

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anela KAURIN

**VPLIV OHRANITVENE OBDELAVE NA LASTNOSTI  
TAL IN STRUKTURO MIKROBNIH ZDRUŽB V DVEH  
PEDO-KLIMATSKIH OKOLJIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anela KAURIN

**VPLIV OHRANITVENE OBDELAVE NA LASTNOSTI TAL IN  
STRUKTURO MIKROBNIH ZDRUŽB V DVEH PEDO-KLIMATSKIH  
OKOLJIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IMPACT OF CONSERVATION TILLAGE ON SOIL PROPERTIES AND  
MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN TWO PEDOCLIMATIC  
CONDITIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Doktorsko delo je bilo opravljeno na poskusnih poljih in v laboratorijih Katedre za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo, na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Del analiz je bil opravljen na Katedri za genetiko, biotehnologijo, žlahtnjenje rastlin in statistiko Oddelka za Agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter v laboratorijih French National Institute for Agricultural Research (INRA), University of Burgundy, Soil in Environmental Microbiology, Dijon, France. Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija in projekt J4-4224) ter delno EU (7 OP, projekt EcoFINDERS). Kandidatka je za gostovanje v INRI prejela štipendijo Francoskega inštituta v Sloveniji.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in Senata Univerze v Ljubljani z dne 11. 2. 2014 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje agronomija.

Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Helena Grčman, za somentorico pa doc. dr. Marjetka Suhadolc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Denis Stajniko

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Član: doc. dr. Rok Mihelič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 26.10.2015

Podpisana Anela Kaurin izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anela Kaurin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 631.46:631.51.01(043.3)
KG	mikrobna ekologija tal/minimalna obdelava/glive/arheje/bakterije/oksidatorji amonijaka/denitrifikatorji/ cikel dušika/sušni stres
AV	KAURIN, Anela, univ. dipl. bioteh.
SA	GRČMAN, Helena (mentor)/SUHADOLC, Marjetka (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje: agronomija
LI	2015
IN	VPLIV OHRANITVENE OBDELAVE NA LASTNOSTI TAL IN STRUKTURO MIKROBNIH ZDRUŽB V DVEH PEDO-KLIMATSKIH OKOLJIH
TD	Doktorska disertacija
OP	XII, 101, [10] str., 13 pregl., 22 sl., 6 pril., 241 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Cilj doktorske naloge je bil preučiti učinke 12-letne minimalne obdelave tal (MT; obdelava tal do 10 cm), v primerjavi s konvencionalno obdelavo (CT; oranje 25 cm globoko), na glavne fizikalno-kemijske lastnosti tal in strukturo mikrobnih združb v dveh pedo-klimatsko različnih okoljih, v Ljubljani in v Moškanjcih. MT je na obeh lokacijah vplivala na vertikalno prerazporeditev organskega ogljika ( $C_{org}$ ), ne pa tudi na povečanje skupne zaloge $C_{org}$ v primerjavi s CT. Povečanje $C_{org}$ v 0–10 cm sloju MT tal se je odrazilo na izboljšani obstojnosti strukturnih agregatov na obeh lokacijah in vodno-zadrževalnih lastnosti tal v Moškanjcih. MT je na obeh lokacijah povečala mikrobno biomaso ter spremenila strukturo bakterijske 16S rRNA in v Moškanjcih tudi glivne ITS združbe. Na strukturo arhejskih 16S rRNA genov obdelava ni vplivala na nobeni lokaciji. Sušni stres je v Moškanjcih, v letu 2013, povzročil zmanjšanje mikrobne biomase in velikosti splošne združbe bakterij, (kren)arhej in gliv, kot tudi velikosti bakterijskih (AOB) in arhejskih amonijak oksidirajočih (AOA) <i>amoA</i> genov ter denitrifikacijskih <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> in <i>nosZII</i> genov, vendar so po vzpostavitvi normalnih razmer vse združbe dosegle začetno velikost. MT je na globini 0–10 cm, v primerjavi s CT, pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi, povečala mikrobno biomaso v povprečju za 49 % ter številčnost bakterijskih in arhejskih 16S rRNA ter glivnih ITS (48 %, 66 %, 34 %, v tem zaporedju), kot tudi AOA in AOB <i>amoA</i> (74 %, 42 %), <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> in <i>nosZII</i> genov (51 %, 45 %, 45 %, 55 %). Na spodnji globini tal, 10–20 cm, je MT povečala številčnost arhejskih 16S rRNA in AOA <i>amoA</i> genov (71 %, 64 %) v primerjavi s CT. Pri MT je bil na globini tal 10–20 cm vpliv suše na splošno združbo arhej ter AOA in AOB manjši kot pri CT. V splošnem lahko zaključimo, da so v zgornjih 10 cm MT tal pogoji za mikrobne združbe bolj ugodni, ne glede na lokacijo ali vremenske razmere.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd  
DC UDC 631.46:631.51.01(043.3)  
CX Soil microbial ecology/minimum tillage/ fungi/archaea/bacteria/ammonia oxidizers/denitrifiers/ nitrogen cycle/drought stress  
AU KAURIN, Anela  
AA GRČMAN, Helena (supervisor)/SUHADOLC, Marjetka (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Agronomy  
PY 2015  
TI IMPACT OF CONSERVATION TILLAGE ON SOIL PROPERTIES AND MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN TWO PEDOCLIMATIC CONDITIONS  
DT Doctoral dissertation  
NO XII, 101, [10] p., 13 tab., 22 fig., 6 ann., 241 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of the doctoral thesis was to examine the long-term effects (12 years) of minimum tillage (MT; disturbance done up to 10 cm deep) in comparison with conventional tillage (CT; the ploughing was done 25 cm deep) on the soil physico-chemical properties and microbial community composition at two different pedo-climatic locations in Slovenia, in Ljubljana and Moškanjci. MT caused vertical redistribution of soil organic carbon ( $C_{org}$ ) at both locations; however, the overall stock in the soil profile remained unaffected. Increased  $C_{org}$  content in the 0-10 cm soil layer of MT improved aggregate stability at both locations and water retention properties in Moškanjci. MT increased microbial biomass and caused changes in composition of bacterial 16S rRNA communities at both locations and fungal ITS communities in Moškanjci. The composition of archaeal communities was not affected by the tillage at any location. In 2013, drought in Moškanjci decreased microbial biomass and the abundance of the total bacterial, (cren)archaeal, and fungal communities, as well as the abundance of archaeal (AOA) and bacterial (AOB) ammonia-oxidizing *amoA*, and denitrifying *nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosZII* genes. However, after establishing the normal conditions, all communities reached their initial size. In the 0-10 cm soil layer, at average soil water content and average soil temperature, MT in comparison with CT increased microbial biomass by 49 % and the abundance of the total archaeal and bacterial 16S rRNA and fungal ITS genes (48%, 66%, 34%, respectively), as well as AOA and AOB *amoA* (74%, 42%), *nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosZII* genes (51%, 45%, 45%, 55%). In the 10-20 cm soil layer, MT increased the abundance of the archaeal 16S rRNA and AOA *amoA* genes (71%, 64%) in comparison with CT. In the 10-20 cm soil layer of MT, drought had a smaller impact on the abundance of archaeal 16S rRNA, AOA and AOB *amoA* genes than in CT. In general, we can conclude that MT in the upper 10 cm of soil provided better living conditions for the microbes, regardless of location or weather conditions.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO PRILOG .....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XII
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 OBDELAVA TAL.....	4
<b>2.1.1 Konvencionalna obdelava tal.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2 Ohranitvena obdelava tal.....</b>	<b>5</b>
2.1.2.1 Razširjenost ohranitvene obdelave v svetu.....	7
2.2 TALNI MIKROORGANIZMI .....	8
<b>2.2.1 Okoljski vplivi na talne mikroorganizme .....</b>	<b>10</b>
2.2.1.1 Neposredni dejavniki, ki vplivajo na talne mikroorganizme.....	10
2.2.1.2 Vpliv stresorjev na mikrobne združbe.....	11
<b>2.2.2 Dušikov cikel in transformacije dušika v tleh .....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1 SHEMA IN OPIS POSKUSA.....	17
<b>3.1.1 Ljubljana.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Moškanjci.....</b>	<b>20</b>
3.2 VZORČENJE.....	20

3.3	ANALIZA KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL .....	22
3.4	ANALIZA FIZIKALNIH LASTNOSTI TAL.....	23
3.5	MIKROBIOLOŠKA ANALIZA TAL.....	24
3.5.1	<b>Izolacija DNA .....</b>	<b>25</b>
3.5.2	<b>Merjenje koncentracij in elektroforeza .....</b>	<b>25</b>
3.5.6	<b>Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) .....</b>	<b>28</b>
3.5.7	<b>Kvantitativni PCR v realnem času .....</b>	<b>28</b>
3.5.8	<b>Priprava in izolacija standardov.....</b>	<b>30</b>
3.6	STATISTIČNA ANALIZA .....	30
4	<b>REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
4.1	VPLIV OBDELAVE NA FIZIKALNO-KEMIJSKE IN BIOTSKE LASTNOSTI TAL V LJUBLJANI IN MOŠKANJCIH .....	32
4.1.1	<b>Vpliv obdelave na kemijske lastnosti tal .....</b>	<b>32</b>
4.1.2	<b>Vpliv obdelave na fizikalne lastnosti tal.....</b>	<b>34</b>
4.2	VPLIV OBDELAVE NA STRUKTURO MIKROBNIH ZDRUŽB .....	38
4.2.1	<b>Vpliv obdelave na mikrobno biomaso .....</b>	<b>38</b>
4.2.2	<b>Vpliv obdelave na strukturo mikrobnih združb .....</b>	<b>39</b>
4.2.2.1	Struktura mikrobnih združb v Ljubljani .....	40
4.2.2.2	Struktura mikrobnih združb v Moškanjcih.....	44
4.3	VPLIV SUŠE NA VELIKOST MIKROBNIH ZDRUŽB V MOŠKANJCIH .....	49
4.3.1	<b>Topne oblike ogljika in dušika .....</b>	<b>50</b>
4.3.2	<b>Mikrobna biomasa in splošna mikrobna združba bakterij, gliv in arhej.....</b>	<b>53</b>
4.3.3	<b>Oksidatorji amonijaka in denitrifikatorji.....</b>	<b>58</b>
5	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>63</b>

5.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL V ODVISNOSTI OD OBDELAVE.....	63
5.2	STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE BAKTERIJ, GLIV IN ARHEJ V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL.....	67
5.3	ODZIV MIKROBNIH ZDRUŽB NA SUŠNI STRES V ODVISNOSTI OD OBDELAVE .....	70
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b> .....	<b>80</b>
7.1	POVZETEK .....	80
7.2	SUMMARY .....	83
<b>8</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>86</b>
	ZAHVALA.....	103



## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz načinov obdelave v odvisnosti od intenzitete mehanskih posegov v tla .....	4
Slika 2: Shematski prikaz mikrobnno posredovanega kroženja dušika v tleh .....	13
Slika 3: Organiziranost denitrifikacijskih encimov na celični membrani gram-negativnih bakterij.....	15
Slika 4: Poskusno polje v Ljubljani (levo) in Moškanjcih (desno) .....	17
Slika 5: Evers Agro Vario Disc (Senner) .....	18
Slika 6: Prikaz meritev vodne infiltracije z uporabo cilindričnega dvojnega infiltrometra v Moškanjcih .....	24
Slika 7: Razporeditev strukturnih agregatov po velikostnih frakcijah pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Ljubljani .....	35
Slika 8: Odstotek strukturnih agregatov v Moškanjcih po velikostnih frakcijah pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT).....	35
Slika 9: Stopnja infiltracije v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT).....	37
Slika 10: Skupna DNA koncentracija ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ tal) v Ljubljani (levo) in Moškanjcih (desno) na globini 0-10 cm in 10-20 cm pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) .....	39
Slika 11: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za bakterije v Ljubljani..	41
Slika 12: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za glive v Ljubljani.....	42
Slika 13: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za arheje v Ljubljani.....	43
Slika 14: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za bakterije v Moškanjcih .....	45
Slika 15: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za glive v Moškanjcih ...	46
Slika 16: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0-10 cm in 10-20 cm) za arheje v Moškanjcih..	47
Slika 17: Dnevne vrednosti padavin, temperature tal in matričnega potenciala na polju v Moškanjcih za obdobje od 1. julija do 5. septembra 2013 .....	49
Slika 18: Vsebnost vode v tleh za vsa vzorčenja v Moškanjcih v letu 2013 pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) .....	50
Slika 19: Vsebnost skupne talne DNA ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ tal) v Moškanjcih glede na način obdelave (ohranitvena obdelava – MT in konvencionalna obdelava – CT) za 5 vzorčenj ..	54

Slika 20: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmiraane vrednosti števila kopij *amoA* gena za amonijak oksidirajoče arheje (AOA) in bakterije (AOB) v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja..... 60

Slika 21: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmiraane vrednosti nitrit reducirajočih *nirK* in *nirS* genov v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja..... 61

Slika 22: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmiraane vrednosti N<sub>2</sub>O reducirajočih *nosZI* in *nosZII* genov v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja ..... 62

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti talnega profila poskusnega polja v Ljubljani in v Moškanjcih .....	18
Preglednica 2: Regionalne klimatske razmere za lokacijo v Ljubljani in Moškanjcih v obdobju 1999-2013.....	19
Preglednica 3: Vsebnost $C_{org}$ in TN v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino .....	33
Preglednica 4: Vsebnost rastlinam dostopnega fosforja in kalija v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino.....	34
Preglednica 5: Obstožnost strukturnih agregatov (%) v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino tal .....	36
Preglednica 6: Volumska gostota tal ( $g\ cm^{-3}$ ) in poroznost (%) v Ljubljani in Moškanjcih v različnih globinah tal pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) .....	36
Preglednica 7: Vodno zadrževalne lastnosti tal (%) v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino tal .....	38
Preglednica 8: Število fragmentov pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Ljubljani. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake .....	44
Preglednica 9: Število fragmentov pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Moškanjcih .....	48
Preglednica 10: Linearni mešani modeli s prikazom p-vrednosti in analiza kontrastov za topni organski ogljik (DOC) ter topne in mineralne oblike dušika (DON, $NH_4N$ in $NO_3N$ ) .....	52
Preglednica 11: Linearni mešani model z oceno povprečne vrednosti za topni organski ogljik (DOC) ter topne in mineralne oblike dušika (DON, $NH_4N$ in $NO_3N$ ) pri povprečni vsebnosti vode v tleh in povprečni temperaturi tal s 95% intervali zaupanja .....	53
Preglednica 12: Linearni mešani modeli s prikazom p-vrednosti in analiza kontrastov za številčnost bakterijskih in arhejskih 16S rRNA in glivnih ITS genov ter bakterijski in arhejski <i>amoA</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> in <i>nosZII</i> .....	56
Preglednica 13: Linearni mešani model z oceno povprečne vrednosti za skupno DNA tal, bakterijski in arhejski 16S rRNA, glivni ITS, bakterijski in arhejski <i>amoA</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> in <i>nosZII</i> pri povprečni vsebnosti vode v tleh in povprečni temperaturi tal s 95% intervali zaupanja.....	56

## KAZALO PRILOG

Priloga A: qPCR pogoji.....	104
Priloga B: Stopnja infiltracije v Ljubljani in Moškanjcih v jesenskem in spomladanskem času pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) .....	105
Priloga C: Povprečna skupna DNA koncentracija ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ tal) v Ljubljani in Moškanjcih na globini 0-10 cm in 10-20 cm pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v odvisnosti od časa .....	106
Priloga D: Povprečno število kopij bakterijskih in arhejskih 16S rRNA in glivnih ITS genov v Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na čas vzorčenja.....	107
Priloga E: Povprečne vrednosti za razmerje med posameznimi funkcionalnimi geni N cikla glede na splošno arhejsko in bakterijsko 16S rRNA populacijo ter razmerja med posameznimi geni N cikla v Moškanjcih .....	109
Priloga F: Povprečno število kopij bakterijskih in arhejskih <i>amoA</i> ter denitrifikacijskih <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> in <i>nosZII</i> genov v Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na čas vzorčenja.....	110

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

(q)PCR	(kvantitativna) verižna reakcija s polimerazo
16S rRNA	16S podenota ribosomalne RNA
<i>amoA</i>	Podenota amonij monooksigenaznega encima
AOA	Amonijak oksidirajoče (kren)arheje
AOB	Amonijak oksidirajoče bakterije
C	Ogljik
C <sub>org</sub>	Organski ogljik
CEC	Kationska izmenjala kapaciteta tal
CT	Konvencionalna obdelava z oranjem (ang. conventional tillage)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
EPK	Efektivna poljska kapaciteta (rastlinam dostopna voda)
ITS	Notranji prepisujoči se vmesnik ribosomske DNA (ang. internal transcribed spacer)
DOC	Topni organski ogljik
DON	Topni organski dušik
MT	Minimalna obdelava (ang. minimum tillage)
NT	Način brez obdelave, neposredna setev (ang. no-tillage)
N	Dušik
N <sub>2</sub>	Atmosferski dušik
N <sub>2</sub> O	Didušikov oksid
NH <sub>3</sub>	Amonijak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonijev ion
<i>nirK</i>	Nitrit reduktazni gen z bakrom v aktivnem centru
<i>nirS</i>	Citokrom cd1 nitrit reduktazni gen
NO	Dušikov monoksid
N <sub>2</sub> O	Didušikov oksid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
<i>nosZ</i>	N <sub>2</sub> O-reduktazni gen
TRF	Terminalni restrikcijski fragment
T-RFLP	Polimorfizem dolžine končnih restrikcijskih fragmentov
UPGMA	Metoda neponderirane aritmetične sredine
PK	Sposobnost tal za zadrževanje vode oziroma poljska kapaciteta (ang. water holding capacity – WHC)

## 1 UVOD

Tla so kompleksen in dinamičen ekosistem, sestavljen iz organskih in mineralnih delcev ter živih organizmov. Velik pomen za delovanje tal imajo ravno organizmi. Biomasa, pestrost in aktivnost združb so odvisni od klimatskih razmer, vegetacije, lastnosti in rabe tal. Največ organizmov se nahaja v površinskem delu tal, kjer je največ hranil in so tla najbolj prezračena. Tako v gramu tal najdemo več kot milijardo bakterij in gliv (Curtis in Sloan, 2005), v nekaj cm<sup>3</sup> pa tudi več sto tisoč vrst talnih živali (praživali, ogorčic, žuželk, deževnikov) (Wu in sod., 2009). Ti organizmi sodelujejo v številnih procesih v tleh, kot je nastajanje strukturnih agregatov, kroženje ogljika in nastanek humusa, kroženje hranil in razgradnja onesnažil.

Tradicionalen (konvencionalni) način obdelave, ki temelji na globokem oranju in naknadni dopolnilni obdelavi, je še vedno prevladujoča oblika obdelave tal v številnih predelih sveta, saj omogoča dobro pripravo setvene površine, dobro zaoravanje žetvenih ostankov in plevelov, povečuje mešanje hranil v profilu ter preprečuje zadrževanje vode na površju (Soane in sod., 2012). Kljub temu pa konvencionalna obdelava pogosto vodi v degradacijo talnih agregatov in izgubo organske snovi. Posledično prihaja do spremembe v biotskem in kemijskem okolju (Young in Ritz, 2000), kar lahko vodi v zbijanje, površinsko odtekanje in erozijo tal ter povzroča izrazite spremembe v sestavi talnih mikroorganizmov in procesih, ki jih ti izvajajo (Roger-Estrade in sod., 2010).

Med alternativna načina konvencionalnemu oranju uvrščamo (i) način brez obdelave (neposredna setev) in (ii) ohranitveno obdelavo tal za katero v splošnem velja, da je površina pokrita z najmanj 30 % rastlinskih ostankov. V dosedanjih študijah so že mnogi avtorji potrdili pozitiven vpliv minimalne obdelave na številne fizikalno-kemijske lastnosti tal, kot so izboljšanje strukture tal, povečanje sposobnosti zadrževanja vode in povečanje zalog organske snovi v tleh (Yaduvanshi in Sharma, 2008; Tabaglio in sod., 2009; Perez-Brandan in sod., 2012), medtem ko drugi značilnih razlik ne ugotavljajo, oziroma so bile te minimalne (Rasmussen, 1999; Gomez-Rey in sod., 2012; Bayer in sod., 2012).

Ker ohranitvena obdelava izboljšuje fizikalno-kemijske lastnosti tal (naštete v zgornjem odstavku), sklepamo, da pozitivno vpliva tudi na velikost, strukturo in pestrost talnih mikrobnih združb. Na mikrobno populacijo namreč v veliki meri vplivajo vodno-zračne razmere v tleh in vsebnost organske snovi (Doran in sod., 1998). O večji vsebnosti organske snovi in povečani mikrobni aktivnosti v zgornjem sloju pri ohranitveni obdelavi so poročali že številni raziskovalci (Bailey in sod., 2002; Spedding in sod., 2004; Minoshima in sod., 2007; Helgason in sod., 2009; Wang in sod., 2012), medtem ko raziskav o vplivu ohranitvene obdelave na mikrobno posredovane procese v tleh, kot sta na primer nitrifikacija in denitrifikacija, primanjkuje, oziroma so si rezultati študij nasprotujoči.

Učinek ohranitvene obdelave tal na fizikalne, kemijske in biotske lastnosti tal je odvisen tudi od specifičnih pedo-klimatskih razmer, v katerih se poskusi izvajajo, ter trajanja poskusov. Študije so pokazale, da so učinki ohranitvene obdelave na tla kratkoročno gledano neopazni in postanejo izraziti šele na dolgi rok (Six in sod., 2004), zato je potrebno postaviti dolgoletne poskuse, če želimo poiskati najustreznejši način obdelave za določen talni tip in določene klimatske razmere.

Biotehniška fakulteta izvaja dolgoletni poskus primerjave konvencionalne (oranja) in ohranitvene (minimalne) obdelave že od leta 1999 v dveh pedo-klimatsko različnih okoljih Slovenije v osrednjem delu, v Ljubljani in v severovzhodnem delu države, v Moškanjcih. Za poskusno polje v Ljubljani je značilno kontinentalno podnebje z večjo povprečno letno količino padavin za približno 460 mm v primerjavi z Moškanjci, kjer imamo subpanonsko podnebje, za katero so poleti značilna sušna obdobja. Lokaciji se razlikujeta v tipu tal (psevdoglej, evtrična rjava tla) in posledično v talnih lastnostih, na primer v teksturi tal. Tla v Ljubljani so teksturno težja (večji delež gline), medtem ko so tla v Moškanjcih teksturno lažja ter z večjim deležem skeleta.

V zadnjem obdobju je aktualno predvsem vprašanje globalnih podnebnih sprememb, ki vplivajo na časovno in prostorsko razporeditev padavin ter povzročajo ekstremne vremenske pojave (suše in nevihte), ki so v zadnjih letih vse pogostejši tudi v Sloveniji (Brenčič, 2012). Podnebni modeli napovedujejo za 5–15 % zmanjšanje vsebnosti vode v zgornjih 10 cm tal do konca stoletja, kar predstavlja resno grožnjo za kmetijstvo (Dai, 2012). Podnebne spremembe v veliki meri vplivajo tudi na obseg in pogostost sušno-deževnega cikla, kar predstavlja velik stres za talne mikroorganizme (Borken in Matzner, 2009). Ti so zaradi hitre odzivnosti lahko zelo dobri indikatorji okoljskih sprememb. Spremembe v vsebnosti vode se direktno odražajo na mikrobnih biomasi, vplivajo pa tudi na fizikalno-kemijske lastnosti tal (Ouyang in Li, 2013), zato je v ospredju vprašanje, kaj se v teh spremenjenih razmerah dogaja z mikrobnimi procesi. Kako se mikroorganizmi odzovejo na pomanjkanje vode? Kaj se zgodi, ko se tla ponovno navlažijo? Tako se je v zadnjem obdobju povečalo število raziskav, ki s simulacijo bodočih podnebnih razmer (sušno-navlaževalni cikli in povišanje temperature) preučujejo odziv mikrobnih združb na nastale stresne razmere (Cantarel in sod., 2012; Placella in Firestone, 2013; Hartmann in sod., 2013; Gschwendtner in sod., 2014). Kljub temu pa raziskav, ki bi preučevale vpliv ohranitvene obdelave na odziv splošne ali funkcionalne mikrobne združbe ob pojavu suše, po naših informacijah, za zdaj še ni.

Z razvojem in uporabo kvantitativne PCR metode v realnem času (qPCR) lahko določimo številčnost glavnih mikrobnih akterjev celotnega N cikla, kot so fiksatorji, amonifikatorji, nitrifikatorji in denitrifikatorji dušika. Glavna tarča kvantitativnih študij o mikroorganizmih, vpletenih v dušikov cikel, so funkcionalni geni, ki kodirajo encime štirih glavnih procesov: fiksacije (*nifH*), mineralizacije (*chiA*, *aprA*), nitrifikacije (*amoA* AOB,

*amoA* AOA, *nxrA*) in denitrifikacije (*narG*, *nirS/K*, *napA*, *nosZ*). Fiksacijo dušika prvenstveno določa izbira rastline (poleg vsebnosti dostopnega dušika v tleh), medtem ko so procesi mineralizacije, nitrifikacije in denitrifikacije močno odvisni od fizikalno-kemijskih razmer v tleh in agrotehničnih ukrepov, kot so na primer vnosi organske snovi, gnojenje z N ter obdelovanje tal (He in sod., 2007; Hallin in sod., 2009; Fischer in sod., 2013; Santi in sod., 2013).

Glavni cilj doktorskega dela je v prvem delu ovrednotiti dolgoročne učinke ohranitvene obdelave na glavne fizikalno-kemijske lastnosti tal ter posledično na velikost in taksonomsko pestrost mikrobnih združb (arhej, bakterij in gliv) na obeh pedo-klimatskih lokacijah. Cilj drugega dela naloge je tudi ovrednotiti učinke obdelave na funkcionalno pestrost izbranih ključnih genov dušikovega cikla ob naravnem pojavu suše v Moškanjcih.

V doktorskem delu predpostavljamo, da:

- (i) je učinek ohranitvene obdelave na fizikalno-kemijske lastnosti tal (vsebnost organske snovi, obstojnost strukturnih agregatov, vodne lastnosti tal) drugačen v pedo-klimatskih pogojih poskusnega polja v Moškanjcih v primerjavi z Ljubljano, ter da se bodo spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih odrazile tudi v strukturi mikrobne združbe arhej, bakterij in gliv na obeh lokacijah;
- (ii) je stresni učinek suše na mikrobno biomaso in funkcionalno pestrost izbranih tarčnih genov N cikla (*amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZ*) pri ohranitveni obdelavi manjši, ter da je s tem stabilnost ekosistema pri ohranitveni obdelavi večja.

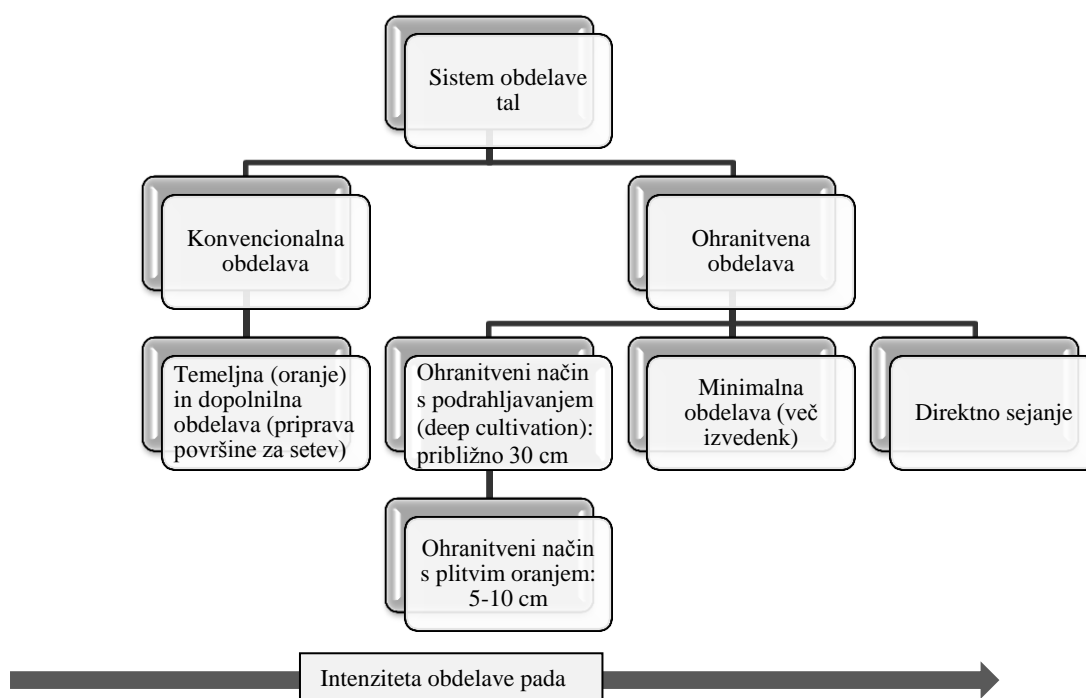


## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OBDELAVA TAL

Glavni namen obdelave tal je priprava sejalne površine, ki bo omogočila optimalno rast in razvoj rastlin, ki bodo dale velik in zanesljiv pridelek. Pri obdelavi tla z različnimi mehanskimi procesi obračamo, drobimo, mešamo in rahljamo (Mrhar, 2002). Namen obdelave tal je optimizacija njene pridelovalne sposobnosti z izboljšanjem fizikalnih, kemijskih in biotskih lastnosti tal (Gajri in sod., 2002).

Tako v Sloveniji kot tudi v večini evropskih držav je še vedno prevladujoč način obdelovanja tal tradicionalna, konvencionalna obdelava tal z lemežnim plugom, medtem ko v svetovnem merilu poleg konvencionalne ločimo še ohranitveno obdelavo. Oba načina se med seboj razlikujeta v intenzivnosti in številu mehanskih posegov v tla (Sl. 1).



Slika 1: Shematski prikaz načinov obdelave v odvisnosti od intenzitete mehanskih posegov v tla (Morris in sod., 2010)

### **2.1.1 Konvencionalna obdelava tal**

Tradicionalen način konvencionalne obdelave tal je sestavljen iz temeljne in dopolnilne obdelave. K temeljni obdelavi, katere namen je priprava tal, ki bo omogočila optimalno rast in razvoj rastlin, sodi oranje, globinsko rahljanje, rigolanje. Osnovno obdelavo tal največkrat predstavlja oranje in uporaba najstarejšega kmetijskega orodja, pluga. Lemežni plug tla obrne, zrahlja, zdrobi ter zaorje žetvene ostanke preteklega setve, plevela in hlevski gnoj. Dopolnilna obdelava pa tla površinsko poravnava ter zdrobi grude na površju. K dopolnilni obdelavi, katere naloga je omogočiti kakovostno setev, dober in izenačen vznik rastlin, pa sodijo brananje, ravnanje, valjanje, osipavanje itd. (Mrhar, 2002).

Prednost konvencionalne obdelave je vsekakor, da omogoča dobro mešanje in rahljanje tal, kar olajša sejanje. Prav tako omogoča dobro homogenost vsebnosti hranil v ornici in povečuje površinsko odtekanje vode, kar omogoča pripravo bolj suhe in toplejše setvene površine, ter na ta način omogoča dobro in enakomerno kalitev semen. Poleg tega predstavlja zelo učinkovit sistem pri zatiranju plevelov, saj jih zaorje skupaj z rastlinskimi ostanki prejšnje setve in z gnojili, kar poveča količino pridelka in kratkoročno zmanjša tveganje za razvoj bolezni. Prednost oranja je tudi v sproščanju hranil preko mineralizacije in oksidacije izpostavljenih organskih snovi, ki jih rastline potrebujejo za rast (Hobbs in sod., 2008; Soane in sod., 2012). Še posebno učinkovita in priporočena je za slabo strukturna in zbita tla, saj jih začasno zrahlja in prezrači (Morris in sod., 2010). Večina kmetov je še vedno mnenja, da dobra agronomska praksa vključuje oranje, saj to zagotavlja velik pridelek, optimalno pripravo setvene površine in uničenje plevelov (Jones in sod., 2006).

Vendar pa konvencionalna obdelava kljub vsem svojim pozitivnim lastnostim lahko pogosto vodi v poslabšanje kakovosti tal. Pri konvencionalni obdelavi so rastlinski ostanki prejšnje setve ponavadi popolnoma zaorani in je površina tal tako izpostavljena negativnim okoljskim dejavnikom, kar lahko povzroči degradacijo talne strukture in vodi v zbijanje in izpiranje tal, erozijo, izgubo organskih snovi in spremembe v strukturi talnih organizmov, kot so deževniki, plenilske žuželke in talni mikroorganizmi (Sullivan, 2004; Soane in sod., 2012).

### **2.1.2 Ohranitvena obdelava tal**

Konvencionalno oranje ima brez dvoma kratkoročno številne prednosti, ki kmetom olajšujejo delo, vendar dolgoročno vodi v degradacijo naravnih virov, od katerih je kmet odvisen (Hobbs in sod., 2008). Ena od možnih rešitev za ohranjanje in/ali izboljšanje kakovosti tal je prehod na ohranjevalne načine obdelave tal. Z oranjem se sloji tal premešajo, pri čemer pride do sproščanja prej zaščitene organske snovi neposredno preko fizičnega uničenja strukturnih agregatov kot tudi posredno preko izpostavitve organske

snovi sušno-navlaževalnim in zamrzovalno-talilnim ciklom. Posledično se zaradi povečane prezračenosti in dostopnosti organske snovi začasno močno poveča mikrobnost aktivnost (Six in sod., 2004), kar privede do pospešene razgradnje organske snovi in izhajanja ogljikovega dioksida (CO<sub>2</sub>) v atmosfero (Lal, 1997). Pri ohranitveni obdelavi tla le rahlo dvignemo in tako slojev ne obračamo. Posledično ostanejo tla kot življenjski prostor bolj ohranjena, kar lahko vpliva tudi na velikost, heterogenost in aktivnost koristnih združb mikroorganizmov ter ostalih talnih organizmov (Young in Ritz, 2000). Med alternativne načine konvencionalnemu oranju uvrščamo vse načine z zmanjšanim mehanskim posegom v tla, za katere v splošnem velja, da je površina tal pokrita z vsaj 30 % rastlinskih ostankov, oziroma načine brez ločene faze obdelave pred setvijo, ki temeljijo na tako imenovani neposredni setvi (»no-tillage«) (Hobbs in sod., 2008).

Skozi zgodovino se je orodje za obdelavo tal spreminjalo in izboljševalo glede na specifične zahteve talnega tipa, klimatskih razmer in zahteve pridelkov (Morris in sod., 2010). Tako so se začela razvijati tudi orodja, ki omogočajo minimalne mehanske posege v tla in s tem tudi širjenje ohranitvenega načina obdelave z zmanjšano intenziteto/številom mehanskih posegov v tla. Sistem ohranitvene obdelave se je začel razvijati v ZDA okoli leta 1940, za prihod prvih komercialno uspešnih orodij na tržišče pa je bilo potrebno počakati do 60-ih let prejšnjega stoletja. Poznamo več variant ohranitvene obdelave, ki jih delimo v pet kategorij (Conservation ..., 2015):

- neposredna setev (no-tillage): obdelava tal zgolj v območju setvene brazdice ter setev (lahko tudi gnojenje in varstvo rastlin) v enem prehodu v predhodno neobdelana tla;
- obdelava z mulčenjem (mulch tillage): pred setvijo je celotna površina tal plitvo (do približno 12 cm globoko) obdelana z različnimi orodji;
- setev v trakovih (strip tillage): sejalna površina je razdeljena na trakove v sejnalno, 5–10 cm široko cono, ki je mehansko obdelana in medvrstno, neobdelano cono;
- setev na grebene (ridge tillage): pred setvijo je približno ena tretjina površine obdelana in oblikovana v ozke grebene, ki so rahlo dvignjeni nad talno površino;
- minimalna obdelava (minimum tillage): vsi preostali načini obdelave, kjer po setvi rastlinski ostanki pokrivajo vsaj 30 % površine tal.

Glavna prednost ohranitvene obdelave je ohranjanje kakovosti tal ter zmanjšanje časa, energije in stroškov pridelave (Baker in sod., 2007b; Soane in sod., 2012). Prav tako preprečuje dvigovanje večjega skeleta iz spodnjih slojev tal na površje. Pri ohranitvenem načinu obdelave so tla vsaj delno prekrita z rastlinskimi ostanki, ki služijo kot zaščita pred vremenskimi vplivi, saj rastlinski ostanki ublažijo erozijsko silo vode, preprečujejo zastajanje in odtekanje vode s površine tal ter tako omejuje izpiranje hranil, rušenje strukture tal in zaskorjenost. Poleg tega v poletnih mesecih ščitijo tla pred direktno sončno energijo in omejujejo evaporacijo. Prav tako ne ruši makropor, glavnih vodnih poti v tleh,

kar posledično izboljša infiltracijo in preprečuje odtekanje vode ter tako ohranja vodne lastnosti tal (Sullivan, 2004; Hobbs in sod., 2008; Soane in sod., 2012).

Kljub vsem naštetim prednostim ima ohranitvena obdelava tudi slabosti. Glavni problem predstavlja tveganje za izgubo pridelka zaradi neprimerne orodja. Potreba po novi strojni opreми namreč predstavlja velik finančni zalogaj, ki si ga večina kmetov ne more privoščiti (Baker in sod., 2007b; Soane in sod., 2012). Velik problem ohranitvene obdelave so vsekakor škodljivci, ki rastlinske ostanke uporabijo kot zavetje pred neugodnimi razmerami. Patogene bakterije in glive ter žuželke pri konvencionalnem oranju zaorjemo skupaj z rastlinskimi ostanki in jih na ta način uničimo, medtem ko pri ohranitveni obdelavi ti patogeni ostanejo, kar lahko povzroči porast nekaterih bolezni in posledično povečano uporabo pesticidov. V določeni meri lahko ta problem rešimo s kolobarjem in tako preprečimo patogeno na ostankih iz prejšnje setve, da bi se še naprej razmnoževal. Rastlinski ostanki služijo tudi kot zavetišče za predatorje patogenov, ki patogene skozi prehranjevalno verigo odstranijo (Baker in sod., 2007b). Podobno težavo predstavljajo pleveli, ki jih pri konvencionalni obdelavi skupaj s semeni zaorjemo, medtem ko pri ohranitvenem načinu ta problem rešujemo z ustreznim kolobarjem, ki vključuje poljščine, posejane v različnem sezonskem obdobju (npr. jeseni in spomladi), enoletnice in trajnice ter uporabo različnih herbicidov (Nichols in sod., 2015). Poleg zgoraj naštetega ohranitvena obdelava lahko povzroča zbitost vrhnjega sloja tal (Soane in sod., 2012).

#### 2.1.2.1 Razširjenost ohranitvene obdelave v svetu

Uveljavljanje ohranitvene obdelave se je začelo v ZDA, hitro pa so ji sledile Brazilija, Argentina in Avstralija, predvsem zaradi težav z erozijo (Lahmar in sod., 2010). Danes je ohranitvena obdelava razširjena tako rekoč v vseh pedo-klimatskih okoljih, tudi takšnih, ki so pred tem veljala za poljedelsko neustrezna. Ohranitvena obdelava se je uveljavila vse od arktičnega predela (npr. Finska), preko tropov (npr. Kenija) in sega globoko v južno poloblo (Falklandski otoki). Najdemo jo tako v nižinskem kot tudi v višinskem delu, vse do 3000 m nadmorske višine (npr. Bolivija, Kolumbija), v ekstremno suhih predelih z manj kot 250 mm letnih padavin (zahodna Avstralija, severna Kitajska) kot tudi ekstremno mokrih predelih s 3000 mm letnih padavin (Čile). Ohranitvena obdelava se je uspešno uveljavila na kmetijah, manjših od polovice hektarja (Kitajska, Zambija), vse do kmetij z več tisoč hektarji (Avstralija, Brazilija, ZDA) (Kassam in sod., 2009; Derpsch in sod., 2010). Prav tako je razširjena na različnih talnih tipih, vse od takšnih z 90 % peska (Avstralija) do takšnih z 80 % gline (Brazilija). Širok spekter pogojev, kjer se je ohranitvena obdelava uspešno uveljavila, njene ekonomske, socialne in okoljske prednosti in prepoznavanje kot resnično trajnostnega sistema, bi morala zagotoviti hitro širjenje te tehnologije v svetu. Čeprav v nekaterih državah (kot so Brazilija, Argentina in Paragvaj) pridelava hrane z uporabo enega izmed načinov ohranitvene obdelave, predvsem sistemom brez obdelave, predstavlja 50 % ali več, je v svetovnem merilu le 5–10 % hrane pridelane z

uporabo tega načina obdelave (Baker in sod., 2007b). Glavne ovire za njeno uveljavljanje so pomanjkanje znanja, tradicija in prepričanje kmetov, neustrezna politika in premalo subvencij, razpoložljivost mehanizacije in ustreznih herbicidov za zatiranje plevelov (Derpsch, 2010). Nasprotujoči si rezultati raziskav o vplivih ohranitvene obdelave in dejstvo, da se spremembe v obdelavi odrazijo šele na dolgi rok, so vsekakor razlogi za manjšo zainteresiranost kmetov za prehod na ta način obdelave.

Razlog za prenos ohranitvene obdelave v Evropo je predvsem ekonomske narave. Učinke ohranitvene obdelave, predvsem zmanjšanje stroškov proizvodnje, so intenzivno preučevali na različnih delih Evrope že med leti 1960 in 1990, vendar je kljub začetnemu interesu malo poročil o raziskavah na tem področju (Soane in Ball, 1998; Rasmussen, 1999; Holland, 2004; Deumlich in sod., 2006). Vpliv ohranitvene obdelave na strukturo tal, vodne lastnosti, vsebnost organske snovi in hranil, populacijo deževnikov in talnih mikroorganizmov ter zbijanje in erozijo tal je v Evropi zelo malo raziskan, saj je sprejemanje ohranitvene obdelave med evropskimi kmeti v primerjavi z ostalimi svetovnimi regijami še vedno zelo majhno (Lahmar in sod., 2010).

## 2.2 TALNI MIKROORGANIZMI

Tla so kompleksen ekosistem, ki je nastal kot poledica številnih zapletenih interakcij med fizikalnimi, kemijskimi ter biološkimi procesi, ki se spreminjajo tako v makro in mikroprostoru kot tudi v času. Tla predstavljajo habitat številnim talnim organizmom. S svojimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot so: vsebnost organske snovi, pH in redoks potencial, izrazito vplivajo na dinamiko mikrobnih združb (Lombard in sod., 2011; Raynaud in Nunan, 2014). Vloga mikroorganizmov v tleh je izjemnega pomena, predvsem zaradi njihove vpletenosti v večino bioloških transformacij ter nastanek in kopičenje stabilnih in biodostopnih zalog C in N (Schulz in sod., 2012). V tleh najdemo širok spekter taksonomsko, strukturno in funkcionalno različnih skupin, vse od prostoživečih bakterij do posameznih gliv, ki lahko pokrivajo več kvadratnih kilometrov površin (Harris, 2009), vendar je razumevanje njihove pestrosti in strukture in s tem vloge v mikrobnouposredovanih procesih še vedno relativno majhno.

Molekularno sekvenciranje na podlagi rRNA genov je pokazalo, da se organizmi delijo v tri glavne domene: bakterije, arheje in evkarionte. Najštevilčnejši predstavnik talnih mikroorganizmov so bakterije z  $10^8$  celic na gram tal in vrstno pestrostjo med  $10^3$  in  $10^6$  na gram tal (Raynaud in Nunan, 2014). Sledile naj bi jim arheje, vendar splošne ocene za talni ekosistem še ni, ter glive z do  $10^6$  celic na gram tal (Hartel, 2005). Na podlagi raziskav v morskem ekosistemu naj bi arheje imele le do 10-krat manjšo pestrost kot bakterije (Galand in sod., 2009).

Kot najbolj zastopan predstavnik talnih mikroorganizmov, ki vpliva na številne procese v tleh, so bakterije najbolj preučevana domena (Pereira e Silva in sod., 2012; Raynaud in Nunan, 2014). Pregled 16S rRNA genomskih knjižnic je pokazal, da se talne bakterije razvrščajo v vsaj 32 debel, med katerimi prevladujejo Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes in Firmicutes. Med njimi so proteobakterije in acidobakterije najbolj zastopani predstavniki talnih bakterij (Janssen, 2006). Med proteobakterijami pomemben delež predstavljajo bakterije, ki v rizosferi tvorijo interakcije s koreninami in s kolonizacijo korenin spodbujajo rast rastlin preko zalaganja rastlin s hranili, produkcijo rastlinskih hormonov in inhibicijo rastlinskih patogenov. Poleg fiksacije dušika imajo med proteobakterijami pomembno vlogo tudi nitrifikatorji, ki amonijak pretvarjajo v bolj dostopno obliko, nitrat. Veliko vlogo, poleg omenjenih skupin bakterij, imajo tudi bakterije, ki sodelujejo v procesih mineralizacije, transformacije in imobilizacije elementov ter s tem njihovem globalnem kroženju (Hayat in sod., 2010).

Veliko vlogo v tleh imajo tudi glive, ki predstavljajo tako večino znanih rastlinskih patogenov kot tudi pomembne razgrajevalce organske snovi in simbiote (Bridge in Spooner, 2001; Tedersoo in sod., 2014). Posebno vlogo imajo saprofitske glive, ki z izločanjem encimov omogočajo razgradnjo kompleksnih, težje razgradljivih organskih ostankov, zaradi česar saprofitske glive dominirajo v razgradnji rastlinskega materiala, kot je celuloza, hemiceluloza in lignin. Poleg tega sodelujejo v heterotrofni respiraciji in predstavljajo ključne dejavnike v procesu kroženja ogljika (Crowther in sod., 2012). Prav tako imajo v talnem ekosistemu pomembno vlogo mikorizne glive, ki s kolonizacijo korenin povečajo zalogo rastlinam dostopnih hranil in vode, nudijo zaščito pred talnimi patogenimi organizmi in ovirajo rast kompetitorskih rastlinskih vrst v neposredni bližini njihove gostiteljske rastline. Poznamo različne tipe mikorize, najpogostejša oblika, ki je prisotna pri okrog 80 % višjih rastlinah, pa je arbuskularna mikoriza (AM) (van der Heijden in sod., 2008).

Vse odkar so bile arheje priznane kot ločena domena, je veljalo prepričanje, da jih pretežno najdemo le v ekstremnih ekosistemih, vendar je z razmahom naprednih molekularnih tehnik postalo jasno, da so arheje pomemben dejavnik tudi v vodnem in talnem ekosistemu (DeLong in Pace, 2001; Timonen in Bomberg, 2009), saj naj bi po nekaterih ugotovitvah predstavljale 20–30 % vseh prokariotov v morskem ekosistemu (Stoica in Herndl, 2007) in do 38 % v tleh (Kemnitz in sod., 2007). Napredek v razumevanju te domene mikroorganizmov so prinesle nedavne raziskave, ki zaradi sekvenciranja številnih arhejskih genomov vključujejo odkritje novih taksonomskih skupin arhej, vključno z amonijak oksidirajočimi arhejami (Schleper in sod., 2005; Walker in sod., 2010). Kljub temu pa je znanje in razumevanje arhej v talnem ekosistemu še vedno zelo omejeno. Z uporabo 16S rRNA so v morskem ekosistemu identificirali dve glavni skupini, imenovani skupina I in II. V skupino I spadajo arheje iz debla Crenarchaeota, v skupino II pa iz debla

Euryarchaeota (Brochier-Armanet in sod., 2008; Stahl in Torre, 2012). Po preteklih raziskavah naj bi v tleh prevladovale predvsem skupine iz debela Crenarchaeota, v katerem naj bi pomembno funkcijo imeli nitrifikatorji (Leininger in sod., 2006; Nicol and Schleper, 2006). Vendar pa večina raziskav, ki preučuje vlogo arhej v procesu nitrifikacije, podaja nasprotujoče si rezultate glede splošne pomembnosti arhej v procesu oksidacije amonijaka (Nicol in sod., 2004; Le Roux in sod., 2008; Tourna in sod., 2008; Jia in Conrad, 2009; Offre in sod., 2009). Na podlagi pregleda genomskih sekvenc so pred kratkim ugotovili, da se v skupini krenarhej (Crenarchaeota), v katero so bile sprva vključene tako mezofilne kot tudi hipertermofilne krenarheje, mezofilne krenarheje močnejše razlikujejo od hipertermofilnih, zato so Brochier-Armanet in sod. (2008) to skupino predlagali kot ločeno, tretje deblo, imenovano Thaumarchaeota, med katere sodijo tudi do sedaj znane amonijak oksidirajoče arheje (Stahl in Torre, 2012).

## **2.2.1 Okoljski vplivi na talne mikroorganizme**

Mikrobne združbe so v tleh odvisne od številnih kompleksnih interakcij med talnimi (tekstura, struktura, velikost por, globina, pH, CEC, vsebnost hranil, prezračenost) in klimatskimi dejavniki (temperatura, količina in razporejenost padavin) ter vegetacijo (koreninski sistem, rastlinski ostanki) (Hartel, 2005; Voroney, 2007). Naštete okoljske dejavnike lahko ločimo na tiste s posrednim in tiste z neposrednim učinkom. Med neposredne dejavnike v prvi vrsti sodijo dostopne oblike C in hranil, vsebnost vode v tleh, temperatura in pH (Brady im Weil, 2008). Dejavniki s posrednim vplivom pa so geografska širina, nadmorska višina, regionalni klimatski pogoji, globina, matična podlaga, raba tal, čas od zadnjega posega v tla in tip vegetacije. Z antropogenimi posegi v okolje, na primer z rabo tal, obdelavo, kolobarjem ter uporabo gnojil in fitofarmaceutskih sredstev, prav tako vplivamo na aktivnost, velikost, pestrost in strukturo mikrobnih združb (Brady im Weil, 2008).

Čeprav so posamezni učinki nekaterih dejavnikov na mikrobno združbo v tleh dobro raziskani v kontroliranih laboratorijskih pogojih, pa vpliv interakcij med samimi talnimi in klimatskimi dejavniki in vegetacijo ter njihove medsebojne interakcije v naravnih pogojih na mikrobne združbe, še vedno niso povsem jasni.

### **2.2.1.1 Neposredni dejavniki, ki vplivajo na talne mikroorganizme**

Organska snov tal je eden izmed najpomembnejših kazalcev kakovosti tal, ki vpliva na številne druge talne lastnosti (Grčman in Zupan, 2010). Organska snov je kompleksna in dinamična komponenta tal, ki je sestavljena iz živih organizmov, odmrlih rastlinskih in živalskih ostankov ter humusa (Leštan, 2001). Humus predstavlja stabilno zalogo organske snovi, ki je zaščitena pred mikrobno razgradnjo in tako predstavlja dolgoročno zalogo hranil. V tleh je humus povezan z glinenimi mineralnimi delci in tvori organsko-mineralne

komplekse, ki so zelo odporni na mikrobno razgradnjo in se v nekaterih tleh zadržijo tudi do 2000 let (Leštan, 2001). Nasprotno pa mikrobna biomasa in lahko razgradljive organske spojine predstavljajo aktivno, dinamično komponento organske snovi, kjer ob ustreznih pogojih pospešeno poteka mineralizacija (Brady in Weil, 2008). Kljub temu, da C v mikrobni biomasi predstavlja le 1–2 % celotnega C v organski snovi tal, ima ta del ključno vlogo, saj mikroorganizmi, kot glavni razgrajevalci organske snovi sodelujejo pri kroženju hranil, nastajanju strukturnih agregatov in vzdrževanju strukture tal (Brady in Weil, 2008). Na vsebnost organske snovi v tleh vplivajo številni klimatski (temperatura, vlaga) in talni dejavniki (vsebnost hranil, talni pH, tekstura tal), pa tudi antropogeni posegi v okolje (raba tal, intenzivnost obdelave) (Grčman in Zupan, 2010).

Na bakterijske in glivne združbe vpliva tudi pH (Wakelin in sod., 2008). Večina mikroorganizmov pretežno živi v nevtralnem okolju, saj je ravno v pH območju med 6–7 največja dostopnost večine hranil, najdemo pa tudi združbe, ki so sposobne tolerirati široke razpone pH (Hartel, 2005). V splošnem naj bi veljalo, da so glive manj občutljive na spremembe v pH tal kot bakterije (Lauber in sod., 2008).

Med dejavnike z neposrednim vplivom na mikrobne združbe sodita tudi temperatura in vsebnost vode v tleh. V kmetijskih tleh ima večina bakterij in gliv temperaturni optimum za rast med 25–30 °C, medtem ko odmik od optimuma lahko povzroči spremembe v strukturi mikrobne združbe. Tako so ugotovili, da povišanje temperature negativno vpliva na glive, kar vodi v zmanjšanje razmerja med glivami in bakterijami, medtem ko znižanje temperature slabše prenašajo bakterije - posledično pride do povečanja razmerja med glivami in bakterijami (Pietikainen in sod., 2005).

Na podoben način vpliva tudi vsebnost vode v tleh. Ta je sicer v prvi vrsti odvisna od vodno-zadrževalnih lastnosti tal in podnebja, vendar na količino vode v nekem trenutku na dani lokaciji določajo trenutne vremenske razmere. Zmanjšanje vsebnosti vode bolje prenašajo glive, ki jim hifni sistem omogoča dostop do globljih predelov tal, medtem ko so bakterije od vode precej bolj odvisne, saj zmanjšanje vsebnosti vode omeji dostopnost hranil, povečanje pa zmanjša prezračenos tal, kar vpliva na njihovo aktivnost (Uhlirova in sod., 2005; Evans in Wallenstein, 2012). Po dosedanjih raziskavah je optimalna vsebnost vode za nekatere aerobne procese, kot je nitrifikacija, pri 50–60 % poljski kapaciteti (Linn in Doran, 1984), medtem ko anaerobni procesi, kot je denitrifikacija, zahtevajo med 80–100 % zapolnjenost por z vodo (Li in sod., 2014).

#### 2.2.1.2 Vpliv stresorjev na mikrobne združbe

Mikrobne združbe so v okolju podvržene številnim negativnim vplivom, ki lahko vplivajo na njihovo funkcijo v okolju in v končni fazi tudi na preživetje v stresnih situacijah, kot so suša, zmrzovanje, visoke temperature, pomanjkanje kisika in prisotnost toksičnih spojin



(Wang in sod., 2010). V stresnih pogojih lahko mikroorganizmi iz rastle faze preidejo v stacionarno fazo, v hudih stresnih razmerah pa tudi v fazo mirovanja in celo smrt (Ouyang in Li, 2013).

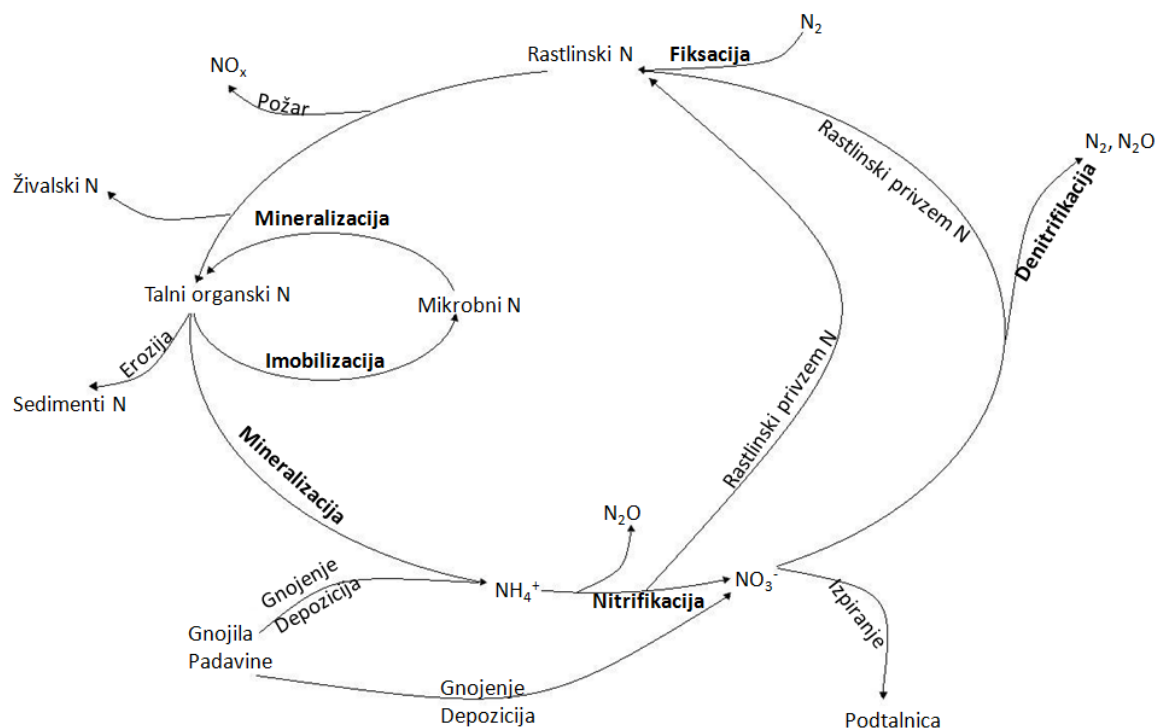
Klimatske spremembe z ekstremnimi sušami in padavinami vplivajo na spremembe v vsebnosti vode v tleh, kar predstavlja stres za talne mikroorganizme, zato se je potreba po razumevanju in napovedovanju mikrobnih posredovanih procesov še povečala. Mikrobne združbe se lahko na sušni stres odzovejo na različne načine. Nekateri kopičijo ozmolite (topljenice), ki jih po navlaževanju razgradijo ter na ta način zmanjšujejo ozmotski pritisk v celicah in preprečujejo dehidracijo. Mikroorganizmi, ki stresa ne morejo tolerirati, lahko preidejo v dormantno stanje, sporulirajo in v najslabšem primeru odmrejo (Ouyang in Li, 2013).

Mikrobne združbe, ki so bile v preteklosti izpostavljene stresnim dejavnikom, kot so na primer vodni stres (Fierer in sod., 2003), zamrzovalni-odtaljevalni cikli (Schimel in sod., 2007) in sušno-navlaževalni cikli, se lahko na te dejavnike prilagodijo in postanejo nanje manj občutljive v primerjavi s tistimi, ki tem vplivom niso bile izpostavljene (Evans in Wallenstein, 2012).

Odziv mikrobnih združb na motnje in stabilnost ekosistema lahko spremljamo preko dveh parametrov: odpornosti, tj. sposobnost mikrobne združbe, da v času trajanja motnje ostane nespremenjena (ang. resistance) in prožnosti, tj. sposobnost mikrobne združbe, da se po koncu motnje vrne v začetno stanje (ang. resilience) (de Vries in Shade, 2013).

### **2.2.2 Dušikov cikel in transformacije dušika v tleh**

Dušik (N) je najbolj zastopan element v naravi, ki je prisoten v atmosferi, litosferi in hidrosferi in predstavlja esencialno hranilo, ki ga tako rastline kot mikroorganizmi potrebujejo za izgradnjo aminokislin. Kroženje dušika med zrakom, tlemi, rastlinami in ostalimi živimi organizmi najlažje opisujemo z dušikovim ciklom, ki je eden najpomembnejših biogeokemičnih ciklov v naravi. Kroženje dušika sestavljajo štirje procesi: fiksacija, mineralizacija (amonifikacija), nitrifikacija in denitrifikacija (Sl. 2). Pretvorbe med različnimi oblikami N v večini opravljajo mikroorganizmi (Philippot in sod., 2007), ki imajo pomembno vlogo v zagotavljanju zadostnih količin N v obliki, ki je rastlinam dostopna. Poleg tega so številne oblike N škodljive za okolje in človeka, zato je razumevanje mikrobnih transformacij N ključnega pomena za vzdrževanje zdravja in produktivnosti ekosistema (Robertson in Groffman, 2007).



Slika 2: Shematski prikaz mikrobno posredovanega kroženja dušika v tleh (Robertson in Groffman, 2007)

Pretvorbe atmosferskega dušika ( $N_2$ ) do amonijaka ( $NH_3$ ) z encimom nitrigenazo lahko katalizirajo nekatere diazotrofne bakterije in arheje v procesu **fiksacije** (Young, 1992; Zhang in sod., 2006). Diazotrofne bakterije so lahko prostoživeče, povezane ali simbiotske, vsem pa je skupno to, da imajo *nif* operon, na katerem gen *nifH* kodira dinitrogenazno reduktazno, podenoto encima nitrogenaze, ki v aktivnem centru nosi železov atom (Poly in sod., 2001; Zhang in sod., 2006). Kot pomemben in najbolj raziskan predstavnik fiksacije atmosferskega dušika so Gram-negativne bakterije rodu *Rhizobium*, ki živijo v sožitju z metuljnicami.

Večina talnega dušika je shranjena v rastlinskih ostankih in organski snovi tal, ki je netopna in rastlinam nedostopna. Proces pretvorbe organskih oblik dušika iz odmrle biomase v enostavnejše, topne oblike, ki jih rastline in ostali organizmi lahko ponovno uporabijo za rast, imenujemo **mineralizacija**. Proces mineralizacije poteka ob pomoči širokega spektra heterotrofnih mikroorganizmov (aerobi in anaerobi, bakterije, glive in arheje), ki s hidrolizo cepijo večje molekule v monomere. V njem sodelujejo tako aerobne kot anaerobne bakterije in glive (Robertson in Groffman, 2007).

V procesu **nitrifikacije** se amonijak ( $NH_3$ ) oksidira v nitrit ( $NO_2^-$ ) in nitrat ( $NO_3^-$ ), ki poteka ob pomoči avtotrofnih mikroorganizmov. V večini primerov gre za obligatne aerobe, ki ogljik za tvorbo lastne biomase pridobivajo iz anorganskih molekul, kot terminalni akceptor elektronov pa uporabljajo kisik. Poleg avtotrofnih mikrobov so nitrifikacije sposobni tudi nekateri heterotrofi, vendar še vedno velja, da v večini tal v tem

procesu dominirajo avtotrofi (Robertson in Groffman, 2007). Proces avtotrofne nitrifikacije poteka v dveh stopnjah ob pomoči filogenetsko različni mikroorganizmov: amonijak oksidirajočih bakterij (AOB) ali amonijak oksidirajočih arhej (AOA) ter nitrit oksidirajočih bakterij (NOB) (Teske in sod., 1994; Francis in sod., 2005; Treusch in sod., 2005; Poly in sod., 2008). Prvi korak nitrifikacije predstavlja oksidacija amonijaka z amonijak oksidirajočimi bakterijami in arhejami, ki poteka preko membransko vezanega encima, amonij monooksigenaze (AMO), ki katalizira oksidacijo amonijaka do  $\text{NO}_2^-$ , ta pa se v drugi stopnji preko encima nitrit oksidoreduktaze, pretvori v  $\text{NO}_3^-$ . Stranski produkti v procesu oksidacije amonijaka lahko vodijo tudi do nastanka toplogrednega plina  $\text{N}_2\text{O}$  (Robertson in Groffman, 2007).

### **Mikrobna oksidacija amonija**

Amonijak oksidirajoče bakterije (AOB) iz  $\beta$  in  $\gamma$  podskupine proteobakterij so še do pred kratkim veljale za najpomembnejše akterje aerobne oksidacije amonijaka (Leininger in sod., 2006). Šele leta 2005 so gene, ki kodirajo podenoto encima amonijak monooksigenaze, odkrili tudi pri arhejah iz debela Crenarchaeota (Thaumarchaeota) (Treusch in sod., 2005). Še več, v zadnjem času postaja vedno bolj jasno, da imajo poleg bakterij pomembno vlogo pri oksidaciji amonijaka v tleh tudi arheje. V številnih raziskavah je bilo že dokazano, da amonijak oksidirajoče arheje (AOA) številčno prevladujejo nad bakterijami z enako funkcijo (AOB) v morskih sedimentih (Beman in Francis, 2006; Santoro in sod., 2008) kot tudi v talnem ekosistemu (Leininger in sod., 2006; Adair in Schwartz, 2008). AOA številčno presegajo AOB v mnogih talnih ekosistemih, od travnikov, pašnikov in gozdov do obdelovanih kmetijskih površin (Leininger in sod., 2006; He in sod., 2007), kljub temu da imajo evolucijsko soroden encim amonijak monooksigenazo, ki je kodiran na operonu *amoCAB* (Nicol in Schleper, 2006). Število kopij *amoA* gena na celico pri bakterijah zanaša med 2 in 3, medtem ko je struktura AOA genoma manj znana, vendar v dosedanjih raziskavah naj bi imele 1 do 3 kopije na celico (Norton in sod., 2002; Wuchter in sod., 2006).

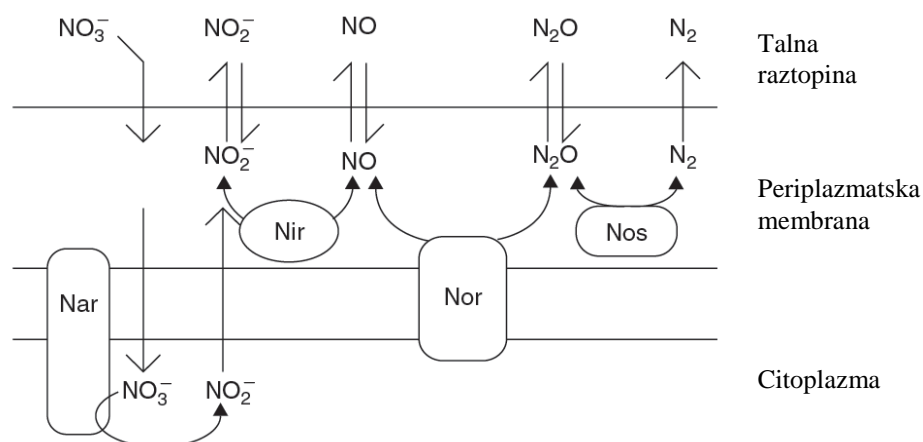
**Denitrifikacija**, redukcija nitrata oziroma nitrita v  $\text{N}_2\text{O}$  oziroma atmosferski dušik ( $\text{N}_2$ ) je glavni mehanizem, preko katerega se fiksiran dušik vrača nazaj v atmosfero. V procesu denitrifikacije gre za anaerobno mikrobno dihanje, pri katerem mikroorganizmi v odsotnosti kisika uporabljajo  $\text{NO}_3^-$  kot alternativni akceptor elektronov (Philippot, 2002). Proces, ki ga pretežno izvajajo heterotrofne bakterije, je sestavljen iz štirih zaporednih korakov redukcije  $\text{NO}_3^-$  v  $\text{N}_2$  (Philippot in sod., 2007). Elektronska transportna veriga teče po celični membrani (Robertson in Groffman, 2007; Sl. 3).



Prvi korak denitrifikacije, redukcijo  $\text{NO}_3^-$  v  $\text{NO}_2^-$ , katalizirata dva tipa encima nitrat reduktaze: membransko vezan (*Nar*) in periplazmatski (*Nap*) (Philippot in sod., 2007). Membransko vezano nitrat reduktazo najdemo pri proteobakterijah, aktinobakterijah in arhejah, medtem ko je periplazmatska prisotna samo pri proteobakterijah (Philippot in Hojberg, 1999; Richardson in sod., 2001). Nitrat reducirajoče proteobakterije imajo lahko prisotnega le enega od encimov, *Nar* ali *Nap*, ali pa kar oba (Philippot, 2002; Zumft, 1997).

Redukcijo  $\text{NO}_2^-$  v  $\text{NO}$ , ključni korak v procesu denitrifikacije, lahko katalizirata evolucijsko nesorodna encima, citokrom *cd1* (*NirS*) in baker (*Cu*) (*NirK*) nitrit reduktaza. Obe nitrit reduktazi sta funkcionalno homologni (Glockner in sod., 1993), vendar se razlikujeta v strukturi in atomu v aktivnem centru. Za razliko od reductentov nitrata, imajo reductenti nitrita običajno le eno nitrit reduktazo (Jones in sod., 2008).

$\text{NO}$  se v nadaljevanju preko  $\text{NO}$ -reduktaze (*NOR*) reducira do toplogrednega plina  $\text{N}_2\text{O}$ , kar katalizirata dva tipa *NOR* encima: eden sprejema elektrone iz citokroma *c* (*cNor*), drugi pa iz kvinola (*qNor*) (Philippot in sod., 2007).



Slika 3: Organiziranost denitrifikacijskih encimov na celični membrani gram-negativnih bakterij (Robertson in Groffman, 2007)

Zadnji korak denitrifikacije, redukcijo  $\text{N}_2\text{O}$  v  $\text{N}_2$ , katalizira  $\text{N}_2\text{O}$ -reduktaza (*NosZ*), ki je locirana v periplazmi gram-negativnih bakterij. Pred kratkim so odkrili dve veji (klada, ang. clade) *nosZ* gena,  $\text{N}_2\text{O}$ -reduktaza s *Cu* katalitičnim mestom (ang. copper catalytic site) pri *nosZ* genu iz I veje in  $\text{N}_2\text{O}$ -reduktaza s C-terminalnim kuperodoksin aktivnim mestom (ang. C-terminal cupredoxin active site) pri *nosZ* genu iz II veje (Jones in sod., 2013). To je omogočilo razvoj novih PCR oligonukleotidnih začetnikov, ki so specifični za drugo vejo *nosZ* gena, ki ga s prejšnjimi seti *nosZ* začetnih oligonukleotidov ni bilo mogoče detektirati. Razmerje med vejama II in I *nosZ* gena se med talnimi vzorci razlikuje. Tako v obdelovanih tleh velja, da je to razmerje nekoliko večje od 1, medtem ko je v

vinogradniških tleh mikrobov z *nosZ* genom druge veje (klada II) vsaj 7-krat več kot prve veje (klada I), v alpskih tleh pa je to razmerje celo manjše od 1. Do nedavnega je tudi veljalo, da *nosZ* gena posedujejo le  $\alpha$ -,  $\beta$ - in  $\gamma$ - proteobakterije, vendar so raziskave pokazale, da je gen prisoten v veliko širšem obsegu tako pri bakterijah kot pri arhejah (Roesch in sod., 2007; Kirchman in sod., 2010; Wessen in sod., 2010; Newton in sod., 2011). Genomske raziskave so razkrile, da imajo lahko denitrifikatorji v genomu različno kombinacijo genov (Zumft in Kroneck, 2007; Jones in sod., 2008) in da približno tretjina bakterij, ki v genomu nosi zapis za *nir* gene, nima zapisa za *nosZ*, kar pomeni, da se proces konča z redukcijo NO v toplogredni plin N<sub>2</sub>O, ki prispeva k nastanku podnebnih sprememb (Jones in sod., 2008).

Tako kultivacijsko odvisne kot neodvisne metode so pokazale, da delež denitrifikatorjev predstavlja do 5 % celotne mikrobne združbe, razporejene v več kot 60 rodov, vključno z arhejami (*Haloarcula*, *Halobacterium* in *Pyrobaculum*) in glivami (*Fusarium*) (Philippot in sod., 2007). Delež reducentov nitrata in AOB v primerjavi s celotno bakterijsko 16S rRNA populacijo predstavlja 5–20 % (*nirK*, *nirS*, *nosZ*) in 0,05–1 % (*amoA*), medtem ko delež AOA *amoA* zavzema 8–27 % celotne krenarhejske 16S rRNA populacije (Bru in sod., 2011).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMA IN OPIS POSKUSA

Primerjava ohranitvene obdelave s konvencionalnim oranjem poteka na dveh različnih pedo-klimatskih lokacijah v Sloveniji že od leta 1999. Tako je bilo v preteklosti na obeh lokacijah opravljenih že kar nekaj raziskav o vplivu obdelave na izbrane fizikalno-kemijske lastnosti tal (Mihelič in sod., 1999, 2000a, 2000b; Čelebić, 2008; Levstik, 2010; Žigon, 2013), medtem ko imamo le eno raziskavo o vplivu obdelave na biotske parametre (Turk in Mihelič, 2013).

Eno eksperimentalno polje se nahaja v osrednji Sloveniji (Ljubljana), drugo pa v severovzhodnem delu Slovenije (Moškanjci) (Sl. 4). Lokaciji se med seboj razlikujeta tako v fizikalno-kemijskih lastnostih tal (Pregl. 1) kot tudi v regionalnih klimatskih pogojih (Pregl. 2). Za našo raziskavo je bila pomembna različna tekstura med lokacijama poskusov. V Moškanjcih so tla teksturno lažja (ilovnata), medtem ko so v Ljubljani teksturno težja (meljasto ilovnata do meljasto glinasto ilovnata do meljasto glinasta) (Pregl. 1). Razlika je tudi v povprečni količini letnih padavin, ki je za obdobje 1999–2013 bila v Ljubljani večja za približno 560 mm (Pregl. 2).



Slika 4: Poskusno polje v Ljubljani (levo) in Moškanjcih (desno)

Figure 4: Field experiment in Ljubljana (left) and Moškanjci (right)

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti talnega profila poskusnega polja v Ljubljani in v Moškanjcih  
 Table 1: Physical characteristics of the soil profile at site Ljubljana and Moškanjci

Horizont	Moškanjci				Ljubljana				
	Ap	A2	Bv	(B)C	Ap	G	Go1	Gr	CGr
Globina (cm)	0 - 20	20 - 32	32 - 46	46-70	0-28	28-40	40-80	80-90	90-120
Pesek (%)	39,8	38,8	38,9	52,5	23,0	14,6	15,6	52,2	44,3
Melj (%)	44,4	43,8	41,1	31,9	52,4	44,7	44,6	28,5	39,7
Glina (%)	15,8	17,4	20,0	15,6	24,6	40,7	39,8	19,3	16,0
Tekstura	Ilovnata	Ilovnata	Ilovnata	Peščeno ilovnata	Meljasto ilovnata	Meljasto glinasta	Meljasto glinasta - meljasto glinasta ilovnata	Meljasto glinasta - meljasto glinasta ilovnata	Peščeno ilovnata - ilovnata

Pri ohranitvenem načinu (minimalna obdelava) so bila tla obdelana z uporabo vlečnega orodja znamke Evers Agro Vario Disc, 4-vrstni (Senner, Nemčija), ki je podobno krožni brani (Sl. 5), vendar se od običajne krožne brane bistveno razlikuje po prostem vpetju vsakega posamičnega diska in po možnosti prilagajanja kota rezanja tal v smeri obdelave. Diski, nameščeni pod kotom 15 °, tla in rastlinske ostanke zarežejo, dvignejo in premešajo le v zgornjih 5–12 cm. Diski so nameščeni v štirih vrstah in orientirani drug proti drugemu, kar omogoča dobro zaoravanje ostankov in mešanje zgornjega dela tal (Žigon, 2013). Površina za setev je bila pri minimalni obdelavi pripravljena v enem do dveh prehodih, pri čemer je na površini tal ostalo precej enakomerno razporejenih rastlinskih ostankov, tako da je bilo vsaj 30 % površine tal prekrivane z ostanki. Pri konvencionalni obdelavi so bila tla obdelana s plugom 20–25 cm globoko, pri čemer so bili vsi rastlinski ostanki in pleveli zaorani. Površina za setev je bila pripravljena z vrtavkasto brano. Tla so bila v obeh primerih obdelana pozno poleti in/ali zgodaj spomladi.



Slika 5: Evers Agro Vario Disc (Senner)  
 Figure 5: Evers Agro Vario Disc (Senner)



Preglednica 2: Regionalne klimatske razmere za lokacijo v Ljubljani in Moškanjcih v obdobju 1999–2013 (ARSO, 2015)

Table 2: Regional climatic conditions in Ljubljana and Moškanjci between 1999 and 2013 (ARSO, 2015)

Leto	LJUBLJANA				MOŠKANJCI			
	Povprečna T [°C]	Povprečna max T [°C]	Povprečna minT [°C]	Količina padavin [mm]	Povprečna T [°C]	Povprečna max T [°C]	Povprečna minT [°C]	Količina padavin [mm]
1999	11,0	15,6	7,0	1500,7	10,0	15,0	5,5	1037,9
2000	12,2	17,3	7,5	1363,1	11,4	17,2	5,9	794,7
2001	11,4	16,2	7,0	1327,7	10,5	15,9	5,5	827,3
2002	11,8	16,4	7,6	1287,8	11,3	16,4	6,5	917,6
2003	11,6	16,9	6,6	1091,0	10,6	16,4	5,0	689,2
2004	10,7	15,2	6,5	1696,1	9,9	14,9	5,2	992,7
2005	10,4	15,0	6,3	1403,3	9,5	14,6	4,5	959,2
2006	11,4	16,2	7,0	1140,8	10,2	15,5	5,1	903,2
2007	12,0	17,1	7,4	1195,9	11,1	16,9	5,9	982,3
2008	11,6	16,2	7,4	1490,2	11,1	16,5	6,2	943,6
2009	11,7	16,5	7,1	1405,5	10,8	16,0	6,0	1078,0
2010	10,7	14,8	6,9	1797,9	10,1	14,8	5,6	986,2
2011	11,8	16,8	7,0	998,1	10,8	16,4	5,6	729,9
2012	12,0	17,1	7,4	1339,2	11,2	16,9	5,8	928,7
2013	11,6	16,0	7,6	1530,5	10,9	15,7	6,1	923,7

### 3.1.1 Ljubljana

Poskusno polje v Ljubljani se nahaja na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete. Tla na tem območju so psevdoglejena (Stagnosols), nastala na aluvialnih prodnatih nanosih, s težko meljasto-glinasto do meljasto-glinasto-ilovnato teksturo. V primerjavi z Moškanjci imajo ta tla slabšo hidravlično prevodnost in slabšo prezračenost. Podnebje je kontinentalno, povprečna letna temperatura za obdobje 1999–2013 znaša 11,5 °C, povprečne letne padavine za isto obdobje pa 1371 mm (ARSO, 2015).

Poskusno polje, velikosti 24 x 48 m, je vzdolžno razdeljeno na dva dela; en del je namenjen konvencionalni obdelavi (CT) in drugi ohranitveni oziroma minimalni obdelavi tal (MT), z vmesnim neobdelovanim pasom širine 1 m. Vsako obravnavane vključuje 12 parcel velikosti 6 x 8 m, od tega so po 3 naključno izbrane parcele (ponovitve) različno gnojene: negnojeno (kontrola), NPK, NPK+kompost in kompost. Za namen doktorske naloge smo vzorčili le na parcelah namenjenih kontroli (negnojeno) ter gnojenju z NPK in gnojenju s kompostom, vendar je pri tem potrebno poudariti, da se v letu prej in v letu vzorčenja tal ni obdelovalo, prav tako tla niso bila pognojena, zato smo pri analizi podatkov izključili faktor gnojenja.



Kolobar s prevlado koruze, ječmena, oljne ogrščice, ovsu in pšenice je bil v letih od 2010 do 2013 prekinjen, v tem obdobju je bila na obeh obravnavanjih posejana lucerna in se tal sploh ni obdelovalo.

### 3.1.2 Moškanjci

Poskusno polje se nahaja v subpanonskem delu Slovenije, na Ptujsko-Dravskem polju, približno 10 km vzhodno od Ptuja, kjer prav tako od leta 1999 poteka primerjava konvencionalnega oranja (CT) z minimalno obdelavo (MT). Tla so klasificirana kot evtrično rjava (Eutric Cambisols), nastala na peščeno prodnatih rečnih nanosih, z visoko vsebnostjo skeleta in ilovnato teksturo (Pregl. 1). Podnebje je kontinentalno, z močnimi značilnostmi subpanonskega ter povprečno letno temperaturo 10,6 °C za obdobje 1999-2013 in povprečno letno količino padavin 913 mm (1999–2013; ARSO, 2015).

Ob postavitvi poskusa je bila njiva velikosti 30 x 100 m prav tako razdeljena na polovico, na MT in CT obravnavanje z vmesnim neobdelovanim pasom širine 1 m. Vsako obravnavanje vključuje 10 parcel velikosti 12 x 8 m, ki predstavljajo ponovitve. Na štirih naključno izbranih parcelah smo opravili vsa vzorčenja.

Kolobar je značilen za regijo, s prevlado pšenice, ječmena, oljne ogrščice in koruze. V času trajanja prvega dela poskusa (opis pod točko 3.2) so bila tla obdelana v začetku aprila 2011 (oljna ogrščica je bila pred tem požeta jeseni leta 2010), koruza je bila posejana 20. 4. 2011 in požeta 5. 10. 2011. Pred setvijo koruze so bila tla pognojena s 100 kg ha<sup>-1</sup> N v obliki uree. Herbicida Frontier X2 (dimetenamid-P) in Stomp 400 (pendimetalin) sta bila dodana 5. 5. 2012 v koncentraciji 1.2 in 3 l ha<sup>-1</sup>.

V času trajanja drugega dela poskusa je bila v letu 2013 na poskusnem polju posejana rž. Pred setvijo rži so bila tla za MT obdelana 30.9.2012 z enim prehodom, za CT pa 6.10.2012. Pred setvijo so bila tla pognojena z 220 kg ha<sup>-1</sup> »izboljševalca tal« PRP-sol ter dognojena s 50 kg ha<sup>-1</sup> uree in 200 kg ha<sup>-1</sup> apnenčevega amonitrata (KAN). Herbicid ARRAT (dikamba, tritosulfuron) je bil dodan 18.4.2013 v koncentraciji 200 g ha<sup>-1</sup> in fungicid Caramba (metkonazol) v koncentraciji 1,5 l ha<sup>-1</sup>.

### 3.2 VZORČENJE

Za prvi del poskusa, katerega namen je bilo ugotavljanje dolgoletnih učinkov različnega načina obdelave na fizikalno-kemijske lastnosti tal in biotske lastnosti tal, smo na obeh lokacijah po 12 letih izvedli celovito vzorčenje. Vzorčenje je bilo izvedeno jeseni leta 2011. V jesenskem času so tla v fazi mirovanja, posledično pridejo učinki drugih dejavnikov, kot je v našem primeru razlika v obdelavi tal, bolj do izraza, saj na ta način omejimo vsaj nekatere izmed dejavnikov v že tako kompleksnem ekosistemu. Tako smo

15. 11. 2011 opravili vzorčenje v Ljubljani, 24. 11. 2011, 7 tednov po žetvi koruze, pa še v Moškanjcih.

Na obeh lokacijah smo za kemijske in mikrobiološke analize z uporabo sonde premera 3 cm iz posamezne parcele odvzeli povprečen vzorec, sestavljen iz petih vbodov, in ga ločili na štiri globine: 0–10 cm, 10–20 cm, 20–30 cm in 30–60 cm. Vzorce, shranjene v polivinilnih vrečkah, smo pospravili v hladilno torbo do prihoda v laboratorij, kjer smo vzorce homogenizirali, presejali skozi 2 mm sito, da smo odstranili koreninice in kamne ter vzorce iz zgornjih dveh globin razdelili na dva dela. En del homogeniziranega vzorca, ki smo ga uporabili za mikrobiološke analize, smo shranili v krioeprovete, postavili na suhi led za 30 minut in shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do uporabe. Drugi del vzorca in vzorce spodnjih dveh globin, ki smo jih uporabili za kemijske analize, smo zračno posušili (ISO 11464, 2006) in shranili v kartonske škatle na sobni temperaturi.

Talne vzorce za določanje volumske gostote, obstojnosti strukturnih agregatov in vodno zadrževalnih lastnosti tal smo prav tako odvzeli v štirih ponovitvah na štirih globinah: 0–10 cm, 10–20 cm in 20–30 cm. Neporušeni talni vzorci so bili odvzeti s pomočjo kopečki cilindrov, višine 5 cm in volumna  $100\text{ cm}^3$  ter posebne sonde in kladiva.

V drugem delu poskusa smo v Moškanjcih med poletjem 2013 opravili dodatna vzorčenja za spremljanje odzivnosti talnih mikroorganizmov na naravni pojav sušnega stresa. V Moškanjcih imamo postavljeno vremensko postajo iMETOS, ki nam v 1 urnih intervalih preko spleta (<http://www.fieldclimate.com>) omogoča spremljanje različnih meteoroloških meritev, kot so merjenje temperature zraka, sončnega sevanja, padavin, hitrosti vetra, temperature tal na globini 5 cm, matričnega potenciala na globini 10 cm, 20 cm in 40 cm, itd. Na podlagi podatkov matričnega potenciala vode v tleh smo izbrali pet časovnih točk: 10. 7. (normalne razmere), 25. 7. (sušne razmere), 7. 8. (sušne razmere), 12. 8. (ponovno navlaževanje) in 3. 9. 2013 (normalne razmere) (Sl. 17). Meritve matričnega potenciala, ki predstavlja sile s katerimi je voda vezana na talni matriks (v saturiranih razmerah je njegova vrednost 0), so služile zgolj za orientacijo pri določanju datumov vzorčenj. Ob vsakem vzorčenju smo vzeli vzorce za gravimetrično določanje vsebnosti vode v tleh in določanje poljske kapacitete na posameznih parcelah. Poljska kapaciteta predstavlja največjo količino vode, ki ostane v tleh potem ko gravitacijska voda odteče. Matrični potencial pri poljski kapaciteti znaša  $-0,33$  barov. Na drugi strani pa so bile meritve temperature tal na globini 5 cm opravljene samo z vremensko postajo.

Postopek vzorčenja in priprava vzorcev za kemijske in mikrobiološke analize je bil enak, kot je opisano zgoraj za prvi del poskusa.

### 3.3 ANALIZA KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL

pH tal smo izmerili v skladu s standardom ISO 10390, ki temelji na elektrokemični meritvi aktivnosti  $H^+$  ionov v suspenziji tal z raztopino  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  kalcijevega klorida ( $CaCl_2$ ) v volumskem razmerju 1:2,5.

Kationsko izmenjalno kapaciteto tal (CEC), ki jo izražamo kot vsoto baznih kationov in izmenljivih kislih ionov (predvsem  $H^+$ , v zelo kislih tleh tudi  $Al^{3+}$ ), smo določili na podlagi metode, opisane v Soil Survey laboratory methods manual (2004). Izmenljive bazične katione ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) smo ekstrahirali z 1 M raztopino amonacetata ( $NH_4OAc$ , pH 7), za določanje izmenljivega  $H^+$  iona pa smo uporabili ekstrakcijsko raztopino barijevega klorida ( $0,5 \text{ M BaCl}_2 + 0,055 \text{ M}$  trietanolamin, pH 8,0).

Meritve organskega ogljika ( $C_{org}$ ) in skupnega dušika (TN) smo izvedli na podlagi metode, določene s standardom SIST ISO 10694 (1995) in SIST ISO 13878 (1995) ter izmerjene na instrumentu vario MAX CNS (Elementar, Nemčija), ki deluje na principu suhega sežiga tal in omogoča hkratno analizo ogljika in dušika. Za določanje skupnega dušika smo talne vzorce sežgali pri  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  in direktno izmerili na aparatu Vario MAX, medtem ko je za določanje skupnega organskega ogljika vzorce bilo potrebno najprej titrirati s 3 % solno kislino. Po sežigu na  $1050 \text{ }^\circ\text{C}$  smo določili vsebnost  $C_{org}$ . Glede na vsebnost  $C_{org}$  in volumsko gostoto tal na posamezni globini tal smo izračunali tudi vsebnost  $C_{org}$  v celotnem profilu 0–60 cm.

Za določanje topnih oblik ogljika (DOC) in dušika (DON) ter nitratnega ( $NO_3\text{-N}$ ) in amonijevega dušika ( $NH_4\text{-N}$ ) smo talne vzorce ekstrahirali z  $0,01 \text{ M}$  raztopino  $CaCl_2$  (ISO 14055, 1999). DOC in DON smo izmerili z uporabo instrumenta vario TOC cube (Elementar), za merjenje  $NO_3\text{-N}$  in  $NH_4\text{-N}$  pa smo uporabili Gallery Automated Photometric Analyzer (Thermo Scientific, ZDA).

Vsebnosti rastlinam dostopnega fosforja in kalija so bile izmerjene po modificirani metodi, določeni s standardom ÖNORM L 1087 (1993). Talni vzorec smo ekstrahirali z  $0,1 \text{ M}$  raztopino amon-laktata in  $0,4 \text{ M}$  očetno kislino (pH 3,7) ter vsebnost fosforja določili spektrofotometrično, vsebnost kalija pa s plamenskim fotometrom.

Delež suhe snovi v tleh oziroma vlažnost tal smo določili po metodi sušenja na  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  do konstantne teže tal (ISO 11465, 1993). Delež suhe snovi smo izračunali na podlagi masnega količnika med vlažnimi in suhimi vzorci.

### 3.4 ANALIZA FIZIKALNIH LASTNOSTI TAL

Teksturo tal smo določili po metodi, opisani v standardu ISO 11277 (2009), ki temelji na modificirani sedimentacijski metodi (Janytzki, 1986). Vsebnost skeleta smo določili s pomočjo kopecki cilindrov in s sušenjem vzorcev na 105 °C do konstantne mase. Suhe talne vzorce smo presejali čez 2 mm sito. Preostanek na situ je predstavljal skelet. Delež skeleta izračunamo na podlagi kvocienta med maso skeleta in preostalega suhega vzorca tal.

Volumsko gostoto, ki je definirana z razmerjem med maso trdne faze tal in volumnom celotnega neporušenega vzorca, smo določali po standardu ISO 11272 (1993). S pomočjo kopecki cilindrov smo vzeli neporušen vzorec tal, ga stehali in posušili pri temperaturi 105 °C do konstantne mase. Vzorec smo ponovno stehali ter na podlagi razmerja med maso trdne faze in znanega volumna cilindra (ob upoštevanju mase in volumna skeleta) določili volumsko gostoto tal kot maso suhih tal na volumsko enoto mokrih tal ( $\text{g cm}^{-3}$ ). Poroznost, razmerje med skupnim volumnom por in celotnim volumnom neporušenega talnega vzorca smo nato izračunali na podlagi gostote trdne faze tal in volumske gostote tal po naslednji enačbi:

$$\text{Poroznost (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Volumska gostota tal}}{\text{Volumska gostota trdne faze tal}}\right) * 100 \quad \dots (2)$$

Za določanje obstojnosti strukturnih agregatov smo uporabili metodo mokrega sejanja (Eijkelkamp, Nizozemska; Kemper in Rosenau, 1986). Pred tem smo s separacijsko metodo ločili talne agregate v pet velikostnih razredov: >4 mm, 2–4 mm, 1–2 mm, 0,5–1 mm in <0,5 mm. Za metodo mokrega sejanja smo uporabili frakciji 2–4 (ostanek na situ 2 mm) in 1–2 (ostanek na 1 mm situ). Vzorce smo najprej namakali v destilirani vodi (razpad manj obstojnih) in nato še v NaOH raztopini (razpad bolj obstojnih agregatov) ter jih posušili na 105 °C. Delež stabilnih agregatov smo določili glede na maso suhih tal v NaOH in vodi.

Sposobnost tal za infiltracijo vode smo izmerili z uporabo cilindričnega dvojnega infiltrometra (Eijkelkamp, Nizozemska) po navodilih proizvajalca. Oba obroča smo napolnili z vodo, kot prikazuje slika 6 in merili količino vode, ki se je infiltrira v tla. Meritve so potekale v notranjem obroču, medtem ko zunanji obroč služi kot varovalo, ki preprečuje vodi iz notranjega obroča, da bi tekla v horizontalni smeri. Stopnjo infiltracije smo izračunali kot kvocient med količino infiltrirane vode (v milimetrih) in časom potrebnim za infiltracijo (v urah).



Slika 6: Prikaz meritev vodne infiltracije z uporabo cilindričnega dvojnega infiltrometra v Moškanjcih  
Figure 6: Water infiltration rate measurements using double ring infiltrometer at site Moškanjci

Vodno zadrževalne lastnosti tal smo določili v skladu s standardom ISO 11274 (1998), ki temelji na uporabi visokotlačne komore, ki omogoča iztiskanje vode pri izbranih tlakih med 0,05 in 15 barov (Eijkelkamp). Porušene talne vzorce smo nasuli v obročke, jih namočili do nasičenosti in postavili v visokotlačno komoro, ki smo jo nastavili na 0,33 bara (poljska kapaciteta - PK) in 15 barov (točka venenja - TV) ter jih v komori pustili dokler ni voda nehala iztekati iz odtočnih cevk. Vzorce smo stekali, posušili na 105 °C do konstantne teže tal ter ponovno stekali. Razlika v masi je predstavljala količino vode v vzorcu. Rastlinam dostopno vodo (EPK) smo izračunali iz razlike med PK in TV.

### 3.5 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA TAL

Tradicionalni mikrobiološki pristopi preučevanja pestrosti mikrobnih združb, ki temeljijo na gojenju celic in morfološki analizi, imajo številne omejitve, saj omogočajo izolacijo in gojenje le majhnega deleža znanih mikroorganizmov. Tako je manj kot 1 % znanih, z mikroskopom identificiranih, bakterij mogoče gojiti s standardnimi laboratorijskimi metodami (Borneman in sod., 1997; Kirk in sod., 2004), zato so se v zadnjih letih razvile številne molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji DNA in RNA in uporabi molekularnih markerjev ter analizi celotne metabolne poti ali le izbranega dela (Harris, 2009). Za preučevanje strukture (navadno se nanaša na razlike med posameznimi skupinami, kot so bakterije, glive in arheje v nekem ekosistemu) in pestrosti (lahko se nanaša na število različnih taksonomskih skupin ali na njihovo funkcijo, ki jo opravljajo v ekosistemu) mikrobnih združb so največkrat v uporabi tipizacijske metode, ki temeljijo na *in vitro* pomnoževanju DNA z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in molekularnih markerjev ter primerjavi DNA profilov (Kolb in sod., 2003; Elsas in Boersma, 2011), kot so npr. AFLP, T-RFLP in DGGE metoda.

Molekularni markerji, ki jih uporabljamo pri PCR pomnoževanju, so lahko ozko specifični, kar pomeni, da so namenjeni ciljanju točno določenega dela metabolne poti, kot je *amoA* gen, ki kodira amonij monooksigenazo, ključni encim pri oksidaciji amonijaka. Na drugi strani imamo širše specifične markerje, ki jih uporabljamo za detekcijo splošne populacije, kot je npr. bakterijska ali arhejska ribosomalna 16S rRNA regija ter glivna ITS regija (Harris, 2009). Bakterijski in arhejski 16S rRNA geni ter glivne ITS regije so evolucijsko ohranjeni univerzalni odseki zaporedja DNA, zato so primeren marker za analizo splošnih mikrobnih združb. 16S rRNA geni so univerzalni esencialni geni prokariotov, ki so prisotni vsaj v eni kopiji na celico (število 16S rRNA kopij na celico se giblje med 1 in 15), zato so idealni markerji v filogenetskih raziskavah in taksonomski klasifikaciji bakterij in arhej (Hallin in sod., 2009; Wang in Qian, 2009).

Za filogenetske raziskave pri glivah je v uporabi več markerjev, kot so npr. 18S rRNA podenota (SSU), 28S rRNA (LSU), regija notranjih distančnikov, ki ločuje dve podenoti rRNA (ITS) (Liu in sod., 2012). V nedavni raziskavi, v kateri so primerjali učinkovitost različnih glivnih markerjev (ITS, SSU, LSU), Schoch in sod. (2012) ugotavljajo, da uporaba univerzalnega ITS markerja pri identifikaciji splošne glivne združbe zajame največji delež populacije.

### **3.5.1 Izolacija DNA**

Za izolacijo DNA iz talnih vzorcev smo uporabili komercialno dostopen kit PowerSoil DNA Isolation Kit ter PowerSoil RNA Isolation Kit v kombinaciji z RNA PowerSoil DNA elution accessory kit (MO BIO Laboratories, ZDA) po navodilih proizvajalca. DNA smo na koncu resuspendirali v 100  $\mu$ l vode proste RNaz in DNaz ter shranili na -20 °C do uporabe.

### **3.5.2 Merjenje koncentracij in elektroforeza**

Koncentracije DNA vzorcev iz leta 2011 in 2012 smo izmerili spektrofotometrično z NanoDropom 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo scientific, ZDA). Koncentracije DNA vzorcev iz leta 2013 pa smo izmerili fluorometrično z uporabo kita Quant-iT DNA Assay Kit (Invitrogen, ZDA) na qPCR aparaturi StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, ZDA) pri 20 °C za 30 s (dvakratna ponovitev). Spektrofotometrično merjenje koncentracij poteka na podlagi absorbance vzorca pri valovni dolžini 260 nm ( $A_{260}$ ) in 280 nm ( $A_{280}$ ). Njuno razmerje uporabljamo kot merilo čistosti DNA vzorca: prisotnosti proteinov v izolatu ( $A_{260}/A_{280}$ ) in merilo prisotnosti organskih spojin soli v izolatu ( $A_{260}/A_{230}$ ). Optimalno razmerje  $A_{260}/A_{280}$  za čisto DNA je 1,8–2,0, razmerje  $A_{260}/A_{230}$  pa 2,0–2,2. Fluorometrično merjenje omogoča natančnejše merjenje koncentracij, saj se barvilo veže le na dvojno verigo. Ob vezavi barvila na dvojno vijačnico pride do emitacije fluorescentne svetlobe, ki jo lahko izmerimo.

V obeh primerih smo čistost izolacije dodatno preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1 % (w/v) agarozni gel v 1x pufru TAE (10x Tris-Acetate-EDTA; Fisher Scientific, ZDA). Na gel smo nanjali DNA vzorce, ki smo jim dodali nanašalno barvilo DNA Loading Dye (Thermo Scientific) ter dolžinski lestvici 100 bp in 1000 bp (Thermo Scientific). Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforetski napravi (BioRad, ZDA) 45 min pri stalni napetosti 150 V. Po končani elektroforezi smo gel dali v kopel z dodatkom etidijevega bromida ( $0,05 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) za 10 min. Elektroforetske vzorce smo opazovali z UV transiluminatorjem Biometra TI 2 (Sigma-Aldrich, ZDA) in jih fotografirali s pomočjo digitalnega fotoaparata (Cannon, ZDA).

### 3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za določanje pestrosti in strukture mikrobnih združb smo uporabili molekularno tehniko T-RFLP (ang. terminal restriction length polymorphism), ki temelji na specifičnem pomnoževanju DNA odsekov v reakciji PCR s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, razrezu PCR pomnožkov in ločevanju restriktov s kapilarno elektroforezo.

Za pomnoževanje DNA fragmentov arhej, bakterij in gliv smo uporabili neredčene DNA vzorce, katerih koncentracije niso presegle  $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ , in jih pomnožili z uporabo GoTaq DNA polimeraze (Promega, ZDA). Za pomnoževanje bakterijskega 16S rRNA gena smo uporabili univerzalni par začetnih oligonukleotidov B27f-FAM (5-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) in 1401r (5-CGG TGT GTA CAA GAA GAC CC-3) (Lane in sod., 1991). PCR reakcija je vsebovala  $3 \mu\text{l}$  matrične DNA,  $0,04 \text{ mM}$  vsakega izmed deoksiribonukleotidov (dNTP) (Qiagen, Nemčija),  $0,4 \mu\text{M}$  oligonukleotidnih začetnikov (Jena bioscience, Nemčija), 1x pufer PCR,  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2,5 \text{ U}$  DNA polimeraze Taq (Promega) in  $0,3 \%$  govejega serumskega albumina (BSA) (Sigma-Aldrich) v končnem volumnu  $50 \mu\text{l}$ . Za pomnoževanje DNA smo uporabili napravo za PCR (Biometra, Nemčija) po naslednjem protokolu: denaturacijski korak ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$  za 4 min), sledila je 29-kratna ponovitev temperaturnih ciklov denaturacije ( $94 \text{ }^\circ\text{C}$  za 60 s), prileganja ( $57 \text{ }^\circ\text{C}$  za 60 s) in podaljševanja ( $72 \text{ }^\circ\text{C}$  za 90 s) ter končno podaljševanje pri  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  za 10 min.

Glavno ITS regijo smo pomnožili z uporabo univerzalnih glivnih začetnih oligonukleotidov ITS1f-FAM (5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3) in ITS4r (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) (White in sod., 1990). PCR mešanica ( $50 \mu\text{l}$ ) je vsebovala  $0,2 \text{ mM}$  vsakega izmed dNTP (Qiagen),  $0,2 \mu\text{M}$  vsakega izmed oligonukleotidnih začetnikov (Jena Bioscience),  $1,5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2,5 \text{ U}$  DNA polimeraze GoTaq (Promega),  $0,3 \%$  BSA (Sigma Aldrich) in  $3 \mu\text{l}$  matrične DNA. DNA smo pomnožili v napravi za PCR po naslednjem programu: 3 min začetne denaturacije pri  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30-kratna ponovitev ciklov denaturacije (60 s pri  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ), prileganja (60 s pri  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in podaljševanja (90 s pri  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ter 10 min končno podaljševanje pri  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pomnoževanje arhejskega 16S rRNA gena smo izvedli v 50 µl reakciji z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov A934r-FAM (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3) in A109f (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3) (Grosskopf in sod., 1998; Stahl in sod., 1991). Reakcijska mešanica je vsebovala 0,2 mM vsakega izmed dNTP (Qiagen), 0,4 µM vsakega izmed oligonukleotidnih začetnikov (Jena Bioscience), 1x pufer PCR, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, in 1,25 U DNA polimeraze GoTaq (Promega), 0,3 % BSA (Sigma Aldercht) in 3 µl matrične DNA. PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih: 3 min pri 94 °C, 35 ciklov denaturacije (60 s pri 94 °C), prileganja (60 s pri 52 °C) in podaljševanja (90 s pri 72 °C) ter končno podaljševanje (10 min pri 72 °C).

Uspešnost pomnoževanja in dolžino produktov smo preverili z 1 % agarozno elektroforezo v 1x pufru TAE.

### 3.5.4 Čiščenje pomnožkov PCR

Produkte PCR smo očistili z uporabo komercialnega kita MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), po navodilih proizvajalca. 50 µl PCR produkta smo dodali 250 µl vezavnega pufera in dobro premešali. Mešanico smo nato nanesti na kolono s filtrom, centrifugirali 1 min pri 13000 rpm ter tekočino v zbirni mikrocentrifugirki (vezavni pufer) zavrgli. V kolono s filtrom smo nato nanesti spiralni pufer, ki vsebuje 100 % etanol, in centrifugirali 1 min. Tekočino v zbirni mikrocentrifugirki smo zavrgli in centrifugirali še 1 min. Kolono smo prestavili v novo sterilno mikrocentrifugirko, dodali 15 µl elucijskega pufera (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) in centrifugirali 1 min. Filter smo zavrgli, očiščenim PCR produktom pa spektrofotometrično izmerili koncentracije z uporabo NanoDropa.

### 3.5.5 Razrez PCR produktov z restrikcijsko endonukleazo in čiščenje restriktov

Za izvedbo molekularne tehnike T-RFLP je potrebno pomnožke PCR razrezati z ustreznimi restrikcijskimi encimi (RE). Uporabili smo tri različne RE, ki prepoznavajo točno določena restrikcijska mesta: *HhaI* (GCG↓C), *MspI* (C↓CGG) in *AluI* (AG↓CT) (Fermentas, ZDA). Reakcijska mešanica je vsebovala 10 µl matrične DNA, 1x reakcijski pufer in 0,5 U posameznega encima ter vodo, prosto RNaz v končnem volumnu 20 µl. Restrikcija je potekala 3 ure pri 37 °C, inaktivacija RE pa na 80 °C 20 min. Po restrikciji smo encime odstranili s komercialno dostopnim kompletom MinElute Reaction Cleanup Kit, po navodilih proizvajalca (Qiagen, Nemčija) in jih shranili pri -20 °C. Protokol je bil enak čiščenju PCR produktov po verižni reakciji s polimerazo.



### 3.5.6 Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)

T-RFLP je tipizacijska metoda, ki omogoča enostavno analizo velikega števila vzorcev, zato je zelo uporabna na področju mikrobne ekologije za ugotavljanje pestrosti mikrobnih združb (Liu in sod., 1997).

Za analizo T-RFLP profilov smo v mikrotitersko ploščo z 96 vdolbinami (Applied Biosystems, ZK) odpipetirali 1  $\mu$ l očiščenega PCR restrikta in mu dodali 11  $\mu$ l formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) ter 0,4  $\mu$ l internega standarda Genescan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems). Po 5 min denaturaciji pri 94 °C smo vzorce ohladili na ledu in analizirali s kapilarno elektroforezo na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130XL (Applied Biosystems), ki zazna le fluorescentno vezane fragmente in jim določi dolžino na podlagi internega dolžinskega standarda ter intenziteto fluorescentnega signala. Postopek kapilarne elektroforeze je bil izveden na Oddelku za zootehniko na Rodici.

Na podlagi podatkov, pridobljenih s sekvenatorjem, smo s pomočjo bioinformacijskega programa GeneMapper verzije 4.0 (Applied Biosystems) opravili analizo T-RFLP profilov. V nadaljnji analizi smo upoštevali le fragmente (T-RFje) dolge med 50 in 500 bp. Tako pripravljene podatke smo s pomočjo spletno dostopnega programoma T-REX verzije 1 rev. 14 (Culman in sod., 2009) pripravili matriko podatkov, ki smo jo uporabili kot osnovo za analizo v programu R (R Core Team, 2013). Interpretacija rezultatov je temeljila na domnevi, da število fragmentov predstavlja število različnih taksonomskih skupin v mikrobnih združbi, višina vrhov elektroforeogramov pa relativni delež posamezne mikrobne populacije.

### 3.5.7 Kvantitativni PCR v realnem času

V talni ekologiji se je v zadnjem desetletju za kvantifikacijo mikrobnih združb uveljavila kvantitativna PCR metoda (qPCR), ki zaradi enostavnosti in visoke občutljivosti predstavlja eno izmed najbolj uporabljenih molekularnih tehnik za preučevanje abundance (številčnosti) mikrobnih združb (Pfaffl, 2004; Smith in Osborn, 2009; Sieber in sod., 2010; Hargreave in sod., 2013).

Velikost mikrobnih združb N-cikla smo določali z uporabo qPCR metode preko genov, ki kodirajo katalitično podenoto ključnih encimov nitrifikacije (arhejski in bakterijski *amoA* gen) in denitrifikacije (*nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII*). Kvantifikacija celotne bakterijske, arhejske in glivne združbe je potekala z uporabo univerzalnih 16S rRNA in ITS molekularnih markerjev. Kvantifikacija je temeljila na intenziteti fluorescentnega signala SYBER Green barvila, izmerjeni na aparaturi za qPCR ABI Vii7 Software (Applied Biosystems). Reakcijska mešanica je vsebovala 2  $\mu$ l matrične DNA s koncentracijo 1 ng/ $\mu$ l, par začetnih oligonukleotidov (Priloga A) s koncentracijo 1  $\mu$ M (za bakterijski in

arhejski *amoA*, bakterijski in arhejski 16S rRNA ter glivni ITS) oziroma 2  $\mu\text{M}$  (za *nirK*, *nirS*, *nosZ1* in *nosZ2*), 1x ABsolute QPCR SYBR Green Rox mix (blue) (Thermo Scientific) in 250 ng bakteriofaga T4gp32 (MP Biomedicals, ZDA) v končnem volumnu 15  $\mu\text{L}$ . Za absolutno kvantifikacijo smo pripravili umeritveno krivuljo z 10-kratnimi redčitvami posameznega plazmidnega standarda od  $10^7$  do  $10^2$  kopij  $\mu\text{L}^{-1}$ . Postopek priprave plazmidnih standardov je opisan pod točko 3.5.8. Reakcijska mešanica za vzorce in standard je bila enaka. Na optično ploščo (Applied Biosystem) smo nanegli vzorce, standarde in negativno kontrolo (voda), jim dodali reakcijsko mešanico in kratko centrifugirali. Vzorce smo nanašali brez tehničnih ponovitev znotraj plošče, medtem ko smo standarde in negativno kontrolo nanegli v dveh ponovitvah. Termalni pogoji reakcij so prikazani v Prilogi A. Vsako ploščo smo ponovili 2-krat. Analizo qPCR produktov izvedli z ABI Vii7 Software. V primeru slabše učinkovitosti (učinkovitost manjša od 70 % in  $R^2$  manjši od 0,95) smo naredili dodatno ponovitev plošče.

Število kopij gena na gram suhih tal smo nato izračunali po naslednji enačbi:

$$\left[ \frac{\text{Število kopij}}{g \text{ suhih tal}} \right] = \frac{\text{Število kopij na reakcijo} \times \text{koncentracija DNA} \left( \frac{ng}{\mu l} \right) \times \text{Volumen DNA po ekstrakciji} (\mu l)}{\text{Volumen matične DNA v qPCR} \times \text{masa suhih tal v DNA ekstrakciji} (g)} \dots (3)$$

Kljub vsem svojim prednostim ima, tako kot vsaka molekularna tehnika, tudi qPCR svoje pomanjkljivosti. Ena od največjih težav metode je neoptimalen potek reakcije zaradi prisotnosti inhibitorjev. V talnih DNA izolatih so pogosto, kljub vsem postopkom čiščenja DNA, lahko prisotni inhibitorji PCR reakcije, ki izvirajo iz samega vzorca (npr. heparin, proteini) ali pa so ostanki metod čiščenja (npr. fenol, proteaze, detergenti, soli). Prisotnost polimeraznih inhibitorjev lahko zmanjša učinkovitost PCR reakcije ali jo v celoti inhibira, zato je pred izvedbo PCR reakcije potrebno izvesti test inhibicije. PCR inhibitorjev se lahko znebimo z dodatnim čiščenjem in/ali redčenjem DNA vzorcev (Hargreave in sod., 2013).

Prisotnost PCR inhibitorjev v DNA vzorcih smo pred qPCR reakcijo preverili z uporabo eksternega kontrolnega pGEM-T vektorja (Promega). V mikrotitrsko ploščo smo nanegli 2  $\mu\text{l}$  pGEM-T plazmida ( $0,5 \times 10^7$  kopij  $\mu\text{L}^{-1}$ ) in 2  $\mu\text{l}$  posameznega talnega DNA vzorca s koncentracijo 1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Kot standard smo uporabili plazmid pGEM-T (2  $\mu\text{l}$ ), ki smo mu dodali 2  $\mu\text{l}$  vode, proste RNaz, ter 4  $\mu\text{l}$  vode, proste RNaz, za negativno kontrolo. Vzorcem, standardom in vodi smo dodali 11  $\mu\text{l}$  reakcijske mešanice, ki je vsebovala 1  $\mu\text{M}$  začetnih oligonukleotidov SP6 (ATT TAG GTG ACA CTA TAG) in T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG), 250 ng bakteriofaga T4gp32 in 1x ABsolute QPCR SYBR Green Rox mix (clear) (Thermo Scientific). Reakcijo smo izvedli v aparaturi za qPCR StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems) pri naslednjih pogojih: začetna denaturacija na 95  $^{\circ}\text{C}$  za 15 min, čemur je sledila 30-kratna ponovitev ciklov denaturacije (95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s),

prileganja (55 °C, 30 s) in podaljševanja (72 °C, 30 s). V nobenem izmed vzorcev inhibicije nismo zaznali.

### 3.5.8 Priprava in izolacija standardov

#### Transformacija kompetentnih celic

Priprava plazmidnih standardov je potekala na institutu INRA, Dijon v Franciji, kjer so za transformacijo uporabili kompetentne celice *E. coli*, seva JM 109 (Promega). Pomnoževanje tarčnih odsekov za bakterijski in arhejski *amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*, bakterijski in arhejski 16S rRNA ter glivni ITS je potekalo z navadnim PCR postopkom. Kompetentnim celicam *E. coli* je bila dodana ligacijska reakcija, ki je vsebovala očiščeni pomnožek PCR (insert) in plazmidni pGEM-T Easy vektor (Promega). Po transformaciji so bile celice nanese na trdno LB gojišče z ampicilinom, PTG in X-Galom za modro-belo selekcijo. Bele kolonije (te so vsebovale celice z vstavljenim plazmidom) so bile nato še namnožene v tekočem LB gojišču z ampicilinom. Namnoževanje celic, tako v trdem kot v tekočem LB gojišču, je potekalo čez noč na 37 °C. Izolacija plazmida z insertom je potekala z uporabo kita High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švica). Koncentracija plazmida je bila fluorometrično izmerjena z uporabo kita Quant-iT DNA Assay Kit, kot je opisano v točki 3.5.2.

Število kopij plazmidnega standarda izračunamo na podlagi izmerjene koncentracije DNA, Avogadrovega števila ( $6,02 \times 10^{23}$ ) ter dolžine plazmida z vstavljenim tarčnim fragmentom po spodnji enačbi, ob predpostavki, da je povprečna molekulska masa dvoverižne DNA  $660 \text{ g mol}^{-1}$ :

$$\left[ \frac{\text{Število molekul}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{DNA koncentracija plazmida} \times 6,02E23}{\text{Dolžina (plazmid+insert)} \times 660} \quad \dots (4)$$

### 3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Statistična analiza podatkov je potekala v programu R (R Core Team, 2013). Podatke za fizikalno-kemijske lastnosti tal ter mikrobnio biomaso smo analizirali kot dvo-faktorsko zasnovan poskus, v katerem prvi faktor predstavlja obdelavo (MT, CT) in drugi globino (0–10 cm, 10–20 cm, 20–30 cm in 40–60 cm). Za ugotavljanje posameznih vplivov obdelave tal in globine ter njune interakcije na talne lastnosti smo v R Comminderju uporabili analizo variance (ANOVA). V primeru značilnih interakcij smo za analizo razlik v povprečjih uporabili Duncanov test ( $p < 0,05$ ). Linearno povezanosti med posameznimi parametri smo določili z analizo linearne regresije.

Določanje pestrosti in strukture mikrobnih združb je potekalo z uporabo RStudia, v katerem smo naredili analizo T-RFLP profilov na podlagi podatkovne matrike, pridobljene s programom T-REX (Culman in sod., 2009). Na osnovi relativne številčnosti oziroma pogostosti posameznih vrhov v T-RFLP profilu smo izrisali toplotne karte (ang. »heat map«). Pred tem smo vse fragmente, nižje od 50 fluorescentnih enot, in fragmente z relativnim deležem, manjšim od 5 %, izključili iz analize. Za izris toplotne karte z dendrogrami smo uporabili metodo UPGMA (»unweighted pair group method with arithmetic mean«, slovensko metoda neponderirane aritmetične sredine) in Bray-Curtisov koeficient podobnosti.

Z uporabo linearnih mešanih modelov smo analizirali vpliv obdelave in globine tal (opisni spremenljivki) ter vsebnosti vode in temperature v tleh (numerični spremenljivki) na velikost mikrobnih združb, določene kot število kopij posameznega gena na gram suhih tal. Podatki o vsebnosti vode v tleh, izraženi kot odstotek spremembe od poljske kapacitete (% PK), in temperaturi tal na zgornjih 5 cm tal (°C) so bili pred analizo centrirani, kar pomeni, da vse povprečne vrednosti kvantificiranih genov veljajo pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi tal. Prav tako so bile vse številske spremenljivke transformirane z naravnim logaritmom. Za razlago razlik med obravnavanji smo izvedli analizo kontrastov s funkcijo »glht« iz programskega paketa »multcomp«. Analiza linearnih mešanih modelov je bila narejena z uporabo funkcije »lmer« iz paketa »lme4«.

## 4 REZULTATI

Z namenom preučevanja učinkov in ustreznosti ohranitvene obdelave smo v prvem delu doktorske naloge v dveh različnih pedo-klimatskih pogojih, v Ljubljani in Moškanjcih, jeseni 2011 (12 let od postavitve poskusa) opravili enkratno vzorčenje za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti tal s posebnim poudarkom na biotskih lastnostih tal.

V drugem delu raziskave smo v letu 2013 na lokaciji v Moškanjcih, za katero so poleti značilna sušna obdobja, preučevali vpliv naravnega pojava sušnega stresa na odziv splošne združbe bakterij, gliv in arhej, kot tudi njenega vpliva na funkcionalno pestrost mikrobnih združb, vključenih v cikel dušika.

### 4.1 VPLIV OBDELAVE NA FIZIKALNO-KEMIJSKE IN BIOTSKE LASTNOSTI TAL V LJUBLJANI IN MOŠKANJCIH

Ohranitvena obdelava je po 12 letih na obeh lokacijah povzročila prerazporeditev  $C_{org}$  v profilu, z največjo vsebnostjo v zgornjih 10 cm tal (Pregl. 3), kar je vplivalo na ostale fizikalno-kemijske (Pregl. 4–7) in mikrobiološke lastnosti tal (Sl. 10–16). Razlog za to je v načinu obdelave, saj se pri minimalni obdelavi za razliko od konvencionalne posamezni sloji tal med seboj niso mešali.

#### 4.1.1 Vpliv obdelave na kemijske lastnosti tal

Na vsebnost  $C_{org}$  sta na obeh lokacijah vplivali tako obdelava kot globina (Ljubljana:  $p < 0,0001$ ; Moškanjci:  $p < 0,05$ ). Minimalna obdelava je na obeh lokacijah povzročila vertikalno prerazporeditev  $C_{org}$  v profilu z največjo vsebnostjo v zgornjem 0–10 cm sloju tal (Pregl. 3), medtem ko je bila vsebnost  $C_{org}$  pri CT obravnavanju enaka v zgornjih 20 cm v Ljubljani oziroma v zgornjih 30 cm v Moškanjcih. Na lokaciji v Ljubljani je MT v primerjavi s CT značilno povečala vsebnost  $C_{org}$  na globini 0–10 cm, medtem ko je bila vsebnost  $C_{org}$  na globinah 10–20 cm in 20–30 cm večja pri CT. Za razliko od Ljubljane pa v Moškanjcih značilnih razlik med MT in CT v zgornjih 0–10 cm in 10–20 cm nismo zaznali, medtem ko je bila vsebnost  $C_{org}$  v 20–30 cm sloju večja pri CT. Posledično se na nobeni izmed lokacij skupna zaloga  $C_{org}$  v profilu ni spremenila in je v Ljubljani pri MT znašala  $85,4 \pm 5,8 \text{ t ha}^{-1}$ , pri CT pa  $90,6 \pm 1,6 \text{ t ha}^{-1}$  ter v Moškanjcih  $57,4 \pm 0,8 \text{ t ha}^{-1}$  pri MT in  $59,1 \pm 2,2 \text{ t ha}^{-1}$  pri CT.

Podobno kot pri  $C_{org}$  je na koncentracijo skupnega dušika na obeh lokacijah močno vplivala interakcija med obdelavo in globino (Ljubljana:  $p < 0,0001$ ; Moškanjci:  $p < 0,05$ ). Prav tako je MT povzročila prerazporeditev TN v profilu, z največjimi vrednostmi v zgornjem sloju tal, medtem ko je bila pri CT zaloga TN v Ljubljani enaka v zgornjem 0–20 cm, oziroma v Moškanjcih v 0–30 cm, sloju tal (Pregl. 3). MT je v Ljubljani značilno povečala vsebnost TN v zgornjih 10 cm v primerjavi s CT, medtem ko razlike v

Moškanjcih niso bile značilne. Na obeh lokacijah je bila na globini 20–30 cm vsebnost TN večja pri CT v primerjavi z MT.

Preglednica 3: Vsebnost  $C_{org}$  in TN v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

Table 3: Soil organic carbon ( $C_{org}$ ) and total nitrogen (TN) in Ljubljana and Moškanjci under minimum (MT) and conventional tillage (CT). Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina (cm)	$C_{org}$ (%)				TN (%)			
		Ljubljana		Moškanjci		Ljubljana		Moškanjci	
MT	0 - 10	2,88 ± 0,05	a	1,60 ± 0,07	a	0,30 ± 0,01	a	0,17 ± 0,01	a
	10 - 20	1,98 ± 0,03	c	1,33 ± 0,05	b	0,21 ± 0,00	cd	0,14 ± 0,00	b
	20 - 30	1,22 ± 0,06	d	1,03 ± 0,09	c	0,14 ± 0,01	e	0,11 ± 0,01	c
	30 - 60	0,56 ± 0,04	e	0,63 ± 0,06	d	0,07 ± 0,00	f	0,08 ± 0,01	d
	0 - 10	2,39 ± 0,03	b	1,45 ± 0,05	ab	0,25 ± 0,00	b	0,16 ± 0,01	ab
CT	10 - 20	2,23 ± 0,04	b	1,40 ± 0,04	ab	0,23 ± 0,00	bc	0,15 ± 0,00	ab
	20 - 30	1,88 ± 0,05	c	1,33 ± 0,10	b	0,20 ± 0,01	d	0,14 ± 0,01	b
	30 - 60	0,67 ± 0,04	e	0,68 ± 0,05	d	0,08 ± 0,00	f	0,09 ± 0,01	d

Značilen vpliv obdelave in globine smo v Ljubljani opazili tudi pri vsebnosti rastlinam dostopnega fosforja in kalija ( $p < 0,0000$ ), medtem ko je v Moškanjcih bil ta vpliv značilen le pri fosforju ( $p < 0,01$ ). Pri MT smo na lokaciji v Ljubljani zaznali značilno prerazporeditev fosforja v profilu, medtem ko pri CT v zgornjih 20 cm razlik v vsebnosti ni bilo, so pa bile značilne v spodnjih dveh globinah (Pregl. 4). V zgornjem 0–10 cm sloju je v Ljubljani pri MT obravnavanju vsebnost fosforja bila značilno večja v primerjavi s CT, medtem ko so bile v vseh ostalih slojih vsebnosti značilno večje pri CT. Nasprotno, v Moškanjcih razlik v vsebnosti fosforja med obdelavama ni bilo, kljub temu pa smo v MT tleh zaznali značilen vpliv globine v zgornjih treh slojih in s tem nakazano prerazporeditev fosforja v profilu (Pregl. 4). Povprečna vsebnost rastlinam dostopnega fosforja (AL-metoda) je v zgornjih 10 cm v Ljubljani znaša  $21,0 \pm 1,0 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri MT in  $16,3 \pm 0,9 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri CT ter v Moškanjcih  $37,1 \pm 1,1 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri MT in  $35,2 \pm 1,6 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri CT.

MT je v zgornjih 10 cm tal na obeh lokacijah prav tako povečala vsebnosti kalija v primerjavi s CT, ki so znašale  $26,6 \pm 1,3 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri MT in  $19,0 \pm 0,5 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri CT v Ljubljani ter  $47,4 \pm 3,7 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri MT in  $38,1 \pm 2,8 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  pri CT v Moškanjcih (Pregl. 4). Vsebnosti kalija so bile na obeh lokacijah v MT tleh značilno večje v zgornjem 0–10 cm sloju in so z globino padale (Pregl. 4).

Preglednica 4: Vsebnost rastlinam dostopnega fosforja in kalija v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

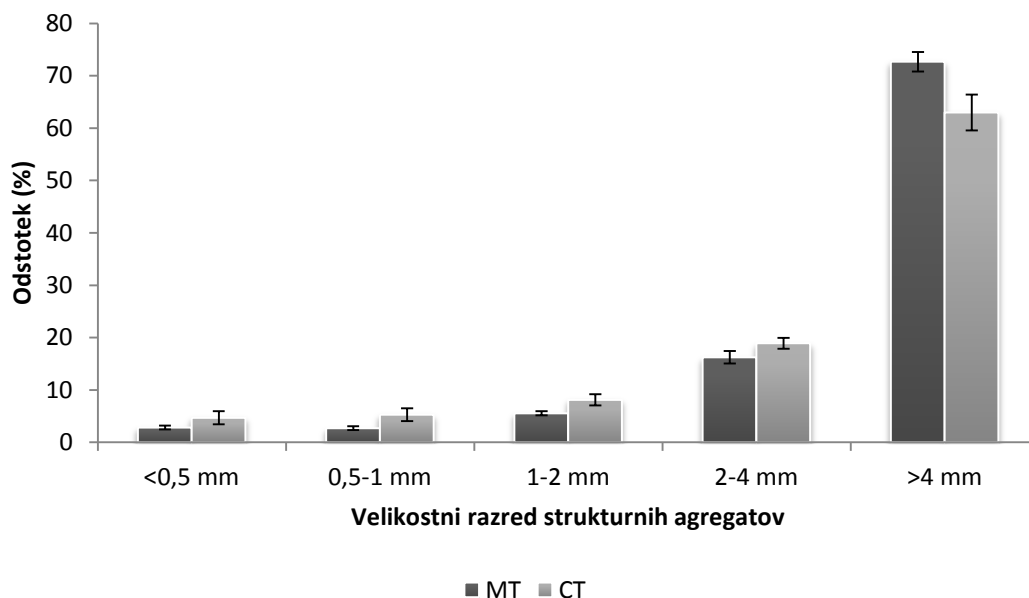
Table 4: Plant available phosphorus and potassium in Ljubljana and Moškanjci under minimum (MT) and conventional tillage (CT). Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina (cm)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)		K <sub>2</sub> O (mg/100g)	
		Ljubljana	Moškanjci	Ljubljana	Moškanjci
MT	0 - 10	20,97 ± 1,07 a	37,13 ± 1,13 a	26,55 ± 1,29 a	47,85 ± 3,56 a
	10 - 20	12,01 ± 0,73 c	34,08 ± 1,73 ab	13,72 ± 0,61 c	30,35 ± 2,62 c
	20 - 30	2,13 ± 0,34 e	20,00 ± 2,77 c	9,63 ± 0,25 d	21,78 ± 1,35 e
	30 - 60	0,87 ± 0,16 g	7,35 ± 2,10 d	8,85 ± 0,23 d	18,25 ± 1,92 e
CT	0 - 10	16,25 ± 0,89 b	35,20 ± 1,55 ab	18,97 ± 0,48 b	38,10 ± 2,84 b
	10 - 20	16,94 ± 1,15 b	36,08 ± 1,76 a	15,58 ± 0,71 c	32,40 ± 1,56 bc
	20 - 30	10,89 ± 1,04 d	29,98 ± 1,81 b	13,91 ± 0,59 c	29,05 ± 1,65 cd
	30 - 60	1,23 ± 0,30 f	8,85 ± 0,65 d	8,30 ± 0,29 d	22,98 ± 2,51 de

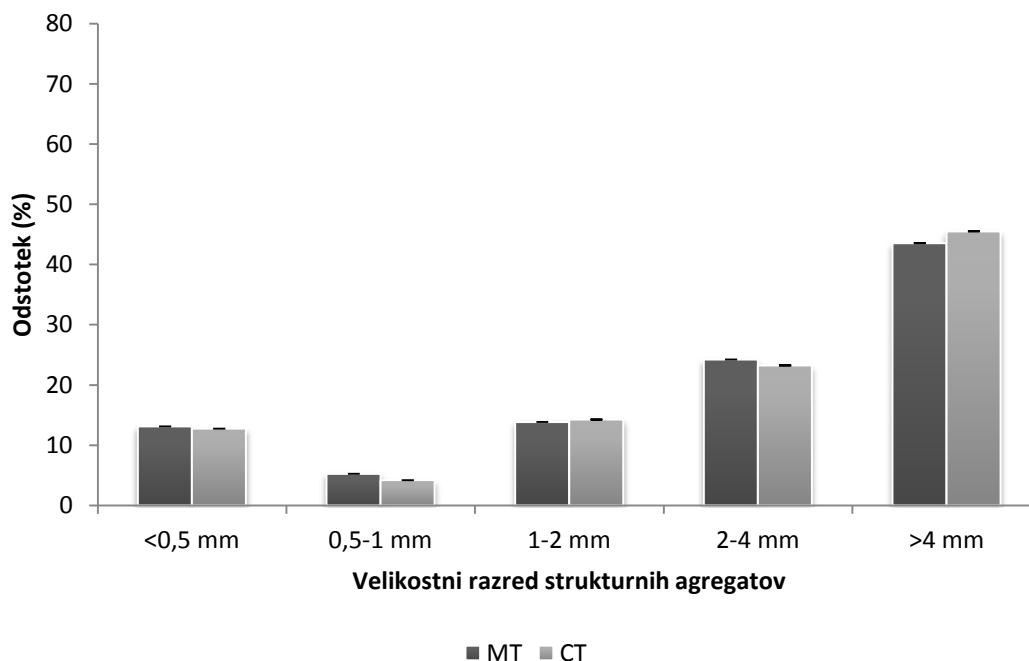
Tako v Ljubljani kot v Moškanjcih razlik v C/N razmerju, pH tal in CEC med obdelavama nismo zaznali. C/N razmerje je bilo v Ljubljani v rangu od 8 v spodnjem sloju (30–60 cm) do 10 v zgornjih slojih tal, v Moškanjcih pa je bila vrednost C/N razmerja v povprečju 9. pH vrednosti so bile v razponu od 6,5 v zgornjem sloju tal do 6,7 spodaj v Ljubljani in od 6,1 zgoraj do 6,5 spodaj v Moškanjcih. Vrednosti CEC v Ljubljani znašale med 18,9 in 20,2 mmol<sub>c</sub> 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> pri MT in 18,8–19,8 mmol<sub>c</sub> 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> pri CT ter v Moškanjcih od 15,2 do 15,6 mmol<sub>c</sub> 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> pri MT in 15,4–15,8 mmol<sub>c</sub> 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> pri CT.

#### 4.1.2 Vpliv obdelave na fizikalne lastnosti tal

Po frakcionaciji talnih agregatov v pet velikostnih razredov smo na obeh lokacijah največji odstotek strukturnih agregatov določili v največjem velikostnem razredu (>4 mm), in sicer v povprečju 67,8 % v Ljubljani ter 44,5 % v Moškanjcih. Sledila je frakcija 2–4 mm s povprečno 17,5 % strukturnih agregatov v Ljubljani in 23,7 % v Moškanjcih pri obeh obdelavah. Najmanjši odstotek agregatov smo v Ljubljani določili v najmanjših dveh velikostnih razredih (<1mm; povprečno 2,8 %) (Sl. 7), medtem ko je bil najmanjši odstotek agregatov v Moškanjcih v 0,5–1 mm frakciji (povprečno 4,5 %). V frakciji 1–2 mm in v frakciji z agregati, manjšimi od 0,5 mm, pa smo v Moškanjcih določili približno enak odstotek (14,5 %) (Sl. 8).



Slika 7: Razporeditev strukturalnih agregatov po velikostnih frakcijah pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Ljubljani. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake  
Figure 7: Aggregate size distribution under minimum (MT) and conventional (CT) tillage in Ljubljana. Average values with standard errors are shown



Slika 8: Odstotek strukturalnih agregatov v Moškanjcih po velikostnih frakcijah pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake  
Figure 8: Aggregate size distribution under minimum (MT) and conventional (CT) tillage in Moškanjci. Average values with standard errors are shown

V nadaljnji analizi smo za določanje obstojnosti strukturalnih agregatov z metodo mokrega sejanja uporabili frakciji 1–2 mm in 2–4 mm. MT je na obeh lokacijah značilno povečala



obstoynost strukturnih agregatov v frakciji 2–4 mm na globini 0–10 cm, medtem ko v spodnjih globinah razlik med obdelavama nismo zaznali (Pregl. 5). MT je v zgornjem sloju tal v Ljubljani izboljšala obstoynost strukturnih agregatov za približno 11 % (78,9±3,4 % pri MT in 70,2±1,4 pri CT) ter v Moškanjcih za približno 24 % v primerjavi s CT (80,9±6,1 % pri MT in 61,3±5,6 % pri CT) (Pregl. 5). V frakciji 1–2 mm razlike med MT in CT niso bile značilne na nobeni izmed lokacij; v Moškanjcih predvsem zaradi prevelike variabilnosti med ponovitvami.

Preglednica 5: Ostoynost strukturnih agregatov (%) v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino tal. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

Table 5: Aggregate stability (%) under minimum (MT) and conventional tillage (CT) in Ljubljana and Moškanjci. Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina (cm)	1–2 mm				2–4 mm			
		Ljubljana		Moškanjci		Ljubljana		Moškanjci	
MT	0 - 10	78,68 ±2,47	a	81,88 ± 4,47	a	78,92 ±3,40	a	80,88 ± 6,08	a
	10 - 20	74,18 ±3,32	a	77,00 ± 6,69	a	77,33 ±3,17	ab	81,40 ± 5,84	a
CT	0 - 10	74,77 ±1,49	a	64,88 ± 9,76	a	70,17 ±1,42	b	61,33 ± 5,62	b
	10 - 20	71,00 ±1,26	a	71,38 ± 2,92	a	70,00 ±2,25	b	74,80 ± 4,77	ab

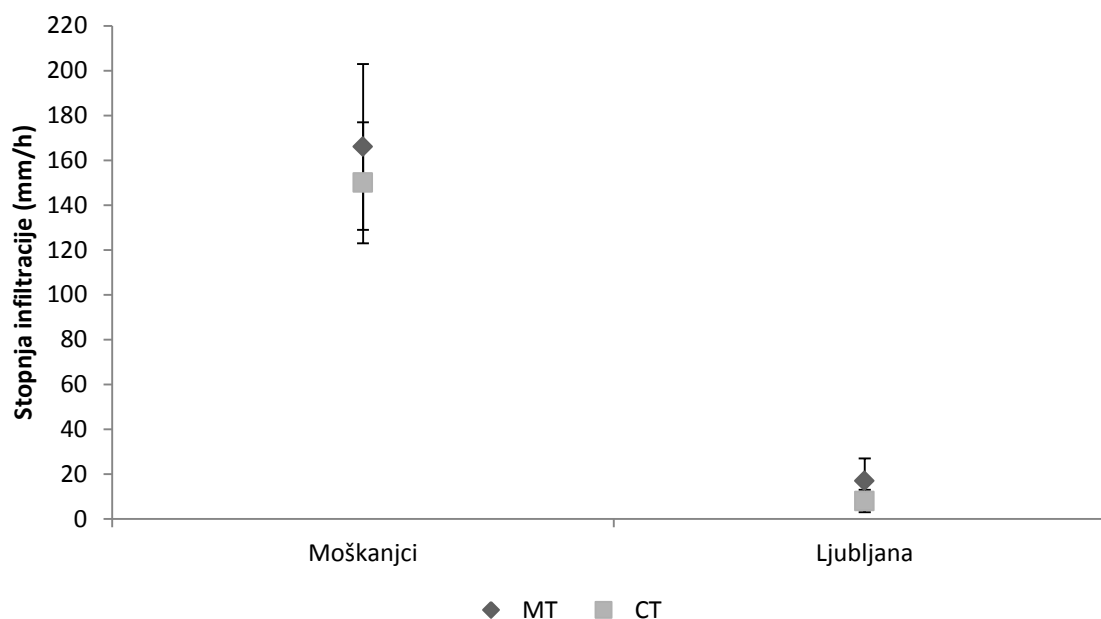
Na volumsko gostoto in poroznost tal je interakcija med obdelavo in globino vplivala le na poskusnem polju v Ljubljani ( $p < 0,001$ ). MT je v Ljubljani zmanjšala volumsko gostoto zgornjega sloja tal ( $1,251 \text{ g cm}^{-3} \pm 0,033$ ) v primerjavi s CT ( $1,368 \text{ g cm}^{-3} \pm 0,023$ ), medtem ko smo v Moškanjcih sicer opazili zmanjšanje volumske gostote zgornjega sloja tal pri MT, vendar so bile vrednosti mejno značilne ( $0,05 < p > 0,1$ ) (Pregl. 6). Povprečna gostota tal v 0–10 cm sloju je pri MT znašala  $1,31 \pm 0,07 \text{ g cm}^{-3}$ , pri CT pa  $1,51 \pm 0,05 \text{ g cm}^{-3}$  (Pregl. 6). Posledično je MT v Ljubljani značilno povečala poroznost tal v zgornjih 10 cm iz 48 % pri CT na 53 % pri MT, medtem ko razlike v Moškanjcih, zaradi prevelike variabilnosti, niso bile značilne (43 % pri CT in 51 % pri MT).

Preglednica 6: Volumska gostota tal ( $\text{g cm}^{-3}$ ) in poroznost (%) v Ljubljani in Moškanjcih v različnih globinah tal pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT). V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0.05$ )

Table 6: Soil bulk density ( $\text{g cm}^{-3}$ ) and soil porosity (%) under minimum (MT) and conventional tillage (CT) in Ljubljana and Moškanjci. Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina (cm)	Volumska gostota ( $\text{g cm}^{-3}$ )				Poroznost (%)			
		Ljubljana		Moškanjci		Ljubljana		Moškanjci	
MT	0 - 10	1,251 ±0,03	c	1,309 ± 0,07	b	52,8 ±1,3	a	50,6 ± 2,7	a
	10 - 20	1,325 ±0,00	bc	1,452 ± 0,05	ab	50,0 ±0,2	ab	45,2 ± 2,0	ab
	20 - 30	1,400 ±0,02	ab	1,599 ± 0,03	a	47,2 ±0,9	bc	39,7 ± 1,3	b
CT	0 - 10	1,368 ±0,02	ab	1,507 ± 0,05	ab	48,4 ±0,9	bc	43,1 ± 1,7	ab
	10 - 20	1,318 ±0,03	bc	1,503 ± 0,03	ab	50,3 ±0,9	ab	43,3 ± 1,3	ab
	20 - 30	1,255 ±0,01	c	1,599 ± 0,01	a	52,7 ±0,2	a	39,6 ± 0,4	b

Na stopnjo infiltracije vode obdelava ni vplivala na nobeni lokaciji. V Ljubljani smo sicer razlike med obdelavama zaznali, vendar zaradi prevelike variabilnosti meritev razlike niso bile značilne (Sl. 9). Variabilnost je bila v Moškanjcih 20 %, v Ljubljani pa kar 60 %. V primerjavi z Ljubljano je bila v Moškanjcih stopnja infiltracije veliko večja. V Ljubljani je infiltracija znašala  $17\pm 10$  mm h<sup>-1</sup> pri MT in  $8\pm 5$  mm h<sup>-1</sup> pri CT, v Moškanjcih pa  $166\pm 37$  mm h<sup>-1</sup> pri MT in  $150\pm 27$  mm h<sup>-1</sup> pri CT (Sl. 9).



Slika 9: Stopnja infiltracije v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti s standardnimi napakami  
Figure 9: Average infiltration rate with standard errors under minimum (MT) and conventional tillage (CT) in Ljubljana and Moškanjci

Poleg infiltracije smo na obeh lokacijah merili tudi poljsko kapaciteto (PK) in točko venenja (TV) ter iz njune razlike izračunali rastlinam dostopno vodo ali učinkovito poljsko kapaciteto (EPK). Značilen vpliv obdelave in globine smo na obeh lokacijah zaznali pri EPK (Ljubljana:  $p < 0,01$ ; Moškanjci  $p < 0,001$ ) in PK (Ljubljana in Moškanjci:  $p < 0,001$ ), medtem ko smo vpliv obdelave in globine na TV zaznali le v Ljubljani ( $p < 0,05$ ). Značilne razlike med obdelavama smo opazili le v zgornjem 0–10 cm sloju, kjer je MT v Ljubljani značilno povečala TV za 28 %, medtem ko je PK ostala nespremenjena (Pregl. 7). Posledično je bil odstotek EPK pri CT za 28 % večji kot pri MT. Nasprotno pa je v Moškanjcih MT v primerjavi s CT v zgornjem 0–10 cm sloju povečala PK iz 22 % na 25 % in EPK iz 10 % na 13 % (Pregl. 7). Na TV v Moškanjcih obdelava ni imela vpliva. Ta je pri obeh obdelavah znašala približno 11,5 %.

Preglednica 7: Vodno zadrževalne lastnosti tal (%) v Ljubljani in Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na globino tal. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

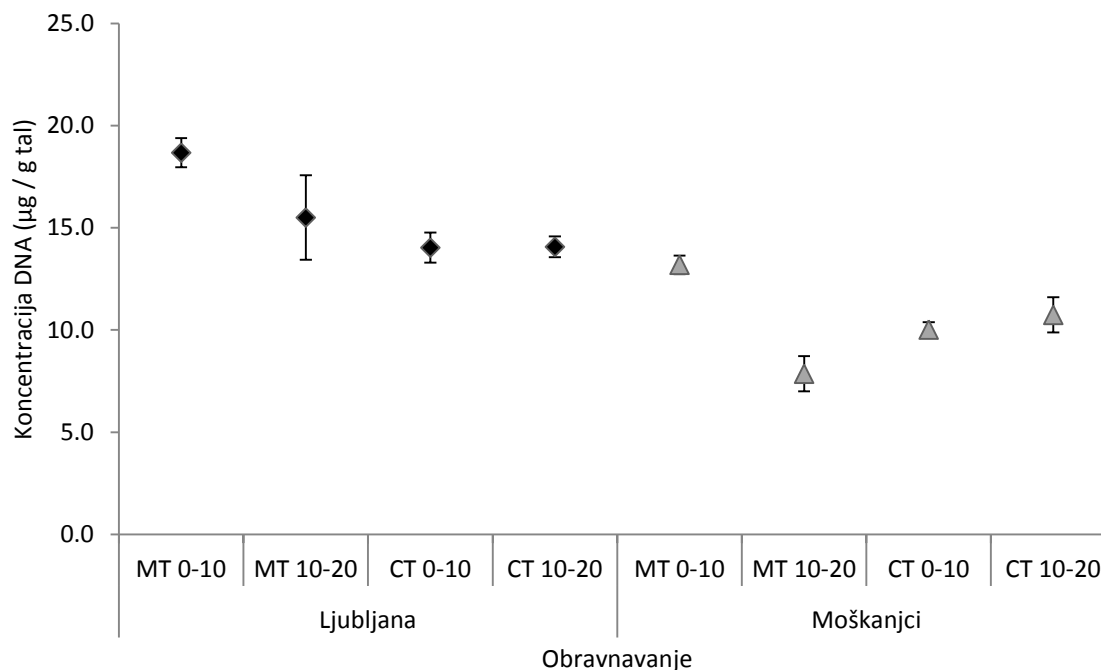
Table 7: Soil water characteristics under minimum (MT) and conventional tillage (CT) in Ljubljana and Moškanjci. Averages and standard errors are shown. Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina (cm)	Poljska kapaciteta (%)		Točka venenja (%)		Rastlinam dostopna voda (%)	
		Ljubljana	Moškanjci	Ljubljana	Moškanjci	Ljubljana	Moškanjci
MT	0 - 10	43.11 ± 1.19 a	24.76 ± 0.48 a	23.76 ± 2.26 a	11.34 ± 0.26 a	19.35 ± 1.25 b	13.43 ± 0.69 a
	10 - 20	40.32 ± 0.53 ac	23.32 ± 0.31 ab	18.32 ± 0.25 b	11.40 ± 0.21 a	22.00 ± 0.72 ab	11.92 ± 0.33 ab
CT	0 - 10	41.76 ± 0.99 ab	22.21 ± 0.24 b	17.10 ± 0.39 b	11.94 ± 0.22 a	24.66 ± 1.35 a	10.27 ± 0.14 b
	10 - 20	39.05 ± 0.63 bc	24.21 ± 0.64 a	17.15 ± 0.25 b	11.33 ± 0.18 a	21.89 ± 0.77 ab	12.89 ± 0.70 a

## 4.2 VPLIV OBDELAVE NA STRUKTURO MIKROBNIH ZDRUŽB

### 4.2.1 Vpliv obdelave na mikrobnio biomaso

Spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti so se odrazile na mikrobnio biomaso, ki smo jo ocenili na osnovi določitve skupne talne DNA (Blagodatskaya in Kuzyakov, 2013). Na skupno talno DNA je na obeh lokacijah vplivala tako obdelava kot globina, z močno značilno interakcijo ( $p < 0,0001$ ). Minimalna obdelava je na obeh lokacijah v zgornjem 0–10 cm sloju tal povečala koncentracijo skupne talne DNA (18,79  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  suhih tal v Ljubljani in 13,19  $\mu\text{g DNA}$  suhih tal v Moškanjcih) v primerjavi s CT (14,03  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  suhih tal v Ljubljani in 10,02  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  suhih tal v Moškanjcih) (Sl. 10). Na globini 10–20 cm so bile razlike med obdelavama značilne le v Moškanjcih, in sicer je bila koncentracija DNA večja pri CT. Med skupno talno DNA in  $C_{\text{org}}$  smo na obeh lokacijah zaznali pozitivno linearno povezavo (Ljubljana:  $R^2=0,36$ ;  $p < 0,0001$ ;  $y=2,486 + 5,398 x$ ; Moškanjci:  $R^2=0,47$ ;  $p < 0,0034$ ;  $y=-5,672 + 11,170 x$ ). Prav tako smo pozitivno linearno povezavo med skupno talno DNA in  $C_{\text{org}}$  dobili tudi v primeru, ko smo primerjali podatke iz obeh lokacij skupaj ( $R^2=0,40$ ;  $p < 0,0002$ ;  $y=2,664 + 5,519 x$ ).



Slika 10: Skupna DNA koncentracija ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  tal) v Ljubljani (levo) in Moškanjcih (desno) na globini 0–10 cm in 10–20 cm pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake

Figure 10: Total soil DNA concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$  soil) in Ljubljana (left) and Moškanjci (right) at 0–10 cm and 10–20 cm soil layers under conventional tillage (CT) and minimum tillage (MT). Averages with standard errors are shown

#### 4.2.2 Vpliv obdelave na strukturo mikrobnih združb

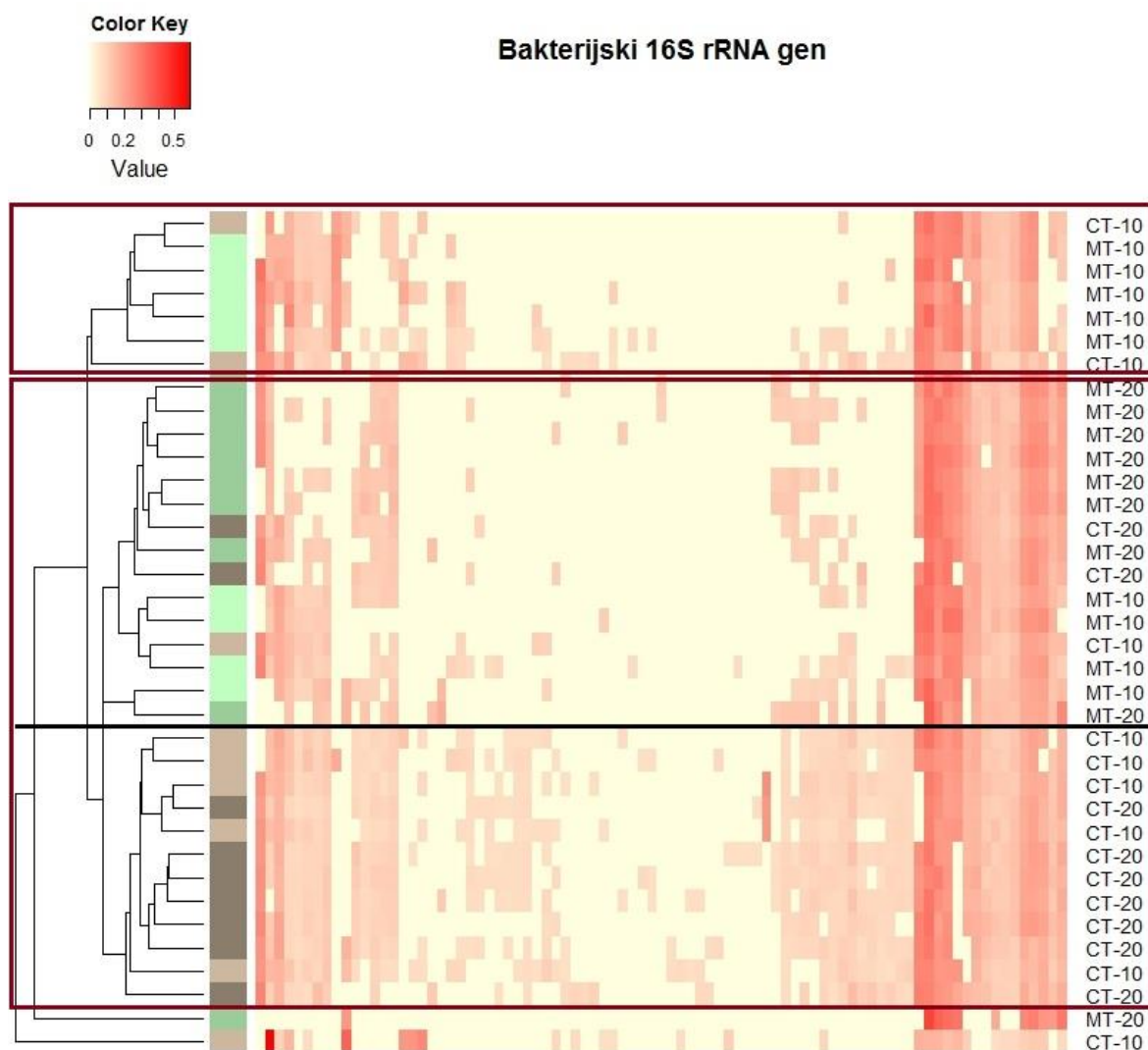
Z metodo hierarhičnega razvrščanja v skupine in uporabo toplotne karte (ang. Hierarchically clustering heat map analysis) smo na podlagi relativnega deleža T-RFLP fragmentov ovrednotili vpliv obdelave na strukturo mikrobnih združb. Toplotna karta prikazuje relativne vrednosti, izražene z intenziteto obarvanosti posameznega fragmenta pri posamezni obdelavi in globini. Dendrogram na levi strani toplotne karte razvršča posamezne vzorce, ki predstavljajo štiri obravnavanja (MT 0–10, MT 10–20, CT 0–10, CT 10–20), v skupine na podlagi raznolikosti, pri čemer dolžina horizontalne veje na dendrogramu pomeni filogenetsko razdaljo med skupinami.

V splošnem minimalna obdelava ni povzročila večjih sprememb v strukturi mikrobnih združb v Ljubljani, lahko pa omenimo nekaj manjših sprememb zaradi obdelave v združbi bakterij (Sl. 11) in manjši vpliv globine na združbo gliv (Sl. 12). Za razliko od Ljubljane so bile v Moškanjcih spremembe v strukturi mikrobnih združb nekoliko izrazitejše, kljub temu pa je bil vpliv minimalne obdelave še vedno razmeroma majhen. Največji vpliv obdelave smo opazili v strukturi bakterijske združbe (Sl. 14), prav tako je vplivala tudi na strukturo glivne združbe (Sl. 15). Potrebno je omeniti še, da so bili nekateri TRF v

bakterijski in glivni združbi na obeh lokacijah specifični glede na način obdelave in/ali globino.

#### 4.2.2.1 Struktura mikrobnih združb v Ljubljani

Na podlagi relativnega deleža 85 bakterijskih TRF smo v Ljubljani bakterije razvrstili v dve glavni skupini: skupino 0–10 cm in skupino z vsemi preostalimi vzorci (Sl. 11). Skupina 0–10 cm zajema le pet vzorcev iz MT in dva iz CT obravnavanja. Druga, bolj heterogena skupina zajema vse preostale vzorce in se deli na dve dodatni podskupini, MT in CT. Pri tem je potrebno poudariti, da so bile razlike med obema podskupinama majhne (Sl. 11). V MT podskupini, v kateri prevladujejo bakterijske združbe iz MT 10–20 cm, najdemo tudi tri CT vzorce in 2 MT vzorca iz 0–10 cm, medtem ko drugo podskupino sestavljajo izključno bakterijske združbe iz CT obravnavanja. Poleg omenjenih skupin sta v spodnjem delu dendrograma prisotna dva osamelca, MT 10–20 in CT 0–10. Iz dendrograma vidimo, da je kar 23 TRF prisotnih samo v CT podskupini, od tega trije samo na globini 0–10 cm (TRF-77, TRF-142 in TRF-180) in pet samo na globini 10–20 cm (TRF-156, TRF-162, TRF-169, TRF-177 in TRF-188). V MT podskupini smo našli dva taka TRF, ki nista bila prisotna pri ostalih obravnavanjih, in sicer enega na globini 0–10 cm (TRF-143) in drugega na globini 10–20 cm (TRF-251).



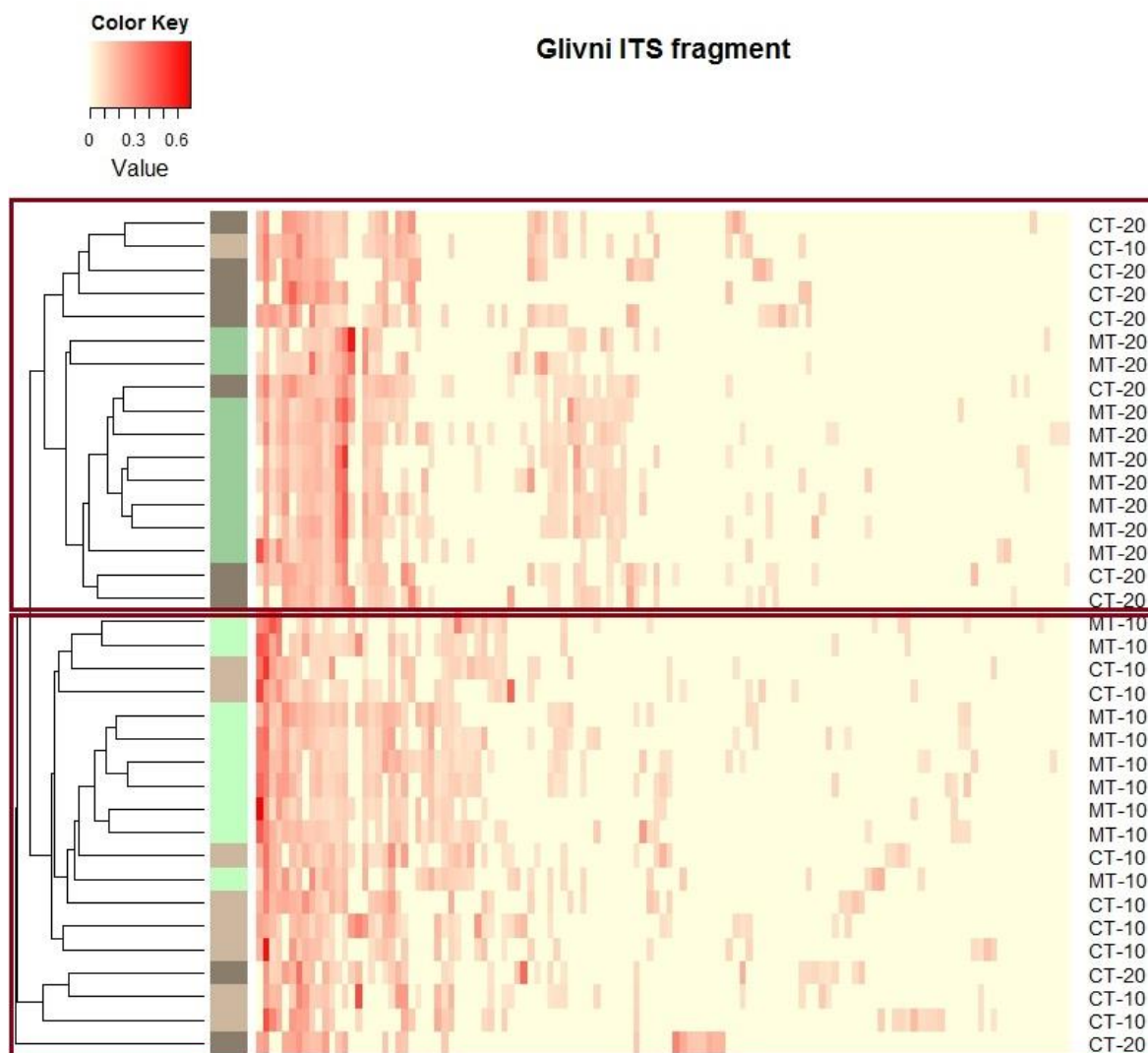
Terminalni restrikcijski fragmenti

Slika 11: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za bakterije v Ljubljani. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 85 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment. Na sliki so označene posamezne skupine

Figure 11: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 85 bacterial TRFs as affected by tillage (minimum - MT) and conventional ploughing - CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Ljubljana. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure. Individual groups are also presented

Za razliko od bakterij smo na strukturo glivne združbe v Ljubljani opazili manjši vpliv globine, medtem ko obdelava na razvrstitev ni vplivala. Na podlagi relativnega deleža 123 glivnih T-RF in hierarhičnega razvrščanja smo glive, kljub majhnim razlikam med skupinami, razvrstili v dve glavni skupini, 0–10 cm in 10–20 cm (Sl. 12). Poleg omenjenih skupin na spodnjem delu dendrograma opazimo tudi manjšo skupino, sestavljeno iz dveh CT vzorcev iz zgornje globine in dveh CT vzorcev iz spodnje globine. Razlike med obema

glavnima skupinama so bile predvsem posledica 37 T-RF, ki so bili prisotni le v skupini 0–10 cm in 19 T-RF prisotnih le v skupini 10–20 cm.



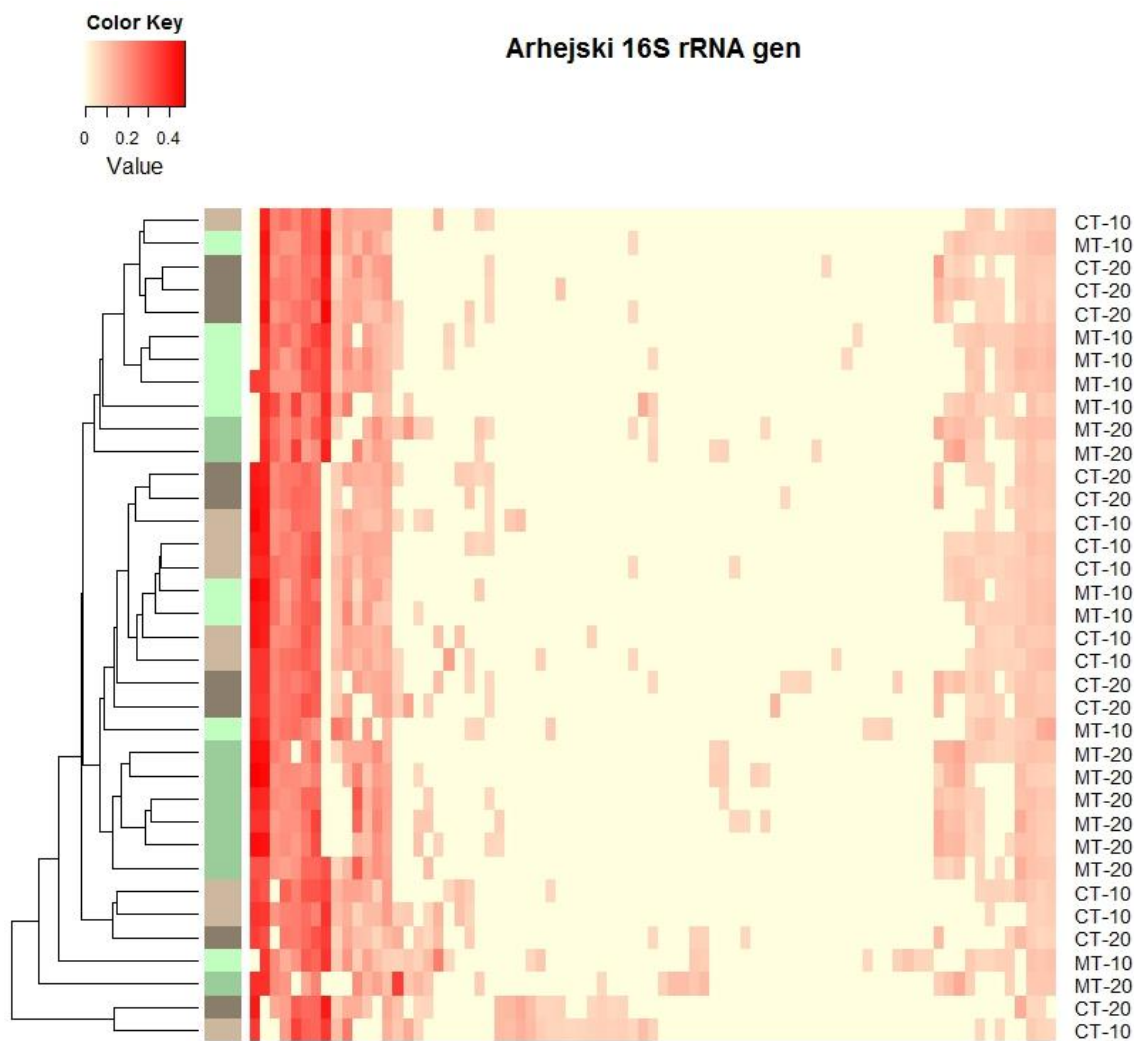
Terminalni restrikcijski fragmenti

Slika 12: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za glive v Ljubljani. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 123 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment. Na sliki so označene posamezne skupine

Figure 12: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 123 fungal TRFs as affected by tillage (minimum - MT) and conventional ploughing - CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Ljubljana. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure. Individual groups are also presented

Na strukturo združbe arhej, v kateri smo določili skupno 79 TRF, tako obdelava kot globina nista imeli vpliva (Sl. 13).

Čeprav so bile razlike v strukturi bakterij med obdelavama majhne, so bile razlike v pestrosti značilne ( $p < 0.000$ ). Večjo pestrost v bakterijski združbi smo zaznali pri CT tako na zgornji ( $43 \pm 5$ ) kot na spodnji globini ( $57 \pm 2$ ) v primerjavi z MT ( $29 \pm 3$  na 0–10 cm in  $31 \pm 1$  na globini 10–20 cm). V CT tleh je bila pestrost večja na spodnji globini in ne v zgornjem sloju tal. Za razliko od bakterij obdelava in globina nista vplivali na pestrost gliv in arhej. Povprečno število TRF je pri glivah bilo  $47 \pm 5$  pri MT in  $41 \pm 7$  pri CT, pri arhejah pa  $75 \pm 3$  pri MT in  $79 \pm 3$  pri CT (Pregl. 8).



Terminalni restrikcijski fragmenti

Slika 13: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za arheje v Ljubljani. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 79 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment

Figure 13: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 79 archaeal TRFs as affected by tillage (minimum - MT and conventional ploughing - CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Ljubljana. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure



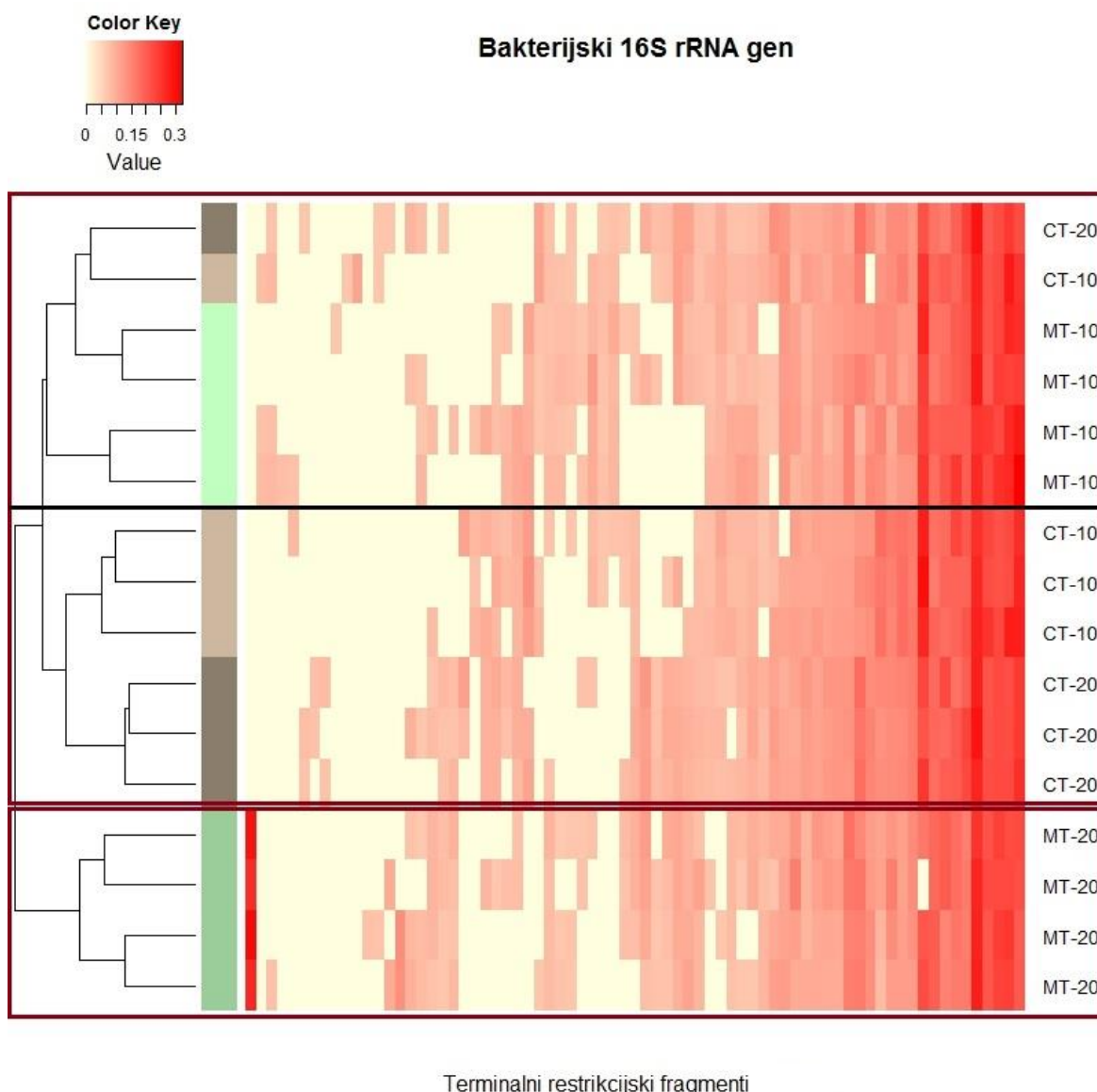
Preglednica 8: Število fragmentov pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Ljubljani. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

Table 8: The number of terminal restriction fragments under minimum (MT) and conventional (CT) tillage at site Ljubljana. Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

Obdelava	Globina	Bakterije	Glive	Arheje
MT	0-10	29 ± 3 c	47 ± 6 a	75 ± 4 a
	10-20	31 ± 1 c	46 ± 7 a	78 ± 4 a
CT	0-10	43 ± 5 b	47 ± 3 a	76 ± 2 a
	10-20	57 ± 2 a	35 ± 6 a	80 ± 3 a

#### 4.2.2.2 Struktura mikrobnih združb v Moškanjcih

Z metodo hierarhičnega razvrščanja v skupine in uporabo toplotne karte smo na podlagi relativnega deleža 73 bakterijskih T-RF razvrstili bakterije v Moškanjcih v dve glavi skupini: skupino MT 10–20 in skupino s preostalimi obravnavanji (Sl. 14). Iz toplotne karte je razvidno, da se bakterijske združbe na globini 10–20 cm pri MT jasno ločijo od druge, bolj heterogene skupine, v katero sodijo bakterijske združbe iz preostalih obravnavanj (MT 0–10, CT 0–10 in CT 10–20 cm). Razlike med obema skupinama so nastale predvsem zaradi prisotnosti fragmenta TRF-139, fragmenta z največjim relativnim deležem, ki je bil prisoten samo pri združbah iz MT 10–20 cm ( $0,08 \pm 0,075$ ) in dvanajstih TRF, ki so bili prisotni v vseh preostalih obravnavanjih, razen pri MT 10–20 cm. V drugi, heterogenejši skupini, sta se oblikovali dve podskupini MT 0–10 cm in CT (CT 0–10 in CT 10–20), vendar so bile razlike med bakterijskimi združbami majhne. V CT podskupini se dodatno nakazujejo tudi razlike med združbami v 0–10 in 10–20 cm sloju. Poleg dvanajstih manjkajočih TRF pri MT 10–20 cm je bilo tudi nekaj takih, ki so bili specifični za posamezna obravnavanja in so skupaj določali glavne razlike med skupinami: trije med njimi so bili prisotni le pri MT 10–20 cm (TRF-139, TRF-140 in TRF-148), tri pri MT 0–10 cm (TRF-92, TRF-99 in TRF-155) in šest pri CT obravnavanju (TRF-82, TRF-153, TRF-199, TRF-218, TRF-220, TRF-226).

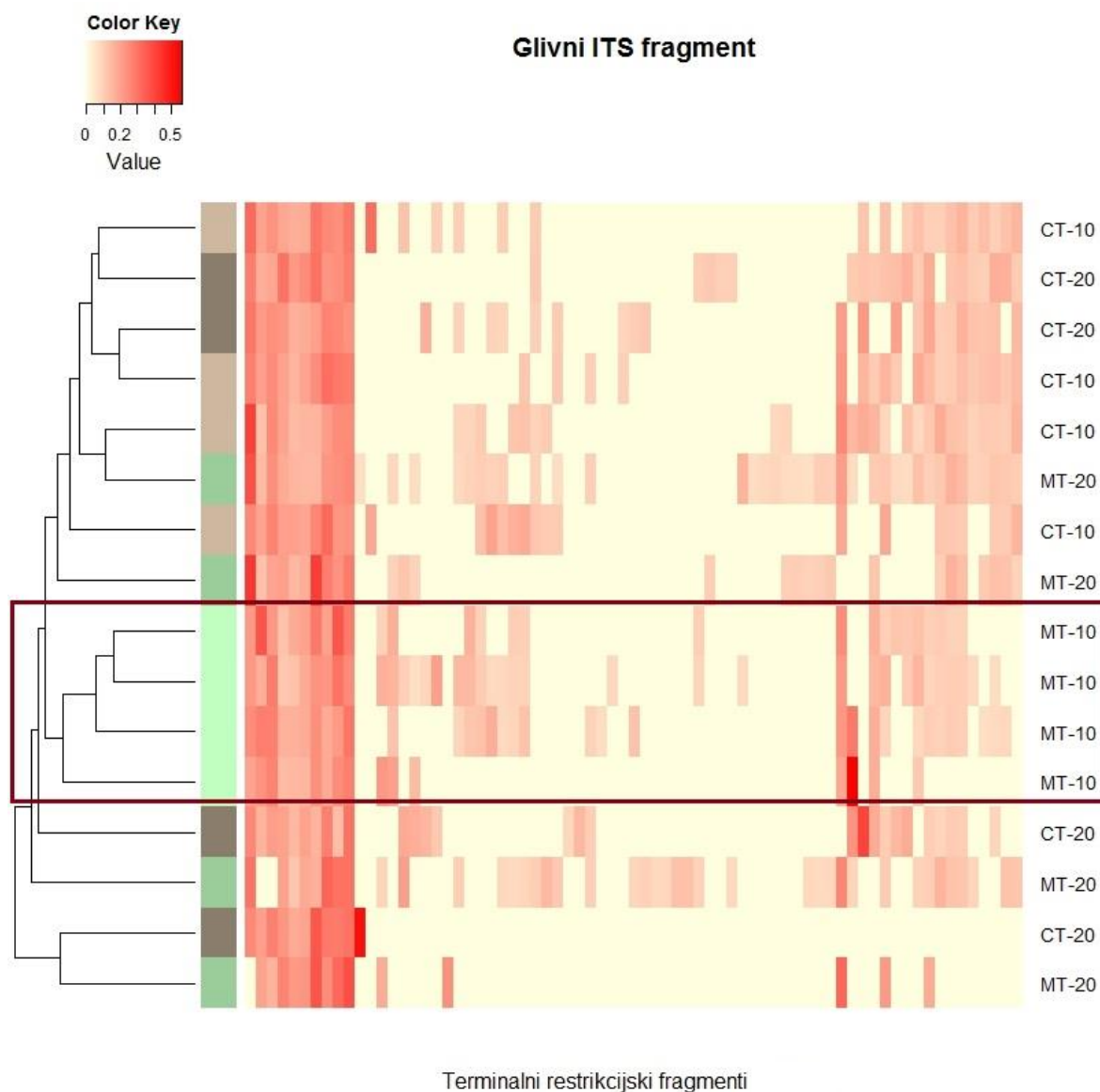


Slika 14: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za bakterije v Moškanjcih. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 73 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment. Na sliki so označene posamezne skupine

Figure 14: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 73 bacterial TRFs as affected by tillage (minimum - MT and conventional ploughing - CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Moškanjci. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure. Individual groups are also presented

Za razliko od bakterijske združbe je bila glivna združba v Moškanjcih bolj heterogena, posledično so bile razlike znotraj glivne združbe manj izrazite (Sl. 15). Zaradi prevelike variabilnosti med ponovitvami metoda hierarhičnega razvrščanja ni pokazala jasne razvrstitve 71 glivnih T-RF v skupine. Najnižjo stopnjo variabilnosti smo zaznali pri glivni združbi iz MT 0–10 cm, ki je tvorila najbolj homogeno skupino v primerjavi z ostalimi obravnavanji. Kljub veliki variabilnosti smo našli nekaj specifičnih fragmentov, in sicer je

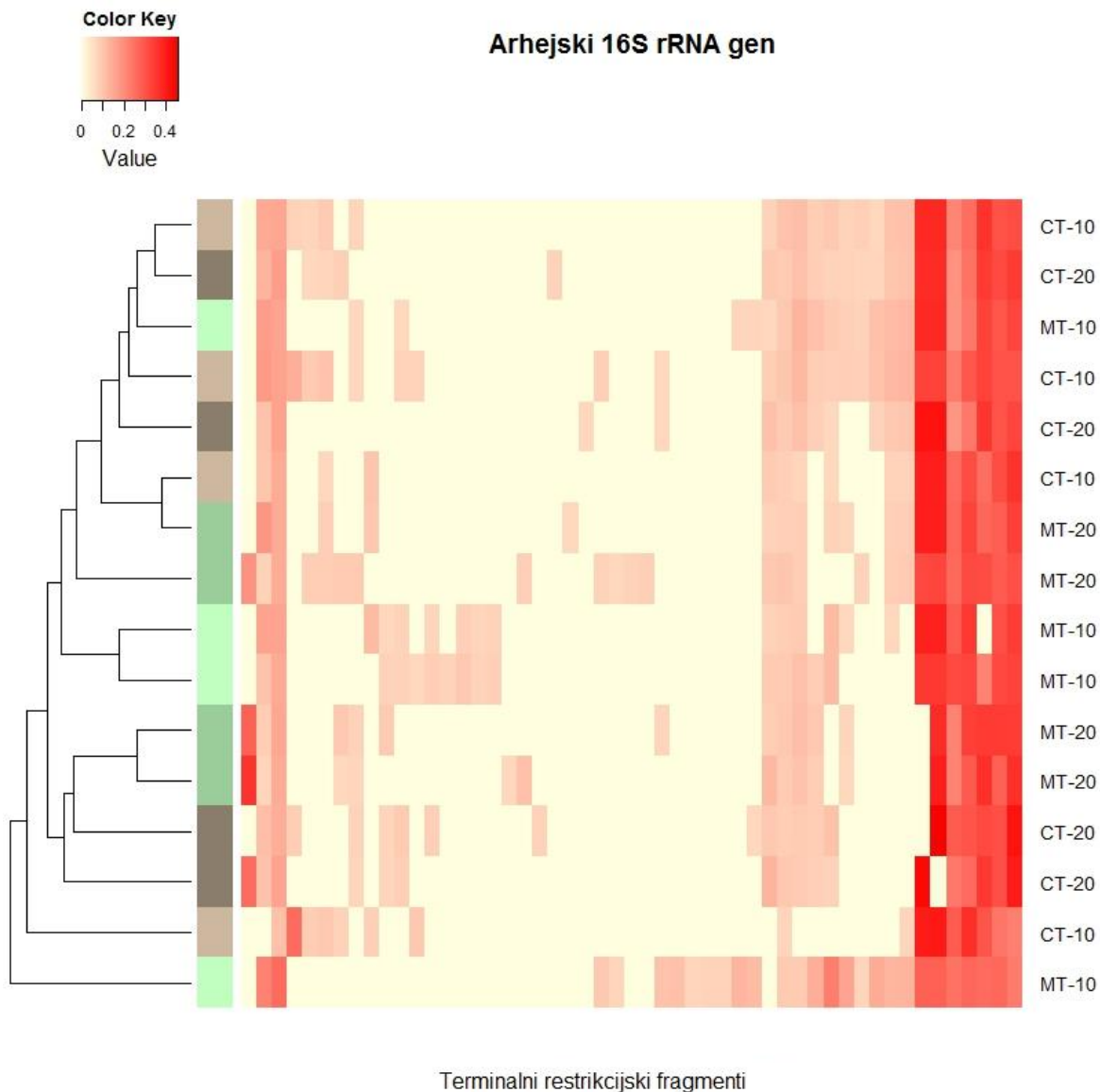
bilo šest TRF prisotnih samo pri MT obravnavanju (TRF-98, TRF-128, TRF-172, TRF-331, TRF-373, TRF-379), od tega so bili trije prisotni samo pri MT 10–20 cm (TRF-172, TRF-331 in TRF-373). Trije TRF so bili prisotni le pri CT obravnavanju (TRF-95, TRF-132, TRF-171), od tega TRF-132 samo na globini 0–10 cm, TRF-95 pa samo na globini 10–20 cm.



Slika 15: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za glive v Moškanjcih. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 71 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment. Na sliki so označene posamezne skupine

Figure 15: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 71 fungal TRFs as affected by tillage (minimum - MT and conventional ploughing - CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Moškanjci. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure. Individual groups are also presented

Podobno kot v Ljubljani tudi na strukturo združbe arhej v Moškanjcih, v kateri smo določili 51 TRF, obdelava ni imela vpliva, prav tako nismo zaznali vpliva globine (Sl. 16).



Slika 16: Toplotna karta in dendrogram s prikazom skupin glede na obdelavo (minimalna – MT in konvencionalna – CT) in globino (0–10 cm in 10–20 cm) za arheje v Moškanjcih. Jakost barve na toplotni karti predstavlja intenziteto izraženosti posameznega fragmenta (TRF) izmed vseh 51 TRF. Intenzivno rdeča pomeni močno izražen fragment

Figure 16: Double hierarchical dendrogram based on the relative abundance of the 51 archaeal TRFs as affected by tillage (minimum - MT and conventional ploughing CT) and soil depth (0-10 cm and 10-20 cm) in Moškanjci. The relative values for bacterial TRF are presented by colour intensity with the legend at the top of the figure

Kljub spremembam v strukturi bakterijske in glivne združbe sprememb v pestrosti nismo zaznali, saj razlike v številu TRF med obravnavanji niso bile statistično značilne. Poprečno

število TRF pri MT in CT obdelavi je bilo za obe globini  $46 \pm 1$  in  $45 \pm 1$  za bakterije,  $30 \pm 6$  in  $28 \pm 3$  za glive ter  $22 \pm 2$  in  $20 \pm 2$  za arheje (Pregl. 9).

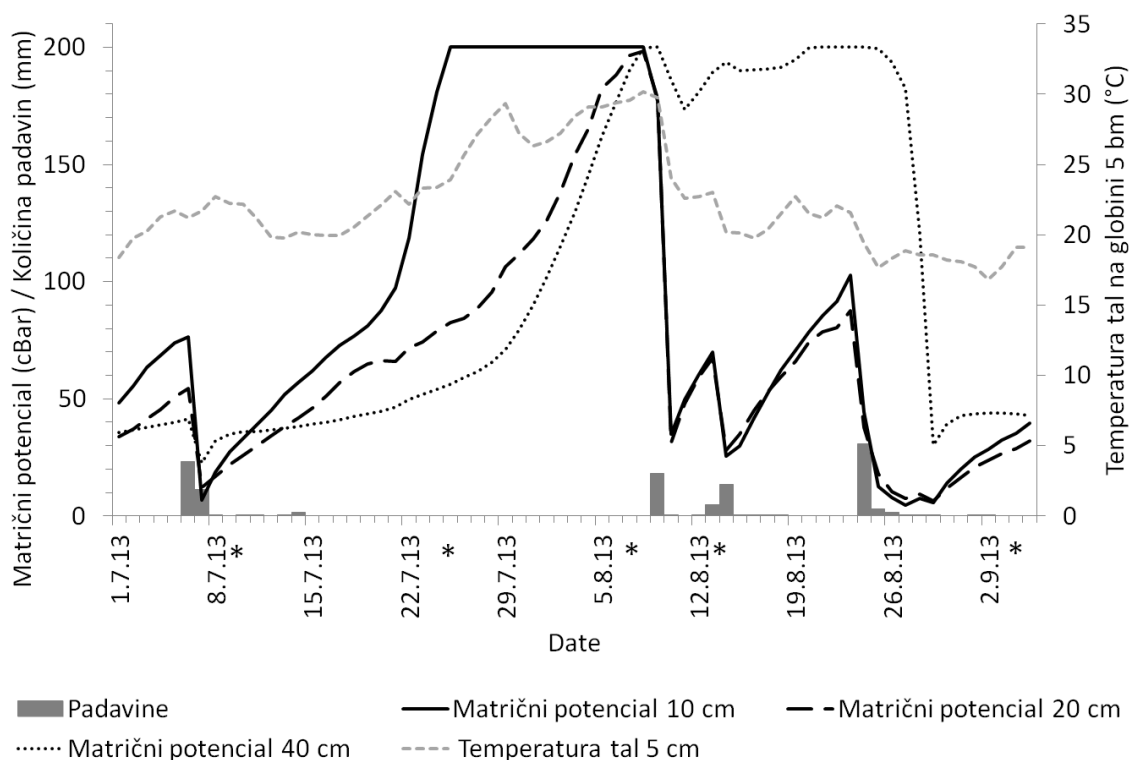
Preglednica 9: Število fragmentov pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v Moškanjcih. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike po Duncanu ( $p < 0,05$ )

Table 9: The number of terminal restriction fragments under minimum (MT) and conventional (CT) tillage at site Moškanjci. Averages and standard errors are shown. Different letters indicate significant differences across treatments and soil layers according to Duncan's test ( $P < 0.05$ )

	Globina (cm)	Bakterije	Glive	Arheje
MT	0-10	$45 \pm 1$ ab	$29 \pm 4$ a	$25 \pm 2$ a
	10-20	$46 \pm 0$ ab	$32 \pm 7$ a	$20 \pm 2$ a
CT	0-10	$42 \pm 2$ b	$30 \pm 2$ a	$21 \pm 3$ a
	10-20	$48 \pm 1$ a	$25 \pm 5$ a	$20 \pm 1$ a

### 4.3 VPLIV SUŠE NA VELIKOST MIKROBNIH ZDRUŽB V MOŠKANJCIIH

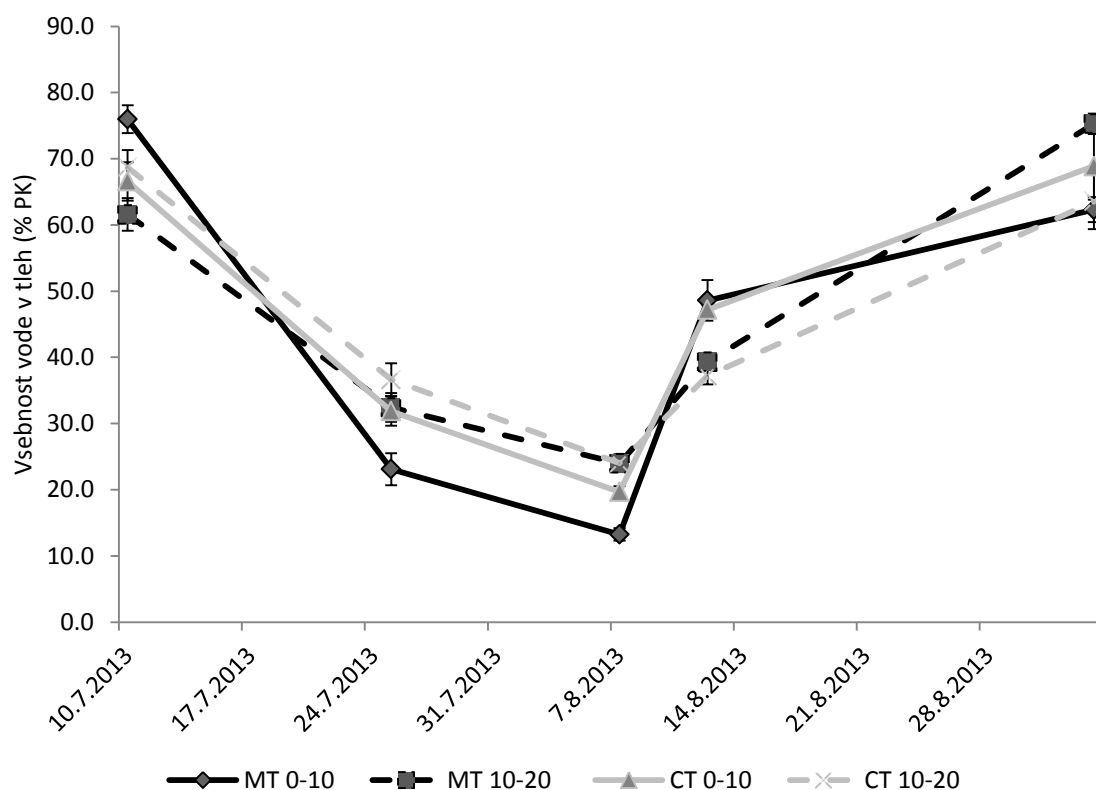
V Moškanjciih smo po 14 letih različne obdelave primerjali odzivnost splošnih in funkcionalnih združb N cikla na sušni stres. Poskusno polje je bilo med julijem in avgustom leta 2013 podvrženo naravni suši.



Slika 17: Dnevne vrednosti padavin, temperature tal in matričnega potenciala na polju v Moškanjciih za obdobje od 1. 7. do 5. 9. 2013. Z zvezdico so označeni termini vzorčen: 10. 7. (optimalni pogoji), 25. 7. (2 tedna brez padavin), 7. 8. (4 tedni brez padavin), 12. 8. (po prvem dežju) in 3. 9. 2013 (po 3 tednih normalnih padavin)

Figure 17: Meteorological measurements of precipitation, soil temperature and matric potential at experimental field Moškanjci. Sampling dates (\*) were chosen based on matric potential: 10<sup>th</sup> July (normal conditions), 25<sup>th</sup> July (two weeks without rain), 7<sup>th</sup> August (four weeks without rain), 12<sup>th</sup> August (after the first rain) and 3<sup>rd</sup> September (after three weeks of usual rainfall events)

Štiritedensko obdobje brez padavin v kombinaciji z naraščajočo temperaturo tal (Sl. 17) je zmanjšalo vsebnost vode v tleh. Vsebnost vode v tleh (izražena v % PK) je pred začetkom suše pri MT na globini 0–10 cm znašala 76 % PK in na globini 10–20 cm 62 % PK, pri CT pa 67 % v zgornjem in 69 % v spodnjem sloju. Po štirih tednih brez padavin in visokih temperaturah se je odstotek vode v tleh zmanjšal na 13 % v zgornji globini in 24 % v spodnji globini pri MT ter na 20 % in 24 % pri CT (Sl. 18). Istočasno se je povprečna dnevna temperatura tal na globini 5 cm iz začetnih 22 °C med sušo povišala na 30 °C. Po koncu suše in tritedenskih normalnih regionalnih padavinskih razmerah so vsebnosti vode v tleh in temperature ponovno dosegle začetne vrednosti.



Slika 18: Vsebnost vode v tleh za vsa vzorčenja v Moškanjcih v letu 2013 pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT): 10. 7. (optimalni pogoji), 25. 7. (2 tedna brez padavin), 7. 8. (4 tedna brez padavin), 12. 8. (po prvem dežju) in 3. 9. 2013 (po 3 tednih normalnih padavin). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake

Figure 18: Soil water content (expressed as % of WHC) for all samples at site Moškanjci in 2013 under minimum (MT) and conventional tillage (CT) at two depths (0-10 cm and 10-20 cm): 10<sup>th</sup> July (normal conditions), 25<sup>th</sup> July (two weeks without rain), 7<sup>th</sup> August (four weeks without rain), 12<sup>th</sup> August (after the first rain) and 3<sup>rd</sup> September (after three weeks of usual rainfall events). Averages with standard errors are shown

#### 4.3.1 Topne oblike ogljika in dušika

Na vsebnost topnega organskega ogljika (DOC) in topnega organskega dušika (DON) sta vplivali tako obdelava in globina kot tudi vsebnost vode in temperatura tal (Pregl. 10). Povprečne vsebnosti DOC in DON v tleh, pri povprečni vsebnosti vode v tleh in povprečni temperaturi, so bile na globini 0–10 cm značilno večje pri MT obravnavanju ( $0,20 \text{ g kg}^{-1}$  tal DOC in  $0,027 \text{ g kg}^{-1}$  tal DON) v primerjavi s CT ( $0,15 \text{ g kg}^{-1}$  tal DOC in  $0,020 \text{ g kg}^{-1}$  tal DON), medtem ko so na spodnji globini razlike med obdelavama bile značilne le pri DOC z večjo vsebnostjo pri MT ( $0,19 \text{ g kg}^{-1}$  tal pri MT in  $0,016 \text{ g kg}^{-1}$  tal pri CT) (Pregl. 11). Značilen vpliv globine smo zaznali le pri DON v MT tleh, z večjo vsebnostjo v zgornjem sloju tal ( $0,027 \text{ g kg}^{-1}$  tal) kot v spodnji 10–20 cm globini ( $0,023 \text{ g kg}^{-1}$  tal). Logaritmirane DOC in DON vrednosti so se linearno zmanjševale z zmanjševanjem vsebnosti vode v tleh in povečanjem temperature, vendar je bil njun vpliv na vsebnosti DOC in DON pri MT na

obeh globinah manjši kot pri CT. Prav tako je bil vpliv vode in temperature na DOC manjši v spodnji globini MT obravnavanja kot na zgornjih 10 cm.

Na vsebnost  $\text{NH}_4\text{-N}$  sta vplivali obdelava in globina, in sicer smo na globini 0–10 cm pri MT zabeležili večjo vsebnostjo ( $5,3 \times 10^{-3} \text{ g kg}^{-1}$ ) kot pri CT ( $4,3 \times 10^{-3} \text{ g kg}^{-1}$ ) (Pregl. 10, 11). Vsebnost  $\text{NO}_3\text{-N}$  v tleh se z obdelavo in globino ni spreminjala in je v povprečju znašala  $0,08 \text{ g kg}^{-1}$  tal. Obe mineralni obliki dušika sta bili odvisni od vpliva vode in temperature. Logaritmirane vrednosti nitrata so se z zmanjšanjem vode in povišanjem temperature povečevale, medtem ko so vrednosti amonijaka s povečanjem vode in temperature naraščale.



Preglednica 10: Linearni mešani modeli s prikazom p-vrednosti in analiza kontrastov za topni organski ogljik (DOC) ter topne in mineralne oblike dušika (DON, NH<sub>4</sub>N in NO<sub>3</sub>N). p-vrednosti so navedene le v primeru, da je bil vir variacije vključen v linearni mešani model in da je bil kontrast testiran v skladu s tabelo ANOVA. Statistično značilne razlike predstavljajo vrednosti s p<0,05 (krepki tisk)

Table 10: p-values from ANOVA table for linear mixed models (upper part) and results of the contrast analysis for them (lower part) for dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON), nitrate nitrogen (NO<sub>3</sub>N) and ammonium nitrogen (NH<sub>4</sub>N): p-values are written if source of variation was included in the linear mixed model and if contrast was tested according to ANOVA table. Statistically significant differences represent values with p<0.05 (marked in bold)

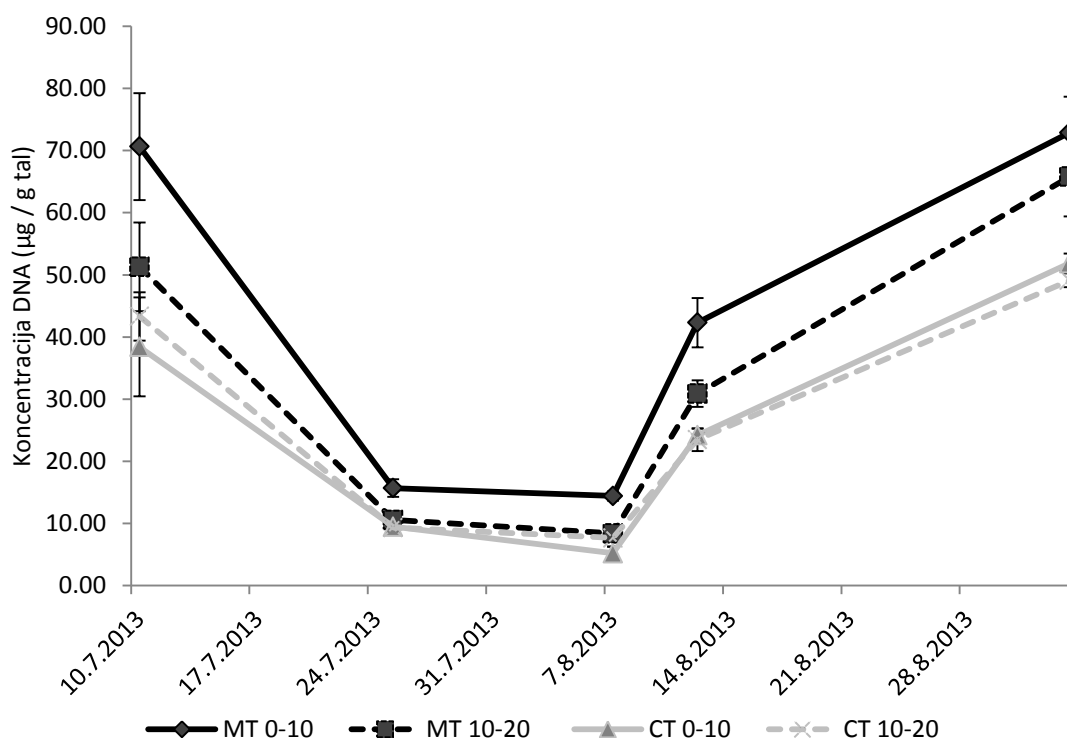
Vir variacije	DOC	DON	NH <sub>4</sub> N	NO <sub>3</sub> N
Obdelava	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	0,4866	0,6842
Globina	0,5937	0,0742	0,0882	0,4931
Voda	<b>0,0254</b>	0,6879	0,2369	0,7839
Temperatura tal	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	0,7317	<b>0,0179</b>
Obdelava:Globina	0,0710	< <b>0,0001</b>	<b>0,0210</b>	
Obdelava:Voda	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	0,5193	
Obdelava:Temperatura	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	0,9413	
Globina:Voda	0,2566	0,3689	0,9052	
Globina:Temperatura	<b>0,0477</b>	0,3572	0,9638	
Voda:Temperatura	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	
Obdelava:Globina:Voda	0,8287	0,5421	0,9800	
Obdelava:Globina:Temperatura	0,3237	0,0737	0,7152	
Obdelava:Voda:Temperatura	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	0,5403	
Obdelava:Globina:Voda:Temperatura	<b>0,0054</b>	0,7709	0,3437	
Kontrasti				
CT 10-20 - CT 0-10	+ 0,9715	+ 0,3320	+ 0,0526	
MT 10-20 - MT 0-10	- 0,6371	- < <b>0,0001</b>	- 0,4859	
MT 0-10 - CT 0-10	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>	+ <b>0,0079</b>	
MT 10-20 - CT 10-20	+ < <b>0,0001</b>	+ 0,3610	- 0,8834	
(MT 0-10 - CT 0-10):Temperatura	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 10-20 - CT 10-20):Temperatura	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 0-10 - CT 0-10):Voda	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 10-20 - CT 10-20):Voda	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 0-10 - CT 0-10):Voda:Temperatura	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 10-20 - CT 10-20):Voda:Temperatura	+ < <b>0,0001</b>	+ < <b>0,0001</b>		
(MT 10-20 - MT 0-10):Voda:Temperatura	+ <b>0,0159</b>	+ 0,9900		

Preglednica 11: Linearni mešani model z oceno povprečne vrednosti za topni organski ogljik (DOC) ter topne in mineralne oblike dušika (DON, NH<sub>4</sub>N in NO<sub>3</sub>N) pri povprečni vsebnosti vode v tleh in povprečni temperaturi tal s 95% intervali zaupanja za štiri obravnavanja, ki predstavljajo obdelavo in globino tal. Prikazane so tudi ocene naklona za spremembo % vsebnosti vode in temperature s 95% intervali zaupanja  
 Table 11: Linear mixed model estimates of average values of the dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON), and ammonium nitrogen (NH<sub>4</sub>N) at average soil water content and average soil temperature with 95% confidence intervals for four treatments defined with tillage and soil depth. Slope estimates for WHC and T with 95% confidence intervals are shown

Obravnavanje	Povprečje	DOC (g kg <sup>-1</sup> )		Povprečje	DON (g kg <sup>-1</sup> )		Povprečje	NH <sub>4</sub> N (g kg <sup>-1</sup> )	
		Sp IZ 95%	Zg IZ 95%		Sp IZ 95%	Zg IZ 95%		Sp IZ 95%	Zg IZ 95%
CT 0-10 cm	0,15	0,14	0,16	0,020	0,018	0,021	0,43x10 <sup>-2</sup>	0,37 x10 <sup>-2</sup>	0,49 x10 <sup>-2</sup>
CT 10-20 cm	0,16	0,15	0,17	0,021	0,020	0,023	0,50 x10 <sup>-2</sup>	0,43 x10 <sup>-2</sup>	0,58 x10 <sup>-2</sup>
MT 0-10 cm	0,20	0,19	0,22	0,027	0,025	0,030	0,53 x10 <sup>-2</sup>	0,45 x10 <sup>-2</sup>	0,61 x10 <sup>-2</sup>
MT 10-20 cm	0,19	0,17	0,21	0,023	0,021	0,025	0,48 x10 <sup>-2</sup>	0,41 x10 <sup>-2</sup>	0,56 x10 <sup>-2</sup>
<i>Naklon</i>									
Voda	-0,02	-0,02	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	0,0005	-0,0048	0,0058
Temperatura	-0,14	-0,16	-0,12	-0,11	-0,13	-0,09	-0,006	-0,030	0,020

#### 4.3.2 Mikrobna biomasa in splošna mikrobna združba bakterij, gliv in arhej

Na mikrobno biomaso, ki smo jo ocenili z določitvijo skupne talne DNA, sta značilno vplivli obdelava in globina, pa tudi voda in temperatura tal (Pregl. 12). Pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi je MT na globini 0–10 cm povečala povprečno koncentracijo DNA (34,9 µg g<sup>-1</sup> tal) v primerjavi s CT (17,9 µg g<sup>-1</sup> tal) (Pregl. 13). Značilen vpliv globine na mikrobno biomaso smo zaznali pri MT z večjo koncentracijo DNA v zgornjih 10 cm (34,9 µg g<sup>-1</sup> tal) v primerjavi s spodnjo 10–20 cm globino (24,0 µg g<sup>-1</sup> tal), medtem ko v CT tleh razlik nismo zaznali. Logaritmirane vrednosti DNA koncentracije so se linearno zmanjševale z zmanjševanjem vode in povečanjem temperature tal (Sl. 19).



Slika 19: Vsebnost skupne talne DNA ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  tal) v Moškanjcih glede na način obdelave (ohranitvena obdelava – MT in konvencionalna obdelava – CT) za 5 vzorčenj: 10. 7. (optimalni pogoji), 25. 7. (2 tedna brez padavin), 7. 8. (4 tedni brez padavin), 12. 8. (po prvem dežju) in 3. 9. 2013 (po 3 tednih normalnih padavin). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake

Figure 19: Total soil DNA content ( $\mu\text{g g}^{-1}$  soil) under conventional tillage (CT) and minimum tillage (MT) at site Moškanjeci in 2013: 10th July (normal conditions), 25th July (two weeks without rain), 7th August (four weeks without rain), 12th August (after the first rain) and 3rd September (after three weeks of usual rainfall events). Averages with standard errors are shown

Na velikost splošne mikrobne združbe, ki smo jo spremljali preko kvantifikacije splošnih bakterijskih in krenarhejskih 16S rRNA genov ter glivne ITS regije, je značilno vplivala tako obdelava in globina kot tudi vode in temperature tal (Pregl. 12). V splošnem smo v vseh pogojih zaznali številčno prevlado bakterij ( $7,1 \times 10^9 - 1,4 \times 10^{10}$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), ki so jim sledile arheje ( $1,7 \times 10^8 - 5,9 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) in glive ( $2,4 \times 10^7 - 5,9 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) (Pregl. 13). Pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi je MT na globini 0–10 cm povečala povprečno številčnost bakterijskih 16S rRNA ( $1,4 \times 10^{10}$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), krenarhejskih 16S rRNA ( $4,2 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) in glivnih ITS genov ( $5,9 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) v primerjavi s CT ( $7,1 \times 10^9$ ,  $1,4 \times 10^8$  in  $2,4 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), medtem ko so bile na spodnji globini razlike med obdelavama značilne samo pri arhejah z večjo številčnostjo pri MT ( $5,9 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) v primerjavi s CT ( $1,7 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal). Značilen vpliv globine na število kopij bakterijskega 16S rRNA in glivnega ITS gena smo zaznali pri MT z večjo številčnostjo v zgornji globini tal.

Logaritmirane vrednosti splošnih bakterijskih, glivnih in arhejskih genov so se linearno zmanjševale z zmanjševanjem vsebnosti vode in povečanjem temperature tal. Vpliv vode

in temperature je bil na število bakterijskih in glivnih genov pri vseh štirih obravnavanjih enak, medtem ko so se arheje v različnih obravnavanjih različno odzvale. Pri MT obravnavanju smo na globini 10–20 cm opazili značilno manjši vpliv vode in temperature na številčnost arhej kot v zgornjih 10 cm ( $p < 0,01$ ). Poleg tega smo na globini 10–20 cm rahlo manjši vpliv vode in temperature na številčnost arhej zaznali pri MT v primerjavi s CT, vendar so bile razlike mejno značilne ( $p = 0,052$ ).

Rezultati kažejo, da je suša sicer zmanjšala številčnost splošne mikrobne združbe bakterij, gliv in arhej, vendar je ta po normalnih tritedenskih padavinah ponovno dosegla začetno velikost (Priloga D).

Preglednica 12: Linearni mešani modeli s prikazom p-vrednosti in analiza kontrastov za številčnost bakterijskih in arhejskih 16S rRNA in glivnih ITS genov ter bakterijski in arhejski *amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII*. p-vrednosti so navedene le v primeru, da je bil vir variacije vključen v linearni mešani model in da je bil kontrast testiran v skladu s tabelo ANOVA. Statistično značilne razlike predstavljajo vrednosti s  $p < 0,05$  (krepki tisk)

Table 12: p-values from ANOVA table for linear mixed models (upper part) and results of the contrast analysis for them (lower part): p-values are written if source of variation was included in the linear mixed model and if contrast was tested according to ANOVA table. Statistically significant differences represent values with  $p < 0.05$  (marked in bold)

Vir variacije	Talna DNA	Glivni ITS	Bakterijski 16S rRNA	Arhejski 16S rRNA	AOB <i>amoA</i>	AOA <i>amoA</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>
Obdelava	<0,0001	0,0002	0,001	<0,0001	0,0235	<0,0001	0,0226	<0,0001	0,01028	0,0001
Globina	0,0450	0,0004	0,6463	0,0345	0,0086	0,0439	0,3920	0,0199	0,2518	0,0001
Voda	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Temperatura	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0390	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Obdelava:Globina	0,0003	<0,0001	0,0033	0,4154	<0,0001	0,1932	0,0824	0,0002	0,0506	<0,0001
Obdelava:Temperatura			0,0127	0,0429	0,0003					
Globina:Temperatura			0,7783	0,6295	0,4519					
Obdelava:Globina:Temperatura			0,0626	0,1007	0,2907					
Globina:Voda			0,0506							
Globina:Voda			0,4623							
Obdelava:Globina:Voda			0,0111							
Obdelava:Globina:Voda:Temperatura			0,0019							
<b>Kontrasti</b>										
CT 10-20 - CT 0-10	+ 0,5290	+ 0,4450	+ 0,1161	+ 0,9576	+ 0,4864	+ 0,0844	+ 0,3120	+ 0,8837	+ 0,06707	+ 0,9040
MT 10-20 - MT 0-10	- <0,0010	- <0,0010	- 0,0205	+ 0,3598	- <0,0010	+ 0,9935	- 0,9846	- <0,0010	- 0,89059	- <0,0010
MT 0-10 - CT 0-10	+ <0,0010	+ <0,0010	+ <0,0010	+ <0,0010	+ <0,0010	+ <0,0010	+ 0,0148	+ <0,0010	+ 0,0015	+ <0,0010
MT 10-20 - CT 10-20	+ 0,1510	+ 0,5210	+ 0,9716	+ <0,0010	- 0,3083	+ <0,0010	+ 0,9979	+ 0,9945	+ 0,9271	- 0,9170
(MT 0-10 - CT 0-10): Temperatura			+ 0,9997							
(MT 10-20 - CT 10-20): Temperatura			+ 0,0435							
(MT 0-10 - CT 0-10): Voda			- 0,9996							
(MT 10-20 - CT 10-20): Voda			- 0,0525							
(MT 10-20 - MT 0-10): Temperatura:Voda			+ <0,0100							
(MT 10-20 - CT 10-20): Temperatura:Voda			+ 0,0519							

Preglednica 13: Linearni mešani model z oceno povprečne vrednosti za skupno DNA tal, bakterijski in arhejski 16S rRNA, glivni ITS, bakterijski in arhejski *amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* pri povprečni vsebnosti vode v tleh in povprečni temperaturi tal s 95% intervali zaupanja za štiri obravnavanja, ki predstavljajo obdelavo in globino tal. Prikazane so tudi ocene naklona za vsebnost vode v tleh in temperature tal s 95% intervali zaupanja

Table 13: Linear mixed model estimates of average values of analysed variables at average water content and average soil temperature with 95% confidence intervals for four treatments defined with tillage and soil depth. The slope estimates with 95% confidence intervals are also shown

Skupna mikrobnna biomasa in število kopij generalna združbe bakterij, gliv in arhej															
Obravnavanje	Skupna DNA g <sup>-1</sup> soil		Bakterijski 16S rRNA kopij g <sup>-1</sup> tal		Arhejski 16S rRNA kopij g <sup>-1</sup> tal		Glivni ITS kopij g <sup>-1</sup> tal		Bakterijski 16S rRNA kopij g <sup>-1</sup> tal		Arhejski 16S rRNA kopij g <sup>-1</sup> tal		Glivni ITS kopij g <sup>-1</sup> tal		
	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%
CT 0-10 cm	17,93	15,18	21,18	7,07 10 <sup>9</sup>	5,63 10 <sup>9</sup>	8,88 10 <sup>9</sup>	1,44 10 <sup>8</sup>	1,08 10 <sup>8</sup>	1,93 10 <sup>8</sup>	2,38 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	3,04 10 <sup>7</sup>
CT 10-20 cm	20,09	17,01	23,72	9,18 10 <sup>9</sup>	7,12 10 <sup>9</sup>	11,53 10 <sup>9</sup>	1,67 10 <sup>8</sup>	1,24 10 <sup>8</sup>	2,25 10 <sup>8</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,24 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,86 10 <sup>7</sup>	2,24 10 <sup>7</sup>	3,66 10 <sup>7</sup>
MT 0-10 cm	34,94	29,57	41,28	13,60 10 <sup>9</sup>	10,83 10 <sup>9</sup>	17,08 10 <sup>9</sup>	4,21 10 <sup>8</sup>	3,03 10 <sup>8</sup>	5,87 10 <sup>8</sup>	5,86 10 <sup>7</sup>	4,58 10 <sup>7</sup>	5,86 10 <sup>7</sup>	5,86 10 <sup>7</sup>	4,58 10 <sup>7</sup>	7,49 10 <sup>7</sup>
MT 10-20 cm	24,04	20,36	28,39	9,65 10 <sup>9</sup>	7,69 10 <sup>9</sup>	12,12 10 <sup>9</sup>	5,86 10 <sup>8</sup>	4,20 10 <sup>8</sup>	8,16 10 <sup>8</sup>	2,41 10 <sup>7</sup>	1,89 10 <sup>7</sup>	2,41 10 <sup>7</sup>	2,41 10 <sup>7</sup>	1,89 10 <sup>7</sup>	3,09 10 <sup>7</sup>
Voda	0,0183	0,0115	0,0252	0,02	0,01	0,03	0,036	0,017	0,055	0,0225	0,0124	0,0225	0,0225	0,0124	0,0326
Temperatura	-0,1019	-0,135	-0,0689	-0,104	-0,138	-0,07	-0,068	-0,1593	0,023	-0,1162	-0,165	-0,1162	-0,1162	-0,165	-0,0674
Naklon															
Oksidatorji amonijaka															
Bakterijski amoA kopij g <sup>-1</sup> tal															
	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%
CT 0-10 cm	1,24 10 <sup>7</sup>	1,01 10 <sup>7</sup>	1,52 10 <sup>7</sup>	4,39 10 <sup>7</sup>	3,09 10 <sup>7</sup>	6,25 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	4,87 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>
CT 10-20 cm	1,48 10 <sup>7</sup>	1,20 10 <sup>7</sup>	1,81 10 <sup>7</sup>	6,93 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	9,85 10 <sup>7</sup>
MT 0-10 cm	2,15 10 <sup>7</sup>	1,75 10 <sup>7</sup>	2,64 10 <sup>7</sup>	17,05 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	24,27 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	24,27 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	24,27 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	11,98 10 <sup>7</sup>	24,27 10 <sup>7</sup>
MT 10-20 cm	1,20 10 <sup>7</sup>	0,98 10 <sup>7</sup>	1,48 10 <sup>7</sup>	18,97 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	26,98 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	26,98 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	26,98 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	13,33 10 <sup>7</sup>	26,98 10 <sup>7</sup>
Voda	0,027	0,018	0,035	0,036	0,023	0,05	0,023	0,023	0,05	0,023	0,023	0,05	0,023	0,023	0,05
Temperatura	-0,11	-0,16	-0,06	-0,178	-0,259	-0,095	-0,178	-0,259	-0,095	-0,178	-0,259	-0,095	-0,178	-0,259	-0,095
Naklon															
Denitrifikatorji															
	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%	Povprečje	Sp IZ 95%	Zg IZ 95%
CT 0-10 cm	2,54 10 <sup>8</sup>	1,63 10 <sup>8</sup>	3,96 10 <sup>8</sup>	4,28 10 <sup>7</sup>	3,54 10 <sup>7</sup>	5,17 10 <sup>7</sup>	2,61 10 <sup>8</sup>	1,91 10 <sup>8</sup>	3,56 10 <sup>8</sup>	2,37 10 <sup>8</sup>	1,86 10 <sup>8</sup>	3,01 10 <sup>8</sup>	2,37 10 <sup>8</sup>	1,86 10 <sup>8</sup>	3,01 10 <sup>8</sup>
CT 10-20 cm	3,96 10 <sup>8</sup>	5,54 10 <sup>8</sup>	6,17 10 <sup>8</sup>	4,74 10 <sup>7</sup>	3,93 10 <sup>7</sup>	5,73 10 <sup>7</sup>	3,87 10 <sup>8</sup>	2,84 10 <sup>8</sup>	5,28 10 <sup>8</sup>	2,57 10 <sup>8</sup>	2,02 10 <sup>8</sup>	3,27 10 <sup>8</sup>	2,57 10 <sup>8</sup>	2,02 10 <sup>8</sup>	3,27 10 <sup>8</sup>
MT 0-10 cm	5,17 10 <sup>8</sup>	3,32 10 <sup>8</sup>	8,05 10 <sup>8</sup>	7,71 10 <sup>7</sup>	6,38 10 <sup>7</sup>	9,32 10 <sup>7</sup>	4,76 10 <sup>8</sup>	3,49 10 <sup>8</sup>	6,49 10 <sup>8</sup>	5,38 10 <sup>8</sup>	4,23 10 <sup>8</sup>	6,84 10 <sup>8</sup>	5,38 10 <sup>8</sup>	4,23 10 <sup>8</sup>	6,84 10 <sup>8</sup>
MT 10-20 cm	4,42 10 <sup>8</sup>	2,81 10 <sup>8</sup>	6,88 10 <sup>8</sup>	5,01 10 <sup>7</sup>	4,15 10 <sup>7</sup>	6,05 10 <sup>7</sup>	4,26 10 <sup>8</sup>	3,12 10 <sup>8</sup>	5,81 10 <sup>8</sup>	2,38 10 <sup>8</sup>	1,87 10 <sup>8</sup>	3,02 10 <sup>8</sup>	2,38 10 <sup>8</sup>	1,87 10 <sup>8</sup>	3,02 10 <sup>8</sup>
Voda	0,0288	0,0177	0,0398	0,0331	0,0231	0,0431	0,0222	0,0144	0,0302	0,0258	0,0159	0,0357	0,0258	0,0159	0,0357
Temperatura	-0,0964	-0,137	-0,055	-0,0799	-0,1166	-0,0433	-0,0924	-0,1298	-0,0542	-0,1336	-0,1813	-0,0859	-0,1336	-0,1813	-0,0859

### 4.3.3 Oksidatorji amonijaka in denitrifikatorji

Kvantifikacija genov, ki kodirajo podenote encimov, vključenih v procese oksidacije amonijaka (*amoA*) in denitrifikacije (*nirK*, *nirS* in *nosZ*), je pokazala značilen vpliv obdelave, vode in temperature tal na številčnost vseh izmerjenih genov N-cikla, medtem ko je globina vplivala na številčnost oksidatorjev amonijaka, v združbi denitrifikatorjev pa le na *nirS* in *nosZII* (Pregl. 12). V primerjavi s CT je MT povečala številčnost AOA *amoA* ( $1,7 \times 10^8$  kopij  $g^{-1}$  tal) in AOB *amoA* ( $2,2 \times 10^7$  kopij  $g^{-1}$  tal), *nirK* ( $5,2 \times 10^8$  kopij  $g^{-1}$  tal), *nirS* ( $7,7 \times 10^7$  kopij  $g^{-1}$  tal), *nosZI* ( $4,8 \times 10^8$  kopij  $g^{-1}$  tal) in *nosZII* genov ( $5,4 \times 10^8$  kopij  $g^{-1}$  tal) v zgornjih 10 cm tal, medtem ko so v spodnjem sloju razlike med obravnavanji bile značilne le pri AOA *amoA* genih z večjo številčnostjo pri MT ( $1,9 \times 10^8$  kopij  $g^{-1}$  tal pri MT in  $6,9 \times 10^7$  kopij  $g^{-1}$  tal pri CT) (Pregl. 13). V MT tleh smo na globini 0–10 cm zaznali večjo številčnost AOB *amoA*, *nirS* in *nosZII* genov v primerjavi z 10–20 cm.

Logaritmirane vrednosti AOA in AOB *amoA*, *nirK*, *nirS* in *nosZ* genov so se v splošnem linearno zmanjševale z zmanjšanjem vsebnosti vode in povečanjem temperature tal (Sl. 20–22). Rezultati kažejo, da je bil vpliv vode in temperature na združbo denitrifikatorjev enak pri MT in CT, medtem ko je bil vpliv povišanja temperature tal na amonijak oksidirajoče bakterije in arheje večji pri CT v primerjavi z MT (Pregl. 12). V AOB populaciji smo na zgornji globini 0–10 cm pri MT opazili nekoliko manjši vpliv temperature na številčnost *amoA* genov v primerjavi s CT, vendar so bile razlike mejno značilne ( $p=0,0602$ ), medtem ko je bil vpliv temperature na številčnost AOA *amoA* genov izrazito manjši pri MT 0–10 cm kot pri CT ( $p=0,0036$ ; Sl. 20). Kljub temu, da Sliki 20 a in 20 b kažeta podoben vpliv vode in temperature na AOA in AOB populacijo, razlike v odzivu AOA in AOB *amoA* na spremembe v vsebnosti vode niso bile statistično značilne, zaradi manjšega vpliva vode na *amoA* gene v primerjavi s temperaturo: povečanje vode za 1 % povzroči povečanje številčnost AOB *amoA* za 2,7 % in AOA *amoA* za 3,6 %, medtem ko povečanje temperature za 1 °C zmanjša številčnost AOB *amoA* za 11,0 % in AOA *amoA* za 18,0 % (Pregl. 13, naklon za vodo in temperaturo). Čeprav razlike v združbi denitrifikatorjev niso bile značilne in slike 21 a in 21 b ter 22 a in 22 b kažejo podoben vpliv vode in temperature na denitrifikatorje, smo podobno rahlo večji vpliv temperature opazili tudi na *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* gene: povečanje vode za 1 % povzroči povečanje številčnost denitrifikacijskih genov za 2,2 do 3,3 %, medtem ko povečanje temperature za 1 °C zmanjša številčnost denitrifikacijskih genov za 8,0–13,4 % (Pregl. 13).

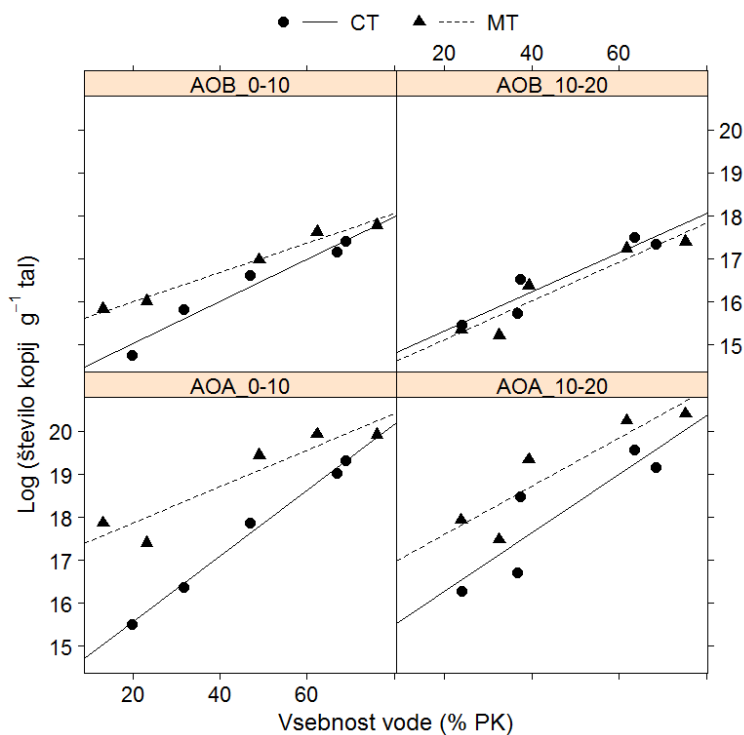
Primerjava AOA in AOB *amoA* gena je pokazala, da je bila povprečna številčnost AOA *amoA* gena pri vseh obravnavanjih od 4 do 19-krat večja od AOB *amoA* gena ne glede na vremenske razmere (Priloga E). Poleg AOA/AOB razmerja smo izračunali tudi relativne deleže AOA v primerjavi s celotno krenarhejsko 16S rRNA populacijo ter delež AOB v primerjavi s celotno bakterijsko 16S rRNA populacijo. Relativni delež AOB je bil pri MT obravnavanju v povprečju 0,018 in pri CT 0,008. Nasprotno pa so AOA predstavljale kar

velik delež arhejske populacije, z relativnim deležem od 0,38 v zgornjem sloju do 0,47 v spodnjem sloju tal.

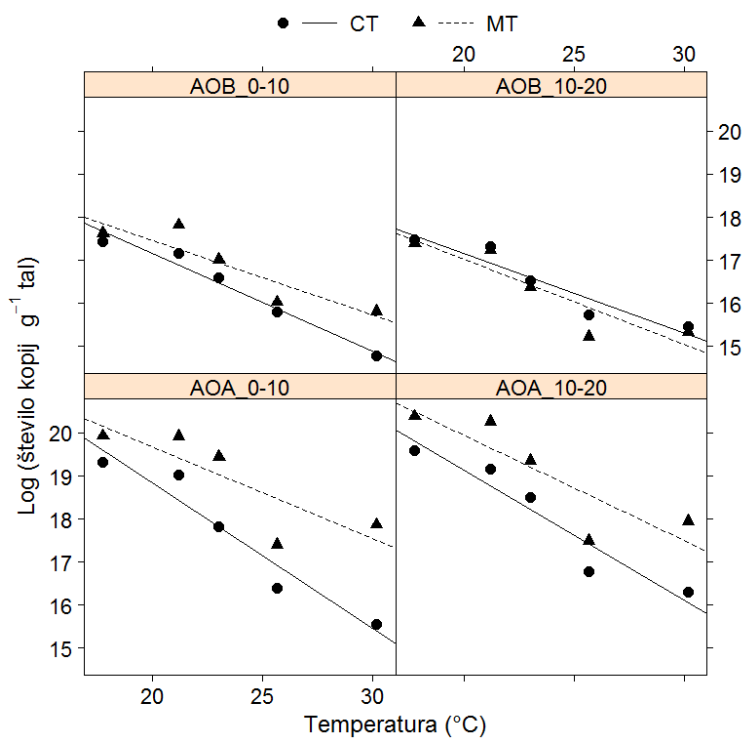
V združbi denitrifikatorjev smo med reducenti nitrita zaznali prevlado *nirK* gena nad *nirS* pri vseh obravnavanjih z večjim medsebojnim razmerjem na globini 10–20 cm tako pri MT (9,3), kot pri CT (8,7) v primerjavi z zgornjim 0–10 cm slojem (7,2 pri MT in 6,3 pri CT) (Priloga E). Delež denitrifikatorjev v primerjavi z bakterijsko 16S rRNA populacijo je pokazal, da *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* predstavljajo približno 4,2 %, 0,57 %, 4,0 % in 3,4 % celotne bakterijske populacije.

Rezultati kažejo, da je suša sicer zmanjšala tudi številčnost funkcionalne mikrobnе združbe nitrifikatorjev in denitrifikatorjev, vendar je ta po normalnih tritedenskih padavinah ponovno dosegla začetno velikost (Priloga F).





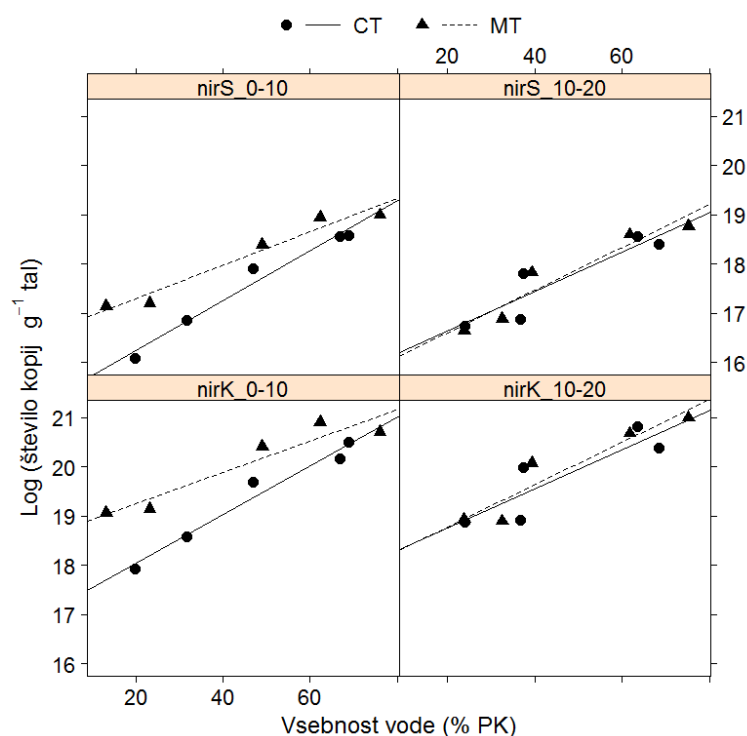
20 a)



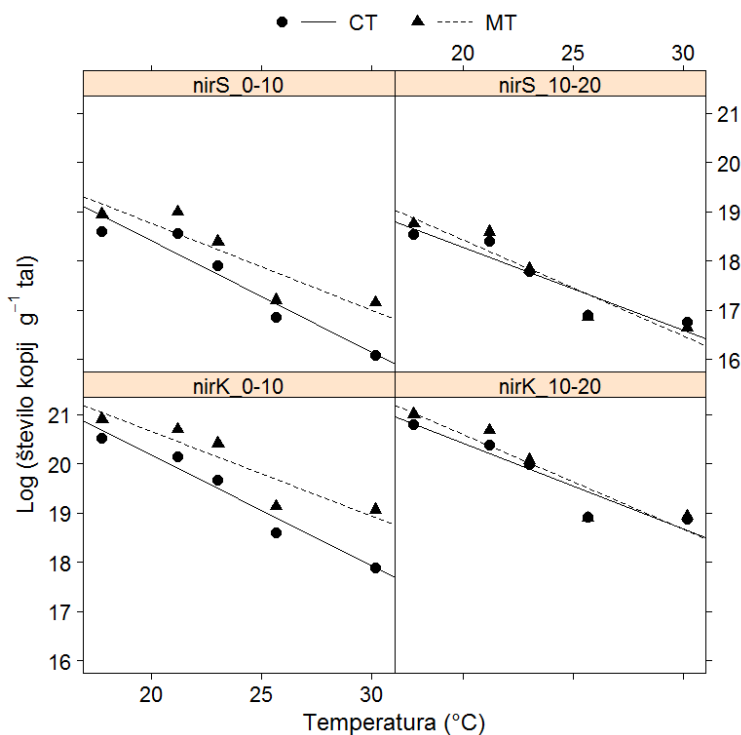
20 b)

Slika 20: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmirane vrednosti števila kopij *amoA* gena za amonijak oksidirajoče arheje (AOA) in bakterije (AOB) v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja (predstavljena kot točke na grafu). Regresijske premice so dodane le za boljšo predstavbo

Figure 20: The influence of a) soil water content and b) temperature on log values of bacterial (AOB) and archaeal *amoA* gene copies (AOA) in dependence of tillage and soil depth for all five sampling dates (represented as dots). Regression lines are added for visual presentation of data on each experimental plot



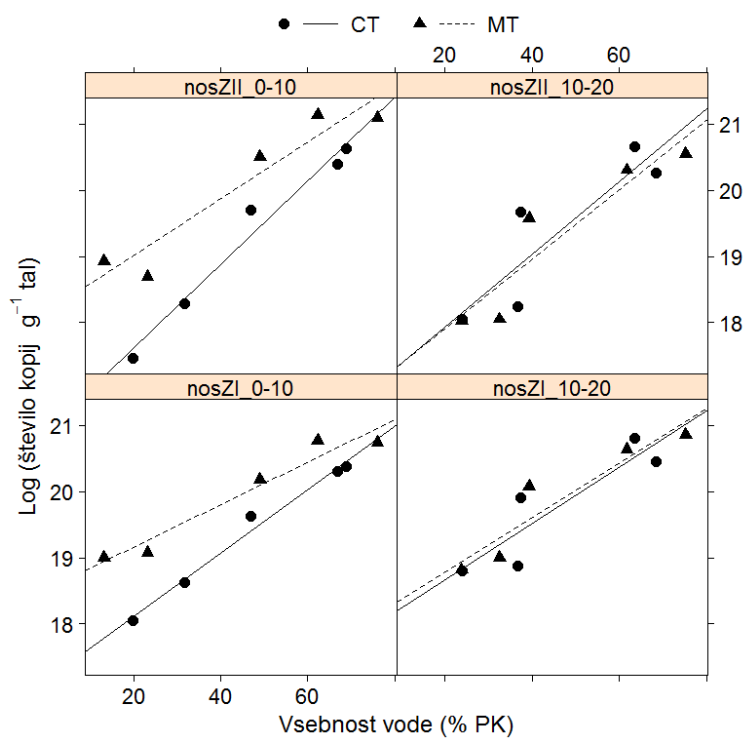
21 a)



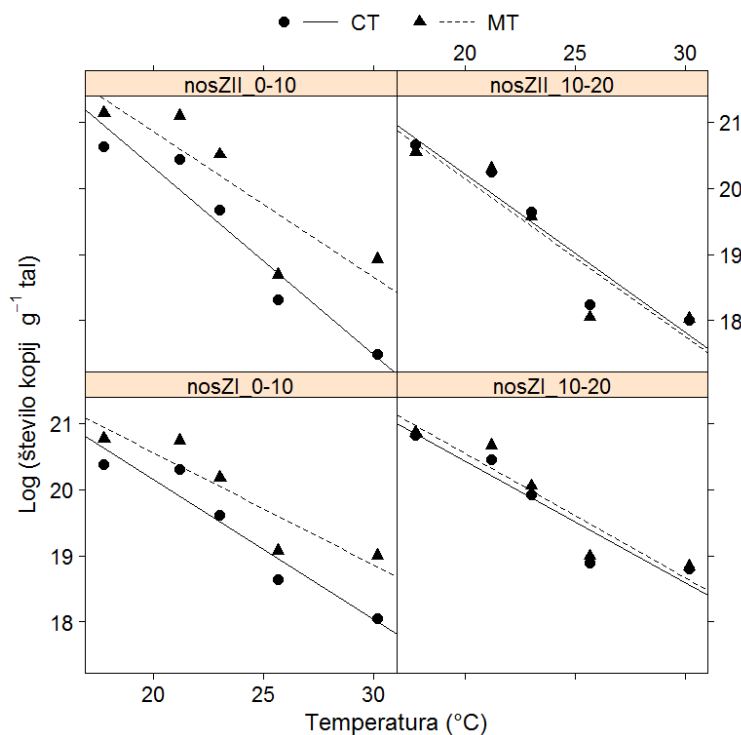
21 b)

Slika 21: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmirane vrednosti nitrit reducirajočih *nirK* in *nirS* genov v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja (predstavljena kot točke na grafu). Regresijske premice so dodane le za boljše predstavo

Figure 21: The influence of a) soil water content and b) temperature on log values of average *nirK* and *nirS* gene copies in dependence of tillage and soil depth for all five sampling dates (represented as dots). Regression lines are added for visual presentation of data on each experimental plot



22 a)



22 b)

Slika 22: Vpliv a) vode in b) temperature tal na logaritmirane vrednosti  $N_2O$  reducirajočih *nosZI* in *nosZII* genov v odvisnosti od obdelave in globine tal za vsa vzorčenja (predstavljena kot točke na grafu). Regresijske premice so dodane le za boljše predstavo

Figure 22: The influence of a) soil water content and b) temperature on log values of average *nosZI* and *nosZII* gene copies in dependence of tillage and soil depth for all five sampling dates (represented as dots). Regression lines are added for visual presentation of data on each experimental plot

## 5 RAZPRAVA

V prvem delu doktorske raziskave smo na poljskih poskusih v Ljubljani in Moškanjcih po 12 letih različne obdelave tal opravili obsežno vzorčenje z namenom preučevanja dolgoletnih učinkov ohranitvene, minimalne obdelave na kakovost tal. S spremembo kmetijske prakse se namreč lahko spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti, posledično pa se spremenijo tudi tla kot življenjski prostor. Obratno lahko spremembe v številčnosti in strukturi mikrobnih skupin vplivajo na spremembe v kroženju hranil, zalogah ogljika in tvorbi strukturnih agregatov. Nastanek novih in stabilnih interakcij med živimi organizmi, pa tudi med živimi organizmi in njihovim okoljem, je kompleksen in dolgotrajen proces. V doktorskem delu smo vzorčenje opravili po dobrem desetletju, saj domnevamo, da so se v tem času vzpostavile glavne interakcije med biotskimi in abiotskimi dejavniki. Richter in sod. (2007) v preglednem članku ugotavljajo, da je za vpogled v dogajanje v tleh po prehodu na drug način obdelave potrebnih najmanj 10 let, medtem ko je za razumevanje dogajanja in napovedovanje učinkov tehnoloških ukrepov na kakovost in delovanje tal potrebnih tudi več kot 100 let. V doktorskem delu smo predpostavili, da bo učinek MT na fizikalno-kemijske lastnosti tal (vsebnost organske snovi, obstojnost strukturnih agregatov, vodno-zadrževalne lastnosti tal) drugačen v pedo-klimatskih razmerah poskusnega polja v Moškanjcih v primerjavi z Ljubljano, ter da se bodo spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih odrazile v strukturi mikrobnih združb arhej, bakterij in gliv na obeh lokacijah.

V drugem delu raziskave smo na lokaciji v Moškanjcih preučevali odziv mikrobnih združb na naravni pojav sušnega stresa. Izrazite suše v vegetacijskem obdobju se v večini pojavljajo v jugozahodnem in severovzhodnem delu Slovenije (Sušnik in Valher, 2013). Predvsem v zadnjem desetletju kmetijska suša postaja vedno večji problem. V letu 2013 smo beležili izrazito sušo v celotni državi, predvsem pa v severovzhodnem delu, kjer so se razmere približale ekstremnim sušnim razmeram leta 2003, ko je bila v Sloveniji zabeležena najhujša suša v zadnjih petdesetih letih (Sušnik in Valher, 2013). Tako smo v letu 2013 v Moškanjcih med ekstremnim sušnim obdobjem izvedli večkratna vzorčenja z namenom preučevanja odziva splošne združbe bakterij, gliv in arhej, kot tudi funkcionalne združbe nitrifikatorjev in denitrifikatorjev, na pojav ekstremnih razmer pri minimalni in konvencionalni obdelavi. Pri tem smo predpostavili, da bo stresni učinek naravne suše pri minimalni obdelavi manjši v primerjavi s konvencionalno ter da bo s tem stabilnost ekosistema večja.

### 5.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL V ODVISNOSTI OD OBDELAVE

Minimalna obdelava je 12 let po postavitvi poskusa na obeh preučevanih lokacijah povečala vsebnost  $C_{org}$  v vrhnjem 0–10 cm sloju tal v primerjavi s spodnjimi (Pregl. 3), kar je vplivalo na izboljšanje ostalih talnih lastnosti na tej globini (Pregl. 5, 6, 7).

Tako v Ljubljani kot v Moškanjcih smo opazili značilno vertikalno prerazporeditev  $C_{org}$  in hranil (skupni dušik, rastlinam dostopna fosfor in kalij) v MT profilu, z značilno večjimi vsebnostmi v zgornjem 0–10 cm sloju tal v primerjavi s spodnjim 10–20 cm slojem, vendar pa se skupna zaloga  $C_{org}$  v profilu (0–60 cm) ni povečala na nobeni izmed lokacij (Pregl. 3). V nasprotju z nekaterimi raziskavami, ki poročajo, da prehod iz intenzivne obdelave na način brez obdelave (neposredna setev; NT) lahko poveča zalogo organskega ogljika v tleh (Mishra in sod., 2010), je kar nekaj takih, ki povečanja zalog ogljika pri ohranitveni obdelavi niso zaznali. Kot so izpostavili že Baker in sod. (2007a), je večina raziskav, ki poroča o povečanju zalog  $C_{org}$  v NT tleh, osredotočena le na zgornjih 30 cm (vključno z zgoraj omenjeno raziskavo, kjer so gledali le zgornjih 40 cm (Mishra in sod., 2010), medtem ko ob upoštevanju celotnega profila tal pri večini teh študij razlike med obdelavama niso več značilne. Podobno kot v naši raziskavi so tudi nekatere druge dolgoletne študije pokazale, da ohranitvena obdelava ne poveča zalog  $C_{org}$  v tleh (Dimassi in sod. 2014; Valboa in sod., 2015). Tako so v nedavni raziskavi Dimassi in sod. (2014), v kateri so po 41 letih v teksturno težjih tleh primerjali neposredno setev, plitvo oranje in intenzivno obdelavo, prav tako ugotovili, da obdelava ni vplivala na zaloge  $C_{org}$  v profilu, vendar je zmanjšanje intenzivnosti obdelave povzročilo povečanje  $C_{org}$  v zgornjih 10 cm in prerazporeditev  $C_{org}$  v profilu pri NT in plitvem oranju. Podobno so Needelman in sod. (1999) v raziskavi, kjer so v različnih pedo-klimatskih razmerah primerjali 17 lokacij s konvencionalno obdelavo in 19 lokacij z načinom brez obdelave, ugotovili, da NT kljub povečanju  $C_{org}$  v zgornjih 5 cm ni povečala skupne zaloge organske snovi v profilu v primerjavi s konvencionalno. Podobno kot Dimassi in sod. (2014) so tudi Needelman in sod. (1999) ugotovili, da NT povzroči le prerazporeditev  $C_{org}$  v profilu z večjo vsebnostjo v zgornjem sloju, kar je v skladu z našimi rezultati. Needelman in sod. (1999) prav tako ugotavljajo, da so učinki NT izrazitejši v teksturno težjih tleh (z večjim deležem gline) v primerjavi s teksturno lažjimi (z večjim deležem peska). Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi, saj smo večje razlike v  $C_{org}$  med MT in CT zaznali v Ljubljani. MT je v Ljubljani povečala količino  $C_{org}$  za 17 %, v Moškanjcih pa 2-krat manj (9 %), saj so v Ljubljani bolj glinena tla (25–41 % gline) v primerjavi z Moškanjci (16–20 %; Pregl. 1).

O povezavi med teksturo in akumulacijo  $C_{org}$  v tleh so poročali tudi v nekaterih drugih študijah. Izgube organske snovi kot posledica obdelave so odvisne tudi od deleža gline. Teksturno težja tla z večjim deležem gline lahko stabilizirajo organsko snov preko tvorbe organsko-mineralnih kompleksov (Feller in sod., 1996) in strukturnih agregatov ter jo na ta način fizično zaščitijo (Feller in Beare, 1997; Six in sod., 2002; Perez-Brinan in sod., 2012). V naši raziskavi so bile zaloge  $C_{org}$  v profilu v Ljubljani v povprečju za 30 t ha<sup>-1</sup> večje kot v Moškanjcih. Vsebnost  $C_{org}$  je bila na obeh lokacijah pri MT večja le v zgornjih 10 cm, medtem ko je v spodnjih slojih bilo več  $C_{org}$  pri CT. Čeprav razlike med MT in CT v vsebnosti  $C_{org}$  v zgornjih 10 cm tal v Moškanjcih v letu 2011 niso bile značilno različne, lahko posredno po izboljšanih fizikalnih lastnostih (Pregl. 5, 7) in mikrobnih biomasi

sklepamo (Sl. 10), da MT povečuje vsebnost  $C_{org}$  v zgornjem sloju tal. To domnevo so potrdili tudi rezultati iz leta 2015, kjer smo na isti lokaciji pri MT zaznali značilno večjo vsebnost  $C_{org}$  v zgornjem sloju tal ( $1,6 \pm 0,05$  %) v primerjavi s CT ( $1,4 \pm 0,05$  %) (podatki niso prikazani).

V Ljubljani so, kljub večjim razlikam med obdelavama v vsebnosti hranil in predvsem  $C_{org}$  v zgornjih 10 cm v primerjavi z Moškanjcih, razlike v fizikalnih lastnostih tal, ki so sicer povezane z vsebnostjo  $C_{org}$ , bile manj izrazite. Glede na večjo vsebnost gline v tleh in večjo količino  $C_{org}$  v Ljubljani v primerjavi z Moškanjci bi v Ljubljani pričakovali izrazitejše spremembe med MT in CT tudi v obstojnosti strukturnih agregatov, vodno zadrževalnih lastnostih tal in infiltraciji, vendar domnevamo, da so bile zaradi razlik v kolobarju te spremembe večje v Moškanjcih. V Ljubljani smo namreč v letih od 2010 do 2013 na polju imeli posejano lucerno, zato se v teh letih tal ni obdelovalo za razliko od Moškanjcev, kjer so bila tla vsako leto dvakrat obdelana. Lucerna je s svojim gostim koreninskim sistemom ustvarila čvrsto strukturo tudi v konvencionalno obdelanih tleh, zato je bil učinek obdelave delno zakrit.

Dosedanje raziskave so pokazale, da lahko konvencionalna obdelava v primerjavi z neposredno setvijo povzroči zmanjšanje velikosti strukturnih agregatov (McVay, 2006) ter zmanjšanje njihove obstojnosti na vodno delovanje (Franzluebbers in Stuedemann, 2008). Razlike v obstojnosti strukturnih agregatov so lahko dokaj velike, že ko primerjamo minimalno obdelavo in konvencionalno oranje (Alvaro-Fuentes in sod., 2008), ko pa primerjamo konvencionalno oranje z neposredno setvijo, so te razlike lahko še veliko večje (Hernanz in sod., 2002; Martinez in sod., 2008; Tabaglio in sod., 2009). V naši raziskavi je MT na obeh lokacijah izboljšala vodno obstojnost 2–4 mm velikih strukturnih agregatov. Glede na večjo vsebnost  $C_{org}$ , kot posledica večjega deleža gline bi pričakovali, da bo v Ljubljani razlika v obstojnosti med obdelavama večja kot v Moškanjcih. MT je v Ljubljani povečala obstojnost strukturnih agregatov le za 11 % v primerjavi s CT, v Moškanjcih pa za 24 % (Pregl. 5), kar je najverjetneje posledica opustitve obdelave zaradi posejane lucerne in gost koreninski splet lucerne s pozitivnim vplivom na rizosfero in izboljšanje strukture tal pri CT v Ljubljani. Na velikost strukturnih agregatov obdelava ni vplivala na nobeni izmed lokacij (Sl. 7, 8). Izboljšanje strukture tal in povečanje obstojnosti strukturnih agregatov je pomemben ukrep za preprečevanje erozije in izpiranja hranil.

Raziskave so pokazale, da povečana obstojnost strukturnih agregatov, poleg povečanja zaloga C, vpliva tudi na povečanje makroagregatov in poroznosti tal, kar vodi v večjo infiltracijsko sposobnost in večji delež rastlinam dostopne vode (Kasper in sod., 2009). MT je v Moškanjcih v zgornjem sloju povečala PK za 10 % in EPK za 13 % v primerjavi s CT (Pregl. 7). Za razliko od Moškanjcev pa v Ljubljani kljub povečani zalogi  $C_{org}$  in povečani poroznosti v zgornjem sloju tal MT ni izboljšala PK, odstotek EPK pa je bil celo večji pri CT.

Na stopnjo infiltracije vode v jesenskem času (druga polovica novembra) obdelava ni imela vpliva na nobeni izmed lokacij, medtem ko smo večjo infiltracijo pri MT v primerjavi s CT zaznali pri spomladanskem merjenju v Moškanjcih (Priloga B). Zaradi odvisnosti fizikalno-kemijskih lastnosti od letnega časa izvajanja meritev smo se odločili za spremljanje infiltracijske sposobnosti tal na obeh lokacijah. Tako smo meritve infiltracije opravili v jesenskem in spomladanskem času. O odvisnosti infiltracije vode od sezonskega obdobja so poročali Diamond in Shanley (2003), ki ugotavljajo, da naj bi bila infiltracija večja poleti kot v hladnejšem obdobju, kar je v nasprotju z našimi rezultati. V našem poskusu je bila stopnja infiltracije na obeh lokacijah od 1,3 do 3,4-krat večja v jesenskem času v primerjavi s spomladanskim merjenjem, vendar so razlike bile značilne samo pri CT v Moškanjcih. Ward in sodelavci (2004) so ugotovili, da je stopnja infiltracije odvisna od prisotnosti rastlinskega pokrova ter mehanskih posegov in rabe tal. Možna razlaga za nekoliko večjo stopnjo infiltracije jeseni bi lahko bila v kolobarju. Jeseni je bila na polju v Moškanjcih posejana koruza, ki z večjim koreninskim sistemom naredi v tleh večje pore in posledično pospeši infiltracijo v primerjavi z ržjo, ki je bila posejana v času spomladanskega merjenja.

Z raziskavo v Moškanjcih smo tako potrdili ugotovitve prejšnjih raziskav o povečani vsebnosti rastlinam dostopne vode in večji poljski kapaciteti (Bescansa in sod., 2006) ter povečani infiltracijski sposobnosti v MT in NT tleh v primerjavi s CT (Yaduvanshi in Sharma, 2008; Alvarez in Steinbach, 2009). Pričakovali smo sicer, da bo MT izboljšala infiltracijo tudi v Ljubljani, vendar razlik med MT in CT ni bilo. Možen razlog za to bi bil, da se v času posevka lucerne tal ni obdelovalo, kar je izboljšalo lastnosti CT tal. Druga razlaga pa je, da razlike med obdelavama niso bile značilne zaradi prevelike variabilnosti med ponovitvami. Za težja tla je značilna počasnejša stopnja infiltracije, zato nastanek makropor lahko močno poveča variabilnost meritev.

V primerjavi z Moškanjci je bila jeseni stopnja infiltracije v Ljubljani pri CT 10-krat in pri MT 19-krat manjša (Slika 9), v spomladanskem času pa 14-krat in 26-krat manjša kot v Moškanjcih. Razlog za to je v teksturi, saj so v Ljubljani tla bolj glinena in je posledično infiltracija počasnejša. Dobra infiltracija preprečuje zastajanje vode na površju, odtekanje s površja in preprečuje nastanek erozije, vendar je zboljšanje infiltracije in vodno-zadrževalnih lastnosti tal pomembno predvsem v okoljih, ki so v poletnih mesecih pogosto podvržena suši, kot je na primer severovzhodni del Slovenije.

## 5.2 STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE BAKTERIJ, GLIV IN ARHEJ V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL

### Vpliv obdelave na mikrobnio biomaso

Spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti so se odrazile na mikrobnio biomaso, ki smo jo ocenili z določitvijo skupne talne DNA. Ekstrakcija skupne DNA iz tal se je že večkrat izkazala kot uspešna in zanesljiva metoda za merjenje mikrobnio biomase v različnih talnih ekosistemih, vključno z gozdnimi, travniškimi in obdelovalnimi tlemi (Marstorp in sod., 2000; Lejon in sod., 2005; Hartmann in sod., 2006; Bouzaiane in sod., 2007; Blagodatskaya in Kuzyakov, 2013).

Tako v Ljubljani kot v Moškanjcih je bila mikrobnio biomasa odvisna od obdelave in od globine. V MT tleh je prerazporeditev  $C_{org}$  in hranil v profilu vplivala tudi na mikrobnio biomaso, ki je bila, enako kot  $C_{org}$ , v zgornjem 0–10 cm sloju tal pri MT, značilno večja kot pri CT (Sl. 10). Naši rezultati so pokazali, da 36 % celotne variabilnosti v mikrobnio biomaso v Ljubljani pojasnjuje vsebnost  $C_{org}$ , medtem ko v Moškanjcih, kljub temu da razlike v vsebnosti  $C_{org}$  med obdelavama niso bile značilne,  $C_{org}$  pojasnjuje kar 47 % celotne variabilnosti v mikrobnio biomaso. Naši rezultati skupaj z nekaterimi drugimi raziskavami (Johnson in sod., 2003; Djukic in sod., 2010; de Vries in sod., 2012; Hu in sod., 2014) potrjujejo predlog Powlson in sod. (1987), da lahko mikrobnio biomasa predstavlja zgođnji indikator sprememb  $C_{org}$ .

V skladu s pričakovanji smo značilen vpliv globine tal na mikrobnio biomaso, kot posledico vertikalne prerazporeditve  $C_{org}$  in hranil ter večje obstojnosti strukturnih agregatov, zaznali v MT tleh, z največjo koncentracijo v zgornjem sloju tal, medtem ko pri CT, zaradi mešanja zgornjega 0–20 cm sloja, razlike med globinama niso bile značilne. O zmanjšanju mikrobnio aktivnosti in biomase z globino tal so poročali že v preteklih raziskavah, saj se z globino poleg hranil manjša tudi količina vode in prezračenost, kar posledično vpliva na mikrobnio biomaso (Fierer in sod., 2003; Feng in sod., 2003; Spedding in sod., 2004; Helgason in sod., 2009).

Na obeh lokacijah je na mikrobnio biomaso vplival tudi čas vzorčenja (Priloga C), vendar je ne glede na sezonsko obdobje bila mikrobnio biomasa v zgornjih 10 cm tal vedno značilno večja pri MT kot pri CT. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Feng in sod. (2003), ki poročajo, da je NT po 12 letih povečala mikrobnio biomaso v zgornjem sloju tal v zimskem, spomladanskem in jesenskem času v primerjavi s CT. Na drugi strani pa Shei in sod. (2013) ugotavljajo, da je sezonsko obdobje primarni dejavnik, ki vpliva na mikrobnio biomaso. V raziskavi, v kateri so preučevali vpliv obdelave, gnojenja in časa, so ugotovili, da NT povečuje mikrobnio biomaso v primerjavi s CT v zgornjih 10 cm v spomladanskem in jesenskem času v primerjavi s CT, ne pa tudi v poletnem obdobju.



Razlog za to naj bi bila vsebnost vode v tleh, ki je bila v poletnem obdobju zmanjšana, zaradi manjše količine padavin, zato je bil vpliv obdelave neviden (Shei in sod., 2013). Te ugotovitve so v nasprotju z našimi rezultati v Moškanjcih, kjer smo v drugem delu raziskave preučevali vpliv suše na mikrobno biomaso in ugotovili, da je mikrobna biomasa večja pri MT v primerjavi s CT tudi v poletnem obdobju. Natančnejša razlaga rezultatov o vplivu suše na mikrobno biomaso je pod točko 5.3.

### **Vpliv obdelave na strukturo mikrobne združbe bakterij, gliv in arhej**

Spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti so v MT tleh vplivale tudi na sestavo mikrobne združbe na obeh lokacijah, vendar je bil vpliv obdelave v Ljubljani manjši kot v Moškanjcih. V Moškanjcih smo največje razlike v strukturi zaznali pri bakterijah na globini 10–20 cm, kar je najverjetneje posledica večje občutljivosti bakterij na omejene količine hranil (Sl. 14). Za razliko od gliv, ki lahko preko svojega hifnega sistema dostopajo do hranil in vode tudi iz bolj oddaljenih predelov tal, pa lahko bakterije dostopajo samo do zalog v svojem neposrednem mikrookolju. O povezavi med vsebnostjo C in hranil s strukturo mikrobnih združb v obdelovanih tleh so poročali že Franklin in Mills (2009), ki so ugotovili, da vsebnost C in N vpliva na velik del mikrobne združbe. Podobno kot v naši raziskavi so tudi Perez-Brinan in sod. (2012) večji vpliv minimalne obdelave zaznali ravno pri bakterijski združbi. Zelo majhne spremembe v bakterijski združbi kot posledica različne obdelave v Ljubljani (Sl. 11) lahko pojasnimo z dejstvom, da se v letu pred vzorčenjem tal zaradi posevka lucerne ni obdelovalo, kar pomeni, da sta bravnava bili relativno podobni v nekaterih bistvenih lastnostih za bakterije, kot so strukturni agregati in vodno-zadrževalne lastnosti tal, ki lahko vplivajo tudi na dostopnost hranil.

Po pričakovanju obdelava na glivno združbo v Ljubljani ni imela vpliva, saj so imele združbe čas za regeneracijo. Z oranjem glive namreč fizično uničimo, saj pretrgamo njihov hifni sistem. Manjše razlike glede na globino smo vseeno zaznali (Sl. 12). Največji učinek obdelave v glivni združbi v Moškanjcih smo opazili pri MT na globini 0–10 cm (Sl. 20). Tako tudi v preteklih raziskavah poročajo o občutljivosti gliv, kot so saprofitske in mikorizne glive, na obdelavo (Elliott in Coleman, 1988; Wardle, 1995; Wortmann in sod., 2008; Helgason in sod., 2010), zato omejitev ali popolna opustitev mehanskih posegov v tla lahko pozitivno vpliva na strukturo glivne združbe, kar potrjujejo tudi naši rezultati.

Po pričakovanjih obdelava in globina nista vplivali na strukturo arhejske združbe na nobeni izmed preučevanih lokacij (Sl. 13, 16). Raziskav o abiotskih vplivih na strukturo arhejske združbe, posebno o vplivu obdelave, je zelo malo. Po dosedanjih raziskavah je združba amonijak oksidirajočih arhej, ki v tleh po nekaterih raziskavah lahko predstavljajo dobro tretjino celotne mikrobne združbe (Kemnitz in sod., 2007), precej stabilna in neobčutljiva na abiotske spremembe, kot so vsebnost potencialno toksičnih kovin v tleh (Ollivier in

sod., 2011) ali raba tal (Bru in sod., 2011). Nekatere raziskave kažejo, da arheje dominirajo v z organsko snovjo bogatih okoljih (Simon in sod., 2000; Pazinato in sod., 2010; Souoza in sod., 2013). V nedavni dolgoletni raziskavi Souoza in sod. (2013) z uporabo pirosekvenciranja ugotavljajo, da so arheje konstantno bolj dominirale v NT tleh v primerjavi s CT tlemi, vendar najverjetneje predvsem zaradi visoke vsebnosti organske snovi pri NT in manj zaradi vpliva obdelave.

Kljub spremembam v strukturi mikrobnih združb bakterij in gliv, razlik v številu TRF v Moškanjcih nismo zaznali, kar kaže na to, da se pestrost z obdelavo ni spremenila (Pregl. 9), medtem ko je bila pestrost bakterij v Ljubljani večja pri CT ( $43 \pm 5$ ) kot pri MT ( $29 \pm 3$ ) v zgornjem kot tudi v spodnjem sloju tal ( $57 \pm 2$  pri CT in  $31 \pm 1$  pri MT; Pregl. 8). Lucerna lahko v rizosferi vpliva na strukturo mikrobnih združb, saj lahko zaradi simbioze s fiksatorji dušika poveča njihovo številčnost, kar lahko vpliva tudi na ostale mikrobnе združbe. V raziskavi o vplivu setve mešanega posevka lucerne in divje rži z in brez dodatka inokuluma s *Sinorhizobium meliloti* so pokazali, da lahko inokulacija z *Rhizobium* vpliva na spremembe v združbi amonijak oksidirajočih bakterij (Sun in sod., 2009). Za razliko od bakterij, na pestrost gliv in arhej obdelava v Ljubljani ni vplivala.

Za razliko od naših rezultatov so v nekaterih drugih raziskavah poročali o povečani pestrosti bakterij z zmanjšanjem intenzitete obdelave (Acosta-Martínez in sod., 2010; Ceja-Navarro in sod., 2010; Silva in sod., 2013) kot tudi nekaterih glivnih skupin, kot so na primer arbuskularne mikorizne glive (Wetze in sod., 2014, Säle in sod., 2015). Razlog za enako pestrost v Moškanjcih pri MT in CT bi lahko bil v majhnem povečanju  $C_{org}$  pri MT v primerjavi s CT, saj ravno vsebnost  $C_{org}$  po poročanju nekaterih raziskav vpliva na strukturo mikrobnе združbe (Franklin in Mills, 2009; Ekelund in sod., 2001; Leckie in sod., 2004; Grayston in Prescott, 2005).

Prav tako moramo upoštevati dejstvo, da smo lahko z uporabo T-RFLP metode spregledali katero izmed taksonomskih skupin, saj smo iz analize izključili vse TRF, ki so bili krajši od 50 bp in nižji od 50 fluorescenčnih enot, da bi se izognili morebitnim dimerom začetnih oligonukleotidov, nastalim med PCR reakcijo. Čeprav je T-RFLP metoda z uporabo kapilarne elektroforeze precej natančna, saj omogoča razlikovanje taksonomskih skupin za 1 bp razlike, ne pa tudi razlikovanja skupin z isto dolžino (Schütte in sod., 2008). Prav tako je število TRF odvisno tudi od izbire restriksijskih encimov in začetnih oligonukleotidov (Liu in sod., 1997; Alvarado in Manjon, 2009). Čeprav smo v doktorskem delu uporabili univerzalne začetne oligonukleotide, ti velikokrat v resnici ne zajamejo vseh taksonomskih skupin. Tako so na primer Wetze in sod. (2014) v raziskavi kjer so primerjali vpliv obdelave na arbuskularne mikorizne glive z uporabo sekvenciranja, T-RFLP metode in morfološke analize spor, ugotovili, da vse tri metode sicer omogočajo zaznavanje povečane pestrosti gliv pri NT obravnavanju v primerjavi s CT, vendar se je morfološka metoda pokazala za bolj občutljivo v primerjavi z obema molekularnima metodama. Za

razliko od obeh molekularnih tehnik je morfološka analiza omogočila zaznavanje manj številčnih skupin gliv. Težava vseh molekularnih tehnik je, da temeljijo na izolaciji DNA iz tal, ki včasih ne omogoča zaznavnosti manj številčnih predstavnikov mikroorganizmov, posledično pa teh tudi z molekularnimi tehnikami ne moremo zaznati (Wetze in sod., 2014).

### 5.3 ODZIV MIKROBNIH ZDRUŽB NA SUŠNI STRES V ODVISNOSTI OD OBDELAVE

Mikrobne združbe so se v splošnem odzvale na spremenjene vodne in temperaturne pogoje v tleh in na spremembe v obdelavi tal. Suša, ki smo jo definirali kot hkratno zmanjšanje vsebnosti vode in povečanje temperature tal, je vplivala na zmanjšanje števila genskih kopij splošne in funkcionalne združbe. Med štiritedenskim brezpadavinskim obdobjem se je vsebnost vode v tleh, ki smo jo izrazili kot odstotek PK, iz začetnih 62–76 % pri MT ter 67–69 % pri CT, zmanjšala na 13–24 % pri MT ter na 20–24 % pri CT obravnavanju (Sl. 18). Istočasno se je povprečna dnevna temperatura tal na globini 5 cm povišala iz 22 °C na 30 °C. Tri tedne po koncu sušnega obdobja je vsebnost vode v tleh dosegla začetne vrednosti, kar je vplivalo tudi na velikost vseh preučevanih združb (Priloga D, F).

#### **Vpliv suše in obdelave na mikrobno biomaso in velikost splošne mikrobne združbe**

Mikrobna biomasa je bila odvisna od obdelave in globine, pa tudi od vsebnosti vode v tleh (% PK) in temperature (Pregl. 12). Pričakovano se je mikrobna biomasa linearno zmanjševala z zmanjšanjem vode in povečanjem temperature. S sušenjem tal je gibanje mikrobov omejeno in dostopnost hranil se zmanjša, posledično je mikrobna aktivnost in biomasa manjša kot v normalnih pogojih (Fierer in sod., 2003; Hamer in sod., 2007; Bapiri in sod., 2010). Mikroorganizmi začnejo v celice kopičiti ozmolite (npr. ogljikove hidrate, aminokislino), da ostanejo v ravnotežju z okoljem ter preprečijo dehidracijo in smrt. Navlaževanje suhih tal povzroči nenadno povečanje dostopnosti hranil, kar drastično poveča mikrobno aktivnost in biomaso ter posledično sproščanje velikih količin C in N iz tal, kar imenujemo »Birch efekt« (Birch, 1958). Ko se tla ponovno namočijo, se namreč morajo mikrobi čim hitreje znebiti teh ozmolitiv, kar naredijo tako, da jih spremenijo v CO<sub>2</sub>, topni organski C in ostala hranila ter na ta način preprečijo vstop v celice (Ouyang in Li, 2013). To drastično povečanje aktivnosti je navadno le kratkotrajno in se po določenem obdobju spet povrne v normalno stanje (Gordon in sod., 2008), kar je v skladu z našimi rezultati. Septembra, po vzpostavitvi normalnih razmer, je bila količina mikrobne biomase enaka kot v začetku julija, pred začetkom suše (Sl. 19).

Poleg suše sta na mikrobno biomaso značilno vplivala tudi obdelava in globina. Na globini 0–10 cm smo pri MT pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi zaznali kar za 49 % večjo mikrobno biomaso v primerjavi s CT (Pregl. 13). Ne glede na vremenske

razmere je MT v zgornjem sloju tal za 1,4 do 2,8-krat povečala mikrobnio biomaso v primerjavi s CT, kar kaže na ugodnejše pogoje za mikroorganizme v MT tleh tudi v stresnih razmerah, ko je bilo tudi razmerje v mikrobnio biomasah med MT in CT največje (2,8).

Spremembe v mikrobnio biomasah so se odrazile tudi v spremembah velikosti splošnih bakterijskih in (kren)arhejskih 16S rRNA ter glivnih ITS kopij genov, ki so bile prav tako odvisne od obdelave in globine ter vsebnosti vode in temperature (Pregl. 12). Suša je značilno vplivala na zmanjšanje splošnih bakterijskih, glivnih in arhejskih genov, in sicer se je število genov linearno zmanjševalo z zmanjševanjem vsebnosti vode in povečanjem temperature. O vplivu suše na sestavo in velikost mikrobnih združb preko sprememb v temperaturi in vsebnosti vode so poročali že v prejšnjih raziskavah. V raziskavi o vplivu ponavljajočih se sušno-navlaževalnih ciklov na rast bakterij in gliv so ugotovili, da sušno-navlaževalni cikli zmanjšajo bakterijsko rast, medtem ko ostane rast gliv neprizadeta (Bapiri in sod., 2010), saj jim sistem hif omogoča prenos hranil in vode iz globljih slojev tal. Prav tako sušne pogoje bolje prenašajo po Gramu pozitivne bakterije, ki imajo debelejšo celično steno kot po Gramu negativne (Nazih in sod., 2001; Uhlirova in sod., 2005), številne med njimi lahko tudi sporulirajo in tako lažje preživijo neugodne razmere (Drenovsky in sod., 2010; Higgins and Dworkin, 2012). Nasprotno od omenjenih raziskav je v našem primeru suša v enaki meri prizadela tako bakterije kot glive. Po nekaterih raziskavah lahko segrevanje in suša močno vplivata na velikost in pestrost bakterijske združbe. Po poročanju Sheik in sodelavcev (2011) povišanje povprečne temperature za približno 2 °C lahko v travniških tleh poveča velikost bakterijske in arhejske združbe, vendar zmanjša njihovo pestrost, medtem ko povišanje temperature v kombinaciji s sušo vodi v zmanjšanje velikosti, kot tudi pestrosti omenjenih združb. Glede na to, da smo v preučevanih pedo-klimatskih razmerah, ki so vsako ali vsako drugo leto izpostavljena suši v prvem delu raziskave v normalnih razmerah, ugotovili, da obdelava vpliva na strukturo bakterij in gliv, ne pa tudi na splošno pestrost, lahko domnevamo, da večjih razlik ne gre pričakovati, kljub temu pa bi v prihodnje mogoče bilo smiselno z uporabo občutljivejših metode, kot je na primer pirosekvenciranje, pogledati vpliv suše na splošno in funkcionalno pestrost bakterij, gliv in arhej.

Za razliko od bakterijske in glivne združbe, na katere je bil vpliv suše pri vseh obravnavanih enak, je bil vpliv spremenjenih vodnih in temperaturnih razmer na arheje drugačen pri MT kot pri CT. V nasprotju z nekaterimi raziskavami, ki poročajo o stabilnosti arhejske združbe in njene neobčutljivosti na okoljske spremembe (Ollivier in sod., 2011), so naši rezultati pokazali, da je bil vpliv suše na velikost arhejske združbe v spodnjem 10–20 cm sloju MT tal manjši kot pri CT, kar lahko kaže na večjo stabilnost arhejske združbe pri MT v primerjavi s CT. Prav tako smo razlike v odzivu arhej na sušo pri MT opazili glede na globino tal, in sicer je bil vpliv suše v spodnjem sloju tal manjši

kot v zgornjem sloju. Razlog za to bi lahko bil v počasnejših spremembah v vsebnosti vode in temperature na globini 10–20 cm v primerjavi z vrhnjim slojem tal.

Podobno kot pri mikrobni biomasi je MT ne glede na sušo (pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi) na globini 0–10 cm povečala povprečno število bakterijskih 16S rRNA genov za povprečno 48 %, arhejskih 16S rRNA za 66 % in glivnih ITS za 34 % v primerjavi s CT ter na globini 10–20 cm število arhejskih 16S rRNA za 72 % v primerjavi s CT. S tem sicer ne moremo potrditi večje stabilnosti talnega ekosistema pri MT v primerjavi s CT, lahko pa zaključimo, da je MT sistem pozitivno vplival na velikost mikrobne populacije tudi v sušnih pogojih, saj je bila ta večja pri MT v primerjavi s CT ter s tem primernejša oblika obdelave v sušno ogroženih področjih.

Rezultati kažejo, da je suša sicer zmanjšala velikost splošne mikrobne združbe, vendar je ta po normalnih tritedenskih padavinah pri vseh obravnavanjih ponovno dosegla začetno velikost, kar kaže na dobro prilagojenost mikrobnih združb v Moškanjcih na sušo oziroma elastičnost ekosistema (Priloga D). Mikrobne združbe v Moškanjcih so bile v preteklosti že podvržene suši v spomladanskem in poletnem obdobju, zato lahko domnevamo, da so se prilagodile spreminjajočim se vodnim in temperaturnim pogojem tal. Že v prejšnjih raziskavah so (Fierer in sod., 2003; Evans in Wallenstein, 2012) potrdili, da se lahko združbe, ki so pogosto izpostavljene sušno-navlaževalnim ciklom, prilagodijo na te razmere in se po vzpostavitvi normalnih razmer povrnejo v prvotno stanje.

### **Vpliv suše in obdelave na velikost združb nitrifikatorjev**

Dolgo je veljalo prepričanje, da v združbi oksidatorjev amonijaka samo bakterije posedujejo *amoA* gen, ki kodira encim amonij monooksigenazo ter imajo tako edine sposobnost aerobne oksidacije amonijaka, ki je prva stopnja v procesu nitrifikacije. Izolacija amonijak oksidirajočih arhej iz debela Crenarchaeota (Thaumarchaeota) in številna prevlada (kren)arhejskega *amoA* gena v tleh nad bakterijskim (Leininger in sod., 2006; He in sod., 2007) je sprožila številne raziskave o podobnosti oziroma razlikah v odzivu amonijak oksidirajočih bakterij (AOB) in amonijak oksidirajočih arhej (AOA) na različne okoljske dejavnike. Številne med njimi kažejo, da na številčnost bakterijskih in arhejskih *amoA* genov vpliva pH (Prosser in Nicol, 2008), temperatura (Adair in sod., 2008), vsebnost vode (Gleeson in sod., 2010), gnojenje (Okano in sod., 2004; He in sod., 2007; Hallin in sod., 2009), vsebnost  $\text{NH}_4^+$  (Jia in Conrad, 2009), raba tal (Colloff in sod., 2008; Hayden in sod., 2010) in izpostavljenost viru onesnaževanja (Höfferle in sod., 2010), vendar si raziskave nasprotujejo.

Vse pogostejša sušna obdobja, ki kot že omenjeno, lahko vplivajo na velikost mikrobnih populacij ter nasprotujoče si raziskave o odzivu AOA in AOB populacije na okoljske dejavnike, so prinesle le še večjo potrebo po razumevanju razlik med AOA in AOB. V

travniških tleh, ki so bila redko podvržena suši, Thion in Prosser (2014) poročata o veliko večjem vplivu sušno-navlaževalnih ciklov na številčnost arhejskih *amoA* genov, medtem ko Adair in sod. (2008) v polsušnih arizonskih tleh poročajo o značilni povezavi med količino padavin in temperaturo tal le s številom bakterijskih *amoA* genov. Na drugi strani pa v kalifornijskih tleh, izpostavljenih vsakoletnim dolgim sušnim obdobjem tako AOA kot AOB *amoA* reagirajo na navlaževanje, le da je odziv bakterij hitrejši (Placella in Firestone, 2013). V nasprotju s prejšnjimi raziskavami naši rezultati kažejo, da je suša preko zmanjšanja vsebnosti vode in povišanja temperature vplivala na zmanjšanje tako AOA kot AOB *amoA* genov (Sl. 20), vendar je bil negativen vpliv suše pri CT večji na AOA populacijo. V zgornjem sloju tal je na številčnost AOA *amoA* genov temperatura imela veliko večji vpliv pri CT kot pri MT obravnavanju. Nekoliko večji vpliv temperature pri CT v primerjavi z MT smo zaznali tudi na številčnost AOB *amoA* genov, vendar je bil vpliv temperature na arheje veliko večji (Pregl. 12), kar kaže na morebitno nišno raznolikost med AOA in AOB, kot so predlagali že v prejšnjih raziskavah (Stopnišek in sod., 2010; Höfferle in sod., 2012; Prosser in Nicol, 2012; Thion in Prosser, 2014). Ne glede na to, da rezultati sicer kažejo večji vpliv temperature na populacijo oksidatorjev amonijaka, saj povišanje temperature za 1 °C v povprečju zmanjša številčnost *amoA* gena za 15 %, medtem ko povečanje vsebnosti vode za 1 % poveča povprečno številčnost *amoA* le za 3 % (Pregl. 13), sta v našem poskusu vsebnost vode v tleh in temperatura odvisni spremenljivki, saj se je vsebnost vode zmanjševala istočasno z naraščanjem temperature, zato lahko rečemo, da je suša močnejše vplivala na zmanjšanje AOA pri CT kot pri MT kot tudi na rahlo zmanjšanje AOB populacije, ne glede na to, da rezultati kažejo, da je na številčnost *amoA* genov značilno vplivala le temperatura tal. Prav tako je potrebno omeniti, da smo vsebnost vode v tleh določali pri vsakem vzorčenju na vseh vzorčenih parcelah in globinah, medtem ko smo podatke o temperaturi dobili s pomočjo vremenske postaje, ki je podala povprečno vrednost temperature za obe obravnavanji (MT in CT) na globini 5 cm. S tem je bila variabilnost podatkov o temperaturi nična, kar je posledično najverjetneje vplivalo na navidezno večji vpliv temperature v primerjavi z vodo.

Podobno kot za splošno bakterijsko in arhejsko združbo tudi za amonijak oksidirajoče bakterije in arheje velja, da je, kljub zmanjšanju velikosti AOA in AOB populacij med sušo, ta po normalnih tritedenskih padavinah ponovno dosegla začetno velikost (Priloga F), kar kaže na elastičnost združbe oksidatorjev amonijaka. Večina raziskav je osredotočenih prevsem na to, kako mikroorganizmi reagirajo na takojšnjo ponovno dostopnost vode (Placella in Firestone, 2013), medtem ko le majhen delež študij vključuje tudi dogajanje po več kot le nekaj dnevih od prvega navlaževanja (Thion in Prosser, 2014; Gschwendtner in sod., 2014). Thion in Prosser (2014) v tleh, ki niso bila prilagojena na sušo, ugotavljajo, da je bila AOA združba sicer manj elastična v primerjavi z AOB, vendar velikost obeh združb po vzpostavitvi normalnih razmer, tri tedne po koncu suše, ni dosegla začetnih vrednosti tako kot v naši raziskavi. V Moškanjcih so mikrobne združbe v tleh pogosto izpostavljene suši in kot kažejo naši rezultati, so se na te razmere tudi dobro prilagodile. Ti rezultati so

pomembni predvsem s stališča klimatskih sprememb in trenutne velike zaskrbljenosti zaradi morebitnih sprememb v velikosti, strukturi in pestrosti mikrobnih združb ter procesih, ki jih regulirajo.

Z zmanjšanjem vsebnosti vode v tleh je dostopnost do amonijaka lahko omejena, kar vpliva na nitrifikacijo. Suša je sicer vplivala tudi na vsebnost mineralnih oblik N, vendar pa ne vsebnost  $\text{NH}_4\text{-N}$  ne  $\text{NO}_3\text{-N}$  nista bili značilno povezani z velikostjo AOA in AOB populacije. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Adair in sod. (2008), ki prav tako niso zaznali povezave med mineralnimi oblikami N in številčnostjo AOA ali AOB *amoA* genov. Prav tako nekatere raziskave ugotavljajo, da povezav med nitrifikacijsko in denitrifikacijsko aktivnostjo ter številom kopij gena ni (Gschwendtner in sod., 2014; Attard in sod., 2011). Pri tem je potrebno poudariti, da število kopij gena predstavlja le genetski potencial za proces in ni nujno povezano s trenutno stopnjo nitrifikacije. V tem primeru bi vsekakor bila ustrežnejša primerjava na nivoju transkriptov, ki predstavljajo aktivno populacijo (Philippot in Hallin, 2005). Tako na primer Placella in Firestone (2013) ugotavljajo, da vsebnost amonijaka pojasnjuje več kot 80 % variabilnosti AOB *amoA* transkriptov.

Kljub temu, da je raziskav o primerjavi med AOA in AOB *amoA* veliko, pa je raziskav o vplivu obdelave tal zelo malo. Cavagnaro in sodelavci (2008) v kratkotrajnem 15-dnevem poskusu, v katerem so preučevali vpliv obdelave in dodatka  $\text{NH}_4^+$ , ugotavljajo, da je velikost AOB populacije narastla takoj po obdelavi ne glede na dodatek  $\text{NH}_4^+$ . Vendar, kot je bilo že prej omenjeno, lahko mikrobi hitro uporabijo na novo mineraliziran N, ki se med obdelavo zaradi mešanja tal sprosti iz strukturnih agregatov in odmrlih celic (Cavagnaro in sod., 2008), kar lahko vodi do neželenih izgub C in N iz talnega ekosistema, zato so raziskave o dolgoročnih vplivih ohranitvene obdelave še toliko pomembnejše. V nedavni raziskavi o vplivu konvencionalne obdelave ter kombinirane obdelave ter setve na grebene in neposredne setve v pridelavi riža na dinamiko dušika, Li in sod. (2015) poročajo, da je bilo po 22 letih število kopij AOA in AOB *amoA* gena značilno večje pri neposredni setvi kot pri CT. Podobno so naši rezultati pokazali, da je MT v primerjavi s CT povečala velikost AOA in AOB *amoA* v zgornjih 10 cm tal, ne glede na vremenske razmere, kar nakazuje na ugodnejše razmere v MT tleh tudi med sušo. MT je v zgornjem 0–10 cm sloju tal (pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi) v povprečju povečala številčnost AOB *amoA* genov za 42 %, AOA *amoA* pa kar za 74 %, medtem ko je v spodnjem 10–20 cm sloju povečala številčnost AOA *amoA* za 64 % v primerjavi s CT (Pregl. 13). Mikrobnna oksidacija amonijaka je prva in ključna stopnja v procesu nitrifikacije, ki vodi do nastanka nitrata, ki ga delno rastline uporabljajo za rast in razvoj, delno pa denitrifikatorji za končno pretvorbo v  $\text{N}_2$ . Pri tem je seveda potrebno omeniti, da prevelike količine vodijo v izpiranje ( $\text{NO}_3^-$ ) in izhajanje v atmosfero v obliki toplogrednih plinov ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Naši rezultati kažejo, da so pri MT razmere za mikroorganizme boljše kot

pri CT, ne glede na vremenske razmere, zato je MT ustrežnejša oblika obdelave v sušno ogroženih območjih.

Ne glede na vsebnost vode v tleh ali temperaturne razmere smo tako pri MT kot pri CT zaznali prevlado AOA *amoA* nad AOB *amoA*, kot je bilo dokazano že v številnih talnih ekosistemih (Leininger in sod., 2006; He in sod., 2007; Adair in sod., 2008). Velikost AOA populacije je bila pri vseh obravnavanjih od 4 do 19-krat večja od AOB, ne glede na vsebnost vode ali temperaturo tal (Priloga E), kar je v skladu s prejšnjimi raziskavami v katerih poročajo, da je razmerje med arhejskim in bakterijskim *amoA* genom v rangu od 1 do 400 (Leininger in sod., 2006; Bru in sod., 2011; Zeglin in sod., 2011). V MT tleh je bilo AOA/AOB razmerje večje kot v CT tleh, z večjim razmerjem v spodnji globini. Razlog za to je predvsem posledica zmanjšanja velikosti AOB *amoA* z globino, medtem ko je velikost AOA *amoA* z globino ostala nespremenjena. Tako kot za splošno bakterijsko združbo tudi za AOB populacijo velja, da je številčnost *amoA* genov večja v zgornjem sloju MT tal kot v spodnji globini, medtem ko na distribucijo AOA *amoA* gena globina, tako kot na splošno arhejsko populacijo, ni vplivala. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Leininger in sod. (2006), ki poročajo o negativnem vplivu globine na velikost AOB, medtem ko na AOA globina ne vpliva. Po nekaterih poročanjih naj bi številčnost AOB populacije bila odvisna od vsebnosti C<sub>org</sub> in TN, kar lahko pojasni večjo številčnost AOB v zgornjem sloju tal (Wessen in sod., 2010). V našem primeru je bilo razmerje med arhejami in bakterijami vedno večje v MT tleh. MT je značilno povečala vsebnost SOC, DOC in DON ter povzročila stratifikacijo C<sub>org</sub> in hranil v profilu, kar kaže na prevlado AOA tako v okoljih bogatih s hranilih kot v okoljih z manjšo vsebnostjo hranil.

### **Vpliv suše in obdelave na velikost združb denitrifikatorjev**

Proces denitrifikacije je odvisen od dostopnosti topnih oblik C, dostopnosti NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in deleža kisika (Barnard in sod., 2005), zato smo predpostavili, da bo denitrifikacija prav tako občutljiva na spremenljive vremenske razmere, ki bodo s povišanjem temperature ter spremembami v količini in razporeditvi padavin vplivale na vlažnosti tal in s tem na količino kisika ter dostopnost hranil. Nedavne ugotovitve Gschwendtner in sod. (2014), ki so preučevali vpliv povišanja temperature za približno 0,8 °C in simulacije suše in navlaževanja, kažejo, da niti temperatura niti suša nista vplivali na AOA *amoA*. Za razliko od *amoA* genov pa je suša značilno vplivala na zmanjšanje števila *nirK* in *nosZ* transkriptov, medtem ko je število *nirS* transkriptov bilo pod mejo detekcije. S tem so pokazali, da spremembe v vsebnosti vode in temperature v tleh lahko prizadenejo denitrifikacijo v vsaj enaki meri kot oksidacijo amonijaka. To domnevo potrjujejo tudi naši rezultati, saj je suša preko spremenjenih vodnih in temperaturnih razmer v tleh vplivala tudi na zmanjšanje števila denitrifikacijskih *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* genov (Sl. 21, 22).



Gschwendtner in sod. (2014) v raziskavi tudi poročajo, da je po navlaževanju število transkriptov ponovno narastlo, kar je v skladu z našimi rezultati. Po koncu sušnega obdobja je število vseh denitrifikacijskih genov v Moškanjcih narastlo in po treh tednih normalnih padavinskih razmer doseglo začetne vrednosti (Priloga F), kar kaže na dobro prilagojenost na sušo oziroma elastičnost populacije denitrifikatorjev v Moškanjcih. Nasprotno od naših ugotovitev Cantarel in sod. (2012) poročajo o pozitivnem vplivu povišanja temperature za 3,5 °C in redukcije padavin za 20 % na velikost AOB *amoA* in *nosZ* populacije v gorskih travniških tleh, medtem ko se *nirK* populacija na te spremembe ni odzivala. Na drugi strani pa Hartmann in sod. (2013) učinkov suše na dveh pedo-klimatsko različnih pašniških tleh na velikost AOA in AOB *amoA*, *nirK* ali *nosZ* niso zaznali, medtem ko je bila velikost *nirS* rahlo zmanjšana. Za razliko od omenjenih študij, v katerih poročajo o različnem vplivu suše na posamezne denitrifikacijske gene, je v Moškanjcih suša v enaki meri vplivala na vse kvantificirane gene (*nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII*) (Pregl. 12). V naši raziskavi smo preučevali naravni pojav suše in navlaževanja, medtem ko so bili pogoji v omenjenih raziskavah (laboratorijsko) regulirani, kar bi lahko pojasnilo različne rezultate med vsemi raziskavami. Prav tako gre v omenjenih raziskavah za drugačno rabo tal (visokogorska pašniška/travniška tla) z drugačnimi pedo-klimatskimi lastnostmi v primerjavi s poskusnim poljem v Moškanjcih, kar je prav tako lahko razlog za drugačne rezultate.

Primerjava naših rezultatov o vplivih na *nosZ* populacijo z večino ostalih raziskav ni najbolj ustrezna, saj večina študij za kvantifikacijo reducentov N<sub>2</sub>O uporablja samo en set začetnih oligonukleotidov in s tem izpusti pomemben delež populacije reducentov N<sub>2</sub>O. Jones in sod. so leta 2013 odkrili dve različni veji (klada) *nosZ* gena, za katera so ugotovili, da je številčnost *nosZ* gena klada II vsaj tolikšna kot klada I, kar pomeni, da se velikost znanih *nosZ* vsaj še podvoji. V obdelovanih tleh velja, da je razmerje med *nosZII* in *nosZI* navadno večje od 1, medtem ko je v vinogradniških tleh to razmerje večje od 7, v alpskih tleh pa manjše od 1 (Jones in sod., 2013). V Moškanjcih se je razmerje med *nosZII* in *nosZI* spremonjalo v rangi od 0,6 v spodnjem sloju, do 1 v zgornjem sloju tal ne glede na obdelavo. Manjše razmerje v spodnjem 10–20 cm sloju tal je predvsem posledica vpliva globine na *nosZII*, medtem ko na *nosZI* globina ni vplivala.

Na velikost populacije denitrifikatorjev je značilno vplivala tudi obdelava. Številčnost *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* genov je bila v zgornjih 10 cm tal značilno večja pri MT v primerjavi s CT (Pregl. 13). V sušnih njivskih tleh, kjer so Melero in sod. (2011) preučevali vpliv obdelave na velikost populacije denitrifikatorjev, so ugotovili, da je bila velikost *nirS* in *nosZ* populacij v rastni fazi pridelka večja pri NT, po žetvi pa pri CT, medtem ko je bilo število *nirK* genov pod mejo detekcije. V naši raziskavi je bila številčnost denitrifikacijskih genov (pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi) vedno večja pri MT, in sicer *nirK* za povprečno 51 %, *nirS* in *nosZI* za 45 % ter *nosZII* genov za 56 % v primerjavi s CT (Pregl. 13), vendar je tu potrebno omeniti, da

so bile vse meritve v našem poskusu opravljene po koncu vegetacijske dobe rži. Podobno kot v naši raziskavi so v glinenih tropskih tleh Baudoin in sod. (2009) pokazali, da ima obdelava močan vpliv na združbo denitrifikatorjev, in sicer je neposredna setev povečala številčnost *nirK* in *nosZ* populacije v primerjavi s CT. Naši rezultati kažejo, da zmanjšana intenzivnost obdelave vodi v povečanje števila denitrifikacijskih genov ne glede na vremenske pogoje. S tem sicer ne moremo trditi, da je MT povečala stabilnosti talnega ekosistema med sušo, lahko pa sklepamo, da so pri MT, z izboljšanimi vodno-zadrževalnimi lastnostmi tal in večjo vsebnostjo hranil v primerjavi s CT, razmere za denitrifikatorje boljše kot pri CT ne glede na vremenske pogoje.

Ne glede na to, da sta *nirK* in *nirS* funkcionalno ekvivalentna v procesu redukcije nitrata (Glockner in sod., 1993), si raziskave o njunem medsebojnem razmerju nasprotujejo. Naši rezultati so pokazali, da med reducenti nitrata pri vseh obravnavanjih *nirK* prevladuje nad *nirS* (Priloga E), kar je v nasprotju z ugotovitvami Hallin in sod. (2009), ki poročajo o prevladi *nirS* v kmetijskih tleh. V splošnem naj bi za *nirK* populacijo veljalo, da ji bolj ustrezajo z ogljikom bogati predeli, kot je rizosfera (Barta in sod., 2010; Ollivier in sod., 2010). Prav tako naj bi bila *nirK* populacija bolj občutljiva na okoljske spremembe kot *nirS*. Teh domnev z našo raziskavo nismo mogli potrditi, ugotovili pa smo, da *nirK* dominirajo nad *nirS* ne glede na obdelavo, globino ali sušo. Prav tako naši rezultati ne kažejo linearne odvisnosti *nirK*, *nirS*, *nosZI* ali *nosZII* z vsebnostjo DOC, DON ali  $\text{NO}_3^-$ .

## 6 SKLEPI

Dolgoletna MT je v preučevanih pedo-klimatskih pogojih vplivala na vertikalno prerazporeditev  $C_{org}$  in hranil v tleh, z večjimi vsebnostmi v zgornjem 0–10 cm sloju v primerjavi s spodnjim 10–20 cm slojem tal. Razlik med MT in CT v skupni zalogi  $C_{org}$  v profilu nismo ugotovili na nobeni izmed izbranih lokacij.

Povečana vsebnost organske snovi v zgornjem 0–10 cm sloju MT tal je vplivala na večjo obstojnost strukturnih agregatov v frakciji 2–4 mm, medtem ko je bil vpliv na vodno-zadrževalne lastnosti tal značilen le na eni izmed lokacij (Moškanjci).

Mikrobna biomasa se je v MT tleh odzvala na prerazporeditev  $C_{org}$  in hranil v profilu ter izboljšanje fizikalnih lastnosti v zgornjih 10 cm, kar je vodilo v povečanje mikrobne biomase na globini 0–10 cm v primerjavi s CT.

Z našo raziskavo smo pokazali različen odziv bakterij, gliv in arhej na spremembe v obdelavi tal. Največje razlike v strukturi smo na obeh lokacijah opazili v bakterijski, na lokaciji v Moškanjcih pa tudi v glivni združbi. Obdelava vpliva na glive preko fizičnega uničenja njihovega hifnega sistema, zato je izostanek obdelave v Ljubljani omogočil glivni združbi čas za regeneracijo. Struktura arhej se z obdelavo ni spreminjala na nobeni izmed lokacij.

V pedo-klimatskih razmerah Moškanjcev smo določili pozitivne učinke MT na več talnih parametrov kot v Ljubljani, kljub temu da bi zaradi večjega deleža gline in posledično večje akumulacije organske snovi bilo za pričakovati ravno obratno. Razlog za to je v posevku lucerne, zaradi česar se v Ljubljani za razliko od Moškanjcev eno leto pred izvedbo vzorčenja tal ni obdelovalo.

Minimalna obdelava z izboljšanjem fizikalno-kemijskih in biotskih lastnosti tal lahko pomembno prispeva k preprečevanju erozije in izpiranja hranil iz talnega ekosistema, še posebno na območjih, kjer so tla plitva in izpostavljena suši, kot je jugovzhodni del države.

Suša je z zmanjšanjem vsebnosti vode in hkratnim povišanjem temperature tal zmanjšala mikrobno biomaso in velikost splošne združbe bakterij gliv in arhej, kot tudi velikost funkcionalne združbe nitrifikatorjev in denitrifikatorjev.

MT je na globini 0–10 cm v primerjavi s CT pri povprečni vsebnosti vode in povprečni temperaturi povečala mikrobno biomaso ter številčnost splošnih bakterijskih in krenarhejskih 16S rRNA, glivnih ITS, AOA in AOB *amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* genov ter na globini 10–20 cm tudi številčnost arhejskih 16S rRNA in AOA *amoA* genov.

Pri MT obravnavanju smo na globini 10–20 cm opazili značilno manjši vpliv suše na številčnost arhejskega 16S rRNA gena v primerjavi s CT 10–20 cm. Prav tako je bil vpliv suše na številčnost AOA in AOB *amoA* genov manjši na spodnji globini 10–20 cm pri MT v primerjavi s CT. Iz tega lahko sklepamo, da so za splošno arhejsko združbo ter amonijak oksidirajoče arheje in bakterije med sušo pogoji bili bolj ugodni v MT kot v CT tleh, kar nakazuje na večjo stabilnost ekosistema v MT tleh.

Kljub zmanjšanju velikosti mikrobne populacije med sušo, je ta po normalnem tritedenskem padavinskem obdobju ponovno dosegla začetno velikost, kar kaže na elastičnost združb v preučevanih pedo-klimatskih pogojih. Združbe v Moškanjcih so bile v preteklosti pogosto podvržene sušnemu stresu, zato lahko sklepamo, da so preučevane združbe dobro prilagojene na sušo.

Izboljšanje fizikalnih in kemijskih lastnosti v MT tleh v primerjavi s CT je izboljšalo življenjske razmere za talne mikroorganizme do te mere, da so bili pogoji v MT ugodnejši tudi med stresnimi razmerami, ob pojavu suše, zato sklepamo, da lahko MT dolgoročno doprinese k večji stabilnosti talnega ekosistema.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Doktorska raziskava se je izvajala na dveh pedo-klimatsko različnih lokacijah v Sloveniji, v Ljubljani in v Moškanjcih, kjer poteka primerjava konvencionalnega oranja in ohranitvene, minimalne obdelave tal že od leta 1999. V primerjavi z Ljubljano, kjer so tla globlja in teksturno težja, z meljasto glineno ilovnato teksturo, so v Moškanjcih tla plitvejša in teksturno lažja, ilovnata, z več skeleta in posledično bolj občutljiva na izpiranje hranil, erozijo in sušo. Prav tako se lokaciji razlikujeta v povprečni količini letnih padavin, ki je v obdobju med 1999–2013 bila za približno 460 mm večja v Ljubljani.

Namen doktorskega dela je bil v prvem delu ovrednotiti dolgoročne učinke minimalne obdelave na glavne fizikalno-kemijske lastnosti tal (vsebnost  $C_{org}$  in hranil, obstojnost strukturnih agregatov, vodno zadrževalne lastnosti tal in infiltracijo) ter z uporabo T-RFLP metode ovrednotiti njen vpliv na strukturo in pestrost mikrobnih združb bakterij, gliv in arhej na obeh lokacijah. Pri tem smo predpostavili, da bo učinek MT na fizikalno-kemijske lastnosti večji v pedo-klimatskih pogojih v Moškanjcih in se bodo spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih na obeh lokacijah odrazile tudi v strukturi mikrobnih združb. V drugem delu naloge smo na poskusnem polju v Moškanjcih z uporabo kvantitativne PCR metode ovrednotili vpliv suše in obdelave na mikrobnio biomaso ter splošno (16S rRNA in ITS) in funkcionalno pestrost mikrobnih združb preko izbranih ključnih genov dušikovega cikla (*amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII*). Predpostavili smo, da bo učinek suše na splošno in funkcionalno pestrost izbranih tarčnih genov N cikla manjši pri MT v primerjavi s CT.

Na obeh lokacijah smo po 12 letih od postavitve poskusa ugotovili značilno vertikalno prerazporeditev  $C_{org}$  in hranil v MT profilu, z največjo vsebnostjo v zgornjem sloju tal, medtem ko je bila pri CT vsebnost  $C_{org}$  in hranil v sloju 0–20 cm enaka. Kljub razlikam v zgornjem sloju je zaloga  $C_{org}$  v profilu (0–60 cm) na obeh lokacijah ostala nespremenjena ( $57,4 \pm 0,8 \text{ t ha}^{-1}$  pri MT in  $59,1 \pm 2,2 \text{ t ha}^{-1}$  pri CT v Moškanjcih;  $85,4 \pm 5,8 \text{ t ha}^{-1}$  pri MT in  $90,6 \pm 1,6 \text{ t ha}^{-1}$  pri CT v Ljubljani). Značilne razlike v med MT in CT v zgornjih 10 cm smo zaznali samo v Ljubljani ( $2,88 \% \pm 0,19$  in  $2,38 \% \pm 0,11$ ), medtem ko v Moškanjcih razlike niso bile značilne ( $1,60 \% \pm 0,07$  in  $1,45 \% \pm 0,05$ ). Večje razlike v vsebnosti  $C_{org}$  med obdelavama v Ljubljani so predvsem posledica večjega deleža gline (25–41 %) v primerjavi z Moškanjci (16–20 %).

Na obeh lokacijah smo zaznali značilen pozitiven učinek na obstojnost strukturnih agregatov velikostnega razreda 2–4 mm. Glede na večji delež gline in večjo vsebnost  $C_{org}$  bi pričakovali večje razlike v obstojnosti agregatov v Ljubljani, vendar se je obstojnost pri MT v Ljubljani povečala le za približno 11 %, v Moškanjcih pa dvakrat več, za 24 % v primerjavi s CT. Tako v Ljubljani kot v Moškanjcih obdelava ni vplivala na obstojnost

strukturnih agregatov 1–2 mm velikostnega razreda kot tudi ne na velikost strukturnih agregatov.

Značilno večjo sposobnost tal za zadrževanje vode smo zaznali le v Moškanjcih, kjer je MT v primerjavi s CT izboljšala PK (24,8 % in 22,2 %) in EPK (13,4 % in 10,3 %) ter v spomladanskem času povečala infiltracijsko sposobnost MT tal ( $128 \pm 31 \text{ mm h}^{-1}$  in  $62 \pm 20 \text{ mm h}^{-1}$ ), medtem ko v jesenskem času razlik v infiltraciji med obdelavama ni bilo. Za razliko od Moškanjcev pa v Ljubljani, kljub povečani zalogi  $C_{\text{org}}$  in povečani poroznosti (8 %) v zgornjem sloju tal, razlik v PK med obdelavama nismo ugotovili. Prav tako MT ni izboljšala infiltracijske sposobnosti tal, kar pa je verjetno posledica velike variabilnosti med meritvami zaradi drenažnega sistema na poskusnem polju v Ljubljani.

V MT tleh je prerazporeditev  $C_{\text{org}}$  in hranil v profilu vplivala tudi na mikrobnio biomaso, ki je bila značilno večja pri MT kot pri CT v zgornjih 10 cm tal na obeh lokacijah. Prav tako smo na obeh lokacijah zaznali pozitivno linearno povezavo med mikrobnio biomaso in  $C_{\text{org}}$ . T-RFLP metoda je pokazala, da je MT vplivala na strukturo bakterijske združbe tako v Ljubljani kot v Moškanjcih, medtem ko je v Moškanjcih vplivala tudi na strukturo glivne združbe. Najizrazitejše spremembe v strukturi so bile na obeh lokacijah v bakterijski združbi. V Moškanjcih so se bakterijske združbe na globini 10–20 cm pri MT jasno ločile od preostalih združb, medtem ko smo v Ljubljani v grobem ločili združbe v MT in CT tleh. Največ sprememb v glivni združbi smo v Moškanjcih opazili pri MT na globini 0–10 cm, v Ljubljani pa smo zaznali le rahel vpliv globine. Na združbo arhej obdelava in globina nista imeli vpliva na nobeni izmed preučevanih lokacij. V doktorskem delu smo za določanje strukture mikrobnih združb uporabili T-RFLP metodo, ki je odvisna tako od uporabljenih molekularnih markerjev kot tudi od izbranih restriksijskih encimov, zato ne moremo izključiti možnosti, da bi z uporabo občutljivejše metode, kot je na primer pirosekvenciranje, zaznali večje razlike v strukturi preučevanih mikrobnih združb. Kljub spremembam v strukturi mikrobnih združb bakterij in gliv razlik v številu TRF v Moškanjcih nismo zaznali, kar lahko nakazuje, da se pestrost z obdelavo ni spremenila. Za razliko od Moškanjcev je bila pestrost bakterij v Ljubljani večja pri CT na obeh globinah v primerjavi z MT.

V drugem delu poskusa smo v Moškanjcih preučevali vpliv suše na mikrobnio biomaso ter splošno (16S rRNA in ITS) in funkcionalno pestrost izbranih tarčnih genov N cikla (*amoA*, *nirK*, *nirS* in *nosZ*). Na mikrobnio biomaso, merjeno kot skupno talno DNA, smo opazili značilen vpliv obdelave in globine kot tudi vsebnosti vode v tleh in temperature. Suša je na zmanjšanje mikrobnio biomase vplivala preko zmanjšanja vode in povečanja temperature tal, kljub temu pa je bila mikrobnio biomasa v zgornjih 10 cm pri MT večja v primerjavi s CT, ne glede na vremenske pogoje.

Podobno kot mikrobna biomasa je tudi velikost splošnih bakterijskih in krenarhejskih 16S rRNA ter glivne ITS genov bila odvisna tako od obdelave in globine kot tudi vode in temperature. MT je na globini 0–10 cm povečala povprečno številčnost bakterijskih 16S rRNA ( $1,4 \times 10^{10}$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), krenarhejskih 16S rRNA ( $4,2 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) in glivnih ITS genov ( $5,9 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) v primerjavi s CT ( $7,1 \times 10^9$ ,  $1,4 \times 10^8$  in  $2,4 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal). V spodnji globini tal so bile razlike med obdelavama značilne samo pri arhejah, z večjo številčnostjo pri MT ( $5,9 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) v primerjavi s CT ( $1,7 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal). Suša je značilno vplivala na zmanjšanje splošnih bakterijskih, glivnih in arhejskih genov, in sicer se je številčnost genov linearno zmanjševala z zmanjševanjem vode in povečanjem temperature. Vpliv suše na arheje je bil pri MT značilno manjši na globini 10–20 cm v primerjavi z vrhnjim slojem tal; prav tako smo na globini 10–20 cm opazili manjši vpliv pri MT v primerjavi s CT. Za razliko od arhej je bil vpliv suše na bakterije in glive pri obeh obdelavah enak.

Tudi na velikost funkcionalne združbe nitrifikatorjev (AOA in AOB *amoA*) in denitrifikatorjev (*nirK*, *nirS* in *nosZ*) je vplivala obdelava ter vsebnost vode in temperatura tal. V primerjavi s CT je MT povečala številčnost AOA *amoA* ( $1,7 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) in AOB *amoA* ( $2,2 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), *nirK* ( $5,2 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), *nirS* ( $7,7 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal), *nosZI* ( $4,8 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) in *nosZII* genov ( $5,4 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal) v zgornjih 10 cm tal, medtem ko so v spodnjem sloju razlike med obravnavanji bile značilne le pri AOA *amoA* genih ( $1,9 \times 10^8$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal pri MT in  $6,9 \times 10^7$  kopij  $\text{g}^{-1}$  tal pri CT). Številčnost AOA in AOB *amoA*, *nirK*, *nirS* in *nosZ* genov se je v splošnem linearno zmanjševala z zmanjšanjem vode in povečanjem temperature. V AOA in AOB populaciji smo na zgornji globini pri MT opazili manjši vpliv suše na številčnost *amoA* genov v primerjavi s CT. Pri tem smo zaznali veliko večji vpliv interakcije med sušo in obdelavo na AOA kot na AOB združbo. Za razliko od oksidatorjev amonijaka pa je bil vpliv suše na denitrifikatorje pri obeh obdelavah enak. Naši rezultati v splošnem kažejo, da so v MT tleh pogoji za mikroorganizme boljši tudi v stresnih razmerah v primerjavi s CT in s tem tudi ustreznost MT sistema boljša v okoljih, podvrženih suši.

Rezultati kažejo, da je suša sicer zmanjšala številčnost tako splošne kot tudi funkcionalne mikrobne združbe, vendar je ta po normalnih tritedenskih padavinah ponovno dosegla začetno velikost, kar kaže na dobro prilagojenost mikrobnih združb v Moškanjih na sušo oziroma njihovo elastičnost v okolju.

Številčnost AOA *amoA* gena je bila pri vseh obravnavanjih od 4 do 20-krat večja od AOB *amoA* gena ne glede na vsebnost vode ali temperaturo. V združbi denitrifikatorjev smo med reducenti nitrita ugotovili prevlado *nirK* gena nad *nirS* pri vseh obravnavanjih.

## 7.2 SUMMARY

Minimum tillage (MT) has been compared to conventional ploughing (CT) side by side at two different locations in Slovenia, in Ljubljana and Moškanjci, since 1999. Site Ljubljana is characterized by silty clay loam texture, with mean annual precipitation 1400 mm. At site Moškanjci, soils are shallow with high gravel content, loam soil texture and mean annual precipitation rate is by 460 mm lower than in Ljubljana; therefore, the soil is more exposed to erosion, drought and nutrient leaching.

The aim of this doctoral thesis was first to evaluate the long-term influence of minimum tillage on main soil physico-chemical properties (soil organic carbon and nutrients, aggregate stability, soil water properties) and consequently on microbial community composition and diversity of bacteria, fungi and archaea using T-RFLP fingerprinting method at both studied locations. We hypothesized that the effect of MT on the physico-chemical properties will be more pronounced in the pedo-climatic conditions at site Moškanjci, and that changes in the physico-chemical properties will reflect in the composition of microbial communities at both locations. In the second part of this doctoral thesis, we evaluated the impact of intensive summer drought on microbial biomass and on the abundance of the general bacterial, archaeal, and fungal population (16S rRNA in ITS), as well as on the abundance of archaeal and bacterial ammonia-oxidizing (*amoA*) and denitrifying (*nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosZII*) genes at site Moškanjci, using quantitative PCR (qPCR) method. We hypothesized that the impact of the drought on general, as well as on functional diversity, will be smaller under MT in comparison with CT.

Significant differences between MT and CT were found in vertical redistribution of soil organic carbon ( $C_{org}$ ) and nutrients at both locations; under MT, concentrations of all nutrients decreased from the soil surface to the lower layers, as opposed to CT, which maintained rather uniform distribution at 0-20 cm depth. However, the overall stock in the investigated soil profile (0-60 cm) remained unaffected at both sites ( $57.4 \pm 0.8 \text{ t ha}^{-1}$  in MT and  $59.1 \pm 2.2 \text{ t ha}^{-1}$  in CT at site Moškanjci;  $85.4 \pm 5.8 \text{ t ha}^{-1}$  in MT and  $90.6 \pm 1.6 \text{ t ha}^{-1}$  in CT at site Ljubljana). In comparison to CT, MT significantly increased  $C_{org}$  content in the first 10 cm of soil in Ljubljana ( $2.88 \pm 0.19\%$  and  $2.38 \pm 0.11\%$ ), while in Moškanjci differences were not significant ( $1.60 \pm 0.07\%$  and  $1.45 \pm 0.05\%$ ). Greater differences in  $C_{org}$  content in Ljubljana were mainly due to the higher clay content (15-41%) in comparison with Moškanjci (20-26%).

MT increased the proportion of water-stable 2-4 mm sized aggregates at both locations. Given the greater proportion of clay and higher content of  $C_{org}$ , greater differences in the aggregate stability would be expected in Ljubljana, however, MT increased aggregate stability by approximately 11% in Ljubljana and 24% in Moškanjci, compared with CT.



Tillage had no effect on the proportion of water-stable 1-2 mm sized aggregates at any location.

Significant differences in the soil water retention properties were recorded only in Moškanjci, where MT in comparison with CT increased water holding capacity (24.8% and 22.2%, respectively), plant available water (13.4% and 10.3%, respectively) and infiltration rate for spring measurements ( $128 \pm 31 \text{ mm h}^{-1}$  and  $62 \pm 20 \text{ mm h}^{-1}$ ), while the infiltration rate in autumn showed no significant differences between the tillage treatments. In Ljubljana, despite the increased amount of  $C_{\text{org}}$  and soil porosity (8%) in the topsoil of MT, no differences in water holding capacity between tillage treatments were observed. Infiltration rate in Ljubljana was also not affected by the tillage; however, this is mainly due to the drainage system on the laboratory field.

Redistribution of  $C_{\text{org}}$  and nutrients was reflected in increased microbial biomass at both locations, with higher concentrations in the topsoil (0-10 cm) of MT compared with CT. Also a positive linear dependence of microbial biomass on  $C_{\text{org}}$  content was observed at both locations. Microbial community composition estimated by T-RFLP fingerprinting method of bacterial 16S rRNA genes was affected by tillage at both locations, while in Moškanjci, tillage affected also the fungal ITS community composition. Bacterial communities in the lower 10-20 cm soil layer of MT were evidently separated from the rest of the treatments, while in Ljubljana a weak separation between MT and CT was observed. Fungal communities in Moškanjci changed the most in the upper 0-10 cm soil layer under MT, while in Ljubljana only a slight influence of depth was observed. The influence of tillage systems or depth on archaeal populations was not evident at any of the studied locations. However, as the sensitivity of the T-RFLP approach depends on the variability of the amplified region of the marker gene, as well as on the used restriction enzyme, it cannot be excluded that the sensitivity of the used fingerprinting approach was insufficient to identify shifts in the archaeal phylum. Despite the observed changes in community composition, no significant differences were found in the average numbers of TRF between MT and CT treatment in Moškanjci, while in Ljubljana higher bacterial diversity was found under CT.

In the second part of the doctoral research, effects of extremely dry summer conditions on microbial biomass, general (16S rRNA in ITS) and functional population (*amoA*, *nirK*, *nirS* and *nosZ*) were evaluated in Moškanjci. Microbial biomass estimated by the total soil DNA content was affected by tillage and depth, as well as by soil water content (expressed as % WHC) and soil temperature. Drought, with decreasing water content and increasing soil temperature, decreased microbial biomass; however, microbial biomass was always higher in the topsoil of MT than in CT soils.

In general, the total (cren)archaeal and bacterial 16S rRNA and fungal ITS genes were significantly affected by tillage and depth, as well as by water content and temperature. In the 0-10 cm soil layer, at average water content and soil temperature, MT increased the average abundance of the total bacterial ( $1.4 \times 10^{10}$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ), archaeal ( $4.2 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) and fungal gene copies ( $5.9 \times 10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) compared with CT ( $7.1 \times 10^9$ ,  $1.4 \times 10^8$  and  $2.4 \times 10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ , respectively). In the lower soil layer, differences between treatments were found only for archaea, with greater abundance in MT treatment ( $5.9 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) compared with CT ( $1.7 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ). Drought significantly decreased the total archaeal, bacterial, and fungal genes. Archaeal 16S rRNA genes were less affected by water content and temperature under MT at 10-20 cm layer than in the topsoil. In addition, the crenarchaeal abundance was slightly less affected by drought in the lower 10-20 cm soil layer of MT treatment than under CT.

Quantification of the (cren)archaeal and bacterial ammonia-oxidizers and denitrifiers targeting functional genes revealed that tillage, water content, and temperature affected the average abundance of all measured N-cycling genes. In comparison with CT, MT increased the average abundance of AOA *amoA* ( $1.7 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) and AOB *amoA* ( $2.2 \times 10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ), *nirK* ( $5.2 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ), *nirS* ( $7.7 \times 10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ), *nosZI* ( $4.8 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) and *nosZII* genes ( $5.4 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$ ) in the upper 10 cm of soil, while in the lower layer, differences between tillage treatments were found only for AOA *amoA* genes, with greater abundance under MT ( $1.9 \times 10^8$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$  in MT and  $6.9 \times 10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$  soil $^{-1}$  in CT). In general, the abundance of AOA and AOB *amoA*, *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes decreased with decreasing water content and increasing temperature. Our results showed lower influence of the soil temperature on AOA in AOB *amoA* genes in the topsoil of MT than in CT, while no significant differences in response to changing water content were observed.

Although drought significantly decreased the abundance of ammonia-oxidizers, denitrifiers and the abundance of general microbial population, after establishing normal conditions, all communities reached their initial size, indicating relatively high recovery and resilience of the microbial communities in Moškanjci.

Our results also showed that AOA *amoA* gene copies predominated over AOB *amoA* gene copies and were four to twenty-times more abundant in all treatments. In denitrifying community, *nirK* genes were more abundant than *nirS* genes in all treatments.

## 8 VIRI

- Acosta-Martínez V., Dowd S.E., Bell C.W., Lascano R., Booker J.D., Zobeck T.M., Upchurch D.R. 2010. Microbial community composition as affected by dryland cropping systems and tillage in a semiarid sandy soil. *Diversity*, 2: 910-931
- Adair K.L., Schwartz E. 2008. Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA. *Microbial Ecology*, 56: 420-426
- Alvarado P., Manjon J.L. 2009. Selection of enzymes for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal internally transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4747-4752
- Alvarez R., Steinbach H.S. 2009. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research*, 104: 1-15
- Alvaro-Fuentes J., Lopez M.V., Cantero-Martinez C., Arrue J.L. 2008. Tillage effects on soil organic carbon fractions in Mediterranean dryland agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 72: 541-547
- ARSO. Agencija Republike Slovenije za Okolje. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, meteo.si, uradna vremenska napoved za Slovenijo.  
<http://meteo.arso.gov.si/met/sl/app/webmet/#webmet==8Sdwx2bhR2cv0WZ0V2bvEGcw9ydlJWblR3LwVnaz9SYtVmYh9iclFGbt9SaulGdugXbsx3cs9mdl5WahxXYyNGapZXZ8tHZv1WYp5mOnMHbvZXZulWYnwCchJXYtVGdlJnOn0UQQdSf> (12. jul. 2015)
- Attard E., Recous S., Chabbi A., De Berranger C., Guillaumaud N., Labreuche J., Philippot L., Schmid B., Le Roux X. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology*, 17: 1975-1989
- Baker J.M., Ochsner T.E., Venterea R.T., Griffis T.J. 2007a. Tillage and soil carbon sequestration—What do we really know? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118: 1-5
- Baker C.J., Saxton K.E., Ritchie W.R., Chamen W.C.T, Reicosky D.C, Ribeiro M.F.S, Justice S.E., P. Hobbs R. 2007b. *No-Tillage Seeding in Conservation Agriculture*. 2<sup>nd</sup> ed. Rome, CABI and FAO: 326 str.
- Bailey V.L., Smith, J.L., Bolto, H.J. 2002. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 997-1007
- Bapiri A., Baath E., Rousk J. 2010. Drying-rewetting cycles affect fungal and bacterial growth differently in an arable soil. *Environmental Microbiology*, 60, 2: 419-428
- Barta J., Melichova T., Vanek D., Picek T., Šantruckova H. 2010. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of nirK and nirS denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry*, 101: 123-132
- Baudoin E., Philippot L., Cheneby D., Chapuis-Lardy L., Fromin N., Bru D., Rabary B., Brauman A. 2009. Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and

- the abundance of denitrifier communities in a tropical soil. *Soil Biology Biochemistry*, 41: 1703–1709
- Bayer C., Gomes J., Vieir F.C.B., Zanatta J.A., de Cassia Piccolo M., Dieckow J. 2012. Methane emission from soil under long-term no-till cropping systems. *Soil and Tillage Research*, 124: 1-7
- Barnard R., Leadley P.W., Hungate B.A. 2005. Global change, nitrification, and denitrification: A review. *Glob Biogeochem Cycle*, 19: 1-13
- Beman J.M., Francis C.A. 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 7767–7777
- Bescansa P., Imaz M.J., Virto I., Enrique A., Hoogmoed W.B. 2006. Soil water retention as affected by tillage and residue management in semiarid Spain. *Soil and Tillage Research*, 87: 19–27
- Birch H.F. 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil*, 10, 1: 9–31
- Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67: 192-211
- Borneman J., Triplett E. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2647–2653
- Borken W., Matzner E. 2009. Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils. *Global Change Biology*, 15, 4: 808–824
- Bouzaiane O., Cherif H., Saidi N., Jedidi N., Hassen A. 2007. Effects of municipal solid waste compost application on the microbial biomass of cultivated and non-cultivated soil in a semi-arid zone. *Waste Management and Research*, 25: 334-342
- Brady N.C., Weil R.R. 2008. Organisms and ecology of the soil. V: the nature and properties of soils. Brady N.C., Weil R.R. (eds.). Pearson Prentice Hall: 443-495
- Brenčič M. 2012. Modeliranje pojavljanja suše na območju Slovenije od začetka 19. stoletja dalje. V: 23. Mišičev vodarski dan. Maribor, VGB: 13-20
- Bridge P., Spooner B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil*, 232: 147-154
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 245-252
- Bru D., Ramette A., Saby N.P.A., Dequiedt S., Ranjard L., Jolivet G., Arrouays D., Philippot L. 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *The ISME Journal*, 5: 532–542
- Cantarel A.A.M., Bloor J.M.G, Pommier T., Guillaumaud N., Moiro C., Soussana J.F., Poly F. 2012. Four years of experimental climate change modifies the microbial drivers of N<sub>2</sub>O fluxes in an upland grassland ecosystem. *Global Change Biology*, 18: 2520–2531

- Cavagnaro T.R., Jackson L.E., Hristova K., Scow K.M. 2008. Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 40: 13-18
- Ceja-Navarro J.A., Rivera-Orduña F.N., Patiño-Zúñiga L., Vila-Sanjurjo A., Crossa J., Govaerts B., Dendooven L. 2010. Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 3685–3691
- Colloff M.J., Wakelin S.A., Gomez D., Rogers S.L. 2008. Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management. *Soil and Biology Biochemistry*, 40: 1637–1645
- Conservation Technology Information Center. Tillage Type Definitions.  
<http://www.conservationinformation.org/resourcedisplay/322/> (11. jun. 2015)
- Crowther T.W., Boddy L., Jones T.H. 2012. Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME Journal*, 6: 1992–2001
- Culman S.W., Bukowski R., Gauch H.G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D.H. 2009. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10:171.  
<http://trex.biohpc.org/> (11. jun. 2015)
- Curtis T.P., Sloan W.T. 2005. Exploring microbial diversity – a vast below. *Science*, 309: 1331-1333
- Čelebić U. 2008. Vsebnost in frakcije organske snovi in dušika pri različni obdelavi njivskih tal. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Oddelek za agronomijo: 43 str.
- Dai A. 2012. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*, 3: 52-58
- DeLong E.F., Pace R.P. 2001. Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology*, 50: 470–478
- Derpsch R., Friedrich T., Kassam A., Hongwen L. 2010. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 3, 1: 1-26
- Deumlich D., Funk R., Frielinghaus M., Schmidt W.A., Nitzsche O. 2006. Basics of effective erosion control in German agriculture: a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 370–381
- Diamond J., Shanley T. 2003. Infiltration rate assessment of some major soils. *Irish Geography*, 36, 1: 32-46
- Dimassi B., Mary B., Wylleman R., Labreuche J., Couture D., Piraux F., Cohan J.P. 2014. Long-term effect of contrasted tillage and crop management on soil carbon dynamics during 41 years Agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 188:134–146
- Ding G.C., Piceno Y.M., Heuer H., Weinert N., Dohrmann A.B., Carrillo A., Andersen G.L., Castellanos T., Tebbe C.C., Smalla K. 2013. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS ONE*, 8: e59497, doi: 10.1371/journal.pone.0059497: 10 str.

- Djukic I., Zehetner F., Mentler A., Gerzabek M.H. 2010. Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 155–161
- Doran J.W., Elliott E.T., Paustian K. 1998. Soil microbial activity, nitrogen cycling, and long term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. *Soil and Tillage Research*, 49: 3-18
- Drenovsky R.E., Steenwerth K. L., Jackson L. E., Scow K.M. 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecology and Biogeography*, 19: 27–39
- Ekelund F., Ronn R., Christensen S. 2001. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 475-481
- Elliott E.T., Coleman D.C. 1988. Let the soil work for us. *Ecological Bulletins*, 39: 23–32
- Elsas J.D., Boersma F.G.H. 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47: 77-87
- Evans S.E., Wallenstein M.D. 2012. Soil microbial community response to drying and rewetting stress: does historical precipitation regime matter? *Biogeochemistry*, 109: 101–116
- Feller C., Albrecht A., Tessier A.D. 1996. Aggregation and organic matter storage in kaolinitic and smectitic soils. V: Aggregation and organic matter storage in agricultural soils. Carter M.R., Stewart B.A. (eds.). Raton, CRS Press: 309–359
- Feller C., Beare M.H. 1997. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma*, 79: 69–116
- Feng Y., Motta A.C., Reeves D.W., Burmester C.H., van Santen E., Osborne J.A. 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1693–1703
- Fierer N., Schimel J.P., Holden P.A. 2003. Influence of drying–rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology*, 45, 1: 63–71
- Fischer D., Uksa M., Tischler W., Kautz T., Köpke U., Schloter M. 2013. Abundance of ammonia oxidizing microbes and denitrifiers in different soil horizons of an agricultural soil in relation to the cultivated crops. *Biology and Fertility of Soils*, 49:1243–1246
- Francis C.A., Roberts K.J.J., Beman M., Santoro A.E., Oakley B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 14683–14688
- Franklin R.B., Mills A.L. 2009. Importance of spatially structured environmental heterogeneity in controlling microbial community composition at small spatial scales in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1833-1840
- Franzluebbers A.J., Stuedemann J.A. 2008. Soil physical responses to cattle grazing cover crops under conventional and no tillage in the Southern Piedmont USA. *Soil and Tillage Research*, 100: 141–153

- Gajri P.R., Arora V.K., Prihar S.S. 2002. Tillage for sustainable cropping. Food Products Press, New York: 155 str.
- Galand P.E., Casamayo E.E., Kirchman D.L., Lovejoy C. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. PANS, 106: 22427-22432
- Gleeson D.B., Müller C., Banerjee S., Ma W., Siciliano S.D., Murphy D.V. 2010. Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. Soil Biology and Biochemistry, 42: 1888-1891
- Glockner A.B., Jungst A., Zumft W.G. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS) of *Pseudomonas stutzeri*. Archives of Microbiology, 160: 18–26
- Gomez-Rey M.X., Couto-Vazquez A., Gonzalez-Prieto S.J., 2012. Nitrogen transformation rates and nutrient availability under conventional plough and conservation tillage. Soil and Tillage Research, 124: 144-152
- Gordon H., Haygarth P.M., Bardgett R.D. 2008. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. Soil Biology and Biochemistry, 40, 2: 302–311
- Grayston S.J., Prescott C.E. 2005. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. Soil Biology and Biochemistry, 37: 1157-1167
- Grčman H., Zupan M. 2010. Praktična pedologija. Ljubljana, Center za pedologijo in varstvo okolja, Biotehniška fakulteta: 52 str.
- Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. Applied and Environmental Microbiology, 64: 960–969
- Gschwendtner S., Tejedor J., Bimueller C., Dannenmann M., Knabner I.K., Schloter M. 2014. Climate change induces shifts in abundance and activity pattern of bacteria and archaea catalyzing major transformation steps in nitrogen turnover in a soil from a Mid-European beech forest. PLoS ONE, 9, 12: e116614, doi: 10.1371/journal.pone.0114278: 20 str.
- Hallin S., Jones C.M., Schloter M., Philippot L. 2009. Relationship between Ncycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. The ISME Journal, 3: 597-605
- Hamer U., Unger M., Makeschin F. 2007. Impact of air-drying and rewetting on PLFA profiles of soil microbial communities. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 170, 2: 259–264
- Hargreave S.K., Roberto A.A., Hofmockel K.S. 2013. Reaction and sample specific inhibition affect standardization of qPCR assays of soil bacterial communities. Soil Biology and Biochemistry, 59: 89-97
- Harris J. 2009. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? Science, 325: 573-574

- Hartmann M., Fließbach A., Oberholzer H.R., Widmer F. 2006. Ranking the magnitude of crop and farming system effects on soil microbial biomass and genetic structure of bacterial communities. *FEMS Microbial Ecology*, 57:378-388
- Hartmann A.A., Barnard R.L., Marhan S., Niklaus P.A. 2013. Effects of drought and N-fertilization on N cycling in two grassland soils. *Oecologia*, 171: 705–717
- Hartel P.G. 2005. The soil habitat. V: Principles and applications of soil microbiology. Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., Zuberer D.A. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. Pearson Prentice Hall: 26-53
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60: 579-598
- Hayden H.L., Drake J., Imhof M., Oxley A.P.A., Nong S., Mele P.M. 2010. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. *Soil Biology Biochemistry*, 42: 1774-1783
- He J.Z., Shen J.P., Zhang L.M., Zhu Y.G., Zheng Y.M., Xu M.G., Di H. 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 9: 2364–2374
- van der Heijden M.G.A., Bardgett R.D., van Straalen N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11: 296–310
- Helgason B.L., Walley F.L., Germida J.J. 2009. Fungal and bacterial abundance in long-term no-till and intensive-till soils of the Northern Great Plains. *Soil Science Society of America Journal*, 73: 120-127
- Helgason B.L., Walley F.L., Germida J.J. 2010. No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates. *Applied Soil Ecology*, 46: 390–397
- Henry, S., Baudouin E., Lopez-Gutierrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 327-335
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5181-5189
- Hernanz J.L., Lopez R., Navarrete L., Sanchez-Giron V. 2002. Long-term effects of tillage systems and rotations on soil structural stability and organic carbon stratification in semiarid central Spain. *Soil and Tillage Research*, 66: 129–141
- Higgins D., Dworkin J. 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 131–148
- Hobbs P., Sayre K, Gupta R. 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363: 543–555



- Höfferle Š., Nicol G.W., Pal L., Hacin J., Prosser J.I., Mandić-Mulec I. 2010. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 302–315
- Höfferle Š., Nicol G.W., Ausec L., Mandić-Mulec I., Prosser J.I. 2012. Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. *FEMS Microbiology Ecology*, 80: 114-123
- Holland J.M. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103: 1–25
- Hu Y., Xiang D., Veresoglou S.D., Chen F., Chen Y., Hao Z., Zhang X., Chen B. 2014. Soil organic carbon and soil structure are driving microbial abundance and community composition across the arid and semi-arid grasslands in northern China. *Biology and Fertility of Soils*, 77: 51-57
- ISO 10390. Soil quality - determination of pH. 2005: 5 str.
- ISO 10694. Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). 1995: 8 str.
- ISO 11272. Soil quality - determination of dry bulk density. Modify after Janytzki, 1986. 1993: 10 str.
- ISO 11274. Soil quality - determination of the water retention characteristic, laboratory methods. 1998: 20 str.
- ISO 11277. Determination of particle size distribution in mineral soil material-method by sieving and sedimentation. 2009. 34 str.
- ISO 11464. Soil quality - pretreatment of samples for physico-chemical analysis. 2006. 11 str.
- ISO 11465. Soil quality - determination of dry matter and water content on a mass basis - gravimetric method. 1993. 3 str.
- ISO 13878. Soil quality - Determination of total nitrogen content after dry combustion (incineration at 900 C in the CN analyser and defining with the tcd detector). 1995: 5 str.
- Janssen P.H. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes: Minireviews. *Applied and environmental microbiology*, 72: 1719-1728
- Jia Z., Conrad R. 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11: 1658–1671
- Johnson D., Booth R.E., Whiteley A.S., Bailey M.J., Read D.J., Grime J.P., Leake J.R. 2003. Plant community composition affects the biomass, activity and diversity of microorganisms in limestone grassland soil. *European Journal of Soil Science*, 54: 671-678
- Jones C.A., Basch G., Baylis A.D., Bazzoni D., Bigs J., Bradbury R.B., Chaney K., Deeks L.K., Field R., Gomez J.A., Jones R.J.A., Jordan V., Lane M.C.G., Leake A., Livermore M., Owens P.N., Ritz K., Sturny W.G., Thomas F. 2006. Conservation agriculture in

- Europe: an approach to sustainable crop production by protecting soil and water? Bracknell, UK, Jealott's Hill: 110 str.
- Jones C.M., Stres B., Rosenquist M., Hallin S. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1955–1966
- Jones C.M., Graf D.R.H., Bru D., Philippot L., Hallin S. 2013. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7: 417–426
- Kasper M., Buchan G.D., Mentler A., Blum W.E.H. 2009. Influence of soil tillage systems on aggregate stability and the distribution of C and N in different aggregate fractions. *Soil and Tillage Research*, 105: 192–199
- Kassam A.H., Friedrich T., Shaxson F., Pretty J. 2009. The spread of conservation agriculture: justification, sustainability and uptake. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 7, 4: 292–320
- Kemnitz D., Kolb S., Conrad R. 2007. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 442–448
- Kemper W.D., Rosenau R.C. 1986. Aggregate stability and size distribution. V: Methods of soil analysis, part 1. Physical and mineralogical methods. Klute A. (ed.). 2<sup>nd</sup> ed. Madison, WI Soil Science Society America: 425–442
- Kirchman D.L., Cottrell M.T., Lovejoy C. 2010. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology*, 12: 1132–1143
- Kirk L.J., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169–188
- Kolb S., Knief C., Stubner S., Conrad R. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2423–2429
- Lahmar R. 2010. Adoption of conservation agriculture in Europe. Lessons of the KASSA project. *Land Use Policy*, 27: 4–10
- Lal R. 1997. Residue management, conservation tillage and soil restoration for mitigating greenhouse effect by CO<sub>2</sub> enrichment. *Soil and Tillage Research*, 43: 81–107
- Lane D.J. 1991. 16/23S rRNA sequencing. V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.). Chichester, United Kingdom: 115–175
- Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2407–2415
- Leckie S.E., Prescott C.E., Grayston S.J., Neufeld J.D., Mohn W.W. 2004. Characterization of humus microbial communities in adjacent forest types that differ in nitrogen availability. *Microbial Ecology*, 48: 29–40

- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature Letters*, 442: 806-809
- Lejon D.P.H., Chaussod R., Ranger J., Ranjard L. 2005. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microbial Ecology*, 50: 614–625
- Leštan D. 2001. *Organska snov tal*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 58 str.
- Levstik S. 2010. *Talne lastnosti kot osnova za napovedovanje volumske gostote tal*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 31 str.
- Li Y., Liu Y.H., Wang Y.L., Niu L., Xu X., Tian Y.Q. 2014. Interactive effects of soil temperature and moisture on soil N mineralization in a *Stipa krylovii* grassland in Inner Mongolia, China. *Journal of Arid Land*, 6: 571–580
- Li S., Jiang X., Wang X., Wright A.L. 2015. Tillage effects on soil nitrification and the dynamic changes in nitrifying microorganisms in a subtropical rice-based ecosystem: A long-term field study. *Soil and Tillage Research*, 150: 132–138
- Linn D. M., Doran J.W. 1984. Effect of water filled pore space on CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O production in tilled and nontilled soils. *Soil Science Society of America Journal*, 48: 1267-1272
- Liu W., Marsh T., Cheng H., Forney L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516-4522
- Liu K.L., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Eichorst S.A., Xie G. 2012. Accurate, Rapid Taxonomic Classification of Fungal Large-Subunit rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5: 1523–1533
- Lombard N., Prestat E., van Elsas J.D., Simonet P. 2011. Soilspecific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, 78: 31–49
- Martinez E., Fuentes J.P., Silva P., Valle S., Acevedo E. 2008. Soil physical properties and wheat root growth as affected by no-tillage and conventional tillage systems in a Mediterranean environment of Chile. *Soil and Tillage Research*, 99: 232–244
- Marstorp H., Guan X., Gong P. 2000. Relationship between dsDNA, chloroformlabile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 879–882
- McVay K.A., Budde J.A., Fabrizzi K., Mikha M.M., Rice C.W., Schlegel A.J., Peterson D.E., Sweeney D.W., Thompson C. 2006. Management effects on soil physical properties in long-term tillage studies in Kansas. *Soil Science Society of America Journal*, 70: 434–438
- Melero S., Pérez-de-Mora A., Murillo J.M., Buegger F., Kleinedam K., Kublik S., Vanderlinden K., Moreno F., Schloter M. 2011. Denitrification in a vertisol under long-term tillage and no-tillage management in dryland agricultural systems: Key genes and potential rates. *Applied Soil Ecology*, 47: 221–225

- Mihelič R., Pačnik T., Lobnik F. 1999. Ekspertiza o možnostih uveljavitve sonaravnih načinov obdelave tal v Sloveniji: faza I. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str.
- Mihelič R., Lobnik F., Pačnik T., Velikonja Bolta Š. 2000a. Ekspertiza o možnostih uveljavitve sonaravnih načinov obdelave tal v Sloveniji: faza II. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 32 str.
- Mihelič R., Pačnik T., Lobnik F. 2000b. Vpliv sonaravne obdelave na nekatere pokazatelje kakovosti tal. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2000: zbornik simpozija. Tajnšek A., Šantavec I (eds.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 269-272
- Minoshima H., Jackson L.E., Cavagnaro T.R., Sánchez-Moreno S., Ferris H., Temple S.R., Goyal S., Mitchell J.P. 2007. Soil food webs and carbon dynamics in response to conservation tillage in California. *Soil Biology and Biochemistry*, 71: 952–963
- Mishra U., Ussiri D.A.N., Lal R. 2010. Tillage effects on soil organic carbon storage and dynamics in Corn Belt of Ohio USA. *Soil and Tillage Research*, 107: 88–96
- Morris N.L., Miller P.C.H., Orson J.H., Froud-Williams R.J. 2010. The adoption of non-inversion tillage systems in the United Kingdom and the agronomic impact on soil, crops and the environment - A review. *Soil and Tillage Research*, 108: 1-15
- Mrhar M. 2002. Tlom prijazna obdelava. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 41-115
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700
- Nazih N., Finlay-Moore O., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. 2001. Whole soil fatty acid methyl ester (FAME) profiles of early soybean rhizosphere as affected by temperature and matric water potential. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 4–5: 693–696
- Needelman B.A., Wander M.M., Bollero G.A., Boast C.W., Sims G.K., Bullock D.G. 1999. Interaction of tillage and soil texture: biologically active soil organic matter in Illinois. *Soil Science Society of America Journal*, 63: 1326-1334
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., Bertilsson S. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75: 14–49
- Nicol G.W., Webster G., Glover L.A., Prosser J.I. 2004. Differential response of archaeal and bacterial communities to nitrogen inputs and pH changes in upland pasture rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, 6: 861–867
- Nicol G.W., Schleper C. 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 14, 5: 207-212
- Nichols V., Verhulst N., Cox R., Govaerts B. 2015. Weed dynamics and conservation agriculture principles: A review. *Field Crops Research*, 183: 56-58
- Norton J.M., Alzerreca J.J., Suwa Y., Klotz M.G. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammoniaoxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 177: 139–149

- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S rRNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 5: 787–797
- Offre P., Prosser J.I., Nicol G.W. 2009. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 99–108
- Okano Y., Hristova K.R., Leutenegger C.M., Jackson L.E., Denison R.F., Gebreyesus B., LeBauer D., Scow K.M. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 20: 1008-1016
- Ollivier J., Kleineidam K., Reichel R., Thiele-Bruhn S., Kotzerke A., Kindler R., Wilke B.M., Schloter M. 2010. Effect of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in nitrogen transformation in the root-rhizosphere complexes of maize and clover. *Applied Environmental Microbiology*, 76: 7903-7909
- Ollivier J., Töwe S., Bannert A., Hai B., Kastl E.M., Meyer A., Su M.X., Kleineidam K., Schloter M. 2011. Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiology Ecology*, 78: 3-16
- ÖNORM L 1087. Chemical analysis of soils: Determination of plant-available phosphate and potassium by calcium-acetate-lactate. 1993. Österreichisches Normungsinstitut, Austria: 11 str.
- Ouyang Y., Li X. 2013. Recent research progress on soil microbial responses to drying–rewetting cycles. *Acta Ecologica Sinica*, 33: 1–6
- Pazinato J.M., Paulo E.N., Mendes L.W., Vazoller R.F., Tsai S.M., 2010. Molecular characterization of the archaeal community in an Amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic Archaea. *Diversity*, 2: 1026–1047
- Pereira e Silva M., Dias A.C.F., Elsas J.D., Salles J.F. 2012. Spatial and Temporal Variation of Archaeal, Bacterial and Fungal Communities in Agricultural Soils. *PLOS ONE*, 7: e51554, doi: 10.1371/journal.pone.0051554: 10 str.
- Perez-Brandán C., Arzeno J.L., Huidobro J., Grümberg B., Conforto C., Hilton S., Bending G.D., Meriles J.M., Vargas-Gi S. 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Protection*, 40: 73-82
- Pfaffl M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: A-Z of Quantitative PCR. Bustin S.A. (ed). 1<sup>st</sup> ed. International University Line, California: 87-112
- Philippot L., Hojberg O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446:1–23
- Philippot L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577: 355–376
- Philippot L., Hallin S. 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 234–239

- Philippot L., Hallin S., Schloter M. 2007. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96: 250-304
- Pietikainen J., Pettersson M., Baath E. 2005. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecology*, 52: 49–58
- Placella S.A., Firestone M.K. 2013. Transcriptional response of nitrifying communities to wetting of dry soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3294–3302
- Poly F., Monrozier L.J., Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Microbiological Research*, 152: 95–103
- Poly F., Wertz S., Brothier E., Degrange V. 2008. First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS Microbiology Ecology*, 63: 132-140
- Powlson D.S., Brookes P.C., Christensen B.T. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 159-164
- Prosser J.I., Nicol G.W. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, 10: 2931-2941
- Prosser J.I., Nicol G.W. 2012. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialization and differentiation. *Trends in Microbiology*, 20: 523–531
- R Core Team. 2013. A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org> (maj 2012)
- Rasmussen K.J. 1999. Impact of ploughless soil tillage on yield and soil quality: a Scandinavian review. *Soil Tillage Research*, 53: 3–14
- Raynaud X., Nunan N. 2014. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*, 9, 1: e87217, doi: 10.1371/journal.pone.0087217: 9 str.
- Richardson D.J., Berks B.C., Russel D.A., Spiro S., Taylor C.J. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 165–178
- Richter Jr. D.B., Callahan Jr. M.A., Powlson D.S., Smith P. 2007. Long-term soil experiments: keys to managing Earth's rapidly changing ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 71: 266-279
- Robertson G.P., Groffman P.M. 2007. Nitrogen transformation. V: *Soil Microbiology, Biochemistry, and Ecology*. Paul E.A. (ed.). New York, Springer: 341-364
- Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G., Triplett E.W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1: 283–290
- Roger-Estrade J., Anger C., Bertrand M., Richard G. 2010. Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture: Review. *Soil and Tillage Research*, 111: 33–40

- Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4704–4712
- Le Roux X., Poly F., Currey P., Commeaux C., Hai B., Nicol G.W., Prosser J.I., Schloter M., Attard E., Klumpp K. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal*, 2: 221–232
- Säle V., Aguilera P., Laczko E., Mader P., Berner A., Zihlmann U., van der Heijden M.G.A., Oehl F. 2015. Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 84: 38–52
- Santi C., Bogusz D., Franche C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*: 1-25
- Santoro A.E., Francis C.A., de Sieyes N.R., Boehm A.B. 2008. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environmental Microbiology*, 10: 1068–1079
- Schimel J., Balser T.C., Wallenstein M. 2007. Microbial stress response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88: 1386-1394
- Schleper C., Jurgens G., Jonuscheit M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 479–488
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Consortium F.B. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109: 6241-6246
- Schulz S., Brankatschk R., Dumig A., Kogel-Knabner I., Schloter M., Zeyer J. 2013. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences*, 10: 3983–3996
- Schütte U.M.E., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Pierson J.D., Forney L.J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S Rna genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 365–380
- Shei Y., Lalande R., Hamel C., Ziadi N., Gagnon B., Hu Z. 2013. Seasonal variation of microbial biomass, activity, and community structure in soil under different tillage and phosphorus management practices. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 803–818
- Sheik C.S., Beasley W.H., Elshahed M.S., Zhou X., Luo Y., Krumholz L.R. 2011. Effect of warming and drought on grassland microbial communities. *The ISME Journal*, 5: 1692–1700
- Sieber M.W., Recknagel P., Glaser F., Witte O.W., Bauer M., Claus R.A., Frahm C. 2010. Substantial performance discrepancies among commercially available kits for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction: a systematic comparative investigator-driven approach. *Analytical Biochemistry*, 401: 1-9
- Silva A.P., Babujia L.C., Matsumoto L.S., Guimarães M.F., Hungria M. 2013. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an Oxisol of Southern Brazil. *The Open Agriculture Journal*, 7: 40-47

- Simon H.M., Dodsworth J.A., Goodman R.M. 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology*, 2: 495–505
- Six J., Feller C., Denef K., Ogle S.M., de Moraes Sa J.C., Albrecht A. 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - effects of no-tillage. *Agronomie*, 22: 755–775
- Six J., Bossuyt H., Degryze S., Denef K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79:7-31
- Smith C.J., Osborn A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 6-20
- Soane B.D., Ball B.C. 1998. Review of management and conduct of long-term tillage studies with special reference to a 25-yr experiment on barley in Scotland. *Soil and Tillage Research*, 45: 17–37
- Soane B.D., Ball B.C., Arvidsson J., Basch G., Moreno E., Roger-Estrade J. 2012. No-till in northern, western and south-western Europe: A review of problems and opportunities for crop production and the environment. *Soil and Tillage Research*, 118: 66-87
- Soil Survey laboratory methods manual. Soil survey investigations report no. 42, version 4.0. 2004. Burt R (ed). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service: 1003 str.
- Souza R.C., Cantão M.E., Ribeiro Vasconcelos A.T., Nogueira M.A., Hungria M. 2013. Soilmetagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*, 72: 49–61
- Spedding T.A., Hamel C., Mehuys G.R., Madramootoo C.A. 2004. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 499–512
- Stahl D.A., Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). New York, John Wiley and Sons Ltd: 205-248
- Stahl D.A., de la Torre J.R. 2012. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66: 83–101
- Stoica E., Herndl G.J. 2007. Contribution of Crenarchaeota and Euryarchaeota to the prokaryotic plankton in the coastal northwestern Black Sea. *Journal of Plankton Research*, 29: 699–706
- Stopnišek N., Gubry-Rangin C., Höfferle Š., Nicol G.W., Mandić-Mulec I., Prosser J.I. 2010. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Applied Environmental Microbiology*, 76: 7626–7634
- Sullivan P. (2004) Sustainable Soil Management: Soil Systems Guide. ATTRA National Sustainable Agriculture Information Service.  
[http://soilslab.cfr.washington.edu/Watershed\\_Stewardship/Sustainable\\_soil.PDF](http://soilslab.cfr.washington.edu/Watershed_Stewardship/Sustainable_soil.PDF).  
(18.5.2012)



- Sun H.Y., Wang C.X., Wang X.D., Rees R.M. 2013. Changes in soil organic carbon and its chemical fractions under different tillage practices on loess soils of the Guanzhong Plain in north-west China. *Soil Use and Management*, 29: 344–353
- Sušnik A., Valher A. 2013. Od mokre pomladi do sušnega poletja 2013 (From Wet Spring to Severe Summer Drought of 2013). *Ujma*, 28: 75-84
- Tabaglio V., Gavazzi C., Menta C. 2009. Physico-chemical indicators and microarthropod communities as influenced by no-till, conventional tillage and nitrogen fertilisation after four years of continuous maize. *Soil and Tillage Research*, 105: 135–142
- Tedersoo L., Bahram M., Pöhlme S., in sod. 2012. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346. <http://www.sciencemag.org/content/346/6213/1256688>
- Teske A., Alm E., Regan J.M., Toze S., Rittmann B.E., Stahl D.A. 1994. Evolutionary relationships among ammonia and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176: 6623–6630
- Thion C., Prosser J.I. 2014. Differential response of nonadapted ammonia-oxidising archaea and bacteria to drying–rewetting stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 90,2: 380-389
- Throbäck I.N., Enwall K., Jarvis A., Hallin S. 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 401–417
- Timonen S., Bomberg M. 2009. Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*, 8: 505–518
- Tourna M., Freitag T. E., Nicol G. W., Prosser J. I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10: 1357–1364
- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk P.H., Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7: 1985-1995
- Turk A., Mihelič R. 2013. Wheat straw decomposition, N-mineralization and microbial biomass after 5 years of conservation tillage in Gleysol field. *Acta agriculturae Slovenica*, 101: 69-75
- Uhlirova E., Elhottova D., Triska J., Šantrůckova H. 2005. Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia Microbiologica*, 50, 2: 161–166
- Valboa G., Lagomarsino A., Brandi G., Agnelli A.E., Simoncini S., Papini R., Vignozzi N., Pellegrini S. 2015. Long-term variations in soil organic matter under different tillage intensities. *Soil and Tillage Research*, 154: 126–135
- Vasileiadis S., Coppolecchia D., Puglisi E., Balloi A., Mapelli F., Hamon R.E., Daffonchio D., Trevisan T. 2012. Response of Ammonia Oxidizing Bacteria and Archaea to Acute Zinc Stress and Different Moisture Regimes in Soil. *Microbial Ecology*, 64: 1028-1037

- Voroney R.P. 2007. The soil habitat V: Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Paul E.A. (ed.). 3<sup>rd</sup> ed. Academic press: 25-49
- De Vries F.T., Manning P., Tallowin J.R.B., Mortimer S.R., Pilgrim E.S., Harrison K.A., Hobbs P.J., Quirk H., Shipley B., Cornelissen J.H.C., Kattge J., Bardgett R.D. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters*, 15: 1230-1239
- De Vries F.T., Shade A. 2013. Controls on soil microbial community stability under climate change. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1-16
- Yaduvanshi N.P.S., Sharma D.R. 2008. Tillage and organic residue manures/ chemical amendment effects on soil organic matter and yield of wheat under sodic water irrigation. *Soil and Tillage Research*, 98: 11-16
- Young P. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. V: Biological nitrogen fixation. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds.). New York, Chapman and Hall: 43–86
- Young I.M., Ritz K. 2000. Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil and Tillage Research*, 53: 201-213
- Wakelin S.A., Macdonald L.M., Rogers S.L., Gregga A.L., Bolgerd T.P., Baldock J.A. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 803-813
- Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N., Arp D.J., in sod. 2010. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 8818–8823
- Wang Y., Qian P.Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16s rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLOS ONE*, 4: e7401, doi: 10.1371/journal.pone.0007401: 9 str.
- Wang Y., Xu J., Shen J., Luo Y., Scheu S., Ke X. 2010. Tillage, residue burning and crop rotation alter soil fungal community and water-stable aggregation in arable fields. *Soil and Tillage Research*, 107: 71–79
- Wang J.J., Li X.Y., Zhu A.N., Zhang H.W., Liang W.J. 2012. Effects of tillage and residue management on soil microbial communities in North China. *Plant, Soil and Environment*, 58: 28–33
- Ward A.D., Trimble S.W. 2004. *Environmental hydrology*. Boca Ratan, CRC Press
- Wardle D.A., 1995. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. *Advances in Ecological Research*, 26: 105–185
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds). New York, Academic Press: 315–322

- Wessen E., Hallin S., Philippot L. 2010. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 1759–1765
- Wetze K., Silva G., Matczinski U., Oehl F., Fester T. 2014. Superior differentiation of arbuscularmycorrhizal fungal communities from till and no-till plots by morphological spore identification when compared to T-RFLP. *Soil Biology and Biochemistry*, 72: 88–96
- Wortmann C.S., Quincke J.A., Drijber R.A., Mamo M., Franti, T. 2008. Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till. *Agronomy Journal*, 100: 1681–1686
- Wu T., Ayres E., Li G., Bardgett R.D., Wall D.H., Garey J.R. 2009. Molecular profiling of soil animal diversity in natural ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 849–857
- Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G.J., Middelburg J.J., Schouten S., Damsté J.S.S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 12317–12322
- Zeglin L.H., Taylor A.E., Myrold D.D., Bottomley P.J. 2011. Bacterial and archaeal amoA gene distribution covaries with soil nitrification properties across a range of land uses. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 717–726
- Zhang Y., Li D., Wang H., Xiao Q., Liu X. 2006. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. *FEMS Microbiology Letters*, 260: 134–142
- Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 533–536
- Zumft W., Kroneck P. 2007. Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*, 52: 107–227
- Žigon P. 2013. Dostopnost hranil v odvisnosti od intenzitete obdelave tal. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se obema mentoricama, prof. dr. Heleni Grčman in doc. dr. Marjetki Suhadolc, za vso podporo, razumevanje, nasvete in strokovno pomoč pri delu in pisanju doktorske naloge. Posebno se zahvaljujem somentorici doc. dr. Marjetki Suhadolc za vso pomoč, debate in nasvete tako pri laboratorijski izvedbi dela, kot tudi pisanju članka in končnega izdelka, brez nje ta izdelek gotovo ne bi bil tako dober.

Članu komisije doc. dr. Roku Miheliču se zahvaljujem za koristne pripombe, ki jih je podal ob pregledu tega dela. Prav tako se zahvaljujem obema preostalima članoma komisije, prof. dr. Denisu Stajniku in prof. dr. Ines Mandič Mulec, za pregled naloge ter koristne pripombe in nasvete.

Hvala tudi doc. dr. Damjani Kastelec za vso statistično pomoč in nasvete, ki so pomembno doprinesli k vrednosti tega dela.

Hvala vsem sodelovcem Katedre za pedplogijo in varstvo okolja za vso pomoč pri izvedbi doktorskega dela, kot tudi sproščena duženja v preteklih letih.

Hvala tudi oddelku *Soil and Environmental Microbiology* inštituta INRA (Francija), predvsem dr. Laurentu Philippotu in Davidu Bruju za vso pomoč in strokovne nasvete ter druženja v času mojega bivanja v Franciji.

Zahvaljujem se tudi Katerdri za genetiko, posebno doc. dr. Nataši Štajner za vse nasvete in diskusijo pri izvedbi laboratorijskega dela.

Iskrena hvala staršem in bratu, ki so me na moji poti vedno spodbujali. Hvala za podporo, razumevanje in potrpežljivost! Hvala tudi prijateljem za podporo, spodbudne besede in potrpežljivost, posebno v zadnjem letu, ko sem bila v veliki časovni stiski.

Hvala vsem, ki ste na kakeršen koli način pripomogli k nastnku tega dela!

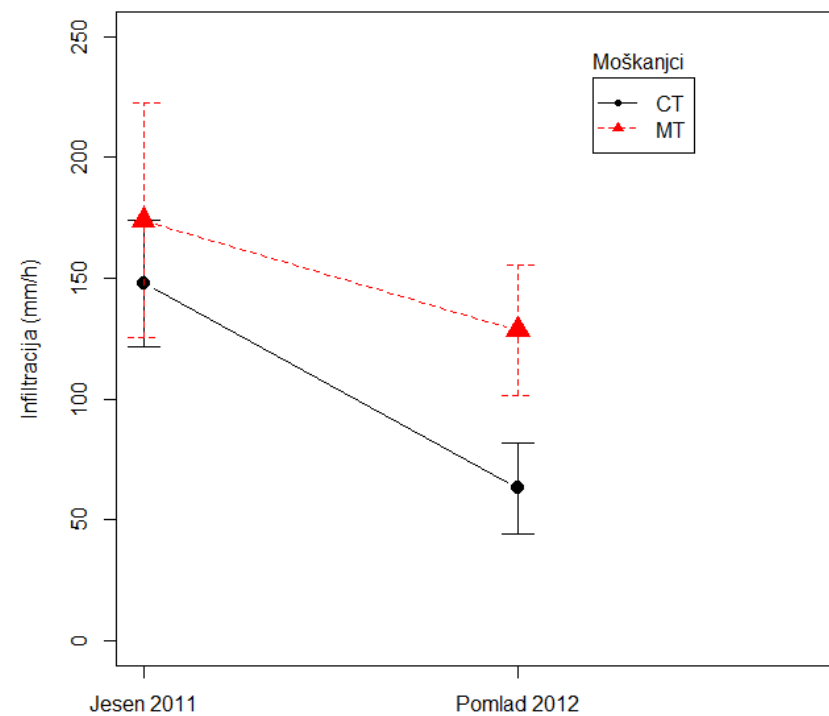
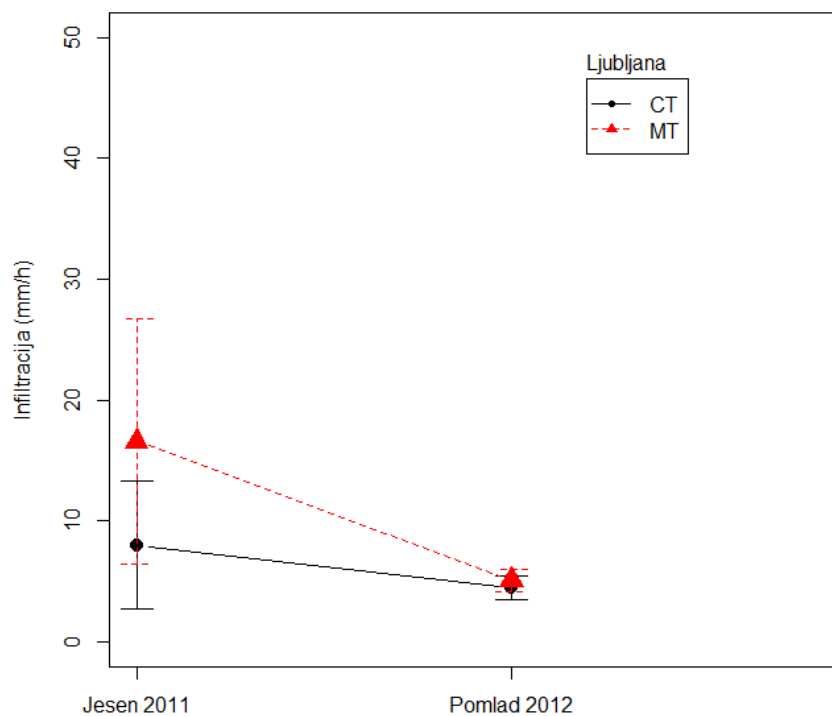
PRILOGA A

qPCR pogoji

Tarčni gen	Oligonukleotidni začetnik	Referenca	Zaporedje	Termalni pogoji	Št. ciklov
Bakterjski 16S rRNA	341F	Muyzer in sod., 1993	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C-15s/60°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	35
	534R		ATTACCGCGGCTGCTGGCA		
Cu nitrit reduktaza: <i>nirK</i>	nirK 876F	Henry in sod., 2004	ATYGGCGGVCA YGGCGA	95°C-15s/63°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	6 <sup>a</sup>
	nirK 1040R		GCCTCGATCAGRTTRTGGTT		
Citokdrom cd <sub>1</sub> nitrit reduktaza: <i>nirS</i>	nirS4QF	Throbäck in sod., 2004	G TSAACGYSAAGGARACSGG	95°C-15s/63°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	6 <sup>a</sup>
	nirS6QR		GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA		
N <sub>2</sub> O-reduktaza: <i>nosZ (kladalI)</i>	nosZ 1840F	Henry in sod., 2006	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST	95°C-15s/54°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	nosZ 2090R		CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA		
N <sub>2</sub> O-reduktaza: <i>nosZ (kladalII)</i>	1153 nosZ 8F	Jones in sod., 2013	CTIGGICCIYTKCAYAC	95°C-15s/54°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	1888 nosZ 29R		GCIGAICARAAITCBGTRC		
Bakterijska amonijak monoooksigenaza: <i>amoA</i>	AmoA1F	Rotthauwe in sod. 1997	GGGGTTTCTACTGGTGGT	95°C-15s/55°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	AmoA2R		CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
Arhejska amonijak monoooksigenaza: <i>amoA</i>	crenamoA23F	Tourna in sod., 2008	ATGGTCTGGCTWAGACG	95°C-15s/55°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	crenamoA616R		GCCATCCATCTGTATGTCCA		
Krenarhejski 16S rRNA	Crenar771F	Ochsenreiter in sod., 2003	ACGGTGAGGGATGAAAGCT	95°C-15s/55°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	Crenar975R		CGGCGTTGACTCCAATTG		
Glivni ITS	ITS 3F	White in sod., 1990	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C-15s/55°C-30s/72°C-30s /80°C-15s	40
	ITS 4R		TCC TCCGCTTATTGATATGC		

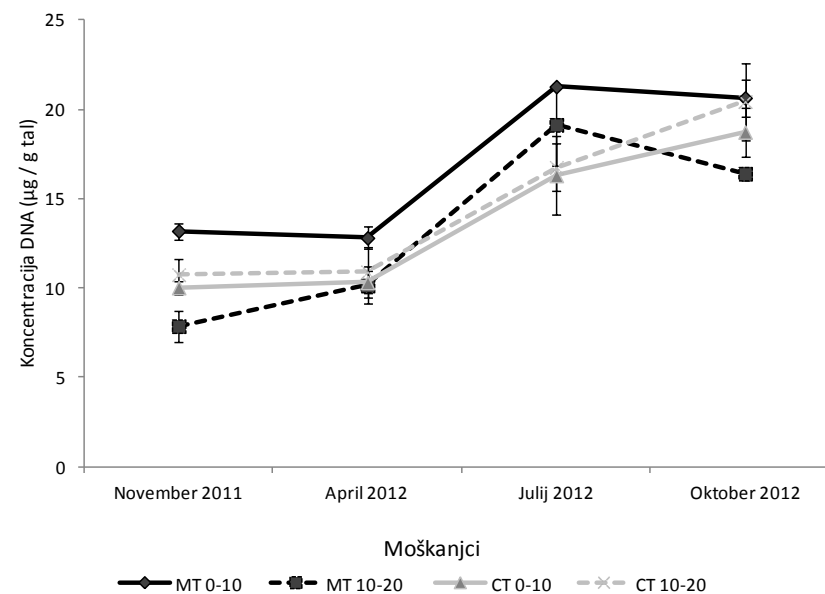
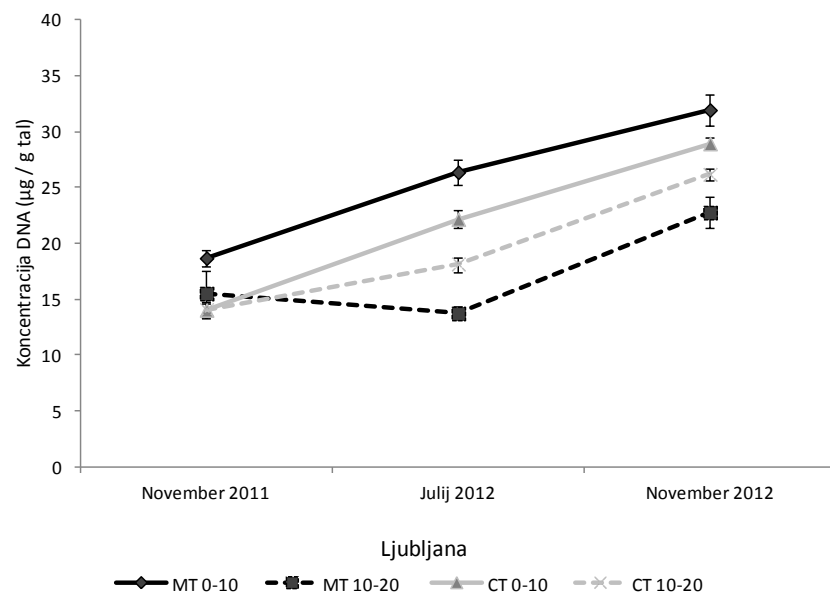
## PRILOGA B

Stopnja infiltracije v Ljubljani in Moškanjcih v jesenskem in spomladanskem času pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti s standardnimi napakami



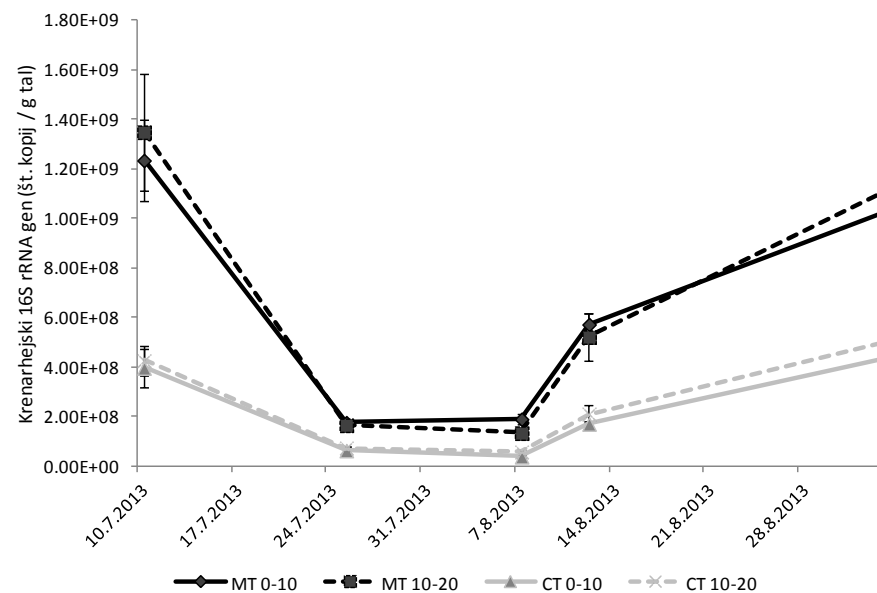
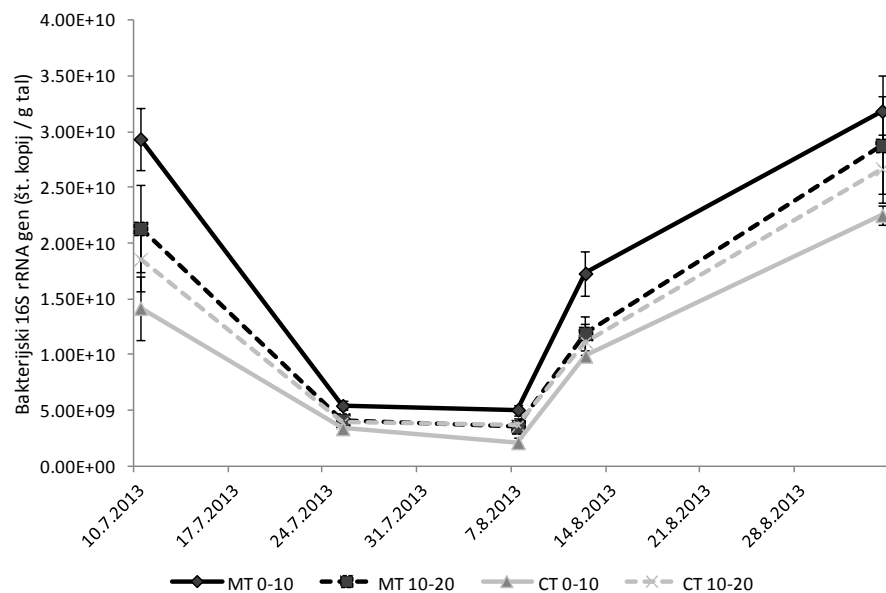
PRILOGA C

Povprečna skupna DNA koncentracija ( $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  tal) v Ljubljani in Moškanjcih na globini 0–10 cm in 10–20 cm pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) v odvisnosti od časa. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake

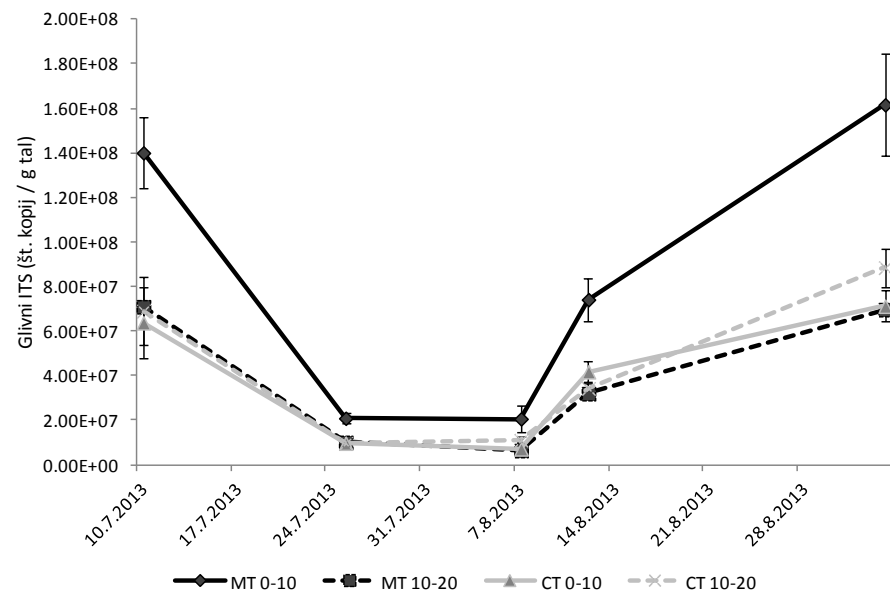


PRILOGA D

Povprečno število kopij bakterijskih in arhejskih 16S rRNA in glivnih ITS genov v Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na čas vzorčenja: 10. 7. (optimalni pogoji), 25. 7. (2 tedna brez padavin), 7. 8. (4 tedni brez padavin), 12. 8. (po prvem dežju) in 3. 9. 2013 (po 3 tednih normalnih padavin). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake







PRILOGA E

Povprečne vrednosti za razmerje med posameznimi funkcionalnimi geni N cikla glede na splošno arhejsko in bakterijsko 16S rRNA populacijo ter razmerja med posameznimi geni N cikla v Moškanjcih

Razmerje	MT 0-10 cm	MT 10-20 cm	CT 0-10 cm	CT 10-20 cm
AOA/ Krenarhejski 16S rRNA	38,16	49,32	38,04	45,37
AOB/ Bakterijski 16S rRNA	1,33	2,18	0,78	0,88
nirK/ Bakterijski 16S rRNA	3,99	4,64	3,81	4,35
nirS/ Bakterijski 16S rRNA	0,57	0,54	0,65	0,54
nosZ1/ Bakterijski 16S rRNA	3,58	4,44	3,86	4,23
nosZ2/ Bakterijski 16S rRNA	4,13	2,67	3,73	2,97
AOA/AOB	8,86	18,50	4,44	5,76
nirK/nirS	7,16	9,26	6,29	8,70
nosZ1/nosZII	1,00	1,96	1,22	1,61
nirK/nosZI	1,09	1,04	0,97	1,02
nirK/nosZII	0,96	1,86	1,07	1,54
nirS/nosZI	0,16	0,12	0,16	0,12
nirS/nosZII	0,14	0,21	0,18	0,18

## PRILOGA F

Povprečno število kopij bakterijskih in arhejskih *amoA* ter denitrifikacijskih *nirK*, *nirS*, *nosZI* in *nosZII* genov v Moškanjcih pri minimalni (MT) in konvencionalni obdelavi (CT) glede na čas vzorčenja: 10. 7. (optimalni pogoji), 25. 7. (2 tedna brez padavin), 7. 8. (4 tedni brez padavin), 12. 8. (po prvem dežju) in 3. 9. 2013 (po 3 tednih normalnih padavin). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti in standardne napake

