

**ÅRSTIDSVARIASJONER HOS MIKROBIELLE SAMFUNN I
RAUNEFJORDEN 2003**

av

Karina Hæstad

**Masteroppgave i biologi, studieretning mikrobiologi
til graden *master of science*.**

November 2005



**INSTITUTT FOR BIOLOGI
UNIVERSITETET I BERGEN**

Forord

Denne mastergradsoppgaven ble utført ved Institutt for biologi, studieretning mikrobiologi, Universitetet i Bergen, i tidsrommet januar 2003 til november 2005.

Jeg ønsker å gi en takk til veilederen min Lise Øvreås for god veiledning, hjelp og støtte under arbeidet med oppgaven. Tusen takk for alt, Lise!!!

Jeg kunne heller ikke ha klart det uten deg, Frida Lise Daae. Tusen takk for de gode råd, hjelpen og den støtte jeg har fått av deg!! Lykke til med masteroppgaven din. Jeg er 100 % sikker på at du klarer dette !

En stor takk til deg Vigdis Torsvik for hjelp med CARD-FISH.

Jeg må også takke deg, Synnøve, for å ha vært en venn da jeg trengte det mest. Tusen takk!!

En stor takk til alle på gruppen min (Steffen, Bjørn Olav, Jørn, Torill og Susanne), Irja, medstudenter, ansatte på mikrobiologisk og alle på MIRACLE-prosjektet. Tusen takk for den støtte jeg har fått av dere, og lykke til med deres arbeid videre!!

En stor takk til alle på Universidad Miguel Hernandez i Alicante som har lært meg mye nyttig bioinformatikk og for den støtte dere har gitt. Det har vært til stor nytte i oppgaven min!

Helt til slutt må jeg takke venner og familien min (Lena, Siw-Anita, Ina, Kim, Arild, mamma og pappa) for den støtte dere har gitt meg. Det har betydd veldig mye, og er noe jeg ikke hadde klart meg for uten!!

TUSEN TAKK!!!

Bergen 01.nov. 2005

Karina Hæstad

Ordforklaringer

BLAST	Basic local alignment search tool
CARD-FISH	CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
CTAB	Hexadecyltrimetylammonium
DAPI	4'6-diamidino-2-fenylindol
DGGE	Denaturerende gradient gelelektroforese
Divergens	To arter, DNA eller proteiner som kommer fra samme opphav, men som er forskjellig som følger av evolusjon.
FISH	Fluorescens <i>In Situ</i> Hybridisering
HRP	Pepperrot peroksidase
Marint snø	Organisk materiale som føres ned til dypet fra et produktivt overflatelag
MIRACLE	Microbial marine communities diversity: from culture to function
NCBI	National center for biotechnology information database
Palindromisk	Leser det samme forlengs og baklengs
PBS	En buffer som inneholder saltene: NaCl, KCl, Na ₂ PO ₄ * 7 H ₂ O og KH ₂ PO ₄
PBST	PBS-buffer med Triton X-100
rDNA	Ribosomal DNA
RDP-II	Ribosomal database project II
rRNA	Ribosomalt RNA
SAR	En gruppe sekvenser som ble påvist for første gang i Sargassohavet

Sammendrag

Målet med mastergradsoppgaven min var å studere årstidsvariasjoner hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden 2003. Fra januar til november 2003 ble det jevnlig tatt prøver ved den marinbiologiske stasjonen på Espegrend. Prøvene ble hentet på samme lokalitet hver gang og tatt ved 5 meters dyp. Mikroorganismer ble høstet på 2 µm filtre, filtrene benyttet til farging med et fluorescerende fargestoff som binder seg til DNA (DAPI), og bakterier, som inneholdt DNA, ble videre telt i et fluorescensmikroskop. Resultatet viste en algeoppblomstring om våren som ble etterfulgt av en sterkere bakterieoppblomstring utover sommeren. Fluorescerende *in Situ* hybridisering med signalamplifiserende reporter enzym (CARD-FISH) ble benyttet for å studere den kvantitative fordelingen av bakterier og arker. Dette resultatet viste flest bakterier om sommeren, mens det var flest arker om våren, en periode på sommeren og på høsten. Det ble også utført fingerprintsanalyse på alle sjøvannsprøvene ved å kombinere PCR amplifisering av 16S rDNA og denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE). Samfunnsprofilene viste en kompleks sammensetning av bakteriesamfunnet i alle prøvene. Tre av båndene ble påvist i alle prøvene, mens 21 av båndene ble kun påvist å forekomme i noen av sjøvannsprøvene. Sekvenseringsanalyser av 16S rDNA bånd viste en dominans av α -proteobakterier gjennom hele året, mens γ -proteobakteriene dominerte etter algeoppblomstringen. Jeg ønsket også å finne ut om det var forskjeller i sammensetningen av bakteriesamfunn før-, under- og etter en algeoppblomstring. Det ble derfor valgt ut tre prøver på bakgrunn av fingerprintsanalysen som representerte det mikrobielle samfunnet før-, under-, og etter en algeoppblomstring. DNA fra disse prøvene ble benyttet som målsekvens for PCR reaksjonen, og det amplifiserte produktet ble så videre klonet inn i vektorer og det ble dannet klonbiblioteker. For å eliminere like kloner ble klonbibliotekene kartlagt ved bruk av restriksjonsanalyse og kloner med ulike restriksjonsmønstre benyttet videre til sekvenseringsanalyser. Resultatene fra de tre bibliotekene ble sammenlignet og likheter/ulikheter belyst. Klonbibliotekene viste en dominerende og divers gruppe av γ -proteobakterier i alle klonbibliotekene, og hvor dominansen var størst under algeoppblomstringen. Det var også en dominerende gruppe av uklassifiserte bakterier i prøver høstet før- og under algeoppblomstringen. Kloner med sekvenslikhet til actinobakterier var størst i sjøvannsprøven høstet etter algeoppblomstringen. Studiet av årstidsvariasjonen hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden 2003 viste at det var en forskjell i det mikrobielle samfunnet før, under og etter en algeoppblomstring. Kun kloner med sekvenslikhet til *Actinoplanes ianthinogenes* og udyrket marin bakterie Klon SPOTSFE02_70ml ble påvist i alle klonbibliotekene, noe som indikerer at det er en stor diversitet av organismer i det mikrobielle samfunnet i Raunefjorden.

Innholdsfortegnelse

<u>Forord</u>	1
<u>Ordforklaringer</u>	2
<u>Sammendrag</u>	3
<u>1. Innledning</u>	6
<u>1.1 Målsetting og problemstilling</u>	6
<u>1.2 Raunefjorden</u>	7
<u>1.2 Historiske perspektiver innen marin mikrobiologi</u>	7
<u>1.3 Genetiske analyser av naturlige mikrobielle samfunn</u>	9
<u>1.4 Bakterioplankton fylogeni</u>	11
<u>1.4.1. γ-Proteobakterier</u>	12
<u>1.4.2. α-Proteobakterier</u>	13
<u>1.4.3. Bacteroidetes</u>	14
<u>1.4.4. Planctomycetales</u>	15
<u>1.4.5. Cyanobakterier</u>	15
<u>1.4.6. Gram-positive Bakterioplankton: Marine Actinobakterier</u>	15
<u>1.4.7. Marine Archaea</u>	16
<u>1.5 Molekylær biologi</u>	16
<u>1.5.1 CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization)</u>	16
<u>1.5.2 DNA isolering</u>	18
<u>1.5.3 PCR (Polymerase kjedereaksjon)</u>	19
<u>1.5.4 Denaturant Gradient Gel Elektroforese (DGGE)</u>	19
<u>1.5.5 Kloning</u>	20
<u>1.5.7 Direkte PCR sekvensering</u>	22
<u>1.6 Bioinformatikk</u>	23
<u>1.6.1 NCBI BLAST</u>	23
<u>1.6.2 Ribosomal Database Project II – Chimera Detection</u>	23
<u>1.6.3 BCM Search Launcher- Sequence Utilies</u>	24
<u>1.6.4 BIOEDIT</u>	24
<u>1.6.5 Clustal W og X</u>	24
<u>1.6.6 PHYLIP</u>	25
<u>1.6.7 TREEVIEW</u>	26
<u>2. Materialer og metoder</u>	27
<u>2.1 Høsting av prøver</u>	27
<u>2.2 CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization)</u>	28
<u>2.2.1 Tillaging av prober</u>	28
<u>2.2.2. Fiksering og filtrering</u>	28
<u>2.2.3 Innleiring</u>	29
<u>2.2.4 Inaktivering av endogene peroksidaser</u>	29
<u>2.2.5 Permeabilitering</u>	29
<u>2.2.6 Hybridisering</u>	30
<u>2.2.7 Signal amplifisering av fluorescerende tyramider</u>	30
<u>2.3 DNA isolering</u>	31
<u>2.4 Polymerase kjede reaksjon (PCR)</u>	31
<u>2.5 PCR -DGGE</u>	31
<u>2.5.1 Denaturerende gradient-gelelektroforese (DGGE)</u>	32
<u>2.5.2 Rensing av PCR-produkt</u>	33

2.5.3 Sekvensering av DGGE-fragmenter.....	33
2.6 Kloning.....	34
2.6.1 PCR temperaturgradient.....	34
2.6.3 TOPO TA kloningsreaksjon.....	35
2.6.3 Analysering av positive transformanter.....	36
2.6.4 Rensing av PCR-produkt.....	36
2.6.5 Lagring av klonede E.coli -celler.....	36
2.6.6 Restriksjonskuttingsanalyse av kloner.....	37
2.6.7 Sekvensering av kloner.....	38
2.7 Sekvensbehandling.....	38
2.8 Konstruering av fylogenetiske trær.....	39
3. Resultater.....	40
3.1 Fysiske, kjemiske og biotiske forhold i Raunefjorden.....	40
3.2 Bakteriesamfunnet og arkesamfunnet studert ved CARD-FISH.....	42
3.3 Molekylære analyser av sjøvannsprøvene.....	44
3.4.1 Samfunnsprofiler.....	45
3.4.2 Sekvensanalyse.....	48
3.5 Bakteriesamfunnet før-, under- og etter en alge- oppblomstring.....	51
3.5.1 Sekvensanalyse av kloner.....	55
4.5 Fylogenetiske analyser.....	63
3. Diskusjon.....	77
4.1 Fysiske, kjemiske og biotiske forhold i Raunefjorden.....	77
4.3 Samfunnsprofiler.....	79
4.4 Bakteriesamfunnet før-, under- og etter en algeoppblomstring.....	83
4.5 Metodeevaluering.....	87
4. Konklusjon.....	89
Appendiks.....	91
A. Buffere og løsninger brukt i oppgaven.....	91
A1. DAPI-farging av celler.....	91
A2. DNA isolering.....	91
A3. Agarose gelelektroforese.....	92
A4. DGGE elektroforese.....	93
A5. Kloning.....	94
A6. CARD-FISH.....	95
B. Molekylvektstandarder for DNA (MBI Fermentas).....	97
Litteraturliste.....	99

1. Innledning.

1.1 Målsetting og problemstilling.

Dette mastergradsarbeidet er knyttet opp mot et prosjekt finansiert av EU's 5 rammeprogram som heter "Microbial Marine Communities Diversity From Culture to Function (MIRACLE)"(prosjektnummer: AKV3-2001-00121). Prosjektet har blitt utført i nært samarbeid med forskere ved Universitetet i Bergen og ved Universidad Miguel Hernandez i Alicante (Spania). Hovedmålsettingen til prosjektet var å gi en økt forståelse av den marine biodiversiteten, marine prosesser og samspillet i økosystemet. En stor utfordring innen mikrobiell økologi er at bare 1-10 % av de bakteriene som er til stede i miljøet lar seg dyrke og isolere i laboratoriet. Et viktig aspekt ved prosjektarbeidet har derfor vært å sammenligne de dyrkbare bakteriene med det totale bakterieplankton tilstede i vannmassene. En kombinasjon av innovative dyrkingsteknikker og molekylære metoder vil kunne føre til et rikt utbytte av nye mikrobielle grupper, som igjen vil gi oss en bedre og mer komplett beskrivelse av de mikrobielle samfunn og deres funksjoner.

Målet med masteroppgaven min var å studere årtidsvariasjoner hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden 2003. Ved å benytte metodene DAPI, CARD-FISH, PCR-DGGE og kloning ønsket jeg å få svar på følgende spørsmål:

- Er det kvantitative forskjeller mellom bakterie- og arkesamfunnet i Raunefjorden?
- Hvordan er sammensetningen av det mikrobielle samfunnet, og er det variasjoner i løpet av året?
- Er det forskjeller i bakteriesamfunnet før-, under- og etter en algeoppblomstring?

1.2 Raunefjorden.

Raunefjorden ligger rett utenfor Espegrend (60°16.2'N/05°12.5'E) og er en typisk norsk fjord med ulike dybder og kanaler. Kystvannet som entrer fjorden er en blanding av to vannmasser: Atlantisk havvann (salinitet < 35 ‰) og ferskvann. Golfstrømmen tar med seg vann med høy salinitet fra Atlanterhavet og entrer Nordsjøen via den engelske kanal og Orken- og Shetlandsøyene. Det meste av ferskvannet, som inneholder lav salinitet, kommer fra lokale avrenninger ved kysten, fra Østersjøen og store elver som renner ut i den sørlige delen av Nordsjøen. Dette fører til dannelse av den norske kyststrømmen, som transporterer mellom 0,2-1 millioner m³ vann per sekund opp langs norskekysten og nordover til Arktis. Ved Arktis blir sjøvannet fra norskekysten avkjølt og sjøvannets tetthet øker. Den økte tettheten gjør at vannet synker og vi får en dypvannsdannelse ved Arktis. Dette kalde vannet blir derfra transportert videre til oppvarming ved det Indiske hav. Utvekslingen av vannmasser fra fjordene er drevet av tilføring av ferskvann, tidevannsstrømmer og atmosfæriske krefter (vind og lufttrykkvariasjoner). Tilføring av næringssaltene nitrogen, fosfor og silisium fra atlantisk vann er viktig for den biologiske produksjonen av planteplankton. Om vinteren er denne produksjonen begrenset av lite lys og lav temperatur. Dette resulterer i økt næringsinnhold i de øvre vannlag på grunn av økt vertikal vindblanding og større avrenning fra land. Om våren gir minkende vindblanding og økt lysforhold en oppblomstring av planteplankton i de øvre vannlagene (Report to the Norrdic Council's International Conference on the Pollution of the Seas, 1989; Skagen og Sætre, 2001; NIVA report, 2003).

1.2 Historiske perspektiver innen marin mikrobiologi.

Studier av bakterier før ca. 1975 baserte seg først og fremst på å dyrke bakteriene i laboratoriet. I tillegg ble antall bakterier bestemt ved hjelp av mikroskopering, eller ved bestemmelse av antall dyrkbare bakterier. Få dyrkede marine bakterier (kun 1-10 % lar seg dyrke) og lavt antall marine bakterier påvist i et vanlig lysmikroskop (mange marine bakterier er for små til å påvises i vanlig lysmikroskop) gjorde at bakterier ble ansett for å være få og ubetydelige i det marine miljø. Den "klassiske næringskjeden" i det pelagiske økosystemet før ca. 1980 bestod derfor av en enkel næringskjede i den fotiske sonen, der næringssalter og CO₂ ble bundet i fotosyntesen i relativt store planktonalger (diatomeer og dinoflagellater), disse ble spist av små krepser, som igjen dannet næringsgrunnlaget for planktonspisende fisk. Bakterienes oppgave i den klassiske næringskjeden ble dermed antatt å kun omfatte nedbrytingen av døde partikler og omdanne ammonium til nitrat. Tiltross for en rekke arbeider som berørte ufullstendigheter og problemer ved den klassiske næringskjeden (Johannes, 1964; Sorokin, 1971; Steele, 1974; Pomeroy, 1974), så fortsatte forskerne

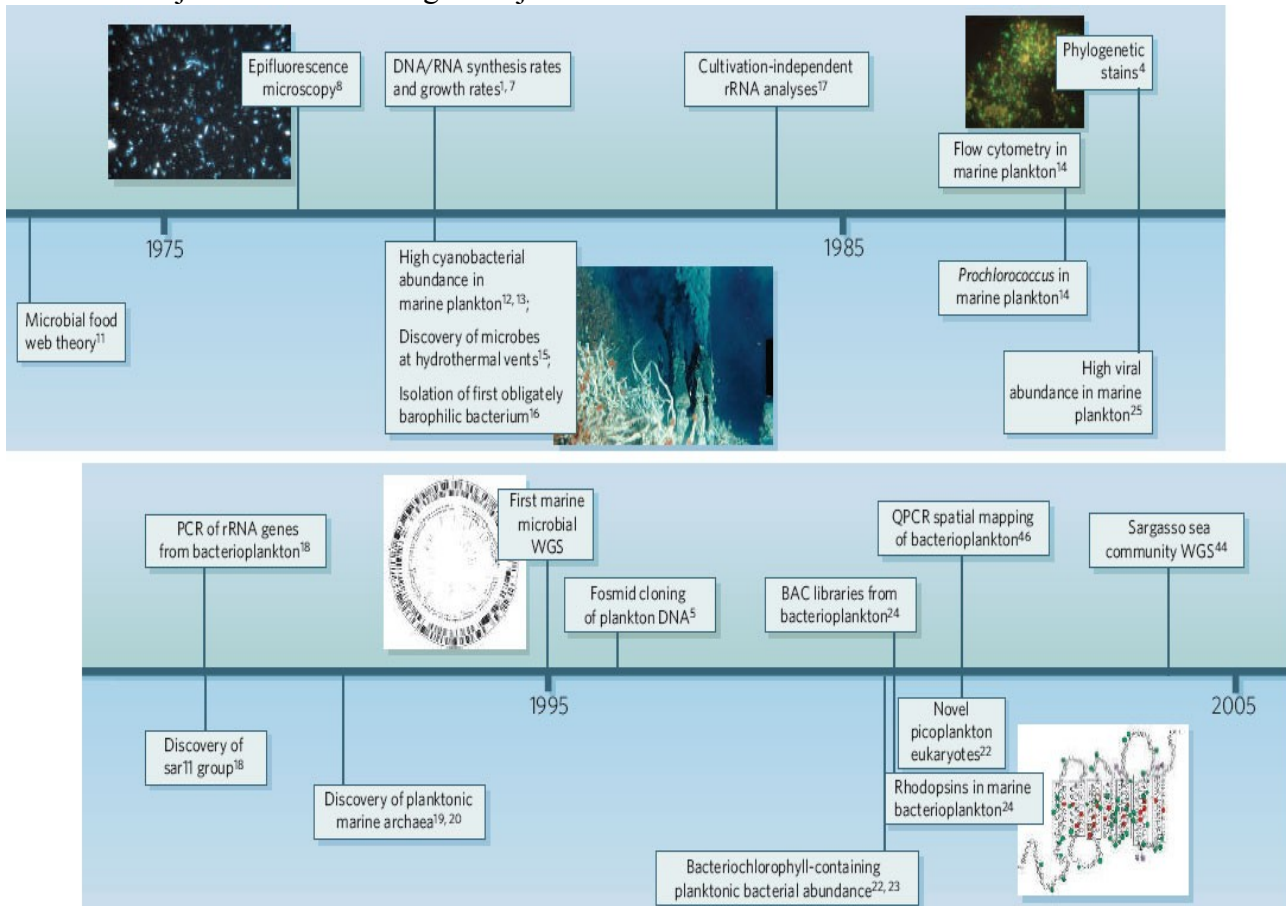
å antyde at bakterier ikke var viktige i det pelagiske økosystemet. En innføring av to nye teknikker; epifluorescensmikroskopi for telling av bakterier (Zimmermann og Meyer-Reil, 1975; Hobbie et al., 1977)(figur 1.1) og innkorporering av radioaktivt thymidin (Fuhrman og Azam, 1980) for måling av DNA-syntese, førte til paradigmeskifter rundt 1980. Disse teknikkene gjorde at man nå fikk et studium av heterotrofe bakterier som en funksjonell gruppe, og det ble viktig å undersøke hvilken rolle bakteriene hadde i det marine økosystemet. Tidligere hadde marin mikrobiologi kun dreiet seg om de bakteriene man kunne dyrke på laboratoriet. I 1983 kom Azam et al. med begrepet den "mikrobielle sløyfen". Fra å kun være viktig ved nedbryting av døde partikler, ble bakteriene viktige ved re-innkorporering av tapt organisk materiale tilbake til næringskjeden (Thingstad, 2003). Det ble da mer interessant å studere bakterier i det marine miljø.

Ved å ta i bruk fluorescensmikroskopi og flow-cytometri (Chisholm et al., 1988) til telling av marine planteplankton, ble det oppdaget dominerende fotoautotrofe picoplankton, som *Synechococcus* (Waterbury et al., 1979; Johnson og Sieburth, 1979) og *Prochlorococcus* (Chisholm et al., 1988), i den fotiske sonen i det åpne hav (figur 1.1). Utviklingen av dyrkingsuavhengige fylogenetiske metoder, som ribosomal RNA (rRNA) sekvensering (Stahl et al., 1984), denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE) (Myers et al., 1987) og fluorescens *in Situ* hybridisering (DeLong et al., 1989), gav startskuddet for moderne miljøgenomiske studier. En kombinasjon av rRNA baserte fylogenetiske teknikker og polymerase kjedereaksjon (PCR)(Mullis et al., 1994) bidro til oppdagelsen av flere dominerende og svært utbredte marine mikrobielle grupper, inkludert SAR11 (*Pelagibacter*)(Giovannoni et al., 1990) og planktonisk marin *Archaea* (DeLong, 1992; Fuhrman et al., 1992; Karner et al., 2001).

I nyere tid har det blitt påvist et høyere antall virus partikler (Bergh et al., 1989) i sjøvann enn det totale bakteriecelletallet (virus: 10^7 - 10^8 partikler per ml, bakterier: 10^5 - 10^6 celler per ml). Virus i havet har også vist seg å være viktige faktorer ved bakterioplankton død og lateral genoverføring (Paul et al., 2002). Nylig har det blitt oppdaget at mange bakterier i overflatesjøvann kan utnytte energien fra sollys ved bruk av proteorhodopsin (Béjà et al., 2000). Det kan være med på å gi ny informasjon om de lysutnyttelsesstrategiene som finnes i overflatesjøvann.

Tiltross for at nye teknikker og metoder innenfor marin mikrobiologi, som kloning av DNA (Weaver og Hedrick, 1997), fosmid kloning av plankton DNA (Stein et al., 1996) og kvantitativ PCR (QPCR) for kartlegging av bakterioplankton (Suzuki et al., 2001), har bidratt til nye oppdagelser og identifiseringer av mange organismer, er det likevel mye som gjenstår å lære om det marine økosystemet. I 2004 utførte Venter et al. fullgenom sekvensering (WGS) av bakteriesamfunn i Sargassohavet, og påviste rundt 1,2 millioner ulike gener (figur 1.1). Et av de nye målene innen marin forskning er derfor å få sekvensert hele genomet til marine mikroorganismer for mulig å få

mer informasjon om strukturer og funksjoner som eksisterer i havet.

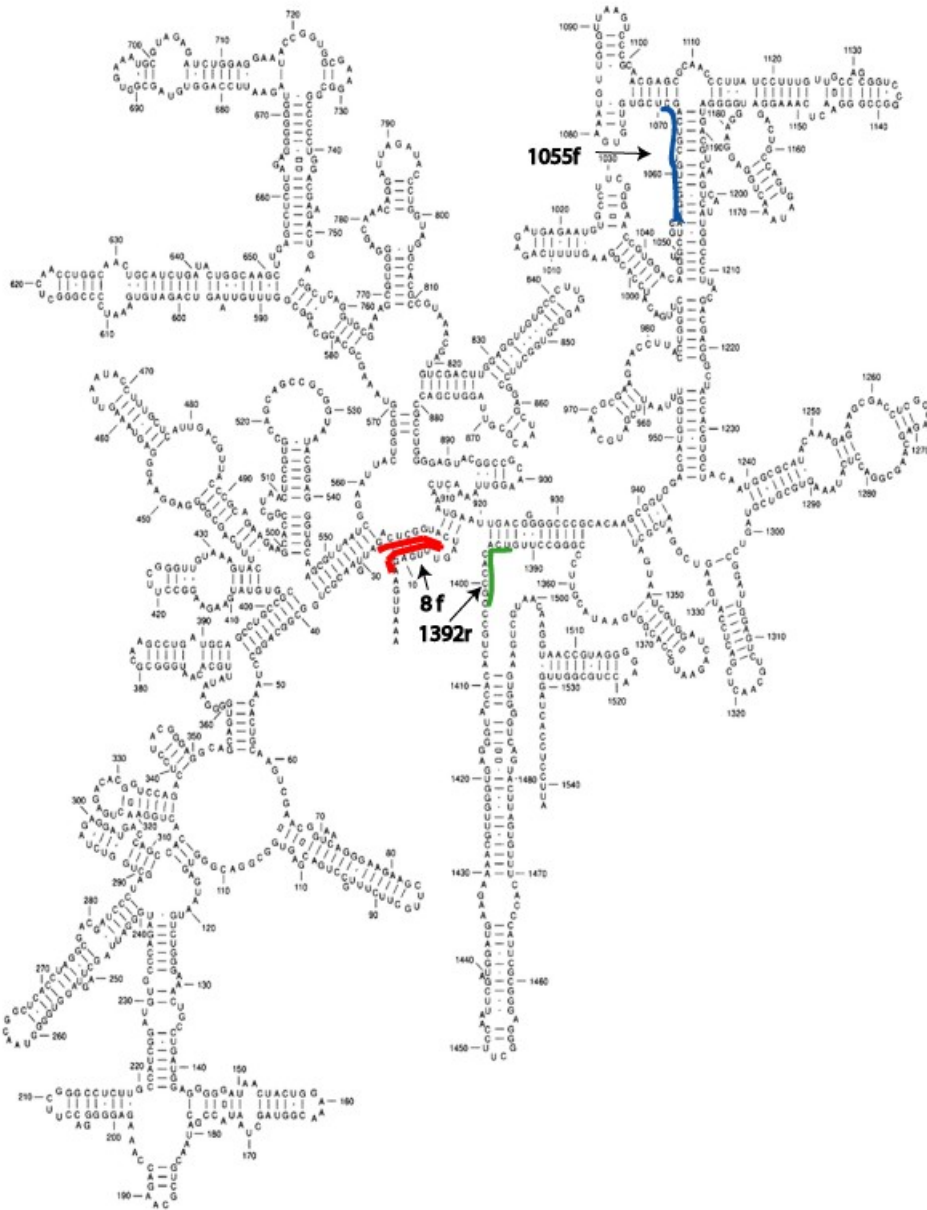


Figur 1.1: Denne figuren viser noen av milepælene innen marin mikrobiologi de siste 30 år. Figuren er hentet fra artikkelen av DeLong og Karl (2005).

1.3 Genetiske analyser av naturlige mikrobielle samfunn.

Tidlig på 1970-tallet oppdaget Carl Woese (Woese, 1987) ved Universitetet i Illinois at spesielle cellulære makromolekyler kunne benyttes som evolusjonære kronometere, og at den evolusjonære avstanden mellom to individer kunne bestemmes på bakgrunn av ulikheter i nukleotid- eller aminosyre sekvenser fra homologe makromolekyler funnet i disse to individene. Dette molekylet, ribosomalt rDNA, deles inn i tre hovedtyper hos prokaryote og har størrelsen 5S, 16S og 23S rDNA. 16S rDNA (ca. 1500 nukleotider) er det molekylet som i størst grad har blitt benyttet til fylogenetiske studier (figur 1.2), og består av flere områder med svært konserverte sekvenser godt egnet for sekvenssammenstilling. Molekylene har også variable områder hvor noen er spesifikke for hver art. De variable områdene har gjort det mulig å identifisere organismer som ikke tidligere har vært dyrket ved hjelp av molekylærbiologiske metoder (Brock og Madigan, 1991). Med den kunnskapen vi har i dag kan det konstrueres spesifikke primere som binder seg til den konservative delen av 16S rDNA-molekylet slik at området mellom primerne blir oppformert. Det amplifiserte området kan deretter bli ligert inn i en vektor, oppformert og sekvensert for videre identifisering.

PCR-amplifiserte 16S DNA fragmenter fra forskjellige miljøprøver kan også analyseres direkte på en polyacrylamidgel med en lineært økende gradient av denaturanter ved å benytte en DGGE (Fischer et al., 1979; Muyzer et al., 1993). Sekvenserte bånd fra samfunnsprofilen kan deretter benyttes til å bestemme organismenes genetiske slektskap (Siering, 1998; Angert et al., 1998; Holmes et al., 2001; Fowler et al., 2001).



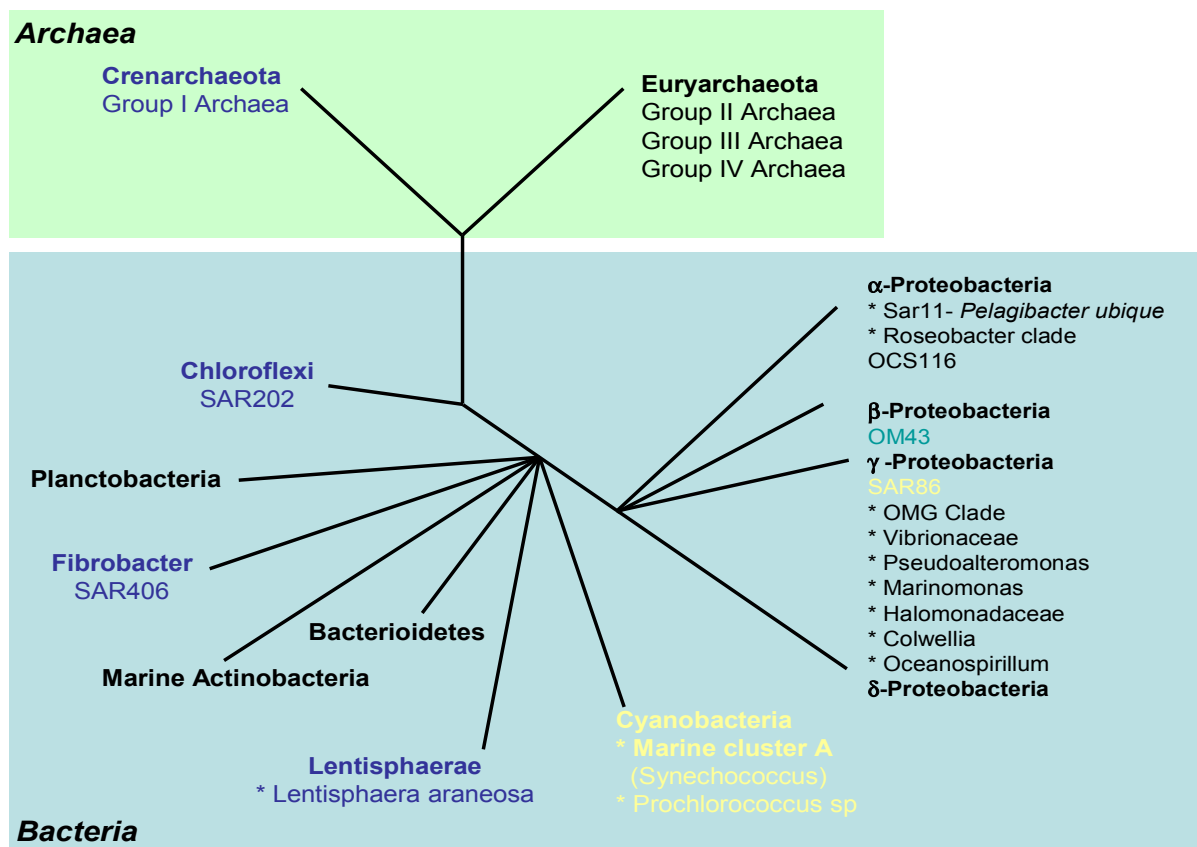
Figur 1.2: Denne figuren viser 16S rRNA hos *E.coli*. Det området som er merket med en farge viser hvor på 16S primere brukt i oppgaven binder seg til 16S rDNA. Her er 8forward primeren merket rød, 1392revers primeren merket grønn, og 1055forward primeren merket blå. Primeren 23SOR binder seg til 23S og er derfor ikke vist på denne figuren (Brock og Madigan, 1991).

De første marine bakteriene som ble isolert var heterotrofe kolonidannende bakterier isolert på næringsrikt medium (agar). Det ble derfor antatt at marine bakterier stort sett var heterotrofe organismer (Fuhrman et al., 1993). Akvatiske heterotrofe bakterier blir karakterisert som

frittlevende 0,2-2,0 μm store organismer som utgjør en del av hovedkomponentene av picoplankton. De transporterer organiske forbindelser over cellemembranen og akkumulerer løselige organiske stoffer fra lave konsentrasjoner (oligotrofe bakterier). De fleste bakterier som har blitt dyrket fram til i dag er i hovedsak fakultativ oligotrofe og copiotrofe, mens forholdsvis få har vist seg å være obligat oligotrofe bakterier (Torrella og Morita, 1981; Giovannoni og Rappé, 2000). I tillegg er det rapportert mange psykrofile bakterier fra kalde marine miljø. En obligat psykrofil bakterie har en optimal veksttemperatur på 15-20 °C eller mindre. Forskere mener derimot at kalde økosystem domineres mest av fakultativ psykrofile eller psykrotolerante bakterier (Nichols et al., 1995). Disse bakteriene har en optimal veksttemperatur ved 20 °C eller mer, men kan også vokse helt ned mot 0°C (Bowman, 2001).

1.4 Bakterioplankton fylogeni.

Studier har vist en betydelig forskjell mellom mikrobielle planktonsamfunn nær kysten og mikrobielle planktonsamfunn i havet (figur 1.3). Fysiske prosesser, som oppvelling og blanding av vannmasser, transporterer næringsstoffer til overflaten, og fører til en høyere produktivitet hos mikrobielle planktonsamfunn nær kysten i forhold til planktonsamfunn i havet. Økningen i mengde næringsstoffer resulterer i en dominans av eukaryote fytoplankton ved kysten, og en forskjell i artssammensetningen mellom planktonsamfunn ved kysten og i havet. De fleste marine bakteriegruppene har også vist seg å opptre i et større antall nær kysten. I tillegg har det blitt påvist flere mikrobielle planktongrupper som er begrenset til kysten (økotyper). Ulike studier av 16S rDNA hos mikroorganismer i pelagiske marine økosystem har vist en stor dominans av klassen *Proteobacteria*. I overflatesjøvann har det mikrobielle planktonsamfunnet vært spesielt dominert av representanter fra underklassen α -*Proteobacteria* og underklassen γ -*Proteobacteria*. Tre andre klasser som også ofte rapporteres tilstede i sjøvann, er klassen *Bacteroidetes*, klassen *Cyanobacteria* og klassen *Planctomycetales*. I 1990-årene fastslo DeLong og Fuhrman at domenet *Archaea* var utbredt og en viktig del av den marine vannkolonnen (Fuhrman et al., 1992; Fuhrman et al., 1997; DeLong, 1992). Giovannoni og Sting kom ut med en artikkel i 2005 som viste en figur (se figur 1.3) med de mest dominerende gruppene av bakterier og arker i marint miljø. I masteroppgaven min har jeg valgt å beskrive noen av disse gruppene som vises i figuren.



Figur 1.3: Dette er et fylogenetisk tre som viser hovedgrenene av fyla innenfor domenet Bacteria og domenet Archaea basert på sammenlikning av 16S ribosomalt RNA sekvenser. De av gruppene som er mest vanlige i sjøvann er merket med svarte bokstaver. Grupper som er påvist i den fotiske sonen er merket med gule bokstaver, grupper som er påvist i kystnære økosystem er merket med grønne bokstaver, mens grupper som er påvist i mesopelagiske og overflatevann gjennom polare vintre er merket med blå bokstaver. Figuren er hentet fra artikkelen av Giovannoni og Sting (2005).

1.4.1. γ -Proteobakterier.

Tradisjonelt sett ble alle gamma-proteobakterier som ikke passet inn i noen annen gruppe plassert innenfor slekten *Alteromonas*. Den bestod av en rekke gram-negative, aerobe, kjemoorganotrofe marine bakterier med en enkel polar flagell. Siden den gang har gruppen blitt delt inn i flere ulike fylogenetiske grener i tillegg til den originale *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Shewanella* og *Glaciecola*. I tillegg danner slektene *Oceanospirillum* og *Marinobacter* separate fylogenetiske grener. Nyere studier basert på 16S rRNA gensekvenser har vist at mange av de nye karakteriserte artene ofte grupperer seg fylogenetisk adskilt fra tidligere karakteriserte og klassifiserte arter innenfor γ -Proteobacteria. Disse studiene kan bety at det er stor diversitet innenfor denne gruppen. *Oceanospirillum* er en gruppe bakterier som har blitt skilt fra andre grupper på grunn av deres morfologi. Gruppen *Oceanospirillum* tilhører de aerobe bakteriene og har en spiralform (dette har derimot vist seg å være en vanlig struktur hos de fleste marine bakterier). Denne gruppen har blitt delt inn i flere retninger av γ -Proteobakterier. En familie som består av

kjente marine bakterier som slektene *Vibrio* og *Photobacterium* er familien *Vibrionaceae* (Baumann et al., 1984; Giovannoni og Rappé, 2000). *Vibrionaceae* har evnen til både å vokse aerobt og i fravær av oksygen ved hjelp av fermenteringsmetabolismer. Denne frittlevende heterotrofe organismen ble sett på som en viktig gruppe innen marint miljø og ble antatt å dominere blant heterotrofe bakterieplankton. Denne påstanden skyldtes at familien *Vibrionaceae* var enkelt å dyrke og dannet lett kolonier på agarskåler. Det er dermed sannsynlig at betydningen av Vibrioer i marint miljø er blitt overestimert. Familien *Vibrionaceae* har også vist seg å danne søstergrener til enterobakterier som også er fakultativ anaerob. Slekten *Shewanella* er en gram-negative, fakultativ anaerob, bevegelig og stavformet bakteriecelle som ofte har blitt isolert fra overflatesjøvann der det er østers, makroalger, sjøis og sedimenter. De dominerer blant barofile isolater (Nogi et al., 1998), er allsidig i næringsveien og kan utnytte en rekke forbindelser. Denne gruppen er nært beslektet med slektene *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia*, familien *Vibrionaceae*, *Escherichia coli* og andre (Giovannoni og Rappé, 2000).

I 2000 ble det påvist sekvenser fra Sargassohavet som ikke lot seg plassere fylogenetisk. Disse sekvensene dannet i stede grupper atskilt fra tidligere klassifiserte organismer, og ble derfor betegnet SAR med påfølgende nummerkode. SAR86 er en gruppe innenfor underklassen γ -Proteobakterier som har fått sitt navn etter de første sekvenserte klonene fra Stillehavet, Atlanterhavet og Sargassohavet. Denne bakterien danner en egen gren innenfor γ -Proteobacteria og viser mindre enn 90 % sekvenslikhet med andre dyrkede og karakteriserte bakterier. Sekvenser fra SAR86 har også vist seg å dominere i marine klonbibliotek, men har tiltross for dette ikke vært dyrket i laboratoriet fram til dags dato. Det er derfor lite man vet om dens morfologi, struktur og fysiologi. I SAR86-gruppen finnes det representanter fra Type I metanotrofe bakterier (*Methylophaga*), autotrofe og fakultativ svovel-oksiderende kjemolitotrofe bakterier, og den fotosyntetisk, svovel-oksiderende slekten *Chromatium* (Fuhrman og Davis, 1997; Giovannoni og Rappé, 2000).

1.4.2. α -Proteobakterier.

Molekylærbiologiske metoder viser at underklassen α -Proteobacteria er mer vanlig i marine miljø enn γ -Proteobakteriene, og da spesielt ved og over maksimumsdybden for klorofyll. Av mikroorganismer som vi hittil har klart å dyrke, er det to ulike fylogenetiske sammenhengende slekter innenfor α -Proteobakteriene hvor vi har flest dyrkede bakterier. De to slektene er *Roseobacter* og *Sphingomonas*. *Roseobacter* er marine kjemoorganotrofe bakterier som har fått navnet etter den første slekten karakterisert. *Roseobacter denitrificans* og *R. litoralis*, isolert fra

overflaten av marine makrofyttiske alger, tilhører gruppen av fototrofiske α -Proteobakterier som produserer bakterioklorofyll *a* under anaerobe forhold, men som ikke bruker sollys til autotrof vekst. Denne slekten inkluderer også *Erythrobacter* (marine), *Erythromicrobium* (ferskvann), *Porphyrobacter* (ferskvann), *Acidiphilum* (ferskvann), og *Roseococcus* (ferskvann). Isolerte *Roseobacter* har ulike metabolismer, men har tilfelles at de kan utnytte organiske og uorganiske svovelforbindelser (Gonzalez et al., 1999). Slekten *Sphingomonas* har lenge blitt oppfattet som synonymt med sykdomsfremkallende organismer med påfølgende infeksjon. Disse organismene er aerobe, noen bevegelige, gram-negative staver, har gule pigmenter og en enkel polar flagell. Denne gruppen er nært beslektet med *Porphyrobacter*, *Erythrobacter*, og *Erythromicrobium* (Giovannoni og Rappé, 2000). Det har også blitt funnet Type II metanotrofe bakterier innenfor α -Proteo- underklassen som inkluderer slektene *Methylosinus* og *Methylocystis*.

SAR11 er en vibrio-formet α -proteobakterie med et volum på $0,01 \mu\text{m}^3$. Den har mindre enn 82 % sekvenslikhet med andre dyrkede heterotrofe α -Proteobakterier. Bakterien ble første gang påvist ved sekvensering av DNA-fragmenter høstet fra Sargassohavet (Rappé et al., 2002), og fikk derav navnet SAR11. Sekvenser fra SAR11 dukker tilstedighet opp i klonbibliotek basert på marine prokaryote plankton, og har blitt oppdaget i alt fra kystnære strøk til dyp ned mot 3000 meter. Den har også blitt påvist i anaerobe marine sedimenter og ferskvannsinnsjøer. Siden oppdagelsen av denne bakteriegruppen i sjøvannsprøver fra Sargassohavet, har denne grenen utviklet seg mer og mer innenfor underklassen α -Proteobakterier. Det kan dermed være stor sannsynlighet for at SAR11 er den mest vanlige mikroorganismen i sjøvann (Giovannoni og Rappé, 2000; Rappé et al., 2002).

SAR116 er en annen gruppe innenfor α -Proteobakteriene. Denne gruppen ser ut til å dominere i havoverflaten og kystnære miljø. SAR116 grenen består av flere veldefinerte undergrupper som skiller seg fra hverandre med 10 % sekvens divergens ved nesten fullstendige 16S rRNA gener. I denne gruppen finnes det til nå ingen dyrkede arter, og mye gjenstår i karakterisering av arten (Giovannoni og Rappé, 2000).

1.4.3. Bacteroidetes.

Bacteroidetes består av organismer som er morfologisk og fenotypisk ulike. De fleste marine isolatene av *Bacteroidetes* er strengt aerobe eller fakultativt anaerobe og kjemoorganotrofe som ofte har en glidende bevegelse. De utgjør viktige komponenter i det marine økosystemet på grunn av deres evne til å nedbryte biomakromolekyler som chitin, agar, DNA og cellulose (Reichenbach, 1992). I nyere tider har det blitt isolert og sekvensert *Bacteroidetes* med tilknytning til "marint snø", makro- og mikroalger, molluskmantelen, og noen har også blitt funnet frittlevende i sjøvann. Mange

sekvenser hentet fra marine miljø plasserer seg innenfor familien *Flavobacteriaceae* beskrevet av Bernardet et al i 1996 (Giovannoni og Rappé, 2000). Det er også slekter av psykrofile og psykrotolerante bakterier innenfor klassen *Bacteroidetes*. Her kan man nevne slektene *Polaribacter* og *Psychroflexus* (Madigan et al., 2003).

1.4.4. Planctomycetales.

Planctomycetales danner en av hovedgrenene i Bakteriedomenet, og skiller seg fra andre bakterier ved at den mangler peptidoglykan i celleveggen. Den har i tillegg uvanlig kort 5S rRNA og et unik 16S rRNA gen (Fuerst, 1995). Marine organismer innenfor denne gruppen fordeler seg mellom slektene *Planctomyces* og *Pirellula*. *Planctomyces* er en bakterie som danner stilker, knopper, og rosetter av aggregerende celler. Den vokser seint og krever lave konsentrasjoner av løselig organisk materiale. De fleste karakteriserte marine arter er kjemoorganotrofe, obligat aerob, og noen fakultativ anaerob. *Planctomyces* er i de fleste tilfeller funnet festet til partikler i marin snø (DeLong et al., 1993). *Pirellula* mangler stilken, men formerer seg ved hjelp av knoppdannelse og danner aggregater av celler. Denne bakterien er ikke like godt studert som *Planctomyces* (Giovannoni og Rappé, 2000).

1.4.5. Cyanobakterier.

Cyanobakterier er encellede og tilhører oksygenisk fotoautotrofe prokaryoter. I sjøvann er det i hovedsak slektene *Synechococcus* og *Prochlorococcus* som dominerer. Disse er nært beslektet og danner en felles fylogenetisk gren kalt marint picophytoplankton. Denne bakterien har levd i havet siden opprinnelsen til oksygenisk fotosyntese, og er en viktig bidragsyter til produksjon av oksygen. De fleste marine cyanobakterier, inkludert *Synechococcus*, har klorofyll *a* og phykobilisomer, mens *Prochlorococcus* har divinyl klorofyll *a* og *b* (Giovannoni og Rappé, 2000).

1.4.6. Gram-positive Bakterioplankton: Marine Actinobakterier.

Klassen *Actinobacteria* er stavformede til filamentøse gram-positive bakterier som stort sett lever aerobt. *Actinobacteria* har høyt GC-innhold og er en klasse som består av mange dyrkede marine bakterier. Marine actinobakterier påvises til stadighet i prøver hentet fra marint miljø, men ikke i like store mengder som andre udyrkede grupper (eksempel SAR11). Data hentet fra marint miljø viser også flest sekvenser funnet i den fotiske sonen, og ingen foreløpig i området under den fotiske sonen (Giovannoni og Rappé, 2000; Madigan et al., 2003).

1.4.7. Marine Archaea.

Marine Arker har blitt funnet i ulike planktonsamfunn og deler seg inn i to divisjoner. Archaea gruppe I er relatert til *Crenarchaeota* og består av en rekke typer arker (Massana et al., 1997) som dominerer på dyp hvor det er lave temperaturer. Archaea gruppe II har felles opprinnelse med *Euryarchaeota* og består av metanogene, ekstremt halofile, noen termofile og mesofile organismer fra bentiske marine mikrobielle samfunn. Denne gruppen dominerer i vannoverflaten (Giovannoni og Rappé, 2000).

1.5 Molekylær biologi.

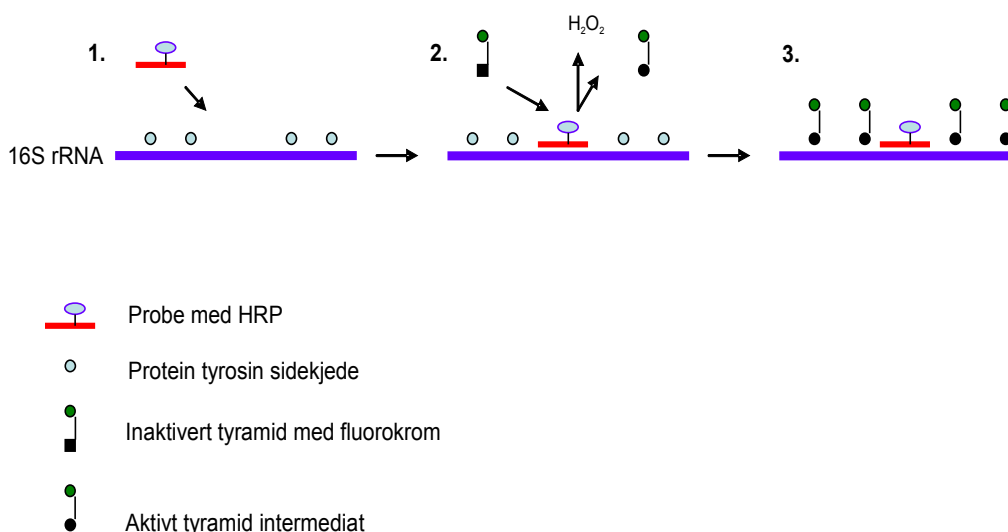
Til å studere årtidsvariasjoner hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden har jeg benyttet ulike molekylærbiologiske metoder. Disse metodene har jeg valgt å gi en kort presentasjon av i kapitlene som følger.

1.5.1 CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization).

Fluorescence *In Situ* hybridisering (FISH) er betegnelsen på metoden som går ut på at en spesifikk probe merket med et fluorescerende fargestoff (fluorokrom) hybridiseres med sin komplementære DNA/RNA tråd i en fiksert celle og dermed avgir et fluorescerende signal. Dette signalet gjør at cellen kan sees i et epifluorescens mikroskop. FISH-metoden har imidlertid vist seg å være vanskelig å bruke på små og langsomt voksende akvatiske bakterier (Morita, R. Y., 1997). Flere forskjellige strategier har derfor blitt forsøkt benyttet for å øke signalintensiteten. Det har blant annet blitt forsøkt med sterkere fluorokrom (Alfreider et al., 1996; Glöckner et al., 1996), bilde forsterket videomikroskopi (Eilers et al., 2000), kloramfenikol behandling for å øke rRNA innholdet i en voksende celle (Overney et al., 1997), hybridisering med flere fluorescens merkede prober (Lebaron et al., 1997; Lee et al., 1993), hjelper oligonukleotid prober (Fuchs et al., 2000; Glöckner et al., 2000), multiplisering av merkede polyribonukleotid prober (DeLong et al., 1999; Karner et al., 2001; Pernthaler et al., 2002), og signal amplifisering med reporter enzymer (Lebaron et al., 1997; Schönhuber et al., 1997).

Et eksempel på en metode hvor signalamplifisering med reporter enzym blir benyttet er CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition and Fluorescence *In Situ* Hybridization) også kalt for tyramid signal amplifisering (TSA). Denne type signal amplifisering med reporter enzymer (punkt 1. i figur

1.4) ble introdusert for immunoblotting og immunosorbent assay ved hjelp av pepperrot peroksidase (HRP, HorseRadish Peroxidase) og merkede tyraminer. CARD er basert på avsetting av store mengder merkede tyramin molekyler ved peroksidase aktivitet (Bobrow et al., 1989). Ved høye mengder av tyramin kan HRP katalysere en dimerisering (punkt 2. i figur 1.4) av denne fenol forbindelsen og danne frie radikaler (Zaitsu et al., 1980; Pernthaler et al., 2002). Ved å tilsette tyraminer i små mengder, som ved signal amplifisering, vil dannelsen av frie radikaler være liten, og det svært reaktive intermediet vil i stedet binde seg til elektronrike blandinger av proteiner, som tyrosin, i nærheten av bindingssetet for peroksidasen (punkt 3. i figur 1.4). Ved å bruke fluorokrommerkede tyramider, vil flere fluorescerende molekyler bindes til hybridiseringssetet *in situ*, og da øke sensitiviteten (Pernthaler et al., 2002). CARD-FISH har vist seg å øke intensiteten av hybridiserte celler 20 ganger i forhold til vanlig FISH med monomerkede fluorescerende prober (Schönhuber et al., 1997). Denne metoden har derfor gjort det mulig å detektere og visualisere pelagiske bakterier som er små eller som har lavt ribosomalinnhold (Pernthaler et al., 2002; Sekar et al., 2003; Sekar et al., 2004).



Figur 1.4: Denne figuren viser hvordan Pepperrot peroksidasen (HRP) ved hjelp av hydrogenperoksid (H_2O_2) gjør om inaktivert tyramid med fluorokrom til svært reaktivt oksidert intermediat som fester seg til tyrosin sidekjerder i nærheten av proben. Det skjer ved at oligonukleotide proben, med Pepperrot peroksidase festet til seg, (punkt 1) binder seg til målsekvensen på 16S rRNA. For at probe-merkede celler skal kunne detekteres under mikroskopet blir det tilsatt inaktivert fluorescens merket tyramid og hydrogenperoksid (H_2O_2) til løsningen. Pepperrot peroksidasen (punkt 2) bruker så hydrogenperoksiden til å aktivere tyramider med fluorokrom. Det fluorescerende tyramidet (punkt 3) vil deretter binde seg til sidekjerder av proteinet tyrosin, som finnes rundt målsekvensen, og gjøre området fluorescerende (Ness et al., 2003).

1.5.2 DNA isolering.

DNA brukt for analyse og manipulering krever vanligvis, til en viss grad, et isolert og rensert DNA. Det er også viktig at metoden man benytter til isolering av DNA er mest mulig skånsom slik at DNA ikke blir fragmentert. I dag finnes det mange metoder for å isolere DNA fra celler. Noen av disse metodene er fenol-kloroform ekstrahering av DNA (Palmiter, 1974), isolering av DNA med silikapartikler (Boom et al., 1990) og isolering av DNA ved CTAB-metoden (Jones og Walker, 1963).

I mange DNA isoleringsteknikker blir celleveggene nedbrutt enzymatisk (f.eks. lysozymbehandling av bakterieceller) og cellemembranen gjort løselig med en ionisk detergent (eks. SDS). Samtidig destabiliserer EDTA celleveggen ved å danne komplekser med divalente kationer (Mg^{2+} - og Ca^{2+} -ioner). Kompleksdannelsen hemmer også nedbrytningen av DNA ved DNaser. Etter at DNA har blitt frigitt i fra cellene, kan RNA fjernes ved å tilsette varmebehandlede Rnaser (eks. Proteinase K). En fenol/kloroform blanding blir deretter brukt for å denaturere proteiner uten å denaturere DNA. Ved hjelp av sentrifugering blir DNA og denaturerte proteiner adskilt yttereliggende. Sentrifugeringen produserer en nedre, organisk fase (kloroform), separert fra den øvre, vannfasen (fenol) med DNA, ved en interfase bestående av denaturerende proteiner. Vannfasen blir overført til et nytt rør, DNA vasket med 70% iskald etanol og DNA utfelt med en alkohol (eks. Isopropanol). Etter sentrifugering blir DNA gjort løselig med en buffer som inneholder EDTA for å unngå DNaser. Bufferløsningen med DNA kan deretter lagres ved 4°C i minst en måned (Wilson og Walker, 2001).

Hos enkelte celler (eks. noen gram-negative bakterier) kan det være vanskelig å isolere DNA som følger av at cellene produserer exopolysakkarider. Hexadecyltrimetylammonium bromid (CTAB) metoden (Jones og Walker, 1963) benytter en kationisk detergent (CTAB) til å felle ut exopolysakkarider og proteiner ved høy ionestyrke, og feller ut DNA ved lav ionestyrke (<0.7M NaCl). CTAB/polysakkarid/protein komplekser fjernes ved ekstraksjon med kloroform og fenol. Deretter kan genomisk DNA fra supernatant felles ut med isopropanol eller etanol (Jones og Walker, 1963).

1.5.3 PCR (Polymerase kjedereaksjon).

PCR står for Polymerase kjedereaksjon, og revolusjonerte forskermiljøene da den ble presentert for første gang av Kary Mullis i 1985. Den gjorde det mulig for forskere til å kunne studere cellulære og molekylære prosesser i organismer på en helt annen måte enn tidligere. Ved hjelp av spesifikke oligonukleotide sekvenser, kalt primere, ble det mulig å oppformere for dermed å identifisere og analysere spesifikke områder av DNA molekylet. PCR baserer seg på DNA replikasjon som skjer naturlig i en celle, og som krever enkeltrådet DNA for at DNA polymerasen skal kunne starte replikasjonen. I PCR maskinen blir enkeltrådet DNA dannet ved å varme opp dobbeltrådede DNA nær kokepunktet ($>90^{\circ}\text{C}$) slik at tråden denatureres. Temperaturen blir deretter senket til mellom 40 og 60°C slik at oligonukleotide primere, som er komplementær til sekvensområdet man er interessert i, kan binde seg til DNA-templatet. Templat-bundet oligonukleotide primere med en fri 3'-OH gruppe vil så fungere som bindepunktet for DNA polymerasen. DNA syntesen starter ved at temperaturen blir hevet til 72°C og den varmestabile DNA polymerasen (ofte Taq DNA polymerase som er isolert fra archaea-bakterien *Thermus aquaticus* (taq)) blir aktivert. DNA polymerasen forlenger deretter DNA-tråden ved hjelp av frie nukleotidebaser (dNTP: ATP, dTTP, dCTP og dGTP). Det gjør at man får produsert en ny DNA-tråd som igjen kan brukes til templat for å produsere flere DNA-tråder. Under PCR er det derfor vanlig å repetere denaturering, primerbinding og forlenging av DNA-templat 20-30 ganger (sykluser) for å produsere mange kopier av samme DNA-tråd (Walker, 2000).

1.5.4 Denaturant Gradient Gel Elektroforese (DGGE).

I 1993 tok Müyzer et al. (1993) for første gang i bruk DGGE til analysering av genetisk diversitet i komplekse mikrobielle populasjoner. Det ble da mulig å studere flere prøver samtidig, og dermed gjøre det lettere å se variasjoner i diversitet over tid. Denaturerende Gradient-Gelelektroforese (DGGE) blir brukt til å studere den genetiske diversiteten innenfor et mikrobielt samfunn og til å oppdage ulike organismer som dominerer innenfor et slikt samfunn. Denne teknikken blir ofte brukt i kombinasjon med PCR. PCR-DGGE kan også bli brukt til å identifisere individuelle populasjoner ved hjelp av hybridiserings analyser og prober, eller ved sekvensering av individuelle bånd. Det har også blitt brukt til å måle variasjoner av bakteriepopulasjoner. PCR-DGGE har blitt benyttet til å studere ulike samfunn innenfor jord (Øvreås et al., 1998), sedimenter (Dahllöf og Karle, 2004), meromiktisk sjø (Øvreås et al., 1997), vannkolonne (Gaidos et al., 2004) og hydrotermale vents (Postec et al., 2005).

Separering i DGGE er basert på den elektroporetiske bevegeligheten til et delvis smeltet DNA

molekyl i polyacrylamidgeler med en lineært økende gradient av denaturerende stoffer (en blanding av formamid og urea). Smeltingen av DNA-fragmenter forekommer i så kalte smeltemener, som er strekk av basepar med identisk smeltetemperatur. Der smeltepunktet for smeltemenerene i dobbeltrådet-DNA tilsvarer denatureringskonsentrasjonen i en gitt posisjon i DGGE gelen, vil det forekomme en transisjon av DNA-trådens heliske form til en delvis smeltet form, og DNA-trådens vandring i gelen vil opphøre. Sekvensvariasjoner innenfor slike domene vil føre til ulik smeltetemperatur for ulike domener. Sekvensvarianter av et bestemt fragment vil derfor stoppe vandringen ved ulike posisjoner i den denaturerende gradienten og kan dermed separeres ved DGGE (Muyzer et al., 1993).

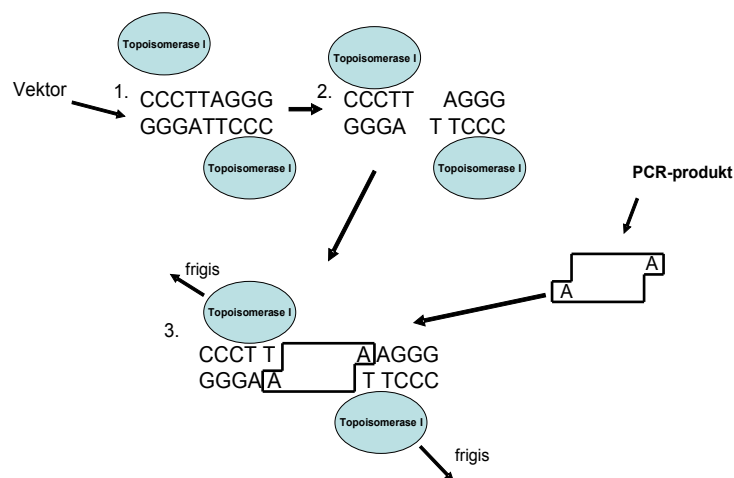
Ved å koble på en 40-nukleotide GC-rik sekvens til 5'-enden på DNA-tråden er det mulig å detektere opp til 100 % av sekvensvariasjonene. Den 40-nukleotide GC-rike sekvensen vil holde de denaturerte DNA-fragmentene sammen. Det vil da dannes en gaffelstruktur som stopper fragmentets vandring, og man vil få veldefinerte bånd. Den GC-rike sekvensen vil også sørge for at DNA-fragmentene foreligger som dobbeltrådet DNA slik at DNA-fragmentene kan reamplifiseres og sekvenseres.

1.5.5 Kloning.

En prosess som tar en samling av DNA-fragmenter og bruker levende celler til å rens og lage mange eksakte replika av individuelle fragmenter blir kalt for molekylær kloning. Molekylær kloning består av to hovedtrinn. I det første trinnet blir DNA fragmenter, med en spesifikk størrelse, satt inn i en spesialisert kromosom-liknende bærer kalt en vektor, som sørger for transport, replikering, og rensing av individuelle DNA fragment. I det neste trinnet transporterer vektorene individuelle fragmenter inn i levende celler, og hvor det blir laget kopier av vektorer i tillegg til det innsatte DNA fragmentet de bærer. Ettersom alle kopiene er identiske, blir de replikerte fragmentene kalt for DNA kloner. Disse DNA klonene kan bli rens for direkte studier eller lagret som samlinger av kloner til seinere studier. Dette kalles da et klonbibliotek (Hartwell et al., 2000).

I denne oppgaven har jeg klonet PCR-produkter ved hjelp av TOPO TA kloningskit (Invitrogen). Ved å benytte TOPO TA kloningskit kan man sette inn et PCR-produkt direkte inn i en plasmidvektor uten bruk av ligase, post-PCR prosedyrer eller PCR primere med spesifikke sekvenser. Dette skyldes at plasmidvektoren (pCR[®]2.1-TOPO[®]) har en Topoisomerase I kovalent bundet til vektoren (punkt 1. i figur 1.5). Topoisomerase I (isolert fra Vaccinia virus) binder seg til den dobbeltrådet DNA-sekvensen ved et spesifikt sete og kutter fosfatdiester ryggraden etter 5'-CCCTT på den ene tråden (punkt 2. i figur 1.5) (Shuman, 1991). PCR produktet med en

deoksyadenosin (A)3'overheng (Taq polymerase har en ikke templat-avhengig terminal transferase aktivitet som setter på deoksyadenosin til 3'enden av PCR produktet under PCR) kan dermed liggeres til vektoren med tymidin(T) 3'-overhenget (punkt 3. i figur 1.5). Dermed kan plasmidet taes opp av en kjemisk kompetent TOP10 *E.coli* celle ved en prosess kalt for transformasjon (Trun og Trempey, 2004)(Invitrogen manual). Transformasjon blir definert som en bakteries evne til å ta opp fritt DNA fra ytre omgivelser. Denne evnen finnes naturlig hos såkalte kompetente celler (*Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella*, etc.), mens andre kan få tilegnet denne egenskapen kunstig ved hjelp av kjemisk behandling eller elektroporering. Kjemisk kan dette gjøres ved å utsette cellene for et divalent eller multivalent kation som CaCl_2 og MnCl_2 . Denne behandlingen må da skje kaldt (0°C) etterfulgt av varmesjokk behandling (42°C) for at DNA-molekylet skal kunne vandre igjennom celledmembranen (Trun og Trempey, 2004).



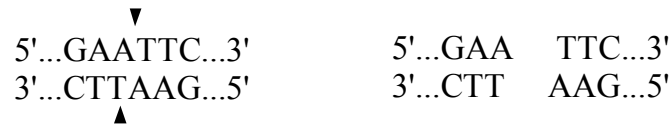
Figur 1.5: En figur som viser hvordan enzymet Topoisomerase I binder seg til vektoren ved et spesifikt sete (1.) og kutter etter 5'-CCCTT på den ene tråden (2.). PCR-produktet med (A)3'overheng blir ligert inn i vektoren og Topoisomerase I frigis fra vektoren (3.).

1.5.6 Restriksjonsenzym.

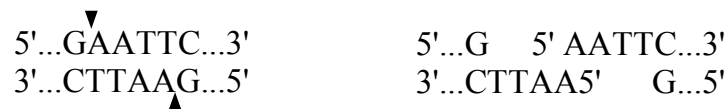
I bakterier finnes et eget forsvarssystem for å beskytte og skille cellens eget DNA fra fremmed DNA som entrer cellens cytoplasma. Når fremmed DNA entrer cellen vil restriksjonsenzym (også kalt restriksjonsendonukleaser) gjenkjenne korte spesifikke (ofte palindrome) DNA sekvenser, og kløyve begge DNA trådene ved å katalysere brudd av fosfordiesterbindinger. Dette kan resultere i tre ulike typer kutt. Den ene typen gir såkalte "blunt ends" (punkt 1. i figur 1.6) som etterlater seg ender som er kuttet rettover. Den andre kuttingen er "sticky ends with 5' overhang" (punkt 2. i figur 1.6) som er kuttet i sikk-sakk mønster slik at man får lengre ender i 5' enden. Den siste kuttingen er "sticky ends with 3'overhang" (punkt 3. i figur 1.6) som kutter sikk-sakk mønster med lengre 3'ender. Restriksjonskuttingen skjer symmetrisk og normalt palindromisk. De fleste

restriksjonsnukleaser gjenkjenner en DNA sekvens på mellom 4-8bp, og hvor modifiseringen og restriksjonskuttingen skjer symmetrisk på begge trådene i nærheten av restriksjonssetet (www.promega.com ; Trun og Trempy, 2004). Noen eksempler på restriksjonsenzymkuttinger:

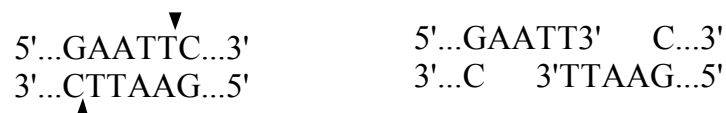
1. **Blunt ends:**



2. **Sticky ends with 5' overhang:**



3. **Sticky ends with 3'overhang:**



Figur 1.6: Denne figuren viser de ulike restriksjonskuttingene som ulike restriksjonsendonukleaser kan utføre på en DNA sekvens (Weaver, Hedrick, 1997).

1.5.7 Direkte PCR sekvensering.

DNA sekvensering er en metode hvor man kan bestemme baserekkefølgen i en DNA sekvens. Sanger, Maxam og Gilbert bidro alle til å lette arbeidsmengden for sekvensering av DNA da Sanger innførte en enzymatisk metode (Sanger et al., 1977), og Maxam og Gilbert en kjemisk nedbrytningsmetode (Maxam og Gilbert, 1977) for DNA sekvensering (Sambrook og Russell, 2001). I dag baserer sekvenseringsmetodene seg på prinsippet om DNA sekvensering med Sanger-Coulson dideoksynukleotidtermineringsmetoden. Dideoksynukleotidtermineringsmetoden (Sanger et al., 1977) baserer seg på at man tilsetter dideoksynukleosid trifosfat byggesteiner (dATP, dCTP, dTTP og dGTP) og DNA polymeraser for DNA syntese til reaksjonsblandingen. I tillegg tilsettes det fire dideoksynukleosid trifosfater (ddNTP, ddATP, ddTTP, ddCTP og ddGTP) som mangler 3'OH-grupper for videre DNA syntese (DNA syntesen vil dermed termineres ved innsetting av slike nukleosider). Hver av dideoksynukleosidene har festet på seg et fargestoff (ddTTP=rød, ddCTP=blå, ddATP=grønn, og ddGTP=sort) som fluoriserer ved en bestemt bølglengde, og som

gjør det mulig å skille de ulike dideoksynukleosidene. En blanding bestående av vanlig dideoksynukleosider og terminerende fluorescerende dideoksynukleosider vil dermed føre til at det blir produsert DNA sekvenser av ulike lengder og med en fluorescerende dideoksynukleosid på sekvensenden. Ved å benytte kapillær gelelektroforese med elektrisk strøm kan man analysere resultatet av sekvenseringen og deretter bestemme baserekkefølgen i DNA sekvensen. Mindre DNA sekvenser vil vandre raskere enn større DNA sekvenser i kapillær gelelektroforesen. I bunnen av gelen vil en laserstråle påvise de fluorescerende basene i det de passerer, og signalene overføres til en datamaskin. Denne maskinen vil da behandle resultatene og bestemme baserekkefølgen i DNA sekvensen (Trun, N. og J. Trempy, 2004).

1.6 Bioinformatikk.

Resultatene fra kloning og DGGE genererte mye sekvensinformasjon som måtte analyseres og behandles ved hjelp av bioinformatikk. Jeg har derfor valgt å gi en kort presentasjon av programmene jeg har benyttet meg av i masteroppgaven.

1.6.1 NCBI BLAST.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) databasen er i hovedsak bygget opp for å analysere proteiner. I BLAST kan man finne korte treff mellom to sekvenser og starter en sammenstilling fra disse sekvensene. I tillegg gir BLAST statistisk informasjon for å hjelpe og forstå den biologiske betydningen av sammenstillingen. I BLAST kan man blant annet søke innen nukleotider, proteiner og genomer. BLAST server er tilgjengelig gratis hos "The National Center for Biotechnology Information (NCBI)" og hjemmesiden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (McGinnis et al., 2004).

1.6.2 Ribosomal Database Project II – Chimera Detection.

Sekvenser som er sammensatt av to sekvenser (chimera) kan identifiseres ved å bruke programmet chimera detection fra databasen Ribosomal Database Project II. Chimera Detection-programmet leser sekvensfilen og tegner et histogram på bakgrunn av sekvensen. Histogrammets fasong gir en indikasjon på om sekvensen er en chimera. RDP er en database som er oppbygd spesielt for RNA analyser, men inneholder færre sekvenser enn Blast. RDP-II databasen er fritt tilgjengelig på websiden (<http://rdp.cme.msu.edu>).

1.6.3 BCM Search Launcher- Sequence Utilies.

Sequences Utilies-programmet fra databasen “BCM Search Launcher” er et program hvor man kan reversere og komplementere nukleinsyre sekvenser for deretter å kunne lagre dem i fasta-format. “BCM Search Launcher” er et integrert sett av World Wide Web (WWW) sider som organiserer molekylær biologisk-relaterte søk og analysemuligheter på en web side. Databasen er fritt tilgjengelig på websiden: (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>).

1.6.4 BIOEDIT.

Bioedit er en biologisk sekvenseditor som kan kjøres i Windows 95/98/NT/2000/xp, og som gir basisfunksjoner for protein- og nukleinsyre editering, sammenstilling, manipulering og analyse. I Bioedit kan man også lese og skrive GenBank, Fasta, Phylip og NBRF/PIR filer samt importerer/eksporterer flere andre format med Don Gilbert's ReadSeq. Programmet er også godt egnet til å behandle store sammenstillinger (>2000 sekvenser). Bioedit er tilgjengelig gratis på nettet (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

1.6.5 Clustal W og X.

Clustal W versjon 1.4 (Thompson et al., 1994) er et program som er laget for å utføre multipl sekvenssammenstilling av biologiske sekvenser. Sekvenssammenstillingen av mange sekvenser skjer automatisk og med en profilbasert relatert sammenstillingsprosedyre. Programmet kan også sammenstille sekvensene 1000 ganger (bootstrap) for deretter å velge den sammenstillingen som inntreffer flest ganger.

Clustal X versjon 1.83 (Thompson et al., 1997) er en versjon av Clustal W med et brukervennlig grafisk vindu. Programmet er laget for at brukeren lett skal kunne velge funksjoner ved hjelp av menyer. I Clustal X kan man utføre multipl sammenstillinger, se resultatet av sammenstillingen og utføre en forbedring av sammenstillingen. Det er også mulig å konstruere ulike trær av sammenstillingen, som bootstrap NJ-tre (neighbor). Bootstrap-programmet konstruerer 1000 ulike trær hvor det så bestemmer sannsynligheten for at et cluster opptrer hver gang på samme sted i et fylogenetisk tre. Denne sannsynligheten vises i form av bootstrapverdier hvor verdier over 75 % indikerer forgrening med stor sikkerhet.

1.6.6 PHYLIP.

Phylip (Phylogeny Interence Package) består av en pakke med programmer som kan brukes til å konstruere et fylogenetisk tre ut fra biologiske data. Pakken er gratis og har blitt brukt av over 15000 registrerte brukere siden 1980. Denne pakken kan lastes ned fra web siden:

<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>

I Phylip kan man blant anslå avstander mellom trær, tegne trær, behandle på ny datasett fra bootstrapping, editere trær og anslå avstandsmatriser. Det kan også behandle data som er nukleotid sekvenser, protein sekvenser, gen sekvenser, restriksjonssete, restriksjonsfragmenter, avstander, diskrete karaterer, og kontinuerlige karakterer.

Det ble brukt følgende programmer i PHYLIP-pakken til å konstruere fylogenetiske trær:

• DNADIST.

DNADIST, skrevet av Joseph Felsenstein (University of Washington), er et program som bruker nukleotidsekvenser for å beregne en avstandsmatrise. Programmet lager da en avstandsmatrise på bakgrunn av fire ulike modeller av nukleotid substitusjon. En av disse fire modellene brukt for nukleotid substitusjon er Jukes and Cantor (1969). Jukes and Cantor sin modell antar at det er uavhengige forandringer på alle steder med lik sannsynlighet. Om baseforandringen er uavhengig av dens identitet og når den forandres, er det lik sannsynlighet for å ende opp med en av de andre basene. Sannsynligheten for at to sekvenser vil være ulike ved et spesielt sted er gitt ved ligningen:

$$p = \frac{3}{4} (1 - e^{-4/3 u t})$$

u = Produktet av substitusjonsraten per enhet tid.

dt = Lengden av tidsintervallet.

p = Sannsynligheten for at to sekvenser vil være ulike ved et spesielt sted.

Dersom vi observerer p kan vi estimere grenlengden ut ved å invertere ligningen øverst til:

$$ut = -\frac{3}{4} \log_e (1 - 4/3 p)$$

Hver avstand kalkulert fra de to artene er et estimat for divergenstiden mellom de to artene. For Jukes – Cantor modellen blir estimatene beregnet ut fra formel ut vist øverst så lenge nukleotid symbolene i de to sekvensene er enten A, C, G, T, U, N, X, ?, eller – (de fire siste symboliserer en delesjon eller ukjent nukleotid).

Avstanden for hvert par av arter estimerer den totale grenlengden mellom to arter, og kan brukes i

avstandsmatriseprogrammene FITCH, KITCH og NEIGHBOR. Programmet leser inn nukleotidsekvenser og skriver ut en outfile med avstandsmatrisen, eller en tabell over likheter mellom sekvenser.

• **NEIGHBOR.**

Dette programmet er et redskap for blant annet Neighbor-Joining metoden fra Saitou og Nei (1986). Programmet er skrevet av Mary Kuhner og Jon Yamato og er et program som egner seg til å konstruere fylogenetiske trær ut fra store datamengder og for bootstrapping. NJ-metoden (Neighbor-Joining) konstruerer trær ved å finne par av operasjonelle taksonomiske enheter eller naboer som minimerer den totale grenlengden i hvert steg av nabogruppingen på bakgrunn av en avstandsmatrise.

• **DRAWGRAM.**

DRAWGRAM er et program som plotter cladogram- eller fenogram-liknende forgrenede tredigram med mange muligheter for orientering av trær og grener, design av tre, bokstavstørrelse og vinkler, tre dybde, margin størrelse, stamme lengde og plassering av knuter på treet. Ved å forhåndsviser plotet på datamaskinen kan man effektivt justere detaljene på treet til slik man vil ha det.

1.6.7 TREEVIEW.

TREEVIEW er et program for visualisering og utskrift av fylogenetiske trær. Dette programmet kan lastes ned gratis fra nettet ved å gå inn på <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. Det kan lese NEXUS trefiler (produsert av PAUP og COMPONENT), og PHYLIP style trefiler (produsert av fastDNAml og CLUSTAL W). Programmet er også tilgjengelig for Apple Macintosh og Microsoft Windows PC-er (Page, 1996).

2. Materialer og metoder.

Tillaging av buffere og løsninger er beskrevet i appendiks C.

2.1 Høsting av prøver.

Totalt 28 prøver ble høstet fra 5 meters dyp i Raunefjorden (60°16.2'N/05°12.5'E) i perioden 28. januar til 26. november 2003. Prøvene ble transportert tilbake til laboratoriet og prosessert umiddelbart. 1/5 – 1 liter sjøvann ble først filtrert på 2 µm hvite polykarbonatfiltre (OSMONICS INC.) for å fjerne store eukaryote alger for så å høste mindre organismer på 0,2µm hvite polykarbonatfiltre (OSMONICS INC.). Filtrene ble deretter plassert i hvert sitt sterile eppendorfrør og lagret i - 40°C frys fram til DNA isolering.

Sjøvannsprøvene fra Raunefjorden ble farget med det fluorescerende stoffet 4'6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) etter prosedyren beskrevet av Porter og Feig (1980). 50ml sjøvann ble fiksert i 2 % formalin. 2 og 5 ml av det fikserte sjøvannet ble filtrert direkte på hvert sitt 0,2 mm anodisc filter (Whatman, England). Deretter ble filtrene farget etter prosedyren beskrevet av Porter og Feig (1980). Overskuddsfarge av DAPI ble fjernet ved filtrering, filtrene vasket med 5 ml 1xPBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 5,4mM Na₂PO₄ * 7 H₂O, 1,8mM KH₂PO₄ og pH 7,3), og deretter montert på objektglass med immersjonsolje. Bakterier tilstede i sjøvannsprøvene ble telt ved hjelp av et Zeiss epifluorescens mikroskop (Zeiss Axioplan epifluorescensmikroskop med 100x objektiv) som hadde et måleokular med rutenett og en filterpakke for DAPI (Zeiss 01). Det ble brukt et oljeimmersjonsobjektiv med 100x forstørring og 10x okular. For hvert filter ble det valgt 100 vilkårlige små ruter og telt antall bakterier. Det totale bakterieantallet i hver sjøvannsprøve ble telt og kalkulert som antall bakterier per ml sjøvann etter formelen beskrevet under. Rutenettarealet ble beregnet til å være 0,0144mm².

$$\text{Bakterier. pr ml} = \frac{\text{Bakterier/rute} * \text{Filterareal mm}^2}{\text{ruteareal mm}^2} * \text{fortynning}$$

ml filtrert

2.2 CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization).

For å bestemme forholdet mellom arker og bakterier i prøvene høstet fra Raunefjorden, ble det utført CARD-FISH etter metoden beskrevet av Pernthaler et al. (2002).

2.2.1 Tillaging av prøber.

Til telling av bakterier ble det benyttet en EUB338-probe og til arker en ARC915-probe. For å kunne utføre CARD måtte probene merkes med pepperotperoksidase (HRP) fra Thermo Hybaid (ThermoBioSciences GmbH, Ulm, Tyskland). Til negativ kontroll ble det brukt en NON388-oligonukleotid probe med pepperotperoksidase (HRP) som var antisens til EUBAC338 (se tabell 2.1).

Tabell 2.1: CARD-FISH-prober brukt i masteroppgaven.

Prober:	Probesevens (5'→3'):	Referanser:
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann et al., 1990)
ARC915	GTCTCCCCCGCCAATTCCT	(Stahl og Amann, 1991)
NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	(Wallner et al., 1993)

Oligonukleotidekonsentrasjonen ble beregnet, som beskrevet av Morita (1997). Dette ble utført ved å måle fotospektrometrisk absorbanse ved 260nm og 404nm for hver av oligonukleotideprobene. Den målte absorbansen ble deretter korrigert etter formelen beskrevet under for å unngå å få med verdien for enzymet (HRP).

$$A_{260nm} = A_{260nm}(\text{målt}) - A_{404nm} * 0,276 \text{ (korrigeringsfaktor)}$$

Den korrigerte absorbansen ble så omgjort til probekonsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$), ettersom absorbanse ved 260nm målt til 1,0 er tilnærmet lik $20\mu\text{g/ml}$ DNA (Morita,1997). Probekonsentrasjonen ble beregnet etter formelen beskrevet under.

$$\text{Mengde DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260nm} * \text{fortynningsfaktor} * 20 \mu\text{g/ml}$$

2.2.2. Fiksering og filtrering.

Sjøvann høstet utenfor Espegrend ble filtrert på hvite $2,0 \mu\text{m}$ polykarbonat filtre (OSMONICS INC.,

Ø= 4.9cm). Deretter ble 33 ml av dette vannet overført til et sterilt 50 ml falconrør, tilsatt 7 ml 6 % Paraformaldehydløsning (pH 7,6) slik at paraformaldehydkonsentrasjonen utgjorde 1 %, og cellene fiksert mørkt i en time ved RT. De fikserte cellene ble så filtrert på 0,22 µm polykarbonat filtre (OSMONICS INC., Ø= 25cm) under moderat vannsug, før filtrene ble vasket to ganger med 10 ml sterilt MilliQ vann (partikkelfritt). Etterpå ble filtrene lufttørket, plassert i en steril petriskål med parafilm, og lagret ved -20 °C til videre analyser.

2.2.3 Innleiring.

Hvert av filtrene med fikserte celler fra sjøvann ble innleiret i en 0,1 % lavsmeltepunktsgarosegel for å hindre tap av celler gjennom permeabiliseringen. Dette ble gjort ved at en lavsmeltepunktsgarosegel ((gelstyrken må være tilnærmet 1000g/cm²) 0,1 % [w/v] MetaPhor[®]agarose(MBA) i 20 ml MilliQvann) ble laget og overført til en steril petriskål for avkjøling. Da agarosegelen hadde en temperatur mellom 37 – 40°C, ble filtrene dyppet i agarosen, deretter lagt på tørkepapir for å fjerne overflødig agarose, og så lagt på et sterilt objektglass. Den siden som skulle studeres under mikroskopet ble da lagt slik at den vendte ned mot objektglasset. Etter at filteret hadde tørket litt ble det fjernet fra objektglasset ved å skylle med litt etanol (80-96 %), overført til en steril petriskål med parafilm, og lagret ved -20°C til videre analyser.

2.2.4 Inaktivering av endogene peroksidaser.

Filtre innleiret i agarose ble inkubert i 50 ml 0,01 M HCl i 10 min ved RT. Dette ble gjort for å unngå at de fikserte bakteriecellenes peroksidaser avsatte merkede tyramin molekyler og dermed ville gi falske positive celler. Deretter ble filtrene vasket i 50 ml 1xPBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5,4 mM Na₂PO₄ * 7 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,6) og så 2 ganger i 50 ml sterilt MQ vann.

2.2.5 Permeabilisering.

For at probene skulle kunne vandre gjennom bakteriecellemembranen ble bakteriene gjort gjennomtrengelige ved å inkubere filtrene med celler i nylaget lysozym løsning (0,1M TrisHCl, 0,05M EDTA, 10 mg/ ml Lysozym og pH 8,0) i 1 time ved 37 °C. Filtre ble så vasket to ganger i 50 ml sd MQ vann før de ble vasket til slutt med 50 ml absolutt etanol. Filtre kunne nå lufttørkes og lagres ved -20°C til videre analyser.

2.2.6 Hybridisering.

I et sterilt eppendorfrør på 2 ml ble 2 -3 filterseksjoner med celler plassert sammen med en hybridiseringsløsning (0,9M NaCl, 20 mM TrisHCl, 0,02 % [wt/vol] SDS, MilliQ vann, 1x blocking reagent (Boehringer, Mannheim, Tyskland), 55 % Formamid [vol/vol] (Fluka) og 10 % Dextran sulfat [wt/vol]) bestående av 3 µl probe (HRP merket EUBAC338-, ARC915- eller NON388-oligonukleotid probe) og 900 µl hybridiseringsbuffer. Hybridiseringsbufferen og probene hadde et forhold på 300:1. Deretter ble rørene med hybridiseringsbuffer og prober inkubert under risting (ca. 200 rpm) i 2 timer ved 35 °C. I 50 ml forvarmet vaskebuffer (5 mM EDTA(pH8,0), 20 mM TrisHCl (pH8,0), 10 mM NaCl, MQ vann, 0,01 % [wt/vol] SDS) ble filtrene vasket i 5 min ved 37 °C. Det var her viktig at man gikk videre til neste steg for å unngå at filtrene tørket.

2.2.7 Signal amplifisering av fluorescerende tyramider.

Filtrene ble inkubert i 50 ml PBST (0,01 % TritonX-100, 1xPBS, pH 7,6) i 15 min ved RT. Overflødig vann ble fjernet fra filtrene ved å legge de på et filterpapir uten å la filtrene tørke ut. Filtrene ble så overført til et nytt eppendorfrør med amplifiseringsløsning (1xPBS (pH 7,6), 0,1 Blocking reagent og 2M NaCl) tilsatt 2 µl fluorescensmerket tyramid (1 mg/ml). Etterpå ble eppendorfrørene med filtre inkubert mørkt under risting (ca. 200rpm) ved 37 °C i 10-15 minutter. På nytt ble overflødig vann fjernet og filtrene overført til et nytt eppendorfrør hvor de ble vasket i 5- 15 min i 50 ml PBST mørkt ved RT. Deretter ble de først vasket i 50 ml sd MQ vann og så 50 ml absolutt etanol. Til slutt ble filtrene lufttørket før de ble lagret ved - 20 °C, eller farget med DAPI.

DAPI-farging ble utført ved at filteret ble plassert på et objektglass, dekket med 50 µl DAPI-løsning (1 µg/ ml) og farget mørkt ved RT i 3 min. DAPI-farge som ikke hadde bundet seg til DNA ble vasket av med 80 % etanol og så sd MQ vann. Deretter ble alle filtrene innleiret i Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK) og studert ved å benytte et epifluorescence mikroskop (Zeiss Axioplan epifluorescensmikroskop med 100x objektiv og filterpakke for DAPI (Zeiss 01) og Cy3 (Chroma HQ 41007; Chroma Tech)). Det ble beregnet antall arker og bakterier som beskrevet under høsting av prøver.

2.3 DNA isolering.

CTAB-metoden som jeg har benyttet til isolering av DNA fra filtrert sjøvann ble utført som beskrevet av Ausubel et al (1992). Det ble også tilført et ekstra trinn med lysozymbehandling av bakteriecellevegger for å være sikker på å få med DNA fra gram-positive bakterier. Dette ble gjort ved at et eppendorfrør som inneholdt 0,2 μ m polykarbonatfilter med filtrert sjøvann ble tilsatt en fersk 250 μ l lysozymløsning bestående av lysozym (1 mg/ml TE) og TE-buffer (10 mM Tris*Cl, 1 mM EDTA, og pH 7,4). Deretter fortsatte DNA isoleringen som beskrevet av Ausubel et al.(1992). Resultatet etter DNA isolering ble visualisert ved agarosegelelektroforese og etidiumbromidfarging. Det ble da brukt en 0,7 % agarosegel (SeaKem[®]LE) i 30 ml 1xTAE buffer og 1 μ l etidiumbromid (10 mg/ml). Til hver av brønnene ble det tilsatt 5 μ l isolert DNA og 1 μ l loadingbuffer (6x). Lambda DNA/EcoRI (MBI Fermentas) ble brukt som standardmarkør.

Agarosegelelektroforesen ble kjørt ved 200V i et elektroforesekar (Submarine agarosegel unit HE Hoefler) i 20 minutter. Deretter ble gelen visualisert og fotografert under UV-lys (Syngene Chemigenius, BioImagine system og GeneSnap program).

2.4 Polymerase kjede reaksjon (PCR).

Det ble benyttet PCR for å oppformere 16S rDNA for videre analyser. Til de forskjellige applikasjonene ble det benyttet forskjellige primerkombinasjoner (se tabell 2.2).

Table 2.2: En oversikt over primer benyttet i oppgaven.

Primer	Primersekvens	Målsekvans	Referanse
1055f	5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'	16S	(Ferris et al., 1996)
1392-GC*	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'	16S	(Ferris et al., 1996)
8f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	16S	(Lane, 1991)
23SOR	5'-TGCCAAGGCATCCACCGT-3'	23S	(Acinas et al., 1999)
M13f	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Vektor	(TOPO TA Cloning [®] Kits manual, 2002)
M13r	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Vektor	(TOPO TA Cloning [®] Kits manual, 2002)

*5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCCGCC-3'

2.5 PCR -DGGE.

Isolert DNA fra de 28 sjøvannsprøvene ble brukt som templat i en PCR med primerkombinasjon 1055f/1392-GC (Ferris et al., 1996). Forward primeren bandt seg til posisjon 1055 på 16S (posisjon 1055-1070 hos *E.coli*) og revers primeren 1392, med GC-rikt område festet til primer, bandt seg til posisjon 1392 på 16S (posisjon 1392 – 1402 hos *E.coli*). Dette resulterte i et fragment på ca. 340 basepar. PCR-reaksjonen ble satt opp som vist i tabell 2.3.

Table 2.3: Standardoppsett for PCR.

Løsninger:	Tilsatt mengde per rør (μ l):	Konsentrasjoner i hvert PCR-rør:
Sterilt vann	Justert til 50	
10xbuffer	5	1x
dNTP (10mM)	4	0,8mM
Forward-primer (100 μ M)	0,25	0,5 μ M
Revers-primer (100 μ M)	0,25	0,5 μ M
DyNAzyme II (2.0U/ μ l)	0,5	100U
Templat	5	1-10 ng

Polymerase kjede reaksjonen ble utført i en PCR system 9700 maskin (Perkin Elmer, N. J., USA) ved å benytte følgende program: 5 minutter denaturering ved 94°C, 30 sykluser av denaturering ved 94°C i 30 sekunder, primerbinding ved 50°C i 30 sekunder og DNA syntese ved 72°C i 1 minutt. Den siste DNA syntesen ble utført ved 72°C i 7 minutter.

For å bekrefte rett amplifisering av PCR-produktene ble resultatet analysert ved agarosegelelektroforese. En fraksjon (5 μ l) av PCR amplifiseringen ble analysert på en 1,5 % (w/v) agarosegel i tris-acetate-EDTA (TAE buffer) buffer tilsatt etidiumbromid. Markøren 100basepar DNA Ladder Plus fra MBI Fermentas ble brukt som standard. Agarosegelelektroforesen ble kjørt ved 200V i 12 minutter og visualisert under UV-lys.

2.5.1 Denaturerende gradient-gelelektroforese (DGGE).

DGGE ble utført i et Hoefer Scientific SE600 vertical dual-cooler system og etter metoden beskrevet av Øvreås et al. (1997). PCR-produktene på ca. 330 bp, produsert ved PCR amplifisering, ble separert ved å benytte en lineær gradient av urea og formamid under DGGE. En blanding av 10 μ l PCR-produkt og 2 μ l loading buffer ble tilsatt en 8% [wt/vol] polyacrylamid gel i 0,5xTAE buffer (20mM Tris, 10mM acetat, 0,5mM Na₂EDTA, pH 7,4). I oppgaven ble det brukt forskjellige konsentrasjoner av urea og formamid, og som varierte fra 30-75 % denaturant. Elektroforesen ble kjørt i 10 min ved 20 V (Electrophoresis Power Supply ST606T, GIBCOBRL), for å samle prøvene i brønnene, for så å bli kjørt ved 70 V i 18 timer.

Etter kjøring ble gelen farget mørkt i 1 time med 10 ml SybrGoldfargeløsning (Molecular Probes). Deretter ble gelen rensert med destillert vann og fotografert under UV-lys (Syngene Chemigenius, BioImagine system og GeneSnap program). DNA bånd av interesse ble stukket ut ved hjelp av en 1 ml steril pipettespiss og overført til et eppendorfrør med 20 μ l sd vann. Pluggene ble så satt i et kjøleskap over natten for passiv eluering og etterpå lagret ved -20° C frem til videre analyser.

Det ble seinere utført PCR reamplifisering av alle pluggene og ny DGGE for å forsikre seg om at alle pluggene var rene og kun bestod av ett bånd. PCR-produkt fra pluggen som inneholdt ett bånd ble tatt med videre til rensing og sekvensering.

2.5.2 Rensing av PCR-produkt.

PCR-produkt fra DGGE-bånd ble rensset ved hjelp av Sigma GenElute™ PCR Clean-Up KIT som beskrevet i protokoll fra Sigma.

2.5.3 Sekvensering av DGGE-fragmenter.

Sekvensreaksjon ble utført ved å benytte Big Dye versjon 2.1 og 3.1 (Applied Biosystems) i henhold til protokoll (se tabell 2.4).

Tabell 2.4: Sekvenseringsprotokoll.

Løsninger:	Big-Dye versjon 2.1 per reaksjon:	Big-Dye versjon 3.1 per reaksjon:
Sd H ₂ O	-	Juster til 10 µl
Big-Dye	2 µl	1 µl
Sekvenseringsbuffer	-	1 µl
DNA templat	200 ng	200 ng
Primer	0,8 pmol	3,2 pmol
Totalvolum:	5 µl	10 µl

Sekvenseringen ble utført i GeneAmp PCR system 9700 maskin (Perkin Elmer, N. J., USA) og PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) MJ-RESEARCH Gradient Cycler. Det ble da kjørt 35 sykluser med denaturering ved 96°C i 15 sekunder, primerbinding ved 50°C i 10 sekunder og DNA syntese ved 60°C i 2 minutter. Primer 1055forward ble benyttet til sekvensering.

Etter sekvensering ble volumet justert til 20 µl med sd H₂O og levert ned til Sekvenseringslaboratoriet på Høyteknologisenteret i Bergen for å bli analysert i ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, N.J., USA).

2.6 Kloning.

Det ble forsøkt ulike primerkombinasjoner for å finne det settet som gav best PCR-produkt for kloning og som dekket hele 16S rDNA, ITS (Intergenicspacer) og litt av 23S rDNA.

Jeg endte dermed opp med å bruke en forward primer som bandt seg til posisjon 8 på 16S (posisjon 8 til 27 hos *E.coli*)(Lane, 1991) og en revers primer som bandt seg til posisjon 23 på 23S (posisjon 23 til 38 hos *E.coli*)(Acinas et al., 1999). Dette gav da et lineært DNA-fragment på ca. 2000 basepar som dekket hele 16S, ITS og deler av 23S rDNA.

2.6.1 PCR temperaturgradient.

En PCR-temperaturgradient ble utført for å finne den optimale temperaturen hvor primerne 8 forward og 23 SOR bandt seg til DNA-templatet. Det ble tilsatt 1 % Bovine serum albumin (BSA) for å stabilisere polymerasen, i tillegg til standardløsninger (se tabell 2.3 under PCR-DGGE). Polymerasen som ble benyttet var Red Hot[®]DNA polymerase (5U/ µl) med tilhørende Red Hot buffer (10x) og MgCl₂ (2 mM) fra ABgene.

Det ble laget en 10 ganger fortynningsserie (10⁻¹-10⁻³ fortynning) av DNA-templatet og med fire paralleller. For å finne den optimale temperaturen for primerbinding til templatet ble hver av de fire parallellene gitt ulik primerbindingstemperatur. Den første parallellen fikk en primerbindingstemperatur på 55,2°C, andre ved 56,0°C, tredje ved 56,7°C, og fjerde ved 57,3°C. I tillegg ble *E.coli* brukt som positiv kontroll, arkebakterien *Metylococcus v.* som negativ kontroll, mens sterilt (sd) vann ble brukt som blank for å utelukke forurensing i PCR-oppsettet.

PCR reaksjonen ble utført i en PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) MJ-RESEARCH Gradient Cycler. Det ble da benyttet følgende program: Denaturering ved 94°C i 5 minutter, 30 sykluser av denaturering ved 94°C i 1 minutt, primerbinding ved mellom 55,2°C og 57,3°C i 30 sekunder og DNA syntese ved 72°C i 1 minutt. I den siste syklusen ble det utført DNA syntese ved 72°C i 7 minutter.

PCR-produktet ble kontrollert på en 1,5 % agarosegel tilsatt etidiumbromid, og gav en produktlengde på ca. 2000 bp.

PCR temperaturgradienten utført med primersettet 8 forward og 23 SOR viste gode produkt ved alle primerbindingstemperaturene. Jeg bestemte meg derfor for å bruke primerbindingstemperatur 56,0°C videre ved kloning, ettersom det da ville gi mindre uspesifikk binding uten å senke bakteriediversiteten for mye. Det ble bestemt å bruke samme oppsett som under PCR temperaturgradienten, og med en parallell bestående av ufortynnet DNA-templat, 10⁻¹ fortynnet DNA-templat, og 10⁻² fortynnet DNA-templat. *E.coli* ble benyttet som positiv kontroll, *Metylococcus v.* som negativ kontroll og sd vann som blank.

PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) MJ-RESEARCH Gradient Cycler ble brukt til PCR reaksjonen, og det ble benyttet samme program som beskrevet under PCR temperaturgradient.

PCR-produktet ble kontrollert på en 1,5 % agarosegel tilsatt etidiumbromid, og gav en produktlengde på ca. 2000 bp.

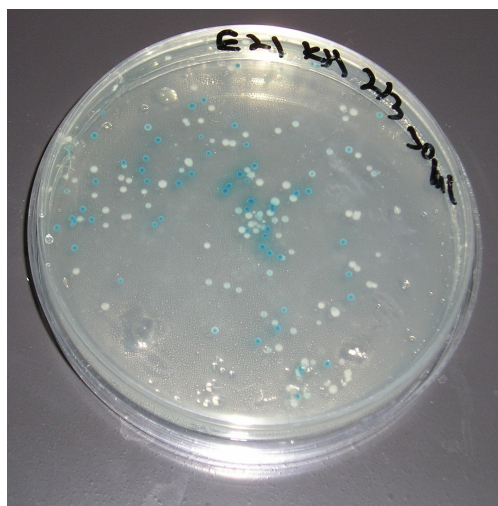
2.6.3 TOPO TA kloningsreaksjon.

Kloningsreaksjonen ble utført som beskrevet i manualen for TOPO TA Cloning[®] og med noen modifikasjoner. LA-skåler med ampicillin (50 µg/ml) ble hver tilsatt en blanding av 40 µl IPTG (100 mM), 40 µl X-GAL (40 mg/ml) og 20 µl sd vann. Skålene ble så forvarmet ved 37°C i 20 – 30 min. 2-3 µl ferskt PCR-produkt ble deretter ligert inn i plasmidet pCR[®]2.1-TOPO[®], og inkubert ved RT i 10 minutter.

Transformering av kjemisk kompetente TOP10 - *E.coli* bakterier (tabell 2.5) ble utført med noen modifikasjoner. Her ble 4 µl av TOPO TA kloningsreaksjonen transformert inn i TOP10-*E.coli* celler for å være sikker på at flest mulig *E.coli*-celler hadde tatt opp plasmid med insert. Deretter ble 10-150 µl av transformasjonen fordelt på hver sin LA-skål med ampicillin, og dyrket over natten ved 37° C. Dagen etter ble 100-200 lyseblå og hvite kolonier (figur 2.1) plukket ved hjelp av sterile tannpirkere for videre analyser.

Table 2.5: En oversikt over *E.coli* bakterie brukt til TOPO[®] TA kloning.

PCR [®] 2.1-TOPO TA Cloning [®] Kit	
Kjemisk kompetente TOP10- <i>E.coli</i> bakterier	<i>F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1 deoR araD139Δ</i> <i>(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>



Figur 2.1 Et bilde som viser blå og hvite kolonier fra prøve 21 etter transformering og dyrking.

2.6.3 Analysering av positive transformanter.

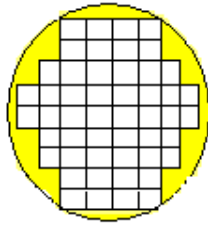
Lyseblå og hvite kolonier ble overført til hvert sitt PCR-rør med PCR-reaksjonsblanding (se tabell 2.3) og kontrollert for rett insert (2000bp) ved hjelp av PCR. Det ble brukt primere (M13 forward (205-221) og M13 revers(391-406)) som binder seg til vektoren og på den måten amplifiserer hele insertet (TOPO TA Cloning®Kits manual, 2002). De klonene som inneholdt rett insert gav et PCR-produkt på ca. 2190 bp. Litt cellemateriale fra en klon ble overført til en PCR-reaksjon ved hjelp av en steril tannpirker og reaksjonen kjørt på en PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) MJ-RESEARCH Gradient Cycler. Det ble da benyttet følgende program: initieringsdenaturering ved 94°C i 10 minutter, 30 sykluser av denaturering ved 94°C i 1 minutt, primerbinding ved 55°C i 1 minutt og DNA syntese ved 72°C i 1 minutt. I den siste syklusen ble det utført 10 minutter DNA syntese ved 72°C.

2.6.4 Rensing av PCR-produkt.

PCR-produkt fra transformanter med rett insert ble rensset ved å benytte GenElute™ PCR Clean-Up KIT(Sigma) i henhold til protokoll.

2.6.5 Lagring av klonede E.coli -celler.

Hver av klonene ble også overført med en steril tannpirker til ny LA-skål med ampicillin som hadde et nummerert rutenett (figur 2.2). Dette systemet ble benyttet for å isolere klonene og deretter kunne holde dem adskilt frem til lagring.



Figur 2.2 Denne figuren viser hvordan hvite og lyseblå kloner ble plukket og overført til hver sin rute på LA-skålen med Ampicillin. Dette ble gjort ved hjelp av en steril tannpirker.

Under kloningsprosessen ble klonede celler lagret ved 4 °C for en kort periode. For langtidslagring ble cellene dyrket opp i LB-medium tilsatt ampicillin ved 37°C over natten. Deretter ble de tilsatt sterilfiltrert glycerol til totalkonsentrasjon på 15 % og lagret ved -80 °C.

2.6.6 Restriksjonskuttingsanalyse av kloner.

For å unngå sekvensering av like kloner ble det utført restriksjonskutting på alle de rensede PCR produktene. Restriksjonsenzymet Hinf I (tabell 2.6), som gjenkjenner 4bp ble valgt til restriksjonskuttingsanalyse. Det ble utført ved at 9,3 µl sd H₂O, 2,0 µl RE10xbuffer, 0,2 µl Acetylated BSA (10 µg/ µl)(Promega) og 8 µl DNA-templat ble blandet og tilsatt 0,5 µl restriksjonsenzym Hinf I(10U/µl). Reaksjonsblandingen ble innkubert i 3 timer og 30 min ved 37 °C. Etter endt reaksjonstid ble blandingen inaktivert ved å tilsette 4 µl 6xloading buffer til hver av prøvene. EDTA som finnes i loadingbufferen vil da inaktivere restriksjonsenzymet Hinf I og stoppe reaksjonen.

Table 2.6: Restriksjonsenzym type II brukt ved restriksjonsanalyse.

Restriksjonsenzym:	Kuttsete:	Isolert fra:
Hinf I (Promega)	5'...G↓ANTC...3'	<i>Haemophilus influenzae</i>

Resultatet etter restriksjonsenzymkuttingen ble analysert ved agarosegelelektroforese. Her var det viktig å få en best mulig separasjon av små DNA fragmenter, og det ble dermed valgt en forholdsvis høy konsentrasjon og en spesiell type agarose. Det ble også valgt en lavere spenning under

elektroforesen. Restriksjonsenzymkuttingen av de første klonene ble analysert på en 2,5-3 % agarosegel (2,5-3 % agarose(SeaKem[®]LE) i 50 ml 1xTAE-buffer). Jeg aplikerte 12 µl av restriksjonskutting/loadingbuffer blandingen i brønnene og brukte 100bp+ som standard. Deretter ble gelen kjørt ved 70V i 1 time. For å unngå overoppheting av gelen under kjøring ble elektroforesekammeret pakket inn med kjøleelementer. Etter kjøring ble gelen farget mørkt i en time med 1 µl/10 ml Etidiumbromid (10 mg/ ml) og fotografert under UV-lys.

2.6.7 Sekvensering av kloner.

De klonene som hadde ulikt kuttemønster ble tatt med videre til sekvensering. De første klonene ble sekvensert med Big Dye-kit versjon 2.1, mens resten ble sekvensert med Big Dye-kit versjon 3.1. Sekvenseringen ble utført som beskrevet under punkt 2.5.3. PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) MJ-RESEARCH Gradient Cycler ble brukt til sekvensering.

2.7 Sekvensbehandling.

Nukleotidsekvenser fra kloner og DGGE-bånd ble sammenliknet med sekvenser i databasen GeneBank ved å bruke søkerverktøyet BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Chimere sekvenser ble identifisert ved å bruke programmet chimera detection fra databasen Ribosomal Database Project II. Nukleinsyresekvenser og deres referanseseqvenser ble sammenstilt 1000 ganger(bootstrap) med Clustal W multiple alignment som finnes integrert i Bioedit-pakken. Sekvensene ble deretter editert ved å korrigere for N-er og feil (ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer kan av og til sette inn N i stedet for baser ved en feil når den leser en sekvens). Helt til slutt ble endene til hver av sekvensene kuttet slik at hver sekvens bestod av lik lengde. Sammenstillingen av klonsekvenser og sammenstillingen av sekvenserte DGGE-bånd ble lagret som fasta-format for å kunne konstruere bootstrap NJ-tre i Clustal X. Det ble også laget en sammenstilling av alle sekvensene fra klonbibliotekene og sekvenserte DGGE-bånd. Sammenstillingen av alle sekvensene var for stor til å kunne visualiseres i Clustal X, og ble derfor lagret som Phylip4-format for å kunne konstruere et fylogenetisk tre ut fra programmer i PHYLIP-pakken. PHYLIP-pakken, som er beskrevet i innledningen, er et bra verktøy til å konstruere fylogenetiske trær ut fra store sammenstillinger.

2.8 Konstruering av fylogenetiske trær.

Sekvenser behandlet i Bioedit og lagret som fasta-format ble på ny sammenstilt i Clustal X 1.83 (Thompson, 1997) ved å utføre en multippel sammenstilling ved NJ (Neighbour Joining), hvor alle sekvensene ble sammenstilt samtidig. Etter sammenstillingen ble funksjonen "Bootstrap NJ-tree" benyttet. Det konstruerte bootstrap-treet ble visualisert i programmet Treeview og editert i Adobe Illustrator 10 (Boyce et al., 2002).

Det ble beregnet en avstandsmatrise av Bioedit-sammenstillingen av alle klonsekvensene og DGGE sekvensene lagret som PHYLIP4-format. Matrisen ble laget ved å lese inn nukleotidesevensene i programmet DNADIST som deretter beregnet avstandsmatrisen med Jukes and Cantor-metoden. Da avstandsmatrisen eller tabellen over likheter mellom sekvensene var beregnet ferdig, ble det skrevet ut som en outfile. Denne outfilen ble endret til infile for at avstandsmatriseprogrammet NEIGHBOR skulle kunne lese matrisen. I NEIGHBOR-programmet ble det konstruert et uforgrenet tre ved å estimere den totale grenlengden mellom to arter på bakgrunn av avstandsmatrisen. Det uforgrenede treet ble skrevet ut som outtree-fil og kunne visualiseres i Treeview ved å endre filnavnet til outtree.tre. For at det skulle bli tegnet et forgrenet tre av sekvensene ble outtree-filen endret til infile, filen lest inn i programmet DRAWGRAM, som etterpå plottet et forgrenet tre av det uforgrenede treet fra NEIGHBOR. Det fylogenetiske treet ble visualisert i Ghostscript og editert i Adobe Illustrator 10.

3. Resultater.

3.1 Fysiske, kjemiske og biotiske forhold i Raunefjorden.

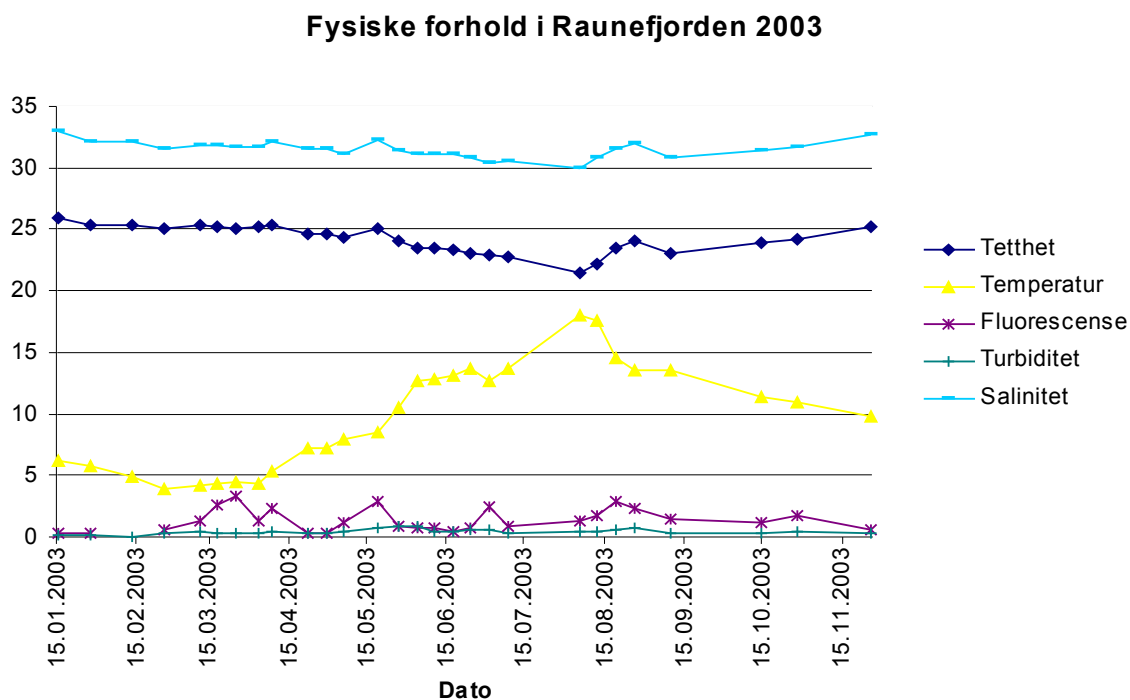
Det ble høstet 28 sjøvannsprøver fra 5 meters dyp av Raunefjorden i perioden 28.januar til 26.november 2003 (tabell 3.1).

Tabell 3.1 Denne tabellen viser når prøvene ble høstet fra Raunefjorden, og hvilket prøvenummer de har videre i oppgaven.

Prøvenr.	Dato for høsting.	Prøvenr.	Dato for høsting
1	28.01.2003	15	19.05.2003
2	13.02.2003	16	27.05.2003
3	19.02.2003	17	03.06.2003
4	25.02.2003	18	10.06.2003
5	04.03.2003	19	17.06.2003
6	11.03.2003	20	24.06.2003
7	18.03.2003	21	01.07.2003
8	25.03.2003	22	08.07.2003
9	03.04.2003	23	05.08.2003
10	08.04.2003	24	19.08.2003
11	22.04.2003	25	02.09.2003
12	29.04.2003	26	14.10.2003
13	06.05.2003	27	28.10.2003
14	13.05.2003	28	26.11.2003

Samtidig med at det ble høstet prøver for DNA analyse, ble det også utført fysiske/kjemiske analyser på sjøvann høstet fra Raunefjorden (figur 3.1). Dette ble utført av forskere ved den marine forskningsstasjonen på Espegrend. Her ble det målt temperatur (gul kurve), tetthet (mørkeblå kurve), turbiditet (grønn kurve), og salinitet (lyseblå kurve) i de enkelte sjøvannsprøvene. De fysiske/kjemiske forholdene i Raunefjorden 2003 i perioden 15.januar til 8.april viste en typisk vintersituasjon med kaldt saltholdig vann med moderat turbiditet (temperatur; 3,0-5,5 °C, salinitet 31-33 ‰, tetthet 25,0-25,9 ‰ og turbiditet 0,2-0,4 ‰). I perioden 22.april til 19.mai endret de fysiske/kjemiske forholdene seg ved at temperaturen i fjorden økte fra 5°C til 8°C. Samtidig ble det målt en økning i salinitet (31,0-32,3 ‰), tetthet (24-25 ‰) og turbiditet (0,4-0,7 ‰). I perioden 19.mai til 4.august fortsatte temperaturen å stige (8°C-18°C), mens en gradvis nedgang i salinitet (32,3 -30 ‰), tetthet (25-21,5 ‰) og turbiditet (0,7-0,5 ‰) ble målt. De fysiske forholdene endret seg igjen i Raunefjorden fra 4.august til 26.november ved at temperaturen (18-10°C) og turbiditeten (0,5-0,35 ‰) avtok, mens tettheten (21,5-24,5 ‰) og saliniteten (30-32 ‰) økte.

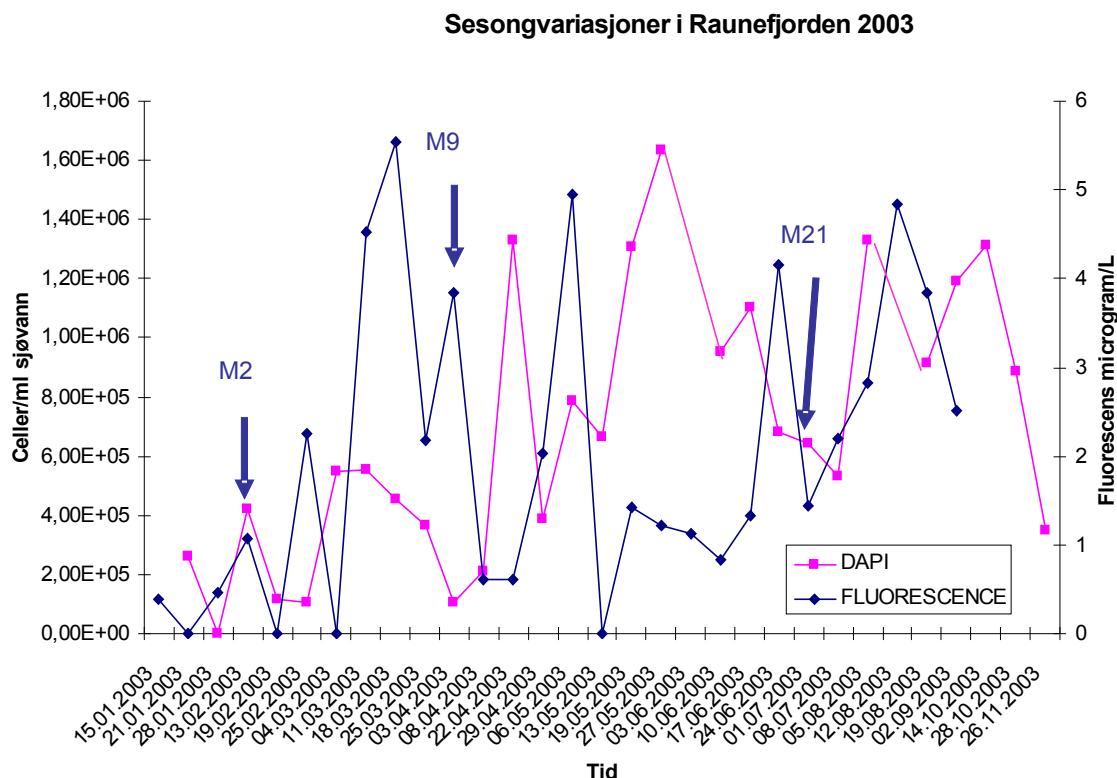
Det ble også målt mengde fluorescens i hver av prøvene. Fluorescens kan benyttes som et mål på mengde klorofyll som igjen kan gi en indikasjon på mengde alger til stede i miljøet. Mengde klorofyll ble beregnet ved å multiplisere fluorescens med en konverteringsfaktor på 1,4 (Jorun Egge, <http://www.bio.uib.no/Code/PersonligSide.php?pid=1007&lang=N>). Resultatet etter målingene viste små algeoppblomstringer i Raunefjorden i perioden 15.02-15.11.2003.



Figur 3.1 Denne figur viser tetthet (mørke blå kurve), temperatur (gul kurve), turbiditet (grønn kurve), salinitet (lyseblå kurve), og fluorescens (lilla kurve) målt i Raunefjorden 2003. Fluorescens er tatt med for å vise hvordan algemengden varierte i forhold til de fysiske forholdene i Raunefjorden.

Grafen for totalt antall bakterier mot mengde klorofyll ($\mu\text{g/l}$) viste en større algeoppblomstring i perioden 25. februar til 8.april 2003 (figur 3.2). Mengde klorofyll målt ved fluorescens viste en økning fra 2,26 til 5,54 μg klorofyll pr. liter sjøvann (18.mars), for deretter å minke til 0,612 μg klorofyll/liter. I perioden 22.april til 26.november 2003 var det en mindre algeoppblomstringer med et fluorescensmaksimum på mellom 4,15-4,95 μg klorofyll/liter. Totalt antall bakterier varierte mellom $1,07 \cdot 10^5$ til $5,53 \cdot 10^5$ celler/ml sjøvann under algeoppblomstringen i perioden 25.februar til 8.april 2003. I perioden 22.april til 8.juli 2003 ble algeoppblomstringen erstattet av en bakterieoppblomstring (figur 3.2). Antall bakterier økte da fra $2,08 \cdot 10^5$ celler/ml til $1,64 \cdot 10^6$ celler/ml (27.mai), for deretter å minke til $5,30 \cdot 10^5$ celler/ml sjøvann. Mengde klorofyll målt ved fluorescens utgjorde mellom 0,83-1,43 μg klorofyll per liter under bakterieoppblomstringen. Etter 8.juli ble bakterieoppblomstringen etterfulgt av flere små alge- og bakterieoppblomstringer. Her var

totalmengden av alger høy når totalmengden av bakterier var lav og motsatt (se figur 3.2).

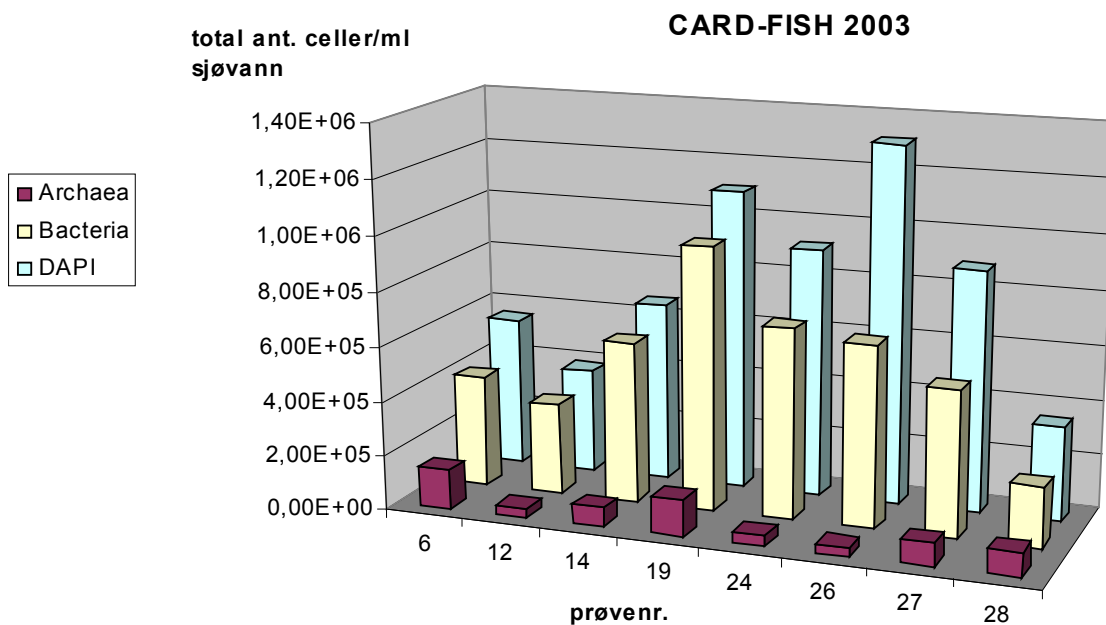


Figur 3.2 Denne kurven viser totalt antall bakterier (DAPI) mot mengde planteplankton (FLUORESCENCE) til stede i prøver høstet i perioden 28. januar til 26. november 2003. Pilene indikerer hvilke prøver det ble laget klonbibliotek av. Disse prøvene blir omtalt i detalj i kapittel 3.5.

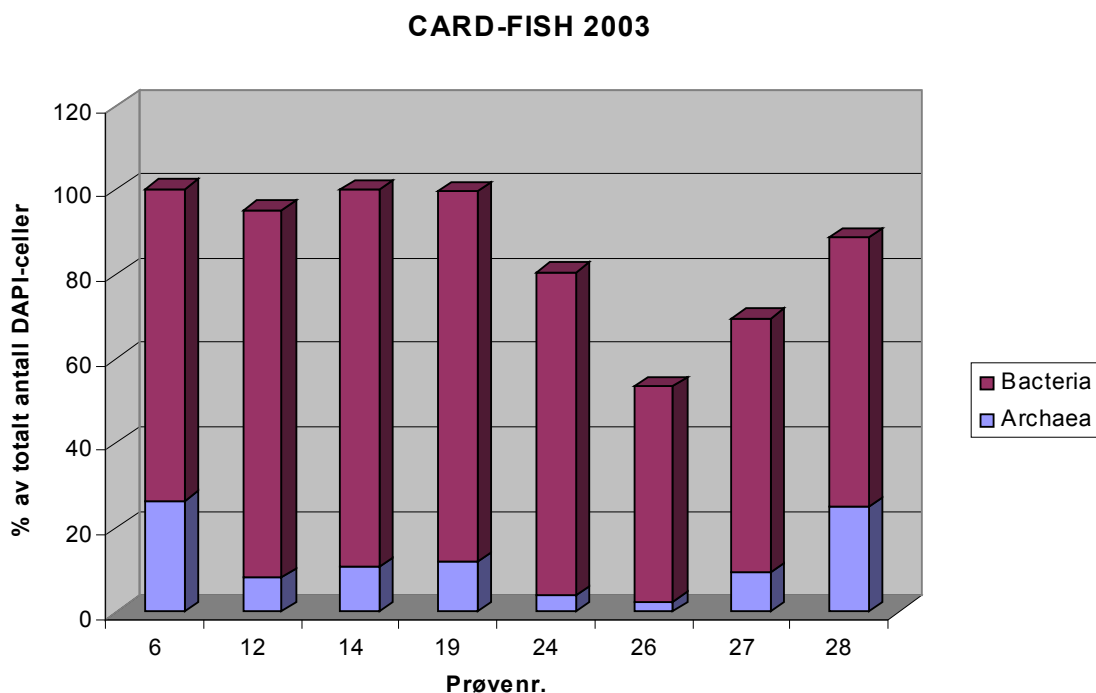
3.2 Bakteriesamfunnet og arkesamfunnet studert ved CARD-FISH.

Bakterier som hybridiserte med EUB338-proben viste en økning om sommeren ($4,09 \cdot 10^5$ til $9,66 \cdot 10^5$ celler/ml), som deretter avtok om høsten ($9,66 \cdot 10^5$ til $2,23 \cdot 10^5$ celler/ml) (figur 3.3). Mengde bakterier varierte mellom 50 % til 89 % av det totale bakterietallet telt ved DAPI, og hvor den største økningen var i prøve 12, 14 og 19 høstet henholdsvis 29.april, 13.mai og 17.juni 2003 (figur 3.4).

Analyser av arkesamfunnet som hybridiserte med ARC915-proben viste et høyere antall av arker i prøve 6 ($1,44 \cdot 10^5$ celler/ml), 19 ($1,32 \cdot 10^5$ celler/ml), 27 ($8,34 \cdot 10^5$ celler/ml) og 28 ($8,73 \cdot 10^4$ celler/ml) høstet henholdsvis 11. mars, 17.juni, 28.oktober og 26.november (figur 3.3). Resultatet etter hybridisering viste også at mengde arker varierte mellom 6 % til 26,9 % av totaltallet gitt ved DAPI (figur 3.4).



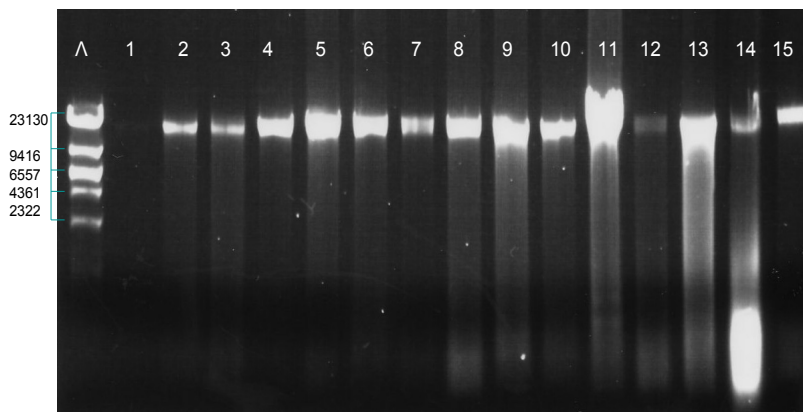
Figur 3.3 Et stolpediagram som viser forholdet mellom antall arker og antall bakterier i prøver høstet året 2003 fra Raunefjorden. Arker er visualisert med rød, bakterier med gul og totaltallet ved DAPI med blå.



Figur 3.4 Et stolpediagram som viser samfunnsstrukturen av bakterioplankton bestemt ved in situ hybridisering av rRNA-bindende fluorescerende oligonukleotidprober i Raunefjorden 2003. Resultatet i hver prøve er vist som prosent av antall DAPI-fargede celler. EUB338-proben ble brukt til å detektere bakterier (rød), mens ARC915-proben ble brukt til å detektere arker (blå).

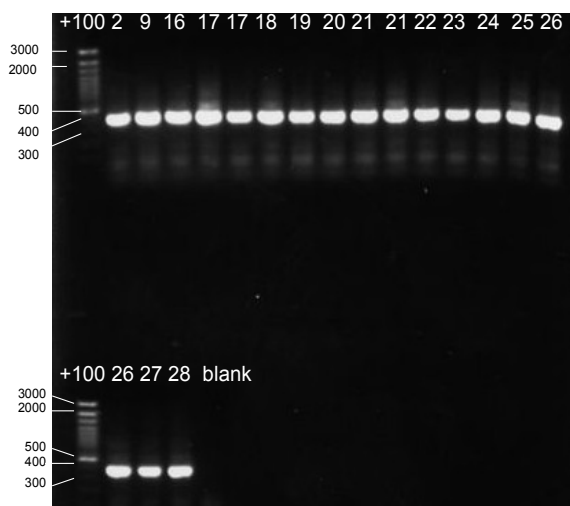
3.3 Molekylære analyser av sjøvannsprøvene.

Det ble isolert DNA fra alle de 28 filtrene (0,22µm) med sjøvann etter den modifiserte CTAB-metoden beskrevet under DNA isolering punkt 2.3. DNA isoleringen resulterte i et bånd som plasserte seg i samme posisjon på gelen som det største båndet til markøren (figur 3.5). Dette båndet representerer genomisk DNA. I prøve 14 kunne det også observeres et bånd helt nederst på gelen. Dette båndet representerer RNA. Prøver med RNA ble rensset på nytt for å være sikker på at det ikke skulle påvirke resultatet videre. Figur 3.5 viser resultatet etter DNA ekstrahering fra prøve 1 til 15.



Figur 3.5: Denne figurene viser resultatet etter DNA isolering fra prøve 1 til 15 analysert på en 0,7 % agarosegel. Lambda DNA/HindIII ble brukt som størrelsesmarkør.

Samtlige prøver ble amplifisert ved å benytte primersett 1055f/1392r-GC. Alle gav et sterkt amplifisert PCR-produkt som var ca. 340 bp stort. Dette ble bekreftet ved analysering av prøvene på en 1,5 % agarosegel (se figur 3.6).



Figur 3.6: Denne figuren viser resultatet etter analyse av PCR-produktene fra prøvene: 2, 9, 16-28 (merket 2,9,16-28 på gelen). +100= standardmarkør 100 baseparDNA Ladder Plus og blank = vann. Prøve 17 og 21 ble rensset to ganger og begge amplifisert ved PCR for å være sikker på at jeg hadde nok DNA til DGGE.

3.4.1 Samfunnsprofiler.

DGGE analysene viste en kompleks sammensetning av bakteriesamfunnet i alle prøvene (se figur 3.7 og 3.8). Det ble i gjennomsnitt påvist 17 bånd i alle de 28 prøvene etter fingerprint analysen (PCR-DGGE). I prøve 3 ble det påvist flest bånd (24), mens prøve 1 hadde færrest bånd (4). Prøve 1 og 3 ble begge høstet før algeoppblomstringen i løpet av vintermånedene januar og februar.

Tre av båndene ble påvist å være tilstede i alle sjøvannsprøvene, mens 21 bånd ble påvist å forekomme kun i noen av sjøvannsprøvene.

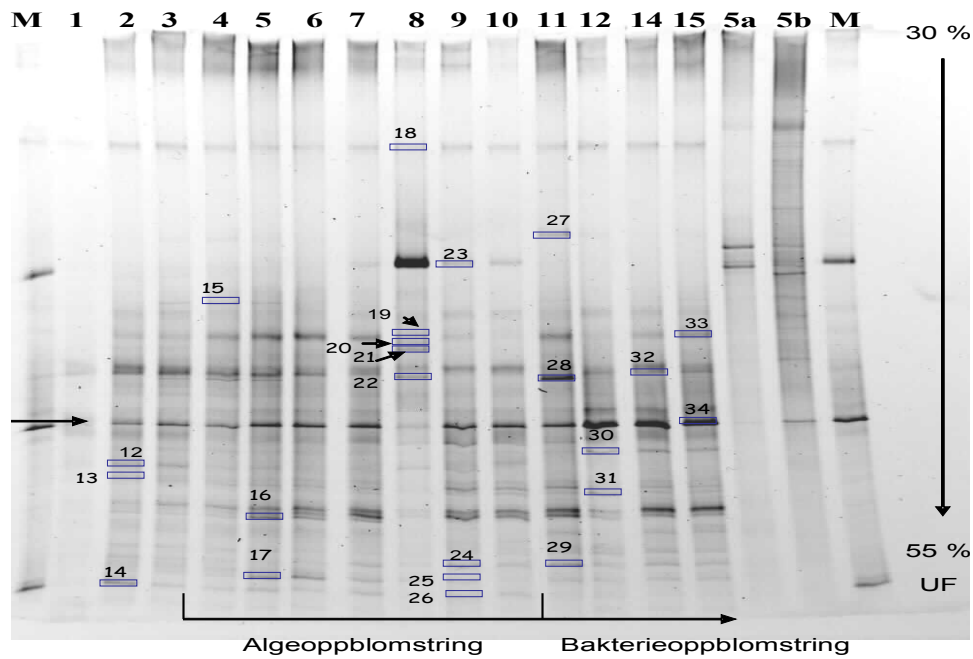
Ett av båndene utmerket seg ved at det dominerte i alle prøvene (tabell 3.2). Dette båndet er representert ved bånd 34 i gel 1 (figur 3.7) og bånd 14 i gel 2 (figur 3.8), og med en pil på bildene. Dette båndet viste en høyere intensitet i prøvene 12-22 som er høstet ved bakterieoppblomstringen. To bånd viste seg å være stabile i alle prøvene. Disse 2 båndene er representert ved bånd 18, 20 og 33 i gel 1 og i tabell 3.2. Tre av båndene, representert ved bånd 12, 13 og 15 i gel 1 og tabell 3.2, var tilstede i prøver høstet før og i begynnelsen av algeoppblomstringen. Bånd 12 og 13 var også tilstede i prøve 8 til 11 høstet i slutten av algeoppblomstringen. Ett bånd var kun tilstede i prøve 8. Dette båndet er representert med bånd 19 i gel 1 og i tabell 3.2.

Det ble også påvist 12 andre stabile bånd under algeoppblomstringen. Seks av disse båndene (figur 3.7; bånd 16, 21, 22, 23, 26, figur 3.8; 31 og tabell 3.2) var tilstede i prøve 5 til 11 høstet under algeoppblomstringen og frem til begynnelsen av bakterieoppblomstringen. Fire av de 12 båndene (tabell 3.2; figur 3.7; bånd 14, 24, 29 og 31) var tilstede i prøve 1 til 17 høstet i begynnelsen og frem til midten av bakterieoppblomstringen. De 2 siste båndene (bånd 17 og 25) ble påvist å være tilstede i prøve 5 til 23 høstet under alge- og bakterieoppblomstringen. Et bånd (28) ble kun påvist i sjøvannsprøve 11, mens et annet bånd (27) ble påvist i prøve 2 til 4 høstet i begynnelsen av algeoppblomstringen, og i prøve 11 høstet i slutten av algeoppblomstringen (figur 3.7 og tabell 3.2). Det var også 1 bånd som ble påvist i prøve 11 til 24 høstet fra begynnelsen av bakterieoppblomstringen og frem til midten av bakterieoppblomstringen. Dette båndet er representert ved bånd 30 i gel 1, bånd 20 i gel 2 og i tabellen (3.2). Ett bånd var tilstede i prøve 12 til 18, prøve 22 til 23 og prøve 26 til 28. Dette båndet er representert ved bånd 32 i gel 1, bånd 11 i gel 2 og tabell 3.2. I prøve 16 til 28 høstet under- og etter bakterieoppblomstringen ble det påvist 7 stabile bånd (se tabell 3.2). Tre av disse båndene (29, 24 og 18, figur 3.8) var tilstede i prøve 16 til 23, mens 1 bånd (bånd 5; figur 3.8) var tilstede i prøve 16 til 28 høstet under- og etter bakterieoppblomstringen. Bånd 6, 15 og 17 (figur 3.8) ble påvist i prøve 23 til 28 høstet etter bakterieoppblomstringen. Bånd 6 ble kun påvist i prøve 25 og 26.

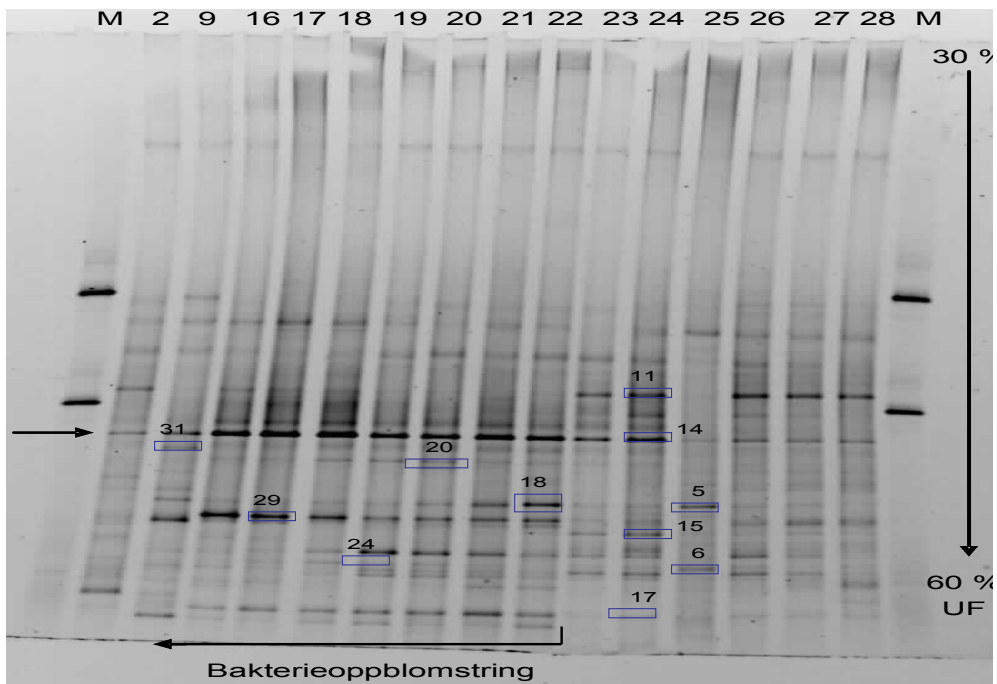
Tabell 3.2: Det ble stanset ut dominerende og unike bånd fra samfunnsprofilene. Denne tabellen viser i hvilke sjøvannsprøver (kolonne) de enkelte båndene (rad) ble påvist. Bånd 12-34 med normal skrifttype i høyre kolonne er stanset ut fra gel 1, mens bånd 31-5 med fet skrifttype er stanset ut fra gel 2. Sjøvannsprøve 4-10 er høstet under algeoppblomstringen, mens sjøvannsprøve 11-22 er høstet under bakterieoppblomstringen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Prøve nr.	
																												Bånd
																												12
																												13
																												14
																												15
																												16
																												17/25
																												18
																												19
																												20/33
																												21
																												22
																												23
																												24
																												26
																												27
																												28
																												29
																												30/20 *
																												31
																												32/11 *
																												34/14 *
																												31
																												29
																												24
																												18
																												17
																												15
																												6
																												5

* Bånd fra begge gelene som gav treff på samme sekvens i BLAST databasen GenBank.



Figur 3.7: DGGE analyse av 16S rDNA-fragmenter fra prøve 1-15. M= standard markør, 1-15 = prøvenummer og UF = urea og formamid. Det ble stukket ut bånd til reamplifisering og sekvensering. Disse er merket 13-34.



Figur 3.8: Denne figuren viser samfunnsprofilen i prøvene 2, 9, 16-28 etter DGGE elektroforese av gel 2. Prøve merket M er markør. 11 bånd ble stukket ut, reamplifisert og sekvensert. Disse er merket 5-31.

3.4.2 Sekvensanalyse.

For å få vite hvilke organismer som var tilstede i Raunefjorden ble reamplifiserte bånd sekvensert, editert, og sammenliknet med sekvenser i BLAST-databasen GeneBank. Resultatene fra tilsammen 29 sekvenserte bånd viste en sekvenslikhet på mellom 93-100 % til sine nærmeste slektninger i databasen (se tabell 3.2 og 3.3). Bånd 12, 19, 24 og 33 ble ikke tatt med i tabellen ettersom de var dårlige sekvenser.

Tabell 3.2 Det beste resultatet etter BLAST-søk med sekvenser av reamplifiserte DGGE-bånd hentet fra prøve 1-15 i figur 3.7.

Nærmeste slektning i GenBank	Bånd nr.	Base-lengde	% likhet	Habitat	Referanser
<u>Chloroplast 16S</u>					
Chloroplast <i>Skeletonema pseudocostatum</i>	X82155	18	309	99	Marint miljø (Rappé et al., 1998)
Chloroplast <i>Cymatosira belgica strain P189</i>	AJ536456	20	311	97	Marint miljø (Medlin og Kaczmarska, upublisert)
Chloroplast <i>Stephanodiscus minutulus</i>	AY221720	21	321	98	Marint miljø (Busse og Preisfeld, 2003, upublisert)
Uncultured Prasinophyte clone OM5	U70715	15	315	98	Cape Hatteras, North Carolina (Rappé et al., 1998)
Uncultured Prasinophycean AEGEAN_115	AF406549	28	321	96	Marint miljø (Moeseneder et al., 2005)
<u>α-Proteobacteria</u>					
<i>Pelagibacter ubique</i> HTCC1002	AF510192	34	316	99	Havet utenfor Oregon (USA) v. 10m dyp (Crump et al., 2004)
Uncultured α -Proteobacterium clone MB11F01	AY033309	32	314	99	Kyst marint miljø (Sekar et al., 2004)
<u>γ-Proteobacteria</u>					
<i>Colwellia rossensis</i> ANT9271	AY167332	14	327	99	Arktis- og Antarktis pakk-is (Brinkmeyer et al., 2003)
Uncultured γ -Proteobacterium Arctic97A-11	AF355037	13	334	98	Arktiske hav (Bano og Hollibaugh, 2002)
<u>β-Proteobacteria</u>					
β -Proteobacterium clone BAL58	AY317112	31	319	99	Marint miljø (Simu og Hagström, 2004)
<u>Bacteroidetes</u>					
<i>Flavobacterium clone G912S3A</i>	AY353822	16	326	98	Sørhavet (Abell og Bowman, 2005)
Unidentified Cytophagales clone OM155	U70686	30	326	96	Cape Hatteras, North Carolina (Bano og Hollibaugh, 2002)
Uncultured bacterium clone BB2_75	AY133378	26	316	97	Antarktisk sediment fra kysten (Powell et al., 2003)
Uncultured Bacteroidetes bact. clone F1C73	AY936183	17/25	321	98/97	Ushuaia, Argentina, Sub-Antarktis (Shivaji og Prabakaran, 2005, upublisert)
Uncultured Flavobacterium clone JS624-14	AB121102	29	328	98	Havet utenfor Japan v. 3.100 m dyp (Arakawa og Kato, 2003, upublisert)
<u>Unclassified kloroplaster</u>					
Enviroment clone OCS31	AF001655	23	321	95	Atlant- og Stillehavet (Rappé et al., 1998)
Unidentified Eukaryote clone OM20	U32670	22	313	96	Atlantehavet (Rappé et al., 1998)
Totalt:		18			

Tabell 3.3 Det beste resultatet etter BLAST-søk med sekvenser av reamplifiserte DGGE-bånd hentet fra prøve 2,9, 16-28 i figur 3.8.

Nærmeste slektning i GenBank	Bånd nr.	Base-lengde	% likhet	Habitat	Referanser
<u>Cyanobacteria</u>					
<i>Synechococcus sp. WH8016</i>	AY172834	24	364	95	Rødehavet (Fuller et al.,2003)
<u>α-Proteobacteria</u>					
<i>Pelagibacter ubique HTCC1002</i>	AF510192	14	354	99	Havet utenfor Oregon (USA) v. 10m dyp (Crump et al.,2004)
Uncultured α -Proteobacterium clone MB11F01	AY033309	11	352	99	Kyst marint miljø (Sekar et al., 2004)
Uncultured Roseobacter clone NAC11-3	AF245632	17	332	100	Nord Atlanteren (González et al., 2000)
Uncultured Rhodobacter. Bact. F4C74	AY697922	6	348	93	Antarktis (Prabakaran og Shivaji, upublisert)
<u>γ-Proteobacteria</u>					
γ -Proteobacterium clone HTCC234	AY102028	18	358	99	Marint miljø fra Oregon (Connon og Giovannoni, 2002)
Marine γ -Proteobacterium cl. HTCC2188	AY386344	5	367	99	Marint miljø (Cho og Giovannoni, 2003)
Uncultured γ -Proteobacterium clone NAC11-19	AF245642	15	369	99	Nord Atlanteren (González et al., 2000)
Uncultured Proteobacterium clone OCS44	AF001650	29	361	99	Kontinental sokkel ved Oregon (González et al., 2000)
<u>Bacteroidetes</u>					
Unidentified Cytophagales clone OM155	U70686	20	360	97	Cape Hatteras, North Carolina (Bano og Hollibaugh, 2002)
Uncultured Flavobacteriaceae clone F4C94	AY697925	31	366	98	Antarktis (Prabakaran og Shivaji, upublisert)
Totalt:		11			

Sekvenserte bånd viste sekvenslikhet i BLAST med sekvenser innenfor *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* og β -*Proteobacteria*. De båndene (tabell 3.2; bånd 16, 17, 25, 26, 29, 30 og tabell 3.3; bånd 20 og 31) som viste likhet med klassen *Bacteroidetes* hadde mellom 96 og 98 % sekvenslikhet med sine nærmeste slekninger. Bånd som viste sekvenslikhet med sekvenser innenfor underklassene α -*Proteobacteria* (tabell 3.2; bånd 32, 34 og tabell 3.3; 6, 11, 14 og 17), γ -*Proteobacteria* (tabell 3.2; bånd 13, 14 og tabell 3.3; 5, 15, 18 og 29) og β -*Proteobacteria* (tabell 3.2; 31), hadde 98-99 % sekvenslikhet med sekvenser i databasen. Det var også noen sekvenserte bånd som gav mellom 96-99 % treff på kloroplaster (16S) fra eukaryote organismer isolert fra marint miljø. En sekvens (bånd 24, tabell 3.3) viste 95 % sekvenslikhet med en cyanobakterie og en annen sekvens (bånd 6, tabell 3.3) viste 93 % sekvenslikhet med en udyrket α -Proteobakterie. Det var også to sekvenserte bånd som viste 96-97 % sekvenslikhet med en uidentifisert Cytophagales (bånd 30 og bånd 20, tabell 3.2 og 3.3). Fra sjøvannsprøver høstet under algeoppblomstringen (figur 3.7) ble det i hovedsak funnet 16S rDNA sekvenser med sekvenslikhet med *Bacteroidetes*, kloroplaster, α -*Proteobacteria* og γ -*Proteobacteria*. Under bakterieoppblomstringen minket dominansen av *Bacteroidetes* og kloroplaster. Denne dominansen

ble erstattet av γ -Proteobakterier og α -Proteobakterier (figur 3.8). Det ble også påvist bånd med sekvenslikhet til klassen *Cyanobacteria* i prøver høstet under bakterieoppblomstringen.

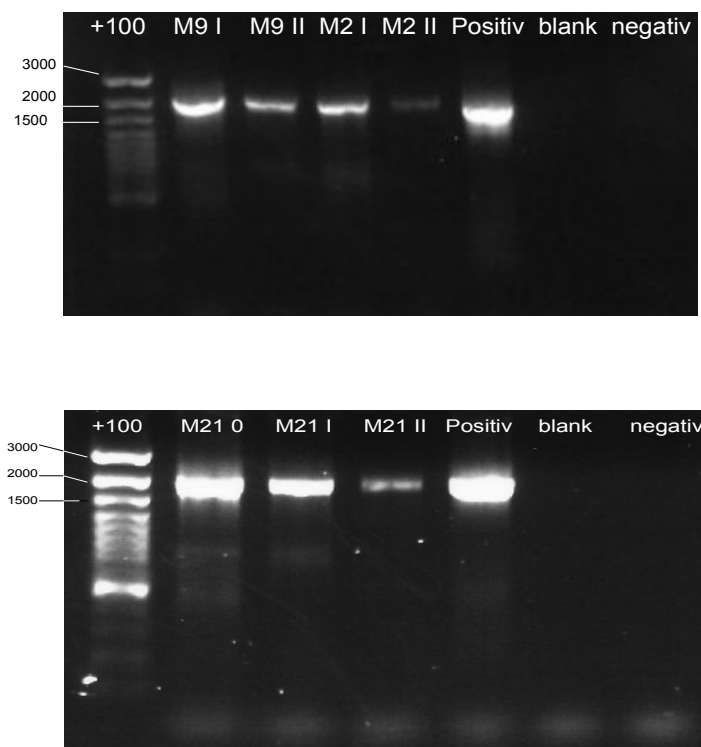
Syv av de sekvenserte båndene viste sekvenslikhet med dyrkede bakterier i databasen, mens 14 av totalt 29 bånd viste sekvenslikhet med udyrkede bakterier i BLAST databasen GenBank. Fire av båndene viste sekvenslikhet med kloroplaster fra dyrkede alger, mens 3 av totalt 29 bånd viste sekvenslikhet med kloroplaster fra udyrkede alger. Et av de sekvenserte båndene viste slektskap med en dyrket cyanobakterie.

De nærmeste slektningene i BLAST databasen GenBank var påvist i kalde marine miljø (Antarktis og Arktis), pelagiske miljø (Atlanterhavet) og varme marine miljø (Stillehavet, havet utenfor Japan, Sørhavet og Nord-Carolina).

3.5 Bakteriesamfunnet før-, under- og etter en algeoppblomstring.

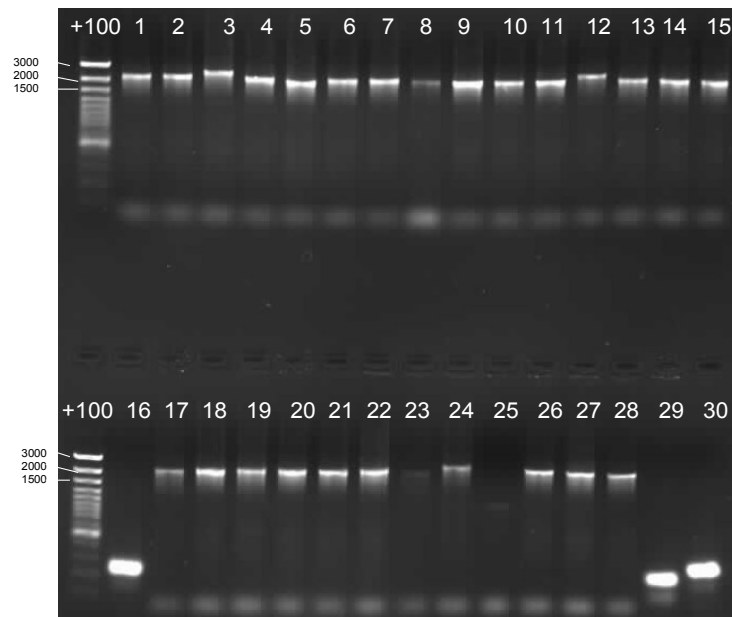
Det ble utført TOPO TA-kloning på prøve 2 (13.februar), prøve 9 (3.april) og prøve 21 (1.juli). Prøvene ble høstet før (M2), under (M9), og etter (M21) algeoppblomstringen (se figur 3.2). Formålet med å lage klonbibliotek av disse tre prøvene var for å sammenlikne forskjeller og likheter i bakteriesammensetningen i prøver høstet før-, under- og etter en algeoppblomstring. Etter kloningen fikk klonbibliotekene navnet M2, M9, og M21, hvor M står for marint og tallet for prøvenummeret. Dette navnet blir brukt videre i oppgaven.

Det primersettet som gav et rent PCR-produkt med nok DNA til kloning var primersettet 8forward og 23SOR. Dette primersettet gav et PCR-produkt på 2000 basepar. I figur 3.9 er PCR-produkt fra prøve 2, 9 og 21 (M2, M9, og M21) vist etter analyse på en 1,5 % agarosegel. Begge gelene viste et 2000 bp stort PCR-produkt i alle prøvene. I prøvene med PCR-produkt fra uforynnet templat (M21 0) og 10 ganger fortynt templat (M2 I, M9 I og M21 I) var det mye PCR produkt av riktig størrelse, men i tillegg uspesifikke bånd. Det ble derfor bestemt å bruke PCR-produkt fra 100 ganger fortynt templat (M2 II, M9 II og M21 II), som ikke hadde et uspesifikt bånd, til kloning.



Figur 3.9 Figuren øverst viser PCR-produktet til prøve M2 og M9 analysert på en 1,5 % agarosegel, mens figuren nederst viser PCR-produktet til prøve M21 analysert på en 1,5 % agarosegel. 0 = uforynnet, I = 10-1 fortynt, og II = 10-2 fortynt DNA-templat. +100= standardmarkør 100bp DNA Ladder Plus, positiv kontroll= *E.coli*, blank = sd H₂O og negativ kontroll= arkebakterien *Metanococcus vanilii*.

Resultatet etter kloning gav mange hvite kolonier, noen lyseblå og noen mørkeblå kolonier. De hvite koloniene og noen lyseblå ble benyttet for videre analyser. Det ble til sammen plukket 300 hvite og lyseblå kolonier fra prøve M2, 400 kolonier fra M9, og 300 kolonier fra M21. Positive transformanter ble sjekket for rett insert ved hjelp av PCR. Agarosegelelektroforesen av PCR-produktene viste en viss variasjon i størrelse på DNA-fragmentene (se figur 3.10), men stort sett var det riktig insert hos alle.



Figur 3.10: PCR-produktene til M21.2.1-30 analysert på en agarosegel. 100bp DNA Ladder Plus(+100) er brukt som standard og sd vann som blank.

Kloner med rett insert ble rensset og kuttet med restriksjonsenzym HinfI for å eliminere like kloner. Resultatet etter kuttingen viste 13 ulike kuttemønstre av 88 kloner fra klonbibliotek M2 (tabell 3.4), 15 ulike kuttemønstre av 128 kloner fra klonbibliotek M9 (tabell 3.5), og 18 ulike restriksjonskutttemønstre av 159 kloner fra klonbibliotek M21 (tabell 3.6). I hver tabell er restriksjonskutttemønstrene vist til venstre for hver av klonene, og de oppkuttete DNA fragmentene av ulik lengde er indikert med piler. Antall kloner som hadde samme restrisjonskutttemønster er markert med normal skrifttype, mens representantene for hver av kuttemønstrene i klonbibliotekene er markert med fet skrifttype. Klonene M9.142, M9.9, M9.69, M9.14, M9.8 og M9.17 ble sekvensert direkte uten å gå via restriksjonsenzymanalyse. Det er derfor ikke vist kuttemønstre for disse klonene.

Tabell 3.4: Denne tabellen viser de 13 ulike restriksjonskuttetemønstrene i Klonbibliotek M2. Representant i klonbiblioteket (til høyre for kuttetemønstret) er markert med fet skrifttype, mens antall kloner med samme kuttetemønster er markert med normal skrifttype.

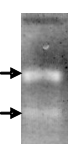
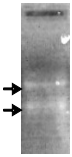
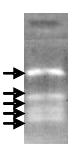
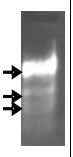
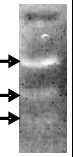
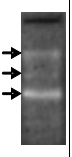
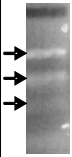
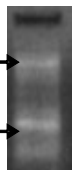
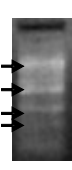
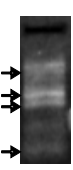
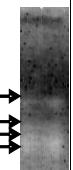
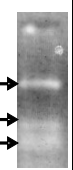
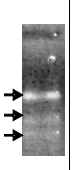
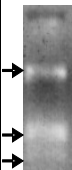
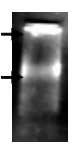
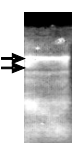
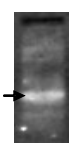
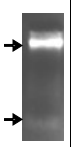
Restriksjonskuttetemønster													
fra													
Klonbibliotek M2													
	M2.4.20 10 kloner		M2.3.27 5 kloner		M2.5.12 8 kloner		M2.3.28 7 kloner		M2.1.36 2 kloner		M2.2.13 2 kloner		M2.3.44 1 klon
	M2.1.10 2 kloner		M2.2.35 11 kloner		M2.1.31 10 kloner		M2.5.36 25 kloner		M2.3.26 1 klon		M2.3.21 8 kloner		

Tabell 3.5: Denne tabellen viser de 15 ulike restriksjonskuttetemønstrene i Klonbibliotek M9. Representant i klonbiblioteket (til høyre for kuttetemønstret) er markert med fet skrifttype, mens antall kloner med samme kuttetemønster er markert med normal skrifttype.

Restriksjonskuttetemønster													
fra													
Klonbibliotek M9													
	M9.446 2 kloner		M9.521 3 kloner		M9.413 2 kloner		M9.182 27 kloner		M9.621 1 klon		M9.505 7 kloner		M9.340 1 klon
	M9.405 1 klon		M9.545 1 klon		M9.536 3 kloner		M9.438 1 klon		M9.129 11 kloner		M9.529 1 klon		M9.153 58 kloner
	M9.142 3 kloner	-	M9.9	-	M9.69	-	M9.14	-	M9.8	-	M9.17		

* M9.9, M9.69, M9.14, M9.8 og M9.17 ble sekvensert direkte, og det finnes derfor ingen restriksjonskuttetemønstre for disse klonene.

Tabell 3.6: Denne tabellen viser de 18 ulike restriksjonskuttemønstrene i Klonbibliotek M21. Representant i klonbiblioteket (til høyre for kuttemønsteret) er markert med fet skrifttype, mens antall kloner med samme kuttemønster er markert med normal skrifttype.

Restriksjonskuttemønster													
fra													
Klonbibliotek M21													
	M21.1.38 21 kloner		M21.6.19 1 klon		M21.1.4 35 kloner		M21.4.8 15 kloner		M21.2.46 10 kloner		M21.5.39 2 kloner		M21.6.38 1 klon
	M21.5.43 1 klon		M21.5.44 2 kloner		M21.3.2 55 kloner		M21.1.25 4 kloner		M21.1.31 2 kloner		M21.1.19 1 klon		M21.2.2 4 kloner
	M21.4.4 1 klon		M21.5.10 1 klon		M21.5.4 2 kloner		M21.4.1 1 klon						

3.5.1 Sekvensanalyse av kloner.

Etter kuttingen med restriksjonsenzym ble de av klonene som viste ulike kuttemønstre sekvensert. Dette resulterte i tilsammen 92 sekvenserte kloner i klonbibliotek M2, og hvor disse klonene hadde fra 95-100 % sekvenslikhet med 13 forskjellige sekvenser i BLAST databasen GenBank (se tabell 3.7).

Tabell 3.7: De beste treff i BLAST-søk med sekvenser fra Klonbibliotek M2.

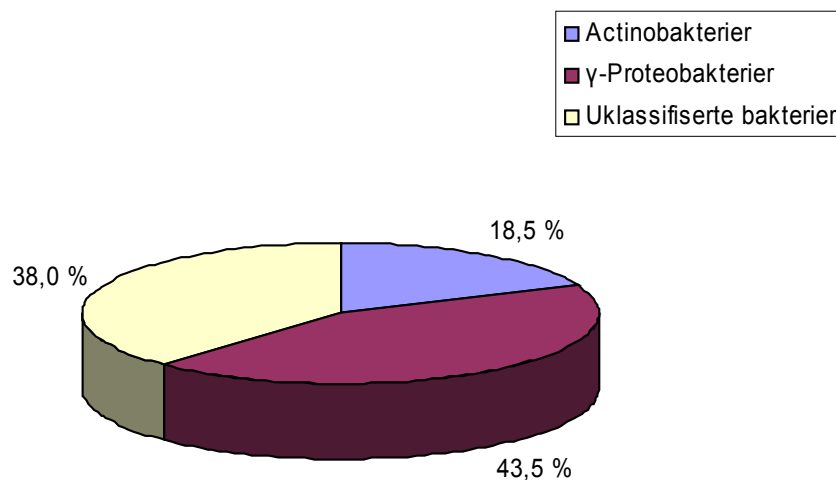
Nærmeste slektning i GenBank	Antall kloner med samme treff	Representant i fylogenetiske trær	Base-Lengde	% lik nærmeste slektning i GenBank	Habitat	Referanser
<u>Actinobacteria</u>						
<i>Actinoplanes ianthinogenes</i>	AB047495	10	M2.4.20	847	95	Marint miljø (Tamura og Hatano, 2001)
Uncultured Actinobacterium MB11A03	AY033296	7	M2.3.28	747	99	Marint miljø (Suzuki et al., 2001)
<u>γ-Proteobacteria</u>						
<i>Halomonas variabilis</i>	AJ306893	2	M2.1.10	838	99	Marint miljø (Arahal et al, 2002)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	U65012	8	M2.3.21	853	98	Marint miljø (Kerkhof, L., 1997)
Uncultured Glaciecola clone F3C16	AY697895	25	M2.5.36 M2.2.10	869 835	96 100	Antarktis (Prabakaran og Shivaji, upublisert)
Uncultured marin Bacterium ZD0433	AJ400356	5	M2.3.27	744	98	Nordsjøen (Zubkov et al., 2002)
<u>Unclassified bacteria</u>						
<i>Bacterium H4</i>	AY345546	2	M2.1.36	830	99	Innsjø "Wai'e'ele'ele water", Hawaii (Donachie et al., upublisert)
Uncultured bacterium clone ZA2333c	AF382102	11	M2.2.35	834	99	Marint miljø (Fuchs et al., upublisert)
Uncultured marine bacterium SPOTSOC00_5m100	DQ009125	1	M2.3.26	844	97	5meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Uncultured bacterium clone ZA3612c	AF382135	1	M2.3.44	879	96	Marint miljø (Fuchs et al., upublisert)
Uncultured bacterium clone ZA3409c	AF382122	8	M2.5.12	868	97	Marint miljø (Fuchs et al., upublisert)
Uncultured bacterium clone ARKCH2Br2-52	AF468234	2	M2.2.13	849	97	Arktis pakkis; northern Fram Strait (Brinkmeyer og Helmke, upublisert)
Uncultured marine bacterium SPOTSFEB02_70 ml	DQ009423	10	M2.1.31	875	96	70meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Totalt:		92	14			

Sekvensene i klonbibliotek M2 (figur 3.11) grupperte seg innenfor underklassen *γ-Proteobacteria* (43,5 %), klassen *Actinobacteria* (18,5 %) og en gruppe bestående av uklassifiserte bakterier (38,0 %). Det viste seg dermed å være flest uklassifiserte bakterier og en svært dominerende gruppe av *γ-Proteobacteria* tidlig på året i Raunefjorden. Førte av 88 kloner viste sekvenslikhet med bakterier tilhørende underklassen *γ-Proteobacteria*. Tjuefem av disse klonene (tabell 3.7) viste fra 96-100 % sekvenslikhet med en udyrket *Glaciecola* Klon F3C16 isolert fra Antarktis. På grunn av den store dominansen av denne gruppen i klonbibliotek M2, ble det tatt med to klonsekvenser (M2.5.36 og M2.2.10) i det fylogenetiske treet. Det var også 8 kloner innenfor underklassen *γ-Proteobacteria* som viste 98 % sekvenshomologi med *Pseudomonas stutzeri*.

Hele 35 kloner kunne ikke bestemmes til undergrupper innenfor domenet *Bacteria*. Elleve av disse klonene viste 99 % sekvenslikhet med en udyrket bakterie Klon ZA2333c, og kun 78 % sekvenslikhet med nærmeste dyrkbare bakterie *Oleanospirillum multiglobuliferum* (AB006764). Ti hadde 96 % sekvenslikhet med en udyrket marine bakterie Klon SPOTSFEB02_70ml og 74 % sekvenslikhet med *Thiothrix sp.*(AF148516). Klonene M2.2.13, M2.5.12, M2.3.44 og M2.3.26 viste 96-97 % sekvenslikhet med en uklassifisert bakterie og kun 30-59 % sekvenslikhet med henholdsvis *Kribella solani*, *Nocardia*, *Clavibacter michiganensis* og *Oleiphilus messinensis*. Fire av klonsekvensene var 95 % lik sin nærmeste slektning i GenBank.

Kun 22 av de 92 klonsekvenser hadde sekvenslikhet med dyrkede bakterier, mens 70 av 92 klonsekvenser hadde sekvenslikhet med udyrkede bakterier. Deres nærmeste slektninger i GenBank har blitt påvist i marint miljø, kaldt marint miljø (Antarktis og Arktis) og pelagisk miljø (Nordsjøen og San Pedrohavet).

Klonbibliotek M2



Figur 3.11 Et diagram som viser hvilke underklasser kloner fra bibliotek M2 plasserte seg innenfor og den prosentvise fordelingen av disse.

I klonbibliotek M9 ble det sekvensert tilsammen 128 kloner, og klonene viste mellom 93-100 % sekvenslikhet med 20 forskjellige sekvenser i BLAST databasen GenBank (tabell 3.8).

Klonsekvensene grupperte seg innenfor underklassen *γ-Proteobacteria* (63,3 %), klassen *Actinobacteria* (4,7 %), uklassifiserte bakterier (31,3 %) og klassen *Firmicutes* (0,8 %) (figur 3.12).

Diagrammet viste en økning i antall *γ-Proteobakterier* i prøve M9 sammenliknet med prøve M2, og en nedgang i antall *Actinobakterier* og uklassifiserte bakterier i prøve M9 sammenliknet med prøve M2. I tillegg ble det også påvist 1 sekvens med sekvenslikhet med en bakterie innenfor klassen *Firmicutes*.

Tabell 3.8: De beste treff etter BLAST-søk med sekvenser fra Klonbibliotek M9.

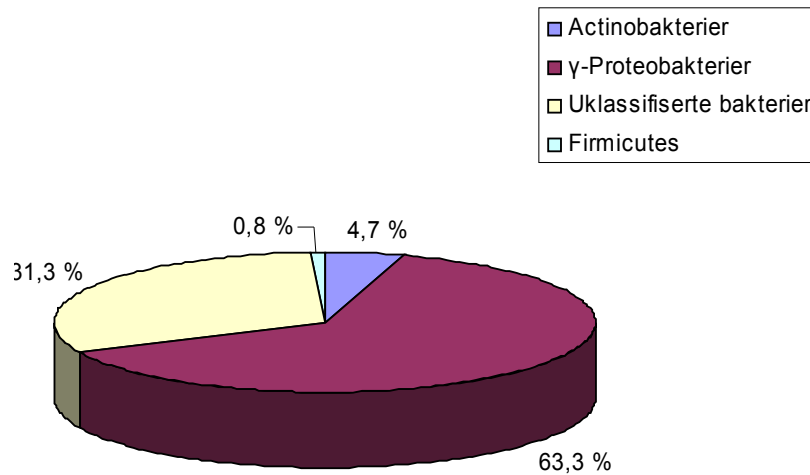
Nærmeste slektning i GenBank	Antall kloner med samme treff	Representant i fylogenetiske trær	Base-Lengde	% lik nærmeste slektning i GenBank	Habitat	Referanser
<i>Actinobacteria</i>						
<i>Actinoplanes ianthinogenes</i>	AB047495	2	M9.446	839	95	Marint miljø (Tamura og Hatano, 2001)
<i>Modestobacter multiseptatus</i>	Y18646	1	M9.621	669	98	Marint miljø (Mevs et al., 2000)
<i>Actinobacterium GP-6</i>	AY145534	1	M9.9	883	94	Brakkvann fra Weser-utløpet (Selje og Simon, upublisert)
Uncultured Actinobacterium clone SV1-12	AJ575521	1	M9.69	853	99	Ferskvann (Warnecke et al., 2004)
Uncultured Actinobacterium clone SV1-10	AJ575519	1	M9.545	479	99	Ferskvann (Warnecke et al., 2004)
<i>Firmicutes</i>						
<i>L. pasteurii</i>	X87150	1	M9.529	636	99	Marint miljø (Janssen et al., 1995)
<i>γ-Proteobacteria</i>						
<i>Glaciecola sp. ANT9148</i>	AY167285	3	M9.521	863	100	Arktisk- og Antarktis pakkis (Brinkmeyer et al., 2003)
<i>Moritella sp.</i>	AB011360	1	M9.14	915	98	Nordvest Stillehavet (Urakawa et al., 1998)
<i>Saccharospirillum impatiens strain EL-105T</i>	AJ315983	7	M9.505	868	98	Ekho innsjøen Vestfold Hills, Øst-Antarktis (Labrenz et al., 2003)
<i>Arhodomonas sp. EL-201</i>	AJ315984	3	M9.536	852	98	Ekho innsjøen Vestfold Hills, Øst-Antarktis (Lawson og Labrenz, upublisert)
Uncultured γ-Proteobacterium clone MB11B11	AY033301	58	M9.153 M9.433	865 882	98 98	Marint miljø (Suzuki et al., 2001)
Uncultured marine bacterium clone ZD0433	AJ400356	2	M9.413	853	98	Nordsjøen (Zubkov et al., 2002)
Uncultured γ-Proteobacterium clone Arctic96A-14	AF354611	2	M9.8	887	97	Det Arktiske hav (Bano og Hollibaugh, 2002)
Uncultured γ-Proteobacterium clone Arctic96B-16	AF354595	1	M9.340	861	98	55meters dyp fra det Arktiske hav (Bano og Hollibaugh, 2002)
Uncultured γ-Proteobacterium clone EB000-65A11	AY627373	1	M9.438	810	93	Monterey bay (Suzuki et al., 2004)
Unclassified Pseudomonas group	AF102866	3	M9.142	851	94	Symbiont i Bankia setacea (Sipe et al., 2000)
<i>Unclassified bacteria</i>						
Uncultured bacterium ZA3235c	AF382112	1	M9.17	903	93	Marint miljø (Fuchs et al., upublisert)
Uncultured marine bacterium SPOTSFEB02_70 ml	DQ009423	27	M9.182 M9.510	889 868	98 98	70meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Uncultured marine bacterium SPOTSAPR01_5m210	DQ009083	1	M9.405	840	96	5meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Uncultured marine bacterium clone PB2.2	DQ071094	11	M9.129	870	98	Overflatevann (Lau og Armbrust, upublisert)
Totalt:		128	22			

Den største gruppen av klonsekvenser i klonbibliotek M9 (81 av 128 kloner) hadde sekvenslikhet med organismer innenfor underklassen *γ-Proteobacteria*. Femtiåtte av disse klonene viste 98 % sekvenshomologi med en udyrket *γ-Proteobakterie* Klon MB11B11 påvist i marint miljø. Denne store gruppen er representert med to klonsekvenser (M9.153 og M9.433) i klonbibliotektreet. Det ble også påvist klonsekvenser (7 kloner) med 98 % sekvenslikhet til *Saccharospirillum impatiens* isolert fra Ekhoinsjøen ved Antarktis.

Førti av 128 klonsekvenser kunne ikke klassifiseres innenfor domenet *Bacteria* (tabell 3.8). Den største gruppen innenfor uklassifiserte bakterier bestod av 27 kloner som hadde 98 % sekvenslikhet med en udyrket marin bakterie Klon SPOTSFEB02_70ml og 71 % sekvenslikhet med nærmeste dyrkbare bakterie *Thiothrix sp.* (AF148516). De 27 klonene er representert med to klonsekvenser (M9.182 og M9.510) i klonbibliotektreet. Klonene M9.129, M9.405 og M9.17 viste 93-98 % sekvenslikhet med uklassifiserte bakterier, og mellom 70-80 % sekvenslikhet med henholdsvis *Bacterium DG890*, *Thiothrix sp.* og *Oleiphilus messinensis*. To av klonene hadde 93 % sekvenslikhet med en udyrket *γ-Proteobakterie* Klon EB000-65A11 og en udyrket bakterie Klon ZA3235c, mens 2 klonsekvenser hadde 94 % sekvenslikhet med en uklassifisert *Pseudomonas* gruppe og *Actinobacterium GP-6*.

De 128 sekvenserte klonene viste størst sekvenslikhet med 19 dyrkbare bakterier og 109 udyrkede bakterier. Sekvensene fra BLAST databasen GenBank var i hovedsak påvist i marint miljø, kalde og varme marine strøk, pelagisk marint miljø og noen sekvenser påvist i ferskvann.

Klonbibliotek M9



Figur 3.12 Dette diagrammet viser den prosentvise fordelingen av underklasser i klonbibliotek M9.

Det ble tilsammen sekvensert 159 kloner i klonbibliotek M21. Klonsekvensene i M21 viste 94-99 % sekvenslikhet med 18 forskjellige sekvenser fra BLAST databasen GenBank (tabell 3.9). De 159 klonene grupperte seg innenfor underklassen *γ-Proteobacteria* (49,1 %), klassen *Actinobacteria* (45,3 %) og blant uklassifiserte bakterier (5,7 %) (figur 3.13). Klonbibliotek M21 viste dermed en økning i antall sekvenser med sekvenshomologi til actinobakterier og en nedgang i antall uklassifiserte bakterier. Underklassen *γ-Proteobakterier* var også her en dominerende gruppe av sekvenser i klonbibliotek M21.

Tabell 3.9: De beste treffene i BLAST-søk med sekvenser fra Klonbibliotek M21.

Nærmeste slektning i GenBank	Antall kloner med samme treff	Representant i fylogenetiske trær	Base-lengde	% lik nærmeste slektning i GenBank	Habitat	Referanser
<i>Actinobacteria</i>						
<i>Actinoplanes ianthinogenes</i>	AB047495	21	M21.1.38	887	98	Marint miljø (Tamura og Hatano, 2001)
Uncultured Actinobacterium MB11A03	AY033296	1	M21.6.19	507	98	Marint miljø (Suzuki et al., 2001)
Uncultured Actinobacterium clone SV1-10	AJ575519	35	M21.1.4	889	99	Ferskvann (Warnecke et al., 2004)
Uncultured Actinobacterium clone SV2-23	AJ575527	15	M21.4.8	557	97	Ferskvann (Warnecke et al., 2004)
<i>γ-Proteobacteria</i>						
<i>Halomonas meridiana</i> strain DSM 5425	AJ306891	10	M21.2.46	886	99	Marint miljø (Arahal et al., 2002)
<i>Halomonas</i> sp. DY-8	AY383044	2	M21.5.39	398	99	Marint miljø (Bian et al., upublisert)
<i>Vibrio logei</i> strain SR181	AY292934	1	M21.6.38	462	98	Marint miljø (Nishiguchi og Nair, 2003)
<i>Fundibacter jadensis</i>	AJ001150	1	M21.5.43	402	99	Intertidal sediment (Bruns og Berthe-Corti, 1999)
<i>γ-Proteobacterium</i> HTCC234	AY102028	1	M21.1.19	884	98	Marint miljø (Connon og Giovannoni, 2002)
Uncultured Cycloclasticus sp. clone CHO-11-1	AB071990	2	M21.5.44	902	99	Marint miljø (Maruyama et al., 2003)
Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone MB11B11	AY033301	55	M21.3.2	416	97	Marint miljø (Suzuki et al., 2001)
Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone EB000-37F04	AY627376	4	M21.1.25	404	98	Marint miljø (Suzuki et al., 2004)
Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone OM60	U70696	2	M21.1.31	893	98	Marint miljø (Rappé et al., 1997)
<i>Unclassified bacteria</i>						
Uncultured bacterium clone ZA3412c	AF382137	4	M21.2.2	387	94	Bakterio-plankton (Fuchs et al., upublisert)
Uncultured bacterium clone ARKCH2Br2-52	AF468234	1	M21.4.4	382	98	Arktis pakkis (Brinkmeyer og Helmke, upublisert)
Uncultured marine bacterium SPOTSFEB02_70 ml	DQ009423	1	M21.5.10	618	98	70meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Uncultured marine bacterium SPOTSAPR01_5m210	DQ009083	2	M21.5.4	466	99	5meters dyp fra San Pedrohavet (Brown et al., 2005)
Uncultured marine bacterium	DQ071068	1	M21.4.1	891	99	Overflatevann (Lau og Armbrust, upublisert)
Totalt:		159	20			

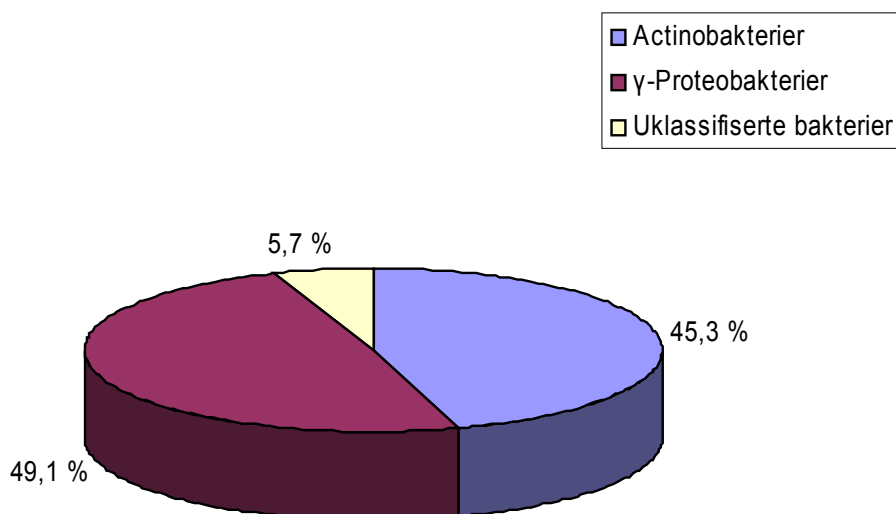
Syttito av 159 hadde sekvenslikhet (97-99 %) med actinobakterier. Trettifem av disse klonene viste 99 % sekvenslikhet med en udyrket actinobakterie Klon SV1-10 påvist i ferskvann. Denne gruppen er representert med to klonsekvenser (M21.1.4 og M21.4.3) i klonbibliotektreet. Det var også 21 klonsekvenser innenfor klassen *Actinobacteria* som viste sekvenshomologi til *Actinoplanes ianthinogenes*.

Nesten halvparten av alle klonene (78 kloner) viste sekvenslikhet med bakterier tilhørende underklassen γ -*Proteobacteria*. Femtifem kloner hadde 97 % sekvenslikhet med den udyrkede γ -Proteobakterie Klon MB11B11, som også er representert med to klonsekvenser (M21.3.2 og M21.5.40) i klonbibliotektreet.

Fire kloner av totalt 9 uklassifiserte bakterier viste 94 % sekvenshomologi med en udyrket bakterie Klon ZA3412c, og kun 73 % sekvenslikhet til nærmeste dyrkbare bakterie *Thiothrix disciformis* (AB042532). De 5 siste uklassifiserte klonene (representanter i klonbibliotek; M21.4.1, M21.5.4, M21.5.10 og M21.4.4) hadde 98-99 % sekvenslikhet med udyrkede bakterier og 60-70 % sekvenslikhet med henholdsvis Candidatus *Microthrix parvicella*, *Thiothrix sp.*, *Nocardioides* og *bacterium DG890*.

Etter søk i BLAST databasen GenBank viste resultatet at kloner i M21 hadde sekvenslikhet med 36 dyrkede bakterier og 123 udyrkede bakterier. Sekvensene fra BLAST databasen GenBank har blitt påvist i marint miljø, arktis, pelagisk marint miljø, ferskvann og overflatevann.

Klonbibliotek M21



Figur 3.13 Et kakediagram som viser i prosent hvordan klonene fra klonbibliotek M21 fordelte seg på underklassene γ -Proteobakterier, Actinobakterier og uklassifiserte bakterier.

4.5 Fylogenetiske analyser.

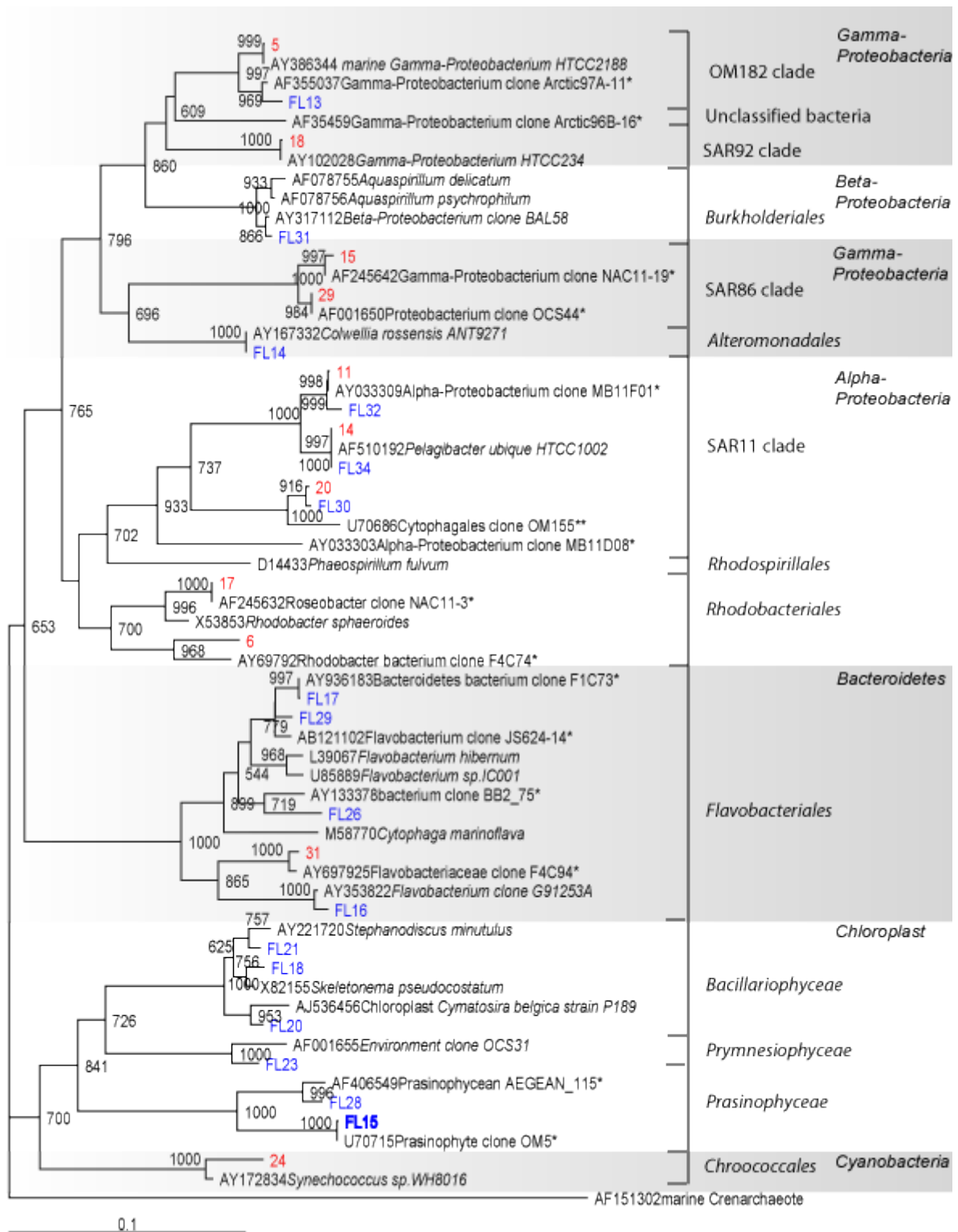
Totalt 27 sekvenserte bånd ble tatt med i fylogenetiske analyser av samfunnsprofilene (figur 3.14). Sekvens 22 og 25 (figur 3.7) ble ikke inkludert i analysen, ettersom 22 var en dårlig sekvens og 25 gav treff på samme sekvens som 17. Det fylogenetiske treet ble stabilisert ved å benytte en *marine Crenarchaeote* fra domenet *Archaea* som utgruppe. Sekvenserte bånd plasserte seg på to hovedgrener bestående av en gren med gram-negative bakterier, og en gren med Cyanobakterier og 16S sekvenser fra kloroplaster i eukaryote alger. Den største grenen representerte gram-negative bakterier bestående av 20 sekvenserte bånd og deres nærmeste slektninger i BLAST databasen GenBank.

De gram negative sekvensene fordelte seg deretter innenfor klassen *Bacteroidetes* (5 sekvenser) og klassen *Proteobacteria* med underklassene γ -*Proteobacteria* (6 sekvenser), β -*Proteobacteria* (1 sekvens) og α -*Proteobacteria* (8 sekvenser). Den største klassen blant gram-negative bakterier var *Proteobakteriene*, og da α - og γ -*Proteobakteriene*. Seks av båndene innenfor underklassen α -*Proteobacteria* viste seg å ha sekvenslikhet til SAR11. Et bånd dominerte i alle sjøvannsprøvene. To sekvenser, som er representert med bånd 34 (figur 3.7) og bånd 14 (figur 3.8), viste sekvenslikhet med den dominerende SAR11-bakterien *Pelagibacter ubique*. Bånd 30 og 20 (figur 3.7 og 3.8) ble påvist i sjøvannsprøver (11-24) høstet under bakterieoppblomstringen. Disse båndene viste seg å ha sekvenshomologi med en uidentifisert SAR11-bakterie. Det ble også påvist to andre bånd (figur 3.7; 32 og figur 3.8; 11) under og etter bakterieoppblomstringen med sekvenslikhet til en udyrket SAR11-bakterie. To sekvenserte bånd (bånd 6 og 17, figur 3.8) grupperte seg innenfor underklassen α -*Proteobacteria* og ordenen *Rhodobacteriales*. En av de to sekvenserte båndene (bånd 17) dominerte i sjøvannsprøver høstet etter bakterieoppblomstringen og hadde sekvenslikhet med en udyrket *Roseobacter*.

To sekvenserte bånd (figur 3.7; 13 og figur 3.8; 5) viste sekvenslikhet med sekvenser innenfor γ -*Proteobakterie*-gruppen OM182. Bånd 5, som var dominerende i sjøvannsprøver høstet under og etter bakterieoppblomstringen, viste sekvenslikhet til en bakterie isolert fra kysten av Oregon. Bånd 13 (figur 3.7), som var dominerende i sjøvannsprøver høstet før- og under algeoppblomstringen, viste sekvenshomologi med en sekvens påvist i sjøvannsprøver høstet fra hav utenfor Arktis. Sekvenserte bånd som grupperte seg innenfor SAR92 (bånd 18) og SAR86 (bånd 15 og 29) ble kun påvist i sjøvannsprøve 16 til 28 (figur 3.8) høstet under og etter bakterieoppblomstringen. SAR92-gruppen består av flere nye sekvenser høstet fra kystnære strøk og pelagisk marint miljø. SAR86-gruppen er svært dominerende i overflatevann og består av sekvenser fra Stillehavet, Atlanterhavet og Sargassohavet. Et bånd (figur 3.7; 31) som ble påvist i sjøvannsprøve 5-15 (figur 3.7) viste

sekvenslikhet med den oligotrofe bakterien *Beta-Proteobacterium BAL58* (β -*Proteobacteria*) isolert fra Østersjøen. Et annet bånd (figur 3.7; 14) som ble påvist før-, under- og etter algeoppblomstringen (figur 3.7) viste sekvenslikhet med den psykrofile arten *Colwellia rossensis* (γ -*Proteobacteria*).

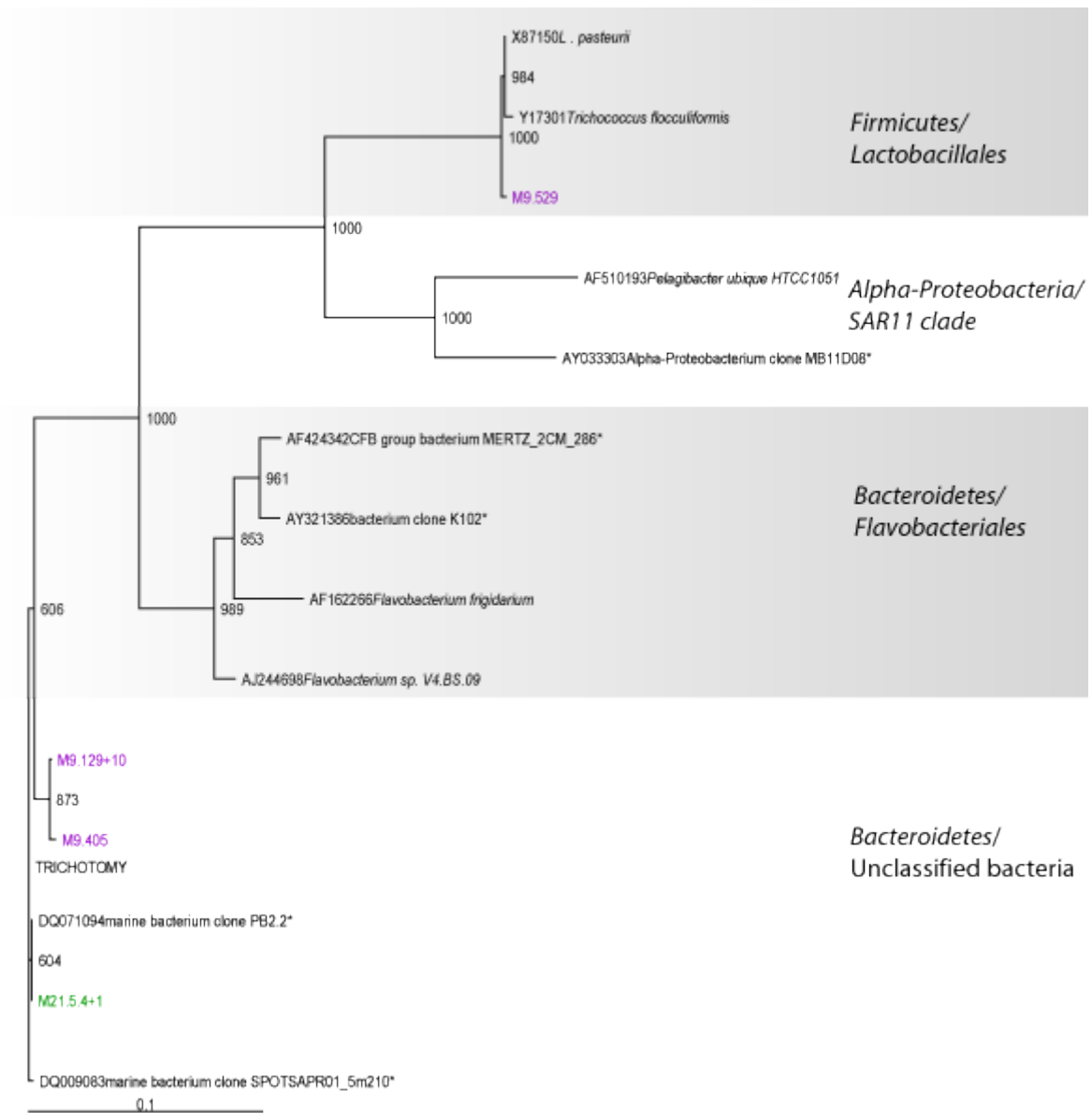
Av de 5 sekvenserte båndene som grupperte seg innenfor klassen *Bacteroidetes*, var det 3 bånd (fig.3.7; 16, 26 og fig.3.8, 31) som kun ble påvist under algeoppblomstringen og i begynnelsen av bakterieoppblomstringen. Bånd 29 (figur 3.7) ble påvist i prøve 6-15 høstet ved slutten av algeoppblomstringen og frem til midten av bakterieoppblomstringen. Bånd 17 (figur 3.7) ble påvist i prøve 5-23 høstet under alge- og bakterieoppblomstringen. De 5 sekvenserte båndene viste sekvenslikhet med bakterier innenfor ordenen *Flavobacteriales*. *Flavobacteriales* inneholder flere psykrofile eller psykrotolerante bakterier som kan nedbryte biomakromolekyler. Sekvenserte bånd som viste seg å ha sekvenslikhet med sekvenser fra 16SrRNA fra kloroplaster fra eukaryote alger, ble påvist i prøver høstet under algeoppblomstringen. Unntaket var båndet med sekvenslikhet til kloroplast hos *Skeletonema pseudostatum*. Dette båndet var tilstede i alle prøvene høstet fra Raunefjorden (se bånd merket 18 på figur 3.8). Det ble også påvist en sekvens med sekvenslikhet med *Synechococcus sp.* som tilhører klassen *Cyanobacteria*.



Figur 3.14: Fylogenetisk tre av 16S rDNA-fragmenter fra sekvenserte DGGE-bånd og sekvenser som gav høyest treff i BLAST databasen GenBank. Bånd sekvensert fra prøve 1-15 er merket FL-13-FL34(blå) og bånd sekvensert fra prøve 2, 9, 16-28 er merket 5-31(rød). Sekvenser merket * er udyrkede, mens sekvenser merket ** er uidentifiserte. Sekvensforskjell på 10 % forskjell i nukleotidrekkefølgen (0,1 forandring per nukleotid) er vist som en målestokk nederst. Bootstrapverdien er tallet ved forgreningspunktet som viser hvor ofte sekvensen forgrener seg slik etter 1000 gangers gjentak.

De 377 klonene fra klonbibliotek M2, M9 og M21 fordelte seg mellom underklassen γ -*Proteobacteria* (256 sekvenser), klassen *Actinobacteria* (106 sekvenser), klassen *Bacteroidetes* (15 sekvenser) og klassen *Firmicutes* (1 sekvens). En sekvens fra β -*Proteobacterium* BAL58 (figur 3.18), en sekvens fra kloroplast OCS31 og en sekvens fra marine crenarchaeote (figur 3.19) ble sammenstilt sammen med sekvenser fra klonbibliotekene og databasen for å stabilisere de fylogenetiske trærne.

Tolv kloner fra klonbibliotek M9 og 2 kloner fra M21 viste sekvenslikhet med uklassifiserte bakterier innenfor fylumet *Bacteroidetes* (figur 3.15). *Bacteroidetes* er et svært diversert fylum bestående av flere organismer som er vanlig i sjøvann og som spiller en viktig rolle i sirkulering av næringsstoffer under algeoppblomstringen. En klon fra bibliotek M9 viste sekvenslikhet med melkesyrebakterien *Lactosphaera pasteurii* (fylum *Firmicutes*).



Figur 3.15: Dette treet viser det fylogenetiske slektskapet mellom 16S rDNA-sekvenser som tilhører fylum Bacteroidetes, Firmicutes og Proteobacteria med underklassen alpha-Proteobacteria. Kloner fra klonbibliotek M2 er merket brun, kloner fra M9 merket lilla, og kloner fra M21 merket grønn. Bakterier som ikke har vært dyrket er merket med *. Målestokken viser en sekvensforskjell på 10 % forskjell i nukleotidrekkefølgen (0,1 forandring per nukleotid). Bootstrapverdien er tallet ved forgreningspunktet og viser hvor ofte sekvensen forgrener seg slik etter 1000 gangers gjentak.

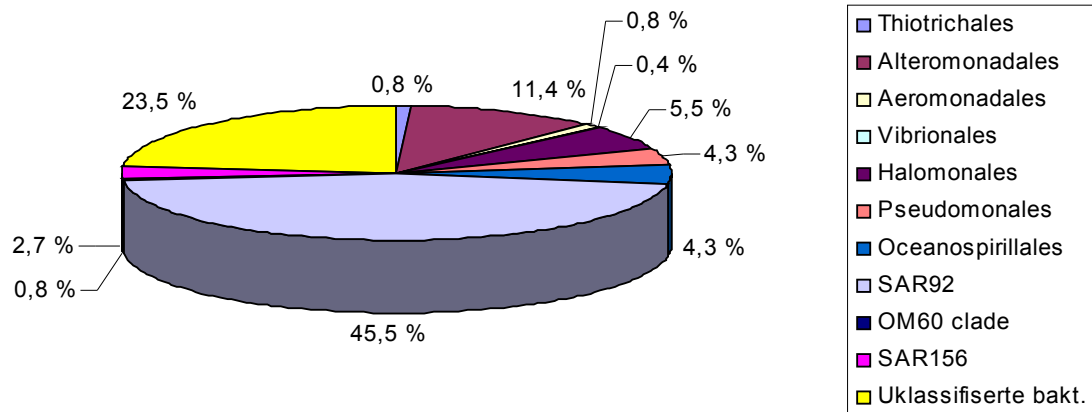
Den største fylogenetiske gruppen (256 sekvenser) var en divers gruppe bestående av sekvenser innenfor underklassen *γ-Proteobacteria*. Denne gruppen bestod av 64 kloner fra klonbibliotek M2, 109 kloner fra klonbibliotek M9 og 83 kloner fra klonbibliotek M21. Klonene fordelte seg mellom 11 ordner bestående av *Thiotrichales*, *Alteromonadales*, *Aeromonadales*, *Oceanospirillales*, *Vibrionales*, *Halomonales*, *Pseudomonadales*, SAR156, OM60, SAR92 og uklassifiserte bakterier (figur 3.16, 3.17 og 3.18). Seksti kloner fra klonbibliotek M9 og 56 kloner fra klonbibliotek M21 viste sekvenslikhet med andre sekvenser innenfor gruppen SAR92 (figur 3.16 og 3.18). SAR92-gruppen har navnet etter den første klonsekvensen isolert fra Sargassohavet og består av en rekke marine udyrkede bakterier. Femtiåtte av klonene fra bibliotek M9 og 55 kloner fra bibliotek M21 viste sekvenshomologi med den udyrkede SAR92-bakterien *γ-Proteobacterium clone MB11B11* isolert fra marint miljø. En stor gruppe bestående av 25 kloner fra bibliotek M2 og 3 kloner fra bibliotek M9 viste seg å ha sekvenslikhet med slekten *Glaciecola* (orden *Alteromonadales*) som er dominerende i Arktis og Antarktis. To kloner fra bibliotek M2 og 10 kloner fra bibliotek M21 viste seg å ha sekvenslikhet med slekten *Halomonas* (orden *Halomonales*). *Halomonas* er en moderat halofil bakterie som har vært isolert fra blant annet hypersaline innsjøer i Antarktis.

Det var også noen kloner (figur 3.16) som viste seg å ha sekvenslikhet med sekvenser innenfor ordenen *Pseudomonadales*. Åtte kloner fra M2 viste sekvenslikhet med *Pseudomonas stutzeri*. Syv kloner fra bibliotek M9 viste seg å ha sekvenslikhet med en microaerofil spirillum ved navn *Saccharospirillum impatiens* isolert fra Ekho innsjøen på Antarktis. Tre kloner fra M9 viste sekvenslikhet med en *Arhodomonas sp.* tilhørende ordenen *Chromatiales*. I det fylogenetiske treet (figur 3.17) plasserte *Arhodomonas sp.* seg under ordenen *Oceanospirillales*. To kloner fra bibliotek M21 viste seg å ha sekvenslikhet med en udyrket Gamma-Proteobacterium clone OM60, mens en klon fra M21 viste sekvenslikhet med den moderat halofile bakterien *Fundibacter jadensis*. En klon fra bibliotek M9 viste sekvenslikhet med den frittlevende og symbiotiske bakterien *Vibrio logei* isolert fra marint miljø. Det var også en klon fra M9 som viste sekvenshomologi med den psykrofile bakterien *Moritella sp.*. To av klonsekvensene fra M21 viste homologi med ordenen *Thiotrichales* og slekten *Cycloclasticus*. *Cycloclasticus* er en obligat aerob bakterier som bruker aromatiske forbindelser som energi- og karbonkilde. Denne bakterien har blitt isolert fra oljeutslipp i marint miljø.

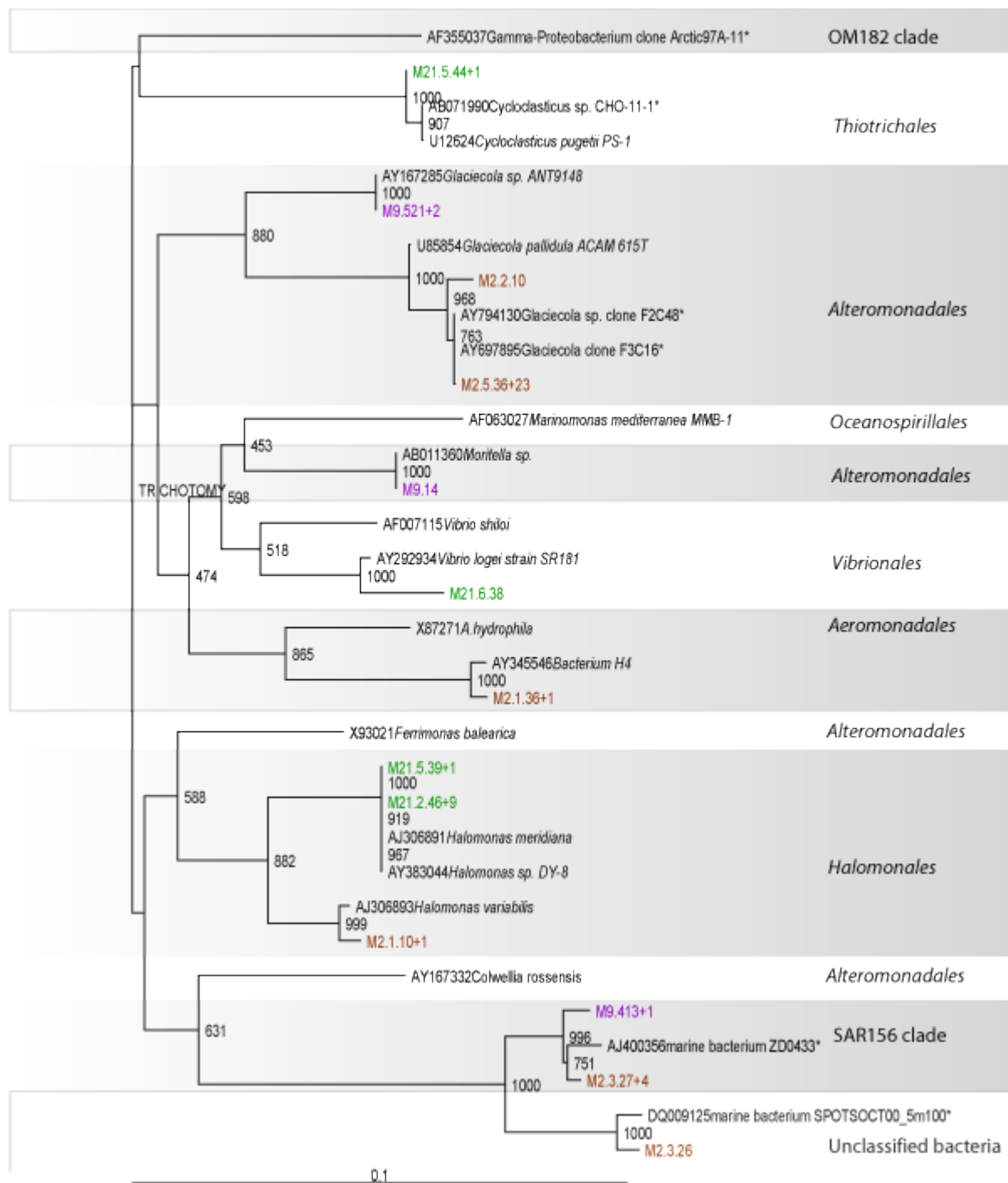
Tjueto kloner fra bibliotek M2, 30 kloner fra bibliotek M9 og 9 kloner fra M21 (figur 3.16) dannet egne grener av uklassifiserte bakterier innenfor klassen *γ-Proteobacteria*. Disse klonene hadde mellom 93-99 % sekvenslikhet med uklassifiserte sekvenser fra BLAST databasen GenBank, og mellom 35-80 % sekvenslikhet med dyrkede bakterier i databasen.

M2.3.44 og M9,17 ble ikke tatt med i det fylogenetiske treet fordi de var dårlige sekvenser.

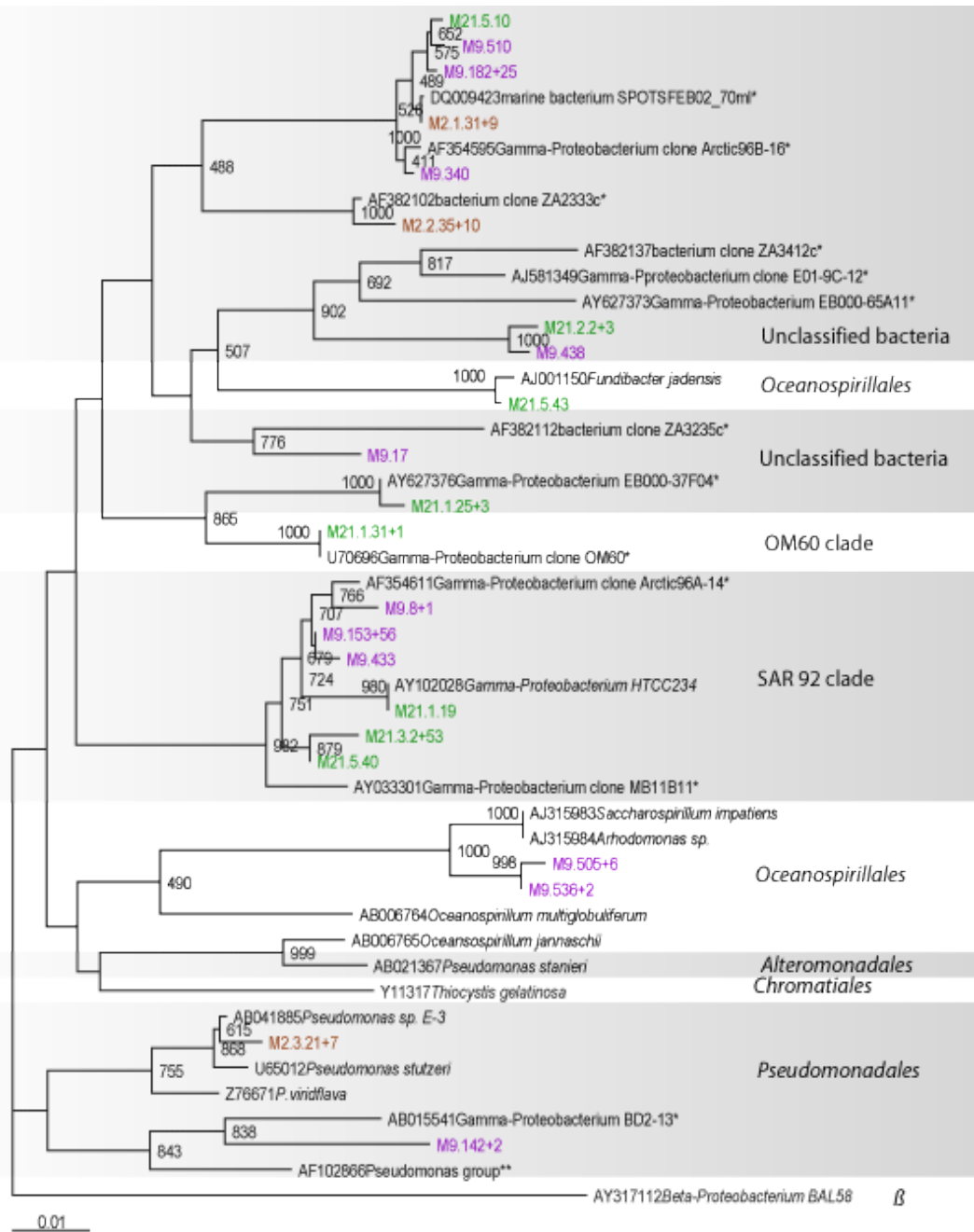
Gamma-Proteobacteria



Figur 3.16: Denne figuren viser hvilke 11 ordner og grupper av underklassen γ -Proteobacteria som kloner fra klonbibliotek M2, M9 og M21 plasserte seg innenfor.



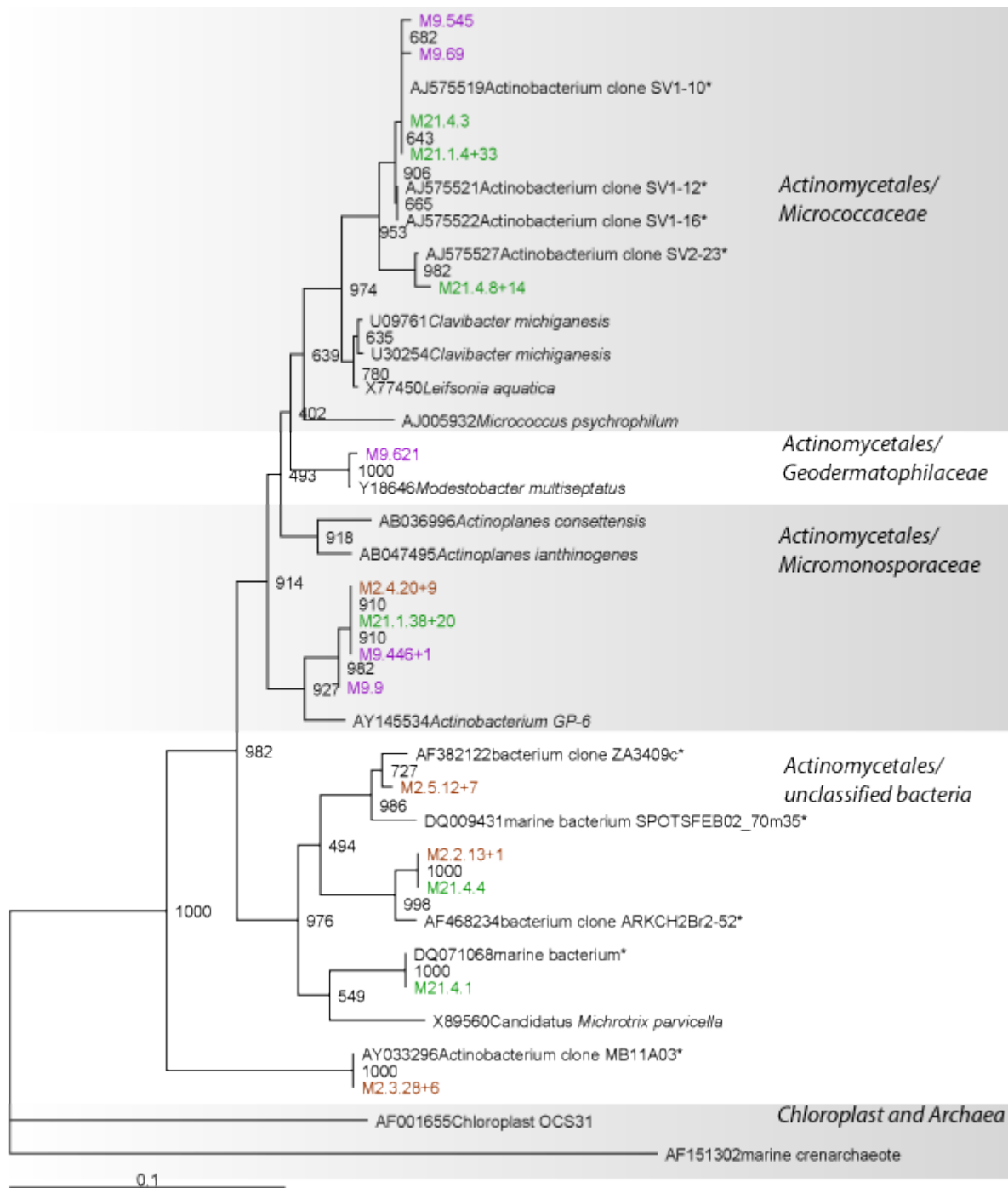
Figur 3.17: Dette treet viser det fylogenetiske slektskapet mellom 16S rDNA-sekvenser som tilhører fylum Proteobacteria og underklassen γ -Proteobacteria. Kloner fra klonbibliotek M2 er merket brun, kloner fra M9 merket lilla, og kloner fra M21 merket grønn. Bakterier som ikke har vært dyrket er merket med *. Målestokken viser en sekvensforskjell på 10 % forskjell i nukleotidrekkefølgen (0,1 forandring per nukleotid). Bootstrapverdien er tallet ved forgreningspunktet og viser hvor ofte sekvensen forgrener seg slik etter 1000 gangers gjentak.



Figur 3.18: Dette tre er en fortsettelse av det fylogenetiske slektskapet mellom 16S rDNA-sekvenser som tilhører fylum Proteobacteria og underklassen γ -Proteobacteria. Kloner fra klonbibliotek M2 er merket brun, kloner fra M9 merket lilla, og kloner fra M21 merket grønn. Bakterier som ikke har vært dyrket er merket *, og uklassifiserte bakterier er merket **. Målestokken viser en sekvensforskjell på 10 % forskjell i nukleotidrekkefølgen (0,1 forandring per nukleotid). Bootstrapverdien er tallet ved forgreningspunktet og viser hvor ofte sekvensen forgrener seg slik etter 1000 gangers gjentak.

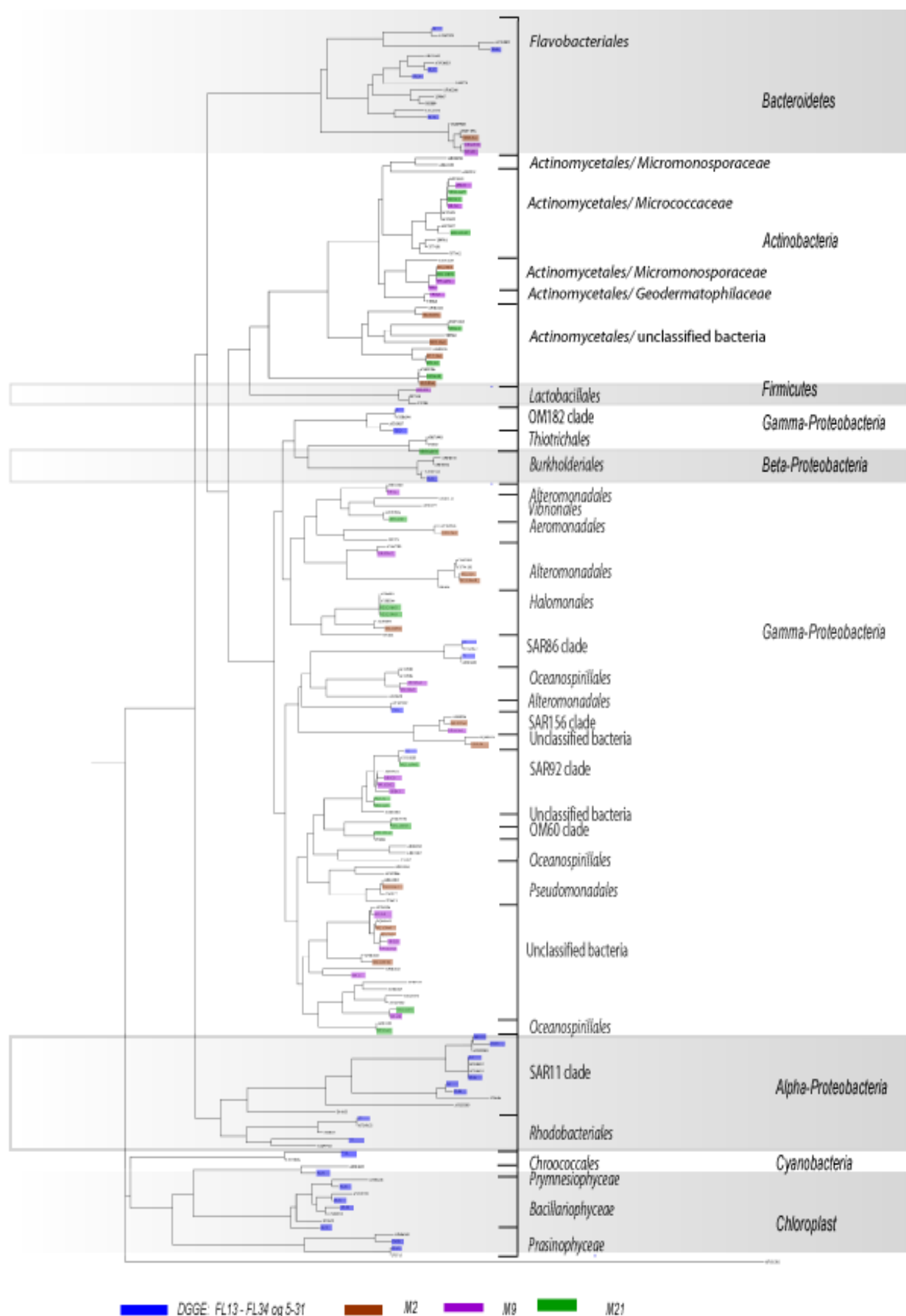
Fylumet *Actinobacteria* (figur 3.19) var den nest største grenen bestående av 106 klonsekvenser fra klonbibliotek M2 (27 sekvenser), M9 (6 sekvenser) og M21 (73 sekvenser). Den største familien innenfor de gram-positive actinobakteriene var familien *Micrococcaceae* bestående av 2 kloner fra bibliotek M9 og 50 kloner fra M21. De fleste klonene innefor denne familien viste sekvenslikhet til arter isolert fra ferskvannshabitat. En annen stor gruppe av kloner (10 sekvenser fra M2, 3 sekvenser fra M9 og 21 sekvenser fra M21) grupperte seg innenfor familien *Micromonosporaceae*. Ti sekvenser fra M2, 3 sekvenser fra M9 og 21 sekvenser fra M21 viste seg å ha sekvenslikhet med den mycelium- og sporedannende slekten *Actinoplanes*. Etter fylogenetiske studier viste det seg at klonene som hadde sekvenslikhet med *Actinoplanes* var mer lik klonsekvenser fra bibliotekene enn sekvensene fra BLAST databasen GenBank. En klon viste sekvenslikhet med *Modestobacter multiseptatus*, som er en knoppformerende actinomycete isolert fra transantarktiske fjell.

Sytten kloner fra bibliotek M2 og 2 kloner fra M21 dannet en egen gren av uklassifiserte bakterier sammen med Candidatus *Michrotrix parvicella*. Candidatus *Michrotrix parvicella* er en filamentøs bakterie isolert fra kloakksystem. Klonene viste seg å ha mellom 97-99 % sekvenslikhet med andre uklassifiserte sekvenser innenfor ordenen Actinomycetales og 36-73 % sekvenslikhet med dyrkede bakterier fra BLAST databasen GenBank. Syv kloner fra bibliotek M2 (99 % sekvenslikhet) dannet en egen gren sammen med den udyrkede actinobacterium clone MB11A03 påvist i marint miljø. De 7 klonene og den udyrkede actinobacterium clone MB11A03 var 30-40 % lik dyrkede bakterier (eksempel: *Micrococcus antarcticus*, *Arthrobacter* og *Clavibacter michiganensis*) tilhørende ordenen *Actinomycetales*. Det ble også påvist 1 klon i klonbibliotek M21 med 98 % sekvenslikhet til den udyrkede actinobacterium clone MB11A03. Denne sekvensen er ikke tatt med i de fylogenetiske studiene fordi det var en dårlig sekvens.



Figur 3.19: Dette treet viser det fylogenetiske slektskapet mellom 16S rDNA-sekvenser som tilhører fylum Actinobacteria. Det er også tatt med en sekvens tilhørende domenet Archaea og en 16S sekvens fra kloroplast tilhørende en eukaryot alge. Kloner fra klonbibliotek M2 er merket brun, kloner fra M9 merket lilla, og kloner fra M21 merket grønn. Bakterier som ikke har vært dyrket er merket med *. M21+1 = 2 klon, mens M21.1.4 = 1 klon. Målestokken viser en sekvensforskjell på 10 % forskjell i nukleotidrekkefølgen (0,1 forandring per nukleotid). Bootstrapverdien er tallet ved forgreningspunktet og viser hvor ofte sekvensen forgrener seg slik etter 1000 gangers gjentak.

For å sammenstille resultatene oppnådd ved fingerprintanalysen (PCR-DGGE) med klonbibliotekresultatene (M2, M9 og M21) ble det laget et nytt fylogenetisk tre av alle de 404 sekvensene (figur 3.20). Den største fylogenetiske gruppen var underklassen *γ-Proteobacteria* bestående av 6 sekvenser fra DGGE og 256 sekvenser fra klonbibliotekene. Sekvenser fra DGGE-bånd er merket blå, mens klonsekvenser er merket brun (M2), lilla (M9) og grønn (M21) på figur 3.20. Fjorten sekvenser fra klonbibliotekene og 5 sekvenser fra DGGE grupperte seg innenfor klassen *Bacteroidetes*, mens 1 sekvens fra klonbibliotekene grupperte seg innenfor klassen *Firmicutes*. Det var bare sekvenserte bånd fra DGGE som grupperte seg innenfor underklassen *α-Proteobacteria* (8 sekvenser), underklassen *β-Proteobacteria* (1 sekvens), klassen *Cyanobacteria* (1 sekvens) og gruppen Chloroplast (7 sekvenser). De resterende sekvensene fra klonbibliotek M2, M9 og M21 grupperte seg innenfor klassen *Actinobacteria* (106 sekvenser).



Figur 3.20: Dette treet viser det fylogenetiske slektskapet mellom 16S rDNA-sekvenser fra klonbibliotekene, DGGE og deres nærmeste slektninger i BLAST GeneBank. Kloner fra klonbibliotek M2 er merket brun, kloner fra M9 merket lilla, og kloner fra M21 merket grønn. Sekvenserte bånd fra prøve 1-28 er merket blå. Nukleotidsekvenser editert og sammenstilt i Bioedit har blitt laget et fylogenetisk tre ut av ved hjelp av programmer i PHYLIP-pakken (punkt 1.6.6).

3. Diskusjon.

Det globale havet danner et integrert system styrt av uavhengige fysiske, kjemiske og biologiske prosesser. Havet representerer det største habitatet på jorden, og rommer den største mikrobielle biomassen og dermed de største mikrobielle populasjonene på jorden. Det har derfor vært en stor utfordring innen mikrobiologisk forskning å identifisere noen av disse organismene. En innføring av molekylære metoder i økologiske studier har gjort det mulig å identifisere en rekke av de mikrobielle gruppene i de ulike hav. Ribosomale (RNA) gener blir benyttet som en universell fylogenetisk markør for identifisering og navngiving av mikrobielle planktongrupper (Giovannoni og Rappé, 2000). Likevel er det bare 1-10 % av bakteriene til stede i marint miljø som har blitt dyrke og isolert i laboratoriet. EU-prosjektet MIRACLE har hatt som mål å kunne øke datamengden, som igjen vil bidra til økt forståelse av det marine økosystemets sammensetning og funksjon. I masteroppgaven har årtidsvariasjoner hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden 2003 blitt studert ved å kombinere ulike metoder som DAPI, CARD-FISH, DGGE og kloning.

4.1 Fysiske, kjemiske og biotiske forhold i Raunefjorden.

Totalt antall bakterier (DAPI) i Raunefjorden 2003 varierte mellom $1,0 \cdot 10^5$ og $1,6 \cdot 10^6$ celler per ml sjøvann. Dette resultatet stemmer med teorien som sier at bakterietallet i sjøvann er relativt konstant (10^5 - 10^6 celler/ml)(Thingstad, 2003; Giovannoni og Sting, 2005). Fluorescens målt i prøver fra Raunefjorden varierte fra 0,83 til 5,54 μg klorofyll per liter sjøvann. I perioden 15. februar til 27. april 2000 målte Larsen et al. (2004) fluorescens i sjøvannsprøver høstet fra Raunefjorden, og påviste et klorofyllmaksimum på ca. 3,5 $\mu\text{g/l}$. Resultatet fra DAPI-tellingene (figur 3.2) viste videre en algeoppblomstring i perioden 25. februar til 8. april etterfulgt av en kraftig bakterieoppblomstring i perioden 22. april til 8. juli 2003 i Raunefjorden. Totalmengden av bakterier var også lav når mengde alger var høy og motsatt. Dette er i samsvar med tidligere studier av diatomèrvåroppblomstringen ved vestkysten av Norge (Bratbak et al., 1990) og studier utført ved blant annet kysten av Belgia, Nova Scotia og Alaska (Andersen og Sørensen, 1986; Billen og Fontigny, 1987; Li og Dickie, 2001; Yager et al., 2001). Disse studiene viste en diatomoppblomstring som ble etterfulgt av en økning i bakteriekonsentrasjonen. Algeoppblomstringen man får langs Norskekysten om våren har vist seg å skyldes en kombinasjon av økning i mengde sollys (Erga og Heimdal, 1984), økt tilgang på næringsstoffer og en temperaturøkning i vannet (Larsen et al., 2004). I perioden 22.april-8.juli økte temperaturen i sjøvannet (figur 3.1) samtidig som det ble observert en bakterieoppblomstring. Det er mye som

tyder på at økt tilgang på løselige næringssalter som følger av økt algebiomasse kan være årsaken til oppblomstringen av bakterier. Løselig dimetylsulfonopropionat (dDMSP)(Ledyard og Dacey, 1994) og løselig organisk karbon (DOC)(Bratbak et al., 1998) er to næringssalter som er viktige for vekst, og i tillegg til at de er viktige komponenter i biomassen hos marine plankton. Næringssaltene dDMSP og DOC kan frigis fra alger ved virus- (Malin et al., 1998) eller dyreplanktonangrep (Dacey og Wakeham, 1986), og vil da kunne bidra til økt vekst av heterotrofe bakterier (Pernthaler og Amann, 2005).

Analyser av bakteriesamfunnet og arkesamfunnet i sjøvannsprøvene med fluorescens *in Situ* hybridisering (CARD-FISH), viste en økning i antall bakterier i løpet av sommeren, med en påfølgende nedgang om høsten. Pernthaler et al. (2002) har rapportert et liknende resultat i overflatesjøvann fra Nordsjøen høstet i perioden januar til desember 1998. Her fant de en økning i antall bakterier om sommeren (52-91 % av totalt antall celler), mens antall bakterier var mindre om høsten. I 1999 studerte Murray et al. prøver høstet fra overflatevann nær Anvers island (Antarktis), og påviste en større bakteriepopulasjon om sommeren ($38,5 \cdot 10^4$ celler/ml) enn om vinteren ($6,0 \cdot 10^4$ celler/ml). Det er mulig at økningen i antall probe-merkede celler om sommeren kan skyldes at bakteriene går inn i en aktiv vekstfase som igjen fører til en økning i mengde ribosomer i cellen. Dette vil da føre til en økning i antall bakterier som følger av økt ribosomal innhold, og da rRNA operoner, fremfor en økning i antall bakterier (Øvreås et al., 2003). Det er også en mulighet for at totaltallet telt ved DAPI kan være overestimert, som følger av at DAPI-fargen, som binder seg til DNA, ikke skiller mellom levende og døde celler. Dette problemet har man ikke med FISH som kun binder seg til rRNA-molekyler som produseres når cellen er i en vekstfase. FISH vil da kun påvise levende celler.

Analyser av arkesamfunnet i Raunefjorden 2003 viste et høyere antall av arker i prøve 6, 19, 27 og 28 høstet henholdsvis 11. mars, 17.juni, 28.oktober og 26.november. Resultatet etter hybridisering viste at antall arker utgjorde mellom 6 % til 26,9 % av totalt antall celler, og at antall arker var høyest om våren, en liten periode om sommeren og om høsten. Et liknende resultatet påviste Pernthaler et al. (2002) i sjøvannsprøvene høstet fra Nordsjøen, hvor antall probe-merkede arker var høyest om våren (26 % av totalt antall celler) og sommeren (31 % av totalt antall celler). Pernthaler et al. (2002) påviste også en større populasjon av euryarchaeota i overflatevann om våren og sommeren, mens crenarchaeota, som er assosiert med dypere vannlag, ble bare påvist i mindre mengder. Dette resultatet kan antyde en oppblomstring av pelagiske euryarchaeota i Nordsjøen om våren og sommeren.

Det ble også påvist en økning i antall arker i sjøvannsprøver høstet fra Raunefjorden vinteren 2003. Denne økningen av arker samsvarer med Murray et al.(1999) som estimerte ut fra FISH resultatene

at *Archaea* utgjorde mellom 7-36 % av det totale picoplankton rRNA i overflatevann om vinteren ved Antarktis. Det er fortsatt usikkert hvilke faktorer som påvirker veksten av arkepopulasjoner i det marine miljø. Likevel er det studier som tyder på at arker kan være kjemoautotrofe og at de kan fikse uorganisk karbon (Herndl et al., 2005; Pearson et al., 2001; Wuchter et al., 2003). Det har også blitt gjort studier av planktoniske arker som indikerer at de kan ta opp aminosyrer for biomasseproduksjon (Overney og Fuhrman, 2000).

Mulige årsaker til at det er større mengder av bakterier i forhold til arker kan skyldes en bedre konkurransevne hos bakterier til å omsette akkumulerende organiske stoffer. Det kan også hende at arker benytter andre kilder enn organiske stoffer som karbon- og energikilde (Church et al., 2003).

4.3 Samfunnsprofiler.

Samfunnsprofilene viste en kompleks sammensetning av bakteriesamfunnet i alle prøvene. Det ble i gjennomsnitt påvist 17 bånd i alle samfunnsprofilene, og hvor 3 av båndene var tilstede i alle prøvene. Tjueen av båndene ble kun påvist i noen av prøvene. Under algeoppblomstringen var det mange bånd med varierende intensitet. Da bakterieoppblomstringen overtok ble det påvist færre antall bånd og bånd med sterkere intensitet. Endringen i samfunnsprofiler fra algeoppblomstringen og til bakterieoppblomstringen kan skyldes en økning av fritt organisk løselige forbindelser i det marine økosystemet som følger av en nedgang i algeoppblomstringen. En frigjøring av organisk løselige forbindelser kan dermed føre til en økt vekst av bakteriepopulasjoner (González et al., 2000).

Sekvensering av totalt 27 bånd viste en dominans av α -proteobakterier og γ -proteobakterier. Bano og Hollibaugh (2002) studerte bakterioplanktonsamfunn i det arktiske hav og fant at 36 % av 88 kloner grupperte seg innenfor underklassen *α -Proteobacteria*, mens 32 % grupperte seg innenfor underklassen *γ -Proteobacteria*. Venter et al. (2004) påviste også en dominans av α -Proteobakterier og γ -proteobakterier i sjøvannsprøver hentet fra Sargassohavet. Fylogenetiske analyser av 16S rDNA fra Raunefjorden analysert på DGGE viste at sekvenserte bånd klassifisert innenfor *α -Proteobacteria* fordelte seg på 2 forgreninger. Den største grenen var SAR11-gruppen bestående av 2 sekvenserte bånd med sekvenshomologi til dyrkede bakterier og 4 sekvenserte bånd med sekvenshomologi til udyrkede bakterier isolert fra overflatevann. SAR11-gruppen karakteriseres av små vibrioformede bakterier og er rapportert å være dominerende i marine miljøer. I tillegg har det blitt påvist fylogenetiske slektninger av SAR11 i permanent anaerobe marine sedimenter og ferskvannsinnsjøer (Giovannoni og Rappé, 2000). Sekvenser av SAR11-bakterier i følge Rappé et al. (2002) utgjør til sammen 26 % av alle ribosomale RNA gener som har blitt identifisert i sjøvann,

og var også dominerende i sjøvannsprøver høstet fra Raunefjorden.

Et bånd (FL34 og 14), som var tilstede under hele årssyklusen og med sekvenslikhet til *Pelagibacter ubique*, dominerte i alle sjøvannsprøvene (figur 3.7 og 3.8), og da spesielt under bakterieoppblomstringen. SAR11-bakterien *Pelagibacter ubique* har blitt beskrevet i mange marine klonbibliotek-studier (Suzuki et al., 2004; Rappé et al., 2002; Simu og Hagström, 2004), og ble for første gang isolert fra Sargassohavet av Rappé et al (2002). Siden den gang har *Pelagibacter ubique* blitt isolert og genomet er fullsekvensert. Sekvenseringen gjorde at det ble påvist gener for proteorhodopsin hos *Pelagibacter ubique*. Proteorhodopsin, som i seinere tid har vist seg å være svært vanlig i marint miljø, er et protein som gjør det mulig for bakterien til å kombinere energi fra sollys med karbonsyklusen i havet (Béjà et al., 2000; Giovannoni et al., 2005). Evnen til å utnytte lysenergi ved hjelp av proteorhodopsin kan muligens være en forklaring på hvorfor sekvenser med sekvenshomologi til *Pelagibacter ubique* var så dominerende i alle prøvene høstet fra Raunefjorden. Fire av båndene som viste likhet med SAR11-gruppen var dominerende i prøver høstet i begynnelsen-, under- og etter bakterieoppblomstringen. To av disse båndene viste seg å ha sekvenslikhet med en udyrket α -Proteobacterium clone MB11F01 og 2 bånd viste seg å ha sekvenslikhet (96-97 %) med en uidentifisert Cytophagales clone OM155. Yager et al. (2001) fant at SAR11 sekvenser var tilstede i DGGE profiler tatt fra prøver høstet før og etter en algeoppblomstring i Chuckchisjøen i Alaska. Dette resultatet kan dermed tyde på at SAR11-gruppen består av organismer med ulike næringskrav og evner til å utnytte løselige næringsstoffer til forskjellige tider og under varierende forhold av alge- og bakterieoppblomstringen.

En annen gren innenfor α -Proteobakteriene utgjorde ordenen *Rhodobacteriales* bestående av 1 bånd med sekvenslikhet til slekten *Roseobacter* og 1 bånd med sekvenslikhet til slekten *Rhodobacter*. *Roseobacter* ble påvist i prøver høstet etter bakterieoppblomstringen i Raunefjorden. Representanter innenfor slekten *Roseobacter* har vist seg å kunne nedbryte dimetylsulfoniopropionat (DMSP) til løselig organisk svovel (González et al., 2000). Det er derfor mulig at *Roseobacter* kan ha utnyttet DMSP som ble frigitt etter bakterieoppblomstringen. Slekten *Roseobacter* har blitt funnet i kystmarine miljø og pelagiske marine miljø (González og Moran, 1997; González et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Eilers et al., 2001). En sekvens (bånd 6) fra Raunefjorden, påvist etter bakterieoppblomstringen, viste seg å ha 93 % sekvenslikhet med en udyrket *Rhodobacter*. I 2004 foreslo Venter et al. (2004) at 16S rRNA gensekvenser, som hadde mindre enn 97 % sekvenslikhet til hverandre, sannsynligvis stammer fra ulike arter. Det kunne dermed bety at sekvensen med 93 % likhet til en udyrket *Rhodobacter* sannsynligvis representerte to ulike fylotyper innenfor ordenen *Rhodobacteriales*.

Seks av totalt 27 sekvenserte bånd grupperte seg innenfor underklassen γ -Proteobacteria. To av

disse båndene, som ble påvist i prøver høstet under- og etter bakterieoppblomstringen, viste seg å ha sekvenslikhet med udyrkede bakterier innenfor SAR86-gruppen. Denne gruppen er oppkalt etter de første klonene funnet i prøver fra Sargassohavet, Stillehavet og Atlanterhavet. Studier utført av González et al. (2000) har vist at denne gruppen sammen med *Roseobacter* og SAR11 utgjør over 50 % av bakterie rDNA i prøver tatt fra overflatevann, og at de er svært dominerende i oppblomstringer av bakterioplanktonsamfunn. Genomet til SAR86 er fullsekvensert og resultater fra dette har vist at proteorhodopsinen er tilstede. Det er derfor mye som tyder på at SAR86 er spesialisert i å utnytte lysenergien og næringsstoffene i den fotske sonen (Giovannoni og Sting, 2005).

To sekvenserte bånd fra prøver høstet i Raunefjorden viste seg å ha likhet med undeklassen γ -Proteobakterier og gruppen OM182. Denne gruppen ble for første gang isolert fra kysten av Cape Hatteras i Nord Carolina av Rappé et al. (1997) og inneholder flere nylig isolerte sekvenser fra marint miljø. Det ene båndet, som viste sekvenslikhet med en udyrket γ -Proteobacterium isolert fra Arktis, ble kun påvist i prøver høstet før- og under algeoppblomstringen. I perioden før- og under algeoppblomstringen var de fysiske forholdene i Raunefjorden styrt av kaldt saltholdig sjøvann med en gradvis omrøring (temperatur 3-5,5 °C og salinitet 31-33 ‰ og turbiditet 0,03-0,27 ‰). Det andre båndet, som viste sekvenslikhet med en dyrket γ -Proteobacterium HTCC2188 isolert fra Oregonkysten, ble påvist i prøver høstet i slutten- og etter bakterieoppblomstringen. Marin γ -Proteobacterium HTCC2188 (Cho og Giovannoni, 2004) har vist seg å være en oligotrof bakterie som foretrekker en DOC konsentrasjon mellom 1,0-4,5mg/liter, noe som muligens kan forklare hvorfor det kun ble påvist sekvenser med homologi til marin γ -Proteobacterium HTCC2188 i slutten- og etter bakterieoppblomstringen i Raunefjorden 2003.

SAR92 er en gruppe innenfor γ -Proteobakteriene som har blitt funnet i klonbibliotek basert på prøver høstet fra åpent hav og kystområder (Cho og Giovannoni, 2004; Britschgi og Giovannoni, 1991; Connon og Giovannoni, 2002). Denne gruppen inneholder en blanding av dyrkede og udyrkede marine organismer. Et bånd, som dominerte i prøver høstet i slutten av bakterieoppblomstringen i Raunefjorden, viste sekvenslikhet med en bakterie innenfor SAR92.

Det ble også funnet et bånd i begynnelsen av bakterieoppblomstringen med sekvenslikhet til β -Proteobakterien *Beta-Proteobacterium clone BAL58*. *Beta-Proteobacterium clone BAL58* har blitt isolert fra Østersjøen (Simu og Hagström, 2004), som er et marint miljø med mye ferskvannsavrenninger. Et bånd, med sekvenslikhet til den sykrofile γ -Proteobakterien *Colwellia rossensis* (Brinkmeyer et al., 2003), ble påvist i prøver høstet før- og under algeoppblomstringen, og i begynnelsen av bakterieoppblomstringen. *Colwellia rossensis* er en fakultativ anaerob kjemoheterotrof bakterie som krever natrium- og magnesium-ioner for å opprettholde

cellestrukturen. Den trives best i marint miljø med temperatur under 15°C og har vært isolert fra Rossjøen i Antarktis (Bowman et al., 1998).

Fem av de 27 sekvenserte båndene grupperte seg innenfor klassen *Bacteroidetes* og ordenen *Flavobacteriales*. *Bacteroidetes* viser seg å være vanlig i marine miljøer (Eilers et al., 2001; Cottrell og Kirchman, 2000; Kirchman et al., 2003) og da spesielt knyttet opp mot diatomeroppblomstringer. Alle de fem sekvenserte båndene ble påvist i prøver høstet under algeoppblomstringen. Ett bånd (FL17) var også tilstede i prøver høstet under bakterieoppblomstringen. Resultatet kunne dermed tyde på at bakterier innenfor denne gruppen hadde en viktig rolle under algeoppblomstringen (Pinhassi et al., 2004). Tidligere studier har vist at medlemmer av *Flavobacteriales* kan vokse på medier med høyt innhold av løselige proteiner (Pinhassi et al., 1999; Cottrell og Kirchman, 2000), noe som kanskje kan forklare deres dominans under algeoppblomstringen.

I alle prøvene som vi har analysert er prøvene forfiltrert med et 2,0µm polykarbonatfilter for å fjerne alger større enn 2 µm. Dette resulterte i at alger mindre enn 2,0µm ble fanget opp av DGGE-primer, ettersom kloroplaster også inneholder 16S rRNA gener, og 16S sekvenser fra kloroplaster påvist i sjøvannsprøvene (Rappé et al., 1998). Syv av totalt 27 sekvenserte bånd viste seg å ha sekvenslikhet med 16S i kloroplaster hos alger. Tre av disse båndene viste seg å ha sekvenslikhet med kloroplaster i diatomèrer (*Skeletonema pseudocostatum*, *Cymatosira belgica* og *Stephanodiscus minutulus*). 16S sekvensene fra kloroplastene ble alle påvist i en sjøvannsprøve høstet 25.mars 2003 (figur 3.7, prøve 8) under algeoppblomstringen. I tillegg ble det påvist 16S sekvenser med sekvenslikhet til familien *Prymnesiophyceae*. Larsen et al. (2004) fikk et liknende resultat da de studerte fyttoplanktonvåroppblomstringen i Raunefjorden 2000. Resultatet til Larsen et al. viste en diatomèr oppblomstring i midten av mars som ble etterfulgt av en *Prymnesiales*-oppblomstring. En nedgang i næringssaltkonsentrasjonen ble målt i slutten av diatomeroppblomstringen, og Larsen et al. antok at nedgangen kunne være en av grunnene til opphøringen av diatomèr oppblomstringen. Nedgangen i næringssaltkonsentrasjonen kan også være en av grunnene til at bakteriekonsentrasjonen i sjøvannsprøven høstet 25.mars 2003 var lav (DAPI-telling og DGGE). I sjøvannsprøver høstet etter 25.mars ble det på ny en økning i antall bånd og antall DAPI-fargede celler da *Prymnesiales*-oppblomstringen førte til en frigivelse av nye næringssalter (Larsen et al., 2004).

To sekvenserte bånd viste seg å ha sekvenslikhet til familien *Prasinophyceae* bestående av små flagellerte celler med klorofyll *a* og *b* (Rappé et al., 1998). På grunn av deres enkle cellemorfologi, som har gjort det vanskelig å påvise dem i marint miljø, er det derfor lite informasjon om Prasinofytter.

Et bånd ble påvist i sjøvannsprøver høstet i slutten av bakterieoppblomstringen og viste seg å ha 95

% sekvenslikhet med *Synechococcus sp. WH8016* (Fuller et al., 2003). Det sekvenserte båndet ble påvist i prøver høstet mot slutten av bakterieoppblomstringen, og er sannsynligvis av en annen fylotype (Venter et al., 2004) enn *Synechococcus sp. WH8016*. Tidligere studier av cyanobakteriesamfunnet i Raunefjorden (Larsen et al., 2004) viste at *Synechococcus* dominerte før, mellom og etter algeoppblomstringene, noe som kan stemme med mine resultater. Det er også studier som tyder på at marine encellede cyanobakterier, som *Synechococcus*, er spesialister på å utnytte næringsstoffer som frigis i perioder med oppvelling og vertikalmiksing av vannmasser (Giovannoni og Sting, 2005). *Synechococcus* har blitt isolert fra Rødehavet og flere marine miljøer (Fuller et al., 2003; Palenik, 1994; Palenik, 2001).

4.4 Bakteriesamfunnet før-, under- og etter en algeoppblomstring.

På bakgrunn av samfunnsprofilene ved DGGE og totaltallet telt ved DAPI ble det valgt å lage et klonbibliotek av prøve 2 (totalt 92 kloner), et av prøve 9 (totalt 128 kloner) og et av prøve 21 (totalt 159 kloner). Disse prøvene skulle da representere bakteriesamfunnet før, under og etter algeoppblomstringen for dermed å kunne gi et svar på om bakteriesamfunnet endret seg under en algeoppblomstring.

γ -Proteobakterier dominerte i alle de tre klonbibliotekene (M2= 43,5 %, M9= 63,3 %, M21= 45,3 %). Denne gruppen har også vist seg å være svært utbredt og dominerende i andre klonbibliotek, deriblant prøver høstet fra Sargassohavet (Venter et al., 2004) og prøver tatt fra is på Antarktis og Arktis (Brinkmeyer et al., 2003). Tjuefem kloner fra klonbibliotek M2 og 2 kloner fra M9 viste seg å ha sekvenslikhet med slekten *Glaciecola* innenfor ordenen *Alteromonadales*. Denne slekten var størst på våren med lave temperaturer (4-5°C), høy salinitet (31-32 ‰) og moderat næringsinnhold, og har blitt isolert fra kalde miljøer som Antarktis og Arktis (Brinkmeyer et al., 2003).

Fjorten kloner fordelte seg på to fylogenetiske grener innenfor den halofile ordenen *Halomonales*. To sekvenser fra klonbibliotek M2 viste seg å ha sekvenshomologi med *Halomonas variabilis*. Karakterisering av *Halomonas variabilis* har vist at denne arten er en kremfarget vibrioformet bakterie som trives i miljøer med moderat salinitet (7-30 ‰) og moderate temperaturer (15-37°C). *Halomonas variabilis* ble for første gang isolert fra Great Salt Lake i Utah (USA) (Arahal et al., 2002). Tolv kloner fra M21 viste seg å ha sekvenslikhet med *Halomonas meridiana* og *Halomonas sp. DY-8*, og plasserte seg på en annen fylogenetisk gren innenfor ordenen *Halomonales*. *Halomonas meridiana* ble første gang isolert fra Hypersaline innsjøer på Antarktis (Arahal et al., 2002), og er en hvit-farget stavformet bakterie som trives best i næringsrikt moderat salint sjøvann

(1-20 ‰ og 0-55°C). Resultater fra mine studier kunne antyde at *Halomonas variabilis* trives best i sjøvann med høyt saltinnhold og moderat næringsinnhold, mens *Halomonas meridiana* foretrakk varmt sjøvannet med lav salinitet og mye næringinnhold.

To kloner fra M21 viste sekvenshomologi med slekten *Cycloclasticus* og den udyrkede *Cycloclasticus* sp. clone CHO-11-1. *Cycloclasticus* har blitt rapportert som en nedbryter av aromatiske hydrokarboner, og da ofte polysykliske aromatiske hydrokarboner (Geiselbrecht et al., 1996; Geiselbrecht et al., 1998). Den udyrkede *Cycloclasticus* sp. clone CHO-11-1 har blitt påvist ved Mikunikysten etter et oljeutslippet i 1997 i Nakhodka (Maruyama et al., 2005).

Kloner med sekvenshomologi med marine bakterier innenfor ordenen *Oceanospirillales* fordelte seg på to ulike fylogenetiske grener. Den ene grenen bestod av 7 kloner fra M9 med sekvenslikhet til *Saccharospirillum impatiens* og 3 kloner fra M9 med sekvenslikhet til *Arhodomonas* sp. Den andre grenen bestod av 2 kloner fra klonbibliotek M21 med sekvenslikhet til arten *Fundibacter jadensis*. *Saccharospirillum impatiens* og *Arhodomonas* sp. er begge isolert fra hypersaline Ekho Lake i Antarktis (Labrenz et al., 2003; Lawson og Labrenz, unpubl.). *Saccharospirillum impatiens* er en microaerofil spirill som kan vokse ved 16-33°C og kan bruke nitrat og ulike hydrokarboner som næringskilde. Den moderat halofile *Fundibacter jadensis* er isolert fra intertidale sedimenter ved Nordsjøkysten av Tyskland og kan nedbryte hydrokarboner, samt redusere nitrat (Bruns og Berthe-Corti, 1999). Det er derfor grunn til å tro at også kloner fra M9 og M21 med sekvenslikhet til *Saccharospirillum*, *Arhodomonas* og *Fundibacter jadensis* har en evne til å utnytte næringssaltene som blir frigitt under algeoppblomstringen (Larsen et al., 2004). *Arhodomonas* sp. er i BLAST databasen GenBank klassifisert under *Chromatiales*, men i mine fylogenetiske analyser grupperte den seg innenfor ordenen *Oceanospirillales*.

Det var også kloner fra M2 og M9 som grupperte innenfor ordenen *Pseudomonadales*. Åtte klonene fra M2 viste seg å ha sekvenslikhet til den heterotrofe bakterien *Pseudomonas stutzeri*, som har evne til denitrifisering og til å nedbryte aromatiske forbindelser (Garciavaldes et al., 1989; Carlson og Ingraham, 1983). Det var også 3 kloner (M9) med sekvenslikhet til en uklassifisert *Pseudomonas*-gruppe påvist som symbiont i *Bankia setacea* (skipsru) (Sipe et al., 2000).

En klon (M21) viste seg å ha sekvenslikhet med *Vibrio logei*. *Vibrio logei* tilhører den godt studerte ordenen *Vibrionales* som også er svært divers bestående av frittlevende og symbiotiske arter (Nishiguchi og Nair, 2003). En av klonene fra klonbibliotek M9 viste sekvenslikhet med ordenen *Alteromonadales* og slekten *Moritella* sp.. *Moritella* er en av de mest kjente sykrofile bakteriene isolert fra marine miljø og gikk tidligere under navnet *Vibrio marinus* (Russell, 1891; Colwell og Morita, 1964). I seinere tid har fylogenetiske studier vist at *Vibrio marinus* er svært ulik andre arter innenfor ordenen *Vibrionales*, og har derfor blitt endret til slekten *Moritella* (Urakawa et al., 1999).

Giovannoni et al. (1990) og Britschgi og Giovannoni (1991) påviste en rekke nye sekvenser fra udyrkede organismer i sjøvannsprøver høstet fra Sargassohavet. Disse sekvensene viste seg å være fylogenetisk forskjellig fra andre dyrkede organismer, og ble derfor kalt SAR etter det første oppdagelsesstedet. To av gruppene som ble identifisert i sjøvann fra Sargassohavet var SAR156 og SAR92. Fem kloner fra M2 og 2 kloner fra M9 viste sekvenslikhet til gruppen SAR156 (Suzuki og DeLong, 2002) og den udyrkede marine bacterium ZD0433 påvist i sjøvannsprøver fra Nordsjøen (Zubkov et al., 2002). SAR156 var det opprinnelige navnet i databasen RDP på sekvenser som nå plasseres under den svært dominerende SAR86-gruppen (González et al., 2000). Seksti kloner fra klonbibliotek M9 og 56 kloner fra M21 viste sekvenshomologi til organismer innenfor SAR92-gruppen. SAR92 har blitt isolert fra nær kysten til det åpne hav (Britschgi og Giovannoni, 1991; Bano og Hollibaugh, 2002; Cho og Giovannoni, 2004). Det var flest kloner innenfor SAR92-gruppen som viste sekvenshomologi til den udyrkede γ -Proteobacterium clone MB11B11 (M9=58, M21= 55). Udyrket γ -Proteobacterium clone MB11B11 ble for første gang identifisert i rDNA klonbibliotek basert på sjøvannsprøver høstet ved Moss Landing utenfor USA (Suzuki et al., 2001). Siden den gang har det blitt isolert marine bakterier med sekvenslikhet til MB11B11 fra næringsrikt overflatesjøvann (Connon og Giovannoni, 2002; Cho og Giovannoni, 2004). Det er derfor mye som tyder på at arter av udyrket γ -Proteobacterium clone MB11B11 har en evne til å utnytte nærings saltene under plankton oppblomstringen. De fylogenetiske resultatene viste også at kloner fra M9 og M21 plasserte seg i hver sin fylogenetisk gruppe adskilt fra hverandre, og at den fylogenetiske gruppen med M21-kloner plasserte seg nærmere den udyrket γ -Proteobacterium clone MB11B11. Dette resultatet kan muligens forklares ved at kloner fra M9 er høstet under algeoppblomstringen, mens kloner fra M21 er høstet under bakterieoppblomstringen, noe som kan tyde på ulike strategier for utnyttelse av næringsstoffer.

Seks kloner fra M21 viste seg å ha sekvenslikhet med en γ -Proteobakterie innenfor OM60-gruppen. OM60-gruppen inneholder en rekke dyrkede og udyrkede oligotrofe bakterier påvist i blant annet kystnær picoplankton i Nordsjøen og vest-Middelhavet (Cho og Giovannoni, 2004; Eilers et al., 2001; Alonso og Pernthaler, 2005; Connon og Giovannoni, 2002).

I alle de tre klonbibliotekene ble det funnet kloner med sekvenslikhet til uklassifiserte bakterier fra BLAST databasen GenBank (M2= 38,0 %, M9= 31,3 %, M21= 5,7 %). Denne gruppen var størst om våren før og under algeoppblomstringen, men minket betraktelig om sommeren under bakterieoppblomstringen. Dette resultatet kan tyde på at de fleste uklassifiserte bakteriene var tilstede tidlig på våren. Tjueto kloner fra M2, 30 kloner fra M9 og 9 kloner fra M21 viste seg å ha sekvenslikhet med uklassifiserte bakterier innenfor klassen γ -Proteobacteria. En klon fra M9 og 4 kloner fra M21 viste 93-94 % sekvenslikhet med en udyrket γ -Proteobacterium clone EB000-65A11

isolert fra Monterey bay utenfor USA (Suzuki et al., 2004). De uklassifiserte bakteriene har blitt påvist i bakterioplankton og i det Arktiske hav, San Pedrohavet, Monterey Bay, og i en innsjø på Hawaii (Fuchs et al., upublisert; Donachie et al., upublisert; Brown et al., 2005).

45,3 % av klonene fra klonbibliotek M21 grupperte seg innenfor klassen *Actinobacteria*, mens kun 18,5 % fra M2 og 4,7 % fra M9 grupperte seg innenfor *Actinobacteria*. Klassen *Actinobacteria* består av flere bakterier isolert og identifisert i ferskvannshabitat, elveutløp og marint miljø (Crump et al., 1999; Warnecke et al., 2004; Eilers et al., 2001). Det var spesielt to store grupper som skilte seg ut blant Actinobakteriene. Disse to gruppene var familien *Micromonosporaceae* bestående av 34 kloner (M2=10, M9=3, M21=21), og familien *Micrococcaceae* bestående av 52 kloner (M9=2, M21=50). Innenfor familien *Micromonosporaceae* var det flest antall kloner (M2=10, M9=2, M21=21) som viste seg å ha sekvenslikhet med arten *Actinoplanes ianthinogenes* hentet fra BLAST databasen GenBank. Noen av bakteriene innenfor slekten *Actinoplanes* var i begynnelsen klassifisert som *Streptomyces* på grunn av cellenes morfologi, men har siden blitt flyttet til slekten *Actinoplanes*. *Actinoplanes* har blitt isolert fra ferskvannssedimenter og marint miljø (Tamura og Hatano, 2001). Fylogenetiske studier viste at kloner fra Raunefjorden med sekvenshomologi til *Actinoplanes* var mer fylogenetisk lik hverandre og *Actinobacterium GP-6* isolert fra Weserutløpet (Selje og Simon, upublisert), enn til *Actinoplanes ianthinogenes*. Dette resultatet kan derfor tyde på at klonene fra Raunefjorden og *Actinoplanes* er av to ulike fylotyper (Venter et al., 2004).

To kloner fra M9 og 50 kloner fra M21 innenfor familien *Micrococcaceae* viste seg å ha sekvenslikhet med udyrkede actinobakterier isolert fra ferskvann (Warnecke et al., 2004). De fysiske forholdene i Raunefjorden da prøve M21 ble høstet, var preget av lav salinitet, høy temperatur og moderat turbiditet (30 ‰, 12,7°C og 0,58 ‰). Den lave saliniteten kan skyldes mye regn i perioden før prøve 21 ble høstet (www.met.no/observasjoner/maned/2003), noe som igjen kan ha ført til påvisning av flere kloner med sekvenslikhet til ferskvannsrelaterte organismer. Studier utført av Crump et al (2004) har vist at elvemunninger ofte består av en blanding av marine- og ferskvannsbakteriesamfunn som følger av en blanding av disse to miljøene.

En klon fra klonbibliotek M9 viste seg å ha sekvenslikhet med familien *Geodermatophilaceae* og arten *Modestobacter multiseptatus* isolert fra transantarktiske fjell (Mevs et al., 2000). *Modestobacter multiseptatus* har blitt påvist i antarktisk jord hvor humiditeten og temperaturen er lav, samt mye vind (Mevs et al., 2000).

Nitten kloner av totalt 106 kloner kunne ikke klassifiseres nærmere innenfor klassen *Actinobacteria*. Tolv av disse klonene (M2= 10, M21= 2) dannet en egen fylogenetisk gren sammen med den filamentøse bakterien *Candidatus Microthrix parvicella* isolert fra kloakkbehandlingsanlegg (Blackall et al., 1996). Syv kloner fra M2 viste sekvenshomologi med udyrket *Actinobacterium*

clone MB11A03 påvist i marint miljø fra Moss Landing, USA (Suzuki et al., 2001). De 7 klonene og udyrket Actinobacterium clone MB11A03 plasserte seg på en egen gren blant Actinobakteriene, noe som kan tyde på at dette er en ny fylogenetisk gruppe.

Bakterier fra fylumet *Bacteroidetes* er vanlig i sjøvann og spiller en viktig rolle i sirkulering av løselig organisk materiale under og etter algeoppblomstringen (Pinhassi et al., 2004). I Raunefjorden 2003 ble det påvist 12 kloner fra M9 høstet under algeoppblomstringen og 2 kloner fra M21 høstet etter algeoppblomstringen med sekvenslikhet til *Bacteroidetes*. Det er derfor mulig at *Bacteroidetes* også kan ha spilt en rolle i sirkulering av organisk materiale i Raunefjorden.

En klon fra M9 viste seg å ha sekvenslikhet med den gram-positive bakterien *Lactosphaera pasteurii* og klassen *Firmicutes*. *Lactosphaera pasteurii* tilhører en ny slekt innenfor melkesyre bakterier og har blitt isolert fra anoksisk nedbrytningsslam fra kloakkanlegg (Janssen et al., 1995).

4.5 Metodeevaluering.

Målet med oppgaven var å få en oversikt over det mikrobielle samfunnet i Raunefjorden 2003. For å få en mer nøyaktig oversikt over det mikrobielle samfunnet ble det derfor valgt å kombinere ulike molekylærbiologiske metoder (DAPI-telling, CARD-FISH, PCR-DGGE og Kloning) i oppgaven.

CARD-FISH var en tidkrevende metode med flere trinn hvor det kunne gå galt, og med liten mulighet til å kunne oppdage feilen før på slutten av prosedyren. Tidspress og mye arbeid med kloningen gjorde at jeg ikke fikk tid til å ytterligere optimalisere CARD-FISH-metoden og resultatene. Det viste seg også at probene, og da spesielt ARC915-proben, inneholdt mange små partikler som fluorescerte under epifluorescensmikroskopet, og dermed gav falske signal. De små partiklene gjorde det derfor vanskelig å skille små arker fra partikler, der arkeantallet var lavt. Det førte igjen til at det ikke ble telt og beregnet totalt antall probe-merkede celler/ml av enkelte CARD-FISH-filtre. Det er også mulig at arke-antallet, og da spesielt om sommeren, er over- eller underestimert som følger av partiklene.

PCR-DGGE viste seg å være en nyttig metode for å studere samfunnsstrukturen i blant annet marine økosystemer. Denne metoden gav et godt bilde på hvordan diversiteten var i det bakterielle samfunnet i form av dominerende bånd og bånddiversitet. Ved å kombinere PCR-DGGE med sekvensering var det mulig å identifisere noen av båndsekvensene.

En fare ved å benytte PCR til studier av samfunnsstrukturer og samfunnsdiversitet er at PCR kan resultere i chimere sekvenser fra to templat og gi kunstige sekvensdiversiteter (Hugenholtz og Huber, 2003; Liesack et al., 1991). I mange tilfeller er det ønskelig å begrense informasjonsmengden fra mikrobiologiske diversiteter ved å benytte spesifikke primere. Slike primere kan igjen føre til en

underestimering (bias) eller overestimering av potensielle diversiteter innenfor en fylogenetisk gruppe. En overestimering eller underestimering av diversiteter vil dermed kunne gi et skjevt bilde av den opprinnelige diversiteten i naturen.

I oppgaven min ble det, i tillegg til CARD-FISH og DGGE, også utført TA TOPO kloning på PCR amplifiserte 16S rDNA sekvenser hentet fra det mikrobielle samfunnet i Raunefjorden. Det kan derfor ikke utelukkes at bruken av PCR for amplifisering av 16S rDNA sekvenser kan ha gitt kunstige sekvensdiversiteter ved at enkelte fylogenetiske grupper har blitt over- eller underestimert. Sekvenserte bånd fra DGGE viste en dominans av α -Proteobakterier og γ -Proteobakterier i sjøvannsprøver høstet fra Raunefjorden, noe som stemmer med tidligere observasjoner i ulike marine miljø (Bano og Hollibaugh (2002); Rappé et al., 2002; Venter et al., 2004). Likevel ble det ikke påvist kloner med sekvenslikhet til bakterier innenfor *α -Proteobacteria*, *β -Proteobacteria* og *Planctomycetales* i noen av klonbibliotekene. Studier seinere har vist at bakterieprimeren 23SOR er dårlig til å fange opp enkelte målsekvenser, som α -Proteobakterier. Det har gjort at γ -Proteobakteriene, som primeren kunne fange opp, har blitt godt kartlagt, mens sekvenser fra *α -Proteobacteria*, *β -Proteobacteria* og *Planctomycetales* ikke har blitt påvist i noen av klonbibliotekene. Primerens selektering av bakteriesekvenser har dermed ført til en høyere diversitet innenfor γ -Proteobakteriene i forhold til den totale diversiteten av alle bakteriegruppene i klonbibliotek M2, M9 og M21. Det er derfor grunn til å tro at ulike sett av primere gir ulike resultat, og at dette bør taes til etterretning ved valg av primere for studier av økologiske systemer.

I 2005 foreslo Pernthaler og Aman å benytte universelle primere for bakterier og arker til å amplifisere hele 16S rRNA gen sekvenser, for deretter å screene sekvensene for spesielle grupper. En kombinasjon av PCR-baserte metoder (DGGE og kloning) og PCR-uavhengige metoder (DAPI og CARD-FISH) kan muligens være veien å gå for å unngå bias-problemet og for å få et mer nøyaktig bilde av samfunnet.

4. Konklusjon.

Det ble høstet til sammen 28 prøver som skulle brukes til å studere bakteriesamfunnet i Raunefjorden 2003. Resultatet etter beregning av totalt antall bakterier (DAPI) og alger (Fluorescens) i hver av prøvene viste en algeoppblomstring i februar-april som ble etterfulgt av en bakterieoppblomstring i april-juli. En beregning av totalt antall EUB338-merkede bakterier og ARC915-merkede arker (CARD-FISH) viste en økning i antall bakterier om sommeren, mens antall arker var høyest om våren, en periode om sommeren og høsten. Det var dermed en kvantitativ forskjell mellom mengde arker og mengde bakterier i Raunefjorden.

PCR-DGGE utført på alle de 28 sjøvannsprøvene viste en kompleks sammensetning av bakteriesamfunnet i alle prøvene. Det ble i gjennomsnitt påvist 17 bånd i alle samfunnsprofilene, og hvor 3 av båndene var tilstede i alle prøvene. Tjueen av båndene ble kun påvist å være tilstede i noen av prøvene.

Sekvensering av 27 bånd viste en dominans av α -*Proteobacteria* og γ -*Proteobacteria*. De sekvenserte båndene fra sjøvannsprøver høstet under algeoppblomstringen og i begynnelsen av bakterieoppblomstringen var dominert av sekvenser med homologi til kloroplast gener, *Bacteroidetes*, β -*Proteobacteria*, SAR11 og OM182 (γ). Klassen *Bacteroidetes* og familien *Flavobacteriaceae* har blitt knyttet opp mot diatomeroppblomstringer, og har vist seg å ha en viktig rolle i sirkulering av næringsstoffer under algeoppblomstringen. Sekvenserte bånd med sekvenslikhet til *Pelagibacter ubique* (SAR11), SAR86, SAR92 og *Roseobacter* (*Rhodobacterales*) dominerte under bakterieoppblomstringen som følger av at løselig organisk materiale ble frigitt under algeoppblomstringen. Studier har også identifisert gener for proteorhodopsin i SAR11- og SAR86-gruppen, noe som indikerer at de også kan utnytte energi fra sollys. Etter bakterieoppblomstringen, da næringssaltkonsentrasjonen var lavere, ble det påvist sekvenser med homologi til OM182, SAR11, *Roseobacter*, *Rhodobacter*, SAR86 og *Cyanobacteria*. Resultatet viste dermed en stabil gruppe av α -proteobakterier hele året studert ved DGGE, mens γ -Proteobakteriene økte under- og etter algeoppblomstringen.

Det ble laget klonbibliotek av sjøvannsprøver høstet før, under og etter algeoppblomstringen i Raunefjorden. Kloner innenfor klonbibliotek M2, M9 og M21 grupperte seg innenfor γ -*Proteobacteria*, uklassifiserte bakterier, *Actinobacteria*, *Firmicutes* og *Bacteroidetes*. Innenfor klonbibliotek M2, høstet før algeoppblomstringen, var det en stor divers og dominerende gruppe γ -Proteobakterier og uklassifiserte bakterier. I tillegg plasserte noen kloner seg innenfor klassen *Actinobacteria*. Innenfor underklassen γ -*Proteobacteria* var det flest kloner som viste sekvenslikhet med slekten *Glaciecola* isolert fra Antarktis. Det var også 8 kloner som viste sekvenslikhet med

Pseudomonadales.

Underklassen γ -Proteobacteria var dominerende i klonbibliotek M9, som ble høstet under algeoppblomstringen. Samtidig ble det påvist færre kloner med sekvenslikhet til uklassifiserte bakterier og Actinobakterier. Det ble også påvist en klon med homologi til klassen *Firmicutes*. I klonbibliotek M9 var det flest kloner med sekvenshomologi til den udyrkede γ -Proteobacterium clone MB11B11 (SAR92). Tolv av klonene fra M9 viste seg å ha sekvenslikhet med *Bacteroidetes*. Det ble også påvist kloner med sekvenslikhet til sykrofile bakterier og hydrokarbon-degraderende bakterier.

Etter algeoppblomstringen var det to dominerende grupper bestående av Actinobakterier og γ -Proteobakterier. Det var også her en gruppe bestående av uklassifiserte bakterier, men denne gruppen var betraktelig redusert i forhold til klonbibliotek M2 og M9. Underklassen γ -*Proteobacteria* var dominert av kloner med homologi til den udyrkede γ -Proteobacterium clone MB11B11 og slekten *Halomonas*. I klassen *Actinobacteria* var det flere kloner som viste sekvenslikhet til udyrkede Actinobakterier påvist i ferskvannshabitat. I klonbibliotek M21 ble det også identifisert kloner med sekvenshomologi til bakterier som er i stand til å bryte ned hydrokarboner (PAH).

Studiet av årstidsvariasjonen hos mikrobielle samfunn i Raunefjorden 2003 viste at det var en forskjell i det mikrobielle samfunnet før, under og etter en algeoppblomstring. Kun kloner med sekvenslikhet til *Actinoplanes ianthinogenes* og udyrket marin bakterie Klon SPOTSFE02_70ml ble påvist i alle klonbibliotekene, noe som indikerer at det er en stor diversitet av organismer i det mikrobielle samfunnet i Raunefjorden. Kloningen gav også et godt detaljert bilde av fordelingen av γ -proteobakteriene før-, under- og etter en algeoppblomstring i Raunefjorden.

Appendiks

A. Buffere og løsninger brukt i oppgaven.

A1. DAPI-farging av celler.

- **DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol)**
- DAPI-stamløsning: 100 µg/ ml sd H₂O
- DAPI-bruksløsning: 1 µg/
ml

- **2 % Formalin**
- 5,5 ml 37 %/100 ml
fortynningsløsning

En 37 % Formalinløsning ble laget og 2,3 ml av dette ble tilsatt sjøvann til et totalvolum på 50 ml.

- **1xPBS for
DAPI**
- NaCl : 8,0g
- KCl : 0,2g
- Na₂HPO₄*
7H₂O : 1,44g
- KH₂PO₄ : 0,24g

Løs i 800 ml vann, juster pH til ca. 7,3 med HCl, tilsett vann til 1 liter og autoklaver.

A2. DNA isolering.

- **Lysozymløsning (1 mg/ ml TE)**

Løs 5 mg av lysozym i 5 ml TE-buffer. Steril filtrer løsning før bruk. Løsningen må være fersk.

- **TE buffer
(pH7,4)**
- Tris*Cl
(pH7,4) 10 mM
- EDTA(pH8,0) 1 mM

- **Proteinase K**

- 20 mg/ ml sdH₂O

- **Lysisbuffer**

- SDS 1 %

- Proteinase K 40 µg/ ml

Løsninger med Proteinase K må sterilfiltreres og ikke autoklaveres for å unngå å ødelegge enzymet.

- **5M NaCl**

- NaCl 29,22g

- sdH₂O 100 ml

- **CTAB**

- Hexadecyltrimetyla mmoniumbromid (w/v) 10 %

- NaCl (0,14g løst i 20 ml sd vann) 0,70 %

0,14g NaCl løses i 20 ml sd H₂O og deretter 2g Hexadecyltrimetyla mmoniumbromid. Bruk magnetrører og varme for å få løst opp blandingen. Autoklaver og fordel på alikvoter.

A3. Agarose gelelektroforese.

- **50xTAE buffer**

- Tris base 242g

- Iseddikk 57,1 ml

- Na₂EDTA*2H₂O 37,2g

Løs i 800 ml sdH₂O, juster pH til ca. 8,5 med HCl, og fyll opp til 1 liter. Autoklaver.

- **6x loading buffer**

- Xylenxyanol 0,20 %

- Sukrose 40 %

- **Etidiumbromidløsning**

- 1xTAE 30 ml

- 10 mg/ ml EtBr 1 µl

A4. DGGE elektroforese.

- **Deionisert formamid**
- Formamid 200 ml
- DOWEX RESIN AG 501X8 7,5g

Blandes og la stå ved RT i 1 time.

- **40 % Acrylamid (37,5:1, acrylamid : bisacrylamid)**
- Acrylamid 100g
- Bisacrylamid 2,67g

Volumet justeres til 250 ml i sd H₂O.

- **Denaturant Stock Solution A**
- (8 % acrylamid, 0,5xTAE buffer, 0 % denaturant)
- 40 % acrylamid/Bis stock løsning 50 ml
- 50xTAE 2,5 ml

Volumet justeres til 250 ml i sd H₂O.

- **Denaturant Stock Solution B (DSSB)**
- (8 % acrylamid, 0,5xTAE buffer, 100 % denaturant)
- 40 % acrylamid/Bis stock løsning 50 ml
- 50xTAE 2,5 ml
- Urea 105g
- Deionisert formamid 100 ml

Volumet justeres til 250 ml i sd H₂O.

- **Ammoniumpersulfatløsning (10 %)**
- **Biorad**
- Ammoniumpersulfat 1g
- sd H₂O 8 ml

Volumet justeres til 10 ml, sterilfiltreres og lagres i alikvoter i fryser.

- **TEMED(N, N, N', N', -tetrametylendiamin, Biorad)**
- **SybrGoldfargeløsning**
- 1000xSybrGold 1 µl
- 1xTAE 10 ml

A5. Kloning.

- **LB** (Luria-Bertani) medium:

• Trypton	10g
• Gjærekstrakt	5g
• NaCl	10g
• sdH ₂ O til totalvolum 1L	

Løs i 900 ml, juster pH til 7,0 med NaOH, og etterfyll med vann til 1 liter. Autoklaver. Etter autoklaving tilsett Ampicillin når mediet er ca. 55 °C.

- **LA** (Luria-Bertani) agar medium:

• Trypton	10g
• Gjærekstrakt	5g
• NaCl	10g
• Bacto agar	15g
• sdH ₂ O til totalvolum 1L	

Løs i 900 ml, juster pH til 7,0 med NaOH, og etterfyll med vann til 1 liter. Autoklaver. Etter autoklaving tilsett Ampicillin når mediet er ca. 55 °C.

- Ampicillin 50 µg/ ml

- **X-Gal** løsning (40 mg/ ml stockløsning):

• (Promega)	
• X-Gal	400 mg
• Dimetylformamid	10 ml

- **IPTG** løsning (100 mM stockløsning):

• (Promega)	
• IPTG	238 mg
• Deionisert H ₂ O	10 ml

- **SOC** medium:

• 2 %Trypton	10g
• 0,5 %Gjærekstrakt	2,5g
• 10 mM NaCl	0,29g
• 2,5 mM KCl	0,93g
• 10 mM MgCl ₂	1,02g
• 10 mM MgSO ₄	1,23g
• sdH ₂ O til totalvolum 0,5L	

- 20 mM Glukose 1,98g

Løs stoffene i 500 ml, autoklaver og tilsett sterilfiltrert glukose.

A6. CARD-FISH.

- **6 % Paraformaldehyd**

- Paraformaldehyd (sigma) 1,5g
- 1M NaOH 75 µl
- 10xPBS (pH7,6) 2,5 ml
- Juster pH med HCl

- **20xPBS for CARD-FISH**
- **(pH 7,6)**

- NaCl 80,0g
- KCl 2,0g
- Na₂HPO₄*2 H₂O 17,8g
- KH₂PO₄ 2,7g

- **0,5M EDTA**
- **(pH 8,0)**

- EDTA*2H₂O 186,1g
- sd H₂O 800 ml

Løs blandingen på magnetrører, juster pH med NaOH, og autoklaver.

- **0,01M HCl**

- **1M TrisHCl (pH 8,0)**

- **20 % [w/v] SDS**

- SDS 16g
- sdH₂O 80 ml

- **Lysozymløsning**

- TrisHCL 0,1M
- EDTA 0,05M
- Lysozym 10 mg/ ml

- **Hybridiseringsbuffer.**

- 5M NaCl 3,6 ml
- 1M TrisHCl 0,4 ml
- 20x SDS 20 µl
- MilliQvann 3 ml

- Formamid • 11 ml
- 10 % Blocking reagent 2,0 ml
- Dextran sulfat 2g

Tilsett Dextran sulfat til løsning, varm (55-60 °C) og rist blanding til alt har løst seg. Sterilfiltrer og lagre i alikvoter ved -20 °C.

• **Vaskebuffer.**

- 0,5M EDTA 0,5 ml
- 1M TrisHCl 1,0 ml
- 5M NaCl • 100 µl
- MQ vann • til 50 ml
- SDS(20x) • 25 µl

Bland de øverste stoffene, juster til 50 ml med MQ, og tilsett SDS. Sterilfiltrer og lagre i alikvoter ved -20 °C.

• **PBST**

- TritonX-100 (0,01 %)
- (molecular biology grade) 25 µl
- 1xPBS 250 ml

• **Blocking reagent (Boehringer Mannheim)**

- Block reagent (w/v) 10x
- 100
- Maleinsyre mM

Løs blocking reagenten i maleinsyre på magnetrører med varme. Etter å ha løst opp stoffet, autoklaver, og lagre i alikvoter ved 4 °C eller -20 °C.

• **Amplifiseringsbuffer.**

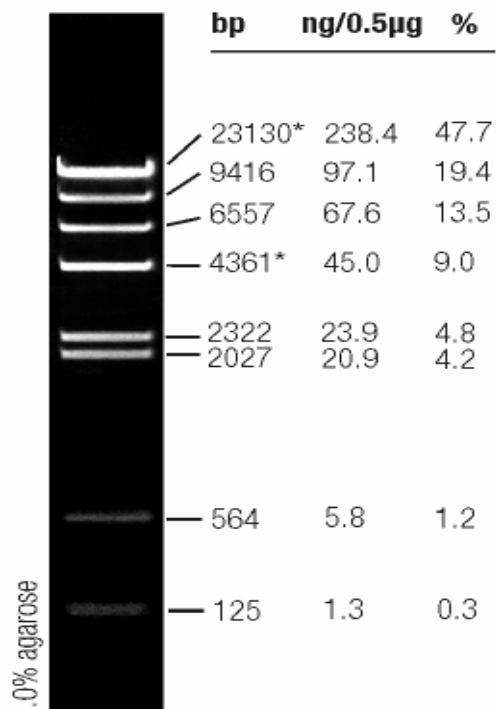
- 20xPBS • 2 ml
- Blocking reagent 0,4 ml
- 5M NaCl • 16 ml
- MQvann • til 40 ml
- Dextran sulfat 4g

Tilsett Dextran sulfat til løsning, varm (55-60 °C) og rist blanding til alt har løst seg. Sterilfiltrer og lagre i alikvoter ved -20 °C.

B. Molekylvektstandarder for DNA (MBI Fermentas).

Lambda DNA/Hind III markør:

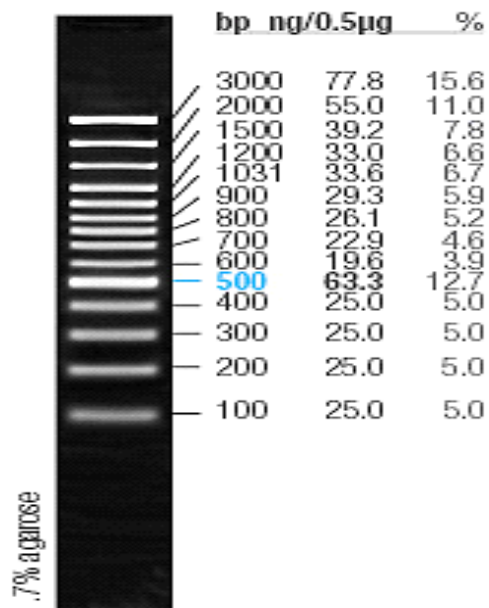
Størrelsesmarkør brukt for identifisering av DNA isolert fra helceller og separert ved agarosegelelektroforese.



Figur B1: Denne figuren viser markøren lambda DNA/EcoRI brukt til analysering av renset DNA.

100bp DNA Ladder Plus:

Størrelsesmarkør brukt for analysering av lineære dobbeltrådede DNA segmenter separert ved agarosegelelektroforese.



Figur B2: Denne figuren viser markøren 100basepar DNA Ladder Plus brukt til analysering av PCR-produkt og restriksjonskutting ved hjelp av en agarosegel.

Litteraturliste.

1. **Abell, G.C.J , Bowmann, J. P.**, *Colonization and community dynamics of class Flavobacteria on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater*. FEMS Microbiol. Ecol., 2005. **53 (3)**: s.379-391.
2. **Acinas, S.G., J. Anton, Rodriguez-Valera, F.**, *Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65(2)**: s. 514-522.
3. **Alfreider, A., et al.**, *Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62(6)**: s. 2138-2144.
4. **Alonso, C. ,Pernthaler, J.**, *Incorporation of glucose under anoxic conditions by bacterioplankton from coastal North Sea surface waters*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71(4)**: s. 1709-1716.
5. **Amann, R.I., et al.**, *Combination of 16S Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow-Cytometry for Analyzing Mixed Microbial-Populations*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56(6)**: s. 1919-1925.
6. **Andersen, P. ,Sorensen, H.M.**, *Population-Dynamics and Trophic Coupling in Pelagic Microorganisms in Eutrophic Coastal Waters*. Marine Ecology-Progress Series, 1986. **33(2)**: s. 99-109.
7. **Angert, E.R., et al.**, *Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky*. American Mineralogist, 1998. **83(11-12)**: s. 1583-1592.
8. **Arahal, D.R., et al.**, *Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002. **52**: s. 241-249.
9. **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.**, *short protocols in molecular biology*. 1992: s. s.3-3 - 3-7, kap. 5, 7,15.
10. **Azam, F., et al.**, *The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea*. Marine Ecology-Progress Series, 1983. **10(3)**: s. 257-263.
11. **Bano, N.,Hollibaugh, J.T.**, *Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68(2)**: s. 505-518.
12. **Baumann, P., Furniss, A. L., Lee, J. V., Vibrio**. In **N. R. Krieg, Holt, J. G.**, *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 1984. eds.: s. s.518-544.
13. **BCM Search Launcher-Sequences Utilies**.
<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>.

14. **Beja, O., et al.**, *Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science, 2000. 289(5486): s. 1902-1906.*
15. **Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G., Haldal, M.**, *High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature, 1989. 340: s. s.467-468.*
16. **Bernardet, J.F., et al.**, *Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus Flavobacterium, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of Flavobacterium hydatis nom nov (basonym, Cytophaga aquatilis Strohl and Tait 1978). International Journal of Systematic Bacteriology, 1996. 46(1): p. 128-148.*
17. **Bian, J., Lin,X., Huang,X., Sun,X., Zhang,H., Shao,Q. og Hong,Y.**, *Screening of Bacteria producing PUFA. Unpublished.*
18. **Billen, G.,Fontigny, A.**, *Dynamics of a Phaeocystis-Dominated Spring Bloom in Belgian Coastal Waters .2. Bacterioplankton Dynamics. Marine Ecology-Progress Series, 1987. 37(2-3): s. 249-257.*
19. **Bioedit.** <http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/biedit.html>.
20. **Blackall, L.L., et al.**, *"Candidatus Microthrix parvicella", a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996. 46(1): s. 344-346.*
21. **Bobrow, M. N., H.T., Shaughnessy KJ, Litt,G.J.**, *Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Methods, 1989: s. 125:279-285.*
22. **Boom, R., et al.**, *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic-Acids. Journal of Clinical Microbiology, 1990. 28(3): s. 495-503.*
23. **Bowman, J.P.**, *Methods for psychrophilic bacteria. Methods in Microbiology, Vol 30, 2001. 30: s. 591-614.*
24. **Bowman, J.P., et al.**, *Colwellia demingiae sp. nov., Colwellia hornerae sp. nov., Colwellia rossensis sp. nov. and Colwellia psychrotropica sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22 : 6 omega 3). International Journal of Systematic Bacteriology, 1998. 48: s. 1171-1180.*
25. **Bratbak, G., et al.**, *Viruses as Partners in Spring Bloom Microbial Trophodynamics. Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56(5): s. 1400-1405.*
26. **Brinkmeyer, R., et al.**, *Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus antarctic pack ice. Applied and Environmental Microbiology, 2003. 69(11): s. 6610-6619.*
27. **Brinkmeyer, R., Helmke,E.**, *Evidence for methylotrophic processes in Arctic pack ice. Unpublished.*
28. **Britschgi, T.B. and S.J. Giovannoni**, *Phylogenetic Analysis of a Natural Marine Bacterioplankton Population by Ribosomal-Rna Gene Cloning and Sequencing. Applied and Environmental Microbiology, 1991. 57(6): s. 1707-1713.*
29. **Brock, T.D. and M.T. Madigan**, *Biology of microorganisms. 6th ed. 1991, Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. XIX, 874 s.684-685.*
30. **Brown, M.V., Schwalbach,M.S., Hewson, I., Fuhrman,J.A.**, *Coupling 16S-ITS*

- rDNA clone libraries and ARISA to show marine microbial diversity: Development and application to a time series. Environ. Microbiol. In press, 2005.*
31. **Bruns, A. L. Berthe-Corti**, *Fundibacter jadensis* gen. nov., sp. nov., a new slightly halophilic bacterium, isolated from intertidal sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999. **49**: s. 441-448.
 32. **Busse, I., Preisfeld, A.**, *Stephanodiscus minutulus* plastid 16S ribosomal RNA gene. *Unpublished*.
 33. **Carlson, C.A., Ingraham, J.L.**, Comparison of Denitrification by *Pseudomonas-Stutzeri*, *Pseudomonas-Aeruginosa*, and *Paracoccus-Denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983. **45**(4): s. 1247-1253.
 34. **Chisholm, S.W., et al.**, A Novel Free-Living Prochlorophyte Abundant in the Oceanic Euphotic Zone. *Nature*, 1988. **334**(6180): s. 340-343.
 35. **Cho, J.C., Giovannoni, S.J.**, Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(1): s. 432-440.
 36. **Church, M.J., et al.**, Abundance and distribution of planktonic Archaea and Bacteria in the waters west of the Antarctic Peninsula. *Limnology and Oceanography*, 2003. **48**(5): s. 1893-1902.
 37. **Colwell, R.R., Morita, R.Y.**, Reisolation + Emendation of Description of *Vibrio Marinus* (Russell) Ford. *Journal of Bacteriology*, 1964. **88**(4): s. 831-&.
 38. **Connon, S.A., Giovannoni, S.J.**, High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(8): s. 3878-3885.
 39. **Cottrell, M.T. and D.L. Kirchman**, Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **66**(4): s. 1692-1697.
 40. **Crump, B.C., E.V. Armbrust, Baross, j. A.**, Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. **65**(7): s. 3192-3204.
 41. **Crump BC, H.C., Sogin ML, Hobbie JE.**, Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time. *Appl Environ Microbiol.*, 2004 Mars. **70**(3): s. s.1494-1505.
 42. **Dacey, J.W.H., Wakeham, S.G.**, Oceanic Dimethylsulfide - Production During Zooplankton Grazing on Phytoplankton. *Science*, 1986. **233**(4770): s. 1314-1316.
 43. **Dahllof, I., Karle, I.M.**, Effect on marine sediment nitrogen fluxes caused by organic matter enrichment with varying organic carbon structure and nitrogen content. *Marine Chemistry*, 2005. **94**(1-4): s. 17-26.
 44. **Delong, E.F.**, Archaea in Coastal Marine Environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89**(12): s. 5685-5689.
 45. **DeLong, E.F., Franks, D. G., Alldredge, A. L.**, Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol.*

- Oceanogr., 1993: s. 38:924-934.
46. **DeLong, E.F. and D.M. Karl**, *Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature*, 2005. **437**(7057): s. 336-342.
 47. **DeLong, E.F., G.S. Wickham, Pace, N.R.**, *Phylogenetic Stains - Ribosomal Rna-Based Probes for the Identification of Single Cells. Science*, 1989. **243**(4896): s. 1360-1363.
 48. **Donachie, S.P., Hou,S., Lee,K.S., Riley,C.W., Pikina,A., Liu,J., Kempe,S., Gregory,T.S., Bossuyt,A., Boerema,J., Malahoff,A., Alam,M.**, *Microbial Communities in the Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot. Unpublished.*
 49. **EGGE, J.**, <http://www.bio.uib.no/Code/PersonligSide.php?pid=1007&lang=N>.
 50. **Eilers, H., et al.**, *Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67**(11): s. 5134-5142.
 51. **Erga, S.R. , Heimdal,B.R.**, *Ecological-Studies on the Phytoplankton of Korsfjorden, Western Norway - the Dynamics of a Spring Bloom Seen in Relation to Hydrographical Conditions and Light Regime. Journal of Plankton Research*, 1984. **6**(1): s. 67-90.
 52. **Felsenstein, J.**, *Distance Methods for Inferring Phylogenies - a Justification. Evolution*, 1984. **38**(1): s. 16-24.
 53. **Felsenstein, J.**, *Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis*, 1996. **266**: s. 418-427.
 54. **Felsenstein, J.**, *PHYMLIP- Phylogeny Inference Package. 2004.*
 55. **Ferris, M.J., G. Muyzer, Ward, D.M.**, *Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(2): s. 340-346.
 56. **Fischer, S.G., Lerman, L.S.**, *Length-Independent Separation of DNA Restriction Fragments in 2-Dimensional Gel-Electrophoresis. Cell*, 1979. **16**(1): s. 191-200.
 57. **Fowler, R., Breeding, L., Ovesen, J., Groves, C.**, *A DNA Fingerprinting Technique to Survey Microbial Diversity in Caves. 2001 National Cave and Karst Management Symposium, 2001.*
 58. **Fuchs, B., Glockner, F. O., Wulf, J., Amann, R.**, *Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **66**: s. s.3603-3607.
 59. **Fuchs, B.M., Zubkov,M.V., Schoenhuber,W., Burkill,P.H., Amann,R.**, *Bacterioplankton Sorting During a Transatlantic Cruise. unpublished.*
 60. **Fuerst, J.A.**, *The Planctomycetes - Emerging Models for Microbial Ecology, Evolution and Cell Biology. Microbiology-Uk*, 1995. **141**: s. 1493-1506.
 61. **Fuhrman, J.A.**, *Measuring Marine Bacterial-Growth - a Citation-Classic Commentary on Thymidine Incorporation as a Measure of Heterotrophic Bacterioplankton Production in Marine Surface Waters - Evaluation and Field Results by Fuhrman,J.A. And Azam,F. Current Contents/Agriculture Biology &*

- Environmental Sciences*, 1993(38): s. 8-8.
62. **Fuhrman, J.A., Azam, F.**, *Bacterioplankton Secondary Production Estimates for Coastal Waters of British-Columbia, Antarctica, and California*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980. **39**(6): s. 1085-1095.
 63. **Fuhrman, J.A., Davis, A. A.**, *Widespread archaea and novel bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences*. *Marine Ecology-Progress Series*, 1997. **150**(1-3): s. 275-285.
 64. **Fuhrman, J.A., K. McCallum, Davis, A. A.**, *Novel Major Archaeobacterial Group from Marine Plankton*. *Nature*, 1992. **356**(6365): s. 148-149.
 65. **Fuhrman, J.A., K. McCallum, Davis, A. A.**, *Phylogenetic Diversity of Subsurface Marine Microbial Communities from the Atlantic and Pacific Oceans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993. **59**(5): s. 1294-1302.
 66. **Fuller NJ, M.D., Partensky F, Vaultot D, Post AF, Scanlan DJ.**, *Clade-Specific 16S Ribosomal DNA Oligonucleotides Reveal the Predominance of a Single Marine Synechococcus Clade throughout a Stratified Water Column in the Red Sea*. *Appl Environ Microbiol.*, 2003 Mai. **69**(5): s. s.2430-2443.
 67. **Gaidos, E., et al.**, *A viable microbial community in a subglacial volcanic crater lake, Iceland*. *Astrobiology*, 2004. **4**(3): s. 327-344.
 68. **Garciavaldes, E., et al.**, *Molecular-Cloning of Aromatic Degradative Genes from Pseudomonas-Stutzeri*. *Fems Microbiology Letters*, 1989. **61**(3): s. 301-306.
 69. **Geiselbrecht, A. D., et al.**, *Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading Cycloclasticus strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound Cycloclasticus strains*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. **64**(12): s. 4703-4710.
 70. **Geiselbrecht, A.D., et al.**, *Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(9): s. 3344-3349.
 71. **Giovannoni, S., Rappé.M**, *Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes*. *Microbial Ecology of the Oceans*, 2000: s. s. 47 -83.
 72. **Giovannoni, S.J., et al.**, *Genetic Diversity in Sargasso Sea Bacterioplankton*. *Nature*, 1990. **345**(6270): s. 60-63.
 73. **Giovannoni, S.J. and U. Sting**, *Molecular diversity and ecology of microbial plankton*. *Nature*, 2005. **437**(7057): s. 343-348.
 74. **Giovannoni, S.J., et al.**, *Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium*. *Science*, 2005. **309**(5738): s. 1242-1245.
 75. **Glöckner, F.O., et al.**, *An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996. **19**(3): s. 403-406.
 76. **Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R.**, *Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **66**: s. s. 5053-5065.

77. **González, J.M., R.P. Kiene, Moran, M. A.**, *Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria. Applied and Environmental Microbiology*, 1999. **65**(9): s. 3810-3819.
78. **González JM, S.R., Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Moran, M. A.**, *Bacterial Community Structure Associated with a Dimethylsulfoniopropionate-Producing North Atlantic Algal Bloom. Appl Environ Microbiol.*, 2000Oct. **66**(10): s. s.4237-4246.
79. **González, J.M., et al.**, *Sagittula stellata gen. nov, sp. nov, a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997. **47**(3): s. 773-780.
80. **Hartwell, L.**, *Genetics : from genes to genomes*. 2000, Boston: McGraw-Hill. XXIII, 820, [45] s.
81. **Herndl, G.J., et al.**, *Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(5): s. 2303-2309.
82. **Hobbie, J.E., R.J. Daley, Jasper, S.**, *Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. Applied and Environmental Microbiology*, 1977. **33**(5): s. 1225-1228.
83. **Holmes, A.J., et al.**, *Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. Environmental Microbiology*, 2001. **3**(4): s. 256-264.
84. **Hugenholtz, P. and T. Huber**, *Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003. **53**: s. 289-293.
85. **Invitrogen**, *TOPO TA Cloning manual*, 2003. www.invitrogen.com.
86. **Janssen, P.H., et al.**, *Lactosphaera Gen-Nov, a New Genus of Lactic-Acid Bacteria, and Transfer of Ruminococcus-Pasteurii Schink 1984 to Lactosphaera-Pasteurii Comb-Nov. International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995. **45**(3): s. 565-571.
87. **Johannes, R.E.**, *Phosphorus Excretion + Body Size in Marine Animals - Microzooplankton + Nutrient Regeneration. Science*, 1964: **146**(364): s. 923-&.
88. **Johnson, P.W. and J.M. Sieburth**, *Chroococcoid Cyanobacteria in the Sea - Ubiquitous and Diverse Phototropic Biomass. Limnology and Oceanography*, 1979. **24**(5): s. 928-935.
89. **Jones, A.S., Walker, R. T.**, *Isolation and Analysis of Deoxyribonucleic Acid of Mycoplasma Mycoides Var. Capri. Nature*, 1963. **198**(488): s. 588-&.
90. **Jukes, T.H., Cantor, R.C.**, *Evolution of protein molecules. In H. N. Munro, ed., Mammalian Protein Metabolism, Academic Press, New York., 1969: s. s. 21-32.*
91. **Karner, M.B., DeLong, E. F., Karl, D. M.**, *Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature*, 2001. **409**(6819): s. 507-510.
92. **Kerkhof, L.**, *A ribosomal RNA operon from Pseudomonas stutzeri Zobell. Gene*, 1997. **192**(2): s. 241-243.
93. **Kirchman, D.L., L.Y. Yu, Cottrell, M. T.**, *Diversity and abundance of uncultured*

- Cytophaga-like bacteria in the Delaware Estuary. Applied and Environmental Microbiology*, 2003. **69**(11): s. 6587-6596.
94. **Labrenz, M., et al.**, *Saccharospirillum impatiens* gen. nov., sp nov., a novel gamma-Proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake (East Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003. **53**: s. 653-660.
95. **Labrenz, M., Lawson, P.A., Tindall, B.J., Collins, M.D., Hirsch, P.**, Unpublished, *Saccharospirillum impatiens* gen. nov., sp. nov., a novel gamma-Proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake.
96. **Lane, D.J.**, 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M, 1991(eds): s. s.115-175.
97. **Larsen, A., et al.**, Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography*, 2004. **49**(1): s. 180-190.
98. **Lau, W.W.Y., Armbrust, E.V.**, Restriction of glycolate oxidase gene, *gldD*, to a subset of marine bacteria based on laboratory isolates and field sampling. Unpublished.
99. **Lawson, P.A., Labrenz, M.**, *Arhodomonas-like organism isolated from Ekho lake*. Unpublished.
100. **Lebaron, P., Catala, P., Fajon, F., Joux, F., Baudart, J., Bernard, L.**, A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997. **63**: s. s. 3274-3278.
101. **Ledyard, K.M., Dacey, J.W.H.**, Dimethylsulfide Production from Dimethylsulfoniopropionate by a Marine Bacterium. *Marine Ecology-Progress Series*, 1994. **110**(1): s. 95-103.
102. **Lee, S.H., Malone, C., Kemp, P. F.**, Use of multiple 16S ribosomal-rRNA-targeted fluorescent-probes to increase signal strength and measure cellular rRNA from natural planktonic bacteria. *Mar. Acol. Prog. Ser.*, 1993. **101**: s. s. 193-201.
103. **Li, W.K.W., Dickie, P.M.**, Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*, 2001. **44**(3): s. 236-246.
104. **Liesack, W., H. Weyland, Stackebrandt, E.**, Potential Risks of Gene Amplification by Pcr as Determined by 16s Rdna Analysis of a Mixed-Culture of Strict Barophilic Bacteria. *Microbial Ecology*, 1991. **21**(3): s. 191-198.
105. **Madigan, M.T., et al.**, *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. 2003, Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall. XXV, 1019, [58] s.
106. **Malin, G., et al.**, Elevated production of dimethylsulfide resulting from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnology and Oceanography*, 1998. **43**(6): s. 1389-1393.
107. **Maruyama, A., et al.**, Dynamics of microbial Populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microbial Ecology*, 2003. **46**(4): s. 442-453.
108. **Massana, R., et al.**, Vertical distribution and phylogenetic characterization of

- marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. Applied and Environmental Microbiology*, 1997. **63**(1): s. 50-56.
109. **Maxam, A.M., Gilbert, W.**, *New Method for Sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. **74**(2): s. 560-564.
110. **Mevs, U., et al.**, *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000. **50**: s. 337-346.
111. **McGinnis, S., Madden, T. L.**, *BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Research*, 2004. **32**: s. W20-W25.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
112. **Medlin, L.K., Kaczmarek, I.**, *Evolution of the diatoms V: morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. Unpublished.*
113. **Meteorologisk institutt**, <http://www.met.no/observasjoner/maned/2003>.
114. **Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Herndl, G.J.**, *A comparison of DNA- and RNA-based clone libraries from the same marine bacterioplankton community. FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005. **51** (3): s. s.341-352.
115. **Morita, R.Y.**, *Bacteria in Oligotrophic Environments. Chapman & Hall, New York*, 1997.
116. **Mullis, K.B., F. Ferré, and R.A. Gibbs**, *The Polymerase chain reaction. 1994, Boston: Birkhäuser. XXII*, 458.
117. **Murray, A.E., et al.**, *A time series assessment of planktonic archaeal variability in the Santa Barbara Channel. Aquatic Microbial Ecology*, 1999. **20**(2): s. 129-145.
118. **Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G.**, *Proliferating of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1993. **59**, **NO. 3**: s. 695-700.
119. **Myers, R.M., T. Maniatis, Lerman, L. S.**, *Detection and Localization of Single Base Changes by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. Methods in Enzymology*, 1987. **155**: s. 501-527.
120. **Ness, J.M., et al.**, *Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2003. **51**(8): s. 981-987.
121. **Nichols, D.S., Nichols, P. D., McMeekin, T. A.**, *Acology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and sea-ice. Sci. Prog.*, 1995. **78**: s.311-347.
122. **Nishiguchi, M.K., Nair, V. S.**, *Evolution of symbiosis in the Vibronaceae: a combined approach using molecules and physiology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003. **53**: s. 2019-2026.
123. **NIVA report no. 4653-2003, S.T.-.** *Common Procedure for Identification of the Eutrophication Status of Maritime Area of the Oslo and Paris Conventions. 2003: s.6-8.*
124. **Nogi, Y., C. Kato, Horikoshi, K.**, *Taxonomic studies of deep-sea barophilic*

- Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 1998. **170**(5): s. 331-338.
125. **Northern Europe's seas**, *Northern Europe's environment*. 1989: s.113,117-118.
126. **Overney, C.C., Fuhrman, J. A.**, Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997. **63**: s.2735-27340.
127. **Overney, C.C., Fuhrman, J. A.**, Marine Planktonic Archaea Take Up Amino Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **NOV. 2000**: s. 4829-4833.
128. **Page, R.D.M.**, TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996. **12**(4): s. 357-358.
129. **Palenik, B.**, Cyanobacterial Community Structure as Seen from Rna-Polymerase Gene Sequence-Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994. **60**(9): s. 3212-3219.
130. **Palenik, B.**, Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67**(2): s. 991-994.
131. **Palmiter, R.D.**, Magnesium Precipitation of Ribonucleoprotein Complexes - Expedient Techniques for Isolation of Undegraded Polysomes and Messenger Ribonucleic-Acid. *Biochemistry*, 1974. **13**(17): s. 3606-3615.
132. **Paul, J.H., et al.**, Marine phage genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2002. **133**(4): s. 463-476.
133. **Pearson, A., et al.**, Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: A case study using compound-specific Delta C-14 analysis. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2001. **65**(18): s. 3123-3137.
134. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, Amann, R.**, Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(6): s. 3094-3101.
135. **Pernthaler, A., Preston, C. M., Pernthaler, J., DeLong, E. F., Amann, R.**, A comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**: s. 661-667.
136. **Pinhassi, J., et al.**, Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*, 1999. **17**(1): s. 13-26.
137. **Pinhassi, J., et al.**, Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(11): s. 6753-6766.
138. **PHYLIP**. <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
139. **Pomeroy, L.R.**, Oceans Food Web, a Changing Paradigm. *Bioscience*, 1974. **24**(9): s. 499-504.
140. **Porter, K.G., Feig, Y. S.**, The Use of Dapi for Identifying and Counting Aquatic Microflora. *Limnology and Oceanography*, 1980. **25**(5): s. 943-948.
141. **Postec, A., et al.**, Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal

- ecosystems. *Current Microbiology*, 2005. **50**(3): s. 138-144.
142. **Powell, S.M., Bowman, J.P., Snape, I., Stark, J.S.**, *Microbial community variation in pristine and polluted coastal Antarctic sediments. FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003. **45** (2): s.135-145.
143. **Prabakaran, S.R., Shivaji, S.**, *Microbial Biodiversity of Antarctica Through rRNA Approach. Unpublished.*
144. **Rappé, M.S., et al.**, *Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. Nature*, 2002. **418**(6898): s. 630-633.
145. **Rappé, M.S., Kemp, P.F., Giovannoni, S.J.**, *Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. Limnol. Oceanogr.*, 1997. **42**(5): s.811-826.
146. **Rappé, M. S., Vergin, K. L., Giovannoni, S. J.**, *Phylogenetic Diversity of Ultraplankton Plastid Small-Subunit rRNA Genes Recovered in Environmental Nucleic Acid Samples from the Pacific and Atlantic Coasts of the United States. Appl Environ Microbiol.*, 1998 Jan. **64**(1): s. 294-303.
147. **Reichenbach, H.**, *The order Cytophagales. 1992: s. 3631-3675.*
148. **Ribosomal Database Project II.** <http://cme.msu.edu>
149. **Russell, H.L.**, *Untersuchungen über im Golf von Neapel lebende Bakterien. Z. Hyg. Infektionskrankh.* 1891. **11**: s.165-206.
150. **Saitou, N., Nei, M.**, *The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Japanese Journal of Genetics*, 1986. **61**(6): s. 611-611.
151. **Sambrook, J., Russell, D. W.**, *Molecular Cloning - a laboratory manual. 2001. 2: s. Kap. 6,11, 12.*
152. **Sanger, F., Nicklen, Coulson, A. R.**, *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. **74**(12): s. 5463-5467.
153. **Schönhuber, W., Fuchs, S. Juretschko, Amann, R.**, *Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl. Environ. Microbiol.*, 1997: s. 63:3268-3273.
154. **Sekar, R., et al.**, *Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(10): s. 6210-6219.
155. **Selje, N., Simon, M.**, *Detection of highly abundant bacteria in the Weser estuary by culture-dependent and culture independent approaches. Unpublished.*
156. **Siering, P.L.**, *The double helix meets the crystal lattice: The power and pitfalls of nucleic acid approaches for biomineralogical investigations. American Mineralogist*, 1998. **83**(11-12): s. 1593-1607.
157. **Simu, K., Hagstrom, A.**, *Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(4): s. 2445-2451.
158. **Sipe, A.R., Wilbur, A. E., Cary, S. C.**, *Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm Bankia setacea (Bivalvia : Teredinidae). Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **66**(4): s. 1685-1691.

159. **Shivaji, S., Prabakaran, S.R.**, *Bacterial diversity in Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. Unpublished.*
160. **Shuman, S.**, *Recombination Mediated by Vaccinia Virus-DNA Topoisomerase-I in Escherichia-Coli Is Sequence Specific. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. 88(22): s. 10104-10108.*
161. **Skagen, D.W., Sætre, R.**, *Havets ressurser 2001. 2001: p. s. 69-70.*
162. **Sorokin, J.**, *On the role of bacteria in the productivity of tropical oceanic waters. Int. Revue ges. Hydrobiol, 1971. 56: s.1-48.*
163. **Stahl, D.A., Amann, R.**, *Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 1991: s.205-248.*
164. **Stahl, D.A., et al.**, *Analysis of Hydrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal-Rna Sequences. Science, 1984. 224(4647): s. 409-411.*
165. **Steele, J.H.**, *The Structure of Marine Ecosystems. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 1974.*
166. **Stein, J.L., et al.**, *Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. Journal of Bacteriology, 1996. 178(3): s. 591-599.*
167. **Sipe, A.R., A.E. Wilbur, and S.C. Cary**, *Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm Bankia setacea (Bivalvia : Teredinidae). Applied and Environmental Microbiology, 2000. 66(4): s. 1685-1691.*
168. **Suzuki, M.T., Béjà, O., Taylor, L.T., DeLong, E. F.**, *Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. Environmental Microbiology, 2001. May. 3(5): s. 323.*
169. **Suzuki, M., DeLong, E. F.**, *Marine prokaryotic diversity. Staley, J.T., og Reisenbach, A. L. eds, Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere, 2002: s.209-234.*
170. **Suzuki, M.T., et al.**, *Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. Aquatic Microbial Ecology, 2001. 24(2): s. 117-127.*
171. **Suzuki, M.T., et al.**, *Phylogenetic screening of ribosomal RNA gene-containing clones in bacterial artificial chromosome (BAC) libraries from different depths in Monterey Bay. Microbial Ecology, 2004. 48(4): s. 473-488.*
172. **Tamura, T., Hatano, K.**, *Phylogenetic analysis of the genus Actinoplanes and transfer of Actinoplanes minutisporangius Ruan et al. 1986 and 'Actinoplanes aurantiacus' to Cryptosporangium minutisporangium comb.nov. and Cryptosporangium aurantiacum sp.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001. 51: p. s.2119-2125.*
173. **Thingstad, F.**, *Mikrobiell økologi-I. Kompendium i BM201, 2003.*
174. **Thompson, J.D., et al.**, *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 1997. 25(24): s. 4876-4882.*
175. **Thompson, J.D., D.G. Higgins, Gibson, T. J.**, *Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence*

- Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(22): s. 4673-4680.
176. **Torrella, F., Morita, R. Y.**, *Microcultural Study of Bacterial Size Changes and Microcolony and Ultramicrocolony Formation by Heterotrophic Bacteria in Seawater*. Applied and Environmental Microbiology, 1981. **41**(2): s. 518-527.
177. **Treeview**. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.
178. **Trun, N., Trempy, J.**, *Fundamental bacterial genetics*. 2004, Malden, Mass.: Blackwell Science. XIII, 287 s.235-237,175-176, 187.
179. **Urakawa, H., et al.**, *A proposal to transfer Vibrio marinus (Russell 1891) to a new genus Moritella gen. nov. as Moritella marina comb. nov. (vol 165, pg 373, 1998)*. Fems Microbiology Letters, 1998. **169**(1): s. 207-207.
180. **Venter, J.C., et al.**, *Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea*. Science, 2004. **304**(5667): s. 66-74.
181. **Walker, J.M., Wilson, K.**, *Principles and techniques of practical biochemistry. 5th ed. 2000*, Cambridge: Cambridge University Press. XVIII, 784.
182. **Wallner, G., R. Amann, Beisker, W.**, *Optimizing Fluorescent Insitu Hybridization with Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms*. Cytometry, 1993. **14**(2): s. 136-143.
183. **Warnecke, F., R. Amann, Pernthaler, J.**, *Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages*. Environmental Microbiology, 2004. **6**(3): s. 242-253.
184. **Waterbury, J.B., et al.**, *Widespread Occurrence of a Unicellular, Marine, Planktonic, Cyanobacterium*. Nature, 1979. **277**(5694): s. 293-294.
185. **Weaver, R.F., Hedrick, P. W.**, *Genetics*. 3rd ed. 1997, Dubuque, Iowa: WM. C. Brown. XVII, 638 s.416-421.
186. **Woese, C.R.**, *Bacterial Evolution*. Microbiological Reviews, 1987. **51**(2): s. 221-271.
187. **Wuchter, C., et al.**, *Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota*. Fems Microbiology Letters, 2003. **219**(2): s. 203-207.
188. **Yager, P.L., et al.**, *Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures*. Limnology and Oceanography, 2001. **46**(4): s. 790-801.
189. **Zaitso, K., Ohkura, Y.**, *New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen-peroxide and peroxidase*. Anal. Biochem., 1980. **109**: s. 109-113.
190. **Zimmermann, R., Meyer-Reil, L.**, *A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters*. Kieler Meeresforsch, 1975. **30**: s.24-27.
191. **Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Archer, S.D., Kiene, R.P., Amann, R. og Burkill, P.H.**, *A population of the alpha-proteobacteria dominates the bacterioplankton and dimethylsulphoniopropionate uptake after an algal bloom in the North Sea*. Deep-sea Res. II, Top. Stud. Oceanogr., 2002. **49**(15): s.3017-3038.
192. **Øvreås, L., et al.**, *Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(7): s. 2739-2742.

193. **Øvreås, L., et al.**, *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, 1997. **63**(9): s. 3367-3373.
194. **Øvreås, L., Einen, J.**, *Microbial diversity and community structure in glassy seafloor basalt; Fingerprinting of microbial communities using PCR-DGGE*. NorFA course in BERGEN, 2002.