

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tamara ODAR

**AKTIVNOST IN STRUKTURA BAKTERIJSKIH MIKROBNIH  
ZDRUŽB V LEDENIŠKIH SEDIMENTIH (SPITZBERGEN,  
SVALBARD, NORVEŠKA) V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH  
DEJAVNIKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON ACTIVITY AND  
STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITY IN GLACIAL  
SEDIMENTS (SPITZBERGEN, SVALBARD, NORWAY)**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Blaž Stresa, za recenzentko pa prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentor: doc. dr. Blaž Stres

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

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: prof. dr. Ines Mandić-Mulec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je last lastnega raziskovalnega dela.

Tamara Odar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26:577.2.083(043)=163.6
KG	ekologija mikroorganizmov/ledeniki/ledeniški sedimenti/Arktika/mikrobne združbe/biološka raznovrstnost/mikrobna aktivnost
AV	ODAR, Tamara
SA	STRES, Blaž (mentor)/ MANDIČ-MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	AKTIVNOST IN STRUKTURA BAKTERIJSKIH MIKROBNIH ZDRUŽB V LEDENIŠKIH SEDIMENTIH (SPITZBERGEN, SVALBARD, NORVEŠKA) V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH DEJAVNIKOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 55 str., 9 pregl., 18 sl., 2 pril., 55 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Preučevali smo aktivnost in strukturo mikrobne združbe, ter kako sta ti odvisni od okoljskih dejavnikov v sedimentih iz ledenika na otoku Spitzbergen, Svalbard, Norveška. Vzorce smo odvzeli na šestih mestih vzdolž ledenika. Izmerili smo pH, teksturo, vlažnost, vsebnost ogljika in dušika, molekulska teža molekul v raztopljeni organski snovi in vsebnost redukcijskih sladkorjev. Mikrobno aktivnost smo merili s tremi različnimi metodami - dehidrogenazna aktivnost, hidroliza fluorescein-diacetata in redukcija resazurina. Vse so pokazale najvišjo aktivnost pri prvih treh vzorcih, ki so vsebovali tudi največji delež ogljika in dušika. Iz vseh vzorcev smo izolirali DNK ter s PCR pomnožili bakterijske gene za 16S rRNK. Pomnoženo DNK smo rezali z dvema restrikcijskima encimoma, <i>HhaI</i> in <i>TaqI</i>. Dobljene fragmente smo injicirali v kapilarno elektroforezo ter podatke analizirali s pomočjo programa BioNumerics. Analize so pokazale, da vzorci tvorijo več skupin, a se med seboj bistveno ne razlikujejo, saj ponovitve vzorcev ne tvorijo značilnih skupkov. Program CANOCO je pokazal, da izmerjeni fizikalno-kemijski parametri razložijo 14,5 % variabilnosti v mikrobni strukturi. Prostorska porazdelitev nima večjega vpliva na strukturo mikrobne združbe, razloži pa 2,5 % variabilnosti. Podobne rezultate smo dobili tudi za mikrobno aktivnost – okoljski parametri razložijo 25 % variabilnosti. Tudi tu prostorska porazdelitev nima znatnega vpliva, razloži pa 5,1 % variabilnosti. Nerazložene variabilnosti je bilo v primeru mikrobne strukture 70,8 %, v primeru mikrobne aktivnosti pa 3,7 %.</p>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.26:577.2.083(043)=163.6

CX microbial ecology/glacier/glacial sediments/Arctic/microbial community/microbial diversity/microbial activity

AU ODAR, Tamara

AA STRES, Blaž (supervisor)/ MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2011

TI INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON ACTIVITY AND STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITY IN GLACIAL SEDIMENTS (SPITZBERGEN, SVALBARD, NORWAY)

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 55 p., 9 tab., 18 fig., 2 ann., 55 ref.

LA sl

AL sl/en

AB We studied the impact of environmental factors on microbial activity and structure in the glacier sediments on the island of Spitzbergen, Svalbard, Norway. Samples were taken from six different points along the glacier. Measured environmental parameters were pH, texture, moisture, carbon and nitrogen content, molecular weight of molecules in dissolved organic matter and concentration of reductive sugars. Microbial activity was determined using dehydrogenase activity, fluoresceine-diacetate hydrolysis and reduction of resazurin. All showed the highest activity in the first three samples that also contained the largest proportion of carbon and nitrogen. DNA was isolated and bacterial genes for 16S rRNA were PCR amplified and cut with two restriction enzymes, *HhaI* and *TaqI*. The resulting fragments were injected in capillary electrophoresis and the data were analyzed using the program BioNumerics. The analyses showed that the samples were divided into several groups by analogy, but were not significantly different from one another and did not form site specific clusters. The variance partitioning showed that the measured physico-chemical parameters and spatial distribution explained 14,5 % and 2,5 % of variability in microbial structure, respectively. Similarly results were obtained for microbial activity - environmental parameters explained 25 % of variability. The spatial distribution explained only 5,1 % of variability. Unexplained variation was in case of microbial structure 70,8 %, and in case of microbial activity 3,7 %.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 POLARNA OBMOČJA IN LEDENIKI .....	3
<b>2.1.1 Led in politermalni ledeniki .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Permafrost.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3 Sedimenti .....</b>	<b>5</b>
2.2 SVALBARD.....	6
<b>2.2.1 Klima na otočju Svalbard .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2 Fjord Kongsfjorden.....</b>	<b>8</b>
2.3 MIKROBNA AKTIVNOST IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE .....	9
<b>2.3.1 Aktivnost mikrobne združbe v odvisnosti od fizikalno-kemijskih dejavnikov.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2 Struktura mikrobne združbe.....</b>	<b>10</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIALI .....	13
3.2 SVALBARD.....	15
3.3 VZORČENJE .....	15
3.4 pH VZORCEV .....	16
3.5 VLAŽNOST .....	17
3.6 TEKSTURA .....	17

3.7 VSEBNOST OGLJIKA IN DUŠIKA .....	18
3.8 MOLEKULSKA TEŽA MOLEKUL V RAZTOPLJENI ORGANSKI SNOVI (MWI) .....	19
3.9 DOLOČANJE REDUKCIJSKIH SLADKORJEV .....	19
3.10 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCEIN DIACETATOM (FDA) .....	20
3.11 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI Z REDUKCIJO RESAZURINA .....	21
3.12 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI Z DEHIDROGENAZNO AKTIVNOSTJO .....	22
3.13 IZOLACIJA DNK IN AGAROSNA ELEKTROFOREZA.....	23
3.14 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR).....	24
3.15 RESTRIKCIJA .....	25
3.16 IZVEDBA T-RFLP .....	25
3.17 ANALIZA T-RFLP PROFILOV.....	25
3.18 ODVISNOST AKTIVNOSTI IN STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH DEJAVNIKOV .....	26
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>27</b>
4.1. SVALBARD.....	27
4.2 pH VZORCEV .....	29
4.3 VLAŽNOST .....	29
4.4 TEKSTURA .....	30
4.5 VSEBNOST OGLJIKA IN DUŠIKA .....	31
4.6 MOLEKULSKA TEŽA MOLEKUL V RAZTOPLJENI ORGANSKI SNOVI.....	32
4.7 DOLOČANJE REDUKCIJSKIH SLADKORJEV .....	33
4.8 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCEIN DIACETATOM (FDA) .....	34
4.9 REDUKCIJA RESAZURINA.....	35
4.10 DEHIDROGENAZNA AKTIVNOST .....	36
4.11 ANALIZA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE .....	37
4.14 AKTIVNOST IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH DEJAVNIKOV .....	39
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>41</b>

5.1 RAZPRAVA.....	41
<b>5.1.1 Okoljski parametri .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.2 Mikrobnna aktivnost in struktura v odvisnosti od prostora in dejavnikov okolja</b> <b>.....</b>	<b>44</b>
5.2 SKLEPI.....	46
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>49</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Arktično območje Svalbard, Norveška (Pivk, 2007) .....	7
Slika 2: Satelitska slika mest vzorčenja na otoku Spitzbergen (Google maps, 2010).....	16
Slika 3: Teksturni trikotnik tal (Wikipedia, 2010b) .....	18
Slika 4: Absorbanca vzorcev ledeniških sedimentov pri 415 nm v odvisnosti od koncentracije glukoze .....	20
Slika 5: Umeritvena krivulja za izračun mikrobne aktivnosti s fluorescein diacetatom .....	21
Slika 6: Odvisnost absorbance raztopine TTF v acetonu od njene koncentracije .....	23
Slika 7: Povprečne letne temperature na otoku Svalbard od leta 1988-2009 in povprečne letne količine padavin od leta 1988-2004 (eKlima, 2010) .....	27
Slika 8: Povprečne mesečne temperature na otočju Svalbard za vsako leto (od 1988-2009) (eKlima, 2010).....	28
Slika 9: Vlažnost vzorcev ledeniških sedimentov. ....	30
Slika 10: Delež gline, melja in peska v posameznih vzorcih ledeniških sedimentov .....	31
Slika 11: Delež ogljika in dušika v posameznem vzorcu ledeniških sedimentov .....	32
Slika 12: Razmerje A365/250 za vsak vzorec ledeniških sedimentov .....	33
Slika 13: Količina reduktivnih sladkorjev v mg v vsakem vzorcu ledeniških sedimentov .....	34
Slika 14: Koncentracija fluorescina v µg v posameznih vzorcih ledeniških sedimentov ...	35
Slika 15: Odstotek reduciranega resazurina v vzorcih ledeniških sedimentov .....	36
Slika 16: Dehidrogenazna aktivnost vzorcev ledeniških sedimentov .....	37
Slika 17: Dendrogram za 18 izolatov (vseh 6 vzorcev v 3 ponovitvah), narejen s programom BioNumerics (Applied Maths, Belgium).....	38
Slika 18: Vpliv izmerjenih parametrov na mikrobno strukturo in aktivnost.....	39



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: GPS koordinate mest vzorčenja.....	15
Preglednica 2: Reagenčna mešanica PAHBAH .....	20
Preglednica 3: pH vrednosti ledeniških sedimentov.....	29
Preglednica 4: Vlažnost vzorcev ledeniških sedimentov .....	30
Preglednica 5: Tekstura tal vzorcev ledeniških sedimentov.....	31
Preglednica 6: Delež ogljika in dušika ter razmerje C/N .....	32
Preglednica 7: Povprečne vrednosti absorbanč pri 600, 365, 280 in 250 nm ter razmerje absorbanč pri 365 in 250 nm s standardnim odklonom.....	33
Preglednica 8: Povprečne vrednosti količine reduktivnih sladkorjev v 5 ml vzorca.....	34
Preglednica 9: Komponente okolja, ki najbolj razložijo variabilnost opaženo v strukturi in aktivnosti mikrobnih združb .....	39

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Prikaz analize povprečnih mesečnih temperatur od leta 1988 do leta 2009 na otočju Svalbard (eKlima, 2010)

Priloga B: pH vzorcev ledeniških sedimentov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>16S rRNK</b>	ribonukleinska kislina male podenote ribosoma
<b>bp</b>	bazni par
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin ( <i>angl.</i> bovine serum albumin)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilirana voda
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleotid
<b>FDA</b>	fluorescin diacetat
<b>GPS</b>	sistem globalnega določanja položaja ( <i>angl.</i> global positioning system)
<b>kb</b>	kilobaza
<b>MWI</b>	indeks molekulske teže ( <i>angl.</i> molecular weight index)
<b>PAHBAH</b>	hidrazid parahidroksibenzojske kisline
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl.</i> polymerase chain reaction)
<b>R<sub>2</sub>A</b>	gojišče iz kvasnega ekstrakta, peptona, kazein hidrolizata, glukoze, topnega škroba in natrijevega piruvata
<b>T-RFLP</b>	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov ( <i>angl.</i> terminal restriction fragment length polymorphism)
<b>TTC</b>	2,3,5-trifeniltetrazolium klorid
<b>TTF</b>	2,3,5-trifeniltetrazolium formazan

## 1 UVOD

### 1.1 NAMEN DELA

Z ločenimi meritvami strukture ali aktivnosti ali velikosti mikrobnih populacij ne moremo zagotoviti razumevanja delovanja mikrobnih združb v okolju. Z določanjem medsebojne soodvisnosti ter stopnje korelacije posameznih setov podatkov pa lahko zgradimo statistično podprte modele okolja. Z njimi lahko v prvi fazi razložimo variabilnost v spremljanih mikrobnih parametrih, ugotovimo, kateri okoljski dejavniki so za to z največjo verjetnostjo odgovorni, kar je podlaga za nadaljnje ciljne eksperimente namenjene potrjevanju ugotovljenih soodvisnosti.

Ledeniški sedimenti brez rastlinskega pokrova so zaradi svoje relativne manjše kompleksnosti v primerjavi z visoko produktivnimi talnimi sistemi zelo primerni modelni sistemi za raziskovanje povezav med mikrobno aktivnostjo in strukturo mikrobnih združb v odvisnosti od izmerjenih fizikalno-kemijskih parametrov okolja.

### 1.2 CILJI IN HIPOTEZE

#### CILJI

- izvesti odvzem reprezentativnih vzorcev v 1400 m dolgem transektu in
- določiti razdalje in prostorske koordinate med vzorčenimi točkami iz podatkov GPS
- izmeriti osnovne fizikalno-kemijske parametre (vlažnost, vsebnost ogljika, vsebnost dušika, razmerje ogljik/dušik, tekstura (5 frakcij), pH, vsebnost reduktivnih sladkorjev, molekulska teža molekul v raztopljeni organski snovi - MWI) v vzorcih sedimenta
- izmeriti mikrobno aktivnost s tremi različnimi tehnikami (dehidrogenazna aktivnost, hidroliza fluorescin-diacetata, redukcija resazurina)
- določiti strukturo bakterijskih mikrobnih združb preko tipizacije s polimorfizmom dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) genov za 16S rRNK bakterij

- ugotoviti ali, in če, kako različni fizikalno-kemijski dejavniki vplivajo na skupno mikrobno aktivnost in ali ti dejavniki vplivajo tudi na strukturo mikrobne združbe ter ali sta struktura in mikrobna aktivnost povezani.

#### DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo naslednje ničte hipoteze ( $H_0$ ):

1.  $H_0$ : fizikalno-kemijski parametri vzorcev se medsebojno ne bodo signifikantno razlikovali.
2.  $H_0$ : fizikalno-kemijski parametri in mikrobne aktivnosti niso medsebojno povezani.
3.  $H_0$ : fizikalno kemijski parametri in struktura mikrobnih združb niso medsebojno povezani.
4.  $H_0$ : struktura mikrobnih združb in mikrobna aktivnost nista medsebojno povezani.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 POLARNA OBMOČJA IN LEDENIKI

Arktika je področje, ki obdaja severni zemeljski tečaj in je omejena z julijsko izotermo 10 °C. Vključuje dele Rusije, Aljaske, Kanade, Grenlandije, Islandije, Laponske in Norveške s Svalbardom, ki ležijo na obalah Severnega ledenega morja oziroma Arktičnega oceana. Arktični ocean je večino leta prekrit z ledenimi ploskvami, debelimi nekaj metrov, ki pa se zaradi globalnega segrevanja vedno bolj tanjšajo, kar vpliva tudi na gibanje ledenikov na tem območju. Zime so mrzle, s temperaturami tudi do -40 °C, poletja pa so toplejša, a še vedno hladna. Zaradi vpliva morja je na obalnih predelih temperatura nekoliko višja (Wikipedia, 2010a).

Značilnost arktične zime je konstantna tema (polarna noč), mraz in stabilne vremenske razmere, medtem ko je za poletje značilna dolgotrajna osončenost, vlažnost in meglenost (Pivk, 2007).

Ledeniki in ledene ploskve pokrivajo približno 10 % Zemljine površine (Edwards in sod., 2010). Dolgo so veljali za abiotska okolja, toda nedavne študije kažejo, da so zelo dinamična okolja, kjer uspevajo različni mikroorganizmi, ki so aktivni kljub nizkim temperaturam (Stibal in Tranter, 2007; Larose in sod., 2009). Tekoča voda, bistvena za potek skoraj vseh bioloških procesov, je poleti na Arktičnih ledenikih dostopna več tednov ali mesecev. Hkrati pa se vetrni nanosi (mešanica organskega in anorganskega materiala ter mikrobne mase), ki se nalagajo na površju ledenika, segrevajo zaradi sončne svetlobe in posledično topijo sneg in led v svoji neposredni okolici. Pri tem nastanejo majhne vertikalne kriokonitske kotanje (navadno premera manj kot 1 m in manj kot 0,5 m globoke) napolnjene z vodo, kjer poteka večina mikrobne aktivnosti (Stibal in sod., 2008; Anesio in sod., 2009). Mikrobne združbe iz teh kotanj so dobro poznane in obsegajo predvsem fototrofne mikroorganizme, cianobakterije in mikroalge, ter heterotrofne bakterije (Stibal in Tranter, 2007).

### 2.1.1 Led in politermalni ledeniki

Ob sneženju se nekateri delci iz atmosfere ujamejo v novo padlem snegu, ki se preoblikuje v led in se skozi čas ohranjajo. Analize sredic ledeniškega ledu se lahko uporabi za določitev preteklih klimatskih sprememb, geoloških dogodkov in vpliva človeške dejavnosti. Ledeniški led ima drugačno morfologijo ledenih kristalov kot morski led, višje temperature (od -3 do -20 °C) in manjša nihanja v slanosti. Za ledeniški led so značilne nizke koncentracije kisika, hranil in svetlobe (Pivk, 2007).

Večina ledenikov na Svalbardu spada med politermalne ledenike. Najdemo jih tudi v kanadskem delu Arktike, Alpah, Kitajski, Aljaski, polarnem delu Rusije in še nekaterih področjih. Značilnost teh ledenikov je toplejši led v sredici ledenika (Hodgkins, 1997) in hladnejši led na površini, robu in koncu ledenika (Pälli, 2003). Bazalni led pod ledenikom se lahko zaradi pritiskov začne taliti. Subledeniška voda nastane iz supraledeniške vode, ki bazo ledenika doseže skozi ledeniške razpoke in kotanje, ter iz vode, ki nastane s trenjem in geotermalnim taljenjem ledu na bazi ledenika. Subledeniške vode sledijo strugi ledenika in reagirajo s skalami in sedimentom, ki ležijo pod njim in zaradi tega vsebujejo visoke koncentracije topljencev in sedimentnih delcev. Ko vode ponovno zamrznejo, vsebujejo subledeniški led zrnat sediment in tako ohrani podatke o geokemijskih in mikrobioloških pogojih v ledeniški strugi (Pivk, 2007).

Subledeniška okolja so težko dostopna za mikrobiološke analize zaradi globine ledu in zapletenega aseptičnega vzorčenja (Pälli, 2003). Kljub temu pa je ta bazalni led s sedimenti sčasoma izpostavljen na ledenškem robu in dostopnejši za analize.

Rezultati filogenetskih analiz genov za 16S rRNK bakterij iz ledeniških okolij so pokazale, da so pripadniki rodov *Methylobacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Spingomonas*, *Arthrobacter* in *Frigobacterium* prilagojeni na življenje in obstoj pri ekstremno nizkih temperaturah. (Miteva in sod., 2004).

### 2.1.2 Permafrost

Permafrost predstavlja prst, sediment ali kamnino s stalno temperaturo pod 0 °C, nahaja pa se pod aktivno plastjo zamrznjene prsti. Zavzema približno 25 % zemeljske površine. Najdemo ga na območju Severne Amerike, Evrazije in Antarktike. V Severni Sibiriji je permafrost globok tudi do 1500 metrov in star 3-4 milijone let (Hansen in sod., 2007). Zemlja je fiksirana z ledom in lahko vsebuje tudi nezmrznjeno vodo, ki omogoča transport snovi v permafrostu (prenos ionov, tekoče vode). Pri -1,5 °C pade delež vode na 5-6 % teže, pri -10 °C na 2-3 % in pri -20 °C na 1-2 % (Rivkina in sod., 2000).

V permafrostu najdemo veliko število različnih, več milijonov let starih mikroorganizmov. Iz sedimentov, ki so bili v zamrznjenem stanju daljše časovno obdobje, so izolirali žive aerobne in anaerobne mikroorganizme, cianobakterije, zelene alge, kvasovke in glive. Skupno število mikroorganizmov v permafrostu je okoli  $10^8$  celic/g, število živih mikroorganizmov pa od  $10^2$ - $10^6$  celic/g (Rivkina in sod., 2004).

Do nedavnega so domnevali, da imajo mikroorganizmi ujeti znotraj ledeniških vključkov začasno znižan nivo metabolizma, pri čemer metabolne aktivnosti ni ali pa je ni mogoče zaslediti. Poskusi merjenja vgradnje radioaktivnih substratov so pokazali značilne rastne krivulje, sorazmerne s temperaturo. V zamrznjeni zemlji so bakterijske celice in delci zemlje verjetno pokriti s tankim vodnim filmom, ki se pri -10 °C stanjša na 5 nm, kar omogoča celicam lažji dostop do hranil in izločanje odpadnih produktov z difuzijo (Rivkina in sod., 2000; Shi in sod., 1996).

### 2.1.3 Sedimenti

Sedimenti ali usedline so nesprijeti ostanki organskega in anorganskega detritnega in raztopljenega materiala. V diagenezi ohranijo nekatere značilnosti območja od koder izvirajo ter tekom ledeniškega transporta pridobijo druge (Schlesinger, 1997).

Sedimenti so kopenskega ali morsklega izvora. Kopenske, ki ostanejo v kontinentalnih bazenih in litificirajo v sedimentne kamnine, imenujemo terestrični. Morski sedimenti so pelaškega ali bentoškega izvora, nastali v biogeokemijskih procesih v oceanih. Po načinu nastanka so klastični, avtogeni ali biogeni (Smithson in sod., 2002).



Kot sediment lahko označimo tudi vse delce, ki se prenašajo s tokom in končno odložijo na dno vodnega telesa. Delci, ki potujejo s tokovi nadslojenega vodnega telesa, se s posedanjem izključujejo iz transporta oziroma kroženja hranil v vodnem stolpu, vstopajo pa v prehranski splet v sedimentu (Klemenčič, 2006).

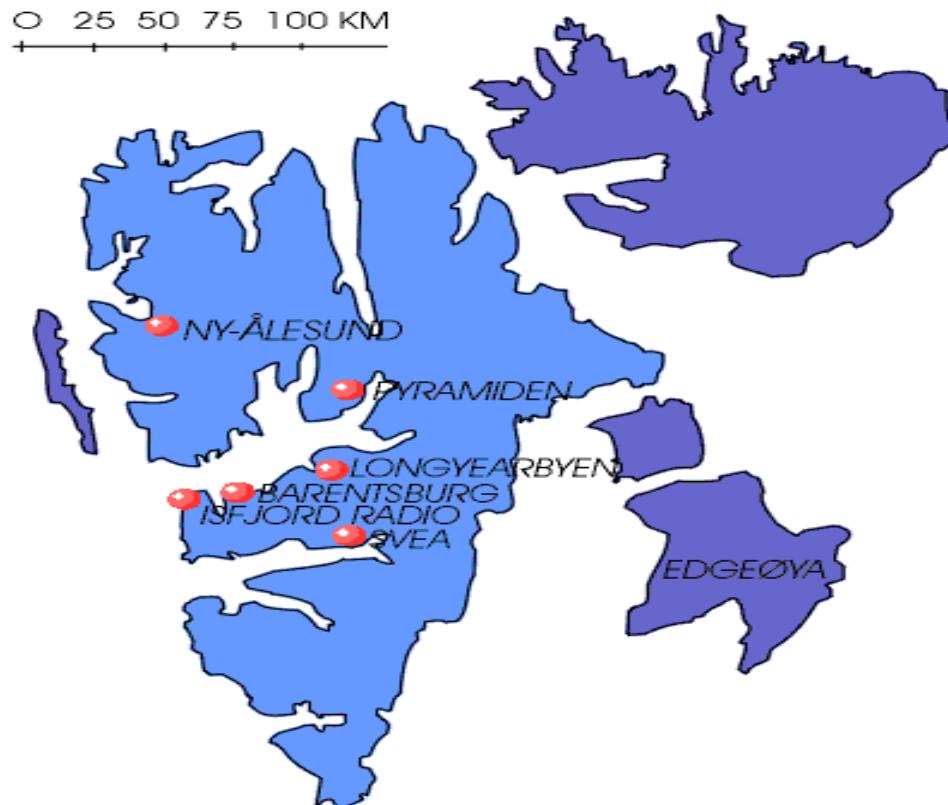
Sedimenti so kompleksni ekosistemi, spremenljivi v času in prostoru. Prostorska spremenljivost, ki jo povzročajo bioturbacija, bioirigacija, podvodno delovanje vulkanov in tektonski premiki, vpliva na porazdelitev potencialnih hranil in biološko aktivnost. Časovna spremenljivost pa se lahko kaže v nihanju količine organske snovi, ki pride v sediment ter spreminjanju strukture in aktivnosti sedimentne mikrobiote (Black in sod., 2002).

Morski sedimenti prekrivajo okoli 70 % zemljine površine in imajo pomembno vlogo pri globalnem kroženju ogljika in dušika (Llobet-Brossa, 1998). Morski sedimenti so nanosi netopnega materiala (kamenja in delcev prsti), ki se v morje prenesejo z vetrom, ledom ali rekami, prav tako pa so lahko ti depoziti posledica ostankov morskih organizmov, produktov podmorskih vulkanskih izbruhov in kemične precipitacije slane vode.

Obalni sedimenti imajo pomembno vlogo pri remineralizaciji organske snovi. Približno 32 do 46 % produktov primarne produkcije se odloži na morsko dno, kjer se večina materiala reoksidira s pomočjo prokariotov (Ravenschlag in sod., 1999).

## 2.2 SVALBARD

Svalbard (slika 1) je otočje v Arktičnem oceanu, ki leži severno od kopnega Evrope, na sredini med Norveško in Severnim polom. Obsega skupino otokov, ki se raztezajo od 74° do 81° severno in od 10° do 35° vzhodno. Otočje je najsevernejši del kraljevine Norveške. Poseljeni so trije otoki: Spitzbergen, Medvedji otok in Hopen, največje mesto pa je Longyearbyen. Otočje je veliko 61,022 km<sup>2</sup>, od tega je približno 60 % prekrita z ledeniki (CIA, 2010).



Slika 1: Arktično območje Svalbard, Norveška (Pivk, 2007)

### 2.2.1 Klima na otočju Svalbard

Severno Atlantski tok blaži arktično klimo Svalbarda. Povprečne poletne temperature so okoli 5 °C, zimske pa okoli -12 °C. Na zahodni obali so nekoliko višje temperature zaradi Severno Atlantskega toka. Severno Atlantski tok je tudi razlog za približno 20 °C višje temperature pozimi na Svalbardu kot v Rusiji ali Kanadi na podobni zemljepisni dolžini. Fjordi in doline v notranjosti, ki so obdane z gorami, imajo najtoplejša poletja in malo padavin .

Otočje Svalbard je stičišče mrzlega polarnega zraka iz severa in mokrega morskega zraka, zmernih temperatur, ki prihaja iz juga, kar povzroča nizek zračni pritisk ter posledično spreminjajoče vreme in močan veter. Poleti je zelo pogosta gosta megla. Padavine so pogoste, a padajo v manjših količinah (Statistics Norway, 2010).

Ozonska plast v stratosferi (plast atmosfere v višini med 15 in 50 km nad zemeljsko površino) je najmočnejša in najpomembnejša zaščita v Zemljini atmosferi pred sončevim sevanjem, predvsem pred ultravijoličnimi (UV) žarki. Ta plast predstavlja zaščito za vsa živa bitja na površju Zemlje in v zgornjih plasteh oceanov (Hansen in sod., 2005).

Leta 1980 je bilo nad Antarktiko opaženo močno zmanjšanje ozonske plasti in se z leti vedno bolj tanjša. Zaradi zmanjšane ozonske plasti, se je raven UV sevanja povečala tudi do ravni, ki je bila izmerjena v tropskih in subtropskih področjih. Podobna opažanja so bila ugotovljena tudi na območjih severne zemljepisne širine (Hansen in sod., 2005).

Na območjih višje zemljepisne širine je najvišja raven UV sevanja opažena v spomladanskih mesecih (april), najnižja pa v jesenskih mesecih. Normalno je raven UV sevanja na območjih višje zemljepisne širine relativno nizka, čeprav lahko nekateri dejavniki, kot na primer polnočno sonce, zvišajo raven sevanja. Najpomembnejši dejavnik intenzivnosti UV sevanja pa je pokritost z oblaki (Hansen in sod., 2005). Vse to ključno vpliva na aktivnost fototrofnih mikroorgnaizmov v morju in na kopnem, ter posledično na količino organskega ogljika uvedenega v ekosistem, kriokonitske kotanje ter vetrne nanose.

### **2.2.2 Fjord Kongsfjorden**

Kongsfjorden je 26,1 km dolg in 4 do 10 km širok fjord. Je eden največjih fjordov na severozahodni obali otočja Spitzbergen (Svalbard). V notranjem delu fjorda (največja globina 94 m) imajo močan vpliv ledeniški iztoki. Zunanji del (največja globina 350 m) pa je povezan z Grenlandskim morjem. Med obema deloma je plitva polica, globoka le 20 metrov (Elverhøi in sod., 1980). Hidroledeniške razmere se spreminjajo glede na sezono. Pozimi je količina vode konstantna, poleti pa pritok vode iz ledenikov in toplejše površje povzročita stratifikacijo v slanosti in temperaturi (Svendsen in sod., 2002). Količina in značilnosti vodne mase vplivata na položaj ledeniškega iztoka v vodnem stolpcu in na sedimentacijo (Zaborska in sod., 2006). Voda v fjordu je toplejša in manj slana kot v odprtem morju pri isti zemljepisni širini, s povprečno temperaturo okoli -5 °C in višjo pomladno-poletno temperaturo. Večinoma voda v fjordu ni zamrznjena, obalni del pa prekriva stabilna plast morskega ledu. Odočne zalive pokrivajo ledeniki in večina teh se

konča v morju, zaradi česar na površini fjorda skozi celo leto plavajo večji ali manjši kosi ledeniškega ledu (Ito in Koduh, 1997).

## 2.3 MIKROBNA AKTIVNOST IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE

Veliko je dokazov, da je bila Zemlja popolnoma prekrita z ledom več kot 10 milijonov let, ledeniški led pa je bil debel tudi preko 1 km (Kirschvink in sod., 2000). V tem obdobju so ledeni habitati služili kot biotsko zavetišče za mikroorganizme, podobne tistim, ki jih najdemo še danes na polarnih območjih. Kljub pomanjkanju svetlobe v subledeniških okoljih, aktivni mikroorganizmi kažejo določene oblike metabolizmov. Mikroskopske, biokemične in izotopske analize so pokazale, da med fazo rasti, ko je dovolj dostopne vode in hranil, subledeniški mikroorganizmi lahko vplivajo na kemijo ledeniške vode. Vir organskega ogljika v subledeniških sedimentih je permafrost, tla nastala s subledeniško abrazijo, in material, ki ga prinesejo na površje ledenika ledeniške kotanje in razpoke, ki ga tam ustvarijo primarni producenti ali prinese veter (Skidmore in sod., 2000). Organski material vsebuje preplete cianobakterij in alg. Pred kratkim je bilo dokazano, da tudi fototrofni mikroorganizmi (cianobakterije, alge) lahko preživijo v takem okolju. Ker del leta v času polarne noči ne morejo aktivno fotosintetizirati, predpostavljajo, da preidejo v fazo mirovanja ali oligotrofnega metabolizma, lahko tudi anabioze. Poleg vira organskega ogljika za avtohtono mikrobno populacijo, imajo lahko tudi aktivno vlogo – ko se ledenik odmakne in postanejo subledeniški sedimenti izpostavljeni sončni svetlobi, lahko ponovno naselijo poledeniška okolja (Kaštovska in sod., 2007).

### 2.3.1 Aktivnost mikrobne združbe v odvisnosti od fizikalno-kemijskih dejavnikov

Ledeniki in ledene plošče pokrivajo obsežen del območij na severni zemljepisni širini. Čeprav na videz delujejo brez življenja, danes vemo, da v supraledeniškem okolju najdemo bolj ali manj raznoliko mikrobno populacijo. Mikroorganizmi z različnimi oblikami metabolizma so aktivni tudi v subledeniških habitatih, kjer svetloba ni prisotna, psihrofili

pa naseljujejo celo razpoke med ledenimi kristali. Fotosintetski mikroorganizmi (cianobakterije in mikroalge) imajo pomembno vlogo primarnih producentov v osvetljenih okoljih (predledeniška tla in v vodi). Domnevno naj bi aktivne mikroorganizme našli tam, kjer je prisotna voda in naplavine. Mikrobne celice naj bi na ledeniško površje prišle z vetrom in vodo ter plazom kamnov iz okoliških hribov, kjer so pripete na mineralne in/ali organske delce. Mikrobne združbe se pojavljajo v treh tipih supraledeniških habitatov – kriokonitskih kotanjah, morenah in ledeniških dolinah (Foght in sod., 2003).

Razvoj mikrobnih združb v ledeniških okoljih je omejen z fizikalno-kemijskimi dejavniki. V kriokonitskih luknjah najdemo mikrobno aktivnost heterotrofnih bakterij, cianobakterij, mikroalg, mikrogliv in nematod. Nasprotno pa v morenah in ledeniških dolinah najdemo mikrobne združbe podobne tistim v tleh. Verjetno je, da različnost fizikalno-kemijskih dejavnikov v ledeniškem okolju vpliva na razvoj mikrobnih združb. Različen pH (4,8 v kriokonitskih razpokah; 8,5 na moreni), delež delcev in njihova tekstura (2 % suhe teže v kriokonitskih razpokah; 99 % suhe teže v ledeniški dolini), razmeroma nizka koncentracija organskega materiala (0,3 % suhe teže v ledeniški dolini; 22 % suhe teže v kriokonitskih razpokah) in nizka koncentracija hranil (dušik do 0,4 % suhe teže; fosfor do 0,8 % suhe teže) vplivajo na strukturo mikrobne združbe v tem okolju. V kriokonitskih razpokah se pojavlja največje število bakterij in alg, medtem ko je v moreni in ledeniški dolini to število precej manjše (Stibal in sod., 2006).

Statistično so sedimenti z višjo vsebnostjo vode najboljše okolje za bakterije, alge in cianobakterije. Opažen je bil tudi pozitiven vpliv nižjega pH na mikrobno rast. Zdi se, da je usoda mikroorganizmov bolj odvisna od fizikalno-kemijskih dejavnikov, kot od prostorskih dejavnikov ali izvora sedimenta (Stibal in sod., 2006).

### **2.3.2 Struktura mikrobne združbe**

Led je dolgo veljal za medij, v katerem se življenje ohranja v metabolno neaktivni obliki. Danes veljajo ledeniki za ekosistem, v katerem najdemo mikroorganizme, ki rastejo tudi pri tako nizkih temperaturah (Stibal in Tranter, 2007). Z razvojem molekularnih tehnik, ki temeljijo na preučevanju sekvenc 16S rDNK, se je močno izboljšalo znanje o aktivnosti in raznolikosti morskih pelaških in bentoških ter ledeniških mikrobnih združb. Analiza večine

novih sekvenc gena 16S rDNK, pridobljenih tako iz vodnega stolpa kot iz morskih sedimentov, je pokazala, da večina vrst sploh še ni bila gojena (Ravenschlag in sod., 2001). Razumevanje mikrobnih združb na površju ledenikov in njihovi bližini pa je šele v zadnjem času središče pozornosti zaradi ugotovljenih povezav z globalnim transportom prašnih delcev na dolge razdalje.

Mikroorganizme, ki so prilagojeni na življenje pri nizkih temperaturah imenujemo psihrofilni ali psihrotolerantni mikroorganizmi. Razlika med njima je, da psihrotolerantni mikroorganizmi po definiciji rastejo tudi pri temperaturah blizu točke ledišča vode, ampak je rast hitrejša pri temperaturah nad 20 °C, medtem ko psihrofili rastejo hitreje pri temperaturah pod 15° C, vendar niso sposobni rasti pri temperaturah nad 20° C (Deegenaars in Watson, 1998). Zaradi številnih selektivnih pritiskov se je razvila edinstvena mikroba združba. V starem ledu je psihrofilnih mikroorganizmov več kot 90 %, medtem ko jih je v vzorcih mlajšega ledu, ki je bil v stiku z morskovo vodo in sedimentom le 21 %, kar pomeni, da se s starostjo ledeniškega ledu povečuje številko psihrofilov. Psihrotolerantni mikroorganizmi prevladujejo predvsem v mikrobnih združbi ledu, ki je nastal s kristalizacijo morske vode (Bowman in sod., 1997). Rast pri tako nizkih temperaturah mikroorganizmom omogoča nekaj fizioloških značilnosti, kot na primer formacija spor, pigmentacija, povečana fluidnost membrane ter produkcija encimov, aktivnih pri nizkih temperaturah (Amato in sod., 2006).

Rezultati filogenetskih analiz genov za 16S rRNK bakterij iz ledeniških okolij so pokazale, da so pripadniki rodov *Methylobacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Spingomonas*, *Arthrobacter* in *Frigobacterium* prilagojeni na življenje in obstoj pri ekstremno nizkih temperaturah (Miteva in sod., 2004).

Ravenschlag in sodelavci so ugotovili, da je v vzorcu sedimenta iz Smeerenburgfjorda sulfatnih reducentov 16 % celotnega števila celic in 29 % celotne prokariotske rRNK. Druge večje filogenetske skupine so bile  $\beta$ - in  $\delta$ -proteobakterije, *Cytophaga-Flavobacterium*, *Planctomycetales* in gram-pozitivne bakterije (Ravenschlag in sod., 2001).

Kaštovksa in sodelavci (2005) so raziskovali strukturo mikrobne združbe dveh ledenikov na Svalbardu. V subledenških sedimentih, vzorcih iz površja ledenika in sedimentih iz

kriokonitskih kotanj so odkrili žive bakterije, cianobakterije in mikroalge. V subledeniških sedimentih in vzorcih iz površja ledenika je bilo število mikroorganizmov podobno majhno, medtem ko je bilo v vzorcih iz kriokonitskih sedimentov in sedimentov z rastlinskim pokrovom število večje. Najpogostejši so bili predstavniki rodu *Leptolyngbya*, *Chlorella* in *Klebaormidium* (cianobakterije) ter alge iz razreda Chlorophyceae. (Kaštovska in sod., 2007; Kaštovska in sod., 2005).

Največje število cianobakterij in alg je bilo v kriokonitskih sedimentih ( $13 \times 10^4 \mu\text{m}^3 \text{mg}^{-1}$ ), sledijo vzorci iz nerodovitne zemlje ( $5,7 \times 10^4 \mu\text{m}^3 \text{mg}^{-1}$ ), vzorci vzeti iz zemlje z rastlinskim pokrovom ( $2,6 \times 10^4 \mu\text{m}^3 \text{mg}^{-1}$ ), najmanj pa v subledeniških sedimentih ( $0,1 \times 10^4 \mu\text{m}^3 \text{mg}^{-1}$ ). V vseh vzorcih so prevladovalе cianobakterije, medtem ko so alge bile prisotne v manjšem številu. Število bakterij je kazalo drugačen trend kot pri cianobakterijah in algah. Največ jih je bilo v vzorcih vzeti iz zemlje z rastlinskim pokrovom ( $13,722 \times 10^8 \text{ celic/mg suhih tal}$ ), nato v kriokonitskih sedimentih ( $3802 \times 10^8 \text{ celic/mg suhih tal}$ ), nerodoviti zemlji ( $654 \times 10^8 \text{ celic/mg suhih tal}$ ), najmanj pa v subledeniških sedimentih ( $78 \times 10^8 \text{ celic/mg suhih tal}$ ). Največja raznolikost cianobakterij in alg je bila v vzorcih sedimenta iz kriokonitskih kotanj. Iz vseh raziskav je očitno, da so kriokonitske kotanje najugodnejše za razvoj mikrobnih združb, navkljub temu, da so podvržene vsem zunanjim spremembam, vremenskim vplivom (osvetljenost, debelina snežne odeje, frekvenca in vrsta padavin, delež prašnih delcev, smer, hitrost, turbulenca vetra). Čeprav subledeniški sedimenti ne ponujajo najugodnejših pogojev, lahko mikroorganizmi tam prav tako preživijo (Kaštovska in sod., 2005).

Analiza povezave fizikalno-kemijskih parametrov in količina biomase cianobakterij in alg je pokazala, da sta zelo pomembna tekstura in vsebnost vode sedimenta, medtem ko na število bakterij najbolj vplivata vsebnost dušika in vode (Kaštovska in sod., 2005).

Zavedati se je potrebno, da mikrobnih združb v tem okolju ne predstavljajo zgolj primarni producenti, temveč kompleksna združba avto- in hetero-trofnih mikroorganizmov.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### a) Reagenti

- dH<sub>2</sub>O
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix, #SMO333 in #SMO248 (MBI Fermentas, Litva)
- agaroz (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- TAMRA 1000 fragment length standard (PE Biosystems, UK)
- etanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- metanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- FDA- fluorescein diacetat
- MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Litva)
- Na- acetat (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- dNTP set (MBI Fermentas, Litva)
- glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- PAHBAH (hidrazid parahidroksi benzojeva kislina, Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- deioniziran formamid (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- resazurin (CellTiter-Blue™, Promega Corporation)
- aceton (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- NaOH (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- CaCl<sub>2</sub> (Bethesda Research Laboratories)
- Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Na citrat (Kemika, Zagreb, Hrvaška)



b) Naprave

- pH-meter
- Centrifuga
- Elektroforeza
- Aparat za verižno reakcijo s polimerazo
- Spektrofotometer
- Čitalec mikrotiterskih plošč
- Kapilarna elektroforeza ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Inc.)
- UV-transiluminator
- Analizator CNHS

c) Kompleti

- UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Solana Beach, California)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

d) Pufri in druge raztopine

- etidijev bromid
- TAE pufer
- kalij-fosfatni pufer ( $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ )
- nalagalni pufer za gelsko elektroforezo- LB (MBI Fermentas, Litva)

e) Encimi

- Taq polimeraza s pripadajočim 10x pufrom B in  $MgCl_2$  (Promega, Madison, WI, ZDA)
- *HhaI* s pripadajočimi pufri (MBI Fermentas, Litva)

f) Začetni oligonukleotidi

- 6-FAM-27f     5' 6-FAM-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' ,  $T_m=51,6^\circ C$ ,
- 927R            5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3' ,  $T_m=46,5^\circ C$

### 3.2 SVALBARD

Na spletni strani Statističnega urada Norveške in eKlima smo poiskali podatke o temperaturah in količini padavin na otočju Svalbard. Podatki o povprečnih letnih temperaturah so bili zabeleženi vse od leta 1988 pa do leta 2009, za količino padavin pa prav tako od leta 1988, a le do leta 2004. Tako za temperaturo kot količino padavin, so bili podatki podani za vsak mesec v letu, v naših rezultatih so predstavljene mesečne vrednosti in povprečne letne vrednosti (Statistics Norway, 2010; eKlima, 2010).

### 3.3 VZORČENJE

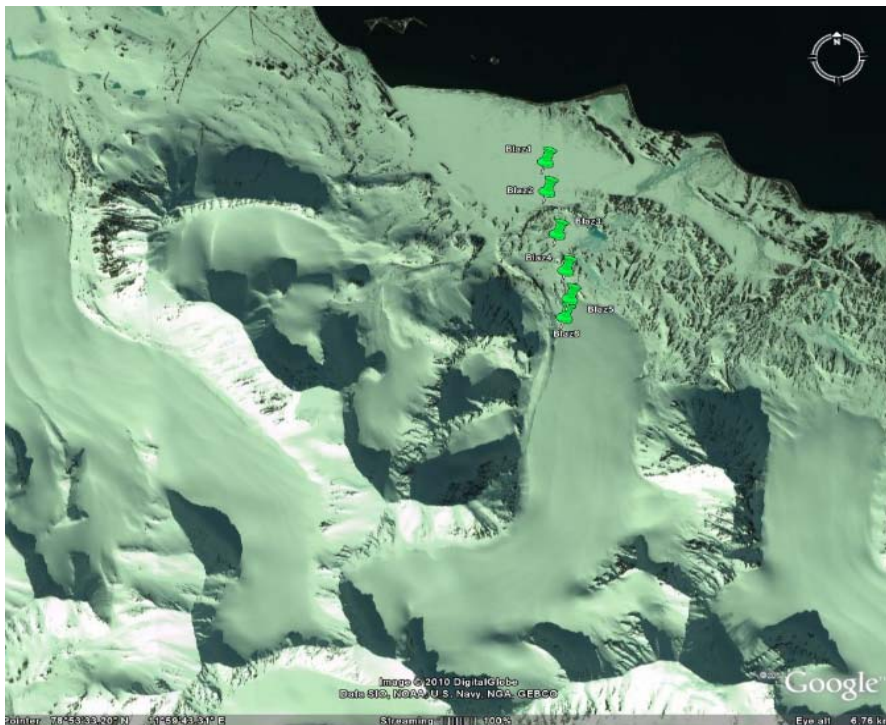
Vzorčenje na otoku Svalbard je potekalo julija 2008. Vzorčili smo šest različnih mest v 1400 m dolgem transektu, in sicer:

- mesto 1 – material ob ledeniku (na moreni),
- mesto 2 – površje ledenika (ves material – ledeniški in nanesen z vetrom),
- mesto 3 – dno ledenika,
- mesto 4 – prehodno območje 1,
- mesto 5 – prehodno območje 2 in
- mesto 6 – morski sediment

Na treh lokacijah znotraj posamezne točke transekta smo odvzeli po 300 g sedimenta za posamezno ponovitev lokacije. Vsaka ponovitev je bila sestavljena iz devetih točk, ki so bile združene. Vzorce smo shranili po vzorčenju pri  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  do začetka analiz.

Preglednica 1: GPS koordinate mest vzorčenja

Oznaka mesta vzorčenja	Koordinate
1	78° 54' 29,70" N, 12° 2' 11,16" E
2	78° 54' 20,70" N, 12° 2' 11,28" E
3	78° 54' 7,68" N, 12° 2' 23,64" E
4	78° 53' 56,52" N, 12° 2' 33,48" E
5	78° 53' 47,88" N, 12° 2' 37,74" E
6	78° 53' 42,30" N, 12° 2' 28,50" E



Slika 2: Satelitska slika mest vzorčenja na otoku Spitzbergen (Google maps, 2010).

Približne razdalje med točkami vzorčenja:

- razdalja med točko 1 in 2 – 350m
- razdalja med točko 2 in 3 – 400m
- razdalja med točko 3 in 4 – 350m
- razdalja med točko 4 in 5 – 250m
- razdalja med točko 5 in 6 – 180m

### 3.4 pH VZORCEV

pH ima velik vpliv na biokemijske lastnosti znotraj in zunaj celičnih encimov, na pH gradient med notranjostjo in zunanostjo celic, topnost mineralov v tleh, obliko amonijskega dušika in topnost  $\text{CO}_2$ . Določali smo aktivno kislost (dejanska kislost) sedimenta. Za določanje kislosti smo v stekleno čašo zatehtali 10 g vzorca, dodali  $\text{dH}_2\text{O}$ , premešali in po 30 min pH določili s pH-metrom. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah.

### 3.5 VLAŽNOST

Vlažnost sedimenta opisuje trenutno vodno stanje sedimenta, saj se vlažnost spreminja glede na vremenske razmere in letni čas. Najprej smo stehtali mikrocentrifugirke, v katere smo dali svež sediment in jih ponovno stehtali. Maso posušenega sedimenta smo določili po sušenju v pečici na 60 °C preko noči in ponovnem tehtanju. Delali smo v treh ponovitvah. Vlažnost smo izračunali po formuli:

$$\%Vlažnosti = \frac{(m_{tal} - m_{suhih\_tal})}{m_{suhital}} \cdot 100 \quad \dots (1)$$

$m_{tal}$  = masa tal

$m_{suhih\ tal}$  = masa suhih tal

### 3.6 TEKSTURA

V infuzijsko stekleničko smo zatehtali 10 g sedimenta in dodali 50 ml 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Stekleničko smo zamašili in inkubirali 12 ur. Infuzijsko stekleničko smo stresali 3 ure. Na lijak smo vstavili sito in ga postavili v valj. Vsebino stekleničke smo prenesli na sito in spirali z destilirano vodo, dokler niso na situ ostali le delci večji od 0,2 mm. Ostanek na situ smo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič. Suspenziji v valju smo dodali destilirano vodo do 1000 ml. Valj smo zamašili in stresali 3 minute. Nato smo postavili valj na mizo in pustili, da delci sedimentirajo. Po 44 sekundah smo iz globine 10 cm odpipetirali 10 ml suspenzije in jo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič – 1. frakcija. Potem smo valj spet stresali 3 minute in po 4min 27sek usedanja ponovili postopek vzorčenja – 2. frakcija. Valj smo znova stresali 3min in po 7 urah 35 minutah odpipetirali 3. frakcijo. Vse tehtiče (delci s sita in 3 frakcije) smo dali v pečico na 105 °C. Po sušenju smo tehtiče stehtali in dobili maso posameznih frakcij v 10 ml vzorca. Delali smo v treh ponovitvah. Material na situ (a) predstavlja delce > 0,2 mm (grobi pesek, GP). Prva frakcija (b) predstavlja delce < 0,05 mm (grobi in fini melj ter glina, GM, FM, G), druga frakcija (c) delce < 0,02 mm (fini melj in glina, FM, G) in tretja frakcija (d) delce < 0,002 mm (glina, G) (Stres, 2007).

Delež posameznih frakcij smo izračunali po naslednjih formulah:

$$\% GP = (a/10) * 100$$

$$\% G = ((d-0,01)/0,1) * 100$$

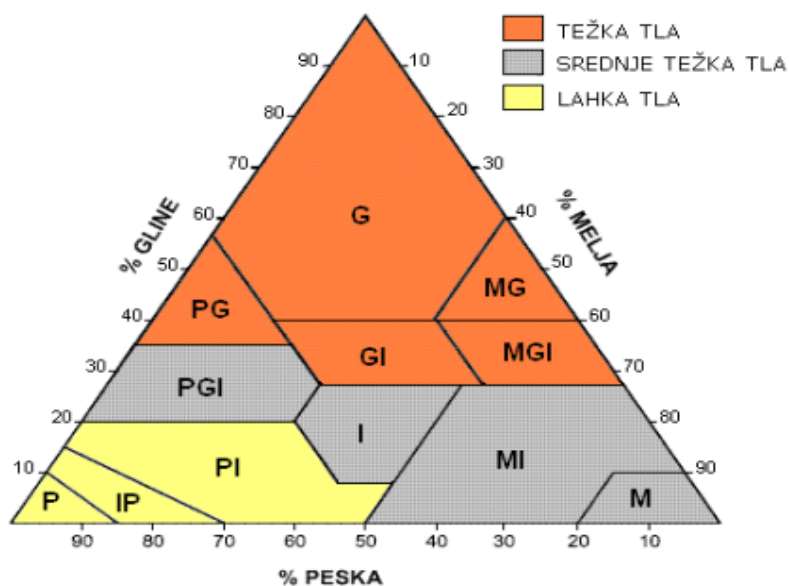
$$\% FM = ((c-d)/0,1) * 100$$

$$\% GM = ((b-c)/0,1) * 100$$

$$\% FP = 100 - (\% GP) - (\% GM) - (\% FM) - (\% G)$$

$$\% P = \% GP + \% FP$$

$$\% M = \% FM + \% GM$$



Slika 3: Teksturni trikotnik tal (Wikipedia, 2010b).

### 3.7 VSEBNOST OGLJIKA IN DUŠIKA

Mikrocentrifugirke smo napolnili z vzorci sedimenta iz vsakega mesta vzorčenja ter jih sušili čez noč na 60 °C. Naslednji dan smo vsebino mikrocentrifugirk stresli v terilnico, da je nastal droben prah, ki smo ga prenesli v sveže mikrocentrifugirke ter jih shranili na -4 °C. Take smo potem poslali na analizo s CHNS analizatorjem (Center za pedologijo).

### 3.8 MOLEKULSKA TEŽA MOLEKUL V RAZTOPLJENI ORGANSKI SNOVI (MWI)

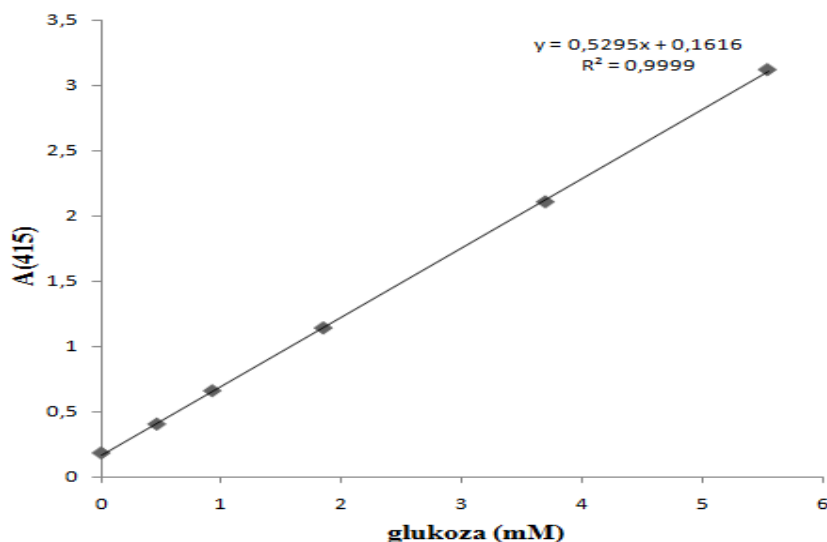
Molekulsko težo molekul v raztopljeni organski snovi smo določili tako, da smo 5 g sedimenta dodali 5 ml vode. Po 20 minutah stresanja pri 150 rpm pri sobni temperaturi smo centrifugirali (10 minut, 1500 obratov/min) ter vzorce prenesli v steklene kivete. Izmerili smo absorbanco s spektrofotometrom (valovne dolžine spektra od 200 nm do 800 nm), glede na slepi vzorec, ki je bil voda (Stres in sod., 2010). Višji kot je indeks, manjša je molekulska teža molekul (Osburn in sod., 2001).

### 3.9 DOLOČANJE REDUKCIJSKIH SLADKORJEV

Postopek smo izvedli po Leverju (Lever, 1977). To je metoda, ki temelji na sproščanju redukcijskih sladkorjev (glukoza, fruktoza, saharoza, ...) in razvoju barve, ki se pojavi pri reakciji med reagentom PAHBAH in sladkorji. Gre za derivat benzojeve kisline, ki se ob redukciji obarva rumeno. Intenziteta barve je sorazmerna s koncentracijo skupnih sladkorjev. Sproščene sladkorje smo merili spektrofotometrično.

Vsebnost reduktivne glukoze v vzorcih sedimenta je bila določena v ekstraktu hladne vode (razmerje 1:1) (Stres in sod., 2010).

Ko smo pripravili reagent PAHBAH (treba ga je pripraviti svežega, saj je obstojen le eno uro), smo ga razdelili po 1 ml v mikrocentrifugirke in dodali 20 µl vzorca (10 g sedimenta in 20 ml destilirane vode). Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali v vodni kopeli na 100 °C 10 min. Ko smo vzorce ohladili, smo prenesli po 300 µl v mikrotitrsko ploščico in s čitalcem spektrofotometrično izmerili intenziteto rumene barve pri 415 nm. Poskus smo delali v treh ponovitvah. Iz standardnih raztopin glukoze (0; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM; 6 mM) smo po istem postopku naredili umeritveno krivuljo.



Slika 4: Absorbanca vzorcev ledeniških sedimentov pri 415 nm v odvisnosti od koncentracije glukoze

Preglednica 2: Reagenčna mešanica PAHBAH

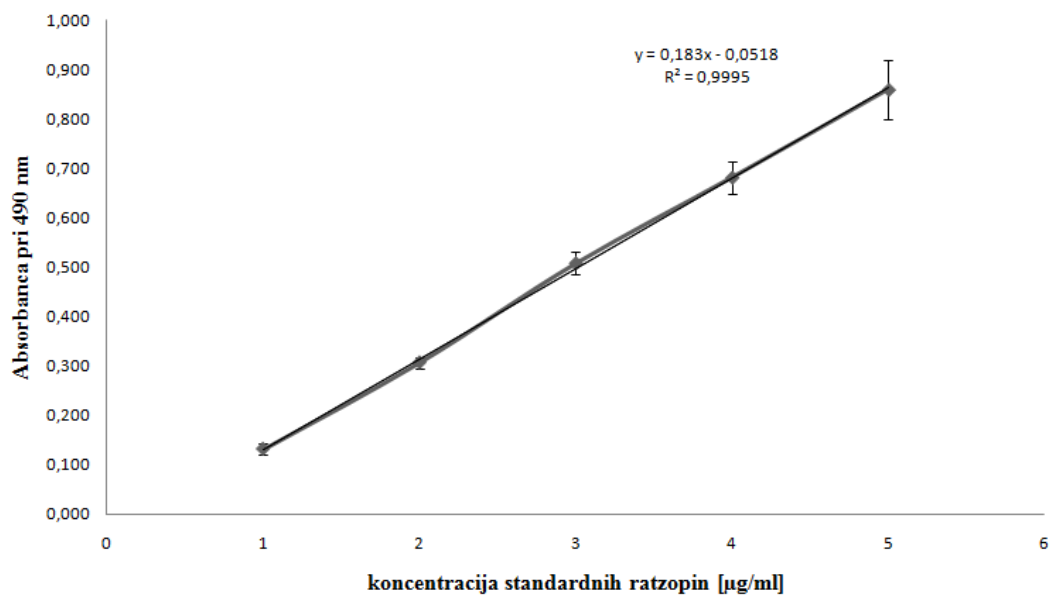
Sestavina	Delež
1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	5 % (v/v)
0,5 M Na-citrat	5 % (v/v)
5 M NaOH	5 % (v/v)
destilirana voda	80 % (v/v)
0,2 M CaCl <sub>2</sub>	5 % (v/v) po kapljicah

### 3.10 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCIN DIACETATOM (FDA)

Mikrobno aktivnost s fluorescin diacetatom smo ugotavljali s postopkom po Adamu (Adam in Duncan, 2000). Prosti in membransko vezani encimi (ne specifične esteraze, proteaze in lipaze) hidrolizirajo brezbarvni fluorescein diacetat do obarvanega končnega produkta fluoresceina, ki ga lahko merimo sprektrofotometrično (Adam in Duncan, 2000). Dva grama vzorca smo zatehtali v 50 ml stekleničke in dodali 15 ml 60 mM kalij fosfatnega pufra. Za začetek poteka reakcije smo dodali še 0,2 ml raztopine 1000 µg FDA ml<sup>-1</sup>. Pripravili so tudi kontrolo – brez dodatka FDA. Stekleničke smo nato ročno premešali in inkubirali 40 minut na sobni temperaturi.

Po 40 minutah smo v digestoriju v vsako stekleničko dolili 15 ml mešanice kloroform/metanol v razmerju 1:2 in premešali. S tem smo ustavili nadaljnji potek reakcije. Vsebino smo prenesli v steklene epruvete in izmerili absorbanco na spektrofotometru pri 490 nm. Delali smo v treh ponovitvah.

Za umeritveno krivuljo smo iz standardne raztopine  $20 \mu\text{g fluorescein ml}^{-1}$  pripravili standardne raztopine koncentracij  $1-5 \mu\text{g fluorescein ml}^{-1}$  in izmerili absorbanco pri 490 nm.



Slika 5: Umeritvena krivulja za izračun mikrobnosti s fluorescein diacetatom

### 3.11 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI Z REDUKCIJO RESAZURINA

Resazurin ima vlogo kolorimetričnega in/ali fluorimetričnega indikatorja in se uporablja za določanje živih celic. Barvilo resazurin (modre barve) meri metabolično kapaciteto celic (Riss in Moravec, 2003). Kuda in Yano (2003) navajata, da je redukcija resazurina v resorufin posledica kemične redukcije gojišča zaradi metabolne aktivnosti mikroorganizmov. Resazurin se reducira v celici in difundira v gojišče. Resazurin lahko reducirajo različni mitohondrialni, citosolni in mikrosomalni encimi (Riss in Moravec, 2003).



Pri tem testu je resazurin (modre barve) reduciran do resorufina (roza barve). Zatehtali smo 0,5 g vzorca, dodali 250 µl gojišča R<sub>2</sub>A (Edwards in sod., 2006) in 600 µl dH<sub>2</sub>O. Kontrola je vsebovala dH<sub>2</sub>O namesto vzorca. Vzorce smo ekvilibrirali v vodni kopeli na 30 °C. Po 10 minutah smo dodali 100 µl resazurina in inkubirali na 30 °C dokler se modra barva ni spremenila do roza. Nato smo vzorce centrifugirali (90 sekund, 10000 obratov), da smo odstranili delce sedimenta. Supernatant (200 µl) smo prenesli na mikrotitersko ploščo in izmerili absorbanco pri 600 nm. Poskus smo delali v treh ponovitvah in dveh paralelkah. Skupno mikrobnost smo opredelili kot procent reduciranega resazurina, po formuli:

$$\% \text{ reduciranega resazurina} = \frac{(117,216) A_{600} - (80,586) A_{570}}{(155,677) A_{600} - (14,652) A_{570}} \dots (2)$$

117,216 = molarni ekstinkcijski koeficient resazurina v okridirani obliki pri 600 nm

80,586 = molarni ekstinkcijski koeficient resazurina v okridirani obliki pri 570 nm

14,652 = molarni ekstinkcijski koeficient resazurina v reducirani obliki (resorufin) pri 600 nm

155,677 = molarni ekstinkcijski koeficient resazurina v reducirani obliki (resorufin) pri 570 nm

A<sub>600</sub> = absorbcija vzorcev pri 600 nm

A<sub>570</sub> = absorbcija vzorcev pri 570 nm

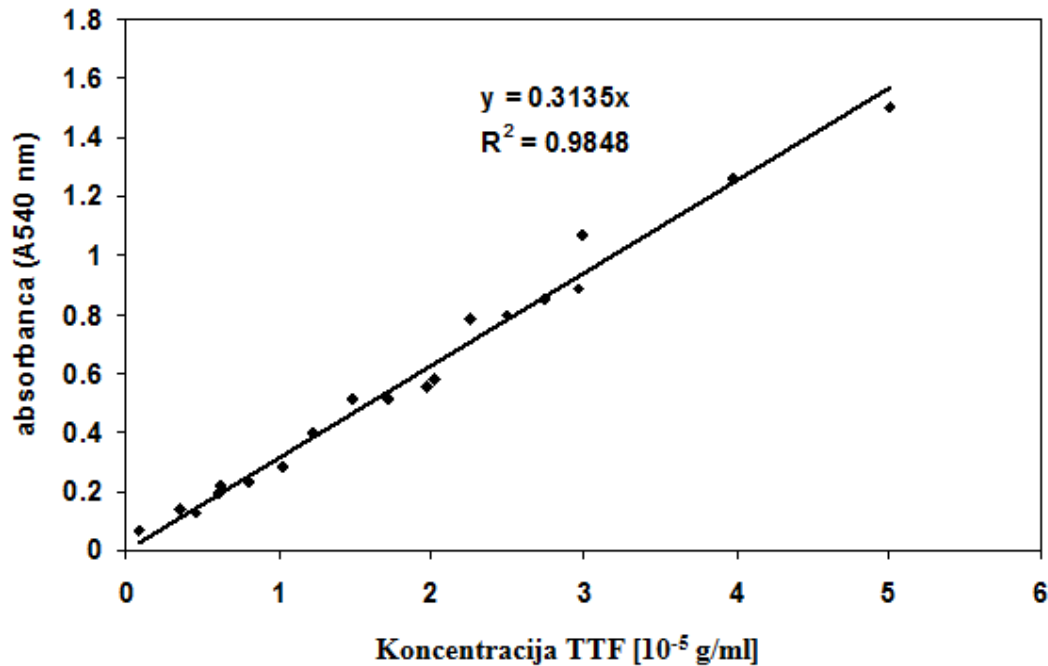
A'<sub>600</sub> = absorbcija slepe probe pri 600 nm

A'<sub>570</sub> = absorbcija slepe probe pri 570 nm

### 3.12 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI Z DEHIDROGENAZNO AKTIVNOSTJO

Dehidrogenazni encimi sodelujejo v reakcijah Krebsovega cikla in drugih reakcijah celičnega metabolizma. Njihovo aktivnost, redukcija TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium klorid) do TTF (2,3,5-trifeniltetrazolium formazan), merimo spektrofotometrično. Zatehtali smo 0,5 g vzorca, 100 µl dH<sub>2</sub>O (eksperimentalna), 500 µl fiziološke raztopine in 700 µl 1 % TTC. Kontrola je vsebovala dH<sub>2</sub>O namesto vzorca. Vzorce smo inkubirali preko noči v vodni kopeli na 30 °C. Po inkubaciji smo nastali TTF ekstrahirali z dodatkom 5 ml acetona

v vsako centrifugirko in jo pretresli. Inkubirali smo 2 uri na sobni temperaturi v temi. Centrifugirke smo vsakih 10 minut pretresli. Po dveh urah inkubacije smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 540 nm. Delali smo v treh ponovitvah.



Slika 6: Odvisnost absorbance raztopine TTF v acetonu od njene koncentracije

### 3.13 IZOLACIJA DNK IN AGARozNA ELEKTROFOREZA

DNK smo izolirali iz vzorcev velikosti 0,5 g sedimenta s kompletom Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit po navodilih proizvajalca za maksimalen izplen DNK. Delali smo v treh ponovitvah. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu.

Pri pripravi 1 % agaroznega gela smo uporabili agarozo in 0,5x TAE pufer. Preden smo vzorce nanegli na gel, smo jim dodali 1/5 volumna nanašalnega barvila (Loading Dye), za standard pa smo uporabili fragmente znanih dolžin (1kb lestvico). Po dokončani elektroforezi, ki je potekala približno 45 minut pri napetosti 80 V, smo gel inkubirali v vodni raztopini etidijevega bromida za 10 minut pri sobni temperaturi, nato pa ga še spirali v vodi 10 minut. Po spiranju smo gel osvetlili z UV-transiluminatorjem in ga fotografirali.

### 3.14 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnoževali bakterijske gene za 16S rRNK, to je malih ribosomskih podenot. V reakciji smo uporabili začetni oligonukleotid 27f označen s fluorokromom 6-FAM, in začetni oligonukleotid 927R. Za pomnoževanje v 25  $\mu$ l reakciji smo uporabili:

- 2,5  $\mu$ l pufra za polimerazo 10x
- 2,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25mM)
- 0,25  $\mu$ l formamida (100 %)
- 0,5  $\mu$ l BSA (10mg/ml)
- 0,5  $\mu$ l dNTP (10mM)
- 0,5  $\mu$ l 6-FAM-27f oligonukleotida (10 $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l 927R oligonukleotida (10 $\mu$ M)
- 16,55  $\mu$ l sterilne MiliQ vode
- 0,2 Taq polimeraze (5U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l izolirane DNK (100x redčena)

Pomnoževanje smo izvedli po sledečem protokolu:

- začetna denaturacija pri 95 °C
  - denaturacija pri 95 °C, 1min
  - prileganje pri 53 °C, 1min
  - podaljševanje pri 72 °C, 1min
  - končno podaljševanje pri 72 °C, 10min
  - hlajenje pri 4 °C
- 35 ciklov

Za vsako DNK smo izvedli dve reakciji PCR, delali smo v dveh ponovitvah. Po pomnožitvi smo reakcije PCR združili, premešali in alikvotne analizirali z gelsko elektroforezo (1 % agarozni gel). S tem smo potrdili ustrezno čistost in velikost pomnožkov.

### 3.15 RESTRIKCIJA

Naredili smo dve ločeni restrikcijski mešanici, ki sta vsebovali pufer za encim (3  $\mu$ l za eno reakcijo), restrikcijski encim *HhaI* oziroma *TaqI* (1  $\mu$ l za eno reakcijo) in dH<sub>2</sub>O (do 30  $\mu$ l za eno reakcijo). Na koncu smo dodali še pomnožek PCR (10  $\mu$ l za eno reakcijo – tako, da je bilo približno 200 ng produkta na restrikcijsko reakcijo). Rezanje je potekalo preko noči na 37 °C, nato pa smo mešanico inaktivirali pri 80 °C, 15 min.

Restrikcijske mešanice smo očistili z etanolno precipitacijo. Dodali smo 1/10 volumna mešanice (3  $\mu$ l) 3M Na-acetata in premešali vsebino. Nato smo dodali 2 volumna (66  $\mu$ l) ledeno hladnega 100 % etanola. Po 30 minutni inkubaciji na ledu smo mešanice centrifugirali 30 minut pri 0 °C pri 13.000g. Odstranili smo supernatant in dodali 500 ml ledeno hladnega 70 % etanola ter centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 13000 g. Zopet smo odstranili supernatant in oborjeno DNK posušili ob ognju v laminariju. Vzorce smo shranili v temi pri -20 °C.

### 3.16 IZVEDBA T-RFLP

Razrezanim in z etanolno precipitacijo očiščenim PCR pomnožkom smo dodali 0,5  $\mu$ l DNK standarda (TAMRA 1000 fragment length standard, PE Biosystems) in 10  $\mu$ l deioniziranega formamida. Pred analizo smo vzorce denaturirali 2 minuti pri 95 °C in jih takoj ohladili na ledu. Po 2,5  $\mu$ l smo pod standardnimi pogoji proizvajalca elektrokinetično injicirali v kapilarno elektroforezo ABI 3130XL.

### 3.17 ANALIZA T-RFLP PROFILOV

Podatke pridobljene s kapilarno elektroforezo smo analizirali s pomočjo programa BioNumerics. Da bi primerjali podobnosti med profili T-RFLP posameznih vzorcev smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije. Za izris dreves podobnosti ali dendrogramov smo uporabili metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means, slovensko neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino).

### 3.18 ODVISNOST AKTIVNOSTI IN STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH DEJAVNIKOV

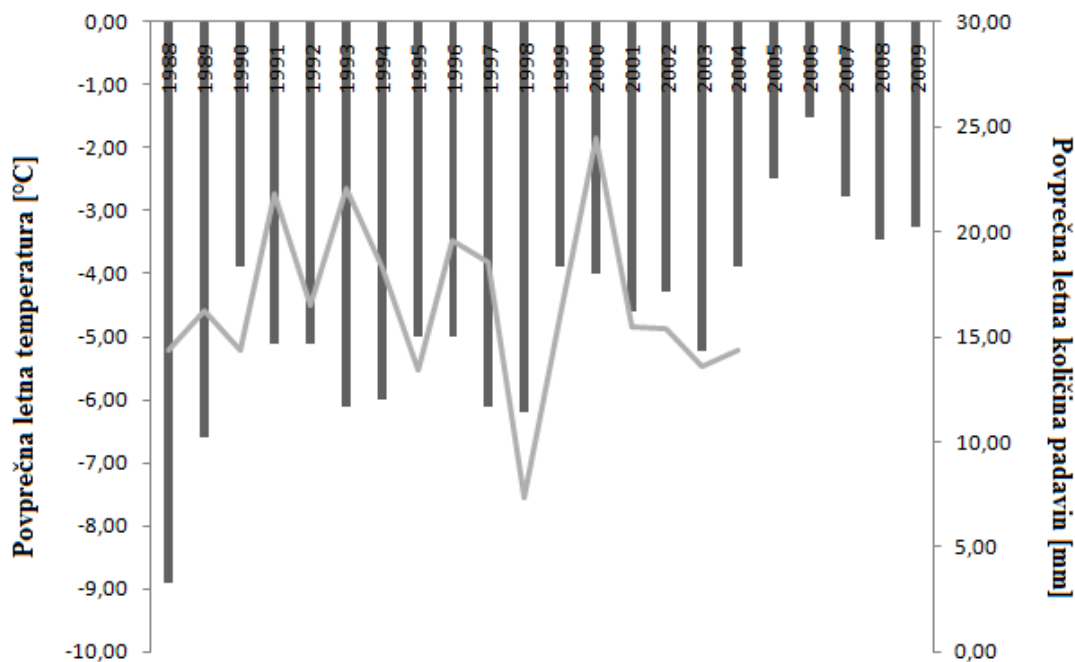
Za določanje deleža variabilnosti bakterijske združbe in aktivnosti smo pripravili štiri tabele, ki so zajemale podatke o okoljskih parametrih, prostorskih parametrih, aktivnosti in strukturi bakterijske združbe. Za tabelo aktivnosti, prostorskih parametrov ter sestavo bakterijske združbe smo izračunali matriko razdalj. Vse matrike smo obdelali s programom CANOCO (2010) Ugotavljali smo delež variabilnosti v mikrobnih združbi, ki jo razložijo okoljski parametri, prostorski parametri in kovariabilnost med njimi, ter enak postopek ponovili še za določitev deleža variabilnosti v aktivnosti.

Program CANOCO (2010) je namenjen analizam velikih setov podatkov. S posamičnimi regresijami bi verjetno prišli do podobnih rezultatov, vendar v bistveno daljšem času in mnogo več dela ter manipulacijami rezultatov. Ordinacije nam pomagajo določiti odnose med odvisnimi (aktivnost, struktura mikrobne združbe) in neodvisnimi spremenljivkami okolja (temperatura, pH, sestava gojišča, tekstura, % C, % N) ter prostora (prostorske koordinate). Podatki lahko izvirajo iz laboratorija, okolja ali proizvodnega procesa (Braak in Šmilauer, 2002; Lepš in Šmilauer, 2003).

## 4 REZULTATI

### 4.1. SVALBARD

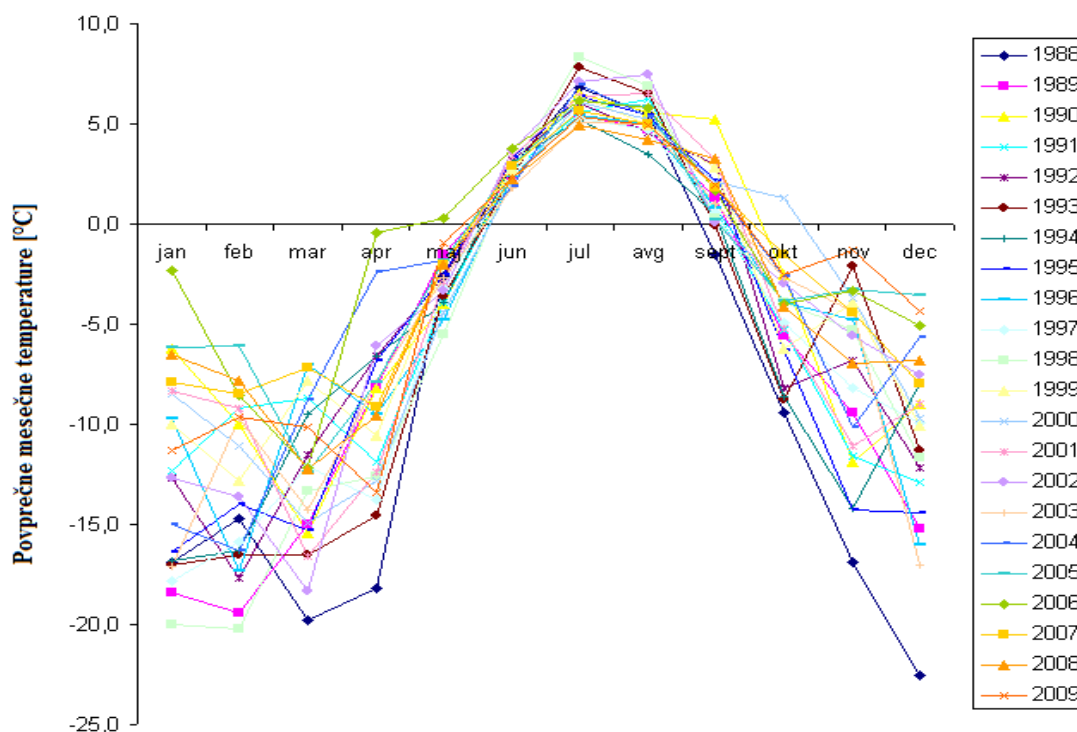
Na sliki 7 so prikazane povprečne letne temperature (stolpci) od leta 1988 do leta 2009 ter povprečne letne količine padavin (črta) od leta 1988 do leta 2004 na otočju Svalbard. Najbolj opazno je, da so povprečne letne temperature bile vsako leto pod 0 °C, vendar se z leti nekoliko višajo. Najnižje temperature so bile prav leta 1988 (-8,9 °C), najvišje pa leta 2006 (-1,5 °C). Padavine padajo v manjših količinah, največ jih je padlo leta 2000, najmanj pa leta 1998.



Slika 7: Povprečne letne temperature (stolpiči) na otoku Svalbard od leta 1988-2009 in povprečne letne količine padavin (siva črta) od leta 1988-2004 (Statistics Norway, 2010; eKlima, 2010).

Iz slike 8 je razvidno, da so v poletnih mesecih (junij, julij, avgust in september) povprečne temperature bile nad 0 °C vsa leta, medtem ko so v ostalih mesecih povprečne temperature pod 0 °C. Najbolj izstopa povprečna januarska temperatura leta 2006, ki je bila znatno višja od povprečnih januarskih temperatur v ostalih letih, ter decembrska povprečna

temperatura leta 1988, ki je bila kar  $-22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prav tako je razvidno veliko nihanje temperatur v zimskih mesecih (od meseca november do marca, odstopanje od  $3,63$  do  $4,92\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) v primerjavi s poletnimi, ki se med leti bistveno manj spreminjajo (standardna deviacija temperature od meseca maja do septembra  $0,54$  do  $1,46\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). To kaže, da se pogoji v času najvišje mikrobne aktivnosti (primarna produkcija, heterotrofija), kar se tiče temperature med leti, ne razlikujejo bistveno.



Slika 8: Povprečne mesečne temperature na otočju Svalbard za vsako posamično leto (od 1988-2009) (eKlima, 2010)

## 4.2 pH VZORCEV

pH vseh vzorcev je rahlo kisel, med njimi so majhne razlike. Večja razlika je le med vzorci 2 oziroma 3 ter 5 oziroma 6. Spremembe aktivnega pH, ki so manjše od 0,5 pH enote ne vplivajo bistveno na mikrobne procese. V sedimentu je ogromno mikroniš, ki se zelo razlikujejo med seboj, saj je to zelo kompleksen in heterogen ekosistem.

Preglednica 3: pH vrednosti ledeniških vzorcev. Podane so vrednosti za vsako meritev ter povprečne vrednosti treh ponovitev in odstopanje.

vzorec	pH	povprečje
1a	6,27	5,71±0,56
1b	5,71	
1c	5,16	
2a	4,98	4,90±0,07
2b	4,87	
2c	4,85	
3a	4,84	4,91±0,06
3b	4,95	
3c	4,93	
4a	5,5	5,77±0,23
4b	5,89	
4c	5,92	
5a	6,28	6,43±0,13
5b	6,49	
5c	6,53	
6a	6,72	6,68±0,05
6b	6,69	
6c	6,63	

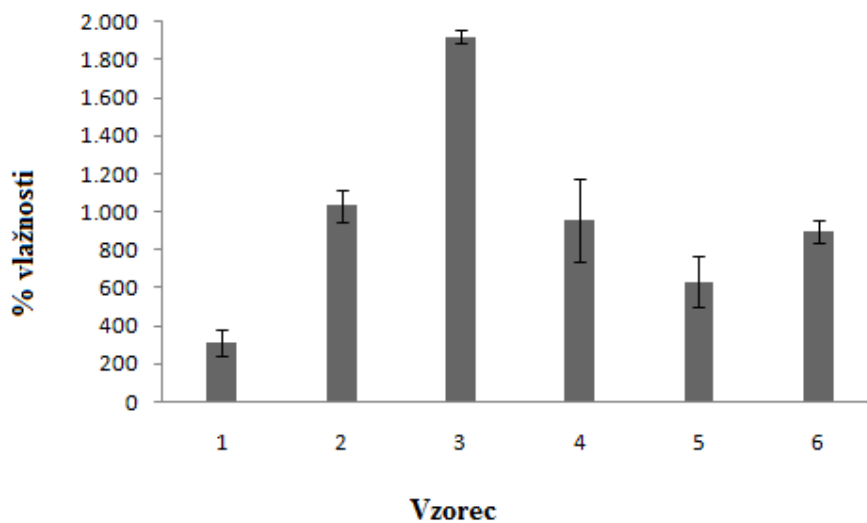
## 4.3 VLAŽNOST

Vlažnost variira glede na letne čase, lokalne padavine, temperaturo, osončenost in ima zato velik vpliv na trenutno aktivnost talnih mikroorganizmov. Vlažnost je bila pričakovano visoka v vseh vzorcih, saj so bili odvzeti na talečem se ledu, na iztoku ledenika ali na obali pod gladino morja. Največja nasičenost z vodo je bila pri vzorcu 3 (sediment iz dna ledenika), čez katerega je tekla voda. Glede na veliko vsebnost vode, le-ta v teh vzorcih najverjetneje ni bila limitna.



Preglednica 4: Vlažnost vzorcev ledeniških sedimentov. Podane so povprečne vrednosti in odstopanje.

vzorec	% vlažnosti
1	310,99±73,57
2	1031,35±83,29
3	1923,28±33,71
4	959,10±220,09
5	630,74±132,37
6	897,93±56,28



Slika 9: Vlažnost vzorcev ledeniških sedimentov. Podane so povprečne vrednosti in odstopanje.

#### 4.4 TEKSTURA

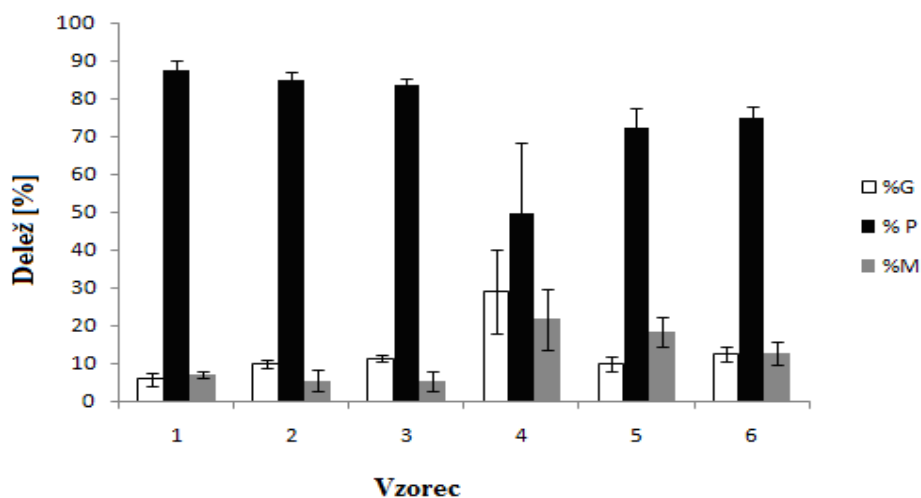
Tekstura sedimenta je ena izmed fizikalnih lastnosti sedimenta, ki zelo vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti le-tega. Trdna faza sedimenta je sestavljena iz mineralnih delcev in trdnih organskih snovi. Tekstura je razmerje med posameznimi mineralnimi frakcijami v tleh. Posamezne frakcije so: grobi pesek, glina, fini melj, grobi melj, fini pesek, pesek, melj.

Preglednica 5: Tekstura sedimenta vzorcev ledeniških sedimentov. Podane so povprečne vrednosti (v odstotkih) vsebnosti posamezne mineralne frakcije v vsakem vzorcu.

vzorec	% GP	% G	% FM	% GM	% FP	% P	% M
1	12,88±4,44	5,77±1,80	4,33±0,80	2,57±1,66	74,45±4,87	87,33±2,64	6,90±0,85
2	43,33±6,60	9,80±0,87	1,77±0,90	3,63±1,91	41,47±4,50	84,80±2,26	5,40±2,69
3	49,04±1,18	11,30±0,78	3,07±0,85	2,00±1,97	34,60±2,41	83,63±1,80	5,07±2,56
4	18,89±3,89	28,97±10,94	10,53±4,50	11,03±3,50	30,58±16,49	49,47±18,82	21,57±8,00
5	24,21±5,91	9,80±2,17	12,07±2,25	6,07±5,05	47,86±4,34	72,07±5,43	18,13±3,94
6	37,88±3,18	12,50±1,91	3,70±1,37	8,87±3,10	37,06±3,51	74,93±2,75	12,57±2,90

Legenda: GP = grobi pesek, G = glina, FM = fini melj, GM = grobi melj, FP = fini pesek, P = pesek, M = melj

Pri vseh vzorcih je opazen največji delež peska, finega in grobega peska. Delež peska je pri vseh vzorcih zastopan v približno enakem deležu in ga je največ. Le pri vzorcu 3 (dno ledenika) je delež peska nekoliko manjši, a je zato več glinenih delcev in melja, kar je zaradi delovanja ledenika logično. Pri vseh vzorcih je najmanjši delež gline.



Slika 10: Delež gline, melja in peska v posameznih vzorcih ledeniških sedimentov

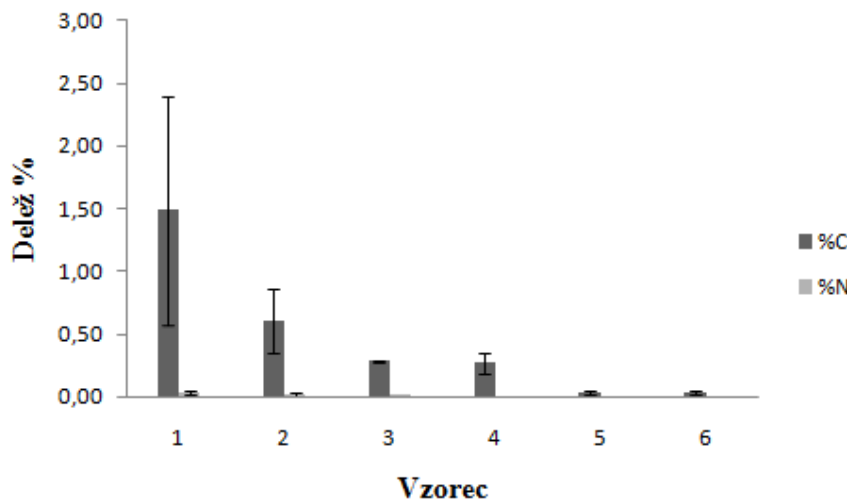
#### 4.5 VSEBNOST OGLJIKA IN DUŠIKA

Vsebnost tako ogljika kot dušika je pri vseh vzorcih majhna, kar lahko pojasni tudi nizko mikrobo aktivnost, saj sta dušik in ogljik pomembna vira hranil mikroorganizmov v

sedimentu. Največ dušika in ogljika je bilo v prvih treh vzorcih – material ob ledeniku, površje ledenika in dno ledenika. Na teh treh območjih je bila tudi najvišja mikrobna aktivnost. Razmerje C/N je bilo najvišje pri tretjem vzorcu.

Preglednica 6: Delež ogljika in dušika ter razmerje C/N. Podane so povprečne vrednosti in odstopanja. Meja detekcije  $N < 0.01$ .

vzorec	% ogljika	% dušika	C/N
1	1,49±0,91	0,03±0,02	28,04±1,73
2	0,60±0,26	0,02±0,01	39,85±5,52
3	0,29±0,05	0,01±0,02	118,81±9,62
4	0,27±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00
5	0,04±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
6	0,03±0,02	0,00±0,00	18,08±0,00



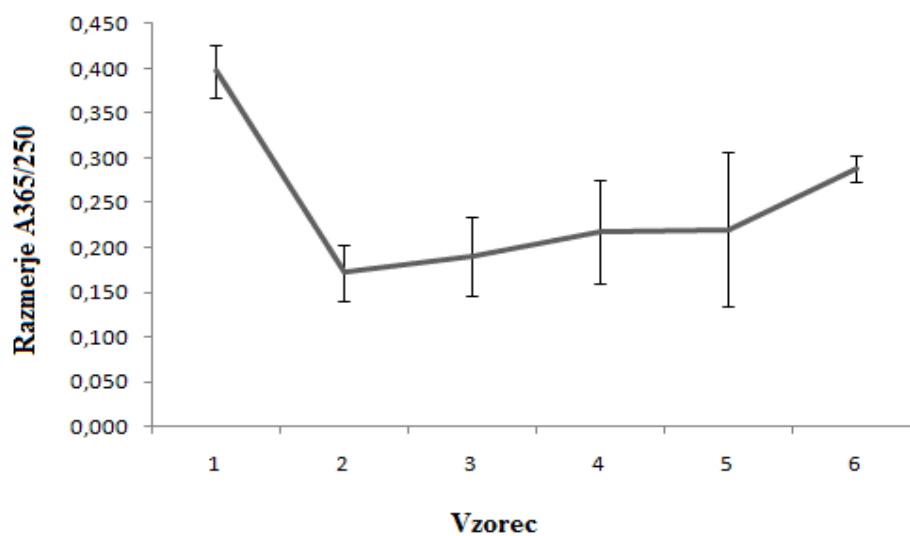
Slika 11: Delež ogljika in dušika v posameznem vzorcu ledeniških sedimentov

#### 4.6 MOLEKULSKA TEŽA MOLEKUL V RAZTOPLJENI ORGANSKI SNOVI

Kvocien absorpcije pri 365 nm in 250 nm je bil uporabljen kot mera za indeks molekulske teže raztopljenih organskih snovi. Iz spodnjega grafa je razvidno, da je najvišja vrednost pri vzorcu 1, najmanjša pri vzorcu 2, nato pa ponovno narašča do vzorca 6.

Preglednica 7: Povprečne vrednosti absorbanč pri 600, 365, 280 in 250 nm ter razmerje absorbanč pri 365 in 250 nm s standardnim odklonom

vzorec	A600	A365	A280	A250	A365/250
1	0,07±0,00	0,15±0,02	0,30±0,06	0,39±0,09	0,397±0,029
2	0,01±0,00	0,06±0,02	0,26±0,11	0,36±0,16	0,172±0,031
3	0,00±0,00	0,02±0,01	0,08±0,02	0,11±0,03	0,190±0,044
4	0,00±0,00	0,02±0,01	0,05±0,02	0,07±0,03	0,218±0,058
5	0,00±0,00	0,02±0,01	0,06±0,03	0,07±0,03	0,221±0,086
6	0,01±0,01	0,11±0,09	0,29±0,25	0,37±0,32	0,288±0,014



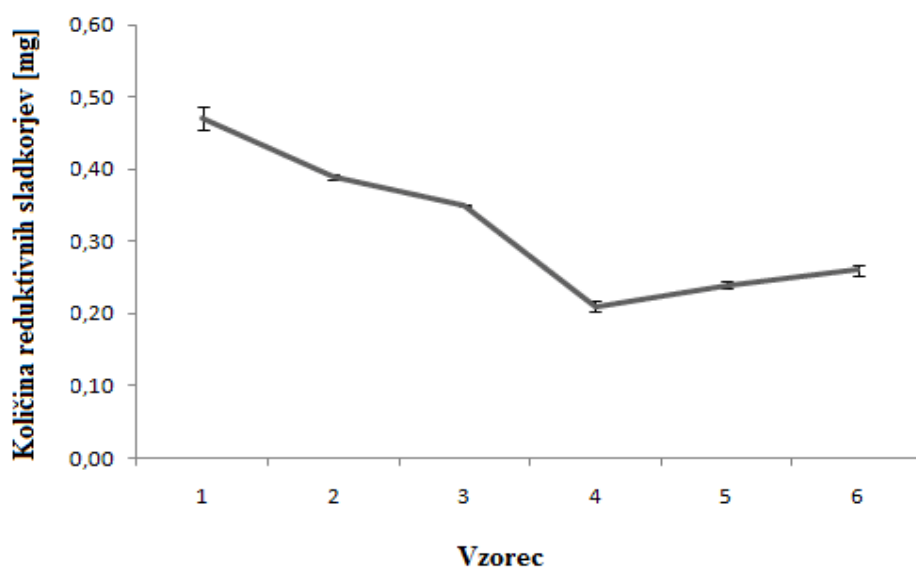
Slika 92: Razmerje A365/250 za vsak vzorec ledeniških sedimentov

#### 4.7 DOLOČANJE REDUKCIJSKIH SLADKORJEV

Vrednosti padajo od vzorca 1 do vzorca 6, kjer je približno za polovico manj redukcijskih sladkorjev, kot v prvem vzorcu.

Preglednica 8: Podane so povprečne vrednosti količine reduktivnih sladkorjev v 5 ml vzorca

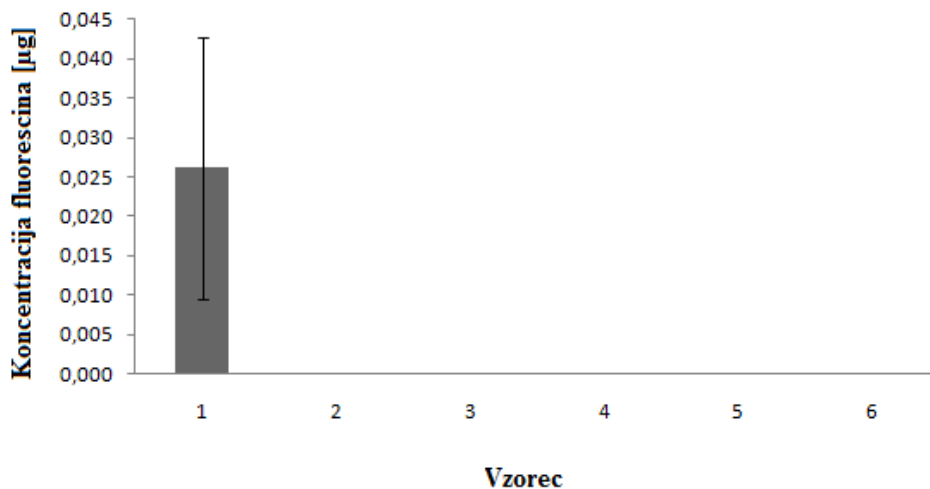
vzorec	količina reduktivnih sladkorjev [mg]/5 ml vzorca
1	0,047±0,016
2	0,039±0,004
3	0,035±0,002
4	0,021±0,008
5	0,024±0,005
6	0,026±0,007



Slika 103: Količina reduktivnih sladkorjev v mg v vsakem vzorcu ledeniških sedimentov

#### 4.8 MERJENJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCEIN DIACETATOM (FDA)

Prosti in membransko vezani encimi hidrolizirajo brezbarvni fluorescein diacetat do obarvanega končnega produkta fluoresceina, ki ga lahko merimo sprektrofotometrično. Aktivnost merjena s to metodo je najnižja pri peščenih in glinastih tleh (Adam in Duncan, 2000).



Slika 114: Koncentracija fluorescina v µg v posameznih vzorcih ledeniških sedimentov

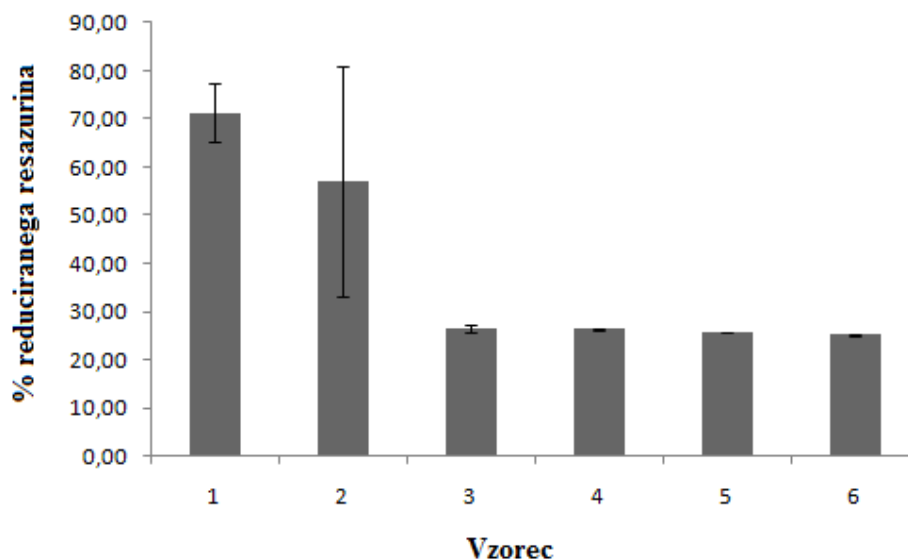
S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo fluoresceina. Opazna je zelo nizka mikroba aktivnost pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu 1, ki je bil edini, pri katerem smo zaznali bistveno spremembo barve.

Tako nizko aktivnost lahko povežemo z dejstvom, da so bili vzorci večinoma peščeni. Pri takem tipu tal pa je mikroba aktivnost z FDA zelo težko zaznati.

#### 4.9 REDUKCIJA RESAZURINA

Resazurin ima vlogo kolorimetričnega in/ali fluorimetričnega indikatorja in se uporablja za določanje živih celic. Barvilo resazurin (modre barve) meri metabolično kapaciteto celic. Žive celice ohranijo sposobnost redukcije resazurina v resorufin (rožnate barve), ki močno fluorescira. Nežive celice pa zaradi izgube metabolične kapacitete ne reducirajo indikatorskega barvila in tako ne proizvajajo fluorescentnega signala (Riss in Moravec, 2003).

Pri tem testu gre torej za redukcijo resazurina (modre barve) do resorufina (roza barve). Absorbanco smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 600 nm in 570 nm.

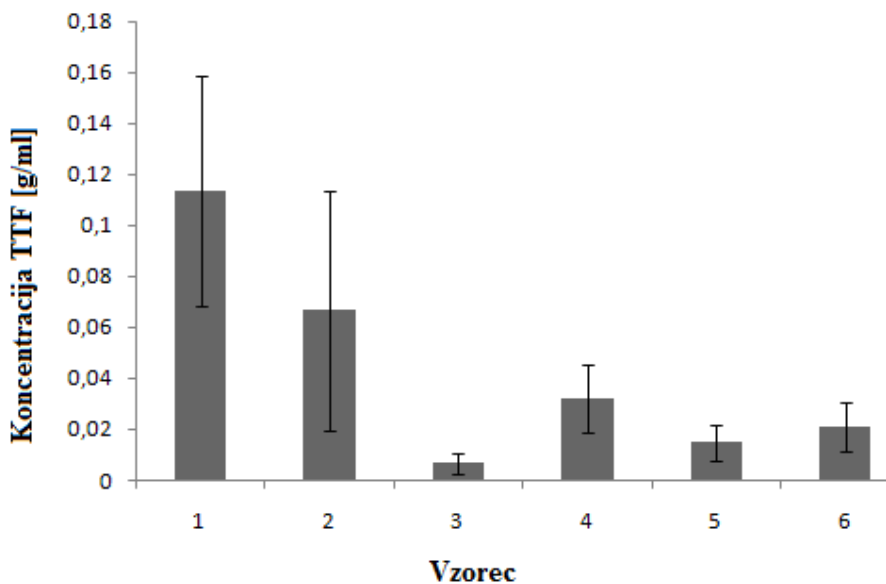


Slika 125: Odstotek reduciranega resazurina

Tako kot tudi pri merjenju mikrobne aktivnosti z FDA, je tudi ta test pokazal največjo aktivnost pri vzorcu 1 in 2. Pri ostalih vzorcih pa so vidne za polovico manjše aktivnosti, ki pa so pri vseh približno enake.

#### 4.10 DEHIDROGENAZNA AKTIVNOST

Za spremljanje dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic se največkrat uporablja redoks indikator TTC, ki omogoča poenostavljeno merjenje dehidrogenazne aktivnosti. TTC je lahko prejemnik elektronov v reakcijah, ki vključujejo različne dehidrogenaze (encimi, ki katalizirajo biološko oksidacijo organske snovi) in encime, ki vsebujejo flavin. Ti encimi reducirajo TTC v netopni TTF. Kristali slednjega se kopičijo v aktivnih celicah, zato ga je potrebno ekstrahirati iz bakterijskih celic z organskimi topili (npr. aceton, metanol) in meriti spektrofotometrično. Pri redukciji TTC v TTF pride do spremembe barve iz rumene v vijolično. Količina nastalega formazana je mera za celokupno metabolično aktivnost mikroorganizmov.



Slika 16: Dehidrogenazna aktivnost vzorcev ledeniških sedimentov

#### 4.11 ANALIZA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE

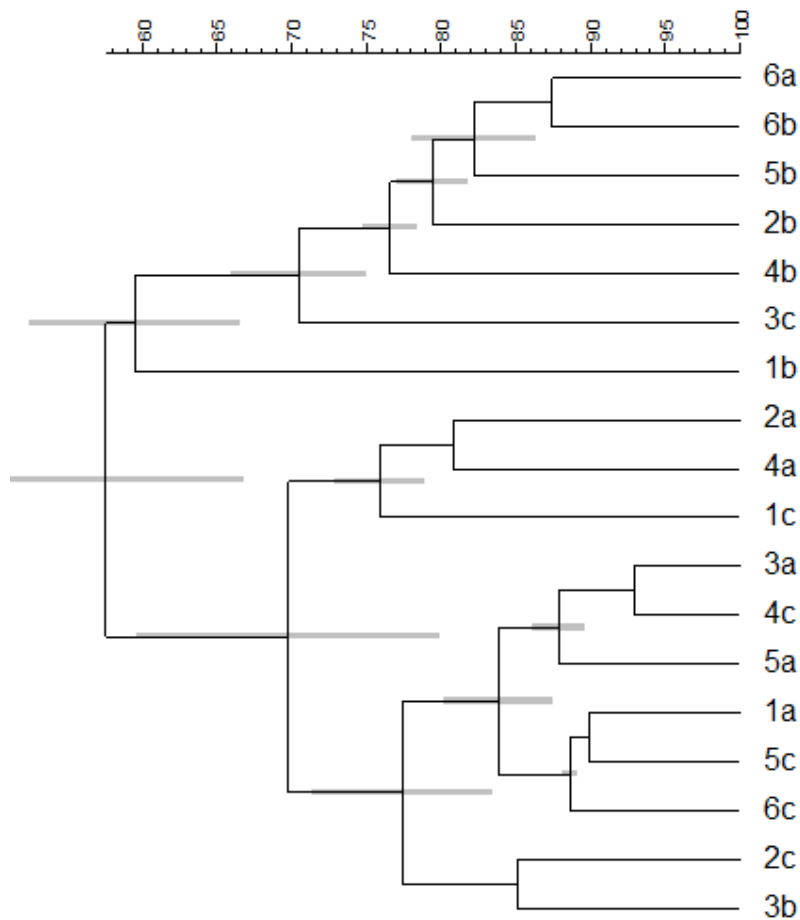
DNK smo izolirali iz vzorcev velikosti 0,5 g sedimenta s kompletom Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu.

Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnoževali bakterijske gene malih ribosomskih podenot, 16S rRNK. V reakciji smo uporabili začetni oligonukleotid 27f označen s fluorokromom 6-FAM, in začetni oligonukleotid 927R. Z agarozno gelsko elektroforezo (1 %) smo potrdili nastanek pričakovanega pomnožka dolžine 900 bp. Pomnoževanje je bilo uspešno, ko smo uporabili 100x razredčeno DNK.

Ena izmed najbolj uporabnih metod za določanje strukture mikroorganizmov je metoda določanja dolžine označenih DNK fragmentov nastalih po rezanju z restrikcijskimi encimi (T-RFLP). Z metodo T-RFLP smo analizirali celotne bakterijske gene za 16S rRNK, ki predstavljajo splošno bakterijsko združbo. Rezultate smo izrisali v drevesih podobnosti oziroma dendrogramih.



Profili T-RFLP celotnih bakterijskih genov za 16S rRNK rezanih s *HhaI* in *TaqI*, so se po podobnostih razdelili v več skupin, ki pa se med seboj ne razlikujejo signifikantno, saj se napake prikazane na dendrogramu prekrivajo, ponovitve vzorcev pa so razpršene po celem dendrogramu in ne tvorijo značilnih skupkov.



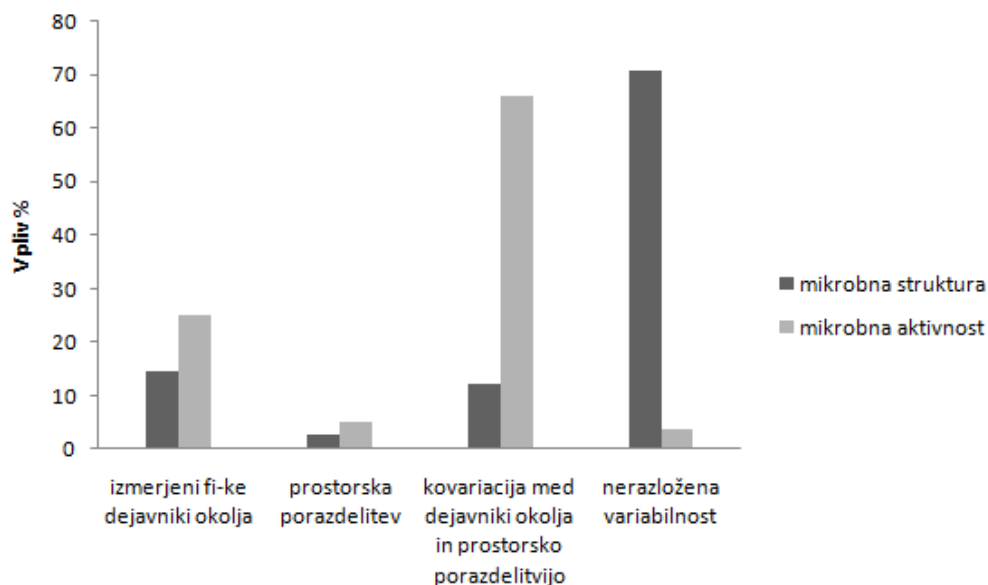
Slika 17: Dendrogram za 18 izolatov (vseh 6 vzorcev v 3 ponovitvah), narejen s programom BioNumerics (Applied Maths, Belgium)

#### 4.14 AKTIVNOST IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH DEJAVNIKOV

Za določitev deleža variabilnosti bakterijske mikrobne združbe in aktivnosti smo predhodno pripravili štiri tabele, ki so zajemale podatke o okoljskih in prostorskih parametrih, aktivnosti ter sestavi mikrobne združbe. S programom CANOCO smo določili posamezne deleže variabilnosti v mikrobioloških parametrih, ki jo lahko pripišemo zgolj parametrom okolja ali zgolj prostorski razporeditvi. V preglednici 9 so prikazani deleži razložene variabilnosti v bakterijski mikrobni združbi in aktivnosti.

Preglednica 9: Komponente okolja, ki najbolj razložijo variabilnost opaženo v strukturi in aktivnosti mikrobnih združb

vplivi (v %)	struktura	aktivnost
izmerjeni fi-ke dejavniki okolja	14,5	25
prostorska porazdelitev	2,5	5,1
kovariacija med dejavniki okolja in prostorsko porazdelitvijo	12,2	66,2
nerazložena variabilnost	70,8	3,7



Slika 18: Vpliv izmerjenih parametrov na mikrobno strukturo in aktivnost

Izmerjeni fizikalno-kemijski dejavniki okolja razložijo 14,5 % in 25 % variabilnosti v strukturi in aktivnosti raziskovanih mikrobnih združb. Prostorska porazdelitev ima manjši vpliv – 2,5 % na variabilnost strukture in 5,1 % na variabilnost aktivnosti. Kovariacija med dejavniki okolja in prostorsko porazdelitvijo mest vzorčenja razloži 12,2 % variabilnosti strukture mikrobne združbe in 66,2 % variabilnosti aktivnosti. Nerazložena variabilnost je 70,8 % pri variabilnosti v strukturi in le 3,7 % pri variabilnosti v aktivnosti mikrobne združbe.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V okolju s konstantno nizkimi temperaturami se izoblikujejo raznolike populacije psihrofilnih in psihrotolerantnih mikroorganizmov (Christner in sod., 2003). Sedimenti (ne samo v klasičnem pomenu morskih ali rečnih sedimentov) so kompleksni ekosistemi, spremenljivi v času in prostoru. Prostorska spremenljivost vpliva na porazdelitev potencialnih hranil in biološko aktivnost, časovna spremenljivost pa se lahko kaže v nihanju količine organske snovi, ki pride v sediment ter spreminjanju strukture in aktivnosti sedimentne mikrobiote. V pričujoči nalogi smo skušali ugotoviti kateri ter v kolikšni meri okoljski dejavniki vplivajo na strukturo mikrobne združbe ter ali sta struktura in mikrobna aktivnost povezani.

#### 5.1.1 Okoljski parametri

Klimo na Svalbardu močno blaži Severno Atlantski tok, ki je odgovoren tudi za nekoliko višje temperature na zahodni obali in približno 20 °C višje temperature pozimi na Svalbardu kot v Rusiji ali Kanadi na podobni zemljepisni dolžini. Kljub temu, pa so povprečne letne temperature vedno pod 0 °C. Opazno je višanje povprečnih letnih temperatur, saj je leta 1988 bila povprečna temperatura skoraj -8,9 °C, leta 2009 pa le še -3,2 °C, kar je najverjetneje posledica segrevanja Zemlje zaradi učinka toplogrednih plinov. Najtoplejši meseci so junij, julij, avgust in september, ko so bile vsa leta povprečne mesečne temperature nad 0 °C.

Padavine so dokaj pogoste, a padajo v manjših količinah, največ leta 2000, najmanj pa leta 1998. Na leto ne pade veliko padavin, med 120 in 230 mm. Povezava med količino padavin in temperaturo zraka je zelo zapletena, so pa vidne določene vzporednice. V relativno mrzlem obdobju od leta 1955-1995 je padlo tudi več padavin, medtem ko v toplejšem obdobju od leta 1996 naprej, je bilo padavin manj (Statistics Norway, 2010).

Razvidno je veliko nihanje temperatur v zimskih mesecih, kjer je najnižje odstopanje skozi leta 3,63 pa vse do 4,92 °C, medtem ko se odstopanja od povprečnih letnih temperatur v poletnih mesecih bistveno manj spreminjajo (odstopanja od 0,54 pa do 1,46 °C). To kaže, da se pogoji v času najvišje mikrobne aktivnosti (primarna produkcija, heterotrofija), kar se tiče temperature med leti, ne razlikujejo bistveno. Opazno je tudi višanje temperatur skozi posamezne mesece vsako leto, najmanjše nihanje temperatur je v mesecu juniju, juliju in avgustu (priloga A).

O smereh in lastnostih vetrov po celotni zračni masi, o njihovih kemijskih lastnostih nismo uspeli pridobiti numeričnih podatkov, preko katerih bi lahko opisali morebitne spremembe vzorcev v sestavi, hitrostih in smereh na lokalni ravni, ki je najverjetneje ključna za prenos in depozicijo delcev z vetrom (Xiang in sod., 2009).

Leta 1980 je bilo nad Antarktiko opaženo močno zmanjšanje ozonske plasti in ta se z leti vedno bolj tanjša. Podobna opažanja so bila ugotovljena tudi na območjih severne zemljepisne širine, kjer je najvišja raven UV sevanja opažena v spomladanskih mesecih (april), najnižja pa v jesenskih mesecih. Za biološke procese s hitrimi spremembami spomladi, so bolj pomembne dnevne količine sevanja, kot pa količina sevanja skozi celoten mesec. Za raziskovanje vpliva UV sevanja na biološke procese, je zato najbolj primeren podatek o količini sevanja okoli 1. maja (Hansen in sod, 2005). Vsekakor pa količina svetlobe v povezavi s temperaturo vpliva na razvoj kriokonitov, celokupno mikrobno biomaso, taljenje ledu in posledično sproščanje ter odlaganje organskega materiala z vodo na nove lokacije.

Ugotovili smo, da je pH sedimentov rahlo kisel, med vzorci pa ni bilo opaziti bistvenih razlik – večja razlika je bila le med vzorci 2 oziroma 3 ter 5 oziroma 6. Z izjemo prvega vzorca (material ob ledeniku), pH rahlo narašča od vzorca 2 do 6.

Ne glede na to, da so bili vzorci nabrani v poletnem mesecu, je bila vlažnost pričakovano visoka v vseh vzorcih, saj so bili odvzeti na področjih, ki so pokrita bodisi z ledom, snegom ali morsko vodo, ali pa predstavljajo osnovo, s katere so bili vzorci odvzeti. Največja nasičenost z vodo je bila pri sedimentu iz dna ledenika (vzorec 3), čeprav bi

pričakovali največjo vlažnost pri vzorcu 4 (prehodno območje), saj je v tem sedimentu bilo največ glinenih delcev, ki zadržujejo vodo. Največji delež je bilo peska, ne glede na to, iz kje je bil sediment vzet. Na videz je bil morski sediment (vzorec 6) videti najbolj glinen, a so bili delci očitno močno vezani na druge delce in jih z uporabljenim postopkom nismo mogli sprati.

Delež ogljika in dušika je zelo nizek pri vseh vzorcih v primerjavi z drugimi tlemi kontinentalne Evrope (Edwards, 2010). Največji delež tako ogljika kot dušika je bil v prvih treh vzorcih – material ob ledeniku, površje ledenika in dno ledenika.

Vsebnost reduktivnih sladkorjev in indeks molekulske teže molekul v raztopljeni organski snovi sta bila najvišja v prvem vzorcu, potem pa vrednosti padajo proti vzorcu 6.

V našem delu smo pokazali, da se izmerjeni okoljski parametri med posameznimi mestih vzorčenja med seboj razlikujejo. Zato lahko našo ničto hipotezo, da se fizikalno-kemijski parametri vzorcev medsebojno ne bodo signifikantno razlikovali, zavržemo.

V rezultatih prikazani diagrami so namenjeni ilustrativnemu prikazovanju različnih gradientov v izmerjenih okoljskih dejavnikih, ki so včasih medsebojno korelirani (npr. C, N, reduktivni sladkorji), nasprotujoči (npr. pH, tekstura) ali pa nimajo trenda (npr. vlažnost, tekstura).

V nadaljevanju bi bilo vsekakor smiselno natančno spremljati tudi druge okoljske dejavnike, kot so osvetljenost (celokupna, UV-A, UV-B, fotosintetska (PAR)), zračna vlaga, cikli odtaljevanja – zmrzovanja, padavine, časovna porazdelitev depozicije delcev po prostoru (prostorska razporeditev na ledeniku), določiti delež mineralnih nutrientov, inorganskih delcev ter organskega materiala v zraku, ter v padavinah.

### **5.1.2 Mikrobna aktivnost in struktura v odvisnosti od prostora in dejavnikov okolja**

Aktivnost mikrobne združbe smo merili s tremi različnimi metodami - dehidrogenazna aktivnost, hidroliza fluorescein diacetata in redukcija resazurina. Izkazalo se je, da so vse tri metode pokazale najvišjo aktivnost pri prvih dveh oziroma treh vzorcih (material ob ledeniku, sediment iz površja in dna ledenika).

Pri merjenju aktivnosti s fluorescein diacetatom je bila aktivnost pri vseh vzorcih, razen pri prvem, skoraj neopazna. To dejstvo lahko povežemo s tem, da so vsi sedimenti vsebovali največ peska, pri takem tipu sedimenta pa je mikrobno aktivnost z FDA zelo težko zaznati.

To je v skladu s pričakovanji, saj je v sedimentu, ki vsebujejo več ogljika in dušika več substratov, ki jih mikroorganizmi lahko uporabijo kot vir hranil. Predpostavljamo, da so v takšnih tleh mikrobne združbe v aktivnem stanju. V prihodnosti predlagamo meritve porazdelitve aktivnih in neaktivnih celic v sveže odvzetih vzorcih sedimenta z Live-Dead Bac Stain (Invitrogen, 2010).

Analize strukture mikrobnih združb v ledeniških sedimentih niso pokazale, da bi znotraj 1400 m dolgega transekta, ki povezuje različne ledeniške habitate, obstajale med seboj signifikantno različne mikrobne združbe. To je izredno zanimivo, saj kaže da z naborom izmerjenih okoljskih dejavnikov nismo zajeli tistih okoljskih dejavnikov, ki strukturirajo te mikrobne združbe. Na to kaže tudi dejstvo, da je delež nepojasnjene variabilnosti v strukturi mikrobnih združb večji od 70 %. Po drugi strani pa je prav zaradi tega možno, da je vpliv selektivnih dejavnikov okolja na strukturo mikrobnih združb v tem okolju bistveno manjši ali pa zaradi temperatur počasnejši ali pa oslavljen zaradi daljših vmesnih obdobj nizkih temperatur (polarne zime), v času katerih se mikrobne aktivnosti zmanjšajo na minimum, ali pa so podvržene dodatnim okoljskim parametrom. Zato naše ničte hipoteze, da fizikalno kemijski parametri in struktura mikrobnih združb niso medsebojno povezani, ne moremo ovreči.

Nasprotno pa v primeru mikrobne aktivnosti okoljski parametri pojasnijo četrtno variabilnosti, avtokorelacija v prostoru je zanemarljivo majhna. To pomeni, da ima sama

medsebojna oddaljenost točk na ledeniku relativno veliko vlogo pri razlagi mikrobne aktivnosti, vendar pa ne večinske. Posebno zanimivo pa je dejstvo, da je delež kovariacije med prostorskimi in okoljskimi parametri v primeru mikrobne aktivnosti zelo velik, kar kaže da je odnos med okoljem in prostorom v tem ekosistemu zelo zapleten. Iz tega lahko zaključimo, da imajo tako okoljski dejavniki kot prostorska porazdelitev znaten vpliv na mikrobno aktivnost. Zato lahko našo ničto hipotezo, da fizikalno-kemijski parametri in mikrobne aktivnosti niso medsebojno povezani, zavržemo.

Menimo, da bi bilo za določitev vpliva omenjenih dejavnikov potrebno v nadaljevanju raziskav dopolniti z bolj podrobnim mapiranjem strukture mikrobnih združb na manjših velikostnih skalah ter različnih časovnih obdobjih, saj je v sedimentu veliko mikroniš, v katerih so združbe, ki so si med seboj lahko precej različne ter se s časom spreminjajo.

Iz porazdelitve razložene variabilnosti strukture in aktivnosti obravnavanih mikrobnih združb lahko zaključimo, da na strukturo in aktivnost ne vplivajo isti parametri okolja in prostora. Zato naše ničte hipoteze, da struktura mikrobnih združb in mikrobna aktivnost nista medsebojno povezani, ne moremo zavreči.



## 5.2 SKLEPI

Od štirih delovnih hipotez, ki smo jih ob začetku postavili, je naša raziskava dve potrdila in dve zavrgla:

1. Fizikalno-kemijski parametri vzorcev se medsebojno signifikantno razlikujejo. Zato našo ničto hipotezo, da se fizikalno-kemijski parametri vzorcev medsebojno ne bodo signifikantno razlikovali, zavržemo.
2. Fizikalno-kemijski parametri in mikrobne aktivnosti so medsebojno povezani, saj okoljski dejavniki in kovariabilnost med okoljem in prostorom razložita več kot 80 % variabilnosti v mikrobni aktivnosti. Zato lahko našo ničto hipotezo, da fizikalno-kemijski parametri in mikrobne aktivnosti niso medsebojno povezani, zavržemo.
3. Fizikalno kemijski parametri in struktura mikrobnih združb niso medsebojno povezani, saj je več kot 70 % variabilnosti v strukturi mikrobne združbe nerazložene. Zato naše ničte hipoteze, da fizikalno kemijski parametri in struktura mikrobnih združb niso medsebojno povezani, ne moremo ovreči.
4. Struktura mikrobnih združb in mikrobna aktivnost nista medsebojno povezani, saj različni dejavniki razložijo njuno variabilnost. Zato naše ničte hipoteze, da struktura mikrobnih združb in mikrobna aktivnost nista medsebojno povezani, ne moremo zavreči.

## 6 POVZETEK

Ledeniki in ledene ploskve pokrivajo približno 10 % Zemljine površine. Dolgo so veljali za abiotska okolja, toda nedavne študije kažejo, da so zelo dinamična okolja, kjer uspevajo različni mikroorganizmi, ki so aktivni kljub nizkim temperaturam. Pri našem delu smo želeli preučiti aktivnost in strukturo mikrobne združbe, ter kako sta ti odvisni od okoljskih dejavnikov, sedimentov iz ledenika na otoku Spitzbergen, Svalbard, Norveška.

Analizirali smo vzorce vzetih iz šest različnih mestih vzdolž ledenika, in sicer: material ob ledeniku (morena), površje ledenika, dno ledenika, dve prehodni območji in morski sediment. Fizikalno-kemijski parametri, ki so nas zanimali so bili pH vzorcev, tekstura, vlažnost, vsebnost ogljika in dušika, molekulska teža molekul v raztopljeni organski snovi in vsebnost redukcijskih sladkorjev. Mikrobno aktivnost smo merili s tremi različnimi metodami - dehidrogenazna aktivnost, hidroliza fluorescein-diacetata in redukcija resazurina.

pH sedimentov je bil rahlo kisel, vlažnost pa pričakovano visoka v vseh vzorcih, saj so bili pokriti bodisi z ledom, snegom ali vodo. Največjo vlažnost bi pričakovali pri vzorcu 4 (prehodno območje), saj je v tem sedimentu bilo največ glinenih delcev, ki zadržujejo vodo.

Izkazalo se je, da so vse tri metode pokazale najvišjo aktivnost pri prvih dveh oziroma treh vzorcih (material ob ledeniku, sediment iz površja in dna ledenika), ki so vsebovali tudi največji delež ogljika in dušika. To je v skladu s pričakovanji, saj je v sedimentu, ki vsebujejo več ogljika in dušika več substratov, ki jih mikroorganizmi lahko uporabijo kot vir hranil.

Iz vseh vzorcev smo tudi izolirali DNK ter uspešnost preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili bakterijske gene za 16S rRNK. Pomnoženo DNK smo nato rezali z dvema restriksijskima encimoma, *HhaI* in *TaqI*. Dobljene fragmente smo injicirali v kapilarno elektroforezo. Podatke pridobljene s

kapilarno elektroforezo smo analizirali s pomočjo programa BioNumerics. Dobili smo drevo podobnosti oziroma dendrogram iz katerega smo lahko razbrali, da vzorci tvorijo več skupin, a se med seboj bistveno ne razlikujejo, saj ponovitve vzorcev ne tvorijo značilnih skupkov.

S programom CANOCO smo ugotavljali delež variabilnosti v združbi in aktivnosti, ki jo razložijo okoljski parametri, prostorski parametri in kovariabilnost med njimi. Rezultati so pokazali, da izmerjeni fizikalno-kemijski parametri razložijo 14,5 % variabilnosti v mikrobni strukturi. Prostorska porazdelitev nima večjega vpliva na strukturo mikrobne združbe, razloži pa 2,5 % variabilnosti. Delež nepojasnjene variabilnosti v strukturi mikrobnih združb večji od 70 %. Podobne rezultate smo dobili tudi za mikrobno aktivnost saj okoljski parametri razložijo 25 % variabilnosti, okoljski dejavniki in kovariabilnost med okoljem in prostorom razložita več kot 80 %. Tudi tu prostorska porazdelitev nima znatnega vpliva, razloži pa 5,1 % variabilnosti.

Menimo, da bi bilo za določitev vpliva omenjenih dejavnikov potrebno v nadaljevanju raziskav dopolniti z bolj podrobnim mapiranjem strukture mikrobnih združb na manjših velikostnih skalah ter različnih časovnih obdobjih, saj je v sedimentu veliko mikroniš, v katerih so združbe, ki so si med seboj lahko precej različne ter se s časom spreminjajo.

## 7 VIRI

Adam G., Duncan H. 2000. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology&Chemistry*, 33, 7-8: 943-951

Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A.M., Barbante C., Boutron C., Ferrari C. 2006. Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 255–264

Anesio A.M., Hodson A.J., Fritz A., Pesner R., Sattler B. 2009. High microbial activity on glaciers: Importance to the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 15, 4: 955-960

Black K.S., Tolhurst T.J., Paterson D.M., Hagerthey S.E. 2002. Working with natural cohesive sediments. *Journal of Hydraulic Engineering*, 128, 1: 2-8

Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Biology*, 63, 8: 3068-3078

Braak C.J.F., Šmilauer P. 2002. CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (V4.5). Itacha, Microcomputer Power: 500 str.

CANOCO. 2010. Canoco for Windows Version 4.5. Itacha, Microcomputer Power: software

CIA. 2010. The world fact book: Svalbard. Washington D.C., Central Intelligence Agency: 1 str.

<https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/sv.html> (19.1.2011)

Christner B.C., Mosley-Thompson E., Thompson L.G., Reeve J. 2003. Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environmental Microbiology*, 5: 433-436

Deegenaars M.L., Watson K. 1998. Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. *Extremophiles*, 2, 1: 41-50

Edwards A., Anesio A.M., Rassner S.M., Sattler B., Hubbard B., Perkins W.T., Young M., Griffith G.W. 2010. Possible interactions between bacterial diversity, microbial activity and supraglacial hydrology of cryoconite holes in Svalbard. *ISME Journal*, 5: 1-11

Edwards I.P., Bürgmann H., Miniaci C., Zeyer J. 2006. Variation in microbial community composition and culturability in the rhizosphere of *Leucanthemopsis alpina* (L.) heywood and adjacent bare soil along an Alpine Chronosequence. *Microbial Ecology*, 52, 4: 679-692

eKlima. 2010. eKlima. Oslo, Norwegian Meteorological Institute: 1 str.

<http://eklima.met.no> (25. nov. 2010)

Elverhøi A., Liestol O., Nagy J. 1980. Glacial erosion, sedimentation and mikrofauna in the inner part of Kongsfjorden, Spitsbergen. *Norsk Polarinstitutt Skrifter*, 172: 33-61

Foght J., Aislabie J., Turner S., Brown C.E., Ryburn J., Saul D.J., Lawson W. 2003. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microbial Ecology*, 47, 4: 329-340

Google maps. 2010. Svalbard. Menlo Park, Google Inc.: 1 str.

<http://maps.google.com/> (5. dec. 2010)

Hansen G., Edvardsen K., Høiskar B.A. 2005. Development of the ozone layer and UV radiation at Svalbard: An assessment for MOSJ. Kjeller, Norwegian Institute for Air Research (NILU): 5 str.

Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K., Jensen L.L., Kristoffersen T., Tiedje J.M., Lomstein B.A., Finster K.W. 2007. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environmental Microbiology*, 9, 11: 2870–2884

Hodgkins R. 1997. Glacier hydrology in Svlabard, Norwegian high Arctic. *Quaternary Science Reviews*, 16, 9: 957-973

Invitrogen. 2010. Live-Dead Bac Stain. Carlsbad, Invitrogen Corporation: 1 str.  
[http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell\\_tissue\\_analysis/pdfs.Par.30412.File.dat/F-076479-BacLight.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/pdfs.Par.30412.File.dat/F-076479-BacLight.pdf) (9.12.2010)

Ito H., Kuhod S. 1997. Characteristics of water in Kongsfjorden, Svalbard. *Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Meteorology and Glaciology*, 11: 211–232

Kaštovska K., Elster J., Stibal M. 2005. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microbial Ecology*, 50, 3: 396-407

Kaštovska K., Stibal M., Šabacka M., Černa B., Šantruckova H., Elster J. 2007. Microbial community structure and ecology of subglacial sediments in two polythermal Svalbard glaciers characterized by epifluorescence microscopy and PLFA. *Polar Biology*, 30, 3:277–287

Kirschvink J.L., Gaidos E.J., Bertani L.E., Beukes N.J., Gutzmer J, Maepa L.N., Steinberger R.E. 2000. Paleoproterozoic snowball Earth: extreme climatic and geochemical global change and its biological consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4:1400–1405

Klemenčič N. 2006. Fenotipska in genotipska opredelitev bakterijskih izolatov iz morskih in sladkovodnih sedimentov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 109 str.

Kuha T., Yano T. 2003. Colorimetric almarBlue assay as a bacterial concentration and spoilage index of marine foods. *Food Control*, 14: 455-461

Larose C., Berger S., Ferrari C., Navarro E., Dommergue A., Schneider D., Vogel T.M. 2009. Microbial sequences retrieved from environmental samples from seasonal Arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway. *Extremophiles*, 14, 2: 205-212

Lepš J., Šmilauer P. 2003. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge, Cambridge University Press: 280 str.

Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81: 21-27

Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Biology*, 64, 7: 2691-2696

Miteva V.I., Sheridan P.P., Brenchley J.E. 2004. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Biology*, 70, 1: 202-213

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

Osburn L.C., Morris D.P., Thorn K.A., Moeller R.E. 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry*, 54, 3: 251-278

Pälli A. 2003. Polythermal glacier studies in Svalbard determined by ground-penetrating radar. Academic dissertation. Oulu, University of Oulu, Department of Geosciences: 33 str.

Pivk P. 2007. Primerjava raznovrstnosti bakterij v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard, Norveška) in zmernega pasu (Grossglockner, Avstrija). Diplomsko delo. Ljubljana,

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije:  
63 str.

Ravenschlag K., Sahn K., Amann R. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Biology*, 67, 1: 387–395

Ravenschlag K., Sahn K., Pernthaler J., Amann R. 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Biology*, 65, 9: 3982–3989

Riss T., Moravec R. 2003. Introducing CellTiter-Blue<sup>®</sup> cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13

Rivkina E.M., Friedmann E.I., McKay C.P., Gilichinsky D.A. 2000. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Applied and Environmental Biology*, 66, 8: 3230–3233

Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J., Tiedje J., Shcherbakova V., Gilichinsky D. 2004. Microbial life in permafrost. *Advances in Space Research*, 33, 8: 1215–1221

Schlesinger W.H. 1997. *Biogeochemistry: an analysis of global change*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, Academic Press: 588 str.

Shi T., Reeves R.H., Gilichinsky D.A., Friedmann E.I. 1996. Characterization of viable bacteria from siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology*, 33, 3: 169-179

Skidmore M., Anderson S.P., Sharp M., Foght J., Lanoil B.D. 2005. Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11:6986–6997



Smithson P., Addison K., Atkinson K. 2002. Fundamentals of the physical environment. 3<sup>rd</sup> ed. London, Routledge: 627 str.

Statistics Norway. 2010. Meteorological data of Svalbard. Oslo, Statistics Norway: 1 str.  
<http://www.ssb.no/english/> (25. nov. 2010)

Stibal M., Tranter M. 2007. Laboratory investigation of inorganic carbon uptake by cryoconite debris from Werenskioldbreen, Svalbard. *Journal of Geophysical Research*, 112, G04S33, doi:10.1029/2007JG000429: 9 str.

Stibal M., Tranter M., Benning L.G., Reháč J. 2008. Microbial primary production on an Arctic glacier is insignificant in comparison with allochthonous organic carbon input. *Environmental Microbiology*, 10, 8: 2172–2178

Stibal M., Šabacka M., Kaštovska K. 2006. Microbial communities on glacier surfaces in Svalbard: Impact of physical and chemical properties on abundance and structure of cyanobacteria and algae. *Microbial Ecology*, 52, 4: 644-654

Stres B. 2007. Praktikum iz mikrobiologije tal za mikrobiologe, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo: 12-12

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, 2: 323-335

Svendsen H., Beszczynska A., Lafauconnier B., Tverberg V., Gerland S., Hagen J., Orbeak O., Bischof J.B., Papucci C., Zajaczkowski M., Azzolini R., Bruland O., Wiencke C., Whinther J.G., Hodson A., Mumford P. 2002. The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden: An Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Research*, 21, 1: 133-166

Wikipedia. 2010a. Arctic. San Francisco, Wikimedia Foundation Inc.: 1 str.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Arctic> (20. nov. 2010)

Wikipedia. 2010b. Tekstura tal. San Francisco, Wikimedia Foundation Inc.: 1 str.

[http://sl.wikipedia.org/wiki/Tekstura\\_tal](http://sl.wikipedia.org/wiki/Tekstura_tal) (23. nov. 2010)

Xiang S.R., Shang T.C., Chen Y., Yao T.D. 2009. Deposition and postdeposition mechanisms as possible drivers of microbial population variability in glacier ice. *FEMS Microbiology Ecology*, 70, 2: 165-176

Zaborska A., Pempkowiak J., Papucci C. 2006. Some sediment characteristics and sedimentation rates in an arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard). *Annual Environmental Protection*, 8: 79-97

## ZAHVALA

Zahvalila bi se :

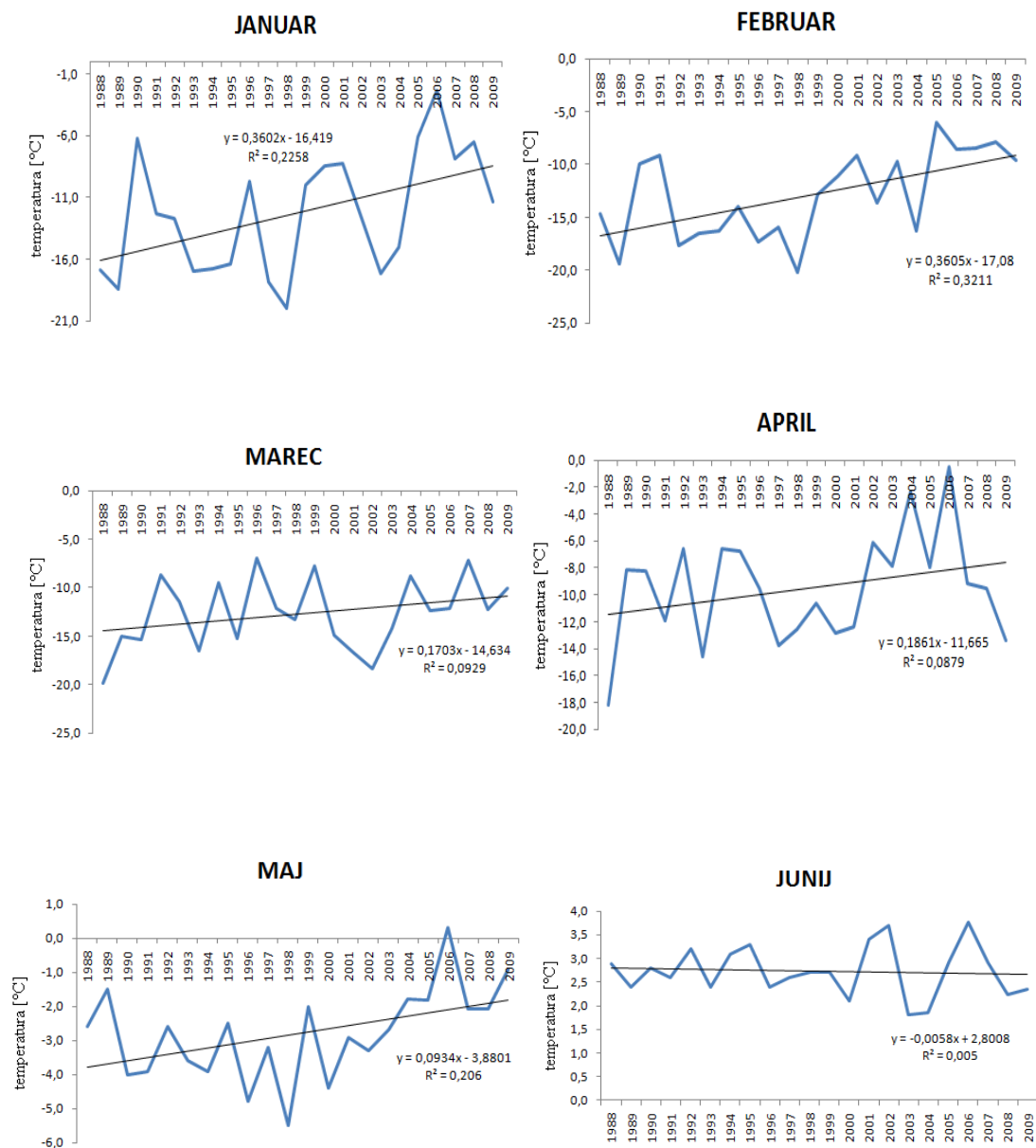
- prof. dr. Nini Gunde-Cimermam, dr. Cenetu Gostinčarju in dr. Poloni Zalar za vzorčenje sedimentov v sklopu njihovega obiska otoka.
- doc. dr. Metki Suhadolc, dr. Andreji Hodnik in Rozaliji Ilc za meritve C in N.
- mag. Luki Lipoglavšek za pomoč pri meritvah reduktivnih sladkorjev.
- dr. Andreju Razpetu za ločevanje pripravljenih restrikcijskih fragmentov.
- prof. dr. Gorazdu Avguštinu, da mi je omogočil opravljanje diplomske naloge na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo
- sodelavcem katedre (Lijana, Marta, Tomaž, Nika, Domen)

Posebna zahvala gre mentorju doc. dr. Blažu Stres za vso pomoč pri izvedbi diplomske naloge ter spodbudi.

Zahvalila bi se tudi staršem ter vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali med študijem.

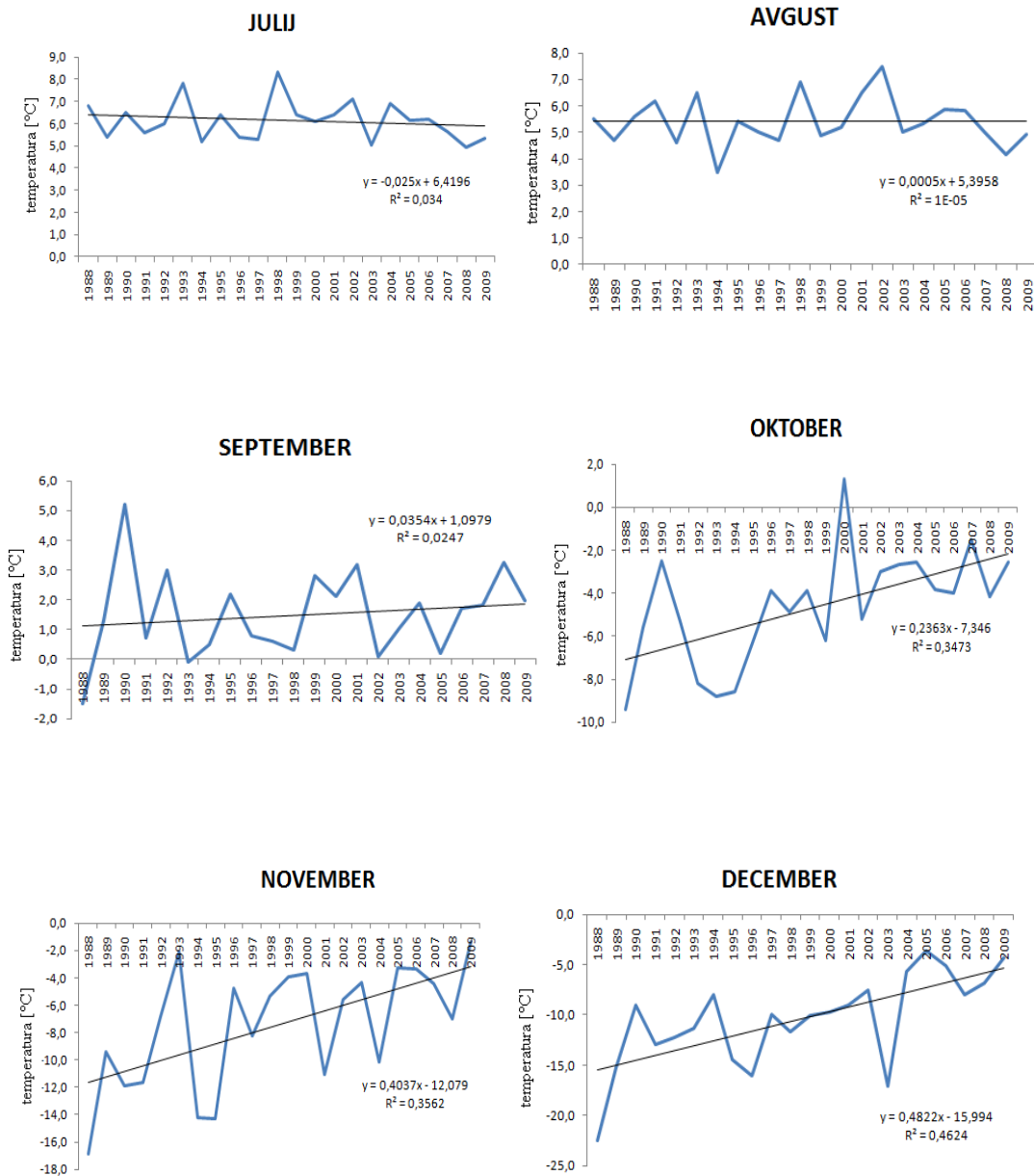
## PRILOGE

### Priloga A: Prikaz analize povprečnih mesečnih temperatur od leta 1988 do leta 2009 na otočju Svalbard (eKlima, 2010)



se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Prikaz analize povprečnih mesečnih temperatur od leta 1988 do leta 2009 na otočju Svalbard (eKlima, 2010)



**Priloga B: pH vzorcev ledeniških sedimentov. Podane so povprečne vrednosti in odstopanje**

