UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Iva LIPOVŠEK

BIOINFORMATSKA IN MOLEKULARNA ANALIZA PARAMETROV VARIABILNOSTI TEHNIK PRI ANALIZAH STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

BIOINFORMATICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF VARIABILITY PARAMETERS OF TECHNIQUES USED FOR ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITIES STRUCTURE

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Blaž Stres, za somentorico dr. Vesna Jerman in za recenzentko doc. dr. Marjetka Suhadolc.

Mentor: doc. dr. Blaž Stres

Somentorica: dr. Vesna Jerman

Recenzentka: doc. dr. Marjetka Suhadolc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. David STOPAR					
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo					
Član:	doc. dr. Blaž STRES					
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko					
Članica:	dr.Vesna JERMAN					
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo					
Članica:	doc. dr. Marjetka SUHADOLC					
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo					

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je last lastnega raziskovalnega dela.

Iva Lipovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

- DK UDK 579.26:631:461:577.2.08:575.112(043)=163.6
- KG mikrobiologija tal/struktura mikrobnih združb/gojena mikrobna biomasa/večkratna zaporedna izolacija DNA/komercialni izolacijski kompleti/16S rRNA/PCR/TRFLP/bioinformatika/RDPII/začetni oligonukleotidi
- AV LIPOVŠEK, Iva
- SA STRES, Blaž (mentor)/JERMAN, Vesna (somentorica)/SUHADOLC, Marjetka (recezentka)
- KZ SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2013
- IN BIOINFORMATSKA IN MOLEKULARNA ANALIZA PARAMETROV VARIABILNOSTI TEHNIK PRI ANALIZI STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 77 str., 10 pregl., 17 sl., 1 pril., 55 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Raziskovali smo, kako na prikaz stanja mikrobne združbe s tipizacijsko metodo T-RFLP vplivajo (i) različni oligonukleotidi, (ii) različni komercialni kompleti za izolacijo DNA in (iii) večkratna zaporedna izolacija DNA ter kakšne spremembe v strukturi mikrobne združbe povzroči (iv) dodatek gojene biomase prvotnemu vzorcu. Vpliv različnih začetnih oligonukleotidov in njihovih parov smo preverili z računalniško analizo na modelni mikrobni združbi, ki so jo sestavljala zaporedja genov za 16S rRNA, zbrana v podatkovni bazi RDP II. Začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na centralne regije gena, prepoznajo večji delež zaporedij v bazi, kot tisti, ki nalegajo na robne regije. Različni začetni oligonukleotidi prikažejo različno stanje iste mikrobne združbe. Za vsak par začetnih oligonukleotidov obstajajo take filogenetske skupine, v katerih začetna oligonukleotida prepoznata signifikantno različno število zaporedij. Zaradi neenakomerne pokritosti osnovne baze z zaporedji genov, ki vključujejo robne regije, se rezultati analiz na osnovi baze, ki vsebuje delna in popolna zaporedja genov za 16S rRNA, razlikujejo od rezultatov analiz v bazi samo popolnih zaporedij. Vpliv ostalih parametrov smo ugotavljali na dveh talnih vzorcih, ki smo ju vzorčili na obdelovalni površini na Rodici in travnati površini Ljubljanskega Barja. Obema vzorcema smo določili pH, delež vode, kapaciteto zadrževanja vode, delež organskega ogljika in teksturo. Vzorca tal sta se razlikovala v vseh izmerjenih fizikalnokemijskih parametrih. V bogatem gojišču NB smo iz obeh vzorcev nagojili biomaso, ki smo jo v različnih količinah (pol-kratni, 1-kratni in 5-kratni) dodali originalnim talnim podvzorcem. Iz gojene frakcije in talnih podvzorcev z dodano gojeno frakcijo smo izolirali DNA z dvema različnima kompletoma za izolacijo. Na originalnih talnih vzorcih smo izvedli 5-kratno zaporedno izolacijo DNA z dvema izolacijskima kompletoma. V reakciji PCR smo pomnožili gene za 16S rRNA s parom začetnih oligonukleotidov FAM-FD1 in 926R in izvedli analizo T-RFLP. Strukturi mikrobnih združb obdelovanih in barjanskih tal sta različni. Dodatek že najmanjše količine gojene frakcije premakne strukturo mikrobne združbe prvotnega vzorca popolnoma k strukturi gojene biomase. Strukture mikrobnih združb podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij istega vzorca niso identične. Z različnim izolacijskim kompletom dobimo različen prikaz strukture mikrobne združbe posameznega podvzorca.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 579.26:631:461:577.2.08:575.112(043)=163.6
- CX soil microbiology/structure of microbial communities/grown microbial biomass/multiple sequential isolation of DNA/commercial kits for DNA isolation/16S rRNA/PCR/TRFLP/bioinformatics/RDPII/primers
- AU LIPOVŠEK, Iva
- AA STRES, Blaž (supervisor)/JERMAN, Vesna (co-advisor)/SUHADOLC, Marjetka (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2013
- TI BIOINFORMATICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF VARIABILITY PARAMETERS OF TECHNIQUES USED FOR ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITIES STRUCTURE
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 77 p., 10 tab., 17 fig., 1 ann., 55 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We studied how (i) different oligonucleotides, (ii) different commercial kits for DNA isolation and (iii) multiple sequential isolation of DNA influence the condition display of microbial communities with the molecular method T-RFLP, and what kind of changes in the structure of microbial community cause (iv) the addition of grown biomass to the primary sample. The influence of different initial oligonucleodites and their pairs was checked by computer analysis on the model microbial community, which consisted of all gene sequences 16S rRNA, collected in the RDP II database. Initial oligonucleodites or primers (from here on this word is used) that are positioned in the central regions of gene recognize a greater proportion of sequences than those, which are positioned in the boundary regions. Different primers show different states of the same microbial community. For each pair of primers there exists such phylogenetic groups in which the first two primers recognize significantly different number of sequences. Because of uneven coverage of the basic database of gene sequences, which include boundary regions, the results of the analysis of microbial community structure that is based on the database that contain partial and complete sequences of 16S rRNA genes, are different from the results of analysis in the database of only complete sequences. Influences of other parameters were determined on two soil samples, which were sampled on arable land in Rodica and the grassland of Ljubljana marshes. For both samples we determined pH, water content, water-holding capacity, organic carbon content and texture. The two soil samples differed in all measured physic-chemical parameters. From both samples in rich nutrient medium we cultivated biomass, which was in different quantities (half-fold, 1-fold and 5fold) added to original floor subsamples. From the cultivated fraction and floor subsamples with added grown fraction we isolated DNA with two different isolation kits. In original soil samples we carried out five-fold sequenced isolation of DNA with two isolation kits. In PCR reaction we amplified 16S rRNA genes with a pair of primers FAM-FD1 and 926R and performed T-RFLP analysis. We found the structure of microbial communities from the soils of Rodica and Ljubljana Marches are different. The appendix of the smallest quantities of cultivated fraction already moves the structure of microbial community of original sample completely to the structure of grown biomass. Structures of microbial community's subsamples in multiple consecutive isolations of the same sample are not identical. With different isolation kits we get different views on the microbial community's structure of individual subsamples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII

1	UV	OD1
	1.1	OPREDELITEV PROBLEMA1
	1.2	CILJI RAZISKOVANJA
	1.3	HIPOTEZE
2	PR	EGLED OBJAV
3	MA	TERIALI IN METODE
	3.1	MATERIALI
	3.2	ANALIZA VPLIVA IZBORA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV NA
	REZU	JLTATE ANALIZE MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO T-RFLP 16
	3.2.	1 Specifičnost naleganja začetnih oligonukleotidov17
	3.2.	2 Razlike v zaznavanju med pari začetnih oligonukleotidov17
	3.2.	3 Skupni dendrogram parov začetnih oligonukleotidov in kombinacij
		parov19
	3.2.	4 Neodvisno prepoznavanje mest naleganja parov začetnih
		oligonukleotidov na naključnem podvzorcu vseh zaporedij 16S rRNA
		daljših od 1500 bp19

V

3.3 VZ	ORČENJE	21
3.4 PR	IPRAVA PODVZORCEV Z DODANO BIOMASO	23
3.5 DC	DLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL	24
3.5.1	Merjenje pH	24
3.5.2	Vsebnost vode v tleh	25
3.5.3	Sposobnost tal za zadrževanje vode	25
3.5.4	Tekstura tal	25
3.5.5	Vsebnost organskega ogljika in organske snovi v tleh	27
3.6 IZ0	DLACIJA GENOMSKE DNA	28
3.6.1	UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit	30
3.6.1.	l Izolacija DNA iz talnih vzorcev z dodano biomaso in vzorcev gojene	
	kulture tal	30
3.6.1.2	2 Večkratna izolacija DNA iz talnih vzorcev	31
3.6.2	NucleoSpin® Soil kit	31
3.6.2.	I Izolacija DNA iz talnih vzorcev z dodano biomaso in vzorcev gojene	
	kulture tal	34
3.6.2.2	2 Večkratna izolacija DNA iz talnih vzorcev	35
3.7 GE	LSKA ELEKTROFOREZA	35
3.8 VE	RIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	36
3.9 ČIŠ	ŠČENJE PRODUKTA PCR	37
3.10 T-I	۶FLP	38
4 REZUI	LTATI	39
4.1 AN	ALIZA VPLIVA IZBIRE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	39
4.1.1	Specifičnost naleganja začetnih oligonukleotidov	40
4.1.2	Razlike v zaznavanju med pari začetnih oligonukleotidov	42

4.1.	.3	Skupni dendrogram parov začetnih oligonukleotidov ir parov	ı kombinacij 45
4.1.	.4	Filogenetsko testiranje sestave mikrobnih združb, v različnimi pari začetnih oligonukleotidov	zorčenimi z 46
4.2	FIZ	IKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL	49
4.3	ANA	ALIZA MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO T-RFLP	
5 RA	ZPR	AVA IN SKLEPI	56
5.1	RAZ	ZPRAVA	56
5.1.	.1	Analiza začetnih oligonukleotidov	56
5.1.	.2	Laboratorijska analiza vpliva izolacijskega kompleta, do biomase ter zaporedne izolacije na profil T-RFLP mikro	datka gojene obne združbe
		dveh različnih talnih vzorcev	
5	.1.2.1	Vpliv kompleta za izolacijo DNA	62
5	.1.2.2	2 Vpliv dodane gojene biomase	63
5	.1.2.3	3 Vpliv večkratne zaporedne izolacije DNA	64
5	.1.2.4	4 Vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti vzorcev tal	65
5.2	SKL	LEPI	67
6 PO	VZE'	ТЕК	68
7 VII	RI		70
ZAHVA	ALA		
PRILO	GE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pari začetnih oligonukleotidov, njihova imena, zaporedja in vir, kjer smo
par zasledili
Preglednica 2: Pari začetnih oligonukleotidov in njihove kombinacije za analizo
statističnih razlik v relativni zastopanosti prepoznanih zaporedij18
Preglednica 3: Oznake in glavne lastnosti posameznih podvzorcev tal pripravljenih za
izolacijo DNA
Preglednica 4: Možne kombinacije pufrov za lizo SL1 in SL2 ter ojačevalca SX pri
izolaciji DNA s kompletom NucleoSpin® Soil kit
Preglednica 5: Koncentracija genomske DNA iz vzorca tal A izolirane s kompletom
NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo
Preglednica 6: Koncentracija genomske DNA iz vzorca tal B izolirane s kompletom
NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo
Preglednica 7: Začetna oligonukleotida in njuni zaporedji
Preglednica 8: Program verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje 16S rRNA gena
Preglednica 9: Deleži prepoznavanja zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP II z 0 in 1
dovoljeno napako pri naleganju za izbrane prednje in zadnje začetne oligonukleotide in
njihove pare
Preglednica 10: Fizikalno-kemijske lastnosti vzorcev tal A in tal B

KAZALO SLIK

Slika 1: Histogram številčne zastopanosti zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP glede
na dolžino zaporedja 16S rRNA (E.coli J01695) (Cole in sod., 2009)
Slika 2: Številčna porazdelitev zaporedij genov za 16S rRNA po dolžini v bazi SILVA
(Pruesse in sod., 2007)
Slika 3: Mesto vzorčenja A in njegove zemljepisne koordinate (Google earth, 2012a) 22
Slika 4: Mesto vzorčenja B in njegove zemljepisne koordinate (Google earth, 2012b)22
Slika 5: Teksturni trikotnik ameriške teksturne klasifikacije z razdelitvijo po Plaster-ju,
1992 (Zupan in sod., 1998)
Slika 6: Izolirana genomska DNA iz vzorca tal A s kompletom NucleoSpin® Soil kit z
različnimi kombinacijami pufrov za lizo
Slika 7: Izolirana genomska DNA iz vzorca tal B s kompletom NucleoSpin® Soil kit z
različnimi kombinacijami pufrov za lizo
Slika 8: Spreminjanje koncentracije DNA po izolaciji s kompletom NucleoSpin® Soil kit z
različnimi kombinacijami pufrov za oba vzorca tal
Slika 9: Ordinacija nm-MDS vseh začetnih oligonukleotidov in parov z 0, 1, 2 in 3
dovoljenimi napakami
Slika 10: Ordinacija nm-MDS začetnih oligonukleotidov in parov z 0, 1, 2 in 3
dovoljenimi napakami brez začetnega oligonukleotida 63F in para 63F_1492R41
Slika 11: Primeri X-Y grafov povprečnih vrednosti relativne zastopanosti zaporedij v
filogenetskih skupinah, kjer so statistične razlike signifikantne za kombinacije parov
začetnih oligonukleotidov
Slika 12: Dendrogram NJ odnosov med pari začetnih oligonukleotidov in kombinacijami
parov glede na filogenetske skupine, kjer je relativna zastopanost prepoznanih zaporedij
signifikantno različna med začetnima oligonukleotidoma v paru, oziroma med paroma
začetnih oligonukleotidov v kombinaciji
Slika 13: Neutežni dendrogram izbranih parov začetnih oligonukleotidov. Rdeče veje
prikazujejo pare začetnih oligonukleotidov, ki se glede na prisotnost ali odsotnost
filogenetskih skupin, signifikantno razlikujejo od osnovne baze zaporedij (R)47

Slika	14:	Utežni	dendrogram	izbranih	parov	začetnih	oligonukleotidov	. Rdeče	veje
prikaz	ujejo	pare za	četnih oligon	ukleotido	v, ki se	glede na	frekvenco zaznav	anja zapo	oredij
v filog	genet	skih sku	pinah,signifik	antno raz	likujejo	od osnov	ne baze zaporedij	(R)	48
Slika	15: I	Primerja	va T-RFLP p	rofilov ba	akterijsl	ke 16S rD	NA 18 podvzorce	ev izolira	ane s
komp	etom	n Nucleo	Spin® Soil ki	t	•••••			•••••	51
Slika	16: I	Primerja	va T-RFLP p	rofilov ba	akterijsl	ke 16S rD	NA 18 podvzorce	ev, izolira	ane s
komp	etom	n UltraC	lean TM Soil D	NA Isolat	ion Kit			•••••	52
Slika	17 : S	Skupni p	ovprečni deno	drogram	restrikc	ijskih pro	filov mikrobnih z	družb vse	eh 36
podvz	orcev	v tal A ir	n tal B	•••••					54

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica mest naleganja začetnih oligonuklotidov na genu za 16S rRNA, deležev zaporedij, ki vsebujejo posamezno mesto naleganja, glede na vsa zaporedja v bazi RDPII ter deležev prepoznavanja posameznega začetnega oligonukleotida, glede na zaporedja, ki vsebujejo mesto naleganja tega začetnega oligonukleotida.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

А	absorbanca
BSA	goveji serumski albumin (angl. »bovine serum albumin«)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. »deoxyribonucleic acid«)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. »ethylenediaminotetraacetic acid«)
6-FAM	6-karboksifluorescein (angl. »6-carboxyfluorescein«)
NB	tekoče hranilno gojišče (angl. »nutrient broth«)
NJ	metoda združevanja sosedov (angl. »neighbour joining«)
OTE	operacijska taksonomska enota
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. »polymerase chain reaction«)
PBS	fosfatni pufer (angl. »phosphate buffered saline«)
rDNA	ribosomska DNA (angl. »ribosomal DNA)
RDP II	podatkovna zbirka Ribosomal Database Project II
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. »ribosomal ribonucleic acid«)
SSU	majhna podenota ribosoma (angl. »small subunit«)
T- RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (<i>angl.</i> »terminal restriction fragment lenght polymorphism«)
UPGMA	metoda aritmetičnega povprečja neutežnih parov (<i>angl.</i> »unweighted pair group method with arithmetic mean«)
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Intenzivne analize mikrobnih združb različnih okoljskih vzorcev potekajo že dobrih dvajset let. Z razvojem molekularnih tehnik se je analiza mikrobnih združb v vseh vrstah ekosistemov izboljšala in olajšala, saj nismo več omejeni z omejitvami gojitvenih tehnik. Vseeno ostaja problem pri pridobivanju reprezentativnih vzorcev, ki ključno vplivajo na razumevanje sestave mikrobnih združb – ali lahko zaupamo, da je izolirana DNA pravi pokazatelj sestave mikrobne združbe v okoljskemu vzorcu.

Mikrobne združbe najdemo povsod na Zemlji, od dostopnosti habitata pa je odvisno, kako dobro so preučene. Tla so pester in kompleksen ekosistem, ki je na dosegu roke, vendar je ravno zaradi kompleksne zgradbe o njihovi fizikalno-kemijski ter biološki sestavi še veliko neznanega. Na sestavo mikrobnih združb v tleh pomembno vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti tal, dostopnost hranil, vegetacija, raba in obdelovanje tal ter podnebje. Zato se mikrobne združbe v tleh z različnimi lastnostmi med seboj razlikujejo.

DNA iz okoljskih vzorcev ponavadi pridobimo z enkratno izolacijo. Klasične metode izolacije DNA so nadomestili komercialni kompleti za izolacijo DNA, ki omogočajo hitro in učinkovito izolacijo DNA iz večjega števila vzorcev. Princip izolacije DNA različnih kompletov je v osnovi enak in združuje mehansko in kemično lizo celic, ter obarjanje nečistoč z različnimi pufri, in tako zagotavljajo kar največji izkoristek in kvaliteto DNA. V diplomski nalogi smo želeli odgovoriti na vprašanje, ali razlike v sestavi in kombinaciji pufrov ter postopku izolacije vplivajo na nadaljnje analize mikrobne združbe ter kakšen je vpliv večkratne zaporedne izolacije skupne genomske DNA enega vzorca na končen rezultat sestave mikrobne združbe.

Za karakterizacijo mikrobnih združb pogosto uporabljamo metodo polimorfizma dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (*angl.* »terminal restriction fragment length polymorphism« ali T-RFLP). Metoda omogoča hitro primerjavo sestave mikrobnih združb različnih vzorcev. Eden ključnih korakov pri tej metodi je pomnoževanje genov za 16S rRNA ali funkcionalnih genov v verižni reakciji s polimerazo (*angl.* »polymerase chain reaction« ali PCR), kjer je eden ali oba od začetnih oligonukleotidov označen s

fluoroscentnim barvilom. Izbiramo lahko med začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na različnih koncih gena in so različno specifični. Ker pa se zaporedja funkcionalnih genov ali genov za 16S rRNA med bakterijskimi vrstami razlikujejo, začetni oligonukleotidi ne morejo nalegati na vse različice gena, ki ga želimo pomnožiti. Vsak začetnik ima svoj »vzorec« prepoznanih genov. Iz tega sledi, da izbor začetnih oligonukleotidov pomembno vpliva na rezultate analiz mikrobne združbe z metodo T-RFLP.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na razlike med mikrobnimi združbami v dveh vzorcih tal z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Preverili smo, ali sestava mikrobne združbe talnega vzorca ostaja enaka po večkratnih zaporednih izolacijah DNA, ter kako na sestavo mikrobne združbe vpliva dodatek gojene mikrobne biomase. Pri izolaciji DNA smo uporabili dva komercialna izolacijska kompleta. Talne mikrobne združbe smo okarakterizirali z metodo T-RFLP na bakterijskem genu za 16S rRNA. Zaporedja bakterijskih genov za 16S rRNA, ki so zbrana v spletni bazi RDP II, so predstavljala modelno združbo, na kateri smo z računalniško analizo preverili vpliv različnih začetnih oligonukleotidov na nadaljnje rezultate analize mikrobne združbe z metodo T-RFLP.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

- Določiti vpliv izbire različnih začetnih oligonukleotidov in njihovih parov na rezultat profiliranja 16S rDNA mikrobnih združb z metodo T-RFLP, in statistično ovrednotiti rezultate, ki jih dobimo z globokim sekvenciranjem mikrobnih združb.
- Ugotoviti vpliv naslednjih dejavnikov na rezultate profiliranja mikrobne združbe talnega vzorca z metodo T-RFLP:

- različne količine dodane biomase, katere struktura se razlikuje od strukture

mikrobne združbe osnovne talne združbe,

- izbira kompleta za izolacijo DNA,

- večkratne zaporedne izolacije DNA iz istega vzorca tal,

- fizikalno-kemijske lastnosti talnih vzorcev.

1.3 HIPOTEZE

Pred začetkom dela smo postavili naslednje delovne hipoteze:

- H₀₁: Dodatek gojene frakcije mikrobne biomase vzorcu tal pred ekstrakcijo DNA ne bo vplival na strukturo mikrobne združbe tal, ki jo lahko zaznamo s tehniko T-RFLP.
- H₀₂: Izbira kompleta za izolacijo DNA ne bo signifikantno vplivala na rezultate analize mikrobne združbe z metodo T-RFLP.
- H₀₃: Profili mikrobnih združb iz različnih zaporednih ekstraktov istega vzorca se medsebojno ne bodo razlikovali.
- H₀₄: Razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih tal ne bodo signifikantno vplivale na strukturo mikrobne združbe.
- H₀₅: Razlike v uspešnosti prepoznavanja zaporedij genov za 16S rRNA različnih parov začetnih oligonukleotidov ne bodo statistično značilne.

2 PREGLED OBJAV

Tradicionalni pristopi ugotavljanja sestave in raznolikosti mikrobnih združb okoljskih vzorcev so temeljili na laboratorijskem gojenju mikroorganizmov. S tem je bilo mogoče dobiti zgolj informacijo o tem, katere vrste so prisotne, ne pa v kakšnem številu in razmerju (Prosser, 2002). Mikroorganizmi, ki jih lahko gojimo, predstavljajo le majhen delež mikroorganizmov prisotnih v naravnih mikrobnih združbah (von Wintzingerode in sod., 1997). Tudi s kombiniranjem različnih gojišč in različnih pogojev gojenja večina mikroorganizmov ne bo zrasla v laboratoriju. Zato s tradicionalnimi gojitvenimi tehnikami ne moremo določiti prave biološke pestrosti okoljskih vzorcev, kvečjemu jo podcenimo (Schneegurt in sod., 2003).

Danes se sestavo mikrobnih združb preučuje z molekularnimi tehnikami, ki omogočajo hiter vpogled v sestavo mikrobnih združb brez potrebe po gojenju mikroorganizmov. Molekularne tehnike temeljijo na analizi genov, prisotnih v okoljskem vzorcu, ki so lahko funkcionalni, ali pa geni za rRNA majhne podenote ribosoma (SSU) (Prosser, 2002). Reakcija PCR, s katero pomnožimo že majhne količine DNA, je omogočila, da lahko zaznamo tudi mikroorganizme, ki se v okolju pojavljajo v majhnem številu in tiste, ki jih ne znamo gojiti (von Wintzingerode in sod., 1997).

Ena od pogosto uporabljenih molekularnih tehnik, ki temelji na pomnoževanju funkcionalnih genov ali genov za 16S rRNA, je metoda T-RFLP (Liu in sod., 1997; Schütte in sod., 2008). Prvi korak je izolacija skupne DNA mikrobne združbe okoljskega vzorca, sledi pomnoževanje izbrane regije bakterijskih genov z reakcijo PCR, kjer sta eden ali oba začetna oligonukleotida označena s fluorescentnim barvilom. Produkt PCR nato razrežemo z enim ali več restrikcijskimi encimi. Fragmente restrikcijske mešanice, ki ji predhodno dodamo velikostni standard DNA, ločimo z gelsko ali kapilarno elektroforezo, laser v avtomatskem sekvenatorju pa zazna označene končne fragmente DNA (Liu in sod., 1997; Osborn in sod., 2000). Zaradi razlik v poziciji mesta rezanja z izbranim encimom med različnimi aleli gena za 16S rRNA med bakterijskimi vrstami dobimo različno dolge končne označene fragmente (Osborne in sod., 2006). Profil T-RFLP, ki prikazuje stanje mikrobne združbe, določajo število fragmentov edinstvene dolžine (v baznih parih) in

relativna zastopanost vsakega fragmenta, ki jo ponazarja velikost ali površina vrha na elektroferogramu (Liu in sod., 1997).

T-RFLP je kvantitativna molekularna metoda, s katero lahko ocenimo raznolikost mikrobne združbe, primerjamo mikrobne združbe različnih vzorcev, primerjamo relativno zastopanost filotipov med združbami, ugotavljamo razlike v sestavi mikrobne združbe na prostorski ali časovni skali in razlike v sestavi mikrobne združbe, ki nastajajo zaradi okoljskih dejavnikov (Liu in sod., 1997; Dunbar in sod., 2001; Osborne in sod., 2006). Metoda je primerna za zaznavanje številčno dominantnih populacij v mikrobnih združbah (Engebretson in Moyer, 2003; Kraigher in sod., 2006).

Raziskovanje mikrobnih združb v tleh z molekularnimi metodami sicer ni pod vplivom sposobnosti ali nesposobnosti mikrobnih vrst, da rastejo v gojiščih, vendar pa so tukaj prisotni drugi dejavniki, zaradi katerih molekularne metode ne prikažejo dejanskega stanja združb v tleh (Schneegurt in sod., 2003). Prvi dejavnik je vzorčenje, ki je fizično porušenje strukture tal, ki lahko spremeni strukturo prisotne mikrobne združbe (Schneegurt in sod., 2003). Mikrobne združbe v tleh se razlikujejo že na majhnih prostorskih skalah, zato je smiselno vzorčiti manjše količine tal na več mestih izbranega območja, ki jih nato združimo (Schneegurt in sod., 2003). Vzorec tal moramo čimprej zamrzniti, da bi ohranili prvotno strukturo mikrobne združbe. Če hranimo vzorec tal naprimer v hladilniku ali pri sobni temperaturi, se lahko že v nekaj urah struktura mikrobne združbe bistveno spremeni zaradi mikroorganizmov, ki se bolj prilagodijo na spremembe temperature oziroma bolje uspevajo pri drugačni temperaturi (Schneegurt in sod., 2003).

Drugi kritični dejavniki so izolacija in čiščenje DNA, pomnoževanje genov s PCR (von Wintzingerode in sod., 1997; Prosser, 2002), izbira in število restrikcijskih encimov (Liu in sod., 1997; Engebretson in Moyer, 2003; Osborne in sod., 2006), ter sama razlaga rezultatov molekularnih analiz (Blackwood in sod., 2003; Osborne in sod., 2006; Schütte in sod., 2008).

Interpretacija stanja talne mikrobne združbe z molekularnimi metodami je odvisna od kvalitete izolirane DNA. Te mora biti količinsko dovolj in biti mora čista, saj so molekularne metode občutljive (Schneegurt in sod., 2003). Ločimo direktno in indirektno izolacijo nukleinskih kislin. Za molekularne analize DNA največkrat izoliramo z direktno

metodo, kar pomeni, da liziramo celice, ko so te še vedno del tal, torej DNA izoliramo in očistimo direktno iz mešanice talnih delcev in celic (Schneegurt in sod., 2003). Liza celic je lahko fizikalna, kemijska, encimska, ali kombinacija le teh. Nabolj učinkovita naj bi bila fizikalna liza celic, saj razbije tudi strukturo tal in omogoči dostop do mikrobov v talnih agregatih, torej do večjega deleža talne mikrobne združbe (Robe in sod., 2003). Učinkovitost lize celic variira med skupinami mikroorganizmov, med vegetativnimi celicami in sporami (Prosser, 2002). Celična stena po Gramu negativnih bakterij se razbije hitreje kot celična stena po Gramu pozitivnih, enako velja, da vegetativne oblike lizirajo hitreje kot spore (von Wintzingerode in sod., 1997; Schneegurt in sod., 2003; Hirsch in sod., 2010). Blagi postopki lize ne razbijejo učinkovito sten spor in po Gramu pozitivnih celic, tako da v skupni izolirani DNA prevladuje DNA po Gramu negativnih celic. Ostrejši pogoji, ki so potrebni za razbitje celične stene po Gramu pozitivnih celic, pa lahko povzročijo fragmentacijo DNA, sproščene iz celic, ki hitreje lizirajo (von Wintzingerode in sod., 1997; Schneegurt in sod., 2003; Frey in sod., 2006; Hirsch in sod., 2010). Zaradi nezadostne lize DNA odpornejših celic ostane v celici, zaradi agresivnejših postopkov lize pa se DNA šibkejših celic razgradi, v obeh primerih pa taka DNA ne bo vključena v končni strukturi mikrobne združbe (von Wintzingerode in sod., 1997). Univerzalnega postopka lize, s katerim bi izolirali nepoškodovano DNA iz vseh mikrobnih celic prisotnih v talnem vzorcu, ni, zato profili T-RFLP mikrobnih združb nikoli ne prikazujejo dejanskega stanja.

Na izolacijo mikrobne DNA vplivajo tudi lastnosti tal (Lloyd-Jones in Hunter, 2001; Thakuria in sod., 2008; Feinstein in sod., 2009). Obstaja več različnih protokolov direktne izolacije DNA iz zemlje, vendar pa nobeden ne zagotavlja enako učinkovite izolacije DNA iz tal z različnimi lastnostmi (Schneegurt in sod., 2003). Lloyd-Jones in Hunter (2001) sta primerjala tri protokole izolacije v štirih različnih vzorcih tal, ki so se med drugim razlikovali po teksturi. Največ DNA sta izolirala iz tal z največjim deležem peska in najmanjšim deležem gline, ne glede na protokol. Tla z visoko vsebnostjo gline v splošnem vsebujejo večji delež organske snovi kot teksturno lažja tla (Hirsch in sod., 2010). V tleh z visokim deležem organske snovi so prisotne huminske substance, ki nižajo izkoristek izolacije DNA (von Wintzingerode in sod., 1997; Schneegurt in sod., 2003; Feinstein in sod., 2009; Hirsch in sod., 2010). Hkrati delujejo inhibitorno na pomnoževanje s PCR in na delovanje restrikcijskih endonukleaz (Schneegurt in sod., 2003). Huminske substance so raznolike molekule, ki se razlikujejo po topnosti in naboju, tako da ni postopka čiščenja s katerim bi lahko odstranili vse substance iz izolata talne DNA (Schneegurt in sod., 2003). Izolati vsebujejo tudi neznane količine ekstracelularne DNA in evkariontsko DNA (Robe in sod., 2003). Postopek čiščenja je odvisen od lastnosti tal in ni univerzalnega postopka, ki bi zagotovil enako čisto DNA vzorcev različnih tal (Schneegurt in sod., 2003). S samim čiščenjem izolirane DNA tudi izgubimo precej DNA (von Wintzingerode in sod., 1997; Prosser, 2002). Čistost in kvaliteta DNA imata velik vpliv na zanesljivost molekularnih metod, ki temeljijo na PCR, s katerimi analiziramo raznolikost mikrobnih združb (Thakuria in sod., 2008), saj manjši izkoristek DNA značilno vpliva na detekcijo manjštevilčnih tarčnih genov v vzorcu (Lloyd-Jones in Hunter, 2001).

Poleg klasičnih metod izolacije DNA so danes na voljo številni komercialni kompleti, kjer izolacijo izvajamo s priloženimi raztopinami po protokolu proizvajalca. Vendar pa ni nujno, da protokol vodi do najboljšega izkoristka DNA (Feinstein in sod., 2009). Thakuria in sod. (2008) so primerjali šest različnih protokolov izolacije, eden od teh je bil komercialni komplet ostalih pet pa klasične metode, na treh različnih vzorcih tal. Iz vseh treh vzorcev tal so najmanjšo količino DNA izolirali ravno s komercialnim kompletom, prav tako pa so s kompletom dosegli najmanjše razmerje A₂₆₀/A₂₈₀ in A₂₆₀/A₂₃₀, in sicer več kot 5-krat manjše količine v primerjavi z ostalimi, klasičnimi protokoli izolacije. Feinstein in sod. (2009) so v treh različnih vzorcih tal, ki so se razlikovali v teksturi in vsebnosti organske snovi, primerjali štiri alternativne korake lize celic, kjer so spreminjali osnovni (protokolarni) postopek lize komercialnega kompleta. Izkazalo se je, da so z osnovnim postopkom pridobili najmanjšo količino skupne bakterijske DNA v vseh treh vzorcih tal.

Primerjava strukture mikrobnih združb med različnimi tlemi na osnovi enkratne izolacije DNA je lahko pravilna, vendar pa z njo zaznamo le razlike med mikrobnimi celicami, ki lažje in hitreje lizirajo. Zaradi vpliva lastnosti tal na izolacijo je smiselno izvesti več zaporednih izolacij DNA iz istega vzorca (Feinstein in sod., 2009). To naj bi povečalo število liziranih celic, z adsorpcijskih mest talnih koloidov odstranilo več vezane DNA in s tem povečalo količino izolirane DNA (Feinstein in sod., 2009). V zgoraj omenjeni študiji so Feinstein in sod. (2009) na vzorcih peščenih, glinenih in organskih tal s komercialnim

kompletom izvedli šest zaporednih izolacij. Ugotovili so, da z vsako nadaljnjo izolacijo lizira toliko novih mikrobnih celic, da se sprosti znatna količina DNA. V glinenih in peščenih tleh so se profili T-RFLP na osnovi gena za 16S rRNA bakterijske združbe vsake od zaporednih izolacij signifikantno razlikovali med sabo. So pa ugotovili, da je povprečen profil T-RFLP po združitvi vseh šestih zaporednih izolacij zelo podoben profilu T-RFLP po združitvi prvih treh zaporednih izolacij. Glede na to Feinstein in sod. (2009) zaključujejo, da iz vzorca izoliramo večino prisotne DNA šele s tremi zaporednimi izolacijami.

Izolaciji skupne mikrobne DNA iz okoljskega vzorca sledi pomnoževanje tarčnih genov v reakciji PCR. Gene za 16S rRNA sestavljajo regije zaporedja, ki so ohranjene med bakterijami, kar olajša poravnavo genov, ko jih želimo primerjati med sabo, in pa variabilne regije, kar omogoča razlikovanje med različnimi taksonomskimi skupinami, tudi do nivoja vrste (Prosser, 2002). Relativna zastopanost vrst se določa na podlagi števila različnih genov za 16S rRNA v vzorcu, vendar pa število genov za 16S rRNA ne ponazarja nujno pravega števila celic določene vrste v vzorcu, saj se število kopij genov za 16S rRNA razlikuje med vrstami (Prosser, 2002; Hirsch in sod., 2010). Zato so Hirsch in sod. (2010) predlagali uporabo funkcionalnih genov, ki so variabilni med vrstami, obenem pa se pogosto pojavljajo le v eni kopiji na genom. Na neenako pomnoževanje tarčnih zaporedij poleg števila kopij gena za 16S rRNA vplivajo tudi razlike v molskem deležu GC parov v zaporedju gena med vrstami (von Wintzingerode in sod., 1997; Frey in sod., 2006). Dvojna vijačnica z večjim deležem GC parov se težje razvije v koraku denaturacije, kot tista z manjšim deležem, kar vodi do preferenčnega pomnoževanja matric z manjšim deležem GC (von Wintzingerode in sod., 1997).

Ključni korak pri pomnoževanju 16S rDNA s PCR je izbira začetnih oligonukleotidov, ki so lahko univerzalni, ali pa specifični za taksonomske skupine (von Wintzingerode in sod., 1997). Od izbora začetnih oligonukleotidov je odvisno, kako podrobno informacijo o filogeniji mikrobne združbe dobimo. Z univerzalnimi in domensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi dobimo splošno informacijo o sestavi mikrobne združbe, s poudarkom na dominantnih populacijah (Liu in sod., 1997). Z uporabo začetnih oligonukletoidov specifičnih za posamezno taksonomsko skupino pa povečamo občutljivost za filogenetske podrobnosti znotraj te taksonomske skupine (Blackwood in sod., 2003).

Pomnožena tarčna DNA odraža kvantitativno zastopanost posamezne vrste, če je učinkovitost pomnoževanja enaka za vse tarčne gene v vzorcu (von Wintzingerode in sod., 1997). Vendar pa nikoli niso vsa zaporedja tarčnih genov v okoljskem vzorcu komplementarna z zaporedji začetnih oligonukleotidov, s katerimi jih želimo pomnožiti (Baker in sod., 2003). Popolni začetni oligonukleotidi bi morali biti specifični za domeno, ki jo preiskujemo, obenem pa komplementarni zaporedjem vseh taksonov znotraj domene (Baker in sod., 2003). Bakterijski gen za 16S rRNA sestavljajo zaporedja baznih parov, ki so popolnoma ohranjena med vrstami, in zaporedja z različno stopnjo variabilnosti. Optimalna dolžina začetnega oligonukleotida je okrog 20 nukleotidov in idealno bi bilo, da bi začetnik pokril sama popolnoma ohranjena mesta gena ter tako zagotovil univerzalnost. Vendar pa se popolnoma ohranjena zaporedja gena ne nahajajo skupaj, večina ie razpršenih, ali pa so združena v štiri do največ deset ohranjenih baznih parov skupaj. Zato par začetnih oligonukleotidov, s katerim bi lahko pomnožili gene za 16S rRNA vseh prokariontov, ne obstaja (Baker in sod., 2003). Iz tega sledi, da v okoljskem vzorcu z enim parom začetnikov nikoli ne bomo pomnožili genov vseh prisotnih mikroorganizmov.

Problem pri razumevanju okoljskih mikrobnih združb predstavljajo tudi razlike, ki nastanejo pri pomnoževanju tarčnih genov z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Različni začetni oligonukleotidi namreč lahko preferenčno pomnožujejo nekatera zaporedja pred drugimi, zaradi česar lahko spregledamo pomembne člane mikrobne združbe (Sipos in sod., 2007). Profili T-RFLP mikrobne združbe istega vzorca, ki jih pridobimo s pomnoževanjem z različnimi pari začetnih oligonukleotidov, se razlikujejo med sabo (Hongoh in sod., 2003; Sipos in sod., 2007; Fortuna in sod., 2011). Profili se razlikujejo tudi po številu vrhov. Fortuna in sod. (2011) so s parom začetnih oligonukleotidov 63F – 1392R dobili večje število končnih fragmentov in tako bolj celovito sliko o strukturi mikrobne združbe, kot s parom 27F – 1392R.

Na slabo pomnoževanje tarčnih zaporedij z izbranim parom začetnih oligonukleotidov vplivajo neujemanja med zaporedji začetnih oligonukleotidov in tarčnih genov (Hongoh in sod., 2003). Nezadostna komplementarnost univerzalnega začetnega oligonukleotida, predvsem na 3' koncu (Baker in sod., 2003) in celo eno samo neujemanje (Hongoh in sod., 2003) lahko prikaže povsem drugačne profile mikrobne združbe. Sipos in sod. (2007) so na preprosti modelni združbi štirih bakterijskih sevov primerjali učinkovitost

pomnoževanja 16S rDNA dveh parov začetnih oligonukleotidov, 27F - 1387R in 63F -1387R. Zaporedji 27F in 1387R sta bili komplementarni z zaporedji mest naleganja genov za 16S rRNA vseh štirih sevov, zaporedje 63F pa se je v mestu naleganja pri dveh sevih razlikovalo v treh nukleotidih. Par 27F – 1387R je v mešanici enakih količin DNA štirih sevov tarčne gene pomnožil v enakem razmerju. Par 63F – 1387R pa je preferenčno pomnoževal tarčne gene tistih dveh sevov, katerih zaporedji sta bili komplementarni z zaporedjem 63F. Ko so ta par preizkusili na mešanici DNA, kjer so bile količine DNA sevov, katerih zaporedja niso bila popolnoma komplementarna z zaporedjem 63F, 10-krat manjše od popolnoma komplementarnih, produkta PCR nekomplementarnih zaporedij niso zaznali. Tudi Hongoh in sod. (2003) so v svoji študiji ugotovili, da začetni oligonukleotid 63F preferenčno nalega na zaporedja genov za 16S rRNA, ki so popolnoma komplementrana njegovemu zaporedju. V genskih knjižnicah mikrobne združbe v prebavilu termita, pripravljenih s parom 63F – 1389R, niso zaznali spirohet, čeprav so bila zaporedja spirohet najštevilčnejša v genskih knjižnicah narejenih z drugimi pari začetnih oligonukleotidov. Ugotovili so, da se zaporedje 63F in zaporedja tarčnih mest genov za 16S rRNA spirohet razlikujejo v 6 do 8 nukleotidih. Hongoh in sod. (2003) so dokazali tudi, da so za preferenčno pomnoževanje krivi prednji začetni oligonukleotidi, saj v genskih knjižnicah pripravljenih z istim prednjim začetnim oligonukleotidom in različnimi zadnjimi (1389R in 1492R) niso opazili sprememb. Na slabo pomnoževanje tarčnega zaporedja najbolj vpliva neujemanje najbližje 3'-koncu (Hongoh in sod., 2003). Ko so neujemajoči nukleotid v zaporedju 63F spremenili v komplementarnega, je začetni oligonukleotid 63F pomnožil zaporedja, ki jih prej ni.

V primeru začetnih oligonukleotidov, specifičnih za določeno bakterijsko ali taksonomsko skupino, se dogaja, da taki začetni oligonukleotidi ne glede na visoko specifičnost nalegajo na netarčna zaporedja (Blackwood in sod., 2003), da neujemanje med zaporedji začetnikov in genov poveča pomnoževanje netarčnih zaporedij in da z naraščanjem neujemanj število prepoznanih netarčnih zaporedij narašča (Morales in Holben, 2009).

Pomnoževanje genov z reakcijo PCR je poleg izbora začetnih oligonukleotidov odvisno tudi od števila ciklov pomnoževanja in temperature v koraku naleganja začetnih oligonukleotidov. Z zmanjševanjem števila ciklov upada kompleksnost profila T-RFLP in inteziteta vrhov (Osborn in sod., 2000). Povečanje števila ciklov poveča število vrhov

profila T-RFLP (Sipos in sod., 2007), se pa zmanjša delež dominantnih populacij ravno na račun novih ribotipov (Hongoh in sod., 2003). Nižanje temperature naleganja lahko poveča število vrhov v profilu T-RFLP (Hongoh in sod., 2003), z višanjem pa se število vrhov v profilu T-RFLP zmanjša (Sipos in sod., 2007). Višja temperatura naleganja vpliva tudi na preferenčno pomnoževanje tarčnih genov, katerih zaporedja se popolnoma komplementarna z zaporedji začetnih oligonukleotidov (Sipos in sod., 2007).

Po restrikciji pomnoženih genov za 16S rRNA dobimo različno dolge označene končne fragmente. Idealno naj bi vsak od fragmentov unikatne dolžine predstavljal eno bakterijsko vrsto ali skupino. Realno imajo nekatere bakterijske skupine restrikcijsko mesto restrikcijskega encima na enakem mestu in posledično enako dolge končne fragmente, zato take skupine na profilu T-RFLP predstavlja isti vrh (Kraigher in sod., 2006). Sklepanje o raznolikosti in strukturi mikrobne združbe na podlagi profila T-RFLP, ki ga dobimo po restrikciji z enim samim restrikcijskim encimom, je lahko napačno, predvsem ocena raznolikosti je pogosto manjša od dejanske, če izberemo napačen encim (Liu in sod., 1997; Engebretson in Moyer, 2003). Pravtako velja, da primerjanje profilov T-RFLP mikrobnih združb različnih vzorcev, narejenih z eno restriktazo, lahko vodi do napačnih zaključkov o podobnosti med mikrobnimi združbami (Osborne in sod., 2006). Zato je smiselna uporaba več restrikcijskih encimov (Engebretson in Moyer, 2003; Osborne in sod., 2006).

Engebretson in Moyer (2003) sta z računalniško simulacijo ocenila 18 restrikcijskih endonukleaz na modelnih združbah z 1, 5, 10, 50 in 100 člani. Ugotovila sta, da se encimi razlikujejo po tem, koliko unikatnih končnih fragmentov znotraj območja, kjer najbolje delujeta kapilarna in gelska elektroforeza (ponavadi med 50 – 500 bp), naredijo in po frekvenci razreševanja posameznih populacij znotraj modelnih združb. Pri zaznavanju operacijskih taksonomskih enot (OTE) v 100 naključnih modelnih združbah znane gostote je odstotek zaznavanja z naraščanjem gostote (števila članov) združbe padal pri vseh encimih, vendar pa so se nekateri encimi bistveno bolje odrezali od drugih. Pri združbah z enim članom je bila stopnja ločevanja od 50 – 98 %, kar pomeni, da je najboljši encim v 98 primerih od 100 pravilno ločil en končni fragment. Pri gostoti 50 članov so encimi v manj kot 71 % zaznali pravilno število OTE, pri gostoti 100 članov pa le v 35 - 58 %. Avtorji razlagajo upad natančnosti ločevanja zaradi povečane frekvence končnih fragmentov enakih dolžin v posamezni modelni združbi z večjim številom mikrobnih članov. Z naključnim zaporednim izborom 18 encimov so preverili, koliko encimov je potrebnih, da se poveča uspešnost zaznavanja OTE. Za nižje vrednosti (1, 5 in 10 članov) je za 100 % zaznavanje OTE dovolj 5 encimov. Pri 50 in 100 članih pa je sposobnost zaznavanja postopoma rasla do končne vrednosti 74 % in 60 % po vseh 18 encimih. Avtorja zaključujeta, da metoda T-RFLP ni najbolj primerna za opisovanje kompleksnih mikrobnih združb, ampak je bolj učinkovita za analizo mikrobne raznolikosti v mikrobnih združbah, kjer je nizka ali srednja vrstna pestrost.

Osborne in sod. (2006) so izvedli ločene restrikcije pomnoženih genov za 16S rRNA dvajsetih talnih vzorcev s šestimi restriktazami in primerjali profile T-RFLP mikrobnih združb vzorcev dobljenih s posameznim encimom. Različni restrikcijski encimi so generirali različne vzorce iste mikrobne združbe. Z uporabo različnih encimov so dobili tudi različna grupiranja teh dvajsetih mikrobnih združb in pri vseh restriktazah so se skupaj združevali zgolj trije pari profilov T-RFLP. Avtorji poudarjajo, da za mikrobne združbe vzorcev, ki imajo profile T-RFLP podobne po restrikciji z vsako od restriktaz, lažje trdimo, da so si tudi resnično podobne.

Podatki, ki jih dobimo z metodo T-RFLP, morajo biti interpretirani previdno. Število populacij v profilu katerekoli združbe je odvisno od gostote vsake populacije prisotne v združbi. Mikrobne populacije, ki niso številčno dominantne, najbrž ne bodo prikazane v profilu, saj DNA te populacije predstavlja le majhen delež DNA celotne mikrobne združbe. Posledica je, da je vrstna pestrost mikrobnih združb podcenjena (Liu in sod., 1997). Pomemben vpliv pri razločevanju končnih fragmentov v profilu T-RFLP ima zato količina DNA, ki jo analiziramo. Ko analiziramo velike količine DNA, lahko razločujemo med končnimi fragmenti z močnejšim signalom, ki predstavljajo številčnejše predstavnike združbe, in šibkejšim signalom, ki so manj številčni predstavniki. Če je količina DNA majhna, vrhovi s šibkejšim signalom padejo pod prag detekcije (Osborne in sod., 2006). Nizki vrhovi, ki predstavljajo manj številčne populacije, so včasih ključni pri razlikovanju med mikrobnimi združbami. Če take vrhove spregledamo, ne zaznamo vseh razlik med združbami (Blackwood in sod., 2003). Pomembno je, da je količina DNA vzorcev, katerih profile T-RFLP primerjamo, enaka (Dunbar in sod., 2001). Ker tekom priprave vzorcev za analizo z metodo T-RFLP, prihaja do napak, kot so odstopanja pri pipetiranju itd., se

količina DNA v vzorcih skoraj zagotovo razlikuje. Zato je potrebno profile T-RFLP, ki jih primerjamo, standardizirati (Dunbar in sod., 2001).

Problem predstavlja tudi ponovljivost profilov T-RFLP (Dunbar in sod., 2001; Osborne in sod., 2006). V teoriji naj bi bili profili ponovitev identični, v praksi pa se je izkazalo, da obstaja variabilnost med njimi, kar spet lahko vodi do napačnih zaključkov, ko primerjamo le enkratne profile T-RFLP mikrobnih združb okoljskih vzorcev (Dunbar in sod., 2001). Osborne in sod. (2006) so dokazali, da ločeno rezanje produkta PCR z isto restriktazo (ponovitve) da podobna profila T-RFLP obeh ponovitev le pri eni ali največ štirih restriktazah od šestih, odvisno od talnega vzorca. Glede na to, da se profili T-RFLP ponovitev niso vedno grupirali skupaj se postavlja vprašanje, ali je grupiranje okoljskih vzorcev brez ponovitev pokazatelj resničnega stanja podobnosti mikrobnih združb različnih vzorcev. Še več, Dunbar in sod. (2001) so pokazali, da se profili T-RFLP devetih enakih delov iste restrikcijske mešanice razlikujejo med seboj: med 169 različnimi končnimi fragmenti, je bilo le 24 takih, ki so se ponovili v vseh devetih profilih.

Egert in Friedrich (2003) sta dokazala, da se v profilih T-RFLP klonov, čistih kultur in okoljskih vzorcev poleg pričakovanih končnih fragmentov pogosto pojavljajo tudi t.i. pseudo-končni fragmenti. Na profilu T-RFLP so vidni kot običajni končni fragmenti (vrhovi), vendar pa restrikcija ni potekla na prvem restrikcijskem mestu od konca zaporedja. Razlog zanje je v tem, da nekateri pomnožki vsebujejo delno enojno vijačnico, kjer se nahaja primarno restrikcijsko mesto, običajne tetramerne restriktaze pa ne prepoznajo oziroma ne morejo rezati enojne vijačnice, zato je primarno mesto le delno razrezano. Restriktaza reže naslednja prepoznavna mesta, posledično pa iz istih pomnožkov dobimo različno dolge končne fragmente. Pseudo-končni fragmenti lahko vplivajo na razumevanje diverzitete mikrobnih združb, saj zaradi njihove prisotnosti lahko sklepamo, da je diverziteta večja od dejanske (Egert in Friedrich, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

a) Naprave

- pH meter Orion 520A (Thermo Scientific, Inc; ZDA)

- mikrocentrifuga MiniSpin plus (Eppendorf AG; Nemčija)

- hlajena mikrocentrifuga Mikro 200R, Hettich Zentrifugen (DJB Labcare, Ltd; VB)

- avtoklav A-21CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)

- vorteks Zx³ (VELP SCIENTIFICA, Srl; Italija)

- vorteks Vortex-Genie 2, model G560E (Scientific Industries, Inc; ZDA)

- vorteks adapter za vorteks Vortex-Genie 2 (Mo Bio Laboratories, Inc; ZDA)

- aparat za verižno reakcijo s polimerazo MyCycler® thermal cycler (BIO RAD Laboratories, Inc; ZDA)

- napajalnik za elektroforezo EPS-200 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.; ZDA)

- spektrofotometer NanoVue 4282 V1.7.3 (GE Healthcare, Ltd; VB)

- termoblok CH-100 (BioSan; Latvija)

- kapilarna elektroforeza ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems; ZDA)

b) Reagenti, pufri, raztopine

- dH₂O

- Sigma H₂O (Sigma Aldrich; ZDA)

- pufer Tango z BSA, 10x (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- Na₂CO₃ (Merck KgaA; Nemčija)

- agaroza SeaKem® LE Agarose (Lonza Group Ltd; Švica)

- DNA lestvica GeneRulerTM 1 kb DNA ladder 0,5 $\mu g/\mu l$, 50 μg , #SM0311 (Fermentas,

Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- etidijev bromid

- MgCl₂ (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- deoksinukleotidi (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

pufer za polimerazo Taq buffer + KCl – MgCl₂ (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- goveji serumski alubmin BSA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

c) Gojišča

- tekoče NB (angl. »nutrient broth«) gojišče:

- 4 g Nutrient Broth (BIOLIFE Italiana S.r.l.; Italia)

- 500 ml dH₂O

V 500 ml hladne destilirane vode smo dodali 4 g gojišča Nutrient Broth v prahu. Ob konstantnem mešanju z magnetnim mešalom smo mešanico segreli do vrenja in nastalo gojišče avtoklavirali. Po eni uri ohlajevanja je bilo gojišče pripravljeno za nadaljnjo uporabo.

d) Kompleti

- UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.; Carlsbad, ZDA)

- NucleoSpin® Soil kit Nucleic Acid and Protein Purification (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Nemčija)

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Nemčija)

e) Encimi

- Taq DNA polimeraza 5 u/µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- *HhaI* 10 u/µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

- *MspI* 10 u/µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)

f) Začetni oligonukleotidi

- FD1-FAM (Microsynth AG; Švica)

- 926R (Microsynth AG; Švica)

3.2 ANALIZA VPLIVA IZBORA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV NA REZULTATE ANALIZE MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO T-RFLP

Po pregledu literature smo izbrali nabor začetnih oligonukleotidov, ki se jih uporablja pri analizi mikrobnih združb z metodo T-RFLP in, ki nalegajo na vse ključne ohranjene regije gena za 16S rRNA (Preglednica 1).

Preglednica 1: Pari začetnih oligonukleotidov, njihova imena, zaporedja in vir, kjer smo par zasledili.^a – prednja začetna oligonukleotida imata enako zaporedje. V nadaljevanju smo uporabljali oznako FD1.^b – zadnja začetna oligonukleotida imata enako zaporedje. V nadaljevanju smo uporabljali oznako 926R.

Prednji začetni oligonukleotid z zaporedjem 5'-3'	Zadnji začetni oligonukleotid z zaporedjem 5'-3'	Vir, kjer smo zasledili par začetnih oligonukleotidov
FD1 ^a	926R ^b	Ta diplomska naloga
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	
8f ^a	536r	Liu in sod., 1997
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	GWATTACCGCGGCKGCTG	
63F	1492R	Thies, 2007
CAGGCCTAAYACATGCAAGTC	ACCTTGTTACGACTT	
341f	926r ^b	Liu in sod, 1997
CCTACGGGAGGCAGCAG	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	
515f	1391R	Frey in sod., 2006
GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GACGGGCGGTGTGTRCA	
27F	1392R	Fortuna in sod., 2011
AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	ACGGGCGGTGTGTRC	

Z orodjem Probe Match na spletni strani RDP (Cole in sod., 2009) smo za začetne oligonukleotide in pare začetnih oligonukleotidov iz Preglednice 1 preverili, koliko

zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP II prepoznajo. Upoštevali smo parametra 0 in 1 dovoljena napaka (*angl.* »allowed errors«) pri naleganju ter iskanje omejili na bakterijsko domeno. Iz števila zaporedij, ki jih je prepoznal začetni oligonukleotid ali par in števila vseh objavljenih bakterijskih zaporedij 16S rRNA v bazi RDP, smo izračunali delež prepoznavanja.

3.2.1 Specifičnost naleganja začetnih oligonukleotidov

V podatkovni bazi RDP II smo z orodjem ProbeMatch izvedli tudi pregled zaporedij genov za16S rRNA, ki jih (i) posamezen začetni oligonukleotid in (ii) par oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica 1) prepozna pri 0, 1, 2 ali 3 dovoljenih napakah, upoštevali pa smo največjo taksonomsko globino (*angl.* »depth«) 10, to je do nivoja rodu. Število zaporedij v posamezni filogenetski skupini smo normalizirali na število zaporedij, ki so imela prepoznavna mesta začetnih oligonukleotidov v isti regiji v podatkovni bazi. Kot kontrolo (*angl.* »ground truth«) smo obravnavali vsa uvrščena zaporedij v posamezni filogenetski skupini, normalizirana na število vseh bakterijskih zaporedij v bazi RDP II. Tako smo lahko primerjali relativno zastopanost zaporedij v posamezni filogenetski skupini, ki jih prepoznajo začetniki ali pari v bazi RDP II med sabo, ter glede na osnovno stanje v bazi (kontrola). Razlike v sestavi združb, ki jih podajo posamezni začetniki in pari oligonukleotidov z 0, 1, 2 in 3 dovoljenimi neujemanji, smo prikazali z ordinacijsko tehniko nm-MDS, kjer smo v programu PAST (Hammer in sod., 2001) kot mero podobnosti uporabili indeks Bray-Curtis, ki upošteva tako prisotnost-odsotnost posameznih skupin kot njihovo relativno zastopanost v združbi.

3.2.2 Razlike v zaznavanju med pari začetnih oligonukleotidov

Za vse možne pare začetnih oligonukleotidov ter kombinacije parov iz Preglednice 1 smo zbrali vrednosti relativne zastopanosti zaporedij v posamezni filogenetski skupini za 0 in 1 dovoljeno napako. Podatkov za 2 in 3 dovoljene napake nismo upoštevali, saj to predstavlja že preveč nespecifične pogoje pomnoževanja genov, kot so smiselni pri PCR in direktnih pomnoževanjih. Pari in kombinacije so zbrani v Preglednici 2. Podatke smo obdelali s statističnim programom Metastats (White in sod., 2009) in dobili podatke o statističnih razlikah med začetnima oligonukleotidoma v posameznem paru oziroma med paroma začetnih oligonukleotidov v posamezni kombinaciji glede na relativno zastopanost prepoznanih zaporedij v vseh filogenetskih skupinah in posebej v filogenetskih skupinah, kjer so razlike signifikantne (p-vrednost je manjša od 0,05).

	Pari		Pari		Pari		Kombinacije parov
	začetnikov		začetnikov		začetnikov		začetnikov
1	27F_536r	10	63F_1492R	19	515f_1392R	26	27F_1392R + 341f_926R
2	27F_926R	11	341f_536r	20	515f_1492R	27	27F_1392R + 515f_1391R
3	27F_1391R	12	341f_926R	21	FD1_536r	28	27F_1392R + 63F_1492R
4	27F_1392R	13	341f_1391R	22	FD1_926R	29	27F_1392R + FD1_536r
5	27F_1492R	14	341f_1392R	23	FD1_1391R	30	27F_1392R + FD1_926R
6	63F_536r	15	341f_1492R	24	FD1_1392R	31	FD1_536r + 63F_1492R
7	63F_926R	16	515f_536r	25	FD1_1492R	32	FD1_536r + 341f_926R
8	63F_1391R	17	515f_926R			33	FD1_536r + 515f_926
9	63F_1392R	18	515f_1391R			34	FD1_536r + FD1_926R
	•		•	I		35	FD1_926R + 63F_1492R
						36	FD1 926R + 341f 926R

Preglednica 2: Pari začetnih oligonukleotidov in njihove kombinacije za analizo statističnih razlik v relativni zastopanosti prepoznanih zaporedij.

V programu PAST smo izrisali X-Y grafe za kombinacije parov začetnih oligonukleotidov (Preglednica 2, vrstice 26 do 37) na podlagi tistih filogenetskih skupin, kjer so razlike v prepoznavanju zaporedij med pari začetnih oligonukleotidov statistično signifikantne (p < 0,05). Na eno os smo nanesli povprečne vrednosti relativne zastopanosti zaporedij v posameznih filogenetskih skupinah enega para začetnikov, na drugo os pa vrednosti drugega para začetnikov posamezne kombinacije. Dodali smo še standardni odklon in pokazali, kakšne so razlike ob 1 dovoljeni napaki pri parih začetnikov. Enako smo naredili za vse filogenetske skupine za posamezno kombinacijo. Standardnega odklona zaradi preglednosti nismo prikazali na vseh grafih.

FD1 926R + 515f 1391R

37

3.2.3 Skupni dendrogram parov začetnih oligonukleotidov in kombinacij parov

Za pare začetnih oligonukleotidov in kombinacije parov (Preglednica 2) smo z metodo Neighbour-Joining izrisali dendrogram, kjer smo upoštevali samo filogenetske skupine, v katerih se, glede na relativno zastopanost prepoznanih zaporedij, začetni oligonukleotidi oziroma pari začetnih oligonukleotidov medsebojno signifikantno razlikujejo.

3.2.4 Neodvisno prepoznavanje mest naleganja parov začetnih oligonukleotidov na naključnem podvzorcu vseh zaporedij 16S rRNA daljših od 1500 bp

Iz podatkovne baze RDP II smo izvozili celotno bazo v formatu fasta. S programom DNAsort (Stres, 2012) spisanem v programskem jeziku C++ smo iz podatkovne baze izluščili zaporedja daljša od 1400 bp, torej zaporedja, ki predstavljajo praktično celoten gen za 16S rRNA in vsebujejo vsa filogenetsko ohranjena mesta naleganja začetnih oligonukleotidov. Po preverjanju smo se odločili za še ostrejši kriterij in izbrali samo zaporedja daljša od 1500 bp. Vseh zaporedij je bilo 165.411. S programom DNArand (Stres, 2012) smo iz nastale zbirke zaporedij gena za 16S rRNA (polne dolžine) naključno izbrali vzorec 20.000 zaporedij, ki smo ga poimenovali baza R. V bazi R smo nato ločeno preverili prepoznavanje parov začetnih oligonukleotidov (brez kombinacij parov). Za takšno velikost baze R smo se odločili zaradi omejitev pri računskih časih kasnejših filogenetskih analiz, kjer časi naraščajo eksponentno s številom zaporedij in dodatno linearno s številom opravljenih primerjav med nastalimi zbirkami zaporedij. Parov s 1392R, ki dajo praktično identične rezultate kot pari z 1391R, nismo upoštevali. Izločili smo tudi pare z 1492R, ker je število zaporedij v podatkovnih bazah, ki imajo to prepoznavno mesto izredno majhno in nereprezentativno v primerjavi z drugimi prepoznavnimi mesti (Slika 1 in Slika 2). Začetna oligonukleotida 63F in 341f smo uporabili tudi v reverzni obliki (63R in 341R).



Slika 1: Histogram številčne zastopanosti zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP glede na dolžino zaporedja 16S rRNA (*E.coli* J01695) (Cole in sod., 2009).



Slika 2: Številčna porazdelitev zaporedij genov za 16S rRNA po dolžini v bazi SILVA (Pruesse in sod., 2007). Rdeča krivulja prikazuje vsa zaporedja 16S rRNAgenov in njihove dolžine v bazi, črna krivulja pa poravnana in preverjena zaporedja 16S rRNA genov.

Pripravili smo dve datoteki z vsemi prednjimi in zadnjimi začetnimi oligonukleotidi in iz baze z 20.000 zaporedji s programom PrimerCartesian (Stres, 2012), spisanem v Python

programskem jeziku, ustvarili 20 vzorcev zaporedij, kot jih prepoznavajo pari začetnih oligonukleotidov. Sete zaporedij smo uredili in poravnali v programu Mothur (Schloss in sod., 2009). Znotraj programa Mothur smo s funkcijo »clearcut« izrisali filogenetsko drevo. S funkcijo »UniFrac« smo primerjali, ali so razlike med dolžinami vej filogenetskega drevesa posameznih setov zaporedij, nastalih z različnimi začetnimi oligonukleotidi, signifikantne. Pri izračunih smo uporabili neutežno obliko (upošteva samo prisotnost neke filogenetske linije) ter utežno (poleg prisotnosti upošteva tudi številčno zastopanost posamezne filogenetske linije).

3.3 VZORČENJE

Vzorčili smo na dveh lokacijah v osrednji Sloveniji, med seboj oddaljenih približno 20 km zračne razdalje.

Vzorčenje tal za vzorec A je potekalo na Rodici, marca 2011, na njivi s strniščnimi ostanki koruze, pred glavnim vhodom Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete (Slika 3). Na območju 4 x 4 metrov smo naključno izbrali 8 točk, ki so bile med seboj oddaljene 1 meter. Na vsaki od točk smo najprej z lopato odstranili zgornjo plast zemlje s strniščnimi ostanki in večjimi kamni, nato pa vzeli po tri zvrhane lopate zemlje, približno od 1-15 cm globine, in jih prenesli v plastično vrečo.

Vzorec B je predstavljala zemlja iz Ljubljanskega barja (Slika 4). Vzorčili smo jo na isti način, kot vzorec A, in sicer jeseni 2010.

Zemljo obeh vzorcev smo presejali skozi sito premera 4 mm, da smo odstranili preostale večje kamne, listje in korenine. Do nadaljnje uporabe (določanje fizikalno-kemijskih lastnosti) smo jo hranili v plastičnih vrečah pri 4 °C. Za molekularne analize smo v večje število mikrocentrifugirk zatehtali po 0,5 g mokre teže presejane zemlje in jih hranili pri - 20 °C.



Slika 3: Mesto vzorčenja A in njegove zemljepisne koordinate (Google earth, 2012a)



Slika 4: Mesto vzorčenja B in njegove zemljepisne koordinate (Google earth, 2012b)

Po pedološki karti RS izdelani v merilu 1:250.000 (Atlas okolja, 2013) so tla vzorca A na širšem območju raziskovalnega polja tipa evtrična rjava na peščeno-prodnatih sedimentih. Tla vzorca B pa spadajo v tip šotnih tal nizkega barja.

3.4 PRIPRAVA PODVZORCEV Z DODANO BIOMASO

Gojene bakterijske kulture vzorca se lahko razlikujejo od bakterijske združbe istega vzorca, ki jo določimo z molekularnimi tehnikami (Chandler in sod., 1997; Dunbar in sod., 1999). Želeli smo ugotoviti, kako vpliva dodatek 0,5-kratne, 1-kratne in 5-kratne količine gojene bakterijske kulture talnemu vzorcu na rezultate tipizacije mikrobne združbe tega vzorce z metodo T-RFLP.

V 0,5 l tekočega bogatega gojišča NB (Nutrient Broth) smo prenesli vzorec tal (približno 0,5 g). Inkubacija je trajala 4 dni na stresalniku (120 rpm) pri 23 °C na svetlobi. Po inkubaciji smo iz obeh gojenih kultur vzorca tal A in tal B v mikrocentrifugirko odpipetirali po 1,7 ml kulture in centrifugirali 5 minut pri 5000×g. Izrabljeno gojišče smo odlili in centrifugirali še 1 minuto pri 5000×g. S pipeto smo odstranili preostalo izrabljeno gojišče. Za vsak vzorec (tla A in tla B) smo pripravili dve ponovitvi. Oborina je predstavljala biomaso v 1,7 ml gojene kulture. Z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, ZDA) smo izolirali DNA iz oborine, in sicer smo celotno vsebino mikrocentrifugirke Bead Solution Tubes (pufer in kroglice) prenesli v mikrocentrifugirke z oborino, nato pa smo sledili navodilom proizvajalca (Instruction Manual, Alternative Protocol For Maximum Yields; MO BIO, 2009), z izjemo koraka 5 (dodatek 200 µl raztopine IRS), ki smo ga izpustili. Po končani izolaciji smo z aparatom NanoVue 4282 V1.7.3 izmerili koncentracijo izolirane DNA. V obeh vzorcih je bila koncentracija skupne genomske DNA okrog 500 ng ml⁻¹ kulture. Bakken in Olsen (1989) sta ugotovila, da je količina DNA v mikroorganizmih, ki smo jih sposobni gojiti, nefiltrirane talne suspenzije med 2 in 9 fg na celico. Večja količina DNA v celici je predvsem posledica večjega števila genomov, največkrat podvojenih, v celici, ki je v stacionarni fazi (Bakken in Olsen, 1989). Celice naših dveh talnih vzorcev, ki smo jih lahko nagojili, so bile v stacionarni fazi, saj smo jih gojili 4 dni. Da ne bi na račun podvojenih genomov dobili napačnega števila bakterijskih celic v kulturi, smo upoštevali spodnjo oceno, torej da je v celici 2 fg DNA. Glede na ta podatek in na podatek o koncentraciji DNA v 1 ml kulture, smo izračunali, da je pri obeh vzorcih približno 2,5*10⁸ bakterijskih celic ml⁻¹. Pol-kratno, 1-kratno ali 5-kratno biomaso smo dobili tako, da smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 0,5 ml, 1 ml ali 5 ml gojene kulture, ter centrifugirali 5 minut pri 5000×g. Izrabljeno gojišče smo odlili, oborinam pa smo dodali 0,5 g svežih tal. Tako smo dobili talne vzorce z dodano biomaso, ki smo jih do nadaljnje uporabe hranili pri - 20 °C.

V študiji Stres in sod. (2010) so z direktnim štetjem bakterijskih celic, obarvanih z akridin oranžem, s fluorescentnim mikroskopom določili 8,6 (\pm 0,23)*10⁸ bakterijskih celic na gram tal v barjanskih tleh (naš vzorec tal B). Mineralna tla, ki so jih preučevali, naj bi se po številu bakterijskih celic na gram tal (4,9 (\pm 0,31)*10⁸) ujemala s tlemi polja na Rodici, ki predstavljajo naš vzorec A (Stres, 2011). Zato smo sklepali, da ima vzorec tal A približno 5*10⁸ bakterijskih celic na gram tal. Ker smo imeli v mikrocentrifugirah 0,5 g sveže teže talnih vzorcev, smo predpostavili, da je v mikrocentrifugirkah, ki vsebujejo vzorec tal B, približno 4*10⁸ bakterijskih celic, v mikrocentrifugirkah z vzorcem tal A pa ter 2,5*10⁸ bakterijskih celic. Število bakterijskih celic, ki smo jih gojili iz obeh vzorcev tal (2,5*10⁸ ml⁻¹) je enako številu bakterijskih celic v 0,5 g svežih tal vzorca A (2,5*10⁸ g⁻¹). Torej so pol-kratne, 1-kratne in 5-kratne količine gojene biomase, ki smo jih dodali svežim tlem, v drugačnem razmerju z biomaso v svežih tleh vzorca A in vzorca B. Bistvo je, da smo želeli preveriti, ali gojena biomasa prevlada nad originalnim vzorecm, obenem pa smo preverili vpliv razmerja med biomaso tal ter gojeno biomaso na profile T-RFLP mikrobne združbe.

3.5 DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL

Fizikalno-kemijske lastnosti tal smo določili presejanim tlem vzorca A, medtem ko smo fizikalno-kemijske lastnosti vzorca B, povzeli iz študije Stres in sod. (2010).

3.5.1 Merjenje pH

Določali smo aktivno kislost tal. V stekleno čašo smo prenesli 10 g vzorca in dodali 25 ml destilirane vode. To smo premešali in s pH-metrom določili vrednost pH. Merili smo v treh ponovitvah.
3.5.2 Vsebnost vode v tleh

Najprej smo stehtali do konstantne teže posušene tehtiče. Vanje smo dodali 10 g vzorca tal in tehtiče sušili preko noči v pečici pri 105 °C. Po sušenju smo tehtiče spet stehtali. Delali smo v treh ponovitvah.

Od mase tehtiča z 10 g vzorca smo odšteli maso tehtiča z vzorcem po sušenju in tako dobili maso vode v tleh. Od mase tehtiča z vzorcem po sušenju smo odšteli maso tehtiča in dobili maso suhih tal. Masni delež vode v tleh smo izračunali z enačbo:

 $\% w = (m_{voda}/m_{suha \ tla}) \times 100 \qquad \dots (1)$

3.5.3 Sposobnost tal za zadrževanje vode

V odcedni cilinder smo naložili plast papirnate brisače, jo navlažili in vse skupaj stehtali. To je predstavljalo maso vlažnega cilindra. Do 1 cm pod robom cilindra smo dodali tla in stehtali; to je bila masa vlažnega cilindra s svežimi tlemi. Cilinder smo pokrili s folijo in ga postavili v posodo z navadno vodo, napolnjeno do višine zemlje v cilindru in ga v njej pustili preko noči. Po navlaževanju smo cilinder prestavili na odcejanje v posodo. Vsako uro smo ga tehtali, do ustalitve teže. Zadnja meritev je predstavljala maso tal z maksimalno količino zadržane vode. Delali smo v treh ponovitvah.

Iz meritev pri določanju trenutne vsebnosti vode (poglavje 3.5.2) in meritev maksimalne količine zadržane vode smo določili maso svežih tal ($m_{sveža tla}$), maso suhih tal($m_{suha tla}$) in maso celokupne zadržane vode ($m_{zadržana voda}$).

Največjo maso vode, ki jo lahko zadrži gram suhih tal ali sposobnost tal za zadrževanje vode (100 % WHC; *angl.* »water holding capacity«) smo izračunali po enačbi:

$$100 \% WHC = (m_{zadržana voda}/m_{suha tla}) \qquad \dots (2)$$

3.5.4 Tekstura tal

V infuzijsko stekleničko smo zatehtali 10 g talnega vzorca, dodali 50 ml 2 % Na₂CO₃. Stekleničko smo zamašili in inkubirali 12 ur, nato pa stresali 3 ure pri 150 rpm. V 1000 ml

merilni valj smo postavili lijak, na katerem je bilo sito. Vsebino stekleničke smo prenesli na sito in jo spirali z destilirano vodo, dokler niso na situ ostali delci večji od 0,2 mm. Vsebino na situ smo prenesli v prehodno posušen in stehtan tehtič. Suspenziji v valju smo dolili destilirano vodo do 1000 ml. Valj smo zamašili in stresali 3 minute. Po stresanju smo pustili, da se delci posedejo, po 44 sekundah smo iz globine 10 cm odpipetirali 10 ml suspenzije in jo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič – 1. frakcija. Valj smo spet stresali 3 minute in po 4 minutah in 27 sekundah usedanja ponovili postopek vzorčenja – 2. frakcija. Valj smo znova stresali 3 minute, po 7 urah in 35minutah odpipetirali še zadnjo, 3. frakcijo. Tehtiče z delci s sita in tremi frakcijami smo sušili v pečici pri 105 °C, preko noči. Delali smo v dveh ponovitvah. Po sušenju smo jih stehtali in izračunali maso posamezne frakcije v 10 ml vzorca:

$$m_{frakcija} = m_{tehtič + frakcija} - m_{tehtič} \qquad \dots (3)$$

Material na situ predstavlja delce večje od 0,2 mm ali grobi pesek ($m_{grobi pesek}$). Prva frakcija predstavlja delce manjše od 0,05 mm – grobi in fini melj ter glina ($m_{grobi melj}$, $m_{fini melj}$, m_{glina}). Druga frakcija so delci manjši od 0,02 mm – fini melj in glina ($m_{fini melj}$, m_{glina}). Tretja frakcija pa so delci manjši od 0,002 mm – glina (m_{glina}).

Deleže posamezni frakcij smo izračunali po naslednjih enačbah:

% Grobi pesek =
$$(m_{grobi \, pesek} / 10) \times 100$$
 ... (4)

% Glina =
$$((m_{glina} - 0,01) / 0,1) \times 100$$
 ... (5)

% Fini melj = ((
$$m_{fini melj} - m_{glina}$$
) / 0, 1) × 100 ... (6)

% Grobi melj = ((
$$m_{grobi melj}$$
 - $m_{fini melj}$) / 0,1) × 100 ... (7)

$$\% Pesek = \% Grobi pesek + \% Fini pesek \qquad ...(9)$$

$$\% Melj = \% Fini melj + \% Grobi melj \qquad ...(10)$$

Teksturni razred smo določili s pomočjo teksturnega trikotnika (Slika 5).



Slika 5: Teksturni trikotnik ameriške teksturne klasifikacije z razdelitvijo po Plaster-ju, 1992 (Zupan in sod., 1998).

3.5.5 Vsebnost organskega ogljika in organske snovi v tleh

Tehtiče s suhimi tlemi (po sušenju v pečici pri 105 °C preko noči), ki smo jih rabili pri merjenju vlažnosti, smo žarili pri 500 °C preko noči. Tehtiče s tlemi po žarjenju smo stehtali. Delali smo v treh ponovitvah.

Delež organskega ogljika na 1 gram suhih tal smo izračunali:

$$% C_{org} = ((m_{tehtic + suha tla} - m_{tehtic + suha tla po \underline{z}arjenju})/m_{suha tla})*100 \qquad \dots (11)$$

Delež organske snovi v tleh smo izračunali z upoštevanjem predpostavke, da organska snov vsebuje 58 % organskega ogljika (Nelson in Sommers, 1996). Zato smo izmerjeno vrednost organskega ogljika pomnožili s pretvorbenim faktorjem 1.724 (Nelson in Sommers, 1996).

3.6 IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili dva komercialna kompleta, UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, ZDA) in NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Nemčija).

Oba kompleta omogočata izolacijo visoko molekularne genomske DNA mikroorganizmov iz talnih vzorcev in delujeta po podobnem principu: liza celic z mehansko silo (keramične kroglice; horizontalno stresanje) in kombinacija raztopin za lizo, odstranitev ostankov celic, kroglic, zemlje, proteinov, huminskih substanc s precipitacijo in centrifugiranjem, vezava DNA na silika membrano v posebnih kolonah in spiranje DNA, kar odstrani še zadnje nečistoče, na koncu pa sprostitev očiščene DNA iz silika membrane.

Oba kompleta zagotavljata odstranitev huminskih substanc in drugih PCR inhibitorjev. Že majhna količina huminskih substanc namreč lahko inhibira polimerazo DNA pa tudi restrikcijske encime (Macherey-Nagel, 2010). Nemoteno delovanje teh encimov je bistveno za uspešnost naše raziskave, saj temelji na verižni reakciji s polimerazo in nadaljnjih restrikcijskih reakcijah. Komplet UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit se za odstranjevanje huminskih substanc in drugih PCR inhibitorjev iz vzorca zanaša na obarjanje z raztopino IRS in centrifugiranje in tako nabiranje vseh inhibitorjev v peletu, medtem ko komplet NucleoSpin® Soil kit vsebuje še dodatno kolono (NucleoSpin® Inhibitor Removal Column), ki naj bi popolnoma odstranila preostale inhibitorjev s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit ge za vzene na silika membrano, pri kompletu NucleoSpin® Soil kit pa se vezano DNA spira štirikrat.

Razlika med kompletoma je tudi ta, da imamo s kompletom NucleoSpin® Soil kit možnost izbirati med dvema raztopinama za lizo in še dodatnim ojačevalcem, ki poveča izkoristek izolacije DNA. Tako se lahko pogoje lize, s kombiniranjem teh treh raztopin, prilagodi vsakemu vzorcu posebej, saj se tla med seboj razlikujejo po sestavi (organska, anorganska snov, huminske substance, kovine, polisaharidi) in drugih fizikalno-kemijskih parametrih, vse to pa vpliva tudi na učinkovitost izolacije DNA (Macherey-Nagel, 2010). Na primer, kombinacija raztopin za lizo, ki je učinkovita pri izolaciji DNA iz barjanskih tal, lahko ni

uspešna pri izolaciji DNA iz mineralnih tal. V kompletu UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit je na voljo le ena kombinacija raztopin za lizo. Podatki so povzeti po navodilih proizvajalca obeh kompletov (MO BIO, 2009; Macherey-Nagel, 2010).

Preglednica 3 prikazuje ključne podatke o posameznih podvzorcih, kot so kraj vzorčenja, vrsta kompleta, s katerim smo izolirali DNA, število zaporedne ekstrakcije, vrsto podvzorca, dodatek gojene biomase in količina dodane biomase.

Preglednica 3: Oznake in glavne lastnosti posameznih podvzorcev tal pripravljenih za izolacijo DNA. **Kraj** vzorčenja: A – Rodica, B – Ljubljansko Barje; **Vrsta ekstrakcijskega kompleta**: UltraCleanTM – UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit, NucleoSpin® – NucleoSpin® Soil kit. Št. zaporedne izolacije: 1 – prvi ekstrakt, 2 – drugi ekstrakt, 3 – tretji ekstrakt, 4 – četrti ekstrakt, 5 – peti ekstrakt. Tla: 1 – podvzorec vsebuje sveža tla; 0 – podvzorec ne vsebuje svežih tal. **Biomasa**: 0 – podvzorec ni gojena biomasa tal; 0,5 – podvzorcu tal je dodana pol-kratna količina gojene biomase; 1 – podvzorcu tal je dodana 1-kratna količina gojene biomase; 1* - podvzorec je gojena biomasa tal.

Zap.št.	Oznaka podvzorca	Kraj vzorčenja	Vrsta izolacijskega kompleta	Št. zaporedne izolacije	Tla	Biomasa
1	A _{1xe} M	А	UltraClean TM	1	1	0
2	A _{2Xe} M	А	UltraClean TM	2	1	0
3	A _{3xe} M	А	UltraClean TM	3	1	0
4	A _{4xe} M	А	UltraClean TM	4	1	0
5	A _{5xe} M	А	UltraClean TM	5	1	0
6	$A_{0,5g}M$	А	UltraClean TM	1	1	0,5
7	A _{1g} M	А	UltraClean TM	1	1	1
8	A _{5g} M	А	UltraClean TM	1	1	5
9	AgM	А	UltraClean TM	1	0	1*
10	B _{1xe} M	В	UltraClean TM	1	1	0
11	B _{2xe} M	В	UltraClean TM	2	1	0
12	B _{3xe} M	В	UltraClean TM	3	1	0

Se nadaljuje...

Zap.št.	Oznaka podvzorca	Kraj vzorčenja	Vrsta izolacijskega kompleta	Št. zaporedne izolacije	Tla	Biomasa
13	B _{4xe} M	В	UltraClean TM	4	1	0
14	B _{5xe} M	В	UltraClean TM	5	1	0
15	$B_{0,5g}M$	В	UltraClean TM	1	1	0,5
16	B _{1g} M	В	UltraClean TM	1	1	1
17	B _{5g} M	В	UltraClean TM	1	1	5
18	BgM	В	UltraClean TM	1	0	1*
19	A _{1xe} N	А	NucleoSpin®	1	1	0
20	A _{2xe} N	А	NucleoSpin®	2	1	0
21	A _{3xe} N	А	NucleoSpin®	3	1	0
22	A _{4xe} N	А	NucleoSpin®	4	1	0
23	A _{5xe} N	А	NucleoSpin®	5	1	0
24	$A_{0,5g}N$	А	NucleoSpin®	1	1	0,5
25	A _{1g} N	А	NucleoSpin®	1	1	1
26	A _{5g} N	А	NucleoSpin®	1	1	5
27	A _g N	А	NucleoSpin®	1	0	1*
28	B _{1xe} N	В	NucleoSpin®	1	1	0
29	B _{2xe} N	В	NucleoSpin®	2	1	0
30	B _{3xe} N	В	NucleoSpin®	3	1	0
31	B _{4xe} N	В	NucleoSpin®	4	1	0
32	B _{5xe} N	В	NucleoSpin®	5	1	0
33	B _{0,5g} N	В	NucleoSpin®	1	1	0,5
34	B _{1g} N	В	NucleoSpin®	1	1	1
35	B _{5g} N	В	NucleoSpin®	1	1	5
36	B _g N	В	NucleoSpin®	1	0	1*

...nadaljevanje Preglednice 3: Oznake in glavne lastnosti posameznih podvzorcev tal pripravljenih za izolacijo DNA.

3.6.1 UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit

3.6.1.1 Izolacija DNA iz talnih vzorcev z dodano biomaso in vzorcev gojene kulture tal

Pri izolaciji DNA iz vzorcev z dodano biomaso ($A_{0,5gM}$, A_{1gM} , A_{5gM} ; $B_{0,5gM}$, B_{1gM} , B_{5gM}) in vzorcev gojene kulture (A_{gM} ; B_{gM}) smo se držali navodil proizvajalca. V prvem koraku smo celotno vsebino priloženih mikrocentrifugirk s pufrom in kroglicami (Bead Solution Tubes, BST) prenesli v mikrocentrifugirke, ki so vsebovale po 0,5 g vzorca, in nato sledili protokolu do konca.

Delali smo v 3 ponovitvah. Vsako ponovitev smo po končani izolaciji razdelili v dodatni 2 mikrocentrifugirki, tako da smo imeli na koncu eno mikrocentrifugirko z 20 μ l in dve s po 15 μ l eluirane DNA. Do nadaljnje uporabe smo jih hranili pri -20 °C.

3.6.1.2 Večkratna izolacija DNA iz talnih vzorcev

Pri postopku večkratne zaporedne izolacije smo prvo izolacijo DNA iz 0,5 g vzorca izvedli do konca po protokolu proizvajalca. Prvotne mikrocentrifugirke BST z dodanim vzorcem pa nismo zavrgli, ampak smo jo uporabili za nadaljnjo izolacijo. Iz sveže mikrocentrifugirke BST smo odpipetirali ves pufer in ga dodali v prvotno mikrocentrifugirko z vzorcem in kroglicami. Nato smo sledili protokolu od koraka št. 2 do konca. To smo ponovili štirikrat, tako da smo na koncu dobili 5 zaporednih ekstrakcij DNA posameznega vzorca (A_{1xeM}, A_{2xeM}, A_{3xeM}, A_{4xeM}, A_{5xeM}; B_{1xeM}, B_{2xeM}, B_{3xeM}, B_{4xeM}, B_{5xeM}).

Delali smo v 3 ponovitvah. Tudi tu smo vsako ponovitev po končani ekstrakciji alikvotirali v dodatni 2 mikrocentrifugirki in jih do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.6.2 NucleoSpin® Soil kit

Kot že omenjeno, imamo pri tem kompletu na izbiro dva pufra za lizo, SL1 in SL2, ter možnost, da dodamo ojačevalec SX, ki naj bi omogočal največji izkoristek ekstrakcije. Vendar pa ojačevalec SX lahko pri vzorcih z visoko vsebnostjo huminskih kislin povzroči, da se te sprostijo v lizat in tako vplivajo na čistost DNA.

Zato smo najprej naredili poskusno serijo, s katero smo določili katera kombinacija pufrov je najboljša za posamezni vzorec. Za vsak vzorec, tal A in tal B, smo naredili 4 izolacije DNA z različnimi kombinacijami prej omenjenih reagentov (Preglednica 4). Vsako izolacijo smo začeli z 0,5 g posameznega vzorca. Poskusne serije nismo delali v paralelkah.

		Ojačevalec
Izolacija	Pufer	SX
1	SL1	Ne
2	SL1	Da
3	SL2	Ne
4	SL2	Da

Preglednica 4: Možne kombinacije pufrov za lizo SL1 in SL2 ter ojačevalca SX pri izolaciji DNA s kompletom NucleoSpin® Soil kit.

Na Sliki 6 in Sliki 7 so rezultati gelske elektroforeze, v Preglednici 5 in Preglednici 6 pa so zbrani rezultati merjenja koncentracije DNA s spektrofotometrom NanoVue 4282 V1.7.3.

-		SL2
=		
	/ SX	/ sx

Slika 6: Izolirana genomska DNA iz vzorca tal A s kompletom NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo.

Preglednica 5: Koncentracija genomske DNA iz vzorca tal A izolirane s kompletom NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo.

	Pufer	Dodatek SX	Koncentracija DNA [ng/µl]
1	SL1	Ne	$9,7 \pm 2,9$
2	SL1	Da	$161,3 \pm 3,2$
3	SL2	Ne	$18,1 \pm 3,8$
4	SL2	Da	$195,5 \pm 1,8$



Slika 7: Izolirana genomska DNA iz vzorca tal B s kompletom NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo.

Preglednica 6: Koncentracija genomske DNA iz vzorca tal B izolirane s kompletom NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za lizo.

	Pufer	Dodatek SX	Koncentracija DNA [ng/µl]
1	SL1	Ne	$228,3 \pm 2,5$
2	SL1	Da	$247,8 \pm 2,0$
3	SL2	Ne	$186,9 \pm 3,4$
4	SL2	Da	$253,1 \pm 2,1$

Slika 8 prikazuje spreminjanje koncentracije DNA glede na kombinacijo pufrov za lizo.



Slika 8: Spreminjanje koncentracije DNA po izolaciji s kompletom NucleoSpin® Soil kit z različnimi kombinacijami pufrov za oba vzorca tal.

Koncentracija DNA vzorca tal B se ni bistveno spreminjala, ne glede na kombinacijo pufrov. Na koncentracijo DNA vzorca tal A pa je izbor kombinacije pufrov opazno vplival. Koncentracija DNA pri kombinacijah z ojačevalcem SX je verjetno visoka zaradi prisotnosti huminskih kislin, ki naj bi jih ta ojačevalec pomagal sprostiti. Zato teh dveh opcij nismo upoštevali. Ker je pri ostalih dveh opcijah (SL1 ali SL2) koncentracija DNA vzorca tal B približno enaka, pri vzorcu tal A pa se vrednosti koncentracije med seboj razlikujeta, saj je koncentracija DNA, ki smo jo dobili po izolaciji s pufrom SL2 skoraj dvakrat večja od koncentracije, ki smo jo dobili po izolaciji s pufrom SL1 (Preglednica 5), smo se odločili, da bomo za nadaljno izolacijo DNA iz obeh talnih vzorcev delali s pufrom SL2.

3.6.2.1 Izolacija DNA iz talnih vzorcev z dodano biomaso in vzorcev gojene kulture tal Za izolacijo DNA iz vzorcev z dodano biomaso ($A_{0,5gN}$, A_{1gN} , A_{5gN} ; $B_{0,5gN}$, B_{1gN} , B_{5gN}) in vzorcev gojene kulture (A_{gN} , B_{gN}) smo se držali protokola proizvajalca, z izjemo točke 2 – dodatek ojačevalca SX, ki smo jo preskočili. Kroglice iz originalne mikrocentrifugirke (NucleoSpin Bead Tube) smo prenesli v mikrocentrifugirke z vzorcem. DNA smo eluirali s 50 μ l elucijskega pufra (Buffer SE), da se je končni volumen eluirane DNA ujemal s končnim volumnom DNA pridobljene s kitom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit, kjer je po navodilih proizvajalca določeno, da se DNA eluira s 50 μ l elucijskega pufra.

Vsako izolacijo smo naredili v 2 ponovitvah. Vsako ponovitev smo po končani izolaciji razdelili v 2 dodatni mikrocentrifugirki in ju do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

Začetna količina vsakega vzorca je bila 0,5 g.

3.6.2.2 Večkratna izolacija DNA iz talnih vzorcev

Pri večkratni zaporedni izolaciji DNA smo sledili navodilom proizvajalca do vključno prvega centrifugiranja v koraku 4. Tu smo supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko in s supernatantom nadaljevali po protokolu do konca. Prvotne mikrocentrifugirke (NucleoSpin Bead Tube) z vzorcem tal nismo zavrgli, ampak smo jo uporabili za nadaljne ekstrakcije. Še štirikrat smo s prvotno mikrocentrifugirko ponovili postopek od koraka 1 do prvega centrifugiranja v koraku 4 in vsakič supernatant prenesli v svežo mikrocentifugirko in nato nadaljevali do konca. V koraku 10 smo DNA eluirali s 50 μ l elucijskega pufra. Tako smo na koncu dobili pet zaporednih ekstrakcij DNA istega vzorca tal (A_{1xeN}, A_{2xeN}, A_{3xeN}, A_{4xeN}, A_{5xeN}; B_{1xeN}, B_{2xeN}, B_{3xeN}, B_{4xeN}, B_{5xeN}).

Vsako izolacijo smo naredili v 2 ponovitvah. Vsako ponovitev smo po končani izolaciji razdelili v 2 dodatni mikrocentrifugirki in jo do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

Začetna količina vsakega vzorca je bila 0,5 g.

3.7 GELSKA ELEKTROFOREZA

Uspešnost izolacije DNA smo preverili z elektroforezo na 1 % agaroznem gelu. V žepke gela smo vnašali 5 μ l posameznega vzorca, ki smo ga pred tem na parafilmu zmešali s 3 μ l nanašalnega pufra. Za standard smo uporabili 1 kb DNA lestvico (GeneRulerlTM 1 kb DNA

ladder 0,5 μ g/ μ l, 50 μ g, Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA) v koncentraciji 0,1 μ g/ μ l.

Elektroforeza je tekla 25 minut pri 100 V in 400 mA.

Po elektroforezi smo gel 10 minut barvali v banjici z vodno raztopino etidijevega bromida in ga nato spirali 10 minut z destilirano vodo. Gel smo v aparatu GEL-Doc 1000 (BIO-RAD, ZDA) osvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali ter sliko analizirali s programom Molecular Analyst Software (BIO-RAD; ZDA).

3.8 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Pomnoževali smo bakterijski gen za 16S rRNA. Uporabili smo začetna oligonukleotida FD1 označenega s flourokromom 6-FAM (6-karboksifluorescin) in 926R.

Preglednica 7: Začetna oligonukleotida in njuni zaporedji.

Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5' -> 3'	Vir
FD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Edwards in sod., 1989
926R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Lane in sod., 1985

Ena reakcijska mešanica je v končnem volumnu 25 μ l vsebovala naslednje reagente v končnih koncentracijah:

- 1x pufer za polimerazo *Taq* buffer + KCl MgCl₂
- 2,5 mM MgCl₂
- 0,20 mg/ml BSA
- 20 μM dNTP
- 200 nM FD1-FAM
- 200 nM 926R
- 1 U *Taq* DNA polimeraze

- $1 \mu l$ matrične DNA
- Sigma H₂O dodana do končnega volumna 25 μ l

Za pomnoževanje gena za 16S rRNA smo uporabljali aparat za verižno reakcijo s polimerazo MyCycler® thermal cycler (BIO RAD, ZDA) in program, ki je zapisan v Preglednici 8.

Preglednica 8: Program verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje 16S rRNA gena.

Korak	temperatura [°C]	trajanje	št. ciklov
začetna denaturacija	95	3 min	1
denaturacija	95	45 s	
prileganje začetnih oligonukleotidov	54	45 s	25
podaljševanje	72	1,20 min	
končno podaljševanje	72	10 min	1
hlajenje	4	∞	1

Uspešnost pomnoževanja smo preverili na 1 % agaroznem gelu.

3.9 ČIŠČENJE PRODUKTA PCR

Produkt PCR smo očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija). Najprej smo v eno mikrocentrifugirko združili skupaj vse ponovitve (2 ali 3) produkta PCR istega podvzorca in dodali Sigma H₂O do skupnega volumna 100 μ l, nato pa sledili priloženim navodilom proizvajalca (Roche Diagnostics GmbH; 2008). V koraku 2 smo centrifugirali 60 sekund. V koraku 7 smo uporabili 50 μ l elucijskega pufra.

3.10 T-RFLP

Za vsak vzorec smo pripravili dve restrikcijski reakciji z različnima encimoma, *HhaI* in *MspI*. Za eno restrikcijsko mešanico, v končnem volumnu 30 μ l, smo v naslednjem vrstnem redu v mikrocentrifugirko dodali:

- 5,5 μl Sigma H₂O
- 3μ l pufra Tango 10x
- 1,5 µl encima (*HhaI/MspI*)
- 20 µl očiščenega produkta PCR

To smo premešali in inkubirali 16 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo restrikcijske mešanice z encimom *MspI* inaktivirali z 20-minutno inkubacijo pri 80 °C. Po inaktivaciji smo mešanice očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit. Restrikcijskih mešanic z encimom *HhaI* nismo inaktivirali, ampak smo jih direktno očistili s kompletom.

Razrezanim in očiščenim produktom PCR smo dodali 0,4 μ l standarda GeneScanTM-500 ROXTM SIZE STANDARD (Applied Biosystems, ZDA) in 7 μ l deioniziranega formamida. Pred injiciranjem v kapilarno elektroforezo ABI 3130*xl* Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA) smo mešanico 2 minuti denaturirali pri 95 °C in nato ohladili na ledu. Injekcija v kapilare je trajala 27 sekund pri napetosti 1,8 kV.

Dobljene podatke smo analizirali s programom BioNumerics 5.1 (Applied Maths, ZDA). Za primerjavo podobnosti med profili T-RFLP smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije. Dendrograme smo izrisali z metodo aritmetičnega povprečja neutežnih parov (*angl.* »Unweighted pair group method with arithmetic mean« ali UPGMA).

4 **REZULTATI**

4.1 ANALIZA VPLIVA IZBIRE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Razlike v deležih prepoznavanja zaporedij 16S rRNA med začetnimi oligonukleotidi so bile velike (Preglednica 9). Delež pri začetnikih, ki nalegajo na sredini zaporedja gena za 16S rRNA (npr. 341f), je bil precej večji od deleža tistih, ki nalegajo na začetku (npr. FD1) ali na koncu gena (npr. 1492R). S povečanjem števila dovoljenih napak pri naleganju se je delež prepoznavanja posameznega začetnega oligonukleotida povečal. Pri parih začetnih oligonukleotidov so bili deleži prepoznavanja, v primerjavi s posameznimi začetnimi oligonukleotidi, v povprečju manjši. Par, kjer oba začetna oligonukleotida nalegata na sredini gena (npr. 341f_926R), je imel večji delež prepoznavanja zaporedij, kot tisti pari, kjer eden od začetnih oligonukleotidov nalega na začetku, drugi pa na koncu, ali začetku in sredini oziroma na sredini in koncu gena. Tudi pri parih je bil delež prepoznavanja ob 1 dovoljeni napaki večji od deleža brez dovoljenih napak.

Preglednica 9: Deleži prepoznavanja zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP II (glede na vsa deponirana zaporedja 16S rRNA v bazi RDP II) z 0 in 1 dovoljeno napako pri naleganju za izbrane prednje in zadnje začetne oligonukleotide in njihove pare.

	Ime začetnega oligonukleotida ali para	Delež prepoznavanja pri 0 dovoljenih napakah (%)	Delež prepoznavanja pri 1 dovoljeni napaki (%)
	FD1	9,60	14,80
Prednji začetni	63F	5,60	16,40
oligonukleotidi	341f	78,30	83,00
	515f	74,10	79,20
	27F	12,20	16,00
	926R	51,40	65,10
Zadnji začetni	536r	68,80	78,50
oligonukleotidi	1492R	10,70	11,60
	1391R	27,90	31,10
	1392R	28,40	31,40
	27F_1392R	6,10	9,10
	63F_1492R	1,20	3,00
Pari začetnih	341f_926R	41,50	54,10
oligonukleotidov	515f_1391R	22,80	26,30
	FD1_536r	7,70	13,10
	FD1_926R	5,70	10,20

4.1.1 Specifičnost naleganja začetnih oligonukleotidov

Združbe, ki so jih prikazali posamezni začetni oligonukleotidi ali njihovi pari, so se med seboj razlikovale. Združbe so se razlikovale tudi s spreminjanjem števila dovoljenih napak pri večini začetnih oligonukleotidov in parov. Variabilnost začetnega oligonukleotida 63F in para 63F_1492R (Slika 9, označeno s puščicama) je bila po spreminjanju števila dovoljenih napačno prepoznanih mest velika, opazna pa je bila tudi pri začetnem oligonukleotidu 926R in parih FD1_926R, FD1_536r in 341f_926R. Najbolj konstanto stanje združbe glede na spreminjanje dovoljenih neujemanj je podal začetni oligonukleotid 1492R (Slika 9). Torej imajo razlike v specifičnosti naleganja (število dovoljenih napak) pri posameznih začetnih oligonukleotidov različno velike učinke na prikaz strukture modelne združbe.



Slika 9: Ordinacija nm-MDS vseh začetnih oligonukleotidov in parov z 0, 1, 2 in 3 dovoljenimi napakami.
Barva – 63F_1492R. Barva – 63F. Barva – 1492R. Barva – 1391R. Barva – 1392R. Barva – 515F_1391R. Barva – 27F. Barva – 27F_1392R. Barva – FD1. Barva – FD1_536r. Barva – FD1_926R.
Barva – 515F. Barva – 926R. Barva – 536r. Barva – 341f. Barva – 341f_926R. Pika – kontrola, združba baze RDP. — Puščici označujeta veliko variabilnost začetnega oligonukleotida 63F in para 63F_1492R.

Z ordinacijsko analizo smo razločili tri skupine začetnih oligonukleotidov (Slika 10): (i) okoli kontrole; (ii) okoli začetnih oligonukleotidov FD1 in 27F; (iii) okoli začetnih

oligonukleotidov 1392R, 1391R in 1492R. Mikrobno združbo, ki je bolj podobna kontroli, to je združbi baze RDP II (rdeča pika spodaj desno na Sliki 10), so prikazali začetni oligonukleotidi 515f, 536r, 341f, 926R in par 341f_926R, to so ti, ki nalegajo na sredini zaporedja gena za 16S rRNA. Torej so se začetni oligonukleotidi in z njimi pridobljene mikrobne združbe na ordinacijskem diagramu ločili glede na mesto naleganja začetnega oligonukleotida.



Slika 10: Ordinacija nm-MDS začetnih oligonukleotidov in parov z 0, 1, 2 in 3 dovoljenimi napakami brez začetnega oligonukleotida 63F in para 63F_1492R. Označene so tri značilne skupine. Za razlago barv glej opis pri Sliki 9.

4.1.2 Razlike v zaznavanju med pari začetnih oligonukleotidov

Z grafi X-Y smo prikazali razlike v zastopanosti prepoznanih zaporedij v posameznih filogenetskih skupinah med dvema paroma začetnih oligonukleotidov pri zaznavanju zaporedij v podatkovni bazi. Grafi X-Y filogenetskih skupin, kjer so razlike v prepoznavanju med pari začetnih oligonukleotidov signifikantne, so pokazali, da obstajajo trije tipi povezav med pari (Slika 11): (i) razpršenost točk po celotnem grafu; (ii) konstantnost; (iii) premo sorazmerje.

Razpršenost točk po celotnem grafu je pokazala, da med paroma začetnih oligonukleotidov izbrane kombinacije obstaja velika razlika v številu zaporedij, ki jih para prepoznata v posamezni filogenetski skupini. To je veljalo na primer za para v kombinaciji FD1_536r + 515f_1391R (Slika 11.1). Povezavo parov v kombinaciji 27F_1392R + 63F_1492R (Slika 11.2) smo opisali kot konstantno, kar pomeni, da so bile vrednosti relativnih zastopanosti zaporedij vseh signifikantnih filogenetskih skupin enega para skoraj vedno blizu nič, medtem ko so se pri drugemu paru te vrednosti spreminjajale. Obstajajo tudi kombinacije parov, npr. 27F_1392R + FD1_926R, katerih točke so na grafu opisale skoraj pravilno premico y=x, se pravi, da sta para kombinacije prepoznala približno enako število zaporedij v enakih filogenetskih skupinah (Slika 11.3).



Slika 11: Primeri X-Y grafov povprečnih vrednosti relativne zastopanosti zaporedij v filogenetskih skupinah, kjer so statistične razlike signifikantne za kombinacije parov začetnih oligonukleotidov. 1 – FD1_536r + 515f_1391R. 2 – 27F_1392R + 63F_1492R. 3 –27F_1392R + FD1_926R.

Rezultati so pokazali še, da se je tip povezave med relativno zastopanostjo zaporedij v signifikantnih filogenetskih skupinah med paroma začetnih oligonukleotidov izbrane kombinacije, pojavil tudi, ko smo primerjali relativno zastopanost zaporedij v vseh filogenetskih skupinah. Če so bile točke razpršene na grafu vseh filogenetskih skupin, so bile razpršene tudi na grafu signifikantnih filogenetskih skupin. Če pa so točke vsaj približno oblikovale premico na grafu vseh skupin, je bila premica tudi na grafu signifikantnih skupin. To, da so se točke, ki predstavljajo relativno zastopanost zaporedij posamezne filogenetske skupine, združile v premico na grafu, čeprav so kvantitativne razlike v prepoznavanju med paroma izbrane kombinacije signifikatne, kaže, da sta para začetnih oligonukleotidov vsaj v teoriji primerljiva.

Z grafi X-Y smo dobili predstavo o tem, ali para začetnih oligonukleotidov prepoznata približno enak delež zaporedij v istih filogenetskih skupinah (tvorita premico), nismo pa dobili podatka, ali prepoznavata tudi ista zaporedja, ki se uvrščajo v posamezno filogenetsko enoto.

4.1.3 Skupni dendrogram parov začetnih oligonukleotidov in kombinacij parov



Slika 12: Dendrogram NJ odnosov med pari začetnih oligonukleotidov in kombinacijami parov glede na filogenetske skupine, kjer je relativna zastopanost prepoznanih zaporedij signifikantno različna med začetnima oligonukleotidoma v paru, oziroma med paroma začetnih oligonukleotidov v kombinaciji. » _«: ločuje začetna oligonukleotida v paru (npr: 341f_1391R). »I«: ločuje para začetnih oligonukleotidov v kombinaciji (npr: 27F_1392RI63F_1492R).

Dendrogram NJ (Slika 12) prikazuje, kateri pari začetnih oligonukleotidov in kombinacije parov so pri prepoznavanju zaporedij rezultirali v enakih razlikah med sabo, oziroma so podali enako izkrivljeno sliko, torej so ekvivalentni med sabo in jih lahko zamenjujemo. Izkazalo se je, da ima vsak par ali kombinacija parov svoj vzorec filogenetskih skupin, v katerih so razlike v prepoznavanju zaporedij med začetnima oligonukleotidoma, ki sestavljata par, oziroma med paroma, ki sestavljata kombinacijo, signifikantne. Tako ne obstajata niti dva para ali dve kombinaciji, ki bi imeli enak vzorec signifikantnih filogenetskih skupin, kvečjemu so si vzorci le zelo podobni, torej so na isti veji, na primer para 341f_1391R in 341f_1392R. Isti prednji začetni oligonukleotidi, ki so v paru z 1391R ali 1392R, imajo podoben vzorec. To je seveda zato, ker je edina razlika med 1391R in 1392R v dolžini zaporedja (1392R je za dva nukleotida krajši), torej prepoznavata v veliki meri enaka zaporedja. Enako velja, da imajo pari FD1 in 27F z enakim zadnjim začetnim

oligonukleotidom (536r, 1492R in 926R) podobne vzorce signifikantnih filogenetskih skupin. Zaporedji FD1 in 27F se razlikujeta le v tem, da vsebuje 27F degeneriran nukleotid M, torej da prepoznava zaporedja, ki imajo na tem mestu nukleotid C ali A, zato je število prepoznanih zaporedij lahko večje. Pari začetnih oligonukleotidov, ki vsebujejo 63F, tvorijo očitno gručo, kjer so tudi vse kombinacije parov, ki vsebujejo par 63F_1492R. Že v ordinaciji nm-MDS (Slika 9) smo pokazali, da sta začetni oligonukleotid 63F in par 63F_1492R najbolj oddaljena od vseh ostalih glede na strukturo mikrobne združbe, ki jo prikažeta, očitno pa so te razlike tako velike, da prevladajo, ne glede na to s katerim začetnim oligonukleotidom ali parom ju združimo. Pri drugih parih in kombinacijah takega grupiranja nismo opazili. Uporaba različnih kombinacij prednjih in zadnjih začetnih oligonukleotidov torej vpliva na prepoznavanje zaporedij v filogenetskih skupinah.

4.1.4 Filogenetsko testiranje sestave mikrobnih združb, vzorčenimi z različnimi pari začetnih oligonukleotidov

Dendrogram spodaj (Slika 13) prikazuje signal prisotnosti-odsotnosti posameznih filogenetskih skupin v prepoznanih zaporedjih z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Signal prisotnosti filogenetske skupine pomeni, da je par prepoznal vsaj eno zaporedje v tej filogenetski skupin, signal neprisotnosti pa pomeni, da ni prepoznal nobenega zaporedja v filogenetski skupini. Vidimo, da je večina parov začetnih oligonukleotidov prepoznala zaporedja filogenetskih skupin, ki so prisotna v osnovni podatkovni bazi (R) ter da razlike na tem nivoju niso signifikantne. Izjema so nabori zaporedji, ki smo jih pridobili s pari, v katerih nastopa 63f ali njegova reverzna oblika, 63r, ki so bili vsi signifikantno različni od ostalih (p<0,05).



Slika 13: Neutežni dendrogram izbranih parov začetnih oligonukleotidov. Rdeče veje prikazujejo pare začetnih oligonukleotidov, ki se glede na prisotnost ali odsotnost filogenetskih skupin, signifikantno razlikujejo od osnovne baze zaporedij (R). V imenih reverznih začetnih oligonukleotidov je dodana oznaka 00.



Slika 14: Utežni dendrogram izbranih parov začetnih oligonukleotidov. Rdeče veje prikazujejo pare začetnih oligonukleotidov, ki se glede na frekvenco zaznavanja zaporedij v filogenetskih skupinah,signifikantno razlikujejo od osnovne baze zaporedij (R). V imenih reverznih začetnih oligonukleotidov je dodana oznaka 00.

Ob upoštevanju številčnosti prepoznanih zaporedij se je izkazalo, da so se praktično vsi nabori zaporedij, ki smo jih pridobili s pari začetnih oligonukleotidov, signifikantno razlikovali od izvorne baze naključnih 20.000 zaporedij (R) (Slika 14). Osnovni podatkovni bazi R so bili najbolj podobni podvzorci tistih parov, ki vsebujejo 1391R, 341f in 515f, naslednji pa tisti, ki vsebujejo 926R in FD1. Ti rezultati se ne ujemajo popolnoma z rezultati direktnega testiranja v RDP II, saj sta tukaj vključena tudi dva robna oligonukleotida (FD1 in 1391R).

4.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL

V Preglednici 10 so zbrani rezultati meritev fizikalno-kemijskih lastnosti za vzorca tal A in tal B.

Preglednica 10: Fizikalno-kemijske lastnosti vzorcev tal A in tal B.

Fizikalno-kemijska lastnost	Tla A	Tla B (Stres in sod., 2010)
рН	$8,16 \pm 0,03$	$7,3 \pm 0,16$
Vlažnost [g H ₂ O/g suha tla]	$0,25 \pm 0,012$	$0,\!45 \pm 0,\!09$
% Organskega ogljika	$7,0 \pm 0,3$	$15,0 \pm 1,8$
% Organske snovi	$12,0 \pm 0,6$	25,9*
100% WHC [g H ₂ O/g suha tla]	$0,736 \pm 0,017$	$1,67 \pm 0,24$
Teksturni razred		
% Gline	$8,00 \pm 0,00$	55,6 ± 9,15
% Melja	53,00 ± 2,83	31,6 ± 2,11
% Peska	$39,00 \pm 2,83$	$12,8 \pm 3,19$

*Vrednost smo dobili z množenjem deleža organskega ogljika in pretvorbenega faktorja 1,724 (Nelson in Sommers, 1996).

Določali smo aktivno kislost, ki je dejanska kislost talne suspenzije vzorca, brez H⁺ in Al³⁺ ionov, vezanih na talne koloide (Stres, 2007). Povprečna vrednost pH vzorca tal A je bila $8,16 \pm 0,03$, vzorca tal B pa $7,3 \pm 0,16$. Tla vzorca A so torej bolj bazična, kot tla vzorca B, ki imajo skoraj nevtralen pH.

Tla vzorca B so vsebovala več vode (45 %) na gram suhih tal, kot tla vzorca A (25 %). En gram suhih tal vzorca A je zadržal največ $0,74 \pm 0,02$ g vode, en gram suhih tal vzorca B pa $1,67 \pm 0,24$ g vode. Tla vzorca B so lahko zadržala več kot dvakrat (2,3-krat) toliko vode, kot tla vzorca A.

Tla vzorca A je sestavljalo 8 % gline, 39 % peska in 53 % melja, kar jih je uvrstilo v teksturni razred meljasta ilovica. Tla vzorca B spadajo v teksturni razred glina, saj so imela 56 % gline, 31 % melja ter 13 % peska.

V gramu suhih tal vzorca A je bilo 12,1 % organske snovi, od tega je 7 % predstavljal organski ogljik. Delež organske snovi v suhih tleh vzorca B je znašal 25,9 %, delež

organskega ogljika pa 15 %. Vzorec tal B je vseboval 2,2-krat toliko organske snovi in organskega ogljika, kot vzorec tal A.

4.3 ANALIZA MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO T-RFLP

Dva vzorca tal, z različnimi fizikalno-kemijskimi parametri, smo glede na izolacijo DNA, razdelili skupaj na 36 podvzorcev, vsakega na 18 podvzorcev: pet zaporednih izolacij skupne genomske DNA tal, izolacijo skupne genomske DNA iz gojene kulture tal ter izolacijo skupne genomske DNA iz tal z dodano pol-kratno, 1-kratno in 5-kratno količino gojene kulture istih tal, smo izvedli z dvema različnima izolacijskima kompletoma.

Izolirano skupno genomsko DNA vsakega od podvzorcev smo ločeno rezali z dvema encimoma, *HhaI* in *MspI*. Restrikcijske produkte smo injicirali v kapilarno elektroforezo in na koncu dobili 72 profilov T-RFLP mikrobnih združb podvzorcev, 36 za vsak encim, ki smo jih analizirali s programom BioNumerics 5.1 (Applied Maths, ZDA). Izrisali smo različne skupne povprečne dendrograme podobnosti profilov T-RFLP ali povprečne razporeditve profilov podvzorcev, glede na informacije iz obeh rezanj (z encimom *HhaI* ter *MspI*) skupaj.

Naredili smo primerjavo profilov T-RFLP bakterijske 16S rDNA podvzorcev izoliranih s kompletom NucleoSpin® Soil kit (Slika 15) in podvzorcev izoliranih s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit (Slika 16). V obeh primerih so se profili ločili v dve gruči, ki sta bili med sabo zelo različni (manj kot 20 % podobnosti). V eni gruči so bili profili podvzorcev iz obeh okolij z dodano biomaso in podvzorca iz obeh okolij samo gojene biomase, v drugi gruči pa so bili profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij iz obeh okolij.



Slika 15: Primerjava T-RFLP profilov bakterijske 16S rDNA 18 podvzorcev izolirane s kompletom NucleoSpin® Soil kit. Veliki črki A in B v oznakah podvzorcev označujeta kraj vzorčenja vzorca, pod-pisan tekst predstavlja število zaporedne izolacije oziroma količino dodane biomase, velika črka N predstavlja vrsto kompleta za izolacijo DNA. Za podrobnejšo razlago oznak podvzorcev glej Preglednico 3. Številke na vozliščih prikazujejo stopnjo podobnosti.

Profili T-RFLP podvzorcev z dodano biomaso in podvzorca gojene biomase, izoliranih s kompletom NucleoSpin® Soil kit iz okolja A ter profili T-RFLP podvzorcev z dodano biomaso in podvzorca gojene biomase izolirani z istim kompletom iz okolja B so si bili precej podobni (83 %). Profili podvzorcev z dodano biomaso iz okolja A so se za malenkost razlikovali od profila podvzorca gojene biomase iz okolja A, vseeno so ti profili med sabo skoraj identični (92 %). Enako velja za profile podvzorcev iz okolja B. Profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij iz okolja A in profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij iz okolja B se med sabo razlikujejo (28 %). Profili podvzorcev

zaporednih izolacij iz okolja A se med sabo razlikujejo za 5-12 %. Profili podvzorcev zaporednih izolacij iz okolja B pa se razlikujejo za 13-22 %.



Slika 16: Primerjava T-RFLP profilov bakterijske 16S rDNA 18 podvzorcev, izolirane s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit. Veliki črki A in B v oznakah podvzorcev označujeta kraj vzorčenja vzorca, pod-pisan tekst predstavlja število zaporedne izolacije oziroma količino dodane biomase, velika črka M predstavlja vrsto kompleta za izolacijo DNA. Za podrobnejšo razlago oznak podvzorcev glej Preglednico 3. Številke na vozliščih predstavljajo stopnjo podobnosti.

Profili podvzorcev izolirani s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit so si med seboj bolj različni. Profili podvzorcev z dodano biomaso in podvzorcev gojene biomase iz obeh okolij sicer tvorijo svojo gručo, vendar pa so si profili med sabo bistveno manj podobni kot profili podvzorcev izoliranih z drugim kompletom. Profil podvzorce gojene biomase tal A (A_{gM}) se od ostalih v tej gruči zelo razlikuje (43 %). Profili podvzorcev z dodano biomaso tal A so si med sabo manj podobni v primerjavi z enakimi podvzorci

izoliranimi z drugim kompletom. Prav tako je bila podobnost med profili podvzorcev z dodano biomaso iz okolja A in profili podvzorcev z dodano biomaso in podvzorca gojene biomase iz okolja B manjša (74 %). V drugi gruči se je profil podvzorca A_{1xeM} zelo razlikoval od ostalih profilov v tej gruči in je za več kot 30 % različen od profilov podvzorcev nadaljnjih štirih zaporednih izolacij iz okolja A, medtem ko so si bili ti štirje med sabo zelo podobni (93 %). Profila podvzorcev prve in druge zaporedne izolacije iz okolja B (B_{1xeM} , B_{2xeM}) sta bila v več kot 20 % različna od profilov podvzorcev ostalih treh zaporednih izolacij iz okolja B, ki pa so bili med sabo praktično identični (97 %).

Slika 17 prikazuje skupni povprečni dendrogram restrikcijskih profilov mikrobnih združb vseh 36 podvzorcev tal A in tal B, kjer smo združili dendrograma profilov T-RFLP bakterijske 16S rDNA izolirane z različnima izolacijskima kompletoma. Ločitev na dve glavni gruči se je ohranila. Prvo gručo sestavljajo profili podvzorcev obeh tal z dodano biomaso ter podvzorca gojene kulture obeh tal, drugo gručo pa profili podvzorcev večkratnih zaporednih ekstrakcij obeh tal. To kaže, da ima okolje manjši vpliv na mikrobne združbe, kot gojenje.

Znotraj prve gruče se sicer profili podvzorcev iz okolja A in B ločijo na dve podgruči, vendar so si vseeno precej podobni (81,7 %). Izjema sta profila $A_{0,5gM}$ in A_{gM} , ki sta od ostalih v tej gruči bistveno drugačna (stopnja podobnosti je 63 %), pa tudi med sabo sta si precej različna – stopnja podobnosti le 68 %. Profili podvzorcev iz tal B v prvi gruči, so ne glede na izolacijski komplet, med sabo praktično identični, najnižja stopnja podobnosti med njimi je 88,9 %. Enako velja za profile iz okolja A, z izjemo prej omenjenih dveh.

Druga gruča se razdeli na štiri dele, kjer se profil podvzorca A_{1xeM} razlikuje od ostalih treh podgruč za 35 %. Profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij iz okolja B so se razdelil na dve podgruči, glede na izolacijski komplet, ki se med sabo razlikujeta v 30 %. Od teh je gruča profilov podvzorcev izoliranih s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit bolj podobna profilom podvzorcev večkratne zaporedne izolacije vzorca tal A, ki smo jih izolirali z obema izolacijskima kompletoma (80 %). Profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij tal A so med seboj zelo podobni in pomešani, ne glede na izolacijski komplet. Izjema je A_{1xeM} .



Slika 17: Skupni povprečni dendrogram restrikcijskih profilov mikrobnih združb vseh 36 podvzorcev tal A in tal B. Legenda je na str. 56.

Legenda: \bigcirc – podvzorci tal A z dodano biomaso in gojena kultura tal A, pridobljeni z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \bigcirc – podvzorci tal A z dodano gojeno biomaso in gojena kultura tal A, pridobljeni z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \square – podvzorci tal B z dodano gojeno biomaso in gojena kultura tal B, pridobljeni z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \square – podvzorci tal B z dodano gojeno biomaso in gojena kultura tal B, pridobljeni z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \bigcirc – podvzorci tal B, pridobljeni z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \bigcirc – podvzorci tal A, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \bigcirc – podvzorci tal A, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \bigcirc – podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom NucleoSpin® Soil kit; \triangle - podvzorci tal B, pridobljeni z večkratno zaporedno izolacijo z izolacijskim kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit. Za podrobnejšo razlago oznak podvzorcev glej Preglednico 3. Spodnja skala prikazuje stopnjo razlikovanja.

Razlog, da profili podvzorcev A_{1xeM} , $A_{0,5gM}$ in A_{gM} odstopajo od drugih, je skoraj gotovo izolacijski komplet, ki je pri teh isti (UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit). Profili enakih podvzorcev, katerih DNA smo izolirali z drugim kompletom ne kažejo takih odstopanj. Profil podvzorca A_{1xeM} se od profilov podvzorcev nadaljnih zaporednih izolacij iz okolja A razlikuje za več kot 30 % (Slika 16), profil A_{1xeN} pa le za največ 12 % (Slika 15). Profila podvzorcev $A_{0,5gN}$ in A_{gN} sta skoraj identična ostalim podvzorcem z dodano biomaso iz okolja A. Če bi bilo za odstopanje krivo kaj drugega, bi se to odražalo tudi na dendrogramu profilov T-RFLP 16S rDNA bakterijske združbe podvzorcev izoliranih z NucleoSpin® Soil kit (Slika 15).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Analiza začetnih oligonukleotidov

Na osnovi baze zaporedij genov za 16S rRNA RDP II smo z računalniško analizo raziskali vpliv izbire začetnih oligonukleotidov na profil mikrobne združbe, ki ga dobimo z metodo T-RFLP.

Prvi del naše analize smo izvedli na celotni podatkovni bazi 16S rRNA genov RDP II, kjer niso vsa zaporedja polnih dolžin, ampak je večina delnih. Ugotovili smo, da začetni oligonukleotidi in pari začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na centralni del zaporedja gena za 16S rRNA, prepoznajo številčno več zaporedij v bazi RDP II. Delež prepoznanih zaporedij je z večanjem števila dovoljenih napak naraščal. Začetni oligonukleotidi 341F, 515F in 536r so prepoznali od 69 % do 78 % vseh bakterijskih zaporedij v bazi pri nič dovoljenih napakah, odstotek prepoznavanja pri dovoljeni eni napaki pa je narastel na 78 -83 %. Začetni oligonukelotidi 27F, FD1, 63F in 1492R, ki vsi nalegajo na začetek oziroma konec zaporedja, so prepoznali 6 - 12 % zaporedji pri nič dovoljenih napakah in 11 - 16 % zaporedij pri eni dovoljeni napaki. Tudi v starejših študijah so ugotovili, da začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na sredini zaporedja gena za 16S rRNA, prepoznajo večje število genov, v primerjavi s tistimi, ki nalegajo na začetku ali na koncu (Liu in sod., 1997; Dunbar in sod., 2001; Baker in sod., 2003; Frank in sod., 2008). So pa Liu in sod. (1997) naleganje začetnih oligonukleotidov preverili na genih celotne dolžine, torej poleg dejavnika zaporedij nepopolnih dolžin obstajajo še drugi dejavniki, ki vplivajo na prepoznavanje.

Pri analizi parov začetnih oligonukleotidov je bila situacija podobna, saj so pari, katerih oba začetna oligonukleotida nalegata bolj na sredini gena, prepoznali večje število zaporedij, kot tisti, kjer eden od začetnih oligonukleotidov nalega na začetku oziroma koncu, drugi pa na sredini, ali pa začetna oligonukleotida nalegata na začetku in koncu. Par 341f_926 prepozna 41,5 % oziroma 54,1 % zaporedij genov za 16S rRNA v bazi RDP II glede na število dovoljenih napak, medtem ko par 63F_1492R prepozna le 1,2 % ali 3 % odvisno od števila dovoljenih napak.

Pari, kjer eden od začetnih oligonukleotidov nalega na sredini, so imeli na račun tega začetnega oligonukleotida precej višji delež prepoznavanja. Lahko pa bi tudi rekli, da ima tak par na račun začetnega oligonukleotida, ki nalega na koncu oz. na začetku, manjši delež prepoznavanja. Začetna oligonukleotida 1391R in 1392R se razlikujeta le v dolžini, in sicer je 1392R dva nukleotida krajši ter sta prepoznala približno enako število zaporedij v bazi RDP II (\approx 28 %). Vendar pa je par 27F_1392R prepoznal le 6,1 % zaporedij, medtem ko je par 515f_1391R prepoznal 22,8 % zaporedij. Ne glede na visok delež prepoznavanja posameznega začetnega oligonukleotida, za par oligonukleotidov, ki imata posamezno oba visok delež prepoznavanja, ne velja, da bosta v paru prepoznala enako visok ali celo višji delež zaporedij. Tako je na primer par 341f_926R prepoznal le 41,5 % vseh zaporedij, čeprav jih je sam 341f prepoznal 78,3 %, 926R pa 51,4 %.

Baze zaporedij genov za 16S rRNA se z leti širijo. Tako je danes v bazi RDP II zbranih 2.319.039 bakterijskih in arhejskih zaporedij 16S rRNA genov (RDP, Release 10.29). Poleg celotnih zaporedij pa je večina delnih in kot je razvidno iz Slike 1, so zaporedja po dolžini neenakomerno porazdeljena. Tako je genov, ki vsebujejo začetne in končne regije neprimerno manj kot tistih, ki vsebujejo zaporedje iz centralne regije. Enako velja za zaporedja v drugih bazah 16S rRNA genov, kot je naprimer SILVA (Pruesse in sod., 2007) (Slika 2). Da posamezen začetni oligonukleotid ali par ne prepozna vseh genov v bazi, je posledica tega, da delna zaporedja ne vsebujejo mesta naleganja začetnega oligonukleotida oziroma ne vsebujejo mesta naleganja obeh začetnih oligonukleotidov, ki nastopata v paru. Vpliv zaporedij nepopolnih dolžin in posledično manjkajočih mest naleganja smo v nadaljnjih analizah zmanjšali tako, da smo število prepoznanih zaporedij posameznega začetnega oligonukleotida. Vseeno pa na ta način ne moremo izključiti dejavnika raznovrstnosti nabora zaporedij, torej heterogenost genov za 16S rRNA med bakterijskimi vrstami.

Različni začetni oligonukleotidi in njihovi pari (Preglednica 1) so v naši analizi prikazali drugačno strukturo iste mikrobne združbe, ki so jo predstavljala bakterijska zaporedja genov za 16S rRNA v bazi RDP II. Na razlike v strukturi mikrobne združbe je vplivalo tudi število dovoljenih napak (neujemanje, insercija, delecija) pri naleganju začetnih oligonukleotidov. Že ena dovoljena napaka je spremenila sliko stanja mikrobne združbe,

saj se je s tem povečalo število zaporedij, ki jih prepozna začetni oligonukleotid. Variabilnost strukture iste mikrobne združbe, glede na število dovoljenih napak pri naleganju, je bila pri nekaterih začetnih oligonukleotidih in parih velika (npr. 63F), pri drugih pa manjša ali komaj opazna (npr. 1492R). Struktura osnovne mikrobne združbe se je v naši analizi razlikovala predvsem glede na mesto naleganja začetnih oligonukleotidov, in sicer glede na to, ali so začetni oligonukleotidi nalegali na (i) začetku, (ii) koncu ali na (iii) sredini gena. Najbolj podobno strukturo osnovni mikrobni združbi smo zaznali z začetnimi oligonukleotidi, ki imajo mesto naleganja na sredini gena: 341F, 515F, 536r, 926R. Pri 926R je bilo zanimivo to, da je bila pri eni dovoljeni napaki struktura mikrobne združbe bolj podobna osnovni mikrobni združbi, kot pri nič dovoljenih napakah (Sliki 8 in 9). Podobno je bilo razvidno tudi iz rezultatov drugih oligonukleotidov in njihovih parov. To zopet kaže, da sama zastopanost zaporedij v podatkovni bazi ni najbolj omejujoč dejavnik pri prepoznavanju. Prej omenjeni začetni oligonukleotidi pa so v kombinaciji z robnimi začetnimi oligonukleotidi (FD1 in 1391R) močno spremenili strukturo mikrobne združbe, kar kaže na vpliv nabora genov za 16S rRNA, navkljub normalizaciji na število prisotnih zaporedij. Podobnost setov zaporedij prepoznanih z različnimi začetnimi oligonukleotidi z izvorno bazo je v osnovi funkcija dveh spremenljivk: lastnosti mesta naleganja začetnih oligonukleotidov in pokritosti podatkovne baze z zaporedji.

S to analizo smo posredno nakazali, da informacija o detekciji filogenetskih skupin, ki jo dobimo s preverjanjem začetnih oligonukleotidov v podatkovnih bazah, ni verodostojna za začetne oligonukleotide, ki nalegajo na robne regije gena za 16S rRNA, ker je nabor genov, ki vsebujejo robne regije, premajhen. Geni za 16S rRNA, ki vsebujejo mesta naleganja centralnih začetnih oligonukleotidov, kot so 341F, 515F, 536r in 926R, so predstavljali 65 - 85 % vseh zaporedij v bazi RDP II (Priloga A). Prav tako so ti začetni oligonukleotidi, z izjemo 926R, prepoznali 86 - 93 % takih zaporedij. Medtem ko je bilo zaporedij, ki so vsebovala robne regije, kamor nalegajo npr. FD1 in 1492R med 11 in največ 31 %. Znotraj teh so začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na konec gena (1391R, 1392R in 1492R), prepoznali okrog 90 % zaporedij, tisti, ki nalegajo na začetek, pa manjši delež sicer ustreznih zaporedij. Začetna oligonukleotida 27F in FD1, ki nalegata na isto mesto na začetku gena (8-27 bp), sta se precej razlikovala v deležu prepoznanih zaporedij, ki vsebujejo to mesto. 27F se od FD1 razlikuje le v tem, da ima namesto enega C

degeneriran nukleotid M. Zaradi tega se je možnost prepoznavanja zaporedij povečala in sicer iz 54 % (FD1) na 69 % (27F). Poleg neenake številčne razporeditve zaporedij glede na dolžino ima vpliv na prepoznavanje tudi vsebnost degeneriranih nukleotidov v zaporedju začetnih oligonukleotidov. Poleg tega pa se zaporedju gena za 16S rRNA lahko pred deponiranjem v podatkovno bazo delno ali v celoti odstrani zaporedja začetnih oligonukleotidov, s katerima smo gen pomnožili (Frank in sod., 2008). Iz tega lahko sklepamo, zakaj je število zaporedij, ki jih prepoznajo robni začetni oligonukleotidi tako nizko.

Za vsak par začetnih oligonukleotidov obstajajo take filogenetske skupine, v katerih sta začetna oligonukleotida, ki tvorita par, prepoznala signifikantno različno število zaporedij, če upoštevamo vse filogenetske skupine, v katerih sta prepoznala zaporedja. Ko smo s pomočjo X-Y grafov primerjali relativno zastopanost zaporedij takih »signifikantnih« filogenetskih skupin med različnimi pari začetnih oligonukleotidov, smo ugotovili, da obstajajo trije tipi povezav med njimi: razpršenost, konstantnost ali premo sorazmerje (y=x). Za slednje velja, da pari, ne glede na signifikantne kvantitativne razlike v prepoznavanju zaporedij, v teh filogenetskih skupinah prepoznajo približno enako število zaporedij. Taki pari začetnih oligonukleotidov so vsaj v teoriji primerljivi, saj prepoznajo iste filogenetske skupine, čeprav z nekoliko različnim kvantitativnim učinkom, ko gre za variabilnost na nižjih taksonomskih nivojih. Torej lahko sklepamo, da bi z uporabo takih parov začetnih oligonukleotidov (npr. par FD1 926R in par 27F 1392R) dobili primerljive rezultate analize mikrobne združbe na nivoju prisotnosti-odsotnosti nekaterih mikrobnih skupin v vzorcu. To smo dokazali tudi z dendrogramom na Sliki 12, ki prikazuje odnose med pari začetnih oligonukleotidov in kombinacijami parov glede na filogenetske skupine, v katerih je relativna zastopanost prepoznanih zaporedij signifikantno različna. Pari, ki so na X-Y grafih tvorili y=x premico, so bili na dendogramu blizu skupaj in obratno, pari, katerih X-Y grafi so bili razpršeni, so bili na dendrogramu bolj oddaljeni. Bolj kot so bili pari ali kombinacije parov oddaljeni v dendrogramu, bolj različne so filogenetske skupine, v katerih se začetni oligonukleotidi posameznih parov ali pari posameznih kombinacij statistično signifikantno razlikujejo po številu prepoznanih zaporedij.

Za zanimivo se je izkazalo, da so začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na iste regije, kot naprimer 27F in FD1 ali pa 1391R in 1392R, in se razlikujejo le v enem nukleotidu ali pa

dolžini, prepoznali različno število zaporedij v celotni bazi RDP II in posledično podali različno strukture iste mikrobne združbe. Vseeno pa so bile razlike v »signifikantnih« filogenetskih skupinah dovolj majhne, da so bili poljubni pari, ki vsebujejo prej naštete začetne oligonukleotide, na isti veji na dendrogramu (Slika 12). Sicer pa se tudi na dendrogramu vidi vpiv mesta naleganja začetnih oligonukleotidov, saj se je večina parov, ki vsaj z enim začetnim oligonukleotidom nalegajo na centralni del gena, grupirala blizu skupaj. S kombiniranjem dveh parov začetnih oligonukleotidov pa pridobimo kvečjemu nove »signifikantne« filogenetske skupine, ki se še razlikujejo od »signifikantnih« filogenetskih skupin posameznih parov, ki sestavljata kombinacijo in niso prisotne pri nobenem od samostojnih parov.

Načeloma smo torej z vsakim parom začetnih oligonukleotidov zaznali različno strukturo iste, osnovne mikrobne združbe. Vsak par ima svoj vzorec »signifikantnih« filogenetskih skupin, ki v nobenem primeru ni enak vzorcu drugih parov in je lahko v najboljšem primeru le precej podoben. Vedno obstajajo tudi zaporedja ali cele filogenetske skupine, ki jih z določenim parom ne bomo zaznali. Poleg tega pa se pari začetnih oligonukleotidov razlikujejo tudi po številčnosti prepoznanih zaporedij v bazi genov za 16S rRNA.

V okoljskih vzorcih skupne genomske DNA mikrobnih združb se slabše odkrivanje oziroma neodkrivanje zaporedij genov za 16S rRNA pri pomnoževanju z reakcijo PCR pripisuje temu, da se zaporedje začetnega oligonukleotida ne ujema z zaporedjem mesta naleganja (Hongoh in sod., 2003; Sipos in sod., 2007). Pri tem se v splošnem zanemarja vse vplive spremenjenih pogojev v sami reakciji tekom zaporednih ciklov, ko nekaterih reagentov ali variant začetnih oligonukleotidov že primanjkuje in prihaja do selektivnega namnoževanja določenih zaporedij ali do inhibicije pomnoževanja drugih (von Witzingerode in sod., 1997). Za učinkovito vezavo in elongacijo ni nujno, da sta zaporedje začetnega oligonukleotida in gena 100 % komplementarna (Morales in Holben, 2009), vendar pa zaradi neujemanj lahko pride do kvantitativne pristranskosti v prid zaporedjem, ki se popolnoma ujemajo z začetnim oligonukleotidom (Frank in sod., 2008). Ravno s tem namenom smo izvedli bioinformacijske analize, kjer smo se napakam pri reakciji PCR izognili in napravili virtualni PCR z zaporedji v dolžini celotnega gena za 16S rRNA v drugem sklopu analiz.
V tem drugem sklopu analiz smo pokazali, da je signal prisotnosti-odsotnosti posameznih taksonomskih skupin v prepoznanih zaporedjih znotraj baze 20.000 celotnih genov za 16S rRNA (R) z različnimi pari začetnih oligonukleotidov v celoti ohranjen, razen pri oligonukleotidu 63F oz. njegovi reverzni obliki, 63R, kjer so razlike v prepoznavanju zaporedij signifikantne. Pri utežni analizi, kjer smo upoštevali številčnost prepoznanih zaporedij v taksonomskih skupinah, so se vsi podvzorci glede na začetne oligonukleotide signifikantno razlikovali med sabo in od izvorne baze R. Izvorni podatkovni bazi R so bili sicer v utežni analizi najbolj podobni tisti pari, ki vsebujejo tako 341f, 515f kot tudi 1391R, naslednji pa tisti, ki vsebujejo 926R in FD1. Rezultati te analize se ne ujemajo z direktnim testiranjem v RDP II, saj sta tu vključena tudi dva robna začetna oligonukleotida (FD1 in 1391R). S tem smo pokazali, da je pri direktnem testiranju začetnih oligonukleotidov pri prepoznavanja zaporedij genov za 16S rRNA v RDP II glavno vlogo za razlike igrala slaba pokritost tarčnih mest, ki se nahajajo izven centralnih regij, v nasprotju z analizo, kjer so bile vse regije enakomerno zastopane. S tem smo potrdili, da je zanesljivost direktnega testiranja začetnih oligonukleotidov v podatkovnih bazah za te skrajne regije omejena.

Začetni oligonukleotid 63F se je v vseh delih analize najbolj razlikoval od ostalih začetnih oligonukleotidov in parov, tako po analizi strukture iste mikrobne združbe kot po stopnji variabilnosti glede na dovoljene napake (Slika 8). V celotni bazi RDP II in med geni, ki imajo njegovo mesto naleganja, prepozna le majhen delež zaporedij (5,6 % in 9,1 %), čeprav je delež genov, ki vsebujejo mesto naleganja 63F v bazi RDP II, precej visok (61,1 %). Zanimivo je, da so npr. Marchesi in sod. (1998) ter Fortuna in sod. (2011) na okoljskih vzorcih pokazali, da ta začetni oligonukleotid pomnoži večje število genov v primerjavi s 27F, česar pa mi na podlagi baze RDP II ne moremo potrditi. Poudariti je treba, da (naključno) izbiranje zaporedij iz podatkovne zbirke RDP II ne predstavlja združb, ki jih najdemo v okolju (Engebretson in Moyer, 2003) in da v naravnih vzorcih obstaja več različic vezavnega mesta posameznega začetnega oligonukleotida med filogenetskimi skupinami, ki jih ne moremo prepoznati z enim začetnim oligonukleotidom (Frank in sod., 2008). Možna razlaga je, da je zaporedje 63F, ki smo ga v teh analizah uporabili mi, komplementarno različici vezavnega mesta, ki je številčno manj zastopana v bazi RDP II.

5.1.2 Laboratorijska analiza vpliva izolacijskega kompleta, dodatka gojene biomase ter zaporedne izolacije na profil T-RFLP mikrobne združbe dveh različnih talnih vzorcev

5.1.2.1 Vpliv kompleta za izolacijo DNA

Z različnima izolacijskima kompletoma smo dobili enako osnovno razdelitev profilov na podvzorce gojene biomase in podvzorce z dodano gojeno biomaso (i) ter na podvzorce večkratnih zaporednih izolacij (ii), ne glede na vzorec tal. Profila kateregakoli enakega podvzorca izoliranega z različnima kompletoma nista bila v nobenem primeru identična. Bolj podobni so bili profili podvzorcev z dodano biomaso enega vzorca tal, kjer smo DNA izolirali z istim kompletom, kot pa profila istega podvzorca, kjer smo DNA izolirali z različnima kompletoma. Enako velja za podvzorce večkratnih zaporednih izolacij, neodvisno od vzorca tal. To dokazuje, da ima izolacijski komplet vsaj majhen vpliv na strukturo mikrobne združbe, ki jo lahko zaznamo s tehniko T-RFLP. Sklepamo, da so razlike med sestavinami in protokolom obeh izolacijskih kompletov dovolj velike, da bistveno spremenijo strukturo mikrobne združbe, kot jo prikaže profil T-RFLP.

Če primerjamo dendrograma izolacijskih kompletov (Slika 15 in Slika 16), vidimo, da je bila stopnja podobnosti večja med profili znotraj dveh glavnih gruč, tistih podvzorcev, kjer smo DNA izolirali s kompletom NucleoSpin® Soil kit (Slika 15). Stopnja podobnosti med profili, ki so vsebovali dodano biomaso, je bila nad 92 %, pri obeh vzorcih tal, med profili večkratnih zaporednih izolacij pa nad 78 % pri vzorcu tal B in nad 88 % pri vzorcu tal A. Profili podvzorcev, kjer je bila dodana biomasa, so se glede na lokacijo vzorčenja, razlikovali v manj kot 17 %, profili podvzorcev večkratne izolacije pa so se glede na lokacijo vzorčenja razlikovali v 28,2 %. Med profili podvzorcev, katerih DNA smo izolirali s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit, so bile stopnje podobnosti manjše, pravtako je bila manjša urejenost podvzorcev znotraj gruč.

Predvidevamo, da je razlog za manjše stopnje podobnosti med profili T-RFLP podvzorcev, kjer smo DNA izolirali s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit (Slika 16) v koraku odstranjevanja huminskih substanc in drugih PCR inhibitorjev, ki motijo delovanje polimeraze DNA in restrikcijskih encimov. Po protokolu kompleta NucleoSpin® Soil kit se inhibitorje in njihove ostanke odstrani s pomočjo dodatne kolone, ki nase veže

inhibitorje in nadaljnega štirikratnega spiranja izolirane DNA. Po protokolu kompleta UltraClean[™] Soil DNA Isolation Kit pa se inhibitorje obarja z zato namenjeno raztopino IRS, izolirano DNA pa se spira le enkrat. Glede na to sklepamo, da smo s kompletom NucleoSpin® Soil kit dobili čistejšo DNA in večji izkoristek le-te, kot s kompletom UltraClean[™] Soil DNA Isolation Kit.

5.1.2.2 Vpliv dodane gojene biomase

Rezultati analize profilov T-RFLP so pokazali, da ima na strukturo mikrobnih združb največji vpliv dodatek gojene biomase vzorcu tal in gojenje samo. Profili podvzorcev z dodano biomaso imajo večjo stopnjo podobnosti kot profili podvzorcev večkratne zaporedne izolacije istega vzorca tal. Ne glede na izolacijski komplet in na vzorec tal, so se profili T-RFLP podvzorcev, ki so vsebovali samo gojeno biomaso oziroma so imeli dodano različno količino biomase, razlikovali za več kot 80 % od profilov podvzorcev večkratnih zaporednih ekstrakcij. Glede na dodano količino gojene biomase se znotraj istega vzorca tal profili mikrobnih združb ne razlikujejo bistveno, niti se ne razlikujejo od profila združbe samo gojene biomase. Visoka stopnja podobnosti je tudi med profili podvzorcev tal B, ki vsebujejo gojene frakcije in profili podvzorcev tal A, ki vsebujejo gojene frakcije (81,7 %). Izjema v tej gruči sta podvzorca tal A z dodano pol-kratno količino gojene biomase in samo gojene biomase (A_{1xeM}, A_{gM}), katerih DNA smo izolirali s kompletom UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit. Predvidevamo, da je razlog za tako odstopanje v izolacijskem kompletu.

Ugotovili smo, da že najmanjša količina dodane gojene biomase prevlada v profilu T-RFLP originalnega vzorca. Razmerja med količino dodane biomase in biomaso vzorca tal A so bila 0,5:1, 1:1 in 5:1, pri vzorcu tal B pa 0,3:1, 0,6:1 in 3:1. Kot je razvidno iz rezultatov je že najmanjše razmerje signifikantno premaknilo stanje mikrobne združbe originalnega vzorca zelo blizu stanju mikrobne združbe gojene biomase. Stopnje podobnosti med profili podvzorcev z dodano biomaso in podvzorca gojene biomase ter profili večkratnih zaporednih izolaciji istega vzorca glede na izolacijski komplet, so bile okrog 15 % za podvzorce tal A in 25 % za podvzorce tal B. To potrjuje tudi Godicelj (2011) v svoji študiji, kjer je ugotovil, da se profil T-RFLP mikrobnih združb vzorca tal razlikujejo za več kot 75 % od profila T-RFLP mikrobne združbe gojene biomase istih tal. V tej študiji je Godicelj (2011) pokazal tudi, da se profil mešanice direktno izolirane DNA iz gojene frakcije istih tal v razmerju 1:1 v 60 % razlikuje od profila mikrobne združbe tal. Vendar pa je ugotovil tudi, da se profil izolirane DNA gojene frakcije v kar 75 % razlikuje od profila prej omenjene mešanice DNA, kar je v nasprotju z našimi rezultati. Poleg tega pa se v njegovi študiji profili mikrobne združbe tal in profili mikrobne združbe istih tal, ki jim je dodal prosto DNA gojene frakcije tal, niso signifikantno razlikovali. V našem primeru so bile razlike med profili gojenih frakcij in podvzorcev z dodano gojeno biomaso istega vzorca tal, zelo majhne (stopnja podobnosti > 85 %), medtem ko so se profili gojene biomase ter podvzorcev z dodano gojeno biomaso in večkratnih zaporednih izolacij istega vzorca tal razlikovali v več kot 80 %. Obstaja torej razlika v tem, ali direktno izolirani DNA vzorca tal dodajamo izolirano DNA gojene frakcije, ali pa biomasi vzorca tal dodamo gojeno biomaso (v našem primeru) oziroma ali biomasi vzorca tal dodamo prosto DNA pred samo izolacijo skupne DNA. Zdi se, da ima pomembno vlogo celični ovoj, ki varuje DNA pred zunanjimi dejavniki in razgradnjo.

5.1.2.3 Vpliv večkratne zaporedne izolacije DNA

Med profili podvzorcev večkratnih zaporednih izolaciji obeh vzorcev tal (A in B) je bila najmanjša stopnja podobnosti 71,3 %, z izjemo podvzorca A_{1xeM} , ki se od ostalih razlikuje v 35 %, predvidevamo, da zaradi izolacijskega kompleta. Ostali profili večkratnih zaporednih izolacij vzorca tal A so bili, ne glede na izolacijski komplet, med sabo zelo podobni (nad 88 %). Po drugi strani so se profili zaporednih izolacij tal B razlikovali med sabo glede na izolacijski komplet. Med profili mikrobnih združb vseh zaporednih izolacij smo zaznali razlike ne glede na vzorec tal in izolacijski komplet. Profila prvih dveh zaporednih izolacij vzorca tal B sta si bila bolj podobna od nadaljnjih treh, med tem ko so bili pri vzorcu A med sabo bolj podobni profili prvih treh zaporednih izolacij.

To, da se profili T-RFLP večkratnih zaporednih izolacij DNA istega vzorca razlikujejo med sabo, so dokazali tudi Feinstein in sod. (2009). Ugotovili so, da se profili mikrobnih združb šestkratnih zaporednih izolacij skupne genomske DNA iz različnih vzorcev tal signifikantno razlikujejo, posebej v glinenih in peščenih tleh, manj pa v organskih tleh.

Ugotovili so tudi, da je profil T-RFLP po združitvi šestih zaporednih izolacij zelo podoben profilu T-RFLP po združitvi prvih treh izolacij, z upoštevanjem uteženega povprečja glede na količino DNA, ki so jo izolirali v vsaki od zaporednih izolacij, ter da skupno število kopij ribosomskih genov po tretji zaporedni izolaciji ne narašča več. Da iz vzorca izoliramo večino DNA, so torej dovolj tri zaporedne izolacije, ki jih združimo. Se pravi, da se profili nadaljnjih izolacij razlikujejo bolj glede na številčno zastopanost in ne več toliko po strukturi. To se je pokazalo tudi pri naših rezultatih, kjer so bili profili prvih dveh ali treh zaporednih izolacij (odvisno od vzorca tal) različni od profilov nadaljnjih izolacij.

5.1.2.4 Vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti vzorcev tal

Strukturi mikrobnih združb vzorcev tal A in tal B sta bili različni. Vzorca tal A in B sta se razlikovala v več lastnostih (pH, vsebnost vode, sposobnost za zadrževanje vode, teksturni razred, vsebnost organske snovi), zato je težko izpostaviti glavni razlog za razlike v strukturi mikrobnih združb.

Profila mikrobnih združb vzorcev tal A in tal B sta se razlikovala za 20 % in 30 %, odvisno od izolacijskega kompleta, v povprečju torej 25 %. Vzorca tal A in tal B pripadata različnima tipoma tal, ki sta nastala na različnih matičnih podlagah. Na strukturo mikrobnih združb ima velik vpliv matična podlaga na kateri so tla nastala (Ulrich in Becker, 2006; Singh in sod., 2007). Profili mikrobnih združb vzorcev tal iste geološke podlage tvorijo svojo gručo. Matična podlaga je bistveni dejavnik v procesih pedogeneze, ki posledično določa tip tal in njihove lastnosti. Eden od razlogov za različno strukturo mikrobnih združb naših vzorcev tal je lahko tekstura, saj tla vzorca B spadajo v teksturni razred gline, tla vzorca A pa v razred meljasta ilovica. Tudi Feinstein in sod. (2009) ter Ulrich in Becker (2006) so ugotovili, da se razlike v teksturi tal odražajo tudi v strukturi mikrobnih združb.

Na mikrobne združbe vpliva tudi vrednost pH tal (Fierer in Jackson, 2006; Enwal in sod., 2007; Osborne in sod., 2011). Fierer in Jackson (2006) sta primerjala strukturo, diverziteto in številčnost mikrobnih združb tal vzorčenih na 98 različnih mestih Severne in Južne Amerike, ki so se med sabo razlikovali po tipu podnebja, zemljepisni širini in tipu

ekosistema (gozd, travnata površina). Ugotovila sta, da razlike v divertziteti, številčnosti in strukturi najbolj razloži talni pH. Tla s podobno vrednostjo pH, a različnih tipov ekosistema in različne geografske lege, imajo podobne bakterijske združbe glede na profile T-RFLP. Enwal in sod. (2007), ki so raziskovali vpliv dolgotrajnega gnojenja z organskimi in anorganskimi gnojili na strukturo talnih mikrobnih združb, pa so pokazali, da se strukture mikrobnih združb razlikujejo glede na gnojilo in sicer posredno, saj različna gnojila različno vplivajo na pH, ta pa potem na strukturo in aktivnost. Mikrobne združbe v tleh, ki so zaradi izbranih gnojil imela izrazito kisel pH, so bile unikatne in zelo različne od mikrobnih združb v tleh z višjim pH. To lahko povežemo z ugotovitvijo Fiererja in Jacksona (2006), da je največja raznolikost bakterijskih združb v tleh, kjer je vrednost pH blizu nevtralne, najmanjša raznolikost pa je v kislih tleh. Mineralna tla vzorca A so bila bolj bazična (vrednost pH 8,16) od organskih tal vzorca B (vrednost pH 7,3). Vseeno pa sta bili vrednosti pH dovolj blizu, da lahko na podlagi ugotovitev Fierer in Jackson-a (2006) sklepamo, da sta ravno zaradi pH, strukturi mikrobnih združb obeh vzorcev vseeno bolj podobni, kot bi pričakovali.

Na strukturo mikrobnih združb v tleh vpliva vegetacija. Že sama prisotnost rastlin in njihova rast prispeva k večji kompleksnosti in drugačni strukturi mikrobnih združb v primerjavi z mikrobnimi združbami v golih tleh (Singh in sod., 2007 in 2009). Mikrobne združbe tal, kjer raste listnato drevje, pašna trava ali grmičevje se značilno razlikujejo med seboj (Chan in sod., 2008). Ker so bila tla vzorca B travnata, tla vzorca A pa so bila gola, z ostanki pridelka (koruze), sklepamo, da je razlog za razlike v strukturi mikrobnih združb v obeh tleh tudi prisotnost vegetacije.

Glede vpliva vsebnosti organskega ogljika in hranil si študije nasprotujejo. V nekaterih primerih naj razlike v količini organskega ogljika v tleh ne bi imele vpliva na strukturo mikrobnih združb (Kraigher in sod., 2006; Ulrich in Becker, 2006; Chan in sod., 2008), spet v drugih primerih pa so opazili signifikantno povezavo med vsebnostjo organskega ogljika in strukturo (Chan in sod., 2006; Singh in sod., 2009). Enako velja za vsebnost vode v tleh. Singh in sod. (2009) so ugotovili signifikanten vpliv na strukturo mikrobne združbe, drugi pa niso zaznali povezave med vsebnostjo vode in spremembami v strukturi (Kraigher in sod., 2006; Stres in sod., 2008; Osborne in sod., 2011). Čeprav sta vsebnost vode na gram suhih tal vzorca B in delež organskega ogljika v njih večji, kot v tleh vzorca

A, ne moremo z gotovostjo trditi, da imata ta dejavnika vpliv na razlike v strukturi mikrobnih združb v naših vzorcih.

5.2 SKLEPI

- Razlike med začetnimi oligonukleotidi in pari začetnih oligonukleotidov v zaznavanju zaporedij genov za 16S rRNA v posameznih filogenetskih skupinah baze RDP II so statistično signifikantne in so odvisne od mesta naleganja.
- Struktura mikrobne združbe, kot jo prikaže analiza T-RFLP, je odvisna od izbire začetnega oligonkuleotida oziroma para začetnih oligonukleotidov.
- Zaporedja genov za 16S rRNA v podatkovnih zbirkah so delna in celotna. Zaradi neenakomerne razporeditve delnih zaporedij, se rezultati zaznavanja vseh zaporedij v podatkovni bazi z različnimi pari začetnih oligonukleotidov razlikujejo od rezultatov zaznavanja med zaporedji genov samo celotne dolžine. Neenaka pokritost negativno vpliva predvsem na zaznavanje robnih začetnih oligonukleotidov.
- Dodatek frakcije gojene mikrobne biomase vzorcu tal pred izolacijo skupne genomske DNA signifikantno vpliva na strukturo talne mikrobne združbe.
- Razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih tal vplivajo na strukturo mikrobne združbe.
- Večkratna zaporedna izolacija DNA iz istega vzorca vpliva na strukturo mikrobne združbe.
- Izbira kompleta za izolacijo DNA vpliva na rezultate analize mikrobnih združb z metodo T-RFLP.

Vse postavljene delovne hipoteze smo ovrgli.

6 POVZETEK

T-RFLP je metoda za zaznavanje strukture mikrobnih združb v okoljskih vzorcih, s katero lahko hitro obdelamo veliko število vzorcev. Vendar pa vključuje veliko parametrov, ki jih lahko spreminjamo. V tej diplomski nalogi nas je zanimalo, kako na rezultate analize strukture mikrobne združbe s to metodo vplivajo različni oligonukleotidi, različni komercialni izolacijski kompleti in večkratne zaporedne izolacije DNA. S pomočjo metode T-RFLP smo ugotavljali tudi, kakšne spremembe v strukturi mikrobne združbe povzroči dodatek gojene biomase prvotnemu vzorcu.

Vzorca tal, s katerima smo delali, sta se razlikovala po kraju in času vzorčenja, tipu tal, ter v vseh izmerjenih fizikalno-kemijskih parametrih: vrednost pH, vsebnost vode, kapaciteta zadrževanja vode, delež organske snovi in organskega ogljika ter tekstura tal. V bogatem gojišču smo iz obeh vzorcev nagojili biomaso, ki smo jo nato v različnih količinah (polkratna, 1-kratna in 5-kratna) dodali originalnim talnim vzorcem. Iz gojene frakcije in talnih podvzorcev z dodano gojeno frakcijo smo izolirali DNA z dvema različnima kompletoma za izolacijo. Na originalnih talnih vzorcih smo izvedli 5-kratno zaporedno izolacijo DNA, prav tako z dvema izolacijskima kompletoma. Na koncu smo imeli 36 izolatov skupne genomske DNA, 18 za vsak izolacijski komplet. V reakciji PCR smo s parom začetnih oligonukleotidov FAM-FD1 in 926R pomnožili gene za 16S rRNA, nato pa izvedli restrikcijo z dvema restrikcijskima encimoma *HhaI* in *MspI*. Restrikcijske produkte smo injicirali v kapilarno elektroforezo, dobljene profile T-RFLP smo analizirali s programom BioNumerics 5.1 (Applied Maths, ZDA) in izrisali povprečne dendrograme razporeditve profilov T-RFLP podvzorcev, glede na informacije iz obeh rezanj skupaj.

Strukturi mikrobnih združb obeh vzorcev tal sta se razlikovali. Dodajanje gojene biomase prvotnemu vzorcu tal je imelo signifikanten vpliv na strukturo mikrobne združbe, saj je že dodatek najmanjše količine gojene frakcije spremenil strukturo talne mikrobne združbe v smeri podobnosti z združbo gojene biomase tal. Izkazalo se je, da je podobnost med profili T-RFLP gojenih kultur in tal z dodano gojeno biomaso obeh vzorcev tal večja, kot pa podobnost profilov gojene kulture in tal z dodano gojeno biomaso ter profilov, ki smo jih dobili z večkratno zaporedno izolacijo, znotraj istega vzorca tal. Strukture mikrobnih

združb podvzorcev večkratnih zaporednih izolacij niso bile identične, imele pa so precej visoko stopnjo podobnosti.

Z različnima izolacijskima kompletoma smo zaznali sicer enako osnovno razdelitev podvzorcev, vendar pa v nobenem primeru profila mikrobne združbe istega podvzorca, kjer smo DNA izolirali z različnima kompletoma, nista bila identična. V skupnem dendrogramu (Slika 17) so se profili podvzorcev glede na izolacijski komplet ločili.

Bazo RDP II zaporedij bakterijskih genov za 16S rRNA smo uporabili kot modelno združbo, na kateri smo z računalniško analizo preverili vpliv izbire različnih začetnih oligonukleotidov. Začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na centralne regije gena, so prepoznali večji delež zaporedij, kot tisti, ki nalegajo na robne regije. Z večanjem števila dovoljenih napak se je delež prepoznanih zaporedij večal, ne glede na mesto naleganja začetnega oligonukleotida. Različni začetni oligonukleotidi so prikazali različno strukturo iste mikrobne združbe, prav tako se je struktura mikrobne združbe spreminjala z večanjem števila dovoljenih napak. Centralni začetni oligonukleotidi so prikazali strukturo najbolj podobno strukturi modelne združbe.

Za vsak par začetnih oligonukleotidov obstajajo take filogenetske skupine, v katerih začetna oligonukleotida prepoznata signifikantno različno število zaporedij. Če imajo pari podobne »signifikantne« filogenetske skupine, jih lahko zamenjujemo med sabo in pričakujemo, da bodo prikazali podobno strukturo iste mikrobne združbe.

Rezultati analiz baze delnih in celotnih zaporedij genov za 16S rRNA se razlikujejo od rezultatov analiz samo celotnih zaporedij. V slednji smo tudi z robnimi začetnimi oligonukleotidi dobili reprezentativno sliko modelne združbe. Glavni razlog za te razlike je v neenakomerni pokritosti osnovne baze z zaporedji genov, ki vključujejo robne regije.

V tej nalogi smo pokazali, da pri analizi mikrobnih združb z metodo T-RFLP obstaja nekaj kritičnih parametrov, katerih spreminjanje lahko bistveno spremeni rezultate. Postavlja se vprašanje, kako zanesljiva sploh je metoda in ali obstaja taka kombinacija parametrov, s katero bi se približali dejanskemu stanju. Z združevanjem izolatov večkratnih zaporednih izolacij (Feinstein in sod., 2009) in združevanjem produktov PCR po pomnoževanju z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (Baker in sod., 2003) se temu lahko približamo.

7 VIRI

- Atlas okolja. 2013. Nukleus verzija v6.0.4835. »Rodica in Tomišelj Ljubljansko Barje«. Pedološka karta RS, 1:250000. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje: 1str. http://gis.arso.gov.si/atlasokolja (8.5.2013)
- Baker G. C., Smith J. J., Cowan D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods, 55: 541-555.
- Bakken R.L., Olsen R.A. 1989. DNA content of soil bacteria of different cell size. Soil Biology and Biochemistry, 21, 6: 789-793.
- Blackwood C. R., Marsh T., Kim S., Paul E. A. 2003. Terminal restriction length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 69, 2: 926-932.
- Chan O. C., Casper P., Sha L. Q., Feng Z. L., Fu Y., Yang X. D., Ulrich A. 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: 449-458.
- 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: 247-259.
- Chandler D. P., Li S. Spadoni C. M., Drake G. R., Balkwill D. L., Fredrickson J. K., Brockman F. J. 1997. A molecular comparison of cuturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. FEMS Microbiology Ecology, 23: 131-144.
- Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2009. The Ribosomal

Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Research, 37, Database issue: D141 - D145.

- Dunbar J., Takala S., Barns S. M., Davis J. A., Kuske C. R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4: 1662-1669.
- 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.
- 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.
- 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.
- Enwall K., Nyberg K., Bertilsson S., Cederlund H., Stenström J., Hallin S. 2007.Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. Soil Biology and Biochemistry, 39, 1: 106-115.
- 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.
- 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.

- Fortuna A., Marsh T. L., Wayne Honeycutt C., Halteman W. A. 2011. Use of primer selection and restriction enzymes to assess bacterial community diversity in an agricultural soil used for potato production via terminal restriction fragment length polymorphism. Applied Microbiology and Biotechnology, 91: 1193-1202.
- 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 16A rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 74, 8: 2461-2470.
- Frey J. C., Angert E. R., Pell A. N. 2006. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphismbased analyses. Journal of Microbiological Methods, 67: 9-19.
- Godicelj A. 2011. Vpliv prostih nukleinskih kislin na zaznavanje strukture in aktivnosti mikrobnih združb. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 89 str.
- Google earth. 2012a. Rodica, Slovenija. 46°08'58,13"S, 14°35'30,47"V, nadmorska višina nad terenom opazovalca 1,00 km, datum posnetka: 25.8.2011. Tele Atlas 2012, Digital Globe 2012. Mountain View, Google Inc.: 1str.

http://www.google.com/earth/index.html (21.8.2012)

Google earth. 2012b. Ljubljansko Barje, Slovenija. 45°58'33,73"S, 14°28'17,45"V, nadmorska višina nad terenom opazovalca 2,04 km, datum posnetka: 25.8.2011. Tele Atlas 2012, Digital Globe 2012. Mountain View, Google Inc.: 1 str. http://www.google.com/earth/index.html (21.8.2012)

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4, 1: art. 4, <u>http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm</u>: 9 str.

- Hirsch P. R., Mauchline T. H., Clark I. M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. Soil Biology and Biochemistry, 42: 878-887.
- Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M., Kudo T. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiology Letters, 221: 299-304.
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., Van Elsas J. D., Mandič-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. Soil Biology and Biochemistry, 38: 2762-2771.
- 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: 4516-4522.
- Lloyd-Jones G., Hunter D. W. F. 2001. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. Soil Biology and Biochemistry, 33: 2053-2059.
- Macherey-Nagel. 2010. Genomic DNA from Soil. User manual. NucleoSpin Soil. 07/2010, Rev. 02. Düren, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG: 23 str.
- Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J., Wade W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2: 795-799.
- MO BIO. 2009. UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit. Instruction manual. Carlsbad, MO BIO Laboratories Inc.: 15 str.

- Morales S. E., Holben W. E. 2009. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificy and efficacy not suggested by *in silico* analysis. Applied and Environmental Microbiology, 75, 9: 2677-2683.
- Nelson D. W., Sommers L. E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. V: Methods of soil analysis. Part 3 – Chemical Methods. Sparks D. L., Page A. L., Helmke P. A., Loeppert R. H. (eds.). Madison, Soil Science Society of America, Inc., American Society of Agronomy: 961-1010.
- Osborn A. M., Moore E. R. B., 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., 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.
- Osborne C. A., Zwart A. B., Broadhurst L. M., Young A. G., Richardson A. E. 2011. The influence of sampling strategies and spatial variation on the detected soil bacterial comunities under three different land-use types. FEMS Microbiology Ecology, 78: 70-79.
- Prosser J. I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. Plant and Soil, 244: 9-17.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B. M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner 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.

- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T. M., Simonet P. 2003. Extraction of DNA from soil. European Journal of Soil Biology, 39: 183-190.
- Roche Applied Science. 2008. High Pure PCR product purification kit. Manheim, Roche Diagnostics Deutschland GmbH: 17 str.
- 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. J., 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.
- Schneegurt M. A., Dore S. Y., Kulpa, Jr. C. F. 2003.Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. Current Issues in Molecular Biology, 5: 1-8.
- Schütte U. M. E., Abdo Z., Bent S. J., Shyu C., Williams C. J., Pierson J. D., Forney L. J. 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: 365-380.
- 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: 239-248.
- Singh B. K., Munro S., Potts J. M., Millard P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. Applied Soil Ecology, 36: 147-155.
- Sipos R., Székely A. J., Palatinszky M., Révész S., Márialigeti 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: 341-350.

- Stres B. 2007. Praktikum iz mikrobiologije tal za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 34 str.
- Stres B., Danevcic T., Pal L., Luka M.M., Resman L., Leskovec S., Hacin J., Mandic-Mulec I. 2008. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. FEMS Microbiology Ecology, 66: 110–122.
- Stres B., Philippot L., Faganeli J., Tiedje J.M. 2010. Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment. FEMS Microbiology Ecology, 74: 323–335.
- Stres B. 2011. »Število bakterijskih celic v mineralnih tleh na Rodici«. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo (osebni vir, oktober 2011).
- Stres B. 2012. »DNAsort, DNArand, PrimerCartesian računalniški programi za urejanje in delo z genskimi zaporedji«. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo (osebni vir, avgust 2012).
- Thakuria D., Schmidt O., Mac Siúrtáin M., Egan D., Doohan F. M. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. Soil Biology and Biochemistry, 40: 1390-1403.
- Ulrich A., Becker R. 2006. Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. FEMS Microbiology Ecology, 56: 430-443.
- von Wintzingerode F., Göbel U. B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 21: 213-229.

- White J. R., Nagarajan N., Pop M. 2009. Statistical methods for detecting differentialy abundant features in clinical metagenomic samples. PLOS Computational Biology, 5, 4, e1000352, doi: 10.1371/journal.pcbi.100352: 11 str.
- Zupan M., Grčman H., Kočevar H. 1998. Navodila za vaje iz pedologije: za študente geologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 62 str.

ZAHVALA

Na prvem mestu se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Blažu Stresu in somentorici dr. Vesni Jerman za njuno pomoč, potrpljenje, pozitivnost in vzpodbudo pri izdelavi te diplomske naloge.

Zahvale gredo tudi:

- Brigiti, Marti in Katji iz Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo za pomoč pri delu v laboratoriju ter takšne in drugačne nasvete.
- Dr. Andreju Razpetu za pomoč pri kapilarni elektroforezi.
- Nadji in Larisi za zabavna druženja na Rodici.
- Jerneju, ker je še najbolj verjel vame.
- Družini predvsem očetu, ki me je, ne glede na vse, vzpodbujal.

PRILOGE

Priloga A: Preglednica mest naleganja začetnih oligonuklotidov na genu za 16S rRNA, deležev zaporedij, ki vsebujejo posamezno mesto naleganja, glede na vsa zaporedja v bazi RDPII ter deležev prepoznavanja posameznega začetnega oligonukleotida, glede na zaporedja, ki vsebujejo mesto naleganja tega začetnega oligonukleotida.

Začetni oligonukleotid	Pozicija glede na 16S rRNA <i>E.coli</i> J01695	Delež zaporedij z mestom naleganja začetnega oligonukleotida (%)	Delež prepoznavanja znotraj zaporedij z mestom naleganja začetnega oligonukleotida (%)
FD1	8-27 bp	17,7	54
27F	8-27 bp	17,7	68,9
63F	43-63 bp	61,1	9,1
341f	341-357 bp	84,9	92,2
515F	515-533 bp	80	92,5
536r	519-536 bp	79,5	86,2
926R	907-926 bp	65,2	77,7
1391R	1391-1407 bp	30,2	90,1
1392R	1392-1406 bp	31,3	89,3
1492R	1492-1506 bp	11,5	91,1