

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

Mojca LEŠNJAK (ZALOŽNIK)

**OSAMITEV IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
MIKROORGANIZMOV IZ TAL LJUBLJANSKEGA BARJA
MAGISTRSKO DELO**

Ljubljana, 2012

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

Mojca LEŠNJAK (ZALOŽNIK)

**OSAMITEV IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
MIKROORGANIZMOV IZ TAL LJUBLJANSKEGA BARJA
MAGISTRSKO DELO**

**ISOLATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF
MICROORGANISMS FROM LJUBLJANA MARSH SOIL
M.SC.THESIS**

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani, ter po sklepu senata Biotehniške fakultete dne 28. 9. 2008, je izdana odločba o izpolnjevanju pogojev za izdelavo magistrskega dela s področja biologije, ter sprejeta tema magistrskega dela z naslovom: Osamitev in morfološka karakterizacija mikroorganizmov iz tal Ljubljanskega barja. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik komisije:	prof. dr. Nina Gunde Cimerman Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta Oddelek za biologijo
Član komisije:	prof. dr. Peter Trontelj Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta Oddelek za biologijo
Član komisije:	doc. dr. Cene Fišer Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta Oddelek za biologijo
Član komisije in mentor:	prof. dr. Ines Mandić Mulec Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 31.01.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Baze podatkov so shranjene pri avtorici. Vsi podatki iz drugih virov so ustrezno citirani.

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

Mojca Lešnjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
 DK, 631.4:579.2 (497.4 Ljubljansko Barje)(043.2)=163.6
 KG HC tla Ljubljanskega Barja/ mikrobne združbe tal/ retardacijski čas/ morfotip/ fiziološki potencial združb/multivariantna analiza
 KK
 AV LEŠNJAK (ZALOŽNIK), Mojca, univ. dipl. mikrobiolog, prof. likovne umetnosti
 SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
 LI, 2011
 IN OSAMITEV IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA MIKROORGANIZMOV IZ TAL LJUBLJANSKEGA BARJA
 TD Magistrsko delo
 OP XVIII, 88 str., 3 pregl., 17. sl., 34 pril., 102 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI

Izvleček

Ekološka raznolikost in pogostost vrst v različnih habitatih in združbah je ena osrednjih tem ekologije. Študije, ki se osredotočajo na mikrobno raznolikost v odvisnosti od časa izrasti kolonij na ploščah so redke, in bakterijska združba, ki je izrasla iz tal Ljubljanskega barja, še ni bila preučevana. V okviru te naloge smo spremljali izrast bakterijske združbe tal nizkega barja na polimernem gojišču z gelanom v obdobju 12 tednov. Spremljali smo čas izrasti kolonije (čas retardacije), redčitev izhodiščnega vzorca tal iz katerega izvira in vsak izolat morfološko opisali. Med 323 morfotipi je 37 morfotipov zraslo v drugem mesecu, 18 morfotipov v tretjem mesecu, preostali morfotipi so izrasli v prvem mesecu inkubacije. S pomočjo metode UPGMA in Jaccardovega koeficienta smo skonstruirali drevo v 48 korakih, s pomočjo katerega smo razložili povezavo časovno ločenih treh morfoloških skupin in časa retardacije. Verjetnost, da bi naključno drevo razložilo njihovo

povezavo z 48 koraki ali manj, je bila manjša ali enaka 0,003 ($P < 0,005$). Korelacija med izrisanim drevesom povezave morfotipov in časom retardacije je bila zato signifikantna, čeprav ne zelo velika. Bogatost morfotipov in raznolikost, določeni na podlagi Shannonovega indeksa, sta padali s časom izrasti kolonije. Sevi prvega meseca so bili bolj raznoliki tudi po barvi kolonij, medtem ko so bili počasni rastoči sevi na splošno brez pigmenta oziroma prozorni do rumenkasti. Izolate smo ponovno združili v združbe na podlagi retardacijskega časa in izhodne redčitve ter ovrednotili njihov metabolni potencial na Biolog ECOploščah. Iz študije lahko zaključimo, da je združba hitro rastočih sevov (prvi mesec) metabolno bolj raznolika kot počasneje rastoči združbi drugega in tretjega meseca. Na število in tip razgrajenih substratov najbolj vpliva čas retardacije (pojasni 59 % variance podatkov), kar smo potrdili tudi z analizo glavnih komponent (angl. PCA-analysis), na referenčno združbo iz HC-tal pa redčitev, saj število razgrajenih substratov referenčne združbe pada z višanjem redčitve. Najpomembnejši dejavnik ločevanja znotraj posameznih časovnih združb 1. in 2. meseca je čas inkubacije, znotraj 3. meseca pa redčitev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
 DC 631.4:579.2 (497.4 Ljubljansko barje)(043.2)=163.6
 CX HC soil from Ljubljana Marsh/soil microbial communities/ retardation
 time/morphotype/physiological potential of microbial communities /multivariate
 analysis
 CC
 AU LEŠNJAK (ZALOŽNIK), Mojca
 AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological department
 PY 2011
 TI ISOLATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF
 MICROORGANISMS FROM LJUBLJANA MARSH SOIL
 DT M.Sc.Thesis
 NO XVIII, 88 p., 3 tab., 17. fig., 34 ann., 102 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB

Abstract

Ecological diversity and frequency of species in different habitats and communities is one of the central themes of ecology. Studies that focus on the microbial diversity in relation to colony retardation time are rare, and the culturable microbial community in Ljubljana marsh soil has not yet been studied. In this study we followed the outgrowth of degraded peat soil bacterial community on a polymeric substrate-based medium in the period of 12 weeks. We determined the colony retardation time (i.e. the time the isolate needs to form a visible colony on solid plate), which was also evaluated in relation to the dilution of the original soil sample, and morphologically described each isolate.

Among the 323 morphotypes, 37 were categorised into the group with the retardation time of 2 months, while 18 morphotypes had the retardation time of 3 months. Other

morphotypes grew out within the 1st month. We explained the connection of time groups with morphological characteristics with the construction of a tree in 48 steps using the UPGMA method and the Jaccard coefficient. Because the probability that a random tree with 48 steps would explain the connection is less than 0,003 ($P < 0,005$), this means that the correlation between a given tree and time group of morphotypes according to retardation time is very significant, although not very large.

Richness and diversity (as defined by the Shannon diversity index) decreased with retardation time. Fast-growing morphotypes were more similar to each other than to the slow-growing morphotypes, which had less pigmented colonies. Communities constructed from the faster-growing strains exhibited higher metabolic diversity than communities of slow growers. The number and type of degraded substrates is most affected by retardation time factor (explained 59 % of the data variance), which was confirmed by principal component analysis (PCA). The reference HC-community, on the other hand, was more affected by dilution factor, as the number of degraded substrates decreased with increased dilution. The most important factor of separation among different retardation time groups of the 1st and 2nd month is incubation time, and dilution among the 3rd month isolates.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	v
KEY WORDS DOCUMENTATION	vii
KAZALO VSEBINE	ix
KAZALO SLIK	xiii
KAZALO PREGLEDNIC	xvi
KAZALO PRILOG	xvii
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	xix
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED LITERATURE	4
2.1 MIKROBNA RAZNOLIKOST TAL	4
2.2 TALNI EKOSISTEM	6
2.2.1 Ljubljansko barje	7
2.3 POVEZAVE MED STRUKTURO IN FUNKCIJO MIKROBNIH ZDRUŽB	8
2.4 ANOMALIJA PLOŠČ IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE	10
2.5 NOVI POSTOPKI ZA OSAMITEV MIKROORGANIZMOV NA TRDNIH GOJIŠČIH	11
2.6 METODE ZA OPIS IN ANALIZO MIKROBNE ZDRUŽBE	13
2.6.1 Morfologija kolonij	13
2.6.2 Molekularne metode	14
2.6.3 Biokemijske metode	16
2.6.3.1 CLPP (Community Level Physiological Profiling)	16
2.6.3.2 Biolog ECOplate	17
2.7 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA USPEH OD GOJENJA ODVISNIH METOD	17
2.7.1 Čas	18
2.7.2 Gojišče	18
2.7.3 Tekoče ali trdno gojišče	19
2.7.4 Redčenje	20
3 MATERIALI IN METODE	22

3.1 MATERIALI	22
Reagent:	22
GOJIŠČA IN DODATKI:	22
Pufri in raztopine:	23
3.2 HODOGRAM POSTOPKOV EKSPERIMENTA	25
3.3 VZORČENJE TAL	26
3.3.1 Področje vzorčenja	26
3.3.2 Način vzorčenja	26
3.4 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V TLEH S FLUORESCENTNO MIKROSKOPIJO	26
3.5 GOJIŠČA	27
3.6 SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH KOLONIJ IZ BARJANSKIH TAL NA TRDNIH GOJIŠČIH	27
3.7 MORFOLOŠKI OPIS IZOLATOV	28
3.8 POSTAVITEV BAZE IZOLATOV V PROGRAMU MICROSOFT ACCESS	29
3.9 SHRANJEVANJE SEVOV	31
3.10 GOJENJE NA LB	32
3.11 VREDNOTENJE METABOLNEGA POTENCIALA MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO FIZIOLOŠKEGA PROFILIRANJA ZDRUŽB (ECOPLOŠČE® BIOLOG)	32
3.12 STATISTIČNE ANALIZE	33
3.12.1 Hierarhično grozdenje morfotipov	33
3.12.2 Preizkus hi-kvadrat	33
3.12.3 Analiza podobnosti metabolnih profilov združb, osamljenih v obdobju 3 mesecev, na trdnem POL-gojišču z multivariantno analizo	34
4 REZULTATI	35
4.1 CELOKUPNO ŠTEVILO IN ŠTEVILO IZRASLIH PROKARIONTOV V TLEH	35
4.2 IZRAST BAKTERIJSKIH KOLONIJ NA POL-GOJIŠČU V ODVISNOSTI OD ČASA IN REDČITVE	35
4.2.1 Število kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4}	35
4.2.2 Število bakterijskih kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od redčitve (redčitve 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6}).	36
4.2.3 Število kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitve 10^{-3} in 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6} .	37
4.2.4 Izračun λ -faktorja za različne tedne izrasti in retardacijske čase	38
4.2.5 CFC-krivulje števila kolonij za POL-gojišče v odvisnosti od časa izrasti pri štirih različnih redčitvah	40

4.2.6	Hipotetične krivulje za vrednost števila kolonij po 1. tednu izrasti na trdnem gojišču za redčitve 10^{-3} in 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6}	41
4.3	MORFOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJSKIH KOLONIJ, IZRASLIH NA TRDNEM POL-GOJIŠČU	43
4.3.1	Hi-kvadrat preiskus povezanosti opisa morfotipa in časovnih skupin glede na retaradacijski čas	44
4.3.2	Shannonov diverzitetni indeks morfotipov glede na retardacijski čas	45
4.3.3	Dendrogram morfoloških tipov	47
4.4	METABOLNI POTENCIAL IZ IZOLATOV SKONSTRUIRANIH ZDRUŽB	50
4.4.1	Razgradnja substratov na Biolog ECo ploščah v odvisnosti od časa retardacije za različne pripravljene združbe, razvrščene po času inkubacije	50
4.4.2	Število razgrajenih substratov glede na tip substrata v odvisnosti od retardacijskega časa	52
4.4.3	Multivariantna analiza metabolnih potencialov sestavljenih združb	54
4.4.4	Ločene PCA analize združb 1. meseca, 2. meseca in 3. meseca	56
4.4.5	Multivariantna analiza referenčne združbe HC-tal na Biolog ECo ploščah	59
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	62
5.1	RASTNE KRIVULJE GOJENJA NA TRDNIH GOJIŠČIH V ODVISNOSTI OD ČASA IZRASI KOLONIJE	62
5.1.1	Mikroskopski pregled talnih mikroorganizmov	62
5.1.2	Rastne krivulje na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti na trdnem gojišču	62
5.2	MORFOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJ, IZRASLIH NA TRDNEM GOJIŠČU, V ODVISNOSTI OD ČASA IZRASI NA TRDNEM GOJIŠČU	66
5.2.1	Shannonov diverzitetni indeks morfologije kolonij glede na retardacijski čas in redčitev	66
5.2.2	Hi-kvadrat preiskus povezanosti opisa morfotipa in časovnih skupin glede na retardacijski čas	67
5.2.3	Dendrogram morfoloških tipov	68
5.3	METABOLNI POTENCIAL ZDRUŽB IN IZOLATOV	68
6	POVZETEK	72
6.1	POVZETEK	72
6.2	SUMMARY	75
7	SKLEPI	77
8	LITERATURA	78
ZAHVALA		

PRILOGE

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram postopkov eksperimenta .	25
Slika 2: Slika seva B266 prikazuje način postavitve slik in opis kolonije v bazi v programu Microsoft Access. Kvadratna mreža ob sliki omogoča približno oceno reda velikosti kolonije – 1 kvadrata meri 1 mm, večji na levi pa 1 cm. Zaradi lažjega ocenjevanja barve kolonije je priložena še standardna barvna skala CMY (Cyan, Magenta, Yellow).	29
Slika 3: Prikaz slike v vidnem polju v Microsoft Access, ki omogoča določanje približne velikosti kolonije. Kvadrata na mreži predstavlja približno 1,75 mm.	30
Slika 4: Število kolonij za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} v odvisnosti od časa izrasti na trdnem gojišču z napako. Prikazani so povprečja in standardni odkloni meritev, preračunani iz štirih različnih vrednosti znotraj treh časovnih enot. Zgornje tri točke – modri romb – označujejo redčitev 10^{-3} , spodnje – rožnati kvadrat – pa redčitev 10^{-4} .	35
Slika 5: Rastne krivulje števila kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitve 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-6} . Za vsak teden posebej je prikazano naraščanje števila kolonij s standardno napako v odvisnosti od časa izrasti za vsako redčitev posebej.	37
Slika 6: CFC-krivulja izolatov, izraslih na POL-gojišču med 12-tedensko inkubacijo. Vrednost v vsaki časovni točki intervala 12. tednov je izračunana kot razmerje med številom v časovni točki izraslih kolonij in končnim številom kolonij. Prikazane so vse štiri redčitve.	40
Slika 7: Odvisnost števila kolonij od redčitve za 4 hipotetične krivulje v 1. tednu rasti v primerjavi z originalno krivuljo na logaritemski skali. Hipotetične krivulje za 12. teden rasti po različnih redčitvah so dobljene iz podatkov števila kolonij v 12. tednu rasti za vsako redčitev posebej. Potem je dejansko število kolonij iz npr. redčitve 10^{-3} vzeto kot referenca in redčeno do redčitve 10^{-6} .	41
Slika 8: Prikaz morfotipov izolatov na POL-gojišču v časovnem obdobju 12 tednov na podlagi 5 opisnih lastnosti – pigment, površina, oblika, red velikosti, prozornost – z ozirom na teden rasti. Levi del skale prikazuje oznake morfotipa, desni pa število izolatov z zapisano kombinacijo lastnosti - prikazuje enake morfotipe skupaj, z barvno lestvico pa je naznačeno, koliko morfotipov iz katerega tedna vsebuje opisna oznaka tega morfotipa. Morfotipi so določeni opisno. Graf je narejen v programu Microsoft Access.	43
Slika 9: Bogatost (A), raznolikost (B) in enakomernost (C) morfotipov na trdnem gojišču POL redčitve 10^{-3} ob treh mesečnih periodah inkubacije. (A) izračunana na podlagi tedensko odčitane števila novih morfotipov, ki so prikazani v Tabeli 7.	46
Slika 10 : Dendrogram podobnosti morfotipov, izraslih na trdnem POL-gojišču. Dendrogram je bil izdelan v programu Macclade – metoda UPGMA (Between Group Linkage in Jaccardov koeficient). Prvi stolpec oznak v drevesu označuje seve z retardacijskim časom (čas, ki ga kolonija potrebuje, da zraste na trdnem gojišču) 1 meseca, drugi stolpec seve z retardacijskim časom 2 mesecev in tretji stolpec seve z retardacijskim časom 3 mesecev.	48
Slika 11: Na osi x je prikazano število korakov, ki so potrebni za konstrukcijo n naključnih dreves, na osi y	

pa število dreves, generiranih s tem številom korakov. Drevo na sliki 10 je pojasnjeno z 48 koraki, kar generira 11 naključnih dreves. 49

Slika 12: Število razgrajenih substratov na Biolog ECOploščah v odvisnosti od časa inkubacije ECOplošč posameznih združb in časa retardacije. Stolpci so razvrščeni glede na število porabljenih substratov – povprečne vrednosti z napako so podane v preglednici 4: od največ do najmanj porabljenih substratov. Substrati so označeni z različnimi barvami glede na čas inkubacije: združbe 1. dne – svetlo modro; 5. dne – rdeče; 15. dne – zeleno; združbe 2. meseca – zeleno; združbe 3. meseca – modro. 50

Slika 13: Število razgrajenih substratov v odvisnosti od retardacijskega časa po tipu substrata po 1 dnevu inkubacije. 53

Slika 14: Število razgrajenih substratov v odvisnosti od retardacijskega časa po tipu substrata po 120 dneh inkubacije. 53

Slika 15: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECOplošč (1., 5., 15. in 120. dan), zraven pa je pripisano tudi število sevov na vsaki plošči. V legendi število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo 1me3 – 112 sevov; za m1e4 – 56 sevov; za m2e3 – 18 sevov; za m2e4 – 8 sevov; za m3e3 – 3 seve; in za m3e4 – 2 seva. Združbe, označene z rdečo barvo, so združbe 1. meseca, zelene barve so združbe 2. meseca, modre barve pa združbe 3. meseca. Polni znaki označujejo redčitev 10^{-3} , prazni pa redčitev 10^{-4} . Krog – 1. dan; trikotnik – 5. dan; kvadrat – 15. dan; petkotnik – 120. dan inkubacije. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 59 % variance; in za komponento 2 – 12 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja. 55

Slika 16: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECOplošč (1., 5., 15. in 120. dan), zraven pa je pripisano tudi število sevov na vsaki plošči. V grafu A število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo 1me3 – 112 sevov; za m1e4 – 56 sevov. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 77 % variance; in za komponento 2 – 9,4 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja, elipse pa združbe, združene glede na 1. in 120. dan inkubacije.

V grafu B število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo m2e3 – 18 sevov; za m2e4 – 8 sevov. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 81 % variance; in za komponento 2 – 10 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja.

V grafu C število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo m3e3 – 3 seve; za m2e4 – 2 seva. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 64 % variance; in za komponento 2 – 20 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja, elipse pa združbe, združene glede na redčitev. 57–58

Slika 17: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v

katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECOplošč (1., 5., 15. in 120. dan. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 42 % variance; za komponento 2 – 18 % variance; in za komponento 3 – 14 % variance podatkov.

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število kolonij v odvisnosti od časa izrasti na POL-gojišču za štiri različne redčitve. Prikazano je povprečno priraščanje števila kolonij za 4 različne redčitve za 12-tedensko periodo v štirih ponovitvah. Za vsako redčitev posebej je prikazano celokupno število kolonij, ki so zrasle v določenem tedenskem obdobju. 36

Preglednica 2: Vrednost λ v odvisnosti od retardacijskega časa za posamezne mikrobne populacije. V 9. tednu števila bakterijskih celic nismo šteli, zato podatkov za ta čas ni. Kot t je bil upoštevan čas štetja bakterij, N_{nes} je končno število kolonij v 12. tednu, kar je približek za število kolonij v neskončnem času, saj smo predvidevali, da se rast ustavlja. Tr smo upoštevali kot srednjo vrednost med obema merjenima vrednostma (v tednih), saj mora biti $\leq t$ (čas štetja). N_t je število na novo izraslih prešteti celic v merjenem tednu. 39

Preglednica 3: Viri ogljika na Biolog ECOploščah. Kodifikacijaska tabela 31 substratov (prava razporeditev je v treh ponovitvah) (Chazarenc in sod., 2010). 52

KAZALO PRILOG

Priloga A: Priraščanje novih kolonij za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} v odvisnosti od časa izrasti na POL-gojišču. Prikazani so povprečja in standardni odkloni meritev, preračunani iz štirih različnih vrednosti znotraj treh časovnih enot.

Priloga B: Število kolonij iz različnih redčitev na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti.

Priloga C: CFC-krivulje za odvisnost števila kolonij od redčitve in časa rasti za POL-gojišče. Vrednost v vsaki časovni točki intervala 12 tednov je izračunana kot razmerje med številom v časovni točki izraslih kolonij in končnim številom kolonij.

Priloga D: Podatki za normalizirano vrednost – število kolonij, izraslih do določenega tedna, proti številu vseh izraslih kolonij na POL-gojišču v inkubacijskem času 12 tednov. Prikazane so vrednosti za vse štiri redčitve skupaj.

Priloga E: CFC-krivulja – normalizirane vrednosti števila kolonij: število kolonij, izraslih do določenega tedna, proti številu vseh izraslih kolonij na POL-gojišču v inkubacijskem času 12 tednov (upoštevane vse redčitve od 10^{-3} do 10^{-6}).

Priloga F: Preglednica za hipotetične krivulje za vrednosti števila kolonij po 1. tednu in ekstrapolirane za vsako redčitev posebej. Podatki, ki so osnova za izračun hipotetičnih krivulj, so podatki po 1. tednu rasti, ki so v tabeli prikazani s krepkim tiskom.

Priloga G: Preglednica za hipotetične krivulje za vrednosti števila kolonij po 12. tednu in ekstrapolirane za vsako redčitev posebej.

Priloga H: Prikaz morfotipov izolatov na POL-gojišču v časovnem obdobju 12 tednov na podlagi 5 opisnih lastnosti – pigment, površina, oblika, red velikosti, prozornost – z ozirom na teden rasti. Levi del skale prikazuje oznake morfotipa, desni pa število izolatov z zapisano kombinacijo lastnosti - prikazuje enake morfotipe skupaj. Morfotipi so določeni opisno. Graf je narejen v programu Microsoft Access.

Priloga I: Prikaz morfotipov izolatov na POL-gojišču v časovnem obdobju 12 tednov na podlagi 5 opisnih lastnosti: pigment, površina, oblika, red velikosti, prozornost. Levi del skale prikazuje oznake morfotipa, desni pa število izolatov z zapisano kombinacijo lastnosti. Morfotipi so določeni opisno. Graf je narejen v programu Microsoft Access.

Priloga J: Nasičenost (bogatos) prikazuje število različnih morfotipov v 3 časovnih obdobjih. Prikazani so povprečno število na novo izraslih različnih morfotipov v vsakem tednu rasti treh ponovitev ter povprečja kolonij v 1., 2. in 3. mesecu za redčitev 10^{-3} , saj je bilo le v tej redčitvi dovolj kolonij za izračun napake. V 9. in 10. tednu ni bilo prirasta kolonij. Raznolikost v odvisnosti od časa izrasti za POL-gojišče. Prikazani so raznolikost morfotipov v vsakem tednu rasti in njihova povprečja ter standardni odkloni za 1., 2. in 3. mesec. Enakomernost v odvisnosti od časa izrasti za POL-gojišče. Prikazani so enakomernost morfotipov v vsakem tednu rasti in njeno povprečje in standardni odklon za 1., 2. in 3. mesec.

Priloga K: Število substratov na Biolog ECOploščah v odvisnosti od retardacijskega časa. Število substratov

je povprečje treh meritev s podano standardno napako. Funkcionalna raznolikost (v %) označuje procent vseh razgrajenih substratov (od 31). Prikazana je v odvisnosti od časa za različne skonstruirane združbe, razvrščena pa po času inkubacije.

Priloga L: Število razgrajenih substratov na Biolog ECo ploščah v odvisnosti od števila sevov v združbi.

Priloga M: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov vseh časov retardacije.

Priloga N: Scree diagram za združbe vseh časov retardacije.

Priloga O: Celokupna pojasnjena varianca za združbe sevov vseh časov.

Priloga P: Komponentna matrika za združbe vseh časov inkubacije.

Priloga R: Celokupna pojasnjena varianca za združbe sevov 1. meseca izrasti redčitev 10^{-3} in 10^{-4} .

Priloga S: Scree diagram za združbe časa retardacije 1 meseca.

Priloga T: Komponentna matrika za seve združbe 1. meseca.

Priloga U: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov časa retardacije 2 mesecev.

Priloga V: Celokupna pojasnjena varianca za seve združb retardacije 2 mesecev.

Priloga Z: 21: Scree diagram za združbe retardacijskega časa 2 mesecev.

Priloga X: Komponentna matrika za seve časa retardacije 2 mesecev.

Priloga Y: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov časa retardacije 3 mesecev.

Priloga A1: Celokupna pojasnjena varianca združbe sevov časa retardacije 3 mesecev.

Priloga B1: Scree diagram za združbe sevov retardacijskega časa 3 mesecev.

Priloga C1: Komponentna matrika za združbe sevov 3. meseca.

Priloga D1: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za referenčne združbe HC-tal.

Priloga E1: Celokupna pojasnjena varianca za referenčne združbe HC-tal.

Priloga F1: Scree diagram za referenčne združbe HC-tal.

Priloga G1: Komponentna matrika za referenčne združbe HC-tal.

Priloga H1: Hi-kvadrat test za 35 lastnosti opisov morfotipov. Izračunali smo pričakovano število morfotipov, če čas retaracije nebi imel nobenega vpliva in dejansko število morfotipov znotraj skupin 1 (hitrorastoči sevi) in 2 (počasirastoči sevi izrasli od 4. tedna dalje). V tabeli testa Hi-kvadrat smo izračunali vrednost Hi-kvadrat koeficienta, stopinje prostosti in stopnjo značilnosti dobljenih razlik za vsako od 35 lastnosti s katerimi smo opisali morfotipe.

Priloga I1: Seznam sekvenc, pridobljenih iz izolatov, izraslih na POL-gojišču v 12-tedenskem časovnem obdobju. Črka B in številka označujeta ime seva, kakor je zaveden v bazi podatkov in v zbirki zamrznjenih sevov. Poleg tega sta navedena še redčitev in teden, v katerem se je izolat prvič pojavil na plošči. Zvezdice označujejo kvaliteto sekvenc. Brez zvezdic – dobra sekvenca. Število zvezdic označuje, kako slaba je sekvenca. Od 1 do 3.

Priloga J1: Baza podatkov o izolatih v programu Microsoft Access (DVD).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kbp	kilobazni pari
CFU	mikrobna celica ali skupek celic, iz katere se razvije posamezna kolonija (ang. colony-forming units)
CFC	ob inkubaciji bakterijskih celic na ploščo se število kolonij po lag periodi povečuje v odvisnosti od časa, kar grafično prikažemo kot colony-forming curve – CFC –, ki prikazuje razmerje med številom izraslih bakterij v enoti časa in vsemi izraslimi bakterijami
DNK	dezoksiribonukleinska kislina
dNTP	dezoksinukleozid trifosfat
fen-HC	nizko barje z višjo vsebnostjo ogljika
LB	Luria Bertani
PCA analiza	metoda glavnih komponent je ena od metod multivariantne analize s pomočjo katere zmanjšamo kompleksnost podatkov in izluščimo glavne spremenljivke
PCR	verižna reakcija s polimerazo
POL-gojišče	gojišče sestavljeno iz polimernih substratov (ksilan, CNC-celuloza, škrob, pektin, ksiloza)
retardacijski čas	t_r (retardacijski čas) je čas izrasti kolonije
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine (ang. unweighted pair-group method with arithmetic mean)
λ faktor	označuje verjetnost pojavljanja kolonij na trdnem gojišču in naj bi bila odvisna tudi od fiziološkega stanja celice

1 UVOD

Od gojenja neodvisne molekularne metode so v zadnjih dveh desetletjih omogočile vpogled v sestavo mikrobnih združb v kompleksnih okoljih. Vendar je neverjetna raznolikost mikrobnega sveta zakladnica, ki jo še vedno slabo poznamo, in zadnje čase se poudarja, da bo za razumevanje principov mikrobne ekologije in metabolne raznolikosti mikrobnih združb v teh okoljih nujno vzgojiti čim večji delež združb tudi v laboratoriju. Osamitev mikroba iz okolja nam namreč omogoča natančno preučevanje njegove fiziologije in ugotavljanje povezav med taksonomsko in metabolno diverziteto mikroorganizmov.

Vendar ta korak ne bo enostaven, saj znamo danes v laboratoriju gojiti le majhen delež mikroorganizmov iz okolja, največ 1 % (Torsvik in sod., 2002, Stres in Tiedje, 2006).

Uporaba morfotipa kot ekološke entitete, s katero lahko vrednotimo diverziteto, ni nova, čeprav so te študije zaradi visokega vložka dela redke (Halderman in Amy, 1993, Bone in Balkwill, 1988, Lebaron in sod., 1998, Nübel in sod., 1998, Westergaard in sod., 2001, Ikner in sod., 2006). Ljubljansko barje predstavlja izredno pester ekosistem, ki vsebuje vse razvojne stopnje šotnih barij – visoko, nizko in degradirano barje – ter pokriva približno 16.000 ha. V laboratoriju Katedre za mikrobiologijo že dalj časa preučujejo mikrobno ekologijo tal tega mokrišnega ekosistema, in na voljo je knjižnica genov za 16S rRNK iz vzorca tal nizkega barja (Kraigher in sod., 2006). Do sedaj iz tega okolja nihče ni poskušal pridobiti bakterijskih izolatov, in študije, v katerih bi v daljšem časovnem obdobju na revnih gojiščih skušali izolirati predstavnike specifične združbe tal in jih morfološko in metabolno okarakterizirati, so izredno redke.

CLPP-metoda z uporabo mikrotitrskih plošč z več viri ogljika je postala pogosto orodje za primerjavo mikrobnih združb glede na njihov funkcijski potencial (Garland in Mills, 1991). Z uporabo Biolog ECOplošč smo želeli preveriti, ali čas retardacije vpliva tudi na izrast metabolno raznolikih združb.

S študijo smo želeli opredeliti najpomembnejši faktor, ki vzpostavlja raznolikost mikrobnih združb, izoliranih iz HC-tal na plošče vzdolž retardacijskega časa (čas, potreben za izrast kolonije na plošči), redčitve, časa inkubacije Biolog ECOplošč in števila sevov v skonstruiranih združbah. Rezultati CLPP z uporabo Biolog ECOplošč so bili analizirani z metodo glavnih komponent – PCA (Principal Component Analysis).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil osamiti mikrobno združbo v zgornjem sloju tal Ljubljanskega barja in okarakterizirati morfološko raznolikost združbe, zrasle na trdnem polimernem (POL) gojišču v odvisnosti od redčitve talne suspenzije in časa inkubacije (retardacijskega časa) v obdobju treh mesecev. Na podlagi morfološkega opisa osamljene združbe in poznavanja časa izrasti smo želeli preveriti povezave med morfološko raznolikostjo/bogatostjo in enokomernostjo izolirane združbe ter retardacijskim časom, potrebnim za izrast kolonij na trdnem gojišču. Poleg tega je bil namen delno okarakterizirati tudi metabolni potencial izrasle združbe.

1.2 HIPOTEZE

Predpostavljamo:

- 1) da bomo iz tal Ljubljanskega barja osamili mikrobno združbo, ki jo lahko razdelimo v več podzdružb, ki se med seboj razlikujejo glede na čas retardacije;
- 2) da se izolati med seboj morfološko in metabolno razlikujejo glede na čas prve izrasti kolonije (čas retardacije) na trdnem POL-gojišču.

Prva hipoteza temelji na modelu FOR-krivulj (CFC krivulje) (Hattori in sod., 1997), ki pravi, da je število kolonij, vidnih na ploščah, funkcija inkubacijskega časa:

$$N(t) = N_{\infty} [1 - \exp(-\lambda(t-t_r))], t \geq t_r$$

N_{∞} je pričakovano število kolonij na plošči ob neskončnem inkubacijskem času, t_r (retardacijski čas) je čas izrasti kolonije, λ pa označuje verjetnost pojavljanja

kolonij in naj bi bila odvisna tudi od fiziološkega stanja celice (Ishikuri in Hattori, 1987, Hattori in sod., 1997).

- 3) s podaljšanjem inkubacijskega časa bomo vzgojili večji delež mikroorganizmov v HC – tleh Ljubljanskega barja, kot bi ga dosegli z običajnim nekajdnevnim inkubacijskim časom. Ta hipoteza je postavljena na osnovi predhodnih ugotovitev Janssna in sod., 2002, 2006, ter Josepha in sod., 2003, ki sta ugotovila, da je za višji delež izraslih mikroorganizmov potreben inkubacijski čas 12 tednov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 MIKROBNA RAZNOLIKOST TAL

Človek se vedno bolj zaveda pomena ohranjanja naravnih vrst, zato je odkrivanje in ohranjanje biotske raznolikosti naravnih ekosistemov pomemben predmet znanstvenih raziskav.

Delovanje bioloških sistemov (ekosistemi ali mikrokozmi) je odvisno od odnosov med tremi glavnimi dejavniki: okoljem, strukturo biološke združbe, njeno raznolikostjo in biološko aktivnostjo (funkcijo). Vloga mikrobov pri delovanju ekosistema pa je še vedno precej nepoznana. Z uporabo molekularnobioloških tehnik so pokazali, da so mikrobne združbe, še posebej v tleh, kompleksne (Torsvik in sod., 1990).

Razumevanje povezav med raznolikostjo, pogostostjo in funkcijo mikrobnih združb je eden temeljnih ciljev mikrobne ekologije, in parameter raznolikosti so že uporabili kot indikator blagostanja in celo zdravja ekosistema. Torsvik in Øvreås (2002) sta predlagala, da se z višanjem raznolikosti mikrobnih združb v nekem ekosistemu poveča njegova stabilnost in odpornost. Vendar ostaja pomen raznolikosti mikrobnih združb za delovanje ekosistema predmet diskusije, pri čemer je večina nejasnosti posledica uporabe nepopolnih metodoloških pristopov (Harris, 2009, Jones in sod., 2009, Atlas in Bartha, 1997, Magurran, 1988, Fierer in sod., 2007).

Ekološka raznolikost je definirana kot številnost in relativna zastopanost vrst v mikrobni združbi danega ekosistema. Lahko je podana kot strukturna raznolikost (določanje strukture združbe) ali pa kot funkcionalna raznolikost (določanje mikrobne aktivnosti) (Andrén in Balandreau, 1999).

Raznolikost mikrobnih združb lahko opišemo (Franklin in sod., 2001):

- s sestavo vrst oziroma operacijskih taksonomskih enot (OTU), kjer jo izrazimo kot Shannon-Wienerjev indeks raznolikosti:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad \dots (1)$$

- pri čemer je i posamezna vrsta, p_i pa delež posameznikov;
- z nasičenostjo vrst, ki predstavlja število vrst (OTU / tipov organizmov) v združbi; nasičenost označimo s S ;
- z enakomernostjo vrst oziroma OTU oziroma tipov, pri čemer je relativna porazdelitev posameznikov med temi tipi enaka:

$$H' / H'_{\max} \text{ in } H'_{\max} = \ln S \quad \dots(2)$$

Termin mikrodiverziteta je bil uporabljen za opis bakterijskih populacij, ki so filogenetsko sorodne, vendar fiziološko različne. Funkcionalna raznolikost vključuje različne funkcije mikroorganizma, pa tudi njihovo izražanje. Proučevanje aktivnosti v povezavi s strukturo mikrobnih združb je težavno, saj je mogoče v laboratoriju gojiti le del mikrobov iz tal. Oligofilne bakterije s strategijo K so bakterije, ki so prilagojene na rast v okoljih z nizko vsebnostjo hranil in bi lahko predstavljale visok delež manjkajoče diverzitete mikrobov, saj običajno slabo rastejo na bogatih gojiščih, ki se najpogosteje uporabljajo za osamitev bakterij iz okolja. Te bakterije bolje rastejo na gojiščih z nizko vsebnostjo substrata in običajno tvorijo majhne kolonije na ploščah (Ferrari in sod., 2005).

Biološke združbe navadno vsebujejo nekaj vrst z velikim številom predstavnikov in veliko vrst z le nekaj predstavniki. Čeprav je za večino energetskega pretoka v združbi običajno odgovornih le nekaj dominantnih vrst, pa manj številne vrste navadno predstavljajo večinsko raznolikost združbe, njihova vloga v združbah pa še ni pojasnjena (Atlas in Bartha, 1997, Phillipot in sod., 2010).

Združba, v kateri je ena ali več populacij dominantnih, kaže na uspešnost dominantnih populacij, in običajno je raznolikost nizka. Po drugi strani pa je združba, ki ima veliko število različnih vrst, ki so razporejene enakomerno, bogata. Slednje se odraža v nižji ravni primarne produkcije na enoto biomase, medtem ko se ohranja stabilna raven raznolikosti (Atlas in Bartha, 1997, cit. po Mangalef, 1979, in Revelante in Gilmartin, 1980).

2.2 TALNI EKOSISTEM

Na splošno so tla zelo kompleksen, heterogen in dinamičen ekosistem, tako po fizikalni in kemijski sestavi kot po biološki raznovrstnosti. Sestavljena so iz anorganskih mineralnih delcev, razkrajajoče se organske snovi in živih organizmov ter igrajo pomembno vlogo pri globalnem kroženju snovi (Atlas in Bartha, 1998). Biološke komponente tal so predvsem mikroorganizmi, ki so ključni pri kroženju elementov in pri razgradnji organske snovi, s čimer vplivajo na globalno kroženje hranil in ogljika.

Gram tal lahko vsebuje do 10^9 mikroorganizmov, ki pripadajo velikemu številu različnih vrst (Franklin in sod., 2001).

Na mikrobni ravni so tla zelo heterogeno okolje, sestavljeno iz različno velikih delcev, ki jih obdajajo prostorčki, napolnjeni z vodo in zrakom, v katerih so lokalizirane mikrobne celice. Mikrohabitati se lahko razlikujejo že na zelo majhnih razdaljah (Van Elsas in van Overbeek, 1993, Nunan in sod., 2003). Mikroorganizmi so navzoči v z vodo napolnjenem prostoru med delci, na površini talnih delcev in v porah znotraj talnih delcev. Na talne delce so pritrjeni s polisaharidnimi adhezini (pritrčili), zunajceličnimi polimernimi substancami in z elektrostatskimi interakcijami. Na ekstrakcijo mikroorganizmov iz tal pomembno vpliva heterogenost okolja. Najlažje se osami prostoživeče mikroorganizme, ki se nahajajo v z vodo napolnjenih prostorih tal, medtem ko je odstranitev mikroorganizmov, ki so vezani na površino tal ali skriti v talnih porah, težja (Metcalf in sod., 1995).

Analiza prostorske razporeditve bakterij gnojenih tal na mikrogeografskih razdaljah je pokazala, da je 80 % bakterij lociranih v mikroporah stabilnih talnih agregatov (Ranjard in Richaume, 2001), kar nakazuje, da ponujajo ti habitati najugodnejše pogoje za rast mikrobov, ki so vezani na dostopnost vode in substratov, difuzijo plinov, zaščito pred predatorji. Sessitsch in sod. (2001) so pokazali, da se mikrobna raznolikost večja obratno sorazmerno z velikostjo talnih delcev in da ima poleg pH tal in vsebnosti organske snovi velik vpliv na mikrobno raznolikost in strukturo združbe tudi velikost delcev. V povezavi s tem so Carson in sod. (2010) ugotovili, da znižana povezava med porami in s tem znižan

vodni potencial in vsebnost vode povečujeta raznolikost bakterijske združbe v tleh. Druge raziskave različnih tipov tal so pokazale, da tip in dostopnost organskih substratov močno vplivata na pogostost mikrobnih skupin in njihovo funkcionalno raznolikost v talnem ekosistemu (Stres in Tiedje, 2006).

2.2.1 Ljubljansko barje

Ljubljansko barje je najbolj južno ležeče nizko barje v Evropi (45°58', 14°28'), pokriva pa površino približno 16000 ha. Glede na vodni režim in preskrbljenost s hranili razlikujemo med visokimi barji (ang. bog) in nizkimi barji (ang. fen) (Dobson in Frid, 1998). Ljubljansko barje predstavlja izredno pester ekosistem, ki vsebuje vse razvojne stopnje šotnih barj – visoko, nizko in degradirano barje (Prus, 2000).

Tla Ljubljanskega barja uvrščamo med hidromorfna tla (Histosol), kamor spadajo tudi šotna tla (Ausec in sod., 2009), ki imajo visoko vsebnost organske snovi. Tla nizkega barja dosežejo do 40-odstotno vsebnost organske snovi. Nastajanje šotnih tal je pogojeno z reliefnimi razmerami (topogena šotna tla) ali pa s klimatskimi razmerami (ombrogena šotna tla). Na lastnosti šotnih tal vplivajo tudi vrsta in stopnja razgradnje rastlinskih ostankov. Nastanek šotnih tal nizkega barja (topogena šotna tla) je vezan na konkavne reliefne oblike ter na prisotnost visoke podtalnice. Šotni horizonti so nastali pretežno iz barjanskih tal ter lesenih listnatih rastlin. Delež mahov je manjši.

Ljubljansko barje je tipičen predstavnik nizkega barja. Pogosto velja, da je nizko barje kislo. To v primeru tal Ljubljanskega barja ne drži. Kisli so le tisti predeli barja, kjer je šota zelo debela oziroma kjer imamo še ostanke visokega barja. Pod šoto leži »gyttya« ali nekdanje jezersko dno, ki je karbonatnega značaja, in tam najdemo številne polžje hišice, zato temu tipu tal pravimo tudi polžarica. Karbonati, raztopljeni v podtalnici, pa zaradi nihanja podtalnice vplivajo tudi na zgornje horizonte šote.

Šotna tla visokega barja (ombrogena šotna tla) nastanejo kot posledica intenzivne rasti in odmiranja mahov vrste *Sphagnum sp.* v razmerah hladne in vlažne klime. Med pretežno mahovnimi ostanki so tudi ostanki lesnatih rastlin (Prus, 2000).

2.3 POVEZAVE MED STRUKTURO IN FUNKCIJO MIKROBNIH ZDRUŽB

Še vedno ni povsem jasno, kakšen je odnos med raznolikostjo mikrobne združbe in njeno funkcijo. Molekularne analize 16S genov rRNK so pokazale, da so mikrobne združbe v okolju izredno raznolike, vendar pa z analizo 16S genov rRNK pridobimo le malo informacij o funkcionalni vlogi preučevanih rodov (Klappenbach in sod., 2000, Forney in sod., 2004).

Sukcesijo združbe omejuje selektivni pritisk fizikalnih, kemijskih in bioloških pogojev, ki obstajajo v danem habitatu in sooblikujejo posamezno nišo. Poleg tega je pomembno tudi ravnotežje med generalisti in specialisti. Izginotje članov združbe, kjer prevladujejo generalisti, v večji meri zavre delovanje združbe, kot pa je to zaznati v združbi, kjer prevladujejo specialisti (Stres in Tiedje, 2006).

Alternativni modeli sukcesije, vključno s časovnim gradientom in razvrščanjem po kompetitivnosti, predvidevajo, da bodo v zgodnjih sukcesijskih združbah dominantne tiste vrste, ki imajo široko nišo, so hitro rastoče in veliko vlagajo v reprodukcijo (oportunistični organizmi), medtem ko bodo v kasnejših fazah dominantni predstavniki, katerih niše so ozko specifične in ki rastejo počasi ter manj vlagajo v samo reprodukcijo (organizmi uravnoveženega ekosistema). Za opis življenjskega sloga mikroorganizmov uporabljamo izraze, kot sta r-selekcija/r-strategi in K-selekcija/K-strategi. R-strategi rastejo hitro, so majhni, potomci se hitro razširjajo in so uspešni v okoljih, ki se hitro spreminjajo, medtem ko K-strategi prevladujejo v stabilnih okoljih, rastejo počasi, so večji in živijo dlje ter uspešno tekmujejo v okolju, kjer so hranila omejena (limitna). Poimenovanje izhaja iz r/K selekcijske teorije, pri čemer je r konstanta rastne hitrosti populacije N, K pa je nosilnost okolja. Obe spremenljivki sta del enostavne Verhulstove enačbe, ki opisuje dinamiko populacij:

$$dN/dt = rN (1 - N/K) \quad \dots(3)$$

R-strategi so običajno prvi, ki kolonizirajo okolje, in Hattori in sod. (1997) ter Janssen (2002) predvidevajo, da mikrobne združbe v zgodnjih sukcesijskih stanjih okolja vsebujejo večji delež bakterij, zmožnih rasti na ploščah. Večji delež organizmov, ki niso zmožni rasti na ploščah, je lahko povezan s kasnejšim sukcesijskim stanjem ekosistema, saj K-strategi za rast porabijo manj energije in imajo zelo specifične rastne zahteve, ki v umetnih gojiščih niso vedno zadovoljene. Iz perspektive sukcesijske teorije je vsem tem mehanizmom skupno, da so se organizmi z razvojem ekosistema prilagodili na ožje, bolj specializirane niše (Franklin in sod., 2001).

Če je v združbi veliko organizmov, sposobnih posameznih biokemijskih reakcij, ki nadomestijo izginule ali neaktivne populacije, to povečuje možnost, da se funkcija v združbi ponovno vzpostavi (Franklin in sod., 2001). Predpostavlja se, da redundantnost funkcije znotraj združbe rabi temu, da prepreči izgubo posamezne funkcije ekosistema.

Zato trdijo, da je preverjanje funkcionalnih karakteristik mikrobnih združb, ki so nastale z redčitvijo in ponovnim izraščanjem kolonij, obetajoča pot generiranja združb, ki se razlikujejo po raznolikosti (bogatosti in enakomernosti) in po strukturi. Numerični algoritmi za simulacije teh odnosov in zgoraj predlagani pristop bi bili lahko v povezavi z drugimi molekularnimi in klasičnimi tehnikami uporaben način raziskovanja mikrobne raznolikosti v povezavi z obsegom niše in metabolno redundantnostjo (Franklin in sod., 2001).

Visoka raznolikost lahko pozitivno prispeva k redundantnosti določenih funkcij in ekotipov, ki so zmožni izražanja ekvivalentnih funkcij, čeprav struktura združbe, določena na osnovi molekularnih analiz, tega ne pokaže. Povezav med strukturo in funkcijo ni mogoče enostavno predvideti, saj lahko pozitivno, negativno ali nevtralno vplivajo druga na drugo, kar je odvisno od okolja (Stres in Tiedje, 2006).

2.4 ANOMALIJA PLOŠČ IN STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE

Razumevanje ekoloških odzivov mikrobnih združb zahteva razumevanje fiziologije posamičnih populacij. Poznavanje fiziologije in genetskega ustroja posameznikov omogoča vpogled v mikrobno raznolikost združb. Janssen in sod. (2002) navajajo, da je dozorelo spoznanje, da je za boljše razumevanje mikrobne ekologije treba osamiti večji delež mikrobne združbe, kot znamo danes. Osamitev mikroba iz okolja nam namreč omogoča natančno preučevanje njegove fiziologije in ugotavljanje povezav med taksonomsko in metabolno diverziteto mikroorganizmov. Vendar ta korak ne bo enostaven, saj znamo danes laboratorijsko gojiti le majhen delež mikroorganizmov iz okolja, največ 1–10 % (Torsvik in sod., 2002).

Pogost vir nesporazumov je napačna predpostavka, da mikroorganizmi iz okolja, ki izrastejo na ploščah, predstavljajo številčno prevladujoče in funkcionalno pomembne vrste v tem okolju. Vendar je večja verjetnost, vsaj kar se tiče prokariontov, da so bili izolirani zaradi svoje zmožnosti izraščanja v kolonije na umetnih gojiščih z visoko vsebnostjo substrata, in ne svoje njihove številnosti v okolju (Hugenholtz 2002).

Schönborn in sod. (2004) navajajo, da študije, ki za analizo mikrobnih združb uporabljajo od gojenja na ploščah neodvisne molekularne metode, nakazujejo, da mikrobi, ki jih ne znamo gojiti, niso nepomembni in da je genetska raznolikost v tleh zelo visoka. Številnih talnih bakterijskih skupin v laboratoriju še vedno ne znamo vzgojiti (Käberlein in sod., 2002), zato obstaja precejšen razkorak med sestavo združbe, ki jo znamo vzgojiti v laboratoriju, in tisto, ki jo opredelimo z molekularnimi, od gojenja neodvisnimi metodami (Tamaki in sod., 2005, Davis in sod., 2005). Predpostavlja se, da več kot 99 % mikroorganizmov iz naravnega okolja ni zmožnih rasti na trdnih gojiščih, ki jih danes uporabljamo v laboratorijih. Ena razlaga za veliko anomalijo plošč je, da mikrobne vrste, ki so dominantne v naravnem okolju, niso prilagojene na rast na gojiščih, ki vsebujejo visoke koncentracije kompleksnega organskega ogljika, in da veliko mikroorganizmov

potrebuje oligotrofne pogoje, da jih lahko uspešno gojimo na ploščah (Connon in Giovannoni, 2002).

Oligotrofne bakterije so bile opisane kot bakterije, ki so prilagojene na rast v okoljih z nizko vsebnostjo hranil in ki bi lahko predstavljale visok delež manjkajoče diverzitete. (Ferrari in sod., 2005, Davis in sod., 2005). Poročajo tudi o neuspešnosti mikromanipulacije posameznih celic, ki jim jih ni uspelo izolirati, saj so se bodisi poškodovale bodisi niso bile zmožne rasti v odsotnosti svojih sintrofnih partnerjev (Käberlein in sod., 2002).

Naslednja težava pri gojitvenih postopkih je točna in konsistentna identifikacija članov združbe. Eden mogočih in že uporabljenih postopkov je opis morfologije kolonij (morfotip), vendar se je treba zavedati, da obstajajo podobni tipi kolonij med taksonomsko različnimi organizmi (Hugenholtz, 2002), kot tudi različni tipi kolonij znotraj vrste (Kolter, 2006).

2.5 NOVI POSTOPKI ZA OSAMITEV MIKROORGANIZMOV NA TRDNIH GOJIŠČIH

Rastlinski polimeri in eksudati korenin so pomemben vir ogljika in energije za mikroorganizme, vendar pa identiteta večine mikroorganizmov, ki razgrajujejo organsko snov v rizosferi, ni poznana. Tla so kompleksen ekosistem, sestavljen iz številnih anorganskih komponent, ki se prepletajo z gradienti kisika in ostalih sprejemnikov elektronov, pri čemer so pomembni tudi vplivi letnih časov, meofavne in rastlin na strukturo mikrobnih združb (Chin in sod., 1999).

Vse metode za ekstrakcijo mikroorganizmov iz tal imajo dve standardni fazi: disperzijo tal v vodni raztopini in ločevanje mikrobnih celic in talnih delcev s centrifugiranjem glede na premer in gostoto ali oboje. Maksimalna disperzija tal v tekoči fazi je ključna za ločitev mikroorganizmov od talnih delcev in agregatov. Disperzijo tal se izvaja s fizikalnimi in

kemijskimi postopki ali z njihovo kombinacijo (Lindahl in Bakken, 1995) tako, da tla mešamo s pufersko raztopino. Število izoliranih mikroorganizmov pozitivno sovpada z intenziteto in trajanjem agitacije, čeprav to velja le za prostoživeče mikroorganizme in tiste, ki so šibko vezani na površino talnih delcev. Ekstrakcijo mikroorganizmov iz tal lahko izboljšamo s sonifikacijo tal 2,5 minute v pufru (Ellery in Schleyer, 1984, Kepner in Pratt, 1994, Buesing in Gessner, 2002).

Predpostavljajo, da uporaba izolacijskih postopkov, ki bolje oponašajo pogoje v naravnem habitatu, poveča verjetnost pridobitve do sedaj še neosamljenih mikrobov. Schönborn (2004) navaja kot eno možnih rešitev, s katerimi bi se izognili t. i. šoku s substratom, gojišče s polimeri. V polimernem gojišču je zelo nizka koncentracija dostopnih substratov in bakterije postopoma razgrajujejo dostopne polimere. Poleg tega se priporoča uporaba netradicionalnih virov hranil, kot so rastlinski eksudati (Chin in sod., 1997), signalnih molekul ali inhibitorjev (neželenih organizmov) in relativno dolgih časov inkubacije (včasih neposredno v naravnem okolju, iz katerega so bili pridobljeni organizmi), zaščita celic pred peroksidi in vključevanje huminskih kislin ali njihovih analogov (antrakinonski disulfonat), prisotnost drugih mikroorganizmov iz ciljnega okolja (Tamaki in sod., 2005), dodajanje signalnih molekul (npr. molekul, ki sodelujejo pri zaznavanju quoruma) (Tamaki in sod., 2005, cit. po Bruns in sod., 2002, Bussmann in sod., 2001, Olson in sod., 2000) oziroma uporaba večjega števila različnih tipov gojišč. Redčitveni gradienti olajšajo hitro določanje optimalnih rastnih pogojev za dva časovno odvisna parametra, kot sta pH in koncentracija hranil, ki ju pogosto uporabljajo kot gradienta na trdnih gojiščih (Hugenholtz, 2002).

Med postopki osamitve mikroorganizmov, ki so že bili uporabljeni, bi izpostavili redčenje vzorca, redčenje vzorca do ekstinkcije (do odsotnosti vseh celic), filtracijo, mikromanipulacijo, optično odstranjevanje posamičnih celic s pinceto, gradientno centrifugiranje, ločevanje celic z uporabo pretočne citometrije. Redčenje vzorca je primerno za osamitev v mikrobni združbi dominantnih organizmov (redčenje, dokler ne ostane samo ciljni organizem). Filtracija vzorca loči celice glede na velikost; če je torej

ciljni organizem posebej velik ali majhen, je to lahko uporabno za ločevanje od primarnega inokuluma (Hugenholtz, 2002).

Chin in sod. (1999) v svoji študiji domnevajo, da so verjetno organizmi iz zgornjih plasti tal bolj aktivni od mikroorganizmov iz globljih plasti zaradi večje vsebnosti hranil v zgornjih slojih in bi lahko zato bolje rasli na mikrobioloških gojiščih. Znano je namreč, da je znižanje deleža bakterij, ki so zmožne rasti na trdnih gojiščih, posledica povečanja deleža neodzivnih celic z globino tal. Znižanje števila izraslih mikroorganizmov z globino tal je lahko tudi posledica neprimerne izbire pogojev gojenja (sestava gojišča, pH, temperatura, pO_2) ali substrata, ki je manj primeren za gojenje fizioloških skupin talnih bakterij, ki so dominantne v globljih plasteh tal.

Verjetno pa mnogih prokariontov nikoli ne bomo uspeli vzgojiti v obliki čiste kulture, saj mnogi mikroorganizmi živijo v obligatno soodvisnem odnosu z drugimi mikroorganizmi. Za te organizme je neposreden dostop do njihovih genomov verjetno edini način, da bolje spoznamo njihov genetski in fiziološki ustroj (Hugenholtz, 2002).

2.6 METODE ZA OPIS IN ANALIZO MIKROBNE ZDRUŽBE

V taksonomiji in identifikaciji mikroorganizmov danes priporočajo uporabo polifaznega pristopa, tj. uporabo različnih metod in postopkov za opis fenotipskih, genotipskih in filogenetskih lastnosti izbranega seva/združbe (Braun in sod., 2006).

2.6.1 Morfologija kolonij

Nedavne študije so pokazale, da je lahko primeren parameter za ugotavljanje raznolikosti mikrobnih združb morfologija kolonij (Hugenholtz, 2002). Pri izolaciji talnih bakterij so se znanstveniki večinoma osredotočali na tiste izolate, ki so odgovorni za posamezne biogeokemične procese v tleh, oziroma so izolirali tiste mikroorganizme, ki so pokazali zaželeno ali edinstveno lastnost (npr. produkcijo protimikrobnih učinkovin, zanimivih encimov). Redke so študije, ki so zaobjele nespecifične populacije izolatov iz talnih

habitatov (Bone in Balkwill, 1988, Halderman in Amy, 1993, Lebaron in sod., 1998). Razpon morfološke variabilnosti znotraj iz določenega okolja vzete združbe mikroorganizmov, ki jih znamo gojiti, je zato slabo poznan. Morfološke lastnosti kot tipizacijski parameter za opis strukture združb prokariontov v tleh so uporabili že Lebaron in sod. (1998), ki so v morfološki opis vključili opis oblike kolonij, velikosti, pigmentiranosti, površine in prereza. Vsaka kombinacija teh petih lastnosti je predstavljala en morfotip.

Uporaba morfologije kolonij za opis strukture mikrobne združbe je bila uporabljena v raziskavah talnih združb (Bone and Balkwill, 1988). Morfotipi so navadno določeni subjektivno; včasih en morfotip predstavlja eno taksonomsko skupino, drugi imajo širši taksonomski obseg in predstavljajo več taksonomskih skupin (Lebaron in sod., 1998). V študiji so Lebaron in sod. (1998) testirali morfotipe homogenih skupin. Najprej so morfotipe opisali, naknadno pa so preverjali, ali sta koloniji, ki imata enak morfotip, tudi ista vrsta. Ugotovili so, da to velja le v primeru pigmentiranih oziroma jasno značilnih morfotipov, pri ostalih, manj značilnih, pa te povezave niso odkrili. Tudi Halderman in Amy (1993) sta pokazala, da je morfologija kolonij dobro izhodišče za določanje diverzitete, čeprav tak opis diverzitete vključuje le mikroorganizme, ki jih znamo gojiti na trdnih gojiščih, in ne celotne diverzitete nekega okolja (Faegri in sod., 1977, in Bakken in sod., 1985).

Starejši eksperimenti so pokazali, da je lahko morfologija kolonij dobro izhodišče za ugotavljanje stabilnosti oziroma dinamike diverzitete in za izračun ekoloških indeksov raznolikosti in enakomernosti (Halderman in Amy, 1993).

2.6.2 Molekularne metode

Za tla je značilna visoka raznolikost bakterijskih združb; v enem gramu tal najdemo celo do milijon različnih 16S rRNA sekvenc (Gans in sod., 2005). Zaradi teh visokih števil so zato sklepali, da je diverziteta kompleksnih mikrobnih združb posledica manj pogostih vrst. Številne študije mikrobnih združb temeljijo na molekularnih tehnikah, ki so omogočile uvid v veliko število 16S rRNA genov. Vendar pa se je treba zavedati, da

knjižnice genov, ki so jih pomnožili, ne predstavljajo nujno popolne in točne slike bakterijske združbe (Janssen, 2006).

Študije, osnovane na 16S rRNA, so jasno pokazale, da je filogenetska raznolikost v tleh precej večja, kot dajejo slutiti od gojenja odvisne študije. Običajno je gen za 16S rRNA uporabljen kot molekularni marker, ki omogoča identifikacijo (ali vsaj filogenetsko uvrstitev) organizma, iz katerega izvira, ne da bi ga bilo treba osamiti (Chin in sod., 1999, Von Wiintzingerode in sod., 1997), do težav pa prihaja pri določanju diverzitete na ravni vrste ali v okviru bližnje sorodnih organizmov oziroma pri tistih taksonih, ki vsebujejo organizme z zelo raznolikimi fenotipi. Hugenholtz (2002) izpostavlja, da široko razširjen horizontalni prenos v svetu bakterij 16S rRNA kot evolucijski marker postavlja pod vprašaj. Rappe in Giovannoni (2003) navajata tudi problem napak v zaporedjih 16S rRNA v podatkovnih bazah, ki otežujejo taksonomsko uvrščanje mikroorganizmov na osnovi tega gena.

Metagenomika ponuja potencial relativno nepristranskega pogleda v genetsko sestavo, metabolni potencial in ekološko vlogo kompleksnih mikrobnih združb (Alvarez in sod., 2009), vendar so ti pristopi bioinformacijsko zahtevni. Popolna genomska rekonstrukcija združbe je bila uspešna predvsem v primerih relativno preprostih mikrobnih združb (Podar in sod., 2007). Slabost metagenomskih in direktnih rekonstrukcij genoma je, da lahko spregledajo predstavnike, ki so številčno slabše zastopani, vendar izvajajo pomembne procese (Stres in Tiedje, 2006).

Z dostopnostjo novih tehnologij sekvenciranja in lažjim dostopom do baz podatkov je postala ocena vrstne bogatosti in enakomernosti (Schloss in Handelsman, 2006, Roesch in sod., 2007, Quince in sod., 2008) ter identifikacija novih bakterijskih debel (Elshahed, 2008a) dostopnejša številnim raziskovalcem, in v literaturi je danes mnogo študij, ki primerjajo združbe različnih okolij na osnovi sekvenciranih genov oziroma delov genov okoljske DNK (Roesch in sod., 2007, Quince in sod., 2008, Liu in sod., 2007).

2.6.3 Biokemijske metode

Funkcionalna diverziteta mikrobne združbe opisuje potencial te združbe za razgradnjo različnih organskih substratov (Zak in sod., 1994). Povezana je, ne pa tudi primerljiva, z genetsko ali taksonomsko diverziteto (Solbrig, 1991).

Genomske sekvence nam omogočajo spekulacijo o potencialni vlogi genov v metabolizmu in fiziologiji celice, in te analize kažejo, da je lahko v gramu tal od 10^5 do 10^6 unikatnih funkcij, ki bi jih lahko izvajala mikrobna združba (Roberts in sod., 2004). Vendar smo zmožni danes v laboratorijih izmeriti le del funkcionalnih sledi (encimatskih reakcij), še slabše pa njihovo regulacijo (Tiedje, 1994, Conrad, 1996). Za preučevanje teh vprašanj so bile uporabljene mikrotitrne plošče Biolog (Garland, 1997). Za raziskovanje raznolikosti porabe substratov mikrobnih združb so najpogosteje uporabili plošče BIOLOG GN, vendar le-te podpirajo hitro rastoče heterotrofne bakterije, zato z njimi ni mogoče določiti metabolne raznolikosti v tleh (Smalla in sod., 1998). Za določevanje širine ekološke niše so uporabili tudi CLPP (Community Level Physiological Profiling – mera za odzivnost združbe) (Degens in Harris 1997, Garland in Mills, 1991), pri čemer so ugotovili, da lahko zmanjševanje količine organske snovi v tleh zmanjša katabolno raznolikost talnih mikrobnih združb (Degens in sod., 2000).

2.6.3.1 CLPP (Community Level Physiological Profiling)

CLPP primerja vzorce porabe ogljikovih substratov med združbami in oceni obseg, do katerega združba porabi vsakega od 95 različnih virov ogljika (Garland in Mills, 1991).

Funkcionalni profil združbe, pridobljen s to metodo, je lahko indikator dostopnosti vira ogljika in hkrati selekcija za specifične funkcionalne tipe organizmov. Izkušnje so pokazale, da je večina mikrobnih celic pri gostoti $> 10^5$ pokazala pozitiven odziv po podaljšani inkubaciji. Garland in Mills (1991) sta domnevala, da lahko stopnja odziva odraža relativno pogostost organizmov, ki so zmožni uporabe določenega substrata.

Zmožnost odkriti sinergistične odnose med člani mikrobne združbe je pomembna lastnost pristopa CLPP k strukturi združbe, ki je druge tehnike nimajo (Garland in sod., 1997).

2.6.3.2 Biolog ECOplate

Princip Ecoplate temelji na mikrotitrskih ploščah Biolog za karakterizacijo mikrobnih združb, ki sta jih prvič uporabila Garland in Mills (1991). Metodologija Biolog EcoPlate™ je bila razvita za ekološko študijo in analizo mikrobnih združb na prošnjo skupine mikrobnih ekologov, ki so želeli več ponovitev, kot jih zagotavljajo Biolog GN. Biolog Ecoplate vsebuje 31 najpogostejše uporabljenih virov ogljika v treh ponovitvah. Združbe mikroorganizmov dajo značilen reakcijski vzorec, ki se imenuje metabolni prstni odtis in ga pridobimo v določenih časovnih obdobjih 2 do 5 dni. Analizira se tipične spremembe v barvi TTC in jih primerja z uporabo statističnih računalniških programov.

2.7 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA USPEH OD GOJENJA ODVISNIH METOD

Visoka diverziteta talnih mikrobnih združb je lahko posledica množice ekoloških niš in prilagoditvenih mehanizmov bakterij (Dykhuisen, 1998, Jaspers in Overmans, 2004) ali pa visoke funkcionalne redundantnosti talnih bakterij (Stres in Tiedje, 2006). Pokazano je bilo tudi, da je odvisna od pH tal, vendar pa ni povezana s temperaturo mesta vzorčenja, zemljepisno širino, vsebnostjo organskega ogljika, razmerjem C : N ali raznolikostjo rastlin (Fierer in Jackson, 2006).

V študijah so Davis in sod. (2005) ugotovili, da čas oziroma dolžina inkubacijske dobe kolonij na trdnih gojiščih pozitivno vpliva na povišanje mikrobne raznolikosti, saj se lahko člani redko izoliranih skupin na ustreznih gojiščih zaradi dolge lag periode pojavijo šele po 2 mesecih inkubacije. Število živih celic na vseh gojiščih je bilo višje, če so uporabili bolj razredčen inokulum. Davis in sod. (2005) ter Schönborn in sod. (2004) pa menijo, da je trdno gojišče bolj uporabno za izolacijo malo raziskanih skupin kot tekoče gojišče. Pomembna je tudi atmosfera, v kateri se bakterije inkubirajo, in Stevenson in sod. (2004) so osamili več acidobakterij v prisotnosti 5 % CO₂. Tamaki in sod. (2005) pa ugotavljajo, da se je število celic, sposobnih rasti na ploščah, zmanjševalo z zniževanjem pH gojišča.

2.7.1 Čas

Ker so v laboratoriju gojeni mikroorganizmi navadno izrasli na bogatih gojiščih in v relativno kratkem času, je eden novejših načinov pridobivanja novih bakterijskih vrst tudi podaljševanje časa inkubacije. Več različnih študij potrjuje, da je bila ena omejitev pri gojenju tudi prekratek čas inkubacije. Standardni inkubacijski časi so med 1 in 4 tedni (Davis in sod., 2005). Davis in sod. (2005) so tako najvišje število izolatov dobili, če so vzorce za 12 tednov inkubirali na gojišču z različnimi substrati in z gelanom kot strjevalnim agensom. Njihovim ugotovitvam pritrjujejo tudi Janssen in sod. (2002), ki so ugotovili, da je potrebna vsaj 10-tedenska inkubacija, da pride do maksimalnega razvoja kolonij na ploščah. Vendar pa Sait in sod. (2002) navajajo, da je kljub 12-tedenski inkubaciji večina predstavnikov zrasla v vidne kolonije že v prvem tednu. Za oceno vpliva časa retardacije (izrast kolonije) na pridobivanje izolatov je mogoče uporabiti model FOR, ki opisuje razmerje med številom kolonij in inkubacijskim (retardacijskim) časom:

$$N(t) = N_{\infty} [1 - \exp(-\lambda(t - t_r))], t \geq t_r \quad (4)$$

Enačba, s katero je opisan model FOR, vsebuje tri parametre: N_{∞} , t_r in λ . Prvi parameter je pričakovano število kolonij na plošči ob neskončnem inkubacijskem času. Drugi parameter t_r (retardacijski čas) je čas izrasti kolonije. Tretji parameter λ pa označuje verjetnost pojavljanja kolonij glede na posamezno celico v populaciji v enoti časa. Označuje raven formacije kolonij, ki naj bi bila odvisna tudi od fiziološkega stanja celice (Ishikuri in Hattori, 1987). Model FOR omogoča oceno števila celic v združbi, ki so potencialno zmožne tvoriti vidno kolonijo na trdnem gojišču.

2.7.2 Gojišče

Davis in sod. (2005, po Jensen, 1968) predlagajo, da mora ustrezno gojišče zadostiti štirim zahtevam:

- standardizirana sestava;
- zagotoviti mora rast kar najbolj širokemu razponu prisotnih bakterij;
- omogoči rast čim manjšemu številu nebakterijskih organizmov;
- zavirati rast polzečih kolonij (Davis in sod., 2005).

Chin in sod. (1999) navajajo, da je znano, da bogateno gojenje na ploščah selekcionira hitro rastoče bakterije, ki pa so na rast na uporabljenem gojišču tudi najbolj prilagojene. Davis in sod. (2005) na tradicionalnih gojiščih niso uspeli izolirati nobenega od redko izraslih predstavnikov, dobili pa so tudi nizko število živih celic. Zato je Janssen (2002) uporabil s hranili revno gojišče DNB (Dilluted Nutrient Broth – razredčena hranilna brozga). DNB z gelanom kot strjevalnim sredstvom se je izkazal za še bolj učinkovito gojišče. Gelrite gelan je nov strjevalni agens z dobro toplotno stabilnostjo, ki je podoben agarju, vendar opazno bolj čist. Po segrevanju in ohlajanju tvori čist gel (s pomočjo kationov, kot sta magnezij in kalcij) (Lin in Casida, 1984).

Davis in sod. (2005) navajajo, da so najvišjo povprečno vrednost živih celic dobili, ko so za rastni substrat uporabili ksilan. Sait in sod. (2002) so ugotovili, da lahko dodatek polimernega substrata in daljši čas inkubacije omogočita osamitev globalno porazdeljenih, a doslej še neznanih talnih bakterij. Polimeri bi bili zato lahko boljši substrati za določevanje števila celic, saj morajo biti najprej razgrajeni, to pa lahko prepreči nenadno izpostavitve talnih bakterij visokim koncentracijam rastnih substratov. Nekateri avtorji namreč trdijo, da lahko nenadna izpostavitve talnih mikrobnih združb visokim koncentracijam hranil povzroči smrt mikrobnih celic (Chin in sod., 1999, Postgate in sod., 1964).

2.7.3 Tekoče ali trdno gojišče

Schönborn in sod. (2004) so ugotovili, da je za gojenje talnih mikroorganizmov številnih bakterijskih debel serijsko redčenje v tekočem gojišču manj primerno kot trdno gojišče.

Vsi predstavniki, izolirani v tekočem gojišču, so se uvrstili v le 4 debela: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* in *Actinobacteria*. Pri treh študijah na trdnih gojiščih pa so uspeli poleg teh izolirati še predstavnike petih drugih debel. Zaključujejo torej, da je trdno gojišče za izolacijo slabo raziskanih skupin bolj uporabno kot tekoče gojišče (Schönborn in sod., 2004).

Schönborn in sod. (2004) navajajo, da so bakterije na trdnem gojišču prostorsko ločene in da zato med njimi redkeje prihaja do negativnih interakcij, kot je liza s koinduciranimi bakteriofagi in/ali produkcija antibiotikov. Poleg tega se signalne molekule, ki so morda

potrebne za iniciacijo rasti, v tekočem gojišču lahko razredčijo (Schoenborn in sod., 2004, po Miller in Bassler, 2001). Člani počasi rastočih skupin morda ne rastejo dovolj hitro, da bi se uspeli uveljaviti v tekoči kulturi, kar bi potem omogočilo naknadno izolacijo. Na trdnem gojišču, kjer so celice prostorsko ločene, pa imajo morda hitro rastoče bakterije manjši vpliv, če je začetni inokulum dovolj razredčen (Janssen in sod., 2002, Joseph in sod., 2003, in Sait in sod., 2002).

2.7.4 Redčenje

Franklin in sod. (2001) so uspešno uporabili redčenje za ugotavljanje mikrobne raznolikosti. Predpostavka njihovih študij je bila, da bi redčenje relativno raznolike združbe odstranilo tipe organizmov, ki so redki.

Po Chin in sod. (1999), kjer so v študiji prav tako uporabili redčenje, bi torej končne pozitivne redčitve dale inokulum, ki ga sestavljajo številčno prevladujoče populacije tal. Rezultati kažejo, da redčenje kompleksne mikrobne združbe ne spremeni celotne raznolikosti izhodne neredčene mešanice, ne glede na enakomernost originalne združbe, dokler se velikost združbe ne zmanjša do te mere, da je število posameznih bakterij v mešanici približno enako začetnemu številu vrst. Od te točke dalje mora raznolikost z nadaljnjim redčenjem padati, saj vsak posameznik, ki je odstranjen iz sistema, zniža število različnih vrst v združbi (Garland, Morales in sod., 1996).

Redčitveno-ekstinkcijska analiza CLPP je bila uporabljena z namenom primerjave relativne raznolikosti in strukture različnih izraslih združb. Ta postopek uporablja redčenje za izločitev heterotrofnih mikrobnih združb. Tako lahko ocenimo raven izgube znakov iz združbe, s predpostavko, da je raven izgubljanja določenih lastnosti iz združbe premo sorazmerna diverziteti originalne združbe in lahko tako ocenimo diverzitetu vzorca (Garland in Lehmann, 1999).

To so potrdili tudi rezultati študije Franklin in sod. (2001), ki so jo zasnovali upoštevaje predpostavko Garlanda in Lehmann (1999). Ugotovili so, da je odstotek bakterij, zmožnih rasti na trdnih gojiščih, višji v združbah, ki so izrasle iz bolj redčenih nacepitev. Po drugi strani pa povečano število izraslih kolonij iz redčitve 10^{-6} kaže na to, da ti organizmi niso omejeni v svojih metabolnih sposobnostih. Primerjava morfologije kolonij na agarju R2A

je pokazala, da sta mikrobna diverziteta in bogatost združbe, zmožne rasti na trdnem gojišču, vzdolž redčitvenega gradienta padali, enakost pa se je večala. Glede na rezultate numeričnih simulacij so zaključili, da je največje razlike v strukturi združbe pričakovati med zelo redčenimi (10^{-4} , 10^{-5}) združbami in vsemi ostalimi redčitvami, neodvisno od sestave prvotne združbe (Franklin in sod., 2001).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Reagent:

Agaroza	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
dNTPset	MBI Fermentas, Litva
Etidijev bromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
GeneRuler™DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, Litva
Glicerol	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Ksilosa	
Celuloza	
Glukoza	
Acetat	
CMC-celuloza	
Škrob	
Alginat	
Ksilan	
Taninska kislina	

Gojišča in dodatki:

<u>LB-gojišče:</u>	Bacto tripton	10 g
	Kvasni ekstrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Gelan (za plošče)	8 g
	dH ₂ O	do 1000 ml
<u>POL-gojišče:</u>	Polimerni substrati	vsakega po 0,02 g/l
	MgSO ₄ pufer (raztopina soli)	10 ml/l

razt. vitaminov (po avtoklaviranju) 80 µl/l

pH uravnan na 6,0–6,5

Gelrite gelan 8 g/l

Gojišča za mikrotitrne plošče:

1 ml TTC (2 %)

Substrat 0,3 g / 200 ml (glukoza, acetat, ksiloza)

Gelan 8 g/l

Raztopina soli 10 ml/l

Vitameni 80 µl/l

Encimi:

Taq DNK-polimeraza

Biotech B&M Labs, S.A., Španija

HaeIII

MBI Fermentas, Litva

Pufri in raztopine:

TAE-pufer 50x:

242 g Tris Base

37,1 ml ledocetne kisline

100 ml 0,5 M EDTA pH 8

dH₂O do 1000 ml

Tris-HCl pufer 100 mM, pH 7,7:

1,66 g Tris Base

5,72 g Tris HCl

dH₂O do 500 ml

Mineralna raztopina soli:

Vsebuje na 1 H₂O

0,1 g MgCl₂·6 H₂O

0,1 g NH₄Cl

0,07 g KH_2PO_4

0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

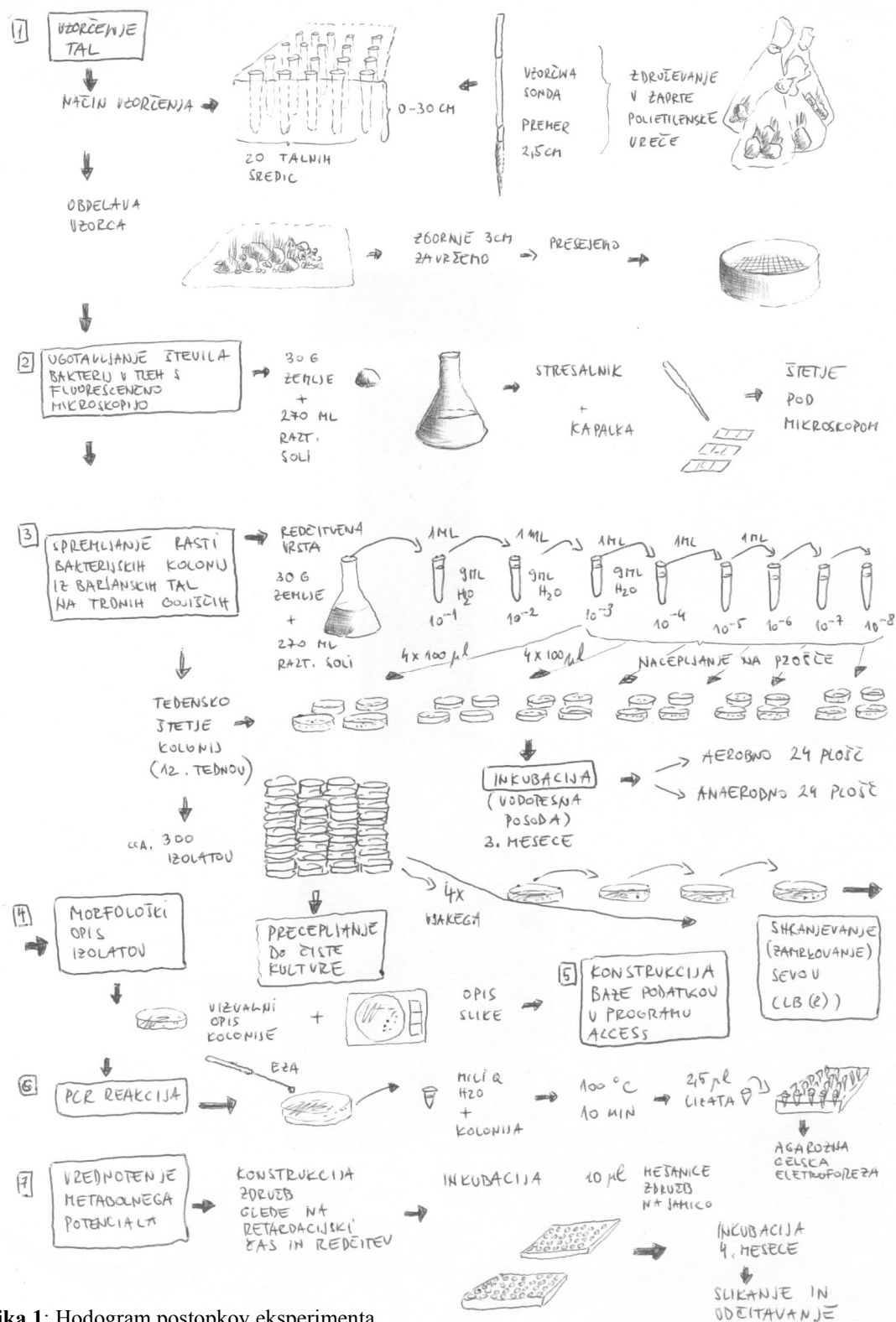
Nalagalni pufer za agarozno gelsko elektroforezo (6x):

50 % (wt/vol) saharoza

0,05 % (wt/vol) bromfenolmodro

Etidijev bromid (10x): 5 mg/ml (wt/vol) raztopina v dH_2O .

3.2 HODOGRAM POSTOPKOV EKSPERIMENTA



Slika 1: Hodogram postopkov eksperimenta.

Figure 1: Flowchart of experimental procedures.

3.3 VZORČENJE TAL

3.3.1 Področje vzorčenja

Vzorci smo vzeli na Ljubljanskem barju, ki leži južno od Ljubljane (45°58' N, 14°28' E) in obsega približno 16000 ha površine. Povprečna letna raven padavin je 1400 mm, povprečna letna temperatura pa 10 °C. Ob zaščitnih ostankih gozda in močvirij predstavljajo 65 % področja pašniki, 25 % pa koruzna polja. Vzorčili smo travniški tip tal nizkega barja na eksperimentalnem polju v Tomišlju, na katerem so že bile opravljene nekatere raziskave. Izbrani tip tal je označen kot fen-HC, kar pomeni višjo vsebnost C_{org} , in je klasificiran kot Histotla (Hacin in sod., 2001, Kraigher in sod., 2006).

3.3.2 Način vzorčenja

Vzorčili smo 20. 12. 2004, in sicer smo z vzorčno sondo (premer 2,5 cm) odvzeli 20 talnih sredic zgornjega sloja tal (0–30 cm) (podvzorcev) s premerom 2,5 cm. Odvzete vzorce smo združili v skupni vzorec in v zaprtih polietilenskih vrečkah prenesli v laboratorij ter obdelali v roku enega dneva po odvzemu (Morris in sod., 2002, Krave in sod., 2002, Mummey in Stahl, 2003, Kang in Mills, 2006). Zavrgli smo vrhnje 3 cm vsake sredice, odstranili večje kamne in korenine ter tla presejali skozi z etanolom sterilizirano medeninasto sito (premer luknjic 4 mm, proizvajalec Retsch GmbH, Nemčija). Vzorec smo do nadaljnje analize shranili v plastičnih vrečkah na 4 °C.

3.4 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V TLEH S FLUORESCENTNO MIKROSKOPIJO

Bakterijske celice v tleh smo šteli pod fluorescentnim mikroskopom (Reichert, Avstrija). 30 g tal smo resuspendirali v 270 ml $MgSO_4$ pufru in stresali 20 min. Talne delce smo posedali 2 min pri sobni temperaturi in s kapalko prenesli 10-krat redčeno talno suspenzijo na objektno stekelce ter vzorec posušili na zraku. Preparat smo fiksirali nad plamenom in celice obarvali z barvilom akridin oranž. Celice smo šteli v 15 naključno izbranih vidnih poljih pri redčitvi 10^{-1} . Število celic smo izračunali po formuli in izrazili na gram suhih tal:

$$N = X \cdot FM \cdot R \quad FM = P_f / \pi r^2 \quad \dots(5)$$

Kjer so N število celic, X povprečno število celic na vidno polje, FM faktor mikroskopa, P_f površina filtra, R redčitev vzorca.

3.5 GOJIŠČA

Bakterije smo osamili iz tal na gojišču:

POL-gojišče: gojišče s polimernimi substrati (ksilan, CNC-celuloza, škrob, pektin, ksiloza) smo pripravili tako, da smo 0,02 g vsakega polimera resuspendirali v 1 l destilirane vode. Gojišče smo strdili z dodatkom 8 g gelana (Sigma-Aldrich, Inc.) na 1 gojišča. Gelan smo predhodno raztopili v 10 ml mineralne raztopine soli (materiali 2.15) in pH gojišča uravnali na pH 6,0–6,5. Po avtoklaviranju smo v gojišče dodali mešanico B-vitaminov v koncentraciji 80 μ l/l.

3.6 SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH KOLONIJ IZ BARJANSKIH TAL NA TRDNIH GOJIŠČIH

Talne suspenzije smo pripravili tako, da smo 30 g tal na mehanskem stresalniku (Crompton Parkinson, Donchester) pri 250 tresljajih/min 30 min stresali v 270 ml raztopine soli (materiali 2.15). Po stresanju smo večje delce talne suspenzije posedali 2 min in nato talno suspenzijo 10-krat redčili v mineralne raztopine soli (materiali 2.15). Redčene vzorce tal smo 10 s ponovno mešali pri 150 rpm in redčili do 10^{-8} s sterilno dH₂O. Po 100 μ l redčitve od 10^{-3} navzdol smo nacepili na trdno gojišče POL s sterilno stekleno palčko v 4 ponovitvah. Plošče smo za 3 mesece inkubirali pri sobni temperaturi v plastičnih vodotesnih posodah, na katerih dno smo položili vlažno papirnato brisačo, da se plošče med inkubacijo ne bi izsušile. Rast kolonij smo spremljali tedensko in na novo prirasle kolonije označevali z različnimi znaki in vodoodpornimi barvnimi markerji. Označene kolonije smo na koncu meseca precepili na sveža gojišča in označili teden, v katerem se je

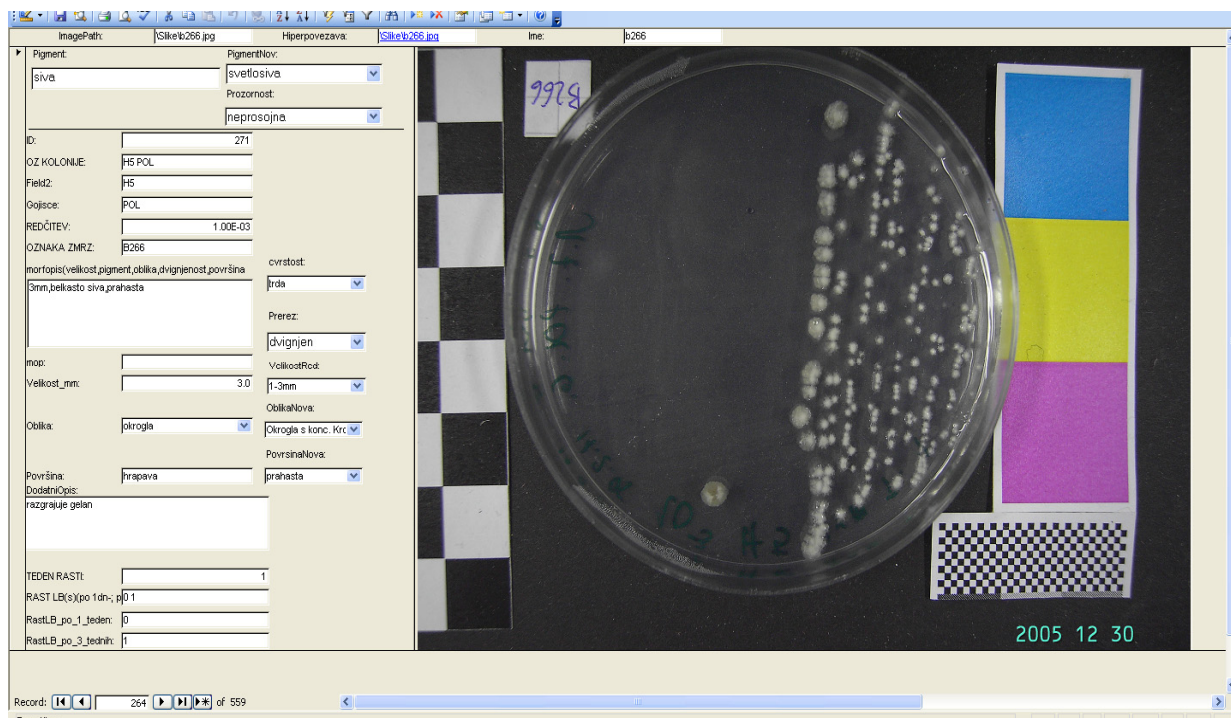
kolonija prvič pojavila. Po tem postopku smo pridobili okrog 350 novih izolatov, ki smo jih naknadno čistili s štirikratnim precepljanjem na sveža gojišča. Za ohranitev živosti bakterijskih kolonij smo le-te po približno enem letu znova precepili na sveža gojišča POL z gelanom. Rast vsakega izolata smo preverili tudi na agarskem LB in tekočem LB-gojišču ter v tekočem POL-gojišču.

3.7 MORFOLOŠKI OPIS IZOLATOV

Kolonije smo združevali v morfotipe na osnovi ključa Smibert in Kriega (1994), ki sta kot morfološki znak uporabila barvo kolonije, red velikosti, obliko oz. rob, površino in transparentnost. Za kategorijo barve smo določili 17 odtenkov; za kategorijo reda velikosti 4 rede velikosti: < 0,1 mm, 0,1–1 mm, 1–3 mm, > 3 mm; za obliko 5 razredov: okrogla, okrogla s koncentričnimi krogi, nepravilna, ni ločenih kolonij, pika (< 0,1 mm); za površino 5 razredov: svetleča, hrapava, prahasta, matirana, neprozorna; za kategorijo transparentnosti 4 razrede; transparentna, prosojna (polprozorna), motna, netransparentna.

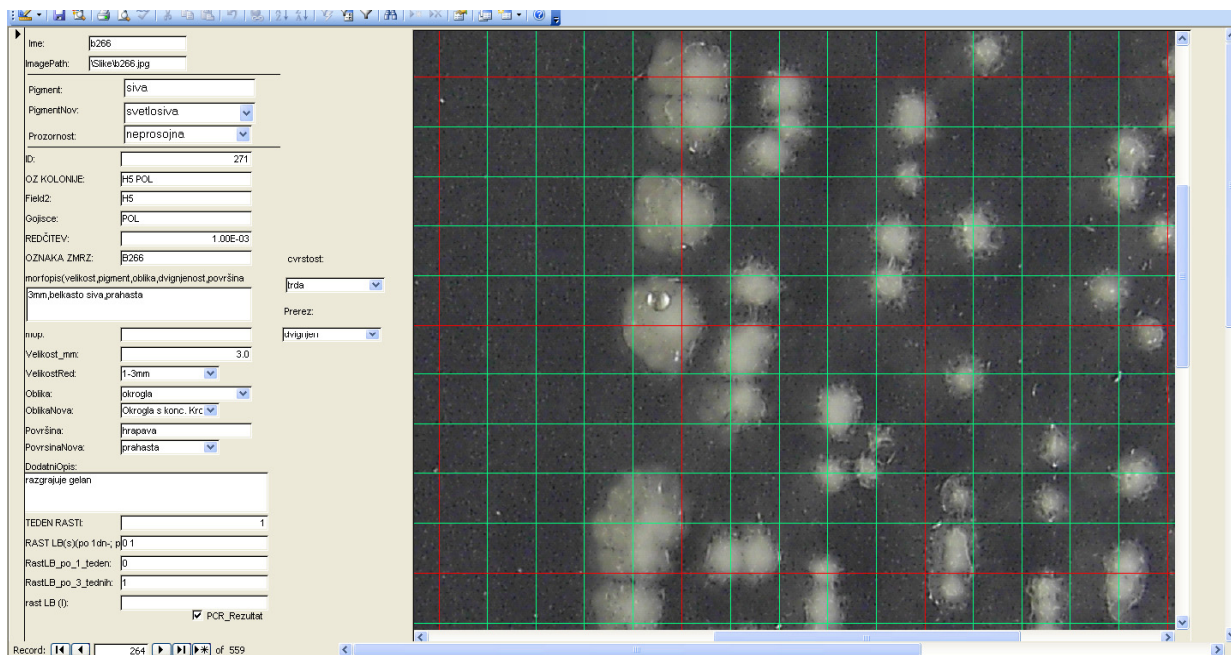
Morfološke značilnosti smo uporabili za ovrednotenje mikrobne združbe. Njene značilnosti smo ovrednotili s tremi parametri: z izračunom bogatosti, s Shannonovim indeksom raznolikosti in izračunom enakomernosti. Vsako kolonijo na plošči smo fotografirali in vnesli v bazo v Accessu (Microsoft Office 2003). Morfotipi so bili subjektivno določeni glede na vizualno pojavnost na plošči takoj po izrasti in glede na primerjavo tega opisa s sliko vsakega izolata. Število različnih morfotipov smo določili glede na čas izrasti kolonije na izhodnih ploščah. S SPSS 13.0 smo skonstruirali matriko s 35 različnimi opisi kolonij in morfotipi. Za vsako združbo so bili za vsak časovni interval (1 teden) izračunani bogatost, enakomernost in raznolikost. Bogatost (S-richness) je izražena kot število različnih morfotipov v združbi. Raznolikost je izražena kot Shannonov indeks raznolikosti: (H') : $H' = -\sum p_i \ln p_i$, kjer i indeksira vsak morfotip ali kategorijo, p_i pa je delež kolonij vsakega morfotipa. Enakomernost (E') smo izračunali po formuli $E = H' / H'_{\max}$, kjer je $H'_{\max} = \ln S$ (Franklin in sod., 2001, cit. po Pielou, 1969).

3.8 POSTAVITEV BAZE IZOLATOV V PROGRAMU MICROSOFT ACCESS



Slika 2: Slika seva B266 prikazuje način postavitve slik in opis kolonije v bazi v programu Microsoft Access. Kvadratna mreža ob sliki omogoča približno oceno reda velikosti kolonije – 1 kvadratega meri 1 mm, večji na levi pa 1 cm. Zaradi lažjega ocenjevanja barve kolonije je priložena še standardna barvna skala CMY (Cyan, Magenta, Yellow).

Figure 2: Picture of isolate B266 shows the type of positioning of pictures and description of colony in Microsoft Access base. Square net enables approximate estimation of colony size – 1 square measures 1 mm, the bigger one on the left 1 cm. Standard color scheme (Cyan, Magenta, Yellow) is enclosed.



Slika 3: Prikaz slike v vidnem polju v Microsoft Access, ki omogoča določanje približne velikosti kolonije. Kvadrata na mreži predstavlja približno 1,75 mm.

Figure 3: Display of the image in visible field in Microsoft Access, which enables estimation of approximate colony size. Square on the net measures 1,75 mm.

Baza v programu Microsoft Access vsebuje vse opisane morfološke podatke o posameznem izolatu. Pridobljeni so z opazovanjem izolata na plošči v kombinaciji s sliko izolata čiste kulture, da bi se čim bolj izognili napaki, ki nastane zaradi subjektivnega opisa. Vzpostavitev baze je bila potrebna zaradi lažjega nadzora, arhiviranja, pregleda in opisa vsakega posamičnega seva. Vsebuje več različnih kategorij za opis kolonije: oznako kolonije, gojišče, na katerem je zrasla, redčitev, način zamrzovanja ter opis morfoloških lastnosti, ki vključujejo: pigment in pigment, ki je na novo opisan (vizualni opis s plošče, združen z opisom s slike), prozornost, čvrstost, prerez, velikost in red velikosti, obliko (vse te kategorije smo opisali na novo – vizualni opis s plošče, združen z opisom s slike), teden izrasti na trdnem gojišču, rast na trdnem in tekočem gojišču LB po 1 in po 3 dneh inkubacije ter rezultat PCR (pri prvem in drugem pomnoževanju). Za karakterizacijo in uvrščanje je bilo izbranih 5 morfoloških lastnosti, primerljivih z literaturo – Smibert in Krieg (1994). Baza v Accessu omogoča priklic podatkov za različne spremenljivke. Hkrati je osnova za nadaljnje delo z osamljeno in opisano združbo, saj omogoča dodajanje in analizo podatkov za vsak posamičen sev. Program omogoča filtriranje sevov po izbrani spremenljivki in danem ukazu. Baza je bila skonstruirana kot pomoč pri morfološkem opisu kolonij in konstrukciji dendrograma, ki je bil osnova za izračun raznolikosti, bogatosti in enakomernosti združbe. Za vsak sev sta poleg vseh opisanih podatkov dodani dve sliki – prva omogoča splošni opis, druga pa je povečava prve in omogoča natančnejše določanje reda velikosti kolonije (Priloga J1 - DVD). Na DVD – ju niso prikazani vsi sevi, ki smo jih precepili na plošče in upoštevali v dendrogramu, prav tako vsi nimajo popolnih podatkov, saj se nekateri po večkratnem precepljanju na plošči niso uspeli ohraniti. DVD omogoča priklic slike s podatki tako da kliknemo na ikono morfo.mdb in izvedemo ukaz open. Pod objects odpremo polje forms in polje slike, ki nam prikaže opisne podatke za morfotip.

3.9 SHRANJEVANJE SEVOV

Seve smo bodisi hranili na trdnih gojiščih bodisi smo jih zamrznili v tekočem LB-gojišču v prisotnosti 0,5 ml glicerola in shranili pri -80°C . Vse seve, ki smo jih precepili do

navidezno čistih kolonij, smo poskušali zamrzniti, vendar večina izolatov v tekočem gojišču ni rasla.

3.10 GOJENJE NA LB

Večina na POL-gojišču zraslih sevov je bilo naknadno testiranih tudi na rast na tekočem in trdnem gojišču LB. Rast na LB je bila testirana po 1 in po 3 dneh inkubacije.

3.11 VREDNOTENJE METABOLNEGA POTENCIALA MIKROBNIH ZDRUŽB Z METODO FIZIOLOŠKEGA PROFILIRANJA ZDRUŽB (ECOPLOŠČE® BIOLOG)

Mikrobne združbe smo umetno skonstruirali tako, da smo kolonije vsakega izolata postrgali s trdnih gojišč in jih resuspendirali v 1 ml mineralne raztopine soli (materiali 2.15). Pripravili smo združbe 1., 2. in 3. meseca, pa tudi ločeno po redčitvah 10^{-3} in 10^{-4} . Za inokulacijo ECOplošč® (Biolog Inc., Hayward, CA, ZDA) smo za vsako luknjico uporabili 20 μ l suspenzije celic skonstruirane združbe. Pred tem smo v vsako luknjico dodali 180 μ l mineralne raztopine soli (materiali 2.15) s 4 g/l gelana in 80 μ l/l raztopine vitaminov B. Plošče smo pri sobni temperaturi inkubirali 4 mesece. Na vsaki plošči je na voljo 31 različnih substratov v treh ponovitvah in tri kontrolne luknjice, ki so napolnjene z vodo. Porabo substrata smo ovrednotili po 1., 5., 15. in 120. dnevu inkubacije, in sicer glede na spremembo barve (pojav viojlične barve), ki je posledica redukcije TTC (tetrazolium tetraklorid). Poleg tega smo ovrednotili tudi metabolni potencial združbe tal Ljubljanskega barja, neposredno za posamezne redčitve tal (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), in ECOplošče inkubirali enako kot v primeru skonstruiranih združb.

3.12 STATISTIČNE ANALIZE

Statistične analize so bile narejene v programih Microsoft Excel, Microsoft Access in SPSS.

3.12.1 Hierarhično grozdenje morfotipov

S pomočjo hierarhičnega grozdenja smo identificirali skupine posameznikov (grozde), ki so si med seboj bolj podobni, kot so podobni ostalim posameznikom v združbi. Vsak izolat smo opisali z morfološkimi značilnostmi (materiali in metode 3.7), in minimalno morfološko razdaljo med pari izračunali z metodo UPGMA in Jaccardovim koeficientom, kot je opisano na spletni strani (http://www.norusis.com/pdf/SPC_v13.pdf). Drevo podobnosti smo izrisali v programu MacClade version 4.08.

3.12.2 Preizkus hi-kvadrat

S preizkusom hi-kvadrat (izračunanim s SPSS 13.0) smo želeli preveriti ničelno hipotezo, da med morfologijo in časovno skupino ni statistično značilnih razlik oziroma povezav. 323 izoliranih in s 35 deskriptorji opisanih morfotipov smo razdelili v dve skupini: hitro rastoče morfotipe (izrasli na ploščah do 4. tedna) in počasi rastoče morfotipe (izrasli na ploščah od 4. do 12. tedna). Za vsakega od opisov morfotipov (pigment, red velikosti, oblika, transparentnost, površina) smo izračunali, ali se zanj skupini sevov retardacijskega časa 1. meseca in sevov retardacijskega časa 2. in 3. mesecev statistično značilno razlikujeta, kar predpostavlja hipoteza H_1 . V programu SPSS smo izbrali: Analiza – Descriptive Statistics – Crosstabs. Pod ukazom Statistics test hi-kvadrat, pod ukazom Cells pa ukaza Expected in Observed. Slednja nam izračunata pričakovano vrednost, če med obema spremenljivkama za dani opis morfotipa in retardacijskega časa ne bi bilo nobene povezanosti, in pa dejansko število opisov morfotipa v določeni časovni skupini.

Pogoji, da je test hi-kvadrat veljaven, pa so, da je frekvenca parametra v skupini vsaj 5, saj sicer postane nezanesljiv, kar je podano kot izjava pod tabelo, kjer program SPSS izračuna odstotek celic s frekvenco manj kot 5. Na osnovi p-vrednosti (stopnja značilnosti) se odločimo, ali hipotezo H_0 za dani parameter zavržemo, kar storimo, če je p-vrednost nižja

od 0,05. S tem za dani parameter potrdimo hipotezo H_1 , tj. da se skupini za ta opis morfotipa statistično značilno razlikujeta.

3.12.3 Analiza podobnosti metabolnih profilov združb, osamljenih v obdobju 3 mesecev, na trdnem POL-gojišču z multivariantno analizo

Podobnost med metabolnimi profili, pridobljenimi z analizo ECOplošč, smo izračunali z multivariantno analizo (PCA, Principal Component Analysis), ki je dostopna znotraj programa SPSS 13.0 za okolje MS Windows). Podatke smo primerjali s korelacijsko matriko in za vsako komponento določili odstotek pojasnjene variance. Upoštevali smo le tiste vrednosti, ki so bile višje od 1 (Total Initial Eigenvalues), oziroma tiste spremenljivke, ki so kumulativno pokrile več kot 80 % pojasnjene variance, pri čemer so bile upoštevane le spremenljivke, ki so same zase pokrile več kot 5 % celotne variance. Število komponent smo ugotavljali tudi s pomočjo Scree diagrama. Kot rotacijsko metodo smo uporabili Direct Oblimin s Kaiserjevo normalizacijo, saj smo domnevali, da lahko spremenljivke kovariirajo. Za ugotavljanje ustreznosti PCA-metode smo uporabili KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov predtest) in Bartlettov test sferičnosti. Analiza zahteva, da je $KMO > 0,5$. Z Bartlettovim testom smo testirali ničelno hipotezo, ki pravi, da je korelacijska matrika enaka identitetni matriki pri $p < 0,005$.

V analizo smo kot spremenljivke vključili retardacijski čas (1. mesec, 2. mesec, 3. mesec), redčitev (10^{-3} , 10^{-4}), število sevov v skonstruirani združbi in čas inkubacije ECOplošč. S to metodo smo analizirali tudi podatke, pridobljene za negojene združbe tal, kjer smo kot spremenljivke upoštevali redčitev talne suspenzije, ki smo jo uporabili kot inokulum (10^{-3} do 10^{-6}), in čas inkubacije Biolog ECOplošč.

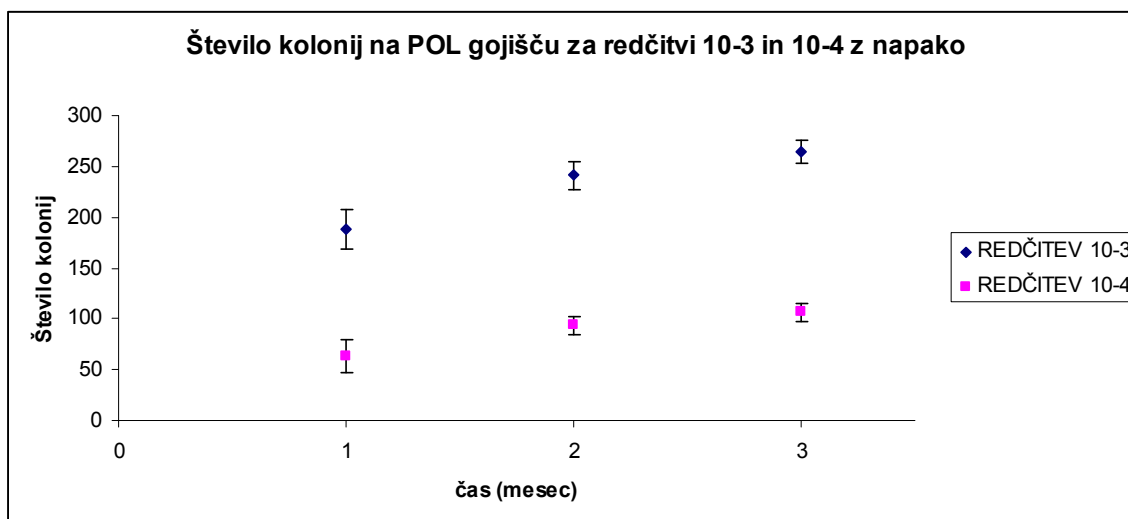
4 REZULTATI

4.1 CELOKUPNO ŠTEVILO IN ŠTEVILO IZRASLIH PROKARIONTOV V TLEH

Število mikroorganizmov v tleh smo ovrednotili z direktnim štetjem z DAPI obarvanih celic na $2,49 \pm 0,31 \times 10^9$ celic g^{-1} suhih tal. V vzorcu je bilo le malo glivnih hif, in večina celic je bila palčk ali kokobacilov. Na POL-gojišču z gelanom je zraslo pri redčitvi 10^{-3} $0,44 \times 10^8$ kolonij g^{-1} suhih tal, pri redčitvi 10^{-4} $1,11 \times 10^8$ kolonij g^{-1} suhih tal, pri redčitvi 10^{-5} $2,8 \times 10^8$ kolonij g^{-1} suhih tal, in pri redčitvi 10^{-6} 8×10^8 kolonij. V povprečju nam je uspelo vzgojiti približno 12,4 % bakterij iz g^{-1} suhih tal.

4.2 IZRAST BAKTERIJSKIH KOLONIJ NA POL-GOJIŠČU V ODVISNOSTI OD ČASA IN REDČITVE

4.2.1 Število kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4}



Slika 4: Število kolonij za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} v odvisnosti od časa izrasti na trdnem gojišču z napako. Prikazani so povprečja in standardni odkloni meritev, preračunani iz štirih različnih vrednosti znotraj treh

časovnih enot. Zgornje tri točke – modri romb – označujejo redčitev 10^{-3} , spodnje – rožnati kvadrat – pa redčitev 10^{-4} .

Figure 4: Number of colonies for 10^{-3} in 10^{-4} dillution in relation to retardation time with standard deviation. Average values and standard deviations are calculated from 4 different values inside three time units. Upper three points – blue rhomb – mark 10^{-3} dillution, lower – pink square mark 10^{-4} dillution.

Število na novo izraslih bakterijskih kolonij je padalo z naraščajočim retardacijskim časom (čas, potreben, da kolonija izraste na plošči), celokupno število kolonij pa je s časom naraščalo. Največji prirast kolonij smo opazili v prvem tednu inkubacije. V povprečju je pri redčitvi 10^{-3} po prvem mesecu zraslo 188 ± 19 kolonij. Povprečno celokupno število kolonij po treh mesecih inkubacije je bilo 264 ± 10 kolonij. V obdobju med 5. in 12. tednom je zraslo 30 % kolonij, ki smo jih ovrednotili kot počasi rastoče, medtem ko je 70 % kolonij zraslo v 1. mesecu in smo jih opredelili kot hitro rastoče (Priloga A).

4.2.2 Število bakterijskih kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od redčitve (redčitve 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6}).

Preglednica 1: Število kolonij v odvisnosti od časa izrasti na POL-gojišču za štiri različne redčitve. Prikazano je povprečno priraščanje števila kolonij za 4 različne redčitve za 12-tedensko periodo v štirih ponovitvah. Za vsako redčitev posebej je prikazano celokupno število kolonij, ki so zrasle v določenem tedenskem obdobju.

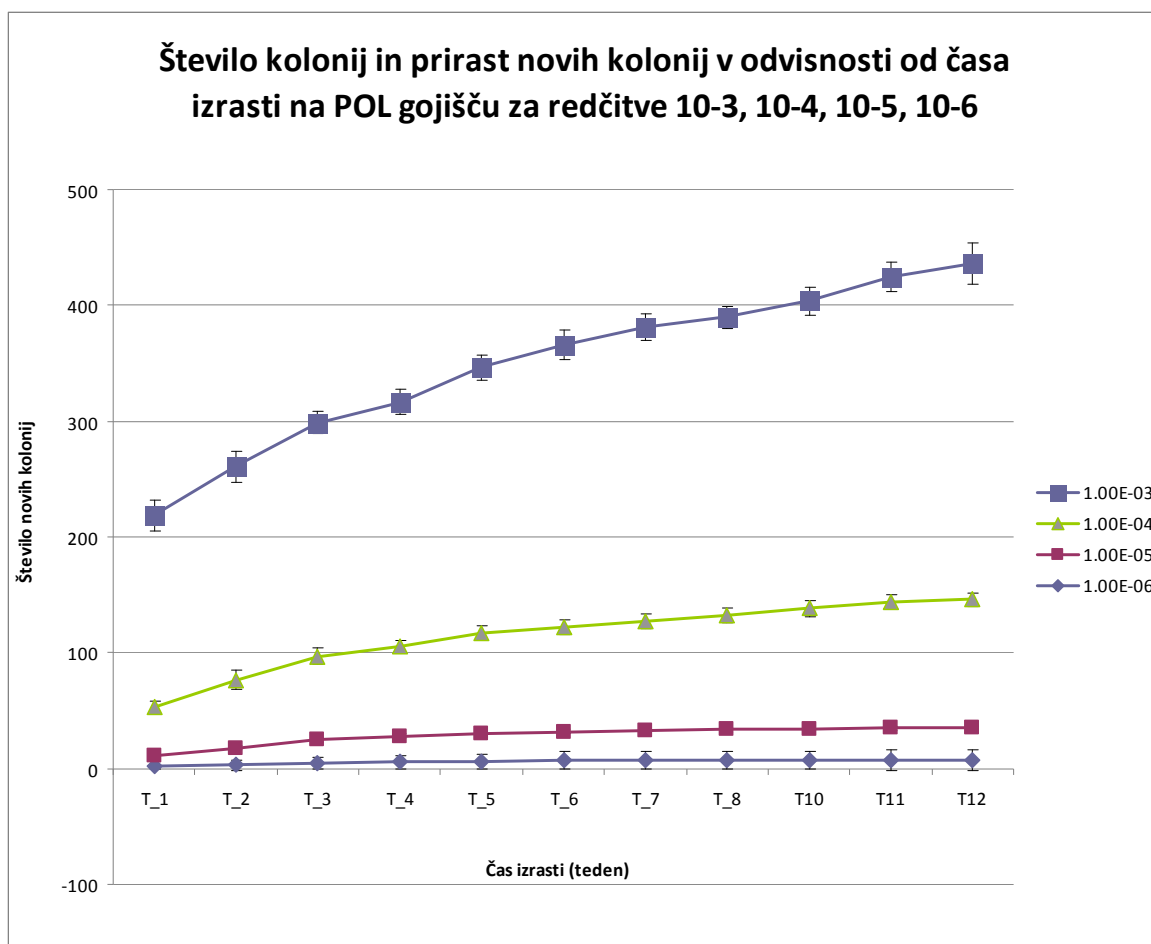
Table 1: Number of colonies in relation to retardation time on POL medium for four different dillutions. Average increase of colony numbers for four different dillutions for 12 week period is shown. For every different dillution whole colony number in time period is shown.

Teden inkubacije / redčitev	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12
Redčitev 10^{-3}	166	184	202	211	230	244	254	258	266	281	290
Redčitev 10^{-4}	43	59	73	78	86	90	95	98	104	109	111
Redčitev 10^{-5}	8	15	20	22	25	25	26	27	27	28	28
Redčitev 10^{-6}	3	3	4	6	6	7	7	7	7	7	7

Število zraslih kolonij na trdnem gojišču POL je z redčitvijo upadlo. Redčenje omogoča pridobivanje tistih mikroorganizmov, ki so v izhodiščnem vzorcu številnejši in zato

izrastejo tudi pri nižjih redčitvah (Franklin in sod., 2001). Opazno je tudi kontinuirano naraščanje števila kolonij, pri čemer je pri nižjih redčitvah ta naklon naraščanja nekoliko večji kot pri višjih redčitvah (Slika 5).

4.2.3 Število kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitve 10^{-3} in 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6} .



Slika 5: Rastne krivulje števila kolonij na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti za redčitve 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Za vsak teden posebej je prikazano naraščanje števila kolonij s standardno napako v odvisnosti od časa izrasti za vsako redčitev posebej.

Figure 5: CFC curves for number of colonies on POL meduim in relation to retardation time and dillution 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . For every week the increase of colony number with standard deviation in relation to retardation time for every single dillution is shown.

Ker ta način prikaza rezultatov ne omogoča neposredne primerjave, smo izračunali »Colony Forming Curves« ali CFC-krivulje (Slika 5). Pri redčitvi 10^{-3} je do 4. tedna zraslo 211 kolonij, po 12 tednih pa se je število povečalo na 290 kolonij, kar je 30,4-odstotni prirast. Pri redčitvi 10^{-4} je do 4. tedna izraslo 77 kolonij, do 12. tedna pa 110 kolonij, kar je 30-odstotni prirast počasi rastočih. Pri redčitvi 10^{-5} je bilo hitro rastočih sevov 22, počasi rastočih sevov pa 6, in prirast je bil nižji, 27,3 %. Pri redčitvi 10^{-6} je prirast počasi rastočih še upadel in je znašal le še 24 %.

4.2.4 Izračun λ -faktorja za različne tedne izrasti in retardacijske čase

Domneva se, da so bakterijske populacije z vrednostjo λ pod 0,5 v dormantni fazi, z vrednostjo λ med 0,5 in 1 v tranzientni ali prehodni fazi, medtem ko vrednosti nad 1 kažejo, da so bakterijske populacije v vegetativnem stanju. Večina bakterij je v fazi mirovanja, ki je določena z vrednostjo λ med 0,005 in 0,3 (Hattori, 1985).

Vrednost λ smo izračunali s pomočjo FOR-modela $N_t = N_{\text{nes}} [1 - e^{-\lambda (t - t_r)}]$. Uporabili smo metodo bisekcije ob predpostavki, da je N_{inf} približno enako številu kolonij v 12. tednu (rasti skoraj ni več). Enačba predpostavlja, da je $t \geq t_r$, zato smo za npr. čas meritve $t = 1$. teden upoštevali t_r (čas retardacije) 0,5 tedna, kar je povprečen retardacijski čas za kolonije, izrasle do konca 1. tedna.

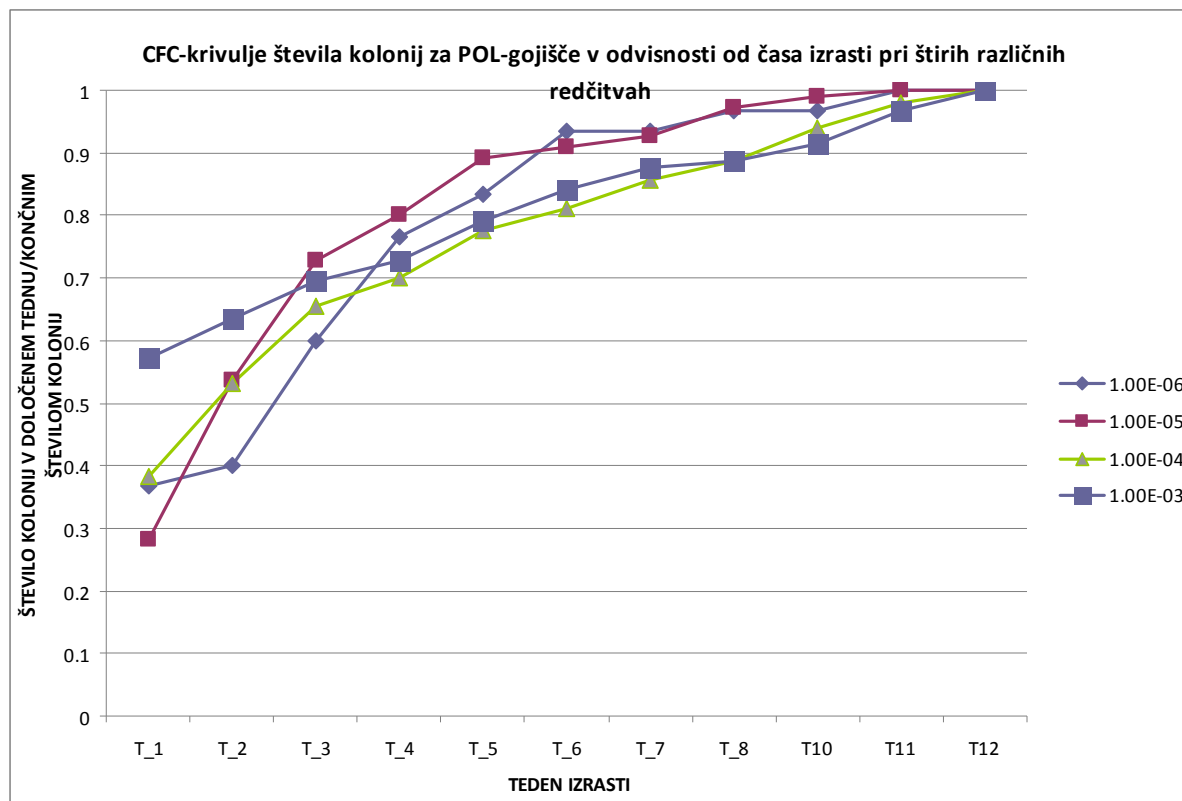
Iz rezultatov je razvidno, da je le skupina bakterij 1. tedna v vegetativnem stanju (vrednost λ nad 1), potem pa vrednost λ pade. V 5. in 7. tednu opazimo rahel porast vrednosti (glede na vrednost λ v prejšnjem tednu), podoben trend (rahlo spremembo naklona) opazamo tudi pri CFC-krivulji (Priloga E), kar nakazuje, da je raven rasti povezana s fiziološkim stanjem celic. Iz rezultatov sledi, da so vse bakterije po 1. tednu izrasti v fazi mirovanja, saj je njihova λ med 0,05 in 0,3. Še najbližje dormantni fazi (λ med 0,3 in 0,5) so bakterije v 2. tednu.

Preglednica 2: Vrednost λ v odvisnosti od retardacijskega časa za posamezne mikrobne populacije. V 9. tednu števila bakterijskih celic nismo šteli, zato podatkov za ta čas ni. Kot t je bil upoštevan čas štetja bakterij, N_{nes} je končno število kolonij v 12. tednu, kar je približek za število kolonij v neskončnem času, saj smo predvidevali, da se rast ustavlja. T_r smo upoštevali kot srednjo vrednost med obema merjenima vrednostma (v tednih), saj mora biti $\leq t$ (čas štetja). N_t je število na novo izraslih prešteti celic v merjenem tednu.

Table 2: λ value in relation to retardation time for different microbial populations. In 9th week the number of bacterial colonies was not counted. As t value we considered the time of colony counting, N_{inf} is the end colonies count in 12th week, which is an approximation for number of colonies in infinite time. We expected that the growth was stopping. T_r was the mean value between both measured values (in weeks), because it must be $\leq t$ (time of colony counting). N_t represents the number of new outgrown and counted cells in measured week.

t (čas štetja)	tr(retardacijski čas)	λ-faktor	Nt
1	0,5	1,32	210
2	1,5	0,25	51
3	2,5	0,184	38
4	3,5	0,085	18
5	4,5	0,193	40
6	5,5	0,042	9
7	6,5	0,12	25
8	7,5	0,038	8
9	8,5	/	/
10	9,5	0,032	7
11	10,5	0,1	21
12	11,5	0,05	11
$N_{\text{nes}} = 436$			

4.2.5 CFC-krivulje števila kolonij za POL-gojišče v odvisnosti od časa izrasti pri štirih različnih redčitvah



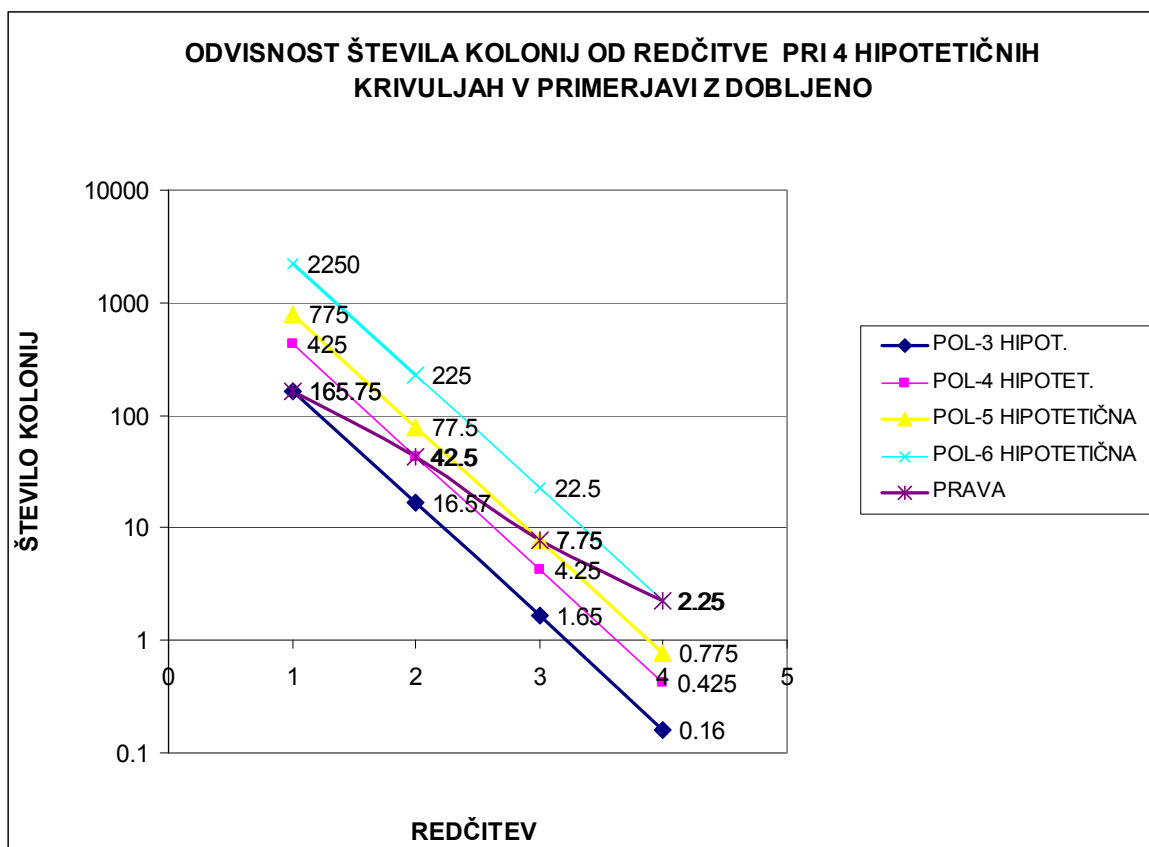
Slika 6: CFC-krivulja izolatov, izraslih na POL-gojišču med 12-tedensko inkubacijo. Vrednost v vsaki časovni točki intervala 12 tednov je izračunana kot razmerje med številom v časovni točki izraslih kolonij in končnim številom kolonij. Prikazane so vse štiri redčitve.

Figure 6: CFC-curve of isolates outgrown on POL medium during 12th incubation period. Value in each time point of the interval is calculated as ratio between number of colonies in time point and end number of colonies for all four dilutions.

Primerjava hitrosti priraščanja novih kolonij pri štirih redčitvah pokaže, da v prvih treh do štirih tednih najhitreje priraščajo kolonije na ploščah, na katere smo nacepili 10^{-5} redčene mešanice (imajo najvišji k krivulje). Pri redčitvi 10^{-6} je opazna 1-tedenska lag perioda, potem pa se hitrost priraščanja približno izenači z redčitvijo 10^{-5} . Naklon CFC-krivulj za redčitve 10^{-5} in 10^{-6} se spremeni med 3. in 4. tednom. V četrtem tednu postanejo krivulje vseh mešanic položnejše, in opaznejših razlik v naklonih med krivuljami različnih redčitev ni. Iz rezultatov je razvidno, da bakterije, ki naj bi jih bilo po predpostavki Franklina in sod. (2001) v izrasli združbi največ, tudi hitreje priraščajo na plošči. Rezultati nadalje

kažejo, da so v izrasli združbi hitro rastoči sevi (zrastejo do 4. tedna) in počasi rastoči sevi (zrastejo v 5.–12. tednu).

4.2.6 Hipotetične krivulje za vrednost števila kolonij po 1. tednu izrasti na trdnem gojišču za redčitve 10^{-3} in 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6}



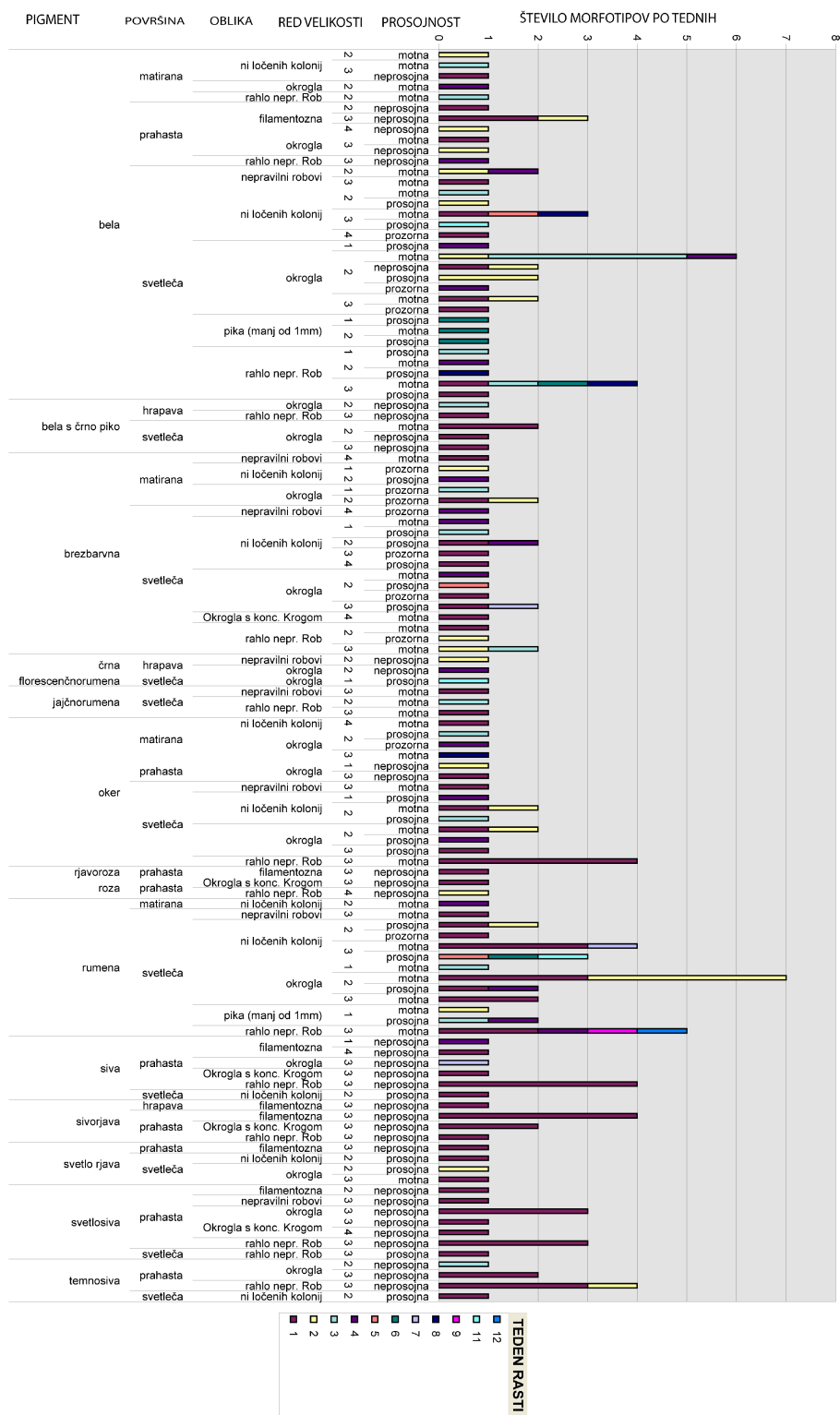
Slika 7: Odvisnost števila kolonij od redčitve za 4 hipotetične krivulje v 1. tednu rasti v primerjavi z originalno krivuljo na logaritemski skali. Hipotetične krivulje za 1. teden rasti po različnih redčitvah so dobljene iz podatkov števila kolonij v 1. tednu rasti za vsako redčitev posebej. Potem je dejansko število kolonij iz npr. redčitve 10^{-3} vzeto kot referenca in redčeno do redčitve 10^{-6} .

Figure 7: Colony numbers in relation to dillution for 4 hypothetical curves in 1. week of growth in relation to the original curve on logarithmical scale. Hypothetical curves for 1. week of growth according to dillutions were acquired from colony numbers in 1. week. The actual number was then taken as a reference number and dilluted untill 10^{-6} dillution.

Rezultati prikazani na Sliki 6 kažejo, da v prvih štirih tednih najhitreje priraščajo sevi iz najbolj redčenih združb. Da bi preverili, kakšen vpliv imajo redčitve na število izraslih kolonij, smo izrisali hipotetične krivulje (Slika 7) števila kolonij iz dejanske vrednosti po

prvem tednu pri določeni redčitvi . Če je bilo na primer dejansko število kolonij pri redčitvi 10^{-3} 290, bi jih morali, hipotetično, pri redčitvi 10^{-4} dobiti 10-krat manj. Primerjava hipotetičnih krivulj hitrosti priraščanja je pokazala, da je prirast novih kolonij najhitrejši pri redčitvah 10^{-5} in 10^{-6} .

4.3 MORFOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJSKIH KOLONIJ, IZRASLIH NA TRDNEM POL GOJIŠČU



Slika 8: Prikaz morfotipov izolatov na POL-gojišču v časovnem obdobju 12 tednov na podlagi 5 opisnih lastnosti – pigment, površina, oblika, red velikosti, prozornost – z ozirom na teden rasti. Levi del skale prikazuje oznake morfotipa, desni pa število izolatov z zapisano kombinacijo lastnosti – prikazuje enake morfotipe skupaj, z barvno lestvico pa je naznačeno, koliko morfotipov iz katerega tedna vsebuje opisna oznaka tega morfotipa. Morfotipi so določeni opisno. Graf je narejen v programu Microsoft Access.

Figure 8: Picture of isolated morphotypes on POL medium in 12. week period on the basis of 5 characteristics– pigment, surface, form, size order, transparency in relation to retardation time. Left part of the scale shows morphotype labels, and right part the number of isolates with combination of different descriptives. Same morphotypes are shown together. The number of morphotypes in each week is shown with color scale. Morphotypes are determined with description. Figure is made with Microsoft Access.

Slika 8 prikazuje število izolatov posamičnih morfotipov. Na sliki lahko sledimo posameznim morfotipom, tednu izrasti, kriterijem, ki smo jih uporabili za opis morfotipa, in tednom, v katerih se je enak morfotip pojavil. V prilogi I je prikazana shema, ki prikazuje številnost posameznih morfotipov. Večina morfotipov se je v združbi pojavila le enkrat, 15 morfotipov ima po dva predstavnika, 11 je takih, pri katerih smo dobili tri izolate, pri sedmih morfotipih smo osamili po 4 predstavnike. Nadalje imamo štiri morfotipe s po 5 izolati in dva morfotipa s po 8 izolati. V prilogi H pa je prikazana številnost morfotipov po tednih izrasti.

4.3.1 Hi-kvadrat preiskus povezanosti opisa morfotipa in časovnih skupin glede na retaradacijski čas

Za vsakega od opisov morfotipa smo želeli preveriti, ali se skupini morfotipov glede na retardacijski čas in morfologija (opis morfotipa) statistično značilno razlikujeta. S tem hkrati potrdimo tudi povezanost morfologije in časa retardacije.

Značilne razlike za vsak opis morfotipa pomenijo, da zavrnemo hipotezo H_0 , ki trdi, da med skupinama morfotipov glede na retardacijski čas ni statistično značilnih razlik. Vsak morfotip je kodiran z zaporedjem 35 lastnosti, od katerih jih ima le 5 oznako 1, ostale pa privzamejo vrednost 0.

Značilne razlike smo dobili za naslednjih 15 lastnosti morfotipa: bela, rumena, svetlo siva, temno siva, štiri, neprosojna, prosojna, motna, matirana, prahasta, svetleča, okrogla s koncentričnim krogom, ni ločenih kolonij, filamentozna in pika (Priloga H1).

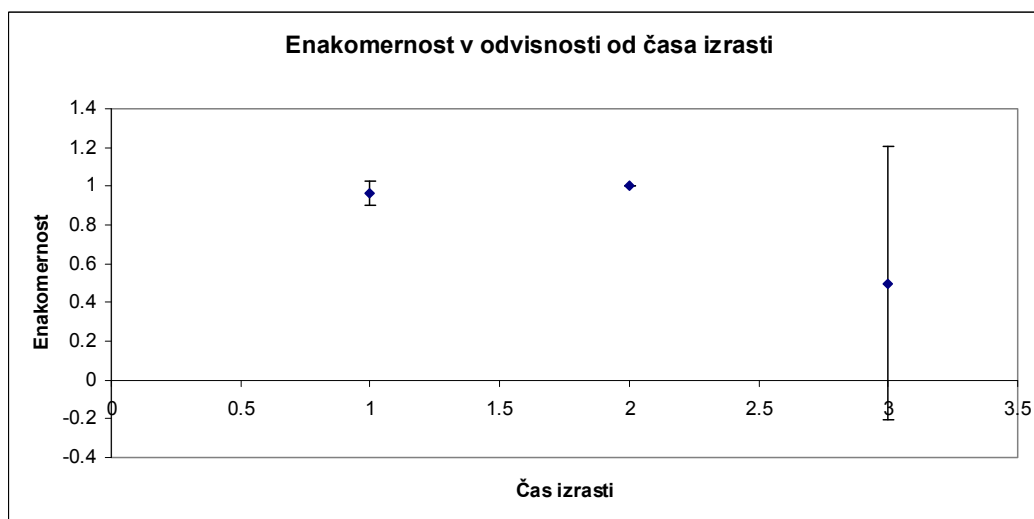
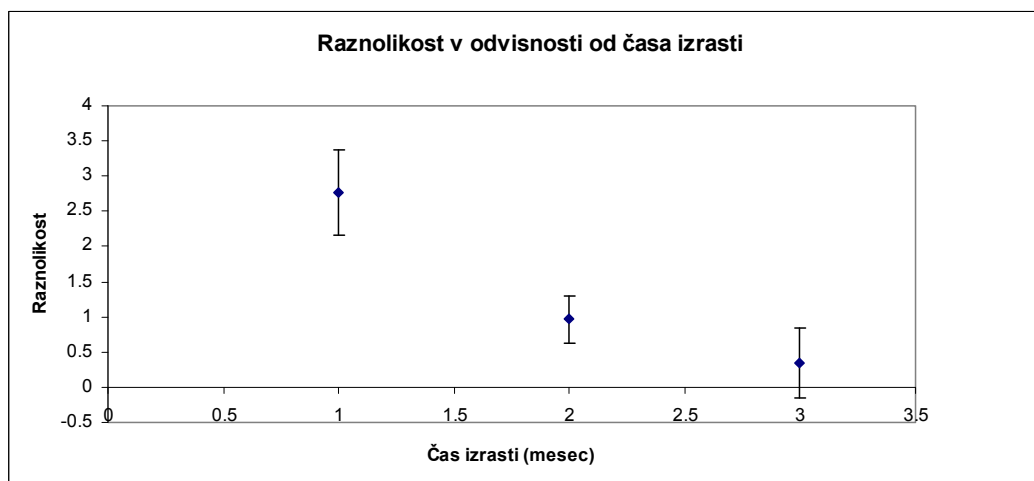
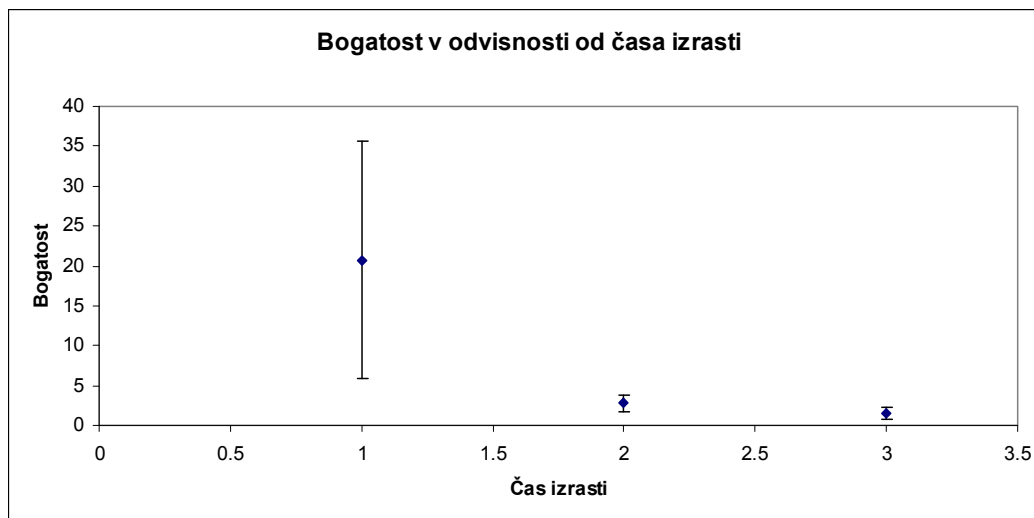
Neznačilne razlike pa smo dobili za naslednje lastnosti morfotipa: bela s črno piko, brezbarvna, črna, fluorescentno rumena, oker, oranžna, rjavo roza, roza, siva, sivo rjava, zelena, okrogla, ena, dva, prozorna, hrapava in nepravilni robovi. Potrebno je omeniti, da se od navedenih opisov morfotipov z neznačilnimi razlikami med skupinami neznačilno res razlikujejo samo opisi morfotipa za red velikosti dva, tri, prozorna, nepravilni robovi, brezbarvna in okrogla (Priloga H1), pri ostalih pa test ni veljaven zaradi prenizke frekvence pojavljanja opisa v drugi skupini, saj je ta nižja od 5. Večinoma gre za opise pigmentiranosti, saj se v drugi skupini morfotipi z opisom pigmenta bela s črno piko, črna, jajčno rumena, oranžna, rjavo roza, roza, svetlo rjava, temno siva, zelena in pa lastnost površine hrapava sploh ne pojavijo, v prvi skupini pa je teh od nekaj predstavnikov do 20 predstavnikov. Zato smo se odločili izvesti še t-test razlike varianc med skupino hitrorastočih sevov (do 4. tedna) in počasirastočih sevov (od 4. – 12- tedna) (rezultati zaradi obsežnosti niso prikazani), saj ta ne upošteva frekvence pojavljanja, ampak variance opisa morfotipa pri vsaki skupini.

Pri opisih morfotipa bela, bela s črno piko, fluorescentno rumena, oker, rumena, sivo rjava, svetlo rjava, svetlo siva, temno siva, matirana, prahasta, svetleča, hrapava, okrogla s konc. krogom, filamentozna (rezultati niso prikazani) pa smo tako za te opise morfotipa dobili značilne razlike, zato lahko domnevamo, da so razlike vsaj v določeni meri posledica retardacijskega časa, ki ga je kolonija potrebovala, da se je pojavila na plošči. Za 23/35 lastnosti (združene lastnosti, pridobljene s testom hi-kvadrat in t-testom) lahko torej ničelno hipotezo zavrnemo, saj je p-vrednost povsod nižja od 0,05, zato obvelja H_1 o neenakosti varianc/frekvenc in potrdimo, da se za navedene lastnosti morfotipa med skupinama hitro in počasirastočih sevov statistično značilno razlikujejo. Iz česar sledi, da so morfotipi iz skupine hitrorastočih sevov v večini značilno različni od morfotipov počasirastočih sevov.

4.3.2 Shannonov diverzitetni indeks morfotipov glede na retardacijski čas

Število novih morfotipov smo ocenili tedensko, kar smo uporabili za oceno bogatosti morfotipov S_M v določeni časovni periodi. Proporcionalne pogostosti pojavljanja vsakega od morfotipov so bile uporabljene za izračun raznolikosti (Shannon-Wienerjevega indeksa

raznolikosti), nasičenosti (bogatosti) in enakomernosti združbe v tedenskih časovnih obdobjih za redčitev 10^{-3} (Priloga J).



Slika 9: Bogatost (A), raznolikost (B) in enakomernost (C) morfotipov na trdnem gojišču POL redčitve 10^{-3} ob treh mesečnih periodah inkubacije. Izračunana na podlagi tedensko odčitane števila novih morfotipov, ki so prikazani v Tabeli 7.

Figure 9: Richness (A), diversity (B) and evenness (C) on solid POL medium for 10^{-3} dillution in relation to three monthly incubation periods. The values were calculated on the basis of weekly read number of new morphotypes shown in Figure 7.

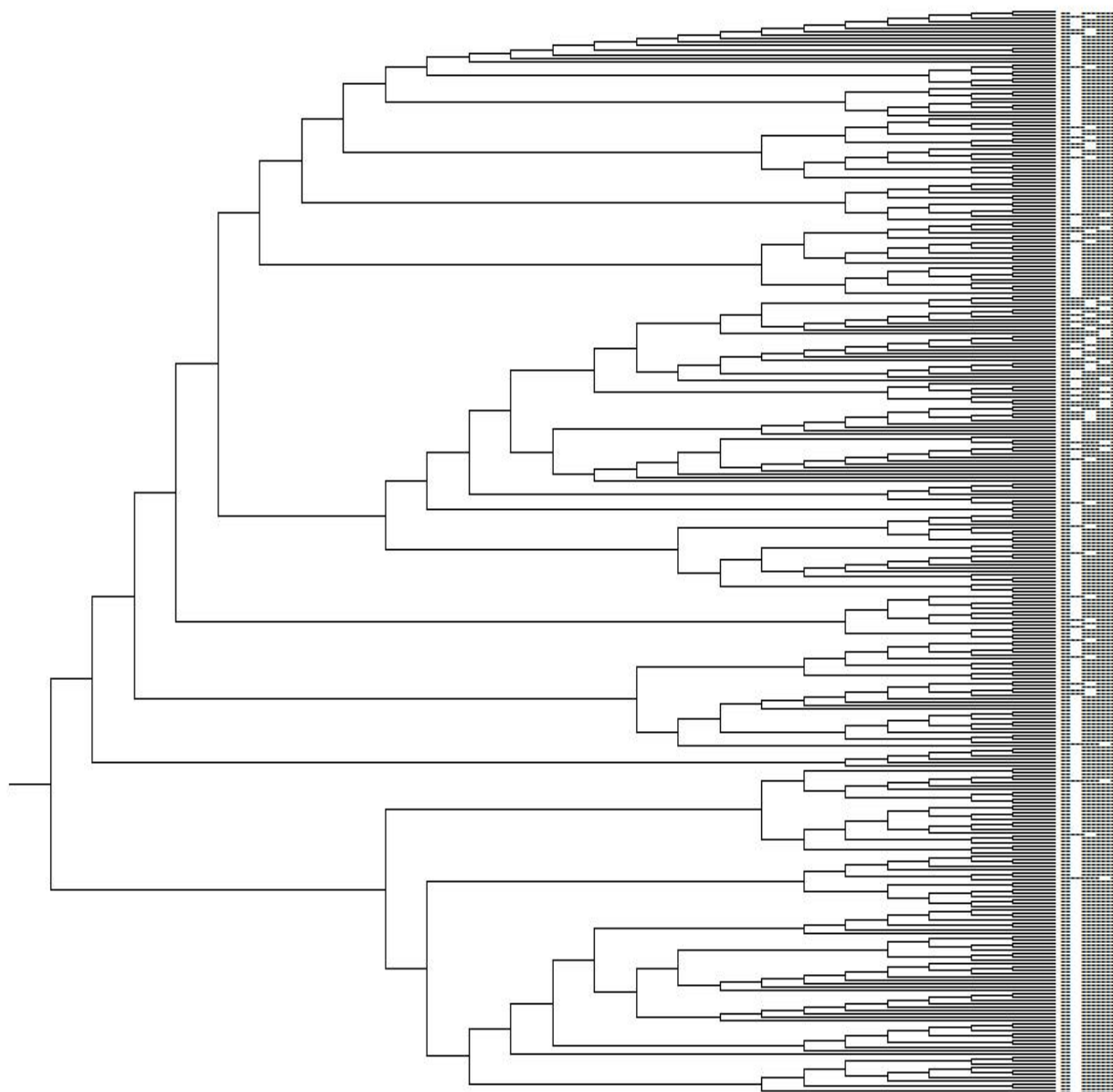
Analiza morfotipov v odvisnosti od časa inkubacije je pokazala, da bogatost in raznolikost s časom inkubacije opazno padeta, medtem ko je enakomernost ostala relativno konstantna. V 9. in 10. tednu inkubacije nismo zabeležili nove izrasti kolonij, kar vpliva na izračun vseh treh parametrov in poveča napako. Shannonov indeks raznolikosti je upadel tudi z redčenjem vzorca (rezultati niso prikazani), kar je bilo pričakovano.

4.3.3 Dendrogram morfoloških tipov

Skupno smo iz barjanskih tal (HC-fen) osamili 323 sevov, med katerimi smo določili 223 unikatnih morfotipov. Na LB-agarju je tvorilo kolonije 178 izolatov, 109 je bilo LB-negativnih, pri 36 izolatih pa rasti na LB-agarju nismo preverjali. Seve, osamljene na POL-gojišču, ki so naknadno zrasli na LB-agarju, smo opredelili kot fakultativne oligotrofe (r-strategi), tiste, ki na LB-agarju niso zrasli, pa kot obligatne oligotrofe (K-strategi).

Med 323 izolati jih je 37 izraslo v 2. mesecu in 18 v 3. mesecu.

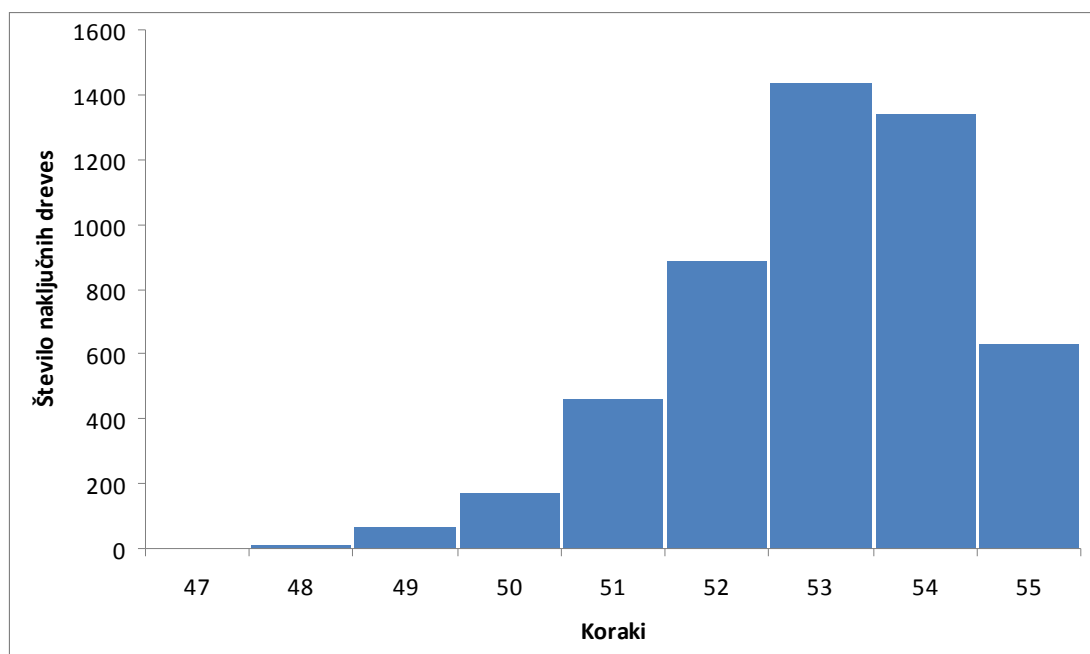
Pripravili smo matriko s 35 različnimi deskriptorji (označevalci) morfologije za 5 različnih lastnosti, s katerimi je opisan vsak morfotip, in izrisali drevo na podlagi Jaccardovih razdalj in razdalj, določenih z metodo UPGMA.



Slika 10: Dendrogram podobnosti morfotipov, izraslih na trdnem POL-gojišču. Dendrogram je bil izdelan v programu Macclade iz matrike izdelane v programu SPSS – metoda UPGMA (Between Group Linkage in Jaccardov koeficient). Prvi stolpec oznak v drevesu označuje seve z retardacijskim časom (čas, ki ga kolonija potrebuje, da zraste na trdnem gojišču) 1 meseca, drugi stolpec seve z retardacijskim časom 2 mesecev in tretji stolpec seve z retardacijskim časom 3 mesecev.

Figure 10: Dendrogram of morphotype similarity, that were outgrown on POL medium. Dendrogram was made in Macclade program from matrix made with SPSS program (UPGMA method – Between group linkage and Jaccard coefficient). The first column in the tree marks the isolates with retardation time of first month, second column isolates with retardation time of second month and third column the isolates with retardation time of third month.

Na sliki 10 je prikazano drevo, ki je dopolnjeno s tremi stolpci, kjer je izpostavljen retardacijski čas posameznega morfotipa. (1.mesec – 1.stolpec; 2. mesec – 2. stolpec; 3. mesec – 3. stolpec), pri čemer so opazne razlike v grozdenju morfotipov glede na retardacijski čas. Signifikanco kovariacije izrisanega drevesa smo določili s primerjavo le-tega z naključnimi drevesi in pri tem ugotovili, da je za izris drevesa na sliki 10 potrebnih 48 korakov (Slika 11). Verjetnost, da bi takšno drevo nastalo naključno, je 0,003 ($p < 0,005$). Rezultati kažejo, da je povezovanje v podskupine, prikazano na sliki 10 signifikantno, saj je verjetnost, da je izrisano drevo naključno, zelo majhna. Iz tega lahko zaključimo da sta morfolologija izraslih kolonij in čas retardacije povezana.

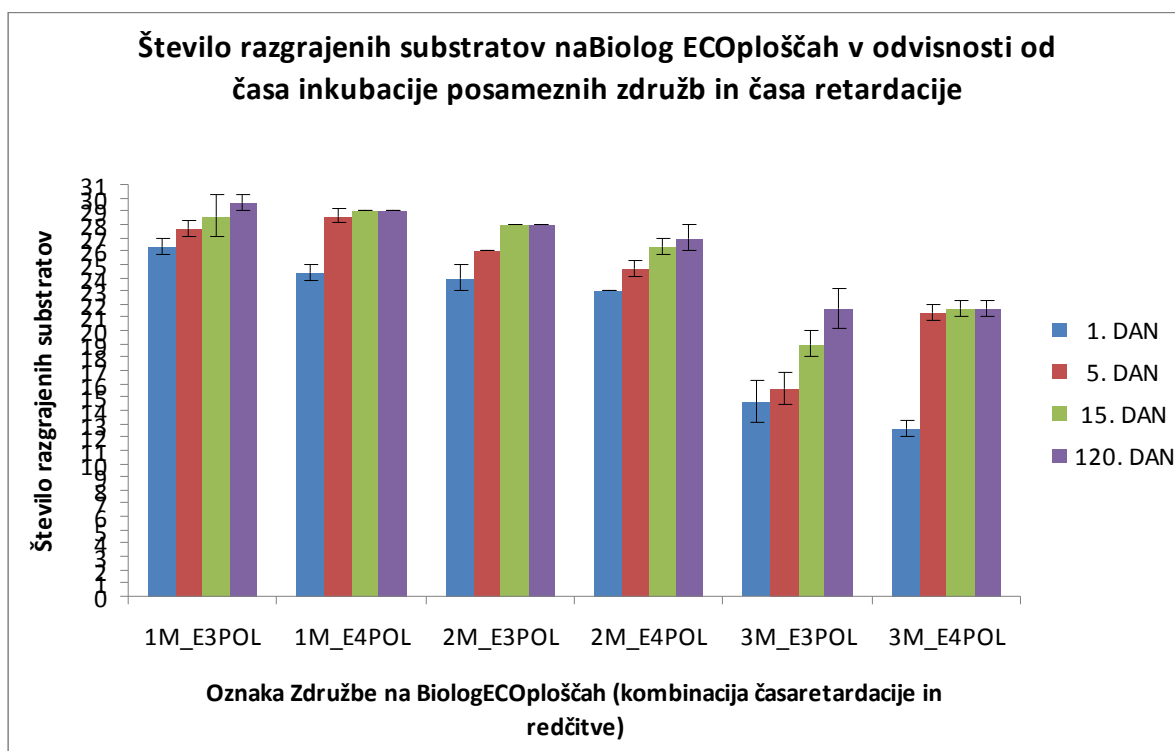


Slika 11: Na osi x je prikazano število korakov, ki so potrebni za konstrukcijo n naključnih dreves, na osi y pa število dreves, generiranih s tem številom korakov. Drevo na sliki 10 je pojasnjeno z 48 koraki, kar generira 11 naključnih dreves.

Figure 11: On x scale the number of steps needed for the construction of n coincidental trees is shown. On y scale the number of trees generated with these number of steps is shown. The tree on Figure 10 is explained by 48 steps, which generates 11 coincidental trees.

4.4 METABOLNI POTENCIAL IZ IZOLATOV SKONSTRUIRANIH ZDRUŽB

4.4.1 Razgradnja substratov na Biolog ECOploščah v odvisnosti od časa retardacije za različne pripravljene združbe, razvrščene po času inkubacije



Slika 12: Število razgrajenih substratov na Biolog ECOploščah v odvisnosti od časa inkubacije ECOplošč posameznih združb in časa retardacije. Stolpci so razvrščeni glede na število porabljenih substratov – povprečne vrednosti z napako so podane v prilogi K: od največ do najmanj porabljenih substratov. Substrati so označeni z različnimi barvami glede na čas inkubacije: inkubacijski čas 1. dne – svetlo modro; 5. dne – rdeče; 15. dne – zeleno; 120. dne – vijolično...

Figure 12: Number of degraded substrates on Biolog ECOplates in relation to incubation time of ECOplates of different communities and retardation time. The columns are arranged according to number of degraded substrates. Mean values with standard deviation are given in supplement K from the least to the highest number of degraded substrates. Substrates are marked with different colors according to incubation time: 1. day – light blue; 5. day – red; 15. day – green; 120. day – purple.

Metabolni potencial bakterijske talne združbe smo določili s pomočjo Biolog ECOplošč, ki omogočajo, da združbo testiramo za sposobnost razgradnje 31 različnih substratov v treh ponovitvah. Ugotovili smo, da število razgrajenih substratov pada z retardacijskim časom.

Rezultati nadalje pokažejo, da število razgrajenih substratov narašča tudi s časom

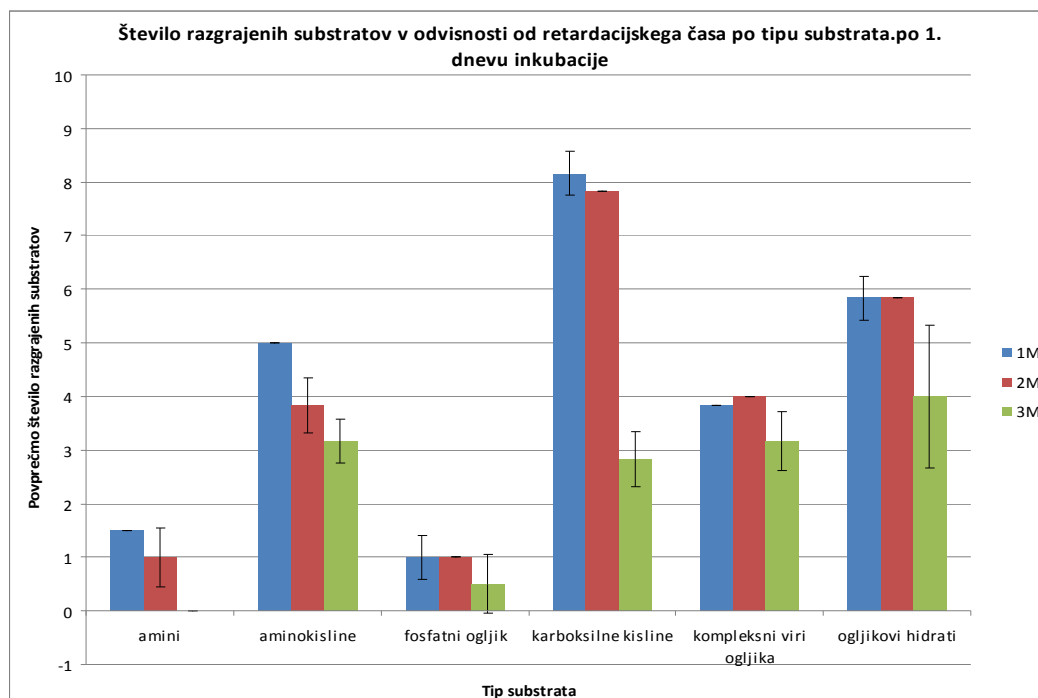
inkubacije ECOplošč. Po 1 dnevu je največ substratov (26) uspela razgraditi združba najhitreje rastočih (1. mesec) in najmanj redčenih sevov (10^{-3}), 24 oziroma povprečno 23 substratov pa so razgradili vsi izolati 2. meseca. Združbi 3. meseca sta pri redčitvi 10^{-3} oziroma 10^{-4} po 1 dnevu inkubacije razgradili le 14 oziroma 12 substratov. S časom inkubacije ECOplošč število razgrajenih substratov sicer narašča, kar kaže na obogatitev posameznikov na izbranih substratih, vendar metabolni potencial združbe 3. meseca nikoli ne doseže potenciala združb 1. meseca, kar kaže že končni nižji odstotek funkcionalne raznolikosti (Priloga K).

4.4.2 Število razgrajenih substratov glede na tip substrata v odvisnosti od retardacijskega časa

Preglednica 3: Viri ogljika na Biolog ECOploščah. Kodifikacijska tabela 31 substratov (prava razporeditev je v treh ponovitvah) (Chazarenc in sod., 2010).

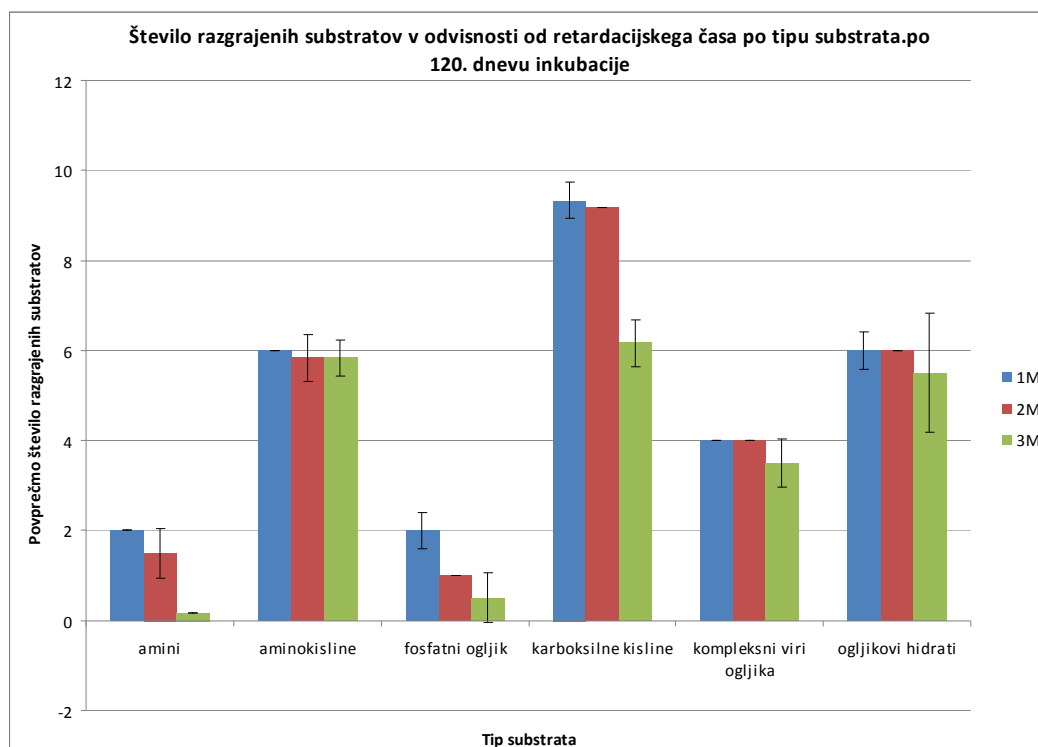
Table 3: Carbon sources on Biolog ECOplates. Kodification table of 31 substrates (real arrangement is in three repetitions) (Chazarenc in sod., 2010).

oznaka	skupina	ime substrata
A1	kontrola	voda
A2	ogljikovi hidrati	β -metil-D-glukozid
A3	karboksilne kisline	D-galaktonska kislina- γ -lakton
A4	aminokisline	L-arginin
B1	karboksilne kisline	piruvična kislina metilni ester
B2	ogljikovi hidrati	D-ksiloza
B3	karboksilne kisline	D-galakturonska kislina
B4	aminokisline	L-asparagin
C1	kompleksni viri ogljika	Tween 40
C2	ogljikovi hidrati	i-eritritol
C3	karboksilne kisline	2-hidroksi benzoična kislina
C4	aminokisline	I-fenilalanin
D1	kompleksni viri ogljika	Tween 80
D2	ogljikovi hidrati	D-manitol
D3	karboksilne kisline	4-hidroksibenzoična kislina
D4	aminokisline	L-serin
E1	kompleksni viri ogljika	α -ciklodekstrin
E2	ogljikovi hidrati	N-acetil-D-glukozamin
E3	karboksilne kisline	γ -hidroksibutirična kislina
E4	aminokisline	L-treonin
F1	kompleksni viri ogljika	glikogen
F2	karboksilne kisline	D-glukozaminska kislina
F3	karboksilne kisline	itakonična kislina
F4	aminokisline	Glicil-L-glutamična kislina
G1	ogljikovi hidrati	D-celobioza
G2	fosfatni ogljik	Glukoza-1-fosfat
G3	karboksilne kisline	α -ketobutirična kislina
G4	amini	feniletilamin
H1	ogljikovi hidrati	a-D-laktoza
H2	fosfatni ogljik	D-1-a-glicerolfosfat
H3	karboksilne kisline	D-malična kislina
H4	amini	putrescin



Slika 13: Število razgrajenih substratov v odvisnosti od retardacijskega časa glede na tipu substrata po 1 dnevu inkubacije.

Figure 13: Number of degraded substrates in relation to retardation time according to substrate type after 1. day of incubation.



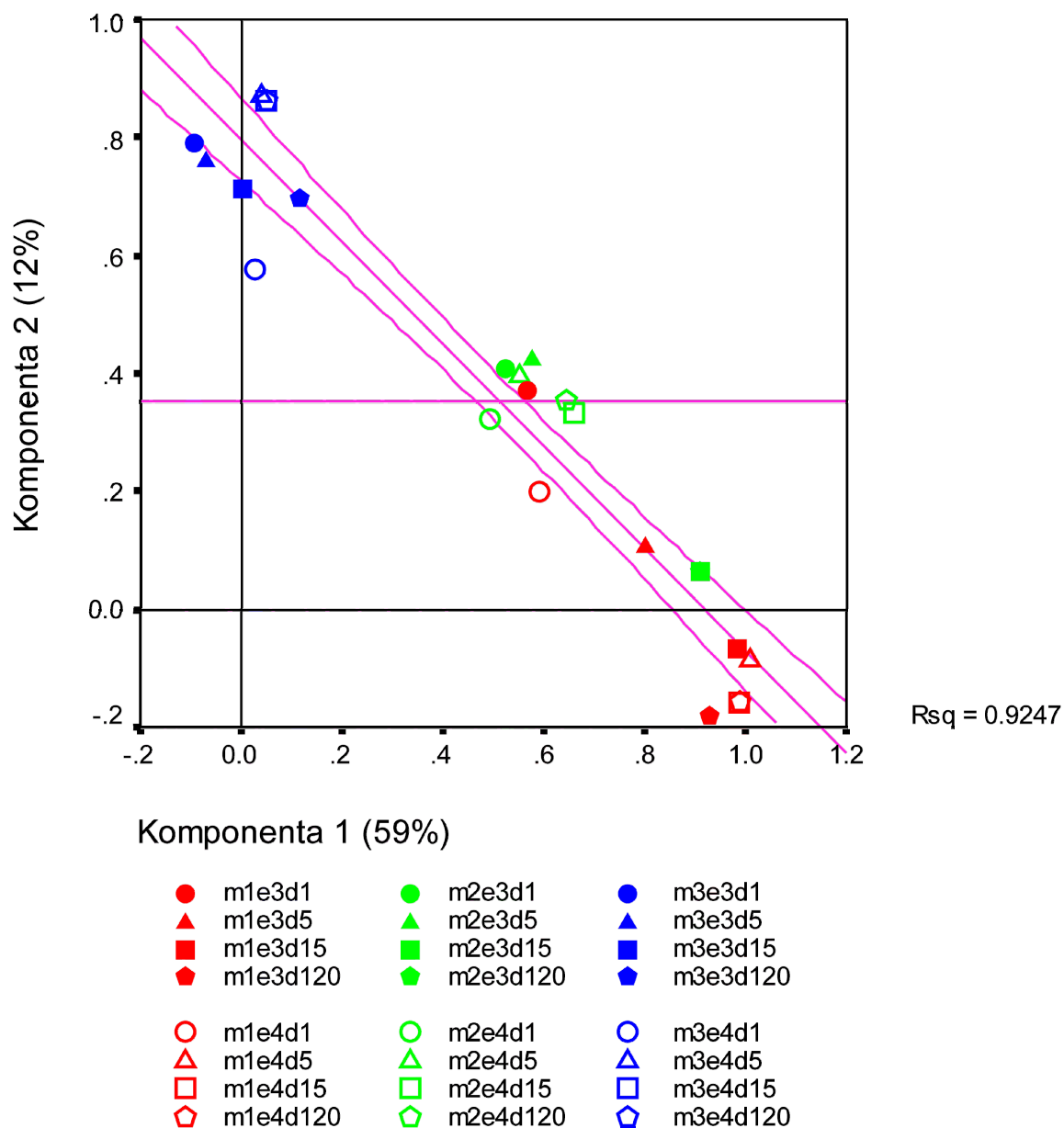
Slika 14: Število razgrajenih substratov v odvisnosti od retardacijskega časa po tipu substrata po 120 dneh inkubacije.

Figure 14: Number of degraded substrates in relation to retardation time according to substrate type after 120. days of incubation.

Tri časovne mikrobne združbe so pokazale podoben potencial za razgradnjo aminokislin, kompleksnih virov ogljika in ogljikovih hidratov po 120. dneh inkubacije (Slika 14). Razlike so bile opazne pri razgradnji aminov, fosfatnega ogljika in karboksilnih kislin. Pri vseh treh skupinah substratov so izolati 3. meseca pokazali najnižji potencial za razgradnjo, medtem ko sta združbi 1. in 2. meseca razgradili podobno število aminov in karboksilnih kislin. Podoben vzorec smo zasledili že po 1 dnevu inkubacije (Slika 13), le da je v začetnem obdobju še vidna razlika med tremi združbami pri razgradnji aminokislin.

4.4.3 Multivariantna analiza metabolnih potencialov sestavljenih združb

S pomočjo metode glavnih komponent (PCA) smo opredelili dejavnike, ki vplivajo na metabolni potencial treh sestavljenih združb (prvi, drugi, tretji mesec). Za vsako združbo smo v štirih različnih inkubacijskih časih ovrednotili potencial za razgradnjo 31 substratov v treh paralelkah na Biolog ECOploščah. Kot odvisne spremenljivke smo obravnavali število razgrajenih substratov na Biolog ECOploščah, kot neodvisne spremenljivke pa smo primerjali združbe, ki so se razlikovale po retardacijskem času, redčitvi (10^{-3} , 10^{-4}), številu sevov in času inkubacije ECOplošč. KMO-test je z vrednostjo 0,694 pokazal, da je PCA-analiza primerna metoda za analizo podatkov. Bartlettov test sferičnosti je z vrednostjo $< 0,005$ potrdil signifikantnost PCA-analize (Priloga M). Rezultati PCA-analize, prikazani na Sliki 15, pojasnijo 71 % skupne variance podatkov. Glede na lastne vrednosti izstopa predvsem prva komponenta, ki pojasni 59 % celotne variance, druga, ki ji sledi, pa 12 % (celokupna pojasnjena variance – Priloga O). V projekciji podatkov na ravnino, določeno s tema dvema komponentama vzdolž lastnega vektorja, dobimo tri skupine, ki jih lahko opredelimo kot skupine glede na retardacijski čas, saj združba tretjega meseca pozitivno korelira s komponento 2 ter negativno s komponento 1, medtem ko združbi 1. in 2. meseca pozitivno korelirata s komponento 1. Pri ostalih neodvisnih spremenljivkah ne opazimo jasnih ločitev (komponentna matrika – Priloga P).



Slika 15: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECOplošč (1., 5., 15. in 120. dan), zraven pa je pripisano tudi število sevov na vsaki plošči. V legendi število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo lme3 – 112 sevov; za m1e4 – 56 sevov; za m2e3 – 18 sevov; za m2e4 – 8 sevov; za m3e3 – 3 seve; in za m3e4 – 2 seva. Združbe, označene z rdečo barvo, so združbe 1. meseca, zelene barve so združbe 2. meseca, modre barve pa združbe 3. meseca. Polni znaki označujejo redčitev 10^{-3} , prazni pa redčitev 10^{-4} . Krog označuje – 1. dan; trikotnik – 5. dan; kvadrat – 15. dan; petkotnik – 120. dan inkubacije. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 59 % variance; in za komponento 2 – 12 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja.

Figure 15: PCA (Principal component analysis). PCA was constructed from data matrix in which all plates differentiating according to dilution and incubation time (1., 5., 15. in 120. day) are shown. The number of isolates in community is added alongside. In legend the number of isolates is not inscribed because of better clearness. It is for 1me3 – 112 isolates; for m1e4 – 56 isoaltes; for m2e3 – 18 isolates; for m2e4 – 8 isolates; for m3e3 – 3 isolates; and for m3e4 – 2 isolates. Communities marked with red color are 1. month retardation time communities, green are 2. month retardation time communities and blue are 3. month retardation time communities. Full marks indicate 10^{-3} dillution, empty marks 10^{-4} dillution. Circle marks – 1. day; triangle – 5. day; square – 15. day; pentagon – 120. day of incubation. The percentage of variance explained with each component is 59 % for component 1 and 12 % for component 2. Purple lines mark the mean and 95 % confidence interval.

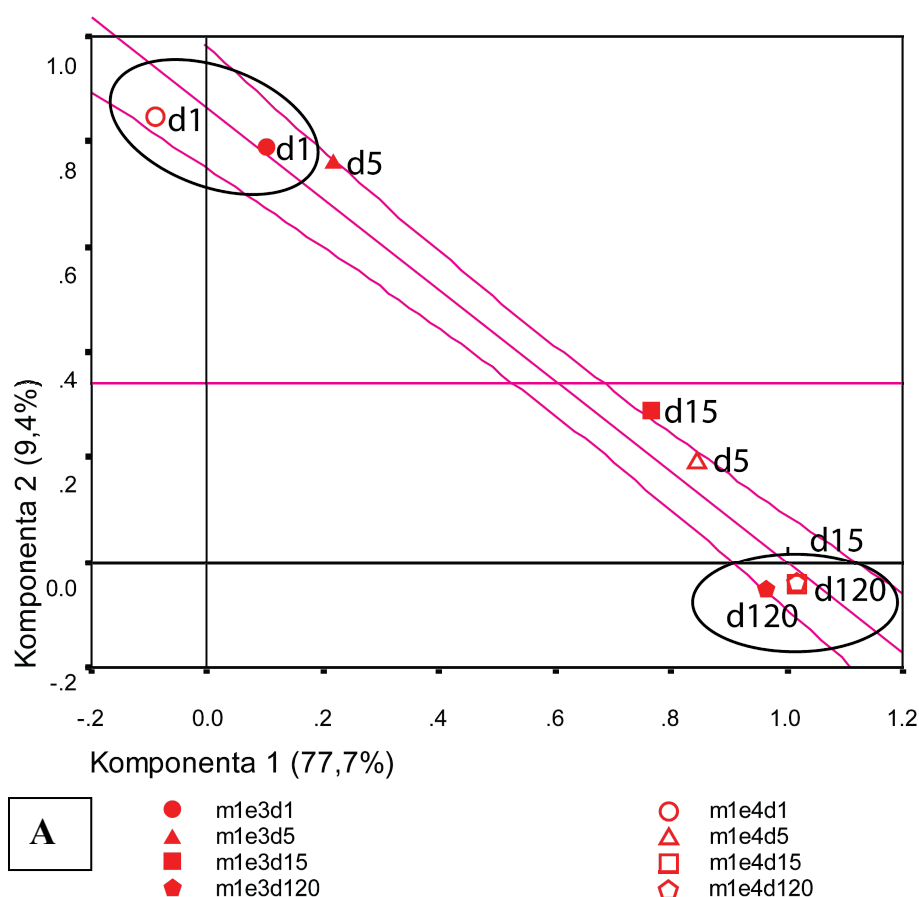
Skupine nam uspe razlikovati glede na retardacijski čas, vendar ne moremo biti popolnoma prepričani o tem, s katero spremenljivko z manj vpliva je dejansko povezana komponenta 2, zato smo opravili še analizo vsake posamične retardacijske podskupine, ki bi nam lahko odgovorila na vprašanje, na katere komponente se združbe ločijo znotraj časovnih skupin.

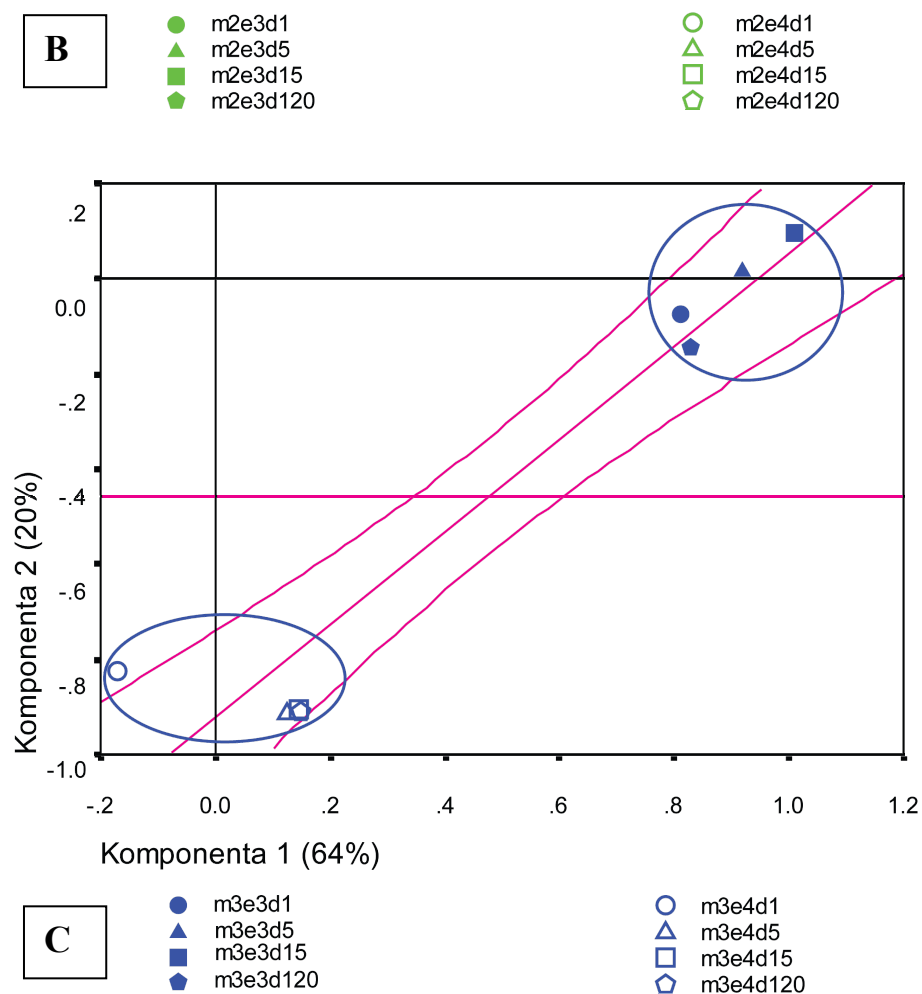
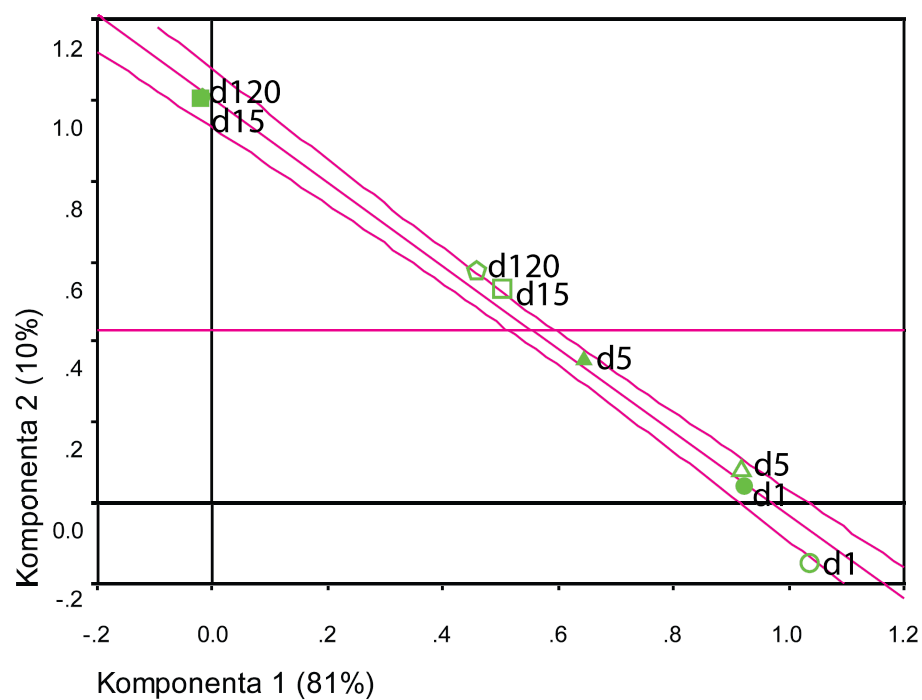
4.4.4 Ločene PCA analize združb 1.meseca , 2. meseca in 3. meseca

Domnevamo, da imajo v združbah sevov 1., 2. in 3. meseca vpliv tri spremenljivke; čas inkubacije (1.dan, 5.dan, 15. dan in 120. dan), redčitev (10^{-3} , 10^{-4}) in število sevov v združbi. Želeli smo določiti katera od teh spremenljivk nam najbolj pojasni razpršenost podatkov (KMO za združbe 1. meseca ni bilo možno izračunati, KMO združb 2. meseca = 0,769, Bartlettov test sferičnosti = 0,000-Priloga U, KMO združb 3. meseca = 0,694, Bartlettov test sferičnosti = 0,000-Priloga Y). V preglednici celokupne pojasnjene variance (Priloga R) in scree diagrama (Priloga S), smo s pomočjo metode glavnih komponent za združbe 1. meseca izločili dve najpomembnejši komponenti. Prva komponenta nam pojasni kar 77,7 % celokupne variance v podatkih, druga pa 9,4 % celokupne variance podatkov. Pri združbah 2. meseca nam že prva komponenta pojasni 81 % variance podatkov, druga komponenta pa 10 % variance (celokupna pojasnjena variance-Priloga V in Scree diagrama- Priloga Z). Pri analizi združb 3. meseca pa razložimo s prvo komponento 64 % in z drugo komponento 20 % variance (celokupna pojasnjena varianca-Priloga A1 in Scree diagrama- Priloga B1).

V komponentni matriki skupin 1. meseca (Priloga 1A je opazna visoka korelacija med

združbama redčitve 10^{-4} in komponento 1, manjša pa z združbo redčitve 10^{-3} . Sklepamo lahko, da se glede na prvo komponento (obstajata dve izjemi) združbi prvega meseca ločijo glede na redčitev. Hkrati je opazen tudi vpliv časa inkubacije plošč, saj sta dan 1 in dan 120 jasno ločena vzdolž komponente 1 in komponente 2. Podoben vzorec je opazen za združbo 2. meseca, kjer je zopet jasnejša ločitev glede na čas inkubacije plošč. Za združbo 3. meseca pa se pokaže precej drugačna razporeditev podatkov in pride do jasne ločitve med metabolnim potencialom dveh redčitev. Redčitev 10^{-3} pozitivno korelira s komponento 1 in 2, medtem ko je korelacija zdržbe redčitve 10^{-4} šibka z obema komponentama (komponentna matrika združb 2. meseca-Priloga X, komponentna matrika združb 3. meseca-Priloga C1).





Slika 16: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECoPlošč (1., 5., 15. in 120. dan), zraven pa je pripisano tudi število sevov na vsaki plošči. V grafu A število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo 1me3 – 112 sevov; za 1me4 – 56 sevov. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 77 % variance; in za komponento 2 – 9,4 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja, elipse pa združbe, združene glede na 1. in 120. dan inkubacije.

V grafu B število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo m2e3 – 18 sevov; za m2e4 – 8 sevov. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 81 % variance; in za komponento 2 – 10 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja.

V grafu C število sevov zaradi boljše preglednosti ni podano, znaša pa: za združbo m3e3 – 3 seve; za m2e4 – 2 seva. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 64 % variance; in za komponento 2 – 20 % variance. Vijolične črte označujejo sredino in 95-odstotni interval zaupanja, elipse pa združbe, združene glede na redčitev.

Figure 16: PCA (Principal component analysis). PCA was constructed from data matrix in which all plates differentiating according to dilution and incubation time (1., 5., 15. in 120. day) are shown. The number of isolates in community is added alongside. In legend the number of isolates is not inscribed because of better clearness. It is for 1me3 – 112 isolates; for 1me4 – 56 isoaltes. The percentage of variance explained with each component is 77 % for component 1 and 9,4 % for component 2. Purple lines mark the mean and 95 % confidence interval, ellipses mark the communities grouped according to 1. and 120. day of incubation.

In Figure B the number of isolates is not added alongside for better clearness. It is for: m2e3 – 18 isoaltes; and for m2e4 – 8 isolates. The percentage of variance explained with each component is 81 % for component 1 and 10 % for component 2. Purple lines mark the mean and 95 % confidence interval.

In Figure C the number of isolates is not added alongside for better clearness. It is for: m3e3 – 3 isolates; and for m3e4 – 2 isolates. The percentage of variance explained with each component is 64 % for component 1 and 20 % for component 2. Purple lines mark the mean and 95 % confidence interval, ellipses mark communites grouped according to dilution.

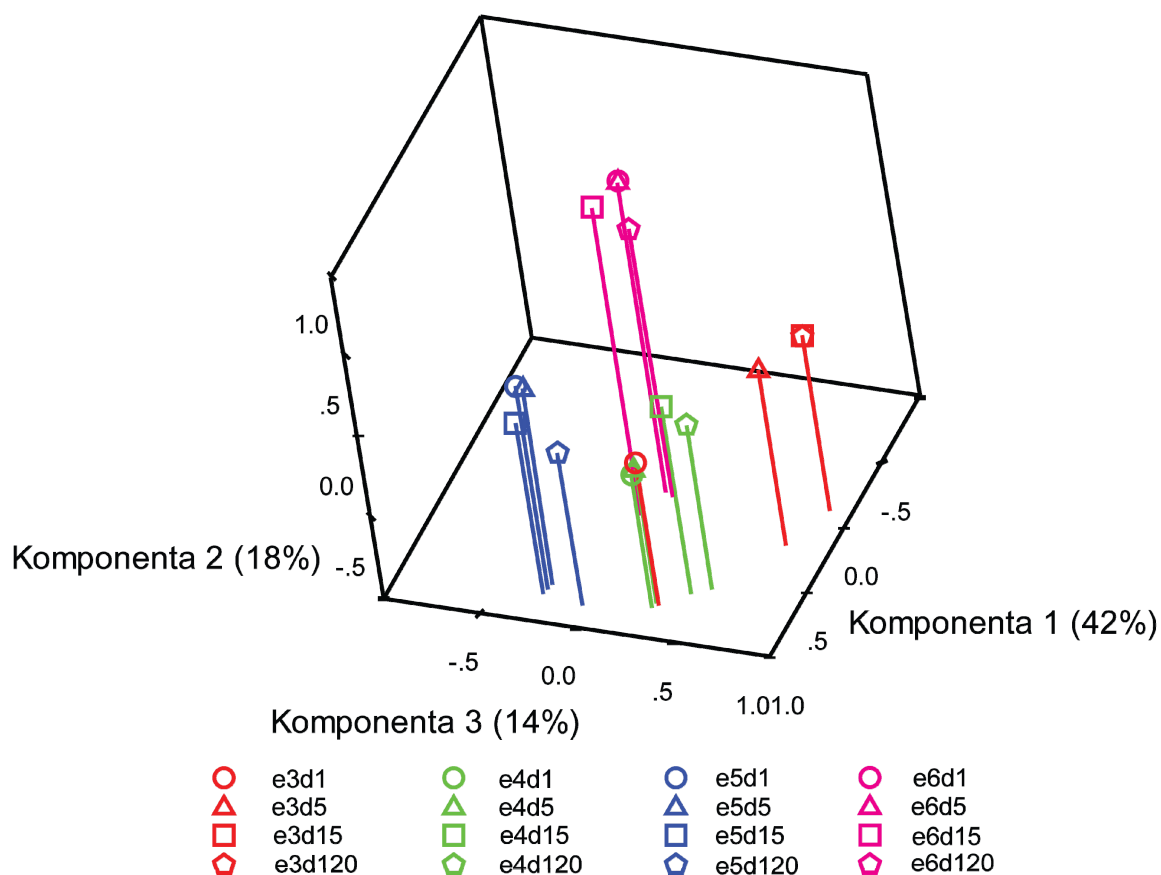
4.4.5 Multivariantna analiza referenčne združbe HC-tal na Biolog ECoPloščah

Analizirali smo podatke 4 talnih združb, ki so se razlikovale glede na redčitev izhodiščnega inokuluma ($KMO = 0,784$, Bartlettov test sferičnosti = 0,000 – Priloga D1). Iz tabele (Priloga E1) o celokupni pojasnjeni varianci ugotovimo, da lahko izločimo kar tri komponente. Prva nam pojasni 42 % variance podatkov, druga 18 % in tretja 14 %.

Vzdolž prve komponente opazimo pozitivno korelacijo metabolnih potencialov za vse 4

združbe. Najmočnejša korelacija se je pokazala za združbo redčitve 10^{-4} , tej pa sledijo združbe redčitve 10^{-5} in 10^{-6} . Redčitev 10^{-3} se razporeja vzdolž te komponente glede na dan inkubacije (1. dan korelira najmočnejše, pri 5. dnevu korelacija malo pade, 15. in 120. dan pa korelirata z enako močjo). Druga komponenta nam kaže jasno pozitivno korelacijo le za redčitve 10^{-6} . Tretja komponenta pozitivno korelira predvsem z redčitvijo 10^{-3} . Iz razporeditve podatkov sklepamo, da ima na metabolni potencial združbe najmočnejši vpliv redčitev inokuluma HC tal. Opazimo pa tudi vpliv časa inkubacije, predvsem pri redčitvi 10^{-3} .

Združbe HC tal



Slika 17: Analiza z metodo glavnih komponent (PCA). PCA je bila skonstruirana iz podatkovne matrike, v katero so bile vnesene vse plošče, ki se razlikujejo glede na redčitve in čas inkubacije Biolog ECOplošč (1., 5., 15. in 120. dan. Odstotek variance, ki je pojasnjena z vsako PCA-osjo, je vpisan v oklepajih na grafu in znaša: za komponento 1 – 42 % variance; za komponento 2 – 18 % variance; in za komponento 3 – 14 % variance podatkov.

Figure 17: PCA analysis. PCA was constructed from data matrix in which all plates differentiating according to dilution and incubation time (1., 5., 15. in 120. day) are shown. The percentage of variance explained with each component is 42 % for component 1, 18 % for component 2 and 14 % for component 3.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RASTNE KRIVULJE GOJENJA NA TRDNIH GOJIŠČIH V ODVISNOSTI OD ČASA IZRISTI KOLONIJE

5.1.1 Mikroskopski pregled talnih mikroorganizmov

V študiji smo s pomočjo DAPI-barvanja v gramu HC-tal našeli $2,49 \pm 0,31 \times 10^9$ bakterij. Število je primerljivo s številom celic, ki so jih v svoji študiji na podobnih tleh prešteli Davis in sod. (2005), in sicer $1,28 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^8$. Povprečno smo pri različnih redčitvah HC-tal vzgojili 12,4 % ali $3,1 \times 10^8$ izolatov združbe g^{-1} suhih tal, kar je primerljivo z drugimi novejšimi študijami. V svoji študiji so Davis in sod. (2005) z uporabo gelana kot strjevalnega agensa uspeli vzgojiti od $5,0 \times 10^7$ do $6,8 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ suhih tal izolatov. Vrednosti variirajo glede na tip uporabljenega substrata in so primerljive z našimi rezultati. Dober donos sevov zmožnih rasti na ploščah lahko pripišemo tudi podaljšani inkubaciji plošč, saj je po prvem tednu inkubacije zraslo 50 % kolonij, po 4 tednih pa še 30 % vseh kolonij.

5.1.2 Rastne krivulje na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti na trdnem gojišču

Osnovna spremenljivka, ki nas je zanimala, je število bakterijskih kolonij v odvisnosti od časa izrasti (časa retardacije) na trdnem gojišču v 12 tednih. Zanimalo nas je tudi, kako na to razmerje vplivata redčitev, iz katere sev izhaja (ta opisuje številnost v izvorni združbi), in hitrost, s katero posamezne podzdružbe (Hattori in sod. (1997) jih imenujejo ekotipi), priraščajo na trdnem gojišču. Za združbo bakterij s podobnim retardacijskim časom Hattori in sod. (1997) nadalje predlagajo poimenovanje »ekokolekcija«. Predpostavili smo, da se bodo združbe, ki se razlikujejo po retardacijskem času, med seboj razlikovale tudi po morfologiji kolonij in metabolnem potencialu.

Rezultati so pokazali, da celokupno število vzgojenih kolonij narašča s časom inkubacije na ploščah, število na novo priraslih pa pada z retardacijskim časom. Pri združeni krivulji, kjer redčitve nismo upoštevali, število bakterij v času prav tako narašča. Lomi krivulje se pri obeh zgodijo po 3. tednu in po 7. tednu. Zato sklepamo, da čas izrasti kolonije na

hitrost rasti vpliva bolj kot redčitev, ki izraža številčno zastopanost posameznega morfotipa v izvorni združbi.

S Slike 6 je razvidno, da imata krivulji bolj redčenih mešanic (10^{-5} in 10^{-6}) višji k krivulje do 3. tedna izrasti na plošči kot pa krivulji manj redčenih mešanic. Kasneje pa se vse krivulje bolj ali manj približajo druga drugi. Iz tega lahko zaključimo, da je med izolati iz bolj redčenih mešanic, ki naj bi jih bilo po teoriji Franklina in sod. (2001) v združbi največ, tudi največ hitro rastočih sevov (tj. sevov, zraslih do 4. tedna).

S hipotetičnimi krivuljami števila izraslih kolonij posameznih redčitev (Slika 7) smo skušali primerjati dejansko število kolonij in število kolonij, če bi na rast na trdnih gojiščih vplivala le redčitev, in pri tem ugotovili, da bi največ kolonij na trdnih gojiščih hipotetično zraslo prav pri bolj redčenih mešanicah. To anomalijo lahko pripišemo hitrejši rasti v združbi najpogostejših sevov, pa tudi zmanjšani znotrajvrstni kompeticiji. Ekološka teorija namreč predvideva, da lahko populacija z zmanjšanjem znotrajvrstne kompeticije številčno precej naraste (Giller, 1984). V delu Franklina in sod. (2001) je bila v združbah (neredčena in enkrat redčena) raznolikost večja – s tem je bilo močnejše tudi medvrstno tekmovanje, združbe pa v primerjavi z zelo redčenimi združbami (10^{-5} in 10^{-6}) dosti manjše, saj jih uspe več prirasti na ploščah, kar je v skladu z našimi rezultati.

Moč medsebojnih interakcij pa bi lahko zniževalo tudi gojenje na trdnih gojiščih. Stevenson in sod. (2004) so namreč v svoji študiji opazili, da uspe na trdnem gojišču iz enake redčitve zrasti več kolonij kot pa v tekočem gojišču. To pripisujejo prostorski ločenosti kolonij na trdnem gojišču in temu, da so kolonije tu manj izpostavljene negativnim vplivom sosednjih kolonij. Zato lahko kolonije na trdnem gojišču tvorijo tudi tisti mikroorganizmi, ki jih sicer ne bi. Po drugi strani pa so se v raziskavi Franklina in sod. (2001) različne združbe drugače odzivale na poskuse invazije in okoljskega stresa. Ugotovili so, da so bolj raznolike (manj redčene) združbe bolj stabilne in da se bolje odzovejo na invazijo. To potrjuje tudi dejstvo, da smo morali v naši študiji najbolj redčene (in s tem najmanj stabilne) mešanice redčitev 10^{-7} in 10^{-8} odstraniti iz poskusa, saj so jih že kmalu po inokulaciji prerasle glive.

Glavno referenco pri izbiri časa inkubacije nam je predstavljala študija Janssena in sod. (2002), in Davis in sod. (2005), ki so ugotovili, da se število kolonij povečuje do 12. tedna.

V naši študiji smo število kolonij na POL-gojišču določali s tedensko meritvijo. Število kolonij se je povečevalo do 12. tedna, ko je iz CFC-krivulje razvidna izravnava in ko smo z merjenjem prenehali. Hattori in sod. (1997) so aktivno bakterijsko združbo preučevali z analizo kinetike tvorbe kolonij talnih bakterij in pri tem ugotovili obstoj CFC-skupin, ki naj bi bile osnovna enota združbe. Hattori (1985) ter Suwa in Hattori (1987) domnevajo, da variabilnost začetka tvorbe kolonij odraža prisotnost hitro in počasi rastočih bakterij in fiziološko stanje celice, ki je lahko dormantna ali aktivno rastoča.

Suwa in Hattori (1987) nadalje predpostavljata, da je mogoče vrednost τ (čas retardacije) na splošno deliti na dva dela: prvi del je čas, preden se celica začne deliti, drugi del pa čas, potreben, da deleča se celica proizvede vidno kolonijo. Na to vpliva več dejavnikov, kot so: generacijski čas organizma, prostorska razporeditev na novo izraslih celic na trdnem gojišču, produkcija sluzavih substanc in mejna velikost za detekcijo vidne kolonije. Opis pojavnosti kolonije vključuje dva parametra – časovno okno (imenovano retardacijski čas) in verjetnost (opisuje jo parameter λ), da se v tem obdobju izolat pojavi na plošči. Stradajoče celice se na ploščah pojavljajo z manjšo verjetnostjo. Vrednost λ navadno pade, ko je kultura stara ali pa ko celice stradajo (Ishikuri in Hattori, 1987). V naši študiji so po izračunu parametra λ v vegetativni fazi samo celice prvega tedna, vse ostale so glede na vrednost λ v mirujoči fazi. Vendar pa se tudi znotraj te populacije kažejo različne vrednosti parametra λ . Povišanje vrednosti v 5. tednu in med 7. in 8. tednom je v skladu s CFC-krivuljami, po drugi strani pa temu ustreza tudi dejstvo, da je znotraj populacije hitro rastočih (glede na CFC-krivulje) v vegetativni fazi, torej sposobna delitve, samo populacija 1. tedna. To nam potrjujejo tudi rezultati z Biolog ECOplošč, saj so omenjeni sevi po sicer podaljšanem času inkubacije uspeli razgraditi večji delež ponujenih substratov, česar ni bilo opaziti po krajših časih inkubacije (do 5 dni).

Po času, potrebnem, da se kolonija pojavi na plošči, tako razlikujemo hitro rastočo (do približno 4. tedna) in počasi rastočo populacijo (celice, zrasle po 4. tednu). Analize strukture združbe kažejo, da smo v prvem mesecu gojenja na ploščah uspeli pridobiti hitro rastoče bakterije (največ sicer v 1. tednu), med katerimi so dominantni r-strategi. Razlike v spremembi strukture pa je bilo opaziti v porazdelitvi števila kolonij glede na retardacijski čas, saj smo z daljšim časom inkubacije opazili postopno povečanje števila K-strategov.

Znotraj hitro rastoče populacije lahko združbe nadalje razlikujemo glede na redčitev, saj kolonije v bolj redčenih združbah do 4. tedna inkubacije priraščajo hitreje in so hkrati tudi metabolno najbolj raznolike.

V povprečju je na 4 vzporednih ploščah pri redčitvi 10^{-3} zraslo 290 kolonij, pri redčitvi 10^{-4} 111 kolonij, pri redčitvi 10^{-5} 28 kolonij in pri zadnji redčitvi, 10^{-6} , 7 kolonij. Če upoštevamo vse plošče, je tako na vseh vzporednih ploščah skupaj zraslo 1745 kolonij. Za morfološki opis in nadaljnje gojenje zaradi prevelike obsežnosti in zahtevnosti ni bilo možno precepiti vseh sevov, zato smo naključno izbrali le del izrasle združbe (cca. 350-kolonij). Ishikuri in Hattori (1987), cit. po Fisher in sod. (1922), navajata, da pod idealnimi pogoji število kolonij na paralelnih ploščah variira na podoben način kot vzorci Poissonove porazdelitve. Pogoji pa so: 1. da vsaka plošča ponuja enake pogoje za razvoj; 2. da je razvoj enega prisotnega organizma neodvisen od drugega organizma; 3. da se izolat razvije le v eno vidno kolonijo; 4. da je za vsako ploščo enako verjetno, da prejme katerikoli organizem; in 5. da so organizmi razporejeni neodvisno. Če je teh pet pogojev izpolnjenih, je lahko povprečno število kolonij, ki se pojavijo na ploščah, neposredna mera za gostoto bakterijske populacije. Zato lahko tudi na manjšem deležu te populacije preverimo vpliv časa inkubacije na morfološke, genetske in fiziološke lastnosti izbrane združbe. Za analizo smo precepili okrog 350 sevov, vendar nekateri sevi niso uspeli zrasti – nekaj so jih prerasle glive, nekaj pa se jih po večkratnem precepljanju (5-kratnem) ni uspelo ohraniti na trdnih gojiščih. Delež počasi rastočih je v tem naboru glede na izvorno združbo na ploščah manjši, saj smo imeli ravno pri sevih iz kasnejše periode največ težav z uspešnim ohranjanjem na trdnem gojišču. Običajno je precepljanje prvič uspelo, v kasnejših poskusih pa jih nismo uspeli ohraniti. Domnevamo, da je bil prvi, uspešni poskus posledica zaloge hranil, ki jo je sev prinesel iz prvotnega okolja, mogoče pa je, da je bila nezmožnost tvorbe kolonij posledica odsotnosti možnih sintrofnih partnerjev ali odsotnost določenih rastnih faktorjev, kar je v svoji študiji ugotovil tudi Köpke (2005).

5.2 MORFOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJ, IZRASLIH NA TRDNEM GOJIŠČU, V ODVISNOSTI OD ČASA IZRISTI NA TRDNEM GOJIŠČU

Namen je bil oceniti morfološko raznolikost vzgojenih mikrobnih združb različnih retardacijskih časov in ugotoviti povezavo med morfologijo kolonij in časom, v katerem so se pojavile na plošči. Opisali smo 324 (224 unikatnih) morfotipov, od tega 37 morfotipov s časom izrasti 2 mesecev in 18 morfotipov s časom izrasti 3 mesecev. Poleg tega smo določili 109 morfotipov, ki po prvem gojenju na revnem gojišču niso uspeli tvoriti kolonije na bogatem LB-gojišču (obligatni oligotrofi).

5.2.1 Shannonov diverzitetni indeks morfologije kolonij glede na retardacijski čas in redčitev

V literaturi nismo zasledili nobene tako obširne raziskave, kot je naša, ki bi se osredotočila tudi na morfološki opis talnih izolatov glede na retardacijski čas in ki bi ta parameter primerjala z morfološko in metabolno diverziteto.

V naši študiji sta bogatost in raznolikost morfotipov padala v odvisnosti od časa izrasti na trdnem gojišču, enakomernost pa je bila visoka in je ostala relativno konstantna vzdolž retardacijkega časa. Hitro rastoči sevi so se morfološko razlikovali od mikrobnih kolonij z daljšim časom retardacije, morfološka raznolikost pa je upadala s časom retardacije, kar je zlasti posledica pigmentiranosti kolonij, ki je pri počasi rastočih sevih revnejša. Iz rezultatov lahko nadalje opazimo, da lahko številne lastnosti pripišemo morfološkemu opisu, značilnemu za (vsaj glede na vizualni opis) aktinomicete (sivi odtenki, prahasta površina itd.), ki jih v 2. in 3. mesecu nismo več opazili.

Ker lahko pigment opravlja tudi funkcijo skladišča odvečnih substanc oziroma funkcijo antibiotika (bakterija vlaga v produkcijo pigmentov, ko ima višek hranil) (Duffose, 2006), je povezava med hitro rastočimi sevi in višjo produkcijo pigmentov pri r-strategih pričakovana.

Večina pigmentiranih kolonij je zrasla v 1. mesecu, kasneje so prevladovali blede rumeni, belkasti ali prozorno motni sevi, pri katerih bi težko sploh govorili o pigmentiranosti.

Pojavnost različnih pigmentiranih izolatov, ki jih opazimo v prvem mesecu, lahko pogojuje dejstvo, da je bil del naših vzorcev vzorčen s površine tal (zgornjih 30 cm). Prevladovanje kromogenih bakterij na talni površini so opazili že Zdanowski in sod. (2001), cit. po Cameron (1970). Naravni pigmenti nudijo dobro zaščito proti različnim tipov UV-radiacije – najvišjo raven preživetja pod UV-B-sevanjem srečamo prav pri pigmentiranih bakterijah (Vosjan in Zdanowski, 2001, cit. po neobjavljenih podatkih v Zdanowski, 2001).

Odvisnost morfološke raznolikosti kolonij od redčitve so preučevali tudi Franklin in sod. (2001) ter pri tem ugotovili, da je morfološka diverziteta najvišja v združbah, izraslih iz neredčenih vzorcev, in da je diverziteta z višanjem redčitve padala. Največjo spremembo v morfološki raznolikosti so opazili med neredčeno in enkrat redčeno združbo. V naši študiji je bila razlika največja med redčitvijo 10^{-3} in 10^{-4} in je podobno padala z redčenjem.

Uporaba morfoloških opisov za opis združb je problematična zaradi zmanjšane diferenciacije kolonij v odnosu do retardacijskega časa (manj pigmentov, manjša velikost), kar delno ovira točno primerjavo oziroma ugotavljanje podobnosti, kar opažata tudi Bone in Balkwill (1988). Lebaron in sod. (1998) so v svoji raziskavi ugotovili, da z morfološko raznolikostjo lahko podcenimo dejansko raznolikost izolatov, saj so avtorji med 63 kolonijami na trdnem gojišču določili le 4 morfotipe. Nizka morfološka raznolikost izolatov bi bila lahko posledica vodnega habitata, iz katerega so bili pridobljeni izolati. Nasprotno pa smo v naši študiji, kjer smo preučevali visoko organska tla, ugotovili izredno visoko raznolikost morfotipov in prevlado unikatnih morfotipov.

5.2.2 Hi-kvadrat preiskus povezanosti opisa morfotipa in časovnih skupin glede na retardacijski čas

Za 23/35 opisov morfotipa smo dobili statistično značilne razlike za opise morfotipa med obema časovnima skupina, s čimer smo za te lastnosti potrdili hipotezo H1, tj. da sta morfologija in čas retardacije povezani spremenljivki. Razlog, zakaj s testom hi-kvadrat nismo dobili značilnih razlik za nekaj pričakovanih opisov pigmenta, je, da se v drugi skupini ta opis pojavlja preredko oziroma se v skupini počasih rastočih sevov sploh ne pojavi. To razliko smo popravili s t-testom, ki sicer za kategorične (diskretne)

spremenljivke (opisujejo pripadnost skupini in so kodirane z 0 ali 1) ni najbolj primeren, ki pa nam je s pomočjo izračuna varianc statistično značilne razlike za večino pigmentiranih opisov morfotipa med skupinama potrdil. Odsotnost ali nizka frekvenca pojavljanja opisov pigmenta v drugi skupini kažeta na visoko raznolikost pigmentov znotraj združbe hitrorastčih sevov, delno pa je lahko to tudi posledica preširokega nabora lastnosti za opis pigmenta.

5.2.3 Dendrogram morfoloških tipov

V analizi podobnosti morfortipov smo s hierarhičnim grozdenjem z metodo UPGMA in Jaccardovim koeficientom določili razdalje med posameznimi morfortipi. Na podlagi pridobljenih podatkov smo izrisali drevo podobnosti, ki je rezultat 48 korakov. Iz drevesa so razvidne ločene skupine morfortipov glede na čas retardacije. Na podlagi pridobljenega drevesa sklepamo, da sta morfologija izolata in čas retardacije povezani spremenljivki.

5.3 METABOLNI POTENCIAL ZDRUŽB IN IZOLATOV

Rezultati so pokazali, da z retardacijskim časom izrasti kolonij metabolni potencial upada in da združbe tretjega meseca povprečno razgradijo manjše število različnih substratov kot združbe prvega in drugega meseca. Višje število substratov, ki jih razgradijo hitro rastoči r-strategi, kaže, da s sukcesijo in prevlado K-strategov, ki bi jih pričakovali med počasi rastočimi sevi, verjetno pride do specializacije niše. Glede na kvaliteto substrata je imela združba 3. meseca v povprečju nižji metabolni potencial za razgradnjo karboksilnih kislin, aminov in fosforiliranih virov ogljika. PCA-analiza je potrdila, da se tri časovne sestavljene združbe metabolno razlikujejo, saj je mogoče z retardacijskim časom razložiti največji delež variance podatkov. Vpliv ostalih spremenljivk zaznamo le, če posamezno združbo analiziramo ločeno. Pri ločeno analiziranih združbah 1. in 2. meseca je največji delež variance razložen s spremenljivko časa inkubacije ECOplošč, manjši delež pa z redčitvijo. Pri združbah tretjega meseca pa je, nasprotno, z redčitvijo razložen večji del variance. V tem primeru je bila združba 10^{-3} sestavljena iz 3 sevov, združba 10^{-4} pa iz 2 sevov. Vendar je analiza posameznih sevov pokazala, da je lahko potencial enega seva

enakovreden potencialu združbe, ki je sestavljena iz številnih sevov (Priloga L). Pri združbah 1. in 2. meseca, ki so bile sestavljene iz več kot 8 sevov, ne pride do opazne razlike v metabolnem potencialu združb. Tak rezultat je verjetno posledica metabolne redundance med sevi (Smalla in sod., 1998, Philippot in sod., 2010).

Vpliv redčitve na metabolni potencial združbe se je pokazal predvsem pri analizi referenčne združbe iz HC-tal, ki je predhodno nismo vzgojili v laboratoriju. Z redčenjem smo v tem primeru odstranili manj številne predstavnike. Verjetno imajo številni sevi iz tal genetski potencial za razgradnjo testiranih substratov, vendar ne dosežejo dovolj visoke celične gostote, da bi lahko to zaznali na ECOploščah. To so potrdila tudi opažanja Verschuereja in sod. (1997), pri katerih nekateri sevi prav tako niso dali pozitivnega odziva na Biolog ECOploščah pri nizkih gostotah ($\pm 10^4$ CFU/ml), medtem ko je bil pri višjih gostotah razvoj vzorca opazen. Po drugi strani pa Verschuere in sod. (1997) ugotavljajo, da je za pozitivno reakcijo zadoščalo že manj kot 10 CFU na jamico. Navajajo, da je v praksi težko zagotoviti gostoto inokulov, kakršno zahteva proizvajalec (10^8 CFU/ml), saj okoljski vzorci pogosto ne dosežejo tako visoke gostote. Mogoče je, da inokulacija vzorcev nizkih gostot (manj od 10^4 CFU/ml) zahteva visoko rast inokuliranih bakterij, preden pride do razvoja barve, kar še poveča prednost hitro rastočih sevov. Posledično tovrstni sevi k vzorcu celotne združbe prispevajo več, kot bi bilo pričakovati iz same sestave združbe.

Število razgrajenih substratov v združbi HC-tal pada z redčitvijo. Že zaradi gojenja na ploščah pride do spremembe razmerij in prilagoditve sevov na izbrano gojišče. Pri hitro rastočih združbah 1. meseca lahko zaznamo tudi vpliv negativnih interakcij, saj število razgrajenih substratov z manjšanjem izhodiščne združbe naraste, in je metabolni potencial 56 izolatov (redčitev 10^{-4}) podoben potencialu izhodiščne združbe tal redčitve 10^{-3} . Torej so hitro rastoči in najbolj pogosti sevi zmožni rasti na ploščah odgovorni za razgradnjo večine substratov na Biolog ECOplošči, kar za počasi rastoče seve ne velja, saj ti tudi po večmesečni inkubaciji niso uspeli razgraditi vseh substratov.

Smalla in sod. (1998) so ugotovili, da so v jamicah Biolog ECOplošč numerično dominantne hitro rastoče *γ -Proteobacteria*, in domnevali, da je to skupina, ki je najbolj odgovorna za opaženi vzorec razgradnje substratov. Nadalje so Verschuere in sod. (1997) ugotovili, da so bili na Biolog ECOploščah dominantni hitro rastoči sevi, četudi so bili v izhodiščni združbi, sestavljeni iz treh sevov, zastopani le 10-odstotno. Pokazali so tudi, da

je aktivnost počasi rastočih članov združbe delno maskirala aktivnost ostalih. Obstaja nekaj dokazov, da na razvoj vzorca Biolog testov vpliva že omejeno število sevov. Heuer in sod. (1995) menijo, da lahko k tvorbi vzorca prispevajo samo hitro rastoče bakterije, ne pa tudi oligotrofne, ki so zmožne rasti na trdnih gojiščih (aerobne heterotrofne), kar naredi ta pristop neobčutljiv za detekcijo strukturnega premika.

Postavlja se vprašanje, ali so substrati, vključeni v Biolog ECOplošče, primerni substrati za vse talne bakterije, saj vsi substrati niso nujno ekološko relevantni in po vsej verjetnosti ne odsevajo diverzitete substratov, ki jih najdemo v okolju (Braun in sod., 2006). Po drugi strani pa združbe drugega in tretjega meseca številnih substratov niso uspele razgraditi, kar kaže, da imajo sevi iz počasneje rastočih združb ožjo prehransko nišo, kar je nasploh značilno za K-stratege.

V primerljivi študiji, ki so jo izvedli Chazarenc in sod. (2010), so na sestavljenem mokrišču inkubirali različne mikrobne združbe v odvisnosti od štirih spremenljivk. Želeli so osvetliti najpomembnejši faktor, ki bi pojasnil raznolikost v razgradnji substratov med mikrobnimi združbami. S PCA-analizo so ugotovili, da je bilo mogoče le majhen del variance podatkov pripisati globini vzorčenja in pa starosti mokrišča, saj so se profili Biolog ECOplošč razlikovali večinoma glede na čas vzorčenja (pojasni 61 % variance podatkov). Vzorci, ki so jih odvzeli v toplejših periodah, so dali večje število pozitivnih odzivov na Biolog ECOploščah v povezavi s prvo PCA-komponento kot pa vzorci, ki so jih odvzeli jeseni in pozimi. Ta vzorec pojasnjujejo z zmanjšano aktivnostjo več bakterijskih vrst v hladnejših pogojih. V naši študiji pa smo ugotovili najmočnejšo povezavo PCA-komponente 1 s časom retardacije, ki je glede na FOR-model (Ishikuri in Hattori, 1997) prav tako povezan z aktivnostjo združbe oz. posameznih sevov, ki jo sestavljajo. Iz tega lahko sklepamo, da smo s spremembo pogojev gojenja (revno gojišče, podaljšan čas izrasti itd.) omogočili namnožitev tistega dela populacije, ki bi ga lahko glede na faktor λ opisali kot stradajočega in počasi rastočega. Po tem, da so sevi, ki so prej za izrast na plošči potrebovali 2–3 mesece, po večkratnem precepljanju kolonije uspeli tvoriti veliko prej (v 14 dneh), lahko sklepamo, da je pri teh sevih prišlo tudi do spremembe aktivnosti. Prav tako smo verjetno z ločenim gojenjem na Biolog ECOploščah in predhodno namnožitvijo do višje celične gostote tem sevom omogočili razgradnjo

substratov, ki jih znotraj celotne združbe zaradi hitrejše rasti r-strategov ne bi uspeli razgraditi.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Ekološka diverziteta, raznolikost in pogostost vrst v različnih habitatih in združbah, je ena glavnih tem ekologije. Je uporaben indikator blagostanja ekosistema, a njena vloga v ekosistemu še ni popolnoma pojasnjena (Franklin in sod., 2001).

Metode gojenja na ploščah imajo še vedno pomembno vlogo v študiji bakterijske biodiverzitete (Hattori, 1987, Janssen, 2002). Čeprav v mikrobni ekologiji trenutno prevladujejo molekularne metode, ostaja izolacija mikroorganizmov na trdnih gojiščih najboljša pot do povezovanja taksonomske in metabolne diverzitete organizmov (Lebaron in sod., 1998).

Razkorak med skupnim številom mikroorganizmov in rezultatom štetja na plošči je v precejšnji meri posledica nepopolnih tehnik gojenja na ploščah, ki ne omogočajo pridobitve vseh v tleh prisotnih bakterij. Od gojenja neodvisne molekularne metode so v zadnjih dveh desetletjih omogočile vpogled v sestavo mikrobnih združb v kompleksnih okoljih, vendar je neverjetna raznolikost mikrobnega sveta zakladnica, ki jo še vedno slabo poznamo. Strokovnjaki zadnje čase poudarjajo, da bo za razumevanje principov mikrobne ekologije in metabolne raznolikosti mikrobnih združb v kompleksnih okoljih nujno gojiti čim večji delež združb tudi v laboratorijih. Osamitev mikroba iz okolja nam namreč omogoča natančno preučevanje njegove fiziologije in ugotavljanje povezav med taksonomsko in metabolno diverziteto mikroorganizmov. Albrecht in sod. (2010), cit. po Chroni in sod. (2009), poudarjajo, da je tradicionalni mikrobiološki pristop še vedno učinkovit, saj mikroorganizmov ne moremo hkrati odkrivati z molekularnimi in z od gojenja na ploščah odvisnimi metodami, in da sta torej pristopa komplementarna. Vendar ta korak ne bo enostaven, saj znamo danes v laboratoriju gojiti le majhen delež mikroorganizmov iz okolja, največ 1–10 % (Torsvik, Øvreas in sod., 2002, Stres in Tiedje, 2006).

V pričujočem delu smo preučevali odnos med časom izrasti izolatov na trdnem gojišču in morfološko raznolikostjo, bogatostjo in enakomernostjo gojene združbe. Predpostavili

smo, da bo čas izrasti kolonije vplival na morfološko sestavo ter metabolni potencial vzgojene združbe. Pričakovali smo, da se bodo izrasle združbe razlikovale tako vzdolž časovnega kot tudi redčitvenega gradienta.

Naši rezultati kažejo, da smo iz visoko organskih tal nizkega barja na ploščah uspeli vzgojiti 12,4 % prešteti celic v tleh. Čas izrasti je vplival na višje število na ploščah dobljenih sevov, saj je zaradi podaljšanega časa inkubacije ($\text{čas} > 4$ tedni) kolonijo uspelo tvoriti 30 % sevov več, kot bi jih vzgojili do 4. tedna. Prav tako smo z višanjem redčitve opazili naraščanje števila izolatov zmožnih izrasti na ploščah.

Na osnovi lomov CFC smo določili 2 osnovni ekokolekciji, in sicer hitro rastoče r-strategie (rast do 4. tedna inkubacije), ki jih je bilo 70 %, in počasi rastoče K-strategie, ki jih je bilo 30 % in so tvorili kolonije po več kot 4 tednih. Meritve faktorja λ pa nam kažejo, da je v vegetativni fazi zares samo populacija celic, izraslih po 1 tednu inkubacije, ostale pa so v fazi mirovanja, kar pomeni, da gre za stradajoče celice.

Ugotovili smo, da metabolna raznolikost pada s časom izrasti združbe. Morfološko drevo, skonstruirano na podlagi opisov morfotipov, lahko razloži povezavo skupin, ločenih glede na retardacijski čas in morfologije z 48 koraki. Verjetnost, da bi tako drevo nastalo po naključju, je manjša ali enaka 0,003 (p nižji od 0,005), iz česar sledi, da sta morfologija in združbe, ločene glede na retardacijski čas, povezani spremenljivki.

Na splošno mikrobne združbe v tleh Ljubljanskega barja kažejo veliko morfološko raznolikost in bogatost, ki padata z retardacijskim časom, enakomernost porazdelitve vzdolž inkubacijskega časa pa ostaja relativno konstantna.

Z analizo glavnih komponent (PCA-analiza) smo potrdili, da je retardacijski čas glavni dejavnik, ki vpliva na metabolni potencial. Nadalje je metabolni potencial odvisen od časa inkubacije, kar velja za skonstruirane združbe s časom retardacije 1 in 2 mesecev, in od redčitve, pri sevih s časom retardacije 3 mesecev, medtem ko metabolni potencial referenčne združbe HC-tal jasno pada z redčitvijo vzorca.

Rezultati te študije bodo uporabni pri načrtovanju prihodnjih raziskav, saj zmožnost ustvarjanja naravnih združb, ki se razlikujejo po kompleksnosti, raziskovalcem omogoča, da upravljajo z diverziteto – morda celo v kvantitativnem smislu –, medtem ko ocenjujejo

njen odnos do drugih lastnosti združbe (stabilnost, podvrženost invaziji ali funkcijo ekosistema).

6.2 SUMMARY

Ecological diversity, richness and frequency of species in different habitats and communities, is one of the central themes of ecological studies. It is a useful indicator of the well-being of an ecosystem; however, its role in the ecosystem has not yet been fully studied (Franklin et al., 2001).

Culturing methods still play an important role in the study of bacterial diversity (Hattori, 1987, Janssen, 2002). Although molecular methods in microbial ecology currently dominate, isolation of microorganisms on solid media remains one of the main routes towards linking taxonomy with the metabolic diversity of organisms (Lebaron et al., 1998). The gap between the total number of microorganisms and the numbers of microorganisms obtained by plate counting is to a large extent caused by imperfect cultivation techniques that do not allow us to obtain all bacteria present in soil.

Cultivation-independent studies in the last two decades have offered us some insight into the composition of microbial communities in complex environments, but the incredible diversity of microbial world is still poorly understood.

Recent efforts of microbiologists accentuate that in order to understand the principles of microbial ecology and the metabolic diversity of microbial communities in complex environments, we need to cultivate a larger portion of microorganisms in the laboratory. Isolation of microbes in the environment enables us to study their physiology and to determine the relationships between the taxonomic and metabolic diversity of microorganisms. Albrecht et al. (2010), cit. Chroni et al. (2009), emphasize that the traditional microbiological approaches are still effective, as microorganisms cannot be detected simultaneously with both molecular methods and cultivation-dependent methods on plates, and that therefore the two approaches are complementary. However, this step will not be easy, as we are currently only able to grow approximately 1–10 % of environmental microorganisms in the laboratory (Torsvik, Øvreas et al., 2002, Stres and Tiedje, 2006).

In the present work we studied the relationship between the retardation time of isolates on solid medium and the morphological diversity, evenness and richness. We have assumed that the prolonged incubation time will affect the regrowth of colony morphology, and

metabolic diversity. We expected that the outgrown communities will also differ along the dilution gradient.

Our results indicate that on highly organic soils of low moors we managed to cultivate 12.4 % of counted cells in the soil. We have also seen increasing numbers of culturable isolates with the increase of dilution.

Results indicated that 70 % formed colonies in the first four weeks and were classified as fast growers, while the remaining 30 % that formed colonies in the second and third month of incubation were classified as slow growers. According to factor λ , only communities of the 1st week of incubation time were in the vegetative phase; all communities grown after the 1st week were in the dormant phase. Richness and diversity (as defined by the Shannon diversity index) decreased with retardation time. Fast-growing morphotypes were more similar to each other than to the slow-growing morphotypes, which had less pigmented colonies. The morphology tree constructed on the basis of morphotype descriptions can explain the connection of different retardation time communities and morphology with 48 steps. The probability that the tree would be a coincidence is less or equal 0,003 (p lower than 0,005), from which we can infer that morphology and retardation time communities do covary.

With PCA analysis, we confirmed that retardation time is the main factor affecting metabolic potential. In the case of communities with the retardation time of 1 or 2 months, the metabolic potential was also influenced by incubation time; however, dilution was the most important factor affecting 3rd month communities. The reference HC-community, on the other hand, was more affected by dilution, as the number of degraded substrates decreased with increased dilution.

The results of this study will be useful in planning future research, as the ability to create natural communities, which vary in complexity, will allow researchers to evaluate other properties of communities such as stability, susceptibility to invasion or ecosystem function.

7 SKLEPI

Število sevov, zmožnih izrasti na ploščah, znaša 12,4 % prešteti celic v tleh. Zaradi podaljšane časa inkubacije (čas > 4 tedni) je kolonijo uspelo tvoriti 30 % sevov več, kot bi jih vzgojili do 4. tedna, kar pomeni, da število kolonij v odvisnosti od časa inkubacije narašča.

Na osnovi lomov CFC smo določili 2 osnovni ekokolekciji, in sicer hitro rastoče r-stratege, ki jih je bilo 70 % in so izrasli na ploščah v prvih štirih tednih, in počasi rastoče K-stratege, ki jih je bilo 30 % in so tvorili kolonije po več kot 4 tednih. Izračun faktorja λ pa nam kaže, da je v vegetativni fazi zares samo populacija celic, izraslih po 1 tednu inkubacije, ostale pa so v fazi mirovanja.

Mikrobne združbe v tleh Ljubljanskega barja kažejo veliko morfološko raznolikost in bogatost, ki padata z retardacijskim časom, enakomernost porazdelitve vzdolž inkubacijskega časa pa ostaja relativno konstantna.

Morfološko drevo, skonstruirano na podlagi opisov morfotipov, lahko razloži povezavo skupin, ločenih glede na retardacijski čas in morfologije, z 48 koraki. Verjetnost, da bi naključno drevo razložilo povezavo z 48 koraki, je manjša ali enaka 0,003 (p nižji od 0,005) iz česar sledi, da sta morfologija in združbe, ločene glede na retardacijski čas, povezani spremenljivki. Test hi-kvadrat in t-test pa nam za 23/35 opisov morfotipa potrdita povezavo morfologije in časovnih skupin.

S pomočjo PCA-analize smo potrdili, da je retardacijski čas najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na metabolno raznolikost za združbe vseh časov retardacije (pojasni 59 % variance podatkov), za referenčno združbo iz HC-tal pa je to redčitev, saj število razgrajenih substratov referenčne združbe pada z višanjem redčitve. Najpomembnejši dejavnik ločevanja znotraj posameznih časovnih združb 1. in 2. meseca je čas inkubacije, znotraj združb 3. meseca pa redčitev.

8 LITERATURA

Albrecht R., Perissol C., Ruauudel F., Le Petit J., Terrom G., 2010. Functional changes in culturable microbial communities during a co-composting process: carbon source utilization and co-metabolism. *Waste management*, 30: 764–770

Alvarez V.G., Teal T.K., Schmidt T.M., 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *The ISME Journal*, 3: 1314–1317

Andrén O., Balandreau J., 1999. Biodiversity and soil functioning – from black box to can of worms? *Applied soil ecology*, 13: 105–108

Atlas R.M., Bartha R., 1997. *Microbial Ecology*, 4th edition. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA: 694 str.

Ausec L., Kraigher B., Mandić-Mulec I., 2009. Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soil. *Soil biology and biochemistry*, 41: 1874–1881

Bakken L.R., 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 238–245

Biolog Ecoplate™, Microbial community analysis. *eco_microplate_sell_sheat*. http://www.biolog.com/pdf/eco_microplate_sell_sheet.pdf (3. februar 2011).

Bone, T.L., Balkwill D.L., 1988. Morphological and cultural comparison of microorganisms in surface soil and subsurface sediments at a pristine study site in Oklahoma. *Microbiology Ecology*, 16: 49–64

Braun B., Boeckelmann U., Grohmann E., Szewzyk U., 2006. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture dependent methods. *Applied Soil Ecology*, 31: 267–279

Buesing N., Gessner M.O., 2002. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms.

Aquatic Microbial Ecology, 27: 29–36

Chin K.-J., Hahn D., Hengstmann U., Liesack W., Janssen P.H., 1999. Characterization and Identification of Numerically Abundant Culturable Bacteria from the Anoxic Bulk Soil of Rice Paddy Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 11: 5042–5049

Chazarenc F., Brisson J., Merlin G., 2010. Seasonal and spatial changes of microorganism communities in constructed Wetlands: A community Level Physiological Profiling Analysis. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010: 6 str.

Classen A.T., Boyle S.I., Haskins K.E., Overby S.T., Hart S.C., 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubational temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology ecology*, 44: 319–328

Connon S.A., Giovannoni S.J., 2002. High-throughput methods for cultivating microorganisms in very-low nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 3878–3885

Conrad R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases. *Microbiological Reviews* 60: 609–640

Davis K.E.R., Joseph S.J., Janssen P.H., 2005. Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2: 826–834

Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Vojvodic-Vukovic M., 2000. Decreases in organic C reserves in soil can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 189–196.

Degens, B.P., Harris J.A., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1309–1320.

Dobson M., Frid. E., 1998. Ecology of aquatic systems. Essex, Addison Wesley Longman

Limited: 222 str.

Duffose L., 2006. Microbial production of food grade pigments. *Food technology and Biotechnology*, 44, 3: 313–321

Dumont M.G., Murrell J.C., 2005. Stable isotope probing – linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 499–504.

Dykhuizen D.E., 1998. Why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 25–33

Ellery W.N., Schleyer M.H., 1984. Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 15: 247–250

Elshahed M.S., Youssef N.H., Spain A.M., Sheik C., Najar F.Z., Sukharnikov L.O., 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5422–5428.

Faegri A., Torsvik V.L., Goksöyr J., 1977. Bacterial and fungal activities in soil: Separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry* 9, 105–112.

Ferrari B.C., Tujula N., Stoner K., Kjelleberg S., 2006. Catalyzed Reporter Deposition – Fluorescence In Situ Hybridization Allows for Enrichment-Independent Detection of Microcolony-Forming Soil Bacteria *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 918–922

Ferrari B.C., Binnerup S.J., Gillings M., 2005. Microcolony Cultivation on a Soil Substrate Membrane System Selects for Previously Uncultured Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8714–8720

Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88: 1354–1364.

Forney L.J., Zhou X., Brown C.J., 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current opinion in Microbiology*, 7: 210–220

Franklin B. R., Garland J.L., Bolster C.H., Mills A.L., 2001. Impact of Dilution on Microbial Community structure and Functional potential: Comparison of Numerical Simulations and Batch Culture Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2: 702–712

Fulthorpe R.R., Roesch L.F., Riva A., Triplett E.W., 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME Journal*, 2: 901–910.

Gans J., Wolinsky M., Dunbar J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390.

Garland J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 289–300.

Garland J.L., Mills A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2351–2359

Giller P.S., 1984. *Community Structure and the Niche*. Chapman and Hall, London: 186 str.

Gomez E., Garland J.L., Roberts M.S., 2004. Microbial structural diversity estimated by dilution-extinction of phenotypic traits and T-RFLP analysis along a land-use intensification gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 2: 253–259

Greve G.D., Boivin M.-E.Y., Schmitt H., Breure T.M., Van Liere B.M. Rutgers M. Optimisation of the analysis of community-level physiological profiles. Manuscript in preparation.

Halderman D.L., Amy P.S., 1993. Diversity within Colony Morphotype: Implications for ecological research. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 933–935.

Harris J., 2009. Soil microbial communities and restoration ecology: Facilitators or followers? *Science*, 325: 573–574

Hattori T., Mitsui H., Haga. H., Wakao N., Shikano S., Gorlach K., Yasuhiro K., El-Beltagy A., Hattori R., 1997. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72: 21–28

Hattori, T., 1985. Kinetics of colony formations of bacteria: An approach to the basis of the plate count method. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.*, 34: 1–36

Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3233–3241

Hugenholtz P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3, 2: 0003.1–0003.8

Insam H., Rangger A., 1997. *Microbial communities: Functional and Structural. Approaches* Springer, Berlin. 263 str.

Ishikuri S., Hattori T., 1987. Analysis of colony-forming curves of soil bacteria. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33: 355–362.

Janssen P., 2006. Identifying the dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16s rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 1719–1728

Janssen P., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M., 2002. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2391–2396

Jaspers E., Overmann J., 2004. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. *Applied and environmental microbiology*, 70, 8: 4831–4839

Jones R.T., Robeson M.S., Lauber C.L. Hamady M., Knight R., Fierer N., 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal* 3: 442–453

Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan C.A., Osborne C.A., Janssen P.H., 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 69, 12: 7210–7215

Käberlein T., Lewis K., Epstein S.S., 2002. Isolating »Uncultivable« Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296: 1127–1129

Kang S., Mills A.L., 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 121–125

Kepner R.L., Pratt J.R., 1994. Use of fluorochromes for a direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiology Reviews*, 58: 603–615

Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M., 2000. rRNA Operon Copy Number reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1328–1333

Kolter R., Greenberg E.P., 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, 441: 300–302

Köpke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H., 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7819–7830

Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., van Elsas J.D., Mandic-Mulec I., 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana marsh.

Soil Biology and Biochemistry, 38: 2762–2771

Lebaron P., Ghiglione J.-P., Fajon C., Batalier N., Normand P., 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. FEMS Microbiology Letters, 160 :137–143

Lin C.C., Casida L.E., Jr., 1984. Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 47: 427–429

Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F.D., Knight R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. Nucleic Acids Research, 35: 120–130.

Magurran A., 1988. Ecological diversity and its measurement. Croom Helm Limited, Cambridge University Press. 175 str.

Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K., 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. Annual Reviews of Microbiology, 49: 461–487.

Mills D.K., Entry J.A., Gillevet P.M., Mathee K., 2007. Assessing microbial community diversity using amplicon length heterogeneity polymerase chain reaction. Soil Science Society of America, 71: 572–578.

Mitsui H., Gorlach K., Lee. H., Hattori R., Hattori T., 1997. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. Journal of Microbiological Methods, 30: 103–110.

Morris C.E., Bardin M., Berge O., Frey-Klett P., Fromin H., Girardin H., Guinbretiere M.H., Lebaron P., Thiery J.M., Troussellier M., 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing primary scientific literature from 1975 to 1999. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66: 592–616.

Mummey D.L., Stahl P.D., 2003. Spatial and temporal variability of bacterial 16S rDNA-based T-RFLP patterns derived from soil of two Wyoming grassland ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 46: 113–120

Nakatsu, C.H., 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America*, 71: 562–571.

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 4: 655–670

Nessa K., Dilruba A., Islam J., Kabir Lutful F.M., Anowar Hossain M., 2007. Usefulness of a Multiplex PCR for Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* in a Diagnostic Microbiology Laboratory Setting. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, 1, 2: 38–42

Nunan N., Wu K., Young I.M., Crawford J.W., Ritz K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 203–215

Philippot L., Andersson S.G.E., Battin T.J., Prosser J.I., Schimel J.P., Whitman W.B., Hallin S., 2010. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 7: 523–529.

Podar M., Abulencia C.B., Walcher M., Hutchinson D., Zengler K., Garcia J.A., Holland T., Cotton D., Hauser L., Keller M., 2007. Targeted access to the genomes of low abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 10: 3205–3214

Prus T., 2000. Klasifikacija tal. Biotehniška fakulteta: <http://stari.bf.uni-lj.si/cpvo/Novo/PDFs/KlasifikacijaTal.pdf> (3. februar 2011)

Quince C., Curtis T.P., Sloan W.T., 2008. The rational exploration of microbial diversity. *ISME Journal*, 2: 997–1006.

Ranjard L., Richaume A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152, 8: 707–716

Rappé M.S., Giovannoni S.J., 2003. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369–394

Rasmussen L.D., Sørensen S.J., 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community on soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 1–9

Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*, 1: 283–290.

Rosello-Mora R., Amann R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39–67

Sait M., Hugenholtz P., Janssen P.H., 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*, 11: 654–661

Schloss P.D., Handelsman J. 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Computational Biology*, 2, 7: e92

Schönborn L., Yates P.S., Grinton B.E., Hugenholtz P., Janssen P.H., 2004. Liquid Serial Dilution Is Inferior to Solid Media for Isolation of Cultures Representative of the Phylum-Level Diversity of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4363–4366.

Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek M.H., Kirchmann H., Kandeler E., 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4215–4224.

Sharma R., Ranjan R., Kapadar R.K., Grover A., 2005. Unculturable bacterial diversity: an untapped resource. *Current Science*, 89, 1: 72–77

Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Tso Liu W., Forney L., 1998. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4: 1220–1225

Smibert R.M., Krieg N.R., 1994. Phenotypic characterization. V: Gerhardt P.P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (ur.). *Methods for general and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC, ZDA, str. 607–615

Solbrig O.T. (ur.), 1991. *From Genes to Ecosystems: A Research Agenda for Biodiversity*. Paris: IUBS. 128 str.

Stevenson B.S., Eichorst S.A., Wertz J.T., Schmidt T.M., Breznak J.A., 2004. New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 8: 4748–4755

Stres B., Tiedje J.M., 2006. New frontiers in Soil Microbiology: How to link Structure and function of Microbial Communities? 2006. *Soil Biology*, 8: 1–22

Suwa Y., Hattori T., 1986. Detection of proliferating bacteria in soil populations by the analysis of colony-forming curves. *Soil Science Plant Nutr.*, 33, 3: 511–515

Tada Y., Ihmori M., Yamaguchi J., 1995. Oligotrophic Bacteria Isolated from Clinical Materials. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2: 493–494

Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nomura N., Matsumura M., Kamagata Y., 2005. Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecular and Improved Cultivation-Based Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4: 2162–2169

Thies J.E., 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment polymorphisms. *Soil Science Society of America*, 71: 579–591

Tiedje J.M., 1994. Denitrifiers. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. str. 245–267

Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L., 1990. High diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 782–787

Torsvik V., Øvreås L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240–245

Van Elsas J.D., Van Overbeek L.S., 1993. Bacterial responses to soil stimuli. V: Kjelleberg S. (ur.). *Starvation in bacteria*. Plenum Press, New York, str. 55–79

Verschuere L., Dhont J., Sorgeloos P., Verstraete W., 1997. Monitoring Biolog patterns and r/K strategists in the intensive culture of *Artemia juvenilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 603–612

Verschuere L., Fievez V., Van Voren L., Verstraete W., 1997. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 353–362

Witzingerode F.W., Goebel U.B., Stackebrandt E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213–229

Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1101–1108

Zdanowski M.K., Weglenski P., 2001. Ecophysiology of soil bacteria in the vicinity of Henryk Arctowski Station, King George Island, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 819–829

Lešnjak M. Osamitev in morfološka karakterizacija mikroorganizmov iz tal Ljubljanskega barja.
Magistrsko delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2012

Zengler K., Toledo G., Rappé M., Elkins J, Mathur E.J., Short J.M., Keller M., 2002
Cultivating the uncultured. PNAS, 99, 24: 15681–15686

Lešnjak M. Osamitev in morfološka karakterizacija mikroorganizmov iz tal Ljubljanskega barja.
Magistrsko delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2012

PRILOGE

Priloga A: Priraščanje novih kolonij za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} v odvisnosti od časa izrasti na POL-gojišču. Prikazani so povprečja in standardni odkloni meritev, preračunani iz štirih različnih vrednosti znotraj treh časovnih enot.

MESEC RASTI	1. mesec		2. mesec		3. mesec	
	povprečje	stand.odklon	povprečje	stand.odklon	povprečje	stand.odklon
REDČITEV 10^{-3}	188	19,1	241	14,1	265	10,8
REDČITEV 10^{-4}	63	15,8	94	8,8	107	8,8

Priloga B: Število kolonij iz različnih redčitev na POL-gojišču v odvisnosti od časa izrasti.

REDČITEV/TEDEN	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12
redčitev 10^{-3}	165,75	184,25	201,75	211	229,5	244,25	254,25	257,5	265,5	281	290,25
redčitev 10^{-4}	42,5	58,75	72,5	77,5	86	89,75	94,75	98,25	104	108,5	110,75
redčitev 10^{-5}	7,75	14,75	20	22	24,5	25	25,5	26,75	27,25	28	28
redčitev 10^{-6}	2,75	2,75	4,25	5,5	6	6,75	6,75	7	7	7,25	7,25

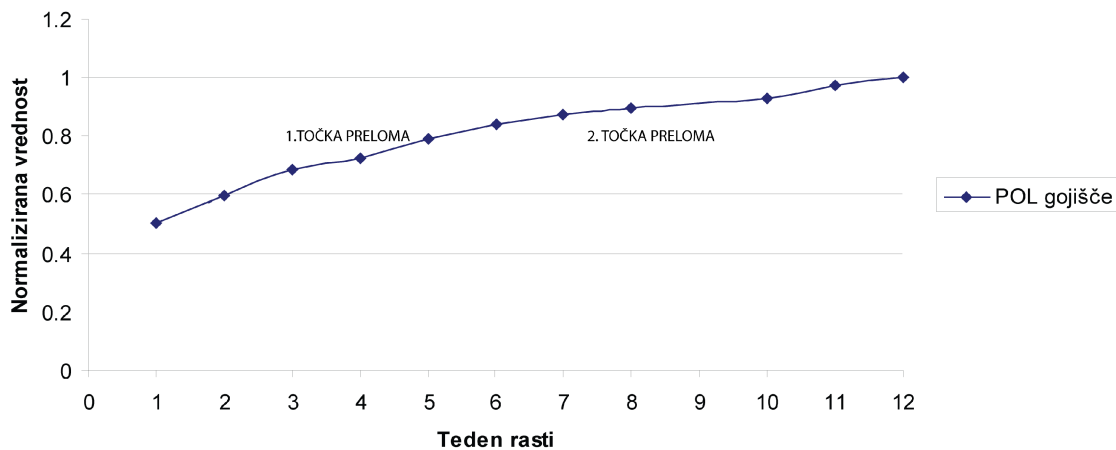
Priloga C: CFC-krivulje za odvisnost števila kolonij od redčitve in časa rasti za POL-gojišče. Vrednost v vsaki časovni točki intervala 12 tednov je izračunana kot razmerje med številom v časovni točki izraslih kolonij in končnim številom kolonij.

TEDEN/REDČITEV	redčitev 10^{-3}	redčitev 10^{-4}	redčitev 10^{-5}	redčitev 10^{-6}
1	0,57155	0,38371	0,27678	0,37931
2	0,63534	0,53047	0,52678	0,37931
3	0,6931	0,65462	0,71428	0,5862
4	0,72758	0,69977	0,78571	0,75862
5	0,79137	0,77652	0,875	0,82758
6	0,84224	0,80812	0,89285	0,93103
7	0,87672	0,85553	0,91071	0,93103
8	0,88706	0,88713	0,95535	0,96551
10	0,91551	0,94545	0,99107	0,96551
11	0,96896	0,97516	1	1
12	1	1	1	1

Priloga D: Podatki za normalizirano vrednost – število kolonij, izraslih do določenega tedna, proti številu vseh izraslih kolonij na POL-gojišču v inkubacijskem času 12 tednov. Prikazane so vrednosti za vse štiri redčitve skupaj.

TEDEN IZRASTI	POL-gojišče –normalizirana vrednost
1	0,500858
2	0,596913
3	0,684391
4	0,724414
5	0,793025
6	0,839337
7	0,874786
8	0,894225
10	0,926815
11	0,973699
12	1

Priloga E: CFC-krivulja – normalizirane vrednosti števila kolonij: število kolonij, izraslih do določenega tedna, proti številu vseh izraslih kolonij na POL-gojišču v inkubacijskem času 12 tednov (upoštevane vse redčitve od 10^{-3} do 10^{-6}).



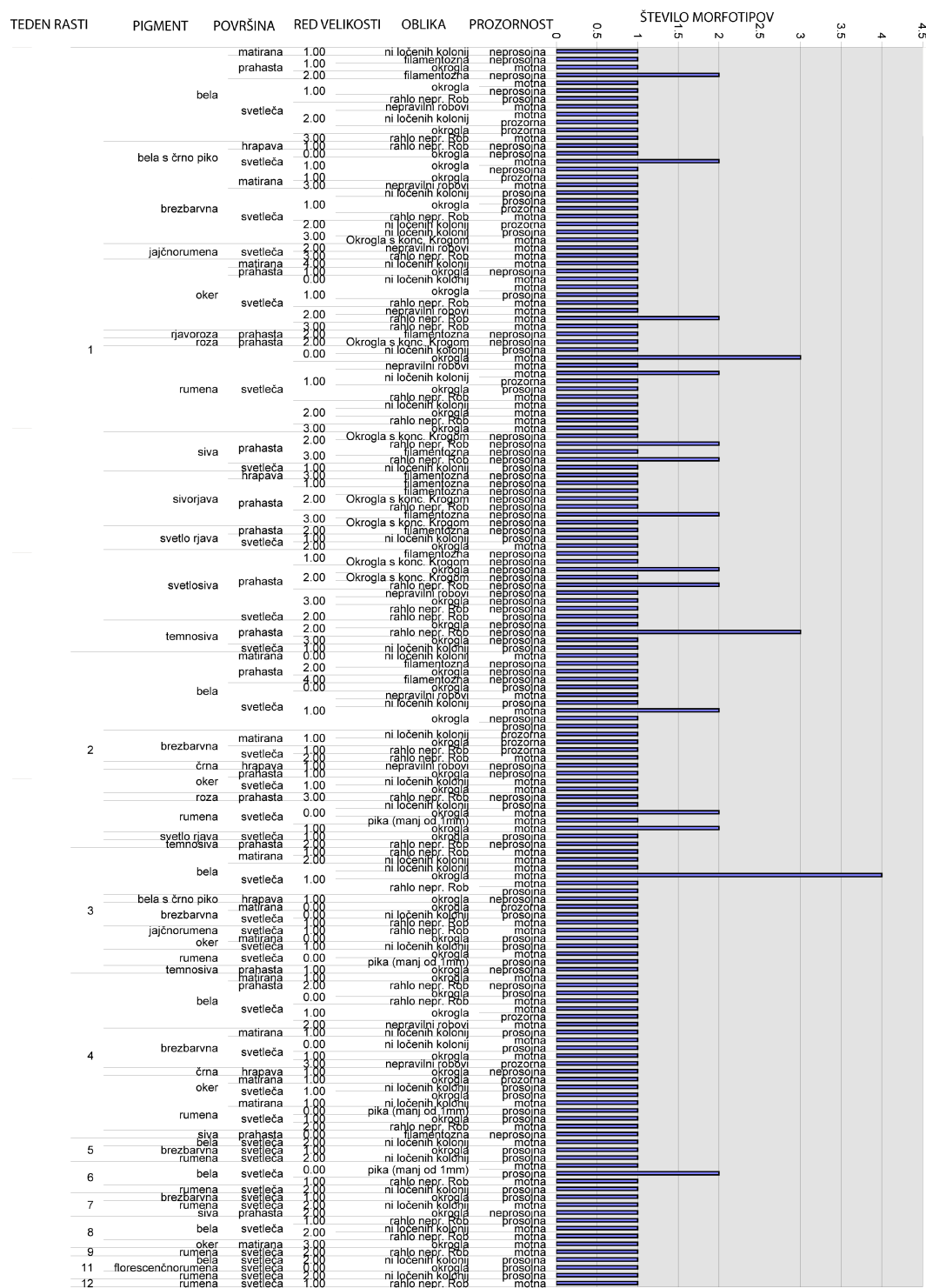
Priloga F: Preglednica za hipotetične krivulje za vrednosti števila kolonij po 1. tednu in ekstrapolirane za vsako redčitev posebej. Podatki, ki so osnova za izračun hipotetičnih krivuj, so podatki po 1. tednu rasti, ki so v tabeli prikazani s krepkim tiskom.

REDČITEV/ŠT. KOLONIJ	POL 10 ⁻³ hip	POL 10 ⁻⁴ hip	POL 10 ⁻⁵ hip	POL 10 ⁻⁶ hip	PRAVA
POL 0,001	165,75	425	775	2250	165,75
POL 0,0001	16,57	42,5	77,5	225	42,5
POL 0,00001	1,65	4,25	7,75	22,5	7,75
POL 0,000001	0,16	0,425	0,775	2,25	2,25

Priloga G: Hipotetične krivulje za vrednosti števila kolonij po 12. tednu in ekstrapolirane za vsako redčitev posebej.

REDČITEV/ŠT. KOLONIJ	POL 10 ⁻³ hip.	POL-10 ⁻⁴ hip.	POL-10 ⁻⁵ hip.	POL-10 ⁻⁶ hip.	PRAVA
1,000000E-03	290,25	1107,5	2800	7250	290,25
1,000000E-04	29,025	110,75	280	725	110,75
1,000000E-05	2,9025	11,075	28	72,5	28
1,000000E-06	0,2905	1,1075	2,8	7,25	7,25

Priloga H: Prikaz morfotipov izolatov na POL-gojišču v časovnem obdobju 12 tednov na podlagi 5 opisnih lastnosti – pigment, površina, oblika, red velikosti, prozornost – z ozirom na teden rasti. Levi del skale prikazuje oznake morfotipa, desni pa število izolatov z zapisano kombinacijo lastnosti - prikazuje enake morfotipe skupaj. Morfotipi so določeni opisno. Graf je narejen v programu Microsoft Access.



[illegible]

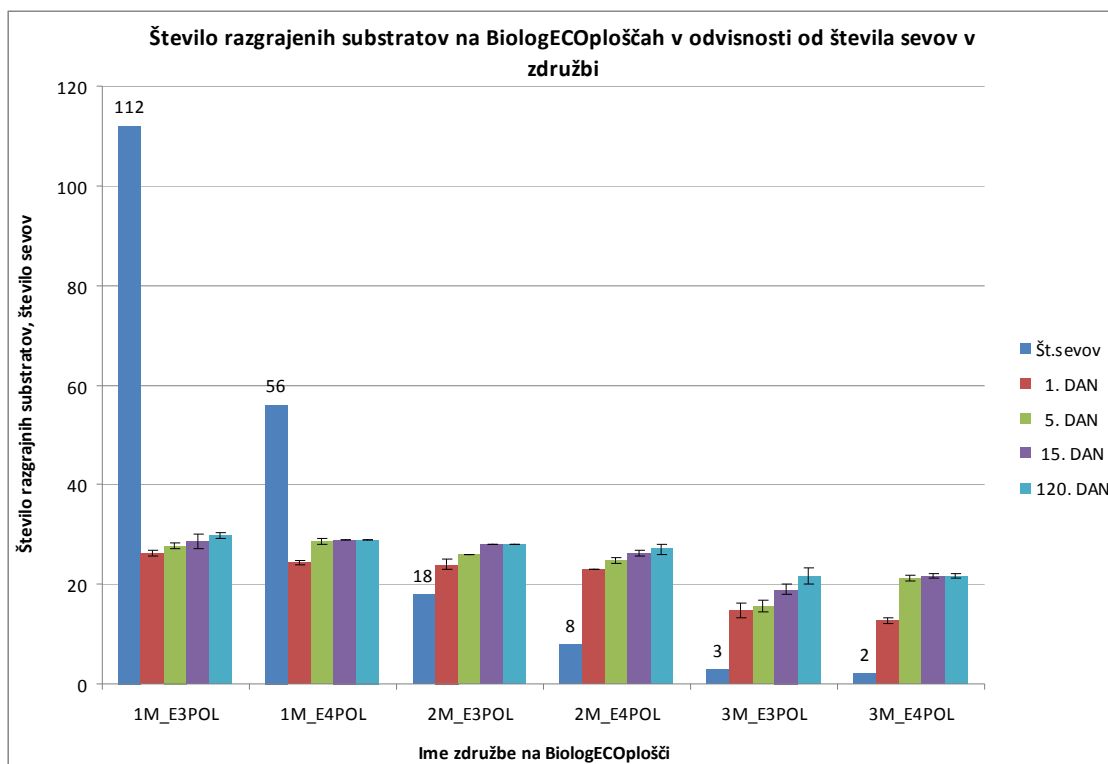
Priloga J: Nasičenost (bogatost) prikazuje število različnih morfotipov v 3 časovnih obdobjih. Prikazani so povprečno število na novo izraslih različnih morfotipov v vsakem tednu rasti treh ponovitev ter povprečja kolonij v 1., 2. in 3. mesecu za redčitev 10^{-3} , saj je bilo le v tej redčitvi dovolj kolonij za izračun napake. V 9. in 10. tednu ni bilo prirasta kolonij. Raznolikost v odvisnosti od časa izrasti za POL-gojišče. Prikazani so raznolikost morfotipov v vsakem tednu rasti in njihova povprečja ter standardni odkloni za 1., 2. in 3. mesec. Enakomernost v odvisnosti od časa izrasti za POL-gojišče. Prikazani so enakomernost morfotipov v vsakem tednu rasti in njeno povprečje in standardni odklon za 1., 2. in 3. mesec.

Čas (teden)	<u>Bogatost</u> (richness)	povprečje	stand. odklon	<u>raznolikost</u>	povprečje	stand. odklon	<u>enakomernost</u>	enak. povprečje	stand. odklon
1	43	20.8	14.9	3.7	2.7	0.6	1.0	1.0	0.06
2	16			2.4			0.9		
3	12			2.5			1.0		
4	12			2.5			1.0		
5	2	2.8	0.0	0.7	0.9	0.3	1.0	1.0	3.64E-05
6	2			0.7			1.0		
7	4			1.4			1.0		
8	3						1.0		
9					0.3	0.5			
10									
11	2	1.5	0.7	0.7			1.0	0.5	0.7
12	1			0			0		

Priloga K: Število substratov na Biolog ECoPloščah v odvisnosti od retardacijskega časa. Število substratov je povprečje treh meritev s podano standardno deviacijo. Funkcionalna raznolikost (v %) označuje odstotek vseh razgrajenih substratov (od 31), prikazana je v odvisnosti od časa za različne skonstruirane združbe, razvrščena pa po času inkubacije.

IME ZDR.NA plošči	1. DAN	ST. DEV.	FUN. R. (%)	5. DAN	ST. DEV.	FUN. R. (%)	15. DAN	ST. DEV.	FUN. R (%)	120. DAN	ST. DEV.	FUN. R. (%)
1M_E3POL	26,3	0,6	84,90 %	27,7	0,6	89,20 %	28,7	1,5	92,50 %	29,7	0,6	95,70 %
1M_E4POL	24,3	0,6	78,50 %	28,7	0,6	92,50 %	29	0	93,50 %	29	0	93,50 %
1M_ESPOL	16,7	1,2	53,80 %	23,3	0,6	75,30 %	26,7	0,6	86,00 %	26,3	0,6	84,90 %
1M_E6POL	19	1,7	61,30 %	29	0	93,50 %	29	0	93,50 %	30	0	96,80 %
2M_E3POL	24	1	77,40 %	26	0	83,90 %	28	0	90,30 %	28	0	90,30 %
2M_E4POL	23	0	74,20 %	24,7	0,6	79,60 %	26,3	0,6	84,90 %	27	1	87,10 %
3M_E3POL	14,7	1,5	47,30 %	15,7	1,2	50,50 %	19	1	61,30 %	21,7	1,5	69,90 %
3M_E4POL	12,7	0,6	40,90 %	21,3	0,6	68,80 %	21,7	0,6	69,90 %	21,7	0,6	69,90 %

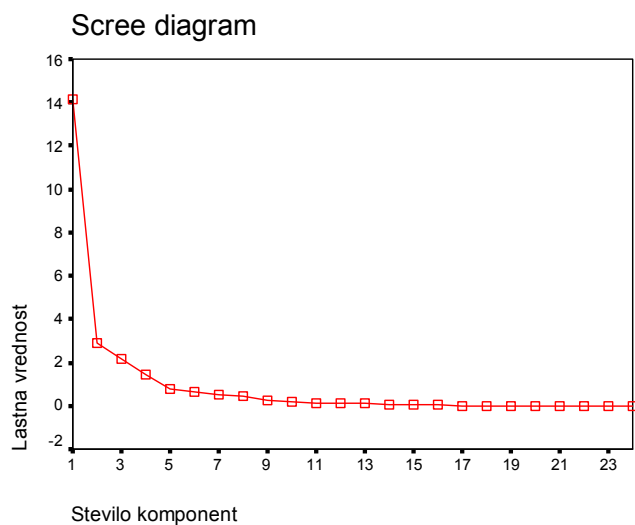
Priloga L: Število razgrajenih substratov na Biolog ECoPloščah v odvisnosti od števila sevov v združbi.



Priloga M: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov predtest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov vseh časov retardacije.

Kaiser-Meyer-Olkinov predtest.		,694
Bartlettov test sferičnosti	Povp. vredn. Hi-kvadrat	419,641
	df (stopinje prostosti)	55
	Stopnja značilnosti.	,000

Priloga N: Scree diagram za združbe vseh časov retardacije.



Priloga O: Celokupna pojasnjena varianca za združbe sevov vseh časov.

	Lastne vrednosti (Initial Eigenvalues)		
Komponente	Skupaj	% Variance	Kumulativa %
1	14,117	58,821	58,821
2	2,888	12,033	70,854
3	2,201	9,171	80,026
4	1,416	5,898	85,924
5	,749	3,123	89,046
6	,669	2,786	91,832
7	,539	2,245	94,077
8	,445	1,856	95,932
9	,239	,994	96,927
10	,213	,889	97,815
11	,141	,589	98,404
12	,137	,569	98,973
13	9,397E-02	,392	99,365
14	5,701E-02	,238	99,602
15	5,496E-02	,229	99,831
16	3,270E-02	,136	99,968
17	6,802E-03	2,834E-02	99,996
18	9,846E-04	4,102E-03	100,000
19	1,207E-15	5,029E-15	100,000
20	1,749E-16	7,286E-16	100,000
21	1,194E-16	4,975E-16	100,000
22	6,861E-18	2,859E-17	100,000
23	-3,629E-17	-1,512E-16	100,000
24	-5,600E-16	-2,333E-15	100,000

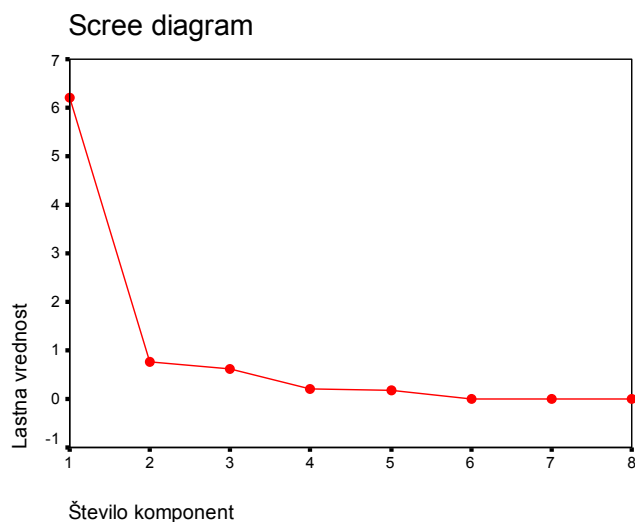
Priloga P: Komponentna matrika za združbe vseh časov inkubacije.

Ime združbe	Komponenta 1	Komponenta 2
M2E3D15	,902	-,282
M2E3D120	,902	-,282
M2E4D120	,884	-1,120E-02
M2E4D15	,880	-2,773E-02
M1E4D5	,875	-,407
M2E3D5	,871	5,646E-02
M1E3D15	,868	-,389
M1E3D5	,829	-,216
M2E4D5	,825	5,175E-02
M1E3D1	,823	2,660E-02
M2E3D1	,814	6,850E-02
M1E4D15	,801	-,444
M1E4D120	,801	-,444
M1E3D120	,728	-,440
M3E4D120	,726	,512
M3E4D15	,726	,512
M3E4D5	,722	,520
M2E4D1	,715	2,399E-02
M1E4D1	,710	-8,667E-02
M3E3D120	,654	,385
M3E3D15	,565	,435
M3E3D1	,536	,517
M3E3D5	,533	,491
M3E4D1	,479	,343

Priloga R: Celokupna pojasnjena varianca za združbe sevov 1. meseca izrasti redčitev 10^{-3} , 10^{-4} .

Komponenta	Lastna vrednost (Initial Eigenvalues)	% Variance	Kumulativa %
1	6,216	77,696	77,696
2	,752	9,405	87,101
3	,615	7,684	94,785
4	,220	2,750	97,535
5	,185	2,311	99,846
6	1,233E-02	,154	100,000
7	2,240E-16	2,800E-15	100,000
8	-1,534E-16	-1,918E-15	100,000

Priloga S: Scree diagram za združbe časa retardacije 1 meseca.



Priloga T: Komponentna matrika za seve združbe 1. meseca.

Ime združbe	Komponenta 1	Komponenta 2
M1E3D15	,985	-3,571E-02
M1E4D5	,980	-,109
M1E4D15	,947	-,277
M1E4D120	,947	-,277
M1E3D120	,891	-,268
M1E3D5	,849	,354
M1E3D1	,765	,399
M1E4D1	,626	,479

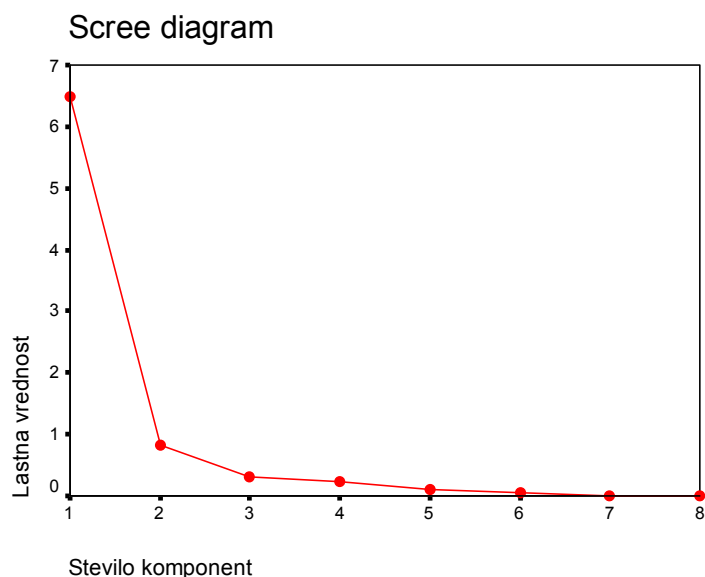
Priloga U: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov predtest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov časa retardacije 2 mesecev.

Kaiser-Meyer-Olkinov test		,769
Bartlettov test sferičnosti	Povpr. hi-kvadrat	321,251
	df (stopinje prostosti)	21
	Stopnja značilnosti	,000

Priloga V: Celokupna pojasnjena varianca za seve združb retardacije 2 mesecev.

	Lastne vrednosti (Initial Eigenvalues)		
Komponenta	Skupaj	% Variance	Kumulativa %
1	6,476	80,953	80,953
2	,835	10,433	91,386
3	,310	3,869	95,255
4	,231	2,886	98,141
5	9.57E+01	1,196	99,337
6	4.55E+01	,569	99,906
7	7.52E+00	9.39E+01	100,000
8	1.22E-13	1.53E-12	100,000

Priloga Z: 21: Scree diagram za združbe retardacijskega časa 2 mesecev.



Priloga X: Komponentna matrika za seve časa retardacije 2 mesecev.

Ime združbe	Komponenta 1	Komponenta 2
	1	2
M2E4D15	,941	6,535E-02
M2E4D120	,937	,105
M2E4D5	,934	,289
M2E3D5	,919	-6,298E-02
M2E3D1	,896	,310
M2E3D120	,863	,471
M2E3D15	,863	,471
M2E4D1	,839	,438

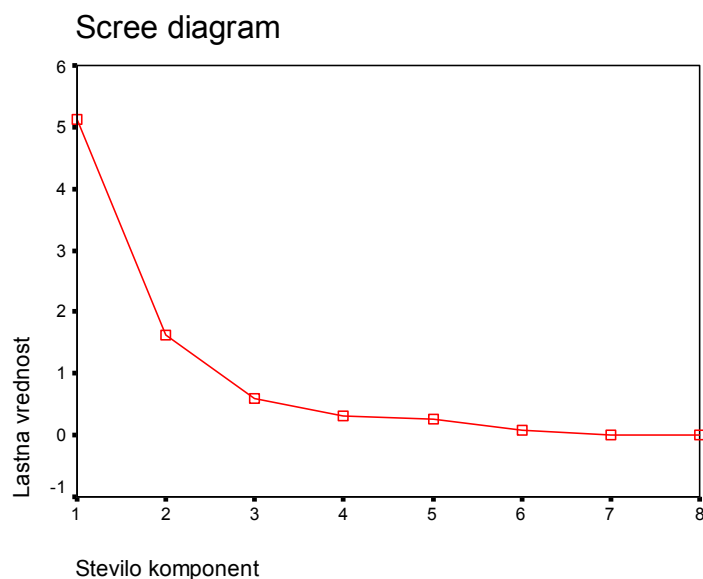
Priloga Y: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za združbe sevov časa retardacije 3 mesecev.

Kaiser-Meyer-Olkin test.		,694
Bartlettov test sferičnosti	Povpr. hi-kvadrat	239,285
	df (stopinje prostosti)	21
	Stopnja značilnosti.	,000

Priloga A1: Celokupna pojasnjena varianca združbe sevov časa retardacije 3 mesecev.

Komponente	Lastna vrednost (Initial Eigenvalues)		Kumulativa %
	Skupaj	% Variance	
1	5,124	64,046	64,046
2	1,632	20,401	84,447
3	,595	7,433	91,879
4	,310	3,880	95,759
5	,250	3,120	98,879
6	8,110E-02	1,014	99,893
7	8,580E-03	,107	100,000
8	-3,796E-16	-4,745E-15	100,000

Priloga B1: Scree diagram za združbe sevov retardacijskega časa 3 mesecev.



Priloga C1: Komponentna matrika za združbe sevov 3. meseca.

Ime združbe	Komponenta 1	Komponenta 2
M3E4D15	,887	-,411
M3E4D120	,887	-,411
M3E4D5	,879	-,426
M3E3D120	,830	,351
M3E3D15	,786	,571
M3E3D5	,771	,484
M3E3D1	,755	,378
M3E4D1	,552	-,536

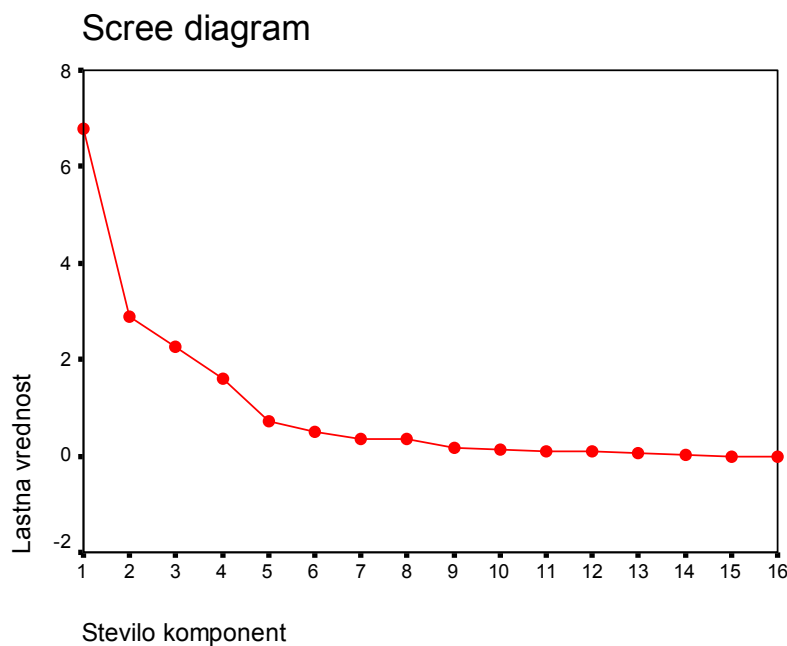
Priloga D1: KMO (Kaiser-Meyer-Olkinov pretest) in Bartlettov test sferičnosti za referenčne združbe HC-tal.

Kaiser-Meyer-Olkinov test		,784
Bartlettov test sferičnosti	Povpr. hi-kvadrat.	412,321
	df (stopinje prostosti)	91
	Stopnja značilnosti.	,000

Priloga E1: Celokupna pojasnjena variance za referenčne združbe HC tal.

Komponenta	Lastna vrednost (Initial Eigenvalues)		Kumulative %
	Skupaj	% of Variance	
1	6.773	42.331	42.331
2	2.887	18.045	60.376
3	2.263	14.145	74.521
4	1.589	9.929	84.450
5	.736	4.602	89.052
6	.495	3.096	92.148
7	.370	2.312	94.459
8	.335	2.092	96.551
9	.171	1.069	97.620
10	.138	.861	98.481
11	9.791E-02	.612	99.093
12	8.248E-02	.516	99.608
13	5.008E-02	.313	99.921
14	1.256E-02	7.851E-02	100.000
15	2.697E-18	1.686E-17	100.000
16	-4.555E-16	-2.847E-15	100.000

Priloga F1: Scree diagram za referenčne združbe HC-tal.



Priloga G1: Komponentna matrika za referenčne združbe HC-tal.

Ime združbe	Komponenta 1	Komponenta 2	Komponenta 3
E4D15	,909	-,104	6,840E-02
E4D120	,840	-,257	,130
E3D1	,824	-,298	-,124
E4D1	,795	-,341	-,163
E4D5	,786	-,339	-,137
E5D120	,707	-,105	-,404
E3D5	,669	-,257	,481
E5D1	,660	,262	-,447
E5D15	,614	9,347E-02	-,512
E5D5	,604	,213	-,437
E6D5	,414	,789	,256
E6D1	,414	,789	,256
E6D15	,521	,777	,122
E6D120	,341	,541	,221
E3D120	,478	-,275	,685
E3D15	,478	-,275	,685

Priloga H1: Hi – kvadrat test za 35 lastnosti opisov morfotipov. Izračunali smo pričakovano število morfotipov, če čas retaracije nebi imel nobenega vpliva in dejansko število morfotipov znotraj skupin 1 (hitrorastoči sevi) in 2 (počasirastoči sevi izrasli od 4. tedna dalje). V tabeli testa Hi-kvadrat smo izračunali vrednost Hi-kvadrat koeficienta, stopinje prostosti in stopnjo značilnosti dobljenih razlik za vsako od 35 lastnosti s katerimi smo opisali morfotipe.

BELA

			BELA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	187	78	265
		Pričakovano število	178,9	86,1	265,0
		% znotraj SKUPINA	70,6 %	29,4 %	100,0 %
	2	Število	29	26	55
		Pričakovano število	37,1	17,9	55,0
		% znotraj SKUPINA	52,7 %	47,3 %	100,0 %
Skupaj		Število	216	104	320
		Pričakovano število	216,0	104,0	320,0
		% znotraj SKUPINA	67,5 %	32,5 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	6,607	1	,010
Razmerje verjetij	6,314	1	,012
Število veljavnih celic	320		

b 0-celice (0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 17,88.

BELA S ČRNO PIKO

			BECPIKA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	262	6	268
		Pričakovano število	263,0	5,0	268,0
		% znotraj SKUPINA	97,8 %	2,2 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,0	1,0	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	317	6	323
		Pričakovano število	317,0	6,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	98,1 %	1,9 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,255	1	,263
Razmerje verjetij	2,263	1	,132
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 1,02.

BREZBARVNA

			BREZBARV		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	222	46	268
		Pričakovano število	218,2	49,8	268,0
		% znotraj SKUPINA	82,8 %	17,2 %	100,0 %
	2	Število	41	14	55
		Pričakovano število	44,8	10,2	55,0
		% znotraj SKUPINA	74,5 %	25,5 %	100,0 %
Skupaj		Število	263	60	323
		Pričakovano število	263,0	60,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	81,4 %	18,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	2,074	1	,150
Razmerje verjetij	1,944	1	,163
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 10,22.

ČRNA

			CRNA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	263	5	268
		Pričakovano število	263,9	4,1	268,0
		% znotraj SKUPINA	98,1 %	1,9 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,1	,9	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	318	5	323
		Pričakovano število	318,0	5,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	98,5 %	1,5 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,042	1	,307
Razmerje verjetij	1,883	1	,170
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,85.

FLORESCENTNORUMENA

			FLORRUM		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	267	1	268
		Pričakovano število	266,3	1,7	268,0
		% znotraj SKUPINA	99,6 %	,4 %	100,0 %
	2	Število	54	1	55
		Pričakovano število	54,7	,3	55,0
		% znotraj SKUPINA	98,2 %	1,8 %	100,0 %
Skupaj		Število	321	2	323
		Pričakovano število	321,0	2,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,4 %	,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,549	1	,213
Razmerje verjetij	1,151	1	,283
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,34.

JAČNORUMENA

			JAJRUME		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	266	2	268
		Pričakovano število	266,3	1,7	268,0
		% znotraj SKUPINA	99,3 %	,7 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,7	,3	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	321	2	323
		Pričakovano število	321,0	2,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,4 %	,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,413	1	,520
Razmerje verjetij	,749	1	,387
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,34.

OKER

			OKER		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	248	20	268
		Pričakovano število	250,6	17,4	268,0
		% znotraj SKUPINA	92,5 %	7,5 %	100,0 %
	2	Število	54	1	55
		Pričakovano število	51,4	3,6	55,0
		% znotraj SKUPINA	98,2 %	1,8 %	100,0 %
Skupaj		Število	302	21	323
		Pričakovano število	302,0	21,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	93,5 %	6,5 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	2,392	1	,122
Razmerje verjetij	3,120	1	,077
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 3,58.

ORANŽNA

			ORANŽNA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	266	2	268
		Pričakovano število	266,3	1,7	268,0
		% znotraj SKUPINA	99,3 %	,7 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,7	,3	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	321	2	323
		Pričakovano število	321,0	2,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,4 %	,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,413	1	,520
Razmerje verjetij	,749	1	,387
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,34.

RJAVOROZA

			RJAVOROZA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	267	1	268
		Pričakovano število	267,2	,8	268,0
		% znotraj SKUPINA	99,6 %	,4%	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,8	,2	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0%	100,0 %
Skupaj		Število	322	1	323
		Pričakovano število	322,0	1,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,7 %	,3%	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,206	1	,650
Razmerje verjetij	,374	1	,541
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,17.

ROZA

			ROZA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	265	3	268
		Pričakovano število	265,5	2,5	268,0
		% znotraj SKUPINA	98,9 %	1,1 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,5	,5	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	320	3	323
		Pričakovano število	320,0	3,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,1 %	,9 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,621	1	,431
Razmerje verjetij	1,126	1	,289
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,51.

RUMENA

			RUMENA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	241	27	268
		Pričakovano število	236,5	31,5	268,0
		% znotraj SKUPINA	89,9 %	10,1 %	100,0 %
	2	Število	44	11	55
		Pričakovano število	48,5	6,5	55,0
		% znotraj SKUPINA	80,0 %	20,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	285	38	323
		Pričakovano število	285,0	38,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	88,2 %	11,8 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	4,331	1	,037
Razmerje verjetij	3,822	1	,051
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 6,47.

SIVA

			SIVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	253	15	268
		Pričakovano število	254,7	13,3	268,0
		% znotraj SKUPINA	94,4 %	5,6 %	100,0 %
	2	Število	54	1	55
		Pričakovano število	52,3	2,7	55,0
		% znotraj SKUPINA	98,2 %	1,8 %	100,0 %
Skupaj		Število	307	16	323
		Pričakovano število	307,0	16,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	95,0 %	5,0 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,384	1	,239
Razmerje verjetij	1,727	1	,189
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 2,72.

SIVORJAVA

			SIVORJAV		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	264	4	268
		Pričakovano število	264,7	3,3	268,0
		% znotraj SKUPINA	98,5 %	1,5 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,3	,7	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	319	4	323
		Pričakovano število	319,0	4,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	98,8 %	1,2 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,831	1	,362
Razmerje verjetij	1,504	1	,220
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,68.

SVETLORJAVA

			SVERJAVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	262	6	268
		Pričakovano število	263,0	5,0	268,0
		% znotraj SKUPINA	97,8 %	2,2 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,0	1,0	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	317	6	323
		Pričakovano število	317,0	6,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	98,1 %	1,9 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,255	1	,263
Razmerje verjetij	2,263	1	,132
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 1,02.

SVETLOSIVA

			SVESIVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	235	33	268
		Pričakovano število	240,6	27,4	268,0
		% znotraj SKUPINA	87,7 %	12,3 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	49,4	5,6	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	290	33	323
		Pričakovano število	290,0	33,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	89,8 %	10,2 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	7,543	1	,006
Razmerje verjetij	13,069	1	,000
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 5,62.

TEMNOSIVA

			TEMSIVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	251	17	268
		Pričakovano število	253,9	14,1	268,0
		% znotraj SKUPINA	93,7 %	6,3 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	52,1	2,9	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	306	17	323
		Pričakovano število	306,0	17,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	94,7 %	5,3 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	3,683	1	,055
Razmerje verjetij	6,538	1	,011
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 2,89.

ZELENA

			ZELENA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	267	1	268
		Pričakovano število	267,2	,8	268,0
		% znotraj SKUPINA	99,6 %	,4 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,8	,2	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	322	1	323
		Pričakovano število	322,0	1,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	99,7%	,3 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,206	1	,650
Razmerje verjetij	,374	1	,541
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je ,17.

OKROGLA

			OKROGLA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	160	108	268
		Pričakovano število	165,1	102,9	268,0
		% znotraj SKUPINA	59,7 %	40,3 %	100,0 %
	2	Število	39	16	55
		Pričakovano število	33,9	21,1	55,0
		% znotraj SKUPINA	70,9 %	29,1 %	100,0 %
Skupaj		Število	199	124	323
		Pričakovano število	199,0	124,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	61,6 %	38,4 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	2,424	1	,120
Razmerje verjetij	2,499	1	,114
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 21,11.

ENA

			ENA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	248	20	268
		Pričakovano število	248,1	19,9	268,0
		% znotraj SKUPINA	92,5 %	7,5 %	100,0 %
	2	Število	51	4	55
		Pričakovano število	50,9	4,1	55,0
		% znotraj SKUPINA	92,7 %	7,3 %	100,0 %
Skupaj		Število	299	24	323
		Pričakovano število	299,0	24,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	92,6 %	7,4 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,002	1	,961
Razmerje verjetij	,002	1	,961
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 4,09.

DVA

			DVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	157	111	268
		Pričakovano število	160,1	107,9	268,0
		% znotraj SKUPINA	58,6 %	41,4 %	100,0 %
	2	Število	36	19	55
		Pričakovano število	32,9	22,1	55,0
		% znotraj SKUPINA	65,5 %	34,5 %	100,0 %
Skupaj		Število	193	130	323
		Pričakovano število	193,0	130,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	59,8 %	40,2 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,896	1	,344
Razmerje verjetij	,909	1	,340
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 22,14.

TRI

			TRI		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	148	120	268
		Pričakovano število	141,9	126,1	268,0
		% znotraj SKUPINA	55,2 %	44,8 %	100,0 %
	2	Število	23	32	55
		Pričakovano število	29,1	25,9	55,0
		% znotraj SKUPINA	41,8 %	58,2 %	100,0 %
Skupaj		Število	171	152	323
		Pričakovano število	171,0	152,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	52,9 %	47,1 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	3,292	1	,070
Razmerje verjetij	3,292	1	,070
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 25,88.

ŠTIRI

			ŠTIRI		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	250	18	268
		Pričakovano število	253,1	14,9	268,0
		% znotraj SKUPINA	93,3 %	6,7 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	51,9	3,1	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	305	18	323
		Pričakovano število	305,0	18,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	94,4 %	5,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	3,912	1	,048
Razmerje verjetij	6,935	1	,008
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 3,07.

PROZORNA

			PROZORNA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	237	31	268
		Pričakovano število	238,1	29,9	268,0
		% znotraj SKUPINA	88,4 %	11,6 %	100,0 %
	2	Število	50	5	55
		Pričakovano število	48,9	6,1	55,0
		% znotraj SKUPINA	90,9 %	9,1 %	100,0 %
Skupaj		Število	287	36	323
		Pričakovano število	287,0	36,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	88,9 %	11,1 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,283	1	,595
Razmerje verjetij	,296	1	,586
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 6,13.

NEPROSOJNA

			NEPROSOJ		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	170	98	268
		Pričakovano število	183,4	84,6	268,0
		% znotraj SKUPINA	63,4 %	36,6 %	100,0 %
	2	Število	51	4	55
		Pričakovano število	37,6	17,4	55,0
		% znotraj SKUPINA	92,7 %	7,3 %	100,0 %
Skupaj		Število	221	102	323
		Pričakovano število	221,0	102,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	68,4 %	31,6 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	18,125	1	,000
Razmerje verjetij	22,267	1	,000
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 17,37.

PROSOJNA

			PROSOJNA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	211	57	268
		Pričakovano število	204,9	63,1	268,0
		% znotraj SKUPINA	78,7 %	21,3 %	100,0 %
	2	Število	36	19	55
		Pričakovano število	42,1	12,9	55,0
		% znotraj SKUPINA	65,5 %	34,5 %	100,0 %
Skupaj		Število	247	76	323
		Pričakovano število	247,0	76,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	76,5 %	23,5 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	4,471	1	,034
Razmerje verjetij	4,172	1	,041
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 12,94.

MOTNA

			MOTNA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	186	82	268
		Pričakovano število	177,6	90,4	268,0
		% znotraj SKUPINA	69,4 %	30,6 %	100,0 %
	2	Število	28	27	55
		Pričakovano število	36,4	18,6	55,0
		% znotraj SKUPINA	50,9 %	49,1 %	100,0 %
Skupaj		Število	214	109	323
		Pričakovano število	214,0	109,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	66,3 %	33,7 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	6,981	1	,008
Razmerje verjetij	6,695	1	,010
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 18,56.

MATIRANA

			MATIRANA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	197	71	268
		Pričakovano število	203,3	64,7	268,0
		% znotraj SKUPINA	73,5 %	26,5 %	100,0 %
	2	Število	48	7	55
		Pričakovano število	41,7	13,3	55,0
		% znotraj SKUPINA	87,3 %	12,7 %	100,0 %
Skupaj		Število	245	78	323
		Pričakovano število	245,0	78,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	75,9 %	24,1 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	4,721	1	,030
Razmerje verjetij	5,285	1	,022
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 13,28.

PRAHASTA

			PRAHASTA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	201	67	268
		Pričakovano število	211,6	56,4	268,0
		% znotraj SKUPINA	75,0 %	25,0 %	100,0 %
	2	Število	54	1	55
		Pričakovano število	43,4	11,6	55,0
		% znotraj SKUPINA	98,2 %	1,8 %	100,0 %
Skupaj		Število	255	68	323
		Pričakovano število	255,0	68,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	78,9 %	21,1 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	14,755	1	,000
Razmerje verjetij	21,058	1	,000
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 11,58.

SVETLEČA

			SVETLEČA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	148	120	268
		Pričakovano število	129,4	138,6	268,0
		% znotraj SKUPINA	55,2 %	44,8 %	100,0 %
	2	Število	8	47	55
		Pričakovano število	26,6	28,4	55,0
		% znotraj SKUPINA	14,5 %	85,5 %	100,0 %
Skupaj		Število	156	167	323
		Pričakovano število	156,0	167,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	48,3 %	51,7 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	30,240	1	,000
Razmerje verjetij	33,181	1	,000
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 26,56.

HRAPAVA

			HRAPAVA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	262	6	268
		Pričakovano število	263,0	5,0	268,0
		% znotraj SKUPINA	97,8 %	2,2 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	54,0	1,0	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	317	6	323
		Pričakovano število	317,0	6,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	98,1 %	1,9 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	1,255	1	,263
Razmerje verjetij	2,263	1	,132
Število veljavnih celic	323		

b 2-celice (50,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 1,02.

NEPRAVILNI ROBOVI

			NEPROB		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	221	47	268
		Pričakovano število	223,2	44,8	268,0
		% znotraj SKUPINA	82,5 %	17,5 %	100,0 %
	2	Število	48	7	55
		Pričakovano število	45,8	9,2	55,0
		% znotraj SKUPINA	87,3 %	12,7 %	100,0 %
Skupaj		Število	269	54	323
		Pričakovano število	269,0	54,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	83,3 %	16,7 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	,758	1	,384
Razmerje verjetij	,803	1	,370
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 9,20.

OKROGLA S KONCENTRIČNIMI KROGI

			OKRKONCK		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	240	28	268
		Pričakovano število	244,8	23,2	268,0
		% znotraj SKUPINA	89,6 %	10,4 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	50,2	4,8	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	295	28	323
		Pričakovano število	295,0	28,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	91,3 %	8,7 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	6,292	1	,012
Razmerje verjetij	10,986	1	,001
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 4,77.

NI LOČENIH KOLONIJ

			NILOKOL		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	208	60	268
		Pričakovano število	195,8	72,2	268,0
		% znotraj SKUPINA	77,6 %	22,4 %	100,0 %
	2	Število	28	27	55
		Pričakovano število	40,2	14,8	55,0
		% znotraj SKUPINA	50,9 %	49,1 %	100,0 %
Skupaj		Število	236	87	323
		Pričakovano število	236,0	87,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	73,1 %	26,9 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	16,534	1	,000
Razmerje verjetij	15,107	1	,000
Število veljavnih celic	323		

b 0-celice (,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 14,81.

FILAMENTOZNA

			FILAMENT		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	247	21	268
		Pričakovano število	250,6	17,4	268,0
		% znotraj SKUPINA	92,2 %	7,8 %	100,0 %
	2	Število	55	0	55
		Pričakovano število	51,4	3,6	55,0
		% znotraj SKUPINA	100,0 %	,0 %	100,0 %
Skupaj		Število	302	21	323
		Pričakovano število	302,0	21,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	93,5 %	6,5 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	4,609	1	,032
Razmerje verjetij	8,134	1	,004
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 3,58.

PIKA

			PIKA		Skupaj
			0	1	
SKUPINA	1	Število	263	5	268
		Pričakovano število	259,7	8,3	268,0
		% znotraj SKUPINA	98,1 %	1,9 %	100,0 %
	2	Število	50	5	55
		Pričakovano število	53,3	1,7	55,0
		% znotraj SKUPINA	90,9 %	9,1 %	100,0 %
Skupaj		Število	313	10	323
		Pričakovano število	313,0	10,0	323,0
		% znotraj SKUPINA	96,9 %	3,1 %	100,0 %

Testi hi-kvadrat

	Vrednost	df (število prostostnih stopenj)	Stopnja značilnosti
Hi-kvadrat koeficient	7,941	1	,005
Razmerje verjetij	5,957	1	,015
Število veljavnih celic	323		

b 1-celice (25,0 %) imajo pričakovano število manj kot 5. Minimalno pričakovano število je 1,70.

Priloga H1 : Seznam sekvenc, pridobljenih iz izolatov, izraslih na POL-gojišču v 12-tedenskem časovnem obdobju. Črka B in številka označujeta ime seva, kakor je zaveden v bazi podatkov in v zbirki zamrznjenih sevov. Poleg tega sta navedena še redčitev in teden, v katerem se je izolat prvič pojavil na plošči. Zvezdice označujejo kvaliteto sekvenc. Brez zvezdic – dobra sekvenca. Število zvezdic označuje, kako slaba je sekvenca. Od 1 do 3. PCR smo izvedli za 189 izolatov (pri katerih smo uspeli dobiti dovolj celične mase za izolacijo DNK v 2. ali 3. ponovitvah). Pozitivno PCR-reakcijo smo dobili pri 89 izolatih, od katerih pa jih je le 12 dalo uporabne sekvence za nadaljnjo primerjalno analizo. Te izolate smo uvrstili v skupine *Proteobacteria* (8 izolatov), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) (1 izolat) in *Firmicutes* (2 izolata). Večino filotipov proteobakterij smo uvrstili med β -proteobakterije (5), 2 izolata med γ -proteobakterije, 1 pa med α -proteobakterije.

1.B229-B-1378R** Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%]
Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[57%] Variovorax[34%]

>B-229-. 10⁻³ 3.teden**

TTNACTGACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTGCGGCCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCCAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAT
TAGATGCAACGCGAAAAACCTTCCCCACCTTTGACATGTACGGAATTCACCAGAGATGGC
TTAGTGCTTGAAAGANAACCGTAACACAGGTACTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCATTAGTTGGTACATTACAGT
TGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTTCACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCC
AACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCATAAAACCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTG

2.B274-!*67-1378R Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%]
Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[84%] Variovorax[45%]

>!*-B274-10⁻³ 5.teden

CGTGAAGTTGATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCT
ACCTTTGACATGTACGGAATTCGCCAGAGATGGCTTAGTGCTCGAAAGAGAACCGTAACA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTTGTCATTAGTTGCTACATTTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTAGGGCTAC
ACACGTCATACAATGGCTGGTACAGA

3.B317-69-1378R Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%]
Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[90%] Acidovorax[56%]

>B317-10⁻⁴ 3.teden

```
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA
ACTGGTTGTTGGGTCTTCACTGACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAA
TTCGCCAGAGATGGCTTAGTGCTTGAAAGAGAACCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCATTA
GTTGCTACATTCAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTG
GTACAAAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAACAGTCGTAGTCCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTA
```

4.B319-*70-1378R** Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%]
Rhizobiales[100%] Brucellaceae[100%] Mycoplana[100%]

>*B319 10⁻⁴ 2.teden**

```
GGGGAGGTAACGGGTTGCGAAAGATTTAAAACTTCAAAGGGAATTGATCGGGGGCCCGCA
CAAGGCGGTGGAGCAATGTGGTTTAATTGNGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCACCTTTT
GACATGCCTGGACCGCCAGAGAGATCTGGCTTTCTCTTCGGAGACTAGGACACAGGTGCT
GCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGGGTGAGGGTGGGTAAAGTCCNGGAACGAGCGCAAC
CCTCGACATTAGTTCCCATCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGNCGGTGCTAAGCC
GGANGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAACATGGGTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCGACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAAGTCGTCTCCAGTTCGGATTGTGC
CTATGCAACTCGAGGGCAACAAGTGGAATC
```

5.B320-71-1378R** Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%]
Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[92%] Variovorax[63%]

>B320-10⁻⁴ 4. teden**

```
GTGAAGTTGNCCGCCTGGGGAGTACGGCTGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
ACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCAC
CTTTGACATGTACGGAATTGCCAGAGATGGCTTAGTGCTCGAAAGAGAACCGTAACACA
GGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCCTTGTCATTAGTTGCATACATTCAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGTCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTAC
ACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAT
AAAACGCAGTCGTAGTCCGG
```

6.B327-**73-1406R - Root[100%] Bacteria[90%] Firmicutes[31%] Clostridia[20%]
Thermoanaerobacteriales[15%]
Thermoanaerobacteriaceae[15%] Thermovenabulum[7%]

>***B327 10⁻⁴ 3. teden

```
TTAGCCGAAACNCGCCNTTTGCCACCGCGCGCGAAATGGTCGAGATTTTAGCTGAGCTGA
ATTTAGATGCATGATACGTTGGCAACCGCCTTACTTAACGCCTTTCTTTTTAGCAGATGC
CTTAGTACTTGCAACCGATTGAAAAACAAGTAGGCAAATCGGTNGNGATTTTATTAAGTG
GTGTGGTGCAAATGGCCACCATTAGCATGCTAGCCTATCAAGATAACAGAATCCTGTACA
AATCGATAANTNTCGCCGTATGCAGCCTGCAANGGTTGAAGATGTGCGTGCCGTAGTGAT
TAAACTTGCCCCAGCAAGTATGCCATCTACGCGCTGTTAAAAATGCGACGGAAGAAGACG
CGTGTTATTGCCGCCAAA
```

7.B328-74-1378R Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%]
Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[85%] Variovorax[41%]

>B328 10⁻⁴ 1. teden

```
CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGANGATGTGGTTTA
ATTTGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTNCGGAATCCCCAGAGATG
GCTTAGTGCTCGAAAGAGAACCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCAGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGATAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTC
AGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTT
GCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAACAGTCGTAGTCCGGATNGCAGTCTGC
AACTG
```

8.B341-***I-1378R - Root[100%] Bacteria[92%] Firmicutes[26%] Clostridia[25%] Clostridiales[11%]
Acidaminococcaceae[4%] Anaeroglobus[2%]

>***B341 10⁻⁴ 3. teden

```
GCATGNCCCTTATTGGCATTGAACTTTGCATCCTTACATTTTCAGAATCGCAAAACCAGNT
GGGGCACAATAACGTATAGGAGAATTGGCTCAAAGGTTACCTTGTGGCACAGGCCTGTGT
AATGGGTGAGCGTGACTTAGCAATTATATATAATCTATANTGCCACTCCTCATTGTTCT
CTCACCTCCTCTTTATTCATTGGTACCTAGCTCTCAAGTTTACTAAGAAAAGCGAAGTA
CACCTTCTCTTTTCTCATNATATTAAGTTCTGNGGTCANATCGTAAGAGCAGTTTTTCA
CTTTTTCCTTCCCACNCCTTTCGGCTTATGGGGA
```

9.B473-8D-1406R Root[100%] Bacteria[100%] Bacteroidetes[100%] Flavobacteria[100%]
Flavobacteriales[100%]
Flavobacteriaceae[100%] Flavobacterium[100%]

>B473 10⁻³ 12. teden

```
CCATTGATACTGTTAACTTGAATTATTAGGAAGTAACTAGAATATGTAGTGTAGCGGTG
AAATGCTTAGAGATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTACTAATGGATTGA
CGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGGATACTAGCTGTTGGAAGCAATTTTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATC
CCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGT
AGATTGACCGGTTTGGAAACAGATCTTTTCGCAAGACAATTTACAAGGTGCTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTAAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTGTTGT
TAGTTGCCAGCGAGTCAAGTCGGGAACCTCTAACAAGACTGCCAGTGCAAATGTGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCCGGTACAGAGAGCAGCCACTGGGCGACCAGGAGCGAATCTATAAAACCGGTCACAGT
TCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
```

10.B475-**A1-1378R - Root[100%] Bacteria[87%] Proteobacteria[24%] Gammaproteobacteria[10%]
Enterobacteriales[7%] Enterobacteriaceae[7%] Buchnera[5%]

> B475 10⁻³ 11. teden**

```
TGGCCTGATTCCATGTGTGCATTGTACTGTGGTGACATTCTGGCATGGCCCTTTTGCCAT
TGAACCTTGCATCCTTACATTTTAGAATCGCAAAACCAGGTGGGGCACAATAATGTATGG
GAATTGGCTCAAAGGTTACCTTGTGGACAGCCCTGTGTAATGGNTGAGTGTATTACAATT
TATTAATNTATANTGCCACTCTCATTTTTCTCACCCCTCCTCTTTATTTCATTGGTACTAC
NTCAAGTTTATAAAAAAGGAATACACTTTCTTTTTCTTATCTATTAAGTTCCGGGGTCA
TATCGTAAGAGCAGTTTTTTATTTTCTCTTCC
```

Priloga 11: Baza podatkov o izolatih v programu Microsoft Access (DVD).