

Vinnsla og vörubrún
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Lífríki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi

Sólveig K. Pétursdóttir
Snædís Björnsdóttir
Alexandra Klonowski
Sólveig Ólafsdóttir
Guðmundur Óli Hreggviðsson

Líftækni

Skýrsla Matís 30-08
Október 2008

ISSN 1670-7192

Lífríki í kalkríkum hverum á Ölkeduhálsi

MATÍS – Prokaria

Október 2008

Sólveig K. Pétursdóttir¹⁾
Snædís Huld Björnsdóttir¹⁾
Alexandra Klonowski¹⁾
Sólveig Ólafsdóttir¹⁾
Guðmundur Óli Hreggviðsson^{1,2)}

¹⁾ Matís-Prokaria, Gylfaflöt 5, 112 Reykjavík

²⁾ Háskóli Íslands, Líffræðiskor, Askja, Sturlugata, 101 Reykjavík



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Titill / Title	Lífriki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi / Microbial ecology of calcium rich hot springs at Ölkelduháls geothermal area		
Höfundar / Authors	Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís Björnsdóttir, Alexandra Klonowski, Sólveig Ólafsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson		
Skýrsla / Report no.	30-09	Útgáfudagur / Date:	Október 2008
Verknr. / project no.			
Styrktaraðilar / funding:	Umhverfis- og orkurannsóknasjóður OR/ The Environmental and Energy Research Fund of Orkuveita Reykjavíkur		
Ágríp á íslensku:	<p>Vistfræði kalkríkra hvera er lítt rannsökuð. Þessi rannsókn fól í sér að greina lífríki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi og meta hvort það hefði sérstöðu miðað við lífríki annarra hvera á sama svæði með sama hita- og sýrustig. Bakteríur voru einangraðar úr hverasýnum með hefðbundnum ræktunaraðferðum. Erfðagreiningaraðferðir voru notaðar til að greina tegundasamsetningu. Allmargar tegundir sem fundust í sýnum úr kalkríkum hverum finnast einnig í öðrum hverum. Það vekur þó athygli að tegundir innan <i>Aquificae</i> fylkingarinnar fundust ekki í sýnunum en þær eru þó afar algengar í hverum og víða ríkjandi. Frumefnamælingar sýndu mun á styrk brennisteins, járns, kolefnis og arsens í kalkríku vatni og öðru hveravatni sem kann að vera skýring á þessu.</p> <p>Með ræktunaraðferðum greindust einkum þekktar bakteríutegundir af <i>Thermus</i> og <i>Bacillus</i> ættkvíslum. Ein ný tegund af <i>Meiothermus</i> ættkvísl var einangruð. Með erfðagreiningaraðferðum náðust 195 raunbakteríuklónar úr kalkríkum hverum sem flokkuðust í 60 tegundir miðað við 98% skyldleika. Þessar 60 tegundir dreifast á níu fylkingar. Tegundirnar sem fundust í sýnunum voru þær sömu milli hvera, en einnig einstakar fyrir sýnið sem þær komu úr. Engar fornbakteríur fundust í sýnunum. Líffræðilegur fjölbreytileiki í sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi var ívið hærri en sambærileg gildi úr vatnshverum með svipaða eiginleika á sama svæði.</p> <p>Hátt hlutfall óþekktara tegunda og ættkvísla í sýnum sem tekin voru í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi vekur athygli. Af 60 tegundum sem alls fundust í sýnunum fannst nægilega náinn ættingi sömu tegundar í 25 tilvikum. Hinar 35 tegundirnar voru það fjarskyldar nánasta ættingja að ekki tókst að flokka þær nema til ættkvísla, ættbálka, ætta eða fjölskyldna. Vistkerfi í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi verður því að teljast afar sérstakt.</p>		
Lykilorð á íslensku:	klakríkir hverir, örveruvistfræði, tegundasamsetning, 16S rRNA, líffræðilegur fjölbreytileiki		

Summary in English:

The ecology of calcium rich hot springs is not well documented. In this study an attempt was made to estimate if microbial species composition in calcium rich hot springs in Ölkelduháls in Iceland was special compared to species composition in other hot springs with similar temperature and pH in the same geothermal area. Isolation methods as well as culture independent methods were used to analyse species composition in the samples. Many species found in the calcium rich hot springs are also found in other hot springs. It is noteworthy that *Aquificae* species were totally absent in samples from calcium rich hot springs, but these species were abundant and dominating in other hot spring samples. Elemental analysis of hot spring water revealed a difference in the concentration of sulphur, iron, carbon and arsenate between calcium rich hot springs and other hot springs in the area.

Known species of *Thermus* and *Bacillus* genera were isolated from the samples. A novel *Meiothermus* species was isolated. Approximately 60 species belonging to nine phyla were identified in the samples using culture independent methods. The species identified in the calcium rich samples were identical between samples but also unique for the sample investigated. No archaea were detected in the samples. Biodiversity calculated for the samples from calcium rich hot springs was slightly higher than in samples from other hot springs.

A high ratio of unknown species and genera in the samples from calcium rich hot springs in Ölkelduháls is remarkable. Of the total of 60 species identified only 25 had a close relative from the same species according to Genbank. The remaining 35 species were only distantly related to their closest relative and could only be classified to genera, families, orders or classes. Thus, the ecology of calcium rich hot springs appears to be quite unique

English keywords:

Calcium rich hot springs, microbial ecology, 16S rRNA gene species composition, biodiversity

Efnisyfirlit

1. INNGANGUR.....	1
2. FRAMKVÆMD	3
2.1 Sýnataka.....	3
2.2 Mælingar á sýnum	3
2.3 Einangrun á DNA	3
2.3.1 Lífmassasýni.....	3
2.3.2 Jarðvegssýni	4
2.3.3 Sýni af vökva og yfirborðsbrák	4
2.4 PCR á 16S rRNA geninu	4
2.5 Klónun og raðgreining.....	4
2.6 Ákvörðun á tegundasamsetningu í sýnum.....	5
2.7 Skyldleikatré.....	5
2.8 Líffræðilegur fjölbreytileiki	5
2.9 Ræktun, einangrun og tegundagreining baktería úr kalkríkum hverum	5
3. NIÐURSTÖÐUR	7
3.1 Sýnataka og sýnatökustaðir	7
3.2 Niðurstöður úr frumefnamælingum	10
3.3 Niðurstöður úr bakteríuræktunum.....	13
3.4 Niðurstöður úr erfðagreiningum á blönduðum sýnum	14
3.4.1 Sýni 661.....	15
3.4.2 Sýni 664.....	16
3.4.3 Sýni 665.....	17
3.4.4 Sýni 667.....	18
3.5 Dreifing tegunda á fylkingar	19
3.6 Líffræðilegur fjölbreytileiki	20
3.7 Ættartré helstu tegunda í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi.....	21
3.7.1 <i>Bacteroidetes</i>	21
3.7.2 <i>Chloroflexi</i>	23
3.7.3 <i>Cyanobacteria</i>	24
3.7.4 <i>Firmicutes</i>	25
3.7.5 <i>Proteobacteria</i>	26
4. UMRÆÐUR.....	29
5. HEIMILDIR	31

1. INNGANGUR

Dreifkjarna örverur eru einu lífverunnar sem geta lifað í heitum hverum. Hámarksvaxtarhitastig heilkjarna örvera er talið vera um 57°C (*Cyanidium caldarium*), en dreifkjarna örvera 113°C. Dreifkjarna örverur flokkast til tveggja ríkja lífheimsins þ.e. til raunbaktería (*eubacteria*) og fornbaktería (*archaea*). Þær síðarnefndu eru almennt séð hita- og sýruþolnari en þær fyrrnefndu. Innan beggja hópa er fjöldi tegunda sem gegna mismunandi hlutverki í vistkerfum hvera. Frumbjarga tegundir leggja grunninn að öðru lífi sem finnst í vistkerfinu. Þessar tegundir eru ýmist ljóstillífandi blágrænar bakteríur sem nýta sólarorku til að binda kolefni úr koldíoxíði eða efnatillífandi bakteríur sem fá orku úr oxun á vetni eða brennisteinsvetni og geta bundið ólífrænt kolefni. Aðrar tegundir vistkerfisins eru ófrumbjarga og þurfa því lífrænt kolefni sem frumbjarga tegundir sjá þeim fyrir.

Notkun sameindalíffræðilegra aðferða við greiningar á tegundasamsetningu mismunandi vistkerfa hefur fleygt fram á síðustu árum. Nú er hægt að greina tegundasamsetningu í blönduðum sýnum án þess að undangengin ræktun sé skilyrði. Sífellt þróaðri tækjakostur gerir kleift að greina tegundasamsetningu í sýni á tiltölulega skömmum tíma. Í ljós hefur komið að lífheimur örveranna er miklum mun fjölbreyttari en talið var. Urmull af áður óþekktum tegundum hefur komið í ljós, en jafnframt hefur fengist staðfesting á því að einungis hefur tekist að rækta örlítið brot af þeim örverutegundum sem raunverulega finnast í lífheiminum. Þróun nýrra ræktunaraðferða og vaxandi þekking á mismunandi lífsferlum auka þó líkurnar á því að með tímanum takist að einangra og greina fleiri tegundir. Algengustu sameindalíffræðilegu aðferðirnar fela í sér raðgreiningu á 16S rRNA geninu sem samkomulag er um að nýta sem tegundagreinandi gen dreifkjörnunga. Á síðustu árum hafa menn raðgreint genið bæði úr ræktuðum örverum og úr blönduðum lífmassa. Vísindamenn víða um heim hafa með tímanum myndað gríðarlega stóran gagnagrunn sem hýsir 16S rRNA genaraðir víðsvegar að. Þessi grunnur “Genbank” hefur nýst sérlega vel til viðmiðunar þegar greina á bakteríu til tegundar, eða ættkvíslar, eða til að greina tegundasamsetningu baktería í sýni.

Almennt hefur verið talið að hitastig og sýrustig ráði mestu um það hvaða tegundir geti lifað á hverjum stað. Á síðari árum hefur þó verið bent á að fleiri þættir kunni að ráða talsverðu um tegundasamsetningu í hverum. Rannsókn var gerð á hverum með áþekka eiginleika hvað

varðaði sýrustig og hitastig í þjóðgarðinum Yellowstone í Bandaríkjunum og kom í ljós að tegundabreytileiki milli „samskonar“ hvera var umtalsverður. Þar bentu menn því á nauðsyn þess að mæla aðra jarðefnafræðilega þætti (Blank, C.E. o.fl. 2002). Í reynd má segja að þessi nálgun eigi vaxandi fylgi að fagna víða um heim og má sjá þess merki í nýlegum greinum um tegundasamsetningu og vistfræði hvera sérstaklega í Yellowstone þjóðgarðinum en einnig víðar. Aukin vitneskja um efni og efnasambönd í nánasta umhverfi hveraörveranna eykur líkur á að hægt verði að einangra og rækta fleiri tegundir á kerfisbundinn hátt. Matís hefur nú yfir að ráða tæki til að mæla frumefni í vatnssýnum og eru vonir bundnar við að innan tíðar megi tengja saman niðurstöður mælinga á frumefnum í vatnshverum og tegundasamsetningu í þeim.

Kveikjan að þessu verkefni um rannsóknir á lífríki í kalkríkum hverum var rannsókn sem gerð var fyrir Orkuveitu Reykjavíkur vegna umhverfismats fyrir Bitru og Hverahlíð en það fól m.a. í sér könnun á lífríki í hverum á Ölkelduhálsi (Sólveig K.Pétursdóttir o.fl. 2006). Í vettvangskönnun á Ölkelduhálsi fundust ítrekað kalkríkir hverir sem forvitnilegt var að kanna. Spurningarnar snerust einkum um það að hvaða marki lífríki í þessum hverum væri sérstakt miðað við lífríki í öðrum hverum með svipaða eðliseiginleika þ.e. hitastig og pH. Ennfremur þótti áhugavert að kanna efnainnihald í þessum sömu hverum.

2. FRAMKVÆMD

2.1 Sýnataka

Sýni voru tekin úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi á vormánuðum 2008. Sýnatökustaðir voru valdir út frá GPS hnitum fyrir slíka hveru sem fram koma í skýrslu sem unnin var vegna umhverfismats fyrir Bitru og Hverahlíð árið 2006. Reynt var að ná sýnilegum lífmassa. Einnig voru tekin vatnssýni í frumefnamælingu. Sýnin voru tekin í dauðhreinsuð ílát og komið fyrir í kæli eins fljótt og unnt var. Vinna hófst við sýnin daginn eftir að sýnatökuferð lauk.

2.2 Mælingar á sýnum

Mælingar voru gerðar á sýrustigi og hitastigi. Mælingar voru endurteknar á sýrustigi á rannsóknastofunni. Leiðni var mæld í vökvásýnum á rannsóknastofu Matís. Frumefnamælingar á 72 frumefnum voru framkvæmdar á þremur vökvásýnum sem tekin voru. Kranavatn frá Matís var haft til samanburðar. Sýnin voru skönnuð í ICP-MS greini með aðferð sem er hálfmagnbundin (semi-quantitative). Aðferðin gefur fyrsta mat á frumefnasamsetningu í óþekktu sýni. Hvert sýni var mælt þrisvar og niðurstöðurnar gefnar sem meðaltal þriggja mælinga. Niðurstöðum verður þó að taka með fyrirvara um skekkju allt að +/- 25%. Frumefnamælingar voru framkvæmdar á efnarannsóknedeild Matís.

2.3 Einangrun á DNA

2.3.1 Lífmassasýni

Lífmassinn var „homogeniseraður“ með því að hrista og hræra sýnið. Því næst voru teknir u.þ.b. 2 mL af lífmassa og leyst upp í sama rúmmáli af TE buffer. Því næst var DNA einangrað úr sýninu með phenol-chloroform aðferð (4 mL phenol settir út í, hrist rólega í 5 mín, og spunnið í skilvindu í 5 mín við 4.500 rpm. Vatnsfasi hirtur ofan af og phenol hreinsun endurtekin, spunnið og vatnsfasi hirtur. Sama rúmmál af blöndu af Chloroform – isoamylalcohol (24:1 vol:vol) sett út í, blandað rólega og spunnið í 5 mín við 4500 rpm. Þá var 1/10 vol af 3M Natrium Acetati sett saman við ásamt 2 x rúmmáli af 96% ísköldu ethanoli, spunnið við 13000 rpm í 30 mín. Floti hellt af og botnfall skolað með 1ml af 70% EtOH og síðan spunnið aftur við 13.000 rpm í 20 mín. Floti hellt af, þurrkað og pellett leystur upp í 100 µL af Te buffer).

2.3.2 Jarðvegssýni

Jarðvegssýni (ca 100mL) voru skoluð í 200mL 0,9% NaCl lausn, hrist duglega nokkrum sinnum og látin standa yfir nótt. Þá var floti hellt ofan af botnfalli, það spunnið (1000 rpm 10 mín), flot hirt og spunnið aftur við 8000 rpm í 20 mín. Botnfallið var hirt og leyst upp í sama rúmmáli af TE buffer. Síðan var phenol – chloroform aðferð (sjá í 2.3.1) notuð til að einangra DNA úr sýninu.

2.3.3 Sýni af vökva og yfirborðsbrák

Sýni af vökva og yfirborðsbrák voru spunnin beint við 8000 rpm. Botnfallið var hirt og það síðan leyst upp í sama rúmmáli af TE buffer og DNA einangrað með phenol chloroform aðferð (2.3.1) eins og áður.

2.4 PCR á 16S rRNA geninu

Algengast er að nota 16S rRNA gen baktería til tegundaákvörðunar og var það gert hér. Þynningarröð var gerð af hverju sýni (óþynnt, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) og voru allar þynningar prófaðar við kjarnsýrumögnun (PCR) á geninu. Mögnun var reynd með sérvirkum 16S endavísium fyrir raunbakteríur (F9 og R1544 eða R805) og fornbakteríur (F23 og R1391). PCR hvarfið (4 μ l 10x polymerasa buffer; 1,0 μ l dNTP (10 μ M), 0,7 μ l Teg polymerasi (0,5U), 1,0 μ l af hvorum vísi (20 μ M) og 27,7 μ l sterilt H₂O og 2,0 μ l af sýni úr hverri þynningu) var gert í tvíriti, þar sem PCR mögnunin fór fram við tvö mismunandi þörunarhitastig vísis og DNA móts, þ.e. við 42°C og 52°C. Hitaferillinn í PCR var 94°C í 4 min, (94°C í 50 sek, 42/52°C í 50 sek., 72°C í 2min) x 35 hringir; og 72°C í 7min, kælt (4°C) í lokin. Afurðirnar voru síðan rafdrengar á 1% agarosa geli með ethidium bromíð og DNA bönd af rétttri stærð (~1500bp) klippt úr gelinu. Ef engin afurð fékkst úr sýninu, var reynt að endurtaka með því að nota "gradient PCR" þar sem þörunarhitastig vísis og móts var breytilegt á bilinu milli 42 og 56°C.

2.5 Klónun og raðgreining

DNA var hreinsað úr gelbútunum með GFX aðferð skv. leiðbeiningum frá framleiðanda (Amersham Biosciences). Klónun var gerð inn í Topo plasmíð og ferjað í Top10 frumur skv. leiðbeiningum frá framleiðanda (Invitrogen). Ræktað var á skálum með LB æti með ampicillini y/n og reynt að fá ca 50 - 100 klóna alls (raunbakteríur og fornbakteríur) úr hverju sýni. Síðan var ræktað í vökvaæti y/n. Gengið var úr skugga um að genið væri á plasmíðinu með PCR hvarfi þar sem M13 F og R vísar sem parast beggja vegna innskots á plasmíðinu

voru notaðir. PCR afurðin var því næst hreinsuð með Exo/Sap skv. leiðbeiningum frá framleiðanda (USB) og raðgreiningarhvarf framkvæmt með Big Dye hvarflausn. Því næst voru raðirnar greindar í Applied Biosystems 3730 raðgreini. Raðirnar voru svo yfirfarnar og flokkaðar við 98% innbyrðis samsvörun í Sequencher forritinu.

2.6 Ákvörðun á tegundasamsetningu í sýnum

Flokkar eins raða ($\geq 98\%$ skyldleiki) og stakar raðir voru bornar saman við þekktar raðir í NCBI Genbank með BLAST forriti á veraldarvefnum. Þannig fengust nánustu ættingjar hvernar raðar (tegundar) og jafnframt skyldleikaprósenta óþekktu tegundarinnar við nánasta þekкта ættingja. Á þennan hátt fékkst yfirlit um tegundasamsetningu í hverju sýni.

2.7 Skyldleikatré

Ættartré yfir 16S rDNA raðir úr helstu fylkingum raunbaktería sem fundust í sýnunum voru gerð. Röðunum var samraðað í Bioedit og Clustal tölvuforritunum og skyldleiki hverra tveggja raða metinn (Neighbour Joining) og túlkaður í svokölluðu ættartré þar sem nánir ættingjar mynda nálægar greinar. Viðmiðunarraðir voru fengnar úr Genbank. Á þennan hátt fékkst yfirlitsmynd af því að hvaða marki sýnin voru lík eða ólík innbyrðis m.t.t. tegundasamsetningar og einnig gleggri mynd af því hvort áður óþekktar tegundir eða hópar væru til staðar í sýnunum.

2.8 Líffræðilegur fjölbreytileiki

Líffræðilegur fjölbreytileiki var metinn í sýnunum með aðferð Curtis og féлага (2002). Niðurstöðurnar voru bornar saman við samskonar greiningu á sýnum úr hverum með svipað pH og hitastig og á sama svæði og kalkríku hverirnir. Mat fékkst á því hvort fjöldi klóna úr hverju sýni væri nægilegur til að endurspeglar raunverulegan tegundafjölbreytileika og hlutföll í sýnunum.

2.9 Ræktun, einangrun og tegundagreining baktería úr kalkríkum hverum

Tilraunir voru gerðar til að rækta bakteríur úr sýnum úr kalkríkum hverum. Sýnum var dreift á ætisskálar með mismunandi æti, þ.e. 166 æti og R2A æti. Ræktun var framkvæmd við 60, 65 og 70°C í 1-3 sólarhringa. Stakar kólóníur sem uxu upp á ætunum voru hirtar með því að endurstrika þeim á samskonar æti og rækta síðan áfram við sömu aðstæður. Nokkrar kólóníur voru valdar til tegundagreiningar með erfðagreiningaraðferð sem var framkvæmd með PCR

kjarnsýrumögnun á 16S rRNA geninu, og hlutaraðgreiningu á því með vísi R805 sem parast innan gensins.

3. NIÐURSTÖÐUR

3.1 Sýnataka og sýnatökustaðir

Greiðlega gekk að finna staðsetningar kalkríkra hvera á Ölkelduhálsi út frá GPS hnitum sem fram komu í skýrslu vegna umhverfismats á Ölkelduhálsi (Sólveig Pétursdóttir o.fl. 2006). Ekki tókst þó að finna alla hverina og er ekki ólíklegt að einhverjar breytingar hafi átt sér stað á svæðinu á þeim tveimur árum sem liðin eru frá því að umhverfismatið fór fram.

Kalkríku hverirnir voru einkum á þremur stöðum (tafla 1) og afar áþekkir að sjá. Þeir einkenndust af kalkútfellingum, rauðbrúnum útfellingum og þörungagróðri (myndir 1-5). Oftast voru þeir í og við lækjarbakka. Reynt var að taka sýni úr einstökum litbrigðum lífmassa sama hvers og jafnframt vatnssýni. Einnig voru tekin sýni úr kalkútfellingunum. Hitastig í hverunum mældist á nokkuð breiðu bili eða allt frá 38°C – 78°C. Eins og búast mátti við var kaldast við yfirborðið en heitara þegar hitanemanum var komið fyrir ofan í lífmassanum. Sýrustig í kalkríku hverunum var nánast það sama og mældist á bilinu pH 6-6,5.

Á mynd 1 sést kalkríkur hver við lækjarfarveg nálægt borholu HE-20 í norðanverðum Ölkelduhálsi. Mynd 2 er af sama hver en tekin nær. Þar sjást þörungamotturnar greinilegar í nærmynd.



Mynd 1. Kalkríkur hver undir lækjarbakka nálægt borholu HE-20. Sýni 661-664 voru tekin á mismunandi stöðum úr lífmassa og vökva úr þessum hver.



Mynd 2. Sýni 661 var tekið úr grænum lífmassa og rauðbrúnum jarðvegi / útfellingum úr þessum kalkríka hver nálægt borholu HE-20.



Mynd 3. Yfirlitsmynd af kalkríkum hver við lækjarbakka nálægt HE-22. Hitastigið mældist 67-70°C í þessum hver og sýrustigið pH 6.0. Sýni 665 var tekið úr þessum hver.

Sýni 667 (mynd 4) var tekið úr kalkríkum hver í nágrenni við sýnatökustað 665. Sýnið var tekið úr kalkútfellingarskel og lífmassalögum undir henni. Hitastigið í hvernunum var ívið hærra en á hinum stöðunum, eða 76°C á um 3 cm dýpi.



Mynd 4. Sýnatökustaður 667. Sýnið var tekið af hvítum kalkútellingum og lífmassa.

Í töflu 1 er yfirlit yfir sýnatökustaði í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Í sumum tilvikum voru nokkur sýni tekin á mismunandi stöðum í sama hver.

TAFLA 1. Sýnatökustaðir, GPS staðsetningar, hitastig og sýrustig

Sýni	Hver	GPS staðsetning	T°C	pH
660	Kalkríkur hver í nágrenni HE-20	N64°03,776; V21°14,447	38	6-6,5
661	Kalkríkur hver í nágrenni HE-20	N64°03,776; V21°14,447	67	6-6,5
662	Kalkríkur hver í nágrenni HE-20	N64°03,776; V21°14,447	78	6-6,5
663	Kalkríkur hver í nágrenni HE-20	N64°03,776; V21°14,447	78	6-6,5
664	Kalkríkur hver í nágrenni HE-20	N64°03,776; V21°14,447	78	6-6,5
665	Kalkríkur hver í nágrenni HE-22	N64°03,626; V21°15,007	68	6,0
667	Kalkríkt útstreymi nálægt HE-22	N64°03,712; V21°14,996	72	6-6,5

Í töflu 2 má sjá gerð sýna sem tekin voru úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Sýrustigið í þessum hverum er á þröngu bili eða pH 6-6,5. Hitastigið er hins vegar breytilegt eins og sést í töflunni.

TAFLA 2. Gerð sýna

Sýni	Gerð sýnis	Athugasemdir	T°C	pH
660	Vatnssýni	Yfirborðsbrák	38	6-6,5
661	Lífmassi	Dökkgræn þörungapekja og rauðbrún pekja	67	6-6,5
662 F	Vatnssýni	Vatnssýni úr kalkhverslind	78	6-6,5
663	Massi	Rauðar útfellingar	78	6-6,5
664	Lífmassi	Græn þörungapekja, rauð/appelsínugul pekja, - lífræn?	78	6-6,5
665	Lífmassi	Græn, appelsínugul þörungapekja	68	6,0
667 F	Lífmassi	Kalkútfelling með grænni þörungapekju og lífmassa	72	6-6,5

Skýringar á töflu. F = Vatnssýni tekið til frumefnamælinga.

3.2 Niðurstöður úr frumefnamælingum

Mælingar á styrk 72 frumefna voru gerðar á þremur vatnssýnum úr hverum á Ölkelduhálsi. Tvö þessara sýna númer 662 og 667 voru úr kalkríkum hverum, en eitt viðmiðunarsýni númer 657 af sama svæði. Kranavatn var haft til samanburðar. Töflur 3, 4 og 5 sýna niðurstöður úr þessum mælingum.

Það eru einkum brennisteinn (S), járn (Fe) og kolefni (C) sem er áhugavert að bera saman þar sem þau fyrrnefndu gegna mikilvægu hlutverki í orkuöflun ýmissa bakteríutegunda, ýmist sem frumefni eða í efnasamböndum. Þegar styrkur þessara efna er skoðaður í hverju sýni fyrir sig sést að styrkur brennisteins er ívið lægri í sýnunum úr kalkríku hverunum en í viðmiðunarsýninu. Sama á við um styrk á járn. Kolefnisinnihald er hins vegar talsvert hærra

í kalkríku hverunum en í viðmiðunarsýni af sama svæði. Talsverður munur er á styrk arsens (As) í kalkríkum hverum og öðrum hverum eins og gildin í töflunum sýna. Önnur efni sem mæld voru sýna í fljótu bragði ekki neitt sérstakt mynstur milli kalkríkra hvera annars vegar og annarra hvera hins vegar. Hér ber þó einnig að hafa í huga að skekkjumörk frumefnamælinganna geta verið allt að 25%.

TAFLA 3. Niðurstöður frumefnamælinga úr sýni 662 úr kalkríkum hver

Water (code:662)			MATÍS tap water		Water (code:662)			MATÍS tap water	
Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**	Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**
Li	2,3	µg/l	49,7	ng/l	Sn	7,6	ng/l	5,1	ng/l
Be	<5,6	ng/l	<2,8	ng/l	Sb	5,5	ng/l	4,6	ng/l
B	3,3	µg/l	2,9	µg/l	Te	<43	ng/l	<21	ng/l
C	83,0	mg/l	7,2	mg/l	I	1,6	µg/l	273,3	ng/l
Na	19,0	mg/l	5,6	mg/l	Cs	34,0	ng/l	1,2	ng/l
Mg	8,1	mg/l	366,7	µg/l	Ba	4,9	µg/l	163,3	ng/l
Al	633,3	ng/l	7,4	µg/l	La	5,4	ng/l	3,3	ng/l
P	14,0	µg/l	11,0	µg/l	Ce	4,0	ng/l	2,4	ng/l
S	5,8	mg/l	1,5	mg/l	Pr	<0,6	ng/l	<0,28	ng/l
Cl	4,2	mg/l	3,8	mg/l	Nd	<3,3	ng/l	<1,6	ng/l
K	1,0	mg/l	98,3	µg/l	Sm	<4	ng/l	<2	ng/l
Sc	10,3	µg/l	1,3	µg/l	Eu	1,6	ng/l	<0,56	ng/l
Ti	6,5	µg/l	783,3	ng/l	Gd	<3,6	ng/l	<1,8	ng/l
V	40,0	ng/l	6,7	µg/l	Tb	<0,6	ng/l	<0,3	ng/l
Mn	38,3	µg/l	1,9	µg/l	Dy	<2,5	ng/l	<1,2	ng/l
Fe	59,7	µg/l	183,3	µg/l	Ho	<0,6	ng/l	<0,32	ng/l
Co	78,7	ng/l	24,0	ng/l	Er	<1,9	ng/l	<0,96	ng/l
Ni	556,7	ng/l	186,7	ng/l	Tm	<0,6	ng/l	<0,32	ng/l
Cu	183,3	ng/l	170,0	ng/l	Yb	<2,9	ng/l	<1,4	ng/l
Zn	683,3	ng/l	120,0	µg/l	Lu	<0,7	ng/l	<0,33	ng/l
Ga	203,3	ng/l	156,7	ng/l	Hf	<2,4	ng/l	<1,2	ng/l
Ge	2,1	µg/l	58,0	ng/l	Ta	<0,7	ng/l	<0,38	ng/l
As	160,0	ng/l	48,0	ng/l	W	13,3	ng/l	16,3	ng/l
Se	343,3	ng/l	246,7	ng/l	Re	<2,1	ng/l	<1	ng/l
Br	32,3	µg/l	25,3	µg/l	Os	<4,4	ng/l	<2,2	ng/l
Rb	4,5	µg/l	236,7	ng/l	Ir	<1,5	ng/l	<0,79	ng/l
Sr	71,0	µg/l	1,5	µg/l	Pt	<4,2	ng/l	<2,1	ng/l
Y	3,8	ng/l	0,7	ng/l	Au	<2,7	ng/l	<1,3	ng/l
Zr	4,5	ng/l	2,3	ng/l	Hg	21	ng/l	12,3	ng/l
Nb	<0,7	ng/l	<0,4	ng/l	Tl	<1,3	ng/l	<0,65	ng/l
Mo	54,3	ng/l	32,7	ng/l	Pb	13,7	ng/l	170,0	ng/l
Ru	<3,9	ng/l	<1,9	ng/l	Bi	1,6	ng/l	<0,59	ng/l
Rh	<3,5	ng/l	<0,3	ng/l	Th	<1	ng/l	<0,5	ng/l
Pd	78,3	ng/l	3,0	ng/l	U	<1	ng/l	10,7	ng/l
Ag	263,3	ng/l	153,3	ng/l	Si	29,0	mg/l	2,9	mg/l
Cd	<7,5	ng/l	8,1	ng/l	Ca	11,0	mg/l	1,0	mg/l

* Concentration reported here is the **mean value of 3 replications**.

** Results are expressed in **different units (mg/l, µg/l, or ng/l)**.

Note: V,Ni,Eu in the sample 662 reported as oxide and Zr as dimer. Ni & Se in the Matís tap water reported as oxide. SR, Reykjavík. 2nd. of June 2008.

TAFLA 4. Niðurstöður frumefnamælinga úr sýni 667 úr kalkríkum hver

Water (code:667)			MATÍS tap water		Water (code:667)			MATÍS tap water	
Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**	Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**
Li	220,0	ng/l	49,7	ng/l	Sn	3,8	ng/l	5,1	ng/l
Be	<2,8	ng/l	<2,8	ng/l	Sb	3,1	ng/l	4,6	ng/l
B	1,7	µg/l	2,9	µg/l	Te	<21	ng/l	<21	ng/l
C	20,7	mg/l	7,2	mg/l	I	493,3	ng/l	273,3	ng/l
Na	5,4	mg/l	5,6	mg/l	Cs	9,9	ng/l	1,2	ng/l
Mg	2,9	mg/l	366,7	µg/l	Ba	2,8	µg/l	163,3	ng/l
Al	1,6	µg/l	7,4	µg/l	La	3,1	ng/l	3,3	ng/l
P	8,0	µg/l	11,0	µg/l	Ce	2,3	ng/l	2,4	ng/l
S	1,8	mg/l	1,5	mg/l	Pr	<0,3	ng/l	<0,28	ng/l
Cl	2,5	mg/l	3,8	mg/l	Nd	<1,6	ng/l	<1,6	ng/l
K	266,7	µg/l	98,3	µg/l	Sm	<2	ng/l	<2	ng/l
Sc	5,5	µg/l	1,3	µg/l	Eu	0,86	ng/l	<0,56	ng/l
Ti	3,3	µg/l	783,3	ng/l	Gd	<1,8	ng/l	<1,8	ng/l
V	20,3	ng/l	6,7	µg/l	Tb	<0,3	ng/l	<0,3	ng/l
Mn	116,7	µg/l	1,9	µg/l	Dy	<1,2	ng/l	<1,2	ng/l
Fe	91,0	µg/l	183,3	µg/l	Ho	<0,3	ng/l	<0,32	ng/l
Co	33,0	ng/l	24,0	ng/l	Er	<0,9	ng/l	<0,96	ng/l
Ni	273,3	ng/l	186,7	ng/l	Tm	<0,3	ng/l	<0,32	ng/l
Cu	113,3	ng/l	170,0	ng/l	Yb	<1,4	ng/l	<1,4	ng/l
Zn	1,2	µg/l	120,0	µg/l	Lu	<0,3	ng/l	<0,33	ng/l
Ga	120,0	ng/l	156,7	ng/l	Hf	<1,2	ng/l	<1,2	ng/l
Ge	386,7	ng/l	58,0	ng/l	Ta	<0,4	ng/l	<0,38	ng/l
As	160,0	ng/l	48,0	ng/l	W	2,5	ng/l	16,3	ng/l
Se	140,0	ng/l	246,7	ng/l	Re	<1	ng/l	<1	ng/l
Br	12,3	µg/l	25,3	µg/l	Os	<2,2	ng/l	<2,2	ng/l
Rb	1,4	µg/l	236,7	ng/l	Ir	<0,8	ng/l	<0,79	ng/l
Sr	17,0	µg/l	1,5	µg/l	Pt	4,3	ng/l	<2,1	ng/l
Y	1,6	ng/l	0,7	ng/l	Au	<1,3	ng/l	<1,3	ng/l
Zr	<6,2	ng/l	2,3	ng/l	Hg	9,6	ng/l	12,3	ng/l
Nb	<0,4	ng/l	<0,4	ng/l	Tl	<0,6	ng/l	<0,65	ng/l
Mo	5,2	ng/l	32,7	ng/l	Pb	14,3	ng/l	170,0	ng/l
Ru	<1,9	ng/l	<1,9	ng/l	Bi	1,1	ng/l	<0,59	ng/l
Rh	0,8	ng/l	<0,3	ng/l	Th	<0,5	ng/l	<0,5	ng/l
Pd	20,3	ng/l	3,0	ng/l	U	<0,5	ng/l	10,7	ng/l
Ag	123,3	ng/l	153,3	ng/l	Si	16,3	mg/l	2,9	mg/l
Cd	<3,7	ng/l	8,1	ng/l	Ca	4,3	mg/l	1,0	mg/l

* Concentration reported here is the **mean value of 3 replications**.

** Results are expressed in **different units (mg/l, µg/l, or ng/l)**.

Note: V,Ni,Mo,Eu in the sample 667 reported as oxide and Zr as dimer. Ni & Se in the Matís tap water reported as oxide. SR, Reykjavík, 2nd. of June 2008.

TAFLA 5. Niðurstöður frumefnamælinga úr sýni 657 – úr viðmiðunarhver

Water (code:657)			MATIS tap water		Water (code:657)			MATIS tap water	
Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**	Element	Conc.*	Unit**	Conc.*	Unit**
Li	673,3	ng/l	49,7	ng/l	Sn	39,3	ng/l	5,1	ng/l
Be	243,3	ng/l	<2,8	ng/l	Sb	9,4	ng/l	4,6	ng/l
B	5,3	µg/l	2,9	µg/l	Te	<100	ng/l	<21	ng/l
C	11,3	mg/l	7,2	mg/l	I	1,3	µg/l	273,3	ng/l
Na	4,3	mg/l	5,6	mg/l	Cs	3,5	ng/l	1,2	ng/l
Mg	4,4	mg/l	366,7	µg/l	Ba	35,3	µg/l	163,3	ng/l
Al	683,3	µg/l	7,4	µg/l	La	1,9	µg/l	3,3	ng/l
P	43,3	µg/l	11,0	µg/l	Ce	4,4	µg/l	2,4	ng/l
S	25,7	mg/l	1,5	mg/l	Pr	610,0	ng/l	<0,28	ng/l
Cl	8,3	mg/l	3,8	mg/l	Nd	3,2	µg/l	<1,6	ng/l
K	220,0	µg/l	98,3	µg/l	Sm	853,3	ng/l	<2	ng/l
Sc	6,6	µg/l	1,3	µg/l	Eu	303,3	ng/l	<0,56	ng/l
Ti	3,9	µg/l	783,3	ng/l	Gd	1,0	µg/l	<1,8	ng/l
V	9,6	µg/l	6,7	µg/l	Tb	170,0	ng/l	<0,3	ng/l
Mn	206,7	µg/l	1,9	µg/l	Dy	1,1	µg/l	<1,2	ng/l
Fe	4,3	mg/l	183,3	µg/l	Ho	206,7	ng/l	<0,32	ng/l
Co	3,3	µg/l	24,0	ng/l	Er	576,7	ng/l	<0,96	ng/l
Ni	3,7	µg/l	186,7	ng/l	Tm	83,0	ng/l	<0,32	ng/l
Cu	9,6	µg/l	170,0	ng/l	Yb	480,0	ng/l	<1,4	ng/l
Zn	26,3	µg/l	120,0	µg/l	Lu	76,0	ng/l	<0,33	ng/l
Ga	1,6	µg/l	156,7	ng/l	Hf	8,5	ng/l	<1,2	ng/l
Ge	760,0	ng/l	58,0	ng/l	Ta	2,4	ng/l	<0,38	ng/l
As	466,7	ng/l	48,0	ng/l	W	11,1	ng/l	16,3	ng/l
Se	896,7	ng/l	246,7	ng/l	Re	<5,3	ng/l	<1	ng/l
Br	58,7	µg/l	25,3	µg/l	Os	<11	ng/l	<2,2	ng/l
Rb	1,4	µg/l	236,7	ng/l	Ir	<3,9	ng/l	<0,79	ng/l
Sr	28,7	µg/l	1,5	µg/l	Pt	<10	ng/l	<2,1	ng/l
Y	4,3	µg/l	0,7	ng/l	Au	<6,8	ng/l	<1,3	ng/l
Zr	13,3	ng/l	2,3	ng/l	Hg	69,3	ng/l	12,3	ng/l
Nb	<1,8	ng/l	<0,4	ng/l	Tl	14,9	ng/l	<0,65	ng/l
Mo	18,0	ng/l	32,7	ng/l	Pb	220,0	ng/l	170,0	ng/l
Ru	<9,9	ng/l	<1,9	ng/l	Bi	4,7	ng/l	<0,59	ng/l
Rh	<1,7	ng/l	<0,3	ng/l	Th	8,5	ng/l	<0,5	ng/l
Pd	146,7	ng/l	3,0	ng/l	U	35,3	ng/l	10,7	ng/l
Ag	766,7	ng/l	153,3	ng/l	Si	14,7	mg/l	2,9	mg/l
Cd	29,0	ng/l	8,1	ng/l	Ca	6,0	mg/l	1,0	mg/l

* Concentration reported here is the **mean value of 3 replications**.

** Results are expressed in **different units (mg/l, µg/l, or ng/l)**.

Note: Ni,Se,Mo,Pd in the sample 657 reported as oxide, Hf as dimer, and Zr as Hydride. Ni & Se in the Matís tap water reported as oxide. SR, Reykjavík. 2nd. of June 2008.

3.3 Niðurstöður úr bakteríuræktunum

Tilraunir voru gerðar til að rækta úr sýnunum á agarætum 166 og R2A við mismunandi hitastig, þ.e. 60, 65 og 70°C. Aðeins sjö tegundir uxu við þær ræktunaraðstæður sem notaðar voru (talfa 6). Þessar tegundir heyra undir tvær fylkingar baktería þ.e. *Deinococcus-Thermus* og *Firmicutes*, en tegundir innan þessara fylkinga eru mjög algengar í hverum almennt og tiltölulega auðræktanlegar. Eins og taflan ber með sér var *Thermus scotoductus* algengastur

(16/31) meðal tegunda sem uxu upp á skálum og fannst í flestum sýnum. *Meiothermus* tegundir voru tiltölulega algengar (4/31). Þrjár *Firmicutes* tegundir fundust og flokkast þær allar undir *Bacillus*.

TAFLA 6. Ræktaðar tegundir úr sýnum úr kalkríkum hverum

Fj.	Nánasti ættingi	Skyld	Fylking	Úr sýni
16	<i>Thermus scotoductus</i> EU330195	99%	<i>Deinoc-Thermus</i>	662, 663, 664, 665
6	<i>Meiothermus ruber</i> AF407750	99%	<i>Deinoc-Thermus</i>	663 & 664
3	<i>Geobacillus kaustophilus</i> BA000043	100%	<i>Firmicutes</i>	664 & 665
1	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> AJ618979	100%	<i>Firmicutes</i>	663
1	<i>Brevibaillus thermoruber</i> AB362290	100%	<i>Firmicutes</i>	664
1	<i>Unc. Meiothermus sp.</i> AY531654	94%	<i>Deinoc-Thermus</i>	663
1	<i>Unc. Thermus sp. clone</i> AY531647	99%	<i>Deinoc Thermus</i>	662
31	ALLS			

Taflan sýnir tegundir sem uxu í sýnum úr kalkríkum hverum og dreifingu þeirra. Númer viðkomandi tegunda í Genbank eru einnig sýnd aftan við tegundarheitið. Mismunandi litir í töflunni flokka tegundirnar sem ræktuðust eftir skyldleika við nánustu ættingja, þ.e. grænt = 98-100%, blátt = 94-97%.

3.4 Niðurstöður úr erfðagreiningum á blönduðum sýnum

Ekki tókst að ná DNA úr öllum sýnum sem tekin voru. Á það sér eðlilegar skýringar: Yfirborðsbrák í sýni 660 náðist ekki í nægilegu magni til að ná nægum lífmassa úr sýninu fyrir DNAeinangrun; sýni 662, vatnssýni, var spunnið niður en innihélt heldur ekki nægilegan lífmassa. Sýni 663 af rauðbrúnnum massa hefur að öllum líkindum verið ólífrænt að mestu leyti og því ekkert DNA að hafa. Einangrun á DNA úr öðrum sýnum, - lífmassasýnum – tókst hins vegar ágætlega.

Raunbakteríumögnun tókst vel á sýnum 661, 664, 665 og 667 og má sjá tegundasmsetningu í þeim í töflum 7 – 10. Hins vegar fundust engar fornbakteríur (archaea) í sýnunum. Tegundir sem tókst að flokka til þekktra tegunda, ræktaðra eða óræktaðra, eru litaðar með grænu í töflunum hér á eftir, tegundir sem flokkuðust til ættkvísla með bláu og tegundir sem ná ekki ættkvíslarskilgreiningu með rauðu. Genbank númer er gefið aftan við nánasta ættingja. Spurningamerki við fylkingar þýðir að erfitt sé að greina viðkomandi röð til fylkingar þar sem hún er það frábrugðin öllu því sem þekkt er.

3.4.1 Sýni 661

Í sýni 661 fundust 22 tegundir (tafla 7). Helmingur þeirra (50%) flokkuðust hvorki til tegundar né ættkvíslar, 23% flokkuðust til ættkvíslar og 27% til tegundar. Skyldleikaprósentan við nánasta ættingja er lág í sýni 661 sem er til vitnis um að tegundir sem finnast í kalkríka hvernum eru lítt þekktar eða óþekktar. Eins og sjá má falla flestir hópar utan við tegundagreiningu, þ.e. eiga sér engan þekktan ættingja sömu tegundar.

TAFLA 7. Tegundasamsetning í sýni 661 (48 klónar, 22 tegundir)

Númer	Nánasti ættingi	Skyld	Fylking	Uppruni	Heimild
661-1-1	Unc bact clone NK2_619 EU376210	87%	Chloroflexi?	Þörungapekja	Kormas et al. 2007
661-4-9	Unc bact clone NK2_619 EU376210	93%	Chloroflexi?	Þörungapekja	Kormas et al. 2007
661-2-1	Uncultured cyanob clone EU753633	96%	Cyanobacteria Leptolyngbya?	Stromatolitar Spánn	Santos, F. et al. 2008
661-10-4	Unc Oscillatoria sp. cl Pc26 DQ058874	90%	Cyanobacteria	Örverupekja Ástralía	Allen et al. 2005
661-15-1	Leptolyngbya sp. Greenl 9 DQ431004	93%	Cyanobacteria Leptolyngb.	Arctic hverir Grænland	Roeselers et al. 2007
661-5-5	Unc bact clone PK324 AY555804	99%	α -proteobact.	Hver Thailand	Kanokratana et al. 2004.
661-12-3	Uncultured bact cl EF492889	97%	α -Proteob.	Jarðv. Fe-Mn Kína	He & Zhang 2007.
661-13-1	Uncultured bacterium clone B15 AF407716	99%	α -Proteob.	Brúnir þræðir 52°C	Spanevello & Patel 2001.
661-14-1	Unc bact clone BacA EU335267	88%	α -Proteob.	Jarðvegur	Hansel et al. 2008.
661-17-1	Unc bact clone R1-27 AB280291	93%	α -Proteob.	Úrgangur	Osaka et al. 2008.
661-20-1	Unc bact cl FFCH5005 EU133576	92%	α -Proteob.	Jarðvegur Oklahoma	Elshahed et al. 2007
661-3-4	Curvibacter gracilis AB109889	100%	β -Proteob.	Lindarvatn Japan	Ding & Yokota 2004
661-9-1	Uncultured b proteob cl CE_05 EF562563	99%	β -Proteob.	Pappírsúrg. Kalifornía	Jin et al. 2007
661-8-5	Unc d- proteob cl 190 EF188489	98%	δ -Proteob.	Altamira hellir, Spánn	Portillo et al. 2006
661-21-1	Unc bact clone PK331 AY555806	95%	δ -Proteob.	Hver Thailand	Kanokratana et al. 2004.
661-22-1	Unc bact clone CM16 AM910068	95%	δ -Proteob.	Methane bakteríur	Qiu 2007.
661-16-1	Uncult bact, cl: 1174-1091-14 AB128879	89%	γ -Proteob?	Sjávarset Japan	Murakami & Naganuma 2003
661-7-2	Uncult bact cl horsej aai92d04 EU463761	93%	Firmicutes?		
661-18-1	Unc cand div WYO bact cl AY150913	90%	Firmicutes?	Jarðvegur	Mummey & Stahl 2002
661-6-1	Unid Actinomycete OPB41 AF027014	86%	Actinomycet	Yellowstone	Hugenholtz et al. 1998.
661-11-2	Unc. Acidobacteria AM902634	99%	Acidobact.	Hver Austurríki	Weidler et al. 2007.
661-19-1	Uncult bact clone 20BSU18 AJ863190	94%	Actinobact.	Jarðvegur	Graff & Conrad 2005

Taflan sýnir yfirlit yfir tegundir sem fundust í sýnunum raðað eftir fylkingum. “Númer”= Númer sýnis-númer raðar innan sýnis-fjöldi samskonar ($\geq 98\%$) raða í sýni. “Nánasti ættingi” = skv. Genbank ásamt númeri; “Skyldleiki” = Skyldleiki við nánasta ættingja (98% = sama tegund); “Fylking” = fylking sem tegundin í sýninu flokkast undir; “Uppruni” = uppruni nánasta ættingja. Mismunandi litir flokka tegundirnar sem fundust eftir skyldleika við nánustu ættingja, þ.e grænt = 98-100%, blátt = 94-97% og rautt <94%. Algengasta tegundin er feitletruð.

Engin ein tegund í sýni 661 virðist afgerandi ríkjandi. Jaðarvistkerfi einkennast af einni ríkjandi tegund og svo þó nokkrum tegundum sem innihalda einn eða tiltölulega fáa fulltrúa. Sá hópur sem kemst næst því að vera ríkjandi í sýninu inniheldur 9 klóna af 48 eða um 19% (númer 661-4-9). Þessi hópur flokkast til fylkingar *Chloroflexi* en telst vera ný tegund þar sem skyldleiki við nánasta ættingja er lægri en 98%. *Chloroflexus* tegundir eru afar algengir í vatnshverum þar sem sýrustig er um pH 7 og eru oft sýnilegar með berum augum þar sem hún vex í umtalsverðu magni.

Blágrænar bakteríur (*Cyanobacteria*) eru nokkrar í sýninu og flestar fjarskyldar þekktum tegundum innan undirhóps þráðlaga *Oscillatoria*. Það vekur athygli að ein tegundanna sem fannst sýnir mestan skyldleika við en er þó einungis fjarskyld annarri tegund blágrænnar bakteríu sem fannst nýverið á Grænlandi (Roselers o.fl. 2007).

Aðrar tegundir í sýninu flokkast flestar til *Proteobacteria* sem er afar stór og sundurleit fylking. Sú sem innihélt flesta fulltrúa í sýninu (661-5-5) er innan hóps α -*proteobacteria*, en nánasti ættingi þessarar tegundar fannst í súlfíðríkum hver á Thailandi þar sem hitastigið var 50-57°C (Kanokratana o.fl. 2004). Nokkrar tegundir flokkast svo til *Firmicutes* sem eru margar hverjar loftfælnar og eiga uppruna sinn í neðri lögum lífmassans.

3.4.2 Sýni 664

Í sýni 664 (tafla 8) voru 47 klónar greindir og dreifðust þeir á 16 tegundir. Flestar þeirra, eða 11 hafa fundist áður ýmist með ræktunum eða sameindalíffræðilegum aðferðum (grænt í töflu). Tvær tegundir ná einungis ættkvíslargreiningu (blátt í töflu) og þrjár eru alsendis óþekktar (<94%, rautt í töflu). Af *proteobakteríum* fundust β -, γ -, og ϵ - *proteobakteríur* en engar α -*proteobakteríur*.

Það sem vekur einkum athygli í sýni 664 er tiltölulega hátt hlutfall tegunda innan *Bacteroidetes* fylkingarinnar. Í sýninu er tegundin *Flavobacterium succinicans* ríkjandi með 20 af 47 greindum klónum eða 42-43%. Þessi tegund vex best án súrefnis í umhverfinu, en þolir það þó. Hún er háð kolsýru (CO₂) við gerjun á glúkósa. Aðrar tegundir innan *Bacteroidetes* sem fundust í sýninu eru fjarskyldar þeim sem þekktar eru og eru auðkenndar með rauðu í töflu 8.

Nokkrar tegundanna sem fundust í sýni 664 hafa fundist áður í fjöruhver á Reykjanesi við Ísafjarðardjúp (Hobel o.fl. 2005). Hér er átt við blágrænar bakteríur af ættkvísl *Fischerella* og eina *Meiothermus* tegund en báðar eru algengar í vatnshverum á Íslandi við hitastig á bilinu

50-62°C. Ein tegund blágrænna baktería (664-11-1) með nánasta ættingja úr hver á Grænlandi sést þarna einnig og er sá sami og fannst í sýni 661.

TAFLA 8. Tegundasamsetning í sýni 664 (47 klónar, 16 tegundir)

Númer	Nánasti ættingi	Skyldl.	Fylking	Uppruni	Heimild
664-15-1	Chloroflexus aurantiacus J-10-fl CP000909	99%	Chloroflexi		Copeland 2007
664-2-1	Unc Fischerella sp. clone AY699371	99%	Cyanobacteria	Fjörúhver Ísland	Hobel et al. 2005
664-10-1	Uncultured Fischerella AY699371	95%	Cyanobacteria	Fjörúhver Ísland	Hobel et al. 2005
664-11-1	Chlorogloeopsis sp. Greenland DQ431000	100%	Cyanobacteria	Hver, Grænland	Roeselers et al 2007
664-5-4	Unc Arcobacter sp. cl DS081 DQ234164	99%	ε-Proteob.	Mangrove	Liao et al. 2007
664-6-7	Unc bacterium cl 3C003632 EU802204	99%	β-Proteob.	Sjávarsvif	Shaw et al. 2008
664-8-2	Unc bacterium clone S-Rwb DQ017928	98%	β-Proteob.	Ferskvatn - Á	Beier et al. 2008
664-9-1	Rheinheimera chironomi DQ298025	98%	γ-Proteob.	Chironomid egg mass/ Vatnssýni	Halpern et al. 2007
664-13-1	Unc bacterium cl DTH5 EF653576	96%	β-Proteob.	Vatnssýni	Qian et al. 2007
664-14-1	Pseudomonas extremaustralis AJ583501	100%	γ-Proteob.	Antarctica	Ayub 2004
664-1-1	Unc soil bacterium clone L1A.13F03 AY989485	90%	Bacteroidetes	Jarðvegur, Alaska	Schloss and Handelsman1995
664-3-20	Flavobacterium succinicans AM230493	99%	Bacteroidetes		Brambilla 2006
664-4-2	Unc bacterium clone DPK1D4 DQ190186	90%	Bacteroidetes	Aquifer	Strap et al. 2005
664-12-1	Unc bacterium GR-296.II.11 AJ296575	93%	Bacteroidetes	Úran náma, Þýskal.	Selenska-Pobell 2002
664-7-2	Unc Meiothermus sp. cl CSR-32 AY699383	99%	Deinococcus- Thermus	Fjörúhver Ísland	Hobel et al. 2005
664-16-1	Paenibacillus sp. AY660695	99%	Firmicutes	Permafrost Siberia	Bakermans et al 2003

Taflan sýnir yfirlit yfir tegundir sem fundust í sýnunum raðað eftir fylkingum. “Númer”= Númer sýnis-númer raðar innan sýnis-fjöldi samskonar (≥98%) raða í sýni. “Nánasti ættingi” = skv. Genbank ásamt númeri; “Skyldleiki” = Skyldleiki við nánasta ættingja (98% = sama tegund); “Fylking” = fylking sem tegundin í sýninu flokkast undir; “Uppruni” = uppruni nánasta ættingja. Mismunandi litir flokka tegundirnar sem fundust eftir skyldleika við nánustu ættingja, þ.e grænt = 98-100%, blátt = 94-97% og rautt <94%. Algengasta tegundin er feitletruð.

3.4.3 Sýni 665

Í sýni 665 (tafla 9) voru 48 klónar greindir sem dreifðust á 14 tegundir. Sex þessara tegunda, eða um 43% hafa fundist áður (grænt í töflu). Þrjár tegundanna ná ættkvíslar-greiningu (blátt í töflu), en fimm þeirra eru afar fjarskyldar nánasta ættingja (rautt í töflu).

Firmicutes tegundir eru einkum áberandi í sýni 665, en innan þessarar fylkingar eru margar tegundir sem lifa við loftfirrðar aðstæður. Ríkjandi tegund í sýninu (665-6-23) með 23 af 48 klónum er *Sporosarcina macmurdoensis* sem er einmitt af þessari fylkingu. Hinar *Firmicutes* tegundirnar eru greinilega nýjar af nálinni þar sem skyldleikaprósenta er lægri en 95%.

Jafnvel er um áður óþekktar ættkvíslir að ræða. *Curvibacter gracilis* af fylkingu β -*proteobacteria* fannst í þessu sýni (665-1-8) í umtalsverðu magni en þessi sama tegund fannst einnig í sýni 661. Þessi tegund hefur fundist í sjó og á jarðhitasvæðum á Hawai.

TAFLA 9. Tegundasamsetning í sýni 665 (48 klónar, 14 tegundir)

Númer	Nánasti ættingi	Skyld	Fylking	Uppruni	Heimild
665-10-1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> AJ308501	95%	Chloroflexi	Örveruþekja	Nubel et al. 2001
665-1-8	<i>Curvibacter gracilis</i> AB109889	100%	β -Proteob.	Lindarvatn Japan	Ding et al. 2004
665-4-1	Unc. b- proteobacterium cl CE_05 EF562563	99%	β -Proteob.	Pappírs-úrgangur Kalifornia	Jin et al. 2007
665-3-1	Uncultured bact cl EU463761	93%	Firmicutes?		Ley et al. 2008
665-5-4	Unc. Firmicutes bact cl. EF665637	89%	Firmicutes	Jarðvegur Michigan	Jangid et al. 2007
665-8-1	Unc bact clone EU466708	99%	Firmicutes		Ley et al. 2008
665-9-1	Uncultured bacterium clone B55 AM162488	92%	Firmicutes?	Súrt umhverfi	Dedysch et al. 2006
665-6-23	<i>Sporosarcina</i> <i>macmurdoensis</i> AJ514408	99%	Firmicutes / Bacillales	Blágr. Þór -þekja Antarctica	Reddy et al. 2003
665-14-1	Arctic soil bacterium MITS4 DQ234493	99%	Firmicutes	Finland jarðvegur	Mannisto & Haggblom 2006
665-7-1	Unc. bacterium clone FFCH9847 EU133745	99%	Bacterioid.	Jarðvegur	Elshahed et al. 2007
665-2-3	Unid. Actinomycete OPB41 AF027014	86%	Actinomyc.	Yellowstone	Hugenholtz et al. 1998
665-11-1	Unc. bacterium cl AS3 EU466698	89%	Actinobact?		Ley et al. 2008
665-12-1	Unc. bacterium clone FFCH1742 EU132976	96%	Actinobact.	Jarðvegur	Elshahed et al. 2007
665-13-1	Uncultured bacterium clone PH1-24 DQ444025	95%	Actinobact.	Set Kína	Zhao et al. 2006

Taflan sýnir yfirlit yfir tegundir sem fundust í sýnunum raðað eftir fylkingum. “Númer”= Númer sýnis-númer raðar innan sýnis-fjöldi samskonar ($\geq 98\%$) raða í sýni. “Nánasti ættingi” = skv. Genbank ásamt númeri; “Skyldleiki” = Skyldleiki við nánasta ættingja (98% = sama tegund); “Fylking” = fylking sem tegundin í sýninu flokkast undir; “Uppruni” = uppruni nánasta ættingja. Mismunandi litir flokka tegundirnar sem fundust eftir skyldleika við nánustu ættingja, þ.e grænt = 98-100%, blátt = 94-97% og rautt <94%. Algengasta tegundin er feitlertuð.

3.4.4 Sýni 667

Úr sýni 667 fengust 52 klónar (tafla 10) sem dreifast á níu tegundir. Tvær þessara tegunda eru þekktar og er önnur þeirra 667-5-36, *Sporosarcina sp.*, er ríkjandi í sýninu með 36 klóna af 52 klónum alls eða 69%. Hin þekktu tegundin 667-6-2, hefur ekki verið ræktuð. Þrjár tegundir í sýninu ná síðan ættkvíslargreiningu ($\leq 98\%$, $\geq 94\%$), en fjórar tegundir eru það fjarskyldar öllu því sem greint hefur verið að þær ná ekki einu sinni ættkvíslargreiningu.

Í sýninu eru talsvert um *Firmicutes* tegundir og er ríkjandi tegund (69%) í sýninu einmitt af ættkvísl *Sporosarcina* og náskyld *Sporosarcina* tegundinni sem fannst í sýni 665. Aðrar tegundir sem sjást í töflu eru *α-proteobakteriur* og *acidobakteriur*.

TAFLA 10. Tegundasamsetning í sýni 667 (52 klónar, 9 tegundir)

Númer	Nánasti ættingi	Skyld	Fylking	Uppruni	Heimild
667-4-1	Unc bact cl FFCH4793EU134576	96%	Acidob. / Chlorofl?	Jarðvegur	Elshahed et al. 2007
667-6-2	Uncult bact cl PK324 AY555804	99%	<i>α-Proteob</i>	Hver Thailand /	Kanokratana et al. 2004
667-9-3	Unc a-proteob cl HB125 EF648106	86%	<i>α-Proteob</i>	Aerobic activ. sludge	Wang et al. 2007
667-3-1	Uncult Firmicutes EF665637	92%	Firmicutes	Jarðvegur Michigan	Jangid et al. 2007
667-5-36	<i>Sporosarcina</i> sp. S11- 2 DQ514313	99%	Firmicutes / Bacillales	Sjávarset Arctic Ocean	Yu et al. 2006
667-7-3	Uncult bact cl B55FBC06 EF558960	83%	Firmicutes ??	Heitur loft- firrður jarðv.	Li et al. 2007
667-1-1	Uncult bact cl 1969c- 07 AY917765	84%	Acidobact.	Hawai Eldfjall	Gomez-Alvarez 2005
667-2-1	Uncult bacterial clone Amb EF018881	95%	Acidobact.		Lesaulnier et al. 2008
667-8-4	Uncult bact cl EU132976	96%	Actinobact	Jarðvegur	Elshahed et al. 2007

Taflan sýnir yfirlit yfir tegundir sem fundust í sýnunum raðað eftir fylkingum. “Númer”= Númer sýnis-númer raðar innan sýnis-fjöldi samskonar ($\geq 98\%$) raða í sýni. “Nánasti ættingi” = skv. Genbank ásamt númeri; “Skyldleiki” = Skyldleiki við nánasta ættingja (98% = sama tegund); “Fylking” = fylking sem tegundin í sýninu flokkast undir; “Uppruni” = uppruni nánasta ættingja. Mismunandi litir flokka tegundirnar sem fundust eftir skyldleika við nánustu ættingja, þ.e grænt = 98-100%, blátt = 94-97% og rautt <94%. Algengasta tegundin er feitletruð.

3.5 Dreifing tegunda á fylkingar

Í töflu 11 má sjá hvernig tegundirnar sem fundust í sýnunum dreifðust á fylkingar. Þar sést að þær dreifast á níu fylkingar. Tegundir af fylkingum *Chloroflexi*, *Proteobacteria* og *Firmicutes* fundust í öllum sýnum sem greind voru. Aðrar fylkingar áttu stöku fulltrúa úr stöku sýnum. Tegundir af fylkingu *Proteobacteria* virðast algengar í kalkríku hverunum. Hér ber að hafa í huga að *Proteobakteriur* eru afar sundurleit fylking baktería sem afla sér lífsviðurværis á fjölbreyttan hátt. Þær flokkaðst í stóra undirhópa α , β , γ , δ og ϵ , en flokkun tegunda úr kalkríkum hverum í þessa undirhópa sést í töflum 7-10. Stærstu undirhóparnir í sýnunum flokkuðust til *α-* eða *β-proteobaktería*. Ein tegund *β-proteobaktería* *Curvibacter gracilis* fannst í tveimur sýnum (661 og 665) af fjórum. Tegund af *Firmicutes* ættkvísl (*Sporosarcina*) er ríkjandi í tveimur (665 og 667) af fjórum sýnum sem greind voru. Blágrænar bakteriur (*Cyanobacteria*) greindust í tveimur sýnum af fjórum. Tegundir af fylkingu *Bacteroidetes* fundust í tveimur sýnum af fjórum, en þó nokkrar tegundir fundust,

sérstaklega í sýni 664, sem flokkast til þessarar fylkingar. *Actinobacteria* fundust í þremur sýnum af fjórum og var um sömu tegundina að ræða úr sýnum 665 og 667. *Actinomycetes* fundust í tveimur sýnum 661 og 665 og var um sömu tegund að ræða. *Thermus* tegundir greindust einungis í einu sýni (664). *Thermus* tegundir voru hins vegar ræktaðar úr fleiri sýnum (tafla 2). *Curvibacter gracilis* fannst í tveimur sýnum af fjórum.

TAFLA 11. Dreifing tegunda í sýnunum á fylkingar innan raunbaktería

Sýni / fj T°C pH	661 / 48 67°C pH6-6,5		664 / 47 78°C pH 6-6,5		665 / 48 68°C pH 6		667 / 52 72°C pH 6-6,5	
	Fj	%	Fj	%	Fj	%	Fj	%
<i>Chloroflexi</i>	10	21%	1	2%	1	2%	1	2%
<i>Cyanobacteria</i>	6	13%	3	6%				
<i>Proteobacteria</i>	25	52%	16	35%	9	19%	5	10%
<i>Firmicutes</i>	3	6%	1	2%	31	65%	40	76%
<i>Actinobacteria</i>	1	2%			3	6%	4	8%
<i>Acidobacteria</i>	2	4%					2	4%
<i>Bacteroidetes</i>			24	51%	1	2%		
<i>Actinomycetes</i>	1	2%			3	6%		
<i>Deinococcus</i> <i>Thermus</i>			2	4%				
ALLS	48	100	47	100	48	100	52	100

Skýringar á töflu: Hver dálkur inniheldur niðurstöður fyrir eitt sýni. Tölugildin í töflunni tákna fjölda innan fylkingar innan hvers sýnis og hlutföll (%). Feitletrun tölugilda tákna mestan fjölda innan sýnis.

3.6 Líffræðilegur fjölbreytileiki

Í töflu 12 hér að neðan er líffræðilegur fjölbreytileiki örvera í sýnunum metinn með aðferð Curtis og féлага (2002). Í aftasta dálki töflunnar eru reiknuð gildi líffræðilegs fjölbreytileika á bilinu 1,4 – 5,3. Þessi gildi eru ívið hærri en sambærileg gildi úr þremur öðrum hverum með svipað hitastig og pH á sama svæði en þau eru sýnd neðst í töflunni.

Eftir því sem aðstæður eru mildari og umhverfisþrýstingur minnkar verður gildi fyrir líffræðilegan fjölbreytileik hærra, þ.e. fleiri tegundir komast af. C gildið (“coverage”) gefur vísbendingu um hvort fjöldi raðgreindra klóna hafi verið nægilegur. Í sýnum 664, 665 og 667 úr kalkríkum hverum og sýnum 462 og 484 úr viðmiðunarhverum, gefur fjöldi raðgreindra klóna nokkuð áreiðanlega mynd af tegundasamsetningu í hvernum og er áreiðanleikinn metinn á bilinu 79-95%. Í sýni 661 og 461 er þetta gildi lægra eða 71% og fjölbreytileikinn meiri og hefði verið betra að greina fleiri klóna úr þeim sýnum. Í heildina eru niðurstöðurnar þó nokkuð sannfærandi.

TAFLA 12. Líffræðilegur fjölbreytileiki í sýnunum

Sýni	T°C	pH	Nt	S	N1	C	Nmax	Nt/Nmax
661	67	6-6,5	48	22	14	71	9	5,3
664	78	6-6,5	47	16	10	79	20	2,4
665	68	6	48	14	10	79	23	2,9
667	72	6-6,5	52	9	4	92	36	1,4
461	60	6,8	31	14	9	71	10	3,1
462	65	6,5	108	26	17	85	57	1,9
484	69	6,5	65	5	3	95	60	1,1

Skýringar: Nt: Heildarfjöldi klóna í sýni; S: Fjöldi tegunda í sýni; n1: Fjöldi með aðeins eina röð í sýni; C (coverage $1-(n1/Nt)$): metur hvort fjöldi greindra klóna í sýninu er nægilegur; Nmax: Fjöldi klóna innan ríkjandi tegundar; Nt/Nmax: líffræðilegur fjölbreytileiki. Skyggði hluti töflunnar gefur til kynna sýni sem tekin voru í kalkríkum hverum, hin sýnin (461, 462 og 484) voru tekin úr vatnshverum á sama svæði.

3.7 Ættartré helstu tegunda í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi

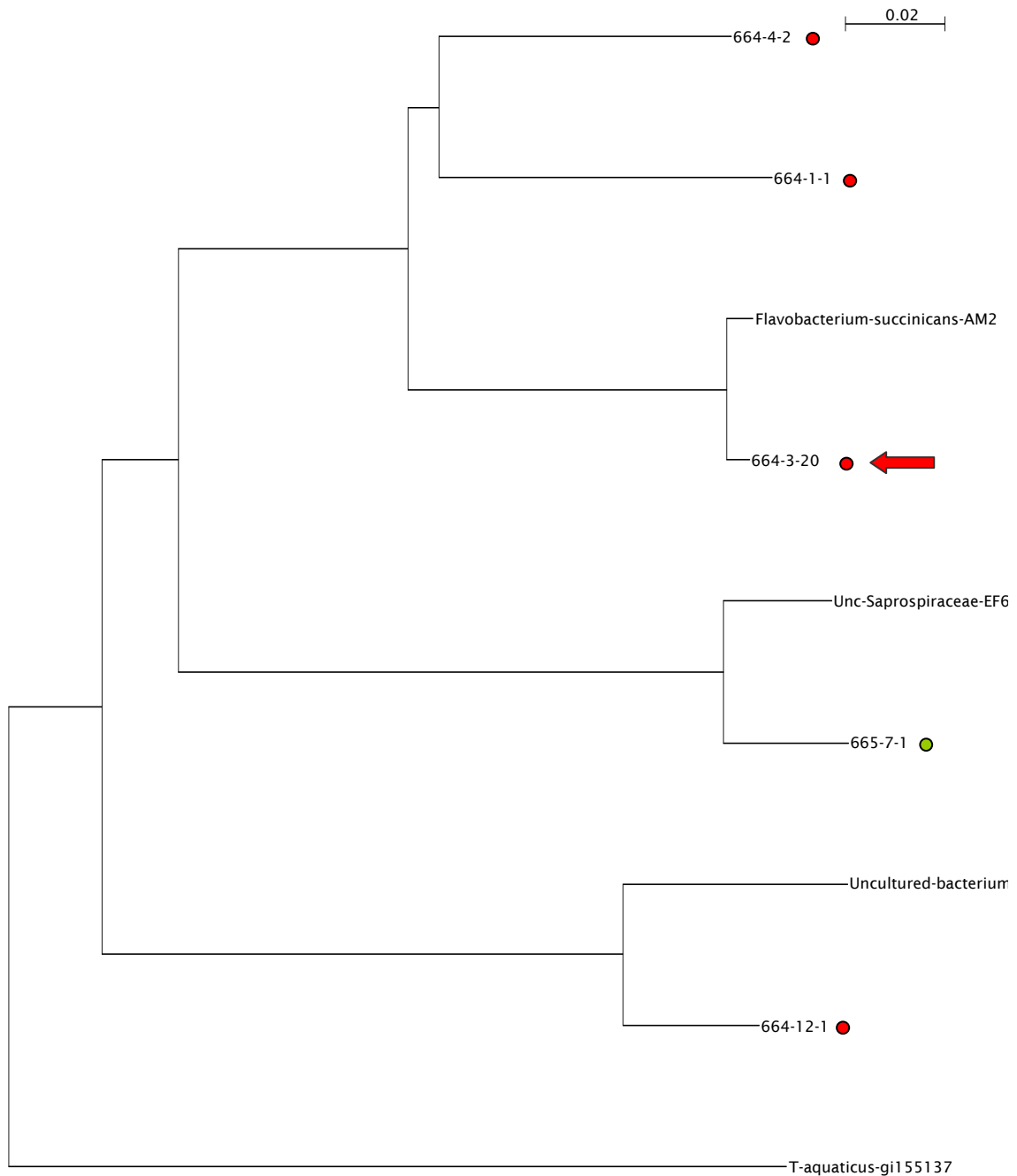
Hér á eftir fara nokkur ættartré sem sýna innbyrðis skyldleika tegunda sem fundust í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi við þekktar tegundir innan sömu fylkinga. Ættartrén byggjast á samröðun og samanburði á 16S rRNA genaröðum úr erfðagreiningunum hér að framan. Ættartré fylkinganna sem innihéldu flesta fulltrúa í sýnunum, þ.e. *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* og *Firmicutes* eru sýnd.

3.7.1 *Bacteroidetes*

Eins og *Bacteroidetes* ættartréð á mynd 5 ber með sér eru tegundirnar sem fundust í kalkríku hverunum fremur fjarskyldar öðrum *Bacteroidetes* tegundum sem fundist hafa víðsvegar um heiminn. Þær mynda því stakar fjarlæggar greinar. Nær allar *Bacteroidetes* tegundirnar sem fundust voru upprunnar í sýni 664 og aðeins ein þeirra kom úr öðru sýni þ.e. 665. Aðeins ein

Bacteroidetes tegund var nægilega skyld nánasta ættingja til að um tegundagreiningu væri að ræða þ.e. *Flavobacterium succinans* sem var ríkjandi tegund í sýni 664.

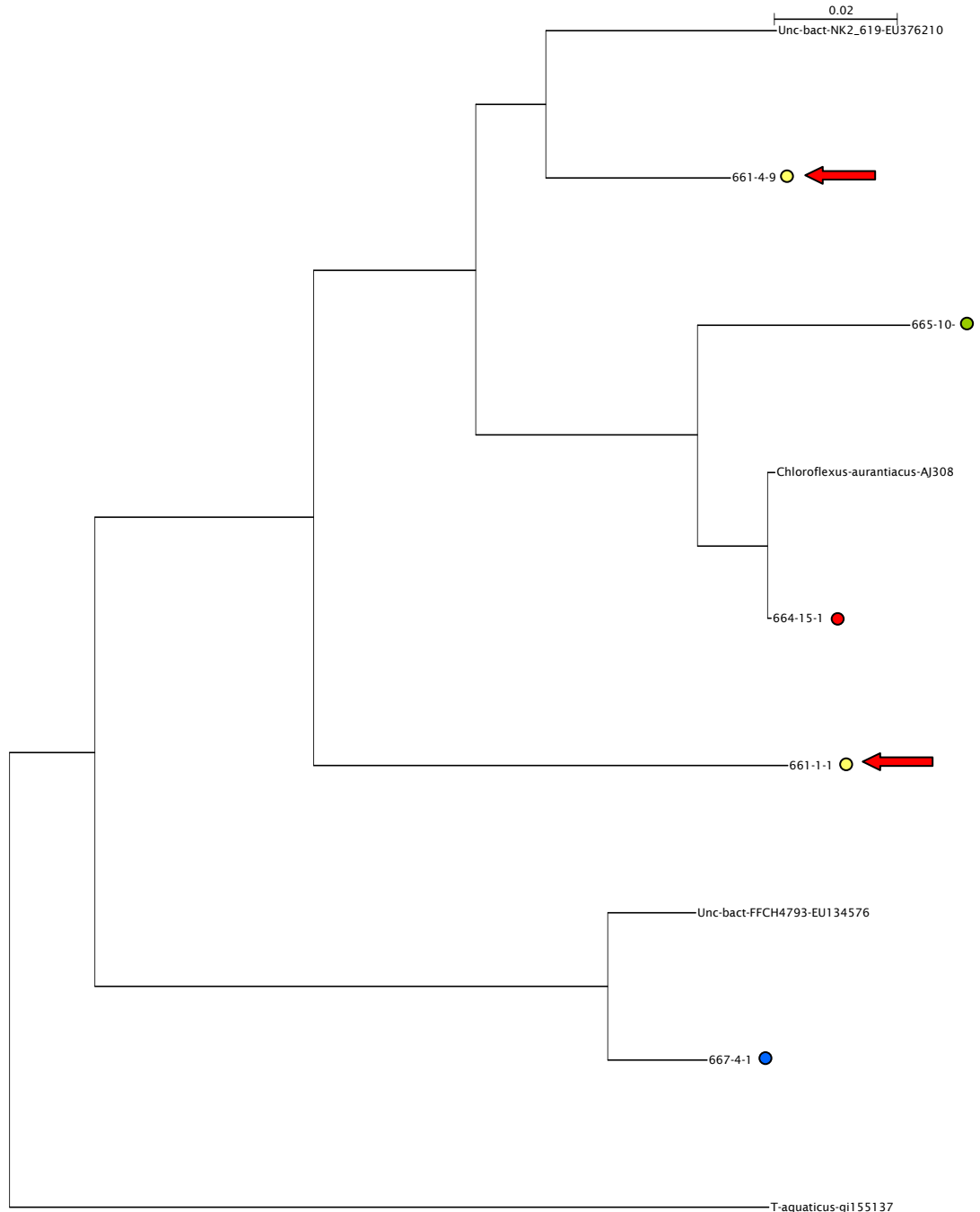
Bacteroidetes skyldleikatré



Mynd 5. Skyldleikatré byggt á samröðun 16S rRNA gena út bakteríum af fylkingu *Bacteroidetes* úr sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Samsvarandi 16S röð úr *Thermus aquaticus* var notuð sem útröð. Litirnir tákna mismunandi hver. Örin sýnir ríkjandi tegund í sýni 664 *Flavobacterium succinans*. Stíkan efst táknar 2% fjarlægð sem svarar til 98% skyldleika.

3.7.2 *Chloroflexi*

Chloroflexus auranticus er ein af einkennistegundum vatnshveranna. Þessi tegund getur nýtt sér sólarljós til frumbjarga lífs og myndar þá oft áberandi appelsínugular örveruþekjur í afrennsli vatnshvera, þar sem sýrustig er u.þ.b. hlutlaust, eða pH 7. Þessi tegund getur einnig lifað ófrumbjarga lífi.

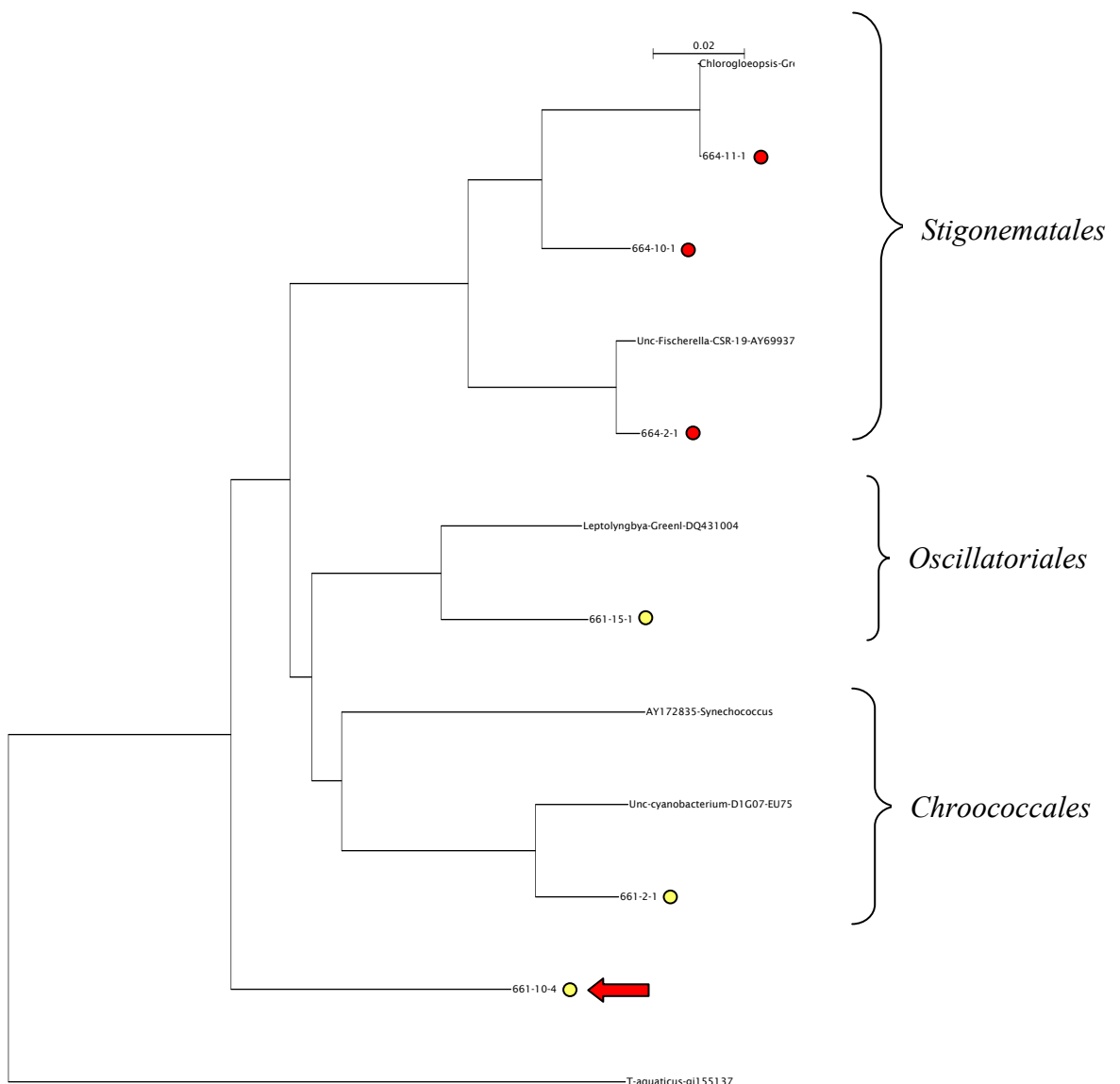


Mynd 7. Skyldleikatré byggt á samröðun 16S rRNA gena út bakteríum af fylkingu *Chloroflexi* úr sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Samsvarandi 16S röð úr *Thermus aquaticus* var notuð sem útröð. Litirnir í hringjunum tákna mismunandi hver. Örvarnar benda í nýjar tegundir. Stíkan efst tákna 2% fjarlægð.

Tegundir innan *Chloroflexi* fylkingarinnar fundust í öllum greindum sýnum úr kalkríku hverunum. Efsta grein trésins sýnir tegund 661-4-9 sem innihélt flesta fulltrúa úr sýni 661 og er greinilega ný tegund. Um miðju trésins er önnur tegund 661-1-1 sem á sér engan náinn ættingja og telst því einnig ný tegund. Tegundir úr sýnum 664 og 665 mynda grein með *Chloroflexus aurantiacus*, en aðeins önnur þeirra flokkast þó til þeirrar tegundar. Neðsta grein trésins sýnir tegund úr sýni 667 sem flokkast með óræktaðri bakteríu.

3.7.3 Cyanobacteria

Cyanobacteria eða blágrænar bakteríur lifa frumbjarga lífi þar sem þær eru ljóstillífandi og geta bundið ólífrænt kolefni úr CO₂ úr andrúmsloftinu. Þær geta því myndað undirstöðu fyrir aðrar ófrumbjarga tegundir.



Mynd 8. Skyldleikatré byggt á samröðun 16S rRNA gena út bakteríum af fylkingu *Cyanobacteria* úr sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Samsvarandi 16S röð úr *Thermus aquaticus* var notuð sem útröð.

Litirnir í hringjunum tákna mismunandi hverj. Örin bendir á nýja tegund eða ættkvísl sem inniheldur 4 fulltrúa úr sýni 661.

Blágrænar bakteríur eru sumar hverjar vel sýnilegar með berum augum í vatnshverum. Þetta á einkum við um tegundir af ættkvíslum *Chlorogloopsis* og *Fischerella* innan *Stigonematales* sem eru algengar í hverum víða um heim og gengu til skamms tíma undir nafninu *Mastigocladus*. Þessar tegundir mynda oft þykkar, grænar, áberandi gróðurmottur í vatnshverum. Þessar tegundir finnast einnig í kalkhverum og mynda efstu greinar trésins á mynd 8. Blágrænar bakteríur greindust þó einungis í tveimur af fjórum sýnum sem tekin voru, þ.e. 661 og 664. Það vekur athygli að þær áttu tiltölulega fáa fulltrúa miðað við hve áberandi þær eru í kalkhverum. Hins vegar voru tegundirnar fjölbreyttar dreifðust víða í trénu (mynd 8).

Tegundir af *Leptolyngbya* ættkvísl innan *Oscillatoriales* hafa fundist í hverum á Íslandi, en sú tegund sem fannst í sýni 661 er tiltölulega fjarskyld næsta ættingja sínum. *Synechococcus* er ættkvísl innan *Chroococcales* ættbálks blágrænna baktería sem finnst í hverum víða um heim. Hún hefur enn ekki fundist hér á landi, en ein tegund, þó aðeins fjarskyld henni fannst í sýni 661 (661-2-1).

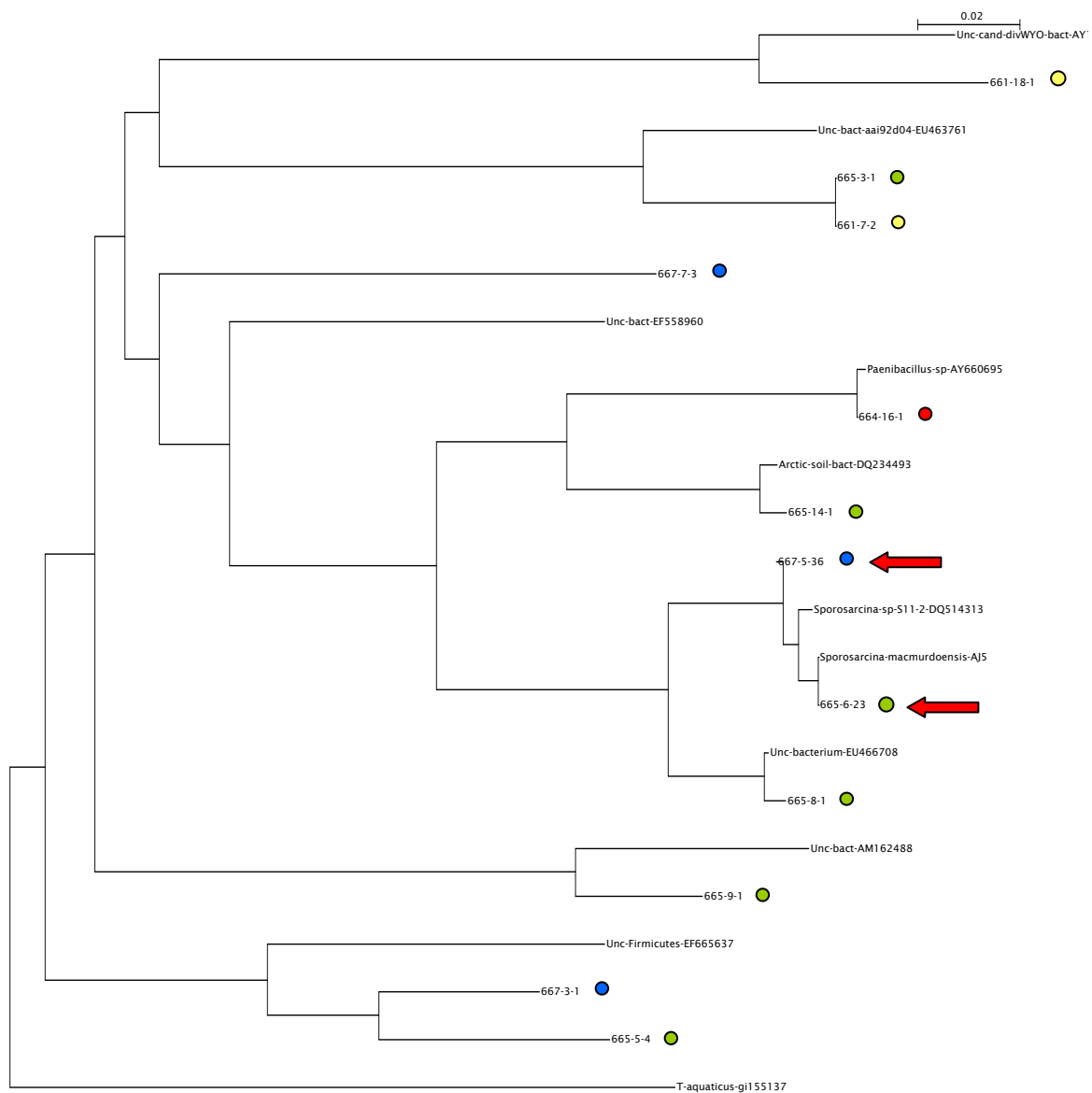
Neðsta grein trésins úr sýni 661 (661-10-4) sem inniheldur 4 fulltrúa sker sig úr og stendur stök og er því áhugaverð. Hér er greinilega um áður óþekkta tegund, jafnvel áður óþekkta ættkvísl að ræða.

3.7.4 Firmicutes

Firmicutes tegundir fundust í mismiklum mæli í öllum sýnum. Sama *Firmicutes* tegundin var ríkjandi í sýnum 667 og 665 og er sýnd með örvum á mynd 9. Þetta er tegund af ættkvísl *Sporosarcina* sem er grómyndandi eins og algengt er með tegundir innan *Firmicutes*. Ýmsar *Bacillus* tegundir fundust einnig í sýnunum. *Bacillus* tegundir eru afar algengar í hverum og hafa ýmsar þeirra verið einangraðar úr hverum á Íslandi.

Raðir númer 665-3-1 og 661-7-2 ofarlega í trénu mynda sameiginlega grein og eru því ein og sama tegundin. Þessi tegund hefur ekki fundist áður svo vitað sé, en sýnir mestan skyldleika við tegund sem hefur aldrei verið ræktuð.

Flestar *Firmicutes* tegundirnar sem fundust í sýnunum úr kalkríku hverunum eiga sér aðeins fjarskylda ættingja eins og djúpar greinar trésins bera með sér. Hér eru þó nokkrar tegundir sem hafa aldrei fundist áður, hvorki með sameindalíffræðilegum aðferðum né ræktunaraðferðum. Í sumum tilvikum er dýpt greinanna það mikil að hún gefur til kynna að um óþekktar ættkvíslir eða jafnvel óþekkta ættbálka geti verið að ræða.



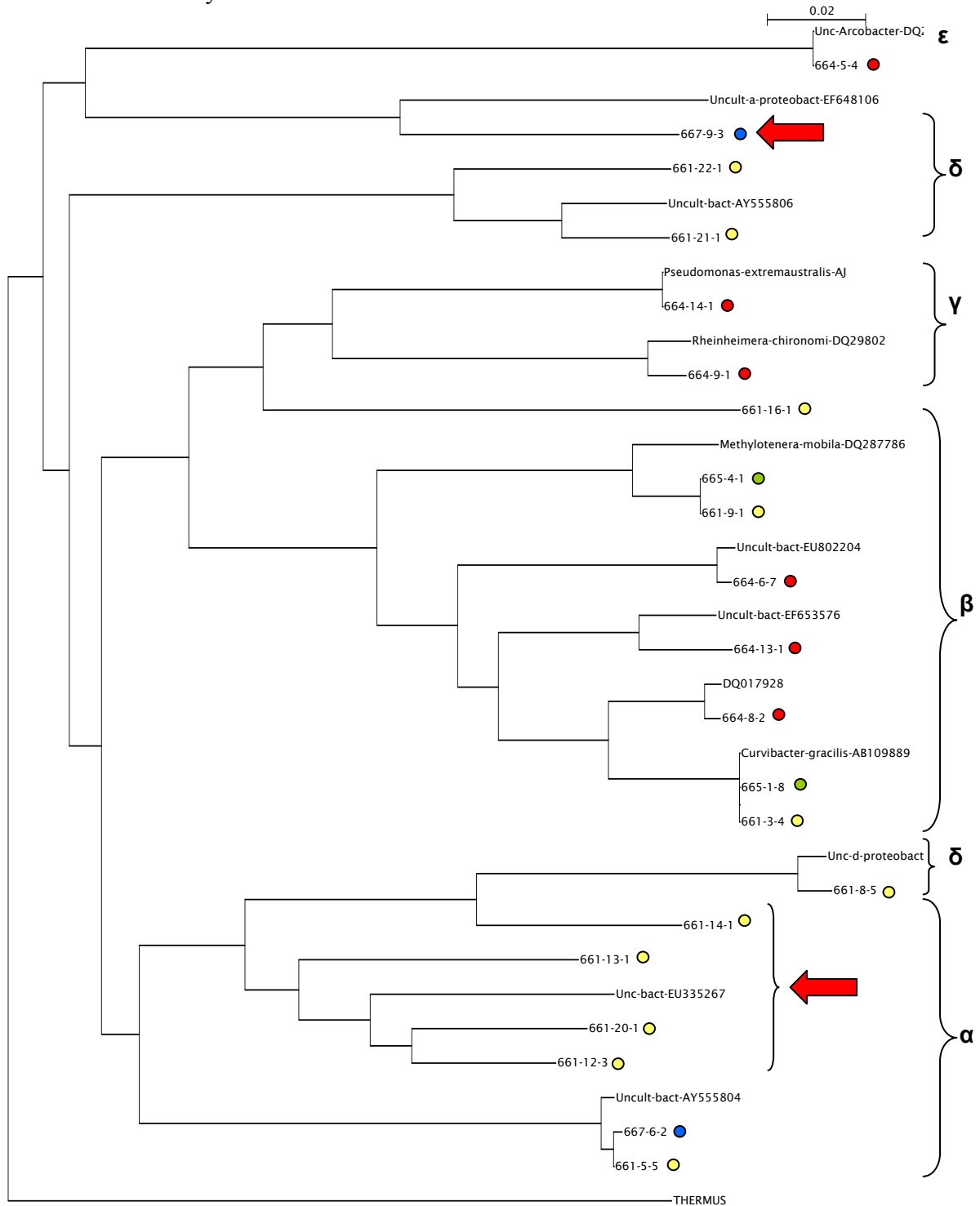
Mynd 9. Skyldleikatré byggt á samröðun 16S rRNA gena út bakteríum af fylkingu *Firmicutes* úr sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Samsvarandi 16S röð úr *Thermus aquaticus* var notuð sem útröð. Litirnir tákna mismunandi hver. *Firmicutes* tegundir fundust í öllum sýnum sem greind voru. *Sporosarcina* tegund var ríkjandi í tveimur sýnum og eru þær sýndar með örnum.

3.7.5 *Proteobacteria*

Proteobakteríur fundust í öllum sýnunum. Sem fyrr segir er *Proteobakteríu* fylkingin afar sundurleitur hópur að allri gerð og starfsemi og er flokkaður í nokkra undirhópa: α , β , γ , δ , og ϵ . Tegundir α - og β -*proteobaktería* finnast víða í hverum, en hinir hóparnir eru sjaldséðari. α -

og β -proteobakteríur voru algengastar í kalkríku hverunum en hinir undirhóparnir fundust einnig.

Proteobacteria skyldleikatré



Mynd 10. Skyldleikatré byggt á samröðun 16S rRNA gena út bakteríum af fylkingu *Proteobacteria* úr sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Undirhópar *Proteobacteria*, (α , β , γ , δ og ϵ) eru sýndir á myndinni. Efri örin sýnir tegund úr sýni 667 sem er það fjarskyld öðru að erfitt er að greina til undirhóps *Proteobacteria*. Neðri örin sýnir nokkrar tegundir sem eru mjög fjarskyldar bakteríum sem þekktar eru í Genbank. Samsvarendi 16S röð úr *Thermus aquaticus* var notuð sem útröð. Mismunandi litir tákna mismunandi hver.

Þegar skyldleikatré *proteobaktería* á mynd 10 er skoðað sést að nánasti ættingi er oft óræktuð tegund. Einnig sést að *α-proteobakteríur* í sýni 661 mynda sérstaka grein óþekktra tegunda neðarlega í trénu (ör). Þetta bendir til nýrrar ættkvíslar eða hóps sem ekki hefur fundist áður svo vitað sé. Í sýni 664 fundust þó nokkrar tegundir *β-proteobaktería* og sést að þær dreifast víða um skyldleikatréd. Ein tegund *β-proteobaktería* *Curvibacter gracilis* fannst í talsverðu magni í tveimur sýnum, þ.e. 661 og 665. Aðrir undirhópar *proteobaktería* fundust í minni mæli.

4. UMRÆÐUR

Þessi rannsókn miðaði að því að greina hvort lífríki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi hefði einhverja sérstöðu miðað við lífríki í hverum almennt. Til að svara þessari spurningu voru notaðar hefðbundnar ræktunaraðferðir fyrir hverabakteríur og sameindalíffræðilegar aðferðir þar sem ræktun er óþörf. Sýni úr kalkríkum hverum og öðrum hverum með svipað hitastig og pH á sama svæði voru greind og borin saman.

Þegar ræktunaraðferðum var beitt á sýnin úr kalkríku hverunum greindust einkum bakteríur sem flokkast til tveggja fylkinga, þ.e. *Deinococcus-Thermus* og *Firmicutes*. Skyldleiki þessara tegunda var 99-100% í öllum tilvikum og því um tegundagreiningu að ræða. Ein ný tegund af *Meiothermus* ættkvísl var þó einangruð og ræktuð og sýndi 94% skyldleika við nánasta ættingja í Genbank.

Með erfðagreiningaraðferðum voru alls greindir 195 raunbakteríuklónar (eubacteria) í sýnum úr kalkríkum hverum. Þessir klónar flokkast í um 60 tegundir raunbaktería miðað við 98% flokkunarmörk. Þessar 60 tegundir flokkast í níu fylkingar alls, sem er talsvert meira en það sem fékkst með ræktunum. Fjöldi bakteríufylkinga er einnig ívið hærri en fjöldi fylkinga í sýnum úr vatnshverum með sambærilega eiginleika (T°C og pH) á sama svæði.

Fylkingar sem eiga sér fulltrúa í kalkríku hverunum eru *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinomycetes* og *Deinococcus - Thermus*. Allmargar tegundir sem fundust í sýnunum finnast einnig í vatnshverum almennt. Þetta á m.a. við um tegundir blágrænna baktería (*Cyanobacteria*), *Bacillus* tegundir og *Thermus* tegundir. Það sem vekur einkum athygli er að tegundir innan *Aquificae* fylkingarinnar sjást ekki í sýnum úr kalkríkum hverum. Þessar tegundir eru þó afar algengar í hverum almennt og víða ríkjandi tegundir í hverum á Ölkelduhálsi þar sem hitastig og pH eru svipuð því sem mældist í kalkríku hverunum. Þess má geta að *Aquificae* tegundir nýta sér brennisteinssambönd s.s. H₂S til orkuvinnslu. Það má því leiða að því líkum að þetta efnasamband sé e.t.v. af skornum skammti í kalkríku hverunum sem voru valdir til sýnatöku í þessu rannsóknarverkefni, eða að eitthvað annað efni sé e.t.v. í of miklum styrk. Það er því nærtækt að skoða niðurstöður úr frumefnamælingum í þessu samhengi til að athuga hvort einhverjar vísbendingar sé þar að finna.

Niðurstöður frumefnamælinga á sýnatökustöðum í kalkríkum hverum annars vegar og hver með svipaða eiginleika á sama svæði hins vegar sýna að styrkur brennisteins (S) í sýnunum er mun lægri í kalkríku sýnunum eða 1,8mg/L í sýni 667; 5,8mg/L í sýni 662, en 25,7mg/L í

viðmiðunarsýninu. Styrkur járns er þó ívið lægri í sýnunum úr kalkríku hverunum eða 91,0 µg/L í sýni 667; 59,7 µg/L í sýni 662 en 4,3mg/L í viðmiðunarsýni 657 af svipuðum slóðum. Mælingar á styrk frumefna í hverum eru tiltölulega nýbyrjaðar hjá Mátis - Prokaria. Verið er að safna meira gagnamagni úr þessum mælingum ásamt gögnum úr erfðagreiningum og er ætlunin að rýna í þennan efnivið í náninni framtíð til að greina betur tengsl styrks efna í umhverfi við tegundasamsetningu örvera í hverunum.

Nokkur skörun fannst milli tegunda sem fundust í kalkríku hverunum, þ.e. sömu tegundir fundust að e-u leyti í sýnunum og má gera því skóna að þar sé um tegundir að ræða sem eru aðlagðar því sérstaka umhverfi sem þar er. Þetta voru tegundir innan α - og β -*proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinomycetes* og *Actinobacteria*. Aðrar tegundir voru þó einstakar fyrir sýnið sem þær komu úr og sýndu oft talsverðan skyldleika milli sýna, þótt ekki væri um sömu tegund að ræða. Niðurstöður úr einu sýninu, 664, skáru sig nokkuð úr, bæði hvað varðar tegundasamsetningu og tiltölulega mikinn skyldleika við nánasta ættingja í Genbank. Þetta sýni var þó tekið við talsvert hærra hitastig en hin sýnin eða við 78°C sem kann að vera skýring hér.

Svo virðist sem fornbakteríur (archaea) þrífist ekki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Ekki tókst að magna upp tegundagreiningandi gen þeirra. Upplýsingar um tilvist fornbaktería í sambærilegum hverum annars staðar eru af skornum skammti. Fjarvera fornbaktería í sýnunum kemur þó ekki á óvart þar sem hitastig og sýrustig þessara hvera eru ekki einkennandi fyrir búsvæði fornbaktería almennt sem þrífast best þar sem umhverfið er heitt og súrt, en hitastig og sýrustig í sýnunum úr kalkríku hverunum voru á bilinu 60-78°C og pH 6-6,5.

Reiknað gildi fyrir líffræðilegan fjölbreytileika í sýnum úr kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi var ívið hærra en sambærileg gildi úr öðrum hverum á sama svæði. Reiknuð gildi líffræðilegs fjölbreytileika í sýnunum úr kalkríkum hverum voru á bilinu 1,4-5,3 en úr vatnshverunum á bilinu 1,1-3,1.

Hátt hlutfall óþekkra tegunda og óþekkra ættkvísla í sýnum sem tekin voru í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi vekur athygli. Almenna skilgreiningin á tegundarhugtakinu meðal baktería miðast við 98% einsleitni milli DNA raða 16S rRNA gensins, þ.e. ef einsleitni er minni en 98% milli tveggja raða, er um tvær tegundir að ræða. Á sama hátt er oftast miðað við 94% við skilgreiningu á ættkvísl. Af 60 tegundum sem fundust í sýnunum fannst nægilega náninn ættingi sömu tegundar í Genbank fyrir 25 þeirra. Hinar 35 voru það fjarskyldar nánasta ættingja að ekki tókst að flokka þær nema til ættkvísla, ættbálka, ætta eða fjölskyldna. Vistkerfi í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi verður því að teljast afar sérstakt.

5. HEIMILDIR

Allen, M.A., Goh, F., Burns, B.P. and Neilan, B.A. 2005. Vastly increased cyanobacterial diversity is indicated by culturing and culture-independent studies of the Shark Bay microbial mats. *Unpublished*.

Ayub, N.D., Pettinari, M.J., Ruiz, J.A. and Lopez, N.I. 2004. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Curr. Microbiol.* 49 (3), 170-174.

Bakermans, C., Tsapin, A.I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D.A. and Neelson, K.H. 2003. Reproduction and metabolism at - 10 degrees C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ. Microbiol.* 5 (4), 321-326.

Beier, S., Witzel, K.P. and Marxsen, J. 2008. Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (1), 188-199.

Brambilla, E. 2006. *Unpublished*

Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Glavina del Rio, T., Hammon, N., Israni, S., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Chertkov, O., Brettin, T., Bruce, D., Detter, J.C., Han, C., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Mikhailova, N., Pierson, B.K., Blankenship, R.E. and Richardson, P. 2007. Complete sequence of *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl. *Unpublished*.

Dedysh, S.N., Pankratov, T.A., Belova, S.E., Kulichevskaya, I.S. and Liesack, W. 2006. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (3), 2110-2117.

Ding, L. and Yokota, A. 2004. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. And *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (PT 6), 2223-2230.

Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Sheik, C., Spain, A.M., Najjar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Roe, B.A., Schloss, P.D., Davis, J.P. and Krumholz, L.R. 2007. Phylogenetic diversity and evolutionary relationships between rare and abundant members of the bacterial community in tallgrass prairie soil. *Unpublished*.

Gomez-Alvarez, V. and Nuesslein, K. 2005. Comparative 16S rRNA Gene Sequence Analysis of Microbial Communities on Recent Hawaiian Volcanic Deposits (1982, 1979, 1974, 1973, 1971, 1969, 1959, 1921, 1894, 1790 & 1700): Colonization and Succession of Microbes in Extreme Environments - Data 2003. *Unpublished*.

Graff, A. and Conrad, R. 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53 (3), 401-415.

- Halpern,M., Landsberg,O., Raats,D. and Rosenberg,E. 2007. Culturable and VBNC *Vibrio cholerae*: Interactions with Chironomid Egg Masses and Their Bacterial Population *Microb. Ecol.* 53 (2), 285-293.
- Hansel,C.M., Fendorf,S., Jardine,P.M. and Francis,C.A. 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (5), 1620-1633.
- He,J. and Zhang,L. 2007. Phylogenetic Analysis of Bacterial Community in Iron-manganese Nodule and Its Surrounding Soil. *Unpublished*.
- Hobel,C.F., Marteinson,V.T., Hreggvidsson,G.O. and Kristjansson,J.K. 2005. Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA and chitinase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (5), 2771-2776.
- Hugenholtz,P., Pitulle,C., Hershberger,K.L. and Pace,N.R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180 (2), 366-376.
- Jangid,K., Williams,M.A., Schmidt,T.M., Coleman,D.C. and Whitman,W.B. 2007. Impact of agricultural land management practices on bacterial soil communities in Michigan. *Unpublished*
- Jin,Q., Giska,J.R., Do,Y. and Banfield,J.F. 2007. Development of a stable microbial consortia capable of degrading complex organic matter. *Unpublished*.
- Kanokratana,P., Chanapan,S., Pootanakit,K. and Eurwilaichitr,L. 2004. Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *J. Basic Microbiol.* 44 (6), 430-444.
- Kormas,K.Ar., Vardaka,E., Gkelis,S. and Moustaka-Gouni,M. 2007. Bacterial 16S rDNA diversity in the water column of Lake Kastoria during a cyanobacterial bloom. *Unpublished*.
- Lesaulnier,C., Papamichail,D., McCorkle,S., Ollivier,B., Skiena,S., Taghavi,S., Zak,D. and van der Lelie,D. 2008. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environ. Microbiol.* 10 (4), 926-941.
- Ley,R.E., Hamady,M., Lozupone,C.A., Turnbaugh,P., Ramey,R.R. II, Bircher,J.S., Tucker,T.A., Schrenzel,M.D., Schlegel,M.L., Knight,R.D. and Gordon,J.I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. In press
- Li,T., Bouchez,T. and Mazeas,L. 2007. Microbial functional groups in a thermophilic anaerobic solid waste digester revealed by stable isotope probing. *Unpublished*.
- Liao,P.C., Huang,B.H. and Huang,S. 2007. Microbial community composition of the danshui river estuary of northern taiwan and the practicality of the phylogenetic method in microbial barcoding. *Microb. Ecol.* 54 (3), 497-507.
- Mannisto,M.K. and Haggblom,M.M. 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (3), 229-243.

- Mummey,D.L. and Stahl,P.D. 2002. Response of soil bacterial communities to disturbance associated with surface mine reclamation. *Unpublished*.
- Murakami,Y. and Naganuma,T. 2003. Microbial communities in the deep subsurface sediments. *Unpublished*.
- Nubel,U., Bateson,M.M., Madigan,M.T., Kuhl,M. and Ward,D.M. 2001. Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (9), 4365-4371.
- Osaka,T., Ebie,Y., Tsuneda,S. and Inamori,Y. 2008. Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* In press.
- Portillo,M.C., Gonzalez,J.M. and Saiz-Jimenez,C. 2006. Microbial diversity in Altamira Cave. *Unpublished*.
- Qian,L., Yang,Y. and Dai,Q. 2007. *Unpublished*.
- Qiu,Q. 2007. Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in Chinese rice field to study activity and composition of methanotrophic bacterial communities in situ. *Unpublished*.
- Reddy,G.S., Matsumoto,G.I. and Shivaji,S. 2003. *Sporosarcina macmurdoensis* sp. nov., from a cyanobacterial mat sample from a pond in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (PT 5), 1363-1367.
- Roeselers,G., Norris,T.B., Castenholz,R.W., Rysgaard,S., Glud,R.N., Kuhl,M. and Muyzer,G. 2007. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ. Microbiol.* 9 (1), 26-38.
- Santos,F., Penya,A., Nogales,B., Soria,E., Garcia del Cura,M.A., Gonzalez-Martin,J.A. and Anton,J. 2008. Bacterial diversity in modern freshwater stromatolites from Ruidera Pools Natural Park, Spain. *Unpublished*
- Schloss,P.D. and Handelsman,J. 1995. The last word: toward a sample based census of bacteria in soil. *Unpublished*.
- Selenska-Pobell,S. 2002. Diversity and activity of bacteria in uranium mining waste piles. In Keith-Roach,M.J. and Lievens,F.R. (Eds.) *Radioactivity in the environment Vol 22- Interactions of microorganisms with radionuclides: 225-254.* Elsevier.
- Shaw,A.K., Halpern,A.L., Beeson,K., Tran,B., Venter,J.C. and Martiny,J.B.H. 2008. *Unpublished*.
- Sólveig Pétursdóttir, Tryggvi Þórðarson, Steinunn Magnúsdóttir og Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2006. Mat á umhverfisáhrifum jarðvarmavirkjana í Hverahlíð og við Ölkelduháls. Skýrsla Prokaria unnin fyrir Orkuveitu Reykjavíkur.
- Spanevello,M.D. and Patel,B.K.C. 2001. Phylogenetic characterization of microbial communities from Australia's Great Artesian Basin. *Unpublished*.

Strap,J.L., Colwell,F.S. and Crawford,R.L. 2005. Comparison of Planktonic and Biofilm Microbial Diversity Within the Snake River Plain Aquifer. *Unpublished*.

Yu,Y., Li,H.R., Chen,B. and Zeng,Y.X. 2006. Phylogenetic diversity of bacteria in marine sediments from the Arctic Ocean. *Unpublished*.

Zhao,Y.-G., Ren,N.-Q. and Wang,A.-J. 2006. Effect of benzene-like compounds on the structure of microbial community in Songhuajiang River sediments. *Unpublished*.

Wang,Z., Zhang,Y. and Yang,M. 2007. Bacterial community dynamics of aerobic activated sludge during different produced water treatment. *Unpublished*.

Weidler,G.W., Gerbl,F.W. and Stan-Lotter,H. 2007, Diversity of Acidobacteria and Planctomycetes in a subsurface radioactive thermal mineral spring in the Central Alps, Austria. *Unpublished*.