

Effekter på bakteriesamfunn av boreslamdeponering på havbunnen

—
Ida Maylen Øverleir

Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)

mai 2014



Forord

Denne oppgaven ble gjort som en del av bolk to (av i alt fem) i BARCUT-prosjektet - Barents Sea Drill Cuttings Research Initiative. Prosjektet har som overordnet mål å identifisere miljøpåvirkningene ved dumping av boreavfall på sjøen samt evaluere de tilknyttede samfunnsmessige aspektene. Det ble initiert av Environmental Waste Management (EWMA) 1. juni 2013 og finansieres fullt ut av oljeselskapet Eni Norge AS. Første bolk var prosjektplanlegging koordinert av EWMA-sekretariatet (www.site.uit.no/ewma.barcut/), mens andre bolk gikk ut på å gjøre havbunnsundersøkelser for å avdekke eventuelle påvirkninger boreavfall kan ha på makrofauna og mikrobiota. Ansvarlig for bolk to er Akvaplan-niva og Universitetet i Tromsø.

Hovedveileder på oppgaven har vært professor Bjarne Landfald med underveileder doktorgradsstipendiat Tan Thu Nguyen.

Jeg vil gjerne gi en stor takk til Sabine Cochrane ved Akvaplan-niva, uten ditt samarbeid ville jeg neppe hatt noe sedimentmateriale å jobbe med. Deretter vil jeg takke mannskap og kaptein Knut Steinar Dyrkorn på M/S «Njord Viking» og ROV-operatørene ved Oceaneering AS. I tillegg, takk til Seila Pandur ved Norstruct, for uvurderlig hjelp med sekvenseringen.

Videre er det veilederne mine som skal ha mye takknemlighet. Bjarne, du har vært en utømmelig kilde til kunnskap og hatt kontordøren åpen til enhver tid – takk for et humørfyllt samarbeid. Og takk til Tan, for mye god hjelp og at du alltid stråler som en sol.

Dernest vil jeg takke de to som gjorde det å ta bachelorgraden til et rent eventyr, Iris og Renate. Takk til Silje, for det uforglemmelige halvåret på Tasmania. Jeg savner ikke det å ha en klasse, når jeg har deg.

Aller sist vil jeg takke familien. Mamma og pappa, dere har lært meg verdien av hardt arbeid og høy arbeidsmoral og dette har lagt grunnlaget for at jeg nå kan levere inn punktumet på seks studieår. Inspirert av pappa, vil jeg til slutt sitere Bjørnstjerne Bjørnson:

«Har du vært i selskap hvor du har måttet skamme deg over arbeidsslitte hender, da har du vært i dårlig selskap»

Sammendrag

Som en del av Barents Sea Drill Cuttings Research Initiative (BARCUT) fokuserte denne masteroppgaven på å avdekke om bakteriesammensetningen i sedimentet rundt en borebrønn påvirkes av boreavfallsdeponeringer. Under tokt med M/S «Njord Viking» 30. november – 3. desember 2013 ble det hentet opp kjerneprøver ved en letebrønn i Brønnlokaliteten. Dette ble gjort samtidig med at Akvaplan-niva gjennomførte havbunnsundersøkelser på samme lokalitet. Det ble tatt prøver fra i alt seks ulike stasjoner, hvor det på halvparten av disse ble hentet opp to paralleller. I min oppgave ble kun de tre stasjonene hvor man hentet opp paralleller undersøkt. Disse lå i et transekt fra 30 til 210 m østover fra brønnen.

DNA ble ekstrahert fra sedimentprøvene og genet for bakterielt 16S ribosomalt RNA ble oppkopierte med PCR ved bruk av universelle primere. Diversiteten av dette genet i de forskjellige PCR-produktene gir da et speilbilde av bakteriediversiteten i de tilsvarende prøvene. PCR-produktene ble sekvensert ved bruk av Next-Generation-sekvenseringsteknologi (Illumina MiSeq) ved Barents BioCentre Lab, Forskningsparken i Tromsø.

De totalt 15,6 millioner råsekvensene som ble produsert ble sammenstilt og filtrert ut fra flere kvalitetskriterier. Det gjenværende sekvensmaterialet ble så analysert med bioinformatiske og statistiske verktøy. Resultatene fra denne studien alene er ikke tilstrekkelig til å kunne trekke en endelig konklusjon, men viser en tendens til endret sammensetning av bakteriesamfunnene i overflatesedimentet med varierende avstand fra borebrønnen.

Abstract

As a part of the Barents Sea Drill Cuttings Research Initiative (BARCUT), this thesis focused on determining whether the bacterial composition of the sediment surrounding a well is influenced by deposited drill cuttings. During a cruise with M/S “Njord Viking” from 30th of November to 3rd of December 2013, core samples from the sediment surrounding an exploration well was recovered. This was done simultaneously with Akvaplan-niva’s seabed surveys on the same location. Samples were taken from six different stations. For half of the stations, samples were taken in parallels. In this thesis, those were the stations investigated. These lay in a transect from 30 to 210 m East of the well.

The DNA was extracted from sediment samples and the gene for bacterial 16S ribosomal RNA was amplified by PCR using universal primers. The diversity of this gene in the different PCR products was meant to mirror the bacterial diversity in the corresponding samples. PCR products were sequenced using Next-Generation sequencing technology (Illumina MiSeq) at Barents BioCentre Lab, Forskningsparken in Tromsø.

The 15.6 million raw sequences produced were joined and filtered by several quality criteria. The remaining sequence material was then analyzed by bioinformatical and statistical tools. The results of this study are not sufficient in order to draw a final conclusion. However, they show a tendency towards that bacterial community composition in surface sediments change with varying distance from the well.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
Innholdsfortegnelse	4
Forkortelser	7
1 Introduksjon	8
1.1 Det norske oljeeventyret.....	8
1.2 Boreavfall som miljøproblem.....	11
1.3 Havbunnen	14
1.4 Mikrobiotaen i sedimentet.....	15
1.5 Metoder for å studere bakteriediversitet.....	17
1.6 Bioinformatiske verktøy.....	18
1.7 Statistiske verktøy for diversitetsanalyse	19
1.8 Målene med denne oppgaven	20
2 Materialer og metoder	21
2.1 Innhenting av prøvemateriale	21
2.2 Målinger av abiotiske faktorer	24
2.3 Isolering av DNA fra sedimentprøvene	24
2.4 Oppkopiering og rensing av 16S rDNA-sekvenser.....	26
2.5 Sekvensering	27
2.6 Sekvensbehandling.....	31
2.6.1 Sammenslåing av forward og reverse reads	31
2.6.2 Kvalitetsfiltrering I.....	32
2.6.3 Sammenslåing av sekvensfilene.....	32
2.6.4 Fjerning av primere	32
2.6.5 Dereplikasjon	32
2.6.6 OTU-gruppering.....	33
2.6.7 Fjerning av kimeriske sekvenser	33
2.6.8 Klargjøring av OTU-tabell	33
2.6.9 Kvalitetsfiltrering II.....	33

2.7	Alfaversitet	34
2.8	Betaversitet	34
2.8.1	Bray-Curtis-dissimilaritetsmatrise	34
2.8.2	Principal Coordinate Analysis	34
2.8.3	Distance-Based Redundancy Analysis	35
2.8.4	Bakteriesammensetning i oksisk og anoksisk sediment	35
3	Resultater	36
3.1	Innhenting av prøvemateriale	36
3.2	Målinger av abiotiske faktorer	38
3.2.1	Oksygenkonsentrasjon	38
3.2.2	Temperatur	40
3.2.3	pH	40
3.3	Generering av 16S rDNA-sekvenser	40
3.4	Sekvensering	41
3.5	Sekvensbehandling	43
3.6	Alfaversitet	45
3.7	Betaversitet	48
3.7.1	Bray-Curtis-dissimilaritetsmatrise	48
3.7.2	Principal Coordinate Analysis	48
3.7.3	Distance-Based Redundancy Analysis	49
3.7.4	Bakteriesammensetningen i oksisk og anoksisk sediment	50
4	Diskusjon	52
4.1	Prøvestasjoner og -materiale	52
4.2	Abiotiske undersøkelser	52
4.3	Generering av 16S rDNA-sekvenser	54
4.3.1	DNA-ekstraksjon og sekvensering	54
4.3.2	Sammenslåing av parede reads og kvalitetsfiltrering	56
4.4	Alfaversitet	57
4.5	Betaversitet	59
5	Konklusjon	62
	Referanseliste	63

Appendiks.....72
Appendiks A.....72
Appendiks B.....73

Forkortelser

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

Cmuso = cm under sedimentoverflaten

DbRDA = Distance-Based Redundancy Analysis

DDH = DNA-DNA-hybridisering

D-matrise = Dissimilaritetsmatrise

D-verdier = Dissimilaritetsverdier

EE = Expected Errors

GQ-score = Gjennomsnittlig Q-score

MDS = Multidimensional Scaling

NG-sekvensering = (High-throughput) Next Generation Sequencing

NOROG = Norsk Olje og Gass

OSPAR = Protecting and Conserving the North-East Atlantic and its Resources

OTU = Operational Taxonomic Unit/operasjonell taksonomisk enhet

PCoA = Principal Coordinate Analysis

PE-tilnærming = «paired-end»-tilnærming

PLONOR = Pose Little or No Risk to the Marine Environment

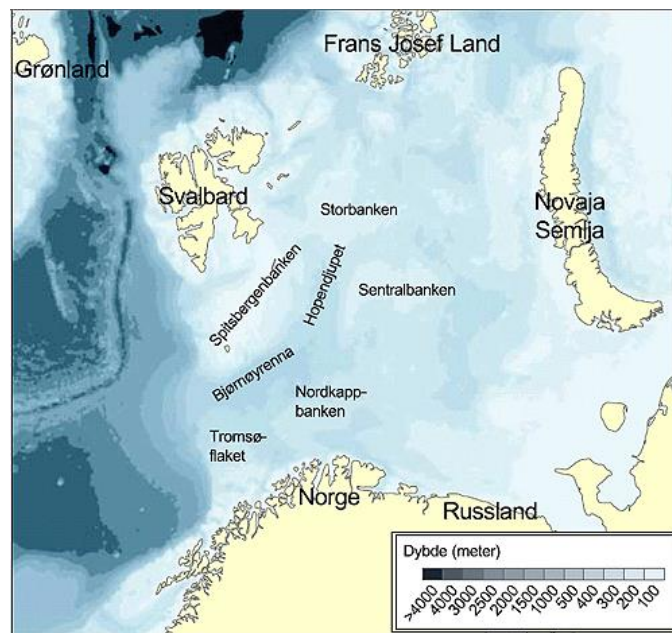
QIIME = Quantitative Insights Into Microbial Ecology

1 Introduksjon

1.1 Det norske oljeeventyret

Norsk oljehistorie hadde sin spede begynnelse 180 km sørvest for Stavanger juli 1966. Borefartøyet «Ocean Traveler» fant ikke der og da spor etter olje og gass, men det ble avdekket at den type geologiske sedimentlag oljeleterne var på jakt etter fantes her. Etter år med prøving og feiling var det lillejulaften 1969 ingen tvil lenger: På norsk kontinentalsokkel hadde man funnet «gull». Det første funnet var et gigantisk oljefunn i Nordsjøen, i feltet som ble gitt navnet Ekofisk. Feltet er den dag i dag et av de største som er blitt oppdaget til havs (Norsk olje & gass 2010).

I 1980 åpnet regjeringen for oljeleting nord for den 62. breddegrad, slik at man kunne starte letingen også i Norskehavet og Barentshavet. Barentshavet er et arktisk sokkelhav, 1 600 000 km² stort, og grenser mot Norskehavet i vest, Novaja Zemlja i øst, russisk og norsk kyst i sør og Polhavet i nord (figur 1.1) (Sakshaug m. fl. 2009). Havdybden ligger hovedsakelig mellom 200 og 500 m men Barentshavet rommer også den mye grunnere Spitsbergenbanken rundt 50 meter dyp samt starten på kontinentalskråningen hvor havdybden er rundt 1400 meter. Generelt sett har vestlig del av Barentshavet grunne sokkelområder og den østlige delen dype sedimentbassenger. I sør får Barentshavet relativt varmt vann tilført via en utløper av den norske atlantehavsstrømmen som sørger for at den sørlige delen holdes fri for is om vinteren. Bjørnøystrømmen, bestående av arktisk vann, strømmer inn i den nordlige delen av Barentshavet (Askheim m. fl. 2013).



Figur 1.1 – Barentshavet
(<http://www.imr.no/barentshavet>)

Ifølge en rapport om norsk petroleumsvirksomhet var det 70 felt i produksjon på den norske kontinentalsokkelen i 2012 (Oljedirektoratet 2012). Hva gjelder Barentshavet var det i januar 2013 boret 97 letebrønner. Disse har hatt høy funn-rate, men få funn har hittil vært kommersielt drivverdige. Som de kommersielt viktigste feltene i Barentshavet kan nevnes Snøhvit (gassfelt), Goliat (oljefelt) og Johan Castberg (tidligere Skrugard: olje- og gassfelt). Det er naturlig å anta at utforskningsaktivitet og produksjon i Barentshavet vil opprettholdes, da det drives boring av 22 produksjonsbrønner på Goliat-feltet og 37 på Johan Castberg-feltet (Falk m. fl. 2013).

Ved utnyttelse av naturressurser vil det alltid være en viss belastning både på natur og miljø, og olje- og gassindustrien er på ingen måte et unntak. Ifølge Norsk olje & gass' (NOROG) miljørapport for 2013 er de alvorligste påvirkningene fra oljeboringsvirksomhet de kontinuerlige utslippene til sjø og luft (NOROG 2013). Utslipp til luft gjelder CO₂, nitrogenoksider (NO_x) og flyktige organiske forbindelser (VOC). De to førstnevnte kommer for det meste fra forbrenning av naturgass (for kraftproduksjon til blant annet drift av pumper og kompressorer), mens VOC-utslipp hovedsakelig er en følge av lasting av olje (Miljødirektoratet 2013).

Utslipp til sjø (tabell 1.1) dreier seg blant annet om boreavfall og produsert vann, hvor førstnevnte utgjør den største typen operasjonelt avfall ved boreoperasjoner (Falk m. fl. 2013).

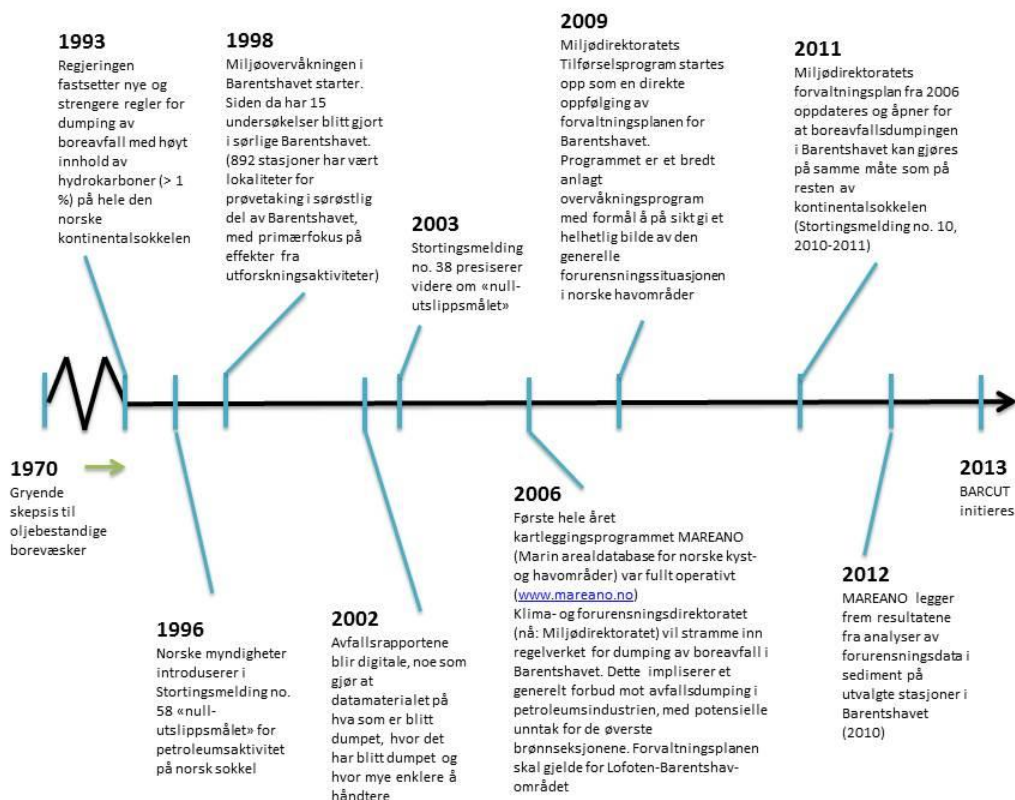
Andre potensielt miljøbelastende aktiviteter fra oljeindustrien er akutte oljesøl og seismikkskyting. Oljesøl gir store konsekvenser for lokal flora og fauna, spesielt sjøfugl. Seismiske undersøkelser brukes for å kartlegge hvilke bergarter som finnes i et leteområde og øker dermed sjansen på å treffe på reservoarer av olje og/eller gass. Lydbølgene som brukes kan forstyrre livet i havet, men i hvilken grad er fortsatt ikke fullt ut klarlagt (Kvilhaug 2007).

Tabell 1.1 - De ulike utslippstypene som genereres i petroleumsindustrien (Oljedirektoratet 2013)

Utslippstype	Utslippskilde	Viktigste komponenter
Produsert vann	Vann som følger petroleumsstrømmen fra reservoaret og som skilles ut i produksjonen. Består av formasjonsvann og kondensert vann og kan også inneholde tilbakeprodusert injeksjonsvann	<ul style="list-style-type: none"> • Dispergert olje • Oppløste organiske forbindelser • Organiske syrer • Løste uorganiske salter • Utfelte salter • Lavradioaktive komponenter • Tungmetaller • Mineraler fra formasjonen • Kjemikalierester
Ballast-/fortregningsvann	Vann som lastes av tankbåter i lossehavner og slippes ut ved lasting av olje på feltet eller gass fra landterminaler	Ballastvann kan inneholde organismer, og bidra til uønsket spredning av disse til nye områder
Fortregningsvann	Sjøvann fra lagerceller i betonginnretninger	Dispergert olje (lavere konsentrasjon enn produsert vann). Komponenter som i produsert vann, men i betydelig lavere konsentrasjoner
Kjølevann	Sjøvann som benyttes for kjøling i produksjonsprosessene	<ul style="list-style-type: none"> • Natriumhypokloritt • Kobber
Drenasjevann	Regn- og spylevann fra innretninger og skip	Kan inneholde forurensninger av olje, borevæske med mer
Sanitæravløpsvann	Sanitæranellegg på innretninger og skip	<ul style="list-style-type: none"> • Næringssalter • Organisk stoff
Vann fra klargjøring av rørledninger	Sjøvann eller ferskvann tilsatt kjemikalier fylles i rørledninger ved legging, og tømmes ut før oppstart av produksjon	<ul style="list-style-type: none"> • Fargestoff (fluorescein) • Biosid (glutaraldehyd, lut-/oksygenfjerner (natriumbisulfitt). Avhengig av metode og rørmateriale
Hydraulikkvæske	Væske som benyttes for å operere ventiler på havbunnsbrønner. Vannbaserte åpne systemer, eller oljebaserte lukkede systemer (med returlinje)	Kjemikalier
Borevæske	Væske som tilsettes i borehullet for blant annet å smøre borekronen, kontrollere trykk og frakte borekaks ut	<ul style="list-style-type: none"> • Barytt • Bentonittleire • Tungmetaller • Kjemikalier
Borekaks	Knust bergmasse fra grunnen	<ul style="list-style-type: none"> • Kan inneholde hydrokarboner fra boring i hydrokarbonholdige lag • Bergartsmineraler • Rester av kjemikalier fra borevæsken

1.2 Boreavfall som miljøproblem

Boreavfallsproblematikken har vært et omdiskutert tema innen petroleumsvirksomheten siden 1970-tallet. Da startet spekulasjonene om at oljebestandig borevæske kunne ha negative effekter på havbunnsfaunaen dersom den ble dumpet på havbunnen. Figur 1.2 viser hvordan regjeringen og statlige institusjoner som Miljødirektoratet tok tak i problemstillingen og fra 1993 iverksatte informasjonsheving om og tiltak for å redusere utslippene.



Figur 1.2 - Tidslinje for perioden hvor boreavfallsproblematikken har vært et tema (Falk m. fl. 2013)

Miljøovervåkinger av Barentshavet indikerer at området er relativt lite forurenset og dette skyldes mest sannsynlig at kun de «snilleste» borevæskene har blitt deponert her. Selv om disse i utgangspunktet ikke skal ha en direkte toksisk effekt på faunaen kan store deponeringer føre til fysisk stress og utarming av oksygen i sedimentet under (Bakke m. fl. 2012, Falk m. fl. 2013). Det sistnevnte vil med stor sannsynlighet kunne påvirke det mikrobielle livet i sedimentene.

Det finnes mye publisert materiale på miljøeffektene av boreavfallsdeponering på norsk sokkel med fokus på bentisk makrofauna (Daan m. fl. 1992, Daan m. fl. 1996, Gates og Jones 2012, Jones m. fl. 2012). Dow med medarbeidere (1990) undersøkte mikrobiologien i et modellsystem av marint sediment kontaminert med oljebaserte borevæsker. Resultatene var at oljebaserte

borevæsker fører til økt vekst hos noen spesielle grupper av bakterier. Svakheten ved disse undersøkelsene er at verktøyene for å analysere mikrobiell diversitet var langt dårligere for 20 år siden. Med de dyrkningsuavhengige metodene forskerne har til sin rådighet i dag er mulighetene for å oppdage effekter på mikrobiell sammensetning av hvilken som helst miljøendring mye større.

Hva er egentlig boreavfall? Under boreoperasjonen brukes borevæske (olje eller vann pluss et vektmateriale) til å frakte borekaks opp, smøre og kjøle borekronen under boring, motvirke at borehullet raser sammen og avpasse trykket i brønnen (Okpokwasili 1995). Blandingen som pumpes til overflaten inneholder dermed borevæske og borekaks (knust steinmasse) og betegnes som boreavfall/-slam (Falk m. fl. 2013). Som navnet tilsier er dette en blanding som må deponeres et sted. Dette kan gjøres like ved brønnen, ved å frakte det vekk og dumpe det i et mindre sårbart område eller ved å ta hånd om det på land (Breuer m. fl. 2004). Et fjerde alternativ er å injisere boreavfallet i en avfallsbrønn (Brendsdal 2011).

Typisk vektmateriale i borevæske kan være baritt, ilmenitt, hematitt eller saltløsning (Falk m. fl. 2013). Baritt inneholder barium, et grunnstoff som ikke er alminnelig utbredt og som dermed kan brukes som et signalstoff i undersøkelser av boreavfallsspredning på havbunnen (Bakke m. fl. 2012).

Opp gjennom tidene har det blitt brukt forskjellige typer borevæske: oljebasert, syntetisk og vannbasert. Oljebaserte borevæsker består av en basisolje i tillegg til vann eller saltløsning. Disse ble i 1993 forbudt å deponere på norsk sokkel (dersom andelen av oljestoffer overstiger 1%) da de så ut til å ha skadelig langtidseffekt på bentos (bunnlevende organismer) (Hudgins 1994). Syntetisk borevæske økte i bruk etter at dette forbudet trådte i kraft. Smøremidlene er syntetisert fra blant annet etylen og var forutsatt å være både biodegraderbare og mindre giftige enn de oljebaserte. Etterfølgende studier viste imidlertid at biodegraderingsegenskapene var omtrent de samme som hos mineraloljene de hadde erstattet. På slutten av 2000 ble det derfor bestemt at bruken av de syntetiske borevæskene også skulle reduseres (Breuer m. fl. 2004).

Vannbasert borevæske antar man kun har en begrenset negativ effekt på miljøet, da denne typen for det meste består av vann og forbindelser som finnes på OSPARs (Protecting and Conserving the North-East Atlantic and its Resources) PLONOR-liste (Pose Little or No Risk to the Marine Environment) (se tabell 1.2). Den eneste negative effekten som er forventet, er at vannbasert boreavfall vil slamme ned havbunnen ved deponering, med de potensielle følgene dette vil ha for organismene som lever der (Miljødirektoratet 2013).

Man antar at deponeringer på havbunnen kan påvirke negativt på tre måter. Den ene er at makrofaunaen tar skade av at store mengder kaks dumpes og fører til fysiske ødeleggelser. Den andre er at forbindelser i borevæskene kan ha direkte toksisk effekt på havbunnsorganismene. For det tredje kan havbunnsmiljøet påvirkes ved at boreavfallet kan ha en indirekte giftig effekt. Mikrober som degraderer organiske forbindelser i avfallet kan lage anoksiske forhold for andre

organismer (Falk m. fl. 2013). I 2004 fikk vi avfallsforskriften som fastslår at deponering av borekaks med vedheng av vannbasert borevæske normalt er tillatt (NOROG 2013).

Eksempler på kjemikalier som innebærer en miljørisiko og som er tatt i bruk under boringsprosesser i Barentshavet fra 1980 til 2012 er de svart-kategoriserte Spercell C og Ancoresin og de rød-kategoriserte Soltex, Newdrill, Polyplus, WBS 200, Silicone DF, Diaseal MF, PHPA. Det er ikke opplyst om boreavfall med innslag av disse kjemikaliene ble dumpet på havbunnen (Falk m. fl. 2013).

Tabell 1.2 - Oversikt over hvordan man med fargekoding klassifiserer alle forbindelser som brukes i offshore-industrien (Falk m. fl. 2013)

Svart	Kjemikaliene skal ikke deponeres, men i spesialtilfeller kan det gis løyve til å gjøre det.
Rød	Kjemikaliene innebærer en risiko for miljøet og bør erstattes av mindre risikable stoffer. Her kan det også gis løyve til å deponere, men da må det prioriteres å finne forbindelser som kan erstatte disse.
Gul	Kjemikaliene er under utredning men antatt ufarlige. Kan deponeres også når det ikke er et spesialtilfelle.
Grønn	Kjemikaliene finnes på OSPARs PLONOR-liste (nevnt ovenfor) og kan deponeres uten spesialtillatelse.

Forskere har undersøkt hva boreavfallsdeponiene i Nordsjøen inneholder og hva som skjer med de ulike bestanddelene etter dumping. Breuer med medarbeidere (2004) poengterer at avfallsdeponiet er en kompleks blanding påvirket av både antropogene og naturlige prosesser (brønnstørrelse, anvendt borevæske, mineralogi rundt brønnhullet og så videre). Spredningen av avfallet vil også avhenge av flere faktorer, som mengden av og hvilken type boreavfall det er snakk om, vannstrømninger og dybden der dumpingene foregår. Forstyrrelser (for eksempel oppvirvling) som skjer etter deponering kan gi økt eksponering av stoffer for organismene i nærheten (Breuer m. fl. 2004).

Det hersker usikkerhet rundt skjebnen til de risikable bestanddelene i boreavfallsdeponiene. Dette gjelder spesielt oljestoffene, hvor mesteparten antas å spres i vannmassene under dumping. Boreavfallsdeponier kan også inneholde metallkontaminanter (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn og spesielt Ba). Skjebnen til disse vil avhenge av flere faktorer, som lokal sedimenteringsrate, binding til uorganiske og organiske molekyler i miljøet eller assimilering i bentisk infauna. Av andre risikable stoffer som kan være bestanddel i boreavfall bør radionuklider nevnes. Disse vil mest sannsynlig forbli i deponiene over lang tid, og organismene rundt vil i liten grad eksponeres for dem hvis boreavfallshaugene får ligge uforstyrret (Breuer m. fl. 2004).

Når det kommer til nasjonale reguleringer i Barentshavet, har norske myndigheter formulert en målsetning om null skadelige utslipp og uttrykt dette i en rekke stortingsmeldinger. Målsetningen ble først nevnt i St.meld. nr. 58 (1996-1997) med videre presiseringer i St.meld. nr. 25 (2002-2003). I sistnevnte slo man fast at nullutslippsmålet skulle gjelde «for alle innretninger og alle operasjoner offshore, både bore- og brønnoperasjoner, produksjon og utslipp fra rørledninger». I St.meld. nr. 8 (2005-2006) karakteriseres områder som verdifulle og sårbare dersom de har «vesentlig betydning for det biologiske mangfoldet og den biologiske produksjonen» og hvor skadevirkninger på miljøet derfor kan få «langvarige eller irreversible konsekvenser». I St.meld. nr. 10 (2010-2011) påpekes det også at Barentshavet er et slikt område da torske- og hysebestanden vokser opp her.

Sammenliknet med andre områder på norsk sokkel hvor det drives oljeboringsvirksomhet har miljøkravene vært strengere i Barentshavet. Som nevnt ovenfor har i hovedsak «snille» borevæsker blitt benyttet. Miljødirektoratet nedla et generelt forbud mot å deponere avfall i 2006, men i 2010 ble dette omgjort til at man kan behandle boreavfall i Barentshavet på samme måte som på resten av den norske kontinentalsokkelen.

Ifølge Oljeindustriens Landsforenings estimer i deres rapport fra 2000 lå det på det tidspunktet 12 millioner m³ boreavfall på havbunnen i Nordsjøen. Siden forbudet mot å deponere oljebasert borevæske først kom i 1993, som nevnt ovenfor, kan man trygt anta at store deler av det som ligger på Nordsjø-bunnen er avfall av den mer skadelige typen (Falk m. fl. 2013).

Ifølge NOROGs miljørapport fra 2013 må det på alle felt der det skal bores gjennomføres en undersøkelse av havbunnen før oppstart og deretter hvert tredje år for å ha en oversikt over de biologiske, kjemiske og fysiske forholdene i sedimentet (NOROG 2013). Blant selskaper som undersøker hvordan boreavfallsdeponiene påvirker fauna på havbunnen kan det forskningsbaserte konsultentselskapet Akvaplan-niva nevnes. De har utarbeidet overvåkningsprogrammer for havbunn og undersøker en rekke fysiske, kjemiske og biologiske parametere, som sedimentkarakteristikk, innhold av metaller som barium, krom og kvikksølv, innhold av hydrokarboner, antall individer og diversitet av dyrearter (Larsen 2013).

1.3 Havbunnen

Havbunnen skiller seg fra vannkolonnen med tanke på abiotiske forhold og innhold av flora og fauna. Den deles topografisk inn i kontinentalsokkelen (kontinentalhyllen og -skråningen), kontinentalstigningen (meget svak skråning), dyphavsslettene, dyphavsgropene, midthavsstigningen og midthavstrygene (Store Norske Leksikon 2009).

Når det gjelder ulike typer bunnssubstrat deler man gjerne inn i hardbunn og bløtbunn. Hardbunn karakteriseres av Artsdatabanken som bunnssubstrat hvor kornstørrelsen er større enn 1,6 cm i diameter. Denne typen substrat finner man gjerne i natursystemtyper som hard afotisk eller eufotisk saltvannsbunn, utsatt hard saltvannsbunn og tareskogsbunn. Bløtbunn er på sin side karakterisert som havbunn bestående av uorganisk bunnssubstrat hvor kornstørrelsen har en

diameter på mindre enn 1,6 cm. Bløtbunn finner man hovedsakelig i natursystemtypene løs afotisk/eufotisk saltvannsbunn (Artsdatabanken År ikke oppgitt).

Bløtbunn kan bestå av litogent og biogent sedimentmateriale. Litogent sedimentmateriale består av finknust stein og mineralpartikler som fraktes til havet, mens biogent sedimentmateriale vil, som navnet vitner om, stamme fra levende materiale (enten døde organismer eller fekal-pellets). Organismene som til slutt ender opp som sediment er i all hovedsak planktoniske organismer med skall av silikat eller kalsiumkarbonat. En stor forskjell fra andre typer sediment er at over tid og ved høyt trykk vil biogent sediment danne hydrokarboner (Ocean Classroom 2013).

Som følge av transportprosesser som diffusjon og bioturbasjon skjer det en utveksling av kjemiske stoffer (blant annet organiske næringsstoffer, jern, metan og dinitrogenoksid) i overgangen mellom sjøvann og sediment (Yücel 2013). Bioturbasjon omfatter både omflytting av sedimentpartikler og bioirrigasjon, når bentiske organismer graver seg ned og dermed gir transport av porevann rundt om i sedimentet (Lohrer m. fl. 2004, Maire m. fl. 2008).

Organismene som lever på havbunnen samles under begrepet bentos. De største av dem (makrobentos, > 1 mm) er best studert: flerbørstemark, koralldyr, sjøstjerner, svamper, sekkedyr og skalldyr. Av mindre organismer kan man finne blant annet hoppekreps, rundormer, diatomeer, ciliater, flagellater og bakterier. På hardbunn vil man gjerne finne fastsittende arter (koralldyr, sekkedyr og svamper), mens det vil være et fravær av gravende arter (flerbørstemark og rundorm). Disse foretrekker naturlig nok bløtbunn. Som en generell regel vil hardbunn være substrat for filterspisere mens bløtbunn vil være dominert av deposittpisere (Encyclopaedia Britannica 2013).

1.4 Mikrobiotaen i sedimentet

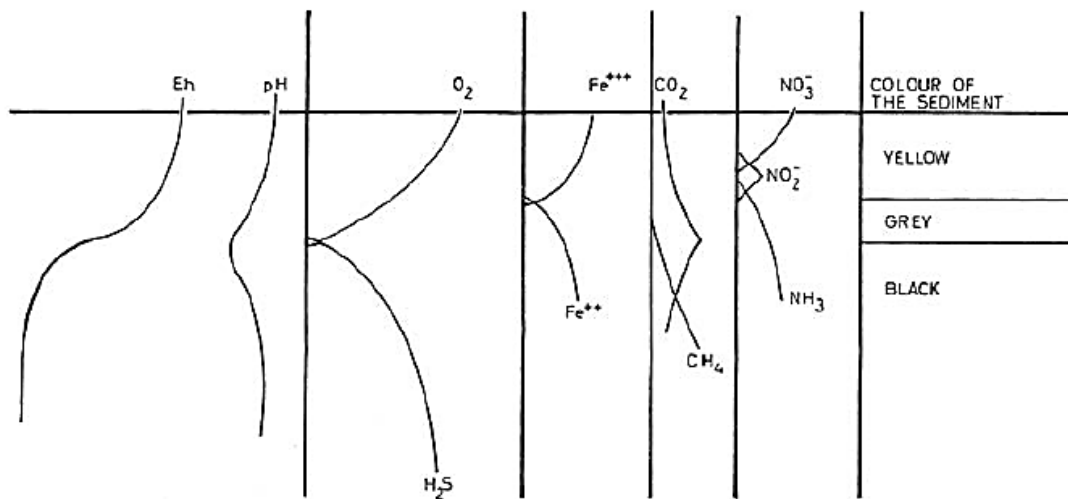
Bakteriesammensetningen i marint sediment er blitt studert nærmere de siste årene ved hjelp av dyrkingsuavhengige metoder. Klonbiblioteker av genet for 16S ribosomalt RNA er blitt analysert fra flere ulike sediment-lokaliteter, som antarktisk sokkelhav (Bowman og McCuaig 2003), Øst-Middelhavet (Polymenakou m. fl. 2009) og Beringhavet (Zeng m. fl. 2011). Arktisk sediment utenfor Svalbard er også undersøkt med tanke på mikrobielle samfunn (Ravenschlag 2001).

Zinger m. fl. (2011) tok over 140 bentiske prøver fra marine miljøer over hele verden, inkludert av bentiske mikrobefunn, og genererte PCR-amplikons av det V6-hypervariable området på 16S rRNA-genet fra det ekstraherte DNA-et. Forskerne fant at de bentiske samfunnene var dominert av gammaproteobakterier (sekvensandelen var $25 \pm 14,6\%$) og deltaproteobakterier ($16 \pm 11,8\%$). Andre taksa som var godt representert i de bentiske bakteriesamfunnene var blant annet *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* og *Planctomycetacia*.

På rekke-nivå er gammaproteobakterier i de fleste studier funnet å ha størst forekomst i sedimentet (Bowman og McCuaig 2003, Schauer m. fl. 2010, Zeng m. fl. 2011), selv om noen forskere kan dokumentere andre resultater. Ravenschlag m. fl. (2001) brukte 16S rRNA-prober for å undersøke marint arktisk sediment fra Svalbard og fant at den største bakterielle gruppen var

Cytophaga-Flavobacterium-gruppen (fra 11% forekomst i de øverste lagene til 3% på 5 cm sedimentdyp). Gammaproteobakterier fulgte dog like etter med 10,5% av talte bakterieceller i øvre sedimentlag (3,5% på 10 cm sedimentdyp) etterfulgt av *Planctomycetales* i litt mindre kvanta (1,5 – 3,7% av talte bakterieceller).

Utbredelsen av forskjellige bakterielle taksa bestemmes av tilgjengeligheten av næringsstoffer og terminale elektronakseptorer (figur 1.3). Den største kilden til organisk materiale, fotosyntesen, skjer i eufotisk sone og kan strekke seg ned til 200 m. Tilførselen av organisk materiale og den mikrobielle remineraliseringen av dette til sediment avtar med økende avstand fra land og økende havdybde. Tilgjengeligheten av organisk materiale er da den avgjørende faktoren som bestemmer hvor høy den metabolske aktiviteten er på en bestemt bunnlokalitet (Orcutt m. fl. 2011).



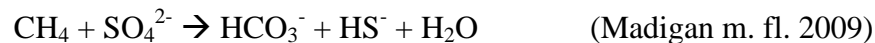
Figur 1.3 – Vertikalfordelingen av forbindelser som det er forventet å finne i marint sediment
(Fenchel 1969)

I næringsrikt sediment med høy tilførsel av organisk materiale er det tilgjengeligheten av terminale elektronakseptorer som bestemmer hvor fort det organiske materialet remineraliseres. I det øverste sedimentlaget vil oksygen utarmes raskt og føre til at andre elektronakseptorer tas i bruk (nitrat – NO_3^- , mangan - Mn^{2+} og jern – Fe^{2+}) (Orcutt m. fl. 2011). Canfield m. fl. (1993) sammenliknet elektronakseptorene oksygen, nitrat, mangan, jern og sulfat med tanke på hvor stor del av oksidasjonen av organisk karbon (C_{org}) de stod for i kyst-sediment. Artikkelforfatterne konkluderte med at oksygenrespirasjon kun stod for 3,6 til 17,4% av total C_{org} -oksidasjon, mens denitrifikasjon var begrenset til en tynn sone under den oksiske sonen. De påviste at mangan-, jern-, og sulfatreduksjon dominerte remineraliseringsprosessen, i den grad at med høye konsentrasjoner av manganoksid til stede vil hovedsakelig manganreduksjon foregå. Dersom konsentrasjonen av dette oksidet var lavt, noe som er mer typisk i kystsediment, ville jern- og sulfatreduksjon være de viktigste prosessene i remineraliseringen av C_{org} (Canfield m. fl. 1993).

Kvantitativt sett er sulfatreduksjon viktigst i remineraliseringen av organisk materiale i sokkelsediment (Canfield 1989). Leloup m. fl. (2009) amplifiserte *dsrAB*-genene i prøver fra marint sediment (0-5 m) og fant at i de øverste lagene (20 cm) viste gensekvensene likhet med *Desulfobacteraceae*: *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* og *Desulfococcus*. *Desulfobacteraceae* tilhører deltaproteobakterier, den klassen som omfatter majoriteten av kjente sulfat-reduserende bakterier (Orcutt m. fl. 2011). Lenger ned i sedimentet dominerte gram-positive sulfat-reduserende bakterier (Leloup m. fl. 2009).

Gammaproteobakteriene er, som nevnt, den klassen med størst forekomst i grunt sokkelsediment. Disse omfatter purpurbakterier (dersom lys er tilgjengelig), nitrifiserende bakterier, svovel- og hydrogenoksidende bakterier og metanotrofe bakterier og representerer dermed en divers gruppe av bakterier som lever både aerobt og anaerobt (Madigan m. fl. 2009).

Archaea (arkebakterier), et av de tre domenene av liv, er funnet overalt hvor man har lett i det marine miljøet. Archaea deles grovt sett inn i to rekker: Euryarchaeota og Crenarchaeota. Noen av disse er funnet å leve syntrofisk med bakterier, blant annet de anaerobe metanotrofe arkebakteriene. Deres samarbeid med sulfatreduserende bakterier viste seg å kunne være svaret på hva som skjer med de store mengdene metan som produseres i dypsedimentet:



Archaea utgjør en relativt liten del av prokaryot liv i de øverste lag av marint sediment sammenliknet med Bacteria og er ikke fokusert på i denne oppgaven.

1.5 Metoder for å studere bakteriediversitet

Prokaryoter har som kjent kun ukjønnnet formering. Dette, samt at rekombinasjon kan skje gjennom horisontal genoverføring, gjør artsinndelingen mer kompleks enn for høyere organismer. I den mikrobielle verdenen brukes fenotypiske og genotypiske data i kombinasjon når man skal beskrive en ny art. På DNA-nivå kan genomisk likhet undersøkes ved hjelp av DNA-DNA-hybridisering. Kriteriet for at to stammer tilhører samme art er at hybridiseringsgraden av genomene må være > 70% av hva den er for to kulturer av samme stamme (Madigan m. fl. 2009).

I tillegg brukes sekvenslikhet i genet for 16S ribosomalt RNA som sammenlikningsgrunnlag: 16S rRNA-genet er et såkalt markørgen (Chmolowska 2013). Det vanligst brukte kriteriet her er å avvise at to organismer er av samme art dersom gensekvensene er mindre 97% sammenfallende. Grunnen til denne avgrensingen er at mikroorganismer med $\geq 97\%$ sekvenslikhet ofte blir avvist som samme art ut fra DNA-DNA-hybridisering (Lozupone og Knight 2008). Basert på fenotypiske og genotypiske egenskaper har så langt nesten 7000 arter av Bacteria og Archaea blitt formelt godkjente (Madigan m. fl. 2009).

Siden etablering av en ny art innenfor mikrobiologien krever beskrivelse av fenotypiske trekk og dermed dyrking, ble man nødt til å introdusere et nytt begrep for å kunne distingvere ikke-

dyrkede organismer som bare er karakterisert gjennom sekvensen for 16S rRNA-genet med et kriterium som er sammenliknbart med en artsinndeling. Med dette formålet er begrepet «operational taxonomic unit» (- OTU) introdusert. Den vanligste OTU-inndelingen er å gruppere gener til å tilhøre samme eller forskjellige OTU-er med 97% sekvenslikhet som grenseverdi, i tråd med artskriteriet ovenfor (Madigan m. fl. 2009).

Ikke alle betingelser i et miljø kan enkelt identifiseres og gjenskapes i et laboratorium. På bakgrunn av dette oppstod begrepet «the great plate count anomaly», som ble introdusert av forskerne Staley og Konopka (1985). Det knytter seg til at kun et mindretall av bakterier (spesielt fra jord- og vannprøver) lar seg dyrke i laboratoriet. Et estimat går ut på at kun 0,1% av bakterier i naturen er dyrkbare (Madigan m. fl. 2009). For å sette det hele på spissen: Skulle man basert kunnskapen om bakterier på de få artene som faktisk lar seg dyrke i laboratoriet, kan dette likestilles med at biologer skulle basert kunnskapen sin om dyreriket på å besøke zoologisk hage.

I nye strategier for analyser av bakteriesamfunn brukes i stor grad en dyrkingsuavhengig tilnærming. Denne går ut på å isolere alt DNA fra et samfunn for så å gjøre videre analyser (enten ved å sekvensene alt genomisk materiale («shotgun»-sekvensering) eller ved å hente ut 16S rDNA-sekvensene (Daniel 2005). Denne strategien gir et mye videre innsyn i diversiteten i den mikrobielle verdenen. Et eksempel på dette er oppdagelsen av «the rare biosphere» i mange naturlige miljøer. Blant forskere innenfor mikrobiologi er det nå en etablert sannhet at et relativt lite antall fylogenetiske grupper dominerer med hensyn til antall individer i disse miljøene, mens et mye større antall grupper som hver rommer et fåtall individer, er de som sørger for mesteparten av den fylogenetiske diversiteten. Det er disse sistnevnte som er blitt benevnt «the rare biosphere» (Sogin m. fl. 2006).

De tidligere nevnte arkebakterienes generelle tilstedeværelse i det marine miljøet hadde neppe blitt oppdaget hadde det ikke vært for 16S rDNA-sekvensanalyse. I 1992 ble de første sekvensene med arkebakterielt opphav påvist i prøver av sjøvann (Delong 1992, Fuhrman m. fl. 1992). Inntil da trodde forskere at Archaea i hovedsak omfattet ekstremofile organismer, det vil si organismer som lever under ekstreme forhold med tanke på blant annet temperatur, pH og saltinnhold. Da man oppdaget at en betydelig andel marine 16S rDNA-sekvenser liknet mest på sekvenser fra en ekstrem termofil arkebakterie skjønte man at Archaea er mye mer alminnelig utbredt enn tidligere antatt (Munn 2011).

1.6 Bioinformatiske verktøy

Mye har skjedd på sekvenseringsfronten siden 1977 da Fred Sanger introduserte dideoxy-nukleotid-sekvensering av DNA (Sanger m. fl. 1977). Først og fremst har antallet parallelle avlesninger ved en enkelt kjøring med ett instrument økt fra 96 til millioner med de nyeste sekvenseringsteknikkene. Disse går samlet under fellesbetegnelsen Next-Generation-sekvensering (NG-sekvensering) (Mardis 2008). NG-sekvensering omfatter da blant annet 454-pyrosekvensering og Solexa/Illumina-sekvensering. I 2012 var kostnaden for å sekvensere med Illumina en hundredel per read av det den ville vært ved bruk av 454-teknologien (Degnan og

Ochman 2012). Svakheten med NG-sekvenseringsmetodene er at de gjennomgående genererer kortere read-lengder enn det som er mulig med Sanger-sekvensering. Dette kan til en viss grad kompenseres for med for eksempel Illumina-teknologien ved at samme fragment kan sekvenseres fra begge ender og deretter slås sammen med databehandlingsverktøy (Rodrigue m. fl. 2010). Utfordringen med så kraftige sekvenseringsverktøy er at den resulterende datamengden krever stor lagringsplass og dessuten stor datakompetanse for å kunne installere, oppdatere og kjøre de nødvendige programmene (Glenn 2011, Scholz m. fl. 2012).

Det er blitt utviklet flere programpakker for analysering av mikrobielle samfunn, blant annet Mothur og QIIME - Quantitative Insights Into Microbial Ecology. Mothur er, ifølge nettsiden deres www.mothur.org, det bioinformatiske verktøyet for analysering av 16S rDNA-sekvenser som er mest referert til. Et alternativ til denne pakken er som sagt QIIME, som kombinerer flere tredjepartsverktøy og egner seg til alt fra demultiplexing av sekvenspooler til kvalitetsfiltrering av sekvenser og gruppering i taksonomiske enheter (OTU-er) (Caporaso m. fl. 2010). For hver operasjon man ønsker å utføre på sekvensdataene finnes det et eller flere script hvor man må angi sekvensfilen(e) og få som output-fil de behandlede sekvensdataene.

1.7 Statistiske verktøy for diversitetsanalyse

I et datasett med et stort antall variabler vil det ofte være vanskelig å avklare den samlede effekten som disse variablene gir. Flere multivariate metoder er utviklet for å beregne og visualisere forskjeller mellom objekter i slike komplekse systemer. Ved diversitetsanalyser av biologiske samfunn er grunnlaget som regel en dissimilaritetsmatrise (videre benevnt D-matriser). Dette er symmetriske matriser der elementene består av dissimilaritetsverdier beregnet for alle par av prøver. D-verdiene angir graden av forskjell mellom prøvene basert på artssammensetningen. Det benyttes flere mål for dissimilaritet, blant annet Euklid-avstand, Bray-Curtis-dissimilaritet, kjikvadrat-avstand og UniFrac-avstand (Faith m. fl. 1987, Lozupone og Knight 2005). Av disse skiller den sistnevnte seg ut da denne baserer seg på fylogenetisk analyse i beregningen av dissimilaritet, det vil si «mengden evolusjonær historie som er unik for hver av to prøver» (Lozupone m. fl. 2011).

Multivariate ordineringsmetoder er ofte brukt i mikrobiell økologi for å visualisere sammenhenger i komplekse data, eller mer spesifikt, til å posisjonere objekter (for eksempel bakteriesamfunnet i en gitt lokalitet) i 2- (mest vanlig) eller 3-dimensjonalt rom ut ifra en artstabell eller D-matrise. Såkalt utvungen ordineringsmetode benytter seg kun av dette datagrunnlaget og plotter objektene som euklidske koordinater i et kartesisk koordinatsystem slik at nærliggende punkter representerer objekter med større likhet i bakteriesammensetning enn punkter lengre fra hverandre. Førsteaksen angir retningen på den største variasjonen i dataene, andreaksen den nest største og så videre. Eksempler på utvungne ordineringsmetoder er prinsipalkomponentanalyse – PCA, Non-metric Multidimensional Scaling - MDS, klassisk Multidimensional Scaling, også kalt Principal Coordinate Analysis – PCoA og Correspondence Analysis – CA (Oksanen 2013).

Ved tvungen ordinerer relateres de mikrobielle samfunnsdataene til andre abiotiske variabler i analysen. Kun den variasjonen i dataene som kan forklares med variasjonen i de abiotiske variablene blir vist. Objektene plottes som punkter mens de abiotiske faktorene plottes som vektorer (Oksanen 2013). Noen eksempler på slike tvungne ordineringsmetoder er Canonical Correspondence Analysis – CCA, Redundance Analysis – RDA og Distance-Based RDA - dbRDA (Legendre og Legendre 1998). Ordineringsmetodene kan kategoriseres ut ifra om de er tvungne eller ikke, typen ordinerer og hvilket mål for dissimilaritet som godtas (tabell 1.4).

Tabell 1.4 - Kategorisering av de ulike ordineringsmetodene (Oksanen 2013)

Navn på ordineringsmetode	Tvungen/utvungen	Mål for dissimilaritet	Type ordinerer
Non-metric Multidimensional Scaling	Utvungen	Alle	Ikke-lineær
Prinsipalkomponentanalyse	Utvungen	Euklidsk avstand	Lineær
Redundancy Analysis	Tvungen	Euklidsk avstand	Lineær
Correspondence Analysis	Utvungen	Kji-kvadrat	Vektet lineær
Canonical Correspondence Analysis	Tvungen	Kji-kvadrat	Vektet lineær
Principal Coordinate Analysis	Utvungen	Alle	Lineær
Distance-Based Redundancy Analysis	Tvungen	Alle	Lineær

1.8 Målene med denne oppgaven

Hovedmålene med denne oppgaven var å avdekke om dumping av boreavfall rundt en borebrønn i Barentshavet manifesterte seg i sammensetningen av bakteriesamfunn i sedimentet. Ved hjelp av sekvensering av amplikoner av genet for 16S ribosomalt RNA og bioinformatiske/statistiske verktøy skulle sediment fra havbunn påvirket av boreavfall sammenliknes med sediment fra antatt upåvirket havbunn.

Det ble videre antatt at deponeringen ville ha en påvirkning på oksygenkonsentrasjonen i sedimentet og dermed indirekte påvirke bakteriesammensetningen. I tillegg gikk antakelsene ut på at det ville være større forskjeller mellom de øvre sedimentsjiktene enn de nedre, som var forventet å ha relativt lik sammensetning av bakterier.

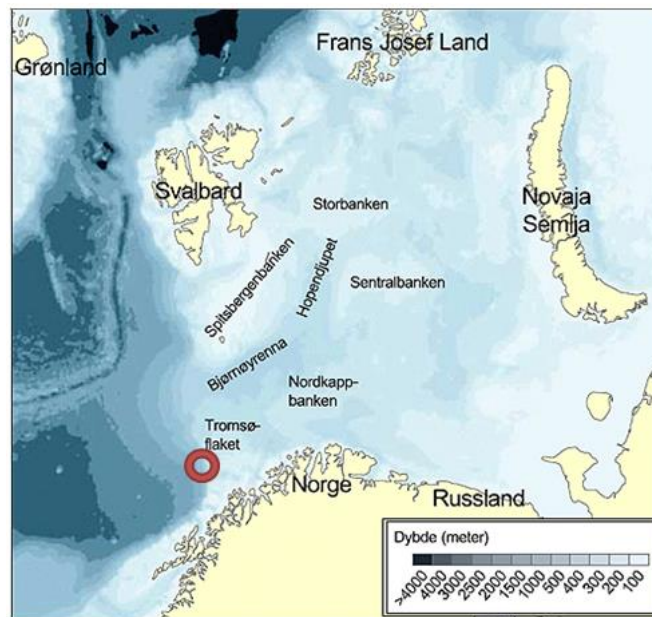
Et av de mer underordnede målene var å undersøke hvilke bakterierekker som dominerer i Barentshavs sediment og å sammenlikne dette med publisert litteratur.

2 Materialer og metoder

2.1 Innhenting av prøvemateriale

Prøvemateriale ble hentet inn i tidsrommet 30. november – 3. desember 2013 med hjelp fra M/S «Njord Viking», et ankringsfartøy leid inn av Eni Norge. Skipet la ut fra Tromsø mot letebrønner, lokalisert på den delen av kontinentalskråningen som er kjent som Eggaskråningen, på omtrent 1400 m dybde (Oljedirektoratet 2013). Om bord var (i tillegg til ordinært mannskap) forsker Sabine Cochrane fra Akvaplan-NIVA, seks operatører fra firmaet Oceaneering (for manøvrering av en ROV - Remotely Operated Vehicle) og undertegnede med veileder. Cochrane hadde gjort en visuell undersøkelse av havbunnen rundt letebrønner i juli 2013, før boringen av denne startet. Samme brønn ble inspisert på nytt for å kunne avdekke eventuelle endringer i faunaen etter avsluttet boring. Da den visuelle havbunnsundersøkelsen ble gjennomført ved hjelp av ROV utstyrt med kamera og robotarm, kunne dette koordineres med våre behov.

Boringen av brønner ble avsluttet i november 2013. Den ble boret så dypt som 4025 m på en havdybde på 1366 m. Konklusjonen fra boringen var at ingen av de ønskede reservoarbergartene var å finne (Oljedirektoratet 2013).

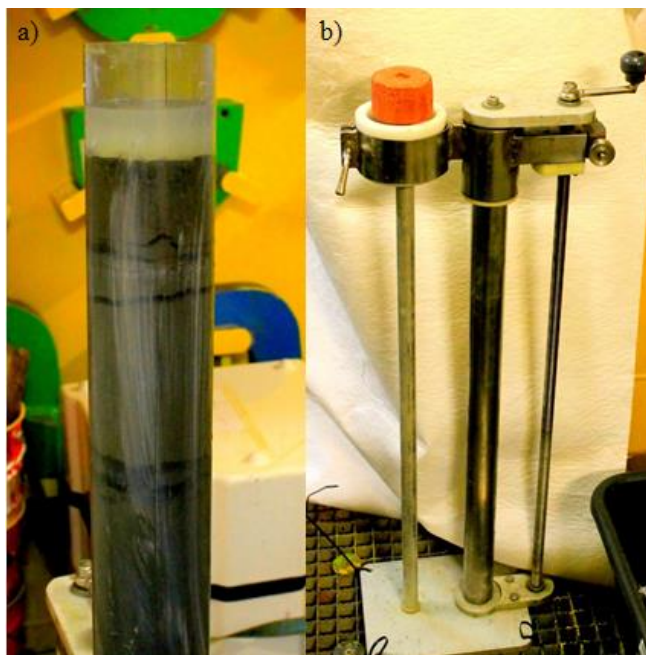


Figur 2.1 - Posisjonen til letebrønner

(<http://www.imr.no/barentshavet>)

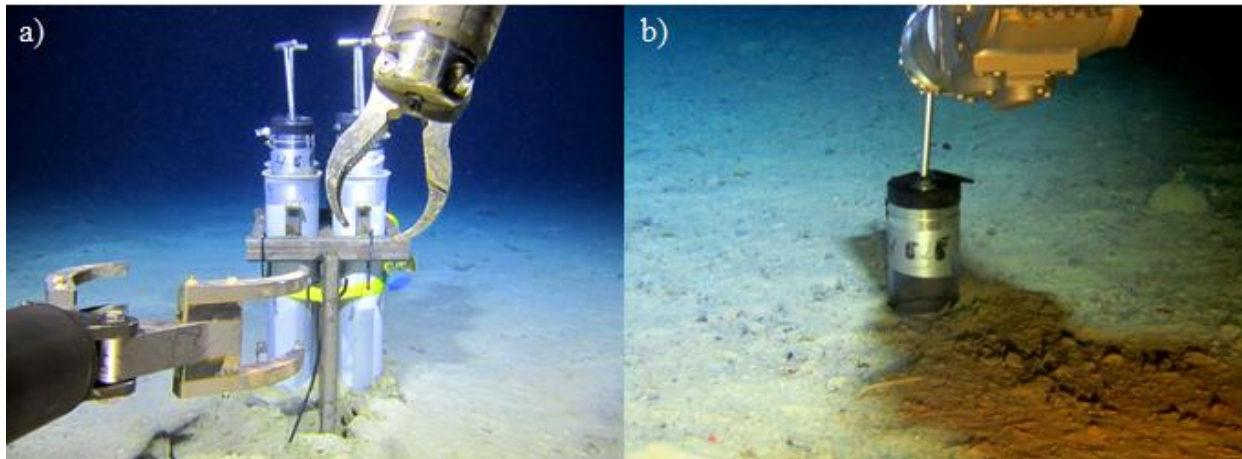
Temperaturen i hele vannsøylen ved letebrønner ble målt av Akvaplan-niva i august 2013, på oppdrag for Eni Norge AS. Temperaturen sank fra 0 til - 1 °C fra 900 - 1400 meters havdyp. Havstrømmen langs sjøbunnen er karakterisert av såkalt kaldt norsk dypsjøvann (Norwegian Cold Deep Water – NCDW) (kilde: Øyvind Leikvin, Akvaplan-niva for Eni Norge AS).

Prøvetakingsutstyret (figur 2.2) bestod av en prøvetakingssylinder (indre diameter 8 cm, lengde 50 cm) med en plastpropp øverst, festet med metallbånd. Plastproppen ga fri luftpassasje ut av sylinderen gjennom en ventil og hadde et T-håndtak i metall som ROV-armen brukte for å håndtere sylinderen. Under transport stod hver plasticsylinder i et rør med bunnpropp av gummi nederst. Når sylinderen var fylt med sediment kunne den settes ned i røret og presses ned på proppen. Denne tettet dermed igjen bunnen av sylinderen.



Figur 2.2 – Prøvetakingsutstyret. Bilde a) viser prøvetakingssylinderen som ble brukt til å ta ut kjerneprøver (indre diameter: 8 cm, lengde: 50 cm). Bilde b) viser verktøyet som ble brukt til å presse prøven ut. Utstyret ble lånt av Akvaplan-niva. Bilder: Ida Øverleir

ROV-en ble senket ned på havbunnen utstyrt med seks rør med prøvetakingssylindre (figur 2.3). Sylinderne ble, én etter én manøvrert av ROV-operatørene til å ta kjerneprøver ved å presses rett ned i sedimentet. ROV-en ble kontrollert fra båten via en kabel. Den kunne flyttes og ROV-armen beveges på signal fra ROV-operatørene om bord på M/S «Njord Viking», som fulgte operasjonen via bevegelige kameraer festet på ROV-en.



Figur 2.3 – Prøvetakingen. Bilde a) viser stativ med rør og prøvetakingssylindre samt ROV-armen, mens bilde b) viser en av prøvetakingssylindrene som presses ned i havbunnsedimentet for å ta opp en kjerneprøve. Bilder: Tatt på oppdrag for Eni Norge av Sabine Cochrane (Akvaplan-niva)/ROV-operatører (Oceaneering)

Prøvehenting ble gjort i to runder, med første runde 1. desember og andre runde 2. desember 2013. I alt ble det tatt opp ni kjerneprøver fordelt på fem stasjoner. To prøver ble tatt opp fra hver av tre stasjoner i et transekt i østlig retning fra brønnen (se tabell 2.1). De tre resterende prøvene ble tatt opp i andre retninger fra brønnen, med én kjerneprøve fra hver stasjon (se figur 2.3).

I utgangspunktet var planen å ta prøver av sedimentet så nært brønnen som mulig. Det ble gjort forsøk på å hente opp sediment i kolonnene 10 m fra brønnen, men uten suksess. Dette kom av at havbunnen her var såpass porøs at sedimentet ikke lot seg stabilisere inne i prøvetakingssylindren.

Tabell 2.1 gir en oversikt over alle sedimentkjerneprøvene som ble hentet opp i løpet av de to dagene M/S «Njord Viking» lå ved letebrønnen. Kun parallellene fra stasjonene 1, 2 og 3 ble brukt for å karakterisere bakteriesamfunn i denne oppgaven.

Tabell 2.1 - Informasjon om kjerneprøvene som ble tatt. Brønnen var tettet igjen med en CAN – ConductorAnchor Node, derav «plugg»

Stasjon	Dato	Avstand fra plugg (m)	Havdybde (m)	Retning fra brønn
1 (to paralleller)	01.12	210	1375	Øst
2 (to paralleller)	01.12	50	1380	Øst
3 (to paralleller)	01.12	30	1370	Øst
4 (én kjerneprøve)	02.12	60	1375	Vest- sørvest
5 (én kjerneprøve)	02.12	100	1370	Nord
6 (én kjerneprøve)	02.12	155	1370	Nord

Ombord ble rør med sedimentsylindrene tatt hånd om av undertegnede og veileder. Sedimentsylindren ble forsiktig frigjort fra transportrøret og bunnproppen og plassert på verktøyet som ble brukt til å presse sedimentkolonnen ut (se figur 2.2). Deretter kunne man med stor nøyaktighet sveive ut ønskede lengder av kjerneprøven. Etter måling av temperatur og oksygenkonsentrasjon (se nedenfor) ble segmenter gjennomskåret i flukt med sylindertoppen og overført til sterile Stomacher®-poser (Seward Ltd, West Sussex, UK). Følgende segmenter ble tatt vare på som prøvemateriale: 0-1 cm, 1-2 cm, 2-5 cm og 5-10 cm. Dette gjaldt for samtlige rør, men unntak av rør 3.1. Her hadde øverste del av sedimentkolonnen blitt presset opp i lokket og dermed var 0-1 cm-sjiktet redusert kraftig. Man valgte å overføre noe av boreslammet som var synlig på toppen og bruke dette som «0-1 cm»-prøve.

Prøvene ble rørt om for å få en homogen prøve i posen og fryst ned ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ved ankomst til Norges Fiskerihøgskole ble de overført til $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -fryser.

Det ble også tatt ut et mindre kvantum (ca. 2 g) fra hver sedimentprøve før innfrysing og overført til kryorør. Disse ble fryst ned i flytende nitrogen, med sikte på senere RNA-analyse og blir ikke berørt videre i denne oppgaven.

2.2 Målinger av abiotiske faktorer

Temperatur- og oksygenkonsentrasjon i kjerneprøvene ble målt om bord. UniSense® nålelektroder (diameter 1,1 mm: Unisense AS, Aarhus N, Danmark) ble benyttet og måledataene ble logget via UniSense® SensorTrace Basic v3.1.3, som var koblet til en bærbar PC. Oksygenmikrosensoren ble kalibrert i samsvar med produsentens brukermanual. Det forutsettes en lineær sammenheng mellom målte mV-verdier og O_2 -konsentrasjon i området mellom mettet løsning og fullstendig anoksitet. Som førstnevnte ble det brukt godt luftet sjøvann der konsentrasjonen i μM ble anslått ved å justere for temperatur og salinitet i samsvar med tabell i manualen. Nullmålingen ble gjort i ferskt tillaget 0,1 M askorbinsyre i 0,1 M NaOH.

pH-målingene ble gjort i laboratoriet på Norges Fiskerihøgskole 25. mars 2014 med et pH-meter 92 (Radiometer Copenhagen). Sediment (~ 5 - 9 g) fra 23 prøver (fra alle sjikt i transektet unntatt 3.1 (0-1 cm)) ble overført i 15 ml koniske plastrør og tilsatt lik mengde (w/w) med MilliQ-vann. pH-meteret ble kalibrert ved hjelp av standardbufferne med pH 4,0, 7,0, 8,0 og 9,0.

2.3 Isolering av DNA fra sedimentprøvene

Ca. 1,0 g sediment fra hver av 24 sedimentprøver (3 stasjoner x 2 parallelle kjerneprøver x 4 segmenter) ble tint og DNA ble isolert ved bruk av PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, USA), der hovedtrekkene er vist i figur 2.4. Protokollen (www.mobio.com) ble modifisert ved at et ekstra steg med homogenisering ble lagt til. Denne ble gjort etter at sedimentet var tilsatt PowerBead-rørene og vortexet.

Homogeniseringen ble utført på følgende måte med en Precellys® 24 Lysis & Homogenization (PEQLAB, Erlangen, Tyskland):

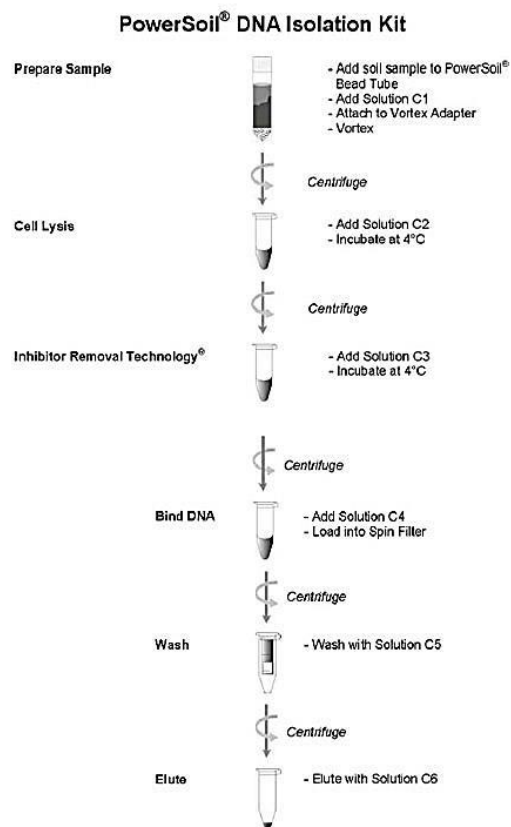
20 s homogenisering (6000 rpm)

2 min på is

Gjentatt 3 ganger

Deretter ble protokollen fra MO BIO fulgt helt til steg 20, hvor det ble tilsatt 30 µl løsning C6 istedenfor 100 µl.

Isolert DNA ble kvantifisert og karakterisert med hensyn til renhet (A_{260}/A_{280}) med et NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometer (NanoDrop Products, Wilmington, USA).



Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com Website: www.mobio.com

Figur 2.4 - Hovedstegene i PowerSoil® DNA Isolation-protokollen

2.4 Oppkopiering og rensing av 16S rDNA-sekvenser

For å kopiere opp området av 16S rRNA-genet som omfatter de hypervariable V3- og V4-regionene ble det brukt PCR (Polymerase Chain Reaction) med det isolerte DNAet som templat og Biochrom Ultra Pure Water som negativ kontroll. 16S rRNA-genet har i alt ni hypervariable regioner flankert av sekvenser som er mer konserverte (Fadrosh m. fl. 2014).

Primerne som ble brukt var 16S Amplicon PCR Forward Primer (produkt navn: illu.ada.341F) (100 µM) og 16S Amplicon PCR Reverse Primer (produkt navn: illu.ada.785R) (100 µM) (Sigma-Aldrich® Inc.). Disse sørger for oppkopiering av et amplicon på 444 basepar og starter ved posisjon 341 og ender ved posisjon 785 i 5'-3' retning (i referanseorganismen *Escherichia coli*). Primerne inneholdt også «overhang adapters» som i neste omgang skal fungere som templat ved den etterfølgende indeks-PCR (se nedenfor).

16S Amplicon PCR Forward Primer =

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

16S Amplicon PCR Reverse Primer =

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

«Overhang adapter»-område i oransje, genspesifikt område i lilla

Valg av primere for amplifisering av V3V4-området av 16S rRNA-genet ble gjort i samsvar med «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (www.support.illumina.com). Her følges anbefalingene fra Klindworth m. fl. (2013) som sammenliknet 175 primere og 512 primer-par *in silico* og kom fram til hvilke par som egner seg best for tre ulike amplicon-størrelsesklasser (100-400, 400-1000 og ≥ 1000 basepar). Forskerne konkluderte med at for *Bacteria* hadde primerparet S-D-Bact-0341-b-S-17 og S-D-Bact-0515-a-A-19 høyest samlet dekning, selv om det hadde svak gjenkjennelse av 10 rekker (derav blant annet *Chlamydiae* og *Caldiserica*). Primerparet S-D-Bact-0564-a-S-15 og S-D-Bact-0785-b-A-18 hadde hakket mindre samlet dekning, men dårlig gjenkjennelse av kun fire rekker (derav blant annet *Chloroflexi* og *Elusimicrobia*). Primerne jeg anvendte, S-D-Bact-0341-b-S-17 og S-D-Bact-0785-b-A-18 kombinerer med andre ord dekningsområdet til de to primerparene som kom best ut i den nevnte studien (Klindworth m. fl. 2013).

PCR-reaksjonen ble gjennomført som anbefalt i den ovennevnte Illumina-protokollen. Det vil si bruk av PCR-kitet KAPA HiFi HotStart Ready Mix (2X) (Kapa Biosystems Inc, Wilmington, USA). For selve reaksjonen ble GeneAmp® PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific Inc.) benyttet.

PCR-miks:

Primer 341F (1 µM): 5 µl

Primer 785R (1 µM): 5 µl

KAPA HiFi Kapa Ready Mix: 12,5 µl

Templat (~ 10 ng/µl): 2,5 µl

Følgende temperaturprogram ble benyttet:

95 °C - 3 min

95 °C - 30 sek

55 °C - 30 sek

72 °C - 30 sek

72 °C - 5 min

4 °C - ∞

Kursiv: Gjentatt med 25 runder

PCR-reaksjonen ble kjørt i triplikater for hver av de 24 DNA-ekstraktene og vellykkede amplifiseringer ble bekreftet som bånd av forventet størrelse etter gelelektroforese-separering på 1% agarosegel tilsatt 5 mg/ml etidiumbromid.

PCR-produktene ble separert på en 0,8% agarosegel tilsatt 5 mg/ml etidiumbromid. Båndene av korrekt størrelse ble skåret ut av gelen og DNAet ble deretter ekstrahert fra gel-skivene ved hjelp av QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Tyskland). Protokoll fra leverandør (www.qiagen.com/products) ble fulgt med unntak av i siste steg, hvor 30 µl EB-buffer ble tilsatt filteret istedenfor 50 µl.

Som siste opprensing ble Agencourt AMPure® XP Beads (Beckman Coulter Inc, Beverly, USA) brukt på ekstraktene. Leverandørens protokoll (www.beckmancoulter.com) ble fulgt med unntak av steg 12 hvor 30 µl EB-buffer ble tilsatt pellet istedenfor 52,5 µl 10 mM Tris pH 8,5 og steg 16 hvor 27 µl av supernatant ble tatt ut istedenfor 50 µl.

Renheten av de rensede DNA-ekstraktene ble til sist sjekket på 1% agarosegel tilsatt 5 mg/ml etidiumbromid.

Alt laboratoriearbeid beskrevet ovenfor ble utført ved Norges Fiskerihøgskole.

2.5 Sekvensering

Videre preparering for sekvensering og selve sekvenseringen ble gjort på Barents BioCentre Lab i Forskningsparken i Tromsø med assistanse fra ingeniør Seila Pandur, Norstruct. Dette arbeidet ble også utført i tråd med «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (www.support.illumina.com). Før preparering ble de 24 prøvene kvantifisert ved hjelp av et Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

For å kunne sortere Illumina-sekvensene til de forskjellige prøvene etter sekvensering, ble hver av de 24 primære PCR-amplikonene påsatt en unik kombinasjon av to indeks-sekvenser («barcode-er») ved hjelp av en «indeks-PCR»-reaksjon (se tabell 2.2).

Følgende ble tilsatt i PCR-rørene:

(Primerne er hentet fra Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina®, San Diego, USA))

Nextera® XT Index 1 Primer (N7XX) (FC-131-1001/FC-131-1002): 5 µl

Nextera® XT Index 2 Primer (S5XX) (FC-131-1001/FC-131-1002): 5 µl

DNA-ekstrakt: 5 – 10 µl (10 µl hvis < 5 ng/µl i primært PCR-produkt, ellers 10 µl)

PCR-grade water: 5 – 10 µl

2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix: 25 µl

PCR-rørene ble så sentrifugert ved 1000 xg i 20 °C i 1 min.

Indeks-PCR-reaksjonen ble kjørt etter følgende program:

95 °C - 3 min

95 °C - 30 sek

55 °C - 30 sek

72 °C - 30 sek

72 °C - 5 min

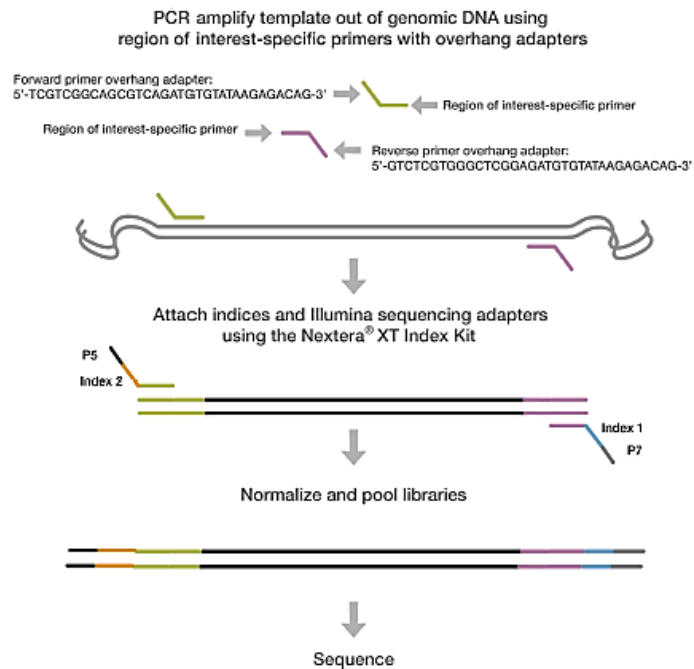
4 °C - ∞

Uthevet i kursiv: 8 runder

Tabell 2.2 – Kombinasjonene av Nextera XT-indeks-primere som ble brukt på de 24 primære PCR-produktene fra de 24 prøvene

	N701	N702	N703	N704	N705	N706
S501	1.1 (0-1 cm)	1.1 (1-2 cm)	1.1 (2-5 cm)	1.1 (5-10 cm)	1.2 (0-1 cm)	1.2 (1-2 cm)
S502	1.2 (2-5 cm)	1.2 (5-10 cm)	2.1 (0-1 cm)	2.1 (1-2 cm)	2.1 (2-5 cm)	2.1 (5-10 cm)
S503	2.2 (0-1 cm)	2.2 (1-2 cm)	2.2 (2-5 cm)	2.2 (5-10 cm)	3.1 (0-1 cm)	3.1 (1-2 cm)
S504	3.1 (2-5 cm)	3.1 (5-10 cm)	3.2 (0-1 cm)	3.2 (1-2 cm)	3.2 (2-5 cm)	3.2 (5-10 cm)

Prøvene identifiseres på følgende måte: Første tall: Stasjonsnummer. Andre tall: parallellnummer. Parentes: sedimentsjikt. Se Appendiks B (tabell B1) for oversikt over indeks-sekvensene



Figur 2.5 – Illustrasjon av hensikten med de to omgangene med PCR-reaksjon. PCR ble kjørt for å for å få kopiert opp den ønskede V3-V4-regionen på 16S rRNA-genet og i tillegg få festet på indeks-sekvenser til disse amplikonene. Figur hentet fra «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (www.support.illumina.com)

De 24 PCR-produktene ble rensert med AMPure XP Beads på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.4, med unntak av at 30 µl supernatant ble tatt ut i siste steg.

For å måle DNA-konsentrasjon etter indeks-PCR ble det brukt et Qubit 2.0 Fluorometer som gir konsentrasjonen av DNA mer spesifikt og presist enn NanoDrop. Deretter ble alle PCR-produktene normalisert til en konsentrasjon på 4 nM, ved hjelp av følgende formel:

$$\frac{(\text{konsentrasjon i } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}})}{(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 600)} = \text{konsentrasjon i nM}$$

Her tilsvarer tallene 660 gjennomsnittlig molekylvekt per basepar av DNA og 600 var estimert gjennomsnittlig antall basepar i amplikonene (inkludert primerne).

5 µl fra hver av de 24 normaliserte prøvene ble samlet i en pool – såkalt multiplexing. Deretter ble 5 µl av denne poolen tilsatt 5 µl 0,2 N NaOH og vortexet raskt. Etter vortexing ble preparatet sentrifugert ved 280 xg ved 20 °C i 1 min og inkubert i 5 min ved romtemperatur.

990 µl is-avkjølt HT1 (hybridiseringsbuffer fra Nextera XT-kitet) ble tilsatt denaturert DNA for å gi et bibliotek med konsentrasjon 20 pM i 1 mM NaOH. Deretter ble blandingen plassert på is.

Neste steg gikk ut på å fortynne DNA til 6 pM. Avkjølt HT1 (420 µl) ble tilsatt denaturert DNA (180 µl), mikset og puls-sentrifugert. Blandingene ble igjen plassert på is.

Da det endelige biblioteket må inneholde minst 5% PhiX (viralt DNA som internkontroll for sekvenseringsmaskinen), måtte det prepareres en PhiX-kontroll. For å gi en 4 nM løsning ble det tilsatt 2 µl 10 nM PhiX-bibliotek til 3 µl 10 mM Tris (pH 8,5). Løsningen (5 µl) ble så blandet med 5 µl 0,2 N NaOH i et mikrosentrifugerør og vortexet raskt. Blandingene ble så inkubert i 5 min ved romtemperatur.

Etter inkubering ble de 10 µl 2 nM denaturert PhiX-bibliotek tilsatt avkjølt HT1 (990 µl) for å gi 20 pM konsentrasjon. I likhet med DNA-biblioteket skulle denne løsningen også fortynnes til 6 pM: 20 pM denaturert PhiX-bibliotek (180 µl) ble tilsatt avkjølt HT1 (420 µl). Dette ble mikset og puls-sentrifugert og deretter plassert på is.

Helt til slutt ble PhiX-kontrollen (30 µl) tilsatt amplikon-biblioteket (570 µl) og mikset. Løsningen ble varmet opp i 2 min ved 96 °C i varmeblokk. Røret ble vendt 1-2 ganger og inkubert på is i 5 min før innholdet ble pipettert i riktig brønn i MiSeq V3 Reagent Cartridge. Denne ble plassert i en MiSeq Desktop Sequencer (Illumina®, San Diego, USA).

Illuminas MiSeq «table-top»-sekvenseringsplattform har maksimum avlesningslengde på 300 basepar med dagens teknologi. Metoden som ble brukt kalles 300PE - «300 basepairs paired-end read» (Fadrosh m. fl. 2014)). For å kunne dekke hele det amplifiserte området av 16S rRNA-genet på ~ 444 basepar krevdes både forward og reverse sekvensering.

Sekvenseringsreaksjonen bestod av tre trinn: preparering av bibliotek, «clustering» og sekvensering. Clustering skjer når adapter-regionen på enkelttråd-DNA-fragmentene bindes kovalent til oligonukleotidene på «flowcell»-en. DNA-fragmentene amplifiseres så med oligonukleotidene som primere og dermed blir hver nye kopi som genereres også bundet kovalent til flowcell-overflaten. Slik dannes lokale ansamlinger av identiske fragmenter spredd utover flow-cellen (figur 2.6).



Figur 2.6 – Illustrasjon av en cluster av kopierte DNA-fragmenter.

Kilde: www.illumina.com

Avlesning skjer parallelt og av både forward- og reverse-trådene ved hjelp av de fire basene A, T, C, G merket med hver sin fluorescens-merkelapp. Naturlig konkurranse mellom de fire basene gir mest mulig korrekt avlesning. Etter hver syntese vil ansamlingene bli belyst på av en laser som avslører fargen på basen som ble festet på tråden. Fluorescensmerkelappen spaltes deretter av for å gi plass til en ny base i neste synteserunde (Ram m. fl. 2011).

Sekvenseringsoperasjonen tok 68 timer inkludert at poolen av sekvenser ble demultiplex-et til sine respektive 24 prøver og indeks- og adapter-sekvenser fjernet fra sekvensdatabasen.

2.6 Sekvensbehandling

2.6.1 Sammenslåing av forward og reverse reads

Poolen av 24 ferdig-sekvenserte DNA-prøver ble delt inn i 24 x 2 filer i fastq.gz-format (for hver prøve fikk man én fil med forward read og én med reverse read). Inndelingen ble gjort automatisk av MiSeq-instrumentet på grunnlag av indekseringen (se kapittel 2.5). Barcode og adaptersekvensene var fjernet fra fastq.gz-filene. Alle avleste sekvenser var merket med identifikasjonsmerkelapper, som eksemplifisert her:

```
Forward read: @M01337:22:000000000-A5PCV:1:1101:21466:1652 1:N:0:3
```

```
Reverse read: @M01337:22:000000000-A5PCV:1:1101:21466:1652 2:N:0:3
```

I den videre sekvensbehandlingen ble programpakken QIIME v1.8.0 (Caporaso m. fl. 2010) benyttet.

Forward og reverse reads ble slått sammen ved hjelp av sekvenslikhet i de overlappende sekvensområdene. I QIIME ble kommandoen *fastq-join* (Erik Aronesty 2011, ea-utils: "Command-line tools for processing biological sequencing data"; Expression Analysis, Durham, NC <http://code.google.com/p/ea-utils>) benyttet med forward- og reverse-filene i fastq-format som input. Maksimum mismatch i overlappende sekvensområde ble satt til 10%.

2.6.2 Kvalitetsfiltrering I

Til kvalitetsfiltrering av de sammenslåtte sekvensene ble programpakken 32-bit USEARCH v7.0.1090 (Edgar 2010) fra drive5 (portal for bioinformatikk) benyttet.

Som nevnt i kapittel 2.6.1 var sekvensfilene fra MiSeq-instrumentet i fastq.gz-format. De ble først pakket ut til fastq-format og kunne så i neste omgang konverteres til fasta- og qual-filer. Fasta-filene inneholdt da selve sekvensene mens qual-filene inneholder informasjon om kvaliteten på sekvensene, oppgitt som en Q-verdi for hver enkelt base. Q-verdien (også kalt Phred-score) er et heltall som uttrykker estimert sannsynlighet for at basen er avlest feil. For Illumina-reads vil Q-verdiene variere fra 1-41.

$$P (\text{feil base}) = 10^{-Q/10} \quad \text{og tilsvarende} \quad Q = -10 \log_{10}(P)$$

En Q-verdi på 3 vil da bety at det er 50% sjanse for at basen er avlest feil (http://drive5.com/usearch/manual/quality_score.html).

I USEARCH brukte jeg videre scriptet *-fastq_filter* med argumentet *-fastq_maxee*. «Maxee» er en forkortelse for «maksimum expected errors» - altså maksimum forventede feil i sekvensen, basert på hver enkelt bases Q-verdi. Maksimum forventede feil ble satt til å være 0,5 og kommandoen vil da fjerne alle sekvenser hvor sannsynligheten for feil er høyere enn 50%.

Output-filene fra denne analysen ble satt til å være i fastq-format (*-fastqout*).

2.6.3 Sammenslåing av sekvensfilene

De 24 kvalitetsfiltrerte sekvensfilene ble slått sammen med kommandoen *split_libraries_fastq.py*. Denne sørget for at samtlige sekvenser ble slått sammen til én fil. *Split_libraries_fastq.py* kan også brukes til å filtrere ut sekvenser ved at man velger en nedre terskel for Q-verdier som ble tillatt. I mitt tilfelle ble nedre grense satt til $Q = 0$ da sekvensene allerede var kvalitetsfiltrerte ved hjelp av USEARCH.

2.6.4 Fjerning av primere

Neste steg i prosessen var å fjerne de 16S rRNA-genspesifikke primerområdene fra sekvensene. Programmet PRINSEQ (v.0.20.4) ble benyttet til dette (Schmieder og Edwards 2011). Ved hjelp av kommandoene *-trim_left* og *-trim_right* kunne man kutte av ønsket antall baser fra hver ende av sekvensene. Da forward-primer (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') og reverse primer (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') er henholdsvis 17 og 21 baser lange ble fragmenter av disse størrelsene kuttet av.

Prosedyrene beskrevet nedenfor (i tillegg til 2.6.2 Kvalitetsfiltrering I) er modifiserte anbefalinger av Mike Robeson, hentet fra QIIME-forumet.

2.6.5 Dereplikasjon

Etter at primerne var fjernet ble sekvensene dereplikert. Det betyr at kun én sekvens av flere identiske beholdes. Scriptet *-derep_fulllength* (USEARCH) ble benyttet. Informasjonen om hvor

mange sekvenser som ble fjernet beholdes dersom `-sizeout`-argumentet velges i kommandoen. Da blir størrelsesannoteringen oppgitt etter sekvens-merkelappene.

2.6.6 OTU-gruppering

Dette går ut på at alle sekvenser sammenliknes med hverandre og deretter grupperes i OTU-clustere ut ifra graden av sekvenslikhet. Scriptet `-cluster_otus` (USEARCH) ble benyttet. Denne kommandoen bruker UPARSE-OTU-algoritmen med et minimumskrav på 97% likhet mellom sekvensene. Input i kommandoen var fasta-filen fra forrige steg, og output-filen en ny fasta-fil med hver OTU representert med én sekvens. Denne OTU-representative sekvensen velges ut som en consensus-sekvens: Hver nukleotidposisjon i consensus-sekvensen fylles av den basen som er mest representert i denne posisjonen.

2.6.7 Fjerning av kimeriske sekvenser

Neste trinn bestod i å fjerne kimeriske sekvenser. En kimera er i denne sammenhengen et hybridprodukt fra PCR-kjøringen hvor et 16S rDNA-fragment stammer fra to organismer (Haas m. fl. 2011). For å fjerne kimeraer brukte man algoritmen UCHIME (Edgar m. fl. 2011) utviklet av Drive5 (scriptet `-uchime_ref`).

2.6.8 Klargjøring av OTU-tabell

For å merke alle OTU-ene som ble plukket ut i clustering-trinnet (her: OTU_1, OTU_2, osv) brukte man Python™-scriptet `fasta_number.py` (<https://www.python.org/>).

Deretter ble alle de kvalitetsfiltrerte sekvensene tilordnet til riktig OTU. Til dette ble scriptet `-usearch_global` kjørt og det ble generert en uc-fil. Dette er en tab-separert tekstfil som enkelt kunne omgjøres til en OTU-tabell med et modifisert Python-script (opphavsmann: Mike Robeson): `uc2otutab_mod.py`.

OTU-tabellen ble så omgjort til en biom-tabell ved hjelp av scriptet `biom_convert`. Biom-formatet (Biological Observation Matrix) egner seg spesielt godt i komparative `-omics`-studier, for eksempel i undersøkelser hvor man bruker markørgener (biom-format.org 2013).

I neste steg ble samtlige OTU-er tilordnet til taksa. Til dette ble scriptet `assign_taxonomy.py` benyttet med tre input-filer: én var fasta-filen med de merkede OTU-ene (OTU_1, OTU_2, og så videre), én var en tekstfil som kan føre sekvenser sammen med sine tildelte taksa og den siste var en fasta-fil med referansesekvenser. Som referansedatabase benyttet man Greengenes Public Database (<http://greengenes.lbl.gov>) mens metoden for tilordning tilhørte BLAST. Output-filen var en tekstfil med taksonomisk tilhørighet angitt til laveste pålitelige nivå for alle OTU-ene.

Siste trinn i OTU-picking-prosessen var å integrere filen med tildelt taksonomi i biom-tabellen. Her ble det benyttet scriptet `biom_add-metadata`.

2.6.9 Kvalitetsfiltrering II

For å oppsummere OTU-tabellen ble scriptet `summarize_taxa.py`. Resultatet var tabeller som gav den prosentvise fordelingen mellom taksa på de forskjellige fylogenetiske nivå, helt ned til slekt.

Tabellene avslørte så at det i enkelte prøver var betydelige innslag av *Enterobacteriaceae*-sekvenser. Ved BLAST-søk ble det konkludert med at dette dreide seg om en *Escherichia coli*-kontaminering som må ha skjedd under laboratoriearbeidet og at sekvensene det gjaldt kunne fjernes fra sekvensmaterialet uten å påvirke integriteten til dataene i avgjørende grad. I tillegg ble flere av OTU-ene ikke klassifisert til noen kjent fylogenetisk gruppe (merket «unassigned») og en del sekvenser ble tilordnet til Archaea og kloroplaster fra eukaryote alger. Alle disse sekvensene ble fjernet fra biom-tabellen ved hjelp av scriptet *filter_otus_from_otu_table.py*.

Ved hjelp av scriptet *biom_convert* ble biom-tabellene omdannet til tabeller i tekst-format som kunne importeres både til regnearket i Excel og inn i programpakken R, for statistiske analyser.

For alle script benyttet i dette kapittelet er kommandoene gitt i tabell B1 i Appendiks B.

2.7 Alfadiversitet

Alfadiversiteten ble undersøkt ved å analysere hvordan bakteriesammensetningen så ut for de 24 prøvene. Bakteriesammensetningen ble karakterisert som hvilke bakterielle taksa som var til stede og dessuten graden av forekomst for de ulike taksonomiske inndelingene.

2.8 Betadiversitet

2.8.1 Bray-Curtis-dissimilaritetsmatrise

Graden av ulikhet i sammensetningen av bakteriesamfunnene (betadiversiteten) mellom de 24 prøvene ble undersøkt basert på OTU-tabellen. Alle statistiske betadiversitetsanalyser ble utført i statistikkprogrammet R (v3.0.1) med pakkene *vegan* (Oksanen 2013), *MASS* (Venables og Ripley 2002), *stats* (R Core Team 2013) og *ape* (Paradis m. fl. 2004).

En dissimilaritetsmatrise (videre benevnt D-matrise) basert på Bray-Curtis-dissimilariteten (Bray og Curtis 1957) (videre benevnt Bray-Curtis for enkelhets skyld) ble beregnet ut ifra OTU-tabellen. Indeksen går fra 0 til 1, hvor to identiske prøver vil ha dissimilaritet 0 og to prøver som ikke har noen arter til felles vil ha dissimilaritet 1.

$$BC_{ij} = \sum_{k=1}^K \frac{|n_{ik} - n_{jk}|}{(n_{ik} + n_{jk})} \quad (\text{Bray og Curtis 1957})$$

hvor n_{ik} er antallet (n) av art nummer k for prøve i

Den resulterende matrisen vil være en symmetrisk 24 x 24-matrise med 0 langs diagonalen. Matrisen ble komponert i R ved hjelp av funksjonen *vegdist*.

2.8.2 Principal Coordinate Analysis

Principal Coordinate Analysis (PCoA) er en ordineringsmetode som plasserer de 24 prøvene som punkter i et koordinatsystem basert på Bray-Curtis-indeksene i D-matrisen. Avstanden mellom punktene i koordinatsystemet gjengir dissimilariteten mellom prøvene. Et todimensjonalt

koordinatsystem vil da gjengi den største variasjonen mellom prøvene langs førsteaksen og den nest største langs andreaksen.

PCoA ble komponert i R (ape) med funksjonen *pcoa* og visualisert med funksjonen *biplot*. Med *cmdscale*-funksjonen (stats) ble det returnert en goodness-of-fit-verdi. Denne oppgir hvor mye av variasjonen i dataene som «fanges» i de to valgte dimensjonene.

2.8.3 Distance-Based Redundancy Analysis

Distance-Based Redundancy Analysis (dbRDA) ble gjort for å ordinere prøvene med hensyn på de abiotiske variablene, såkalt tvungen ordinerer. DbRDA forklarer variasjonen i prøvedataene med hensyn på de abiotiske faktorene i et plott hvor bakteriesamfunnet i hver prøve er punkter og de abiotiske variablene framstilles som vektorer (en matematisk størrelse som bestemmes av lengde og retning). Vektorene peker i den retningen den tilhørende abiotiske variabelen endrer seg raskest, mens vektorlengden er proporsjonal med graden av korrelasjon mellom ordinerer og den abiotiske variabelen (Oksanen 2013).

Kommandoen *capscale* (vegan) ble benyttet i R med dissimilaritetsmatrisen og variablene brønnnavstand, sedimentdybde og pH som input. Visualisering av plottet ble gjort med funksjonen *ordiplot* (vegan). Deretter ble funksjonen *varpart* (vegan) brukt for å finne ut hvor mange prosent av den samlede variasjonen som kunne forklares med hver av de tre abiotiske variablene.

Funksjonen *anova* (stats) testet for signifikansen av bidragene fra vektorene ved en permutasjonstest. Radene i D-matrisen ble permutert og deretter ble det gjort en ny dbRD-analyse med det «nye» datasettet. Dersom mer enn 95% av de permuterte datasettene gav redusert bidrag til forklart variasjon fra den aktuelle abiotiske faktoren tilsa dette at bidraget fra denne ikke skyldtes tilfeldigheter. I min signifikanstest valgte jeg å kjøre 1999 permutasjoner.

2.8.4 Bakteriesammensetning i oksisk og anoksisk sediment

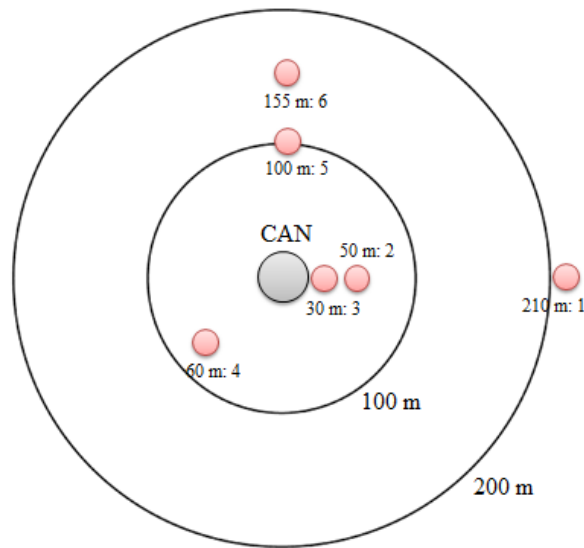
Bakteriesammensetningen og artsrikdom i oksisk og anoksisk sediment ble sammenliknet i den grad oksygendataene tillot. Sedimentsjikt med oksygenkonsentrasjoner lavere enn 10 μM (målt i midten av sjiktet) ble klassifisert som anoksiske mens de med $\geq 70 \mu\text{M}$ midt i sjiktet ble definert som oksiske. Seks sedimentprøver ble klassifisert som å komme fra oksisk miljø, mot 12 fra anoksiske (der hvor 2-5 cm-sjiktet var karakterisert som anoksisk gikk jeg ut ifra at dette gjaldt for 5-10 cm-sjiktet også, selv om det ikke forelå noen måling). Artsrikdom (antall OTU-er) ble talt for den oksiske og anoksiske gruppen. Gjennomsnittlig prosentvis forekomst av bakterierekker (proteobakterier ble inndelt i klasser) for prøvene i de to kategoriene ble regnet ut på grunnlag av OTU-tabellen og sammenliknet kvantitativt ved å se på differansene i forekomst.

I tillegg ble en dbRD-analyse utført for en undermengde av OTU-dataene og alle de fire abiotiske variablene. Analysen ble utført på samme måte som beskrevet over i underkapittel 2.8.3.

3 Resultater

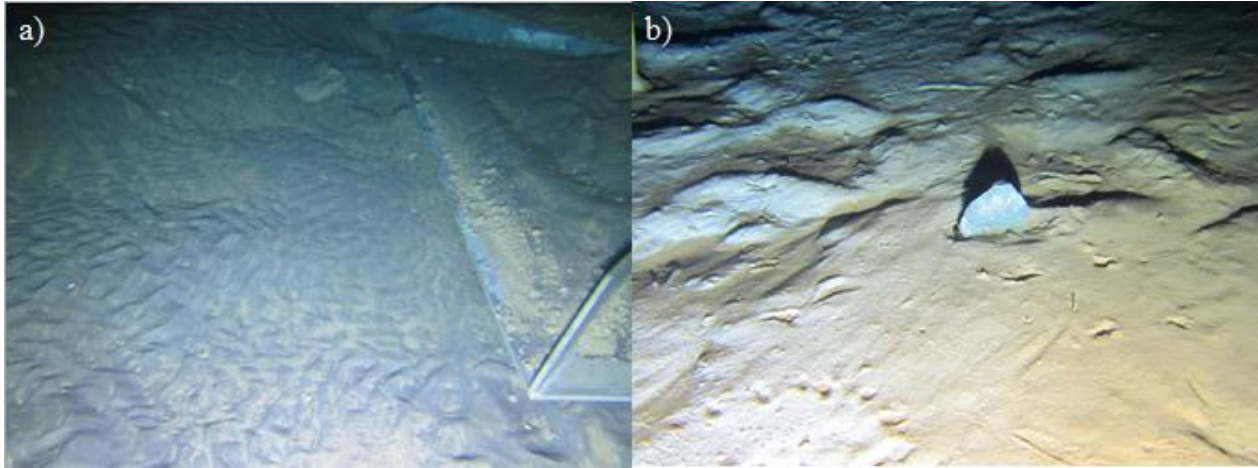
3.1 Innhenting av prøvemateriale

Prøvetakingen ble gjort 1. og 2. desember 2013 fra ankringsfartøyet M/S «Njord Viking» ved hjelp av ROV (Remotely Operated Vehicle). Henting av kjerneprøvene fra havbunnen ble kombinert med en visuell undersøkelse av denne i regi av Akvaplan-niva. Det ble hentet opp kjerneprøver fra seks stasjoner (figur 3.1). Fra stasjonene 1-3 ble kjerneprøvene hentet opp i paralleller, mens fra stasjonene 4-6 ble det kun tatt opp enkeltprøver. Kjerneprøvene fra stasjonene 1-3 ble brukt i denne oppgaven til analysering av bakteriesammensetning.



Figur 3.1 - Stasjonene hvor det ble hentet opp kjerneprøver i paralleller eller som enkeltprøver. CAN = letebrønnen. Meter fra brønn: Stasjonsnummer.
Kilde: iSURVEY AS

I denne oppgaven ble det fokusert på de seks kjerneprøvene hentet opp fra tre stasjoner plassert i et transekt 210 meter (rørene 1.1 og 1.2), 50 meter (rørene 2.1 og 2.2) og 30 meter (rørene 3.1 og 3.2) fra brønnen. De to kjerneprøvene som ble hentet opp 210 meter fra brønnen ble behandlet som kontrollprøver etter samråd med Akvaplan-niva og ROV-inspeksjonen av havbunnen. På de to stasjonene nærmest brønnen kunne man se et lag av boreslam på toppen av havbunnen, altså ble disse prøvene behandlet som påvirkede. Her var det i utgangspunktet meningen av de mest påvirkede stasjonene skulle tas nærmere brønnen, men på 10 m avstand var havbunnen så porøs at det ikke lot seg gjøre å stabilisere sediment/boreslam i prøvetakingssylinderen til denne var på plass i røret med bunnpropp. De visuelle undersøkelsene ble dokumentert ved filmopptak og stillbilder. Figur 3.2 a) og b) viser sedimentoverflaten henholdsvis 0 m og 30 m fra brønnen. Kruksningsmønsteret i overflaten er typisk for boreslamdeponeringer.



Figur 3.2 – Lokaliteten. Bilde a) viser sedimentoverflaten like ved brønn, bilde b) viser sedimentoverflaten ved stasjon 3 (30 m fra brønn). Bilder: Tatt på oppdrag fra Eni Norge AS av Sabine Cochrane (Akvaplan-niva)/ROV-operatører (Oceaneering)

De seks kjerneprøvene ble fraktet med ROV-en til skipet og tatt hånd om på dekk der. Hver prøvesylinder ble frigjort fra rør og bunnpropp og deretter plassert på anordningen som ble brukt til å sveive sedimentkolonnen ut av sylindere. Vi hadde noen problemer med å beholde sedimentkolonnene helt intakte. Rør 1.2 fikk litt resting under fjerning av bunnproppen i tillegg til at noe av sedimentkolonnen hadde rent ut av prøvesylindere før man fikk proppet bunnen igjen. Det siste var imidlertid ikke noe stort problem da vi kun tok vare på de øverste 10 cm av sedimentkolonnen. Rør 3.1 fikk litt røff behandling slik at øverste del av sedimentkolonnen ble presset opp i lokket. Mye av det øverste laget var dermed borte. Likevel kunne man se boreslammet tydelig (jamfør figur 3.3 b), som en leirete masse med mye lysere farge enn havbunnssedimentet. Prøven fra det øverste 1 cm-sjiktet ble for denne prøven begrenset til sedimentrestene sentralt i søyla. Det øverste laget på kjerneprøvene fra stasjon 2 bestod av omtrent 1 mm boreslam. Dette kommer fram mot det gråbrune sedimentet på samme figur, boreslammet er lysere og mer oransje på farge. De øverste lagene i rør 3.2 var uforstyrrede og øverst så man et 2 mm tykt lag med boreslam. I dette røret var slammet mer flytende og jevnt fordelt enn de øvrige rørene med slam. Figur 3.3 d) viser også bilde av overflaten i rør 6 for sammenliknings skyld. Her ser man ingen rester av finpartikulært boreslam, kun det mye grovere havbunnssedimentet.



Figur 3.3 – Overflaten til noen av sedimentprøvene. Bilde a) viser rør 2.2, bilde b) rør 3.1, bilde c) rør 3.2 og bilde d) viser rør 6 (ikke en del av transektet men ble inkludert her for å vise hvordan kontrollhavbunnen så ut, da bilder fra stasjon 1 mangler). Bilder: Ida Øverleir

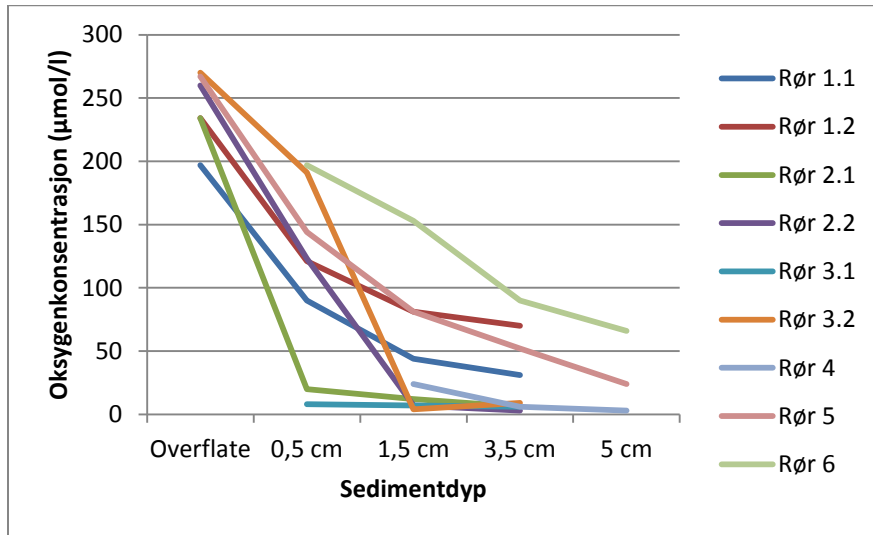
3.2 Målinger av abiotiske faktorer

3.2.1 Oksygenkonsentrasjon

Oksygenkonsentrasjonen ($\mu\text{mol/l}$) ble målt for hver kjerneprøve om bord på M/S «Njord Viking». For å få et bredere bilde av redoks-forholdene i sedimentet omkring borebrønnen har jeg inkludert samtlige prøvestasjoner, det vil si også de tre som ikke inngår i mine mikrobiologiske undersøkelser. Det ble ført en mikrosensor ned i sedimentsjiktene til forhåndsbestemte dybder som svarte til midtre dybde av de tre øverste sjiktene som ble tatt ut (0,5, 1,5 og 3,5 cm). I tillegg ble O_2 -nivået målt ved sedimentoverflaten for rørene 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.2 og 4.0. Måling ble dessuten gjort 5 cm ned i sedimentet for rørene 4, 5 og 6. En logger koblet til PC loggførte signalene på sekundbasis. I enkelte prøver varierte O_2 -nivåene betydelig når sensoren ble forflyttet horisontalt ved samme sedimentdybde. Verdiene som er angitt i figur 3.4 er da estimerte middelnivåer ut fra loggerdataene.

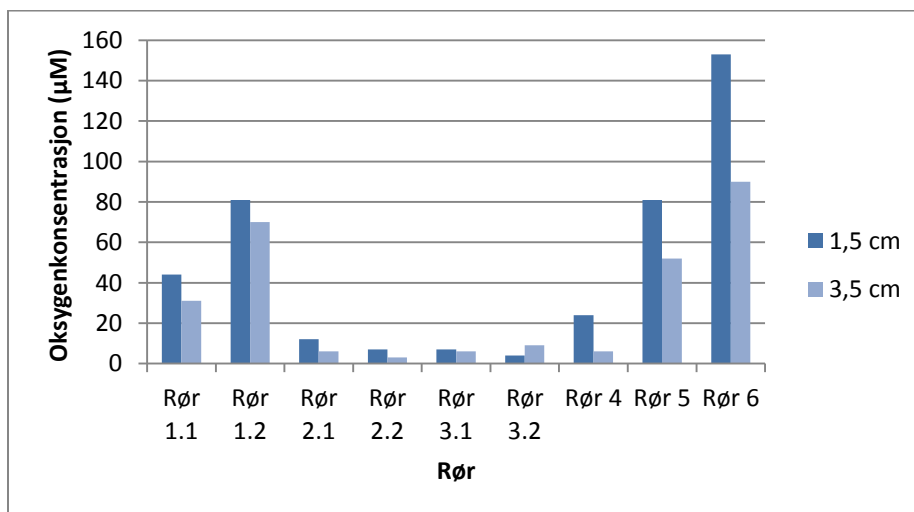
Overflatemålingene varierte fra 197 til 270 μM , mens det 0,5 cm lenger ned i sedimentkolonnen var en langt større variasjon, det vil si i området 8 – 197 μM (her mangler måledata for rør 4).

Oksygenkonsentrasjonen ved 1,5 og 3,5 cm ble målt for samtlige ni rør. Disse viste stor variasjon, det vil si 4 – 153 μM ved 1,5 cm og 3 – 90 μM ved 3,5 cm (figur 3.4).



Figur 3.4 - Oksygenkonsentrasjon ($\mu\text{mol/l}$) målt nedover i sedimentlagene. Her er samtlige målepunkter i de ni kjerneprøvene inkludert, fordelt på seks stasjoner

Figur 3.5 viser forskjellen mellom stasjonene med hensyn til hvor raskt oksygenivået sank nedover i sedimentkolonnen. Mens oksygenkonsentrasjon ved sedimentdybder på 1,5 og 3,5 cm var sunket til anoksisk nivå ($< 10 \mu\text{M}$) i samtlige rør fra stasjonene 2 og 3 (ved 3,5 cm også fra stasjon 4), var nivåene vesentlig høyere ved stasjonene 1, 5 og 6.



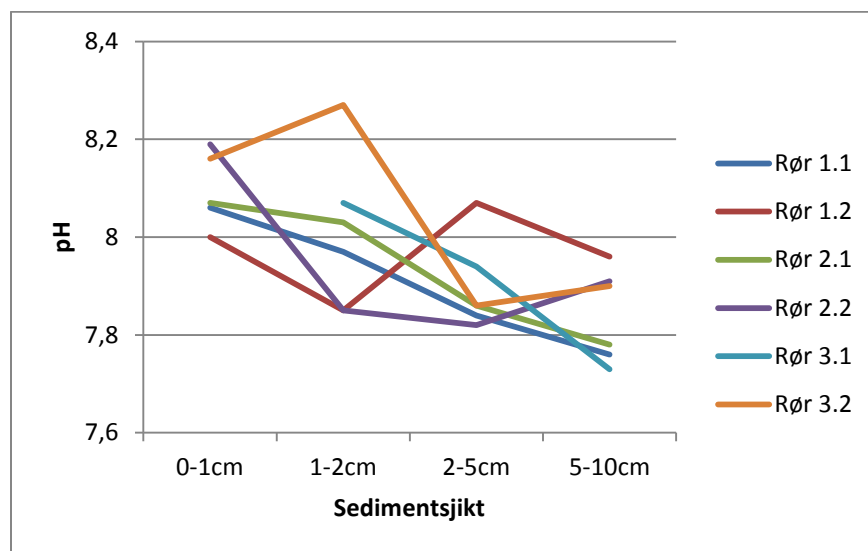
Figur 3.5 - Oksygenkonsentrasjon 1,5 og 3,5 cm ned i sedimentkolonnene

3.2.2 Temperatur

Temperaturen i arbeidsområdene og rørene logget om bord under opparbeidingen av prøvene. Ikke-opparbeidede rør ble oppbevart i samme område og arbeidet tok opptil 4,5 time, så rørtemperaturene jevnet seg ut med romtemperaturen etter hvert. Siden det ble arbeidet på delvis åpent dekk, var romtemperaturen vesentlig høyere på dag 2 (5 – 8 °C) enn dag 1 (0 – 1 °C) på grunn av værromslag.

3.2.3 pH

pH ble målt i tinte sedimentprøver ved Norges Fiskerihøgskole omtrent 4 måneder etter prøvetakingen. Sedimentet ble suspendert i MilliQ-vann (1:1 w/w) før målingen. Figur 3.6 viser at pH sank med ca. 0,3 enheter fra det øverste til det nederste sjiktet i de fleste prøverørene. Unntaket var rør 1.2, som ikke viste noen nedadgående trend.

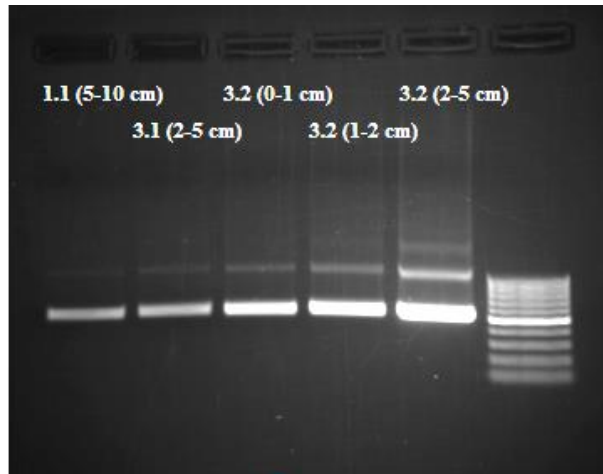


Figur 3.6 - pH målt i tinte sedimentprøver

3.3 Generering av 16S rDNA-sekvenser

Utgangspunktet for DNA-ekstraksjonen fra hver av de 24 sedimentprøvene (3 stasjoner x 2 paralleller x 4 sjikt) var ~ 1 g sediment. Den ekstraksjonsmetoden som gav tilfredsstillende resultater i form av synlig PCR-produkt på elektroforese-gel ble utviklet etter noe prøving og feiling. Den endelige prosedyren fulgte i hovedtrekk protokollen til det benyttede PowerSoil®-kitet, men denne ble supplert med et homogeniseringstrinn. Da dette ble innført lyktes det å isolere DNA i tilfredsstillende mengder fra samtlige 24 sedimentprøver.

PCR-reaksjonene for amplifisering av V3-V4-området på 16S rRNA-genet fra de 24 DNA-ekstraktene ble kjørt i tre paralleller. For størstedelen av disse var det nødvendig å kutte båndet med korrekt størrelse (~ 500 basepar) ut av agarose-gelen for å bli kvitt forurensingen fra andre oftest større DNA-fragmenter. Figur 3.7 viser band både med og uten forurensing.



Figur 3.7 – Gelbilde av fem PCR-produkter med varierende grad av forurensing. Negativt kontroll vises ikke på bildet. Til høyre vises GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

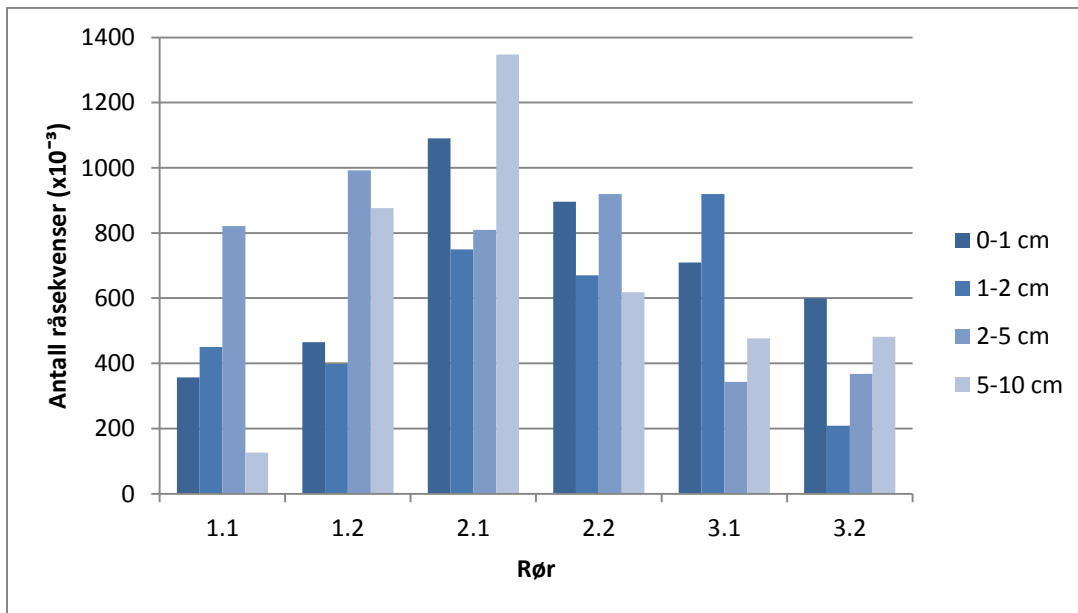
Før videre opparbeiding for sekvensering ble PCR-produktene kvantifisert med et Qubit®-fluorometer. Av tabell 3.1 ser man at konsentrasjonen av DNA varierte veldig, fra 1,9 ng/μl til 28,2 ng/μl. For prøvene hvor [DNA] < 5 ng/μl ble det tilsatt dobbel mengde (10 μl) ved den etterfølgende indeks-PCR-reaksjonen.

Tabell 3.1 - Konsentrasjon av DNA (ng/μl) i de rensede triplikatt-PCR-produktene

Prøve-ID	Sedimentsjikt			
	0-1 cm	1-2 cm	2-5 cm	5-10 cm
Rør 1.1	4,7	4,4	1,9	5,5
Rør 1.2	3	5	3,5	4,5
Rør 2.1	17	17,3	13	11,5
Rør 2.2	3,9	16,3	26,8	4,2
Rør 3.1	8	28,2	23,8	2,3
Rør 3.2	19,9	16,5	8,3	1,3

3.4 Sekvensering

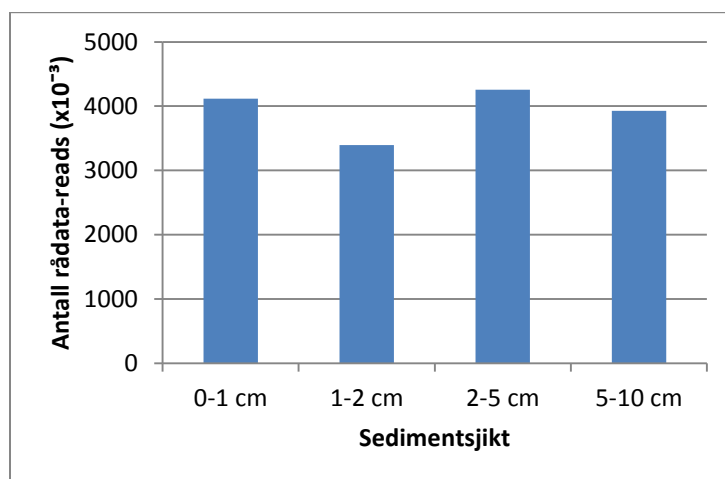
Den 68 timers lange «paired end»-sekvenseringen med MiSeq-sekvenseringsplattform genererte 24 x 2 sekvensfiler. Det totale antallet genererte sekvenspar (forward og reverse read) var 15 696 622. Gjennomsnittet for hver prøve var på 654 026 sekvenser, men her viste dataene stor variasjon (standardavvik ± 298 566). Sekvensmengden varierte fra 126 729 til 1 347 782 sekvenser (figur 3.8). Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom mengden DNA (ng/μl) i de rensede PCR-produktene og utbyttet av sekvenseringen i form av antall råsekvenser. En plotting av disse variablene mot hverandre gav en korrelasjonskoeffisient på bare 0,05.



Figur 3.8 - Antall råsekvenser ($\times 10^{-3}$) generert fra 16S rRNA-gensekvenser amplifisert fra sedimentprøvene. Det vil si at antallet man kan lese av på grafen gjelder for både forward- og reverse-filen (ikke summert) for hver prøve

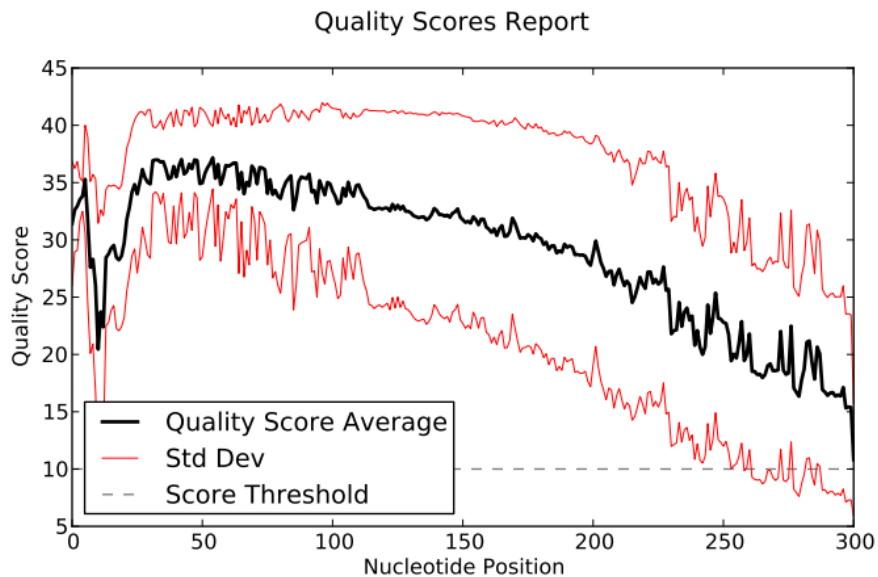
Det store flertall av råsekvensene hadde en read-lengde på 300 basepar, som er den størrelsen denne versjonen av MiSeq-sekvenseringskit-et forespeilte.

Antall råsekvenser fordelt på de fire sedimentsjiktene er vist i figur 3.9. Figuren viser at selv om antallet varierte stort fra prøve til prøve, var det stabilt mellom de forskjellige sjiktene i det samlede sekvensmaterialet.



Figur 3.9 - Mengden råsekvenser for de enkelte sedimentsjiktene, sammenlagt for alle de seks prøvene

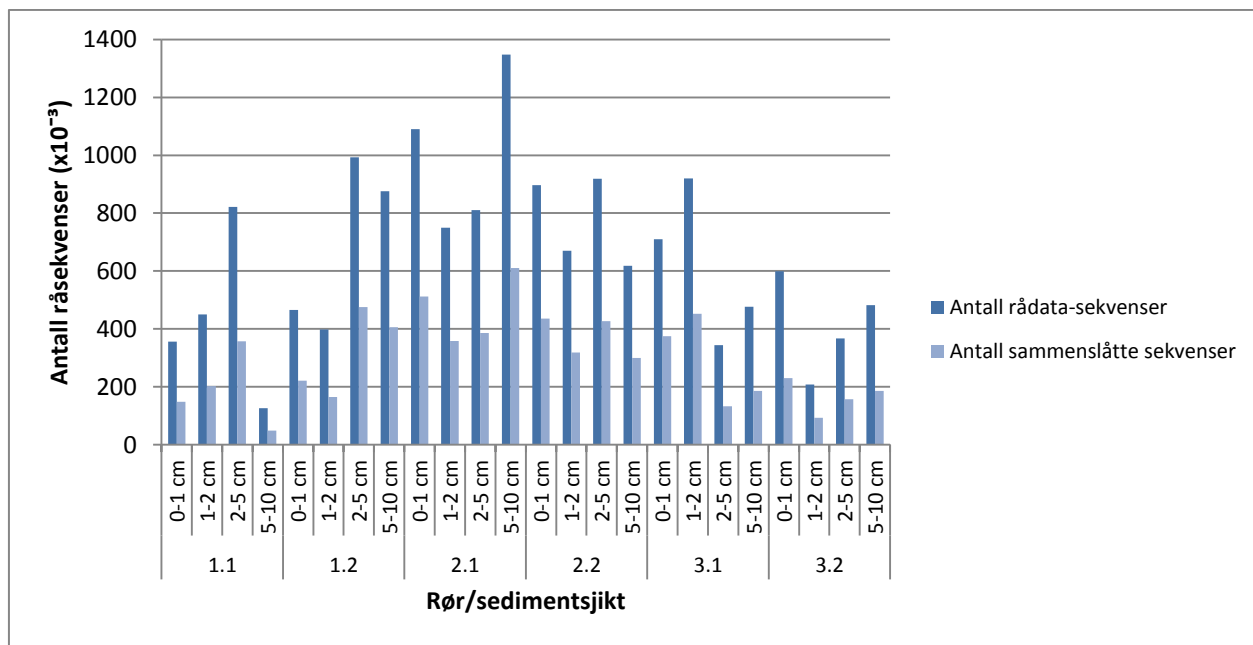
Kvaliteten på read-ene ble oppsummert i et kvalitetsscore-plott (figur 3.10) som viser nukleotidposisjon og gjennomsnittlig Q-verdi (se underkapittel 2.6.2) med standardavvik. En typisk utvikling av Q-verdien gjennom sekvensen er illustrert i figur 3.10 med plottet av gjennomsnittsverdier av 356 732 reads for prøve 1.1 (0-1 cm). Figur 3.10 viser at Q-verdien faller markant mellom nukleotidposisjon 0 og 25, før den øker og stabiliserer seg på $Q = 35$. Denne Q-verdien tilsvarer en sannsynlighet på 0,00032 for at basen er plassert feil, altså en relativt lav sannsynlighet. Etter den 150. nukleotidposisjonen ser Q-verdien ut til å falle jevnt til den når ~ 15 rundt den 50. siste nukleotidposisjonen.



Figur 3.10 – Gjennomsnittlig Q-verdi for hver nukleotidposisjon i forward read av prøve 1.1 (0-1 cm)

3.5 Sekvensbehandling

For å slå sammen forward- og reverse-sekvensene ble scriptet *fastq-join* i programpakken QIIME benyttet. Maksimum tillatt mismatch i overlappende del ble satt til 10% og minimum overlappende sekvenslengde til å være 6 baser (sistnevnte ved et forhåndsvalg i scriptet). I gjennomsnitt lot $44,8 \pm 4,1\%$ av sekvensene seg slå sammen (figur 3.11) og gjennomsnittslengden på overlapp mellom forward- og reverse-sekvenser var $145,1 \pm 1,8$ baser. Gjennomsnittslengden på de sammenslåtte sekvensene var $454,9 \pm 3,2$ baser (inkludert de 16S rRNA-genspesifikke primer-områdene).



Figur 3.11 - Antallet råsekvenser før sammenslåing og etter. Det vil si at antallet man kan lese av på grafen gjelder for både forward- og reverse-filen (ikke summert) for hver prøve

Sekvensene ble kvalitetsfiltrerte ved hjelp av `-fastq_filter`-argumentet `-fastq_maxee 0,5`, slik at sekvenser hvor sannsynligheten for minst én feil var større enn 50% ble forkastet. De forkastede sekvensene ut fra dette kriteriet utgjorde 49,6%. Etter kvalitetsfiltreringen ble sekvensene slått sammen i en pool for å forenkle videre analysetrinn. Sammenslåingen av alle de 24 kvalitetsfiltrerte sekvensfilene resulterte i en fil med 3 624 530 sekvenser. Primere ble fjernet og dermed var sekvensene redusert til en gjennomsnittslengde på 416,3 baser.

Flere av prøvene viste seg å ha kontaminering fra *Enterobacteriaceae*-DNA. Dette gjaldt i størst grad for prøvene 1.2 (2-5 cm), 2.2 (2-5 cm), 3.1 (5-10 cm) og 3.2 (1-2 cm), hvor kontamineringssekvensene tilsvarte så mye som 13 – 33% av totalt antall sekvenser. For resten av prøvene utgjorde kontamineringen 0 til 2% av sekvensene. Det viste seg å være én OTU som gjorde det desidert største utslaget, med nesten 87 000 sekvenser. BLAST-søk av konsensus-sekvensen viste at den hadde 100% sekvenslikhet med *Escherichia coli*. Dette bidro til at vi gikk ut ifra at disse sekvensene skyldtes kontaminering av DNA-prøvene, da forekomsten fremsto som helt tilfeldig blant stasjoner og sedimentdybde, og at *E. coli* er en mesofil bakterie hvis naturlige habitat er tarmene hos varmblodige dyr.

I tillegg inneholdt sekvensdataene Archaea-DNA (534 OTU-er), kloroplast-DNA (67 OTU-er) og OTU-er uten tildelt taksonomi («Unassigned», 14 348 OTU-er). Disse OTU-ene ble da filtrert ut av OTU-tabellen ved hjelp av scriptet `filter_otus_from_otu_table.py`. Et avsluttende søk gav etter dette 0 treff for «entero», «chloroplast», «archaea» og «unassigned».

3.6 Alfadiversitet

Hvilke arter som var å finne i prøvene og i hvor store andeler de utgjorde (alfadiversiteten) ble undersøkt for å kartlegge bakteriesammensetningen i subarktisk sediment. Sekvensene i den sammenslåtte sekvenspoolen (2 814 669 sekvenser) fordelte seg på 22 861 clustere (OTU-er) ut ifra $\geq 97\%$ sekvenslikhet. For hver OTU ble det komponert en konsensus-sekvens. Dette ble gjort ved at alle sekvensene i den enkelte OTU-en ble sammenliknet og den basen som var vanligst i hver posisjon ble valgt. Tildeling av taksonomi til hver konsensus-sekvens ble så gjort ved hjelp av python-scriptet `-assign_taxonomy.py` i QIIME og med Greengenes Public Database (<http://greengenes.lbl.gov>).

Det ble satt opp en tabell (3.2) med gjennomsnittlig forekomst av bakterierekkene hvor *Proteobacteria* ble inndelt klassevis. Rekker hvor gjennomsnittlig forekomst var mindre enn 0,1% ble oppsummert under «Andre». Den fullstendige tabellen over forekomsten av ulike bakterierekker (ikke vist her) viste at det i alt ble funnet 24 ulike offisielt godkjente taksa i tillegg til 41 ikke-dyrkede fylogenetiske grupper.

Proteobacteria var rekken med desidert høyest forekomst i sedimentprøvene, med i gjennomsnitt 57,1% av sekvensene ($\geq 97\%$ sekvenslikhet). Gammaproteobakterier, alfavproteobakterier og deltaproteobakterier var representerte i 14,7 – 24,5% av sekvensene. Etter *Proteobacteria* var *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* og *Planctomycetes* rekkene med størst gjennomsnittlig forekomst. Disse varierte fra 5,2 til 6,5% av sekvensene. Flere av rekkene i tabell 3.2 er kun navngitt ved forkortelser eller som kandidat og er da ikke offisielt godkjente som rekker. Dersom singletons ikke ble talt med, fikk man samme fordelingen som i tabell 3.2, med unntak av at andelen *Alphaproteobacteria* steg til 15,6%.

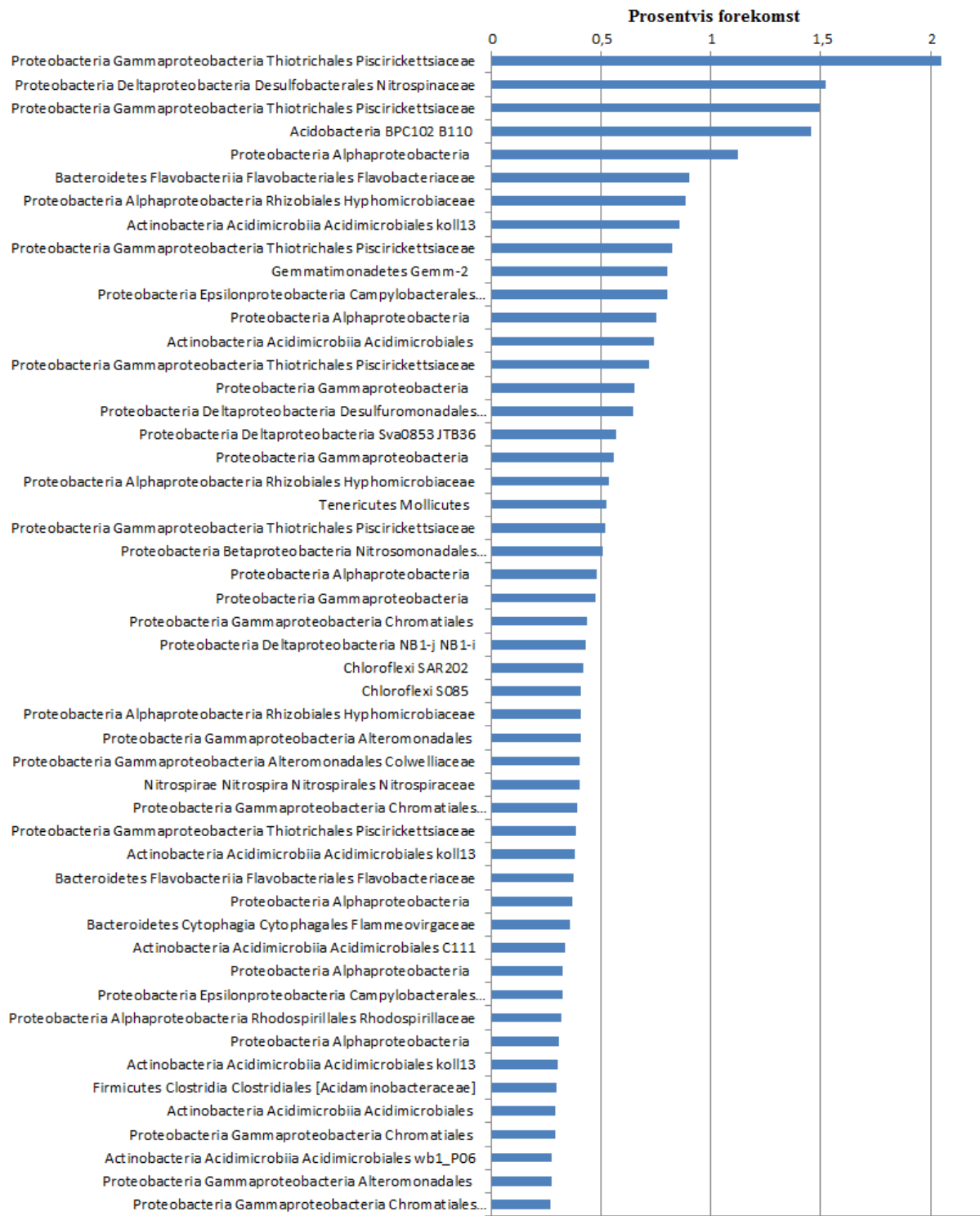
En rank-abundance-kurve viser fordelingsprofilen for de 50 fylogenetiske gruppene med størst gjennomsnittlig forekomst (figur 3.12). OTU-ene er rangert nedover langs y-aksen etter synkende andel av sekvensene i prosent. I den totale rank-abundance-kurven med samtlige 22 861 OTU-er utgjorde singletons, det vil si OTU-er representert med kun én sekvens, 5110 (22,4%) av mine gjenværende OTU-er etter alle filtreringstrinn.

Tabell 3.2 - Oversikt over rekkene med > 0,1% gjennomsnittlig forekomst.

Proteobacteria er delt inn klassevis og

Rekkene med mindre forekomst inkluderes under «Andre»

Taksa	Gjennomsnitt i prosent
<i>Gammaproteobacteria</i>	24,5
<i>Alphaproteobacteria</i>	15,5
<i>Deltaproteobacteria</i>	14,8
<i>Chloroflexi</i>	6,5
<i>Bacteroidetes</i>	6,5
<i>Acidobacteria</i>	6,5
<i>Actinobacteria</i>	6,1
<i>Planctomycetes</i>	5,2
<i>Gemmatimonadetes</i>	2,7
<i>Verrucomicrobia</i>	1,5
<i>Epsilonproteobacteria</i>	1,5
<i>Tenericutes</i>	0,8
<i>Nitrospirae</i>	0,8
<i>Betaproteobacteria</i>	0,8
SBR1093	0,7
<i>Firmicutes</i>	0,6
OD1	0,6
WS3	0,6
GN02	0,3
NKB19	0,3
NC10	0,3
TM6	0,3
<i>Chlorobi</i>	0,3
<i>Chlamydiae</i>	0,2
<i>Elusimicrobia</i>	0,2
OP3	0,2
<i>Caldithrix</i>	0,2
OP8	0,2
GN04	0,2
<i>Spirochaetes</i>	0,1
OP9	0,1
<i>Lentisphaerae</i>	0,1
BRC1	0,1
Kandidat <i>Caldithrix</i>	0,1
Andre	0,5



Figur 3.12 - Rank-abundance-kurve for de 50 OTU-ene med størst gjennomsnittlig forekomst

3.7 Betadiversitet

3.7.1 Bray-Curtis-dissimilaritetsmatrise

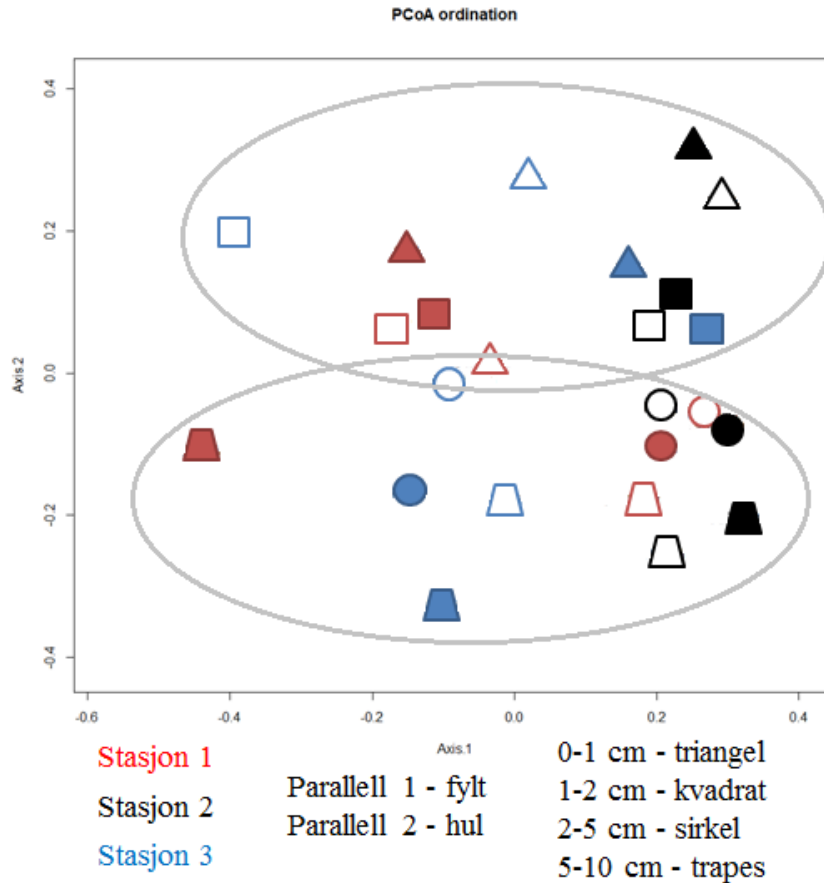
Med utgangspunkt i OTU-tabellen ble en Bray-Curtis-D-matrise ble komponert i R (vegan). Denne hadde 0 langs diagonalen, men ellers verdier som varierte fra 0,21 til 0,92 mellom prøver. Den minste dissimilariteten ble regnet ut for to parallelle prøver: 1-2 cm-sjiktene for stasjon 2, mens den største forskjellen var mellom prøvene 1.1 (5-10 cm) og 2.1 (0-1 cm). Gjennomsnittsverdien for alle dissimilaritetene var $0,56 \pm 0,16$.

3.7.2 Principal Coordinate Analysis

Ordineringsmetoden PCoA bruker egenvektorer for å finne de prinsipale aksene som fanger opp variasjonen i n-dimensjonalt rom best. De to egenvektorene med de største egenverdiene ble da valgt ut som akser i et nytt koordinatsystem og alle posisjonene til prøvene i det mangedimensjonale rommet ble projisert ned på dette nye 2-dimensjonale rommet. Dette nye koordinatsystemet (figur 3.13) angir retningen hvor variasjonen er størst langs førsteaksen, andreaksen angir retningen med nest størst variasjon og så videre.

Langs retningen av førsteaksen fordelte prøvene fra stasjon 1 og 3 seg over hele variasjonsområdet og viste ingen klar separasjon seg imellom, mens stasjon 2-prøvene grupperte seg innen et snevert variasjonsområde fra $\sim 0,2$ til $\sim 0,4$. Langs retningen av andreaksen var det en tydelig variasjon som samsvarte med sjiktinndelingen av kjerneprøvene. Toppsjiktene (0-1 og 1-2 cm) var å finne i det positive området av andreaksen, mens bunnsjiktene (2-5 og 5-10 cm) var å finne i det negative området av andreaksen (se inndelinger i figur 3.13).

Funksjonen *cmdscale* returnerte en goodness-of-fit-verdi på 0,47. Dette svarer til at 47% av variansen i dataene gjøres rede for i dette todimensjonale ordineringsplottet.

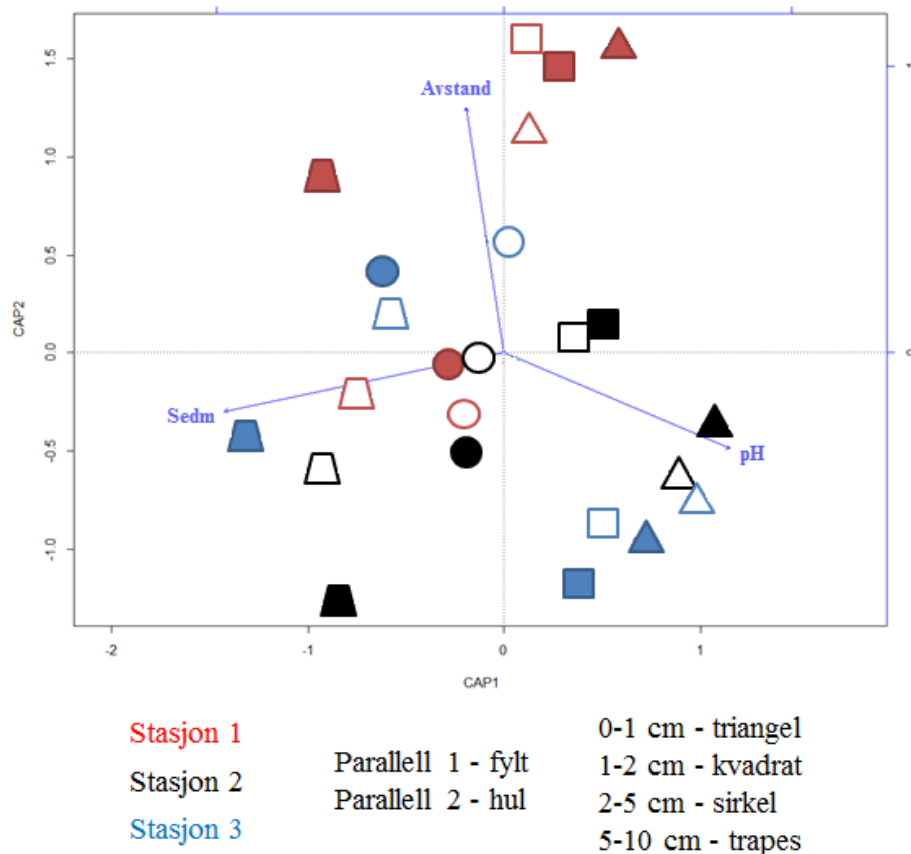


Figur 3.13 – Principal Coordinate Analysis basert på Bray-Curtis-D-matrisen. Sirklene er tegnet inn manuelt i etterkant

3.7.3 Distance-Based Redundancy Analysis

Distance-Based Redundancy Analysis (dbRDA) er en tvungen ordineringsmetode som tok utgangspunkt i Bray-Curtis-matrisen og de abiotiske variablene som ble målt. Metoden beregner hvor mye variasjonen de abiotiske faktorene kan gjøre rede for av variasjonen i OTU-dataene. Figur 3.14 viser dbRDA-ordineringsen av de 24 prøvene med hensyn på tre av forklaringsvariablene: brønnnavstand, sedimentdybde og pH. Disse er representert som tre vektorer.

Funksjonen *varpart* (vegan) i R beregnet hvor mye variasjon hver av vektorene gjorde rede for. For denne modellen svarte brønnnavstand for 5,3%, sedimentdybde for 10,5% og pH for 9,3%. Ved hjelp av *anova*-funksjonen ble det undersøkt for hvilke av disse abiotiske faktorene resultatet var signifikant. 1999 permutasjoner ble gjort og for de forskjellige faktorene var p-verdiene 0,037 (Avstand), 0,002 (Sedm) og 0,095 (pH). Med et signifikansnivå på 0,05 var det da brønnnavstand og sedimentdybde som gav signifikante bidrag til variasjonen i OTU-dataene.



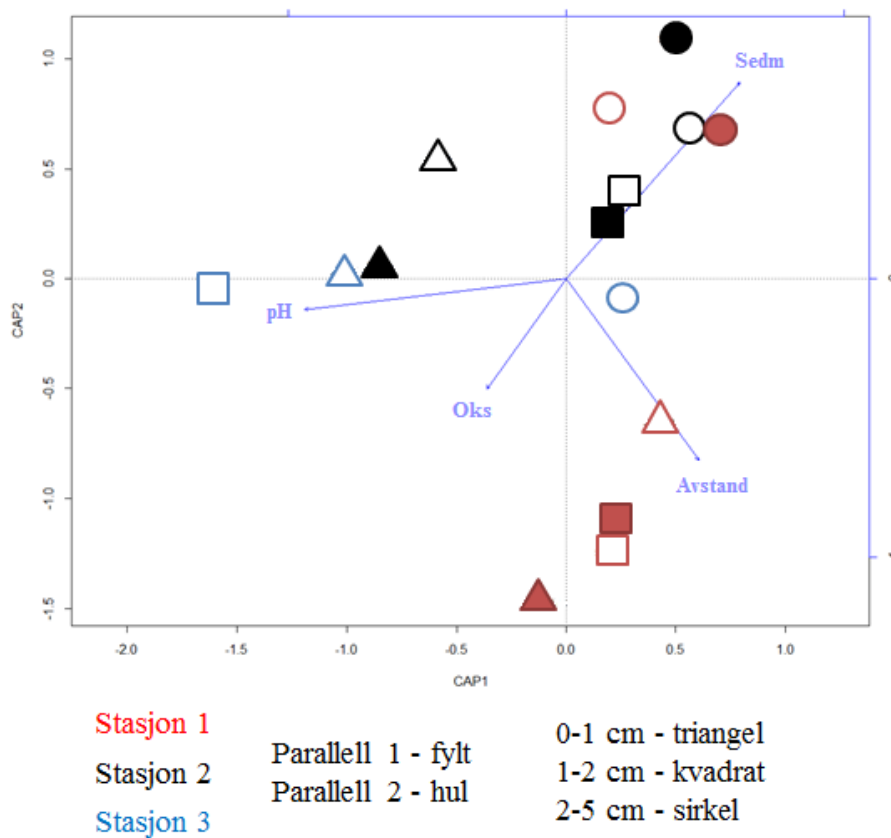
Figur 3.14 – Distance-Based Redundancy Analysis basert på Bray-Curtis-dissimilaritetsmatrisen

3.7.4 Bakteriesammensetningen i oksisk og anoksisk sediment

Gjennomsnittlig forekomst av bakterierekker ble sammenliknet for sediment som ble definert som oksisk (oksygenkonsentrasjon $\geq 70 \mu\text{M}$) og anoksisk ($< 10 \mu\text{M}$). Dette gjaldt henholdsvis seks og 12 prøver. OTU-rikdommen for oksisk sediment var 16 587 OTU-er mens den for anoksisk sediment var 12 838. Da totalt antall OTU-er var 22 861 var det stor grad av overlapp mellom oksisk og anoksisk sediment.

Andelen bakterierekker (proteobakterier ble inndelt klassevis) ble sammenliknet for disse to grupperingene ved å se på absoluttdifferansen i gjennomsnittlig forekomst for begge gruppene. Absoluttverdien av differansene varierte fra omtrent 0 til 0,9%, hvor den største forskjellen gjaldt forekomsten av epsilonproteobakterier. Gjennomsnittlig forekomst av denne bakterierekken var 1,4 og 2,3% for henholdsvis oksisk og anoksisk. Andre taksa hvor absoluttdifferansen var *relativt* høy, det vil si i området 0,6 – 0,9%, var *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, aktinobakterier, *Tenericutes* og gammaproteobakterier. Kun for de to sistnevnte var forekomsten høyere i anoksisk sediment enn i oksisk.

Da undersøkelsene ovenfor ikke baserte seg på noen statistisk metode ble dbRD-analyse også utført med oksygenkonsentrasjonen som en av de abiotiske variablene. Dette var for å undersøke i hvilken grad variasjonen i oksygendataene bidro til variasjonen i bakteriesammensetning. Denne analysen måtte gjøres på et litt tynnere grunnlag enn den forrige siden oksygendata manglet for 5-10 cm-sjiktene. I tillegg var det gjort så få målinger for første parallellen fra stasjon 2 at denne ikke ble inkludert i det hele tatt. Analysen resulterte i et dbRDA-plott (figur 3.15). Vektorene for sedimentdybde og oksygenkonsentrasjon peker i motsatt retning av hverandre, noe som indikerer at de to variablene er omvendt korrelerte. Funksjonen *varpart* i R viste at oksygenvariabelen svarte for 5,7% av variasjonen i dataene, men dette var overhodet ikke et statistisk signifikant bidrag (funksjonen *anova* gav en p-verdi på 0,54).



Figur 3.15 – Distance-Based Redundancy Analysis basert på Bray-Curtis-D-verdier og alle de målte abiotiske faktorene

4 Diskusjon

4.1 Prøvestasjoner og -materiale

Som lokalitet for prøvetakingen ble en letebrønn i Brønnlokaliteten på Eggaskråningen valgt ut. Hovedgrunnen til dette var at Akvaplan-niva hadde gjort miljøundersøkelser av havbunnen rundt brønnen før Eni Norge startet prøveboringen. Vår prøvetaking ble derfor gjort i forbindelse med en oppfølgingsundersøkelse på samme sted. Letebrønnen befinner seg på omtrent 1400 meters dyp (Oljedirektoratet 2012). Den viste seg å være tørr og Eni Norge besluttet å avslutte boringen i oktober 2013 (Oljedirektoratet 2013). 1258 m³ av avfallet som boringen av den ~ 3400 m dype brønnen hadde generert, ble deponert direkte på havbunnen (Cochrane m. fl., 2014).

Et punkt stikker seg frem som negativt når man i ettertid vurderer valget av prøvetakingslokalitet. Det ene er at Eni Norge i årsrapporten for operasjonelle utslipp oppgir at det ikke benyttes verken oljebasert eller syntetisk borevæske (Eni Norge 2012). Dette medfører at vi ikke fikk undersøkt hva deponeringen av boreavfall kunne ført med seg dersom den hadde vært alvorlig i form av større mengder avfall og med oljeholdige bestanddeler. Til gjengjeld gjøres disse undersøkelsene for å kunne si noe om hvordan deponering av boreavfall påvirker havbunnen *i dag*. Etter dagens retningslinjer skal deponering av oljeholdig boreavfall (> 1% oljekomponenter) foregå meget sjeldent.

Prøvematerialet ble hentet opp som to parallelle kjerneprøver for hver av tre stasjoner. Disse tre stasjonene var planlagt lokalisert slik at én stasjon var maksimalt utsatt for deponering, én stasjon var middels utsatt og den siste var én kontrollstasjon der påvirkningen var antatt å være neglisjerbar. I utgangspunktet skulle rørene 3.1 og 3.2 hentes opp like ved brønnen, og man gjorde flere forsøk på å ta kjerneprøver så nært som 10 meter fra denne. Problemet var at prøvetakingsutstyret som ble brukt krevde en viss kompaktet i sedimentet: Plastsylinderen måtte presses ned i havbunnsedimentene, dras opp med kjerneprøven, forflyttes noen meter og føres ned i sitt respektive rør med gummipropp nederst, uten at sedimentsylinderen skulle sige ut. Deponeringen av boreavfall i omtrent 20 meter radius rundt letebrønnen var så markant at det ikke lyktes å få de løse massene til å holde seg i plastsylinderen gjennom disse operasjonene. Forsker Sabine Cochrane ved Akvaplan-niva bekreftet at problemene med å ta kjerneprøver så nær brønner var velkjent fra tidligere undersøkelser. Prøvene fra den antatt mest belastede lokaliteten ble derfor tatt så langt som 30 m fra brønnen. Her var det visuelle topplaget med boreavfall, som skilte seg tydelig fra det naturlige havbunnsedimentet på stedet ikke mer enn ca. 2 mm tykt i kjerneprøvene. For resten av stasjonene var prøvetakingen relativt uproblematisk. Der ble sylinderen presset ned til et leirelag som fungerte som en naturlig propp.

4.2 Abiotiske undersøkelser

Registreringen av abiotiske faktorer omfattet avstanden fra prøvelokalitetene til brønnen, sjiktdybden for de enkelte sedimentprøvene og oksygen- og pH-gradientene nedover i sedimentkolonnene. Temperaturmålinger ble ikke utført *in situ*, men på dekk og reflekterte derfor

mer variasjonen under prøveopparbeidingen der enn forholdene på havbunnen. Disse er dermed ikke lagt stor vekt på i ettertid.

pH-målingene viste seg å variere innenfor et forholdsvis lite område på 0,5 enheter, det vil si mellom pH 7,7 og pH 8,2. Berner (1981) poengterte at pH egner seg dårlig som sedimentkarakteristikk da variasjonsområdet som regel er forholdsvis lite. Forøvrig foreslo han som alternativ å dele inn sediment-miljøer i oksiske og anoksiske og deretter dele inn de anoksiske miljøene avhengig av tilstedeværelsen av oppløst svovel eller ikke. Artikkelforfatteren oppgav i samme artikkel at over 90% av alle pH-målingene han noen gang har foretatt i normalt marint og brakkvann-sediment hadde mellom pH 6,5 og 7,5 (Berner 1981). Disse målingene stemmer dårlig med mine målinger hvor ingen hadde så lave verdier. Grunnen til dette kan være at Berners pH-målinger ble gjort i sediment fra grunnere havdyp. Her vil som regel tilførselen av organisk materiale være større og den oksiske sonen mindre. Videre, når forholdene i sedimentet går over til å bli anoksiske, vil organisk materiale degraderes gjennom flere sekvenser. Først ekstracellulær hydrolytisk degradering av polymerer, deretter fermentering til kortkjedede organiske syrer og H₂ og til slutt oksidasjon til CO₂ og vann (Finke og Jorgensen 2008). Fenchel (1969) fant for øvrig at pH-verdien var på det laveste ved redoks-diskontinuitetslaget.

Oksygenkonsentrasjon ble ikke målt lenger ned enn 3,5 cmuso for noen av transekt-kjerneprøvene. Dette skyldtes at nålen til målesensoren ikke var lang nok. En løsning hadde vært å vente til 2-5 cm-sjiktet var skåret av og tatt hånd om og deretter foretatt målingene, men dette ble ikke prioritert av tidsårsaker.

Grunnen til at vi valgte å måle oksygenkonsentrasjonen var at denne må antas å påvirke hvilke bakterier som dominerer. Mikroorganismer i marint sediment uten lys tilgjengelig er avhengige av redoks- og fermenteringsreaksjoner for å skaffe energi. En redoks-reaksjon kan ikke skje uten tilstedeværelse av både en elektrondonor (en oksiderbar forbindelse) og en elektronmottaker (en reduserbar forbindelse). De vanligste elektrondonorene i dyphavsområder er organisk materiale, hydrogen, metan, reduserte svovelforbindelser, redusert jern og mangan og ammonium. Rangert fra størst til minst reduksjonspotensiale er de vanligste elektronakseptorene oksygen, nitrat, nitritt, manganoksider og jernoksider, oksiderte svovelforbindelser og karbondioksid. Altså har oksygen høyest redoks-potensiale av alle elektronakseptorene (Orcutt m. fl. 2011). Sammenhengen mellom hvor dypt den oksiske sonen strekker seg ned i sedimentet og mengden organisk materiale som er tilgjengelig der er omvendt korrelert. I marint sediment med moderate til store mengder organisk materiale kan den oksiske sonen være så tynn som noen millimeter, mens den på steder hvor organisk materiale er sjelden vare kan strekke seg flere meter ned i sedimentet (nevnt ovenfor) (Orcutt m. fl. 2011).

Det finnes flere eksempler fra litteraturen på at den oksiske sonen varierer i stor grad fra en type lokalitet til en annen. Yücel (2013) målte oksygenkonsentrasjonen i kjerneprøver fra flere typer middelhavssediment ved hjelp av en voltametriske mikroelektrode. På 510 meters havdybde fant han en oksisk sone på 11 mm med ikke-detekterbar oksygenkonsentrasjon lenger ned (< 20 µM).

Liknende resultater hadde Bowman med medarbeidere (2003). De fant en oksisk sone på 4 mm (761 m havdybde i antarktisk sokkelsediment). Durbin og Teske (2011) målte den til å være 60-70 cm i Sør-Stillehavet (5306 m havdybde). Ifølge mine resultater strakk den oksiske sonen i antatt upåvirket sediment ved ca. 1400 m dyp i Eggaskråningen seg mer enn 3,5 cm ned.

Oksygen produseres som kjent i den eufotiske havsonen av fotosyntetiske organismer. Det som ikke utveksles med atmosfæren transporteres til dels ned i dypet (Orcutt m. fl. 2011). I marint sediment vil oksygenet diffundere nedover, men graden av oksygenpenetrering vil blant annet påvirkes av hvor finpartikulært sedimentet er. Et lag med finpartikulært boreavfall på havbunnen kan i utgangspunktet dermed forventes å hemme denne penetreringen. Videre vil mye organisk materiale eller andre reduktanter fremme aerob respirasjon og dermed også hemme oksygenpenetreringen ned i havbunnen (Sundby 2006). Resultatene mine viste en mye raskere nedgang i konsentrasjonen mellom stasjonene 2, 3 og 4 sammenliknet med 1, 5 og 6 (figur 3.5). De tre førstnevnte var stasjonene nærmest brønnen og dermed de som var antatt å ha størst påvirkning fra boreavfallsdeponeringene. Dette var også stasjonene hvor vi så et tydelig lag med boreslam deponert på havbunnen. Målingene 0,5 cmuso varierte stort mellom parallellene både ved stasjon 2 og 3. Dette kan skyldes at boreavfallsdeponeringen ikke var spredd jevnt utover havbunnen, noe som var vanskelig å se under prøvetakingen. Slik «patchiness» kan da være forklaringen, siden parallell-målingene av de nedre sedimentsjiktene ikke varierte i like stor grad.

4.3 Generering av 16S rDNA-sekvenser

4.3.1 DNA-ekstraksjon og sekvensering

Sedimentprøvene ble hentet ut fra kjerneprøvene innen ~ 4,5 time etter prøvetaking. I løpet av den tidsperioden kunne det ha skjedd en selektering av artene i prøvene. Rochelle m. fl. (1994) sammenliknet hvordan ulik håndtering av prøver tatt fra anoksisk marint sediment påvirket bakteriesammensetningen, karakterisert ved 16S rDNA-analyse. Kontroll-handteringsmetoden var nedfrysning innen to timer og ble sammenliknet med lagring i 24 timer før nedfrysning. Sedimentprøvene ble hentet ut fra henholdsvis indre og ytre del av kjerneprøvene. Bare fem av 44 identifiserte sekvenser i kontroll-prøven ble gjenfunnet i 24-timers-sedimentprøvene. Fire av disse fem representerte da obligate aerobe organismer, noe som tydet på at det hadde skjedd en selektering av aerobere under lagringen (Rochelle m. fl. 1994). Siden bakteriesammensetningen i sedimentprøvene skulle sammenliknes var det viktigste at de fikk tilnærmet lik behandling. I utgangspunktet burde derfor tidsforløpet og temperaturforholdene i perioden mellom prøvene ble tatt om bord og fryst ned vært omtrent de samme for alle sedimentrørene. Dette lot seg ikke gjøre siden arbeidet med hver kjerneprøve var tidkrevende og omgivelsestemperaturen varierte stort fra den ene dagen til den andre. Tidsforløp og temperaturforhold kunne vært inkludert i betadiversitetsanalysen, men ble ansett som variabler av mindre viktighet og dermed utelatt fra denne.

Neste trinn i prosessen var å ekstrahere DNA fra sedimentprøvene. For å ekstrahere arvemateriale (deoksynukleinsyrer) fra bakterieceller kreves et (eller flere) lyseringstrinn for å ødelegge

cellemembranen. I denne oppgaven ble det benyttet PowerBeads fra PowerSoil-kitet i kombinasjon med homogenisering og etterfølgende risting med SDS og andre membranbrytende stoffer. Celle-lysning er en kritisk del av DNA-ekstraksjon med sikte på senere PCR-amplifisering. Dersom cellene ikke ødelegges nok eller at kun en spesiell type celler ødelegges gir de etterfølgende analysene et feil bilde av den virkelige bakteriesammensetningen. På den annen side, dersom behandlingen av cellene er for tøff fører dette til at deoksynukleinsyrene fra gram-negative celler (som er enklere å lysere) fragmenteres. Slike fragmenter kan skape problemer under PCR-kjøringen (se nedenfor) (Wintzingerode m. fl. 1997). Forfatterne anbefalte å sammenlikne resultatene fra flere ekstraksjonsmetoder, men dette ble ikke gjort her av tidsårsaker: Det ble kun benyttet én ekstraksjonsmetode.

Polymerase Chain Reaction (PCR) ble kjørt i triplikater for hver av de 24 prøvene. Dette skyldtes at amplifisering av samfunnsprøver gir en viss risiko for dannelse av kimeriske produkter, delesjonsmutanter og punkt-mutanter (Wintzingerode m. fl. 1997). Da slike feilkilder ikke er reproduerbare kan de til en viss grad unngås ved å mikse sammen PCR-produktene fra flere uavhengige kjøring (Kanagawa 2003). En annen feilkilde knyttet til PCR-kjøring er den varierende affiniteten primerne kan ha til forskjellige fylogenetiske grupper (Cai m. fl. 2013). Denne variasjonen vil dog høyst sannsynlig utspille seg på samme måte i alle prøvene og dermed ikke påvirke betadiversiteten i like stor grad som alfadiversiteten. Dette gjelder dersom ekstraksjon og PCR gjøres på en standardisert måte for alle prøvene, noe som var tilfelle i denne oppgaven.

Utbyttet av sekvenseringen var 15,7 millioner sekvenspar. Fadrosch m. fl. (2014) sekvenserte tre amplikon-pools med 300PE MiSeq-protokollen, det vil si den samme som jeg brukte. De fikk et utbytte på gjennomsnittlig 12,5 millioner sekvenser, altså et litt mindre antall enn i denne oppgaven, men i samme størrelsesorden. Sammenliknet med denne studien virker antall råsekvenser plausibelt. Gjennomsnittlig read-lengde for sekvensene mine var ~ 300 basepar. Siden 300PE MiSeq ikke kan generere sekvenser med større read-lengde enn dette indikerer gjennomsnittsverdien at veldig få reads var kortere enn 300 basepar.

Som vist for en prøve i resultatdelen, avtok kvaliteten (Q-score) utover i read-et for de fleste sekvenser og var markert dårligere for de siste 50-100 basene. I publisert litteratur er det diskutert hvorvidt MiSeq egner seg til sekvensering av amplikon-biblioteker. Ifølge Fadrosch m. fl. (2014) har sekvenseringsplattformen større problemer med å sekvensere 16S rRNA-biblioteker med lav sekvensdiversitet enn den har med mer tilfeldige biblioteker, som genomiske eller metagenomiske. Anbefalingene i artikkelen går ut på å tilsette en høyere andel PhiX (opp mot 50%) dersom MiSeq skal brukes til å sekvensere en sekvenspool med lav diversitet. I denne oppgaven ble det tilsatt 5% PhiX, etter Illuminas anbefalinger i «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation». Illumina anbefalte til gjengjeld å tilsette $\geq 25\%$ PhiX dersom det skulle benyttes en eldre versjon av MiSeq Software (MCS v2.2). I denne oppgaven ble det derimot benyttet en oppdatert versjon og antakelsene var at 5% PhiX var nok. På grunnlag av utviklingen av Q-scorene mot slutten av avlesningene, kan det se ut som dette var en feilvurdering.

4.3.2 Sammenslåing av parede reads og kvalitetsfiltrering

Som nevnt tidligere måtte amplikon-ene som var generert med 341F- og 785R-primere sekvenseres fra begge endene for å dekke de to hypervariable områdene V3 og V4 i 16S rRNA-genet. I referanseorganismen *E. coli* er dette amplikonet 444 basepar (ikke medregnet adapter- og indekssekvenser) mens Illumina MiSeq med nåværende teknologi har en maksimal read-lengde på 300 basepar. Sekvenseringen resulterte, som nevnt ovenfor, i reads hvor kvaliteten falt mot slutten av avlesningene, men siden det ble brukt en paired-end-tilnærming vil den delen av read-ene med dårligst kvalitet være den samme som overlappende del idet forward og reverse read slås sammen. På den måten «forsvinner» sekvensdelene hvor sannsynligheten for at basen er feil er relativt stor.

Scriptet *fastq-join*, som ble brukt i denne oppgaven til sammenslåingen av reads-par, bruker en annerledes algoritme enn den mange andre verktøy til samme formål og er optimalisert for å behandle Illumina-avlesninger (Aronesty 2013). Aronesty (2013) gjorde en sammenlikningsstudie av ulike fusjoneringsprogrammer og kom fram til at dersom en sekvenseringsplattform med generelt lav feil-rate (noe Illumina anses som) er blitt benyttet kan metoder som bruker Fastq-Join-algoritmen fungere bedre med tanke på kvalitet og effektivitet.

Jeg valgte å sette øvre grense for mismatch mellom to overlappende sekvensdeler så høyt som 10%. Dette var for å unngå at for mange sekvenser skulle kastes bort for tidlig i sekvensbearbeidingen. Dette ble også gjort i visshet om at output-sekvensene senere skulle utsettes for strengere filtreringskrav (se avsnitt 2.4.2 Kvalitetsfiltrering). Ved hjelp av *fastq-join*-scriptet ble 44,8% av sekvens-parene slått sammen. De resterende 55,2 prosentene passerte verken filtreringskravet nevnt ovenfor eller kravet om minimum 6 baser i overlappende sekvens. De sekvensene som ikke lot seg slå sammen utgjorde en relativt stor del av sekvensdataene, spesielt dersom en sammenlikner med Fadrosch m. fl. (2014) sine resultater. Artikkelforfatterne sekvenserte tre amplikon-pools (V3-V4-området) med 300PE MiSeq-protokollen og benyttet PANDAseq (Masella m. fl. 2012) og FLASH (Magoc og Salzberg 2011) til sammenslåing av parede sekvenser (uten å kvalitetsfiltrere først, i likhet med meg). I dette tilfellet ble henholdsvis 93,0 og 92,5% av sekvensene parete. Dette har mest sannsynlig en sammenheng med kvaliteten på dataene (se over, underkapittel 4.3.1) og tilsetningen av større andel PhiX-bibliotek i sekvenseringsmiksen.

Det finnes flere metoder for å kvalitetsfiltrere sekvensdata. Noen av scriptene bruker Q-verdien. Som nevnt tidligere er dette et heltall som representerer estimert sannsynlighet for at basen er feil. Filtrering av «bad reads» ved hjelp av Q-verdien for hver base gjøres enten ved å bruke gjennomsnittlig Q-verdi (videre benevnt GQ-score) eller «expected errors», det vil si forventede feil (videre benevnt EE) for hver sekvens. Sistnevnte ble benyttet i denne oppgaven. Dette er fordi GQ-scoren kan gi et feil bilde av sekvensen dersom denne har noen få lave Q-verdier men generelt flere høye. Lave enkeltverdier for Q vil prege EE-verdien i stor grad, mens dette er informasjon som går tapt dersom man kun beregner GQ-score.

4.4 Alfadiversitet

16S rDNA-sekvensene ekstrahert fra de 24 sedimentprøvene ble fordelt i OTU-clustere med $\geq 97\%$ sekvenslikhet som terskel. Det finnes flere metoder for OTU-clustering men i denne oppgaven ble algoritmen UPARSE benyttet, nærmere bestemt scriptet *-cluster_otus* brukt (Edgar 2013). UPARSE er implementert i programpakken USEARCH v7. Artikkelforfatteren brukte Illumina MiSeq-reads fra to konstruerte bakteriesamfunn med et kjent antall fylogenetiske grupper og testet UPARSE mot den mye anvendte QIIME-analysepakken. Når det gjaldt sekvenskvalitet viste konsensus-sekvensen til de fleste USEARCH-OTU-ene klart bedre samsvar ($\geq 99\%$ identitet) med den opprinnelige biologiske sekvensen, enn de QIIME-genererte OTU-ene. Videre overestimerte QIIME antallet OTU-er grovt mens USEARCH gav god overensstemmelse mellom faktisk og estimert antall (Edgar 2013).

Rangeringen av de 22 861 OTU-ene generert med UPARSE etter antall sekvenser innen hver OTU ble visuelt framstilt i et rank-abundance-diagram. Dette viste at så lite som ~ 20 OTU-er hadde merkbart høyere forekomst enn resten. Dette er et mønster som er høyst forventet å få, også i bakteriesamfunn fra sediment (Hughes m. fl. 2001). Det tilsvarer den karakteristiske «rare biosphere»-profilen (Sogin m. fl. 2006) som tidligere er påvist generelt i terrestriske og marine miljøer ved dypsekvensering av 16S rRNA-genet. Slike bakteriesamfunn er karakterisert ved at de fleste rDNA-sekvensene tilhører et relativt lite antall OTU-er mens den totale fylogenetiske diversiteten domineres av et meget stort antall OTU-er som hver er representert med et lite antall sekvenser. En betydelig andel av disse foreligger som singletons, det vil si OTU-er som kun er representert med én sekvens.

Konsensus-sekvensen fra OTU-en som stod for den aller største kontamineringen (målt i antall sekvenser) ble mer spesifikt plassert ved BLAST-søk (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvensen viste høy sekvenslikhet med *E. coli*, en bakterie som ikke er forventet å finne i subarktisk marint sediment. BLAST-søk ble også gjort for noen av kontaminant-OTU-ene som stammet fra bare et fåtall sekvenser (1-5). Disse ble plassert som blant annet marint bakterioplankton (maksimum identifikasjon 95%) og den hydrokarbon-degraderende bakterien *Enterobacter cloacae* (100%). Arulazhagan (2010) skal ha isolert sistnevnte fra marint miljø. Hydrokarbon-degraderende mikroorganismer har normalt lav forekomst i marint miljø, men forurensing fra petroleumshydrokarboner kan stimulere til vekst hos disse. Det kunne spekuleres i om noen få av *Enterobacteriaceae*-sekvensene faktisk ikke var kontamineringssekvenser, hadde det ikke vært for at brønnen ble påvist å være tørr og det heller ikke ble brukt hydrokarbonholdige borevæsker. Det ble, som nevnt tidligere, konkludert med at det dreide seg om en kontaminering, mye fordi kontaminant-sekvensene ble funnet i sterkt varierende grad og i tilsynelatende tilfeldige prøver når det gjaldt dybdesjikt og annen plassering. Kontamineringen har mest sannsynlig skjedd ved pipettering i forbindelse med den første PCR-kjøringen.

De videre analysene av prøvene viste at proteobakterier dominerer i marint sediment, med 57,1% av sekvensene. Proteobakterier er med god margin den største bakterierekken i tillegg til at den også omfatter flest typer metabolisme. Rekken representeres av fototrofe, kjemolitotrofe,

metanotrofe, aerobe og fakultativt aerobe kjemoorganotrofe bakterier (Madigan m. fl. 2009). Ikke overraskende har tidligere studier vist liknende resultater. Schauer (2010) undersøkte sediment i tre søratlantiske dyphavsbassenger med tanke på bakteriesamfunn og fant at proteobakterier utgjorde 58 – 64% av sekvensene (basert på 100% sekvenslikhet). Da Bowman og McCuaig (2003) undersøkte antarktisk sokkelsediment fant de også at proteobakterier dominerte i prøvene deres.

I likhet med Zinger m. fl. (2011) fant jeg at gammaproteobakteriene hadde størst gjennomsnittlig forekomst i marint sediment (25% sammenliknet med 24,5% i min studie). Klasse *Gammaproteobacteria* utgjorde på samme måte 37 – 45% av sekvensene i de tre dyphavsbassengene som ble undersøkt av Schauer m. fl. (2010). Gammaproteobakteriene som man kan forvente å finne i marint sediment står bak flere metabolske strategier, blant dem metanoksidasjon, svovel- og hydrogenoksidasjon samt nitrogenfiksering (hvor alle de nevnte kan foregå aerobt) (Madigan m. fl. 2009, Orcutt m. fl. 2011).

En oppsummering av hvilke taksa som er funnet ved ulike havdyp og sedimentdybder vises i tabell 4.1. Denne tar utgangspunkt i de 15 rekkene (klassene dersom proteobakterier) som viste seg å ha høyest forekomst i mine prøver. Kvalitativt sett ser det ut til at mine funn stemmer overens med publisert litteratur. Det bør bemerkes at alle de refererte artikkelforfatterne (med unntak av Zinger m. fl.) analyserte klonbiblioteker og dermed ikke fikk generert like stor mengde med informasjon som det ble gjort i denne oppgaven.

Tabell 4.1 – Publiserte kvalitative funn av bakterielle taksa på ulike sedimentlokaliteter, inkludert det som ble funnet i denne oppgaven

Publisert litteratur:	(Zinger m. fl. 2011)	(Zeng m. fl. 2011)	(Schauer m. fl. 2010)	(Bowman og McCuaig 2003)	(Polymenakou m. fl. 2005)	Denne oppgaven
Hav (dybde, m)	Globalt	150-400	5032-5649	761	2670-3603	1400
Sedimentdybde (cm)	10	Ikke oppgitt	2	21	1	10
Acidobakterier	x	x	x	x	x	x
Aktinobakterier	x	x	x	x	x	x
Alfaproteobakterier	x	x	x	x	x	x
<i>Bacteroidetes</i>		x	x		x	x
Betaproteobakterier	x	x	x	x	x	x
<i>Chloroflexi</i>	x	x	x		x	x
Deltaproteobakterier	x	x	x	x	x	x
Epsilonproteobakterier	x	x		x	x	x
<i>Firmicutes</i>	x	x			x	x
Gammaproteobakterier	x	x	x	x	x	x
<i>Nitrospirae</i>		x	x	x	x	x
<i>Planctomycetes</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Verrucomicrobia</i>		x	x	x	x	x
<i>Gemmatimonadetes</i>			x		x	x
<i>Tenericutes</i>						x

4.5 Betadiversitet

Det overordnede målet med denne oppgaven var å undersøke om det fantes en forskjell i bakteriesammensetningen i boreavfall-påvirket og antatt upåvirket sediment. Dersom denne eksisterte var antakelsene at den mest sannsynlig ville manifestere seg i det øvre sedimentsjiktet.

Det finnes flere indekser å velge mellom for å kvantifisere graden av dissimilaritet i arts-sammensetning mellom to eller flere samfunn (betadiversiteten). Det mest intuitive målet for dissimilaritet er muligens Euklidsk avstand. Dette er roten av kvadratsummen av avstandene mellom objektene i multidimensjonalt rom (hvor hver art representerer en akse som står ortogonalt på alle andre akser). Det som gjør Euklidsk avstand ugunstig i noen tilfeller, er at den som sagt baserer seg på kvadrerte differanser, noe som gjør at enkeltstående store differanser vil dominere. Bray-Curtis, Jaccard og Kulczynski er alle såkalte Manhattan-indekser som ikke bruker den kvadrerte differansen. Manhattan-indeksene gir en verdi fra 0 til 1, hvor 1 tilsvarer at prøvene ikke har noen arter felles (Oksanen 2013). Faith med medarbeidere (1987) undersøkte ni dissimilaritetsindekser med hensyn på robusthet. Et av kriteriene var at verdiene skulle ha en robust, lineær sammenheng med den faktiske økologiske avstanden. Faith konkluderte med at Bray-Curtis viste større robusthet enn blant annet Kji-kvadrat og Euklidsk avstand og denne ble valgt for å konstruere en D-matrise i denne studien.

Det kan også trekkes frem negative aspekter ved å bruke Bray-Curtis som mål for avstand. Blant annet at denne ikke tar hensyn til at hvert objekt (her: prøve) kan variere i volum (her: totalt antall sekvenser). Tvert imot tar Bray-Curtis utgangspunkt i at alle objektene har samme «størrelse». Dette var ikke et faktum når det gjaldt mine prøver og det kan diskuteres om det burde vært valgt et annet mål for dissimilaritet. Et alternativ var UniFrac-avstanden, som ut ifra det fylogenetiske treet (basert på OTU-tabellen) kvantifiserer hvor mye evolusjonær historie som er unik for hver av prøvene som sammenliknes. Vektet UniFrac vil i tillegg inkludere forskjellene i relativ forekomst og regnes som et komplement til standard-UniFrac (Lozupone m. fl. 2011). Komponeringen av en D-matrise basert på UniFrac-avstanden ville dog tatt lengre tid, da QIIME bruker lang tid på å generere fylogenetiske tre. Derfor må tidsperspektivet ha noe av skylden for at Bray-Curtis ble benyttet i stedet.

For å visualisere graden av dissimilaritet mellom de 24 prøvene ble det brukt multivariat ordineringsmetode. Jeg valgte klassisk Multidimensional Scaling, også kalt Principal Coordinate Analysis (PCoA). Metoden likner den mer anvendte Principal Component Analysis siden den også bruker en lineær fremgangsmåte for å ordinere objektene i et kartesisk koordinatsystem. I tillegg beregner både PCA og PCoA egenverdier som mål på hvor mye av variasjonen som er forklart ved hjelp av de «nye» aksene. Fordelen med PCoA er dog at metoden opererer på bakgrunn av en dissimilaritetsmatrise og kan dermed ta i bruk ethvert mål for dissimilaritet (Ramette 2007).

Et av problemene med å benytte ikke-euklidisk avstand i PCoA er at det kan genereres negative egenverdier. Som nevnt før beregner PCoA egenverdiene for hver variabel i D-matrisen, som et uttrykk for hvor mye variasjon det er i dataene i retning av den tilhørende egenvektoren. Med funksjonen *pcoa* (som fungerer på samme måte som *cmdscale*) kan man velge ulike korreksjonsmetoder for å unngå negative egenverdier, som for eksempel Cailliez' eller Lingoes metode. Begge ble forsøkt på D-matrisen og resultatet ble PCoA-plott som så identiske ut som det opprinnelige.

To prøver stakk seg ut som «outliers» med store negative verdier langs førsteaksen i PCoA-plottet, nemlig 1.1 (5-10 cm) og 3.2 (1-2 cm) (det ble ikke testet om disse kvalifiserte som «outliers», statistisk sett). En grundigere titt på OTU-tabellen viste at outlier-ene var av prøvene med færrest sekvenser i utgangspunktet, med henholdsvis 14 796 og 24 214 sekvenser mot det gjennomsnittlige antallet på 177 278. Dette kan tyde på at de lave sekvensantallene har skylden for den markante variasjonen mellom disse to prøvene og resten. Videre, dersom plasseringen til de 24 prøvene i PCoA-plottet i retning av førsteaksen sammenliknes med det tilhørende antallet (sammenslåtte) sekvenser (figur 3.11), er trenden at prøvene med flest sekvenser ligger lengst mot høyre i plottet. Ettersom tallet synker er prøvene plassert lenger mot venstre.

Som nevnt tidligere tar ikke Bray-Curtis hensyn til at prøvene varierer i størrelse. Derfor er det naturlig å tro at artssammensetningen påvirkes av antallet sekvenser. Blant annet viste det seg at outlier-ene avvek fra resten av prøvene når det gjaldt forekomsten av minst én OTU, identifisert til familien *Piscirickettsiaceae* under gammaproteobakterier. Gjennomsnittlig forekomst blant de

24 prøvene var 2336 sekvenser, mens for outlier-ne var forekomsten på henholdsvis 167 og 349 sekvenser.

Siden PCoA-plottet viste en viss spredning mellom de tre stasjonene langs førsteaksen og mellom sjiktene langs andreaksen ville det være interessant å se denne variasjonen i sammenheng med brønnnavstand, sedimentdybde og pH. Derfor ble det utført en tvungen ordnering av OTU-dataene med hensyn på de abiotiske faktorene brønnnavstand, sedimentdybde og pH (oksygendataene var for mangelfulle til å inkluderes). R tilbyr tre metoder for en slik analyse og da disse fungerer ganske likt, ble Distance-Based RDA (dbRDA, også kjent som Constrained Analysis of Principal Coordinates) valgt ut (Oksanen 2009). Funksjonen *capscale* ble brukt på fullstendige data. Da det manglet én pH-måling (3.1 0-1 cm) på grunn av mangel på materiale, ble det besluttet å kalkulere en pH-verdi basert på målingene av de andre 0-1 cm-sjiktene. Dette skyldtes at *capscale* ikke kan behandle manglende enkeltverdier i en datamatrise. DbR-analysen pekte mot at variasjonen forklart av henholdsvis sedimentdybde og brønnnavstand ikke skyldtes tilfeldigheter. I avsnitt 4.2 ble det påpekt at pH fungerer dårlig som sedimentkarakteristikk på grunn av at verdiene varierer i liten grad og resultatene av dbRDA-en kan se ut til å underbygge dette.

Absoluttverdien av differansen i forekomst for oksisk ($> 70 \mu\text{M}$) og anoksisk ($< 10 \mu\text{M}$) gruppe ble studert og viste seg å være slående liten ($\sim 0 - \sim 0,9\%$). Disse resultatene manifesterte seg videre i DbRD-analysen hvor oksygenvariabelen var inkludert. Variasjonen i bakteriesammensetningene forklart av variasjonen i oksygendataene viste seg ikke å være statistisk signifikant etter en permutasjonstest med 1999 permutasjoner (p-verdi = 0,54).

Durbin og Teske (2011) undersøkte dyphavssediment med tanke på hvordan bakteriesammensetningen endret seg ut ifra redoks-lagdelingen, det vil si oksygen- og nitratprofilen. Artikkelforfatterne oppdaget at bakteriesammensetningen på rekke- og klasse-nivå i oksisk og anoksisk del av sedimentkolonnen utviste en tydelig forskjell. Denne forskjellen var å spore i at oksisk sediment ble karakterisert som et mer komplekst samfunn bestående av alfa-, gamma- og deltaproteobakterier, samt aktinobakterier og *Gemmatimonadetes*, mens anoksisk sediment hovedsakelig var dominert av *Chloroflexi* og *Planctomycetes*. Mine resultater var ikke sammenliknbare med disse. Først og fremst var den gjennomsnittlige andelen alfaproteobakterier like høy under oksiske og anoksiske forhold. Andelen gammaproteobakterier var dessuten noe høyere i anoksisk enn i oksisk sediment. I tillegg var forekomsten av *Chloroflexi* og *Planctomycetes* høyere i oksisk gruppe, motsatt av hva artikkelforfatterne fant.

5 Konklusjon

Det ble undersøkt om det fantes forskjeller i bakteriesammensetningen mellom prøvestasjoner rundt en letebrønn i Barentshavet med antatt ulike grader av påvirkning fra boreavfall. Boringen av letebrønnen startet i midten av juli i 2013 og varte til midten av november samme år. Det var ikke kjent nøyaktig når deponeringen av boreavfallet på havbunnen startet. Ikke-kontrollkjerneprøvene, som ble hentet opp i starten av desember 2013 kan dog antas å ha vært påvirket av boreavfallsdeponeringene i tre til fire måneder. Da spør det om de saktevoksende bakteriene som lever i sediment hvor temperaturen i de nærliggende vannmassene er målt til å være $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ har vært påvirket lenge nok til at samfunnssammensetningen har endret seg som følge av dette. Den generelle sammensetningen av bakteriesamfunn viste seg videre å stemme overens med det som tidligere er vist for marint sediment.

Den utvungne multivariate ordineringsanalysen viste at variasjonen langs førsteaksen i hovedsak var påvirket av to outlier-prøver. Dette kan ha forstyrret ordineringsanalysen og dermed fått de antatte avstandene mellom kontrollstasjonene og de påvirkede stasjonene til å «forsvinne». De tvungne ordineringsanalysene viste derimot at brønnavstanden bidro statistisk signifikant til forskjellene mellom de øverste sedimentsjiktene (med størst avstand mellom kontrollstasjonene og de påvirkede). Dette hadde dog vært en mer robust konklusjon dersom PCoA-plottet underbygget denne variasjonen.

De initiale antakelsene om oksygenkonsentrasjonen i sedimentet gikk i første omgang ut på at denne ville påvirkes av boreavfallsdeponeringen. Dette ble bekreftet: Det finpartikulære boreslammet har mest sannsynlig fungert som en barriere for oksygendiffusjon ned i sedimentet.

Det ble også antatt at oksygenkonsentrasjonen ville påvirke bakteriesammensetningen. Med de analysene som ble utført i denne oppgaven ble det ikke konkludert med at dette var tilfelle. Analyser utført med mer tilstrekkelige oksygenmålinger kunne gitt et klarere svar på dette.

Referanseliste

Aronesty, E. (2013) "Comparison of Sequencing Utility Programs" *The Open Bioinformatics Journal* **7** 1-8

Artsdatabanken. "Bløtbunn i marine systemer". Oppdatert sist: 11.01.2014, fra <http://www.artsdatabanken.no/NiN/Naturtype/471>

Arulazhagan, P., Vasudevan, N. og Yeom, I. T. (2010) "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment" *International Journal of Environmental Science and Technology* **7** 639-652

Askheim, S., Hallenstvedt, A. og Bryhni, I. "Barentshavet". Oppdatert sist: 18.09.13. Lastet ned 18.11.2013, fra <http://snl.no/Barentshavet>

Bakke, T., Klungsøyr, J. og Sanni, S. (2012) "Long-term effects of discharges to sea from petroleum-related activities - The results of ten years' research" Report from The Oceans and Coastal Areas Program, Forskningsrådet, Oslo

Berner, R. A. (1981) "A new geochemical classification of sedimentary environments" *Journal of Sedimentary Petrology* **51** 359-365

biom-format.org. "The Biological Observation Matrix (BIOM) format". Oppdatert sist: 04.12.13. Lastet ned 09.04.2014, fra <http://biom-format.org/>

Bowman, J. P. og McCuaig, R. D. (2003) "Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment" *Applied and Environmental Microbiology* **69** 2463-2483

Bray, J. R. og Curtis, J. T. (1957) "An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin" *Ecological Monographs* **27** 325-349

Brendsdal, A. (2011) Kaksinjeksjon - erfaringer og tiltak, Statoil-presentasjon. <http://www.ptil.no/getfile.php/Presentasjoner/2011%20Milj%C3%B8seminar%20N%C3%A5r%20ulykker%20truer%20milj%C3%B8et/Statoil%20-%20Kaksinjeksjon%20-%20erfaringer%20og%20tiltak%20Ptil%2017.02.2011.pdf>

Breuer, E., Stevenson, A. G., Howe, J. A., Carroll, J. og Shimmield, G. B. (2004) "Drill cutting accumulations in the Northern and Central North Sea: a review of environmental interactions and chemical fate" *Marine Pollution Bulletin* **48** 12-25

Cai, L., Ye, L., Tong, A. H. Y., Lok, S. og Zhang, T. (2013) "Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets" *Plos One* **8** e53649

Canfield, D. E. (1989) "Sulfate reduction and oxic respiration in marine sediments - implications for organic-carbon preservation in euxinic environments" *Deep-Sea Research Part A-Oceanographic Research Papers* **36** 121-138

Canfield, D. E., Jorgensen, B. B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N. B., Thamdrup, B., Hansen, J. W., Nielsen, L. P. og Hall, P. O. J. (1993) "Pathways of organic-carbon oxidation in 3 continental-margin sediments" *Marine Geology* **113** 27-40

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. D., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. og Knight, R. "QIIME - Quantitative Insights Into Microbial Ecology". Oppdatert sist: 20.11.2013, fra <http://qiime.org/>

Chmolowska, D. (2013) "A practical introduction to microbial community sequencing" *Central European Journal of Biology* **8** 399-409

Cochrane, S. K. J., Paulsen, J. E., Leikvin, Ø., Hansen, J., Torbergesen, H. E., Pierfelici, S. (2014) "Assessing exploratory drilling impacts on an arctic deepwater sea-pen habitat in offshore Norway" Presentert ved SPE International Conference on Health, Safety and Environment, Long Beach, California, 17. – 19. Mars 2014

Daan, R., Booij, K., Mulder, M. og VanWeerlee, E. M. (1996) "Environmental effects of a discharge of drill cuttings contaminated with ester-based drilling muds in the North Sea" *Environmental Toxicology and Chemistry* **15** 1709-1722

Daan, R., Vanhetgroenewoud, H., Dejong, S. A. og Mulder, M. (1992) "Physicochemical and Biological Features of a Drilling Site in the North Sea, 1 Year after Discharges of Oil-Contaminated Drill Cuttings" *Marine Ecology Progress Series* **91** 37-45

Daniel, R. (2005) "The metagenomics of soil" *Nature Reviews Microbiology* **3** 470-478

Degnan, P. H. og Ochman, H. (2012) "Illumina-based analysis of microbial community diversity" *Isme Journal* **6** 183-194

Delong, E. F. (1992) "Archaea in Coastal Marine Environments" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5685-5689

Devold, H. (2009) Oil and gas production handbook - An introduction to oil and gas production. ABB AS, Oslo. ISBN 978-82-997886-3-2

Dow, F. K., Davies, J. M. og Raffaelli, D. (1990) "The effects of drill cuttings on a model marine sediment system" *Marine Environmental Research* **29** 103-134

Durbin, A. M. og Teske, A. (2011) "Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments" *Environmental Microbiology* **13** 3219-3234

Edgar, R. C. (2010) "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST" *Bioinformatics* **26** 2460-2461

Edgar, R. C. (2013) "UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads" *Nature Methods* **10** 996-+

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. og Knight, R. (2011) "UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection" *Bioinformatics* **27** 2194-2200

Encyclopaedia Britannica. "Benthos". Lastet ned 18.11.2013, fra <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/61141/benthos>

Eni Norge (2012) "Årsrapport for operasjonelle utslipp 2012, leteboring".

Eni Norge AS (Saipem). "Scarabeo 8". Oppdatert sist: 13.02.2014. Lastet ned 13.04.2014, fra <http://www.saipem.it/site/article.jsp?idArticle=5429&instance=2&node=2012&channel=2&ext=template/37DueColonne&int=article/1DefaultArticolo>

Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M. og Ravel, J. (2014) "An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform" *Microbiome* **2**

Faith, D. P., Minchin, P. R. og Belbin, L. (1987) "Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance" *Vegetatio* **69** 57-68

Falk, A. H., Larsen, L.-H. og Cochrane, S. (2013) BARCUT - Barents Sea drill cuttings research initiative. Desk study, Akvaplan-niva, Tromsø

Fenchel, T. (1969) "The ecology of marine microbenthos" *Ophelia* **6** 1-182

Finke, N. og Jorgensen, B. B. (2008) "Response of fermentation and sulfate reduction to experimental temperature changes in temperate and Arctic marine sediments" *Isme Journal* **2** 815-829

Fuhrman, J. A., McCallum, K. og Davis, A. A. (1992) "Novel major archaeobacterial group from marine plankton" *Nature* **356** 148-149

Gates, A. R. og Jones, D. O. B. (2012) "Recovery of Benthic Megafauna from Anthropogenic Disturbance at a Hydrocarbon Drilling Well (380 m Depth in the Norwegian Sea)" *Plos One* **7** e44114

Glenn, T. C. (2011) "Field guide to next-generation DNA sequencers" *Molecular Ecology Resources* **11** 759-769

Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methe, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., Birren, B. W. og Consortium, H. M. (2011) "Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons" *Genome Research* **21** 494-504

Hudgins, C. M. (1994) "Chemical use in North Sea oil and gas-E&P" *Journal of Petroleum Technology* **46** 67-74

Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. og Bohannon, B. J. M. (2001) "Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity" *Applied and Environmental Microbiology* **67** 4399-4406

Jones, D. O. B., Gates, A. R. og Lausen, B. (2012) "Recovery of deep-water megafaunal assemblages from hydrocarbon drilling disturbance in the Faroe-Shetland Channel" *Marine Ecology Progress Series* **461** 71-82

Kanagawa, T. (2003) "Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR)" *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96** 317-323

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. og Glockner, F. O. (2013) "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies" *Nucleic Acids Research* **41** e1

Kvilhaug, O. D. (2007) Masteroppgave: Hvordan ivaretas hensynet til ressursene og fiskerne ved seismisk datainnsamling - lovløshet satt i system?, Universitetet i Tromsø

Larsen, L.-H. "Akvaplan-niva - Overvåking". Oppdatert sist: 11.11.2013, fra <http://www.akvaplan.niva.no/no/marine/monitoring>

Legendre, P. og Legendre, L. (1998) *Numerical Ecology*, 2nd Edition, Elsevier Science, Amsterdam

Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C. og Jorgensen, B. B. (2009) "Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation" *Environmental Microbiology* **11** 1278-1291

Lohrer, A. M., Thrush, S. F. og Gibbs, M. M. (2004) "Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions" *Nature* **431** 1092-1095

Lozupone, C. og Knight, R. (2005) "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities" *Applied and Environmental Microbiology* **71** 8228-8235

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. og Knight, R. (2011) "UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison" *Isme Journal* **5** 169-172

Lozupone, C. A. og Knight, R. (2008) "Species divergence and the measurement of microbial diversity" *Fems Microbiology Reviews* **32** 557-578

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. og Clark, D. P. (2009) *Brock Biology of Microorganisms*, 12th Edition. Pearson Education, San Fransisco

Magoc, T. og Salzberg, S. L. (2011) "FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies" *Bioinformatics* **27** 2957-2963

Maire, O., Lecroart, P., Meysman, F., Rosenberg, R., Duchene, J. C. og Gremare, A. (2008) "Quantification of sediment reworking rates in bioturbation research: a review" *Aquatic Biology* **2** 219-238

Mardis, E. R. (2008) "Next-generation DNA sequencing methods" *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9** 387-402

Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G. og Neufeld, J. D. (2012) "PANDAseq: PAired-eND Assembler for Illumina sequences" *Bmc Bioinformatics* **13**

Miljødirektoratet. "Borevæsker". Oppdatert sist: 29.11.2013, fra <http://www.miljostatus.no/Tema/Hav-og-kyst/Olje-og-gass/Utslipp-til-luft-og-sjo/Utslipp-til-sjo/Borevasker/>

Miljødirektoratet. "Utslipp til luft". Oppdatert sist: 20.09.2013. Lastet ned 09.01.2014, fra <http://www.miljostatus.no/Tema/Hav-og-kyst/Olje-og-gass/Utslipp-til-luft-og-sjo/Utslipp-til-luft/>

Munn, C. (2011) *Marine Microbiology - Ecology and Applications*, 2nd Edition, Garland Science, New York, USA

NOROG (2013) MILJØRAPPORT 2013 www.norskoljeoggass.no

Norsk olje & gass. "Olje- og gasshistorien". Oppdatert sist: 03.08.2010. Lastet ned: 18.10.2013, fra <http://www.norskoljeoggass.no/no/Faktasider/Oljehistorie/>

Ocean Classroom. "Sediments". Oppdatert sist: 18.11.2013. http://www.oceanclassrooms.com/ms101_u3_c2_sb_1

Okpokwasili, G. C., Nnubia, C. (1995) "Effects of oil spill dispersants and drilling fluids on substrate specificity of marine bacteria" *Waste Management* **15** 515-520

Oksanen, J. (2009) "Ordination and Analysis of Dissimilarities: Tutorial with R and vegan", <http://www.bio.utk.edu/fesin/msa2009/R/veganbird.pdf>

Oksanen, J. (2013) "Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan tutorial", <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>

Oljedirektoratet (2012) "FAKTA 2012 - Norsk petroleumsvirksomhet", Olje- og energidepartementet, Oljedirektoratet, http://npd.no/Global/Norsk/3-Publikasjoner/Faktahefter/Fakta2012/Fakta_2012_web.pdf

Oljedirektoratet (2013) "Helhetlig forvaltningsplan for Nordsjøen og Skagerrak - Sektorutredning for petroleumsvirksomhet", Rapport TA – 2828/2011

Oljedirektoratet. "Tørr brønn sørvest i Barentshavet - [REDACTED]". Oppdatert sist: 10.03.2014, fra [http://www.npd.no/no/Nyheter/Resultat-av-leteboring/2013/\[REDACTED\]/](http://www.npd.no/no/Nyheter/Resultat-av-leteboring/2013/[REDACTED]/)

Orcutt, B. N., Sylvan, J. B., Knab, N. J. og Edwards, K. J. (2011) "Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor" *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75** 361-+

Paradis, E., Claude, J. og Strimmer, K. (2004) "APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language" *Bioinformatics* **20** 289-290

Polymenakou, P. N., Bertilsson, S., Tselepides, A. og Stephanou, E. G. (2005) "Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries" *Microbial Ecology* **50** 447-462

Polymenakou, P. N., Lampadariou, N., Mandalakis, M. og Tselepides, A. (2009) "Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea" *Systematic and Applied Microbiology* **32** 17-26

R Core Team (2013) "R: A language and environment for statistical computing" Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing, Wien

Ram, J. L., Karim, A. S., Sendler, E. D. og Kato, I. (2011) "Strategy for microbiome analysis using 16S rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform" *Systems Biology in Reproductive Medicine* **57** 162-170

Ramette, A. (2007) "Multivariate analyses in microbial ecology" *Fems Microbiology Ecology* **62** 142-160

Ravenschlag, K., Sahn, K. og Amann, R. (2001) "Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard)" *Applied and Environmental Microbiology* **67** 387-395

Rochelle, P. A., Cragg, B. A., Fry, J. C., Parkes, R. J. og Weightman, A. J. (1994) "Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S ribosomal-RNA gene sequence analysis" *Fems Microbiology Ecology* **15** 215-225

Rodrigue, S., Materna, A. C., Timberlake, S. C., Blackburn, M. C., Malmstrom, R. R., Alm, E. J. og Chisholm, S. W. (2010) "Unlocking Short Read Sequencing for Metagenomics" *Plos One* **5** e11840

Sakshaug, E., Johnsen, G. og Kovacs, K. (2009) *Ecosystem Barents Sea*, Tapir Academic Press, Trondheim

Sanger, F., Nicklen, S. og Coulson, A. R. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 5463-5467

Schauer, R., Bienhold, C., Ramette, A. og Harder, J. (2010) "Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean" *Isme Journal* **4** 159-170

Schmieder, R. og Edwards, R. (2011) "Quality control and preprocessing of metagenomic datasets" *Bioinformatics* **27** 863-864

Scholz, M. B., Lo, C. C. og Chain, P. S. G. (2012) "Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis" *Current Opinion in Biotechnology* **23** 9-15

Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M. og Herndl, G. J. (2006) "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 12115-12120

Staley, J. T. og Konopka, A. (1985) "Measurement of Insitu Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats" *Annual Review of Microbiology* **39** 321-346

Store Norske Leksikon. "Havbunnen". Oppdatert sist: 14.02.09. Lastet ned 17.11.2013, fra <http://snl.no/havbunnen>

Sundby, B. (2006) "Transient state diagenesis in continental margin muds" *Marine Chemistry* **102** 2-12

Venables, W. N. og Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*, 4th Edition, Springer, New York

Wintzingerode, F. v., B., G. U. og Stackebrandt, E. (1997) "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis" *Fems Microbiology Reviews* **21** 213-229

Yücel, M. (2013) "Down the thermodynamic ladder: A comparative study of marine redox gradients across diverse sedimentary environments" *Estuarine Coastal and Shelf Science* **131** 83-92

Zeng, Y. X., Zou, Y., Chen, B., Grebmeier, J. M., Li, H. R., Yu, Y. og Zheng, T. L. (2011) "Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea" *Polar Biology* **34** 907-919

Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., Martiny, J. B. H., Sogin, M., Boetius, A. og Ramette, A. (2011) "Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems" *Plos One* **6** e24570

Appendiks

Appendiks A

Tabell A1 gir en fullstendig oversikt over hvilke kommandoer som ble kjørt under sekvensbehandlingen.

Tabell A1 – Oversikt over alle scriptene benyttet i sekvensbehandlingen

Script	Kommando
<i>fastq-join</i>	<i>fastq-join forward.fastq reverse.fastq -o joined -p 10</i>
<i>-fastq-filter</i>	<i>filepath/usearch -fastq_filter filepath/join.fastq -fastaout qual.fasta -fastq_maxee 0.5 -threads 24</i>
<i>split_libraries_fastq.join</i>	<i>split_libraries.fastq.py -i S1.qual.fastq,...,S24.qual.fastq --sample_ids S.1,...,S.24 -o splitqual -m Mapping_1.txt,...,Mapping_24.txt --barcode_type 'not-barcoded' --store_demultiplexed_fastq</i>
<i>-trim_left/-trim_right</i>	<i>perl filepath/prinseq-lite.pl -trim_left 17 -trim_right 21 -fastq filepath/sekvenser.fastq -out_format 3</i>
<i>-derep_fulllength</i>	<i>derep_fulllength sekvenser.fasta -output sekvenser.derep.fasta -sizeout -threads 24</i>
<i>-cluster_otus</i>	<i>filepath/usearch -cluster_otus sekvenser.derep.fasta -otus sekvenser.otu-er.fasta</i>
<i>-uchime_ref</i>	<i>filepath/userach -uchime_ref sekvenser.otu-er.fasta -db gold.txt -strand plus -nonchimeras sekvenser.chim.fasta -threads 64</i>
<i>fasta_number.py</i>	<i>python filepath/fasta_number.py sekvenser.chim.fasta OTU_ > sekvenser.otulab.fasta</i>
<i>-usearch_global</i>	<i>filepath/usearch -usearch_global sekvenser.fasta -db sekvenser.otulab.fasta -strand plus -id 0.97 -uc otu.map.uc -threads 24</i>
<i>uc2otutab_mod.py</i>	<i>python filepath/uc2otutab_mod.py otu.map.uc > sekv.otu-table.txt</i>
<i>biom convert</i>	<i>biom convert --table-type="otu table" -i sekv.otu-table.txt -o sekv.otu-table.biom</i>
<i>assign_taxonomy.py</i>	<i>assign_taxonomy.py -v --rdp_max_memory 8000 -t /macqiime/greengenes/gg_13_8_otus/taxonomy/97_otu_taxonomy.txt -r /macqiime/greengenes/gg_13_8_otus/rep_set/97_otus.fasta -i sekv.otulab.fasta -o assigned_taxonomy</i>
<i>biom add-metadata</i>	<i>biom add-metadata --sc-separated taxonomy --observation-header OTUID,taxonomy --observation-metadata-fp assigned_taxonomy/tax_assignments.txt -i sekv.otu-table.biom -o sekv.tax.otu-table.biom</i>
<i>filter_otus_from_otu_table.py</i>	<i>filter_taxa_from_otu_table.py -i sekv.tax.otu-table.biom -o otu-table.biom -n "Unassigned",k__Archaea,f__Enterobacteriaceae,c__Chloroplast</i>
<i>biom convert</i>	<i>biom convert -i sekv.er.tax.otu-table.biom -o sekv.er.tax.otu-table.txt -b --header-key taxonomy</i>
<i>summarize_taxa.py</i>	<i>summarize_taxa.py -i otu-table.biom -o oppsummering</i>
<i>jackknifed_beta_diversity.py</i>	<i>jackknifed_beta_diversity.py -i otu-table.biom -o jackknifed_bray -e 500 -m combined_mapping_file.txt -p custom_parameters.txt</i>

Tabell A2 gir en fullstendig oversikt over hvilke R-kommandoer som ble kjørt under de statistiske analysene.

Tabell A2 – Oversikt over funksjonene og pakkene som ble brukt i R under de statistiske analysene

Funksjon	Pakke	Kommando
<i>vegdist</i>	vegan	<i>bc = vegdist(otu)</i>
<i>isoMDS</i>	MASS	<i>nmMDS.otu.bc = isoMDS(bc)</i>
<i>pcoa</i>	ape	<i>otu.bc.pcoa = pcoa(bc)</i> <i>otu.bc.dbrda = capscale(otu.bc ~ Avstand + Sedimentdybde + pH)</i>
<i>capscale</i>	vegan	
<i>cmdscale</i>	stats	<i>pcoa = cmdscale(bc, eig = TRUE)</i>
<i>varpart</i>	vegan	<i>vp = varpart(bc, Avstand, Sedm, pH)</i>
<i>anova</i>	stats?	<i>anova(dbrda, by = "terms", permu = 2000)</i>

Appendiks B

Tabell B1 gir en oversikt over barcode-sekvensene benyttet under prepareringen til sekvensering.

Tabell B1: Indeks-sekvensene som ble benyttet som barcode-er

Indeks 1	Sekvens	Indeks 2	Sekvens
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT		
N706	TAGGCATG		