
Biomineralisering i kalde grotter:

Eksempler fra Nordland

MASTERGRADSOPPGAVE I GEOVITENSKAP

Victoria Sæbø



UNIVERSITETET I BERGEN
INSTITUTT FOR GEOVITENSKAP

Juni 2019

Sammendrag

Samhandlingen mellom biologi og geologi i grotter er fortsatt lite forstått. Dette gjelder spesielt for biomineralisering; prosessen der mikroorganismer danner mineraler. Med bakgrunn i dette er det i denne oppgaven gjennomført en studie på mulig biologisk dannelse av jarositt ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) og månemelk (CaCO_3) i et utvalg av grotter i Nordland, Nord-Norge. Dette har blitt undersøkt ved å kombinere geokjemiske analyser med mikrobiologiske og molekylærbiologiske metoder.

Studien viser tilstedeværelse av bakterier med stor diversitet i speleothemet månemelk. Undersøkelser viser bakterier med evner til å tilrettelegge miljøet for utfelling av kalsiumkarbonat (CaCO_3), ved blant annet å øke pH-verdien som videre fremmer utfelling. Dette er demonstrert ved utfelling av kalsiumkarbonat i agar-plater inokulert med bakterier fra månemelk, i tillegg til sekvenseringsdata som identifiserer bakterier kjent fra andre studier på biologisk dannet månemelk.

Sulfatmineralene jarositt og gips ser ut til å være abiotisk dannet. Mineralene er trolig dannet som følge av at vann reagerer med pyritt (FeS_2) som videre oksideres på grunn av et oksiderende grottemiljø. Det er mange utfordringer knyttet til bruk av mikrobiologiske og molekylærbiologiske metoder på jarositt og gips, og det er nødvendig med optimalisering av metoder for å sikkert kunne bestemme dannelsesprosessen. Framtidig arbeid bør inkludere analyser av svovel-isotoper som vil kunne avsløre en biologisk eller abiotisk opprinnelse.

Stikkord: biomineralisering, geomikrobiologi, gips, grotter, jarositt, månemelk.

Forord

Denne masteroppgaven er finansiert av EEA/NFR gjennom prosjektet CAVEICE.

Først og fremst vil jeg takke mine to veiledere, Prof. Stein-Erik Lauritzen og Prof. Lise Øvreås. Takk til Stein-Erik for at du har introdusert meg for det spennende fagfeltet som er speleologi, og for at jeg har fått ha uforglemmelige opplevelser i grotter i både Norge og Slovenia de to siste årene. Takk til Lise som har introdusert meg for mikrobiologi – et helt nytt fagfelt for meg! Det har vært både utfordrende, lærerikt og gøy. Jeg vil takke dere begge for å ha fått lov til å arbeide med et så spennende prosjekt, og for god veiledning underveis.

Videre må en stor takk rettes til Julia E. Storesund, for både korrekturlesing, hjelp med bioinformatikk, og for å alltid være tilgjengelig for alle små og store spørsmål.

Takk til Hilde R. Armo for all veiledning på laboratoriet og for gode råd underveis. Takk til Sverre Aksnes for hjelp til prøvetaking under feltarbeidet. En takk rettes også til Irene Heggstad for god veiledning på SEM.

En ekstra stor takk må rettes til grottegjengen; Helen, Ragnhild, Magnus og Christos – dere har gjort årene med grottemaster ekstra trivelige! I tillegg vil jeg takke alle på hovedkvarteret for morsomme stunder i masterhverdagen, og ikke minst mine medstudenter på instituttet for fem fantastiske år i Bergen.

Takk til Sverre Emil (og Snorre) som har holdt orden i heimen og som alltid er tålmodig med meg, selv i ekstra travle tider.

Bergen, juni 2019

Victoria Sæbø

Biologisk terminologi

Eukaryot: én- eller flercellede organismer som har avgrenset cellekjerne, og som er større og mer komplekst oppbygd enn prokaryoter. Eukaryot omfatter alt liv unntatt bakterier og arker.

Karbonkilde: karbon er et sentralt grunnstoff i alle levende organismer og er nødvendig for at de skal kunne vokse. Organismer benytter seg enten av en organisk karbonkilde eller en uorganisk karbonkilde (e.g., CO₂).

Metabolisme: kalles også stoffskifte og beskriver alle kjemiske reaksjoner i en celle. Dette gjelder både reaksjoner som produserer energi (katabolisme) og reaksjoner som krever energi (anabolisme).

Mikromiljø: de umiddelbare omgivelsene til en celle eller en gruppe av celler.

Mikroorganisme: organisme som er for liten til at den kan ses med det blotte øyet, kalles også mikrobe. Termen gjelder bakterier, arker, gjærsopp og encellede dyr.

Miljøprøve: prøve som er tatt i et bestemt miljø man er interessert i å studere. Prøven kan for eksempel være fra havet, jord eller være en mineral-/bergartsprøve.

Nukleinsyre: DNA og RNA er nukleinsyrer og bærer av den genetiske informasjonen i en celle.

Prokaryot: encellede organismer uten cellekjerne. Prokaryot omfatter to domener: Bacteria og Archaea.

Forkortelser

BSA	bovint serumalbumin
CaCO ₃	kalsiumkarbonat
CTAB	cetrimoniumbromid
EDS	energidispersiv røntgenspektroskopi
FISH	fluorescerende <i>in situ</i> hybridisering
IC	ionekromatografi
ICP-OES	induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri
NA	næringsagar
NMDS	ikke-metrisk multidimensjonal skalering
OTU	operasjonelle taksonomiske enheter
PBS	fosfatbufret saltoppløsning
PCR	polymerasekjedereaksjon
ppm	deler per million (mg/L)
R2A	Reasoner's 2A-agar
SA	sulfitagar
SEM	sveipelektronmikroskop
TB4	trippel B-4-agar
TSA	tiosulfat
vv	våtvekt
XRD	røntgendiffraksjon
Ø	diameter

Grottene

GR	Grønligrotta
HMN	Hammarnesgrotta
MO	Moengrotta
OKS	Okshola
TH	Tukthuset

Innholdsfortegnelse

1	INTRODUKSJON	1
2	OMRÅDEBESKRIVELSE	3
2.1	GEOGRAFISK BELIGGENHET.....	3
2.2	BERGGRUNNSGEOLOGI.....	4
2.3	GROTTELOKALITETER I RANA.....	6
2.4	GROTTELOKALITETER I FAUSKE.....	10
3	TEORI	13
3.1	KARST OG GROTTET.....	13
3.1.1	<i>Hva er karst?</i>	13
3.1.2	<i>Den norske karsttypen</i>	14
3.1.3	<i>Karbonatsystemet</i>	14
3.1.4	<i>Karstgrotter og deres dannelsesprosess</i>	15
3.2	GROTTEINNHOLD.....	16
3.2.1	<i>Grottemineraler</i>	16
3.2.2	<i>Speleothemer</i>	17
3.2.3	<i>Mineraldannende prosesser i grotter</i>	17
3.2.4	<i>Mineralisering i kalde grotter</i>	18
3.2.5	<i>Biominalisering</i>	19
3.2.6	<i>Månemelk</i>	20
3.2.7	<i>Gips og jarositt</i>	21
3.3	GROTTEMIKROBIOLOGI.....	23
3.3.1	<i>Bruk av 16S rRNA i mikrobiologi</i>	23
3.3.2	<i>Grottemikrobiologi i et historisk perspektiv</i>	24
3.3.3	<i>Grotter som økosystem</i>	25
3.3.4	<i>Tilførsel av organisk karbon</i>	26
3.3.5	<i>Kjemoautotrofi i grotter</i>	26
3.3.6	<i>Det bakterielle samfunnet i grotter</i>	27
3.3.7	<i>Hvorfor er det viktig å studere grottemikrobiologi?</i>	28
4	MATERIALE OG METODE	29
4.1	FELTARBEID.....	29
4.1.1	<i>Prøvetakingsområdet</i>	29
4.1.2	<i>Prøvetaking og prøvemateriale</i>	29
4.1.3	<i>pH og temperatur</i>	33
4.2	GEOKJEMISKE ANALYSER.....	33
4.2.1	<i>Ionekromatografi (IC)</i>	33
4.2.2	<i>Induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri</i>	34
4.2.3	<i>Energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS)</i>	34
4.2.4	<i>Røntgendiffraksjon (XRD)</i>	35
4.3	DYRKING.....	35
4.4	MIKROSKOPI.....	36
4.4.1	<i>Sveipelektronmikroskop (SEM)</i>	36
4.4.2	<i>Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)</i>	37
4.5	MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER.....	39
4.5.1	<i>DNA-ekstraksjon</i>	39

4.5.2	<i>Polymerasekjedereaksjon (PCR)</i>	41
4.5.3	<i>Agarose gelelektroforese</i>	43
4.5.4	<i>Illumina-sekvensering</i>	43
4.5.5	<i>Bioinformatikk</i>	44
4.5.6	<i>DNA-sekvensering av renkultur</i>	45
5	RESULTAT	47
5.1	PRØVEMATERIALE.....	47
5.1.1	<i>pH og temperatur</i>	47
5.1.2	<i>Våtvekt og tørrvekt</i>	48
5.2	GEOKJEMISKE ANALYSER.....	49
5.2.1	<i>Ionekromatografi (IC)</i>	49
5.2.2	<i>Induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri</i>	50
5.2.3	<i>Energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS)</i>	53
5.2.4	<i>Røntgendiffraksjon (XRD)</i>	54
5.3	DYRKING.....	56
5.4	MIKROSKOPI.....	58
5.4.1	<i>Sveipelektronmikroskop (SEM)</i>	58
5.4.2	<i>Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)</i>	65
5.5	MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER.....	69
5.5.1	<i>PCR og Illumina-sekvensering</i>	69
5.5.2	<i>Karakterisering av bakteriesamfunnet ved Illumina</i>	71
5.5.3	<i>DNA-sekvensering av renkultur</i>	80
6	DISKUSJON	85
6.1	JAROSITT OG GIPS.....	85
6.1.1	<i>pH og temperatur</i>	85
6.1.2	<i>EDS og XRD</i>	86
6.1.3	<i>Dyrking</i>	87
6.1.4	<i>Sveipelektronmikroskop (SEM)</i>	87
6.1.5	<i>DNA-ekstraksjon</i>	88
6.1.6	<i>Er biomineralisering en mulighet?</i>	88
6.1.7	<i>Forslag til dannelsesprosess for jarositt og gips</i>	89
6.1.8	<i>Konsekvenser</i>	90
6.2	MÅNEMELK.....	91
6.2.1	<i>Geokjemi</i>	91
6.2.2	<i>Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)</i>	92
6.2.3	<i>Sveipelektronmikroskop (SEM)</i>	94
6.2.4	<i>Isolater</i>	95
6.2.5	<i>Karakterisering av bakteriesamfunnet ved Illumina</i>	96
6.2.6	<i>Er biomineralisering en mulighet?</i>	98
6.2.7	<i>Forslag til dannelsesprosess for månemelk</i>	99
6.2.8	<i>Konsekvenser</i>	102
7	KONKLUSJON	103
8	VIDERE ARBEID	105
	REFERANSER.....	107
	VEDLEGG.....	115

1 Introduksjon

Mikroorganismer er allestedsnærværende på jorden og man finner dem i alle typer miljø. De stedene på jorden hvor man enda ikke har funnet mikroorganismer, er der hvor man ikke har lett etter dem (Douglas, 2005). Dette gjelder også for grotter hvor mikroorganismer både er tilstede i et stort antall og ser ut til å spille en viktig rolle som drivere av de biogeokjemiske syklusene.

I tidlig grotteforskning ble det hovedsakelig lagt vekt på geologi og kjemi framfor mikrobiologi, fordi man antok at det man ikke kunne se med det blotte øyet ikke var viktig. Da nye metoder innen mikrobiologi ble tatt i bruk endret dette seg, og man vet nå med stor sikkerhet at mikroorganismer er fundamentale for alle økosystemer på jorden. Selv om det er innforstått at mikroorganismene er viktige aktører i grotteøkosystemer, er kunnskapen om mikroorganismenes diversitet og aktivitet i grottene begrenset (Engel, 2015). I dette fagfeltet må man derfor skifte fokus fra å ikke bare beskrive «*hvem som er der*» men i tillegg prøve å forstå «*hva de gjør der*» (Engel, 2010).

Grotter blir sett på som ekstreme miljø for liv, både på grunn av totalt fravær av lys og svært lave konsentrasjoner av næringsstoffer. Mikroorganismer har eksistert på jorden i mer enn 3,8 milliarder år og har den største evnen av alle livsformer til å tilpasse seg ekstreme miljø. Derfor er det mikroorganismer som dominerer grottemiljøet (Torsvik & Øvreås, 2008). Miljøet i grotter er ekstremt og derfor utvikler mikroorganismene i disse miljøene gjerne spesielle egenskaper for å skaffe seg energi. Dette kan for eksempel være mikroorganismer som utnytter energien i uorganiske forbindelser i mineraler og bergarter, som fører til at mineralene gjennomgår en endring. Dette er grunnen til at grotter er utmerkede laboratorier til å studere samhandlingen mellom biologi og geologi (Engel, 2012a).

I denne oppgaven ønsker vi å undersøke om enkelte mineraldannende prosesser i utvalgte kalde grotter i Nordland, er fremmet av mikroorganismenes aktivitet. Det er allerede utført flere studier på biomineralisering av månemelk i grotter i tempererte og tropiske soner (e.g., Cañaveras et al., 2006; Baskar et al., 2011; Maciejewska et al., 2017), men studier fra arktiske og subarktiske grottemiljø er mer mangelfull. Det er også gjort studier på jarositt som biomineral (e.g., Grishin et al., 1988; Daoud & Karamanev, 2006), men som hovedsakelig er utført i ekstremt sure miljø.

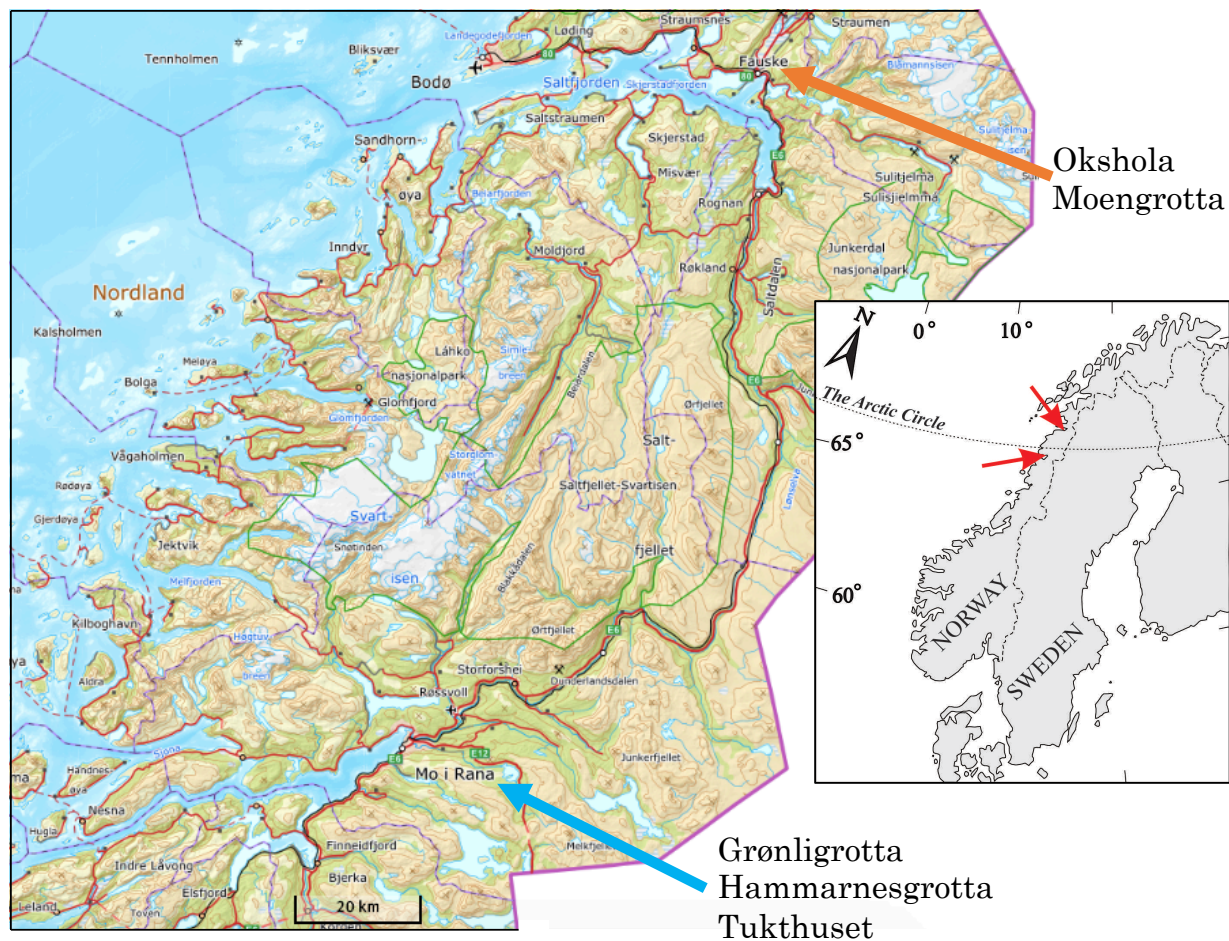
For vår studie var det derfor ønskelig å kartlegge om biomineralisering av månemelk og jarositt er viktige biologiske fenomener også i de kalde grottemiljøene i Nordland, Nord-Norge. Forskningsspørsmålet for oppgaven er *hva eller hvem* som har dannet mineralene og *hvordan* de har blitt. Dette undersøkes ved å kombinere geokjemiske, mikrobiologiske og molekylærbiologiske metoder. Geokjemiske metoder ble benyttet for å bestemme mineralene og elementinnhold i prøvene. Mikrobiologiske metoder ble brukt for å beskrive det mikrobielle samfunnet og dyrke opp mikroorganismene fra grottemiljøet på laboratoriet. Dette for å kunne studere deres aktivitet og interaksjon med mineraler og elementer i miljøet. I tillegg ble molekylærbiologiske metoder og sekvenseringsteknologi benyttet for å kartlegge mikroorganismers tilstedeværelse og diversitet i de forskjellige grottene.

Hvis spørsmålene om *hvem, hva og hvordan* blir besvart kan man også undersøke om dannelsesprosessene for disse mineralene har noen videre konsekvenser. Kan oksidasjon av pyritt og dannelse av jarositt føre til en tidligere grottedannelse, i et scenario hvor grotten ikke får tilført CO₂ fra overflaten? Har mikroorganismer i grottene spesielle egenskaper som kan gjøre dem viktige for andre fagfelt? Kan prosesser som skjer i dette miljøet forklare prosesser i andre, lignende miljø?

2 Områdebeskrivelse

2.1 Geografisk beliggenhet

Feltområdene er lokalisert i Rana og Fauske kommune, i Nordland (figur 2.1.1). Områdene blir ofte sett på som Norges viktigste innen karst, med rundt 200 grotter registrert kun i Rana. Grottene som har vært prøvelokaliteter for dette prosjektet er Grønligrotta, Tukthuset, Hammarnesgrotta, Okshola og Moengrotta. Grønligrotta ligger på omtrent 250 moh. og er lokalisert 20 km nordøst for Mo i Rana sentrum. Grotten er Norges eldste turistgrotte, og den eneste som er tilrettelagt for turister (Lauritzen et al., 2005b). Tukthuset ligger på 114 moh. og er lokalisert ovenfor Langvatnet i Rana kommune. Hammarnesgrotta har flere dagåpninger (i.e., grotteinnganger) som ligger på mellom 210-220 moh. Grotten er lokalisert ovenfor Langvatnet i Rana kommune (Lauritzen, 1996). Okshola er en del av grottesystemet Okshola-Kristihola, som er det nest lengste grottesystemet i Norge. Grotten er lokalisert nord for Nedrevatn i Fauske kommune (Skoglund & Lauritzen, 2010). Moengrotta ligger på 200 moh. i Mefjell-massivet i Fauske kommune (Reigstad et al., u.å.). Koordinater vil ikke bli oppgitt med hensyn på vern av grottene.

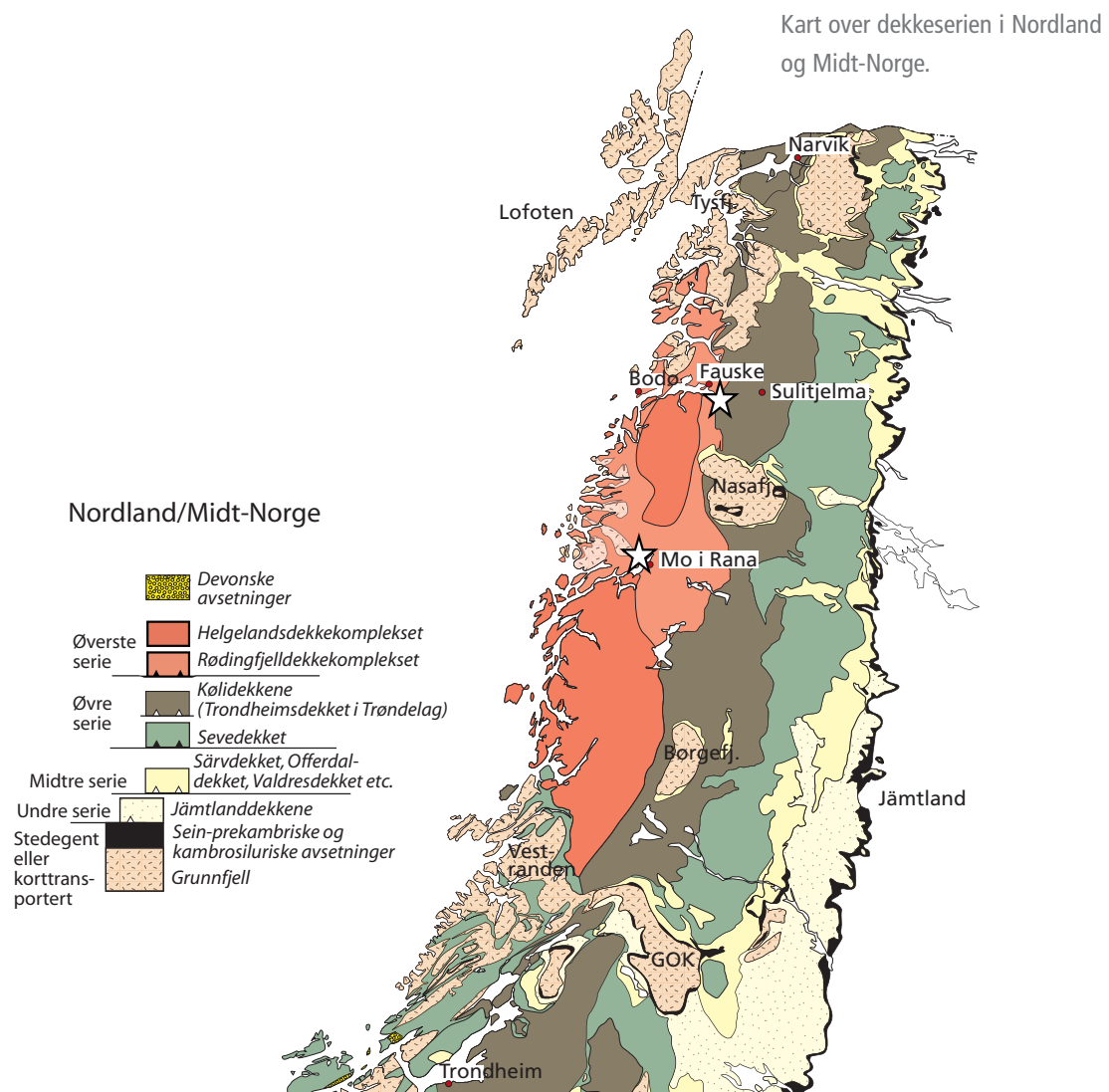


Figur 2.1.1. Stort kartutsnitt viser hvor Mo i Rana (blå pil) og Fauske (oransje pil) er lokalisert i Nordland. Grønligrotta, Hammarnesgrotta og Tukthuset er lokalisert nær Mo i Rana, mens Okshola og Moengrotta er lokalisert nær Fauske. Mindre kartutsnitt til høyre indikerer hvor kommunene er lokalisert i Norge, og er gjengitt med tillatelse fra Stein-Erik Lauritzen. Kartdata modifisert fra Kartverket (2019).

2.2 Berggrunnsgeologi

Berggrunnen i de to feltområdene tilhører Rødingsfjelldekkekomplekset og Fauskedekket (Kølidekkene), som begge er undergrupper av Nordlandsdekkene (figur 2.2.1). Rødingsfjelldekkekomplekset består av kalkspat- og dolomitmarmor, granittisk gneis, i tillegg til glimmerskifer som lokalt har store forekomster av jernmalmer. Fauskedekket er den øverste enheten i Kølidekkene og domineres av kalkspat- og dolomitmarmor, glimmerskifer og lokalt tykk konglomerat. Fauskedekket grenser til det overliggende Rødingfjelldekkekomplekset (Fossen et al., 2013).

Omtrent alle karbonatbergarter i kaledonidene opprinner fra prekambriske og paleozoiske kalksteiner og dolomittsteiner som ble utsatt for regional metamorfose under den kaledonske fjellkjedefoldingen. Den kaledonske fjellkjeden ble dannet da Laurentia og Baltika kolliderte og lukket Iapetushavet, fra sen ordovicium til tidlig devon (Lauritzen & Skoglund, 2013). Fra tidlig mesozoikum har episoder med erosjon og landheving eksponert karbonatbergartene som smale marmorbånd med stor lateral utbredelse. Marmorbåndene forekommer mellom lag av glimmer- eller kvartsittskifer, gneiser, og mer sjeldent granittintrusjoner. En slik forekomst av smale marmorbånd kalles for stripekarst, eller *den norske karsttypen*, ettersom den norske geologen Gunnar Horn introduserte begrepet (Horn, 1937; Lauritzen, 2001).



Figur 2.2.1. Kart over dekkeserien i Nordland. Grønligrotta, Hammarnesgrotta og Tukthuset er utviklet i berggrunn tilhørende Rødingfjelldekkekomplekset. Moengrotta og Okshola er utviklet i berggrunn tilhørende Fauskedekket (Kølidedekkene). Hvide stjerner indikerer hvor Rana og Fauske er lokalisert. Modifisert fra Fossen et al. (2013).

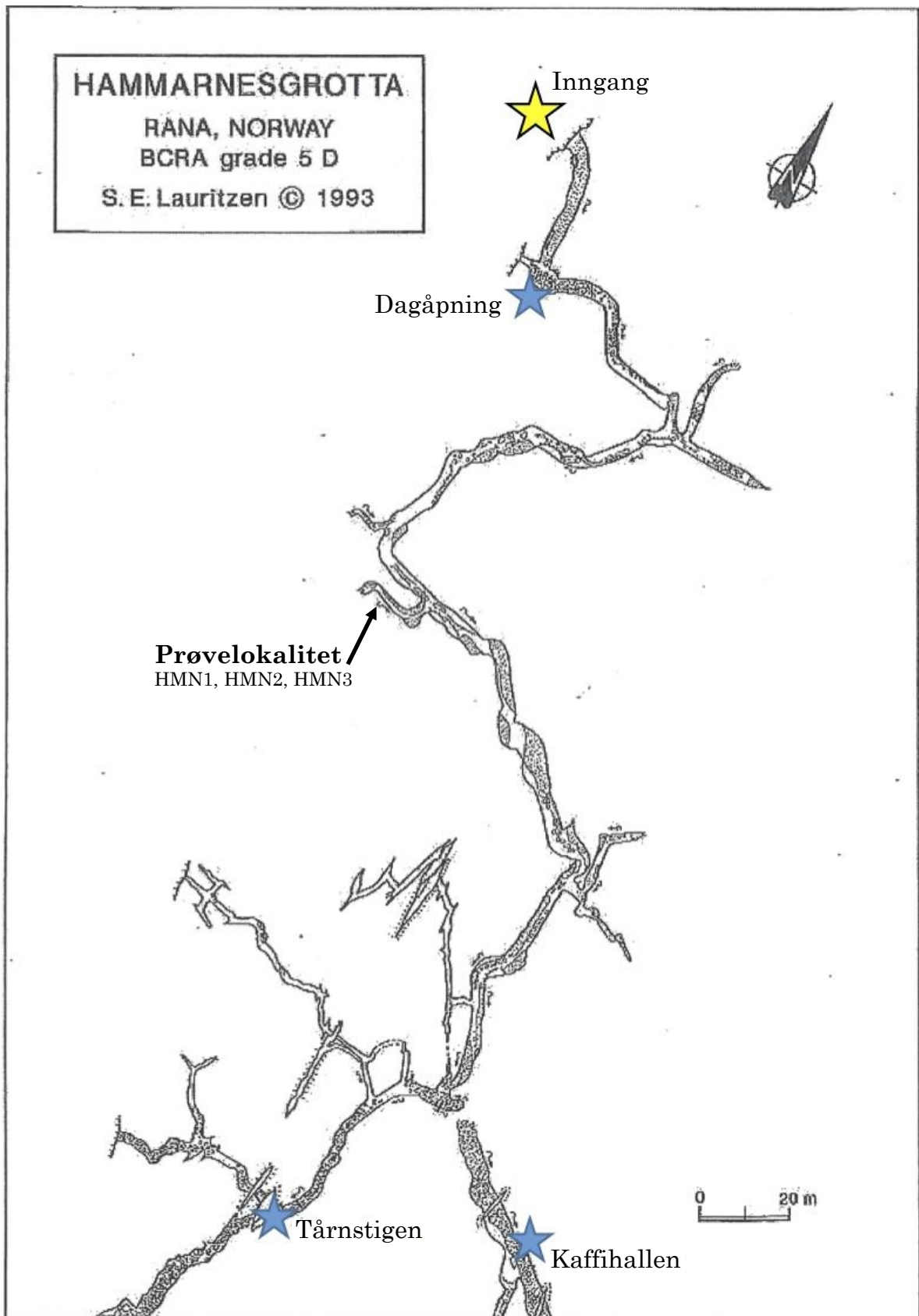
2.3 Grottelokaliteter i Rana

Hammarnesgrotta (figur 2.3.2) og Tukthuset (figur 2.3.3) hører begge til et større grottesystem som er adskilt av sedimentinnfyllinger. Begge grottene er lokalisert langs den nedre grensen av et over 100 meter tykt marmorlag, og ligger nær eller på det underliggende laget av glimmerskifer (Lauritzen, 1996). Det er få stalaktitter og stalagmitter i Tukthuset og Hammarnesgrotta, men i sistnevnte finnes det derimot stalagmittplater («flowstone») som er prøvetatt og datert. Dateringene gir en minstealder på 550 ka for Hammarnesgrotta (Lauritzen et al., 1994). Fra Tukthuset er det ikke foretatt noen dateringer, men da grottene tilhører samme system kan man anta at alderen er omtrent lik for Tukthuset og Hammarnesgrotta (S. E. Lauritzen 2019, personlig kommunikasjon, 27. februar).

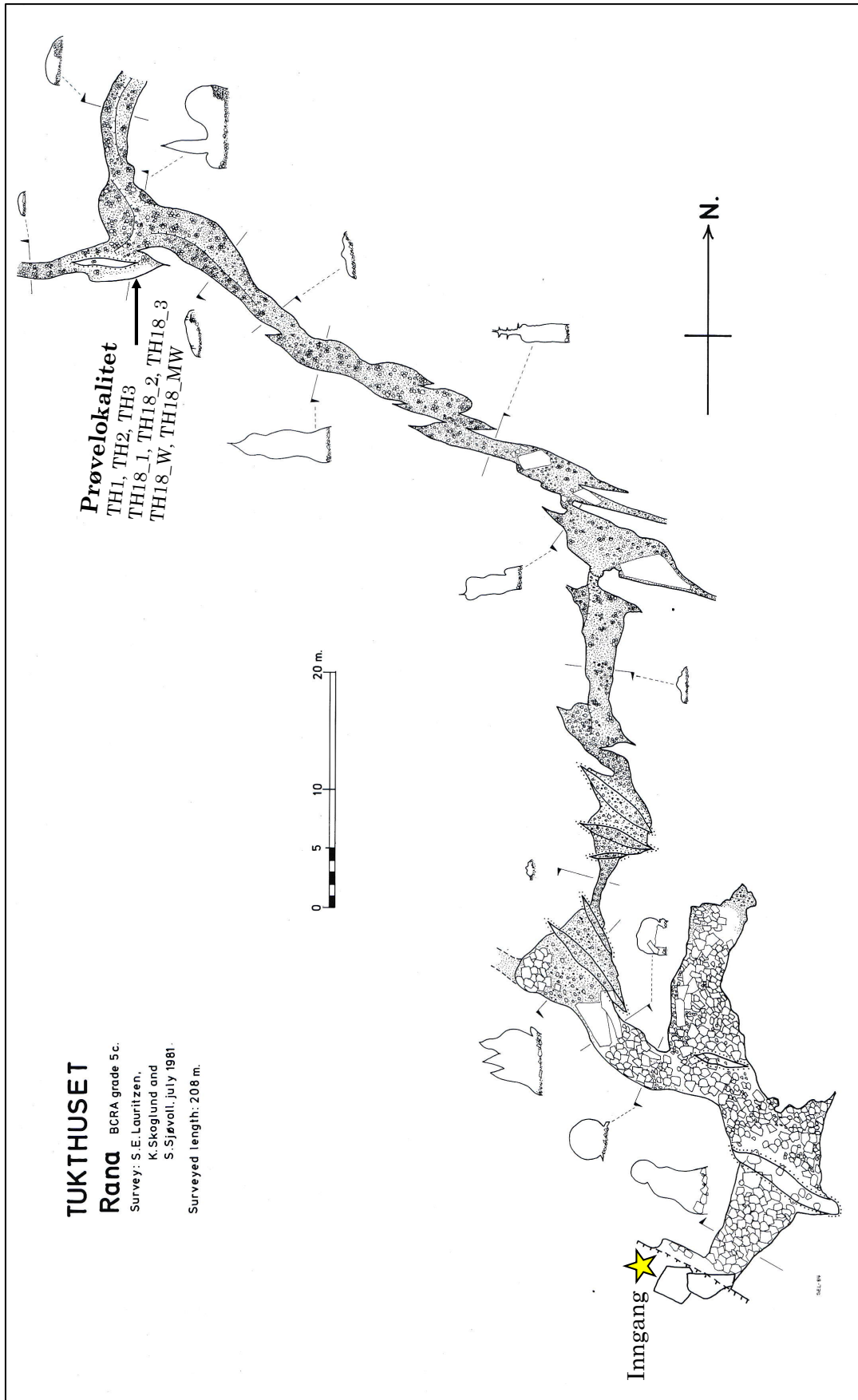
Grønligrotta (figur 2.3.4) består av et labyrintsystem i marmor, og er avgrenset av en overliggende glimmerskiferkontakt (Lauritzen, 1996). I kontakten mellom marmor og glimmerskifer er grottetaket impregnert med pyritt. Det er derfor foreslått at pyrittoksidasjon og korrosjon ved svovelsyre (figur 2.3.1) kan ha vært de første speleogenetiske prosessene (Lauritzen et al., 2005b). Grønligrotta har få dryppsteiner og derfor ingen gode dateringer som gir en minstealder for grotten. Man kan likevel anta at også denne grotten har en liknende minstealder som Hammarnesgrotta (S. E. Lauritzen 2019, personlig kommunikasjon, 27. februar).



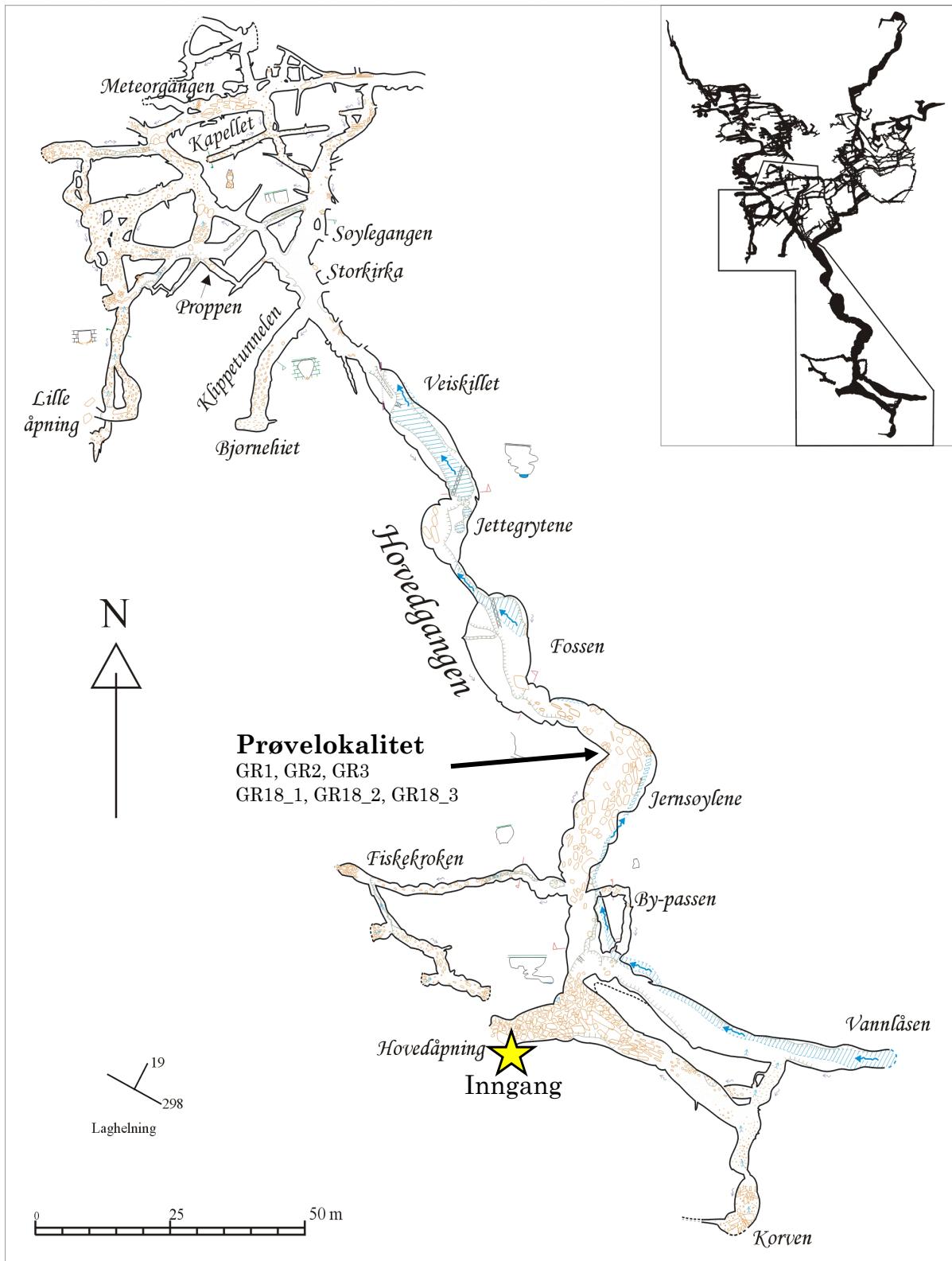
Figur 2.3.1. Dryppegroper i marmor dannet av surt vann som inneholder svovelsyre. Kilden er det pyrittholdige glimmerskifertaket i Grønligrotta. Foto: Stein-Erik Lauritzen, 2001.



Figur 2.3.2. Kart som illustrerer den nordligste delen av Hammarnesgrotta. Det er kun i denne delen av grotten det har blitt samlet inn prøver. Blå stjerner indikerer ulike navngitte lokaliteter i grotten. Gul stjerne indikerer inngangen til denne delen av grotten. Svart pil indikerer lokaliteten hvor prøver ble samlet. Fra Lauritzen (1996).



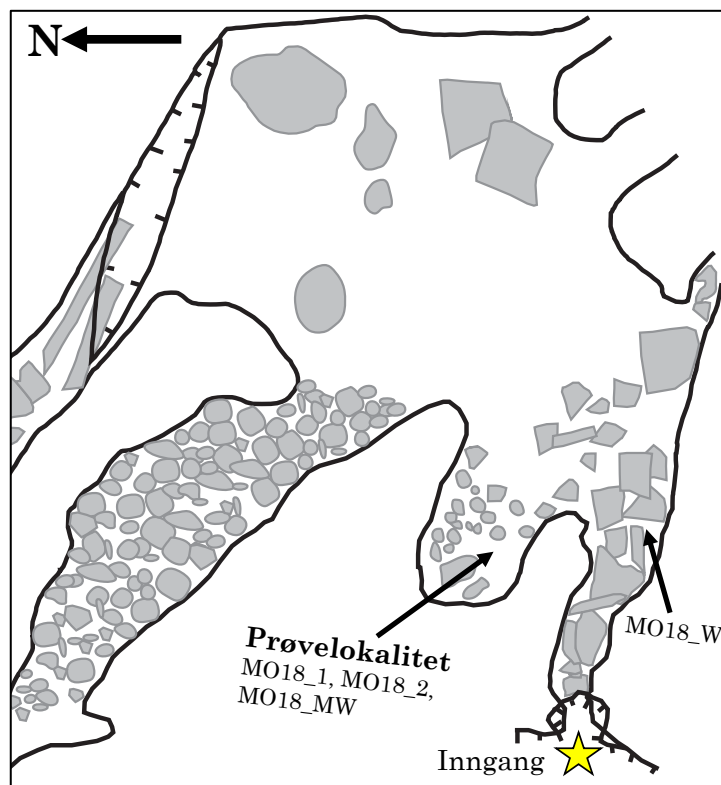
Figur 2.3.3. Kart som illustrerer Tukthuset. Gul stjerne indikerer hvor inngangen til grotten er, mens svart pil indikerer lokaliteten hvor det ble samlet prøver av både månemelk og vann. Gjengitt med tillatelse fra Stein-Erik Lauritzen.



Figur 2.3.4. Kart som illustrerer Grønligrotta. Gul stjerne indikerer hvor hovedinngangen til grotten er, mens svart pil indikerer lokaliteten hvor det ble samlet prøver. Prøvelokaliteten er rett ved den navngitte lokaliteten «Jernsøylene». Fra Skoglund (2002).

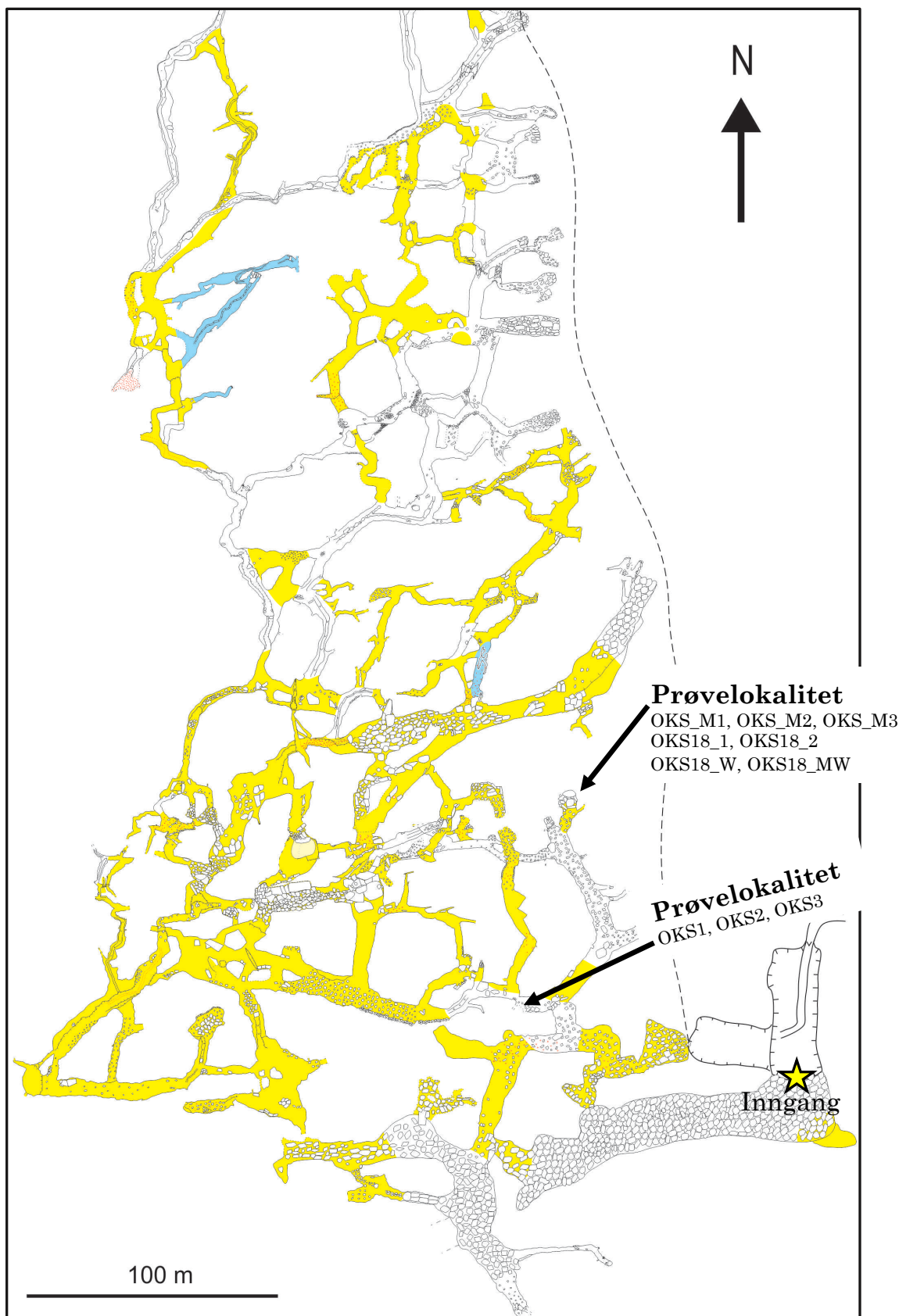
2.4 Grottelokaliteter i Fauske

Moengrotta (figur 2.4.1) er utviklet i et marmorbånd tilhørende Rognangruppen i Fauskedekket (Melezhik et al., 2000; Reigstad et al., u.å.). I samme karststripe ligger det også flere grotter, deriblant Svarthamarhola (Lauritzen et al., 2005a). Moengrotta er en aktiv nedløpsgrotte og mottar vann fra et 1,9 km² stort nedbørsfelt. Det nedre nivået i grotten er derfor et aktivt bekkeløp, mens det øvre nivået er tørrlagt (Reigstad et al., u.å.). Som følge av mangelen på dryppsteiner i Moengrotta er det ikke gjort noen dateringer som angir en minstealder for grotten.



Figur 2.4.1. Figur som illustrerer Moengrotta. Gul stjerne indikerer hvor hovedinngangen til grotten er, mens svart pil indikerer lokaliteten hvor det ble samlet prøver. Modifisert fra Reigstad et al. (u.å.).

Okshola-grottesystemet (figur 2.4.2) er i likhet med Moengrotta, utviklet i marmor tilhørende Rognangruppen i Fauskedekket (Melezhik et al., 2000; Skoglund & Lauritzen, 2010). Grotten ligger i marmor med overliggende glimmerskifer, og flere kollapser har gjort at mange av grottepassasjene er flyttet inn i selve glimmerskiferen. Uranserie-datering av en stalagmittplate fra Okshola gir en minstealder på 350 ka (Lauritzen, 1996).



Figur 2.4.2. Kart som illustrerer Okshola. Gul stjerne indikerer hvor inngangen til grotten er, mens de sorte pilene indikerer hvor prøvelokalitetene er. Fra Skoglund & Lauritzen (2010).

3 Teori

Dette kapitlet er skrevet med hensikt i å belyse teori relatert til både speleologi og geomikrobiologi. Første del presenterer teori tilknyttet karst og grotter. Andre del presenterer teori tilknyttet mineraler og mineraldannende prosesser i grotter. Tredje del presenterer teori tilknyttet geomikrobiologi.

3.1 Karst og grotter

3.1.1 Hva er karst?

Karst er et type landskap hvor kjemisk oppløsning er den dominerende landkapsdannende prosessen (Palmer, 1991). Karstlandskapet har en distinktiv hydrologi og kjennetegnes ved landformer dannet av en kombinasjon av bergarter med høy oppløselighet og godt utviklet sekundær porøsitet. Karstlandskap er karakterisert av elementer som blant annet «forreven» overflate (karren), lukkede forsenkninger (doliner) og underjordiske landformer (grotter) (Ford & Williams, 2007). Så og si alle overflateformer man finner i dette landskapet er et resultat av enten drenering inne i bergartsmassen, innsynkning eller kollaps trigget av utviklingen av en underliggende grotte (Palmer, 1991).

At man har en lett oppløselig bergart alene er ikke tilstrekkelig til å få dannet karst. Det spiller også en viktig rolle hvordan bergartens struktur og litologi er. Oppløselige bergarter med ekstremt høy primær porøsitet har som regel lite utviklet karst. Oppløselige bergarter med ubetydelig primær porøsitet, som senere har utviklet stor sekundær porøsitet, er et godt grunnlag for velutviklet karst (Ford & Williams, 2007).

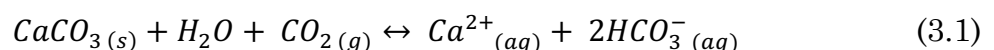
3.1.2 Den norske karsttypen

I Norge er det meste av karst utviklet i metamorfe karbonater. Selv de karbonatene som gjennomgikk lavgrads metamorfose har blitt rekrystallisert til marmor. I disse bergartene er det hovedsakelig utviklet stripekarst. Denne typen karst er definert som lateralt omfattende, men stratigrafisk tynne, bånd av karstifiserbare bergarter. Båndene ligger lagvis langs annen impermeabel berggrunn, hovedsakelig glimmerskifer. Stripekarst i Nordland slik den er i dag, er et resultat av både den kaledonske fjellkjedefoldingen og glasiasjonene i kvartær (Skoglund & Lauritzen, 2011).

Karstifiseringen er intensiv i den litologiske kontakten mellom marmor og glimmerskifer, og flere av grottene i Nordland er dannet i slike kontakter (Lauritzen, 2001). Under regional metamorfose i forbindelse med den kaledonske fjellkjededannelsen har all original porøsitet blitt fjernet fra bergartene, slik at grottedannelse i denne settingen avhenger av sprekker, forkastninger og litologiske kontakter dannet i det sprø regimet (Skoglund & Lauritzen, 2011).

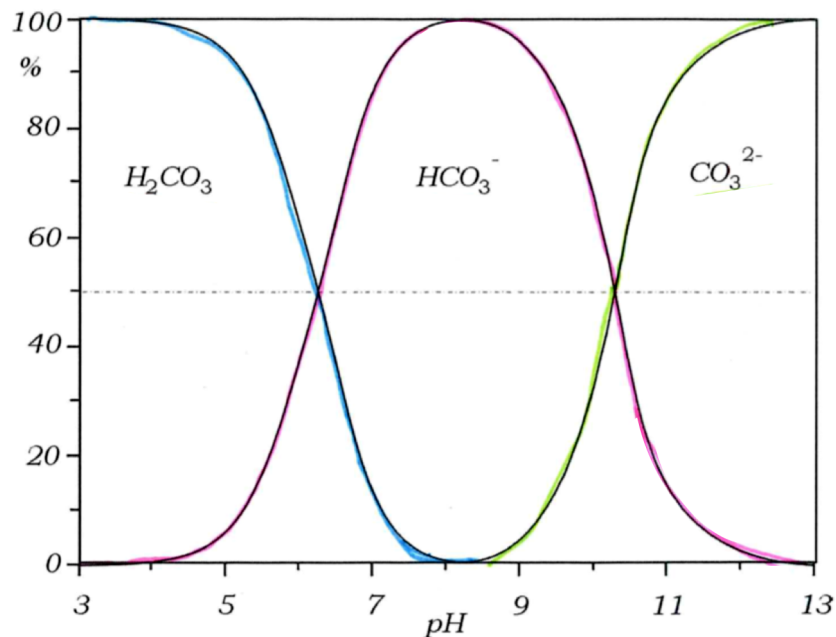
3.1.3 Karbonatsystemet

Oppløsning av kalsiumkarbonat (CaCO_3) skjer gjennom reaksjon med vann og karbondioksid (CO_2), slik at det spaltes i ioner av kalsium (Ca^{2+}) og bikarbonat (HCO_3^-) (Lauritzen, 2010). Samhandlingen mellom vann og karbonatbergarter, som er den drivende kraften for både karstifisering og dannelse av speleothemer, kan framstilles ved én forenklet kjemisk reaksjon (formel 3.1). Reaksjonen fra venstre til høyre konsumerer CO_2 og løser opp kalkstein, mens motsatt reaksjon frigir CO_2 og danner kalsiumkarbonat (Onac & Forti, 2011).



Reaksjonen fra høyre til venstre kan skje som følge av at CO_2 trekkes ut av systemet på grunn av avgassing eller på grunn av at pH endres ved tilførsel av en

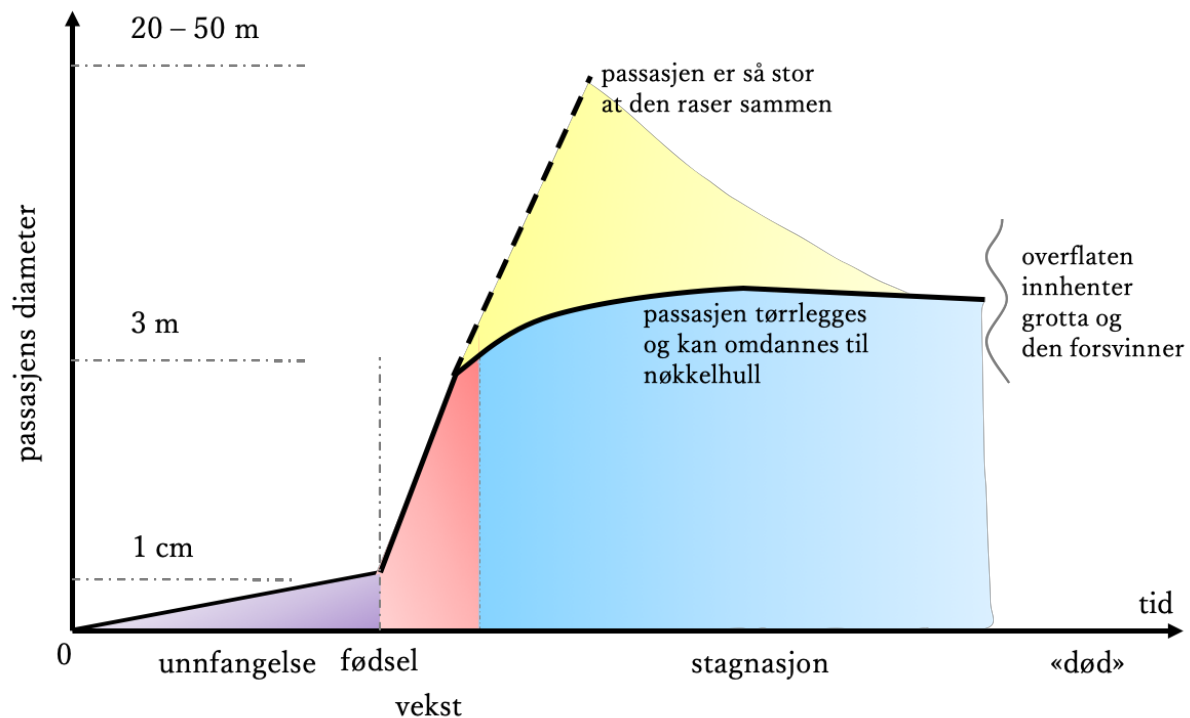
base (økt pH). Konsentrasjonen av ulike karbonatspecies er avhengig av pH, slik som demonstrert ved figur 3.1.1 (Lauritzen, 2017).



Figur 3.1.1. Karbonatlikevektene er pH-avhengige. Kurvene i figuren viser hvordan den prosentvise sammensetningen endrer seg ettersom pH-verdien endrer seg. Modifisert fra Lauritzen (2017).

3.1.4 Karstgrotter og deres dannelsesprosess

Grotter defineres som et naturlig forekommende hulrom i undergrunnen som er stort nok til at mennesker kan komme seg inn. Karstgrotter er hulrom som forstørres ved kjemisk oppløsning av den omkringliggende bergarten (Ford & Williams, 2007). Det første steget i dannelsen av en grotte er utviklingen fra en smal sprekk til en diameter på rundt 1 cm, som er en svært saktegående prosess. Når oppløsningen av bergarten har vært tilstrekkelig og sprekken har blitt utvidet til rundt 1 cm, øker oppløsningshastigheten 100 – 1000 ganger, og man går fra laminær til turbulent strømning. Dette kalles gjerne for det «kjemiske gjennombruddet», hvor turbulensen i vannet akselerer oppløsningsprosessen slik at passasjen kan vokse seg til meterstørrelse på bare noen tusen år (figur 3.1.2) (Lauritzen, 2018). Denne prosessen hvor et grottesystem utvikles, kalles for speleogenese (Ford & Williams, 2007).



Figur 3.1.2. Illustrasjon av en «grottes livsløp»; fra en sprekk begynner å utvides, til passasjen er stor nok for mennesker, og deretter til passasjen enten raser sammen eller tørregges. Utviklingen fra en smal sprekk (~0,1 mm) til den er omtrent 1 cm, kan ta så mye som $10^4 - 10^5$ år. Etter dette er utviklingen raskere, og vekstraten kan være opptil 1 mm/år. Modifisert fra Lauritzen (2018).

3.2 Grottenes innhold

3.2.1 Grottemineraler

Betegnelsen grottemineraler gjelder kun mineraler som er dannet i grotter, altså etter at grotten selv har blitt dannet. Grottemineraler er sekundærmineraler og dannes fra fysisk-kjemiske reaksjoner av primærmineraler i bergarter eller løsmasser. Grottemineralene dannes som følge av den spesifikke grottens unike forhold, og grottemiljøet har derfor direkte innvirkning på dannelsen av mineralene (Hill & Forti, 1997). Faktorer som styrer mineraldannelsen inkluderer blant annet temperatur, partialtrykk (karbondioksid, pCO_2), og hvilket materiale grotten er utviklet i (e.g., karbonater, evaporitter). Dannelsen kan også trigges eller tilrettelegges av mikroorganismer som har sitt habitat i grotten (Onac & Forti, 2011).

Samme type mineral kan ha ulike opprinnelser i en grotte, som følge av at det finnes flere prosesser som kan føre til utfelling av samme kjemiske substans. Gips kan for eksempel dannes både ved fordampning og som følge av pyrittoksidasjon (Lauritzen, 2017). De vanligste mineralene man finner i grotter er kalsitt, aragonitt og gips (Hill & Forti, 1997). I denne oppgaven vil fokuset ligge på sulfatmineralene jarositt og gips.

3.2.2 Speleothemer

Termen speleothem betyr generelt grotteinnhold, og alt som fyller grotten er derfor per definisjon speleothemer. I praksis brukes imidlertid denne termen hovedsakelig på ulike typer dryppsteiner, som stalagmitter og stalaktitter.

Speleothem betegner den morfologiske formen til en mineralavsetning, ikke dens sammensetning (Lauritzen, 2017). Kalsitt for eksempel, er et grottemineral, men ikke et speleothem. En kalsitt-stalaktitt derimot, er et speleothem som består av kalsitt (Hill & Forti, 1995). Samme type speleothem kan være dannet av ulike mineraler, avhengig av hvilken grotte det vokser i (Lauritzen, 2017). I denne oppgaven vil fokuset ligge på speleothemet månemelk.

3.2.3 Mineraldannende prosesser i grotter

Fysisk-kjemiske prosesser i grottemiljøet omdanner mineraler fra grottens bergmasse og sedimenter til sekundærmineraler. Dette kan foregå ved at man får homogen utfelling fra vannløsninger, eller man kan ha heterogene reaksjoner mellom eksisterende faste faser og ioner i vannløsning. Ofte har mikroorganismer en avgjørende rolle i mineraldannelsen, der de gjerne katalyserer reaksjonene (Lauritzen, 2017).

De geokjemiske dannelsesprosessene av grottemineraler deles vanligvis inn i tre mekanismer; redoksreaksjoner, ionebytting og hydratisering/dehydratisering. Redoksreaksjoner kan skje når meteorisk vann siver gjennom de karstifiserte bergartene og lager et oksiderende og surt miljø i grotten. I dette sure miljøet kan

sulfater som pyritt lett oksideres til ulike jernoksider. Selv om flere uorganiske prosesser involverer redoksreaksjoner, blir mange av reaksjonene ofte utført av mikroorganismer (Onac & Forti, 2011). Tidligere ble det antatt at det ikke foregikk reduisering i vesentlig grad. Senere forskning viser derimot at også dette er en aktiv prosess som skjer i grotter, gjerne i regi av mikroorganismer (Northup & Lavoie, 2001).

Ionebytting skjer mellom to kjemiske forbindelser hvor deler av begge byttes om slik at det dannes to nye mineraler med samme ioner. Disse reaksjonene involverer ofte én karbonatforbindelse og én mer eller mindre sterk syre. Tilstedeværelse av syre skyldes gjerne en oksidasjonsprosess (Onac & Forti, 2011).

Hydratisering/dehydratisering foregår som følge av at mange ioniske forbindelser inkorporerer vannmolekyler i strukturen sin (e.g., gips, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), slik at forbindelsens stabilitet påvirkes av luftfuktigheten. I et tørt miljø kan hydratiserte mineraler miste sitt krystalliserte vann og omgjøres til nye forbindelser. I fuktigere miljø kan forbindelser uten vann ta opp vann fra grottens atmosfære (Onac & Forti, 2011).

3.2.4 Mineralisering i kalde grotter

Mineralisering i kalde grotter skiller seg ut fra mineralisering i tempererte og tropiske grotter, både ved dannelsen av spesielle grottemineraler og ved andre vekstvilkår av speleothemer. Isgrotter og grotter som tidligere har huset is, kan inneholde spesielle sekundære mineralforekomster som ikke observeres i grotter som aldri har hatt temperaturer under 0 °C. Mineralene som har blitt utfelt som følge av lave temperaturer hører til gruppen av *kryogene grottemineraler* (CCM), hvor kryogene karbonater og kryogen gips er de vanligste (Žák et al., 2018). Som følge av at Mg^{2+} lettere inkorporeres inn i is enn Ca^{2+} , har ofte kryogene karbonater et høyere Mg/Ca-forhold sammenlignet med speleothemer som ikke er dannet under like fryseforhold, men som er dannet i samme grotte (Bazarova et al., 2016).

Karbonatavsetninger i form av stalaktitter og stalagmitter, er generelt mye bedre vist fram i grotter i tropiske og tempererte soner, enn i de grottene som befinner seg i kalde regioner. Både ved at dryppsteinene er større og ved at de er i et større antall. Som følge av de kalde forholdene er dryppsteiner også sjeldne i grottene i Norge (Onac & Lauritzen, 1995). Dette er et resultat av blant annet klimatiske forhold, som fører til en større kontrast mellom CO₂ i atmosfæren og jord i tropene, enn det er i subarktiske og alpine miljø. I de kalde miljøene er derfor ikke vannet som infiltrerer grottene overmettet, og man får ikke samme hastighet i utfelling som i de varmere regionene (Ford & Williams, 2007).

3.2.5 Biomineralisering

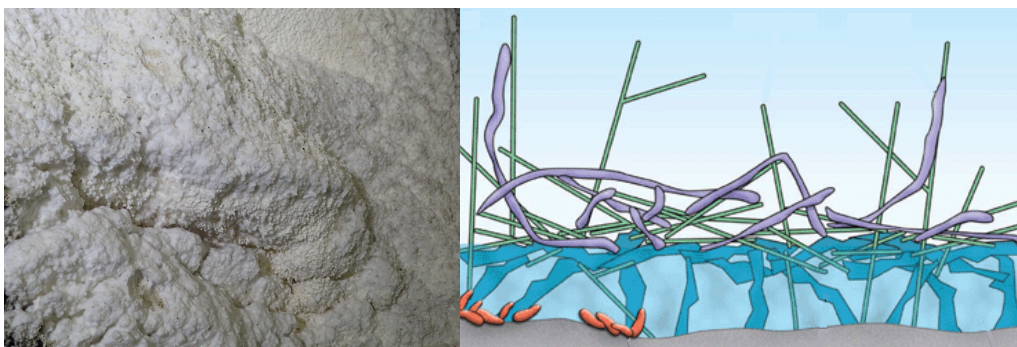
Økt forskning på geomikrobiologi i grotter de senere år, har gjort at man i dag har en større forståelse for hvordan mikroorganismer samhandler med bergarter og mineraler (Onac & Forti, 2011). I dag er det kjent at mineraler kan felles ut som følge av blant annet enzymer syntetisert av mikroorganismer, ved at mikroorganismer endrer miljøets pH, eller ved at organismer fungerer som nukleasjonspunkt for mineraler (Northup et al., 1997). Nukleasjon eller kimdannelse er det første steget i krystallvekst, og innebærer at ulike ioner orienteres i et mønster slik at det dannes et krystallinsk fast stoff (Onac, 1997). Prosessen der mikroorganismer danner mineraler kalles for biomineralisering (Konhauser, 2007).

Biomineralisering kan skje på to måter, hvor den ene innebærer mineralutfelling uten at organismen har noen kontroll over prosessen. Dette kalles for biologisk indusert-mineralisering, og innebærer at mineraler dannes som et biprodukt fra cellens metabolske aktivitet eller fra cellens samhandling med det omkringliggende akvatiske miljøet. Den andre prosessen kalles biologisk kontrollert-mineralisering og innebærer at mineralutfellingen er regulert av organismen, og at mineralet har en fysiologisk hensikt (Konhauser, 2007). Biologisk indusert-mineralisering er prosessen man antar at skjer i grottemiljøet.

Majoriteten av mineralutfellinger som dannes som følge av biologisk induert-mineralisering blir dannet passivt, hvor mikroorganismer indirekte påvirker mineraliseringen. Dette inkluderer mikroorganismers metabolske aktivitet, som kan påvirke metningsgraden til mineraler. Eksempler på dette er en økning i pH i miljøet, som fremmer utfelling av karbonat, eller sulfat-reduserende bakterier som induserer dannelsen av metallsulfider som følge av at de produserer hydrogensulfid (H_2S) (Konhauser, 2007). Det er liten tvil om at tilstedeværelsen av en metabolsk aktiv celle på et mineral har stor innvirkning på både mineralets mikrostruktur og geokjemien i mikromiljøet (Douglas, 2005).

3.2.6 Månemelk

Månemelk er en kategori av speleothemer vanligvis bestående av karbonater (e.g., kalsitt, aragonitt), men som også kan bestå av sulfater, fosfater, silikater og andre mineraltyper (Hill & Forti, 1997). Fra Norge er det det påvist månemelk bestående av kalsitt, gips og aragonitt/hydromagnesitt (Onac & Ghergari, 1993). Månemelk er definert ut fra tekstur mer enn ytre form, og beskrives som hvite, «blomkålaktige», amorfe krystallmasser. Utseendet til månemelk gir inntrykk av en masse som «vokser» på grotteveggen (Lauritzen, 2017). Speleothemet er ofte svært vannholdig og endrer utseende i takt med vanninnholdet. Med høyere vanninnhold har månemelk et utseende som ligner cottage cheese, mens lavt vanninnhold gir en mer pulveraktig form som kan ligne på talk eller kritt (Hill & Forti, 1997). Speleothemet består oftest av fibrose krystaller, som vanligvis har en nålete eller forgrenet form når det undersøkes i mikroskop (figur 3.2.1) (Ford & Williams, 2007).



Figur 3.2.1. Månemelk slik det *kan* observeres makroskopisk (venstre) og mikroskopisk (høyre). Modifisert fra Barton & Jurado (2007) og Cañaveras et al. (2006). Foto: Victoria Sæbø, 2018.

Dannelse av månemelk er ikke begrenset til et spesifikt sted i en grotte eller til en spesifikk kjemisk reaksjon, men avhenger trolig av fysiokjemiske forhold. Hvordan månemelk dannes er et omdiskutert tema, og det finnes forslag til både abiotiske og biotiske dannelsesprosesser (Lavoie et al., 2010). En mulig biotisk dannelsesprosess av månemelk ble for første gang foreslått i 1946 av en norsk botaniker (Høeg, 1946). Det er foreslått dannelsesmåter der mikroorganismer feller ut kalsitt direkte (Northup et al., 1997; Castanier et al., 1999) og der mikroorganismene danner et nukleasjonspunkt hvor mineraler kan felles ut (Pentecost & Bauld, 1988; Jones & Kahle, 1993).

Hill & Forti (1997) har foreslått fire ulike dannelsesmodeller for månemelk, som involverer både abiotiske og biotiske prosesser: 1) ved utfrysning fra vannløsning (kryogent grottemineral), 2) biomineralisering ved mikroorganismer, 3) at månemelk er nedbrytningsresidu fra bergveggen, og 4) mineralene felles ut i mikrokrystallin tilstand og vokser seg aldri store. Månemelk kan muligens dannes fra alle disse prosessene, eller i en prosess der flere av de overnevnte kombineres (Lauritzen, 2017).

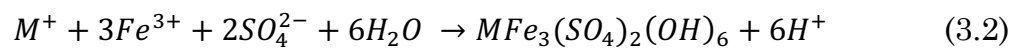
For å få dannet månemelk bestående av kalsitt, er det nødvendig med tilgjengelig karbon, kalsium og oksygen. CaCO_3 kan dannes fra bikarbonat (HCO_3^-) og kalsium (Ca^{2+}), eller fra karbonat (CO_3^{2-}) og kalsium. CO_3^{2-} kan blant annet genereres fra aktiviteten til bakterier, mens Ca^{2+} er tilgjengelig i miljøet fra karbonatbergarten i grotten (Seifan & Berenjian, 2019).

3.2.7 Gips og jarositt

Gips og jarositt tilhører klassen for sulfatmineraler. I kalksteingrotter opptrer sulfatmineraler oftest som skorper på grotteveggen (Hill & Forti, 1997), noe de også gjør i grottene i Nordland. Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) er, etter kalsitt og aragonitt, det tredje mest vanlige grottemineralet. Mineralet er vanligvis fargeløst eller hvitt, og har en monoklin krystallstruktur. Gipskrystallene opptrer ofte som flak (Hill & Forti, 1997). Gips er naturligvis mest tilstede i gipsgrotter, samt i tempererte til

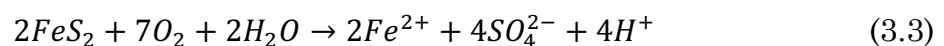
tropiske kalksteingrotter som for det meste er relativt tørre. Mineralet er mindre tilstede i kalde og fuktige grotter i arktiske miljø (Ford & Williams, 2007)

Jarositt ($KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$) opptrer som belegg eller skorper på grottevegger, og er mindre vanlig i grotter enn gips (Hill & Forti, 1997). Det finnes flere typer av jarositt, hvor den generelle kjemiske formelen er $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, der M kan være blant annet K^+ , Na^+ eller H_3O^+ . Kalium er det vanligste kationet i jarositt. Mineralet dannes vanligvis i sure og sulfatrike miljø, hvor mineralet blir dannet som et resultat av oksidasjon av sulfider (Baron & Palmer, 1996). En av de vanligste forekomstene av jarositt er i forbindelse med pyrittoksidasjon (FeS_2), spesielt i pyrittholdige skifre (Michel & van Everdingen, 1987). Utfelling av jarositt blir typisk beskrevet med følgende reaksjon (hvor M for eksempel kan være K^+):

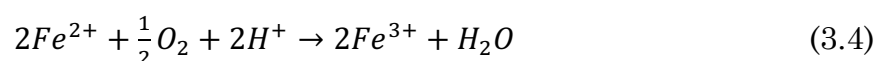


Abiotisk pyrittoksidasjon kan skje når pyritt eksponeres for vann og oksygen. Ved tilstedeværelse av vann vil pyrittoksidasjon føre til at dannelse av syre (H^+), sulfat (SO_4^{2-}) og vandig toverdige jern (Fe^{2+}). Den abiotiske prosessen er beskrevet som en energikrevende og langsom prosess, men det finnes også ulike bakterier som kan katalysere pyrittoksidasjon slik at prosessen er hurtigere (Dos Santos et al., 2016). Høy konsentrasjonen av sulfat som et resultat av pyrittoksidasjon, kan føre til at man i tillegg til jarositt også får utfelt gips fra prosessen (Michel & van Everdingen, 1987).

Utfelling av gips er derimot også avhengig av at det er nok Ca^{2+} tilgjengelig, noe det ofte er i karstgrotter dannet i karbonater. Når pyritt oksideres i et oksiderende miljø, fungerer gjerne oksygen som oksidant (Schoonen et al., 2000) (formel 3.3).



Videre vil det toverdige jernet oksideres til treverdige jern, enten som følge av et oksiderende miljø eller som følge av mikrobiell aktivitet (Schoonen et al., 2000) (formel 3.4).

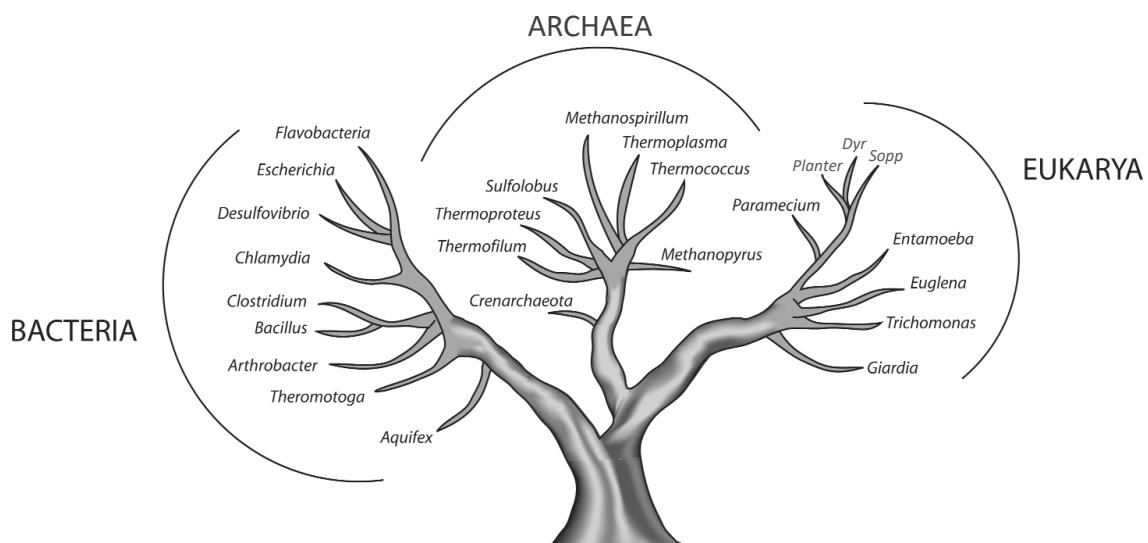


3.3 Grottemikrobiologi

3.3.1 Bruk av 16S rRNA i mikrobiologi

Det er i dag godt etablert at alt liv på Jorden deles inn i tre primære grupper; bakterier, arker og eukaryoter (figur 3.3.1). Forskjellen mellom gruppene er store – enda større enn forskjellen mellom et dyr og en plante. Under arbeidet med å systematisere naturen oppdaget man at alt liv er dominert av mikroorganismer. Bacteria og Archaea, samt majoriteten av Eukarya, er alle mikrobielle (Woese et al., 1990).

For å kunne bestemme det evolusjonære forholdet mellom ulike organismer måtte det velges et gen for sekvensstudier som er universelt og tilstede i alle organismer, og som er konservativt. I prokaryoter er dette genet 16S ribosomal RNA, mens det for eukaryoter er 18S ribosomal RNA. Disse genene spiller en fundamental rolle i alle organismer og som følge av dette har enkelte deler av genet forblitt konservative. Dette er grunnen til at man kan bruke slike gen til å identifisere alt fra den minste bakterie til det største dyr (Konhauser, 2007). For å sammenligne rRNA-sekvenser fra ulike organismer, kan avstanden mellom dem brukes til å lage et fylogenetisk tre for å illustrere slektskap, som vist ved figur 3.3.1.



Figur 3.3.1. «Livets tre» som viser de tre domeneene; bakterier, arker og eukaryoter. Treet er laget basert på sammenligning av 16S/18S rRNA-sekvenser. Lengden på grenene er omtrentlige. Modifisert fra Barton (2006).

3.3.2 Grottemikrobiologi i et historisk perspektiv

Sammen med utviklingen av nye mikrobiologiske metoder har det vært en økende interesse for mikrobiologi i grotter de siste tiårene. Det mikrobielle livet i grotter ble tidlig forsket på (Høeg, 1946; Faust, 1949; Caumartin, 1963; Rusterholtz & Mallory, 1994), men som følge av begrensninger i metodene som ble brukt var kunnskapen om disse økosystemene liten (Engel, 2010). Tidligere studier brukte hovedsakelig tradisjonelle kulturmedier utviklet fra humanmedisin til å studere mikroorganismenes utbredelse i naturen. Disse mediene var komponert for å gjengi forholdene i menneskekroppen, hvor også inkubasjon foregikk ved 37 °C (Lavoie, 2015). Dette er forhold som ikke er tilpasset de oligotrofe organismene man finner i grotter, og derfor hadde man ikke et reelt bilde av den mikrobielle diversiteten i miljøene (Engel, 2010). Fenomenet med kultiverbare og ikke-kultiverbare mikroorganismer var også en av årsakene til dette. Staley & Konopka (1985) introduserte begrepet «the Great Plate Count Anomaly» med bakgrunn i at de fleste mikroorganismene man observerer direkte fra miljøprøver i mikroskop, ikke kan dyrkes opp under laboratoriebetingelser.

Som følge av begrensninger i metoder konkluderte mange med at de fleste av mikroorganismene i grottemiljøet kun var transporterte organismer fra overflaten, som hadde blitt fraktet inn i grotten med perkolerende/strømmende vann, vind eller dyr. Det ble også antatt at disse organismene kun var heterotrofe organismer og matkilder for høyere organismer. I dag er det kjent at selv om en del av mikroorganismene i grotter trolig er transportert fra overflaten, finnes det også mikroorganismer som er unike fra overflatemiljøet (Engel, 2010). Siden 90-tallet har metodene utviklet seg, og man bruker i dag medier med lavere næringsinnhold, ulike mikroskopteknikker som sveipelektronmikroskop, i tillegg til molekylærbiologiske metoder som gir et direkte inntrykk av diversiteten i miljøprøvene (Lavoie, 2015). De siste tiår har moderne molekylærbiologiske metoder klart å bevise at enkelte avsetninger i grotter er et resultat av mikrobiell aktivitet (Engel, 2012b).

3.3.3 Grotter som økosystem

Grotter er unike økosystem, og fordi disse økosystemene ligger inne i berg kan man si at den geologiske settingen både definerer grensene av økosystemet og hvor mye energi som tilføres dem (Simon, 2012). Grotter eksisterer i mange ulike geologiske materialer, men alle deler likevel noen felles karakteristikk med hensyn på miljøfaktorer. Dette inkluderer mangel på sollys, lave nivå av næringsstoffer, samt at grottene har relativt konstant temperatur og luftfuktighet (Lauritzen, 2018). Som følge av at sollys ikke er tilgjengelig som energikilde i grotter, regnes grotter ofte som ekstreme miljø. Likevel er det relativt stabile miljø, som følge av at de andre fysiske parameterne er milde og konstante (Northup & Lavoie, 2001). Det finnes derimot mange ulike typer grotter, og det er vanskelig å beskrive en generell mikrobiell diversitet for grotter (Hershey & Barton, 2018).

Økosystemet i grotter kan ikke benytte seg av lysenergi (fotoautotrofi), og er derfor helt avhengig av enten tilførsel av organisk materiale fra overflaten eller av *in situ* kilder til uorganisk kjemisk energi (kjemolitotrofi). Grotteøkosystem kan derfor klassifiseres inn i to ulike typer: 1) grotteøkosystem avhengig av allohton organisk karbon (i.e., karbon tilført utenfra, heterotrofe organismer) og 2) grotteøkosystem med tilstrekkelig mengde uorganisk kjemisk energi som muliggjør kjemosyntetisk primærproduksjon *in situ* (kjemolitotrofe organismer). Dette er en svært forenklet måte å klassifisere grotter på, og det finnes naturligvis mange tilfeller av grotteøkosystem som er avhengige av både allohton organisk karbon og *in situ* kjemosyntese (Jones & Macalady, 2016).

3.3.4 Tilførsel av organisk karbon

Økosystem som livnærer seg på organisk karbon er avhengig av å få tilførsel av organisk materiale, som for eksempel planterester dannet gjennom fotosyntese. Som følge av det totale mørket som er i grotter er dette materialet dannet ved fotosyntese på overflaten og deretter transportert inn i grotteøkosystemet (Lavoie, 2015). Det organiske materialet tilføres oftest grottesystemet i oppløst- eller partikkelform, sammen med perkolerende eller strømmende vann (Simon et al., 2007). En annen kilde til organisk materiale kan komme fra fekalt materiale fra ulike organismer, som for eksempel guano fra overvintrede flaggermus (Culver & Pipan, 2009). Felles for disse tilførselene av materiale er at de gjerne er sporadiske prosesser, og grotter som avhenger av denne tilførselen defineres derfor som oligotrofe miljø – altså *næringsfattige* miljø (Jones & Macalady, 2016).

3.3.5 Kjemoautotrofi i grotter

Grotter mangler det meste av energien som danner grunnlaget for liv på jordens overflate, som følge av det totale mørket og manglende fotosyntese (Barton, 2006). Forrige avsnitt beskriver hvordan alloktont organisk materiale livnærer grotter, og tidligere ble det antatt at liv i grotter kun livnærte seg på en slik tilførsel. I dag er det derimot kjent at det finnes andre mulige energikilder i grotter, gjerne tilgjengelig fra bergarter eller fra mineralrikt grunnvann (Engel, 2012a). Enkelte mikroorganismer er spesialiserte for slike energikilder, og de skaffer seg derfor energi ved å kjemisk omdanne uorganiske forbindelser og videre gjøre om uorganisk karbon til organisk karbon (Engel, 2012a). Slike mikroorganismer kalles kjemoautotrofer, og er primærprodusenter som skaffer energi fra kjemiske reaksjoner uavhengig av sollys (Culver & Pipan, 2009). Typiske energikilder kan være H_2S , Fe^{2+} eller elementært svovel (Tronsmo, 2016). De kjemoautotrofe organismene som «spiser stein» kalles for kjemolitoautotrofe organismer, og de skaffer energi ved å overføre elektroner fra en kjemisk forbindelse (elektron donor) til en annen (elektronakseptor) (Engel, 2012a).

3.3.6 Det bakterielle samfunnet i grotter

Etter at molekylærbiologiske og kultiveringsuavhengige metoder ble tatt i bruk ble det oppdaget at de fleste karstgrotter inneholder et bredt spekter av ulike mikroorganismer (Barton, 2015). Det mikrobielle samfunnet i oligotrofe grotter domineres ofte av fyla som Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Acidobacteria, Verrumicrobia, Gemmatimonadetes og Nitrospira (Hershey & Barton, 2018). Actinomycetales (Actinobacteria), Firmicutes og Bacteroidetes, er blant de mest studerte heterotrofe organismene man kjenner til. Disse fyla har ulike evner som gjør dem viktige for nedbrytning av organisk materiale i grotter, som videre bidrar med næring til resten av økosystemet. Planctomycetes, Chloroflexi og Acidobacteria er ikke like godt beskrevet som andre fyla, men man tror at de kan ha en like stor fylogenetisk og metabolsk diversitet som det godt beskrevne fylum Proteobacteria. Som følge av utfordringer knyttet til isolering av kultiverbare representanter fra disse fyla, vet man ikke sikkert hvilke roller de har i grottemiljøet. Det at de stadig identifiseres i molekylære analyser fra slike miljø, indikerer likevel at de trolig har metabolske evner som ligner de bedre beskrevne fyla, og at også disse bakteriene er viktige bakterier i grottemiljøet (Barton, 2015, og referanser deri).

Grotter assosiert med svovelsyrespeleogenese (i.e., grottedannelse som følge av frigjort svovelsyre) er eksempler på grotter hvor det bakterielle samfunnet er dominert av kjemolitototrofiske bakterier. I motsetning til grotter som domineres av nedbrytere/heterotrofe bakterier som beskrevet i avsnittet over, har disse økosystemene ofte lavere diversitet. Fra denne type miljø er de fleste bakterier assosiert med svoveloksidasjon og sulfatreduksjon, og er hovedsakelig representert av ulike slekter Proteobacteria (e.g., *Sulfurovum*, *Acidithiobacillus*) (Paterson & Engel, 2015). Betaproteobacteria som *Gallionella* og *Leptothrix* assosieres med grotter som har jern- og manganavsetninger (Saiz-Jimenez, 2015).

3.3.7 Hvorfor er det viktig å studere grottemikrobiologi?

Grotter er laboratorier med enkle naturlige økosystemer hvor man har lett tilgang til å studere underjordiske miljøer. Mikroorganismer i slike miljøer kan brukes til å følge med på klimaendring, forurensning av vann, og til å undersøke hvordan et miljø gjenopprettes etter å ha blitt utsatt for en spesifikk stressfaktor (Lavoie, 2015). Som følge av at mikroorganismer i grottemiljøer ofte har en helt unik biokjemi kan de også brukes til å studere potensielt liv på andre planeter og til å identifisere nye medisiner (Cheeptham, 2013). Det å studere geomikrobiologi i grotter kan ha direkte relevans for studier av liv på andre planeter. Dette er som følge av at grotter som økosystem beskytter dens «beboere» fra skadelige effekter som UV-stråling, samtidig som de stimulerer til vekst av kjemolitotrofe mikroorganismer (Boston et al., 2003).

Fra grottemiljøer har man også oppdaget mikroorganismer som kan bryte ned komplekse kjemiske forbindelser og farlige forurensninger som opptrer i forbindelse med produksjon av plast. Dermed kan mikroorganismer fra grotter også spille en rolle i opprensning av forurensede naturlige habitater (bioremediering) (Barton, 2006). Grottemikrobiologi er med andre ord viktig for mange ulike fagfelt og vil trolig ha stor betydning for verden fremover.

4 Materiale og metode

Dette kapittelet forklarer hvilke metoder og teknikker som har blitt brukt under arbeidet med oppgaven. Metodene inkluderer både feltarbeid, laboratoriearbeid og dataanalyse, og er en kombinasjon av geokjemiske og mikrobiologiske metoder.

4.1 Feltarbeid

4.1.1 Prøvetakingsområdet

Det ble gjennomført to feltperioder på 1 uke hver, i 2017 og 2018. Feltarbeidet ble utført i fem ulike grotter lokalisert i Rana og Fauske kommune, i Nordland (kapittel 2.1). I 2017 ble prøvemateriale samlet i Grønligrotta, Okshola, Hammarnesgrotta og Tukthuset. I 2018 ble prøvemateriale samlet i Grønligrotta, Tukthuset, Okshola og Moengrotta.

4.1.2 Prøvetaking og prøvemateriale

Totalt 31 prøver ble samlet inn fra grottene. Femten prøver ble samlet i september 2017, mens ti prøver ble samlet i august 2018 (tabell 4.1.1). Mineral- og speleothempøver, som inkluderer jarositt, gips og månemelk (figur 4.1.1), ble samlet i sterile 15 og 50 mL Falcon-rør ved bruk av steril spatel. Noen prøver ble tilsatt RNAlater, mens de resterende ikke ble tilsatt noe. RNAlater er en flytende reagens som brukes til å bevare vevsprøver som senere skal brukes i analyse av RNA (Moghen & Halgunset, 2015). Det ble tatt to vannprøver fra hver av grottene (Tukthuset, Okshola og Moengrotta); én hvor vann ble tatt direkte ut av månemelk ved bruk av sprøyte og Rhizon-filterpinne (figur 4.1.2) og én som ble samlet fra dryppende vann som tilsynelatende ikke var i kontakt med månemelk. Vannprøver ble samlet i sterile 50 mL Falcon-rør. Rør med prøver ble videre sikret i poser og holdt mørkt og kaldt i kjøleboks under frakting. Alt av prøvemateriale

ble oppbevart mørkt ved 4 °C frem til det ble brukt i ulike analyser. Dette er forhold som ligner forholdene i de grottene prøvene har blitt hentet fra. Tabell 4.1.1 viser en oversikt over alle mineral- og speleothempøver som ble samlet i 2017 og 2018. Tabell 4.1.2 viser en oversikt over vannprøvene samlet i 2018.



Figur 4.1.1. Venstre: Brungul jarositt og hvit gips på rusten glimmerskifer, Grønligrotta. Høyre: Forekomst av månemelk på marmorvegg, Tukthuset. Foto: Stein-Erik Lauritzen, 2017.



Figur 4.1.2. Prøvetaking av vann i Moengrotta. På fotografiet blir det tatt prøve av vann direkte fra månemelk ved å bruke sprøyte og filterpinne. Prøvetaking av vann fra månemelk ble gjort etter at det var tatt prøver av selve månemelken under sterile betingelser. Foto: Stein-Erik Lauritzen, 2018.

Tabell 4.1.1. Oversikt over mineral- og speleothemprøver som har blitt samlet inn i løpet av feltperiodene i september 2017 og august 2018. Prøvene er hentet fra fem ulike grotter; Grønligrotta, Hammarnesgrotta, Tukthuset, Okshola og Moengrotta. Alle grottene er lokalisert i Rana eller Fauske kommune, i Nordland. Oversikten viser hvilken grotte prøven er hentet fra, prøvenavn, dato for prøvetaking og en enkel beskrivelse av hva som ble tatt prøve av, samt en oversikt over hvilke prøver som ble tilsatt RNAlater.

Grotte	Prøve	Dato hentet	Beskrivelse
Grønligrotta	GR1	25.09.2017	Brungule (jarositt) og hvite (gips) skorper på rusten glimmerskifer.
Grønligrotta	GR2	25.09.2017	Brungule (jarositt) og hvite (gips) skorper på rusten glimmerskifer. Tilsatt RNAlater.
Grønligrotta	GR3	25.09.2017	Brungule (jarositt) og hvite (gips) skorper på rusten glimmerskifer.
Grønligrotta	GR18_1	18.08.2018	Gul, fuktig forekomst av jarositt, med noen hvite gipskrystaller.
Grønligrotta	GR18_2	18.08.2018	Gul, fuktig forekomst av jarositt, med noen hvite gipskrystaller.
Grønligrotta	GR18_3	18.08.2018	Gul, tørr forekomst av jarositt.
Okshola	OXS1	28.09.2017	Skorpe av gips.
Okshola	OXS2	28.09.2017	Skorpe av gips, prøve tilsatt RNAlater.
Okshola	OXS3	28.09.2017	Skorpe av gips.
Okshola	OXS_M1	28.09.2017	2 cm lag av månemelk som ligger over sedimenter.
Okshola	OXS_M2	28.09.2017	2 cm lag av månemelk som ligger over sedimenter.
Okshola	OXS_M3	28.09.2017	2 cm lag av månemelk som ligger over sedimenter.
Okshola	OXS18_1	21.08.2018	Forekomst av månemelk inne i en 5 cm bred sprekk.
Okshola	OXS18_2	21.08.2018	Forekomst av månemelk ved «morenepluggen», prøve tilsatt RNAlater.
Hammarnesgrotta	HMN1	29.09.2017	0,5 cm lag av månemelk på marmorveggen.
Hammarnesgrotta	HMN2	29.09.2017	0,5 cm lag av månemelk på marmorveggen.
Hammarnesgrotta	HMN3	29.09.2017	0,5 cm lag av månemelk på marmorveggen.
Tukthuset	TH1	30.09.2017	Tykk forekomst av månemelk som dekker en hel vegg.

Tukthuset	TH2	30.09.2017	Tykk forekomst av månelk som dekker en hel vegg.
Tukthuset	TH3	30.09.2017	Tykk forekomst av månelk som dekker en hel vegg.
Tukthuset	TH18_1	19.08.2017	4 cm tykk månelk som dekker en hel vegg.
Tukthuset	TH18_2	19.08.2017	4 cm tykk månelk som dekker en hel vegg.
Tukthuset	TH18_3	19.08.2017	4 cm tykk månelk som dekker en hel vegg.
Moengrotta	MO18_1	21.08.2017	Tykk, våt «ball» av månelk som henger ned fra grottetaket.
Moengrotta	MO18_2	21.08.2017	Tykk, våt «ball» av månelk i grottetaket, prøve tilsatt RNAlater.

Tabell 4.1.2. Oversikt over vannprøver som ble samlet inn i august 2018. Prøvene er hentet fra tre ulike grotter; Okshola, Tukthuset og Moengrotta. Alle grottene er lokalisert i Rana eller Fauske kommune, i Nordland. Oversikten viser grotten prøven er hentet fra, prøvenavn, dato for prøvetaking og beskrivelse av hvordan prøven ble tatt.

Grotte	Prøve	Dato hentet	Beskrivelse
Tukthuset	TH18_W	19.08.2018	Tatt fra dryppende vann fra sprekk, ikke i kontakt med månelk.
Tukthuset	TH18_MW	19.08.2018	Vann tatt direkte fra månelk ved hjelp av sprøyte og Rhizon-filterpinne.
Okshola	OKS18_W	21.08.2018	Vann samlet fra dråper, ikke i kontakt med månelk.
Okshola	OKS18_MW	21.08.2018	Vann tatt direkte fra månelk ved hjelp av sprøyte og Rhizon-filterpinne.
Moengrotta	MO18_W	21.08.2018	Tatt fra rennende vann under steiner og blokker, ikke i kontakt med månelk.
Moengrotta	MO18_MW	21.08.2018	Vann tatt direkte fra månelk ved hjelp av sprøyte og Rhizon-filterpinne.

Som følge av at månemelk er en betegnelse på en ytre form heller enn et mineral, kan en slik forekomst kalles månemelk før det har blitt gjennomført geokjemiske analyser som bekrefter sammensetning. Jarositt og gips er derimot mineraler og man bør derfor ha geokjemiske analyser på plass for å få bekreftet den kjemiske sammensetningen, før de konsekvent kalles for jarositt og gips. For enkelhets skyld vil likevel prøvene tatt fra gule og hvite skorper i Grønligrotta og Okshola bli kalt for jarositt og gips, før dette er bekreftet. Dette er for å gjøre det klart hvilke prøver det refereres til.

4.1.3 pH og temperatur

pH ble målt av mineral- og speleothemprøver samlet inn i september 2017. Dette ble gjort på laboratoriet i Bergen, en tid etter prøvetaking. Før måling ble prøvene blandet ut i molekyllært vann. Molekyllært vann er deionisert vann, som er vann fjernet for ioner. I 2018 ble det gjennomført pH-målinger av vannprøver. Dette ble gjort utenfor grottene samme dag som prøvetaking, ved bruk av et Jenway 370 pH-meter.

Temperaturen i grottene ble ikke målt på stedet da grottene har en relativt stabil temperatur gjennom hele året. Denne temperaturen sammenfaller med årsmiddeltemperaturen for det området grotten befinner seg i.

4.2 Geokjemiske analyser

4.2.1 Ionekromatografi (IC)

Konsentrasjonen av anioner i vannprøvene ble bestemt ved ionekromatografi, også kalt *ionebyttekromatografi*. Metoden baserer seg på kromatografisk separasjon og deteksjon av anioner og kationer, hvor ionene blir separert i en separasjonskolonne med ionebyttemateriale. Ionene separeres basert på hastigheten de beveger seg gjennom kolonnen med (Fritz & Gjerde, 2009).

Konsentrasjon ble målt ved bruk av en 732 IC detektor og en Metrosep A Supp 4-250 kolonne (Metrohm). Det ble brukt deteksjonsgrense for ferskvann og verdier under denne grensen ble ikke detektert. Deteksjonsgrensen er 2 ppm for klorid (Cl^-) og nitrat (NO_3^-), 0,2 ppm for bromid (Br^-) og 0,5 ppm for sulfat (SO_4^{2-}). Usikkerhet til målingene er omtrent $\pm 2\%$. Prøver ble håndtert av Hildegunn Almelid ved ICP-MS laboratoriet, ved Bergen Geoanalytiske Fasiliteter.

4.2.2 Induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri

Induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri (ICP-OES) ble brukt til å bestemme konsentrasjonen av ulike grunnstoffer i vannprøvene. ICP-OES er en effektiv teknikk som har stor prøvekapasitet og kan gjennomføre multi-elementanalyse med relativt høy hastighet. Teknikken baserer seg på at prøven, som oftest flytende, konverteres til en aerosol. Aerosolen transporteres gjennom plasmaet, hvor høy temperatur fører til at en liten del eksiteres. De eksiterte atomene og ionene gir opphav til sin egen karakteristiske stråling som instrumentet måler i bølgelengder og deretter fremstiller som konsentrasjon (Boss & Fredeen, 2004).

Konsentrasjonen av de ulike grunnstoffene ble målt ved å bruk av en Thermo Scientific iCAP 7600. Det ble brukt deteksjonsgrense for ferskvann og verdier under denne grensen ble ikke detektert. Deteksjonsgrensen er 1 ppm for natrium (Na), 0,1 ppm for kalsium (Ca) og kalium (K), 0,05 ppm for mangan (Mn), 0,02 ppm magnesium (Mg), 0,00125 ppm for strontium (Sr) og 0,001 ppm for jern (Fe). Instrumentet gjør tre målinger per element, og konsentrasjonen som fremstilles er gjennomsnittet av disse tre målingene. Prøver ble håndtert av Hildegunn Almelid ved ICP-MS laboratoriet, ved Bergen Geoanalytiske Fasiliteter.

4.2.3 Energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS)

Elementanalyse av prøvene ved energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS eller EDX) ble gjennomført som en del av undersøkelsene i sveipelektronmikroskop (SEM). Hvert grunnstoff har sitt spesifikke emisjonsspekter for røntgenstråler og

dette utnytter EDS for å kunne identifisere de ulike grunnstoffene. Alle grunnstoff fra atomnummer 4 (Beryllium) til 92 (Uran) kan måles med denne metoden (CFAMM, u.å.). Det er feilkilder tilknyttet EDS da bildet kan vandre slik at man ikke treffer ønsket punkt, og derfor leser av et ikke-representativt resultat.

4.2.4 Røntgendiffraksjon (XRD)

Røntgendiffraksjon er en teknikk som brukes for å studere krystallstruktur og for å bestemme mineralogien til finkornede sedimenter. Metoden er enkel å gjennomføre og man trenger kun en liten mengde materiale (Poppe et al., 2001).

XRD ble gjennomført ved bruk av en D8 Advance Eco røntgendiffraksjonskanner (BRUKER) på prøvene GR18, OKS18, MO18 og TH18. Prøvene ble lufttørket før de ble knust med en morter og tilsatt noen dråper destillert vann. Deretter ble prøvene jevnt fordelt på en glassplate, hvor de igjen fikk lufttørke. Programvaren DIFFRAC.EVA.V4.1.1 og Crystallography Open Database ble brukt til å analysere og tolke de oppnådde spektrene.

4.3 Dyrking

Prøver av månemelk og jarositt/gips ble benyttet som inokulum på definerte medier. Inokulum er termen som brukes når mikroorganismer settes til et medium, mens de mikroorganismene som vokser opp på mediet kalles for en kultur (Tronsmo, 2016). Dyrkingeksperimentet ble gjennomført for å identifisere det kultiverbare samfunnet i prøvene. Videre ble det prøvd å identifisere bakterier som spiller en aktiv rolle i biomineralisering av månemelk og jarositt/gips.

Det ble brukt flere typer definerte medier til dyrkingen. Thiosulfat-agar (TSA) og sulfitt-agar (SA) er medier som brukes til å dyrke bakterier som utnytter svovel i sin metabolisme. Trippel B4-agar (TB4) er et medium som brukes til å undersøke kalsittutfelling fra bakterier (Marvasi et al., 2012). Dette mediet ble brukt for å undersøke om bakterier isolert fra månemelk har evnen til å felle ut CaCO_3 .

Næringsagar (NA) ble brukt som et generelt medium, for å kunne dyrke opp mest mulig av de kultiverbare bakteriene. R2A-medium er et næringsfattig medium som ble brukt for å dyrke opp bakteriene tilpasset et oligotroft miljø (Reasoner & Geldreich, 1985). Oppskrifter på medier finnes i vedlegg D.

Thiosulfat-agar og sulfitt-agar (Baskar et al., 2011) ble inokulert med jarositt. Næringsagar (Baskar et al., 2011) og R2A-agar ble inokulert med både jarositt og månemelk. Trippel B4-agar (Baskar et al., 2011) ble inokulert med månemelk. Medier med inokulum ble inkubert mørkt ved 4 °C. Etter inkubering ble kolonier med ulik morfologi plukket og strøket ut på nye agar-plater med samme medium, for å oppnå renkultur. Renkulturer ble videre analysert i sveipelektronmikroskop (kapittel 4.4.1) og ved bruk av molekylærbiologiske metoder (kapittel 4.5.6).

Renkulturer brukt til molekylærbiologiske metoder ble til slutt strøket ut på både TB4- og R2A-medium og deretter undersøkt i SEM. Dette ble gjort for å undersøke om det kunne observeres ulikheter i veksten på mediene, og for å undersøke om begge mediene ville vise utfelling av CaCO₃.

4.4 Mikroskopi

4.4.1 Sveipelektronmikroskop (SEM)

Sveipelektronmikroskop brukes i geomikrobiologi til å ta bilder av prøver som inneholder både mineraler og celler, slik at samhandlingen mellom dem kan undersøkes (Schädler et al., 2008). SEM gir tredimensjonale bilder med informasjon om prøvens morfologi og topografi, og er derfor viktige for å kunne studere både cellestrukturer og krystallmorfologi på detaljnivå (Tronsmo, 2016).

Miljøprøver og stammer isolert fra dyrkingeksperiment ble preparert for analyser i SEM. Prøvemateriale eller celler ble fiksert i 2.5% glutaraldehyde, og deretter filtrert på 0,22 µm polykarbonatfilter i en Millipore-manifold. Videre ble det gjennomført en dehydreringsserie med etanol på filtrene (1 x 50%, 1 x 75%, 2 x

96%, 10 minutt hver). Filtrene ble til slutt lufttørket og plassert på aluminiums-stubber. Stubber med filter ble belagt gull/palladium, iridium eller karbon (tabell 4.4.1), før undersøkelse i SEM. Hvilket belegg man bruker avhenger av om man ønsker gode bilder eller om man skal gjennomføre elementanalyse. Både iridium og gull/palladium fungerer godt når man hovedsakelig ønsker gode bilder (I. Heggstad 2018, personlig kommunikasjon, 2 oktober).

Tabell 4.4.1. Oversikt over prøver som ble undersøkt i sveipelektronmikroskop, med dato for første undersøkelsen og hvilket belegg de fikk før analyse. Au/Pd = gull/palladium.

Prøver	Dato undersøkt	Belegg
GR18_1, GR18_3	02.10.2018	Karbon
OKS18_1, MO18_1, TH18_1	02.10.2018	Iridium
GR18_1, GR18_3, OKS18_1	12.10.2018	Au/Pd
MO18_1, TH18_1	12.10.2018	Iridium
TH1 1, TH1 2, TH1 3, TH1 4 (kulturer)	04.02.2019	Iridium
MO18 1, MO18 2, OKS18 1 (kulturer)	13.03.2019	Au/Pd
OKS18 4, TH18 1, GR18 1 (kulturer)	13.03.2019	Au/Pd
TH18 x 2, OKS18 x 2, MO18 x 2 (kulturer)	27.03.2019	Iridium

4.4.2 Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)

Fluorescerende *in situ* hybridisering er en kultiveringsuavhengig analysemetode som bruker spesifikke nukleinsyreprober bundet til fluorescerende stoffer for å identifisere celler (Wagner et al., 2003). En nukleinsyreprobe er en oligonukleotid (i.e., kort fragment av enkelttrådet DNA eller RNA) som er komplementær til en sekvens i et målgen eller i rRNA (16S eller 23S rRNA i prokaryoter) (Madigan et al., 2015). FISH muliggjør det å identifisere både kultiverbare og ikke-kultiverbare mikroorganismer på en rask og effektiv måte, ved å kombinere presisjonen til molekylærgenetikk med den visuelle informasjon mikroskopi gir (Moter & Göbel, 2000). Metoden har derfor blitt en av de mest foretrukne metodene når målet er å undersøke mikroorganismer i miljøprøver (Amann et al., 2001). Det at FISH muliggjør direkte kvantifisering av celler, i stedet for å kun telle oppdyrkede celler, gjør at man også unngår «The Great Plate Anomaly», hvor bare 1% av bakteriene lar seg dyrke opp (Staley & Konopka, 1985).

Probene som brukes kan designes til å være spesifikke, og da kun reagere med én art, eller til å være generelle slik at man kan se alle celler som hører under et domene (e.g., bakterier). Teknologien muliggjør i tillegg det å bruke flere ulike prober under samme eksperiment, slik at en spesifikk og en generell probe kan kombineres til å beregne prosentandelen av den spesifikke arten (Madigan et al., 2015).

Før hybridisering ble prøver homogenisert og fiksert i 1-2% paraformaldehyd ved 4 °C over natten. Dette er for å fikserte cellene samtidig som de blir permeable for de fluorescerende probene (Moter & Göbel, 2000). Deretter ble fikserte prøver filtrert på 0,22 µm polykarbonatfilter i en Millipore-manifold. Filtrene ble oppbevart ved –20 °C. Hybridisering ble gjort etter protokollen (vedlegg C) med fluorkromer (i.e., fargestoff som avgir fluorescens) lagt til probene. Etter hybridisering ble filtrene farget med DAPI (4',6-diamidino-2 phenylindole); et fargestoff som binder seg til all DNA. Proben NON338 [Cy3] ble brukt som negativ kontroll. FISH ble gjennomført før resultatet fra Illumina-sekvensering var klart, og prober ble derfor valgt ut basert på tidligere arbeid på lignende prøver og miljø. Probene som ble brukt var derfor ikke optimalisert for våre prøver. Det ble brukt både generelle og spesifikke prober (tabell 4.4.2).

Tabell 4.4.2. Nukleinsyreprober brukt til fluorescerende *in situ* hybridisering. Probene ble brukt på både månemelk og jarositt/gips. Alle probene var merket med fluorkrom Cy3 på 5'-enden.

Probe	Målgruppe	Referanse
EUB338 I	De fleste bakterier	(Amann et al., 1990)
EUB338 II	<i>Planctomycetales</i>	(Daims et al., 1999)
EUB338III	<i>Verrucomicrobiales</i>	(Daims et al., 1999)
NON338	–	(Wallner et al., 1993)
HGC236	<i>Actinobacteria</i>	(Erhart et al., 1997)
BET42a	<i>Betaproteobacteria</i>	(Manz et al., 1992)
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	(Manz et al., 1992)

For å kunne detektere nesten alle bakterier, ble det brukt en 1:1:1 blanding av EUB338 I, EUB338 II og EUB338 III (kjent som EUBMIX).

GAM42a binder i noen tilfeller til DNA av Betaproteobacteria, og BET42a gjør noen ganger det samme med Gammaproteobacteria (Manz et al., 1992). Det ble derfor brukt en 1:1 blanding av disse probene (GAMBET), som detekterer begge grupper uten å skille mellom dem.

Undersøkelser i fluorescensmikroskop ble gjort ved bruk av et Zeiss Axio Imager Z.1 eplifluorescensmikroskop. Bilder ble tatt ved hjelp av kameraet Zeiss AxioCam MRm og programvaren Zeiss AxioVision. Som følge av at de undersøkte prøvene var mineral- og speleothemprøver med tykke utfellinger, ble bilder på ulike plan i preparatene satt sammen til ett bilde, hvor alle dybdene er i fokus. For å få bilder med ulike filter ble det brukt flerkannelsfluorescens.

Det ble i forbindelse med undersøkelsene også gjennomført telling av celler farget med DAPI, ved hjelp av rutenett i mikroskopet. Etter telling ble konsentrasjonen av celler per gram (våtvekt) beregnet (formel 4.1).

$$\frac{\text{celler}}{g} = \frac{\frac{\text{celler}}{\text{antall telleruter i rutenettet}} \times \frac{\text{filtreringsområde}}{\text{telleområde}} \times \text{fortynning}}{\text{homogenisert masse i gram}} \quad (4.1)$$

Det var ikke mulig å telle celler merket med prober direkte i mikroskop fordi intensiteten til Cy3-fluorokromet var for lav. Det var likevel mulig å ta bilder fordi kameraet overeksponerer preparatet, slik at de detekterte cellene blir synlige.

4.5 Molekylærbiologiske metoder

4.5.1 DNA-ekstraksjon

Miljøprøver tilsatt RNAlater ble brukt til DNA-ekstraksjon. RNAlater ble fjernet ved at prøvene ble overført til nye rør hvor de ble tilsatt enten sterilfiltrert PBS eller ultrarent vann. Deretter ble rørene sentrifugert i 30 minutt på 10400 rpm. Supernatanten (i.e., væsken som flyter over det faste residuet) ble så fjernet fra røret og prøvene var klar for ekstraksjon av DNA. Prøver av månemelk var etter

denne behandlingen knust og finkornet, mens jarositt/gips i tillegg måtte knuses med steril morter.

DNA fra månemelk og jarositt/gips ble ekstrahert ved bruk av The PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Labaroties, Inc.). Ekstraksjonen ble utført etter produsentens protokoll (MO BIO, 2014). Det ble i tillegg gjennomført DNA-ekstraksjon fra prøver av jarositt/gips ved bruk av CTAB (cetrimoniumbromid). Denne ekstraksjonsmetoden involverer flere steg med tilsetning av ulike reagenser, i tillegg til flere runder med inkubering på ulike temperaturer (vedlegg C). All ekstrahert DNA ble oppbevart ved -20 °C. Oversikt over mengde materiale brukt i DNA-ekstraksjon og hvilken ekstraksjonsmetode som er brukt er gitt i tabell 4.5.1.

Tabell 4.5.1. Oversikt over mengde materiale som ble brukt i DNA-ekstraksjon, fra de ulike prøvene av månemelk og jarositt/gips. Tabellen viser også hvilken metode for DNA-ekstraksjon som ble brukt.

Prøve	Mengde	Type materiale	Ekstraksjonsmetode
GR2	0,44 g	Jarositt/gips	PowerSoil
OKS2	0,59 g	Jarositt/gips	PowerSoil
OKS_M3	0,47 g	Månemelk	PowerSoil
HMN3	0,48 g	Månemelk	PowerSoil
TH3	0,52 g	Månemelk	PowerSoil
OKS18_2 I	0,30 g	Månemelk	PowerSoil
OKS18_2 II	0,41 g	Månemelk	PowerSoil
MO18_3	0,37 g	Månemelk	PowerSoil
TH18_3	0,18 g	Månemelk	PowerSoil
GR2	0,59 g	Jarositt/gips	CTAB
OKS2	0,56 g	Jarositt/gips	CTAB

4.5.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Polymerasekjedereaksjon (PCR) ble brukt for å amplifisere 16S rRNA-gen fra miljø-DNA. Denne sekvensen brukes for å identifisere prokaryote medlemmer av det mikrobielle samfunnet. Det ble brukt generelle primere mot bakterie- og arke-16S rRNA genet, som skal fange store deler av begge domener. Amplifisering av 18S rRNA-gen ble gjort for å identifisere eukaryote medlemmer av samfunnet. PCR foregår i tre trinn som gjentas i et bestemt antall sykluser. Første trinn er denaturering som fører til at DNA-templatet som er dobbeltrådet, deles i to tråder. Andre trinn er annealing, som er det trinnet hvor de spesielt utvalgte primerne binder seg til en bestemt målsekvens (templatet). Tredje trinn er polymerisering, som er det trinnet hvor det syntetiseres en komplementær kopi av templatet. De tre trinnene gjentas i antall sykluser som er valgt (Tronsmo, 2016).

For amplifisering av 16S rRNA-gen ble det tilsatt 5 µL DNA-templat til en masterblanding med følgende reagenser; 10µL HotStarTaq DNA-polymerase (Qiagen), 0,5 µL 100% BSA, 1 µL 519F-primer (10 µM), 1 µL 806RB-primer (10 µM) (tabell 4.5.2) og 2,5 µL dsH₂O. PCR-program ble kjørt som vist i tabell 4.5.3.

Tabell 4.5.2. Primerne som ble brukt i PCR-reaksjonen for å amplifisere 16S rRNA-gen. Primerne var fortynnet til 10 µM. **M=A/C, H=A/C/T, V=A/C/G, W=A/T.**

Primer	Målsekvens (5'-3')	Referanse
519F	CAGCMGCCGCGGTAA	(Øvreås et al., 1997)
806RB	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	(Apprill et al., 2015)

Tabell 4.5.3. PCR-program for HotStarTaq DNA-polymerase. Det første trinnet med 95 °C må være tilstede for at Taq-polymerasen, som er varmestabil, skal virke. Forskjellige antall sykluser ble prøvd ut før det optimale antall ble bestemt.

Temperatur	Minutter	Antall sykluser
95°C (Hot start)	15:00	1
95°C	00:20	} 25
55°C	00:30	
72°C	00:30	
72°C	07:00	1
4°C	∞	1

For amplifisering av 18S rRNA-gen ble templat tilsatt en masterblanding med 10 µL HotStarTaq DNA-polymerase (Qiagen), 0,5 µL 100% BSA, 1 µL EUK566f-primer (10 µM), 1 µL Euk1200r-primer (10 µM) (tabell 4.5.4) og 2,5 µL dsH₂O. PCR-program ble kjørt som beskrevet i tabell 4.5.5.

Tabell 4.5.4. Primerne som ble brukt i PCR-reaksjonen for å amplifisere 18S rRNA-gener. Primerne var fortynnet til 10 µM.

Primer	Måsekvens (5'-3')	Referanse
Euk566f	CAG CAG CCG CGG TAA TTC C	(Hadziavdic et al., 2014)
Euk1200r	CCC GTG TTG AGT CAA ATT AAG	(Hadziavdic et al., 2014)

Tabell 4.5.5. PCR-program for amplifisering av 18S rRNA-gen. Det første trinnet med 95 °C må være tilstede for at Taq-polymerasen (HotStar) som er varmestabil, skal virke. Forskjellige antall sykluser ble prøvd ut før det optimale antall ble bestemt.

Temperatur	Minutter	Antall sykluser
95 °C (Hot start)	15:00	1
95 °C	00:30	} 28
56 °C	00:30	
72 °C	01:00	
72 °C	07:00	1
4 °C	∞	1

For vanskelige prøver ble det gjort flere justeringer for å prøve og få et positivt PCR-produkt. Det ble brukt ulike ekstraksjonsmetoder (PowerSoil® og CTAB). Videre ble det gjennomført forsøk med både BSA (bovint serumalbumin) og DMSO (dimetylsulfoksid) i PCR-reaksjonen. Disse løsningene bidrar til å øke utbytte fra PCR-reaksjonene når prøven er uren, ved å binde urenheter som kan hemme PCR-reaksjonen. BSA gav bedre resultat og ble derfor brukt videre i reaksjonene. Vanskelige prøver ble i tillegg tilsatt *E. coli* for å undersøke om det kunne være komponenter i prøvene som hindret PCR-reaksjonen.

4.5.3 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese ble brukt til å undersøke kvaliteten på amplifiserte PCR-produkt. Metoden brukes til å skille og identifisere fragmenter av DNA eller RNA på en gel laget av agarose. Gelen inneholder et fluorescerende fargestoff (GelRed) som binder seg til DNA slik at det er mulig å visualisere det under UV-lys.

2 µL av DNA-størrelsesmarkør (GeneRuler 1kb DNA-stige, Thermo Scientific) og 3 µL av PCR-produkt sammen med en lastefarge (6x loading dye) ble tilsatt i hver sine brønner i gelen. Gelelektroforese ble gjort ved å bruke 1xTAE-buffer med 1% agarose og 0,004% GelRed. DNA ble visualisert med UV-lys for å kunne bestemme styrke av DNA.

4.5.4 Illumina-sekvensering

DNA fra månemelk ble preparert for Illumina-sekvensering for å karakterisere det prokaryote samfunnet i prøvene. Illumina er annengenerasjons DNA-sekvensering («high-throughput sequencing»), som er en metode hvor man kan sekvensere et stort antall prøver samtidig i samme maskin (Illumina, 2017).

Preparering av prøver ble gjort i henhold til Nextera-protokollen fra Illumina («16S rRNA Amplicon protocol for Illumina dual nested PCR») (vedlegg C). 16S rRNA-gen ble amplifisert i første PCR (kapittel 4.5.2) og deretter rensset ved bruk av AMPure XP beads (Beckman Coulter). Videre ble DNA-konsentrasjon målt ved hjelp av et Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen). DNA-konsentrasjonen ble brukt for å bestemme mengde templat til den andre PCR-reaksjonen.

For 2. PCR-reaksjon ble det brukt fremover- og revers-primere med unike identifikasjonsmarkører («barcode») for hvert av templatene (tabell 4.5.6). PCR-programmet ble optimalisert og kjørt som beskrevet i tabell 4.5.7.

Tabell 4.5.6. Oversikt over hvilke primerkombinasjoner som ble brukt til hvilke prøver i den andre PCR-reaksjonen. Dette er den andre og siste reaksjonen som gjennomføres som en del av en to-trinns PCR, før produktene renses og klargjøres for DNA-sekvensering ved Illumina. F er fremover-primer, R er revers-primer.

Primer	Identifikasjonsmarkør	Prøve
F4	AGAGTAGA	Alle prøvene
R1	TCGCCTTA	HMN3 I
R2	CTAGTACG	HMN3 II
R3	TTCTGCCT	OKS_M3
R4	GCTCAGGA	OKS18_2 I
R5	AGGAGTCC	OKS18_2 II
R6	CATGCCTA	TH3

Tabell 4.5.7. Termale forhold under PCR-reaksjonen i andre trinn av en to-trinns PCR. Det første trinnet med 95 °C må være tilstede for at Taq-polymerasen (HotStar) skal virke.

Temperatur	Minutter	Antall sykluser
95 °C (Hot start)	15:00	1
95 °C	00:20	10
62 °C	00:30	
72 °C	00:30	
72 °C	07:00	1
4 °C	∞	1

Etter 2. PCR-reaksjon ble produktene igjen renses ved å bruke AMPure XP beads. Produktene ble deretter målt på både et Qubit 2.0 fluorometer og på NanoDrop. Sistnevnte brukes for å bestemme A260/280 og A260/230-forholdene, som gir informasjon om tilstedeværelse av forurensninger i prøvene. Videre ble alle prøver slått sammen i ekvimolare mengder basert på den målte DNA-konsentrasjonen, før de ble sendt inn til Illumina-sekvensering.

4.5.5 Bioinformatikk

Etter sekvensering ble råsekvenser prosessert og renses ved bruk av Mothur v.1.41.3 med fremgangsmåten som beskrevet i MiSeq SOP (Kozich et al., 2013), slik at man ender opp med sekvenser av god kvalitet. Videre ble OTU-er (operasjonelle taksonomiske enheter) bestående av sekvenser som var 97% like

eller mer, samlet til én OTU, og «alignet» (justert) mot SILVA (v132) databasen, for å finne taksonomisk tilhørighet (Quast et al., 2012). Bioinformatikk og prosessering av råsekvenser ble gjennomført av Julia E. Storesund.

Ved bruk av R-pakken Vegan (R Core Team, 2018; Oksanen et al., 2019) ble det gjort beregninger av ulike diversitetsindekser, samt laget NMDS (ikke-metrisk multidimensjonal skalering). Diversitetsindekser brukes for å estimere biodiversiteten i et samfunn. Biodiversiteten til et samfunn forteller noe om hvor mange arter som forekommer der og hvor mange individer som representerer de ulike artene (UiO, 2019). De tre diversitetsindeksene som ble beregnet inkluderer Chao1, Shannon Diversity og Pielou's Evenness. Chao1 viser antall arter som sannsynligvis finnes i prøven, Shannon er beregnet på bakgrunn av antall OTU-er og hvordan disse er fordelt, mens Pielou's sier noe om hvor jevnt fordelt OTU-ene er. Beregningene ble gjennomført av Julia E. Storesund.

4.5.6 DNA-sekvensering av renkultur

Etter renkultur var oppnådd i dyrkingeksperimentet (kapittel 4.3) ble kolonier plukket og overført til rør med 10 µl ultrarent vann. Rørene ble satt på en 80 °C varmeblokk i 2 minutter og deretter på is i 2 minutter. Dette ble repetert to ganger. Cellesuspensjonen ble videre brukt som templat i en PCR-reaksjon for amplifisering av 16S rRNA-gen, med samme reagenser som beskrevet i kapittel 4.5.2. PCR-programmet ble kjørt som beskrevet i tabell 4.5.8.

Tabell 4.5.8. PCR-program for preparering av DNA til BigDye-sekvensering. Dette ble gjort på isolater fra dyrkingeksperimentet.

Temperatur	Minutter	Antall sykluser
95 °C (Hot start)	15:00	1
95 °C	00:45	28
55 °C	00:45	
72 °C	01:00	
72 °C	07:00	1
4 °C	∞	1

PCR-produktene ble rensset ved bruk av Illustra™ ExoProStar™, for å oppnå ren DNA. 5 µL av PCR-produktet ble tilsatt i nye rør sammen med 2 µL ExoProStar. PCR-program for rensing var 15 minutter ved 37 °C etterfulgt av 15 minutter ved 80 °C. Rensede PCR-produkt ble videre preparert for sekvensering med BigDye. For hvert templat ble det brukt 1 µL BigDye, 1 µL sekvenseringsbuffer, 3,2 µL primer og 2,8 µL dsH₂O og 2 µL PCR-produkt. PCR-programmet ble kjørt som beskrevet i tabell 4.5.9.

Tabell 4.5.9. PCR-program for amplifisering av 16S rRNA-gen. Isolater ble brukt som DNA-templat i reaksjonen.

Temperatur	Minutter	Antall sykluser
96 °C	05:00	1
96 °C	00:10	25
55 °C	00:05	
60 °C	04:00	
4 °C	∞	1

PCR-produkt ble sendt inn til Sekvenseringslaboratoriet ved Institutt for biovitenskap, for DNA-sekvensering.

Sekvensene ble rensset i Chromas, før revers- og fremover-sekvens ble satt sammen i JalView (Waterhouse et al., 2009). Til slutt ble sekvensene justert («alignet») og ferdigstilt i ClustalO (Sievers et al., 2011). For å identifisere organismene ble sekvensene sammenliknet med sekvenser i BLAST-databasen til GenBank (Altschul et al., 1990).

5 Resultat

Resultat fra denne studien kommer fra undersøkelser av jarositt, gips og månemelk, samlet inn fra kalde grotter i Nordland. Det er i tillegg gjennomført analyser av vannprøver. I dette kapittelet presenterer hovedresultatene, mens tilleggsinformasjon er presentert i vedlegg.

5.1 Prøvemateriale

5.1.1 pH og temperatur

Årsmiddeltemperatur for Rana er 3,1 °C (KSS, 2016), og gjelder for Grønligrotta, Tukthuset og Hammarnesgrotta. For Fauske er årsmiddeltemperaturen 4,1 °C (KSS, 2016), og gjelder for Okshola og Moengrotta. At grottenes temperatur ligger nær årsmiddeltemperatur for området de befinner seg i, ble bekreftet i en studie fra Søylegrotta i Rana (Lauritzen & Lundberg, 1999). Temperaturen i Søylegrotta ble målt i ett sammenhengende år, hvor resultatet ble en grottetemperatur på 2,8 °C ($\pm 0,32$ °C), som er nær årsmiddeltemperaturen for Rana.

pH-målinger av mineral- og speleothemprøver, samt vannprøver, er presentert i tabell 5.1.1. Målingene viser en pH-verdi på 9,3-9,8 for alle prøver av månemelk. Vannprøver tatt av både dryppende vann og vann tatt direkte ut fra månemelk, viser en trend der pH-verdien i vann fra månemelk er litt høyere. Målt pH av jarositt/gips lå på 4,30 (Grønligrotta) og 6,36 (Okshola). Det er feilkilder tilknyttet pH-måling av speleothem- og mineralprøvene da prøvene ble suspendert i vann før måling. Vannet var ultrarent vann, men det at prøven fortynnes vil likevel påvirke resultatet. Tilførsel av H₂O reduserer konsentrasjonen av ioner (H⁺ og OH⁻), og dermed vil pH gå mot 7. Man trenger likevel en fortynning x10 for å endre pH-verdien med 1. Her ble prøvene fortynnet 2-4 ganger og differansen mellom målingene og den reelle pH er trolig bare noen tidels pH.

Tabell 5.1.1. Oversikt over pH-verdier av både mineral-, speleothem- og vannprøver. Måling av mineral- og speleothemprøver ble gjort en tid etter prøvetaking. Måling av vannprøver ble gjort samme dag som prøvetaking.

Grotte	pH	Type prøve
Okshola	9,72	Månemelk
Okshola	6,36	Jarositt/gips
Hammarnesgrotta	9,39	Månemelk
Tukthuset	9,76	Månemelk
Grønligrotta	4,30	Jarositt
Tukthuset	8,05	Vann fra månemelk
Tukthuset	7,97	Dryppende vann
Moengrotta	8,07	Vann fra månemelk
Moengrotta	8,00	Dryppende vann
Okshola	8,18	Vann fra månemelk
Okshola	8,14	Dryppende vann

5.1.2 Våtvekt og tørrvekt

Våtvekt- og tørrvektsanalyse ble gjennomført på fire prøver av månemelk, og viste at vanninnholdet i prøvene varierte fra 69-93%. Prøvene inkluderer TH1 fra Tukthuset (85%), HMN1 fra Hammarnesgrotta (93%), OKS_M1 fra Okshola (69%) og MO18_1 fra Moengrotta (84%).

Analysen ble gjort en stund etter at prøvene ble samlet inn (opptil 12 mnd), og det er derfor mulig at resultatene ikke er representative. Prøvene har derimot vært lagret i lukkede Falcon-rør hele tiden frem til analyse, som betyr at de har hatt stabile forhold som ligner *in situ* forholdene i grotten. Rørene har vært åpnet i forbindelse med andre metoder, men man kan likevel anta at fordampning og lignende ikke har en stor effekt.

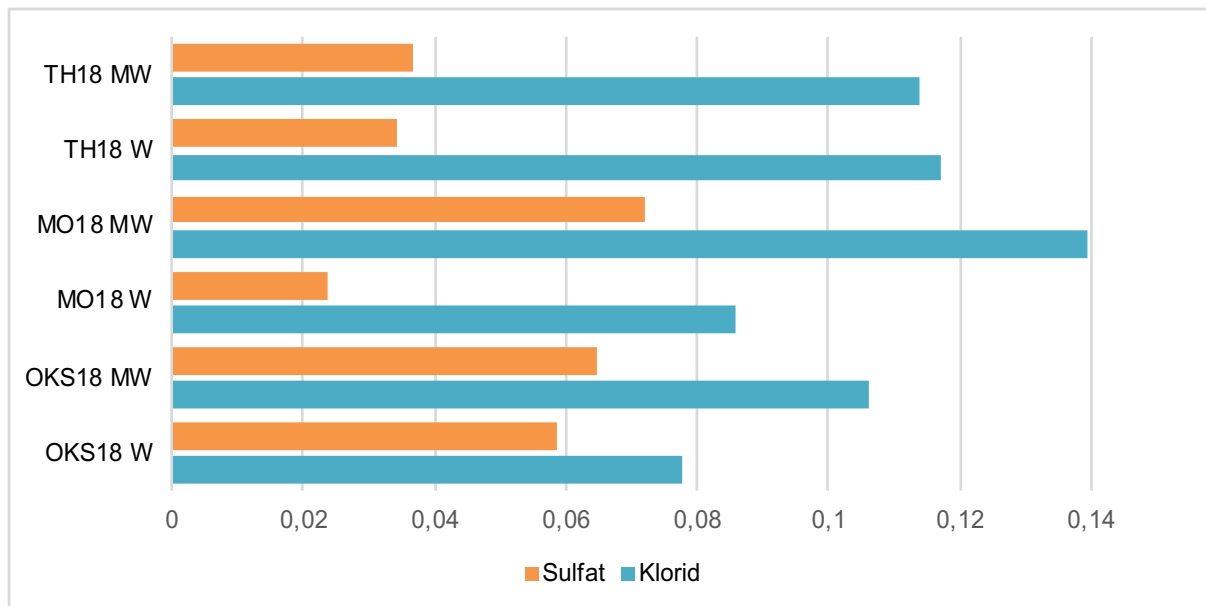
Vanninnholdet i månemelk er generelt høyt, og kan være alt fra 40 til 96% (Hill & Forti, 1997). I en studie fra Italia hadde månemelk et vanninnhold på mellom 77-93,5% (Borsato et al., 2000), som ligner på vanninnholdet i prøvene fra Nordland.

5.2 Geokjemiske analyser

5.2.1 Ionekromatografi (IC)

I Moenggrotta og Okshola er konsentrasjonen av klorid (Cl^-) høyere i prøvene av vann tatt direkte ut fra månelmelk (heretter månelmelkvann), enn i prøvene tatt av dryppende vann (heretter dryppevann). Forskjellen mellom månelmelkvann og dryppevann er 0,032 mMol/L for Okshola og 0,054 mMol/L for Moenggrotta. I prøvene fra Tukthuset er det kun 0,01 mMol/L forskjell mellom prøvene, og man kan se på forskjellen som ubetydelig (figur 5.2.1).

Konsentrasjonen av sulfat (SO_4^{2-}) er høyere i månelmelkvann enn dryppevann for alle tre grotter, med størst forskjell i prøvene fra Moenggrotta (0,048 mMol/L) (figur 5.2.1)



Figur 5.2.1. Konsentrasjon av sulfat (oransje) og klorid (blå) i de ulike vannprøvene. MW viser til vann tatt fra månelmelk, mens W viser til dryppende vann.

Konsentrasjon av både klorid og sulfat er vist ved tabell 5.2.1. Konsentrasjonen av bromid (Br^-) og nitrat (NO_3^-) var under deteksjonsgrensene på henholdsvis 0,2 og 2 ppm.

Tabell 5.2.1. Konsentrasjon av anioner bestemt ved ionekromatografi. Tabellen viser kun resultatet av klorid og sulfat, da alle målinger av bromid og nitrat var under deteksjonsgrensen. MW viser til vann fra månemelk, mens W viser til dryppende vann.

Prøve	Cl ⁻ (ppm)	Cl ⁻ (mMol/L)	SO ₄ ²⁻ (ppm)	SO ₄ ²⁻ (mMol/L)
OXS18_W	2,75	0,078	5,62	0,059
OXS18_MW	3,77	0,11	6,20	0,065
MO18_W	3,05	0,086	2,26	0,024
MO18_MW	4,94	0,14	6,92	0,072
TH18_W	4,15	0,12	3,28	0,034
TH18_MW	4,04	0,11	3,53	0,037

5.2.2 Induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektrometri

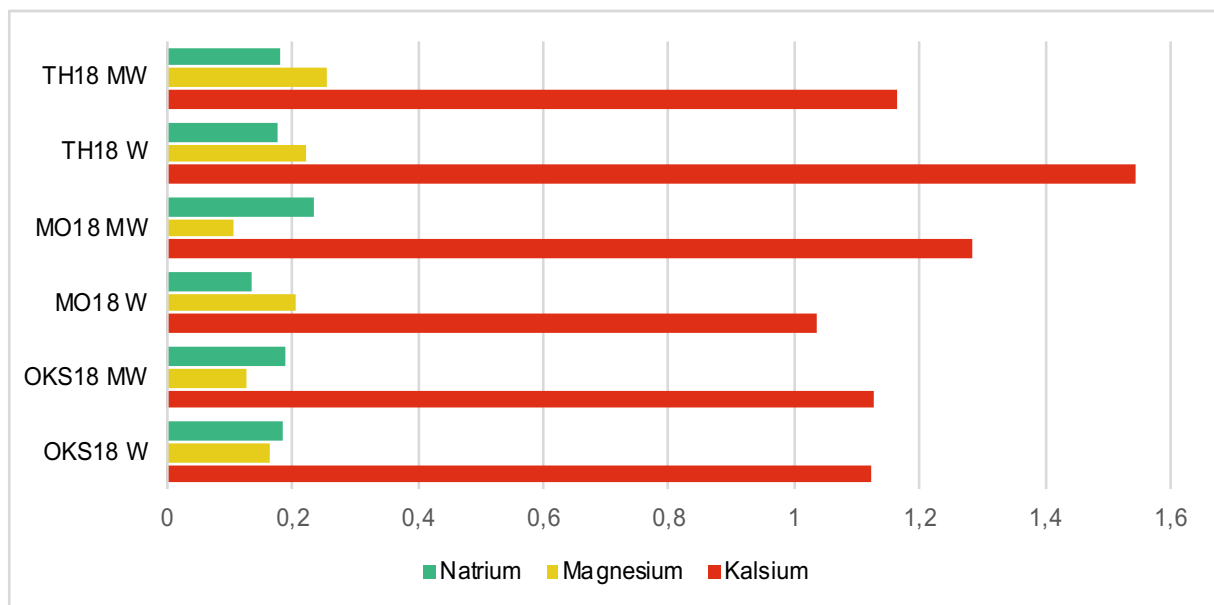
Kalsium (Ca²⁺) er det dominerende kationet for alle seks prøver. Videre følger natrium (Na⁺) og magnesium (Mg²⁺), mens konsentrasjonen av de resterende elementene (jern, kalium og strontium) er i svært små mengder (10⁻⁵ – 10⁻⁸ mMol/L) (tabell 5.2.2). Usikkerheten til målingene er større desto nærmere deteksjonsgrensen konsentrasjonen av elementet er. Det er derfor en større usikkerhet i målingene til de tre sistnevnte, enn for elementene med høyere konsentrasjon.

Konsentrasjonen av natrium er høyere i månemelkvann enn dryppevann for alle tre grotter. Verdiene for de ulike vannprøvene er likevel relativt like med konsentrasjoner på 0,18-0,23 mMol/L for månemelkvann, og 0,13-0,18 mMol/L for dryppevann.

Konsentrasjonen av magnesium er i prøvene fra Tukthuset høyere i månemelkvann enn dryppevann, mens den er høyere i dryppevann enn månemelkvann for både Moengrotta og Okshola. I Moengrotta og Okshola er magnesiumkonsentrasjonen i månemelkvann 0,11-0,12 mMol/L, mens den i månemelkvann fra Tukthuset er 0,26 mMol/L. Konsentrasjonen i dryppevann er 0,22 mMol/L for Tukthuset, og 0,16-0,20 mMol/L for Moengrotta og Okshola.

For konsentrasjonen av kalsium viser alle tre grotter ulike resultat. I Tukthuset er det en høyere konsentrasjon i dryppevann (1,54 mMol/L) enn i månemelkvann (1,17 mMol/L), og det er i disse to prøvene man ser den største forskjellen. I Moengrotta er kalsiumkonsentrasjonen høyere i månemelkvann (1,28 mMol/L) enn i dryppevann (1,03 mMol/L). I vannprøvene fra Okshola er konsentrasjonen nærmest helt lik for begge typer vannprøver.

Konsentrasjon av natrium, magnesium og kalsium er fremstilt i figur 5.2.2. Konsentrasjon av alle målte kationer er vist ved tabell 5.2.2.



Figur 5.2.2. Konsentrasjonene av natrium (grønn), magnesium (gul) og kalsium (rød) i de ulike vannprøvene. MW viser til vann fra månemelk, men W viser til dryppende vann. Disse tre elementene var de mest dominerende i alle prøvene, mens jern, kalium og strontium kun ble detektert i spormengder

Ca/Mg-forholdet varierer fra 4,5 til 12,2 i vannprøvene (tabell 5.2.3), med høyest ratio i MO18_MW (12,2). Man tror at forholdet av Ca/Mg avhenger av den litogene kilden, og at et høyt forhold (i.e., stor andel kalsium) er et resultat av forvitringen av kalsitt. Dersom forholdet av Ca/Ca+Mg er lik 1, antar man at vannet reagerer med ren kalsitt (Jeelani et al., 2011). I vannprøvene fra Nordland er denne verdien på 0,8-0,9, og ligger dermed nær verdien for helt ren kalsitt.

Tabell 5.2.2. Konsentrasjon av kationer bestemt ved ICP-OES. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ og K⁺ er vanligvis de dominerende kationene i ferskvann (Brezonik & Arnold, 2011). Okshola (OKS18) og Moengrotta (MO18) har en lignende trend hva gjelder forskjeller mellom MW-vann og W-vann, mens prøvene fra Tukthuset (TH18) varierer. Mangan ble ikke detektert i noen av prøvene, og er derfor ikke tatt med i tabellen. ID = ikke detektert.

Prøve-ID	Ca ppm	Ca mmol L ⁻¹	Fe ppm	Fe mmol L ⁻¹	K ppm	K mmol L ⁻¹	Mg ppm	Mg mmol L ⁻¹	Na ppm	Na mmol L ⁻¹	Sr ppm	Sr mmol L ⁻¹
OKS18_W	44,93	1,12	0,0047	0,000085	0,41	0,011	3,98	0,16	4,22	0,18	0,20	0,0023
OKS18_MW	45,18	1,13	0,022	0,00039	0,54	0,014	3,03	0,12	4,36	0,19	0,21	0,0024
MO18_W	41,45	1,03	ID	ID	ID	ID	4,97	0,20	3,09	0,13	0,065	0,00074
MO18_MW	51,44	1,28	0,016	0,00029	0,44	0,011	2,56	0,11	5,35	0,23	0,21	0,0024
TH18_W	61,86	1,54	0,0019	0,000034	0,28	0,0071	5,38	0,22	4,02	0,18	0,082	0,00093
TH18_MW	46,69	1,17	0,0014	0,000026	0,65	0,017	6,23	0,26	4,18	0,18	0,068	0,00078

Tabell 5.2.3. Forhold mellom Ca og Mg i de ulike vannprøvene. Forholdet er beregnet på mMol/L-verdier. En høy Ca/Mg-ratio indikerer at den litogene kilden hovedsakelig er kalsitt, noe Ca/Ca+Mg = 1 viser.

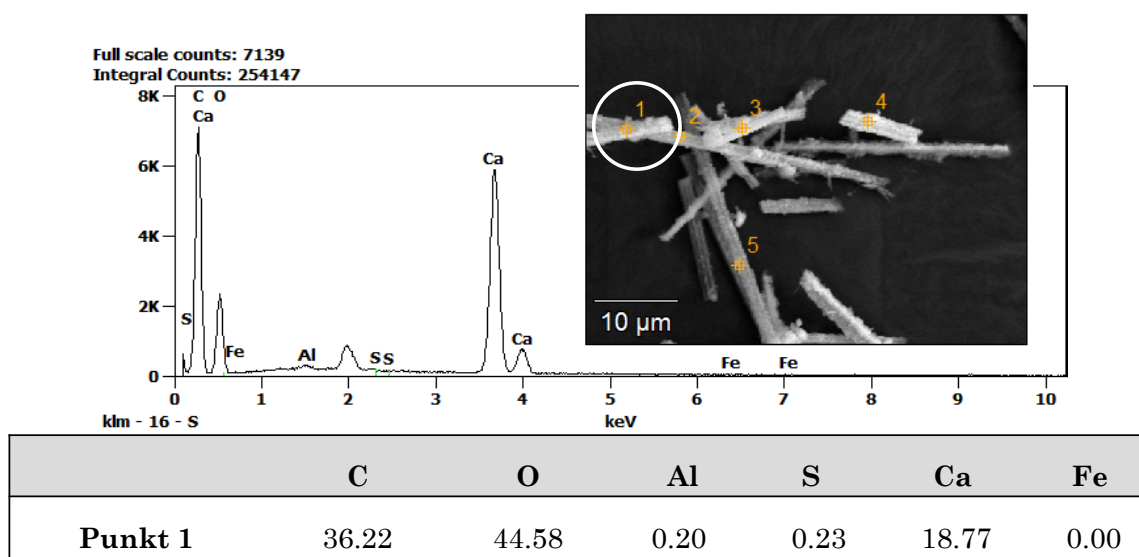
Prøve	Ca/Mg	Ca/Ca+Mg
OKS18_W	6,9	0,9
OKS18_MW	9,1	0,9
MO18_W	5,1	0,8
MO18_MW	12,2	0,9
TH18_W	7,0	0,9
TH18_MW	4,5	0,8

5.2.3 Energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS)

Elementanalyse ved EDS ga en indikasjon på hvilke elementer og mineraler de native prøvene (i.e., miljøprøvene) bestod av.

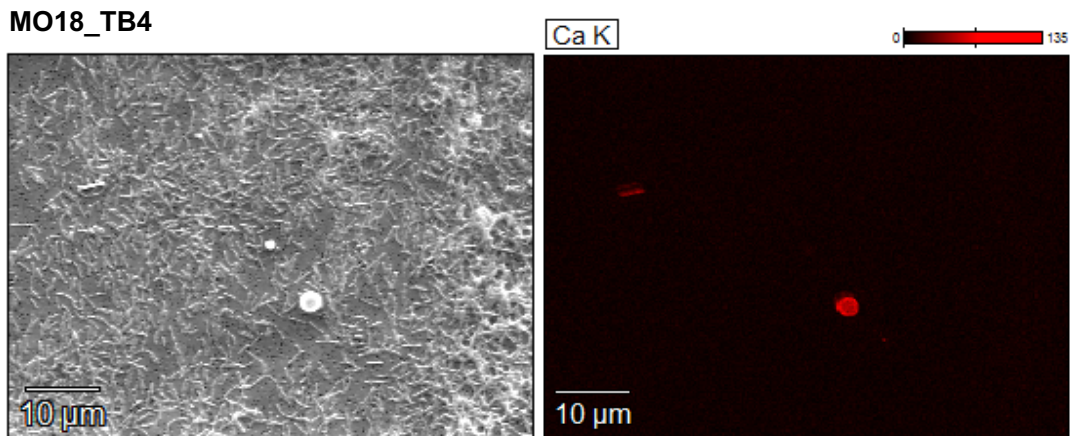
Prøver fra Grønligrotta bestod av krystaller med ulik morfologi (kapittel 5.4.1). En av krystallformene viste topper på kalsium, svovel og oksygen, og det antas derfor at dette er $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (gips). Det var mer utfordrende å gjøre analyser av den andre krystallformen, da disse krystallene var mindre samtidig som de ofte lå oppå gipskrystallene. Dermed kan en potensiell feilkilde være at strålen treffer mer enn bare den krystallen man ønsker å analysere. Analysen viste likevel topper av oksygen, svovel, kalsium, kalium, jern, silisium og noe aluminium. De mindre krystallene kan derfor være jarositt ($\text{KFe}^{3+}(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2$). Den relative atomvekten for elementene var fra én analyse 2,83 atom% K, 10,38 atom% Fe og 6,64 atom% S. Det var generelt lite kalium i prøvene, og enda mindre natrium. Jern utgjorde ofte en større andel enn svovel.

Månemelk fra Moengrotta (figur 5.2.3) viste tydelige topper av karbon, kalsium og oksygen. Det samme resultatet var også gjeldende for månemelk fra Tukthuset og Okshola. Fra én analyse var den relative atomvekten for elementene 36,22 atom% C, 44,58 atom% O, og 18,77 atom% Ca.



Figur 5.2.3. EDS-analyse av krystaller i månemelk hentet fra Moengrotta. Analysen viste en tydelig dominans av karbon (C), kalsium (Ca) og oksygen (O) Graf og tabell viser til punkt 1 i bildet.

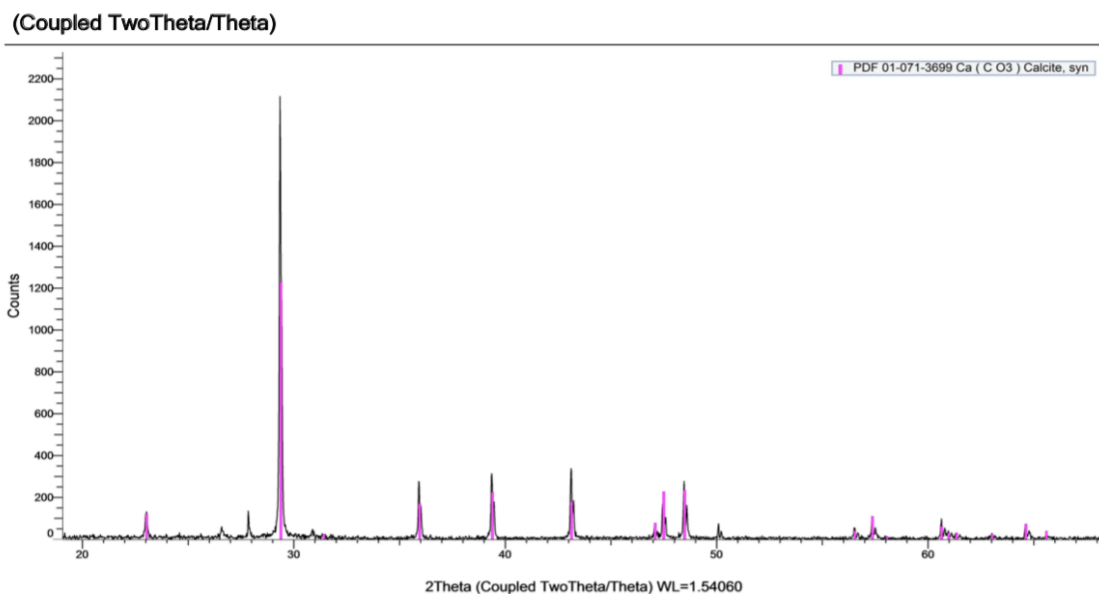
Mulige utfellinger i isolater var mer utfordrende å analysere på grunn av størrelse. Ved å bruke kartleggingsfunksjonen var det imidlertid mulig å analysere hele bildet. Analysen viste at mulige utfellinger inneholder kalsium (figur 5.2.4). Det blir ikke oppgitt relativ atomvekt for elementer ved bruk av kartlegging.



Figur 5.2.4. EDS-analyse av mulige utfellinger i isolat. Mikrografiet til venstre viser partikkelen som ble analysert, mens mikrografiet til høyre viser hvor det er identifisert kalsium. Rød farge betyr høyt kalsiuminnhold, mens svart farge betyr at ingen kalsium er detektert.

5.2.4 Røntgendiffraksjon (XRD)

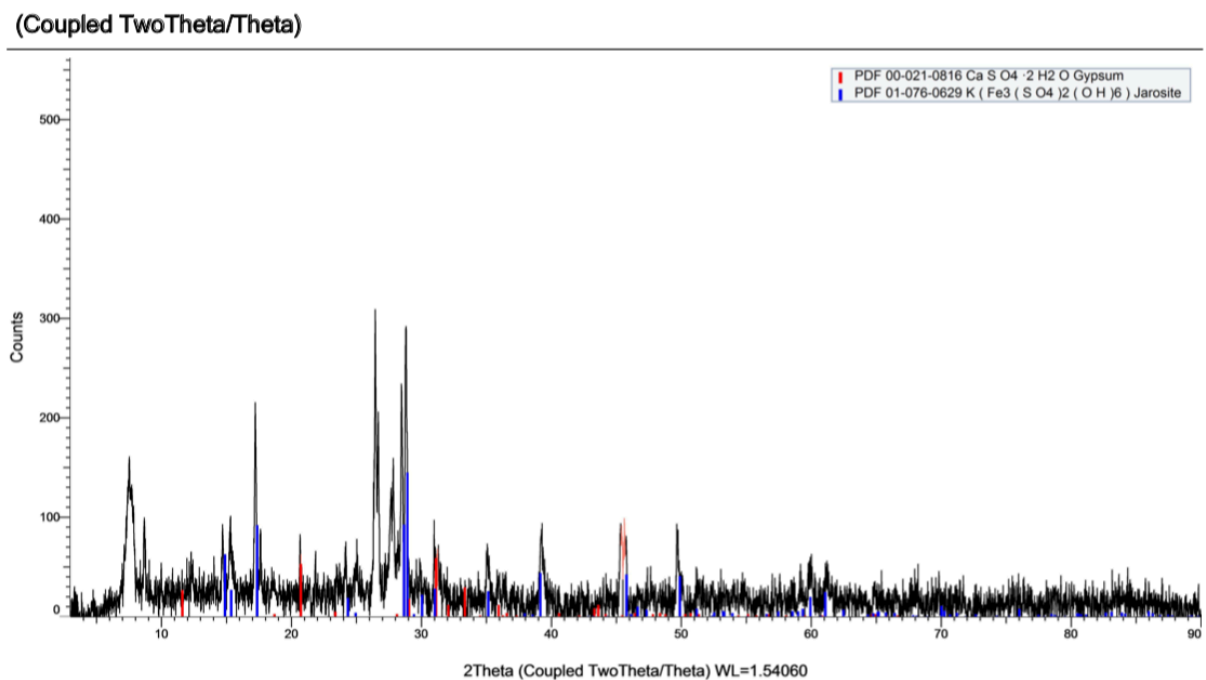
De oppnådde spektrene fra XRD viste tydelige toppene for kalsitt for alle tre prøver av månemelk (figur 5.2.5). Alle toppene i disse spektrene ble identifisert som kalsitt, og dermed er månemelken trolig 100% kalsitt.



Figur 5.2.5. Spektre fra XRD-analyse gjort på månemelk fra Okshola, hvor alle toppene er identifisert som kalsitt (rosa). Månemelk fra Tukthuset og Moengrotta viste samme resultat.

Spektrene for prøver fra Grønligrotta viste mer støy på kurvene og ikke like tydelige topper. Analysen ble gjort på to ulike prøver fra Grønligrotta, men begge hadde mye støy. Både for mye og for lite homogenisering av mineralet kan føre til at man får støy på spektrene (I. M. Dumitru 2019, personlig kommunikasjon, 30. april).

I én av prøvene fra Grønligrotta ble det påvist topper av både gips og jarositt (figur 5.2.6), mens toppene i den andre prøven hovedsakelig ble identifisert som gips. Andre mineraler identifisert fra prøvene var anortitt, kvarts og biotitt. Dette er mineraler man ofte finner i glimmerskifer.



Figur 5.2.6. Spektre fra XRD-analyse gjort på mineralprøve fra Grønligrotta. Spektret viser topper av gips (rød) og jarositt (blå). Spektret inneholder mye støy, og det ble også identifisert mineraler som anortitt, kvarts og biotitt.

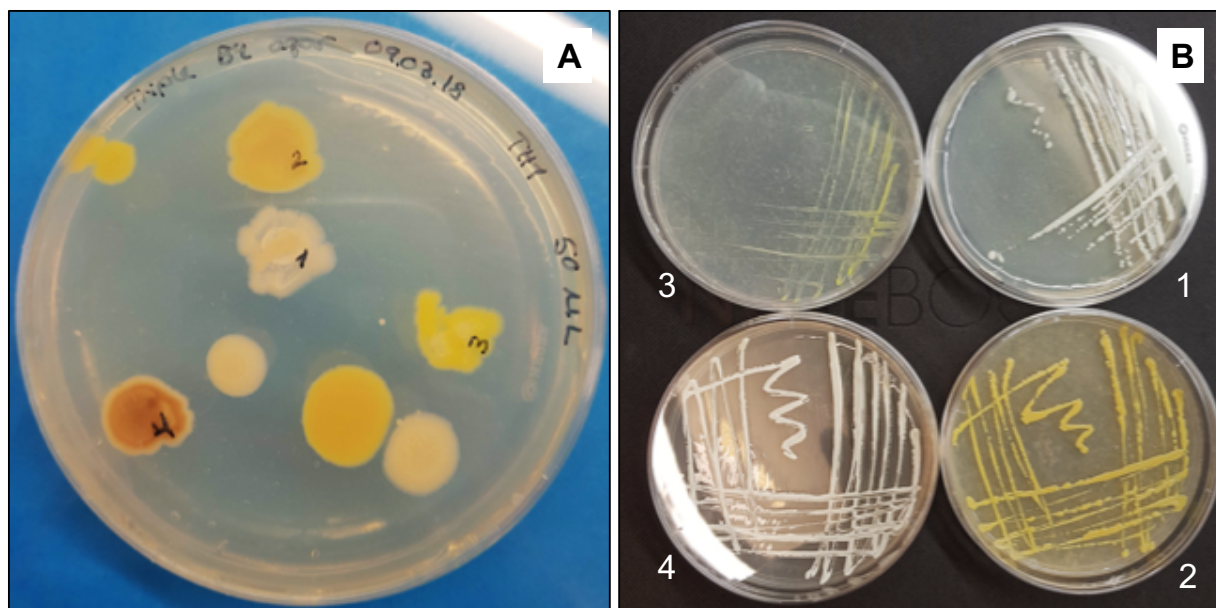
5.3 Dyrking

Alle skåler med NA-medium hadde vekst etter 1 måneds inkubering ved 4 °C. Kolonier på skåler inokulert med månemelk fra Tukthuset og Okshola var relativt like, med noen kremfargede kolonier ($\varnothing = 0,5$ cm), samt noen mindre hvite kolonier ($\varnothing < 1$ mm). Skåler inokulert med månemelk fra Hammarnesgrotta hadde samme kremfargede kolonier, i tillegg til sopplignende kolonier. Med «sopplignende» menes det at koloniene er større ($\varnothing \sim 2$ cm) og ligner mugg.

Av skåler med SA- og TSA-medium, var det kun vekst på skåler inokulert med jarositt fra Grønligrotta. Koloniene var grønne til kremfargede, med en slags svart «forsteining» i midten. De var også harde og gummiaktige. Det ble gjort forsøk på å plukke og streke ut koloniene til videre bruk.

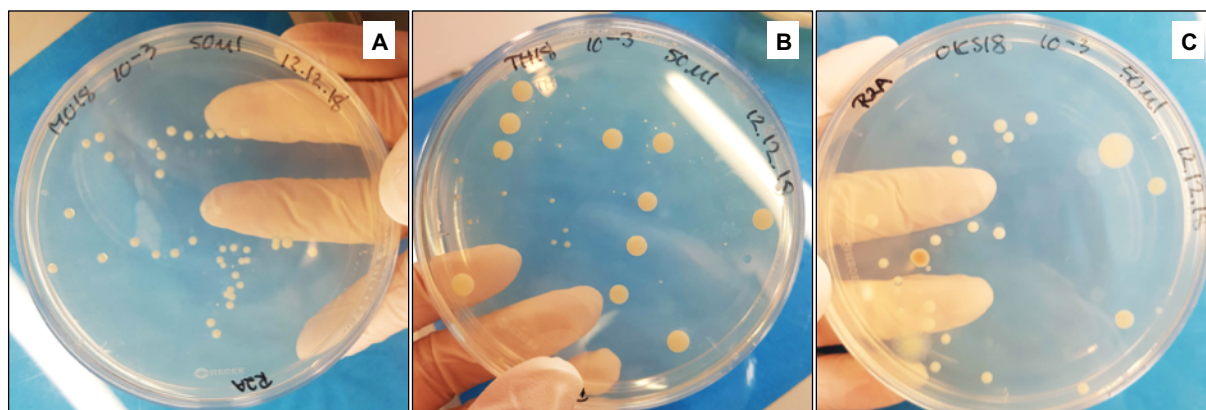
Fra skåler med TB4-medium inokulert med månemelk fra Okshola, Hammarnesgrotta og Tukthuset, ble det etter 2 måneder observert mye vekst på skåler fra Tukthuset mens det var lite på de andre. Skålen inokulert med månemelk fra Tukthuset hadde ni kolonier som vokste svært godt, med svært forskjellig kolonimorfologi og pigmentering. Koloniene ble strøket ut videre på nye skåler med samme medium (figur 5.3.1) for isolering av renkultur. Da renkultur var oppnådd ble det undersøkt i sveipelektronmikroskop, i tillegg til at det ble gjort sekvensering av 16S rRNA-genet på isolater.

Etter omtrent 7 måneder inkubering kunne det observeres hvit, kalkaktig utfelling makroskopisk på én av TB4-skålene inokulert med månemelk fra Tukthuset (figur 5.3.1, merket med 1).



Figur 5.3.1. Petriskåler med Trippel B4-medium inokulert med månemelk fra Tukthuset. **(a)** Vekst på petriskålen etter 2 måneder inkubering ved 4 °C. Koloniene merket med tall ble strøket ut på nye skåler med samme medium. **(b)** Vekst på nye skåler, strøket ut fra skålen på figur 4.2a. Det ble foretatt flere utstrykninger før renkulturer ble oppnådd og kulturene kunne brukes videre i andre analyser. De hvite tallene på figur 4.2b korresponderer til tallene på petriskålen i figur 4.2a.

TB4-skåler inokulert med månemelk samlet inn i 2018 hadde lite vekst, og etter inkubering ved 4 °C i 3 måneder kunne ingen kolonier observeres. Det ble derfor besluttet å inokulere R2A-skåler med samme prøver. R2A fikk vekst på samtlige skåler etter kun 1 måned inkubering. Kolonier på R2A-skåler viste lignende vekst som på de tidligere nevnte NA-skålene, med hovedsakelig to ulike typer av kolonier hva gjelder morfologi og farge (figur 5.3.2).



Figur 5.3.2. Petriskåler med R2A-medium inokulert med månemelk hentet i august 2018, fra tre ulike grotter. Alle tre skåler er inokulert med 50 µl av en 10^{-3} -fortynning av prøvene. **(a)** R2A-skål inokulert med månemelk fra Moengrotta. **(b)** R2A-skål inokulert med månemelk fra Tukthuset. **(c)** R2A-skål inokulert med månemelk fra Okshola.

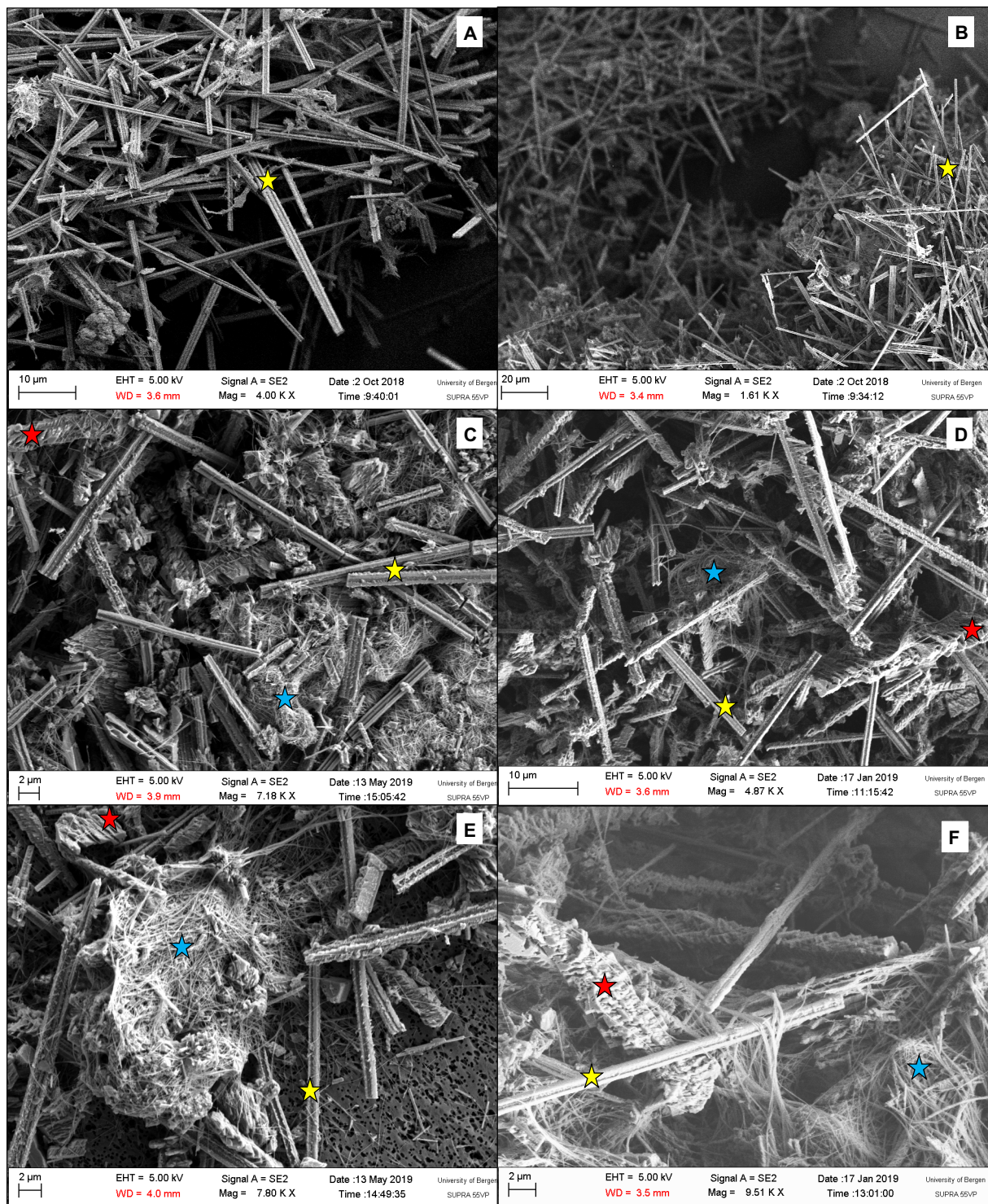
5.4 Mikroskopi

5.4.1 Sveipelektronmikroskop (SEM)

Miljøprøver

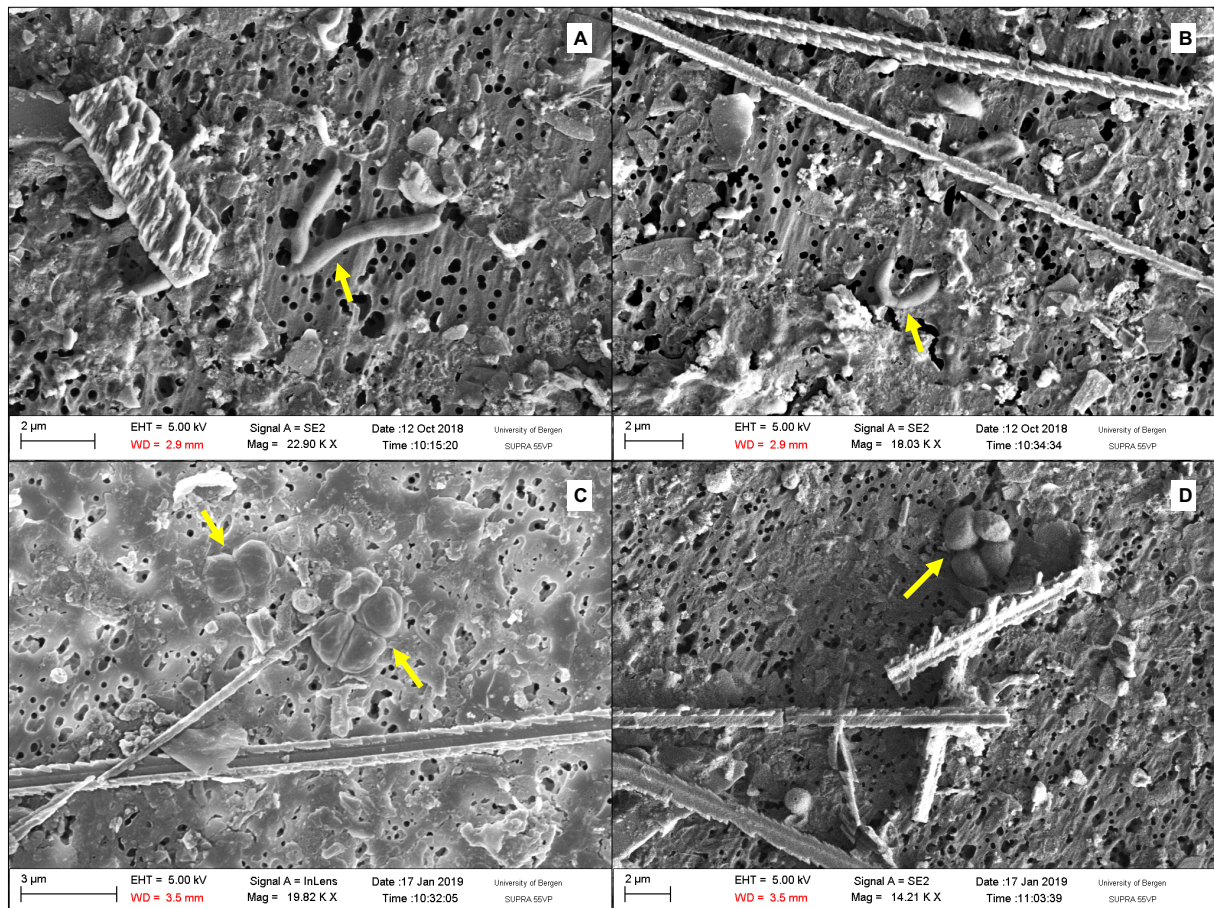
Undersøkelse av månemelk i SEM viste krystaller av den karakteristiske nålete og fibrøse formen (figur 5.4.1) beskrevet fra tidligere studier (e.g., Borsato et al., 2000; Cañaveras et al., 2006; Cailleau et al., 2009; Curry et al., 2009; Baskar et al., 2011). Krystallene kunne enkelte steder observeres som aggregater bestående av tilfeldig orienterte nåler.

Det ble hovedsakelige observert tre ulike krystallformer; 0,5-2 μm brede og opptil 80 μm lange monokrystalline nåler (nålefiberkalsitt) (figur 5.4.1, gul stjerne), 2-5 μm brede og opptil 40 μm lange polykrystalline krystaller (figur 5.4.1, rød stjerne), og filamenter eller nanofiber med en bredde helt ned til nanometer og ukjent lengde (figur 5.4.1, blå stjerne). Nålene så helt stive ut, mens nanofibrene så ut til å være mer fleksible. Nanofibrene ga inntrykk av å «krølle» seg rundt de andre krystallene. Polykrystallene var mer ujevne og grove («taggete») enn de andre krystallene. Alle tre krystallformer er kjent fra tidligere studier på månemelk, men terminologien som brukes er ikke konsekvent. Det som i denne studien kalles nålefiberkalsitt eller nålefiberkrystall, er i andre studier navngitt som blant annet monokrystalline staver (Cañaveras et al., 1999; Maciejewska et al., 2017), mikrofiber (Borsato et al., 2000) og kalsittfiber (Cañaveras et al., 2006). Bindschedler et al. (2014) har laget en oversikt over terminologi brukt for denne type krystaller, hvor nålefiberkrystall ser ut til å være mest brukt. Polykrystaller kalles også for polykrystalline fibre (Maciejewska et al., 2017) og polykrystalline kjeder (Borsato et al., 2000; Cañaveras et al., 2006).



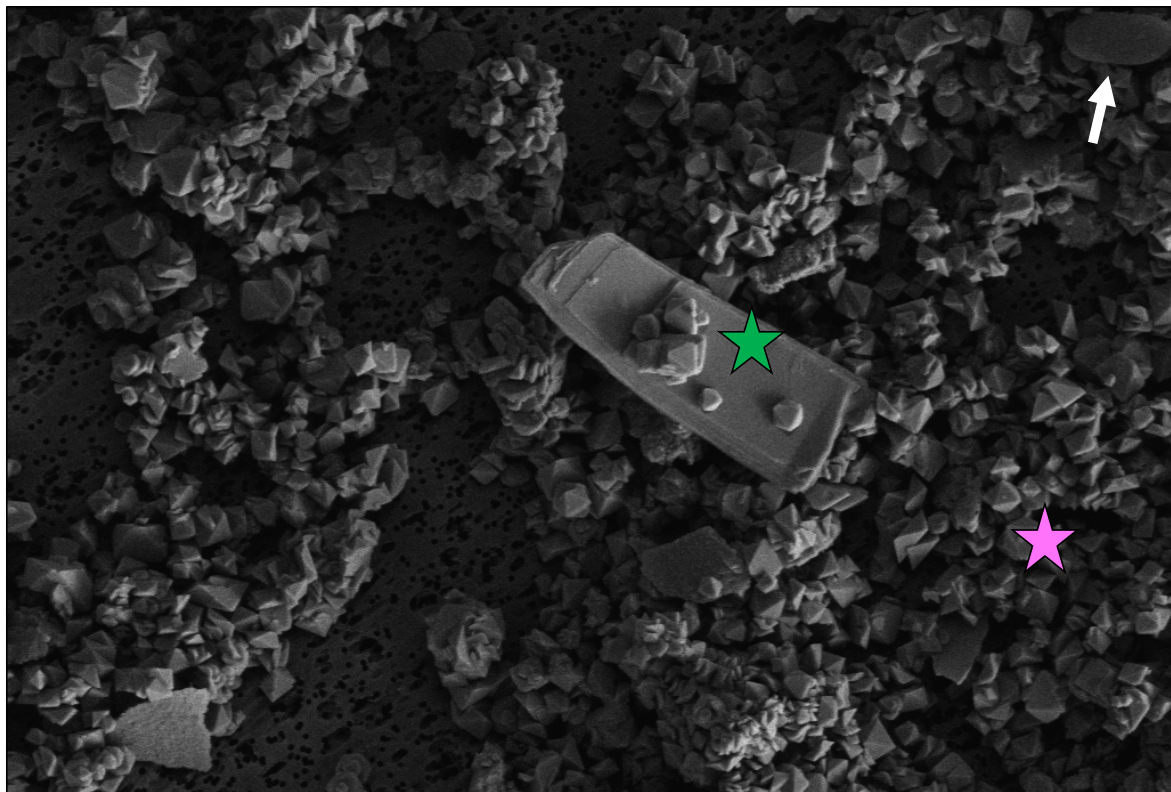
Figur 5.4.1. Mikrografier av månemelk. (a-b) viser månemelk fra Okshola. (c-e) viser månemelk fra Tukthuset. (f) viser månemelk fra Moengrotta. Nålefiberkrystaller er indikert ved gul stjerne, polykrystaller er indikert ved rød stjerne, nanofiber/filamenter er indikert ved blå stjerne.

I månemelk fra Okshola ble det observert celler, både stavformet (~2-3 μm lange) og kokker (i.e., kuleformet) (~1,5 μm diameter). Staver ble hovedsakelig observert enkeltvis, eller to og to sammen, mens noen kokker var anordnet som tetraeder (figur 5.4.2). Det ble ikke observert celler i andre prøver av månemelk.



Figur 5.4.2. Mikrografier av celler observert i månemelk hentet fra Okshola (OKS18_1). (a-b) Bøyde, stavformede celler. 2-3 μm lange. (c-d) Kokker anordnet som tetraeder (i.e., sammensatt av fire celler). Cellene ligger tett assosiert med krystaller og er indikert ved gul pil.

I jarositt/gips fra Grønligrotta ble det hovedsakelig observert to ulike typer krystallformer (figur 5.4.3). De mindre krystallene var karakterisert av en pyramidal-kubisk krystallform, med en vidde på omtrent 1-3 μm . Dette er krystallmorfologi som tidligere har blitt beskrevet fra jarositt. Den andre formen var karakterisert av rektangulære, flakete krystaller, og ligner krystallmorfologi som er beskrevet fra gips. Gipskrystallene var større, med lengde opptil 50 μm . Det er tilsynelatende få celler i disse prøvene, men det kunne observeres enkelte former innimellom krystallene som ligner tykke staver (figur 5.4.3, indikert med hvit pil).



2 μm

EHT = 5.00 kV
WD = 3.0 mm

Signal A = SE2
Mag = 9.27 K X

Date :12 Oct 2018
Time :11:24:45

University of Bergen
SUPRA 55VP



10 μm

EHT = 5.00 kV
WD = 3.8 mm

Signal A = SE2
Mag = 2.98 K X

Date :13 May 2019
Time :14:30:15

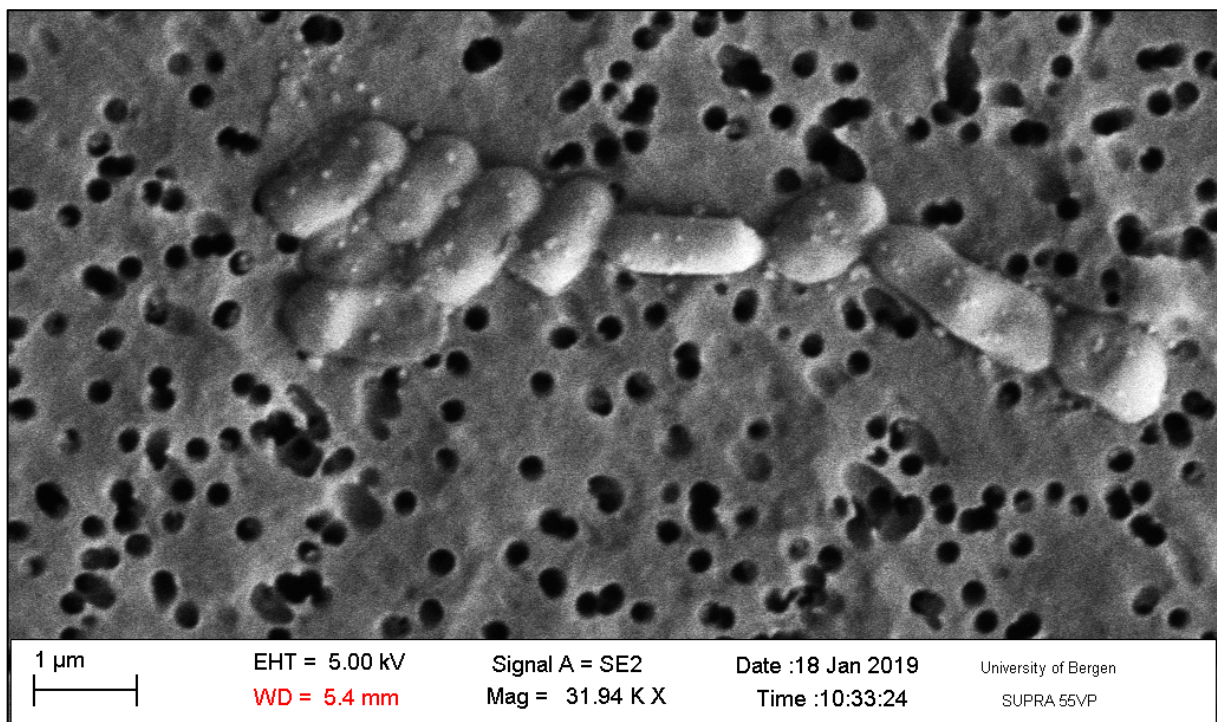
University of Bergen
SUPRA 55VP

Figur 5.4.3. Mikrografier av mineralprøve hentet i Grønligrotta (GR18_1). Prøven bestod hovedsakelig av to ulike krystallformer. Den ene typen hadde kubisk krystallform (rosa stjerne) og passer med jarositt, mens den andre hadde flakete krystallform (grønn stjerne) og passer med andre observasjoner av gips. Det ble også observert noe som kan se ut som en kort, stavformet celle (indikert ved hvit pil).

Isolater

Isolater fra dyrkingseksperimentet ble preparert og undersøkt i SEM. Isolater som ble undersøkt var utelukkende fra medier inokulert med månemelk, da de grønne, gummiaktige koloniene på medier inokulert med jarositt var for harde til å bli plukket.

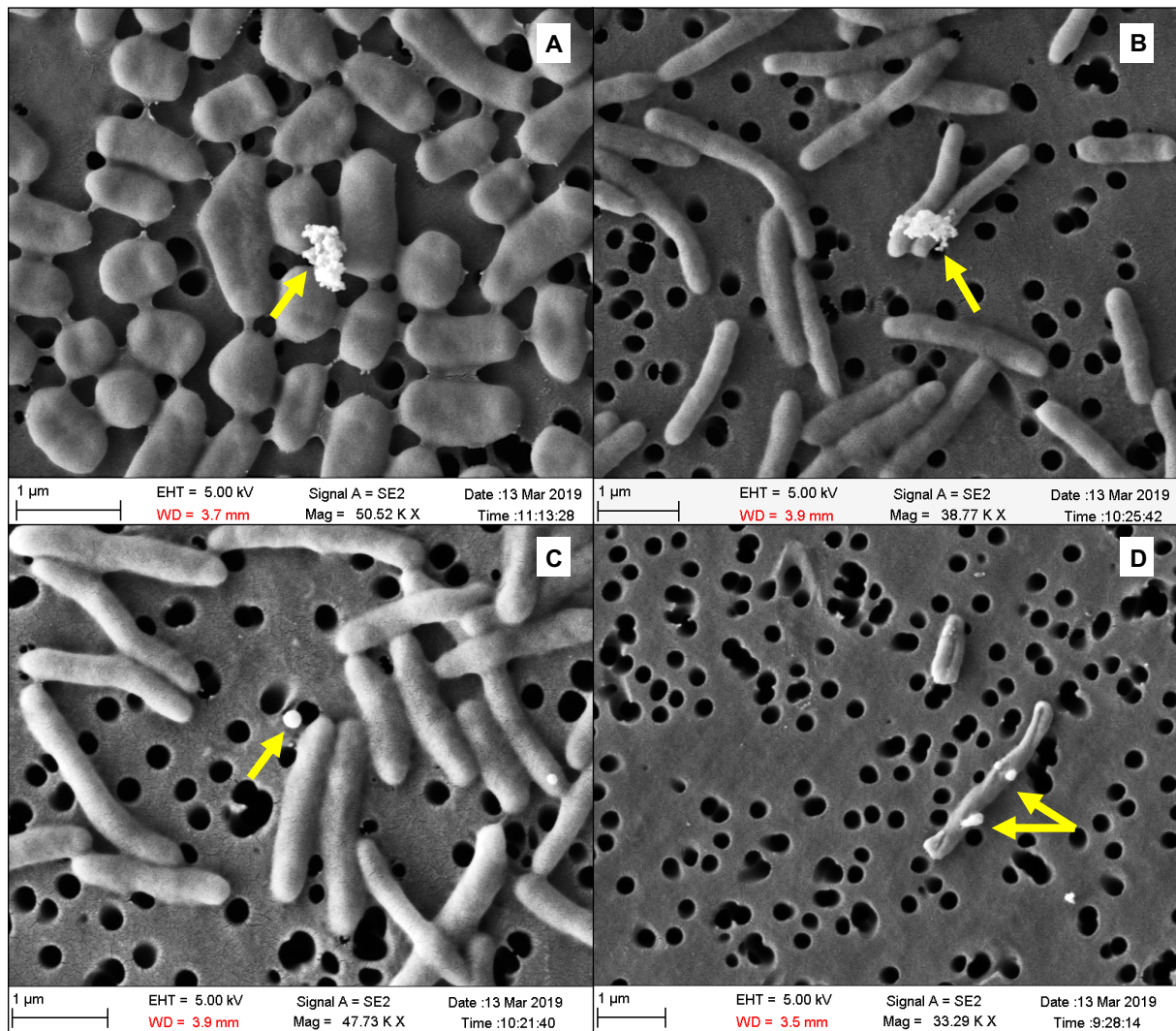
Kulturer fra TB4-media inokulert med månemelk fra Tukthuset hadde en stor andel stavformede celler (0,5-2 μm lange). I isolat TH1 2 kunne det observeres celler dekket med «prikker» eller små «forhøyninger» (figur 5.4.4). «Prikkene» kan ligne uorganisk, forsteinet materiale, men det var ikke mulig å bekrefte dette ved elementanalyse. I et annet isolat fra samme inokulum var cellene lengre og mer bøyde (2-2,5 μm lange).



Figur 5.4.4. Mikrografi av celler fra isolat TH1 2. Cellene har en lengde på omtrent 1,5 μm og ligger tett sammen. Cellene er også dekket av hvite «prikker», som vist ved mikrografiet. Det lot seg ikke gjøre EDS-analyse av disse «prikkene».

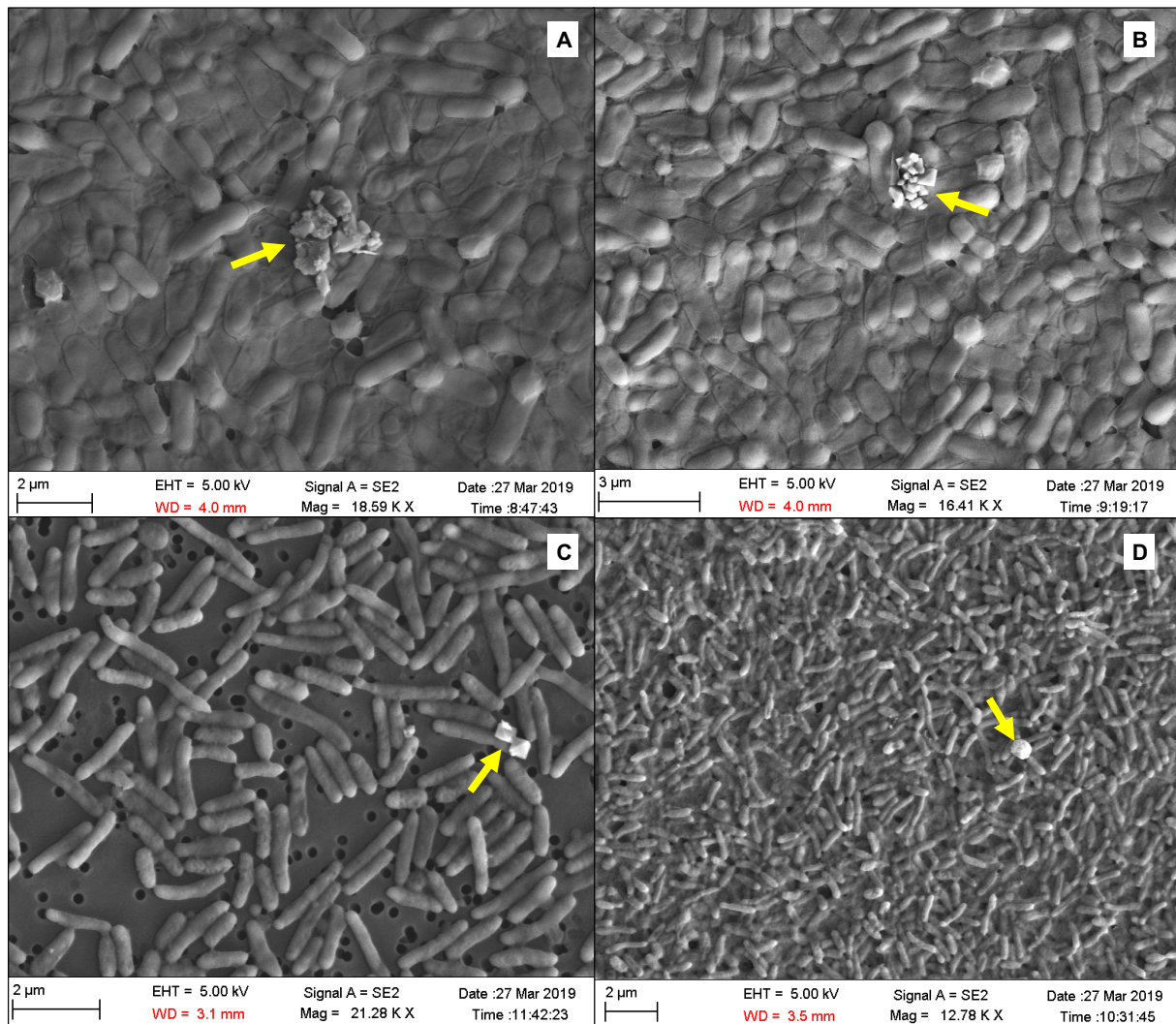
Det ble videre gjort undersøkelser i SEM av isolater fra TB4-medier inokulert med månemelk fra flere ulike grotter. Fra disse isolatene ble det observert både lange (2-3 μm) og kortere, tykke (1-2 μm) staver. Det kunne i tillegg observeres både ansamlinger av uregelmessige partikler, samt romboedriske og sfæriske partikler,

med størrelser på $< 0,3 \mu\text{m}$ (figur 5.4.5). Det var ikke mulig å identifisere disse partiklene ved EDS (elementanalyse). Det ble likevel gjort analyse av andre partikler enn de avbildet nedenfor, som viste topper av kalsium. Alle partiklene fremstår som hvite på mikrografiene, som kan indikere at de reflekterer flere elektroner enn cellene. Dette indikerer at partiklene er uorganiske.



Figur 5.4.5. Mikrografier fra SEM-undersøkelse av isolater. (a-b) viser isolater fra månemelk fra Okshola, med aggregater av partikler som ligger oppå cellene. (c) viser isolat fra månemelk fra Okshola, med en tett assosiert sfærisk partikkel. (d) viser isolat fra månemelk fra Moengrotta, med irregulære til sfæriske partikler som ligger oppå noe som ser ut som en celle. De mulige utfellingene er indikert ved gul pil.

Som følge av at TB4 er et medium spesielt utviklet for å påvise utfelling av CaCO_3 , ble det også besluttet å bruke R2A som et «kontrollmedium». Dette ble gjort for å undersøke om uorganiske partikler kun var tilstede i kulturer dyrket på TB4, eller om de også kunne observeres på R2A. Fra eksperimentet ble det observert mulig utfellinger i begge typer medium, med størrelser på $< 0,5 \mu\text{m}$ (figur 5.4.6).



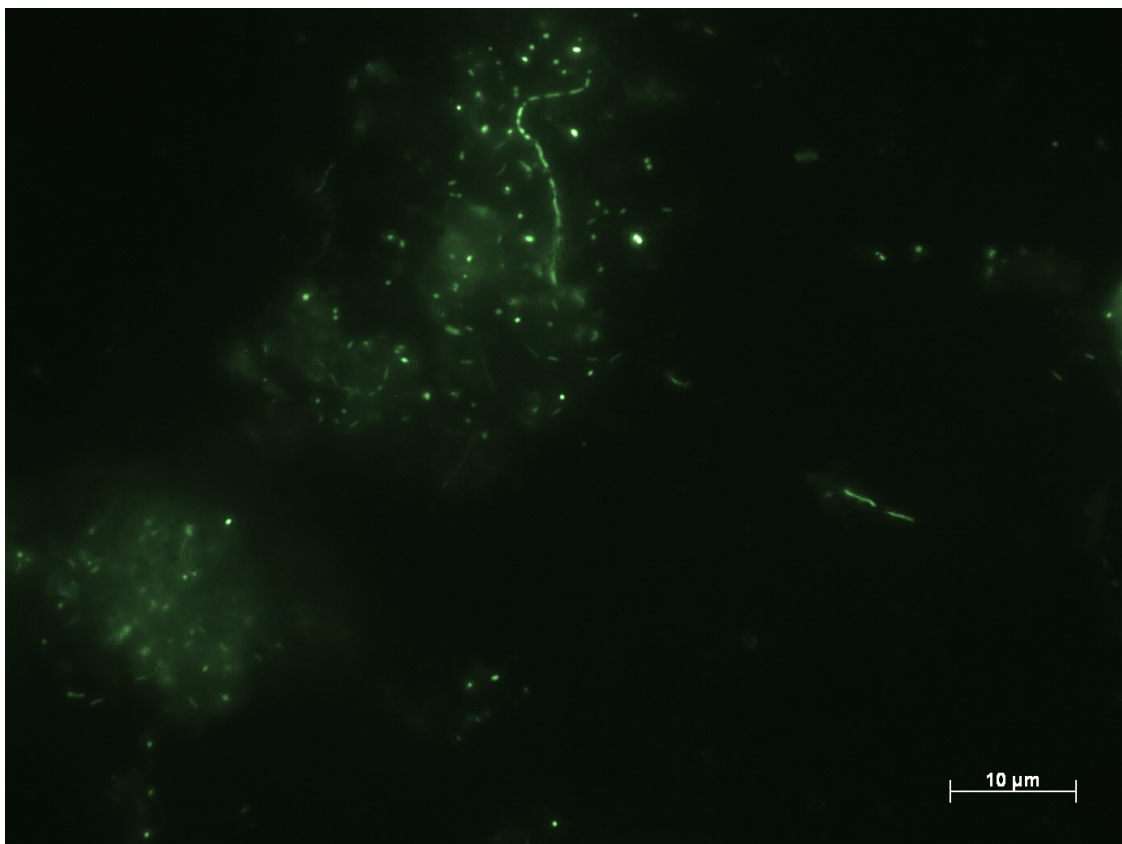
Figur 5.4.6. Mikrografier som viser mulige utfellinger i kulturer dyrket på både TB4-medium og R2A-medium. (a-b) viser kulturer dyrket på TB4-medium, med aggregater av uregelmessige og romboedriske partikler. Disse kulturene har vokst opp med månemelk fra Okshola som inokulum. (c-d) viser kulturer dyrket på R2A-medium, med romboedriske til sfæriske partikler. Kulturene har vokst opp med månemelk fra Moengrotta (c) og Tukthuset (d) som inokulum.

Det kunne også observeres velutviklede nålefiberkrystaller og polykrystaller i både R2A og TB4. Nålene var i enkelte kulturer totalt dekket av celler som så ut til å vokse oppå dem.

5.4.2 *Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)*

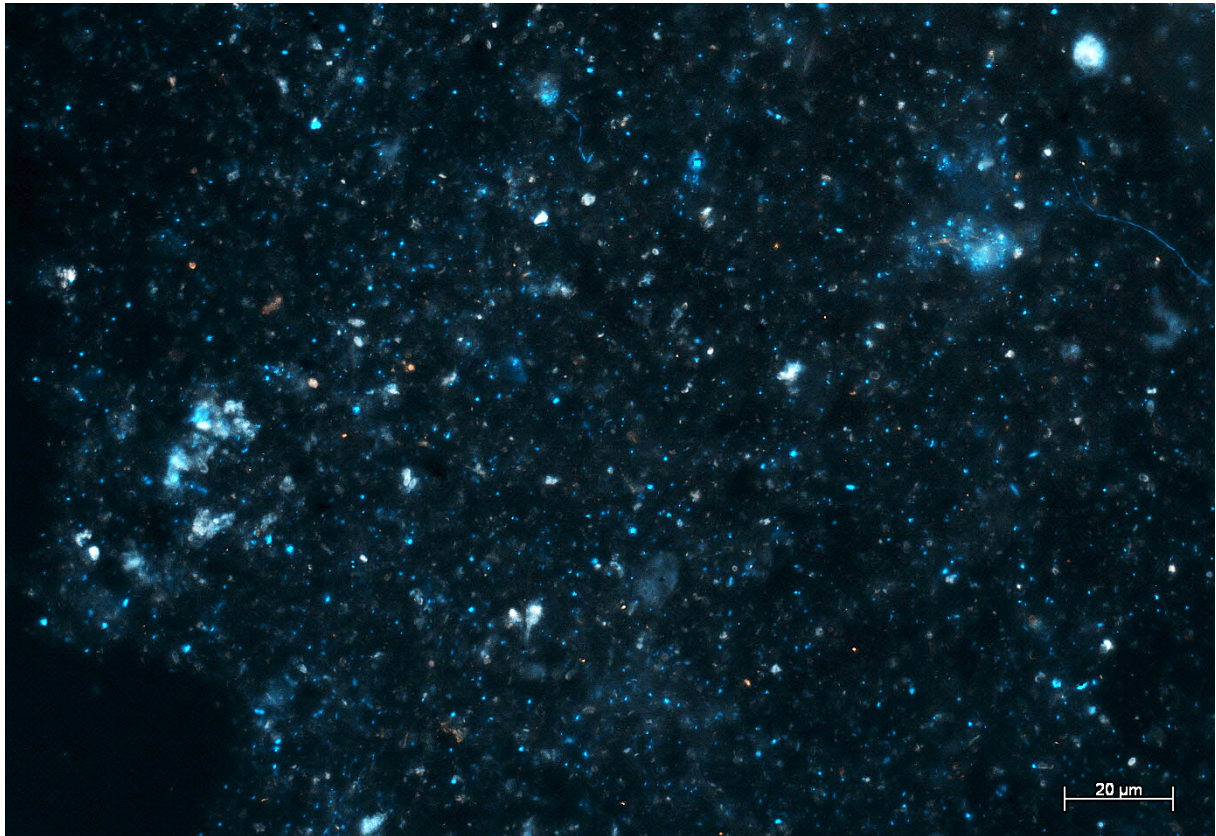
Ved hjelp av FISH var det mulig å både observere celler i mikroskop og identifisere spesifikke taksonomiske grupper. Alle probene som ble brukt var merket med fluorokromet Cy3, og kunne derfor ikke brukes samtidig. Alle undersøkelser er derfor gjennomført med én probe i tillegg til fargestoffet DAPI. I dette kapitlet presenteres et utvalg av bilder tatt i fluorescensmikroskop, mens de resterende finnes i vedlegg B.

Bruk av bakterieproben EUB338 sammen med DAPI viste at det meste av celler var bakterier. I både månemelk (OKS, HMN, TH) og jarositt/gips (GR) var det en nesten 100% overlapp mellom EUB338 og DAPI. I månemelk fra Okshola kunne det observeres både enkeltstående celler og kjeder sammensatt av flere celler. Begge typer ble detektert med EUB338 og ble dermed identifisert som bakterier (figur 5.4.7).



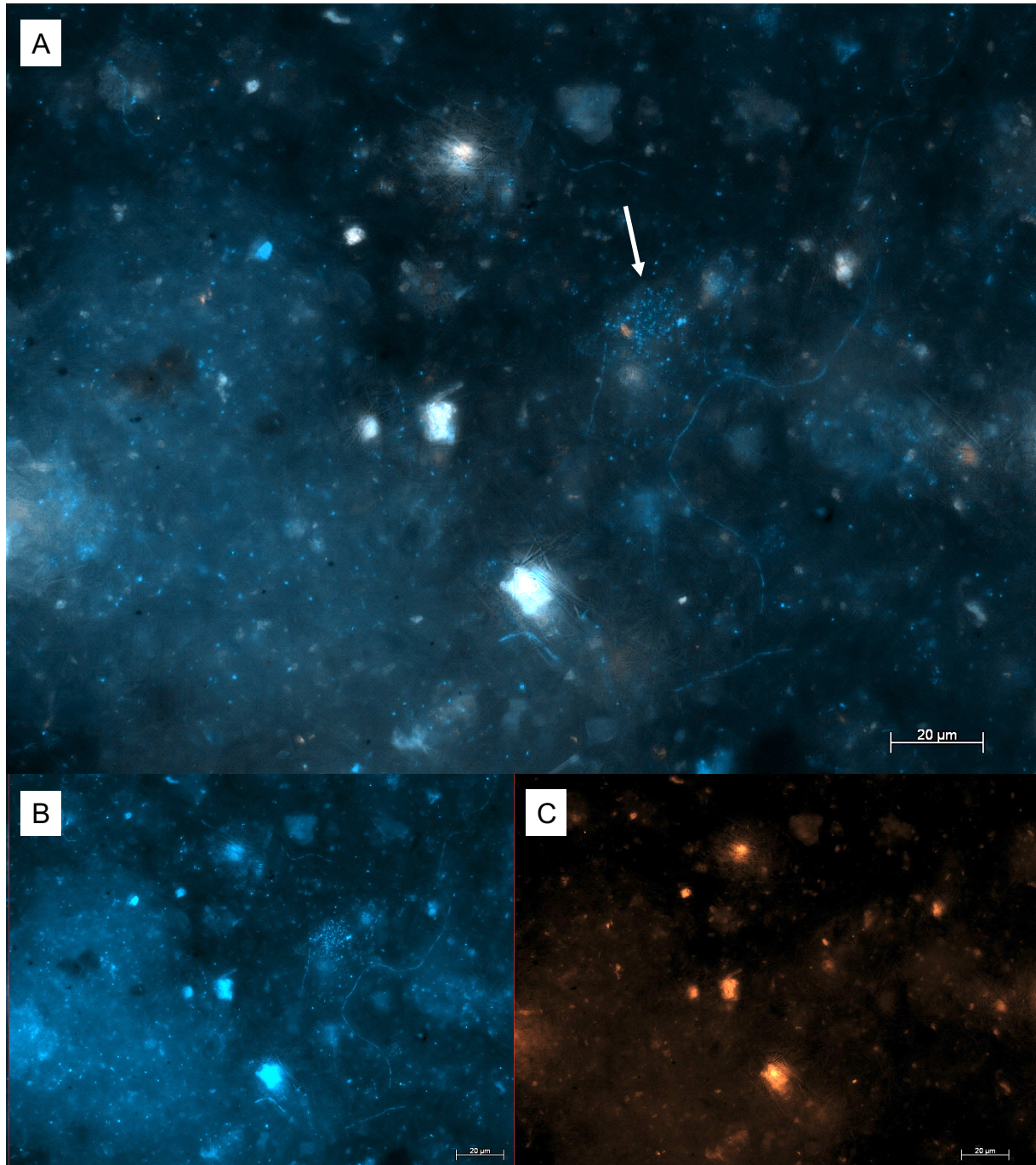
Figur 5.4.7. Mikrografi av FISH gjort på månemelk fra Okshola. Prøven er farget med DAPI som farger alt (blå), og proben EUB338 som detekterer alle bakterier (gul). Mikrografiet viser overlappen mellom de to, som gir grønnfargen. Prøven er fortynnet 100x, og mikrografiet er tatt på 100x forstørrelse.

Proben HGC236 som detekterer Actinobacteria, ble brukt på månemelk. Det ble ikke foretatt telling av celler merket med HGC236, men ut fra mikrografier kan det se ut til at oppmot 1/3 av alle celler er identifisert som Actinobacteria (figur 5.4.8). I månemelk fra Hammarnesgrotta ble mange av de enkeltstående cellene merket med HGC236, mens kjeder eller filamenter kun var farget med DAPI (figur 5.4.9). Det samme ble observert i månemelk fra Okshola (figur 5.4.8).



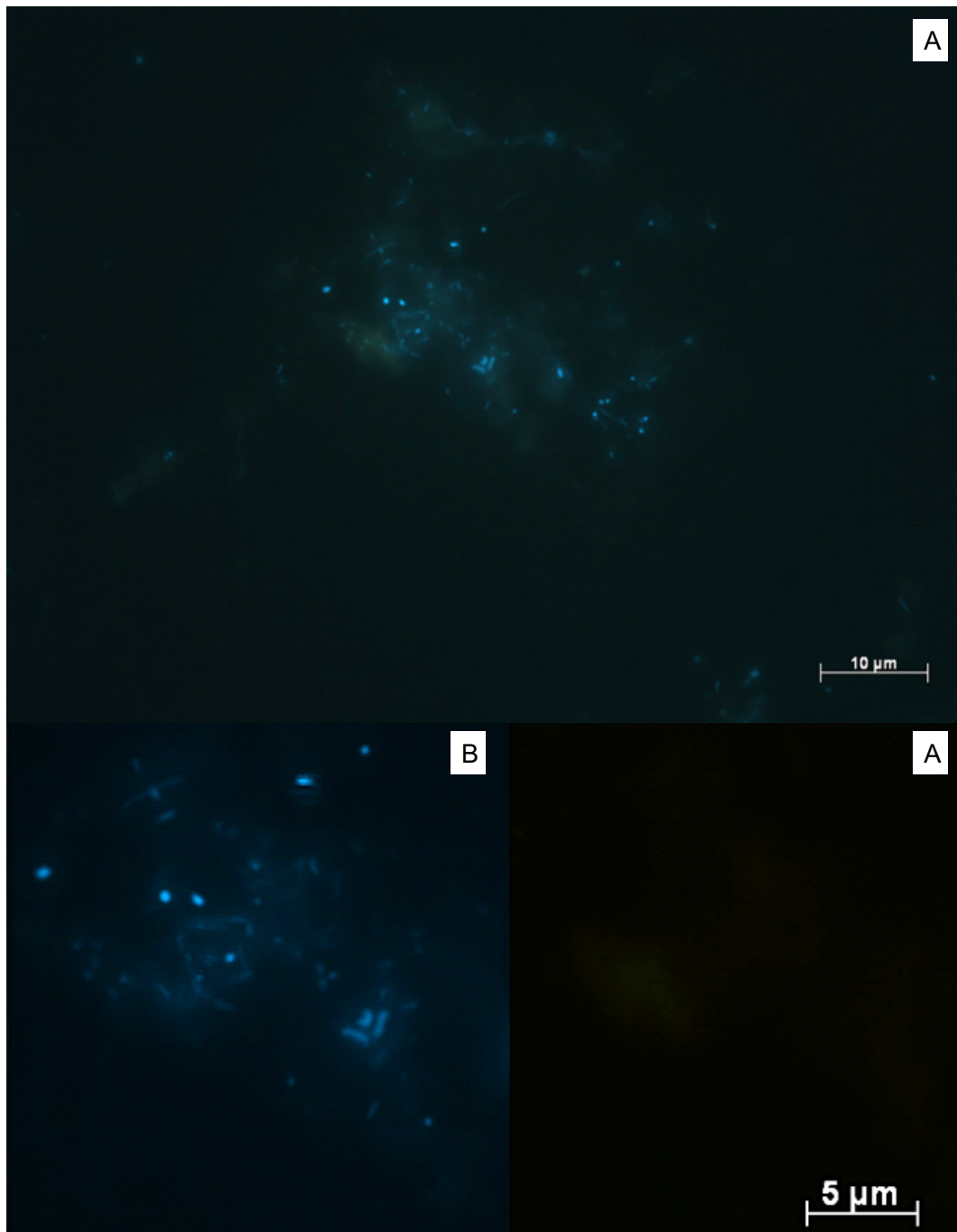
Figur 5.4.8. Mikrografi av FISH gjort på månemelk fra Okshola. Prøven er farget med DAPI som farger alt (blå), og proben HGC236 som detekterer Actinobacteria (oransje). Mikrografiet viser overlappen mellom DAPI og HGC236. Selv om overlappen ser ut til å være dominert av blå (DAPI), var det tydelig når HGC236 ble observert alene at en stor andel var merket med proben også. Prøven er fortynnet 10x, og mikrografiet er tatt på 40x forstørrelse.

Mikrografier av månemelk fra Hammarnesgrotta viser at prøven inneholder ansamlinger av celler; områder hvor det er høyere cellekonsentrasjon enn andre områder. Dette er vist ved figur 5.4.9 (indikert med hvit pil).



Figur 5.4.9. Mikrografi av FISH gjort på månemelk fra Hammarnesgrotta. Prøven er farget med DAPI som farger alt (blå) og HGC236 som detekterer Actinobacteria (oransje). **(a)** viser overlappen mellom DAPI og HGC236. Hvit pil indikerer ansamling av celler. **(b)** viser alt som er farget med DAPI. **(c)** viser alt som er merket med HGC236. Selv om mikrografiet 4.13a ser ut til å kun være blått, ser man på 4.13c at en stor andel er merket med HGC236 (oransje). Prøven er fortynnet 10x, og mikrografiet er tatt på 40x forstørrelse.

Blandingen av GAM42a og BET42a som detekterer både Gammaproteobacteria og Betaproteobacteria (GAMBET), viste ingen overlapp med DAPI-fargede celler. Alle fire prøver (OKS, TH, HMN og GR) ble undersøkt, men det ble ikke detektert celler merket med GAMBET i noen av prøvene. Dette er demonstrert ved månemelk fra Okshola (figur 5.4.10), hvor det kun er DAPI-fargede celler som vises.



Figur 5.4.10. Mikrografi av FISH gjort på månemelk fra Okshola. Prøven er farget med DAPI som farger alt (blå) og GAMBET som detekterer Gammaproteobacteria og Betaproteobacteria (gul). (a) viser overlappen mellom DAPI og GAMBET. (b) viser prøven med kun DAPI-filter. (c) viser kun Cy3-filter som skal vise GAMBET. Prøven er fortynnet 100x, og mikrografiet er tatt på 100x forstørrelse.

Antall celler per gram (våtvekt) var høyest i månemelk fra Okshola. I denne prøven varierte antallet på $3,41-5,96 \times 10^8$ celler per gram (vv). I månemelk fra Tukthuset var antallet celler $1,29 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ (vv). Månemelk fra Hammarnesgrotta hadde det laveste antallet celler, med verdier på $3,60-4,46 \times 10^7$ celler g^{-1} (vv). I jarositt/gips fra Grønligrotta lå verdiene på $6,73-7,69 \times 10^7$ celler g^{-1} (vv).

5.5 Molekylærbiologiske metoder

5.5.1 PCR og Illumina-sekvensering

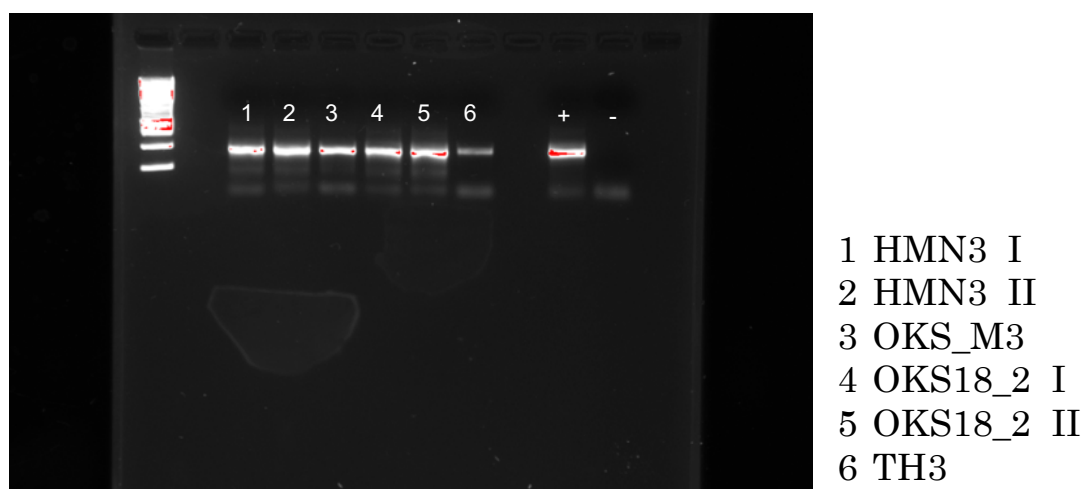
Etter DNA-ekstraksjon ble konsentrasjoner av DNA målt ved Qubit. Målingene viste generelt lave konsentrasjoner, og nesten halvparten hadde konsentrasjoner som ikke ble detektert av måleinstrumentet (tabell 5.5.1).

Tabell 5.5.1. Oversikt over målt DNA-konsentrasjon av prøver av månemelk og gips/jarositt. Målingene ble gjort etter DNA-ekstraksjon ved PowerSoil og CTAB. BD = under deteksjonsgrense.

Prøve	DNA-konsentrasjon (ng/ μL)
HMN3 I	1,57
HMN3 II	1,65
TH3	0,159
OKS_M3	0,259
OKS18_2 I	0,965
OKS18_2 II	2,11
MO18_2	BD
TH18_3	BD
GR2	BD
OKS2	BD
GR2 (CTAB)	BD
OKS2 (CTAB)	0,0112

Amplifisering av 16S rRNA-gen var kun vellykket for et fåtall av prøvene. Første PCR av DNA gjort på prøver fra 2017 gav PCR-produkt på HMN3, OKS_M3 og TH3 (månemelk), men ingen produkt på jarositt/gips fra Grønligrotta og Okshola. Av prøver samlet inn i 2018 var det kun to paralleller av OKS18_2 som fikk positivt

PCR-produkt. Dermed ble seks prøver med positive resultat brukt videre i Illumina-sekvensering (figur 5.5.1).



Figur 5.5.1. Agarose gel som viser PCR-produktene fra 2.PCR i en to-trinns PCR i forbindelse med Illumina-sekvensering. Tallene på gelen korresponderer til tallene på høyre side, og viser hvor prøvene ble tilsatt. + er positiv kontroll (*E.coli*), mens – er negativ kontroll (ultrarent vann).

Selv om resultatet fra andre PCR i en to-trinns PCR var vellykket, var det andre problemer tilknyttet renheten på produktene. A260/280 og A260/230-forholdene viste tall utenfor det som er anbefalt. Akseptabel ratio for A260/280 er omtrent 1,8, mens 2,0 – 2,2 er akseptabelt for A260/A230 (Thermo Scientific, 2010). Produktene måtte gjennomgå flere runder med rensing, som kan være en utfordring da man ønsker å rense prøvene uten å miste for mye DNA underveis. Av de seks prøvene ble alle utenom TH3 til slutt sendt inn til sekvensering. TH3 hadde for lav DNA-konsentrasjon (1,22 ng/μL), og var for uren til å bli tatt med (A260/A280 = 0,9, A260/A230 = 1,01). Endelige DNA-konsentrasjoner til innsendte prøver, samt ratioer for A260/280 og A260/230, er presentert i tabell 5.5.2.

Tabell 5.5.2. De endelige DNA-konsentrasjonene, samt ratio for A260/280 og A260/230 før de ble sendt til sekvensering. Av disse seks, ble kun fem sendt inn. TH3 ble besluttet å ikke ha med på grunn av for lav DNA-konsentrasjon og dårlige tall for ratioene.

Prøve	Konsentrasjon (ng/μL)	A260/280	A260/230
HMN3 I	16,1	1,83	1,11
HMN3 II	17,0	1,80	1,20
OKS_M3	15,3	1,78	0,93
OKS18_2 I	16,6	1,87	1,09
OKS18_2 II	11,1	1,86	1,72

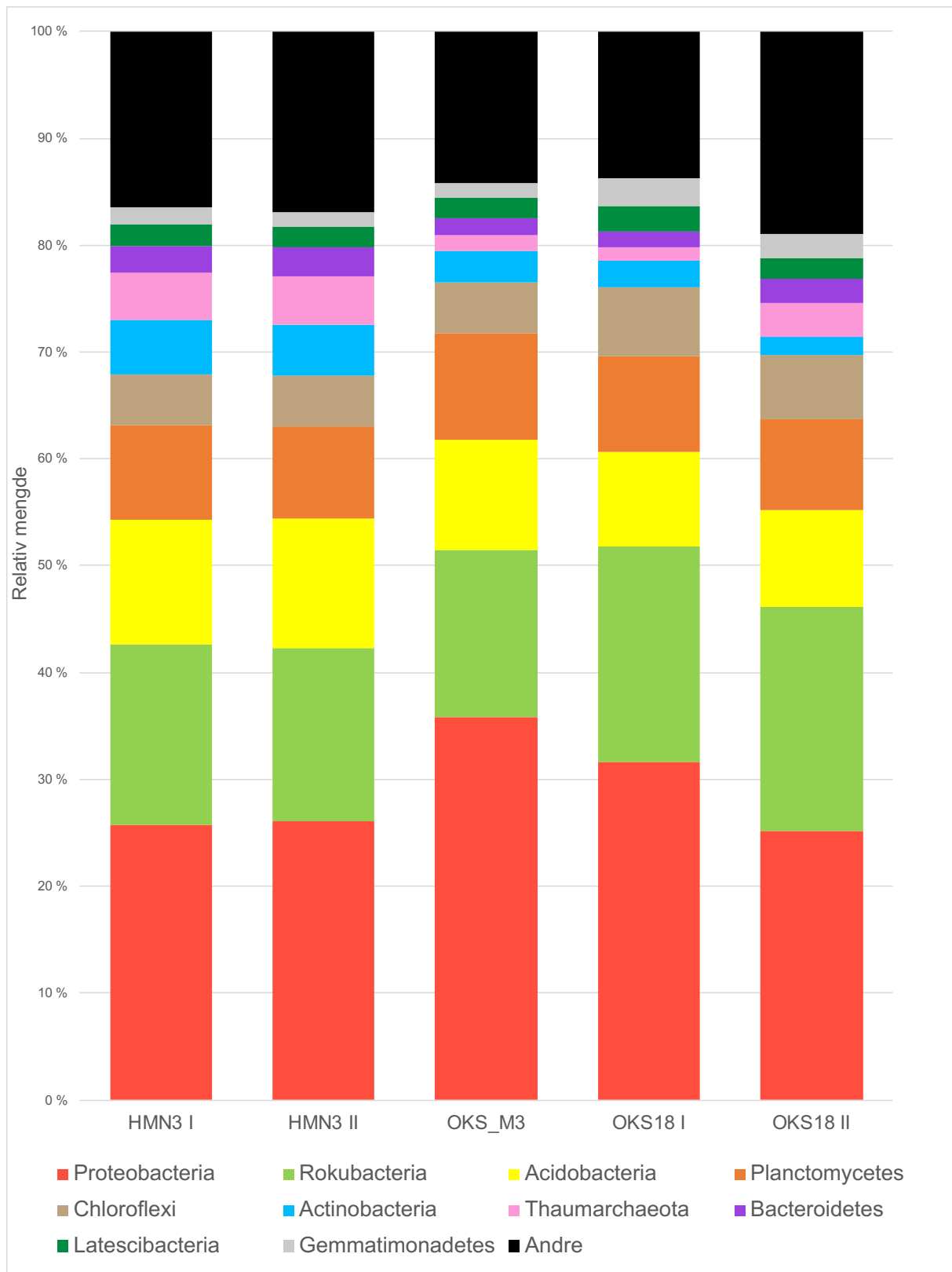
5.5.2 Karakterisering av bakteriesamfunnet ved Illumina

Etter rensing og kvalitetskontroll av totalt 851 906 sekvenser («reads»), gjenstod det 676 137 sekvenser. Det betyr at ~80% av sekvensene var av god kvalitet. Sekvensene var gruppert sammen i 23100 operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) med 97% likhet. Av alle OTU-ene var 96,6% bakterier og 3,4% arker. Hver prøve hadde et OTU-antall på mellom 6000 – 9000. HMN3 I hadde høyest antall OTU-er (9348), mens OKS_M3 hadde det laveste (6108) (tabell 5.5.3).

Tabell 5.5.3. Antall operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for hver av de fem prøvene. HMN3 I og HMN3 II, samt OKS18_2 I og OKS18_2 II er paralleller av samme prøve. Antall OTU inkluderer OTU-er for både arker og bakterier.

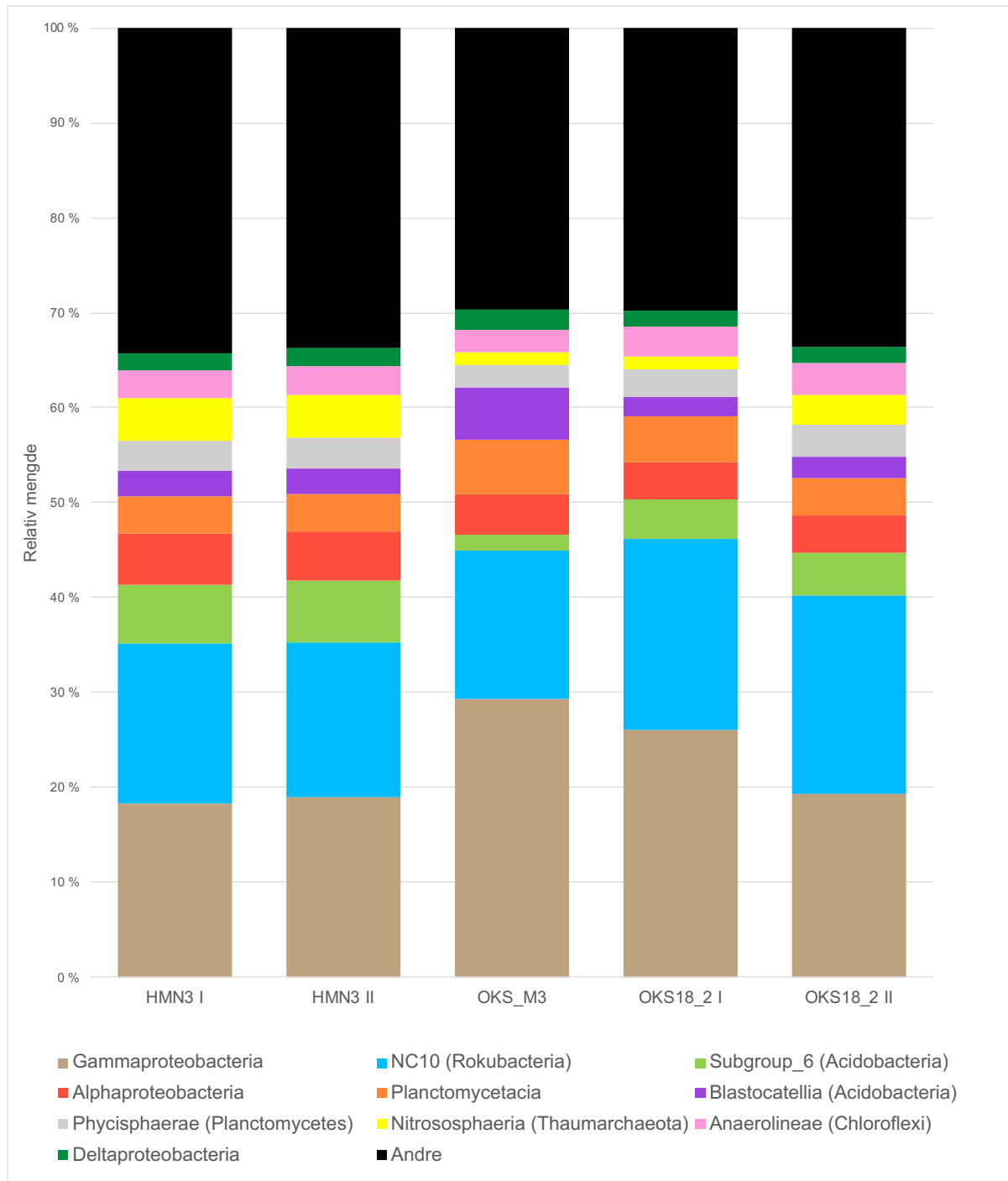
Prøve	Grotte	År samplet	Antall OTU
HMN3 I	Hammarnesgrotta	2017	9348
HMN3 II	Hammarnesgrotta	2017	8511
OKS_M3	Okshola	2017	6108
OKS18_2 I	Okshola	2018	8561
OKS18_2 II	Okshola	2018	7499

Blant bakteriene var Proteobacteria det dominerende fylum med 25-35% av alle OTU-er (figur 5.5.2). Videre fulgte Rokubacteria (15-20%), Acidobacteria (~10%) og Planctomycetes (~10%) (figur 5.5.2). Rokubacteria er et nylig definert fylum som tidligere var kjent som «Candidate Division SPAM» (Becraft et al., 2017). Blant de mest dominerende fyla var det kun ett som var fra domene Archaea (fylum Thaumarchaeota). Generelt sett viste analysene at prøvene inneholdt en god spredning av ulike OTU-er, som indikerer et mikrobielt samfunn med stort mangfold (figur 5.5.2). Før framstilling av samfunnet i diagrammer ble OTU-er som kun var representert av 1-2 sekvenser fjernet. Kategorien «andre» i diagrammet inkluderer både de mindre dominerende fyla og de uklassifiserte sekvensene. 5-6% av sekvensene ble ikke identifisert og er dermed uklassifiserte.



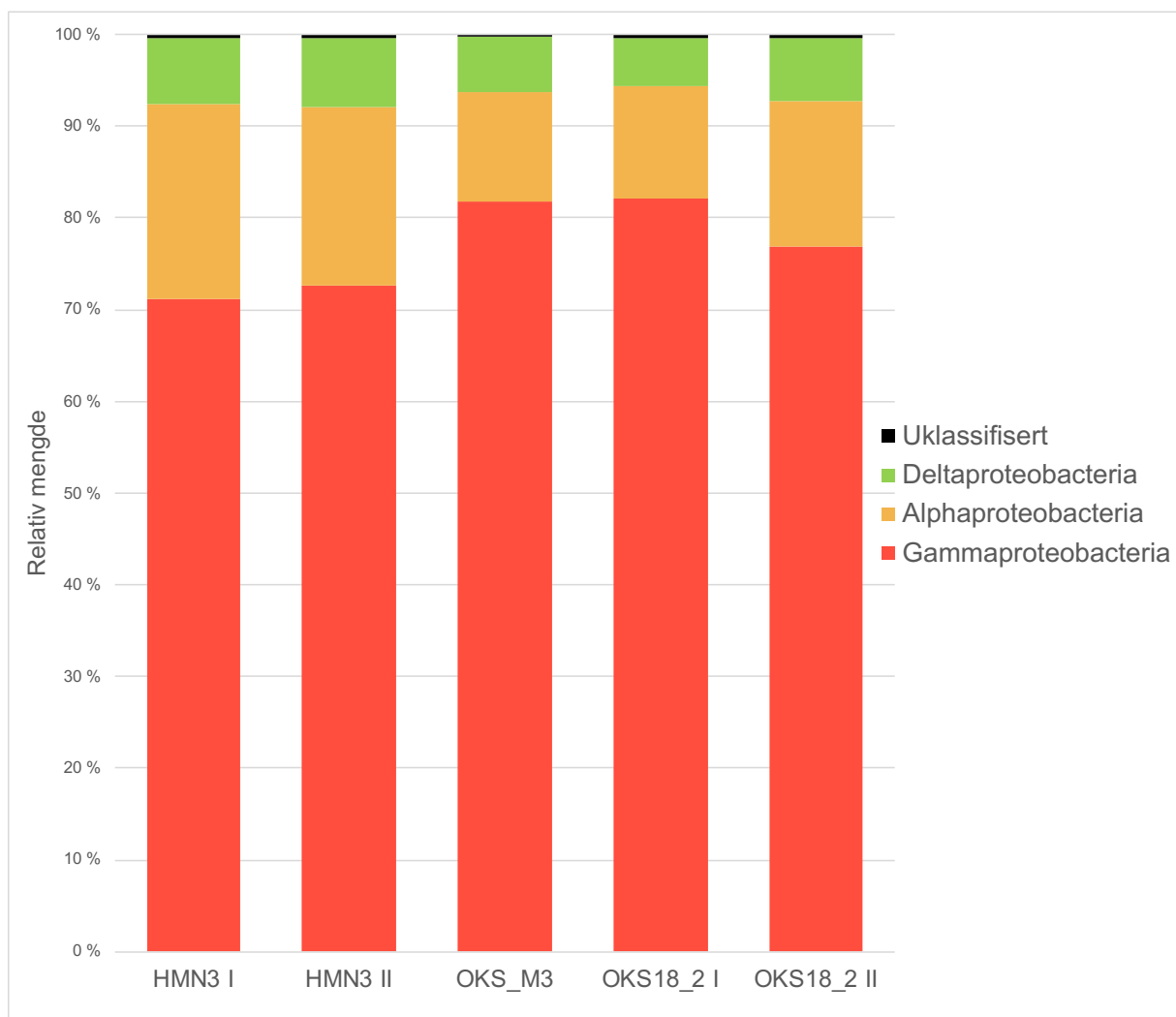
Figur 5.5.2. Sammensetning av det prokaryote samfunnet i prøver av månemelk. Diagrammet viser relativ mengde (gitt i prosent) av ulike fylum, i hver av de fem prøvene. De ti mest dominerende fylum er trukket frem, mens resterende fylum (inkludert de uklassifiserte sekvensene) er slått sammen i kategorien «andre». 9/10 av de mest dominerende fylum er bakterier, mens Thaumarchaeota er eneste representant fra arkene.

På lavere taksonomisk nivå er de tre mest dominerende klassene Gammaproteobacteria (fylum Proteobacteria), NC10 (fylum Rokubacteria) og Subgroup_6 (fylum Acidobacteria). Det er noen mindre forskjeller mellom de fem prøvene, men samme klasser dominerer i samtlige (figur 5.5.3).



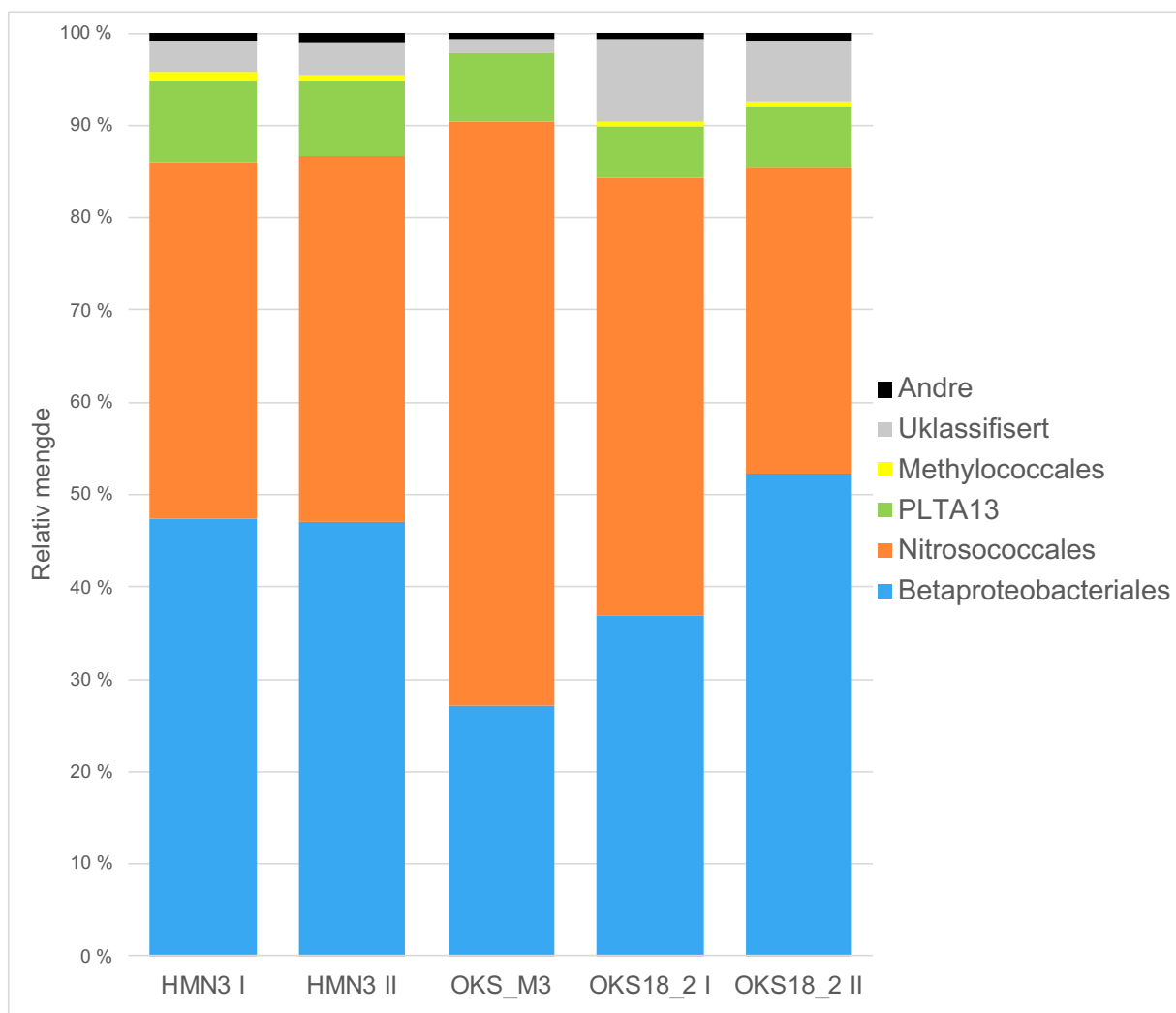
Figur 5.5.3. Relativ mengde (gitt i prosent) av de dominerende klassene i hver av de fem prøvene. De ti mest dominerende klassene er trukket frem, mens de resterende klassene (inkludert de uklassifiserte) er slått sammen i kategorien «andre». Som med fylum, er også 9/10 klasser bakterier, mens 1/10 er arker.

Innad i det dominerende fylum (Proteobacteria) er det en stor dominans av klasse Gammaproteobacteria. Blant hele det prokaryote samfunnet i prøvene utgjør klassen 17-29%, og innad i Proteobacteria utgjør klassen over 70%. I klasse Gammaproteobacteria er også tidligere klasse Betaproteobacteria, som i SILVA v 132 er blitt reklassifisert som orden Betaproteobacteriales (Parks et al., 2018). Etter Gamma følger Alphaproteobacteria (10-20% av Proteobacteria), og deretter Deltaproteobacteria (5-8% av Proteobacteria) (figur 5.5.4). Epsilonproteobacteria er fraværende fra samtlige prøver.



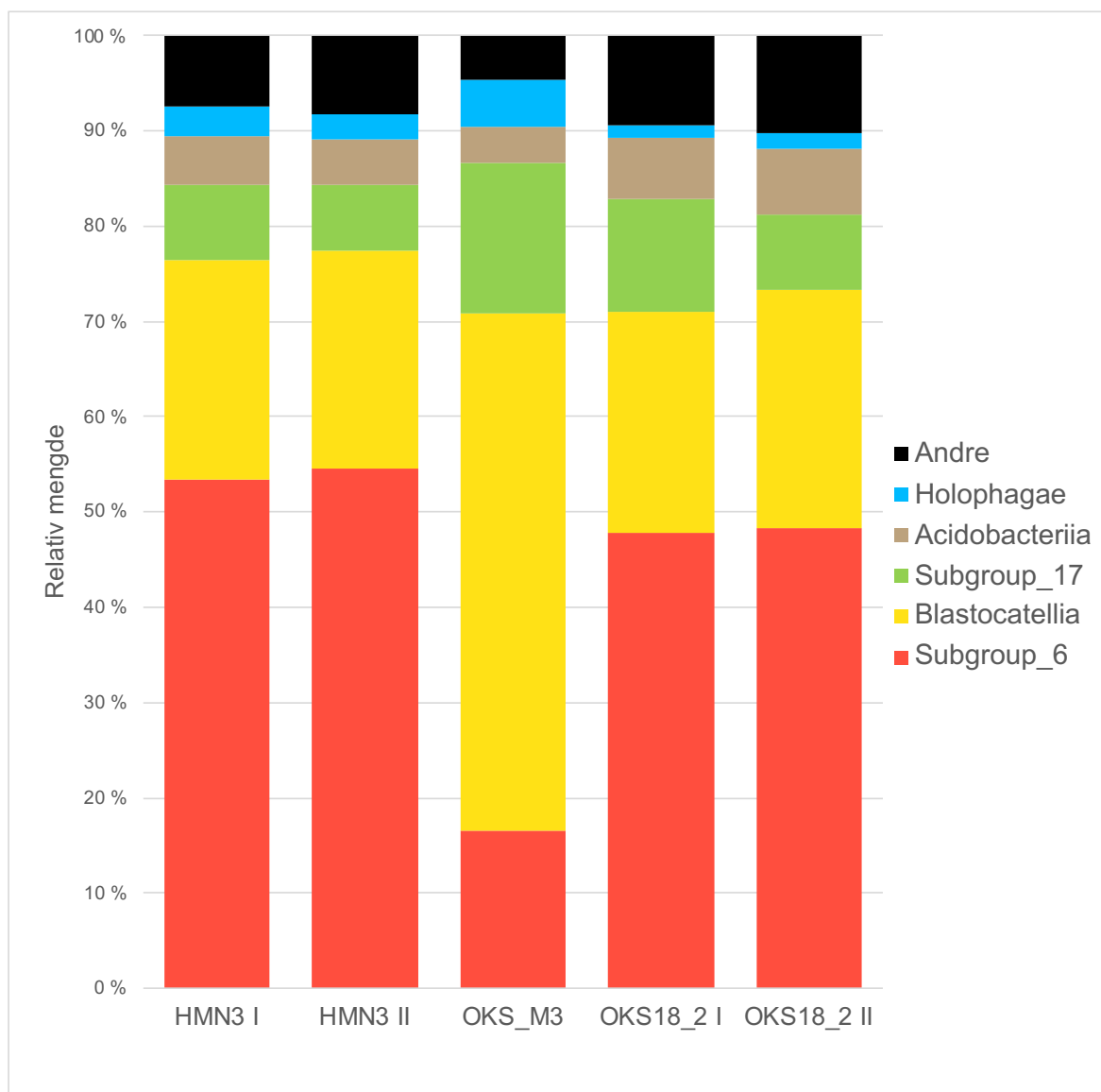
Figur 5.5.4. Relativ mengde (gitt i prosent) av dominerende klasser i Proteobacteria. Diagrammet viser den relative mengden innad i Proteobacteria, ikke for hele det prokaryote samfunnet. Gammaproteobacteria utgjør ~70% av Proteobacteria, men bare 17-29% av hele samfunnet. Alphaproteobacteria utgjør 10-20% av Proteobacteria, men bare 4-5% av hele samfunnet. Deltaproteobacteria utgjør 5-8% av Proteobacteria, men bare ~2% av hele samfunnet.

I Gammaproteobacteria er det en dominans av to ulike ordener. Dette er orden Betaproteobacteriales (i.e., tidligere klasse Betaproteobacteria) som utgjør 27-52% av Gammaproteobacteria, og orden Nitrosococcales som utgjør 33-63% (figur 5.5.5). Den dominerende slekten er WB1-P19 (orden Nitrosococcales), og utgjør 33-63% av Gammaproteobacteria. På dette taksonomiske nivået er det tydeligere at det er en vesentlig forskjell mellom de ulike prøvene. Spesielt orden Nitrosococcales utgjør en større relativ mengde i OKS_M3 (60%), sammenlignet med de fire andre prøvene (30-45%).



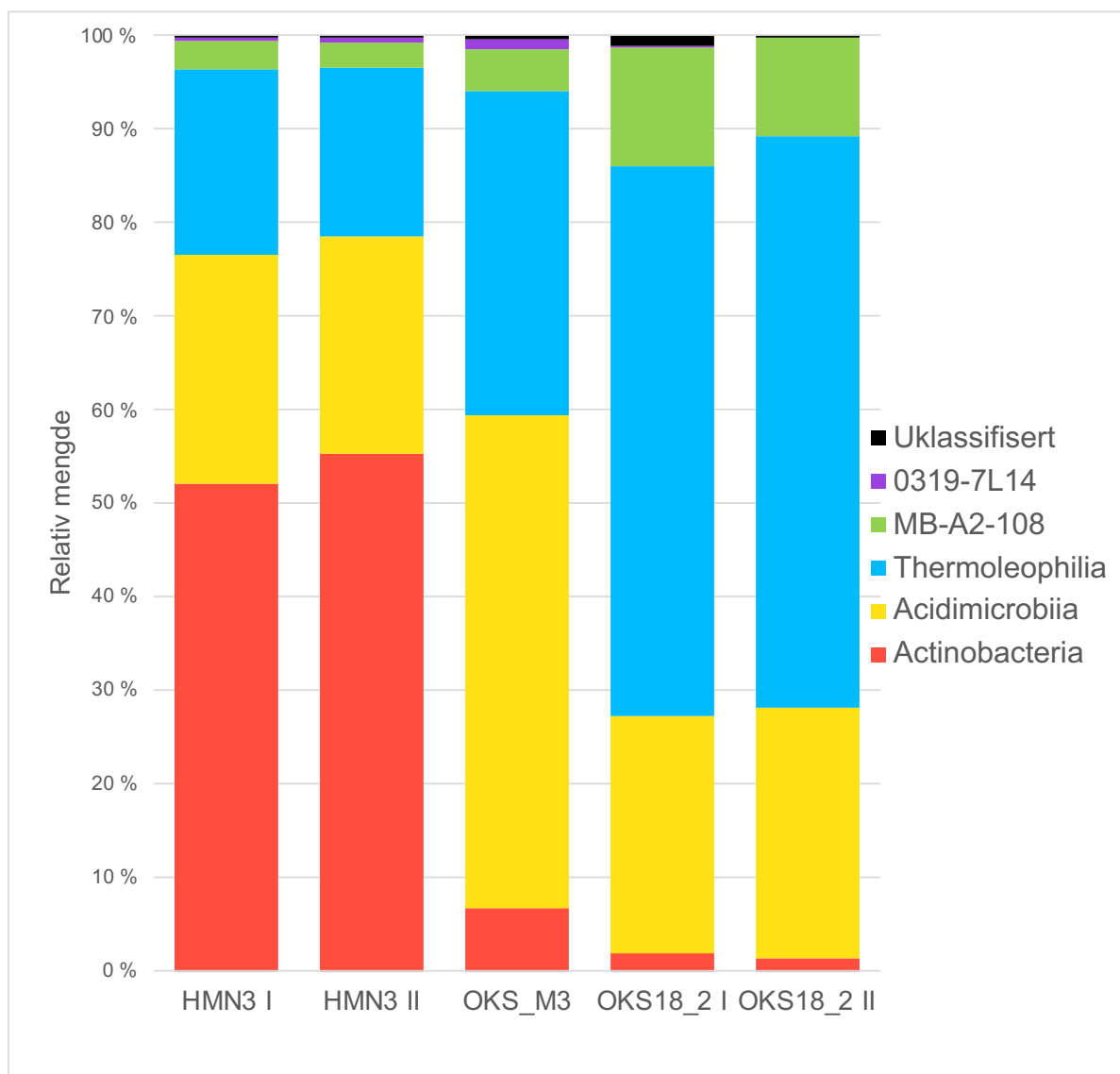
Figur 5.5.5. Relativ mengde (gitt i %) av dominerende ordener i Gammaproteobacteria. Klassen domineres av to ordener; Betaproteobacteriales (tidligere Betaproteobacteria) og Nitrosococcales. Diagrammet viser den relative mengden innad i klasse Gammaproteobacteria, ikke for hele det prokaryote samfunnet.

Acidobacteria er det tredje mest dominerende fylum i det prokaryote samfunnet i prøvene, med 9-12%. I Acidobacteria er det hovedsakelig to klasser som dominerer; Blastocatellia (Subgroup_4) og Subgroup_6 (figur 5.5.6). Acidobacteria er et fylum av bakterier som er svært utbredt i naturen, og har potensielt samme metabolske diversitet som Proteobacteria (Kielak et al., 2016). I dette fylumet er det større forskjeller mellom de fem prøvene, sammenlignet med Proteobacteria. Her skiller spesielt OKS_M3 seg ut fra de andre fire, ved at klasse Blastocatellia er mer dominerende enn klasse Subgroup_6.



Figur 5.5.6. Relativ mengde (gitt i prosent) av dominerende klasser i Acidobacteria. Diagrammet viser den relative mengden innad i Acidobacteria, ikke for hele det prokaryote samfunnet. Subgroup_6 utgjør 15-50% av Acidobacteria, men bare 1-6% av hele samfunnet. Blastocatellia (Subgroup_4) utgjør 20-55% av fylumet, men bare 2-5% av hele samfunnet. Subgroup_6 er den mest dominerende klassen i HMN3 og OKS18, mens Blastocatellia dominerer i OKS_M3.

Actinobacteria, det mest dominerende fylum fra dyrkingen (kapittel 5.5.3), er tatt med for å vise fordelingen av klasser i miljøprøver (figur 5.5.7). Fra Illumina-sekvensering var Actinobacteria bare det sjette mest dominerende fylum, med 2-5% totalt i prøvene. Fordelingen av klasser viser store ulikheter mellom prøvene, hvor blant annet klasse Actinobacteria som dominerer i HMN3 (~55%), er en av de minst dominerende klassene i OKS_M3 og OKS18 (1-7%). I OKS18 er det klasse Thermoleophilia som dominerer klart (~60%), ens Acidimicrobiia dominerer i OKS_M3 (53%).



Figur 5.5.7. Relativ mengde (gitt i prosent) av dominerende klasser i Actinobacteria. Diagrammet viser den relative mengden innad i Actinobacteria, ikke for hele det prokaryote samfunnet. Hvilke klasser som dominerer varier mye mellom de fem ulike prøvene.

Rokubacteria er det andre mest dominerende fylum i prøvene, og er nylig blitt definert (Becraft et al., 2017). I prøvene består Rokubacteria kun av én klasse. Klassen (NC10) består videre av to ulike ordener som utgjør omtrent 50% hver i samtlige prøver; orden Methylospirales og orden Rokubacteriales.

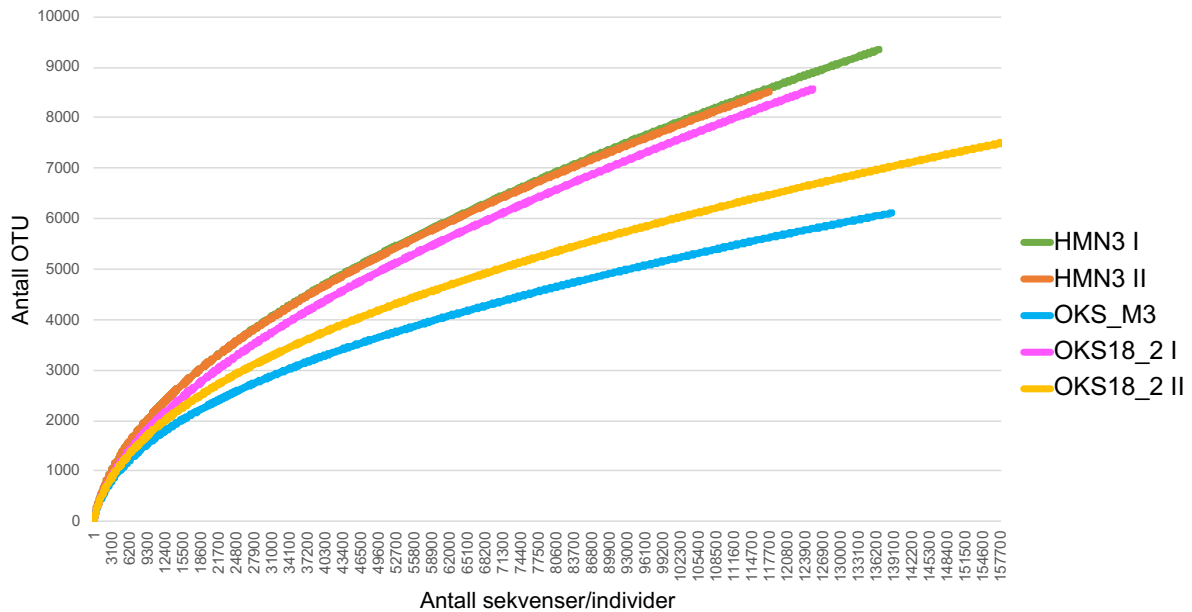
Verdier for ulike diversitetsindekser ble beregnet ved bruk av R-pakken «Vegan» (tabell 5.5.4). Indeksene viser at parallellene fra Hammarnesgrotta har større diversitet enn prøvene fra Okshola. HMN3 I og II har både et større antall arter og jevnere fordeling av artene. Alle prøver har likevel relativt lik fordeling av OTU-er (Pielou's Evenness). OKS_M3 fra Okshola har lavest diversitet.

Tabell 5.5.4. Diversitetsindekser som viser biodiversiteten i de fem ulike prøvene. Indeksene er beregnet ved bruk av R-pakken «Vegan», og er gjort av Julia E. Storesund.

Prøve	Chao1 Richness	Shannon Diversity	Pielou's Evenness
HMN3 I	8551	6,20	0,73
HMN3 II	8511	6,18	0,73
OKS_M3	5621	5,44	0,67
OKS18_2 I	8241	5,78	0,69
OKS18_2 II	6469	5,95	0,71

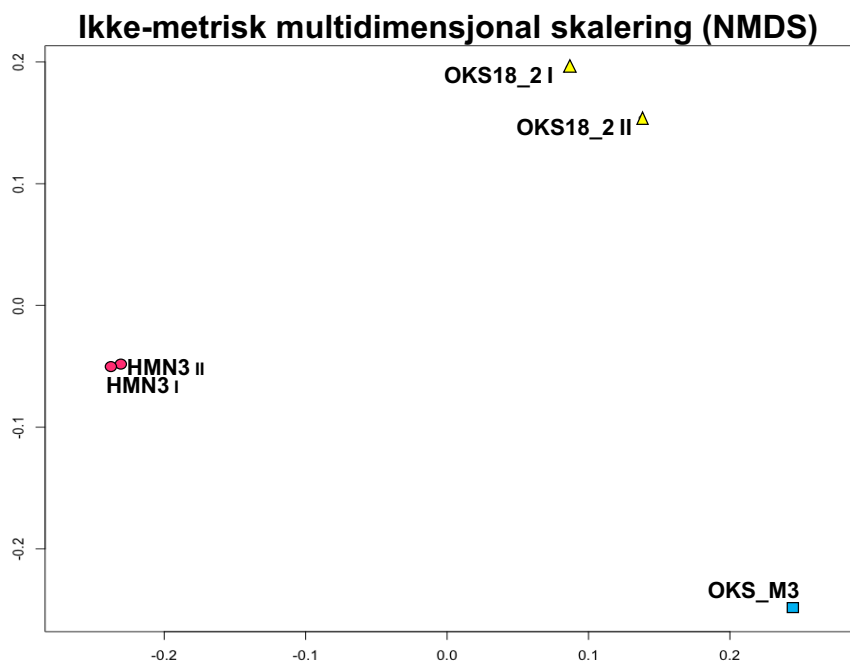
Fortynningskurven («rarefaction curve») viser sammenhengen mellom antall operasjonelle taksonomiske enheter og antall individer i prøvene, og er framstilt i figur 5.5.8. Desto flere ulike OTU-er og jevnere fordeling, desto brattere vil kurven være. En slak kurve betyr at artene er ujevnt fordelt, og at man har mange ulike OTU-er med få representanter (Gotelli & Colwell, 2011). Her er alle kurvene relativt bratte og indikerer en jevn fordeling av arter. Det er likevel noen forskjeller, hvor HMN generelt sett har en brattere kurve enn OKS, som betyr at OKS har en lavere artsrikdom enn HMN. Det at ingen av kurvene flater ut betyr at «metningspunktet» for kurven ikke er nådd, som indikerer at prøvene ikke representerer hele samfunnet i miljøet.

Figur 5.5.8 viser at parallellene HMN3 I og II har overlappende kurver, som betyr at de er svært like. Parallellene OKS18 I og II har ikke overlappende kurver og dermed er det en forskjell i artsrikdom mellom disse to.



Figur 5.5.8. Fortynningskurve («rarefaction curve») som viser forholdet mellom antall OTU (y-akse) og antall individer (x-akse) i prøvene. Kurven viser at det er større forskjell mellom OKS-parallellene enn HMN-parallellene, og at HMN har en større artsriktom enn OKS.

NMDS (ikke-metrisk multidimensjonal skalering) illustrerer hvor ulike eller like prøvene er (figur 5.5.9). Fra framstillingen er det tydelig at parallellene fra Hammarnesgrotta overlapper og er svært like. Parallellene fra Okshola (OKS18) overlapper ikke og er mer ulike. OKS_M3 er mest forskjellig fra de fire andre.



Figur 5.5.9. NMDS som viser hvor like prøvene er, basert på distansematriser. Figuren viser at parallellene av HMN3 er nærmest helt like, mens parallellene OKS18 er mer ulike. OKS_M3 er mest ulik de andre prøvene. NMDS er laget ved hjelp av Vegan-pakken i R.

5.5.3 DNA-sekvensering av renkultur

Det ble gjennomført DNA-sekvensering av isolater i oktober 2018 og februar 2019. I 2018 ble fire renkulturer dyrket på TB4-sekvensert. Disse var dyrket opp med månemelk fra Tukthuset som inokulum. I 2019 ble det gjort sekvensering på fire isolater dyrket på R2A-medium inokulert med månemelk fra Tukthuset (x 1), Okshola (x 2) og Moengrotta (x 1).

For å identifisere organismene ble sekvensene sammenliknet med sekvenser i BLAST-databasen til GenBank (Altschul et al., 1990). Resultatet fra søket er vist ved tabell 5.5.6. Isolatene fra TB4-medium var alle fylogenetisk tilhørende fylum Actinobacteria. I skåler med R2A-medium ble det isolert kulturer av både fylum Actinobacteria og klasse Betaproteobacteria (fylum Proteobacteria).

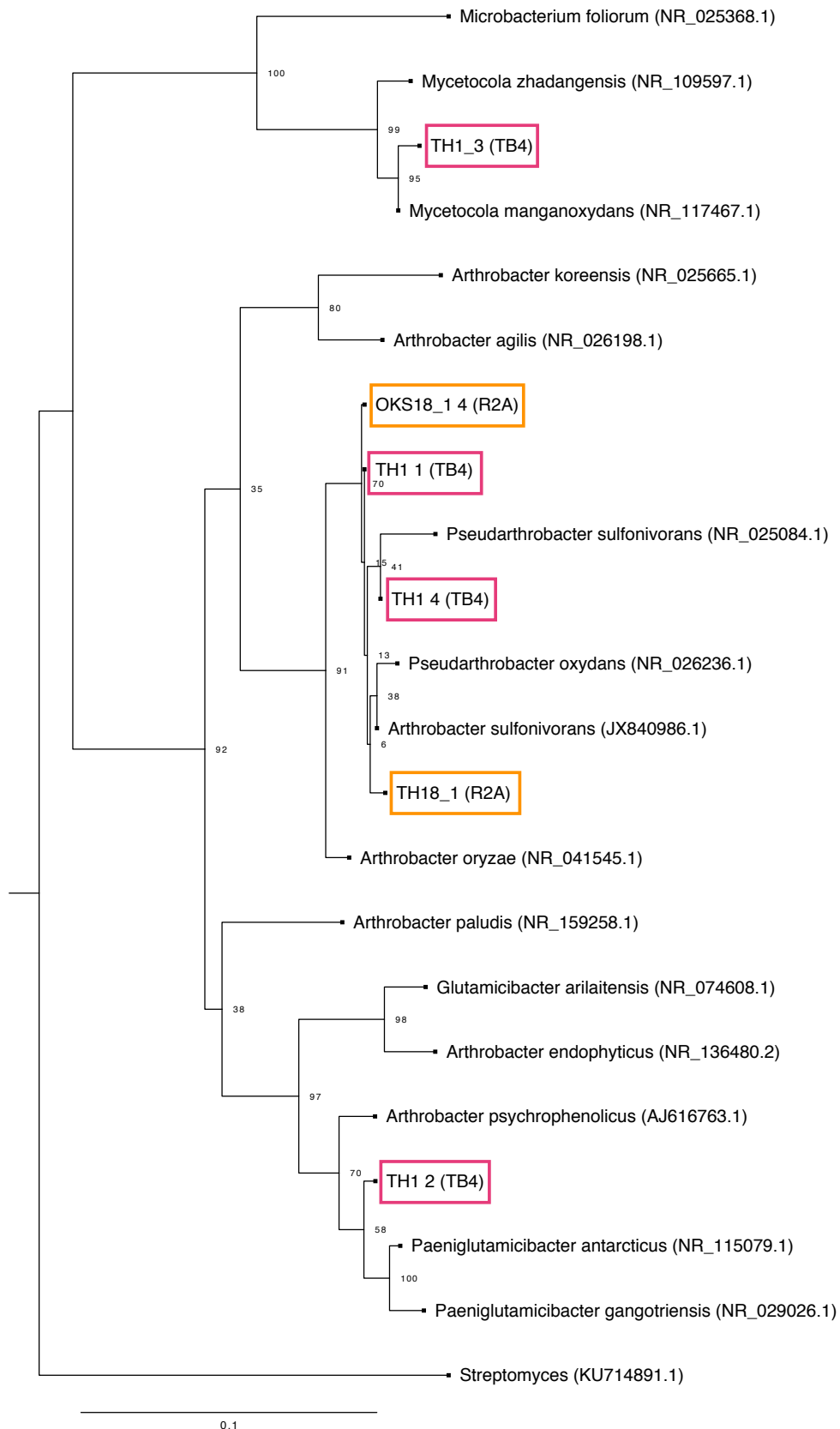
For å bestemme hvordan de ulike isolatene er gruppert sammen ble det laget fylogenetiske trær. Fylogenetiske trær brukes for å beskrive slektskapet og den evolusjonære sammenhengen mellom ulike arter. Det fylogenetiske treet for Actinobacteria viste at fire av isolatene var svært like (figur 5.5.10). Likheten mellom de fire isolatene er også vist ved tabell 5.5.5, som viser at isolatene har mer enn 99% lik 16S rRNA-sekvens. Denne beregningen ble gjort ved bruk av BLAST («Align two sequences»).

Tabell 5.5.5. Likheten mellom isolatene identifisert som Actinobacteria. Tallene er hentet fra BLAST-databasen til Genbank ved å bruke «align two sequences»-funksjonen. Alle isolatene er 91% likere eller mer. Fire av isolatene (TH 1, TH1 4, OKS18_1 4, TH18_1) er mer enn 99% like.

Isolat	TH1 1	TH1 2	TH1 3	TH1 4	OKS18_1 4	TH18_1
TH1 1	1.0000	0.9641	0.9151	0.9964	0.9986	0.9936
TH1 2	0.9641	1.0000	0.9178	0.9647	0.9960	0.9636
TH1 3	0.9151	0.9178	1.0000	0.9153	0.9179	0.9169
TH1 4	0.9964	0.9647	0.9153	1.0000	0.9957	0.9928
OKS18_1 4	0.9986	0.9660	0.9179	0.9957	1.0000	0.9943
TH18_1	0.9936	0.9636	0.9169	0.9928	0.9943	1.0000

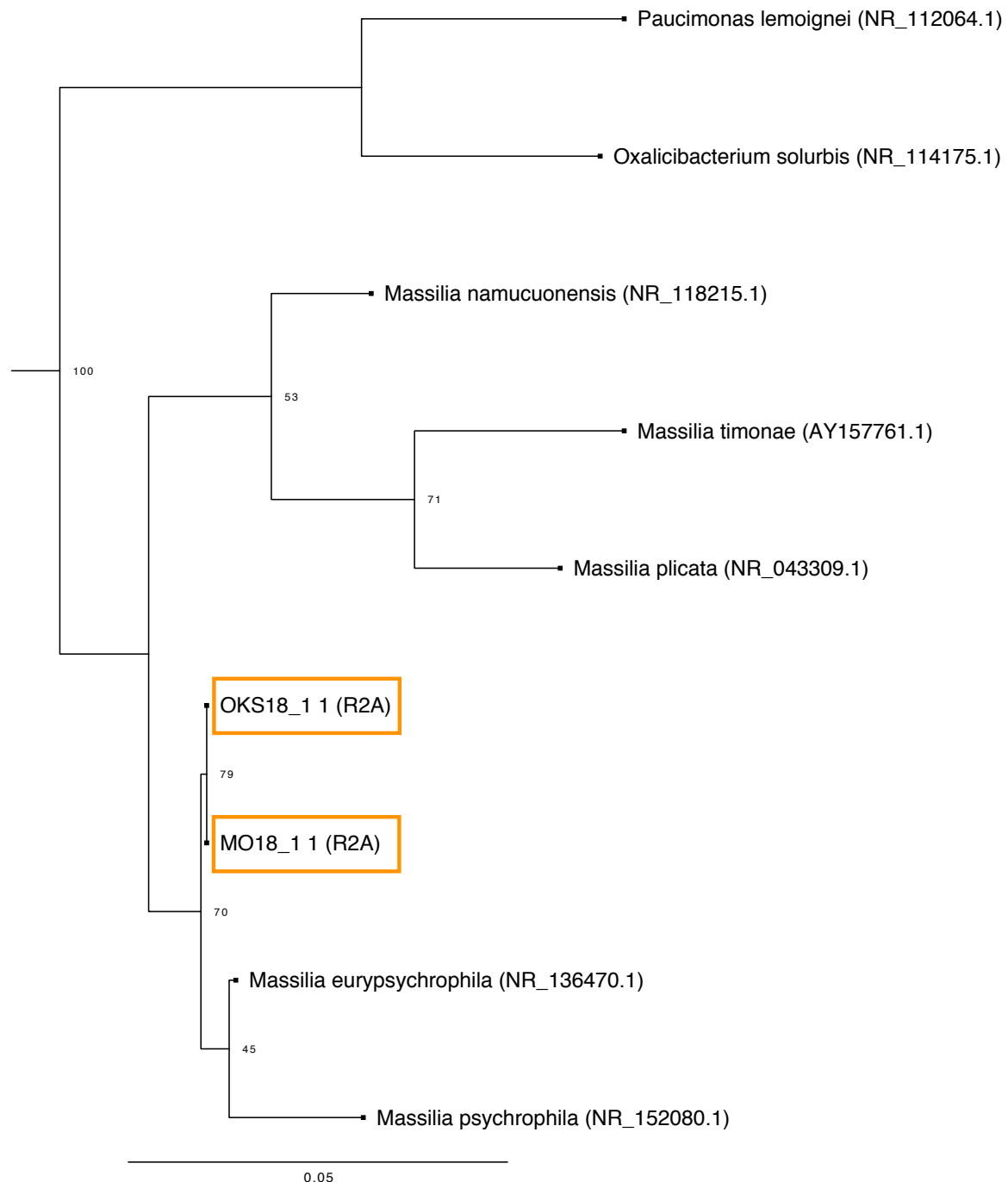
Tabell 5.5.6. Resultat fra søk i BLAST-databasen til GenBank. Databasen «16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)» er brukt i BLAST-søket. Det er valgt ut to treff for hvert av isolatene, og tabellen er ordnet etter fylum. Kolonnen for habitat viser hvilket miljø bakterien først ble isolert fra, med medfølgende referanse i kolonnen lengst til høyre. E-verdien var 0,0 for alle treffene som er presentert i tabellen. AMS = Antarktiske marine sedimenter. TH = Tukthuset. MO = Moengrotta. OKS = Okshola. AJ = Antarktisk jord. AMS = Antarktiske marine sedimenter.

Nærmeste slektning i GenBank	Isolat	Likhet	Dekning	Tilgangsnr.	Habitat	Referanse
<u>Actinobacteria</u>						
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> strain DSM 20119	TH18 1	98,65%	100%	NR_026236.1	Luft	(Kallimanis et al., 2009)
“	OKS18 4	98,86%	100%	“	Luft	“
“	TH1 1	98,66%	99%	“	Luft	“
“	TH1 4	99,14%	99%	“	Luft	“
<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	TH18 1	98,58%	100%	NR_025084.1	Jord	(Borodina et al., 2000)
“	TH1 4	99,14%	99%	“	Jord	“
<i>Arthrobacter oryzae</i> strain KV-651	OKS18 4	98,72%	100%	NR_041545.1	Jord	(Kageyama et al., 2008)
“	TH1 1	98,45%	99%	“	Jord	“
<i>Paeniglutamicibacter antarcticus</i> strain SPC26	TH1 2	98,59%	99%	NR_115079.1	AMS	(Pindi et al., 2010)
<i>Paeniglutamicibacter gangotriensis</i> strain Lz1Y	TH1 2	98,24%	99%	NR_029026.1	AJ	(Gupta et al., 2004)
<i>Mycetocola manganoxydans</i> strain MB1-14	TH1 3	99,49%	97%	NR_117467.1	Ørken	(Luo et al., 2012)
<i>Mycetocola zhadangensis</i> strain ZD1-4	TH1 3	98,41%	98%	NR_109597.1	Snø	(Shen et al., 2013)
<u>Betaproteobacteria</u>						
<i>Massilia namucuoensis</i> strain 333-1-0411	OKS18 1	97,61%	100%	NR_118215.1	Jord	(Kong et al., 2013)
“	MO18 1	97,66%	100%	“	Jord	“
<i>Massilia psychrophila</i> strain B1555-1	OKS18 1	97,94%	99%	NR_152080.1	Iskjerne	(Guo et al., 2016)
“	MO18 1	98%	99%	“	Iskjerne	“



Figur 5.5.10. Fylogenetisk tre (maximum likelihood) med isolater identifisert som Actinobacteria. I tillegg til de seks isolatene, er det tatt med arter identifisert med BLAST. For hvert isolat er det tatt med to arter som er mer enn 97% like og én art som er mindre enn 95% lik. Streptomyces er tatt med for å rote treet. Tilgangsnummer («accession number») er indikert i parentesen bak artsnavnet. Verdier på forgreiningene er «bootstrap»-verdier. Det ble brukt 100 «bootstraps».

Det fylogenetiske treet for isolatene identifisert som Betaproteobacteria viste at også disse isolatene var svært like (figur 5.5.11). Sammenligning av isolatene i BLAST indikerte at de hadde 100% identisk 16S rRNA-gen.



Figur 5.5.11. Fylogenetisk tre (maximum likelihood) med isolater identifisert som Proteobacteria. I tillegg til de to isolatene, er det tatt med arter identifisert med BLAST. For hvert isolat er det tatt med to arter som er mer enn 97% like og én art som er mindre enn 95% lik. Tilgangsnummer («accession number») er indikert i parentesen bak artsnavnet. Verdier på forgreiningene er «bootstrap»-verdier. Det ble brukt 100 «bootstraps».

6 Diskusjon

Problemstillingen for oppgaven er å finne ut *hva* som danner gips, jarositt og månemelk, og videre *hvordan* de dannes. Målet var derfor å undersøke om mineralene og speleothemet dannes biotisk, abiotisk eller som følge av en kombinasjon av de to. I dette kapittelet diskuteres resultatene fra gips/jarositt og månemelk hver for seg. Ved å evaluere metoder og tolke resultater blir et forslag til dannelse av grottemineralene og speleothemet presentert.

6.1 Jarositt og gips

6.1.1 pH og temperatur

Målt pH-verdi av jarositt/gips ligger på 4,30 og 6,36, som er høyere enn hva som vanligvis rapporteres fra forekomster av jarositt. Tidligere studier på jarositt har som regel vist svært sure miljøer, med pH-verdier helt ned mot 1 (Kaksonen et al., 2014). Mulige feilkilder fra pH-målingen er allerede beskrevet i resultatene, og det er mulig at prøven med pH = 4,3 egentlig har en pH < 4. Det er hovedsakelig ved pH < 4 at man får Fe³⁺ utfelt som jarositt. Ved høyere pH minker mengden jarositt, mens mengden gips øker (Nurmi et al., 2010). Dette er fordi en økning i pH gjør gips stabil, men fører til oppløsning av jarositt (Zolotov & Shock, 2005). At prøvene består av en blanding av jarositt og gips kan også være årsaken til at pH-verdien er høyere enn hva som er kjent fra jarositt.

Lav temperatur (~4 °C) i grottene i Nordland er en parameter som er uvanlig sammenlignet med andre forekomster av jarositt. Fra tidligere studier rapporteres det at optimal temperatur for jarositt ligger på 20-30 °C (Kupka et al., 2007). Dermed favoriserer verken temperatur eller pH utfelling av jarositt i grottene i Nordland slik de er i dag. Tidligere arbeid gjort på lignende temperaturer (5 °C) og pH-verdier (pH > 5) viser at mineralet schwertmannitt (Fe₈O₈(OH)₆SO₄)

(Bigham et al., 1994; Bigham et al., 1996) favoriseres over jarositt under slike forhold. Dette er derimot et mindre stabilt mineral som ofte blir omgjort til jarositt med tiden (Kupka et al., 2007). Forekomster av schwertmannitt beskrives i likhet med jarositt som brungule til oransje, og det kan være vanskelig å skille mellom mineralene i felt.

6.1.2 EDS og XRD

Elementanalyse ved EDS (energidispersiv røntgenspektroskopi) indikerte at noen krystaller var gips, mens andre var jarositt. Det ble også detektert silisium og aluminium, som er elementer i blant annet muskovitt ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{Fe},\text{OH})_2$) og kvarts (SiO_2). Muskovitt og kvarts er begge vanlige mineraler i glimmerskifer. Mineralprøver fra Grønligrotta ble tatt av skorper på rusten glimmerskifer, og det er derfor ingen overraskelse at noen glimmerskifer-assosierte mineraler er å finne i prøvene. XRD-analysene (røntgendiffraksjon) viste hovedsakelig tilstedeværelse av gips og jarositt, med en dominans av gips. Dette kan ha en sammenheng med pH-verdien slik som beskrevet ovenfor.

Den idealiserte formelen for jarositt har et atomært forhold på 1:1:2 for K:Fe:S. Analyser av jarositt fra Grønligrotta ved EDS viste derimot ikke dette forholdet. Det var generelt lite kalium tilstede, så det er mulig at mineralet er H_3O^+ -jarositt eller at man har en blandingsovergang mellom K^+ og H_3O^+ . Analysen viste også at jern utgjør en større andel enn svovel. I schwertmannitt er det atomære forholdet mellom elementene 8:1 (Fe:S). At det er for mye jern sammenlignet med den idealiserte formelen for jarositt og for lite for den idealiserte formelen for schwertmannitt, kan bety at det er sistnevnte som først har blitt dannet for og deretter bli omgjort til jarositt. Det at analysene fra XRD kun viste jarositt og ikke schwertmannitt er imidlertid et godt nok bevis for at mineralet er jarositt, og at det er EDS-metoden som er usikker. EDS kan muligens kun brukes som en indikator, mens XRD er mer pålitelig og brukes for å påvise mineralene.

6.1.3 Dyrking

Sulfittagar (SA) og tiosulfatagar (TSA) inokulert med 50 µL jarositt/gips (10^{-1} fortynning) gav noe vekst. Det var ikke mulig å plukke de grønne koloniene med svarte forsteininger i midten fordi de var for harde. Den spesielle karakteristikken ved disse koloniene ligner ikke på kolonier rapportert fra tidligere arbeid relatert til isolering av bakterier fra jarositt. Det er ikke mulig å si noe om hvilken type organisme som har dannet koloniene eller om det er relatert til en kjemisk reaksjon, som følge av at det ikke er resultater fra verken lysmikroskop, SEM eller DNA-sekvensering.

At mediene ikke var optimalisert for jarositt med hensyn på pH vil naturlig påvirke resultatet og den oppnådde veksten. Dersom det er jern-oksiderende bakterier man antar å finne i prøvene slik som i tidligere studier på jarositt, vet man at disse bakteriene er svært pH-avhengige. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, som er den mest rapporterte bakterien fra pyrittoksidasjon og utfelling av jarositt, vokser helst på pH-verdier på mellom 1 og 2 (Valdés et al., 2008). Da er det nærliggende å tro at medier med en pH på 4-6 ikke er optimalt for å fremme vekst av disse. For videre arbeid bør det derfor foretas mer nøyaktige pH-målinger i tillegg til at sammensetning av medium bør optimaliseres.

6.1.4 Sveipelektronmikroskop (SEM)

Undersøkelser av prøver fra Grønligrotta i SEM viste krystaller med kjent morfologi av både gips og jarositt. Fra undersøkelsene kunne det observeres hovedsakelig store, flakete krystaller (gips) og mindre pyramidal-kubiske krystaller (jarositt). Det er allerede diskutert om det heller kan være schwertmannitt enn jarositt. Her er SEM et godt verktøy da de to mineralene vanligvis har ulik krystallform. Schwertmannitt beskrives til å ha lite utviklet krystaller sammenlignet med jarositt som har godt utviklet krystaller (Wang et al., 2006). I våre prøver var krystallene godt utviklet.

6.1.5 DNA-ekstraksjon

Isolering av DNA fra jarositt gav negative resultater. Det ble derfor ikke gjort DNA-sekvensering av jarositt og gips, verken av isolater eller de native prøvene. Undersøkelser i fluorescensmikroskop viste at det var en tilstedeværelse av celler i prøvene ($6,73\text{-}7,69 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ våtvekt), og det kan derfor være problemer knyttet til PCR eller DNA-ekstraksjon. Test med *E.coli* tilsatt i templatet viste at det ikke er komponenter som hindrer PCR-reaksjonen, og det er trolig noe som hindrer DNA-ekstraksjon.

Det er kjent at det kan være vanskelig å ekstrahere DNA fra mineralprøver. For eksempel kan sterke bindinger mellom celler og mineraler gjøre det vanskelig å løsne dem fra hverandre, slik at man ikke klarer å få ut DNA. Dette fordi DNA er negativt ladet slik at de lett bindes til mineraler. Videre kan det være utfordringer med mineral- og bergartsprøver fordi det mikrobielle samfunnet er «fanget» inne i matriksen (Herrera & Cockell, 2007). En annen årsak kan være at cellene i prøvene er små og derfor vanskelige å få i lysis (i.e., bryte ned cellemembran). Begge ekstraksjonsmetodene som ble benyttet (CTAB og Powersoil) har derimot vært vellykket for andre vanskelige prøver med liten biomasse. Muligheten for at det ikke finnes noe DNA å ekstrahere fra prøvene må derfor vurderes. Andre studier på jarositt har konkludert med at mineralet er blottet for mikroorganismer (Jones & Renaut, 2007), og man kan ikke se helt bort i fra at det er tilfellet her. At resultatet fra FISH viser DNA-holdige celler og at dyrking gav noe vekst, er derimot argumenter for at det er celler tilstede og at det er ekstraksjonsmetodene som ikke har fungert.

6.1.6 Er biomineralisering en mulighet?

Det er påvist flere tilfeller hvor *A. ferrooxidans* oksiderer Fe^{2+} til Fe^{3+} etter abiotisk oppløsning av pyritt, og det er også beskrevet tilfeller hvor bakterien er en viktig katalysator for begge reaksjonene (Crundwell, 2003). *A. ferrooxidans* er derimot en acidofil (i.e., «syreelskende») bakterie som vokser ved svært lave pH-verdier på mellom 1 og 2 (Valdés et al., 2008). Det er derfor ikke selvsagt at bakterien også

finnes i jarosittforekomstene i Grønligrotta og Okshola. Den svovel-oksiderende bakterien *Acidithiobacillus thiooxidans* er en annen bakterie kjent fra pyrittoksidasjon. I likhet med *A. ferrooxidans* vokser også *A. thiooxidans* på lave pH-verdier og ved 25 °C (McGuire et al., 2001). Fra studier der utfelling av jarositt har blitt påvist som en biologisk prosess er det dessuten observert at utfellingene utvikles mer som aggregater enn tydelige krystaller (Jones & Renaut, 2007). Undersøkelser i SEM har vist at jarositt fra Grønligrotta består av godt utviklede krystaller, som kan være en indikator på at det heller er dannet abiotisk.

Alt tatt i betraktning virker det sannsynlig at jarositt og gips i grottene i Nordland er dannet abiotisk framfor biotisk. Det at pH og temperatur i miljøet ikke er optimale for vekst av kjente bakterier fra lignende prosesser støtter denne antakelsen, sammen med det faktum at abiotisk oksidasjon av Fe^{2+} til Fe^{3+} er svært effektiv i oksiderende miljø med høyere pH. Det er likevel flere usikkerheter og man kan ikke vite opphavet til mineralene helt sikkert. Det er mulig den reelle pH-verdien i jarositt mye lavere enn den målte verdien. Det kan også kun spekuleres i om de kjente jern- og svovel-oksiderende bakteriene er tilstede eller ikke, så lenge det ikke finnes sekvenseringsdata. For framtidig arbeid vil spesielt optimalisering av dyrking og FISH være viktig. En annen tilnærming er å analysere svovel-isotoper i jarositt og gips. Dersom mineralene er dannet fra biologisk aktivitet vil den lette isotopen ($\delta^{32}\text{S}$) dominere over den tunge isotopen ($\delta^{34}\text{S}$), fordi den lette isotopen favoriseres av mikroorganismer (Ford & Williams, 2007).

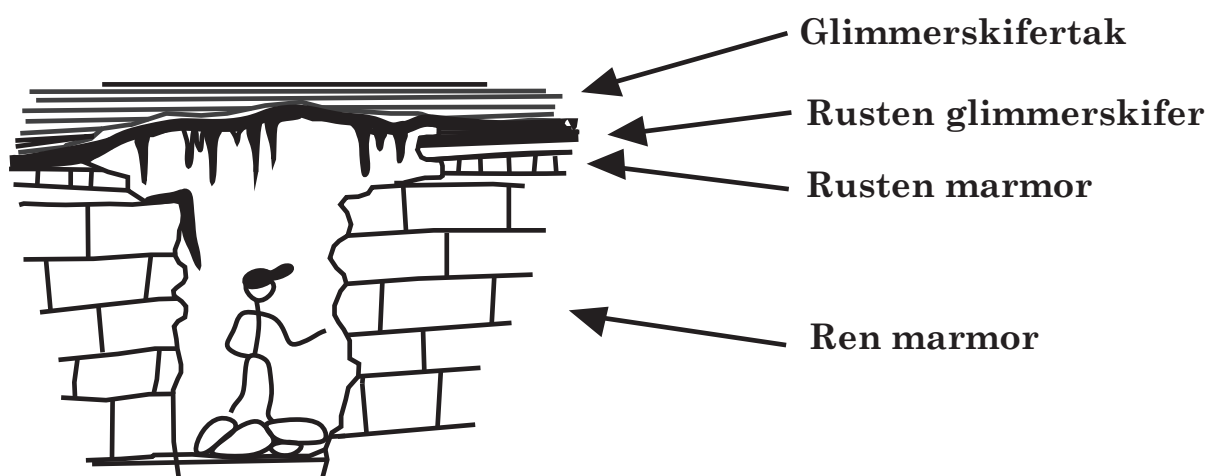
6.1.7 Forslag til dannelsesprosess for jarositt og gips

En abiotisk dannelsesprosess for jarositt og gips starter med tilgang på vann. I Grønligrotta er det god tilgang på vann og under siste felttur i 2018 var områdene hvor man fant forekomster av jarositt og gips svært fuktige. Vann bidrar med oksygen som reagerer med pyritt, og det blir dannet oppløst toverdlig jern, sulfat og syre (H^+ -ioner). Videre oksideres Fe^{2+} til Fe^{3+} , som er reaksjonen der jern-oksiderende bakterier bidrar i enkelte miljø. I Grønligrotta og Okshola skjer denne prosessen trolig som følge av at det er et oksiderende miljø i grottene. Etter

oksidasjon av pyritt får man dannet de sekundære mineralene jarositt og gips. Jarositt dannes fra reaksjonen mellom K^+ (eller et annet monovalent kation, for eksempel hydroniumion, H_3O^+), Fe^{3+} , SO_4^{2-} og vann. Fra denne reaksjonen slippes syre ut i miljøet. Kilder til K^+ -ioner kan være glimmerskifer, som består av blant annet muskovitt. Forvitring av glimmerskifer vil føre til tilgjengelige K^+ -ioner i vannfase. Gips dannes fra reaksjonen mellom Ca^{2+} , SO_4^{2-} og vann, hvor kalsium er tilgjengelig i miljøet som et resultat av oppløsningen av $CaCO_3$. Man kan se for seg et scenario hvor først jarositt felles ut frem til Fe^{3+} -ionene er brukt opp, og deretter at gips dannes fra resterende sulfationer og kalsium. Da avhenger dominansen av jarositt eller gips av konsentrasjonen av jern kontra kalsium, i tillegg til hvilken pH-verdi som er i miljøet.

6.1.8 Konsekvenser

Pyrittoksidasjon og påfølgende utfelling av jarositt frigjør syre til miljøet. Det er derfor foreslått at dannelsen av passasjer i Grønligrotta og Okshola kan være initiert av disse mekanismene (Lauritzen, 2001). Frigjort H^+ vil føre til en surere løsning, som kan føre til oppløsning av marmor (figur 6.1.1) (Ford & Williams, 2007). Tilstedeværelse av jarositt som er påvist her, sammen med morfologiske trekk som syredannede dryppegroper i marmor (figur 2.3.1, kapittel 2.3), er begge indikatorer på at det er eller har vært et surt miljø i Grønligrotta.



Figur 6.1.1. Figur som illustrerer hvordan surt vann med svovelsyre kan løse opp marmor. Dette kan skje som følge av pyrittoksidasjon i glimmerskifertaket. Modifisert fra Lauritzen et al. (2005b).

Mulige implikasjoner av dette er at man kan få initiert tidlig speleogenese (i.e., grottedannelse) uten tilgang på CO₂, dersom pyrittoksidasjon med påfølgende korrosjon ved svovelsyre er tilstrekkelig. Da kan man se for seg et scenario der tidlig speleogenese kan ha skjedd samtidig som det har vært isdekker over Nordland i kvartær, fordi oksidasjonsprosessen er uavhengig av atmosfærisk CO₂. Med tidlig speleogenese menes det første steget hvor en liten sprekk utvides og prosessen settes i gang. Man tenker imidlertid at i et slikt scenario vil mangelen på atmosfærisk oksygen være en begrensende faktor som kan hindre oksidasjonen av pyritt (Tranter et al., 1993). Ved lave konsentrasjoner av atmosfærederivert O₂ kan tilstedeværelsen av mikrobielle populasjoner drive pyrittoksidasjonen og dermed bidra til initieringen av speleogenese. Det er også en mulighet for at prosessen kan skje dersom det er nok oksygen i det subglasiale vannet (Tranter et al., 2002). At man i denne studien ikke har kunnet påvise tilstedeværelsen av bakterier som bidrar i pyrittoksidasjon gjør at spørsmålet rundt dette mulige scenarioet med CO₂-uavhengig speleogenese forblir uløst.

6.2 Månemelk

6.2.1 Geokjemi

Geokjemiske analyser av vannprøver ved IC (ionekromatografi) og ICP-OES (induktivt koplet plasma optisk emisjonsspektometri) viste konsentrasjoner lik de man vanligvis har i ferskvann. De dominerende kationene i ferskvann er som oftest Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ og K⁺, mens Fe og Sr gjerne finnes i mindre mengder (Brezonik & Arnold, 2011). Det samme gjelder konsentrasjonene av Cl⁻ og SO₄²⁻. Det er noen forskjeller i konsentrasjonene når man sammenligner de to ulike prøvene fra hver grotte (dryppende vann og vann tatt direkte fra månemelk), men det er ingen trend der disse forskjellene er like for alle tre grotter. Det er derfor vanskelig å trekke ut noen konklusjoner fra analysene annet enn at alle vannprøvene viser normale konsentrasjoner for ferskvann med noen lokale, marginale variasjoner. For elementene med lavest konsentrasjone vil usikkerhet tilknyttet målingene gjøre at forskjellene mellom prøvene blir ubetydelige.

Det er gjort samme geokjemiske analyser av perkolerende vann som renner over månemelk i to ulike grotter nord-øst i Italia (Engel et al., 2013). Konsentrasjon av ioner viser nærmest helt like verdier som fra vår studie, med en klar dominans av Ca^{2+} . Den største forskjellen er at konsentrasjonen av Mg^{2+} var $<0,002-0,04$ mMol/L for grottene i Italia, og $0,11-0,25$ mMol/L for grottene i Nordland. Også i en grotte i India er det blitt gjort geokjemiske analyser av «månemelkvann» (Baskar et al., 2011). Fra dette arbeidet ser man igjen lignende konsentrasjoner for de målte ionene utenom konsentrasjonen av Mg^{2+} som er høyere i grotten i India enn grottene i Nordland.

Analyser ved XRD viste relativt entydig resultat der alle undersøkte prøver av månemelk bestod av kalsitt. Dette ble også bekreftet fra utregningene på Ca/Mg-forholdet, som indikerte at det var ren kalsitt. Kalsitt er det vanligste mineralet som månemelk består av og siden grottene i Nordland er utviklet i marmor som i stor grad består av kalsitt, var det også kalsitt man forventet å finne i disse forekomstene. De atomære forholdene fra analyser med EDS er derimot ikke helt lik den idealiserte formelen (Ca:C:O, 1:1:3). Dette kan være som følge av usikkerheter tilknyttet selve metoden.

Utfellingene som forekom i petriskåler inokulert med månemelk var vanskelige å utføre elementanalyser på, da partiklene var små ($< 5 \mu\text{m}$) slik at det er usikkert hvorvidt man treffer det man ønsker å analysere. Det var likevel mulig å analysere hele bildet ved bruk av kartleggingsfunksjonen, som viste topper for kalsium. Dette er en god indikator på at utfellingene er CaCO_3 fordi ingenting annet i preparatene inneholder dette elementet.

6.2.2 Fluorescerende in situ hybridisering (FISH)

Bakterieproben (EUB338) viste en nærmest 100% overlapp med DAPI basert på telling på mikrografier, som stemmer godt overens med resultater fra Illumina-sekvensering. Derfor er det hovedsakelig bakterier som er tilstede i prøvene, og lite arker og eukaryoter (e.g., sopp). Det ble heller ikke observert noe som så ut

som sopp rent morfologisk, da det man fant av lange kjeder var sammensatt av flere celler og ikke var soppkyfer. Flere av prøvene hadde områder hvor det var en ansamling av celler, som kan være «hotspots» hvor det er et høyere antall celler enn de omkringliggende områdene. Konsekvensene av dette er at man har et heterogent samfunn som varierer stort selv på et lite areal.

Fra undersøkelser med HGC236-proben kunne det se ut som at 1/3 av de DAPI-fargede cellene også tilhørte fylum Actinobacteria. Dette resultatet stemmer greit sammenlignet med DNA-sekvensering av isolater, men ikke sammenlignet med Illumina-resultatene. Potensielle feilkilder må derfor vurderes. For eksempel kan det være at proben ikke er spesifikk mot Actinobacteria, men i tillegg fanger opp andre bakteriegrupper. At GAMBET-proben (Gamma- og Betaproteobacteria) ikke detekterte celler i noen prøver er et argument for at utførelsen av metoden ikke har vært optimal. At de dominerende klassene fra Illumina tilsynelatende ikke er tilstede i det hele tatt når prøvene undersøkes med FISH medfører at alle resultater fra metoden må vurderes og potensielt forkastes. Det er mulig at det kun er *in situ* hybridiseringen med GAMBET som ikke har vært optimal, og at resultatene med andre prober er representative. Da det ikke har blitt gjort mer enn ett forsøk med probene kan man derimot ikke vite sikkert om dette er tilfellet eller ikke.

Beregning av cellekonsentrasjon basert på telling i fluorescensmikroskop viste konsentrasjoner på rundt 10^7 - 10^8 celler g^{-1} (våtvekt). I de fleste andre studier på mikrobielle samfunn i grotter er konsentrasjonen omtrent 10^6 celler per gram bergart/mineral (Barton & Jurado, 2007). Det er mulig at månemelk fra Nordland har en høyere konsentrasjon av celler enn hva man vanligvis finner i næringsfattige grottemiljø, men det finnes også feilkilder man må diskutere. Som tidligere beskrevet inneholdt prøvene ansamlinger av celler. Selv om det ble gjort flere tellinger på ulike steder på hvert av de *in situ* hybridiserte filtrene, kan disse ansamlingene medføre at man får en høyere cellekonsentrasjon enn hva som er realiteten. Hadde det blitt foretatt telling på mange ulike prøver fra samme

forekomst kunne man kanskje ha fått en lavere konsentrasjon, eller funnet ut at de eksisterende beregningene er representative.

6.2.3 Sveipelektronmikroskop (SEM)

Undersøkelser i SEM viste at månemelk inneholder aggregater av nåleformede krystaller, filamenter, samt «taggete» krystaller. Aggregatene gjorde det vanskelig å observere om det lå noe under eller mellom dem, men i de mer fortynnede prøvene kunne man observere celler. Det som i resultatet ble kalt for filamenter eller nanofiber har i tidligere arbeid blitt lite undersøkt sammenlignet med nålefiberkalsitt, fordi enkelte forfattere har antatt at det er organisk (Bindschedler et al., 2014). Det er trolig som følge av den fleksible naturen til fibrene at man ved første inntrykk konkluderer med at det er biologisk (Borsato et al., 2000). I denne studien virker derimot nanofibrene å være uorganiske. Det diskuteres også om nålefiberkalsitt er dannet abiotisk, fra bakterier eller fra sopp. I følge Cailleau et al. (2009) har nålefiberkalsitt glatte flater som følge av at de dannes inne i organiske «lommer» relatert til sopp. I denne studien er det derimot ikke blitt observert noe som ligner på organiske «lommer» og heller ikke noe som utpeker seg som sopp. Månemelk i vår studie er derfor enten dannet abiotisk eller fra bakteriell aktivitet, eller fra en kombinasjon av begge.

Fra undersøkelser av isolater i SEM kunne det observeres mulige utfellinger i skåler med TB4-medium. Det ble observert «prikker» på celler, ansamlinger av uregelmessige partikler, samt romboedriske og sfæriske utfellinger. Felles for alle var at de fremstod som uorganiske. Alle utfellingene var svært små, med størrelser helt ned i 0,1 µm. I andre studier på bakteriell kalsittutfelling er ofte utfellingene en del større, med størrelser helt opp til 200 µm (Baskar et al., 2011). Dette kan være som følge av at inkubasjon i andre studier ofte foregår ved høyere temperatur (18-25 °C) enn i denne studien (4 °C). Høyere temperatur fører til at de kjemiske reaksjonene skjer hurtigere, og dermed vil utfelling og krystallvekst skje hurtigere. Det at utfellingene i våre kulturer observeres tett assosiert med bakteriene, ofte ved å ligge oppå dem, indikerer at de kan ha en biologisk

opprinnelse. Utfellinger ble også observert i skåler med R2A-medium som var det mediet man ikke forventet å finne kalsittutfellinger i. Dette fordi mediet ikke inneholder en kalsiumkilde slik som TB4. Baskar et al. (2011) har derimot også isolert bakterier som feller ut kalsitt på medium uten en åpenbar kalsiumkilde.

Det som taler i mot at observerte uorganiske partikler er nye utfellinger dannet i kulturene, er at det i tillegg til små partikler kunne observeres store, fullstendige nålefiberkrystaller og polykrystaller. Dette kunne observeres i både TB4- og R2A-medium. Krystallene er trolig for store og velutviklede til å ha blitt dannet i kulturene, og det er mer sannsynlig at de stammer fra de originale miljøprøvene. Det at mange av de små partiklene ser ut til å ha sfærisk eller romboedrisk krystallform er derimot et godt bevis for at de faktisk er nydannelser. Nydannede enkeltkrystaller av kalsitt har ofte en romboedrisk form (Lauritzen, 2017) og kalsitt utfelt i bakteriekulturer har fra tidligere studier blitt beskrevet til å både ha sfærisk, romboedrisk og kubisk form (Busquets et al., 2014). Det er derfor svært sannsynlig at partiklene er nydannet kalsitt og ikke biter av gamle krystaller, og man kan si sikkert at bakterier isolert fra månemelk kan tilrettelegge for utfelling.

6.2.4 Isolater

DNA-sekvensering av isolater viste en stor dominans av Actinobacteria. Dette er en gruppe bakterier som ofte dominerer kultiveringseksperimenter fra oligotrofe grottemiljø, og fra arbeid hvor mulig bakteriell utfelling av CaCO_3 undersøkes. De fleste bakterier i dette fylumet er kjemoorganotrofe og næringsmessig allsidige (Mohammadipanah & Dehghani, 2017). Bakteriene er svært tilpasningsdyktige, som kan være årsaken til at de dominerer på skålene. Tidligere arbeid på Actinobacteria fra grotter har vist at bakteriene vokser best ved 28 °C og dårligst ved 5 °C (Rangseekeaw & Pathom-Aree, 2019), hvor sistnevnte er lik temperaturen i grottene i Nordland og derfor den temperaturen som ble brukt til inkubering. Med studien fra Nordland har vi likevel vist at det finnes flere aktinobakterier som vokser godt ved 4 °C.

Bruken av trippel B4-medium som indikator for biomineralisering av CaCO₃ ser ut til å være en god tilnærming da TB4 viste både mer mangfoldig vekst enn de andre mediene, i tillegg til at man kunne observere utfellinger. Tidligere studier på samme problemstilling har vist at bakteriell utfelling av CaCO₃ er størst på dette mediet (Borsato et al., 2000) og at Actinobacteria vokser best på medier tilsatt kalsium (Rangseekaew & Pathom-Aree, 2019). Det at man i SEM kunne observere utfellinger i R2A i tillegg til TB4, sår derimot tvil om det er faktiske utfellinger av CaCO₃. I de fleste studier på månemelk og dets opprinnelse brukes TB4 eller B4 som medium for å dyrke opp bakterier og undersøke mulig utfelling. Enkelte bruker kun (T)B4 uten å kontrollere det mot andre medier med andre sammensetninger (e.g., Cacchio et al., 2003; Banks et al., 2010). Det finnes likevel tidligere studier hvor det er brukt et «kontrollmedium». Fra Herrenberggrotten i Tyskland ble det kun brukt B4-medium, men med ulik grad av kalsiuminnhold for å undersøke om bakteriene ville felle ut CaCO₃ med mindre kalsium tilgjengelig (Rusznýák et al., 2012). Resultatet viste at *Arthrobacter oxydans* klarte å felle ut mineralet selv med lite kalsium. Denne arten av Actinobacteria har blitt identifisert fra DNA-sekvensering av isolater i vår studie. Isolatet identifisert som *Pseudarthrobacter oxydans* (isolat TH1 1) er også isolert fra skålen hvor det ble observert makroskopisk kalkutfelling. Resultatene tyder på at dette er en art av Actinobacteria med stor evne til å enten legge til rette for eller direkte felle ut CaCO₃, både med lite kalsium tilgjengelig og ved lav temperatur. Det var også denne arten som var lik flest antall isolater (TH1 1, TH1 4, TH18 1 og OKS18 4), som kan indikere at arten er utbredt i miljøet. Resultat fra Illumina indikerer derimot det motsatte. Sekvenseringsdataene viser ingen stor andel av orden Micrococcales som arten hører til under, i noen av de fem prøvene.

6.2.5 Karakterisering av bakteriesamfunnet ved Illumina

Tidligere undersøkelser har vist at månemelk ofte inneholder et mangfoldig mikrobielt samfunn (Maciejewska et al., 2018), noe denne studien også viser. At Illumina-sekvenseringen har paralleller som i teorien skal være like, men som viser ulikheter, må derimot diskuteres. Dette kan være et resultat av valg av

primere (Schirmer et al., 2015), og det optimale ville vært å bruke flere ulike. Primerne som er brukt i denne studien er likevel blant de beste man kjenner til og er benyttet i mange tilsvarende studier. Paralleller som viser ulikheter kan også være et resultat av mikrobielle «hotspots» som beskrevet i kapittel 6.2.2. Dersom prøver har «hotspots» med ansamlinger av mikroorganismer kan man risikere at selv prøver som er tatt samme sted i naturen, kan vise forskjeller ved undersøkelser med molekylærbiologiske metoder (Dann et al., 2018).

Det er fra før av gjennomført noen få undersøkelser på den mikrobielle diversiteten i månemelk fra grotter i Nordland. Helt tilbake i 1946 ble månemelk fra Tukthuset undersøkt av O. A. Høeg på vegne av Gunnar Horn. Høeg konkluderte med at speleothemet bestod av cyanobakterier (Høeg, 1946). I en masteroppgave fra 2018 ble det gjort DNA-sekvensering på månemelk fra Lapphullet i Mo i Rana. I dette prøvematerialet bestod det prokaryote samfunnet av 99,4% bakterier, med fyla som blant annet Candidate division SPAM (nå: Rokubacteria), Actinobacteria og Proteobacteria (Gabrielsen, 2018). Den mikrobielle diversiteten i månemelk fra Moengrotta har også blitt undersøkt (Reigstad et al., u.å.). Fra månemelk i Moengrotta ble Thaumarchaeota (Archaea) identifisert som det mest dominerende fylum i våt månemelk, med nesten 50%. Videre fulgte Candidate division SPAM (nå Rokubacteria), Chloroflexi og Proteobacteria. Tørr månemelk hadde en dominans av Candidate division SPAM (50%), etterfulgt av Planctomycetes, Proteobacteria og Chloroflexi (Reigstad et al., u.å.). Det er likheter mellom de tidligere studiene og vår studie, med unntak av Acidobacteria som utgjør opptil 12% av det prokaryote samfunnet i vår månemelk.

Sammenlignes sekvenseringsdataene med studier hvor det har blitt konkludert med at månemelk har en biologisk opprinnelse kan man se store likheter. I månemelk fra Altamiragrotten i Spania var det hovedsakelig klasser innen Proteobacteria og Actinobacteria som dominerte det mikrobielle samfunnet (Portillo & Gonzalez, 2011). Månemelk fra Tomba degli Scudi i Italia var også dominert av Proteobacteria og Actinobacteria, i tillegg til Acidobacteria (Cirigliano et al., 2018), som ligner på sammensetningen i månemelk fra Okshola og

Hammarnesgrotta. Både Proteobacteria og Actinobacteria går mye igjen i artikler som omhandler månemelk eller biomineralisering av CaCO_3 (e.g., Banks et al., 2010; Rusznyák et al., 2012; Busquets et al., 2014; Maciejewska et al., 2017), og begge er blant de mest karakteriserte bakteriene (Madigan et al., 2019).

Gammaproteobacteria er klassen med størst relativ mengde i samtlige prøver. 50-70% av bakteriene i klassen er identifisert som kjente ammoniumoksidierende familier; Nitrosomonadaceae og Nitrosococcaceae. Dette er bakterier som bruker ammonium eller ammoniakk ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) i sin metabolisme, hvor de oksiderer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ til NO_2^- (nitritt). Reaksjonen skjer best ved høy pH og god oksygentilgang (Madigan et al., 2019), under samme forhold som grottene i Nordland har. Rokubacteria (15-20% i prøvene) er også potensielle bidragsyttere i nitrogensyklusen. Fylumet mangler kultiverte og karakteriserte representanter, men har 79-83% lik 16S rRNA-sekvens som Nitrospirae (Becraft et al., 2017). Dette er et fylum med blant annet nitritt-oksidierende bakterier (Holmes et al., 2001), som kan bety at også arter innen Rokubacteria har slike evner. Acidobacteria (9-12% i prøvene) antas å ha samme metabolske diversitet som Proteobacteria. Alle kultiverte representanter av Acidobacteria er imidlertid heterotrofe bakterier (Kielak et al., 2016). De fleste av Planctomycetes (~10% i prøvene) er også heterotrofe bakterier (Tomczyk-Żak & Zielenkiewicz, 2016). Andre antatt heterotrofe bakterier i prøvene inkluderer Burkholderiaceae (Betaproteobacteria) og Actinobacteria, som også er bakteriene isolert fra dyrking i vår studie. Heterotrofe bakterier i miljøet kan trolig bidra med ammonium til de ammoniumoksidierende bakteriene (McArthur, 2006), slik at samfunnet livnæres av nitrogensyklusen.

6.2.6 Er biomineralisering en mulighet?

Resultatene fra denne studien peker mot at månemelk i kalde grotter i Nordland har en bakteriell opprinnelse. Bevis for dette inkluderer isolering av bakterier kjent fra utfelling av CaCO_3 , utfelling av CaCO_3 i isolater, mikrografier av miljøprøver som viser bakterier tett assosiert med kalsittkrystaller, samt resultat

fra Illumina-sekvensering som viser tilstedeværelse av mikroorganismer kjent fra biomineralisering. Resultatene stemmer med litteratur som finnes på bakteriell innflytelse på månemelk, men observasjon av kalsitt i R2A-medium taler i mot de andre resultatene. R2A inneholder imidlertid noe kasein, som er et kalsiumholdig protein, men det er usikkert hvorvidt dette er tilstrekkelig. Alle resultater tatt i betraktning peker likevel mot at biologien er en drivende faktor i dannelsen av kalsitt og månemelk i grottene i Nordland.

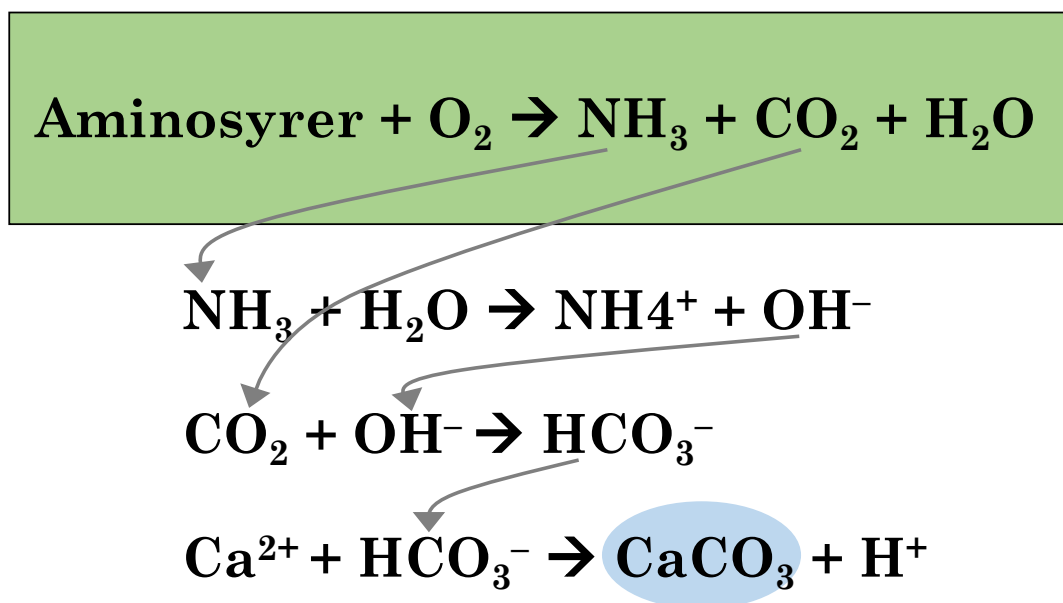
Som følge av at bare et svært lite utvalg av bakteriene lar seg dyrke opp under laboratoriebetingelser, er det vanskelig å konkludere med hvilke av bakteriene som bidrar i utfelling av kalsitt. Det er kun arter av Actinobacteria og Betaproteobacteria det har vært mulig å overvåke aktiviteten til. Dermed kan man ikke vite sikkert hva de resterende bakteriene og arkene gjør i dette miljøet. Sekvenseringsdata viser i tillegg at selv om det er Actinobacteria som dominerer i dyrkingeksperimentet, er det ikke disse bakteriene som dominerer i miljøet. Det er mulig at de mindre studerte bakteriene som for eksempel Acidobacteria og Rokubacteria, er mye større bidragsyttere enn man vet når det kommer til utfelling av kalsitt. Sekvenseringsdataene viser imidlertid lignende resultat sammenlignet med andre studier på biologisk dannet kalsitt.

6.2.7 Forslag til dannelsesprosess for månemelk

Konsentrasjonen av Ca^{2+} , mengde oppløst uorganisk karbon (DIC), tilgjengelige nukleasjonspunkt og pH er alle faktorer som påvirker utfellingen av CaCO_3 (Hammes & Verstraete, 2002). Av disse er det miljøets pH og tilgjengelige nukleasjonspunkt bakterier gjerne bidrar til. En økning i pH-verdi fører til at karbonatlikevekten (kapittel 3.1.3) går mot CO_3^{2-} , og fremmer dermed utfelling av CaCO_3 dersom det er Ca^{2+} tilgjengelig i miljøet (Maciejewska et al., 2017).

Ammonifisering er en prosess som kan føre til økt pH i mikromiljøet rundt cellene. Prosessen innebærer nedbrytning av organisk nitrogen til ammonium (NH_4^+), og fører til en alkalisering av miljøet (figur 6.2.1). Mange heterotrofe bakterier er

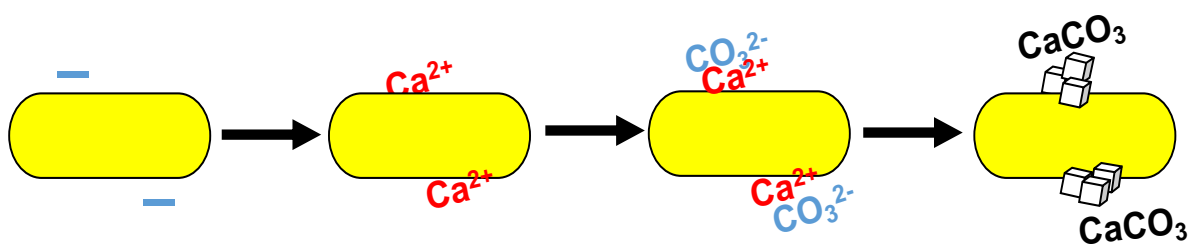
antatt å være ammonifiserende (McArthur, 2006). Fra dyrkingeksperimentet er alle isolater identifisert som heterotrofe bakterier og det er stor sannsynlighet for at de kan utføre ammonifisering. Det er derfor mulig at dette er en prosess som tilrettelegger for utfelling av CaCO_3 i grottene i Nordland. Både TB4 og R2A, mediene hvor det ble observert CaCO_3 -utfelling, inneholder aminosyrerike komponenter som for eksempel gjærekstrakt. Ammonifisering av aminosyrer kan være prosessen som har tilrettelagt for utfelling i kulturene. Det ble derimot ikke gjennomført pH-måling av mediene etter observert utfelling og det er dermed ikke sikkert at det har vært en økning i pH. I grottene vil aminosyrer være tilgjengelig i organisk materiale som kommer inn i grotten sammen med perkolerende vann og lignende (Maciejewska et al., 2017). Identifiseringen av bakterier involvert i nitrogensyklusen støtter antakelsen om at det er ammonifisering som er den drivende prosessen. Når ammonium er tilgjengelig i miljøet som følge av ammonifisering er det også sannsynlig at det finnes andre bakterier som utnytter dette, slik som ammonium-oksiderende bakterier. Prosessen fra ammonifisering av aminosyrer fram til utfelling av kalsiumkarbonat er vist ved figur 6.2.1.



Figur 6.2.1. De kjemiske reaksjonene involvert i ammonifisering og påfølgende utfelling av kalsiumkarbonat, CaCO_3 . Aminosyrer kan være tilgjengelig fra organisk materiale som kommer inn i grotten sammen med perkolerende vann. Modifisert fra Zhu & Dittrich (2016).

Som vist ved figur 6.2.1 kan metabolsk aktivitet i grottemiljø føre til utfellingen av CaCO_3 . Bakterielt dannede krystaller kan videre danne et nukleasjonspunkt hvor

krystallvekst skjer gjennom andre prosesser (Banks et al., 2010). Det at de mulige utfellingene hovedsakelig ble observert oppå eller rett ved bakteriene i SEM, er en indikator på at overflaten til bakteriene fungerer som et nukleasjonspunkt (figur 6.2.2). Mikrobielle celler har en negativ nettoladning slik at positivt ladde atomer og forbindelser binder seg til cellens overflate. På denne måten skapes det en ladningsgradient mellom cellen og det omkringliggende miljøet (Kirchman, 2018). Kationer som Ca^{2+} kan derfor binde seg til cellers overflate og videre reagere med karbonat (CO_3^{2-}), slik at det dannes kalsiumkarbonat (Ramachandran et al., 2001).



Figur 6.2.2. Celle som nukleasjonspunkt for utfelling av CaCO_3 . Celler er negativt ladet og dermed kan kationer som Ca^{2+} binde seg til cellens overflate. Deretter kan negativt ladet CO_3^{2-} reagere med Ca^{2+} , som kan føre til dannelsen av CaCO_3 på cellens overflate. Disse partiklene danner krystallkimer for videre krystallvekst. Første krystallkime av kalsitt er gjerne mer romboedrisk enn antydnet ved denne figuren.

Den første krystallkimen av kalsiumkarbonat er gjerne amorft kalsiumkarbonat (ACC) som er den minst stabile polymorfe CaCO_3 -fasen (Lauritzen, 2017). Hvordan krystallene vokser videre til de oppnår de kjente krystallformene (nanofiber, nålefiberkalsitt og polykrystaller) er ikke mulig å si ut fra våre resultater alene. Det virker imidlertid som at teorien om at mineralene felles ut i mikrokrystallin tilstand og aldri vokser seg store kan stemme (Hill & Forti, 1997).

Tidligere studier hvor det har blitt antatt at nanofibrene er bakterielle hyfer, har foreslått krystallvekst som innebærer at nålene vokser langs hyfene (Cañaveras et al., 2006). I denne studien virker derimot nanofibrene å være uorganiske, og det er heller sannsynlig at krystallveksten skjer ved andre prosesser. I følge Borsato et al. (2000) kan romboedriske kalsittkrystaller vokse til monokrystalline nåler som følge av at vanntilførselen er styrt av kapillærkrefter. Forfatterne nevner videre at nåleformen kan være et resultat av lav utløpshastighet til sigevannet, luftfuktighet nær 100% og lav metningsgrad med hensyn på kalsium.

Fiberkrystaller av andre mineraler (e.g., halitt) kan dannes som resultat av spiralvekst, hvor krystallene dannes gjennom porøse overflater som fremmer langsmed krystallvekst (Lauritzen, 2017). Basert på observasjonene våre virker imidlertid ikke dette å være tilfellet for månemelk. Da det ikke er gjort noen observasjoner på utviklingen fra nydannet kalsitt til utviklede nålekrystaller blir alle nevnte prosesser for krystallvekst kun spekulasjoner. Vi kan derimot med sikkerhet si at dannelsen av den første krystallkimen er initiert og tilrettelagt av bakterier i grottemiljøet.

6.2.8 Konsekvenser

Dannelse av kalsiumkarbonat ved biomineralisering har mange potensielle bruksområder, innen alt fra bioteknologi til geoteknologi og ingeniørfag. Bakterier som fremmer dannelsen av CaCO_3 kan brukes i for eksempel fjerning av kalsium fra avløpsvann, til atmosfærisk CO_2 -fangst og til forbedring av byggemateriale. Biomineralisering av CaCO_3 initiert av ammonifisering har blant annet blitt brukt til restaurering av monumenter og bygninger som er laget av kalkstein. Se Dhami et al. (2013) for en utdypende artikkel på de mulige ingeniørfaglige bruksområdene til kalsiumkarbonat dannet fra biomineralisering.

De første studiene av bakterier i grotter ble gjort for rundt 100 år siden, men globalt og ikke minst nasjonalt har vi kun studert en svært liten del av de grottene vi kjenner til i dag. Grotter representerer lukkede økosystem med liten eller ingen påvirkning fra overflaten, og mikroorganismer fra grotter er en potensiell kilde til nye biokjemiske forbindelser. Isolering av bakterier fra grotter er derfor viktig i jakten på nye antibiotika. Actinobacteria, som er det dominerende fylum blant isolatene i denne studien, er kjent for å være en viktig kilde til antibiotika. Man tror at nesten 80% av verdens antibiotika kan produseres av ulike typer aktinobakterier (Anandan et al., 2016). I dag er sykdommer tilknyttet multiresistente bakterier en stor trussel for folkehelsen i hele verden (Ghosh et al., 2017). Isolering av aktinobakterier fra grotter kan derfor potensielt være svært viktig for det globale helsevesenet i framtiden (Alanis, 2005).

7 Konklusjon

Problemstilling for oppgaven er å finne ut hvordan gips, jarositt og månemelk har blitt dannet i kalde grotter i Nordland. Gjennom geokjemiske, mikrobiologiske og molekylærbiologiske metoder har problemstillingen blitt undersøkt og forslag til dannelsesprosesser har blitt presentert.

- Oksidasjon av pyritt i Grønligrotta og Okshola skjer mest sannsynlig abiotisk som følge av en reaksjon med vann og at det er et oksiderende miljø i grotten.
- Jarositt og gips i Grønligrotta og Okshola er trolig dannet som følge av abiotiske prosesser, hvor Fe^{2+} oksideres abiotisk til Fe^{3+} . Nødvendige K^+ -ioner for dannelse av jarositt er tilgjengelig fra glimmerskifer, mens nødvendig Ca^{2+} for dannelse av gips er tilgjengelig fra karbonatbergarten.
- Månemelk fra Okshola og Hammarnesgrotta viser en stor mikrobiell diversitet fra molekylærbiologiske metoder, med en jevn fordeling av OTU-er (operasjonelle taksonomiske enheter).
- Biologi virker til å være en drivende faktor i biomineralisering av CaCO_3 og den biologiske aktiviteten er viktig for geologien.
- Månemelk fra grottene i Nordland er mest sannsynlig dannet som følge av den metabolske aktiviteten til bakterier, og er dermed et resultat av biologisk indusert-mineralisering. Bakteriene tilrettelegger for utfelling av CaCO_3 ved å heve pH-verdien lokalt, i tillegg til å fungere som nukleasjonspunkt for krystalldannelse.
- Hvordan den videre krystallveksten av kalsitt foregår og hvorfor krystallene er fiber eller nåler, er fortsatt et ubesvart spørsmål. Det kreves flere *in vitro* undersøkelser av krystalldannelse og påfølgende vekst for å kunne bestemme dette.

8 Videre arbeid

- Det bør brukes mer tid på å optimalisere dyrking for jarositt og gips. Her bør det testes ut ulike medier som for eksempel 9K-medium, pH må optimaliseres, i tillegg til at man kan inokulere medium med svært lav pH (< 3) for å undersøke tilstedeværelsen av jern-oksiderende bakterier i prøvene. En annen idé kan være å bruke et medium som er tilsatt pyritt eller kjemisk utfelt jernsulfid (FeS) for å undersøke om bakteriene utnytter dette og «spiser» mineralet (kjemolitotrofe bakterier).
- Analyser av stabil isotoper kan brukes for å avgjøre om jarositt og gips har en biologisk opprinnelse. Mikroorganismer favoriserer $\delta^{32}\text{S}$ over $\delta^{34}\text{S}$, og derfor vil fordelingen mellom disse være avslørende for om mineralene er biologisk dannet eller ikke. Det bør også undersøkes om stabil isotop kan brukes i undersøkelser av månemelk (e.g., $\delta^{13}\text{C}$).
- For å kunne fastslå at dannelsen av månemelk virkelig er initiert og tilrettelagt av bakterier bør man gjennomføre et mer omfattende dyrkingseksperiment enn hva som kunne gjøres innenfor rammen av denne hovedoppgaven. Det kan for eksempel være å bruke flere typer medium, bruke ulike kalsiumkilder, inkubere «kontrollskåler» uten bakterier under samme forhold som de med bakterier, inkubere skåler ved ulike temperatur for å undersøke hastigheten på utfelling og krystallvekst, samt måle pH på mediet etter utfelling for å undersøke om bakteriene faktisk øker pH-verdien i mikromiljøet.
- For å kunne danne et mer helhetlig bilde av det mikrobielle samfunnet i prøvene bør FISH optimaliseres for både månemelk og jarositt/gips. Denne metoden er tidkrevende, men er verdt å bruke tid på for å kunne direkte observere cellene i prøvene. Metoden må optimaliseres ved å teste ut ulike prober, ulike prosedyrer for preparering og flere ulike fortyninger av prøvene. Dette er en metode som kan være spesielt viktig for jarositt/gips dersom man ikke klarer å løse problemet med DNA-ekstraksjon.

- Acidobacteria og Rokubacteria utgjør en stor mengde i månemelk, men man vet lite om disse bakteriene. Dette kan være bakterier som er drivende for prosessene i miljøet og det bør derfor brukes mye tid på å isolere og videre karakterisere dem.
- Actinobacteria isolert fra grotter er en potensielt viktig kilde til antibiotika. Dette kan være viktig for medisin fremover og bør undersøkes nærmere.
- Det kan også være en idé å besøke de lettere tilgjengelige grottene igjen, med mer utstyr sammenlignet med de andre feltturene. Da kan man for eksempel ta flere målinger av ulike miljøparametere (for eksempel *in situ* pH-måling med en mikro pH-elektrode), samle prøver direkte i flytende medium, gjøre direkte DNA-ekstraksjon og fryse prøver i flytende nitrogen.

Referanser

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36 (6): 697-705.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403-10.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (6): 1919-1925.
- Amann, R. I., Fuchs, B. M. & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (3): 231-236.
- Anandan, R., Dharumadurai, D. & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to Actinobacteria. I: Dhanasekaran, D. (red.) *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. UK: IntechOpen.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R. & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75 (2): 129-137.
- Banks, E. D., Taylor, N. M., Gulley, J., Lubbers, B. R., Giarrizzo, J. G., Bullen, H. A., Hoehler, T. M. & Barton, H. A. (2010). Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, 27 (5): 444-454.
- Baron, D. & Palmer, C. D. (1996). Solubility of jarosite at 4–35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60 (2): 185-195.
- Barton, H. A. (2006). Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68 (2): 43-54.
- Barton, H. A. (2015). Starving artists: bacterial oligotrophic heterotrophy in caves. I: Engel, A. S. (red.) *Life in Extreme Environments, Microbial Life of Cave Systems*. UK: De Gruyter.
- Barton, H. A. & Jurado, V. (2007). What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, 2 (3): 132-138.
- Baskar, S., Baskar, R. & Routh, J. (2011). Biogenic evidences of moonmilk deposition in the Mawmluh cave, Meghalaya, India. *Geomicrobiology Journal*, 28 (3): 252-265.
- Bazarova, E. P., Kadebskaya, O. I., Kononov, A. M. & Ushchapovskaya, Z. F. (2016). Conditions and characteristics of cryogenic mineral formation in the caves of southern part of Siberian platform folding margins (Western Pre-Baikal region and Eastern Sayan). *Vestnik Permskogo Universiteta*, 31 (2): 22-34 (engelsk sammendrag).
- Becraft, E. D., Woyke, T., Jarett, J., Ivanova, N., Godoy-Vitorino, F., Poulton, N., Brown, J. M., Brown, J., Lau, M. C. Y., Onstott, T., Eisen, J. A., Moser, D. & Stepanauskas, R. (2017). Rokubacteria: genomic giants among the uncultured bacterial phyla. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2264.
- Bigham, J. M., Carlson, L. & Murad, E. (1994). Schwertmannite, a new iron oxyhydroxysulphate from Pyhäsalmi, Finland, and other localities. *Mineralogical Magazine*, 58 (393): 641-648.
- Bigham, J. M., Schwertmann, U., Traina, S. J., Winland, R. L. & Wolf, M. (1996). Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60 (12): 2111-2121.
- Bindschedler, S., Cailleau, G., Braissant, O., Millièrè, L., Job, D. & Verrecchia, E. (2014). Unravelling the enigmatic origin of calcitic nanofibres in soils and caves: purely physicochemical or biogenic processes? *Biogeosciences*, 11 (10): 2809-2825.
- Borodina, E., Kelly, D. P., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. & Wood, A. P. (2000). Dimethylsulfone as a growth substrate for novel methylotrophic species of *Hyphomicrobium* and *Arthrobacter*. *Archives of Microbiology*, 173 (5): 425-437.

- Borsato, A., Frisia, S., Jones, B. & Van Der Borg, K. (2000). Calcite moonmilk: crystal morphology and environment of formation in caves in the Italian Alps. *Journal of Sedimentary Research*, 70 (5): 1171-1182.
- Boston, P., Frederick, R., Welch, S., Werker, J., Meyer, T., Sprungman, B., Hildreth-Werker, V., Thompson, S. & Murphy, D. (2003). Human utilization of subsurface extraterrestrial environments. *Gravitational and Space Biology Bulletin*, 16 (2): 121-131.
- Brezonik, P. L. & Arnold, W. A. (2011). *Water Chemistry: An Introduction to the Chemistry of Natural and Engineered Aquatic Systems*. New York: Oxford University Press.
- Busquets, A., Fornós, J. J., Zafra, F., Lalucat, J. & Merino, A. (2014). Microbial communities in a coastal cave: Cova des Pas de Vallgornera (Mallorca, Western Mediterranean). *International Journal of Speleology*, 43 (2): 205-216.
- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G. & Lepidi, A. (2003). Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal*, 20 (2): 85-98.
- Cailleau, G., Verrecchia, E. P., Braissant, O. & Emmanuel, L. (2009). The biogenic origin of needle fibre calcite. *Sedimentology*, 56 (6): 1858-1875.
- Cañaveras, J. C., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Lario, J., Laiz, L., Gonzalez, J. M. & Saiz-Jimenez, C. (2006). On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften*, 93 (1): 27-32.
- Cañaveras, J. C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P., Laiz, L. & Gonzalez, I. (1999). Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal*, 16 (1): 9-25.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.-P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126 (1-4): 9-23.
- Caumartin, V. (1963). Review of the microbiology of underground environments. *Bulletin of the National Speleological Society*, 25 (1): 1-14.
- Cheeptham, N. (2013). Advances and challenges in studying cave microbial diversity. I: Cheeptham, N. (red.) SpringerBriefs in Microbiology, *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*. New York: Springer.
- Cirigliano, A., Tomassetti, M. C., Di Pietro, M., Mura, F., Maneschi, M. L., Gentili, M. D., Cardazzo, B., Arrighi, C., Mazzoni, C., Negri, R. & Rinaldi, T. (2018). Calcite moonmilk of microbial origin in the Etruscan Tomba degli Scudi in Tarquinia, Italy. *Scientific Reports*, 8 (1): 15839.
- Crundwell, F. K. (2003). How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy*, 71 (1-2): 75-81.
- Culver, D. C. & Pipan, T. (2009). *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Biology of Habitats. Oxford: Oxford University Press.
- Curry, M. D., Boston, P. J., Spilde, M. N., Baichtal, J. F. & Campbell, A. R. (2009). Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska. *International Journal of Speleology*, 38 (2): 111-128.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22 (3): 434-444.
- Dann, L. M., McKerral, J. C., Smith, R. J., Tobe, S. S., Paterson, J. S., Seymour, J. R., Oliver, R. L. & Mitchell, J. G. (2018). Microbial micropatches within microbial hotspots. *PLoS ONE*, 13 (5).
- Daoud, J. & Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 19 (9): 960-967.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S. & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4: 314.
- Dos Santos, E. C., de Mendonça Silva, J. C. & Duarte, H. A. (2016). Pyrite oxidation mechanism by oxygen in aqueous medium. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120 (5): 2760-2768.
- Douglas, S. (2005). Mineralogical footprints of microbial life. *American Journal of Science*, 305 (6-8): 503-525.
- Engel, A. S. (2010). Microbial diversity of cave ecosystems. I: Barton, L. L., Mandl, M. & Loy, A. (red.) *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Dordrecht: Springer.

- Engel, A. S. (2012a). Chemoautotrophy. I: White, W. B. & Culver, D. C. (red.) *Encyclopedia of Caves*. Amsterdam: Elsevier.
- Engel, A. S. (2012b). Microbes. I: White, W. B. & Culver, D. C. (red.) *Encyclopedia of Caves*. Amsterdam: Elsevier.
- Engel, A. S. (2015). Bringing microbes into focus for speleology: an introduction. I: Engel, A. S. (red.) *Life in Extreme Environments, Microbial Life of Cave Systems*. UK: De Gruyter.
- Engel, A. S., Paoletti, M. G., Beggio, M., Dorigo, L., Pamio, A., Gomiero, T., Furlan, C., Brilli, M., Dreon, A. L. & Bertoni, R. (2013). Comparative microbial community composition from secondary carbonate (moonmilk) deposits: implications for the Cansiliella Servadeii cave hydropetric food web. *International Journal of Speleology*, 42 (3): 181-192.
- Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R. J., Amann, R. & Blackall, L. L. (1997). Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "Microthrix parvicella" in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 20 (2): 310-318.
- Faust, B. (1949). The formation of saltpeter in caves. *Bulletin of the National Speleological Society*, 11: 17-23.
- Ford, D. & Williams, P. (2007). *Karst Hydrogeology and Geomorphology*. Chichester: Wiley.
- Fossen, H., Pedersen, R.-B., Bergh, S. & Andresen, A. (2013). En fjellkjede blir til. I: Ramberg, I. B., Bryhni, I., Nøttvedt, A. & Rangnes, K. (red.) *Landet blir til: Norges geologi*. Trondheim: Norsk Geologisk Forening.
- Fritz, J. S. & Gjerde, D. T. (2009). *Ion Chromatography*. 4 utg. Weinheim: Wiley-VCH.
- Gabrielsen, I. M. (2018). *Mineraldannende prosesser, biosignaturer og finkornede sedimenter i karstgrotter ved Reingardslivatnet, Mo i Rana* [Mastergradsoppgave]. Bergen: Universitetet i Bergen.
- Ghosh, S., Kuisiene, N. & Cheeptham, N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: reality or pipe dream? *Biochemical Pharmacology*, 134: 18-34.
- Gotelli, N. J. & Colwell, R. K. (2011). Estimating species richness. I: Magurran, A. E. & McGill, B. J. (red.) *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*. New York: Oxford University Press.
- Grishin, S. I., Bigham, J. M. & Tuovinen, O. H. (1988). Characterization of jarosite formed upon bacterial oxidation of ferrous sulfate in a packed-bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (12): 3101-3106.
- Guo, B., Liu, Y., Gu, Z., Shen, L., Liu, K., Wang, N., Xing, T., Liu, H., Zhou, Y. & Li, J. (2016). *Massilia psychrophila* sp. nov., isolated from an ice core. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (10): 4088-4093.
- Gupta, P., Reddy, G. S. N., Delille, D. & Shivaji, S. (2004). *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (6): 2375-2378.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M. & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, 9 (2).
- Hammes, F. & Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1 (1): 3-7.
- Herrera, A. & Cockell, C. S. (2007). Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 70 (1): 1-12.
- Hershey, O. S. & Barton, H. A. (2018). The microbial diversity of caves. I: Moldovan, O. T., Kovác, L. u. & Halse, S. (red.) *Ecological Studies, Cave Ecology*. Cham: Springer.
- Hill, C. A. & Forti, P. (1995). The classification of cave minerals and speleothems. *International Journal of Speleology*, 24 (1-4): 77-82.
- Hill, C. A. & Forti, P. (1997). *Cave Minerals of the World*. 2 utg. Huntsville: National Speleological Society.
- Holmes, A., Tujula, N., Holley, M., Contos, A., M. James, J., Rogers, P. & Gillings, M. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 3 (4): 256-264.
- Horn, G. (1937). Über einige karsthöhlen in Norwegen. *Mitteilungen für Höhlen und Karstforschung*, 1 (sitert i Lauritzen (2001)).

- Høeg, O. A. (1946). Cyanophyceae and bacteria in calcareous sediments in the interior of limestone caves in Nord-Rana, Norway. *Nytt Magasine for Naturvidenskapene*, 85: 99-104.
- Jeelani, G. H., Bhat, N. A., Shivanna, K. & Bhat, M. Y. (2011). Geochemical characterization of surface water and spring water in SE Kashmir Valley, Western Himalaya: implications to water–rock interaction. *Journal of Earth System Science*, 120 (5): 921-932.
- Jones, B. & Kahle, C. F. (1993). Morphology, relationship, and origin of fiber and dendrite calcite crystals. *Journal of Sedimentary Research*, 63 (6): 1018-1031.
- Jones, B. & Renaut, R. W. (2007). Selective mineralization of microbes in Fe-rich precipitates (jarosite, hydrous ferric oxides) from acid hot springs in the Waiotapu geothermal area, North Island, New Zealand. *Sedimentary Geology*, 194 (1): 77-98.
- Jones, D. S. & Macalady, J. L. (2016). The snotty and the stringy: energy for subsurface life in caves. I: Hurst, C. J. (red.) *Advances in Environmental Microbiology, Their World: A Diversity of Microbial Environments*. Cham: Springer.
- Kageyama, A., Morisaki, K., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (1): 53-56.
- Kaksonen, A. H., Morris, C., Rea, S., Li, J., Usher, K. M., McDonald, R. G., Hilario, F., Hosken, T., Jackson, M. & du Plessis, C. A. (2014). Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: part II — jarosite precipitate characterisation and acid recovery by conversion to hematite. *Hydrometallurgy*, 147-148: 264-272.
- Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C. & Koukkou, A. I. (2009). *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (2): 275-279.
- Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A. & Kuramae, E. E. (2016). The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology*, 7: 744.
- Kirchman, D. L. (2018). *Processes in Microbial Ecology*. 2 utg. Oxford: Oxford University Press.
- Kong, B. H., Li, Y. H., Liu, M., Liu, Y., Li, C. L., Liu, L., Yang, Z. W. & Yu, R. (2013). *Massilia namucuoensis* sp. nov., isolated from a soil sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (1): 352-357.
- Konhauser, K. (2007). *Introduction to Geomicrobiology*. Malden: Blackwell Publishing.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (17): 5112-5120.
- Kupka, D., Rzhepishevskaya, O. I., Dopson, M., Lindström, E. B., Karnachuk, O. V. & Tuovinen, O. H. (2007). Bacterial oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 97 (6): 1470-1478.
- Lauritzen, S. E. (1996). *Karst Landforms and Caves of Nordland, North Norway*. Bergen: Universitetet i Bergen. Upublisert manuskript.
- Lauritzen, S. E. (2001). Marble stripe karst of the Scandinavian Caledonides: an end-member in the contact karst spectrum. *Acta Carsologica*, 30 (2): 47-79.
- Lauritzen, S. E. (2010). *Grotter: Norges ukjente underverden*. Oslo: Tun.
- Lauritzen, S. E. (2017). *Karst- og grottelære*. Bergen: Universitetet i Bergen. Upublisert manuskript.
- Lauritzen, S. E. (2018). Physiography of the caves. I: Moldovan, O. T., Kovác, L. u. & Halse, S. (red.) *Ecological Studies, Cave Ecology*. Cham: Springer.
- Lauritzen, S. E., Baastad, L., Bjørlien, J., Fedje, E. & Holmlund, P. (2005a). The Svarthamar cave research project, Fauske, North Norway. *Proceedings of the 14th International Congress of Speleology*, Athen-Kalamos.
- Lauritzen, S. E., Haugen, J. E., Løvlie, R. & Gilje-Nielsen, H. (1994). Geochronological potential of isoleucine epimerization in calcite speleothems. *Quaternary Research*, 41 (1): 52-58.
- Lauritzen, S. E., Hestangen, H., Skutlaberg, S. M. & Øvrevik, R. (2005b). The Grønli-Seter cave research project, Rana, North Norway. *Proceedings of the 14th International Congress of Speleology*, Athen-Kalamos.

- Lauritzen, S. E. & Lundberg, J. (1999). Calibration of the speleothem delta function: an absolute temperature record for the Holocene in northern Norway. *The Holocene*, 9 (6): 659-669.
- Lauritzen, S. E. & Skoglund, R. Ø. (2013). Glacier ice-contact speleogenesis in marble stripe karst. I: Schroder, J. F. & Frumkin, A. (red.) *Treatise on Geomorphology*. Amsterdam: Elsevier.
- Lavoie, K. H. (2015). «A grand, gloomy, and peculiar place»: microbiology in the Mammoth cave region. I: Engel, A. S. (red.) *Life in Extreme Environments, Microbial Life of Cave Systems*. UK: De Gruyter.
- Lavoie, K. H., Northup, D. E. & Barton, H. A. (2010). Microbe-mineral interactions: cave geomicrobiology. I: Jain, S. K., Khan, A. A. & Rai, M. (red.) *Geomicrobiology*. New Hampshire: CRC Press.
- Luo, X., Wang, J., Zeng, X.-C., Wang, Y., Zhou, L., Nie, Y., Dai, J. & Fang, C. (2012). Mycetocola manganoxydans sp. nov., an actinobacterium isolated from the Taklamakan desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (12): 2967-2970.
- Maciejewska, M., Adam, D., Naômé, A., Martinet, L., Tenconi, E., Całusińska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D. & Compère, P. (2017). Assessment of the potential role of Streptomyces in cave moonmilk formation. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1181.
- Maciejewska, M., Całusińska, M., Cornet, L., Adam, D., Pessi, I., Malchair, S., Delfosse, P., Baurain, D., Barton, H. & Carnol, M. (2018). High-throughput sequencing analysis of the actinobacterial spatial diversity in moonmilk deposits. *Antibiotics*, 7 (2): 27.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. 14 utg. Harlow: Pearson.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. 15 utg. New York: Pearson.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15 (4): 593-600.
- Marvasi, M., Gallagher, K. L., Martinez, L. C., Molina Pagan, W. C., Rodríguez Santiago, R. E., Castilloveitia Vega, G. & Visscher, P. T. (2012). Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiology Journal*, 29 (10): 916-924.
- McArthur, J. V. (2006). *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*. UK: Elsevier.
- McGuire, M. M., Edwards, K. J., Banfield, J. F. & Hamers, R. J. (2001). Kinetics, surface chemistry, and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65 (8): 1243-1258.
- Melezhik, V. A., Heldal, T., Roberts, D., Gorokhov, I. M. & Fallick, A. E. (2000). Depositional environment and apparent age of the Fauske carbonate conglomerate, North Norwegian Caledonides. *NGU Bulletin*, 436: 147-168.
- Michel, F. A. & van Everdingen, R. O. (1987). Formation of a jarosite deposit on Cretaceous shales in the Fort Norman area, Northwest Territories. *The Canadian Mineralogist*, 25 (2): 221-226.
- Moghen, A. & Halgunset, J. (2015). RNA-kvalitet i vevsprøver. *Bioingeniøren*, 1: 22-27.
- Mohammadipanah, F. & Dehghani, M. (2017). Classification and taxonomy of Actinobacteria. I: Wink, J., Mohammadipanah, F. & Hamedi, J. (red.) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Cham: Springer.
- Moter, A. & Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41 (2): 85-112.
- Northup, D. E. & Lavoie, K. H. (2001). Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*, 18 (3): 199-222.
- Northup, D. E., Reysenbach, A.-L. & Pace, N. R. (1997). Microorganisms and speleothems. I: Hill, C. & Forti, P. (red.) *Cave Minerals of the World*. Huntsville: National Speleological Society.
- Nurmi, P., Özkaya, B., Sasaki, K., Kaksonen, A. H., Riekkola-Vanhanen, M., Tuovinen, O. H. & Puhakka, J. A. (2010). Biooxidation and precipitation for iron and sulfate removal from heap bioleaching effluent streams. *Hydrometallurgy*, 101 (1): 7-14.
- Onac, B. P. (1997). Crystallography of speleothems. I: Hill, C. & Forti, P. (red.) *Cave Minerals of the World*. Huntsville: National Speleological Society.

- Onac, B. P. & Forti, P. (2011). Minerogenetic mechanisms occurring in the cave environment: an overview. *International Journal of Speleology*, 40 (2): 79-98.
- Onac, B. P. & Ghergari, L. (1993). Moonmilk mineralogy in some Romanian and Norwegian caves. *Cave Science*, 20 (3): 107-111 (sitert i Lauritzen (2017)).
- Onac, B. P. & Lauritzen, S. E. (1995). On some cave minerals from northern Norway. *International Journal of Speleology*, 24 (1-4): 67-75.
- Palmer, A. N. (1991). Origin and morphology of limestone caves. *Geological Society of America Bulletin*, 103 (1): 1-21.
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A. & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36 (10): 996–1004.
- Paterson, A. & Engel, A. S. (2015). Predicting bacterial diversity in caves associated with sulfuric acid speleogenesis. I: Engel, A. S. (red.) *Life in Extreme Environments, Microbial Life of Cave Systems*. UK: De Gruyter.
- Pentecost, A. & Bauld, J. (1988). Nucleation of calcite on the sheaths of Cyanobacteria using a simple diffusion cell. *Geomicrobiology Journal*, 6 (2): 129-135.
- Pindi, P. K., Manorama, R., Begum, Z. & Shivaji, S. (2010). *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60 (10): 2263-2266.
- Portillo, M. C. & Gonzalez, J. M. (2011). Moonmilk deposits originate from specific bacterial communities in Altamira cave (Spain). *Microbial Ecology*, 61 (1): 182-189.
- Quast, C., Pruesse, E., Gerken, J., Peplies, J., Yarza, P., Yilmaz, P., Schweer, T. & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41: 590-596.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. & Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using microorganisms. *ACI Materials Journal*, 98 (1): 3-9.
- Rangseekaew, P. & Pathom-Aree, W. (2019). Cave Actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 10: 387.
- Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (1): 1-7.
- Reigstad, L. J., Thorseth, I. H., Lauritzen, S.-E. & Torsvik, V. L. (u.å.). *Geomicrobiology of subarctic moonmilk deposits in Moen cave, Norway*. Upublisert manuskript.
- Rusterholtz, K. J. & Mallory, L. M. (1994). Density, activity, and diversity of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microbial Ecology*, 28 (1): 79-99.
- Rusznýák, A., Akob, D. M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K. U., Neu, T. R., Frosch, T., Popp, J., Keiner, R. & Geletneky, J. (2012). Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg cave. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (4): 1157-1167.
- Saiz-Jimenez, C. (2015). The microbiology of show caves, mines, tunnels, and tombs: implications for management and conservation. I: Engel, A. S. (red.) *Life in Extreme Environments, Microbial Life of Cave Systems*. UK: De Gruyter.
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T. & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, 43 (6): e37.
- Schoonen, M., Elsetinow, A., Borda, M. & Strongin, D. (2000). Effect of temperature and illumination on pyrite oxidation between pH 2 and 6. *Geochemical Transactions*, 4.
- Schädler, S., Burkhardt, C. & Kappler, A. (2008). Evaluation of electron microscopic sample preparation methods and imaging techniques for characterization of cell-mineral aggregates. *Geomicrobiology Journal*, 25 (5): 228-239.
- Seifan, M. & Berenjian, A. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (12): 4693–4708.
- Shen, L., Liu, Y., Yao, T., Kang, S., Wang, Y., Jiao, N., Liu, H., Zhou, Y., Xu, B. & Liu, X. (2013). *Mycetocolazhadangensis* sp. nov., isolated from snow. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (9): 3375-3378.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7 (1): 539.
- Simon, K. S. (2012). Cave ecosystems. I: White, W. B. & Culver, D. C. (red.) *Encyclopedia of Caves*. Amsterdam: Elsevier.
- Simon, K. S., Pipan, T. & Culver, D. C. (2007). A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69 (2): 279-284.
- Skoglund, R. Ø. (2002). *Hydrogeologi og karstkorrosjon i Grønli-Seterakviferen, Mo i Rana* [Cand. scient. oppgave]. Bergen: Universitetet i Bergen.
- Skoglund, R. Ø. & Lauritzen, S. E. (2010). Morphology and speleogenesis of Okshola (Fauske, northern Norway): example of a multi-stage network cave in a glacial landscape. *Norwegian Journal of Geology*, 90: 123-137.
- Skoglund, R. Ø. & Lauritzen, S.-E. (2011). Subglacial maze origin in low-dip marble stripe karst: examples from Norway. *Journal of Cave and Karst Studies*, 73 (1): 31-43.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39 (1): 321-346.
- Tomczyk-Żak, K. & Zielenkiewicz, U. (2016). Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*, 33 (1): 20-38.
- Torsvik, V. & Øvreås, L. (2008). Microbial diversity, life strategies, and adaptation to life in extreme soils. I: Dion, P. & Nautiyal, C. S. (red.) *Soil Biology, Microbiology of Extreme Soils*. Berlin: Springer.
- Tranter, M., Brown, G., Raiswell, R., Sharp, M. & Gurnell, A. (1993). A conceptual model of solute acquisition by alpine glacial meltwaters. *Journal of Glaciology*, 39 (133): 573-581.
- Tranter, M., Sharp, M. J., Lamb, H. R., Brown, G. H., Hubbard, B. P. & Willis, I. C. (2002). Geochemical weathering at the bed of Haut Glacier d'Arolla, Switzerland—a new model. *Hydrological Processes*, 16 (5): 959-993.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., 2nd, Eisen, J. A. & Holmes, D. S. (2008). Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics*, 9: 597.
- Wagner, M., Horn, M. & Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 302-309.
- Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Journal of Quantitative Cell Science*, 14 (2): 136-143.
- Wang, H., Bigham, J. M. & Tuovinen, O. H. (2006). Formation of schwertmannite and its transformation to jarosite in the presence of acidophilic iron-oxidizing microorganisms. *Materials Science and Engineering: C*, 26 (4): 588-592.
- Waterhouse, A. M., Martin, D. M. A., Barton, G. J., Procter, J. B. & Clamp, M. (2009). Jalview version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25 (9): 1189-1191.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (12): 4576-4579.
- Žák, K., Onac, B. P., Kadebskaya, O. I., Filippi, M., Dublyansky, Y. & Luetscher, M. (2018). Cryogenic mineral formation in caves. I: Perşoiu, A. & Lauritzen, S. E. (red.) *Ice Caves*. Amsterdam: Elsevier.
- Zolotov, M. Y. & Shock, E. L. (2005). Formation of jarosite-bearing deposits through aqueous oxidation of pyrite at Meridiani Planum, Mars. *Geophysical Research Letters*, 32 (21).
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L. & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9): 3367-3373.

Elektroniske referanser

- CFAMM (u.å.). *Introduction to energy dispersive X-ray spectrometry (EDS)* [Internett]. Riverside: University of California. Tilgjengelig fra: <https://cfamm.ucr.edu/documents/eds-intro.pdf> [Lest 16. januar 2019].
- Illumina (2017). *An introduction to next-generation sequencing technology* [Internett]: Illumina. Tilgjengelig fra: https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf [Lest 25. april 2019].
- Kartverket (2019). *Norgeskart* [Internett]. Tilgjengelig fra: <https://www.norgeskart.no> [Lest 24. januar 2019].
- KSS (2016). *Klimaprofil Nordland* [Internett]. Et kunnskapsgrunnlag for klimatilpasning: Norsk Klimaservicesenter. Tilgjengelig fra: https://klimaservicesenter.no/faces/desktop/article.xhtml?uri=klimaservicesenteret/klimaprofil_er/klimaprofil-nordland [Lest 20. februar 2019].
- MO BIO (2014). *PowerSoil® DNA Isolation Kit* [Internett]: MO BIO Laboratories, Inc. Tilgjengelig fra: <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf> [Lest 27. november 2018].
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. & Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2* [Internett]. Tilgjengelig fra: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Lest 29. mai 2019].
- Poppe, L. J., Paskevich, V. F., Hathaway, J. C. & Blackwood, D. S. (2001). *A laboratory manual for X-Ray powder diffraction* [Internett]. Massachusetts: U. S. Geological Survey. Tilgjengelig fra: <http://pubs.usgs.gov/openfile/of01-041/htmldocs/intro.html> [Lest 20. februar 2019].
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing* [Internett]. Wien: R Foundation for Statistical Computing. Tilgjengelig fra: <https://www.R-project.org/>. [Lest 29. mai 2019].
- Thermo Scientific (2010). *Thermo Scientific NanoDrop spectrophotometers: nucleic acid* [Internett]: Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf> [Lest 5. april 2019].
- UiO (2019). *Biodiversitet* [Internett]. UiO: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/biodivers.html> [Lest 25. april 2019].

Vedlegg

A Personlig kommunikasjon

Irene Heggstad, Seniorforskningsingeniør
Institutt for geovitenskap, Universitetet i Bergen
Irene.Heggstad@uib.no

Dato for kommunikasjon: oktober 2018

Stein-Erik Lauritzen, Professor
Institutt for geovitenskap, Universitetet i Bergen
Stein.Lauritzen@uib.no

Dato for kommunikasjon: februar 2019

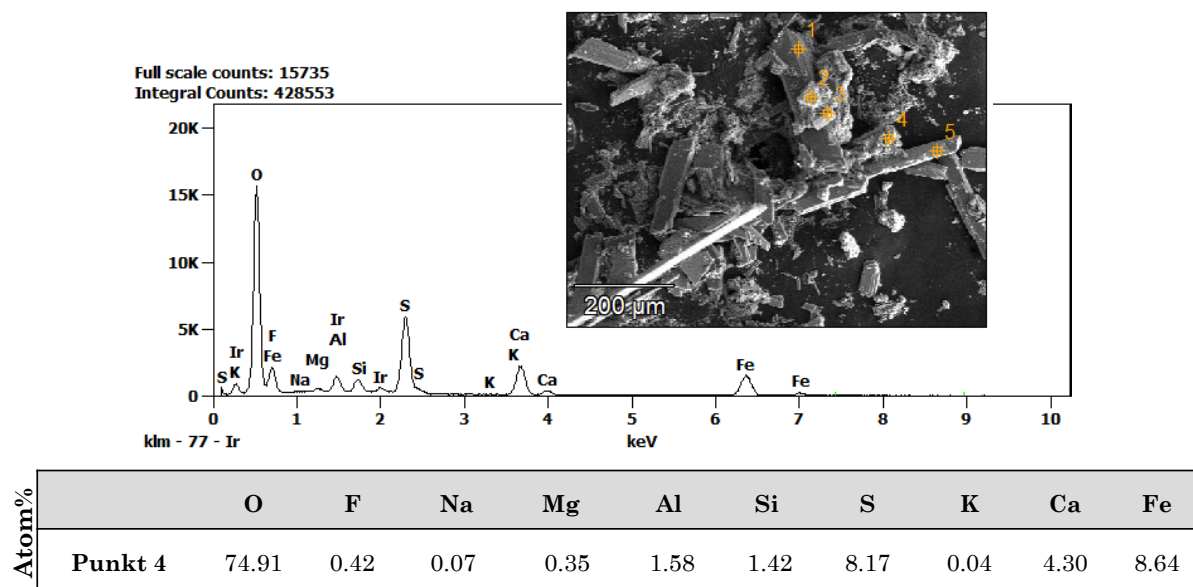
Irina Maria Dumitru, Avdelingsingeniør
Institutt for geovitenskap, Universitetet i Bergen
Irina.Dumitru@uib.no

Dato for kommunikasjon: april 2019

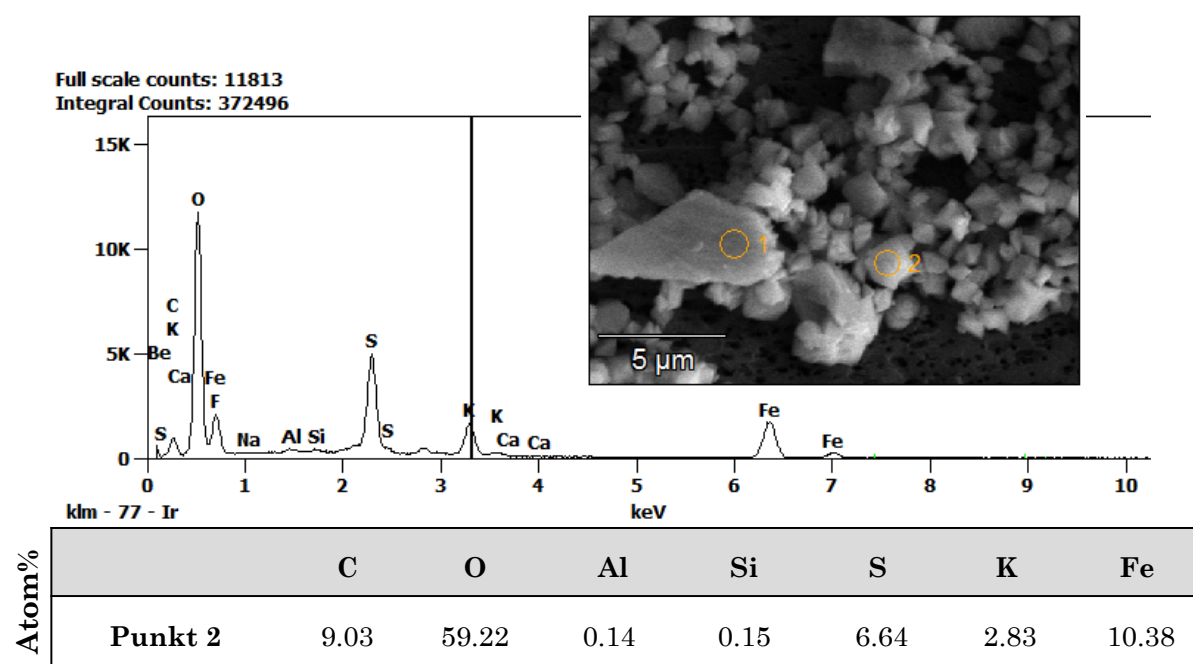
B Ytterligere tabeller og resultater

B.1 Geokjemiske analyser

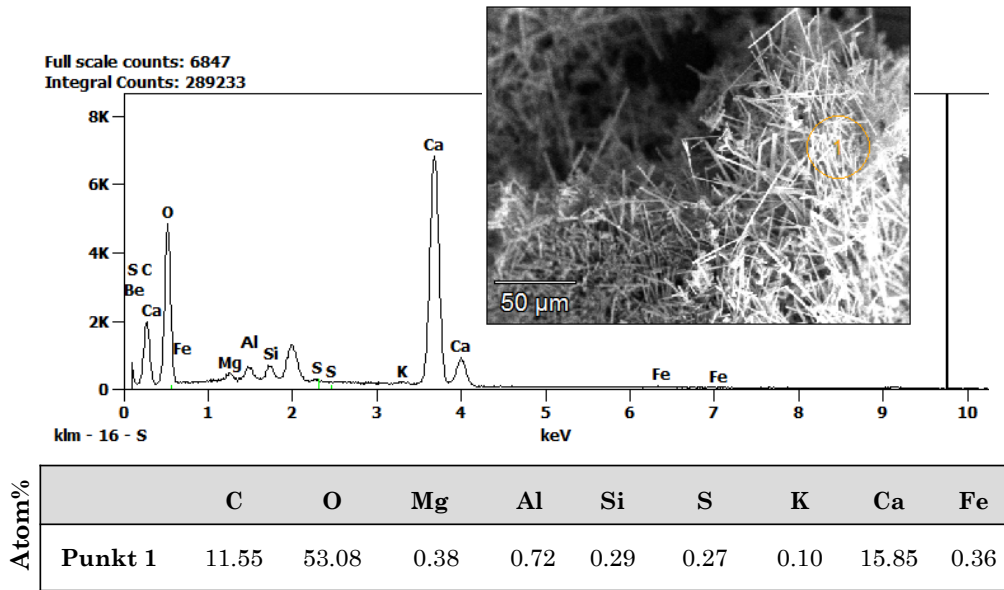
B.1.1 Energidispersiv røntgenspektroskopi (EDS)



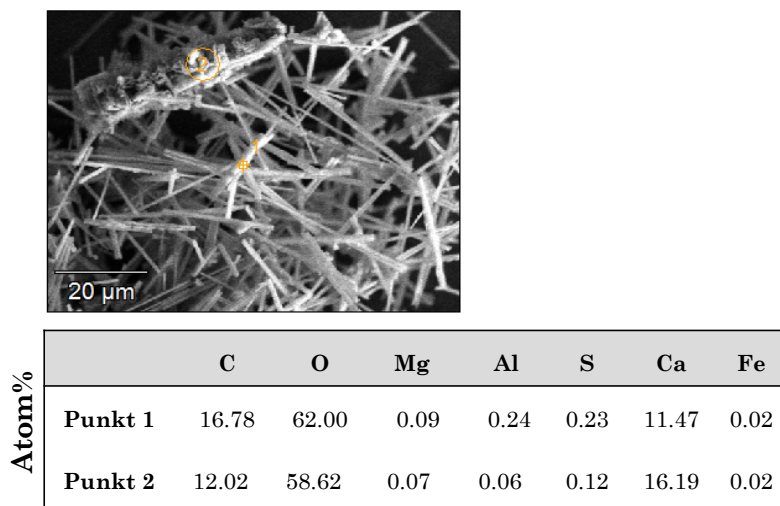
Figur B.1.1. EDS-analyse av jarositt fra Grønligrotta (GR1).



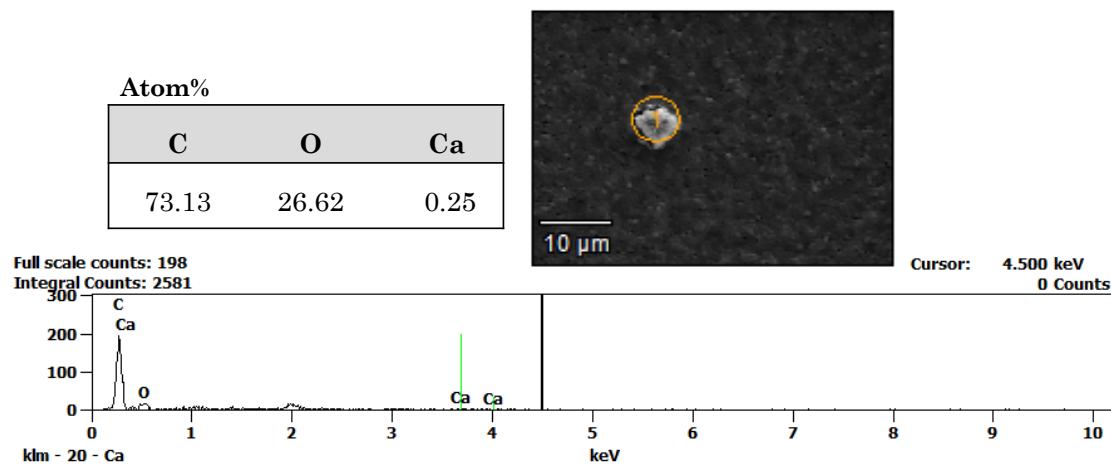
Figur B.1.2. EDS-analyse av jarositt fra Grønligrotta (GR18_3).



Figur B.1.3. EDS-analyse av mårnemelk fra Okshola (OKS18_1).



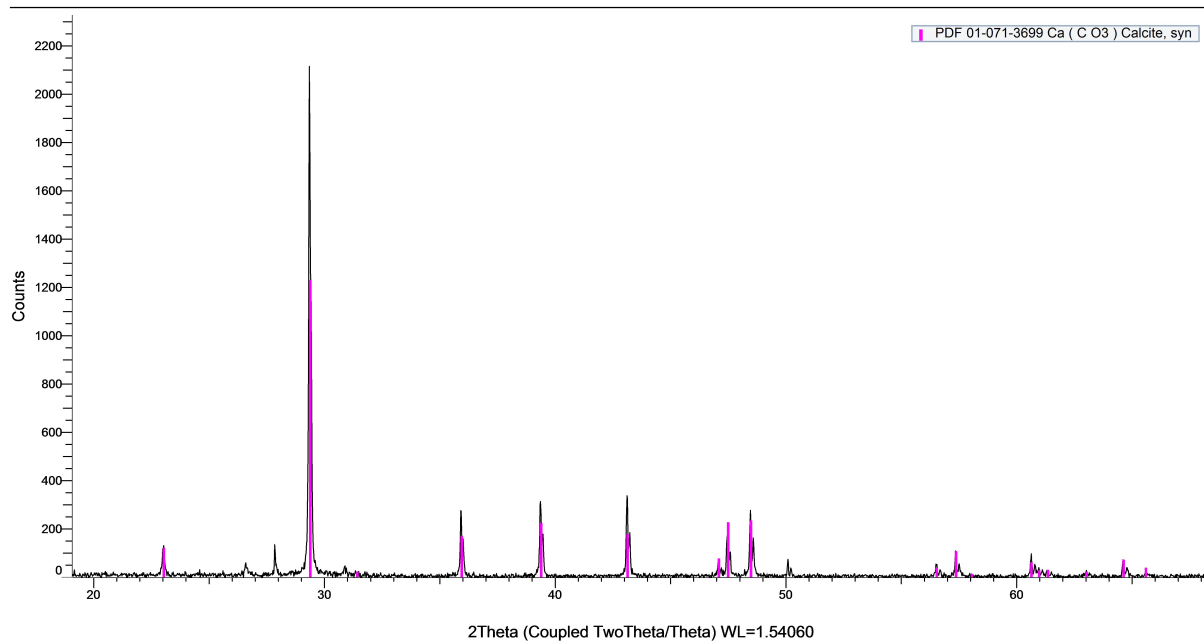
Figur B.1.4. EDS-analyse av mårnemelk fra Tukthuset (TH18_1).



Figur B.1.5. EDS-analyse av utfelling i TB4-medium inokulert med mårnemelk fra Okshola.

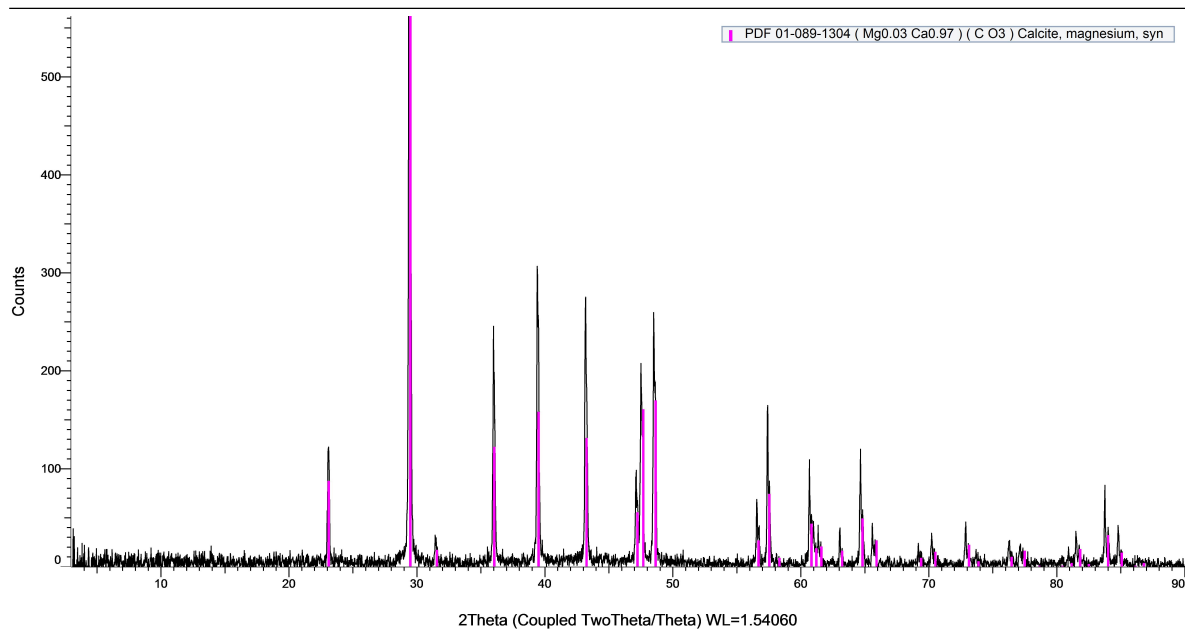
B.1.2 Røntgendiffraksjon (XRD)

(Coupled TwoTheta/Theta)



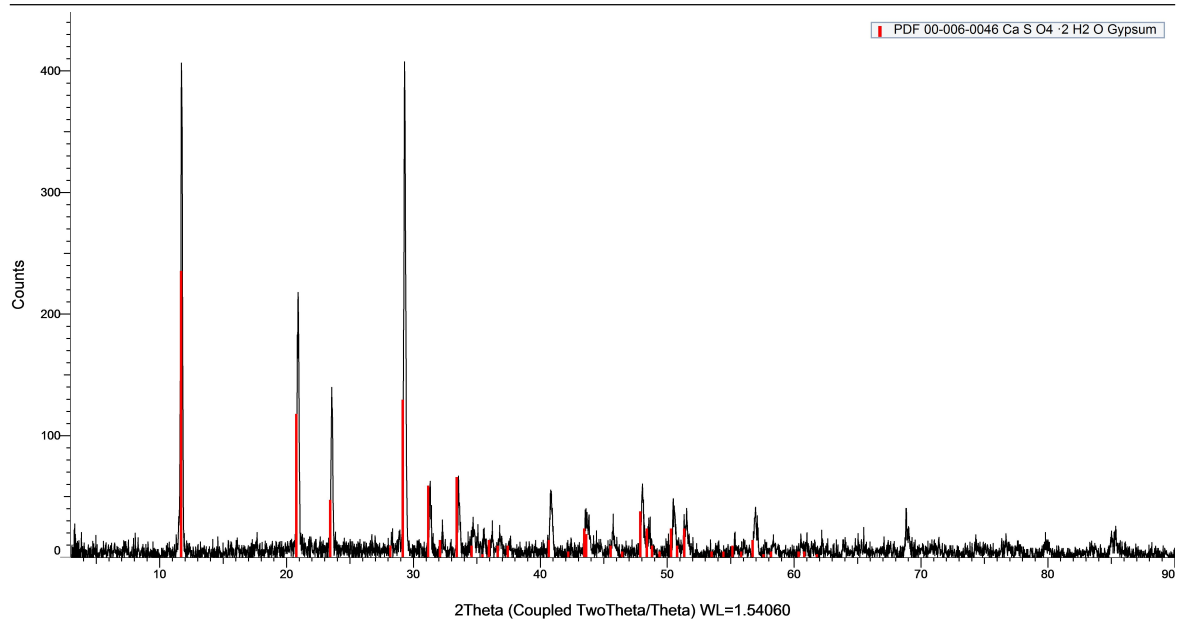
Figur B.1.4. XRD-analyse av månemelk fra Okshola.

(Coupled TwoTheta/Theta)



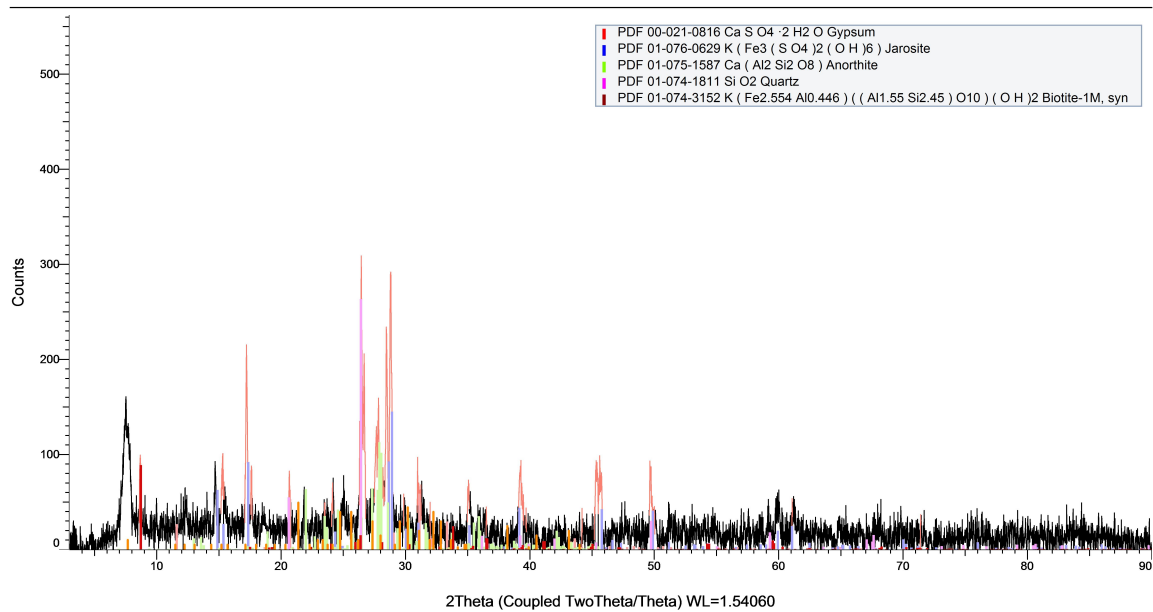
Figur B.1.5. XRD-analyse av månemelk fra Tukthuset.

(Coupled TwoTheta/Theta)



Figur B.1.6. XRD-analyse av gips fra Grønligrotta.

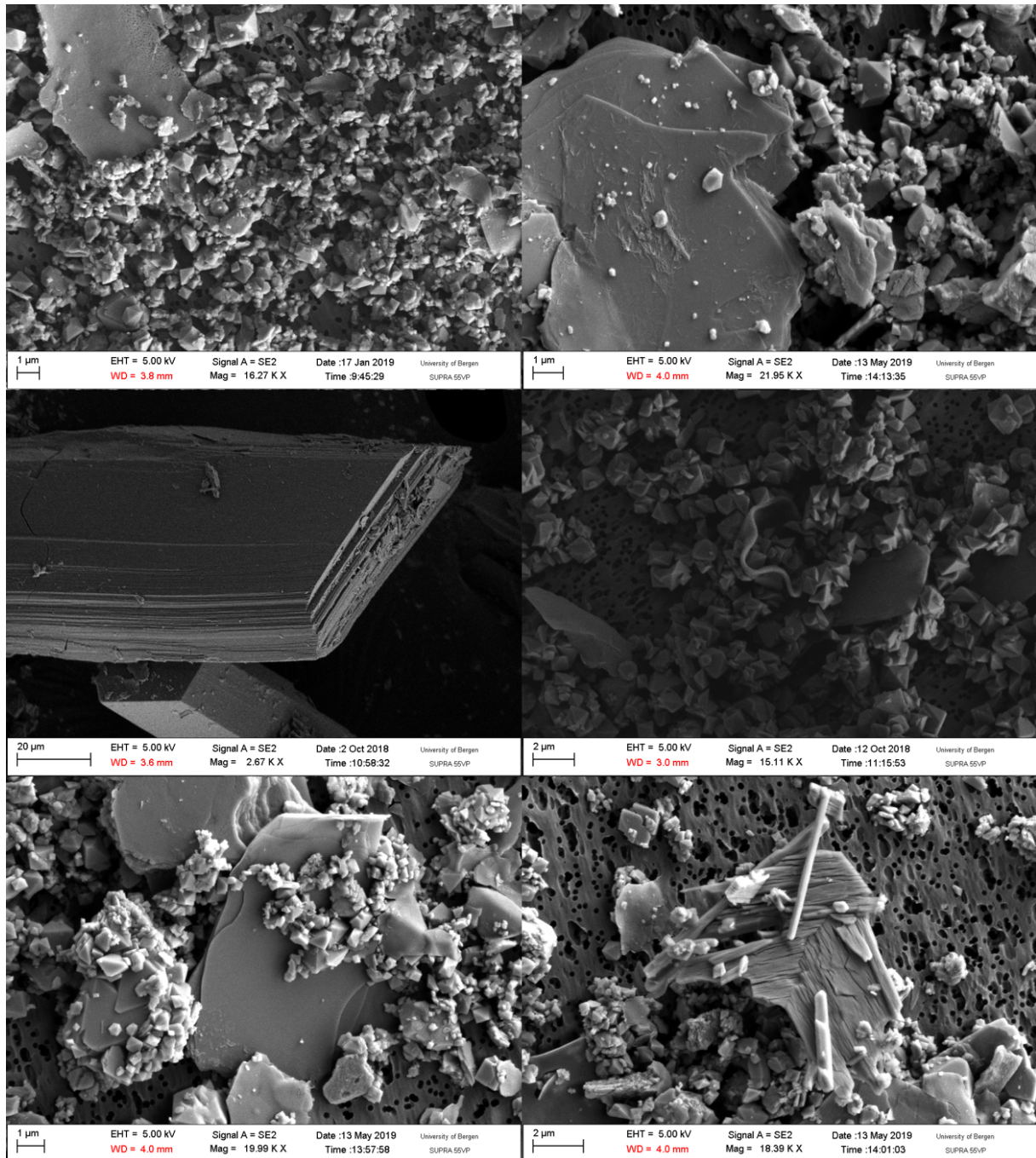
(Coupled TwoTheta/Theta)



Figur B.1.7. XRD-analyse av prøve fra Grønligrotta.

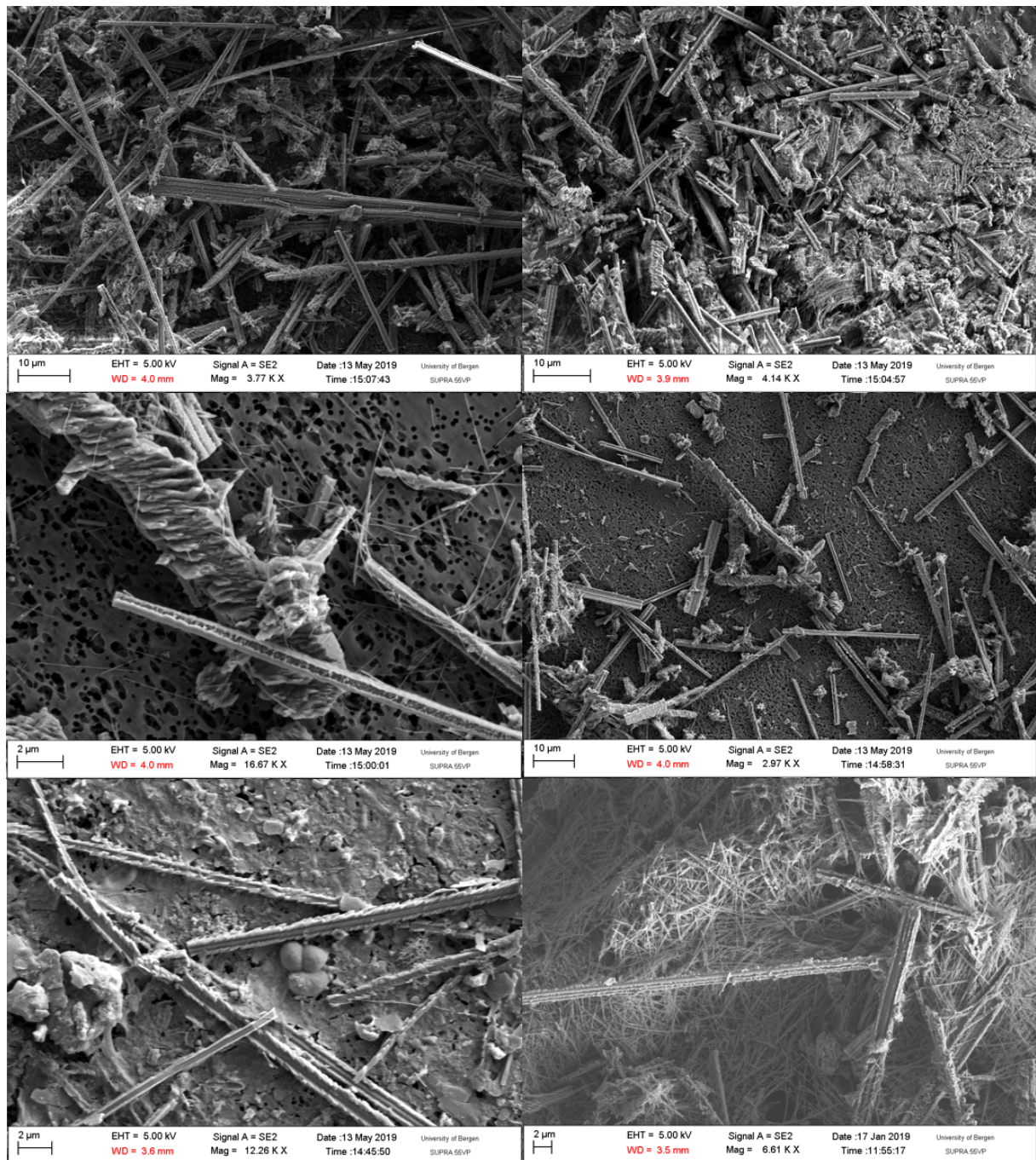
B.2 Sveip-elektroniskop (SEM)

B.2.1 Jarositt og gips



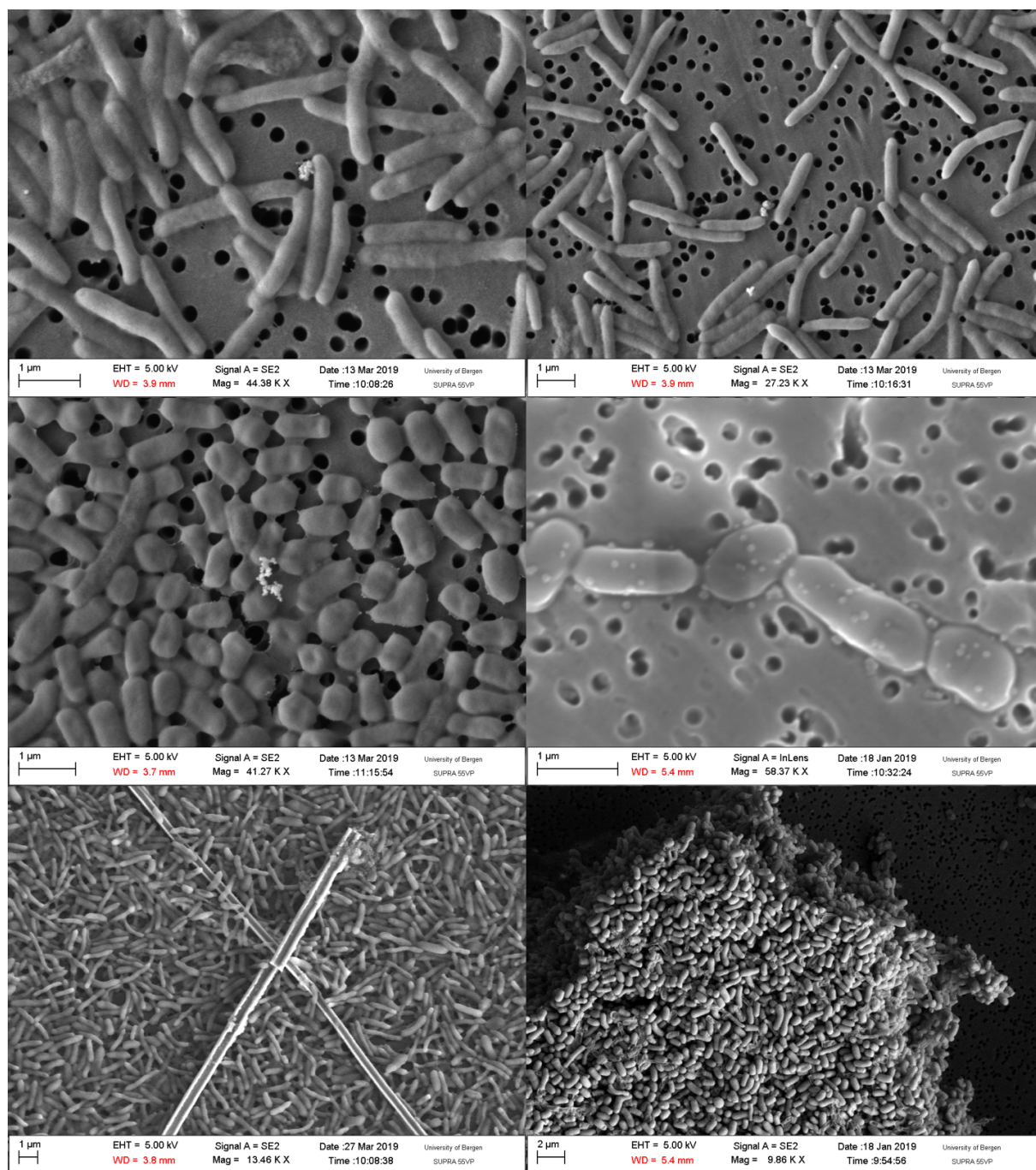
Figur B.2.1. SEM-mikrografier av gips og jarositt fra Grønligrotta.

B.2.2 Månemelk



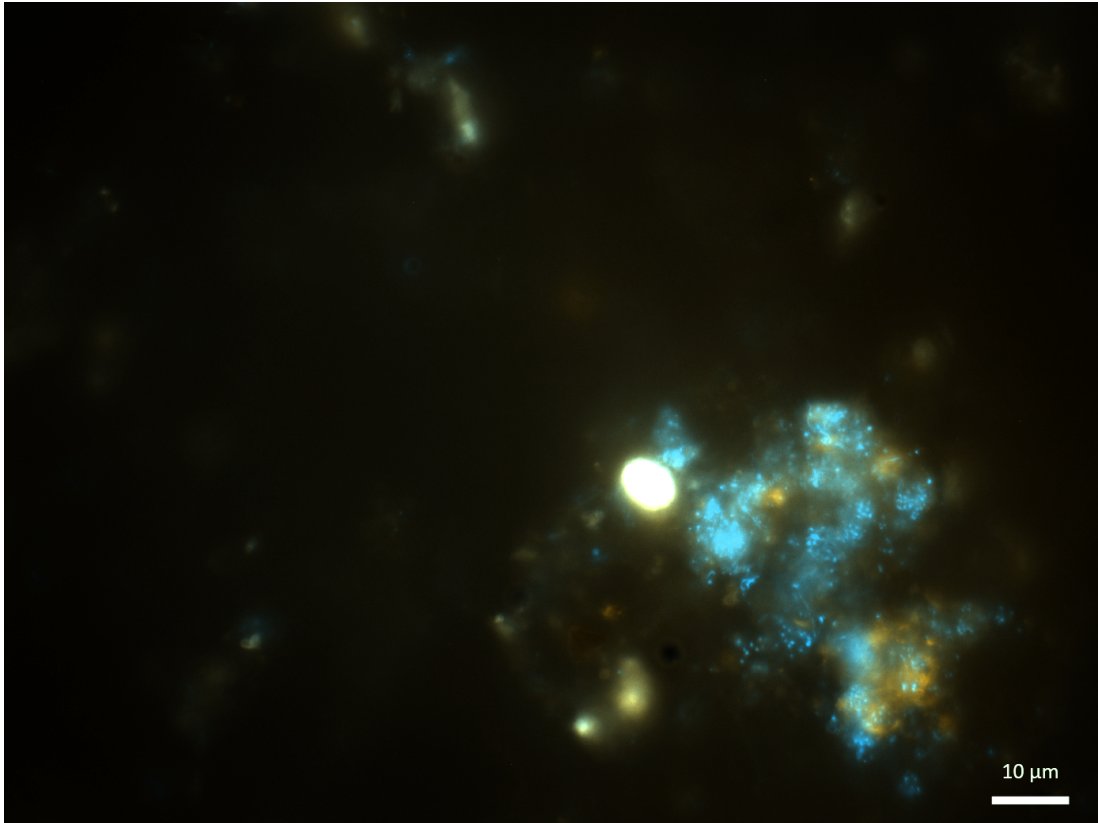
Figur B.2.2. SEM-mikrografier av månemelk. Venstre, ovenfra og ned: Tukthuset, Tukthuset, Okshola. Høyre, ovenfra og ned: Tukthuset, Tukthuset, Moengrotta.

B.2.3 Isolater

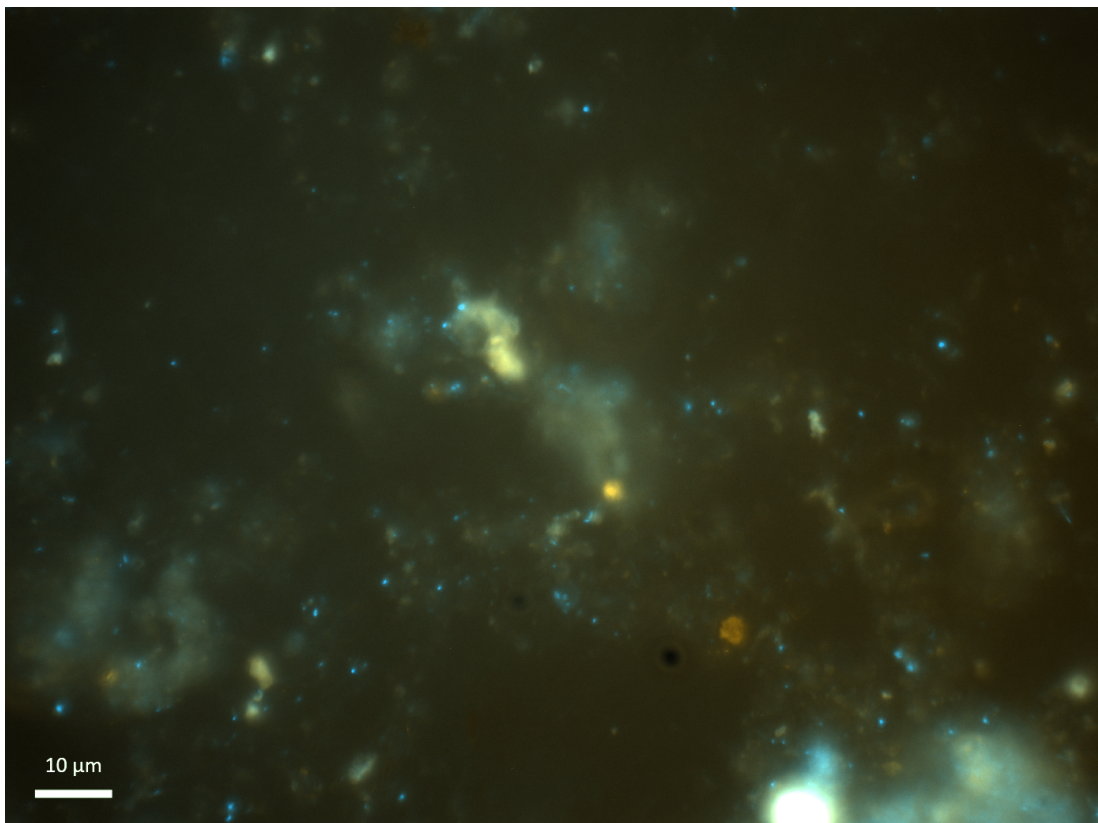


Figur B.2.3. SEM-mikrografier av isolater. Venstre, ovenfra og ned: Okshola (TB4), Okshola (TB4), Tukthuset (TB4). Høyre, ovenfra og ned: Okshola (TB4), Tukthuset (TB4), Tukthuset (TB4).

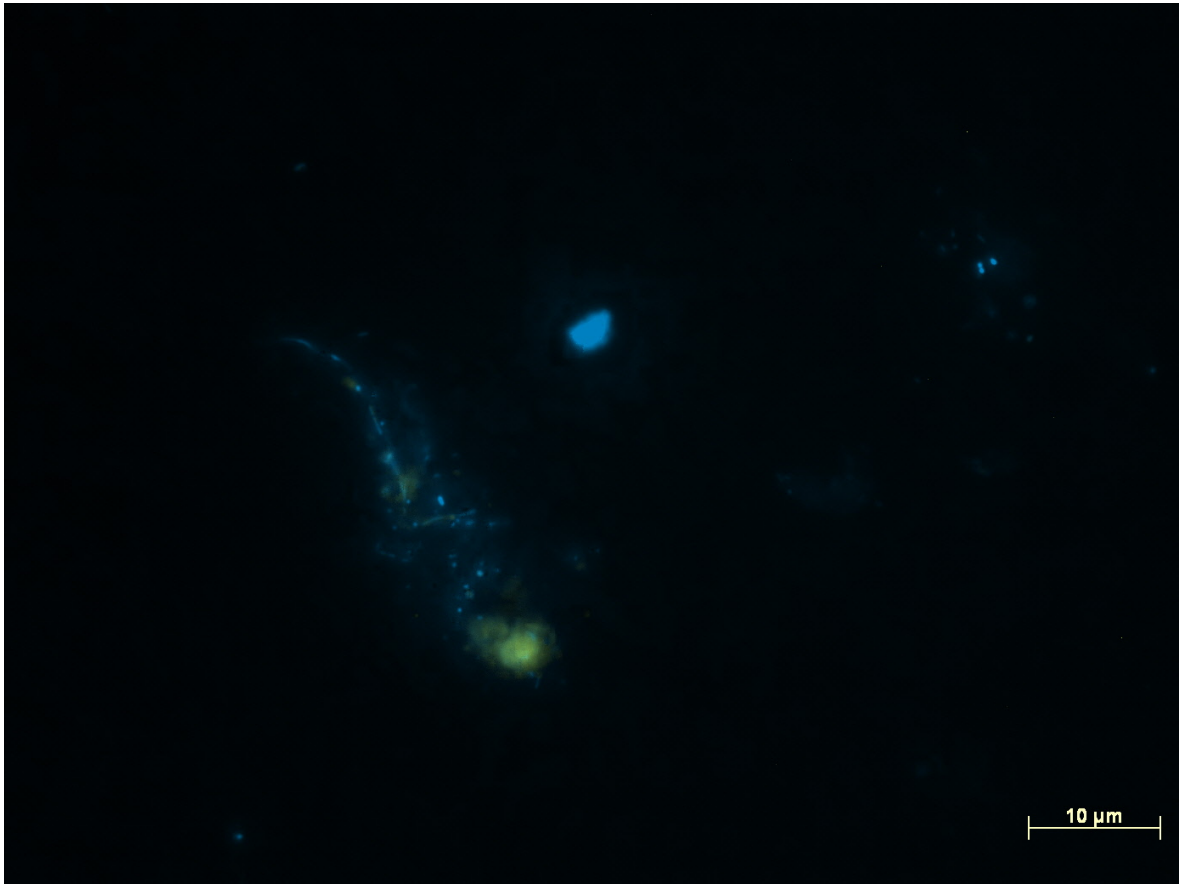
B.3 Fluroescerende in situ hybridisering (FISH)



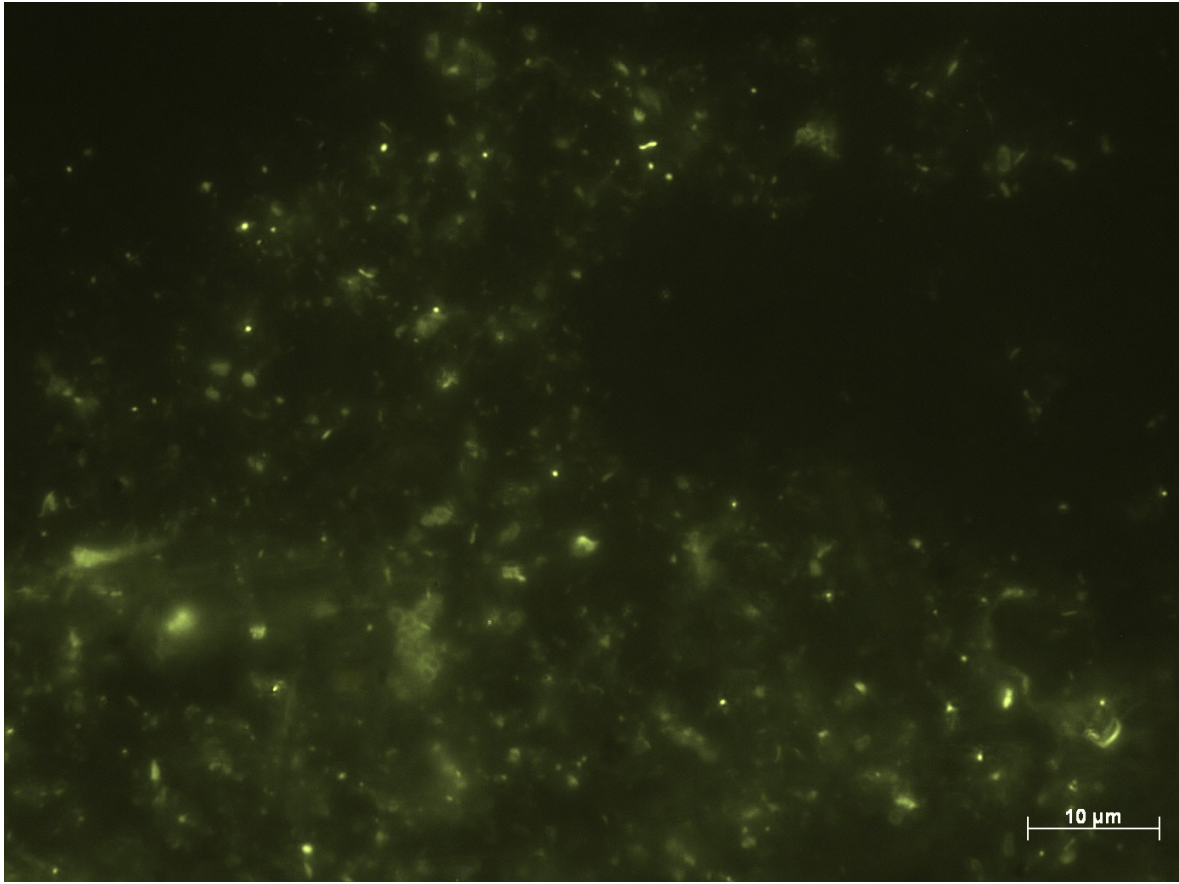
Figur B.5.1. Månemelk fra Okshola. DAPI og EUB338.



Figur B.5.2. Månemelk fra Okshola. DAPI og EUB338.



Figur B.5.3. Månemelk fra Okshola. DAPI og EUB338.



Figur B.5.3. Månemelk fra Hammarnesgrotta. DAPI og EUB338.

C Protokoller

C.1 Sveip-elektronmikroskop

Denne protokollen er utarbeidet ved senter for geobiologi (CGB), ved Universitetet i Bergen. Oversatt fra engelsk til norsk av Victoria Sæbø i 2019.

C.1.1 Utstyr og løsninger

- Millipore-bøtte for 12 x 25 mm filter
- Vakuumpumpe
- 25 mm polykarbonatfilter
- 25 mm nylonbasert støttefilter
- Glutaraldehyd
- Pinsett
- 50, 75 og 95% etanol
- Petriskåler (Ø = 5 cm)
- Falconrør (50 mL)

C.1.2 Prosedyre

1. Fikser prøver i 2% glutaraldehyd. La det stå i minst 1 time på romtemperatur eller lenger på 4°C.
2. Bruk en Millipore-bøtte, og sett på nylonfilter og 0,2 µm polykarbonatfilter (Ø = 25 mm).
3. Tilsett omtrent 5 mL 0,2 µm filtrert vann eller PBS.
4. Tilsett fiksert prøvemateriale, sug materialet på filteret, ikke tørk.
5. Tilsett 5 mL 50% etanol, la stå i 10 min, sug på filteret, ikke tørk.
6. Tilsett 5 mL 75% etanol, la stå i 10 min, sug på filteret, ikke tørk.
7. Tilsett 5 mL 96% etanol, la stå i 10 min, sug på filteret, ikke tørk, gjør dette to ganger.
8. Tørking av prøver:
 - a. Frysetørking.

- b. Kritisk punkt-tørking: overfør filter til 50mL Falconrør som inneholder etanol og fortsett deretter med kritisk punkt-tørking med CO₂.
- c. Lufttørking: filter tørkes på filterbøtten og overføres deretter til en Petriskål. Oppbevares på 4°C til mikroskopering.

C.2 Fluorescerende in situ hybridisering

Modifisert og oversatt av Victoria Sæbø (2019). Satt sammen fra Petra Hribovšek 2017, David FISH protokoll, Vigdis, Mia Bengtsson 2009 (Basert på Silva protokoll: <http://www.arb-silva.de/fish-probes/>).

C.2.1 Fiksering av celler

Fikser prøvene i 1-2% paraformaldehyd (endelig konsentrasjon, fra ferskt tilberedt 6% stamløsning) på romtemperatur i minst 20 minutt, eller på 4°C over natten (maks 24 timer). Alternativt kan man bruke 1-2% formaldehyd (endelig konsentrasjon, fra fersk 37% løsning).

C.2.2 Filtrering av prøver på polykarbonatfilter

1. Sett cellulose-nitratfilter (støttefilter, 0,45 µm) på manifoldbøtten.
2. Sett et hvitt polykarbonatfilter (0,2 µm) ble glinsende side opp, oppå støttefilteret.
3. Monter filterenheten og koble til vakuumpumpen.
4. Tilsett 5 mL (Ø = 25 mm) sterilfiltrert 1xPBS til filter. Tilsett deretter den fikserte prøven til filteret (1-5 mL).
5. Filtrer med moderat vakuum, sug filter tørt.
6. Vask to ganger med 5 mL (Ø = 25 mm) sterilfiltrert, ultrarent vann (lag til filtrert vann ved å filtrere gjennom 0,2 µm sprøytefilter).
7. Sug filter tørt og rens med 5 mL PBS.
8. Tørk filter forsiktig på linsepapir eller tørkepapir.
9. Oppbevar filter på -20°C.

NB! Whatman Anodisc kan ikke brukes fordi CY3-prober fester seg til filteret.

C.2.3 Tillaging av hybridiserings- og vaskebuffer

Tabell C.1: FISH hybridiseringsbuffer (alle volum i μL).

Formamid	0%	10%	20%	30%	35%	40%	50%	60%
MilliQ-vann	800	700	600	500	450	400	300	200
Formamid	0	100	200	300	350	400	500	600
5M NaCl				180				
1M Tris pH 8				20				
10% SDS				1				

Tabell C.2: FISH vaskebuffer (alle volum i μL). MilliQ-vann tilsettes slik at det endelige volumet blir 50 mL.

Formamid	0%	10%	20%	30%	35%	40%	50%	60%
5M NaCl	9000	4500	2150	1020	700	460	180	40
0,5M EDTA	0	0	500	500	500	500	500	500
1M Tris pH 8				1000				
MilliQ-vann				*				
10% SDS				50				

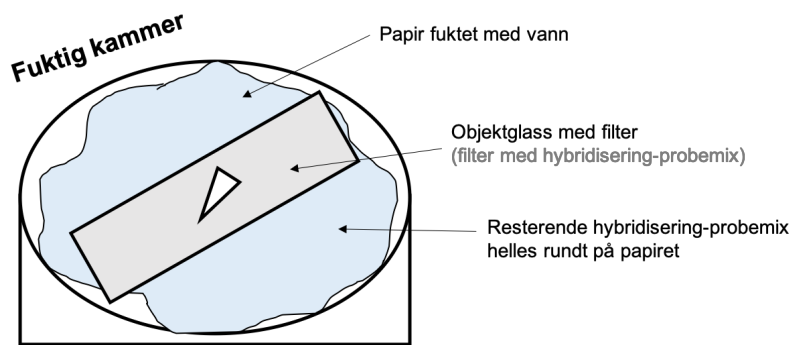
Hybridiseringsbuffer(e) lages til (2 mL per filterbit) med de korrekte formamidkonsentrasjonen(e) for proben(e) som skal brukes (tabell E.3).

Tabell C.3: Formamidkonsentrasjoner for prøber som brukes i FISH.

Probe	Målgruppe	Formamid %
EUB338 I	De fleste bakterier	10-20
EUB338 II	Planctomycetales	10-20
EUB338 III	Verrucomicrobiales	10-20
BET42a	Betaproteobacteria	45
GAM42a	Gammaproteobacteria	45
HGC236	Actinobacteria	20
NONEUB	—	—

C.2.4 *In situ* hybridisering på polykarbonatfilter

1. Kutt filtrene ($\text{\O} = 25 \text{ mm}$) i biter (omtrent 1 cm^2) med et sterilt barberblad. Ett filter kan deles inn i 8 biter, og hver bit markeres med blyant i ytterkanten.
2. Lag til hybridiseringsbuffer-probeblending: bland arbeidsløsning av probe ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) med hybridiseringsbuffer i 1:10 (e.g. $4 \mu\text{L}$ probe + $40 \mu\text{L}$ hybridiseringsbuffer = $45 \mu\text{L}$ hybridiseringsløsning). Beregn $20\text{-}50 \mu\text{L}$ av løsningen per filterbit.
3. Plasser filterbitene med pinsett på et objektglass og tilsett deretter $\sim 20 \mu\text{L}$ av hybridiserings-probeblending oppå filteret.
4. Sett deretter objektglasset inn i et fuktig kammer (petriskål) som vist ved figuren nedenfor:



Det «fuktige kammeret» lukkes godt med parafilm rundt.

5. Hybridiser i det fuktige kammeret på 46°C i 90 minutt.
6. Fjern filteret fra hybridiseringskammeret og putt det i et rør (1 filterbit per 50 mL rør) med forvarmet (48°C) vaskebuffer. Inkuber på 48°C i 15 minutt.
7. Hell vaskebuffer med filterbit ut på en Petriskål. Plukk filterbiten med pinsett og overfør til nytt 50 mL rør med sterilfiltrert MilliQ-vann, og vask i flere sekunder.
8. Tørk filterbitene på linsepapir i mørket.

C.2.5 Farging med DAPI

1. Legg dråper ($50 \mu\text{L}$) av DAPI-løsning ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) i en Petriskål.
2. Plasser de tørkede filterbitene på dråpene og inkuber i romtemperatur i 10 min (husk å holde det mørkt).

3. Flytt filtrene over på ny Petriskål, der de legges oppå dråper (50 μ L) med MilliQ-vann. Deretter lufttørkes de på linsepapir.
4. Monter filtrene på objektglass og dekk med én dråpe (20-30 μ L) antifalmende løsning, og ha til slutt dekkglass oppå.
5. Se på preparatene i et epifluorescerende mikroskop (Zeiss) ved å bruke korrekt UV-filter: grønt filter for Cy3 og blått filter for DAPI. Bruk immersjonsolje når 40x og 100x-objektene brukes.

C.2.6 Løsninger

Løsninger som lages ferskt hver gang

- Paraformaldehyd stamløsning (6%) til fiksering (100 mL): arbeid i avtrekksskap, paraformaldehyd er svært giftig! Varm opp 80 mL MilliQ-vann til 60°C (bruk begerglass og magnetrører). Tilsett 6 gram Paraformaldehyd. Tilsett 300 μ L 2M NaOH samtidig som røring. Når løsningen er klar, flytt begerglasset av varmen og tilsett 10 mL av 10x PBS-stamløsning. Juster pH til 7,2-7,4. Sterilfiltrer og oppbevar på 4°C i maks 48 timer før bruk.
- Antifalmende løsning: 10 μ L fenylendiamin blandes med 990 μ L glyserol/PBS.
- FISH hybridiseringsbuffer
- FISH vaskebuffer

Løsninger som kan lages på forhånd

10xPBS

- Løs opp 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (* $2\text{H}_2\text{O}$ = 7,64 g) og 2 g KH_2PO_4 i 800 mL MilliQ-vann.
- Juster pH til 7,4 og fyll opp til 1 L. Autoklaver og oppbevar på romtemperatur.
- For 1xPBS: fortynn 10x stamløsning med MilliQ-vann og juster pH hvis nødvendig (pH 9.0 for DAPI arbeidsløsning). Autoklaver og oppbevar på romtemperatur.

5M NaCl-løsning

- Løs opp 29,2 g NaCl i 80 mL MilliQ-vann (varm opp forsiktig mens du rører). Juster volum til 100 mL. Sterilfiltrer og oppbevar på romtemperatur.

0,5M EDTA-løsning

- Løs opp 186,1 g EDTA i 800 mL MilliQ-vann, rør og juster pH til 8,0 ved å tilsette NaOH-pellets (omtrent 20 g). Juster volum til 1 L. Autoklaver og oppbevar på romtemperatur.

10% Na-dodecylsulfate-løsning (SDS)

- Tilsett 100 g SDS (elektroforesegrad) til 900 mL MilliQ-vann, og varm opp til 68°C for å løse opp. Juster pH til 7,2 ved å bruke konsentrert HCl. Ikke nødvendig å sterilisere, husk å bruke maske når SDS veies inn (det finkornede støvet er farlig å inhalere). Oppbevar på romtemperatur.

1M Tris-HCl-løsning

- Løs opp 121,1 g Tris (Trizma base) i 800 mL MilliQ-vann, tilsett konsentrert HCl (for pH 7,4 = 70 mL, pH 7,6 = 60 mL, pH 8,0 = 42 mL), og la det kjøles. Juster den endelige pH, fyll opp til 1 L, autoklaver og oppbevar på romtemperatur.

DAPI-løsning

- Stamløsning: vei opp en liten mengde DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-pulver og løs det opp i korrekt volum av MilliQ-vann for å lage en 1 mg/mL-løsning (e.g. 1 mg DAPI til 1 mL MilliQ). Del opp i flere rør og oppbevar på -20°C.
- Arbeidsløsning: tilsett 20 µL DAPI-stamløsning til 10 mL 1xPBS (pH 9,0). Del opp i flere rør og oppbevar på -20°C .

C.3 CTAB DNA-ekstraksjon

1. Tilsett 1 mL lysisbuffer*, 100 µL lysozym (100 mg/mL) til 0,3-0,4 gram jord/mineral. Inkuber på 37C i 30-40 min.
2. Tilsett 20 µL RNAase, 20 µL Proteinase K (20 mg/mL) og 30 µL 10% SDS til lysaten. Inkuber på 55C i 1 time.
3. Tilsett 80 µL CTAB/NaCl (forvarmet til 65C) og 100 µL 5M NaCl. Inkuber på 65C i 20 min i vannbad.
4. Tilsett 785 µL kloroform/isomylalkohol (24:1), bland godt og sentrifuger på maks hastighet i 15 min (sentrifuger igjen hvis den organiske og vandige fasen ikke er godt separert).
5. Overfør den vandige fasen til et nytt rør. Tilsett 1/10 volum av 3M NaAc (natriumacetat) og 1 volum (1:1 med den vandige fasen) isopropanol, bland forsiktig men grundig. For vanskelig prøver med lav biomasse, kan 0,05-1 µg glykogen (endelig konsentrasjon) tilsettes til NaAc/isopropanol-blandingen. Inkuber på -20C over natten.
6. Sentrifuger blandingen fra dagen før i 10-15 min på 10'000 rpm. Tilsett 500 µL kald 70% etanol, og sentrifuger på ny i 10 min på 10'000 rpm.
7. Forkast supernatant og lufttørk pellet. Løs opp DNA i 50 µL nukleasefritt vann eller TE-buffer.

*Lysisbuffer (i 1 L): 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 750 mM sukrose.

C.4 Illumina-PCR 16S rRNA amplikon protokoll for Illumina «dual nested» PCR (Nextera)

Modifisert etter Petra Hribovsek 2018, Oliver Müller 2014, Anders Lanzén 2013, modifisert etter Sarah Haig.

Denne protokollen beskriver hvordan man amplifiseres 16S rRNA fra mikrobielle samfunn hentet fra ulike miljø, til bruk i «dual nested» Illumina-sekvensering (MiSeq v2). Metoden bruker en to-trinns PCR («nested» PCR) for å først amplifisere V4-regionen i 16S rRNA, noe som etterlater et overheng som inkluderer en Illumina-adapter og fem N-er. Den andre amplifikasjonen retter seg mot de overhengende Illumina-adapterne og inkluderer identifikasjonsmarkørsekvensene (8 versjoner for fremover og 12 for revers). Sammen muliggjør disse 8+12 identifikasjonsmarkørene sekvensering av 96 prøver parallelt ved bruk av MiSeq v2-kjemien.

C.4.1 Primere

Første PCR:

FAdapter-N5-519F:

CTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CAGCMGCCGCGGTAA

RAdapter-806RB;

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-GGACTACHVGGGTWTCTAAT

(M=A/C, H=A/C/T, V=A/C/G, W=A/T)

Andre PCR:

FAdapter-“barcode”-FLinker:

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-XXXXXXXX-ACACTCTTTCCCTACACGACG

RAdapter-«barcode»-RLinker:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXX-

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

- X-ene erstattes av en unik identifikasjonsmarkørsekvens («barcode sequence») for hver prøve. Se tabell nedenfor for de ulike versjonene tilgjengelig på laboratoriet.

C.4.2 DNA

Mål DNA-konsentrasjonen i prøvene dine (Nanodrop eller Qubit). Fortynn DNA til omtrent 5-10 ng/ μ L.

C.4.3 Første PCR

Lag triplikater på 20 μ L for hver av prøvene i den første PCR for å minimere PCR «drift». Slå triplikater sammen etter PCR.

per 20 μ L reaksjon:

- 10 μ L Qiagen HotStar masterblanding
- 0,5 μ L BSA (100%)
- 0,5 μ L FAdapter-N5-primer (10 mM)
- 0,5 μ L RAdapterprimer (10 mM)
- x μ L templat (10 ng)

Tilsett dH₂O, fyll opp til 20 μ L.

Termale forhold:

Temperatur	Tid
95°C	15:00 (hot start)
<i>25 sykluser:</i>	
95°C	00:20
55°C	00:30
72°C	00:30
72°C	07:00
4°C	∞

- Antall sykluser kan økes til omtrent 25 hvis man ikke oppnår tilstrekkelig produktkonsentrasjon. Man bør likevel heller prøve å optimalisere templatkonsentrasjon først, enten ved å fortynne eller bruke mer templat.
- Slå sammen og sjekk deretter produktene på gel før rensing. Hvis produktkonsentrasjonen er for lav endres templatkonsentrasjonen (se over).

C.4.4 Rense med DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo research)

Gjøres etter produsentens instruksjoner (Manual: D4003).

Mål DNA-konsentrasjonen for alle prøvene etter rensing (Qubit).

C.4.5 Andre PCR

Sørg for at alle prøver har unike fremover og revers «barcode»-kombinasjoner og noter alltid hvilke «barcode»-kombinasjoner som brukes både på papir og i Excel.

per 50 µL reaksjon:

Felles del:

- 25 µL Qiagen hotstar masterblanding
- 18 µL dsH₂O

Unikt for hver prøve:

- 1 µL FAdapter-barcode-FLinker (fortynnet til 10 µM)
- 1 µL RAdapter-barcode-RLinker (fortynnet til 10 µM)
- x µL (50 ng) templat (fra sammenslåtte 1. PCR-prøver)

Termale forhold:

Temperatur	Tid
95°C	15:00 (hot start)
<i>15 sykluser*:</i>	
95°C	00:20
62°C	00:30
72°C	00:30
72°C	07:00
4°C	∞

*Bruk færre sykluser hvis det er mulig (for å sjekke).

Visualiser PCR-produktene på en gel ved å laste dem ved siden av én eller to produkter fra første PCR. Produktene fra andre PCR skal være tydelig lenger (dette kan være enklere hvis gelen kjøres i 45 min eller mer).

C.4.6 Rensing ved bruk av Ampure XP

1. Bland fersk 70% etanol (skal blandes ferskt og eksakt for hver reaksjon, eventuelt oppbevares i kun et par dager). Bruk **0,729 mL 96% EtOH** og **0,271 mL vann** for hver resulterende 1 mL av 70% EtOH.
2. (Slå sammen replikat PCR-produkt hvis noen ble brukt)
3. Vortex flasken med Ampure XP i 20 sek
4. Tilsett 85 μL Ampure beads fra flasken til hvert rør (60 μL). Vortex i 5 sek.
5. Inkuber på romtemperatur i 5 minutt. (Sett Ampure-flasken i kjøleskapet).
6. Plasser rørene på magnetenheten i 5 minutt.
7. Fjern og forkast supernatant fra rørene, samtidig som rørene fortsatt står på magneten. Tilsett 500 μL 70% ethanol med én gang etter fjerning av supernatant, før du går over til neste rør. Inkuber i 1 minutt eller i så lang tid det tar å gjøre ferdig alle rørene.
8. Repeter steg 7).
9. Fjern all etanol fra rørene (vær grundig), og sørg for at ingen dråper ligger igjen i rørene. Større dråper kan fjernes ved å bruke 0,5-10-pipetten.
10. La rørene stå med lokket åpent og la de lufttørke i 5 minutt. Jobb effektivt med å fjerne etanolen fra alle rørene, slik at de første ikke står og tørker for lenge.
11. Ta rørene av magneten og tilsett 25 μL nukleasefritt vann (TE-buffer den siste gangen) for å eluere DNA-et.
12. Plasser rørene tilbake på magneten i 1 minutt.
13. Fjern supernatanten forsiktig og tilsett den i nye (1,5 eller 0,5 mL) rør.
Pass på at du ikke får med noen «beads» – la heller noen mikroliter ligge igjen!

Mål DNA-konsentrasjonen på alle prøvene etter rensing (Qubit). Visualiser på gel ved siden av ubrukte produkter fra første PCR for å verifisere størrelsesforskjellen. Båndet som representerer templatet fra PCR 1 skal være så mye svakere at det er usynlig ved siden av båndet fra PCR 2.

C.4.7 Slå sammen før det sendes til sekvensering

Slå sammen alle prøver i ekvimolare mengder (eller den ratioen du ønsker), basert på de målte konsentrasjonene, til et totalt volum på 120-150 µL (men få bekreftelse fra sekvenseringscenteret først, for å forsikre deg om at dette er å foretrekke). En hver prøve som har for lav konsentrasjon (typisk <2 ng/µL) kan bli konsentrert ved å bruke vakuumsentrifugering. Sjekk ut hvilken endelig DNA-konsentrasjon sekvenseringscenteret ønsker å få prøvene levert i.

C.4.8 Krav fra Norsk sekvenseringscenter (NSC)

Prøvenes renhet må måles med Nanodrop og den minimale DNA-standarden for A260/A280-ratioen skal være mellom 1,8 og 2,0, mens den foretrukne A260/A230-ratioene skal være nær 1,8.

Tabell med identifikasjonsmarkert («barcoded») F- og R-primere for andre PCR

Fremover ID	Sekvens
F1 ('N501')	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- TAGATCGCACACTCTTTCCCTACACGACG
F2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- CTCTCTATACTCTTTCCCTACACGACG
F3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- TATCCTCTACACTCTTTCCCTACACGACG
F4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- AGAGTAGAACACTCTTTCCCTACACGACG
F5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- GTAAGGAGACTCTTTCCCTACACGACG
F6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- ACTGCATAACTCTTTCCCTACACGACG
F7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- AAGGAGTAACACTCTTTCCCTACACGACG
F8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- CTAAGCCTACTCTTTCCCTACACGACG

Revers ID	Sekvens
R1 (N701')	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATT CGCCTTA - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTAGTACG - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TTCTGCCT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCTCAGGA - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGGAGTCC - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CATGCCTA - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTAGAGAG - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R8	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CCTCTCTG - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R9	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGCGTAGC - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CAGCCTCG - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R11	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TGCCTCTT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
R12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCTCTAC - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

D Dyrkingsmedier

D.1 Næringsagar

Tabell D.1: NA-medium

Komponent	Mengde
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Kjøttekstrakt	1,5 g
Gjærekstrakt	1,5 g
Agar	15 g
Destillert H ₂ O	1000 mL

pH justeres til 8-8,5.

D.2 Trippel B4-agar

Tabell D.2: TB4-medium

Komponent	Mengde
Kalsiumacetat	2,5 g
Gjærekstrakt	4 g
Glukose	10 g
Agar	18 g
Destillert H ₂ O	1000 mL

pH justeres til 8-8,5.

D.3 Sulfittagar

Tabell D.3: SA-medium

Komponent	Mengde
Trypton	10 g
Nariumsulfitt	1 g
Agar	20 g
Destillert H ₂ O	1000 mL

pH justeres til 6-7.

D.4 Tiosulfatagar

Tabell D.4: TSA-medium

Komponent	Mengde
Na ₂ S ₂ O ₃ * 5H ₂ O	5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,25 g
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,01 g
Agar	15 g
Destillert H ₂ O	1000 mL

pH justeres til 6-7.

D.5 Reasoners 2A-agar

Tabell D.5: R2A-medium

Komponent	Mengde
R2A-medium	18,12 g
RO-vann	1000 mL

