrobni združbi pa je hkrati močno negativno korelirana s pH tal. Bakterije reda *Saprospirales* se na vplive okolja odzivajo podobno kot skupina 4 acidobakterij.

Vprašanje je s kakšnimi mehanizmi nadmorska višina in pH vplivata na mikrobno združbo. Višja nadmorska višina je naprimer povezana z zmanjšanjem površine, spremembo temperature in količine padavin, večjo količino UV sevanja, več ciklov

zamrzovanja in odtaljevanja in večjim vplivom vetra. Pri rastlinah in živalih so višinski vzorci pestrosti najbolj povezani s temperaturo in padavinami. V tleh v suhem podnebjju so v več raziskavah odkrili, da sta ključna dejavnika pri oblikovanju bakterijske in arhejske združbe količina padavin oziroma količina vode v tleh (Angel in sod., 2010; Clark in sod., 2009; Castro in sod., 2010). Tudi zaznani vpliv pH bi bil lahko posledica posrednih dejavnikov. Nekateri indici pa kažejo, da ima vsaj na nekatere skupine direkten vpliv. Acidobakterije so tako naprimer filogenetsko bolj povezane, ko pH tal odstopa od nevtralnega, kar bi lahko pomenilo, da imajo sorodne skupine enake mehanizme za vzdrževanje znotrajceličnega pH (Jones in sod., 2009).

5.1.4.3 Kakšen delež mikrobne združbe smo spoznali

Trenutne ocene pestrosti tal, ki temeljijo na najbolj obsežnih sekvenciranjih genov za 16S rRNA kažejo, da lahko v gramu tal pričakujemo od 10.000 do 30.000 filotipov, ki jih definiramo kot sekvence s 97% podobnosti (Fierer in Lennon, 2011; Holmsgaard in sod., 2011). Z 124 oziroma 122 filotipi v himalajskih knjižnicah smo zajeli le kanček te pestrosti, kar kažejo tudi rarefakcijske krivulje. Pri 97% podobnosti je odstopanje od diagonale minimalno, približevanja asimptoti ne moremo predvideti, tako da so tudi ocene skupne pestrosti netočne (Gihring in sod., 2012). Indeksi pestrosti so podobni kot indeksi podobno velikih knjižnic pripravljenih iz različnih tal. Iz krivulj vidimo, da je zastopanost filotipov zelo enakomerna (angl. eveness), brez izstopajočih OTUjev z velikim številom sekvenc. Krivulji se bližata platoju pri 80% podobnosti, kar pomeni, da smo, ob upoštevanju popačenj, ki ga tak opis na nivoju analize sekvenc genov za 16S rRNA lahko prinese, opisali pestrost na ravni filogenetskih debel. Popoln opis družbe je ob upoštevanju razvitosti tehnologije v času izvedbe raziskave nepraktičen in nesmiseln. Večina raziskav s klonskimi knjižnicami ne presega reda velikosti himalajskih knjižnic. Največja knjižnica iz tal je tako obsegala 4889 klonov, v njej so odkrili 1714 filotipov in predvideli obstoj 3555 filotipov (Morales in sod., 2009), kar je glede na najnovejša spoznanja še vedno le majhen delež pestrosti. Taka globina analize s klonskimi knjižnicami postane povsem neizvedljiva, ko želimo za primerjati knjižnice več vzorcev. Večje razlike med mikrobnimi združbami zaznamo že z nekaj več kot sto sekvencami (Lemos in sod., 2011). Možnost za večjo

globino analize predstavljajo novi sistemi za paralelno sekvenciranje (zaenkrat) kratkih odsekov genov za 16S rRNA več vzorcev. Dolžina pridobljenih sekvenc zaenkrat sicer še omejuje informativnost take analize, vendar je ta ob istem vložku vseeno za dva razreda ali več večja kot s klonskimi knjižnicami (Liu in sod., 2007; Caporaso in sod., 2011). Trenutne ocene so, da bi lahko v vzorcu tal zaznali do 95% filotipov s približno 500.000 pridobljenimi sekvencami, oziroma skoraj vse z 1.000.000 pridobljenih sekvenc (Holmsgaard in sod., 2011).

Če skušamo na kratko odgovoriti na vprašanje iz naslova tega poglavja (5.1.4) je verjetno najbolj korekten odgovor, da še ne vemo v kakšni meri je mikrobna združba v tleh na najvišjih nadmorskih višinah drugačna od drugih združb v tleh. Profiliranje združbe s TRFLP kaže, da nadmorska višina vpliva na strukturo mikrobne združbe, primerjave knjižnic pa kažejo da ni močne povezave med nadmorsko višino in filogenetsko sestavo mikrobnih združb. Bolj zanesljiv odgovor bomo verjetno lahko dobili, ko bo globlji pregled mikrobne združbe postal bolj dostopen in se bodo uveljavili standardizirani postopki analize mikrobne združbe.

5.1.5 Spreminjanje združb v času

V luči velikega interesa za spremembe v okolju, ki jih povzročajo povišana količina CO₂ ter globalno in lokalno zabeležen porast temperature zraka (Kellenberger in sod., 2006; Thomas in Rai, 2005; Ishikawa in sod., 2001), so nas zanimale tudi spremembe mikrobne združbe tega ekstremnega okolja v času. S profiliranjem mikrobne združbe (TRFLP) smo spremljali spremembe na dveh nadmorskih višinah (5200 m in 6000 m) v vzorcih, ki so bili odvzeti v dveh naknadnih vzorčenjih (leta 2005 in 2006). Opazili smo razlike v strukturi mikrobnih združb v tleh med posameznimi obdobji vzorčenja (slika 20), ki pa so drugačne na različnih višinah. Pri vzorcih s 5200 m so tvorili vsi štirje vzorci posameznega vzorčenja povezane skupine. Razlike med njimi so bile v rangi razlik med vzorci s 5200 in 6000 m odvzetih v letu 2002. Zanimivo je, da je bila tudi os sprememb ista (os x), zaradi česar bi lahko interpretirali mikrobno združbo iz let 2005 in 2006 kot združbo iz navidezno nižje nadmorske višine iz leta 2002. Vendar pa za razliko od vpliva nadmorske višine leta

2002 ta sprememba nima konstantne smeri. Časovno bolj oddaljeni vzorci namreč niso bolj oddaljeni po profilu mikrobne združbe. V zanimivi simulaciji segrevanja okolja v Alpah (Budge in sod., 2011), v kateri so raziskovalci tla iz nadmorske višine 2500 m preselili na 1900 m in s tem povzročili 3,3°C višjo temperaturo, so s profiliranjem združbe ugotovili, da je odziv združbe zelo počasen in se je združba v enajstih letih le deloma približala okoliški.

Raziskav o vplivu CO₂ na mikrobno združbo v tleh zmernega podnebja je več. Tudi v dolgotrajnih eksperimentih z velikim pribitkom CO₂ v večini raziskav korenitih sprememb niso zaznali, še posebej, če so se omejili le na zastopanost posameznih filogenetskih debel v mikrobni združbi (Castro in sod., 2010; Austin in sod., 2009). He in sod. (2012) zaznajo malo zmanjšano pestrost in majhne spremembe v združbi, vpliv CO₂ pa je večinoma posreden. Na združbo vpliva preko vpliva na rastline in značilnosti tal. Tudi Lesaulnier in sod. (2008) so zaznali spremembe pri različnih koncentracijah CO₂, na nižjih filogenetskih ravneh od debel. Opisane statistično značilne spremembe v deblu acidobakterij so imele enak trend kot so ga raziskovalci opazili pri vplivu pH na globalni ravni (Jones in sod., 2009). Pri povišani koncentraciji CO₂ je padla zastopanost acidobakterij, znižal se je delež skupin 1, 2 in 3 ter narasel delež skupin 4 in 6. Menimo, da bi opažene spremembe v himalajskih združbah težko pojasnili s spremembami v temperaturi in koncentraciji CO₂ v preučevanem obdobju. Prav tako ni videti, da bi šlo za sezonska nihanja, kot so jih opazili v zmernejših podnebjih (Lipson in sod., 2004; Cruz-Martinez in sod., 2009), saj si jesenska vzorca (2002, 2005) nista bila bolj podobna, kot sta bila podobna jesenskemu (2006). V raziskavi vpliva različnih klimatskih dejavnikov (temperatura, CO₂, padavine) na mikrobno združbo tal zmernega podnebja (Tennessee, ZDA; Castro in sod., 2010) pa so ugotovili, da ima največji vpliv na mikrobno združbo dostopnost vode. Predpostavljajo, da je ta vpliv posreden preko vpliva na rastline. Različna količina padavin povzroči različno aktivnost rastlin in s tem različen vnos substratov v tla, kar bi lahko imelo za posledico tudi opaženo razliko v mikrobni združbi v himalajskih tleh na 5200 m. Raziskovalci so našli pomembne vplive vode tudi na mikrobno združbo v gozdnih (Fierer in sod., 2007) in travniških tleh (Singh in sod., 2009).

Pri vzorcih odvzetih s 6000 m smo opazili drugačen vzorec sprememb. Med vzorci iz leta 2002 in 2005 nismo opazili bistvenih sprememb. Le eden od vzorcev iz leta 2005 je kazal večjo podobnost z vzorci odvzetimi na 5200 m, kar bi lahko nakazovalo spremembe zaradi segrevanja. V gruči vzorcev iz let 2002 in 2005 je bil tudi en vzorec iz leta 2006. Iz tega bi lahko sklepali, da je združba v tleh s 6000 m, na katerih ne uspevajo rastline, konstantna in ne kaže enakih odzivov na vplive okolja kot združba na 5200 m. Ostali vzorci iz leta 2006 so se močno ločili od drugih vzorcev in v drugi dimenziji PCO kot spremembe, ki smo jih opisovali do sedaj. Zato sklepamo, da je tudi izvor spremembe združbe drug. Iz teh rezultatov in analize klonske knjižnice 16S rRNA s 6000 m leta 2002, kjer je bil najbolj zastopan filotip *Microcoleus vaginatus* predpostavljamo, da je bila na površini tal prisotna funkcionalna biološka skorja, ki ohranja konstantne razmere v tleh in s tem tudi konstantno strukturo mikrobne združbe, čeprav je raziskovalci v času vzorčenja niso opazili. Poleg razlage, da so za tri ločene vzorce iz leta 2006 odgovorni topografski dejavniki, dopuščamo možnost, da je na mestu vzorčenj teh treh tal prišlo do porušenja biološke skorje, možno tudi zaradi naših predhodnih vzorčenj in s tem do vnosa sprememb v strukturo mikrobne združbe (Kuske in sod., 2012).

Dodaten argument, zaradi katerega sklepamo, da je bila tudi v vzorcih tal odvzetih iz 6000 m prisotna stalna talna mikrobna združba, torej da vzorčen material ni posledica sprotnih vetrnih nanosov delcev iz nižjih nadmorskih višin prihaja iz sestave klonske knjižnice. Več raziskav je pokazalo značilen visok delež betaproteobakterij v hitro spreminjajočih tleh, tako v vetrnih nanosih (Tarlera in sod., 2008) kot v tleh ob umikajočih ledenikih (Nemergut in sod., 2007) in na površini ledenika (Philippot in sod., 2011). V knjižnici s 6000 m je delež sekvenc betaproteobakterij majhen in enak kot v tleh s 5200 m.

5.2 SKLEPI

Osamitev DNA z izbrano metodo ni bila glavni vir variabilnosti med profili TRFLP istega vzorca. Razlika v Pearsonovem koeficientu korelacije med profili istega vzorca je bila v povprečju deset odstotkov.

Vse tri restrikcijske endonukleaze so omogočile podobno ločitev mikrobnih združb, pri čemer je vsaka ločila boljše določen nabor vzorcev. Najbolj smiselno je prikazati skupen rezultat več restrikcij kot povprečje posameznih eksperimentov z ordinacijo v prostoru.

Krajši odsek 16S rRNA z variabilno regijo 4 vsebuje podobno informacijo o strukturi združb kot daljši odsek 16S rRNA, vendar ločitev v skupine vzorcev v primeru krajšega odseka ni tako jasna in razlike med vzorci z različnih nadmorskih višin so manjše. V primeru analize z več restrikcijskimi endonukleazami, vsaka dodatna uporabljena restrikcijska endonukleaza pri analizi regije V4 doprinese več informacije k skupni ugotovljeni razliki med združbami, kot pri daljšem odseku 16S rRNA.

Mikrobna združba v himalajskih tleh na pobočju nad ledenikom Kanchenjunga se na različnih nadmorskih višinah razlikuje. Na pobočju med 5200 in 6000 m nm razlika v strukturi združbe ugotovljena s TRFLP narašča z naraščajočo razliko v nadmorski višini.

Med dejavniki okolja, ki smo jih opisali, je nadmorska višina najpomembnejši dejavnik pri oblikovanju mikrobne združbe in razloži 20% variance. Drugi najpomembnejši dejavnik je pH tal, ki razloži 10% variance.

Mikrobna združba v tleh z višine 5200 m nm se je v treh časih vzorčenja razlikovala. Spremembe v strukturi združbe s časom niso enosmerne, tako kot pri nadmorski višini, torej mikrobna združba časovno bolj oddaljenih vzorcev ni bolj različna. Interpretacija sprememb na 6000 m nm je manj zanesljiva, saj vzorci iz leta 2006 ne tvorijo homogene gruče. Mikrobna združba vzorčena v letih 2002 in 2005 se ne razlikuje. Opažene spremembe v strukturi mikrobne združbe na obeh nadmorskih višinah se torej razlikujejo.

Večino razlik v mikrobni združbi na različnih nadmorskih višinah in v različnih časovnih točkah vzorčenja na 5200 m nm se pri PCO kaže v isti dimenziji, kar bi lahko pomenilo, da je za večino variabilnosti odgovoren en okoljski dejavnik, oziroma skupina povezanih dejavnikov.

Klonski knjižnici genov za 16S rRNA s 5200 in 6000 m sta vsebovali sekvence bakterij iz filogenetskih debel, ki so običajno prisotna v tleh. Najštevilčnejše so bile sekvence iz debel *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* in *Verrucomicrobia*. Večji delež na 5200 m so imele sekvence bakterij iz debel *Acidobacteria* in *Verrucomicrobia*, na 6000 m pa iz debel *Bacteroidetes* in *Actinobacteria*. Posebnost knjižnice s 6000 m so sekvence bakterij iz debla *Cyanobacteria*.

Vsi kazalci mikrobne pestrosti kažejo, da na obeh nadmorskih višinah obstaja pestra bakterijska združba, ki je po sestavi podobna drugim talnim združbam. Na podlagi teh rezultatov in rezultatov primerjave s klonskimi knjižnicami gena 16S rRNA iz drugih okolij predpostavljamo, da zaznani signali t.j. sekvence genov za 16S rRNA niso posledica vetrnih nanosov iz nižjih nadmorskih višin in obstojnosti DNA pri nizkih temperaturah.

Najštevilčnejši filotip celotnega nabora pridobljenih sekvenc (5 sekvenc s 6000 m nm) pripada vrsti *Microcoleus vaginatus*. Ta cianobakterija predstavlja strukturni del bioloških skorij v številnih talnih okoljih brez vegetacije. Pri vzorčenju v Himalaji na površini tal skorje niso opazili.

V bazah sekvenc smo odkrili knjižnice, ki so po skupni filogenetski strukturi bolj podobne eni od himalajskih knjižnic, kot sta si ti podobni med seboj. Več podobnih knjižnic smo našli v primeru himalajske knjižnice s 5200 m. Primerjava ni pokazala jasnega ločevanja klonskih knjižnic glede na okolje iz katerega so bili odvzeti vzorci tal (visokogorski, arktični, antarktični, zmerno podnebje).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Visokogorska tla v Himalaji so specifično okolje, ki ga zaznamuje ekstremna nadmorska višina in z njo povezani dejavniki. Hkrati predstavlja okolje brez neposrednih vplivov človeka. Tla so mešanica trdne, tekoče in plinske faze, hkrati raznolik in dinamičen sistem z ogromno površino, katerega znaten delež predstavljajo mikroorganizmi, med njimi pa predvsem s pestrostjo izstopajo bakterije. Preučevanje pestrosti bakterijskih talnih združb se je v zadnjem desetletju naslonilo na t.i. molekularne metode, predvsem v povezavi z molekulo 16S rRNA, saj so raziskovalci ugotovili, da s tradicionalnim pristopom z gojenjem, ne uspemo zajeti večjega dela bakterijske pestrosti.

V letu 2002 je bilo vzorčeno pobočje med 5000 in 6000 m nadmorske višine v vzhodnem delu osrednje Himalaje nad ledenikom Kanchenjunga. Na šestih nadmorskih višinah je bil vzorčen horizontalni presek pobočja s štirimi vzorci v razdalji 200 m. Na dveh višinah, 5200 m in 6000 m so bila tla vzorčena še v letih 2005 in 2006. Iz vzorcev tal smo osamili DNA v treh ponovitvah in pomnožili začetni del genov za 16S rRNA z označenim začetnim oligonukleotidom 27F. Ob izpostavitvi mešanice pomnoženih okoljskih sekvenc 16S rRNA restriksijskim endonukleazam nastanejo različno dolgi odseki, ki smo jih ločili in zaznali s kapilarno elektroforezo (TRFLP). S tremi različnimi restriksijskimi endonukleazami smo tako pridobili prve informacije o razlikah v bakterijski združbi tal. Analizirali smo tudi teksturo tal, pH ter količino skupnega dušika in organskega ogljika v tleh ter iskali povezavo med spremembami teh dejavnikov in nadmorske višine ter spremembami mikrobne združbe.

Zanimalo nas je tudi ali variabilna regija 4 (V4) molekule 16S rRNA, ki se v najnovejših raziskavah uporablja za podrobnejšo analizo mikrobne združbe s pirosekvenciranjem vsebuje informacijo na podlagi katere bi lahko ugotovili razlike v strukturi mikrobne združbe. Zato smo pomnožili ustrezen del 16S rRNA iz vzorcev in tako kot pri zgoraj opisanem daljšem delu ustvarili tri profile mikrobne združbe s tremi restriksijskimi endonukleazami. Nazadnje smo iz dveh vzorcev tal z nadmorske višine 5200 in 6000 m

pripravili klonski knjižnici genov za 16S rRNA s skupno 277 sekvencami. Sekvence smo filogenetsko opredelili in opisali razlike med knjižnicama ter knjižnici primerjali s podobnimi knjižnicami iz drugih okolij.

Poleg samega opisa mikrobne združbe nas je zanimalo tudi nekaj metodoloških vidikov molekularnih mikrobno ekoloških raziskav. Ugotovili smo, da osamitev DNA z izbrano metodo ni glavni vir variabilnosti, ki smo jo opazili med profili TRFLP istega vzorca. Razlika v Pearsonovem koeficientu korelacije med profili istega vzorca je v povprečju znašala 10%, torej združb z manjšo razliko s to metodo ne moremo ločevati. Vse tri restrikcijske endonukleaze so pokazale podobne rezultate, pri čemer je vsaka omogočila boljše razlikovanje določenega nabora vzorcev. Skupni rezultat vseh treh TRFLP je tako prikazal najbolj ločene skupine vzorcev s posameznih nadmorskih višin ob hkrati najbolj združenih vzorcih s posamezne višine. Pearsonov koeficient korelacije elektroferogramov je najbolj ločil vzorce z različnih višin. Podatki izluščeni v obliki tabel elektroforetskih vrhov pa so pokazali podobno sliko razlik mikrobne združbe, vendar z manjšimi razmaki med skupinami vzorcev. Krajši odsek 16S rRNA, ki vsebuje variabilno regijo 4 je prav tako pokazal podobno sliko, vendar ločitev v skupine vzorcev v tem primeru ni bila tako jasna in razlike med nadmorskimi višinami so bile manjše. Vsaka dodatna uporabljana restrikcijska endonukleaza je v primeru analize regije V4 prinesla več informacije kot pri analizi daljšega odseka 16S rRNA. Z dendrogramom smo razporedili skupine hierarhično v gruče, ki so smiselne le za najbolj podobne vzorce, nadaljnja hierarhija pa v večini primerov ni bila smiselna. Menimo da analiza glavnih koordinat (PCO), ki prikaže razlike v dveh dimenzijah prostora, s čimer hkrati nakaže strukturo razlik med združbami, bolj smiselno prikaže razlike v strukturi preučevanih mikrobnih združb.

Mikrobne združbe tal iz različnih nadmorskih višin so se razlikovale. Vzorci s površine ledenika niso tvorili povezane gruče ampak so se med seboj razlikovali in hkrati razlikovali od vseh ostalih vzorcev. Najbolj so si podobni vzorci s 5200 in 5400 m, ki so tvorili gruči ločeni od ostalih vzorcev. Vzorci s 5600, 5800 in 6000 m niso tvorili ločenih gruč, se pa tudi pri teh vzorcih vidi trend naraščanja razlik v mikrobni združbi z naraščajočo razliko v nadmorski višini. Tudi multivariatna statistična analiza je pokazala, da je nadmorska višina najpomembnejši dejavnik pri oblikovanju mikrobne združbe in le

razložila 20% variance. Statistično značilen je bil še vpliv pH tal in skupnega dušika v tleh. V nadmorski višini se verjetno skrivajo vplivi več različnih dejavnikov, tako talne strukture, vegetacije, naklona kot temperature.

Spremembe v strukturi mikrobne združbe smo opazili tudi pri vzorcih iz iste lokacije, ki so bili odvzeti v različnih letih. Še posebej je bilo časovno spreminjanje združbe izrazito pri vzorcih odvzetih na 5200 m, kjer so bile razlike med najbolj oddaljenimi vzorci iz različnih let večje kot med višinsko najbolj oddaljenimi vzorci iz leta 2002. Spremembe s časom pa niso enosmerne, tako kot pri nadmorski višini, torej mikrobna združba časovno bolj oddaljenih vzorcev ni bolj različna. Prav tako si nista bolj podobni združbi vzorčeni v istem letnem času. Se pa spremembe v mikrobni združbi glede na statistično analizo PCO tako v višinski kot časovni skali kažejo v isti dimenziji, kar bi lahko nakazovalo, da je za večino variabilnosti odgovoren en okoljski dejavnik oziroma skupina povezanih dejavnikov. Čeprav glede na količino padavin ne gre za izjemno sušno okolje, za katera je znano, da je v njih mikrobna združba odvisna predvsem od količine dostopne vode, predvidevamo da je zaradi kombinacije naklona terena, visokega deleža peska in velikega izhlapevanja zaradi sončnega obsevanja, prav dostopnost vode eden od pomembnejših dejavnikov pri oblikovanju mikrobne združbe. Ta bi bil lahko odgovoren tako za spremembe v času, kot za spremembe, ki so posledica višinske razlike. Tako kot v mnogih nedavnih raziskavah, smo kljub zelo ozkemu razponu vrednosti pH tal spoznali pH kot pomemben dejavnik okolja, ki vpliva na sestavo mikrobne združbe in ni neposredno povezan z nadmorsko višino.

Mikrobni združbi tal odvzetih na 5200 in 6000 m sta se izkazali kot različni tudi ko smo primerjali sestavo klonskih knjižnic s 137 in 140 delnimi sekvencami 16S rRNA. Obe sta vsebovali sekvence iz bakterijskih filogenetskih debel, ki so običajno prisotna v tleh. Najštevilčnejše sekvence so pripadale bakterijam iz debel *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* in *Verrucomicrobia*. V knjižnici s 5200 m so imela večji delež debla *Acidobacteria* in *Verrucomicrobia*, na 6000 m pa *Bacteroidetes* in *Actinobacteria*. Posebnost knjižnice s 6000 m so sekvence debla *Cyanobacteria*. Obe knjižnici sta vsebovali zelo podobno število filotipov pri vseh filogenetskih razdaljah, podobno oceno bogatosti filotipov pri 97% podobnosti sekvenc in visoko enakomernost

zastopanosti posameznih filotipov v knjižnici. Prekrivanje filotipov med knjižnicama pri 97% podobnosti sekvenc je majhno. Najštevilčnejši filotip (5 sekvenc) smo uvrstili med cianobakterije iz vrste *Microcoleus vaginatus*, ki je značilna za biološke zemeljske skorje hladnih in vročih puščav.

V bazah podatkov smo odkrili knjižnice s podobnimi sekvencami in ugotovili, da so bile nekatere od njih po filogenetski strukturi bolj podobne eni od knjižnic, ki smo ju pripravili v tem delu, kot sta si bili ti knjižnici podobni med seboj. Več bolj podobnih knjižnic smo odkrili v primeru himalajske knjižnice s 5200 m. Posebne podobnosti himalajskih knjižnic s knjižnicami določenega tipa talnega okolja nismo odkrili. V razredu najbližjih knjižnici s 5200 m sta dve knjižnici iz travniških tal z mediteransko klimo in knjižnica visokogorske tundre v Skalnem gorovju. V razredu najbližjih knjižnici s 6000 m pa so tri knjižnice tal brez strnjene vegetacije iz Antarktike in tri iz tal poraščenimi z drevesi zmernega podnebja.

6.2 SUMMARY

Highland soils in the Himalayas are specific environments characterized by extreme altitude and related environmental factors. At the same time they represent environments without direct human impact. The soil is a heterogeneous and dynamic system with mixture of solid, liquid and gas phase, forming large internal surface area. The system is occupied by microorganisms among which bacteria dominate with their diversity. Bacterial diversity studies have focused on molecular diversity of 16S rRNA in the last decade, while it was found that the traditional cultivation approach fails in describing majority of bacterial diversity.

For this study soil between 5000 and 6000 m above sea level (asl) in the eastern part of central Himalaya, on the slope above glacier Kanchenjunga was sampled in 2002. Four samples were collected at a distance of 200 m on a horizontal cross section of the slope at each of six different altitudes. At two altitudes, 5200 and 6000 m, samples were collected also in the years 2005 and 2006. The total microbial DNA was isolated in triplicates from the soil samples and the initial part of the 16S rRNA gene with a fluorescently labeled primer was amplified. When environmental mixtures of 16S rRNA sequences are exposed to various restriction endonucleases, fragments of different length are generated, that can be separated and detected by capillary electrophoresis (TRFLP). Using three different restriction endonucleases the initial information about the differences in bacterial soil communities was obtained. The soil structure, pH as well as total nitrogen and organic carbon contents were studied too in order to identify the connection between these factors, differences in altitude and changes in the structure of microbial communities.

Further, 16S rRNA variable region 4 (V4) interesting for a more detailed analysis of microbial communities through pyrosequencing was investigated. We were interested in resolving power of this region for Himalayan soil communities. As in longer 16S rRNA segment used more commonly in TRFLP and also used as primary method of this work, three profiles of microbial communities were created with three restriction endonucleases. Two soil samples from altitudes 5200 and 6000 m asl were chosen for preparation of 16S rRNA gene libraries and in total 277 sequences were retrieved. Sequences were

phylogenetically identified and differences between the two libraries were compared with similar libraries from other environments.

Besides describing the microbial communities, we were also interested in certain methodological aspects of molecular microbial ecology research. We found that the chosen DNA isolation method is not a major source of variability between TRFLP profiles of the same sample. The difference in the Pearson correlation coefficient between the profiles of the same sample averaged 10%, so the communities with a smaller difference cannot be separated with this method. Usage of all three restriction endonucleases has shown similar results, where each enzyme separated specific set of samples better. The joined result of all three TRFLPs showed the most distinct groups of samples from various altitudes and at the same time the most tightly grouped samples from same altitudes. Pearson's correlation coefficient of electropherograms has enabled the most efficient distinction between the samples from different heights. The data extracted in the form of tables of electrophoretic peaks show a similar picture of microbial community differences, but with smaller spacing between groups of samples. Analysis of a short stretch of 16S rRNA containing V4 region also showed a similar picture, but the separation of the samples is not so clear and the differences between the altitudes are smaller in this case. Use of additional restriction endonucleas yielded more information in the case of V4 than with the longer section of the 16S rRNA. Dendrogram hierarchy is meaningful only for the nearest cluster, whereas further hierarchy is not very informative. We believe that the analysis of the principal coordinates (PCO), which displays the differences in two-dimensional space, which also indicates the structure of the differences between communities, gives a more meaningful display of the differences in microbial communities.

Composition of Himalayan soil microbial communities from different altitudes varied. Samples from the surface of the glacier did not form a cluster and differed also from all other samples. The samples from 5200 and 5400 m asl form tight clusters. Samples from 5600, 5800 and 6000 m didn't form separate clusters. However, for all samples a trend of increasing differences in microbial communities along with increasing altitude differences can be observed. Additionally, multivariate statistical analysis showed that the altitude is the most important factor in shaping the microbial community and explains 20% of the

variance. The influence of soil pH and total nitrogen content is also statistically significant. The altitude is likely to include the effects of several factors: soil structure, vegetation, slope and temperature.

Changes in microbial communities were also observed in samples from the same locations that were taken at different times. The changes of microbial community in time are particularly distinctive at the altitude of 5200 m asl, where the differences between the most distant samples are larger than the differences from most distant samples of vertical profile sampled in 2002. The observed changes in time are not directional as in the case of altitude, as the microbial communities from most distant sampling times are not most distant. The samples gathered in the same season (autumn) are also not more similar. However, the changes in the microbial community structure observed at different altitudes as well as different sampling periods are within the same dimension according to ordination method PCO. This could indicate that one environmental factor or a group of related factors is responsible for most of the variability. Himalayan highland studied here is not an extremely arid environment according to the amount of rainfall. For other arid environments it is known that the microbial community depends on the amount of available water. Nevertheless, due to combination of slope, high proportion of sand and high evaporation due to solar radiation, water availability could be one of the most important factors in shaping microbial communities in this environment too. Water availability may thus be responsible for both changes over time as for observed differences due to altitude gradient. As in many recent surveys, even though only a very narrow pH range was covered in this work, pH was recognized as an important environmental factor affecting the composition of the microbial community and is not directly related to the altitude.

Microbial communities of the Himalayan soil obtained at 5200 and 6000 m asl differ also in composition of 16S rRNA gene libraries with 137 and 140 partial sequences. Both libraries contain sequences from bacterial phyla normally present in the soil. The most abundant sequences were from bacteria belonging to phyla *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* and *Verrucomicrobia*. At 5200 m the proportions of sequences from phyla *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* were higher,

whereas at 6000 m sequences from phyla *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* were more abundant. Sequences of the phylum *Cyanobacteria* were exclusive to the library from 6000 m. Both libraries have a very similar number of phylotypes at all levels of phylogenetic distance, a similar assessment of phylotype richness at 97% similarity and high evenness of the phylotypes. Phylotype overlap between the libraries at 97% similarity is low. Cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* was found to be the most abundant phylotype (5 sequences). *M. vaginatus* is a typical bacterial species in soil biological crusts from cold and hot deserts.

For both libraries we were able to find libraries in databases that were more similar in the phylogenetic structure to our libraries, as were our libraries similar to each other. Particular similarities with a specific type of the soil environment were not identified. For the library from 5200 m we were able to find more similar and a larger number of similar libraries. Two libraries from grassland soil in Mediterranean climate and one from high mountain tundra in the Rocky Mountains were recognized as the most related. Three libraries of the fell-field soils in Antarctica and three libraries of soils overgrown with trees of moderate climate were identified as most similar to the library from 6000 m.

7 VIRI

- Abdo Z., Schuette U.M.E., Bent S.J., Williams C.J., Forney L.J., Joyce P. 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology*, 8, 5: 929-938
- Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V., Polz M.F. 2005. PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8966-8969
- Alef K., Nannipieri P. 1995 *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, Academic Press: 576 str.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59, 1: 143-169
- Angel R., Soares M.I., Ungar E.D., Gillor O. 2010. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. *ISME Journal*, 4, 4: 553-563
- Austin E.E., Castro H.F., Sides K.E., Schadt C.W., Classen A.T. 2009. Assessment of 10 years of CO₂ fumigation on soil microbial communities and function in a sweetgum plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 3: 514-520
- Avaniss-Aghajani E., Jones K., Chapman D., Brunk C. 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17, 1: 144-148
- Bahl J., Lau M.C.Y., Smith G.J.D., Vijaykrishna D., Cary S.C., Lacap D.C., Lee C.K., Papke R.T., Warren-Rhodes K.A., Wong F.K.Y., McKay C.P., Pointing S.B. 2011. Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. *Nature Communications*, 2; 163
- Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 3: 541-555
- Baker K.L., Langenheder S., Nicol G.W., Ricketts D., Killham K., Campbell C.D., Prosser J.I. 2009. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 11: 2292-2298
- Blackwood C.B., Marsh T., Kim S.H., Paul E.A. 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2: 926-932
- Blackwood C.B., Hudleston D., Zak D.R., Buyer J.S. 2007. Interpreting Ecological Diversity Indices Applied to Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data: Insights from Simulated Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5276-5283
- Borneman J., Triplett E.W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 7: 2647-2653
- Bottos E.M., Vincent W.F., Greer C.W., Whyte L.G. 2008. Prokaryotic diversity of arctic ice shelf microbial mats. *Environmental Microbiology*, 10, 4: 950-966
- Bruce K.D. 1997. Analysis of mer Gene Subclasses within Bacterial Communities in Soils and Sediments Resolved by Fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 12: 4914-4919

- Bryant J.A., Lamanna C., Morlon H., Kerkhoff A.J., Enquist B.J., Green J.L. 2008. Microbes on mountainsides: Contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, Supplement 1: 11505-11511
- Budge K., Leifeld J., Egli M., Fuhrer J. 2011. Soil microbial communities in (sub)alpine grasslands indicate a moderate shift towards new environmental conditions 11 years after soil translocation. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 6: 1148-1154
- Burgmann H., Pesaro M., Widmer F., Zeyer J. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 45, 1: 7-20
- Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 1: 4516-4522
- Carrigg C., Rice O., Kavanagh S., Collins G., Flaherty V. 2007. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 4: 955-964
- Cary S.C., McDonald I.R., Barrett J.E., Cowan D.A. 2010. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 2: 129-138
- Castro H.F., Classen A.T., Austin E.E., Norby R.J., Schadt C.W. 2010. Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4: 999-1007
- Chan O.C., Yang X., Fu Y., Feng Z., Sha L., Casper P., Zou X. 2006. 16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 2: 247-259
- Cheng S.M., Foght J.M. 2007. Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 318-330
- Chim Chan O., Casper P., Sha L.Q., Feng Z.L., Fu Y., Yang X.D., Ulrich A., Zou X.M. 2008. Vegetation cover of forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 3: 449-458
- Chu H., Fierer N., Lauber C.L., Caporaso J.G., Knight R., Grogan P. 2010. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 12, 11: 2998-3006
- Clark J., Campbell J., Grizzle H., Acosta-Martinez V., Zak J. 2009. Soil Microbial Community Response to Drought and Precipitation Variability in the Chihuahuan Desert. *Microbial Ecology*, 57, 2: 248-260
- Clement B.G., Kehl L.E., DeBord K.L., Kitts C.L. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 31, 3: 135-142
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 33, 1: 294-296
- 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: 141-145
- Costello E.K., Schmidt S.K. 2006. Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental Microbiology*, 8, 8: 1471-1486

- Costello E.K., Halloy S.R.P., Reed S.C., Sowell P., Schmidt S.K. 2009. A fumarole-supported island of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape, Socompa Volcano, Puna de Atacama, Andes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3:735-747
- Cruz-Martinez K., Suttle K.B., Brodie E.L., Power M.E., Andersen G.L., Banfield J.F. 2009. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME Journal*, 3, 6: 738-744
- Delmont T.O., Robe P., Cecillon S., Clark I.M., Constancias F., Simonet P., Hirsch P.R., Vogel T.M. 2011. Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4: 1315-1324
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7: 5069-5072
- Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2000. Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2943-2950
- Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2001. Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 190-197
- Dunbar J., Barns S.M., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2002. Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6: 3035-3045
- Egert M., Friedrich M.W. 2003. Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragments, a PCR-Related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5: 2555-2562
- Elshahed M.S., Youssef N.H., Spain A.M., Sheik C., Najar F.Z., Sukharnikov L.O., Roe B.A., Davis J.P., Schloss P.D., Bailey V.L., Krumholz L.R. 2008. Novelty and Uniqueness Patterns of Rare Members of the Soil Biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 17: 5422-5428
- Engebretson J.J., Moyer C.L. 2003. Fidelity of Select Restriction Endonucleases in Determining Microbial Diversity by Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 4823-4829
- Feinstein L.M., Sul W.J., Blackwood C.B. 2009. Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 16: 5428-5433
- Felsenstein J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39, 4: 783-791
- Fierer N., Jackson R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 3: 626-631
- Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88, 6: 1354-1364
- Fierer N., McCain C.M., Meir P., Zimmermann M., Rapp J.M., Silman M.R., Knight R. 2010. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology*, 92, 4: 797-804
- Fierer N., Lennon J.T. 2011. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany*, 98, 3: 439-448

- Forney L.J., Zhou X., Brown C.J. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 3: 210-220
- Frank J.A., Reich C.I., Sharma S., Weisbaum J.S., Wilson B.A., Olsen G.J. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2461-2470
- Freeman K.R., Pescador M.Y., Reed S.C., Costello E.K., Robeson M.S., Schmidt S.K. 2009. Soil CO₂ flux and photoautotrophic community composition in high-elevation, barren soil. *Environmental Microbiology*, 11, 3: 674-686
- Frey J.C., Angert E.R., Pell A.N. 2006. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 1: 9-19
- Frostegard A., Courtois S., Ramišse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. 1999. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 12: 5409-5420
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 399 str.
- Gihring T.M., Green S.J., Schadt C.W. 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environmental Microbiology*, 14, 2: 285-290
- Gomez-Alvarez V., King G.M., Nusslein K. 2007. Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 1: 60-73
- Hackl E., Zechmeister-Boltenstern S., Bodrossy L., Sessitsch A. 2004. Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 9: 5057-5065
- 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
- Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. 2008. Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5: 1620-1633
- Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K., Jensen L.L., Kristoffersen T., Tiedje J.M., Lomstein B.A., Finster K.W. 2007. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environmental Microbiology*, 9, 11: 2870-2884
- He Z., Piceno Y., Deng Y., Xu M., Lu Z., DeSantis T., Andersen G., Hobbie S.E., Reich P.B., Zhou J. 2012. The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *ISME Journal*, 6, 2: 259-272
- Hedges J.I., Stern J.H. 1984. Carbon and Nitrogen Determinations of Carbonate-Containing Solids. *Limnology and Oceanography*, 29, 3: 657-663
- Hervas A., Casamayor E.O. 2009. High similarity between bacterioneuston and airborne bacterial community compositions in a high mountain lake area. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 2: 219-228
- Holmsgaard P.N., Norman A., Hede S.C., Poulsen P.H.B., Al Soud W.A., Hansen L.H., Sorensen S.J. 2011. Bias in bacterial diversity as a result of Nycodenz extraction from bulk soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 10: 2152-2159

- Huse S.M., Dethlefsen L., Huber J.A., Welch D.M., Relman D.A., Sogin M.L. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4, 11: e1000255
- Ishikawa M., Watanabe T., Nakamura N. 2001. Genetic differences of rock glaciers and the discontinuous mountain permafrost zone in Kanchanjunga Himal, eastern Nepal. *Permafrost and Periglacial Processes*, 12, 3: 243-253
- Janssen P.H. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 1719-1728
- Jobb G., von Haeseler A., Strimmer K. 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 1: 18
- Jones R.T., Robeson M.S., Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 3, 4: 442-453
- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 4: 317-323
- Kaplan C.W., Astaire J.C., Sanders M.E., Reddy B.S., Kitts C.L. 2001. 16S Ribosomal DNA Terminal Restriction Fragment Pattern Analysis of Bacterial Communities in Feces of Rats Fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4: 1935-1939
- Kaplan C.W., Kitts C.L. 2003. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 1: 121-125
- Kellenberger T.W., Shubiger W.A., Itten K.I. 2006. Object Oriented Land Cover Mapping of the Kenchenjunga Conservation Area (KCA) in Nepal, for Sustainable Development and Use of Natural Resources. *Geoscience and Remote Sensing Symposium, 2006. IGARSS 2006. IEEE International Conference*, 2365-2368
- King A.J., Meyer A.F., Schmidt S.K. 2008. High levels of microbial biomass and activity in unvegetated tropical and temperate alpine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 10: 2605-2610
- King A.J., Freeman K.R., McCormick K.F., Lynch R.C., Lozupone C., Knight R., Schmidt S.K. 2010. Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nature Communications*, 1; 53.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 2: 169-188
- Kitts C.L. 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2, 1: 17-25
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., van Elsas J.D., Mandic-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 9: 2762-2771
- Kreader C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3: 1102-1106
- Krsek M., Wellington E.M.H. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 39, 1: 1-16

- Kurata S., Kanagawa T., Magariyama Y., Takatsu K., Yamada K., Yokomaku T., Kamagata Y. 2004. Reevaluation and Reduction of a PCR Bias Caused by Reannealing of Templates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 7545-7549
- Kuske C.R., Yeager C.M., Johnson S., Ticknor L.O., Belnap J. 2012. Response and resilience of soil biocrust bacterial communities to chronic physical disturbance in arid shrublands. *ISME Journal*, 6, 4: 886-897
- LaMontagne M.G., Michel F.C., Holden P.A., Reddy C.A. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49, 3: 255-264
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 15: 5111-5120
- Lazzaro A., Abegg C., Zeyer J. 2009. Bacterial community structure of glacier forefields on siliceous and calcareous bedrock. *European Journal of Soil Science*, 60, 6: 860-870
- Lemos L.N., Fulthorpe R.R., Triplett E.W., Roesch L.F.W. 2011. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 1: 42-51
- Lesaulnier C., Papamichail D., McCorkle S., Ollivier B., Skiena S., Taghavi S., Zak D., Van Der Lelie D. 2008. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology*, 10, 4: 926-941
- Ley R.E., Williams M.W., Schmidt S.K. 2004. Microbial population dynamics in an extreme environment: controlling factors in talus soils at 3750 m in the Colorado Rocky Mountains. *Biogeochemistry*, 68, 3: 297-311
- Lipson D.A., Schmidt S.K., Monson R.K. 2000. Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 4: 441-448
- Lipson D.A., Schmidt S.K. 2004. Seasonal Changes in an Alpine Soil Bacterial Community in the Colorado Rocky Mountains. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2867-2879
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4516-4522
- Liu Y., Yao T., Kang S., Jiao N., Zeng Y., Shi Y., Luo T., Jing Z., Huang S. 2006. Seasonal variation of snow microbial community structure in the East Rongbuk glacier, Mt. Everest. *Chinese Science Bulletin*, 51, 12: 1476-1486
- Liu Y., Yao T., Kang S., Jiao N., Zeng Y., Huang S., Luo T. 2007. Microbial community structure in major habitats above 6000 m on Mount Everest. *Chinese Science Bulletin*, 52, 17: 2350-2357
- Liu Y., Yao T., Jiao N., Kang S., Xu B., Zeng Y., Huang S., Liu X. 2009. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers. *Extremophiles*, 13, 3: 411-423
- Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F.D., Knight R. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, 18: e120
- Lozupone C., Hamady M., Knight R. 2006. UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics*, 7, 1: 371
- Lueders T., Friedrich M.W. 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using

- defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 320-326
- Marsh T.L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 3: 323-327
- Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3616-3620
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G., Catroux G. 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5: 2354-2359
- Morales S.E., Holben W.E. 2009. Empirical Testing of 16S rRNA Gene PCR Primer Pairs Reveals Variance in Target Specificity and Efficacy Not Suggested by In Silico Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 9: 2677-2683
- Morales S.E., Cosart T.F., Johnson J.V., Holben W.E. 2009. Extensive Phylogenetic Analysis of a Soil Bacterial Community Illustrates Extreme Taxon Evenness and the Effects of Amplicon Length, Degree of Coverage, and DNA Fractionation on Classification and Ecological Parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3: 668-675
- Nacke H., Thorner A., Wollherr A., Will C., Hodac L., Herold N., Schoning I., Schrupf M., Daniel R. 2011. Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE*, 6, 2: e17000
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 4: 655-670
- Nemergut D.R., Anderson S.P., Cleveland C.C., Martin A.P., Miller A.E., Seimon A., Schmidt S.K. 2007. Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial Ecology*, 53, 1: 110-122
- Nemergut D.R., Townsend A.R., Sattin S.R., Freeman K.R., Fierer N., Neff J.C., Bowman W.D., Schadt C.W., Weintraub M.N., Schmidt S.K. 2008. The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 10, 11: 3093-3105
- Nemergut D.R., Costello E.K., Hamady M., Lozupone C., Jiang L., Schmidt S.K., Fierer N., Townsend A.R., Cleveland C.C., Stanish L., Knight R. 2011. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology*, 13, 1: 135-144
- Osborn A.M., Moore E.R., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39-50
- Osborne C.A., Galic M., Sangwan P., Janssen P.H. 2005. PCR-generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 248, 2: 183-187
- Osborne C.A., Rees G.N., Bernstein Y., Janssen P.H. 2006. New Threshold and Confidence Estimates for Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Complex Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2: 1270-1278
- Philippot L., Tscherko D., Bru D., Kandeler E. 2011. Distribution of High Bacterial Taxa Across the Chronosequence of Two Alpine Glacier Forelands. *Microbial Ecology*, 61, 2: 303-312
- Pointing S.B., Chan Y., Lacap D.C., Lau M.C.Y., Jurgens J.A., Farrell R.L. 2009. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 47: 19964-19969

- Polz M.F., Cavanaugh C.M. 1998. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 10: 3724-3730
- Pradhan S., Srinivas T., Pindi P., Kishore K., Begum Z., Singh P., Singh A., Pratibha M., Yasala A., Reddy G., Shivaji S. 2010. Bacterial biodiversity from Roopkund Glacier, Himalayan mountain ranges, India. *Extremophiles*, 14, 4: 377-395
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glockner F.O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, 21: 7188-7196
- Rees G., Baldwin D., Watson G., Perryman S., Nielsen D. 2004. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 4: 339-347
- Rehakova K., Chlumská Z., Doležal J. 2011. Soil Cyanobacterial and Microalgal Diversity in Dry Mountains of Ladakh, NW Himalaya, as Related to Site, Altitude, and Vegetation. *Microbial Ecology*, 62, 2: 337-346
- Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 10: 3417-3418
- Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W.G., Triplett E.W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*, 1, 4: 283-290
- Rousk J., Baath E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G., Knight R., Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4, 10: 1340-1351
- Sait L., Galic M., Strugnell R.A., Janssen P.H. 2003. Secretory Antibodies Do Not Affect the Composition of the Bacterial Microbiota in the Terminal Ileum of 10-Week-Old Mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4: 2100-2109
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*, 18, 24: 7465
- Sattin S., Cleveland C., Hood E., Reed S., King A., Schmidt S., Robeson M., Ascarrunz N., Nemergut D. 2009. Functional shifts in unvegetated, perhumid, recently-deglaciated soils do not correlate with shifts in soil bacterial community composition. *The Journal of Microbiology*, 47, 6: 673-681
- Schuette U., Abdo Z., Bent S., Shyu C., Williams C., Pierson J., Forney L. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 3: 365-380
- Schloss P.D., Handelsman J. 2006. Toward a Census of Bacteria in Soil. *PLoS Computational Biology*, 2, 7: e92
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 23: 7537-7541
- Schloss P.D. 2010. The Effects of Alignment Quality, Distance Calculation Method, Sequence Filtering, and Region on the Analysis of 16S rRNA Gene-Based Studies. *PLoS Computational Biology*, 6, 7: e1000844

- Schmidt S., Nemergut D., Miller A., Freeman K., King A., Seimon A. 2009. Microbial activity and diversity during extreme freeze-thaw cycles in periglacial soils, 5400m elevation, Cordillera Vilcanota, Per. *Extremophiles*, 13, 5: 807-816
- Schmidt S.K., Reed S.C., Nemergut D.R., Stuart Grandy A., Cleveland C.C., Weintraub M.N., Hill A.W., Costello E.K., Meyer A.F., Neff J.C., Martin A.M. 2008. The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 1653: 2793-2802
- Schmidt S.K., Lynch R.C., King A.J., Karki D., Robeson M.S., Nagy L., Williams M.W., Mitter M.S., Freeman K.R. 2011. Phylogeography of microbial phototrophs in the dry valleys of the high Himalayas and Antarctica. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, 1706: 702-708
- Singh B.K., Dawson L.A., Macdonald C.A., Buckland S.M. 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology*, 41, 3: 239-248
- Singh D., Takahashi K., Kim M., Chun J., Adams J. 2012. A Hump-Backed Trend in Bacterial Diversity with Elevation on Mount Fuji, Japan. *Microbial Ecology*, 63, 2: 429-437
- Sipos R., Szekeley A.J., Palatinszky M., Revesz S., Marialigeti K., Nikolausz M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 2: 341-350
- Skidmore M., Anderson S.P., Sharp M., Foght J., Lanoil B.D. 2005. Comparison of Microbial Community Compositions of Two Subglacial Environments Reveals a Possible Role for Microbes in Chemical Weathering Processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6986-6997
- Steven B., Briggs G., McKay C.P., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G. 2007. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 513-523
- Stomeo F., Makhalyane T.P., Valverde A., Pointing S.B., Stevens M.I., Cary C.S., Tuffin M.I., Cowan D.A. 2012. Abiotic factors influence microbial diversity in permanently cold soil horizons of a maritime-associated Antarctic Dry Valley. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 2: 326-340
- Stres B., Philippot L., Faganeli J., Tiedje J.M. 2010. Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial community in two temperate soils: a laboratory experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 2: 323-335
- Sul W.J., Cole J.R., Jesus E.d., Wang Q., Farris R.J., Fish J.A., Tiedje J.M. 2011. Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 35: 14637-14642
- Suzuki M.T., Giovannoni S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 625-630
- Suzuki M., Rappę M.S., Giovannoni S.J. 1998. Kinetic Bias in Estimates of Coastal Picoplankton Community Structure Obtained by Measurements of Small-Subunit rRNA Gene PCR Amplicon Length Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 11: 4522-4529
- Tarlera S., Jangid K., Ivester A.H., Whitman W.B., Williams M.A. 2008. Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 1: 129-140

- Tebbe C.C., Vahjen W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 8: 2657-2665
- Terrat S., Christen R., Dequiedt S., Lelièvre M., Nowak V., Regnier T., Bachar D., Plassart P., Wincker P., Jolivet C., Bispo A., Lemanceau P., Maron P.A., Mougél C., Ranjard L. 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 5, 1: 135-141
- Thomas J.K., Rai S.C. 2005. An overview of glaciers, glacier retreat and subsequent Impacts in Nepal, India and China. WWF Nepal Program: 70 str.
<http://assets.wwf.org.uk/downloads/himalayaglaciersonreport2005.pdf>
- Tomitani A., Knoll A.H., Cavanaugh C.M., Ohno T. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular, phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 14: 5442-5447
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3: 782-787
- Tringe S.G., von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E.M. 2005. Comparative Metagenomics of Microbial Communities. *Science*, 308, 5721: 554-557
- Taubel M., Rintala H., Pitkäranta M., Paulin L., Laitinen S., Pekkanen J., Hyvärinen A., Nevalainen A. 2009. The occupant as a source of house dust bacteria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124, 4: 834-840
- Walker J.J., Pace N.R. 2007. Phylogenetic Composition of Rocky Mountain Endolithic Microbial Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 11: 3497-3504
- Wallenstein M.D., McMahon S., Schimel J. 2007. Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 428-435
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261-5267
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, 173, 2: 697-703
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 10: 3741-3751
- Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 3: 213-229
- Woese C.R., Fox G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 11: 5088-5090
- Yeates C., Gillings M., Davison A., Altavilla N., Veal D. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1, 1: 40-47
- Yergeau E., Newsham K.K., Pearce D.A., Kowalchuk G.A. 2007. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology*, 9, 11: 2670-2682
- Yergeau E., Bokhorst S., Huiskes A.H.L., Boschker H.T.S., Aerts R., Kowalchuk G.A. 2007. Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 436-451

ZAHVALA

Najlepša hvala dolgoletnemu mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za vse potrpljenje.

Hvala tudi doc. dr. Blažu Stresu za vzorce in pomoč pri zasnovi doktorskega dela.

Hvala dr. Andreju Razpetu za pomoč pri kapilarni elektroforezi in prof. dr. Jadranu Faganeliju za analizo elementarne sestave tal.

Hvala dr. Lijani Fanedl za pomoč pri pripravi klonske knjižnice in Brigiti Nograšek za natančno preverjanje filogenije.

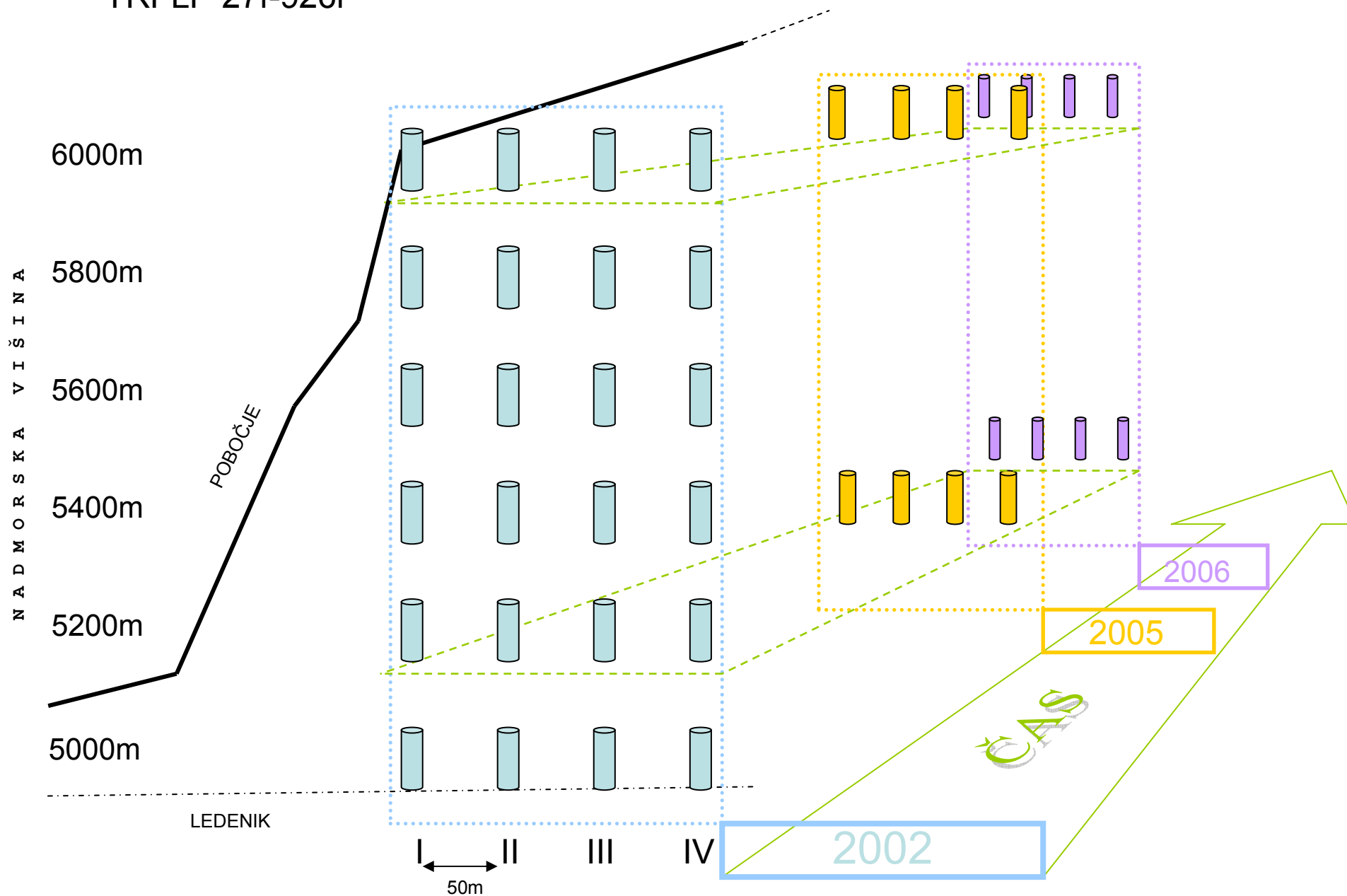
Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, ki so prispevali k nastanku tega dela.

PRILOGE

Priloga A:
Sheme opravljenih eksperimentov

Profil mikrobne združbe (vsi vzorci)

TRFLP 27f-926r

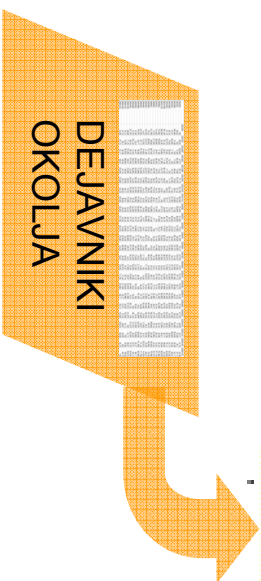
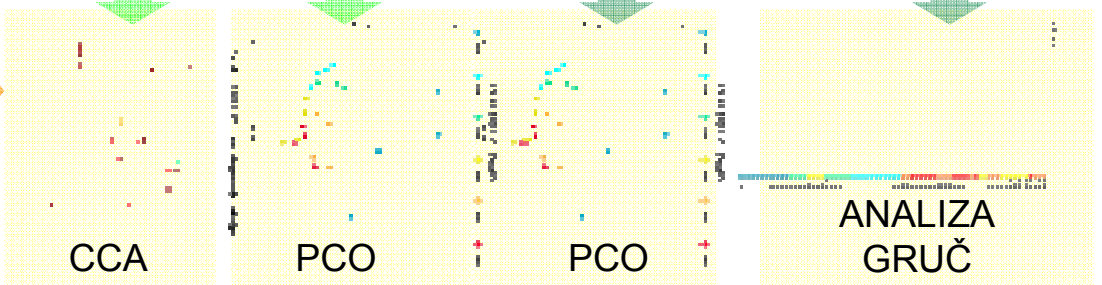
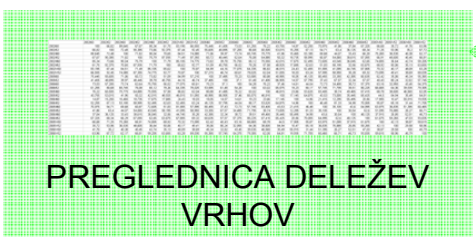
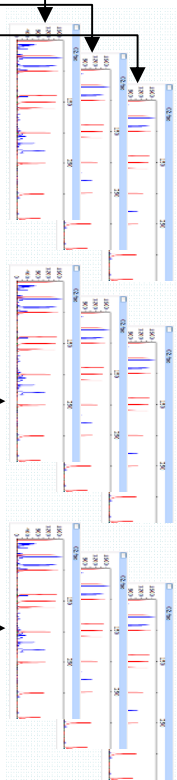
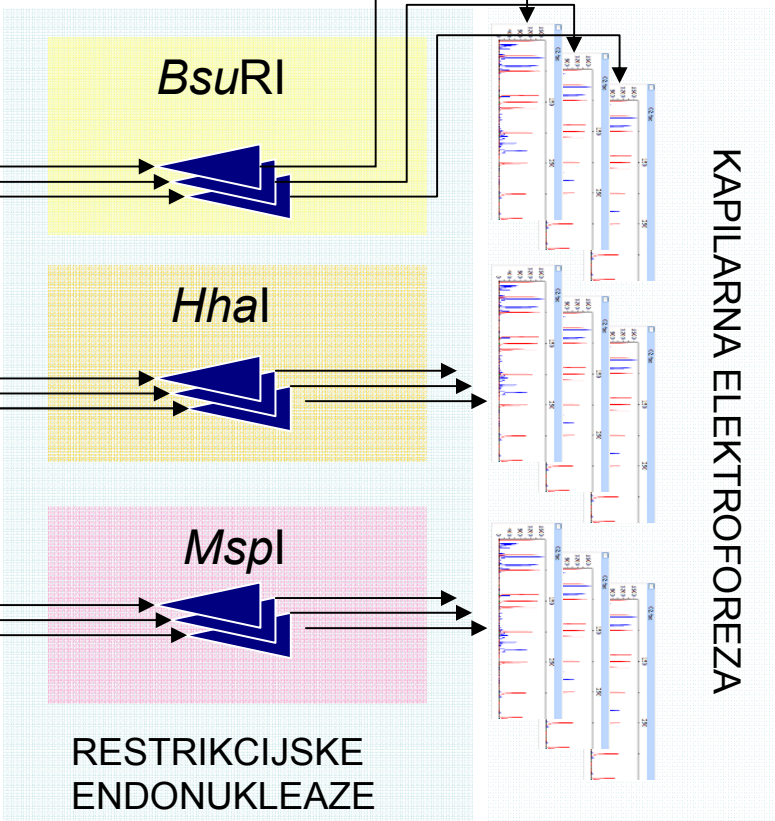
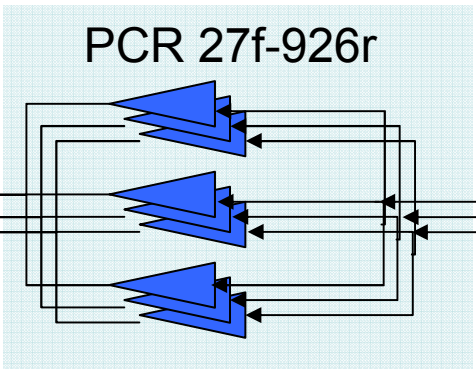
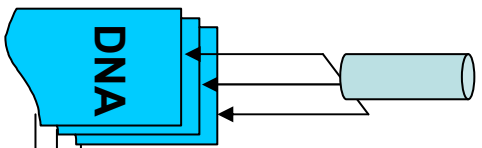


POTEK RAZISKAVE

Mikrobna združba

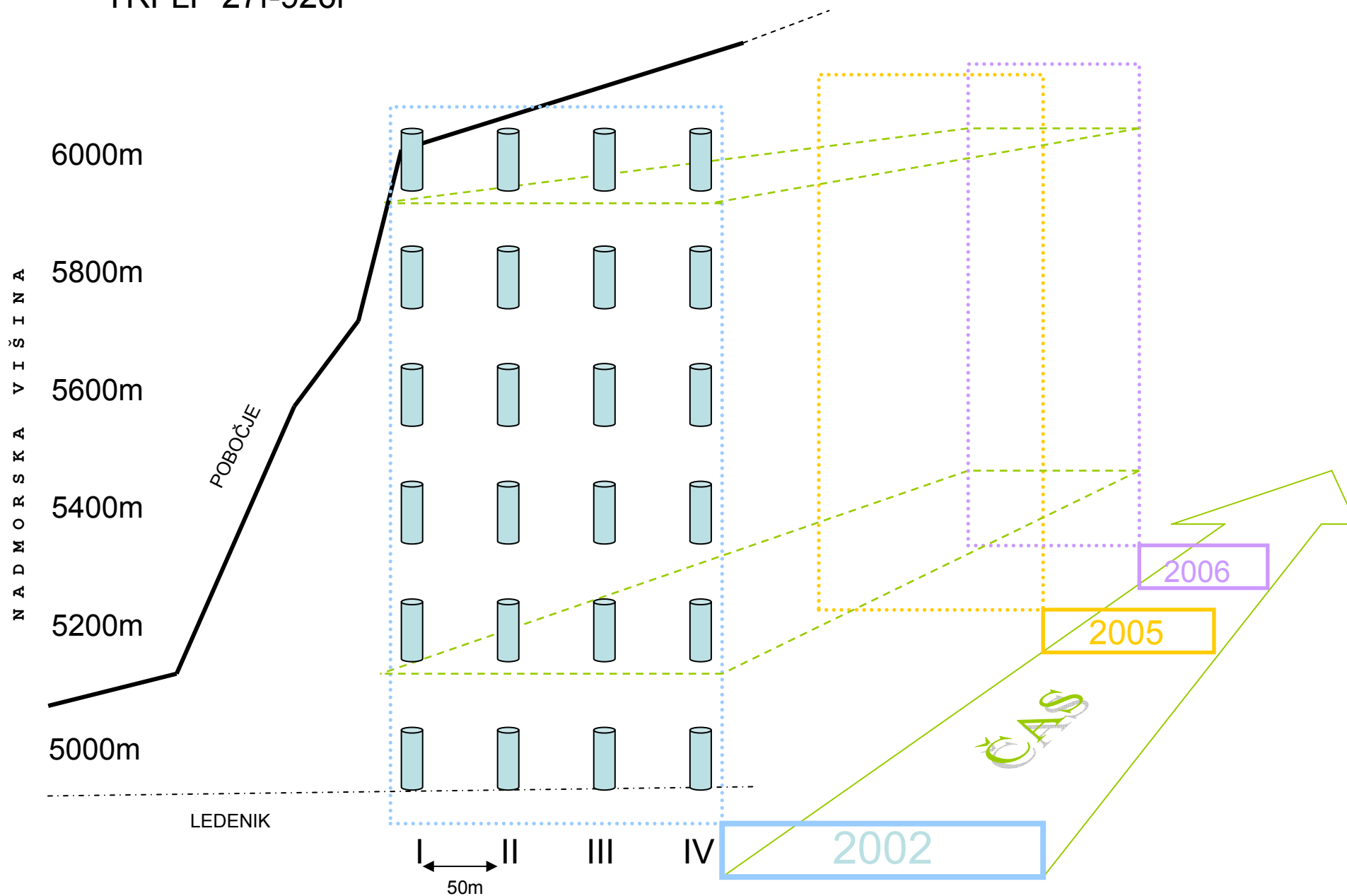
TRFLP 918bp

KAPILARNA ELEKTROFOREZA

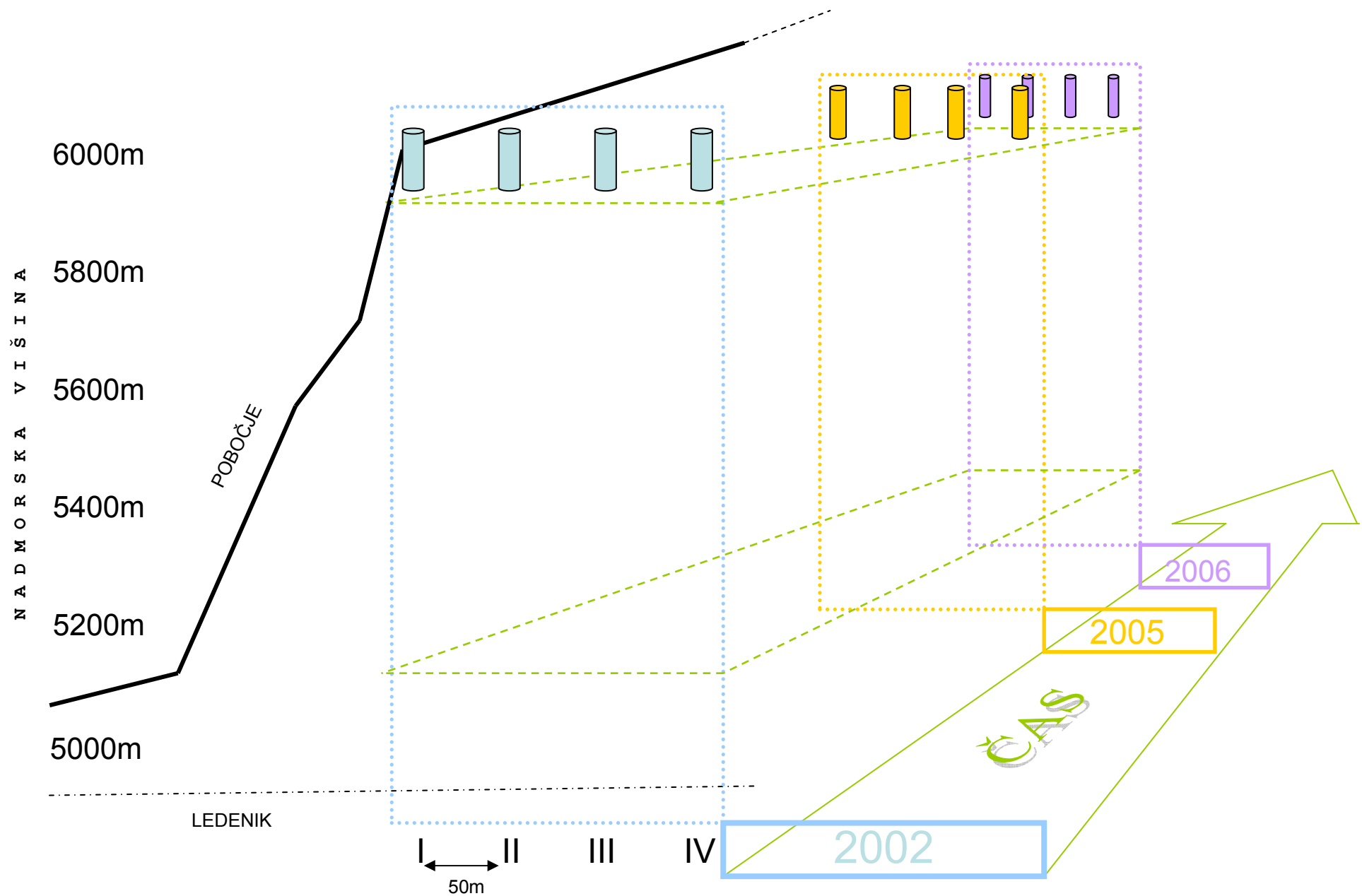


Dejavniki okolja in mikrobná združba

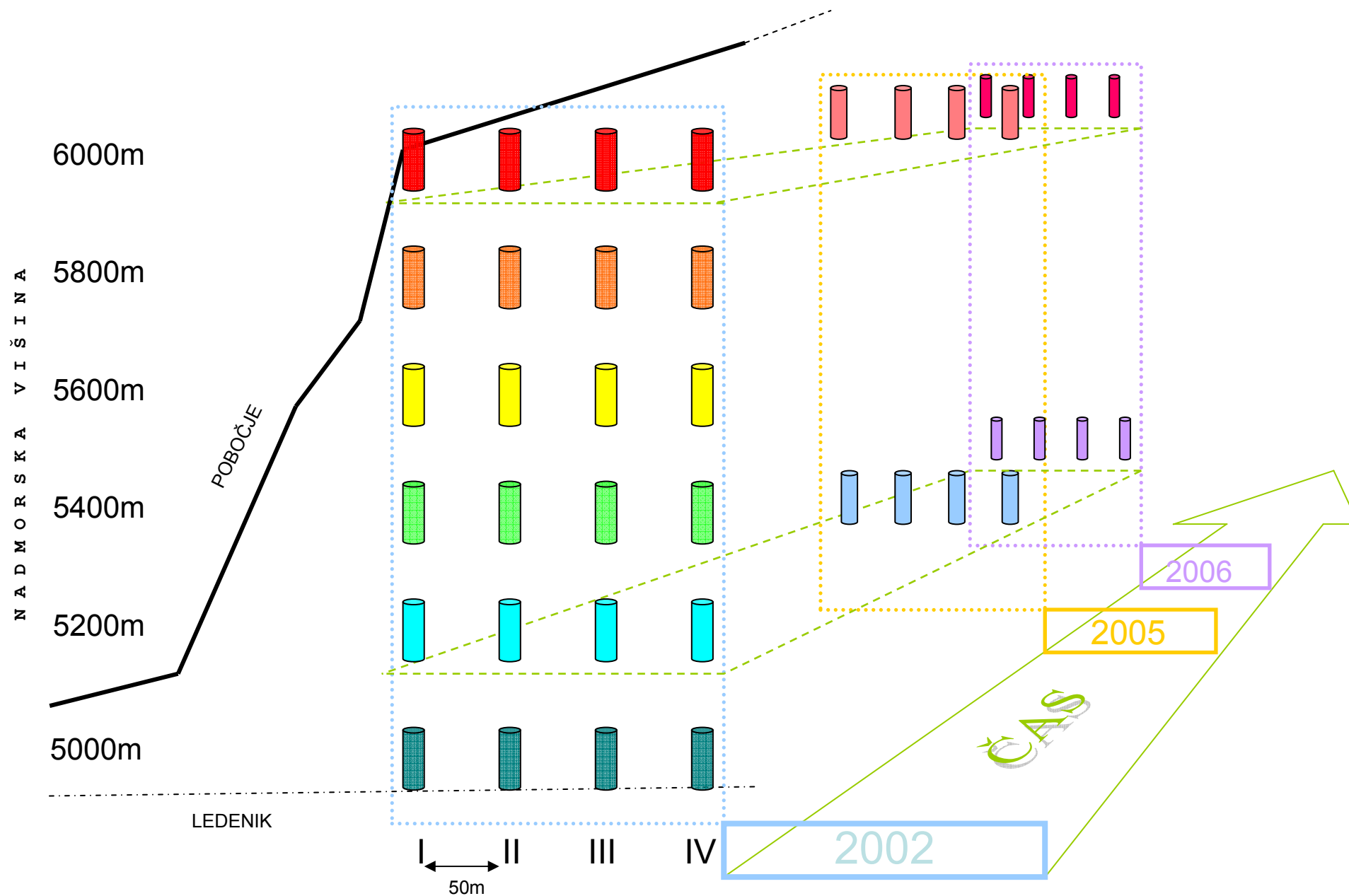
TRFLP 27f-926r



Primerjava TRFLP 27f-926r in TRFLP V4



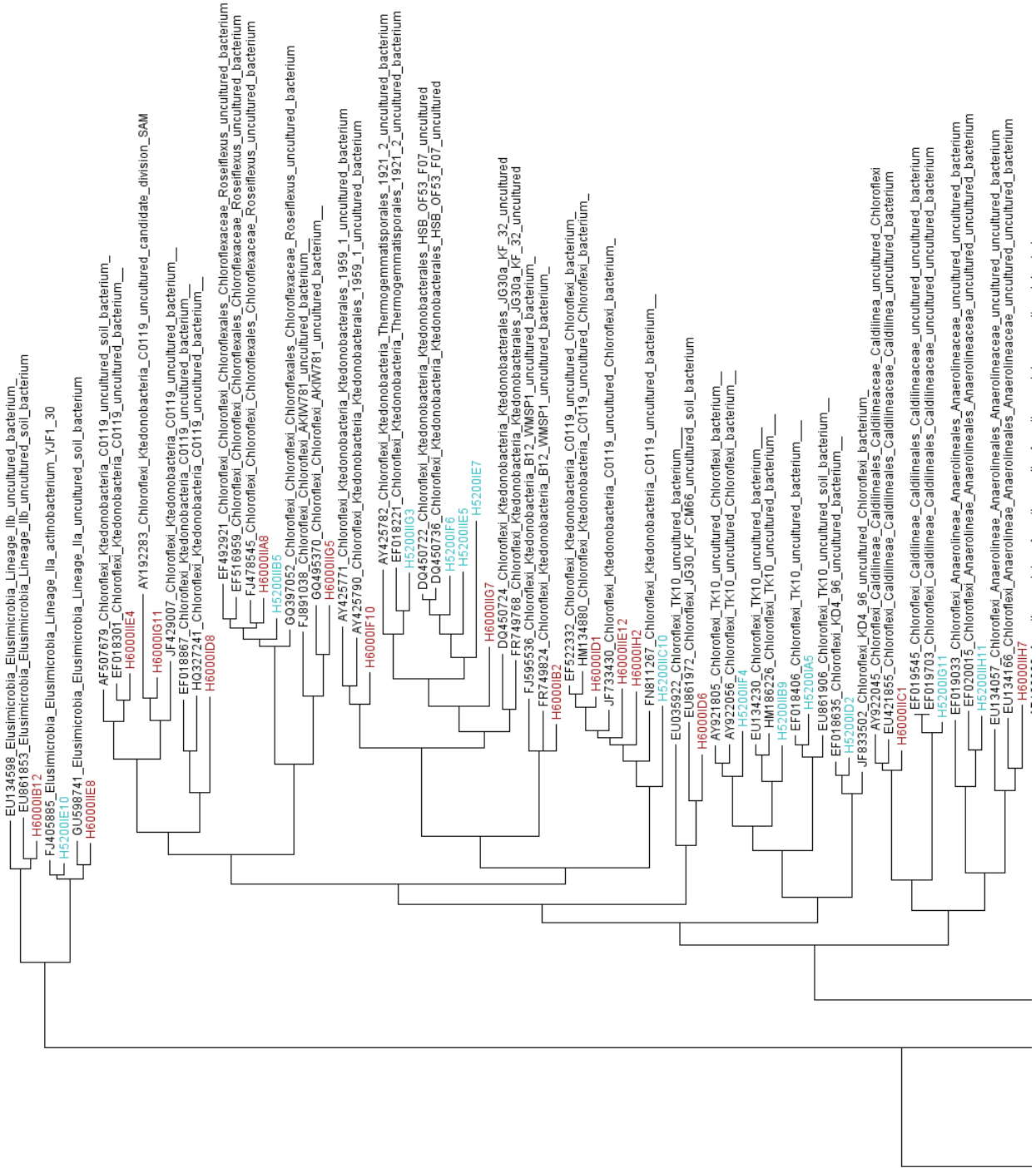
Barvne oznake vzorcev na slikah



Priloga B:

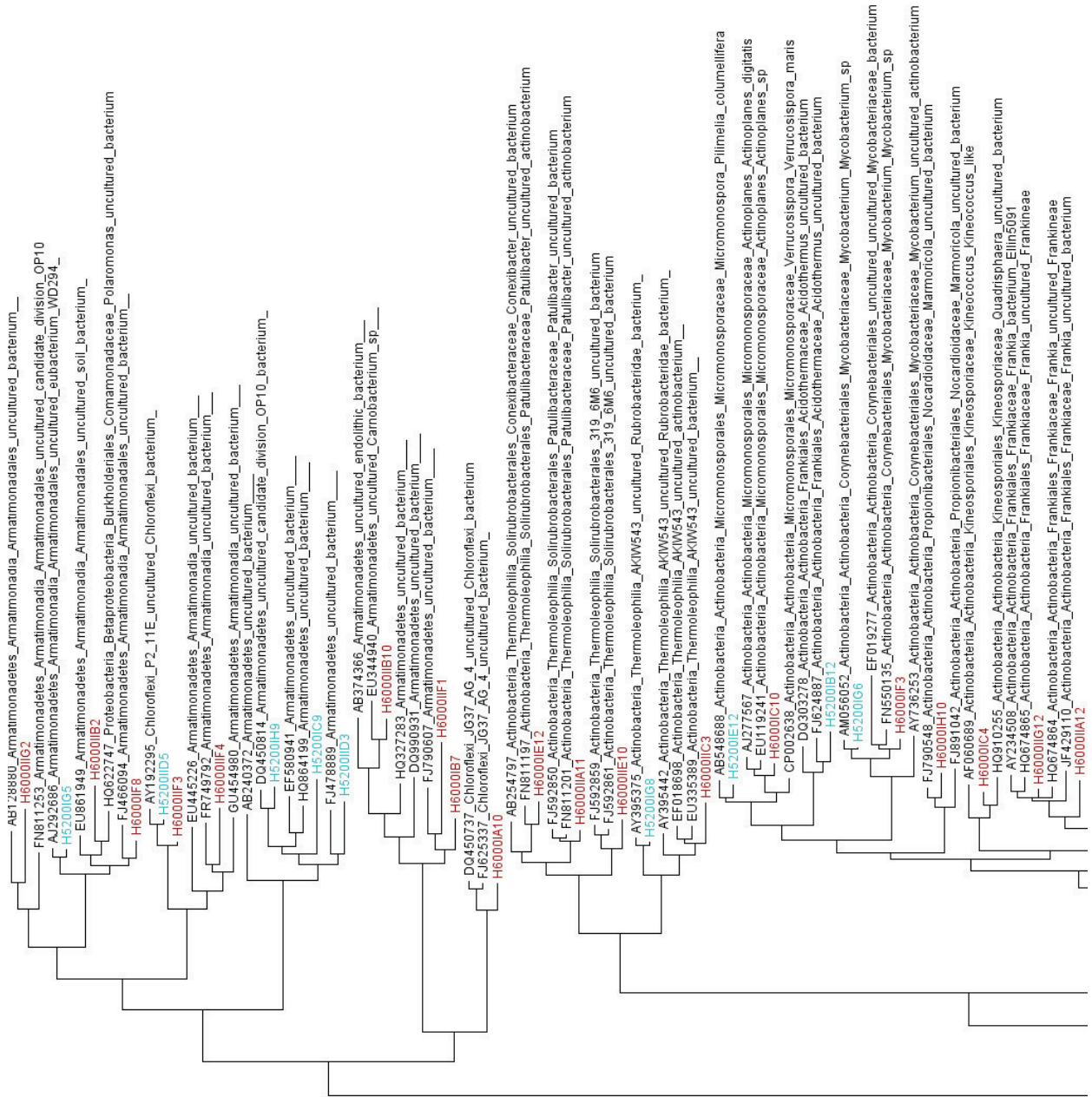
Filogenetsko drevo sekvenc obeh knjižnic (modro 5200 m, rdeče 6000 m), skupaj z dvema najbolj podobnima sekvencama vsake himalajske sekvence iz baze SINA. Uporabljen je algoritem Maximum likelihood v programu Treefinder.

Chloroflexi

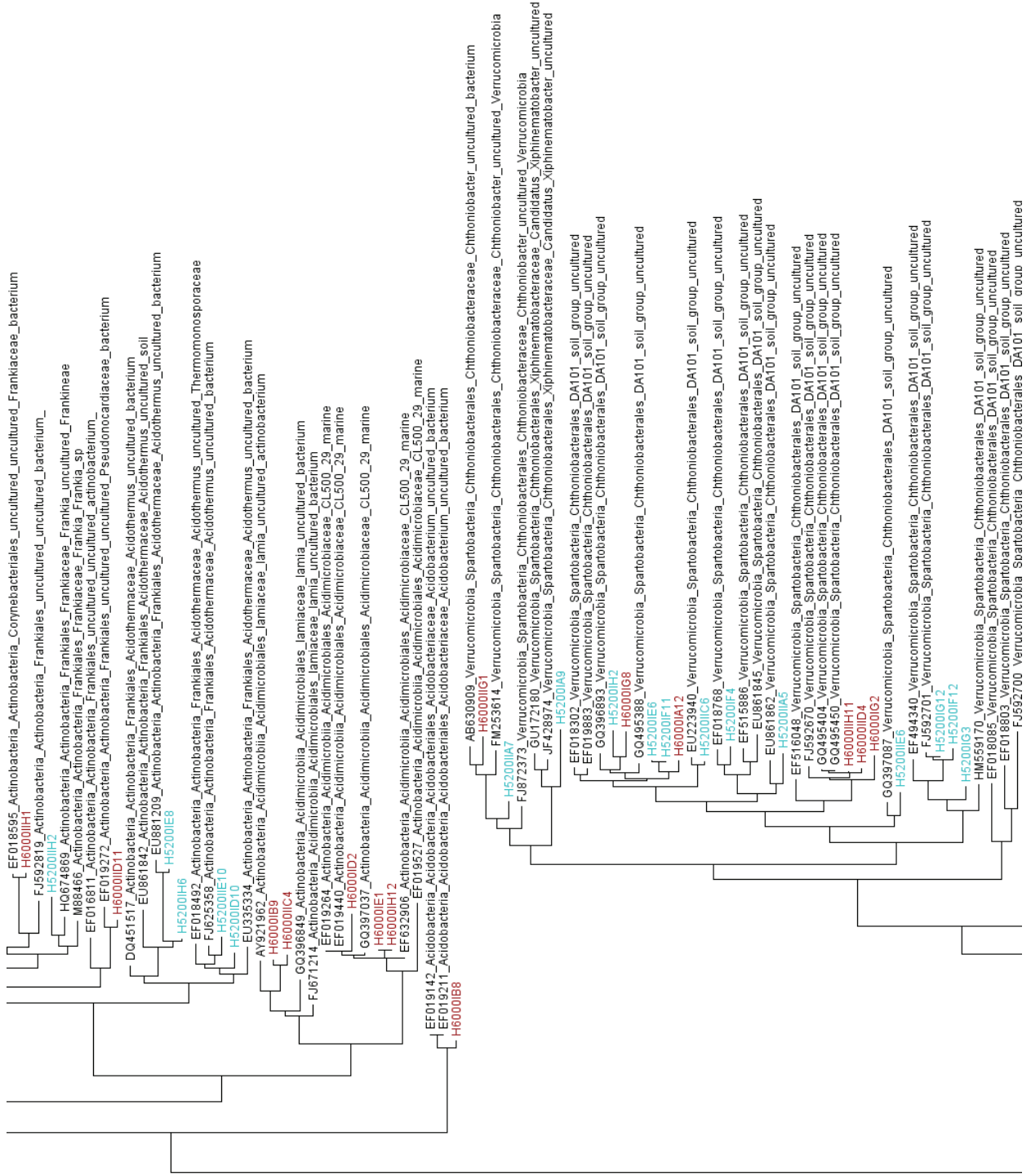


Armatimonadetes

Actinobacteria



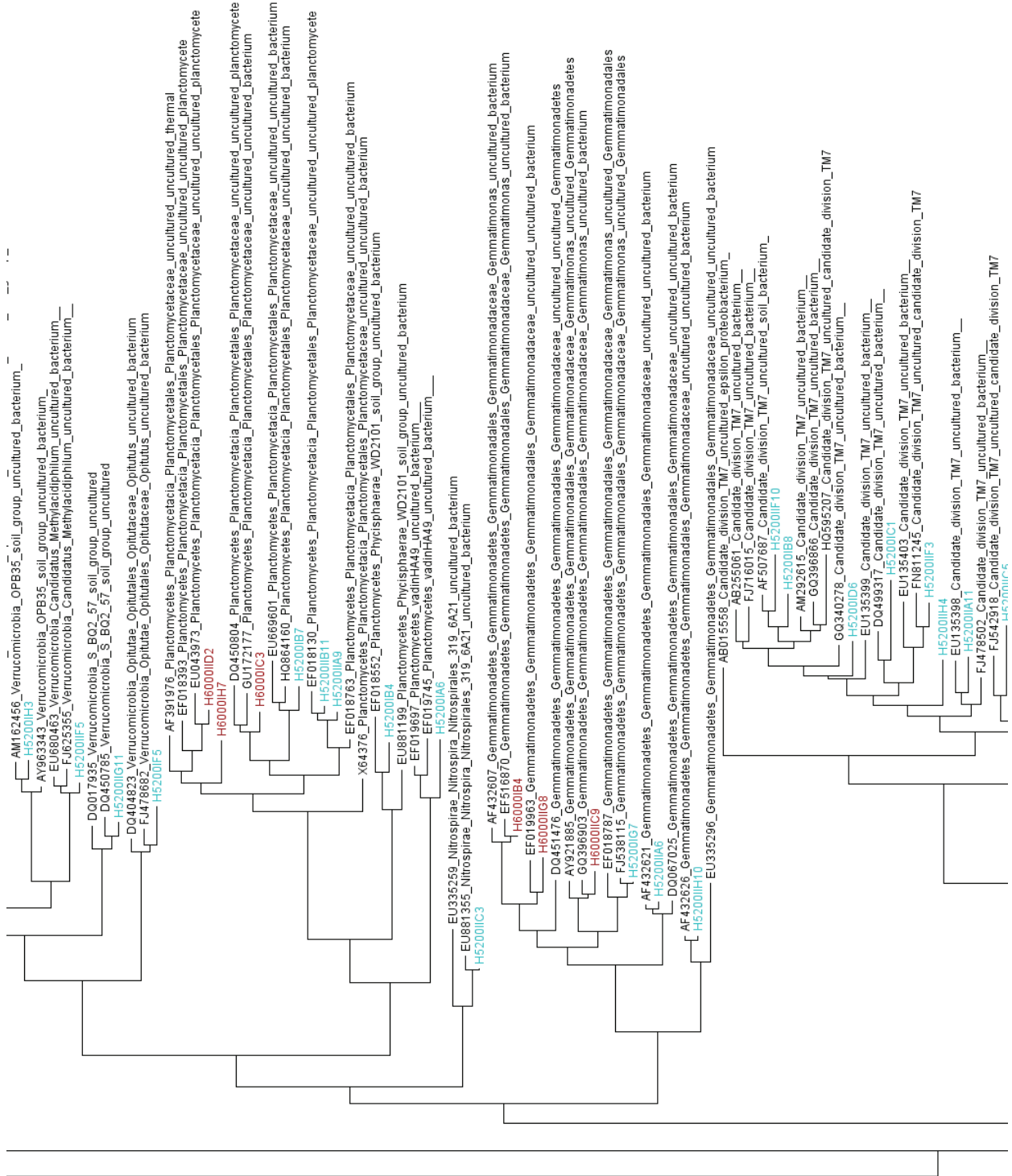
Verrucomicrobia



Planctomycetes

Gemmatimonadetes

TM7



Acidobacteria

