

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ana JURŠE

**UGOTAVLJANJE PRIMERNOSTI NAVADNEGA
TRSTA (*Phragmites australis*) IN RAZLIČNIH
KLONOV TOPOLA (*Populus spp.*) ZA ČIŠČENJE
ODPADNE VODE S POVIŠANO SLANOSTJO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ana JURŠE

UGOTAVLJANJE PRIMERNOSTI NAVADNEGA TRSTA (*Phragmites australis*) IN RAZLIČNIH KLONOV TOPOLA (*Populus spp.*) ZA ČIŠČENJE ODPADNE VODE S POVIŠANO SLANOSTJO

DOKTORSKA DISERTACIJA

THE SUITABILITY OF REED (*Phragmites australis*) AND DIFFERENT CLONES OF POPLAR (*Populus spp.*) FOR THE TREATMENT OF WASTE WATER WITH A HIGH SALINITY

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 3. 7. 2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposredni prehod na doktorski študij Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biologije. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Alenka Gaberščik in za somentorja prof. dr. Danijel Vrhovšek.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, Katedri za ekologijo in varstvo okolja. Eksperimentalni del je bil opravljen v sklopu Centralne čistilne naprave Ajdovščina in s pomočjo mednarodnega raziskovalnega projekta "CLEARH2O – Multifunctional approach to municipal and industrial wastewater treatment and water reuse scenarios".

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu 41. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 3. 7. 2013 sta bila z odločbo št. 5–669/13 VJJ sprejeta tema in naslov disertacije.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mihael J. TOMAN, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Mateja GERM, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana PLEMENITAŠ, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Ana JURŠE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 581.5:582.681.81(043.3)=163.6
KG	rastlinska čistilna naprava/ <i>Phragmites australis</i> / kloni topola/ povišana slanost odpadne vode/BPK ₅ /KPK
AV	JURŠE, Ana, univ. dipl. inž. gozd.
SA	GABERŠČIK, Alenka (mentor)/VRHOVŠEK, Danijel (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologije
LI	2015
IN	UGOTAVLJANJE PRIMERNOSTI NAVADNEGA TRSTA (<i>Phragmites australis</i>) IN RAZLIČNIH KLONOV TOPOLA (<i>Populus</i> spp.) ZA ČIŠČENJE ODPADNE VODE S POVIŠANO SLANOSTJO
TD	Doktorska disertacija
OP	XIII, 104 str., 5 pregl., 32 sl., 3 pril., 161 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AL	Poskus je bil sestavljen iz dveh eksperimentalnih vertikalnih rastlinskih čistilnih naprav (V-RČN) in treh eksperimentalnih filtrirnih gred (V-FILTER). Do avgusta 2011 smo postopno dodajali sol (NaCl) od 1,4 do 11 mg/l v V-FILTER ter v V-RČN enotah od 4,32 do 30 mg/L NaCl. Rezultati raziskave so pokazali, da je bila učinkovitost zmanjševanja v obeh sistemih za KPK v povprečju nad 40 % ter za BPK ₅ nad 80 %. Navadni trst iz neslanega okolja je bolje uspeval v pogojih na poviše slanosti, kot trst iz slanega okolja. Koncentracije Na ⁻ in Cl ⁻ ionov so bile v obeh sistemih na iztokih višje kot na dotokih. Pri topolih je prišlo do zmanjšanja rasti v višino pri koncentraciji soli 6,2 g/l, pri navadnem trstu pa pri koncentraciji 12,88 g/l. Vrednosti parametrov Fv/Fm in Yield v obeh sistemih so bile v povprečju v vseh enotah (razen v kontrolni) pod vrednostjo 0.83.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC UDC 581.5:582.681.81(043.3)=163.6

CX Constructed wetland/*Phragmites australis*/populus clones/increased wastewater salinity/BOD₅/COD

AU JURŠE, Ana

AA GABERŠČIK, Alenka (supervisor)/VRHOVŠEK, Danijel (co–advisor)

PP SI–1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biology

PY 2015

TI THE SUITABILITY OF REED (*Phragmites australis*) AND DIFFERENT CLONES OF POPLAR (*Populus* spp.) FOR THE TREATMENT OF WASTE WATER WITH A HIGH SALINITY

DT Doctoral dissertation

NO XIII, 104 p., 5 tab., 32 fig., 3 ann., 161 ref.

LA SI

AL sl/en

AB The model was composed of two experimental vertical constructed wetlands (V–RČN) planted with common reed (*Phragmites australis*) and three experimental filter units (V–FILTER) planted with four different clones of poplar. The experimental units were filled with diluted wastewater from municipal wastewater treatment plant (from the primary settling tank) which was gradually loaded with salt. As a control model, two units were used, first planted with reeds and the other planted with poplars, to which salt was not added. The results have shown that the removal efficiency of both the system for COD on average was above 40 % and BOD₅ of 80 %. The concentrations of Na and Cl ions were higher at outlets than the in the inlets for both systems. The values of the parameter Fv/Fm and Yield in both systems were, on average, below 0.83 in all units (except control), indicating that the plants were exposed to stress. The total mass of aboveground and belowground dry biomass was significantly higher in control units for both systems, in comparison to the experimental units.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	XII
Kazalo okrajšav	XIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 SLANOST ODPADNIH VOD.....	5
2.2 VPLIV SLANOSTI NA DELOVANJE RASTLIN	8
2.3 FITOREMEDIACIJA V OKOLJU POVIŠANE SLANOSTI	9
2.4 RASTLINSKE ČISTILNE NAPRAVE	11
2.5 NAVADNI TRST (<i>PHRAGMITES AUSTRALIS</i>).....	13
2.6 KLONI TOPOLA (<i>POPULUS SPP.</i>).....	15
2.7 PEŠČENI VEGETACIJSKI FILTRI	16
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 POSTAVITEV POSKUSA	19
3.1.1 Mesto in sestava poskusa	19
3.1.2 Rastlinski material v poskusu.....	25
3.1.3 Opis klonov topola	27
3.2 ANALIZE RASTLIN IN VODE.....	31
3.2.1 Vzorčenje vode	31
3.2.2 Vzorčenje rastlin in substrata	34
3.2.3 Mikrobiološke analize	34
3.3 METEOROLOŠKI PODATKI	36
3.4 KOLIČINE DOTOKA VODE V V–RČN IN V–FILTER	39
3.5 ANALIZE OB KONCU POSKUSA	41
3.6 STATISTIČNE ANALIZE.....	43
4 REZULTATI.....	44
4.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE DOTOČNE TER IZTOČNE VODE	44
4.1.1 Kakovost vode v sistemu V–RČN	44
4.1.2 Kakovost vode v sistemu V–FILTER	46
4.4 ODZIV NAVADNEGA TRSTA	48
4.4.1 Morfološke značilnosti in ekofiziološki odziv.....	48

4.4.1.1	Višina poganjka, premer stebela in število poganjkov	48
4.4.1.2	Fluorescenca klorofila a	53
4.4.1.3	Suha masa	55
4.5	ODZIV KLONOV TOPOLA	56
4.5.1	Morfološke značilnosti in ekofiziološki odziv	56
4.5.1.1	Višina poganjka, premer stebela in število poganjkov	56
4.5.1.2	Fluorescenca klorofila a	61
4.5.1.3	Suha masa	65
4.6	MIKROBIOLOŠKE ANALIZE	67
5	RAZPRAVA	71
5.1	KAKOVOST VODE NA DOTOKIH IN IZTOKIH SISTEMA V–RČN IN V–FILTER	71
5.2	ODZIV NAVADNEGA TRSTA IN KLONOV TOPOLA NA POVIŠANO SLANOST	73
5.3	MIKROBIOLOŠKE ANALIZE	77
6	ZAKLJUČKI	79
7	POVZETEK (SUMMARY)	81
7.1	POVZETEK	81
7.2	SUMMARY	84
8	VIRI	86
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Opis klonov topola.....	28
Pregl. 2: Uporabljena metoda za določen parameter.....	34
Pregl. 3: Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu, zasajenim z navadnim trstom (V– RČN) v mS cm^{-1} , $^{\circ}\text{C}$, mg l^{-1} . Dotok eksperimentalnih enot D1, iztok eksperimentalne enote I1 in I2, dotok kontrolne enote D3, iztok kontrolne enote I4. Podatki so aritmetične sredine \pm SD ($n = 3\text{--}15$). Različne črke v vrsti predstavljajo statistično značilno razliko parametra med obravnavami pri 5 % verjetnosti ($a = \text{D1}$, $b = \text{I1}$, $c = \text{I2}$, $d = \text{D3}$, $e = \text{I4}$).....	45
Pregl. 4: Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu zasajenim s kloni topolov (V– FILTER) v mS cm^{-1} , $^{\circ}\text{C}$, mg l^{-1} . Dotok eksperimentalne enote D2, iztok eksperimentalne enote I3, dotok kontrolne enote D4, iztok kontrolne enote I5. Podatki so aritmetične sredine \pm SD ($n = 15$ ali 7 ali 3). Različne črke v vrsti predstavljajo statistično značilno razliko parametra med obravnavami pri 5 % verjetnosti ($a = \text{D2}$, $b = \text{I3}$, $c = \text{I2}$, $d = \text{D4}$)	47
Pregl. 5: Povprečne višine glavnega poganjka in standardna napaka, premer stebila in število poganjkov, za vse klone topolov v kontrolnih (V–FILTER–KONTR) in eksperimentalnih enotah skupaj (V–FILTER–EKSP). Različna črka v vrsti pomeni statistično značilne razlike med kloni pri 5 % verjetnosti ($a = \text{Lux}$, $b = \text{Guardi}$, $c = \text{I–214}$, $d = \text{Vilafranca}$).....	61

KAZALO SLIK

Sl. 1: Centralna čistilna naprava Ajdovščina (www.ksda.si)	19
Sl. 2: Načrt postavitve pilotnega modela; D1– dotok v V– RČN, D2– dotok v V–FILTER, D3– dotok v V–RČN–KONTR, D4 – dotok v V–FILTER–KONTR, I1– iztok iz V–RČN–1, I2– iztok iz V–RČN–2. I3– iztok iz V–FILTER–2, I4– iztok iz V–RČN–KONTR, I5– iztok iz V–FILTER–KONTR (Jurše A.).....	20
Sl. 3: Prečni profil pilotnega modela (Jurše A.)	21
Sl. 4: Načrt sistema V–RČN (Jurše A.).....	22
Sl. 5: Načrt sistema V–FILTER (Jurše A.)	23
Sl. 6: Načrt zasaditve (Jurše A.)	24
Sl. 7: Potaknjenci topolov, kloni Vila Franca, Lux, I–214 in Guardi (Jurše A.).....	26
Sl. 8: Rizomi navadnega trsta s solin Strunjan (levo) in iz rastlinske čistilne naprave v Ajdovščini (desno) (Jurše A.)	27
Sl. 9: Oprema in potek vzorčenja v času poskusa na CCN Ajdovščina (Jurše A.)	33
Sl. 10: Povprečne dnevne temperature zraka, izmerjene s pomočjo meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina.....	37
Sl. 11: Vsota dnevnih padavin (moder graf) in povprečna dnevna vlaga (rdeči graf), izmerjena s pomočjo avtomatske meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina	38
Sl. 12: Povprečna dnevna hitrost vetra, izmerjena s pomočjo avtomatske meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina.....	38
Sl. 13: Poraba in količina vode.....	40
Sl. 14: Prikaz nalog ob koncu poskusa (Jurše A.)	42
Sl. 15: Višine najvišjega poganjka (mm) navadnega trsta v času vzorčenj: 6. 5., 6. 7. In 30.8., v kontrolni enoti (V–RČN–KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trsti iz neslanega okolja (V–RČN–1) in v eksperimentalni enoti navadni trsti iz slanega okolja (V–RČN–2). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.).....	49
Sl. 16: Premer najvišjega poganjka (mm) navadnega trsta v času vzorčenj: 6. 5., 6. 7. in 30. 8., v kontrolni enoti (V–RČN–KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trst iz neslanega okolja (V–RČN–1) in v eksperimentalni enoti navadni trst iz slanega okolja (V–RČN–2). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.).....	51
Sl. 17: Povprečno število poganjkov (relativno število) navadnega trsta v kontrolni enoti (V–RČN–KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trst iz neslanega okolja (V–RČN–1) in v eksperimentalni enoti navadni trst iz slanega okolja (V–RČN–2). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, izstopajoče vrednosti, n = 85. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike	

- v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti ($a = V-RČN-KONTR$, $b = V-RČN-1$, $c = V-RČN-2$)..... 52
- Sl. 18: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri navadnem trstu v kontrolni enoti ($V-RČN-KONTR$), v eksperimentalni enoti $V-RČN-1$ (navadni trst iz neslanega okolja) in $V-RČN-2$ (navadni trst iz slanega okolja). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, $n = 15$ 54
- Sl. 19: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter Yield) pri navadnem trstu v kontrolni enoti ($V-RČN-KONTR$), v eksperimentalni enoti $V-RČN-1$ (navadni trst iz neslanega okolja) in $V-RČN-2$ (navadni trst iz slanega okolja). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, $n = 15$ 55
- Sl. 20: Vsota suhe biomase nadzemnih in podzemnih delov navadnega trsta ob koncu eksperimenta v kontrolni enoti ($V-RČN-KONTR$) in v eksperimentalnih enotah ($V-RČN 1$, $V-RČN 2$), $n = 3$ 56
- Sl. 21: Višine glavnega poganjka (mm) klonov topola v času vzorčenja: 28. 4., 1. 7. in 30.8., v kontrolni enoti ($V-FILTER-KONTR$) in v eksperimentalnih enotah ($V-FILTER-1$, $V-FILTER-2$, $V-FILTER-3$). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; $n = 16$ ($a = 28. 4.$, $b = 1. 7.$, $c = 30. 8.$)..... 58
- Sl. 22: Premer glavnega poganjka (mm) klonov topola v času vzorčenja: 28. 4., 1. 7. in 30.8., v kontrolni enoti ($V-FILTER-KONTR$) in v eksperimentalnih enotah ($V-FILTER-1$, $V-FILTER-2$, $V-FILTER-3$). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; $n = 16$ ($a = 28. 4.$, $b = 1. 7.$, $c = 20. 8.$)..... 59
- Sl. 23: Povprečne vrednosti števila poganjkov topolov za kontrolno enoto ($V-FILTER-KONTR$) in vse eksperimentalne enote ($V-FILTER-1$, $V-FILTER-2$, $V-FILTER-3$). Grablje predstavljajo standardno napako, različne črke pa statistične razlike med obravnavami pri 5 % verjetnosti; $n = 288$ (višina, premer) ali 272 (število poganjkov) ($a = V-FILTER-KONTR$, $b = V-FILTER-1$, $c = V-FILTER-2$, $d = V-FILTER-3$) 60
- Sl. 24: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri vseh topolih v kontrolni enoti ($V-FILTER-KONTR$) in v eksperimentalnih enotah skupaj $V-FILTER-EKSP$. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, $n = 80$ ($V-FILTER-KONTR$) in $n = 240$ ($V-FILTER-EKSP$). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavami pri 5 % verjetnosti ($a = V-FILTER-KONTR$, $b = V-FILTER-EKSP$) 62
- Sl. 25: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri klonih topola (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) v kontrolni enoti ($V-FILTER-KONTR$) in v eksperimentalnih enotah skupaj

- V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 20 (V-FILTER-KONTR) in n = 60 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji znotraj ene vrste klona pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP) 63
- Sl. 26: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitost fotosistema FS II (parameter Yield) pri vseh topolih v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 80 (V-FILTER-KONTR) in n = 240 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP) 64
- Sl. 27: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti sistema FS II (Yield) pri klonih topola (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 20 (V-FILTER-KONTR) in n = 60 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji znotraj ene vrste klona pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)..... 65
- Sl. 28: Vsota suhe biomase nadzemnih in podzemnih delov klonov topola ob koncu eksperimenta v kontrolni enoti (V-FILTER 1-KONTR) in v eksperimentalnih enotah (V-FILTER 1, V-FILTER 2, V-FILTER 3) skupaj za vse klone topola. Grablje predstavljajo standardno napako meritev, n = 86 (nadzemni del) in n = 54 (podzemni del). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko mase nadzemnih delov rastlin med obravnavanji pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-1, c = V-FILTER-2, d = V-FILTER-3) 66
- Sl. 29: Povprečne vrednosti suhe mase nadzemnih (levo) in podzemnih (desno) delov rastlin klonov topolov (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca). Grablje predstavljajo standardno napako, n = 12 67
- Sl. 30: Profili mikrobnih združb na DGGE gelu v rizosferi rastlin navadnega trsta (M – marker; 1, 2, 3 – navadni trst pri vtoku, po treh fazah, v rizosferi prva rastlina, druga enota; 4, 5, 6 – navadni trst ob vtoku po treh fazah, v rizosferi druga rastlina, druga enota; 7, 8, 9 in 10, 11, 12 enako kot prej, le da so tu rastline na iztoku, druga rastlina, druga enota; 13–18 enako kot prej, le da je to prva enota na vtoku in 19–24 na iztoku (IFB) 68
- Sl. 31: Profili mikrobnih združb na DGGE gelu v substratu s 3 % slanostjo (M – marker; 1,2, 3 – profil bakterijske združbe v substratu druge grede od 10 cm globine do 90 cm; 4, 5, 6 in 7, 8, 9 – drugi in tretji triplikati vzorčenja; 10 – 18 – triplikati iz prve enote; 19 in 20 – dotok in iztok v obe enoti (IFB) 69
- Sl. 32: Primerjava povezanih mikrobnih združb; primerjava trsta iz slanega okolja (strs) in navadnega trsta iz neslanega okolja (netrs) v slanem okolju (3 %) z mešanimi trsti

(K: iz slanega in neslanega okolja) in v neslanem okolju (0 %). Korenine trsta (koren), rizosfera (rizo) in substrat (pesek) odvzeti pri dotokih (DO) in iztokih (IZ) v slanem okolju in nespecifičnem neslanem kontrolnem okolju (K) (IFB)..... 70

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu, zasajenim z navadnim trstom (V–RČN) v mS cm^{-1} , $^{\circ}\text{C}$, mg l^{-1} in učinkovitost čiščenja. Dotok eksperimentalnih enot D1, iztoka eksperimentalne enote I1 in I2, dotok kontrolne enote D3, iztok kontrolne enote I4. Podatki so aritmetične sredine \pm SD ($n = 3\text{--}15$)
- Priloga B: Višina glavnega poganjka (mm) navadnega trsta in klonov topola
- Priloga C: Povprečne vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri navadnem trstu v kontrolni enoti (V–RČN–KONTR), v eksperimentalni enoti V–RČN⁻¹ (navadni trst iz neslanega okolja) in V–RČN–2 (navadni trst iz slanega okolja)

KAZALO OKRAJŠAV

ANOVA	analiza variance
CČN	centralna čistilna naprava
Fv/Fm	količnik variabilne (Fv) in maksimalne (Fm) fluorescence temotno adptiranega vzorca
BPK ₅	biološka potreba po kisiku
Yield	količnik variabilne in maksimalne (Fms) fluorescence osvetljenega vzorca
KPK	kemijska potreba po kisiku
PPFD	tok fotonov fotosintezno aktivnega spektra sevanja
RČN	rastlinska čistilna naprava
SSF	Slow Sand Filtration
SRC	Short Rotation Coppice
V– RČN	vertikalna rastlinska čistilna naprava
V– FILTER	vertikalni peščeni filter

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Težave industrijske družbe so velika poraba vode in nastajanje velikih količin odpadne vode ter zviševanje potreb po pitni vodi. Za vzdrževanje zadostne količine kakovostnih virov pitne vode in zdravega okolja sta ključna zmanjšanje porabe in ponovna uporaba prečiščene vode. Zaradi omejenosti vodnih virov so na tem področju pravila, ki jih morajo upoštevati strokovnjaki pri načrtovanju rabe vode in učinkovitem upravljanju vodnih virov. Recikliranje odpadnih voda in ponovna uporaba vode sta razvijajoči se alternativni možnosti, ki lahko zmanjšata pritisk na vodne vire. Uporaba obdelane vode je odvisna od številnih dejavnikov, kot so na primer zakonska ureditev področja in politični, tehnični, ekonomski, okoljski ter socialni vidiki (Lazarova in Bahri, 2005).

Pitne vode primanjkuje v večjem delu sveta. Ocenjujejo, da bo v prihodnjih 50 letih več kot 40 % ljudi živel na sušnih območjih, kjer bo veliko pomanjkanje vode (IWMI, 2000, cit. po Lazarova in Bahri, 2005). V današnjem času nastaja več odpadne vode kot kadarkoli prej v zgodovini planeta. Pri tem je vsak šesti zemljan brez pitne vode, približno 2,9 milijarde ljudi pa pije vodo, ki ni ustrezna (WHO/UNESCO, 2010). Zagotavljanje potreb po pitni vodi in čiščenje odpadne vode sta tako v sodobnem svetu prednostni nalogi s socialnega, tehnološkega, ekonomskega in političnega vidika. Na območjih, kjer primanjkuje vode, je postala aktualna ponovna uporaba očiščene vode, predvsem za namakanje. V strokovnih krogih velja načelo celovitega upravljanja z vodami, predvsem s stališča preudarne in trajnostne rabe vode. Oskrba z vodo in poraba vode sta postali strateškega pomena in sta odvisni od dejavnikov, kot so kakovost okolja in socialne ter ekonomske značilnosti območja.

V okolju se pogosto srečujemo z odpadno vodo s povišano slanostjo. Vir soli je lahko v mešanici komunalne odpadne vode z morskovo vodo, v industrijskih odpadnih vodah z visoko vsebnostjo soli (kot je npr. mesnopredelovalna industrija), v zimski padavinski vodi, ki odteka s soljenih cest, itd. Visoko slanost je mogoče najti tudi v izcednih vodah z odlagališč, kjer lahko električna prevodnost izcednih voda doseže vrednosti slanosti, ki

presegajo raven morske vode (Bulc, Vrhovšek, 1996, Lundmark, 2003, Zupančič Justin, 2008, Zupančič Justin, Zupančič, 2009, Bulc, 2006, Liu in sod. 2013).

Odpadno vodo danes očistimo do te mere, da ustreza normativom za iztok (Uredba o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo, Ur. l. RS, št. 47/05, 45/07, 49/09 in 64/12). Zaradi povečanih potreb po vodi se počasi povečuje tudi recikliranje vode. Komunalne odpadne vode so obremenjene z organskimi snovmi, ki so večinoma dobro razgradljive, in z manjšim deležem težje razgradljivih ter strupenih snovi, ki jih je treba odstraniti v procesu čiščenja. Poleg tega se lahko pojavljajo velike razlike v pH in količini vode ter onesnaževalih, ki so povezane s trenutno proizvodnjo. To narekuje potrebo po specifičnih čistilnih tehnikah. Komunalne odpadne vode in industrijske odpadne vode se v Sloveniji v splošnem lahko odvajajo v kanalizacijo, kadar dosegajo predpisane standarde. V primeru povišanega iznosa onesnaževal je potrebno predčiščenje pred izpustom v kanalizacijo ali pa se izbere popolno čiščenje odpadne vode, da se doseže normativ za iztok. Glede na prej omenjena dejstva o sestavi odpadne vode so rastlinske čistilne naprave z visoko pufersko kapaciteto primerna tehnologija za tovrstno obremenjene odpadne vode. V nekaterih primerih je neposredna uporaba nemogoča, zato je potrebno izboljšanje (prilagoditev) obstoječe tehnologije oz. uporaba primerne kombinacije različnih tehnoloških postopkov za doseganje višje učinkovitosti čiščenja na manjšem prostoru za specifična onesnaževala.

Pri domači uporabi in industrijskih obratih prihaja do velike porabe vode, kar predstavlja pomemben izziv za razvoj novih, okolju prijaznih tehnologij. Nekatere odpadne vode iz industrije lahko vsebujejo veliko soli. Do povišane slanosti prihaja predvsem v prehrambni industriji in industriji pijač. Sol neposredno vpliva na biološko čiščenje, saj se mikroorganizmi na raztopljene soli različno odzivajo. V primeru stalnih koncentracij slanosti, ki so značilne za industrijske odpadne vode, je možno vzpostaviti sistem čiščenja s halofilnimi oz. halotolerantnimi rastlinami in mikroorganizmi (Lefebvre in Moletta, 2006).

Z izboljšanjem tehnoloških procesov je moč doseči varčnejšo porabo vode, težje pa je z obstoječimi tehnološkimi rešitvami dosežati visoke standarde za ponovno uporabo

prečiščene vode v industrijskem procesu in kmetijstvu. Razvoj novih čistilnih sistemov tako temelji na razvoju in kombinaciji tehnologij, katerih rezultat je doseganje izjemno visokih standardov kakovosti vode. V tem kontekstu predstavlja fitoremediacija (uporaba rastlin v čistilnih procesih) učinkovit in okolju prijazen način za čiščenje obremenjenih tal in sedimentov ter odpadne vode. Z razumevanjem, kako rastline določene snovi sprejemajo ali izločajo iz okolja, prenašajo v različna tkiva, presnavljajo in nalagajo, lahko s pravnimi ukrepi njihov prispevek k čiščenju okolja še povečamo. Pri tem moramo poznati naravo onesnaževal, njihovo biološko razpoložljivost, strupenost in njihove metabolne poti. Poleg tega je sposobnost rastlin pri privzemanju in pretvorbi onesnaževal v neposredni povezavi z mikrobno floro v rizosferi (mikrobi na in v rastlinskih koreninah), zaradi česar je potrebno tudi razumevanje fizikalnih, kemijskih ter bioloških vplivov na njihovo delovanje.

V disertaciji bo preizkušen način enostavnejših fitoremediacijskih rešitev, kjer se čiščenje in ponovna uporaba vode izvajata s pomočjo rastlin ter s produkcijo biomase. Osredotočili se bomo na učinkovitost čiščenja odpadne vode z uporabo naravnih čistilnih sistemov, zasajenih z makrofiti in kloni topolov, prilagojenimi na povišano slanost v vodi. Učinkovitost čiščenja odpadne vode bomo v raziskavi spremljali tudi s pomočjo učinkovitosti zmanjševanja vrednosti organskih obremenitev (KPK, BPK₅). Primernost izbire posameznih rastlinskih vrst bomo spremljali s pomočjo meritev dosežene biomase in porabe vode v času rasti. Disertacija se osredotoča na vodo s povišano slanostjo oz. s povišano koncentracijo Na⁻ in Cl⁻ ionov, za katere menimo, da je kapaciteta njihove odstranitve z RČN majhna (majhna kapaciteta vezave na substrat, mikrobo ali rastline).

Ker s fitoremediacijo težko odstranimo soli iz odpadne vode, je cilj raziskave usmerjen v čim večjo porabo odpadne vode za razvoj nove rastlinske biomase. Eden od ciljev raziskave je tako izbira najustrežnejših rastlin, ki so prilagojene na povišano slanost. Vse do zdaj so se fitoremediacijski pristopi čiščenja odpadne vode v Sloveniji obravnavali zgolj s stališča vrednotenja učinkovitosti odstranjevanja posameznih snovi iz vode v sklopu celotnega sistema (aktivnost mikroorganizmov, vezave snovi v substrat in rastline).

1.2 HIPOTEZE

Raziskovalne hipoteze disertacije so bile naslednje:

1. Z uporabo rastlin in na njih vezane mikrobne flore iz naravnih rastišč s povišano slanostjo pričakujemo večjo učinkovitost čiščenja odpadne vode kot z uporabo rastlin iz rastišč, kjer koncentracije soli niso povišane.
2. Različni kloni topolov in navadni trst se bodo glede na rastne parametre različno odzvali na povečano koncentracijo soli.
3. Učinkovitost čiščenja bo povezana z izmerjenimi rastnimi parametri pri uporabljenih rastlinah.
4. Zaradi visoke evapotranspiracije uporabljenih rastlin in nizke zmožnosti vezave kloridov s pomočjo rastlin ter substrata, pričakujemo na iztokih povečane koncentracije soli in zmanjšanje količine vode.
5. S pulznim vertikalnim pretokom vode skozi rastlinski čistilni sistem lahko dosežemo večjo prezračenosť sistema in s tem boljšo učinkovitost zmanjševanja organskih obremenitev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SLANOST ODPADNIH VOD

Voda spada med obnovljive vire. V zadnjem času pa je vseeno opaziti povečano pomanjkanje vode, in sicer zaradi povečanih potreb ter klimatskih sprememb, ki ponekod vodijo v usihanje vodnih virov. Zaradi tega se kaže velika potreba po bolj trajnostnem upravljanju z vodnimi viri na načine, kot je zmanjševanje porabe in izgub, ter učinkovitejše čiščenje odpadne vode z možnostjo njene ponovne porabe. Na drugi strani pa se srečujemo z omejenimi finančnimi viri za investiranje v zahtevne tehnološke postopke čiščenja odpadne vode. Zaželeni so torej enostavni pristopi, z nizkimi začetnimi vložki in tudi z enostavnim ter s finančno nezahtevnim obratovanjem in vzdrževanjem (Barbosa in sod., 2014).

Eden izmed ciljev čiščenja odpadnih voda je zmanjšanje organskih obremenitev, z namenom, da se doseže neškodljiv vpliv za vodna telesa. V skladu z vodno direktivo 2000/60/EC (Water Framework Directive) je »dober ekološki status« treba doseči za vse evropske vode do leta 2015. Glede na to dejstvo je bistveno, da sistemi čiščenja odpadnih vod opravljajo svojo nalogo v čim večji meri, predvsem pri odstranjevanju organskih obremenitev in patogenih mikroorganizmov.

Odpadno vodo iz različnih panog danes uspešno čistijo do normativov za iztok. Zaradi povečanih potreb se počasi povečuje tudi recikliranje vode. Odpadne vode iz prehranske industrije so visoko obremenjene z organskimi snovmi, ki so večinoma dobro razgradljive, in z manjšim deležem težje razgradljivih ter strupenih snovi, ki jih je treba odstraniti v procesu čiščenja. Glede na trenutno proizvodnjo tega se lahko pojavljajo visoka nihanja pH, količine vode in drugih onesnaževal, kar narekuje potrebo po posebnih čistilnih tehnikah. Zelo pogosta skupna problematika teh voda so povečane koncentracije soli (Jurše in sod., 2014).

Odstranjevanje onesnaževal iz odpadnih voda s povišano slanostjo predstavlja do 5 % globalnih zahtev pri čiščenju odpadnih voda (Lefebvre in sod., 2006). Odvajanje takšne

odpadne vode v naravo močno vpliva na vodno življenje, vire pitne vode in kmetijstvo. Zakonodaja na tem področju postaja vse strožja, zato sta v današnjem času postali čiščenje in odstranjevanje organskih snovi ter soli v odpadni vodi obvezni v mnogih državah. Slane odpadne vode se običajno obravnavajo s pomočjo fizikalno–kemičnih sredstev, saj so običajno biološki načini čiščenja močno omejeni zaradi soli. Stroški uporabe fizikalno–kemičnih sredstev so po navadi visoki, medtem ko so alternativni naravni sistemi obravnave organskih snovi slane odpadne vode dandanes vse pogosto predmet raziskav po vsem svetu tudi zaradi nižjih operativnih stroškov (Lefebvre in Moletta, 2006).

Eden izmed alternativnih čistilnih sistemov so rastlinske čistilne naprave (RČN). Uporaba teh sistemov postaja vse bolj popularna v več državah (Aktros in Tsihtintzis, 2007), vendar njihova uporaba pri čiščenju slanih odpadnih voda še ni povsem raziskana. Rastlinske čistilne naprave so učinkoviti sistemi za odstranjevanje trdih in organskih snovi, hranil ter kovin, prisotnih v različnih vrstah odpadnih vod (Hammer, 1989; Kadlec in sod. 2000; Kadlec in Wallace 2009; Mainev in sod. 2009; Vymazal in sod. 1998). Muffarege in sodelavci (2011) navajajo, da je izbira primernih makrofitov pomemben del rastlinske čistilne naprave, saj morajo makrofiti preživeti potencialne strupene učinke in variabilnost kakovosti odpadne vode. Regionalno razširjene makrofitske vrste so prilagojene na lokalno klimo in edafske razmere. Kljub temu je njihovo delovanje v spremenljivih razmerah odpadnih voda, kot so slanost, pH, raztopljeni kisik (DO) in koncentracije onesnaževalcev, pogosto še neznano. Iztoki s povišanim pH in z visoko slanostjo so posledice mnogih industrijskih procesov (Muffarege in sodelavci, 2011).

Ohranjanje narave se začne pri viru onesnaženja. Obremenitve komunalnih voda lahko torej zmanjšamo tam, kjer nastajajo. Kljub temu pa določene snovi preidejo v odpadno vodo in jih je treba odstraniti. S čiščenjem odpadne vode želimo ohranjati okolje in izboljšati zdravstveno stanje prebivalcev. Komunalna odpadna voda lahko vsebuje vrsto odpadnih snovi in običajno vsebuje približno 99,9 % vode in približno 0,1 % trdnih snovi (Roš, 2001). Splošne metode čiščenja odpadnih voda delimo na intenzivne in ekstenzivne biološke metode čiščenja. Intenzivne metode temeljijo na intenziviranem procesu samoočiščenja, ki tudi sicer poteka v naravi in temelji na življenjski dejavnosti mikroorganizmov. Običajno se delijo na tri stopnje: primarna, sekundarna in terciarna

stopnja čiščenja. V praksi je v uporabi delitev, ki se omejuje na način čiščenja odpadne vode, in sicer kot fizikalno, kemijsko in biološko čiščenje. S primarno, sekundarno in terciarno stopnjo čiščenja je predvsem opredeljena stopnja očiščenosti odpadne vode oz. katere snovi in v kakšni meri se bodo iz odpadne vode odstranile (Tchobanoglous in sod., 2003). Kakršna koli metoda se na določenem mestu uporabi, mora končni produkt, to je očiščena voda, zadovoljevati osnovne okoljske standarde, ki so določeni z Uredbo o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo (Ur. l. RS, št. 47/05, 45/07, 79/09 in 64/12).

V nekaterih primerih pa največje breme predstavljajo mineralne snovi. Williams in sod. (1999) menijo, da je med onesnaževali, ki obremenjujejo podtalnico v deželah zmernege pasu, med najpomembnejšimi NaCl. Ker je NaCl dobro topen v vodi, se ob topljenju snega in dežja spira s cestišč ter vpliva na vsebnost natrijevih in kloridnih ionov v bližnjih vodnih telesih (potoki, jezera, močvirja), podtalnici, zajetjih pitne vode ter v samih tleh ob cestah. Povečana slanost vpliva tako na živali kot na rastline, prek pitne vode pa tudi na človeka. Vir slanih odpadnih voda so lahko tudi industrija (usnjarska, živilskopredelovalna industrija itd.) in procesi razsoljevanja naravno slanih voda (Lofrano in sod, 2013). Povečana vsebnost soli v odpadnih vodah lahko neugodno vpliva na aktivno blato bioloških čistilnih naprav in s tem na biološko stopnjo čiščenja (Panswad in Anan, 1999; Hamoda in Al-Attar, 1995). Obstajajo različne možnosti uporabe rastlinskih čistilnih naprav in drugih fitotehnoloških pristopov, ki zagotavljajo visoko blažilno zmogljivost pri obravnavanju vode s povečano slanostjo (Justin in sod., 2009, Zalesny in Zalesny Jr., 2009; Justin in sod, 2010). Odpadna voda, ki vsebuje veliko količino soli, nastaja tudi pri regeneraciji ionskih izmenjevalnih kolon, ki se uporabljajo za odstranjevanje nitratov iz odpadnih voda različnih industrij. Poleg soli ta voda vsebuje veliko nitratov, ki so bili prej v industrijski odpadni vodi. Za njihovo odstranjevanje so najprimernejši halofilni denitrifikatorski organizmi, ki so prilagojeni na slano okolje (Peyton in sod., 2001). Z večanjem koncentracije NaCl se v odpadni vodi (od 8 do 45 g/l) povečuje kemijska potreba po kisiku (KPK) na iztoku. Veliko raziskav je bilo narejenih v zvezi z odstranjevanjem dušika iz odpadnih voda z veliko vsebnostjo amonijevega (od 100 do 1000 mg/l NH₄-N) ali nitratnega dušika (od 500 do 36 000 mg/l NO₃-N) in z visokimi koncentracijami soli (od 3 do 12 %): Peyton in sod. (2001), Dincer in Kargi (2001), Campos in sod. (2002).

Biološki procesi čiščenja so lahko zaradi prisotnosti soli močno ovirani (Lefebvre in Moletta, 2006). Dincer in Kargi (2001) ugotavljata, da imajo koncentracije soli, višje od 3 %, očitno škodljiv vpliv na proces nitrifikacije.

2.2 VPLIV SLANOSTI NA DELOVANJE RASTLIN

Škodljivi učinki slanosti na rast rastlin so povezani z nizkim osmotskim potencialom substrata, z neravnovesjem hranil, s specifičnim vplivom ionov, s hormonalnim neravnovesjem in z indukcijo antioksidativnih encimov, lahko pa tudi kot kombinacija vseh naštetih dejavnikov (Parida in Das, 2005). Odziv rastlin na slanostni stres je odvisen od več spremenljivk: jakost slanostnega stresa (koncentracije soli in čas izpostavljenosti), genska zasnova določene vrste, razvojna stopnja rastline in okolja (Jaleel in sod., 2007). Odpornost rastlin proti slanosti ni izključno povezana s prilagoditvijo na strupenost ionov Na^+ in Cl^- , ampak tudi s prilagoditvijo na sekundarne učinke slanosti (Munns, 2002).

Proizvodnja biomase je odvisna od kopičenja ogljikovih spojin, ki nastajajo v procesu fotosinteze, vendar pa povišana slanost negativno vpliva na fotosintezno aktivnost rastline (Zhu, 2001; Ashraf, 2003). Slanost zmanjša zmožnost rastline po privzemu vode in povzroča zmanjšanje rasti skupaj s spremembami metabolizma (Munns, 2002). Slanostni stres v rastlini poruši vodno in ionsko ravnovesje, tako na ravni celotne rastline kot tudi na celični ravni. To pa povzroči poškodbe molekul, ustavitve rasti in tudi smrt rastline (Zhu, 2001).

Slanost na rastlino vpliva različno: znižuje vodni potencial rastline, povzroča strupene učinke ionov Na^+ in Cl^- , ki jih rastlina absorbira, in moti privzem drugih esencialnih hranil. Slednje pri trajnicah nima takojšnjega vpliva na rast, saj imajo rastline lahko rezervna hranila, ki se mobilizirajo (Flowers in Flowers, 2005). Odpornost rastlin na slanost je sposobnost rastline, da raste in zaključi svoj življenjski cikel v substratu, ki vsebuje visoke koncentracije raztopljenih soli. Glede na odnos do povečanih koncentracij soli halofite delimo na obligatne in fakultativne (Parida in Das, 2005).

Kaseva in Mbuligwe (2010) sta ugotovila, da je bila rastlinska čistilna naprava, zasajena z vrsto *Phragmites mauritanus*, učinkovita pri odstranjevanju kroma iz odpadne vode z visoko koncentracijo raztopljenih snovi (cca. 11 g/l). Prav zato so rastlinske čistilne naprave lahko primerne za čiščenje slanih odpadnih voda, le da je izbira primernih rastlin zelo pomembna. Močvirske rastline, rastoče v rastlinskih čistilnih napravah, so zelo pomembne, ker opravljajo funkcije v povezavi s čiščenjem odpadnih voda (Brix, 1997). Najpogosteje uporabljene rastline so močne in hitro rastoče emergentne močvirske rastline (Vymazal and Kröpfelová, 2008), kot sta *Typha latifolia* in *Phragmites australis* (Brisson and Chazarenc, 2009). Ko imamo opravka z odpadnimi vodami s povišano slanostjo, moramo nameniti veliko pozornosti izbiri rastlin, odpornih na sol, z namenom, da dosežemo prožen ter učinkovit sistem čiščenja. Klomjek in Nitorisravut (2005) sta ocenila možnost uporabe rastlinskih čistilnih naprav za odstranjevanje onesnažil iz slanih odpadnih vod z uporabo osmih rastlinskih vrst. Poročata, da ima ozkolistni rogoz (*Typha angustifolia*) najboljšo rast v primerjavi z drugimi rastlinami (*Cyperus corymbosus*, *Brachiaria mutica*, *Vetiveria zizaniodes*, *Spartina patens*, *Leptochloa fusca* and *Echinodorus cordifolius*). Kaseva in Mbuligwe (2010) sta ugotovila, da je bila rastlinska čistilna naprava, zasajena z vrsto *Phragmites mauritanus*, učinkovita pri odstranjevanju kroma iz odpadne vode z visoko vsebnostjo raztopljenih trdnih snovi (cca. 11 g l⁻¹).

Trošt–Sedej (2005) je v svoji raziskavi ugotovila, da na fotosintezno aktivnost rastline močno vplivajo razmere v okolju, temperatura, sevanje, gostota toka fotonov fotosintezno aktivnega spektra sevanja (PPFD), dostopnost hranil in vode ter drugi okoljski dejavniki. Razmerje parametra Fv/Fm je merilo potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema II in je sorazmerno neto fotosintezi (Krause in Wies, 1991). Pri vitalnih rastlinah dosega razmerje Fv/Fm vrednosti 0,83 (Bjorkman in Demmig, 1987) in se zmanjša, kadar je rastlina izpostavljena stresnim razmeram.

2.3 FITOREMEDIACIJA V OKOLJU POVIŠANE SLANOSTI

Izsledki najnovejših raziskav potrjujejo, da lahko fitotehnologije (uporaba rastlin v čistilnih procesih) ponujajo učinkovito in okolju prijazno orodje za čiščenje onesnaženih tal, sedimentov, onesnaženih industrijskih tal ter onesnažene odpadne vode (Justin in sod.,

2009, Zalesny in Zalesny Jr., 2009, Justin in sod., 2010). Rastline s svojo stalno prisotnostjo pravzaprav ves čas prispevajo k izboljševanju stanja okolja, tudi brez naših posegov. Topoli in navadni trst so primerne rastline za fitoremediacijo v okoljih z visoko slanostjo (Shannon in sod., 1999, Klomjek in Nitorisavut, 2005; Zalesny in sod., 2007; Zalesny in Bauer, 2007; Calheiros, 2010). Topoli privzemajo različna onesnaževala, vključno s hranili (nitrati, amonij, fosfat), kovine, metaloide, petrokemijske spojine (goriva, topila), pesticide in topne radionuklide. Topol ima veliko transpiracijo, kar delno vpliva tudi na privzem hranil. Privzemanje hranil je olajšano z velikim koreninskim sistemom z velikim deležem drobnih koreninic, ki imajo manj kot 1 mm premera. Te drobne korenine privzemajo velike količine vode in hranil ter nudijo življenjski prostor mikoriznim glivam (Licht in Isebrands, 2005). Za topole je znano, da lahko privzemajo od 20 do 50 kg vode na drevo na dan (Hinckley in sod., 1994).

Ker s fitotehničkim procesom težko odstranimo vse soli iz odpadnih vod, je bil naš cilj usmerjen v čim večjo porabo takšnih odpadnih vod pri razvoju nove rastlinske biomase. Eden od ciljev raziskave je bil tako izbira najustreznejših rastlin, ki so prilagojene na razmere povišane slanosti. Fitoremediacija vključuje niz tehnologij, ki uporabljajo rastline in z njimi povezane mikroorganizme za remediacijo onesnaženih predelov (Chappel, 1997; Phytoremediation Decision ..., 1999; Susarla in sod., 2002; Pulford in Watson, 2003). Rastline privzemajo skoraj vsa potrebna hranila v vodotopni obliki s pomočjo korenin (Licht in Isebrands, 2005). Lesnate rastline lahko poleg visokega evapotranspiracijskega potenciala v okolico sproščajo encime za razgradnjo različnih snovi, globoke korenine in sposobnost nalaganja onesnaževal. V mnogih primerih imajo tudi visoko stopnjo rasti in zato veliko produkcijo biomase (Chappell, 1997). Fitoremediacija je primerna tako v primeru točkovnih kot razpršenih virih onesnaženja (Phytoremediation Decision ..., 1999), kljub vsemu pa ima omejitve. Uporablja se lahko le tam, kjer imajo rastline ugodne razmere za rast. Koncentracije onesnažil ne smejo biti previsoke, da ne povzročijo stresa pri rastlinah, onesnažila morajo biti v biološko dostopni obliki, prav tako onesnaženje ne sme biti preveč globoko, kajti korenine rastlin morajo doseči onesnažila (Phytoremediation Decision ..., 1999).

2.4 RASTLINSKE ČISTILNE NAPRAVE

Rastlinske čistilne naprave (RČN) so biološki sistemi, ki se lahko uporabljajo za čiščenje različnih vrst onesnaženih vod (Brix, 1994; Vymazal in sod., 2006). Rastlinske čistilne naprave so bile uspešno uporabljene za čiščenje gospodinjskih odplak (Brix in sod., 2011; El Hamouri in sod., 2007; Konnerup in sod., 2009; Trang in sod., 2010), odpadnih vod iz usnjarn (Calheiros in sod., 2009; Emmanuel in Anand, 2007), blata s svinjskih farm (Dan in sod., 2011; Kantawanichkul in sod., 2009; Meers in sod., 2008) in vode iz ribnikov (Konnerup in sod., 2011). Biološki procesi čiščenja so lahko ovirani zaradi visokih koncentracij soli (Lefebvre in Moletta, 2006), kar pa je slabo preučeno (Karajić in sod., 2010).

Eden izmed načinov čiščenja odpadnih voda z uporabo naravnih procesov so RČN, kjer so rastline, tla (substrat) in mikroorganizmi v pomoč pri čiščenju odpadne vode (Renman in Kietlinska, 2000). Za RČN je znano, da lahko zmanjšajo količino onesnaževal iz različnih virov kot so primarna in sekundarna komunalna odpadna voda, odtok padavinske vode s cestišč, tehnološka odpadna voda, odpadna voda s kmetijskih površin, izcedna voda ter kislá rudniška izcedna voda (Kietlinska, 2003, Kadlec in Knight, 1996, Vymazal in sod., 1998, Moshiri, 1993). Za razliko od tradicionalnih tehnik veljajo za tehnologijo, prijazno do okolja, ki običajno zahteva manjši vnos kemikalij in električne energije za delovanje (Kietlinska, 2003). Rastlinske čistilne naprave se za čiščenje komunalne odpadne vode uporabljajo že desetletja (Ran in sod., 2004, Vymazal, 2005, Maine in sod., 2005). Večinoma delujejo gravitacijsko, brez strojne in električne opreme, če razmere to omogočajo. Procesí, ki potekajo v rastlinski čistilni napravi, posnemajo delovanje naravnih mokrišč in so bili predmet številnih raziskav (Vrhovšek in Vovk Korže, 2007).

Za povečanje učinkovitosti obravnavanja slane odpadne vode v RČN je nujno, da se optimizirajo lastnosti RČN. Pomemben del sistema RČN so mikrobne združbe, ki pa so občutljive na slanost. Faulwetter in sod. (2009) ter Truu in sod. (2009) so preučevali različne tipe RČN v povezavi z aktivnostjo mikrobnih združb v takšnih sistemih. Calherious in sod. (2010) so objavili raziskavo o vplivih visoke slanosti na mikrobne združbe v dveh horizontalnih RČN s podpovršinskim tokom, zasajenih z različnimi vrstami

rastlin. Ugotovili so, da pestra in prepoznavna bakterijska združba vpliva na delovanje RČN v povezavi z vrsto zasajenih rastlin. Različne študije, ki so se ukvarjale z običajnimi kulturami bakterij, kažejo, da obstajajo štiri težavnostne skupine v fazi obravnave slane odpadne vode z organizmi iz sladkovodnih in talnih ekosistemov (Woolard and Irvine, 1995). Številne raziskave navajajo, da je uporaba mikroorganizmov, odpornih na slanost, v bioloških obravnavah lahko racionalen pristop pri obravnavi slane odpadne vode (Kargi in Dincer, 1996; Kargi in Uygur, 1996; Tellez in sod., 1995; Hinteregger in Streichsbier, 1997; Dincer in Kargi, 1999; Yang in sod., 2000).

RČN so postale široko uporabljena tehnologija tudi zaradi nizkih stroškov vzdrževanja in obratovanja ter visoke sposobnosti raztapljanja (Brix 1987, Green in Upton, 1994, Liang in sod., 2003). Kompleksni vzajemni procesi, ki povezujejo močvirske rastline, mikroorganizme in substrat v RČN, so glavni mehanizmi čiščenja odpadnih vod (Chen in sod., 2004). Starejše študije navajajo, da so procesi pri čiščenju odpadnih voda močno povezani z lastnostmi močvirskih mikroorganizmov in z nalogami koreninskega sistema rastlin (Tanner, 2001, Kadlec in sod., 2005, Stein in Hook, 2005). Močvirske rastline ustvarjajo oksične razmere v koreninski coni, zato tam potekajo intenzivne interakcije med rastlinami, mikroorganizmi, substratom in onesnaževali ter fizikalno–kemijski in biološki procesi (Kivaisi, 2001, Stottmeister in sod., 2003).

V RČN potekajo različni fizikalni in biokemijski procesi, kot so aerobna ter anaerobna razgradnja, filtracija, sedimentacija in adsorpcija, ki zagotavljajo učinkovito čiščenje organskih, dušikovih, fosforjevih snovi in težkih kovin ter drugih strupenih snovi v odpadni vodi. Postopek čiščenja odpadnih voda poteka v med seboj povezanih gredah, v katerih imajo glavno vlogo ustrezna mešanica substrata, mikroorganizmi in izbrane močvirske rastline s svojim koreninskim sistemom. Proces čiščenja so predvsem odvisni od hidravlične prevodnosti substrata, števila ter vrst mikroorganizmov, oskrbe mikroorganizmov s kisikom in kemičnih razmer v substratu (Haberl in sod., 2003).

RČN so še posebej učinkovite pri zniževanju vsebnosti biološko razgradljivih snovi, odstranjevanju suspendiranih trdnih delcev, dušika, fosforja, ogljikovodikov in tudi kovin. Na podlagi podatkov iz različne literature je učinkovitost zmanjševanja obremenitev v vodi

z rastlinskimi čistilnimi napravami za neusedljive snovi 80–90 %, fosfor 26–60,6 %, dušik 22,6–48,5 %, BPK₅ 65–97 %, ter bakterije fekalnega izvora in drugih bakterij pa 90–99% (Vučinić in sod., 2008). Razgradnja snovi poteka v oksidnih in anoksidnih območjih. Tako se anaerobni in aerobni mikroorganizmi dopolnjujejo ter povečujejo učinkovitost čiščenja (Langergraber, 2008). Pri tem aerobne in anaerobne bakterije prispevajo glavni delež k čiščenju odpadne vode (80 % čiščenja). K ostalim 20 % čiščenja prispevajo rastline z vezavo mineralnih snovi (npr. fosfatov, nitratov) in drugih, tudi nekaterih strupenih snovi v rastlinska tkiva (Vrhovšek in Vovk Korže, 2007). Najpogostejše so RČN, ki so zasajene z emergentnimi rastlinami, kot sta taksona *Typha* spp. in *Phragmites australis* (Kadlec in Knight, 1996).

2.5 NAVADNI TRST (*PHRAGMITES AUSTRALIS*)

Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steud. (navadni trst) je emerzna rastlina, ki razvije asimilacijske površine in večji del stebela nad vodno gladino. Navadni trst kot prevladujoča vrsta lahko uspeva na območjih z različnim hidrološkim režimom. Tako ločimo kopenski »terestični trst«, ki uspeva ob jezerih, in »prehodni trst«, ki uspeva na prehodu voda – kopno (ob strugah), ter »litoralni trst«, ki uspeva na poplavljenih predelih (Gaberščik in Urbanc–Berčič, 2002 b).

Navadni trst je najbolj razširjena kritosemenka, značilna vrsta iz ekotonov med kopenskim in vodnim okoljem, od sladkovodnih do slanih ekosistemov (van der Putten, 1997; Cronk in Fennessy, 2001, Mauchamp in Methy, 2004). Navadni trst je lahko začasno izpostavljen popolni potopitvi ali suši, ki lahko traja od nekaj dni do nekaj mesecev (Mauchamp in Methy, 2004). Prilagodi se lahko na globoko vodo ali na pomanjkanje vode, in sicer s fenotipsko plastičnostjo (Vretare in sod., 2001, Pagter in sod., 2005). White in Ganf (2002) poročata, da lahko globoka voda vpliva na delovanje navadnega trsta tako, da omejuje dovod kisika do podzemnih delov rastlin.

Navadni trst je kozmopolitska vrsta in je pogosta pomembna sestavina sladkovodnih ekosistemov. Najpogosteje ga najdemo blizu celinskih vod in v brakičnih ter slanih mokriščih. Prav tako ga lahko najdemo v nekaterih tropskih mokriščih, vendar ne na

območjih Amazonije in centralne Afrike. Razširjen je v Združenih državah Amerike, raste v močvirjih in barjih, ponavadi naseljuje vmesna območja med močvirji in gorskimi predeli (Roman in sod., 1984). Navadni trst se lahko razširja s kloni. To mu je omogočilo, da se je izjemno razširil po Združenih državah Amerike in celo na Japonskem, kjer pogosto izpodriva avtohtono močvirsko vegetacijo v celinskih vodah, ter v brakičnih in slanih mokriščih, kjer razvije monokulture (Mayerson in sod., 2000). Marks s sodelavci (1994) navaja, da je nadzor širjanja navadnega trsta postal nujen ukrep zaradi strahu pred izgubo biodiverzitete v teh močvirjih. Meyerson s sodelavci (2000) je pregledal literaturo in povzel razpoložljive podatke o navadnem trstu v Združenih državah Amerike ter ugotovil, da je njegovo izkoreninjenje v celinskih vodah povečalo raznolikost rastlin v vseh primerih. Kljub temu ne sme biti cilj upravljanja nad širjenjem navadnega trsta izkoreninjenje, saj je na določenih območjih ta vrsta zelo pomembna za celotno biocenozo na teh območjih (Hellings in Gallagher, 1992).

Navadni trst je zelo pogost tudi v Evropi. Pogosto se uporablja pri grajenih močvirjih, kot so sistemi RČN. Rast je obilna, korenine segajo do globine 75 cm in več. V tleh ima razrasle rizome, ki imajo založno vlogo. Nadzemni deli pozimi propadejo. Zgodaj pomladi poženejo poganjki, ki v 2–3 mesecih zrastejo do višine 2–3 m (Kadlec in sod., 2000). Suha biomasa podzemnih delov je okoli 2000 mg/m^2 , kar pri 30 cm globine zaseda kar tretjino celotnega volumna. Biomasa nadzemnih delov je običajno manjša od podzemnih. Cveti med julijem in oktobrom. Uspešno tekmuje z drugimi vrstami. Zelo učinkovito dovaja kisik v podzemne dele in okolico korenin. Vymazal (1998) navaja, da naj bi iz korenin v tla prešlo do $4,3 \text{ g/m}^2/\text{dan}$ kisika ($0,02\text{--}12 \text{ g/m}^2/\text{dan}$). Iz trstičja izhlapi tudi $15 \text{ l/m}^2/\text{dan}$ vode. Pri eno leto starem sestoju je Kukanja (1999) izmerila izhlapevanje vode $11,9 \text{ l/m}^2/\text{dan}$, Herlič (1993) pa $3,7 \text{ l/m}^2/\text{dan}$. Ob zasaditvi RČN se priporoča gostota 2–6 rastlin na kvadratni meter (Urbanc–Berčič in sod., 1998; Bulc in Vrhovšek, 2002a).

Navadni trst (*Phragmites australis*) se je uspešno prilagodil na terestične habitate, kjer njegovi ekotipi izkazujejo odpornost proti suši, slanosti in nizkim temperaturam (Gorai in sod., 2007; Engloner, 2009). Dobro prenaša tudi slanost in uspešno raste v brakičnih ter slanih močvirjih (Burdick in sod., 2001). Rast navadnega trsta se postopno zmanjšuje z naraščanjem koncentracij NaCl v raztopini (Gorai in sod., 2007, 2010; Pagter in sod,

2009). Munns (2009) v svoji raziskavi navaja, da je zmanjšanje rasti odvisno od obdobja rasti v slanih razmerah.

2.6 KLONI TOPOLA (*POPULUS* SPP.)

Topoli (*Populus* spp.) so bili v preteklosti obširno preučeni, predvsem z vidika produkcije biomase za uporabo vlaken, goriva in fitoremediacijskega učinka (Dickmann, 2001; Isebrands in Karnosky, 2001; Coleman in Stanturf, 2006). Izjemne lastnosti topolov, ki so pripomogle k takšni pestri uporabi vrste, so: dobro ukoreninjenje, hitra rast, visoka stopnja fotosinteze in obsežna poraba vode (Ceulemans in sod., 1992; Pontailier in sod., 1999; Zalesny in sod., 2006).

Topoli privzemajo hranila in različna onesnaževala, kovine, metaloide, petrokemijske spojine (goriva, topila), pesticide ter topne radionuklide. Topoli imajo veliko sposobnost privzema in oddajanja vode, zato se na območjih, zasajenih s topoli, spiranje različnih topnih snovi z območja rizosfere v podtalnico zmanjšuje. Privzem je močno povezan z obsežnim koreninskim sistemom z velikim deležem drobnih koreninic, ki imajo manj kot 1 mm premera. Drobne korenine privzemajo velike količine vode in hranil ter nudijo življenjski prostor mikoriznim glivam (Licht in Isebrands, 2005). Za topole je znano, da lahko privzemajo od 20 do 50 kg vode na drevo na dan. Topoli so poleg navadnega trsta primerne rastline za fitoremediacijo v okoljih z visoko slanostjo (Shannon in sod., 1999, Klomjek in Nitorisavut, 2005, Zalesny in sod., 2007; Zalesny in Bauer, 2007; Calheiros, 2010).

Široka genetska raznolikost topolovih vrst in selekcija klonov povečata potencialno uporabo teh rastlin v različnih okoljih. Schutz in sod. (2004) ter Licht in Isebrands (2005) navajajo, da so topolove kulture koristni elementi okolja, predvsem kot vegetacijski pasovi ob potokih in vegetacijski filtri v fitoremediacijske namene. Pomembna komponenta razvoja fitoremediacijskih sistemov je ocena zmožnosti topolov za remediacijo vode v tleh (Zalesny in Bauer, 2007). Nekatere vrste in kloni topolov so primerni za fitoremediacijo zaradi njihove hitre rasti (Zalesny in sod., 2005a), visoke porabe vode (Zalesny in sod., 2006) in obsežnih koreninskih sistemov (Zalesny, Riemenscheider in Hall, 2005). Topoli

izkazujejo široko genetsko pestrost in relativno uspešno interspecifično hibridizacijo (Eckenwalder, 1984).

Slana območja je možno zasaditi s hitrorastočimi drevesnimi vrstami, kot so različne vrste topola, z izraženo odpornostjo na slanost (Marcar in sod., 1993). *Populus euphratica* Oliv. je ena izmed najbolj odpornih vrst na povečano slanost v tleh (Chen in sod., 2002). Občutljivost na slanost je bila zaznana pri različnih klonih znotraj rodov, kot so *Populus deltoides* Marshall (Singh in sod., 1999) ali *Populus alba* L. (Cuevas in sod., 1997, Sixto in sod., 2005). Slednji je bolj toleranten na povišano slanost od drugih rodov (Kuzmysky in sod., 1999). Beli topol je močno razširjen na jugu in vzhodu Evrope ter v centralnih predelih Evrope. Prisoten je tudi v Srednji Aziji in na severu Evrope (FAO, 1980). Njegova prisotnost ob rečnih ekosistemih po vsem Sredozemlju je bil vzrok za njegovo vključitev v evropski Program gozdnih genskih virov (EUFORGEN, 1999). Vrsta je pomembna predvsem zaradi hitrega priraščanja ter dobrega prilagajanja na stresne razmere v okolju. To je v preteklosti zbudilo zanimanje za pogozdovanje s to vrsto in vključitev vrste v program ohranjanja vrste (Peso in sod., 1997), tudi za obnovo degradiranih območij.

Zaraščanje obremenjenih površin s topoli in spremljanje evapotranspiracijskega ter fitoremediacijskega odziva vegetacijskih pokrovov sta lahko učinkoviti z okoljskega in ekonomskega vidika (Isebrands in Kornasky, 2001). Informacije o fitoremediacijski kapaciteti topolov in vrb so pomembne zaradi ekoloških učinkov in ekonomske učinkovitosti procesa remediacije onesnaženih območij (Zalesny in Bauer, 2007).

2.7 PEŠČENI VEGETACIJSKI FILTRI

Peščeni vegetacijski filtri so vrste čistilnih sistemov, ki so sestavljeni iz vode, substrata, rastlin, rastlinskega odpada, nevretenčarjev in mikroorganizmov. Onesnaževala se v takšnih sistemih odstranijo s kombinacijo fizikalnih, kemičnih in bioloških procesov, vključujoč usedanje, adsorpcijo v substrat, asimilacijo v tkiva rastlin ter mikrobnou transformacijo (Brix, 1993; Kadlec in sod., 2000). Prochaska in Zouboulis (2003) v svoji raziskavi ugotavljata, da je učinkovitost peščenega filtra pri odstranjevanju suspendiranih

delcev 82 %. Učinkovitost zmanjševanja kemijske potrebe po kisiku (KPK) je bila od 50 % do 70 %.

Prednost počasne peščene filtracije (SSF) je v preprosti in ekonomični postavitvi, v obratovanju in vzdrževanju sistema, prav tako sistem za delovanje ne potrebuje kemikalij ter dodatne energije (Visscher in sod., 1987). Peščeni vegetacijski filtri prestrežejo različna onesnaževala iz odpadnih voda in tal, ki bi drugače odtekala v okolje. Spojine kot so nitrat, amonij, trikloroeten in nekatere kovine, rastline privzemajo ter jih tako odstranijo iz tal. Večina onesnaževal pa nikoli ne vstopi v rastline, zadržijo se namreč v koreninski coni, kjer jih razgradijo mikrobi (Licht in Isebrands, 2005). Pri vegetacijskih peščenih filtrih se nadzemni deli rastlin lahko periodično posekajo ali požanjejo, pri tem pa se določena onesnaževala, ki jih rastlina prenaša v nadzemne dele, odstranijo iz sistema. Vegetacijski filtri se uporabljajo kot sistemi za predčiščenje pred rastlinskim čistilnim sistemom. Lahko pa služijo kot dodatno čiščenje ali kot zmanjšanje volumna odpadne vode zaradi povišane evapotranspiracije hitrorastočih lesnatih rastlin.

Učinkovitost vegetacijskih filtrov je bila predstavljena v več različnih študijah, izvedenih v različnih državah (Nixon in sod., 2001, Mirck in sod., 2005). Vrbe in topoli v nasadih hitrorastočih drevesnih vrst s kratko obhodnjo (short rotation coppice – SRC) so lahko zaradi izjemne rasti visoko učinkoviti pri recikliranju organskih ostankov iz odpadnih voda (Lebrecque M., Teodorescu T. I., 2001). Hitra produkcija biomase je povezana s hitrim kroženjem hranil in z obilno porabo vode (Mirck in sod., 2005). Pretekle študije so dokazale, da vrbe in topoli v SRC porabijo znatno več vode kot kmetijske vrste ter ostale drevesne vrste (Grip in sod., 1989, Hinckles in sod., 1994, Lindroth in sod., 1994). Kljub temu da so vrbe in topoli znani po svoji odpornosti na visok nivo vode, lahko intenzivno namakanje zmanjša izmenjavo plinov s substratom in negativno vpliva na proizvodnjo biomase (Mirck in sod., 2005). Za zagotovitev dobre vzpostavitve vegetacijskega filtra je treba upoštevati in izbrati primerno vrsto oz. klon, ki omogoča najboljši izkoristek transpiracijskega potenciala ter učinkovit privzem hranil (Fillion in sod., 2009). Privzem hranil iz odpadnih vod obenem omogoča drevesu hitrejšo rast, večjo produkcijo biomase in očiščenost vode do te mere, da je primerna za izpust v okolje (Larsson, 2003). Guidi (2008) v svoji raziskavi navaja, da je velika poraba vode topolovih in vrbovih hitrorastočih

nasadov, bolj odvisna od razpoložljivosti hranil kot od specifičnega ekološkega odziva rastline. Zaradi tega lahko sklepamo, da je obe vrsti možno uporabljati za čiščenje različnih vrst odpadne vode, ki vsebuje visoke koncentracije fosforja in dušika (Guidi, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSTAVITEV POSKUSA

3.1.1 Mesto in sestava poskusa

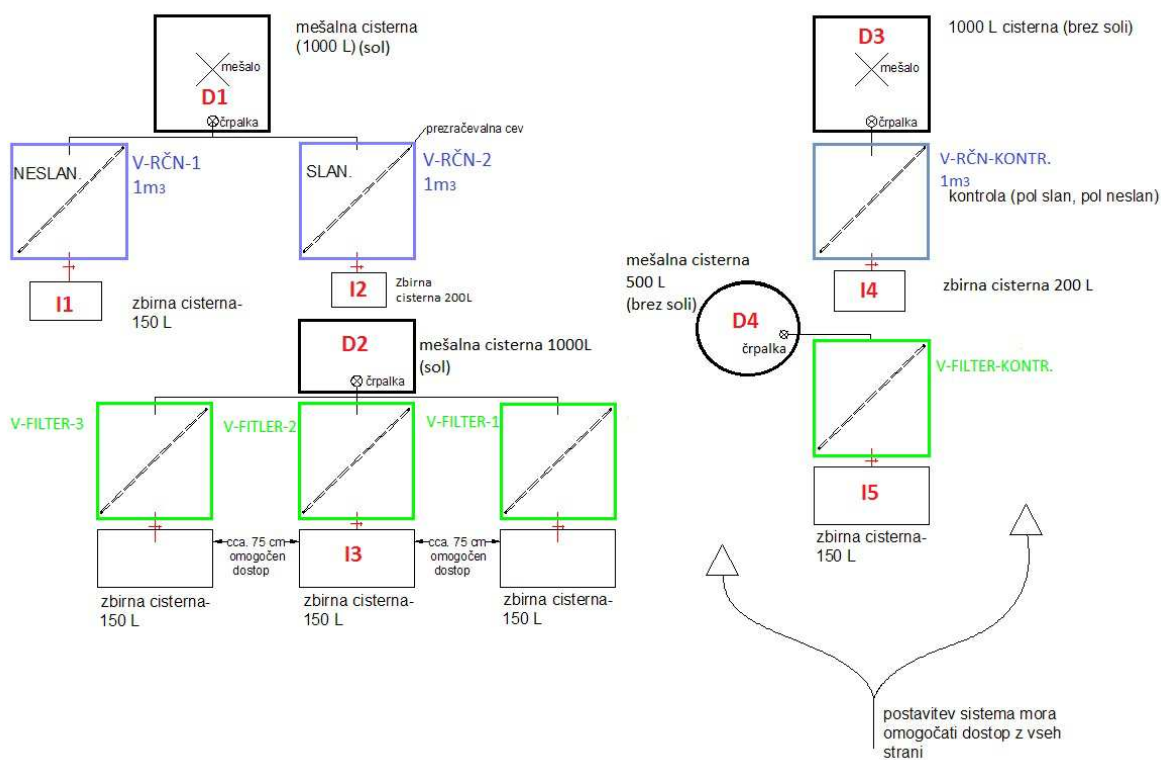
Poskus je bil postavljen v okviru Centralne čistilne naprave Ajdovščina (45°52'N, 13°54'E), od aprila 2011 do konca septembra 2011. Mesto postavitve poskusa smo izbrali zaradi možnosti uporabe odpadnih in komunalnih vod iz primarnega usedalnika čistilne naprave. Po opravljenem pregledu odpadnih voda, ki prihajajo iz različnih virov živilskopredelovalne industrije na tem območju, smo določili najpogostejša onesnaževala v teh vodah, kot sta visoka slanost in visoka organska obremenitev. Na podlagi tega je bil načrtovan poskus, katerega cilj je bil zmanjševanje koncentracije onesnaževal.



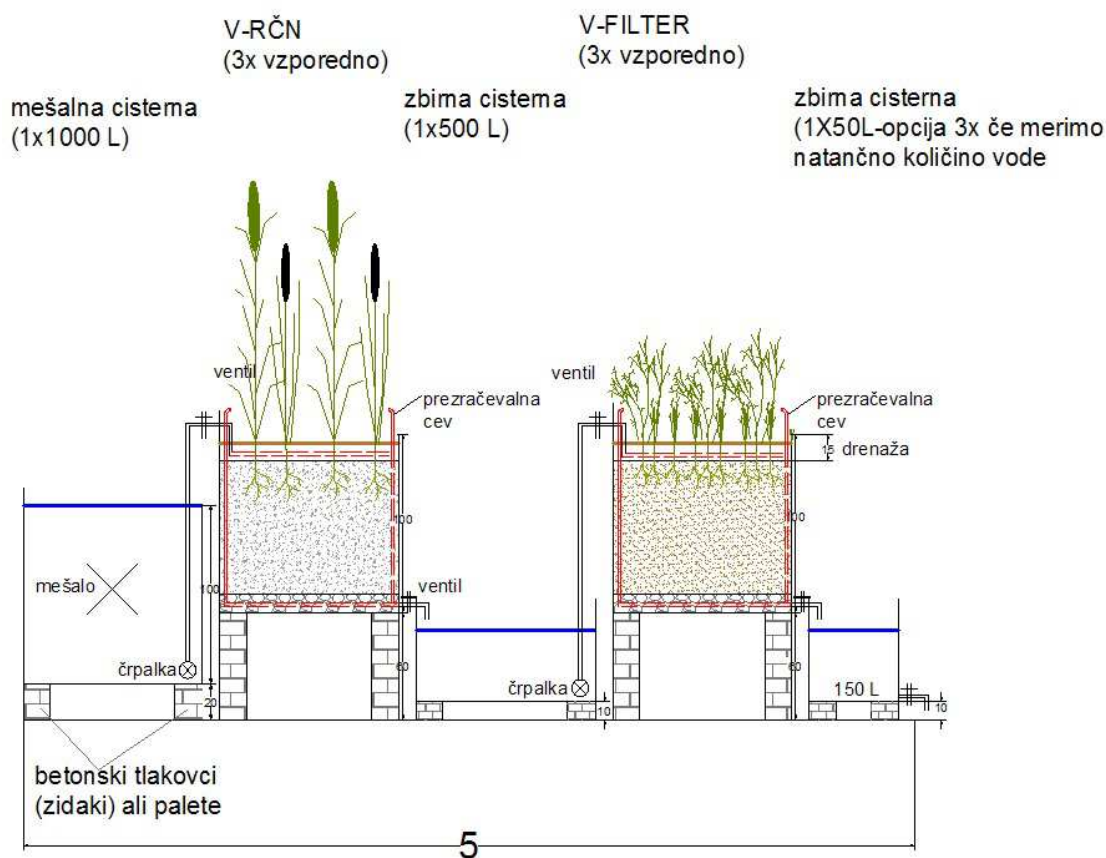
Slika 1: Centralna čistilna naprava Ajdovščina (www.ksda.si)
Figure 1: Central Wastewater Treatment Plant (www.ksda.si)

Pred postavitvijo modela smo izvedli celovito študijo domačih in tujih raziskav s področja: izbora primernih substratov za sistem vertikalne trstične grede oz. vegetacijskih filtrov, izbora substratov vertikalne rastlinske čistilne naprave, izbora rastlin za oba sistema, hidravličnih preračunov pretokov in zadrževanja vode ter izbora primernosti rastlin za zasaditev sistemov s toleranco na povišano slanost.

Poskus je bil sestavljen iz več enot, s čimer smo dosegli dovolj eksperimentalnih ponovitev. Sestavljen je bil iz dveh eksperimentalnih vertikalnih rastlinskih čistilnih naprav (V-RČN), zasajenih z navadnim trsom (*Phragmites australis*) in treh eksperimentalnih filtrirnih gred (V-FILTER), zasajenih s štirimi različnimi kloni topola. Eksperimentalne grede smo polnili z razredčeno dotočno vodo komunalne čistilne naprave (iz primarnega usedalnika), ki smo ji postopoma dodajali raztopino soli. Kot kontrolni objekt smo vzpostavili dve gredi, prvo zasajeno s trstičjem (V-RČN-KONTR), in drugo, zasajeno s topoli (V-FILTER-KONTR), v kateri pa nismo dodajali soli.



Slika 2: Načrt postavitve pilotnega modela; D1– dotok v V– RČN, D2– dotok v V– FILTER, D3– dotok v V–RČN–KONTR, D4 – dotok v V–FILTER–KONTR, I1– iztok iz V–RČN–1, I2– iztok iz V–RČN–2. I3– iztok iz V–FILTER–2, I4– iztok iz V–RČN –KONTR, I5– iztok iz V–FILTER–KONTR (Jurše A.)
 Figure 2: Plan the layout of the model; D1– inlet in V–RČN, D2– inlet in V– FILTER, D3– inlet in V–RČN–KONTR, D4– inlet in V–FILTER–KONTR, I1– outlet from V–RČN–1, I2– outlet from V–RČN–2. I3– outlet from V–FILTER–2, I4– outlet from V–RČN–KONTR, I5– outlet from V–FILTER–KONTR (Jurše A.)

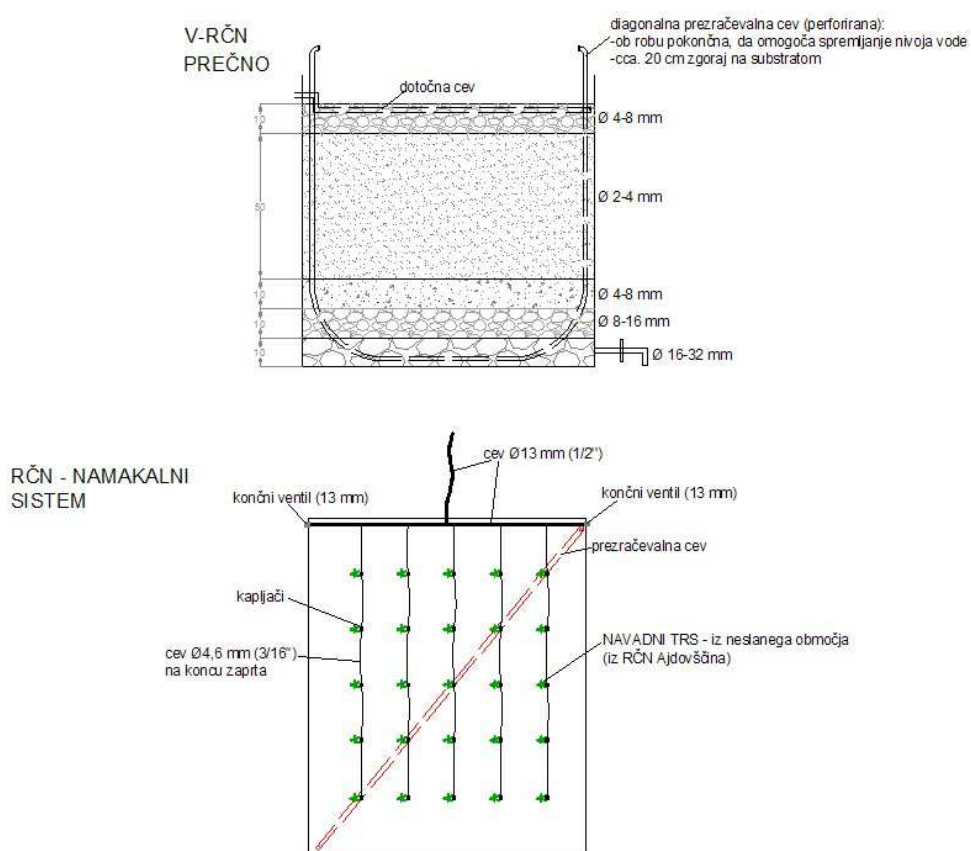


Slika 3: Prečni profil pilotnega modela (Jurše A.)
Figure 3: The cross – section of pilot model (Jurše A.)

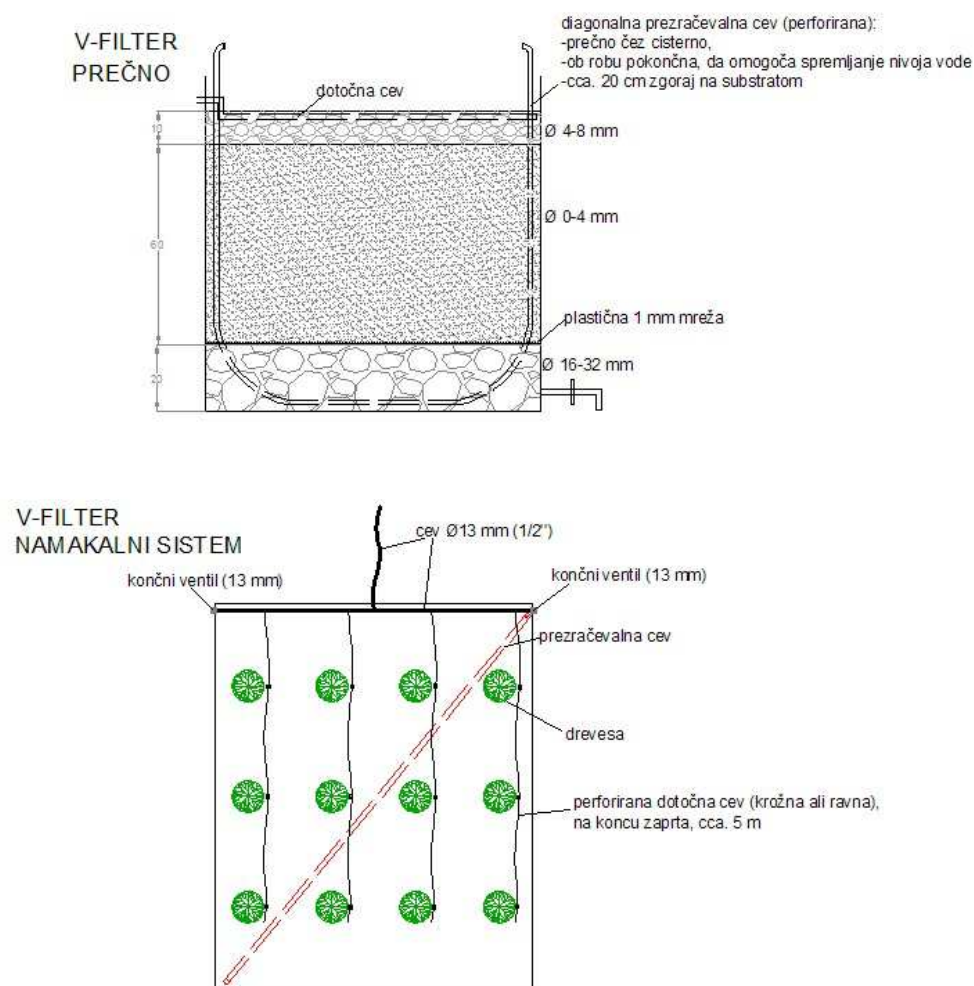
Dotok odpadne vode iz primarnega usedalnika prek skupnih dotočnih cistern je bil vertikalno speljan čez namakalni sistem, razširjen po celotni površini eksperimentalnih in kontrolnih enot. Voda, speljana čez namakalni sistem, je bila mešanica odpadne vode iz primarnega usedalnika iz CČN Ajdovščina in podtalne vode. Zbiralni cisterni sta bili dve, ena za sistem V–RČN, druga pa za sistem V–FILTER. V zbiralnih cisternah je bila zgoraj omenjena mešanica vode z dodano slanostjo za vsak sistem posebej. V času trajanja poskusa je slanost vode postopno naraščala (slika 3, slika 4 in slika 5).

Od maja do avgusta 2011 smo postopno dodajali sol (NaCl) od 1,4 do 11 mg/l v V–FILTER in od 4,32 do 30 mg/l NaCl v enote V–RČN. Dodajali smo morsko sol, ki se uporablja za posipavanje cest.

Rezultate, pridobljene v eksperimentalnih enotah obeh sistemov, smo primerjali z rezultati v kontrolnih enotah, kjer ni bilo dodane soli. Dotočna voda se je dodajala v treh zaporednih intervalih po dve uri na dan s pomočjo avtomatskega namakalnega sistema. V prvih štirih tednih so bile rastline dnevno namakane z nižjo koncentracijo soli v vodi. S tem smo zagotovili ustrezno ukoreninjenje rastlin. Po štirih tednih smo stopnjo slanosti zviševali tedensko, in sicer do konca poskusa od 11 mg/l v V-FILTER do 30 mg/l NaCl v V-RČN. Poskus je trajal od začetka aprila do konca avgusta, ko smo vseh 75 rastlin porezali.



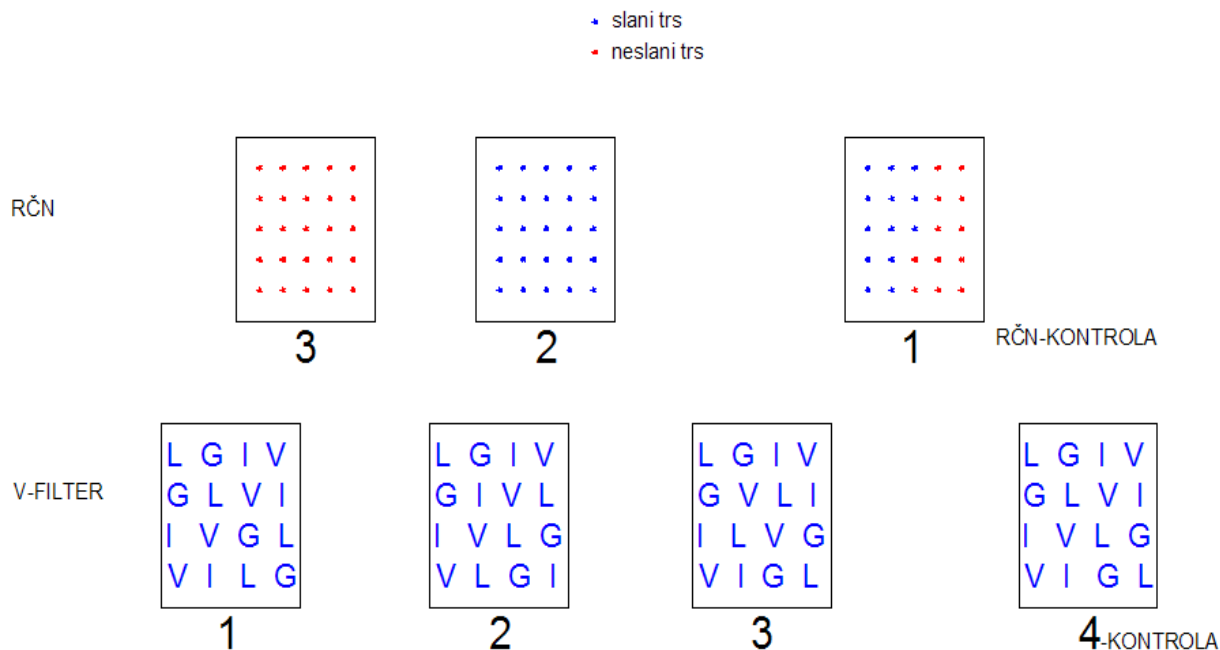
Slika 4: Načrt sistema V-RČN (Jurše A.)
Figure 4: System design of V-RČN (Jurše A.)



Slika 5: Načrt sistema V-FILTER (Jurše A.)
Figure 5: System design of V-FILTER (Jurše A.)

Na začetku rastne sezone, sredi marca 2011, smo pilotni model osnovali in pripravili vse potrebno za zasaditev enot. Za zasaditev eksperimentalnih modelov v enotah V-FILTER smo uporabili 25 cm dolge potaknjence iz eno letnega poganjka dreves topolov *Populus deltoids* klon »Lux«, *Populus × canadensis* klon »I-214«, *Populus × Canadensis* klon »Guardi« in *Populus alba* klon »Villa Franca«. Pred sadnjo smo poganjke namočili za en dan v vodo do višine 20 cm. Potaknjenci topola so bili posajeni v eksperimentalne enote V-FILTER in v kontrolno enoto modela V-FILTER. Eksperimentalne enote V-FILTER so bile napolnjene z 1 m³ peska z različno granulacijo po vertikalnih plasteh (slika 4 in 5). Zgornjih 5 cm vsakega potaknjenca je po sadnji ostal zunaj. Vsaka enota V-FILTER je

bila zasajena s šestnajstimi potaknjenci topola, po sistemu latinskega kvadrata z razporeditvijo 4x4 (štirje potaknjenci klona I-214, štirje potaknjenci klona Guardi, štirje potaknjenci klona Vila Franca in štirje potaknjenci klona Lux) (slika 6).



Slika 6: Načrt zasaditve (Jurše A.)
 Figure 6: Planting plan (Jurše A.)

Rastline navadnega trsta so bile posajene v eno kontrolno enoto V-RČN in v dve eksperimentalni enoti V-RČN. Vsaka enota je bila zasajena s 24 rastlinami. Polovica kontrolna enota V-RČN je bila zasajena z navadnim trstom iz »neslanega« okolja (CČN Ajdovščina), polovica pa s navadnim trstom iz »slanega« okolja (Sečoveljske soline). Enote V-RČN so bile prav tako napolnjene z 1 m³ peska oz. substrata različne granulacije, nasipane po vertikalnih plasteh. Substrat v enotah V-RČN je bil bolj fine granulacije kot v enotah V-FILTER (slika 6).

3.1.2 Rastlinski material v poskusu

Vse rastline smo posadili na začetku vegetacijske dobe in so bile v začetnem obdobju namakane le z mešanico vodovodne vode ter komunalne odpadne vode po primarnem čiščenju. Namakanje brez dodajanja soli je trajalo do začetka maja leta 2011, da so se rastline uspešno ukoreninile. Na začetku junija smo s postopnim dodajanjem soli (NaCl) povečali slanost.

Potaknjence klonov topola (*Populus deltoides* Bart. cl. I-69/55 (*syn. Lux*), *Populus* × *canadensis* Moench cl. I-214, *Populus* × *canadensis* Moench cl. Guardi, *Populus alba* L. cl. Villa Franca) smo pridobili iz topolovih klonov, vzgojenih na Inštitutu za raziskovanje topolov, na Raziskovalnem oddelku za intenzivno proizvodnjo lesa, Casale Monferrato, Italija (Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, Unita di Ricerca per le produzioni Legnose fuori Foresta, Casale Monferrato, Italia) (slika 7). Uporabili smo tri klone topolov s potencialno izraženo povišano stopnjo tolerance na slanost. V eksperimentalnih gredah smo jih uporabili z namenom ugotovitve njihovega fitoremediacijskega potenciala in stopnje rasti v razmerah povišane slanosti ter povišane organske obremenitve.



Slika 7: Potaknjenci topolov, kloni Vila Franca, Lux, I-214 in Guardi (Jurše A.)
Figure 7: Cutting of poplars, clone Vila Franca, Lux, I-214 and Guardi (Jurše A.)

Rizome vrste *Phragmites australis* smo pridobili z dveh lokacij z različno stopnjo slanosti: iz obstoječe rastlinske čistilne naprave v bližini CČN Ajdovščina in z območja solin v Strunjanu (45°31'N, 13°36'E). Namen izbora rastlin je bil preučiti stopnjo odpornosti dveh različnih ekotipov trstičja v odpadni vodi s povišano slanostjo in povišano organsko obremenitvijo (slika 8).



Slika 8: Rizomi navadnega trsta s solin Strunjan (levo) in iz rastlinske čistilne naprave v Ajdovščini (desno) (Jurše A.)

Figure 8: Reed rhizome from salt pans Strunjan (left) and constructed wetlands in Ajdovščina (right) (Jurše A.)

3.1.3 Opis klonov topola

Opis klonov je povzet po gradivu Inštituta za raziskave topolov Casale Monferrato, Italija (CRA, 2014).

Beli topol (*Populus alba* L.) pokriva naravna območja srednje in južne Evrope, severne Afrike, zahodne Azije in srednje Azije (FAO 1980). Številne sorte se tradicionalno gojijo na Bližnjem vzhodu ("Roumi"; "Ankara AT"; "Kabudeh Schirazih"; "Kabudeh Bumi"), in drugje, kjer so beli topol uvedli med komercialne kulture v drugi polovici dvajsetega stoletja. Eden od teh kultivarjev je klon z imenom "Villafranca", ki je bil vzgojen na Raziskovalnem inštitutu za topole, Casale Monferrato (Italija) v letu 1954 s križanjem ženskega *Populus alba* Villafranca Piemonte (Piedmont, Italija) in moškega osebka iste vrste iz kraja Luce (Toskana, Italija). Ta klon je bil registriran za komercialno uporabo v Italiji leta 1989 in na Madžarskem leta 1987. "Villafranca" se uporablja za pogozdovanja na ravninah ob rekah in v posebnih sestojih za proizvodnjo okrogle hlodovine (pohišstvo, palete itd.).

Confalonieri (2002) poroča, da je bil klon 'Villafranca' testiran v raziskavi in eksperimentalnem programu, ki ga je izvajal ENEL (Italian Electric Company), in sicer z namenom, da razvijejo primerne modele za množično proizvodnjo lesa za energijo (Schenone et al. 1997). 'Villafranca' izkazuje visoko produkcijo biomase (okoli 9 t/ha/leto suhe snovi) in izjemen odziv po zasaditvi. Ta klon zahteva previdno obravnavo v prvih nekaj mesecih po sadnji, ker lahko plevel močno škoduje mladim topolovim rastlinam (Facciotto and Schenone 1998).

Preglednica 1: Opis klonov topola
 Table 1: Description of poplar clones

	Vrsta klona			
	Populus deltoides Bartr., klon »Lux«	Populus x euramericana (Dode) Guinie, klon »I-214«	Populus x euramericana (Dode) Guinier, klon »Guardi«	Populus alba L., klon »Villafranca«
Splošne informacije				
Družina	Salicaceae	Salicaceae	Salicaceae	Salicaceae
Vrsta	Populus deltoides Bartr.	Populus x euramericana (Dode) Guinie	Populus x euramericana (Dode) Guinier	Populus alba L.
Sinonim	P.x euramericana P.x robusta	P. xrobusta, P.xcanadensis	/	'I-58/57'
Materinska rastlina	P. deltoides –Illinois (USA)	P. sp 'Canadese bianco'	P. deltoides '3261/958' (Stoneville 1) – USA	P.alba 'n. 2 – Istituto Pignatelli' – Villafranca Piemonte (TO)
Moška rastlina	In situ priložnostno opraševanje	Incerto (P. nigra 'Nero Stella', Vigone–TO)	P. nigra 'Bordils' (Spagna)	P.alba (Lucca)

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1: Opis klonov topola

Selektor	Istituto di sperimentazione per la pioppicoltura (ISP)–Casale Monferrato (AL)	prof. G. Jacometti – Villafranca Piemonte (TO)	Centro di sperimentazione agricola e forestale (CSAF) – Roma	Istituto di sperimentazione per la pioppicoltura (ISP) – Casale Monferrato (AL)
Spol	Ženski	Ženski	Ženski	Ženski
Opis morfologije in fenologije rastline				
Oblika list	Širok	Polširok	Ozek	Polširok
Barva listov	Rdečkasta v fazi cvetenja in v odrasli dobi	Rdečkasto v fazi cvetenja in v odrasli dobi	Rumeno – zelena	Zelena – bela
Barva brstov	Zelena	Rdečkasta	Rjava	Zelena
Kalitev	Zgodnja	Zgodnja	Pozno	Zgodnja
Deblo	Rahlo valovito in cilindrične oblike	Rahlo valovito in cilindrično z redkimi sekcijami	Gladko	Rahlo valovito
Lubje	Grbasto	Gladko, sive barve	Gladko, sive barve	Gladko, sive barve
Gojenje				
Razmnoževanje	Zelo dobro vegetativno razmnoževanje; enostavno ukoreninjenje potaknjencev	Zelo dobro vegetativno razmnoževanje; enostavno ukoreninjenje potaknjencev	Zelo dobro vegetativno razmnoževanje; enostavno ukoreninjenje potaknjencev	Slabše vegetativno razmnoževanje; za ukoreninjenje potaknjencev potrebno veliko vlage

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1: Opis klonov topola

Pedološke razmere	Prilagojen na različne vrste tal, tudi na suhe pogoje	Prilagojen na različne vrste tal; lahko raste v zelo hladnem okolju	Prilagojen na različne vrste tal, razen na karbonatna.	Prilagojen na različne vrste tal, tudi na karbonatna tla
Gojenje	Ne prenese močnega vetra. V prvem letu razvoja namakanje in gnojenje nista priporočljivi, saj lahko povzročita zlom ali upogibanje rastlin.	Raste hitro z visoko stabilnostjo. Enostavno obrezovanje. V Italiji eden izmed najbolj razširjenih klonov. S ciklom 10–12 let in 280–330 rastlin/ha, v nižinah proizvede v povprečju 20–22 m/ha/leto.	Ne prenese močnega vetra, enostaven za obrezovanje.	Raste na tleh z veliko vode, prirašča počasneje kot ostali kloni; cikel na 15 let, raste lahko v velikih gostotah sestojja in dobro prenaša redčenje; težave pri obrezovanju. se nadaljuje
Deblo	Les je precej težak (bazalna gostota do 0,37 g/cm ³), primeren za različno uporabo	Lahek les (bazalna gostota 0,29 g/cm ³), bele barve, zelo primeren za vezane plošče.	Zmerno težek les (bazalna gostota 0,33 g/cm ³), primeren za različno uporabo.	Lahek les (bazalna gostota 0,27 g/cm ³); primeren za žagani les in vezane plošče
Odpornost na:				
Spomladansko osutost	Zelo visoka	Zelo visoka	Zelo visoka	Zelo visoka
Plesni	Visoka	Srednja	Slaba	Zelo visoka
Okužbo z <i>Marssonina brunnea</i>	Zelo visoka	Nizka	Srednja	Zelo visoka
Kortikalne nekroze	Zelo visoka	Srednja	Zelo slaba	Zelo visoka
Rjave lise	Zelo visoka	Visoka	Zelo slaba	Zelo visoka

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1: Opis klonov topola

Mozaični virus	Nizek	Zelo visoka	Zelo visoka	Zelo visoka
Volnate uši <i>Phloeomyzus passerinii</i>	Zelo visoka	Nizka	Srednja	Zelo visoka
Veter	Nizka	Visoka	Srednja	Visoka

3.2 ANALIZE RASTLIN IN VODE

V nadaljevanju poizkusa je potekalo redno odzemanje vzorcev vode za opravljanje analiz vode. Izvajale so se sprotne tedenske analize električne prevodnosti vode s konduktometrom. Na 14 dni so se izvajale skrajšane laboratorijske analize fizikalnih in kemijskih lastnosti vode. Trikrat v celotnem obdobju poskusa smo izvedli razširjeno analizo fizikalnih in kemijskih lastnosti vode.

Tedensko vzorčenje fizioloških in kemijskih parametrov smo opravili med aprilom 2011 in oktobrom 2011. Tedensko smo spremljali rast dreves (višina, premer, število poganjkov) in merili ekofiziološke parametre. S pomočjo meritev transpiracije in vodnega potenciala smo spremljali spremembe vodnega režima v rastlinah, s pomočjo fluorescence klorofila *a* pa vitalnost rastlin. Merili smo tudi temperaturo listov. V času poteka poskusa so potekale tudi meritve abiotskih dejavnikov, ki so se opravljale s pomočjo avtomatske meteorološke postaje, postavljene na mestu poskusa (last Gozdarskega inštituta Slovenije). Tako smo pridobili podatke o temperaturi zraka, relativni zračni vlagi (higrometer), količini padavin in smeri ter hitrosti vetra. S pomočjo teh parametrov smo lahko določili povprečno dnevno temperaturo zraka.

3.2.1 Vzorčenje vode

Vodo smo vzorčili na dotokih in iztokih kontrolnih enot V–RČN in sistema V–FILTER brez dodane soli (RČN–D3, RČN–I4, V–FILTER–D4, V–FITLER–I5) ter na dotoku in iztoku eksperimentalnih enot obeh sistemov s slano vodo (RČN–D1, RČN–I1, RČN–I2,

V–FILTER– D2, V–FILTER– I3). Odvzeti vzorci vode so bili zbrani v sterilne posode in shranjeni na hladnem v hladilniku do laboratorijske analize, ki je bila opravljena v štirih urah.

Vzorci vode so bili analizirani v laboratoriju Centralne čistilne naprave Ajdovščina. Analize so temeljile na standardnih metodah (APHA, AWWA, WEF, 1998) za naslednje parametre: biokemijska potreba po kisiku (BPK₅), določena z manometrično metodo s pomočjo merilnega aparata OxiTop R (WTW, Giessen, Germany), kemijska potreba po kisiku (KPK), določena z dikromatično digestorično metodo (s kalijevim dikromatom v žveplovih kislini in srebrov sulfat kot katalizator), in skupne suspendirane snovi (TSS), določene s filtracijo pod vakuumom, skozi 47 mm debel steklen mikrofibra filter (934–AH Whatman) in po sušenju na konstantni temperaturi 105 °C. Na mestu poteka poskusa smo pH, prevodnost in temperature vode izmerili z aparaturo HI 98128 (instrument ETE MultiLine P4). Zračno temperaturo, zračno vlažnost, količino padavin, solarno energijo, hitrost in smer vetra smo določili z vremensko postajo na samem mestu poskusa.



Slika 9: Oprema in potek vzorčenja v času poskusa na CČN Ajdovščina (Jurše A.)
Figure 9: Equipment and sampling during the experiment at WWTP Ajdovščina (Jurše A.)

Vzorčenje vode in analize so bili narejeni v skladu z dodajanjem slanosti na dotočnih cisternah. Odvzem vzorcev je bil narejen na vsaki dotočni in iztočni enoti sistema V–RČN. Prav tako na dotočni cisterni sistema V–FILTER in na eni iztočni enoti. Ti vzorci so bili nato analizirani v laboratoriju Centralne čistilne naprave Ajdovščina in na Zavodu za zdravstveno varstvo Nova Gorica, in sicer s pomočjo certificiranih nacionalnih standardnih analitičnih metod (DIN, SIST ISO, ISO/DIS, m SIST, MP LC). Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne in iztočne vode, kot so na primer temperatura, pH, električna prevodnost in raztopljeni kisik (DO), so bile tedensko merjene na samem mestu poskusa s pomočjo instrumenta WTW MultiLine P4. Analitične metode za analize kemijske sestave dotočne in iztočne vode so predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Uporabljena metoda za določen parameter
 Table 2: The method used for a particular parameter

Parameter	Metoda	Enota
pH (0,01 M CaCl ₂)	W PH ISO 10523 (conductometer WTW MultiLine P4)	
Električna prevodnost (EC)	W EC ISO 7888 (conductometer WTW MultiLine P4)	mS cm ⁻¹
Biološka potreba po kisiku (BPK ₅)	SIST ISO 5815 (thermostatic cabinet, oximeter WTW)	mg l ⁻¹
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	SIST ISO 6060 (Titrator Mettler)	mg l ⁻¹
Temperatura (°C)	SIST ISO 7888 (conductometer WTW MultiLine P4)	°C
Na ⁺	SIST ISO 8288: 1996 method A (Atomic adsorb. Spectrophotometer Varian Spectra 300 FAAS)	mg l ⁻¹
Cl ⁻		mg l ⁻¹
Mg ²⁺		mg l ⁻¹
K ⁺		mg l ⁻¹
SO ₄ ²⁻	MP LC 022: 2009 (HPLC HP 1050)	mg l ⁻¹
SS		mg l ⁻¹
TP		mg l ⁻¹
TN		mg l ⁻¹
NH ₄ ⁺ -N		mg l ⁻¹
NO ₃ ⁻ -N		mg l ⁻¹

3.2.2 Vzorčenje rastlin in substrata

Lastnosti rastlin, kot so: višina rastline, premer in fotokemična učinkovitost, so bile izmerjene točno določenih petih rastlinah iz vsake enote. Ob koncu poizkusa smo zbrali ves rastlinski material iz enot in ga posušili. Ločeno smo sušili nadzemne in podzemne dele rastlin ter jih ločeno tudi tehtali. Rezultate, pridobljene z merjenjem rastlin iz eksperimentalnih enot, smo primerjali z rezultati rastlin iz kontrolnih enot.

3.2.3 Mikrobiološke analize

S pomočjo Inštituta za fizikalno biologijo (IFB, d. o. o.) smo v okviru mikrobioloških analiz opravili vzorčenje mineralnega substrata iz pilotnega objekta in rizosfere s koreninami ter dotočne in iztočne vode iz enot poskusa. Vzorčenje poskusa je potekalo 2. 9. 2011 v Ajdovščini. Odvzeli so se vzorci dotočne in iztočne vode, vzorci treh faz rastlinskega dela (rizosfere) in vzorci substrata. Vzorčenje je potekalo s pomočjo sterilnih

metod. Vzorci so se hranili na hladnem vse do laboratorija Inštituta za fizikalno biologijo, d. o. o., kjer so vzorce shranili v zamrzovalniku na -18°C .

Iz vsake enote smo odvzeli 6 rastlin s pripadajočo rizosfero. Vzorce smo nato razdelili na tri frakcije: rizosfero, prst ob koreninah in rizoplan oziroma površino korenine. Prav tako se je odvzelo po 1 l vode na vtokih in iztokih ter iz enot, na koncu pa še prst na površini, 10 cm pod površino, na sredini in na dnu enot V–RČN.

Iz vsake enote V–RČN smo vzorčili po 3 rastline s pripadajočo rizosfero, ki smo jo razdelili na 3 vzorce po 21 rastlin (skupaj 63 vzorcev). V posamezni enoti V–RČN smo vzorčili 3 paralelke in 4 plasti, in sicer površino 5–10 cm od vrha, na sredini in na dnu (12 X 7 vzorcev = 84 vzorcev):

- 4 enote = vtok/4 vzorci
- 7 X iztok/7 vzorcev
- skupaj 158 vzorcev

V laboratoriju Inštituta za fizikalno biologijo, d. o. o. smo uporabili optimiziran postopek za čim boljši izkoristek izolacije DNA in RNA s pomočjo kompleta reagentov DNAid ter meritve koncentracije DNA in RNA s pomočjo naprave ter kompleta reagentov Qubit, proizvajalca Invitrogen. Izolirani bakterijski DNA smo nato s pomočjo PCR–tehnike pomnožili dele 16S–zaporedja (Delgado in sod., 2008). Optimizirali smo izbiro primernih začetnih oligonukleotidov in nato z njimi pomnožena 16–S zaporedja detektirali s tehniko denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE). V prvi fazi smo z DGGE določili fragmente, ki smo jim določili natančna zaporedja na podlagi katerih smo identificirali pestrost posameznih mikroorganizmov. S pomočjo PCR–tehnike v realnem času in izolirane DNA smo nato še kvantificirali prisotnost posameznih mikroorganizmov.

Uporabili smo modifikacijo metode izolacije DNA iz korenin in substrata iz čistilnih naprav. Iz substrata smo po standardnem postopku izolirali DNA s pomočjo DNAid kita. Zaradi večjih delcev peska smo morali optimizirati izolacijo mikrobnih celic iz površine delcev. V vodi enake slanosti, v posamezni gredi čistilne naprave, smo uprabili metodo nečnega stresanja, vorteksiranja in ultrazvočno kopel. Po zadnji metodi smo dobili največ

sproščenih celic, ki smo jih potem koncentrirali s pomočjo centrifugiranja. Tako pridobljeni izolant se je uporabil za nadaljnje postopke izolacije DNA. Ko smo optimizirali metodo izolacije DNA, smo izolirali iz vseh vzorcev celokupno DNA.

Podroben opis protokolov in postopkov izolacije DNK iz čistih kultur mikrobakterij vzorcev, merjenja koncentracije DNK v izoliranih vzorcih, agarozna gelska elektroforeza in analize 16S rRNK nukleotidnih zaporedij so podani v prilogi 4.

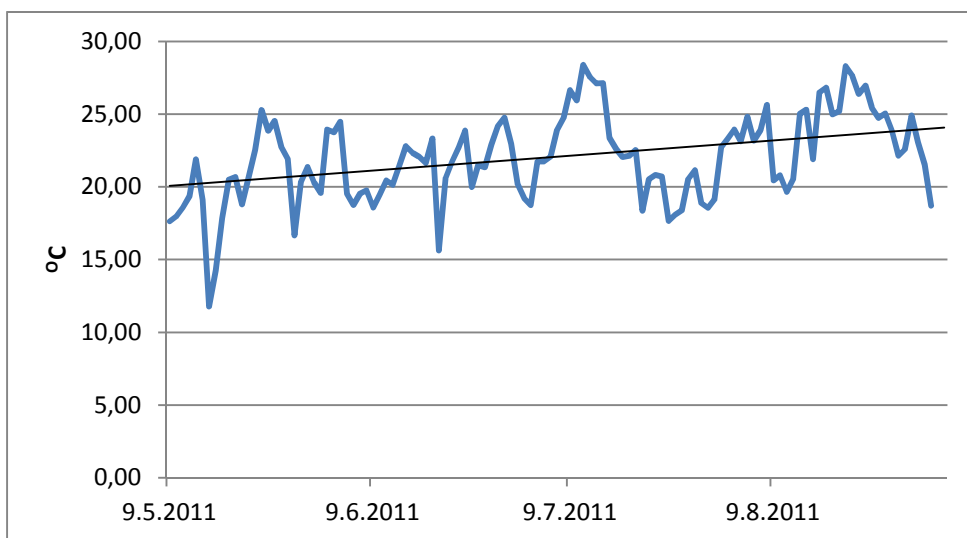
V končne postopke identifikacije bakterij so bili vključeni naslednji vzorci:

- Navadni trst iz V–RČN (4 rastline iz eksperimentalnih enot – 3 % slanost in 4 rastline iz kontrolne enote – 0 % slanost);
- od tega dve rastlini iz posameznih enot na vtoku in dve na iztoku (skupaj 8 rastlin);
- od vsake rastline so se uporabile vse tri vzorčene faze:
 - I. faza: otrepane korenine
 - II. faza: sprane korenine
 - III. faza: korenine

3.3 METEOROLOŠKI PODATKI

Meteorološke podatke za mesto pilotnega objekta smo pridobili neposredno iz avtomatske vremenske postaje Davis, ki je na pol ure beležila podatke o količini padavin, smeri in hitrosti vetra, temperaturi, zračnem tlaku, zračni vlagi itd.

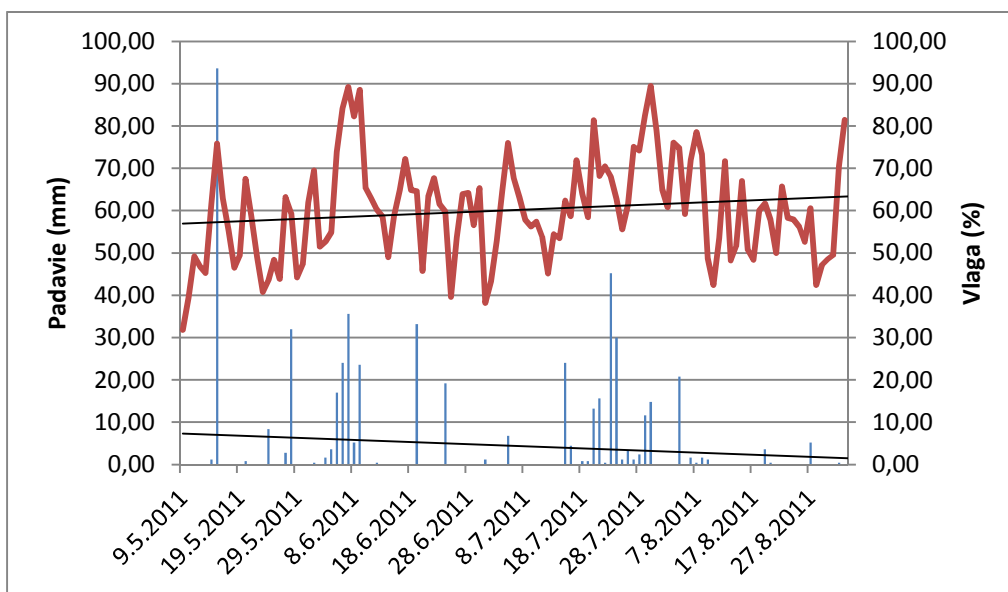
Podatke vremenske postaje smo sproti spremljali in jih ob koncu eksperimenta tudi povzeli ter statistično obdelali. Meritve na meteorološki postaji so potekale od 9. 5. 2011 do 2. 9. 2011.



Slika 10: Povprečne dnevne temperature zraka, izmerjene s pomočjo meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina

Figure 10: Average daily air temperatures measured using a meteorological station in the central wastewater treatment plant Ajdovščina

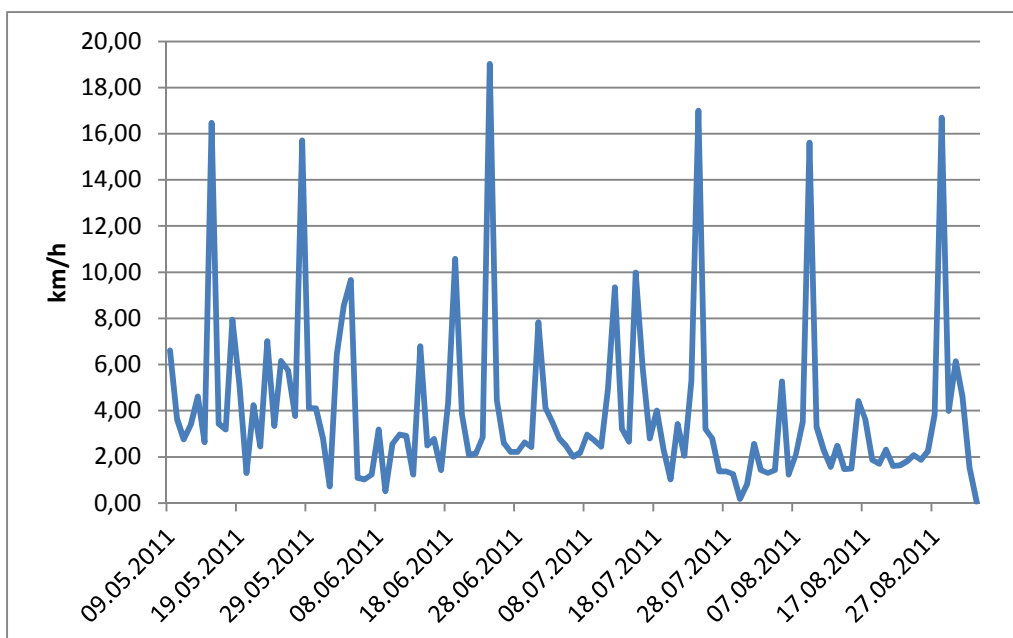
Povprečne dnevne temperature so bile izračunane na klimatološki način, kar pomeni, da je bila povprečna temperatura izračuna iz treh terminskih vrednosti ob 7:00, 14:00 ter ob 21:00. Slika povprečnih dnevni temperatur zraka (slika 10) kaže, da so temperature dnevno močno nihale in da je bila najnižja povprečna temperatura izmerjena 15. maja, ko je dosegla 11,8 °C, najvišja pa 11. julija ko je dosegla 28,4 °C. Linearna trendna črta napovedi temperature zraka nakazuje v obdobju meritev rahlo težnjo naraščanja (slika 10). Slika 11 prikazuje vsoto dnevni temperatur in povprečno dnevno vlago zraka. Količina padavin je proti koncu poskusa upadala. Najmanj padavin je bilo v začetku meseca julija in v mesecu avgustu. Vlažnost zraka je pričakovano narasla ob padavinah in upadla ob suši.



Slika 11: Vsota dnevni padavin (moder graf) in povprečna dnevna vlaga (rdeči graf), izmerjena s pomočjo avtomatske meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina

Figure 11: Average daily air temperatures measured using a meteorological station in the central wastewater treatment plant Ajdovščina

Poskus je bil postavljen na vetrovnem območju v bližini Ajdovščine. To lahko vidimo na sliki 12, ki prikazuje veliko nihanje povprečne hitrosti vetra med dnevi. Velikokrat je hitrost vetra bila tudi čez 16 km/h.



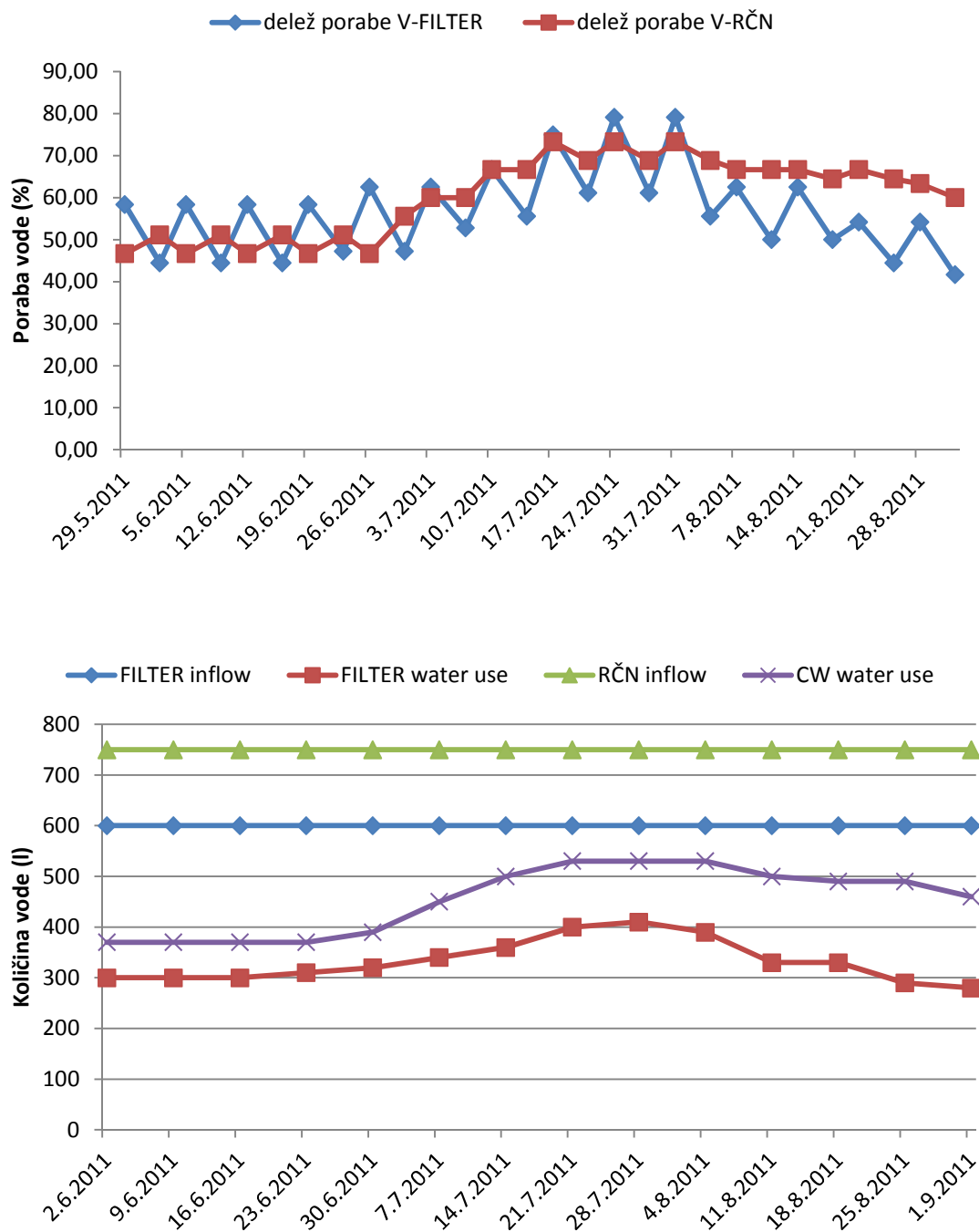
Slika 12: Povprečna dnevna hitrost vetra, izmerjena s pomočjo avtomatske meteorološke postaje pri Centralni čistilni napravi Ajdovščina

Figure 12: The average daily wind speed measured by the automatic meteorological stations in central wastewater treatment plant Ajdovščina

3.4 KOLIČINE DOTOKA VODE V V-RČN IN V-FILTER

Količino vode v dotočnih in iztočnih cisternah smo merili skozi celotno obdobje poteka poskusa. Količino vode na dotokih smo regulirali s pomočjo avtomatskih ur, ki so 5 dni v tednu, 4 ure na dan konstantno dovajale po 120 litrov vode na dan (40 l/h) za sistem V-FILTER in po 150 litrov vode na dan (37,5 l/h) za sistem V-RČN. Dva dneva v tednu pa so bile ure izklopljene, torej ni bilo dodatnega dotoka vode v dotočne cisterne.

Eksperimentalne enote smo polnili z razredčeno dotočno vodo komunalne čistilne naprave (iz primarnega usedalnika), ki smo ji postopoma dodajali raztopino soli (NaCl). Slanost vode smo do konca avgusta 2011 postopno zviševali, in sicer od 1,4 do 11 g/l v V-FILTER in od 4,32 do 30 g/l NaCl v V-RČN. Kot kontrolni objekt smo vzpostavili dve gredi, prvo zasajeno s trstičjem (V-RČN-KONTR), in drugo, zasajeno s topoli (V-FILTER-KONTR), v kateri pa nismo dodajali soli. Vsaka eksperimentalna enota je bila napolnjena z 1 m³ peščenega substrata različnih granulacij. Eksperimentalne enote so bile zasajene konec marca 2011. V času trimesečnega obdobja poteka poskusa je delež porabe vode (evapotranspiracije) dosegel 60,5 % v V-RČN in 55,5 % v V-FILTER glede na količino dodane vode. Z naraščanjem slanosti je poraba vode upadla, kar se je močneje odražalo v V-FILTER (slika 13).



Slika 13: Poraba in količina vode
 Figure 13: Consumption and quantity of water

3.5 ANALIZE OB KONCU POSKUSA

Po koncu poskusa smo izmerili suho maso topolov in navadnega trsta ter opravili preostale analize substrata in rastlin. Na Inštitutu za fizikalno biologijo, d. o. o., smo opravili mikrobiološke analize mineralnega substrata iz enot poskusa. Iz vsake poskusne enote smo vzorčili po tri rastline s pripadajočo rizosfero. Odvzeli smo tudi vzorce vode na vtokih, iztokih in v cisternah ter na koncu še prst na površini, 10 cm pod površino, na sredini in na dnu filtrirne grede (slika 14).

Po vzorčenju rastlinskega materiala iz poskusa so delavci Inštituta za fizikalno biologijo, d. o. o., material prenesli v svoje prostore in ga primerno hranili. V letu 2011 in 2012 smo v laboratorijih Inštituta izvedli modifikacijo metode izolacije DNA iz korenin in substrata iz enot V-RČN. Ko smo optimizirali metodo izolacije DNA, smo izolirali iz vseh vzorcev celotno DNA. Vzorci so bili naslednji:

1. 3 % slanost in 0 % slanost
 - A. faze dveh rastlin na dotoku
 - a. rizosfera
 - b. rizosferna tla
 - c. rizoplan
 - B. faze dveh rastlin na iztoku
 - a. rizosfera
 - b. rizosferna tla rizoplan
 - C. faze substrata na dotoku
 - a. 10 cm od površine
 - b. 50 cm od površine
 - c. 90 cm od površine
 - D. faze substrata na iztoku
 - a. 10 cm od površine
 - b. 50 cm od površine
 - c. 90 cm od površine

Za vse pridobljene vzorce smo nato optimizirali postopek čim boljše izolacije DNA in RNA s pomočjo kompleta reagentov DNAid ter meritve koncentracije DNA in RNA s pomočjo naprave ter kompleta reagentov Qubit. Pridobljeni bakterijski DNA smo s pomočjo tehnike PCR pomnožili dele 16S–zaporedja. Optimizirali smo izbiro primernih začetnih oligonukleotidov in nato z njimi pomnožena 16S–zaporedja detektirali s tehniko denuracijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE). Na koncu so se z optimizirano tehniko izolacije, pomnoževanja in detekcije DNA/RNA identificirali mikroorganizmi, ki so se nahajali v posameznih odvzetih vzorcih. V prvi fazi smo z DGGE določili fragmente, ki smo jim določili natančna zaporedja, na podlagi katerih smo nato identificirali posamezne mikroorganizme. S pomočjo PCR–tehnike v realnem času in izolirane DNA smo nato kvantificirali še prisotnost posameznih mikroorganizmov.



Slika 14: Prikaz nalog ob koncu poskusa (Jurše A.)

Figure 14: Showing tasks at the end of the experiment (Jurše A.)

3.6 STATISTIČNE ANALIZE

Izmerjeni parametri kakovosti vode in rasti rastlin so bili predhodno testirani z enosmernim Levenovim testom homogenosti varianc. Zaradi vpliva različnih dejavnikov so bile razlike med vzorci analizirane z analizo variance (one-way ANOVA). Test Post Hoc Bonfferoni in LSD-test sta bila uporabljena za določanje statistično značilnih razlik znotraj vzorcev. Pri naštetih testih smo verjetnosti značilnih razlik pri 5 % verjetnosti označili z različnimi črkami. Vse statistične analize so bile narejene s pomočjo programskega orodja SPSS for Windows 12.0.0 (StatPoint., USA).

Značilne razlike aritmetičnih sredin merjenih parametrov rasti rastlin (višina, premer in število poganjkov) v vzorcih sistema V-RČN in V-FILTER, do katerih bi lahko prišlo zaradi povišane slanosti ter organske obremenitve dotočne vode, smo med dvema vzorcema določali z dvosmernim Studentovim t-testom enakosti aritmetičnih sredin. Statistično značilne razlike med več kot dvema vzorcema, torej med parametri rasti v eksperimentalnih enotah V-RČN in sistema V-FILTER ter med parametri v kontrolni in eksperimentalni enoti, smo ugotovili z analizo variance (one-way ANOVA) ter s testom Bonfferoni post hoc.

Prav tako smo testirali razlike v parametrih kakovosti vode na dotokih in iztokih kontrolnih in eksperimentalnih enot V-RČN in V-FILTER sistema. Značilne razlike v parametrih smo ugotavljali z analizo variance (one-way ANOVA). Razlike med obravnavami za določen parameter smo testirali s testom LSD post hoc.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE DOTOČNE TER IZTOČNE VODE

Meritve fizikalnih in kemijskih lastnosti dotočne ter iztočne vode so potekale na samem mestu pilotnega objekta od 19. 5. 2011 do 2. 9. 2011. Podatki o splošnih, organskih in preostalih parametrih so podani ločeno za V-RČN in sistem V-FILTER. Podatki so prikazani ločeno za eksperimentalne in kontrolne enote, ki so tudi del poskusa.

4.1.1 Kakovost vode v sistemu V-RČN

Rezultati analize kakovosti dotočne in iztočne vode v sistemu V-RČN so prikazani v preglednici 2. Vrednosti parametra pH se niso statistično značilno razlikovale med različnimi mesti vzorčenja. Srednje vrednosti parametra so bile na dotoku eksperimentalnih enot ter na dotoku kontrolne enote podobne, medtem ko so bile vrednosti pH na iztokih eksperimentalnih enot v povprečju višje od kontrolne enote. Specifična elektroprevodnost se je značilno razlikovala med dotokom eksperimentalne enote (D1) in dotokom ter iztokom kontrolne enote (D3 in I4). Prav tako so se značilno razlikovale vrednosti prevodnosti med iztoki eksperimentalnih enot (I1 in I2) ter kontrolne enote (I4). Med iztokom eksperimentalne enote, zasajene s trstom iz neslanega in slanega okolja, v elektroprevodnosti ni bilo opaznih razlik. Temperatura vode je bila v povprečju v vseh dotokih in iztokih dokaj konstantna ter ni bistveno odstopala med dotoki eksperimentalnih in kontrolnih enot. Značilna razlika je bila opazna pri temperaturi vode med eksperimentalnima iztokoma (I1 in I2) ter kontrolnim dotokom (D3). Koncentracije kisika so bile v vseh enotah nizke in med seboj niso izkazovale bistvenih razlik v povprečnih vrednostih. Koncentracije parametra KPK so bile statistično značilno različne le med dotokom eksperimentalnih enot (D1) in iztokom kontrolne enote (I4). Kljub temu pa so bile vrednosti KPK na iztokih eksperimentalnih enot in kontrolne enote bistveno nižje od dotočnih vrednosti.

Preglednica 3: Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu, zasajenim z navadnim trstom (V–RČN) v mS cm⁻¹, °C, mg l⁻¹. Dotok eksperimentalnih enot D1, iztoka eksperimentalne enote I1 in I2, dotok kontrolne enote D3, iztok kontrolne enote I4. Podatki so aritmetične sredine ± SD (n = 3–15). Različne črke v vrsti predstavljajo statistično značilno razliko parametra med obravnavami pri 5 % verjetnosti (a = D1, b = I1, c = I2, d = D3, e = I4)

Table 3: Physical and chemical properties of the inflow and outflow of water in the system planted with comon reed (V–RČN) in mS cm⁻¹, °C, mg l⁻¹. Inflow of eksperimental unit D1, outflow of eksperimental units I1 in I2, inflow of control unit D3, outflow of control unit I4. Data are arithmetic averages ± SD (n = 3–15). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = D1, b = I1, c = I2, d = D3, e = I4)

Obravnava	V–RČN–EKSP			V–RČN–KONTR	
		V–RČN–1	V–RČN–2		
Parameter	D1	I1	I2	D3	I4
pH	6,6 ± 1,9	7,4 ± 2,1 ^d	7,4 ± 2,2 ^d	5,2 ± 3,3 ^{bce}	7,2 ± 2,1 ^d
Prevodnost	22,8 ± 33,0 ^{de}	27,5 ± 22,7 ^{de}	33,9 ± 28,3 ^{de}	0,3 ± 0,2 ^{abc}	1,4 ± 2,2 ^{acb}
Temperatura	22,3 ± 6,6	23,6 ± 7,0 ^d	23,6 ± 7,1 ^d	17,6 ± 11,4 ^{bce}	24,9 ± 2,5 ^d
Kisik	3,2 ± 2,5	3,6 ± 2,9	3,6 ± 3,0	2,8 ± 2,8	3,3 ± 2,2
KPK	106,0 ± 123,0 ^e	55,6 ± 57,6	51,1 ± 50,4	46,0 ± 35,0	11,0 ± 4,7 ^a
BPK ₅	21,9 ± 27,3 ^{bce}	2,0 ± 1,4 ^a	2,0 ± 1,5 ^a	17,7 ± 21,8	1,5 ± 0,5 ^a
Klorid	7409,0 ± 8056,1 ^{de}	9850,6 ± 8767,4 ^{de}	9232,0 ± 8784,0 ^{de}	5,9 ± 3,7 ^{abc}	8,6 ± 4,8 ^{abc}
Natrij	4469,6 ± 4331,9 ^{de}	5944,0 ± 5925,0 ^{de}	5282,0 ± 4872,7 ^{de}	11,8 ± 12,5 ^{abc}	15,1 ± 11,7 ^{abc}
Neraztopljene snovi	16,7 ± 24,3	3,1 ± 3,3	2,5 ± 2,2	2,4 ± 4,2	1,5 ± 1,4
Usedljive snovi	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Amonijev dušik	2,2 ± 2,3	1,6 ± 1,0	0,7 ± 1,0	0,9 ± 1,6	0,2 ± 0,1
Nitratni dušik	0,5 ± 0,4	0,0 ± 0,5	1,2 ± 1,6	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,8
Celotni dušik	4,5 ± 3,6 ^e	2,5 ± 1,3	2,9 ± 1,4	1,5 ± 2,6	0,5 ± 0,4 ^a
Celotni fosfor	0,8 ± 0,7	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,6
Kalcij	26,3 ± 9,1	42,7 ± 16,0 ^d	33,3 ± 11,0 ^d	9,7 ± 16,7 ^{bce}	34,3 ± 6,5 ^d
Magnezij	10,3 ± 5,1 ^{ce}	21,0 ± 3,5 ^d	23,0 ± 3,5 ^{ad}	2,9 ± 5,1 ^{bce}	29,3 ± 12,6 ^{ad}
Kalij	7,9 ± 5,8	14,2 ± 11,2	14,9 ± 11,7	0,9 ± 1,6	1,0 ± 0,4
Sulfat	6,1 ± 3,9 ^b	14,6 ± 5,2 ^d	10,2 ± 4,4 ^{ad}	0,8 ± 1,4 ^{bce}	8,6 ± 5,9 ^{ad}

Učinkovitost čiščenja, merjena s pomočjo KPK, je bila v povprečju 40,09 % v eksperimentalni V–RČN–1, zasajeni s trsti iz neslanega okolja, in malenkost nižja (37,17 %) v eksperimentalni V–RČN–2, zasajeni s trsti iz slanega okolja. V kontrolni enoti V–RČN je bila učinkovitost zmanjšanja KPK bistveno višja, tj. 74,20 % (priloga A). Koncentracije parametra BPK₅ na dotoku eksperimentalnih enot (D1) so se značilno razlikovale od iztokov (I1, I2 in I4). Razlike v iztočnih vrednostih BPK₅ so bile namreč nižje med eksperimentalnimi in kontrolnimi enotami. Učinkovitost zmanjšanja BPK₅ na

iztoku je tako znašala 88,92 % za eksperimentalno V-RČN, zasajeno s trsti iz neslanega okolja, 83,92 % za eksperimentalno V-RČN, zasajeno s trsti iz slanega okolja in 84,33 % za kontrolno V-RČN (priloga A). Koncentracije Cl⁻ in Na⁻ ionov na dotoku eksperimentalne enote (D1) so bile značilno različne od dotoka kontrolne enote (D3) ter iztoka kontrolne enote (I4). Med dotokom in iztoki eksperimentalnih enot pa ni bilo statistično značilnih razlik. Vrednosti Cl⁻ in Na⁻ ionov na iztokih so bile višje kot na dotokih, torej ni bilo zaznati zmanjševanja ionov na iztokih. Koncentracije Ca so bile značilno različne med dotokom kontrolne enote (D3) in iztokom kontrolne enote (I4) ter iztokoma eksperimentalnih enot (I1 in I2). Koncentracije Mg na dotoku kontrolne enote (D1) so bile značilno različne z iztokom eksperimentalne enote I2 in iztokom kontrolne enote (I4). Prav tako so bile v vrednostih Mg statistično značilne razlike med dotokom in iztokom kontrolne enote. Vrednosti sulfata na dotoku eksperimentalne enote (D1) so bile statistično značilno različne med iztokom eksperimentalne enote I2 in kontrolne enote (I4). Značilne razlike so se pokazale tudi v vrednostih sulfata med dotokom in iztokom kontrolne enote (preglednica 2).

4.1.2 Kakovost vode v sistemu V-FILTER

Rezultati analize kakovosti dotočne in iztočne vode v sistemu V-FILTER so prikazani v preglednici 3. Vrednosti parametra pH se niso statistično značilno razlikovale med različnimi mesti vzorčenja, le da so bile srednje vrednosti parametra na dotoku eksperimentalnih enot višje od vrednosti, dosežene na dotoku kontrolne enote. Specifična elektroprevodnost je bila značilno različna med dotokom eksperimentalne enote (D2) in dotokom kontrolne enote (D4), medtem ko razlik med dotokom ter iztokom eksperimentalne enote ni bilo zaznati. Povprečne vrednosti temperature vode v eksperimentalnih enotah niso bile statistično značilno različne. Te razlike so se izkazale v kontrolni enoti, kjer je bila povprečna temperatura na dotoku bistveno nižja od iztočnih vrednosti. Pri vsebnosti raztopljenega kisika v vodi so se pokazale statistično značilne razlike v kontrolni enoti med dotokom in iztokom. Koncentracije parametra KPK so se značilno razlikovale med dotokom eksperimentalne enote (D2) in iztokom eksperimentalne enote (I3) ter iztokom kontrolne enote (I5). Podobno se je pokazalo pri parametru BPK₅, kjer so bile bistvene razlike med dotokom eksperimentalne enote (D2) in iztokom

eksperimentalne enote (I3) ter iztokom kontrolne enote (I5). V eksperimentalnih enotah sistema V-FILTER je učinkovitost čiščenja dosegla 56,19 % in 87,84 % zmanjšanje KPK ter BPK₅ in 71,46 % ter 86,96 % zmanjšanje KPK in BPK₅ v kontrolnih enotah (priloga A). Koncentracije Cl⁻ in Na⁻ ionov so bile statistično značilno različne med dotokom eksperimentalnih enot ter dotokom in iztokom kontrolne enote. Razlik med dotokom in iztokom eksperimentalnih enot ni bilo zaznati. Koncentracije Cl⁻ in Na⁻ ionov so bile na iztokih višje od vrednosti na dotokih. Statistično značilne razlike so se pokazale pri vrednosti sulfata, in sicer med dotokom ter iztokom eksperimentalne enote.

Preglednica 4: Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu zasajenim s kloni topolov (V-FILTER) v mS cm⁻¹, °C, mg l⁻¹. Dotok eksperimentalne enote D2, iztok eksperimentalne enote I3, dotok kontrolne enote D4, iztok kontrolne enote I5. Podatki so aritmetične sredine ± SD (n = 15 ali 7 ali 3). Različne črke v vrsti predstavljajo statistično značilno razliko parametra med obravnavami pri 5 % verjetnosti (a = D2, b = I3, c = I2, d = D4)

Table 4: Physical and chemical properties of the inflow and outflow of water in the system planted with poplars (V-FILTER) in mS cm⁻¹, °C, mg l⁻¹. Inflow of eksperimental unit D2, outflow of eksperimental units I3, inflow of control unit D4, outflow of control unit I5. Data are arithmetic averages ± SD (n = 15 or 7 or 3). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = D2, b = I3, c = I2, d = D4)

Obravnava	V- FILTER- EKSP		V- FILTER- KONTR	
	D2	I3	D4	I5
pH	6,6 ± 1,9	7,4 ± 2,1	5,7 ± 3,0	7,1 ± 2,0
Prevodnost	11,1 ± 11,6 ^{cd}	11,4 ± 9,4 ^{ce}	0,3 ± 0,2 ^{ab}	0,7 ± 1,0 ^{ab}
Temperatura	21,9 ± 6,4	25,2 ± 2,8 ^c	19,1 ± 10,2 ^{bd}	25,0 ± 2,6 ^c
Kisik	2,7 ± 2,6	3,6 ± 2,3	2,2 ± 2,6	4,4 ± 2,6
KPK	91,6 ± 89,6 ^{bcd}	31,1 ± 27,8 ^a	37,1 ± 27,2 ^a	11,6 ± 7,0 ^a
BPK ₅	25,0 ± 25,2 ^{bd}	2,3 ± 1,9 ^a	13,2 ± 11,3	1,9 ± 1,9 ^a
Klorid	3173,3 ± 3421,9 ^{cd}	3534,0 ± 3216,2 ^{cd}	10,4 ± 5,4 ^{ab}	14,4 ± 8,6 ^{ab}
Natrij	1841,0 ± 2082,8 ^{cd}	1982,6 ± 1532,7 ^{cd}	13,8 ± 8,2 ^{ab}	12,7 ± 6,9 ^{ab}
Neraztopljene snovi	3,8 ± 6,6	1,2 ± 2,0	0,5 ± 0,8	0,9 ± 1,5
Usedljive snovi	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Amonijev dušik	2,0 ± 2,2	0,01 ± 0,01	1,7 ± 2,9	0,01 ± 0,01
Nitratni dušik	0,3 ± 0,5	1,9 ± 1,9	0,2 ± 0,4	0,01 ± 0,01
Celotni dušik	4,4 ± 4,8	2,4 ± 2,4	3,3 ± 4,0	0,1 ± 0,12
Celotni fosfor	0,9 ± 0,9	0,04 ± 0,01	0,5 ± 0,6	0,02 ± 0,02
Kalcij	20,0 ± 17,4	35,3 ± 11,6	22,7 ± 20,5	20,7 ± 18,0
Magnezij	4,8 ± 4,3	23,0 ± 5,6	6,2 ± 5,4	16,7 ± 17,6
Kalij	4,2 ± 3,6	3,8 ± 4,7	1,9 ± 2,3	1,3 ± 1,2
Sulfat	3,1 ± 2,7 ^b	12,7 ± 1,2 ^a	3,5 ± 4,3	8,2 ± 8,5

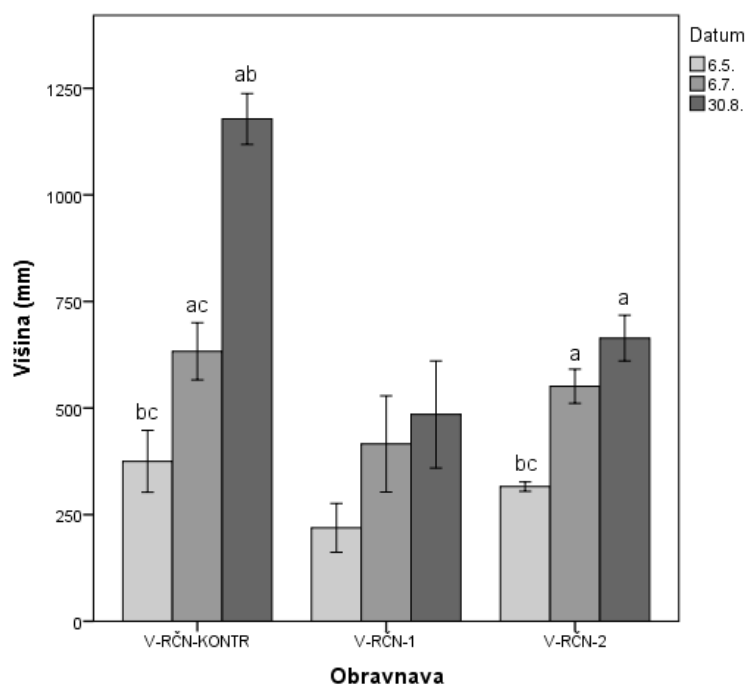
4.4 ODZIV NAVADNEGA TRSTA

4.4.1 Morfološke značilnosti in ekofiziološki odziv

Na osebkih navadnega trsta smo na petih, naključno izbranih rastlinah izvajali ponavljajoče se meritve parametra višine stbla, premera in števila poganjkov. Meritve so potekale skupno v 17 različnih dnevih od maja do konca septembra 2011. Povišana slanost dotočne vode v eksperimentalnih enotah in povišana biološka obremenitev vode sta vplivali na premer, višino ter število izmerjenih trstov. V kontrolni enoti so bili premer, višina in število poganjkov v povprečju večji kot v eksperimentalnih enotah (priloga B).

4.4.1.1 Višina poganjka, premer stbla in število poganjkov

V povprečnih višinah navadnega trsta so se statistično značilne razlike pokazale med kontrolno enoto (V-RČN-KONTR) in obema eksperimentalnima enotama (V-RČN-1 in V-RČN-2). Prav tako so se pokazale značilne razlike v višinah obeh eksperimentalnih enot, le da je navadni trst iz slanega okolja, zasajen v enoti V-RČN-2, imel v povprečju višje glavne poganjke kot navadni trst iz enote V-RČN-1 iz neslanega okolja (slika 15).



Slika 15: Višine najvišjega poganjka (mm) navadnega trsta v času vzorčenja: 6. 5., 6. 7. in 30. 8., v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trsti iz neslanega okolja (V-RČN-1) in v eksperimentalni enoti navadni trsti iz slanega okolja (V-RČN-2). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.)

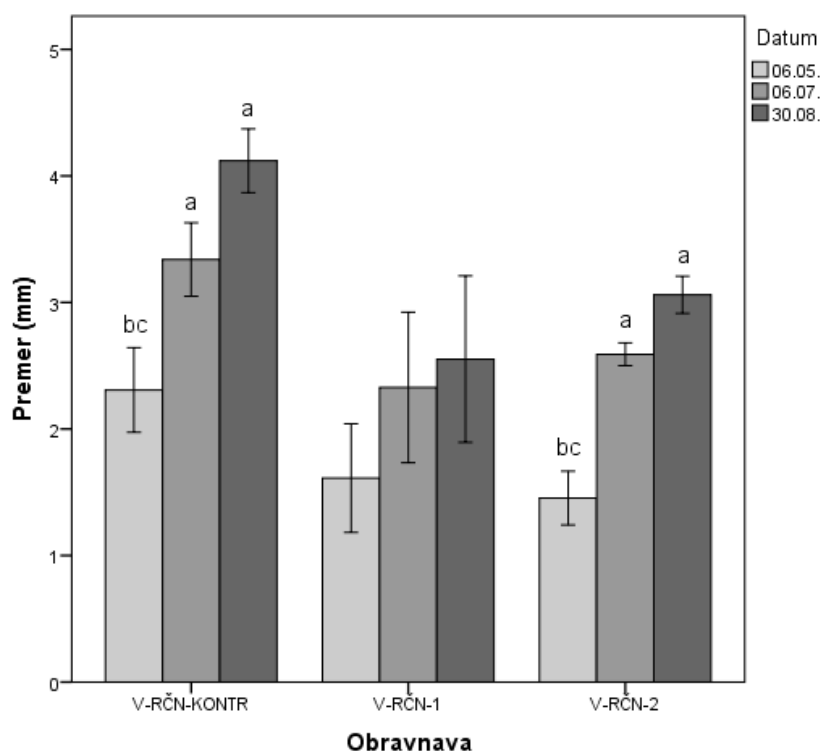
Figure 15: High of the main shoot (mm) of common reed in the time of sampling 6. 5., 6. 7. and 30. 8., in control unit (V-RČN-KONTR), in experimental unit with reed from non-salty environmental (V-RČN-1) and in experimental unit with common reed from salty environmental (V-RČN-2). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.)

V času prvega vzorčenja (6. 5. 2011) so bili trsti v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR) v povprečju visoki 375,0 mm, v času drugega vzorčenja (6. 7. 2011) so bili trsti v povprečju visoki 633,0 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 1178,0 mm. Povprečna višina trstov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 258,0 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina trstov povišala za 545,0 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med drugim in tretjim vzorčenjem. Razlike v višini poganjka navadnega trsta so bile tudi med drugim in tretjim vzorčenjem.

V eksperimentalni enoti 1 (V-RČN-1) so bili trsti v času prvega vzorčenja (6. 5. 2011) v povprečju visoki 219,0 mm, v času drugega vzorčenja (6. 7. 2011) so bili trsti v povprečju visoki 416,0 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 485,0 mm. Povprečna višina trstov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 197,0 mm. Med drugim in tretjim

vzorčenjem pa se je višina trstov povišala za 69,0 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo. V eksperimentalni enoti 1 (V-RČN-2) so bili trsti v času prvega vzorčenja (6. 5. 2011) v povprečju visoki 315,8 mm, v času drugega vzorčenja (6. 7. 2011) so bili trsti v povprečju visoki 551,0 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 664,0 mm. Povprečna višina trstov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 235,2 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina trstov povišala za 113,0 mm. Statistično značilnih razlik med časi vzorčenja ni bilo (slika 15).

Povprečni premeri trsta so bili v povprečju v kontrolni enoti višji kot v eksperimentalnih enotah. Medtem ko je med eksperimentalnimi enotami najvišje vrednosti premera dosegal navadni trst v enoti V-RČN-2 (navadni trst iz slanega okolja). Statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih premera poganjka so se pokazale tudi med kontrolno in obema eksperimentalnima enotama (slika 16).

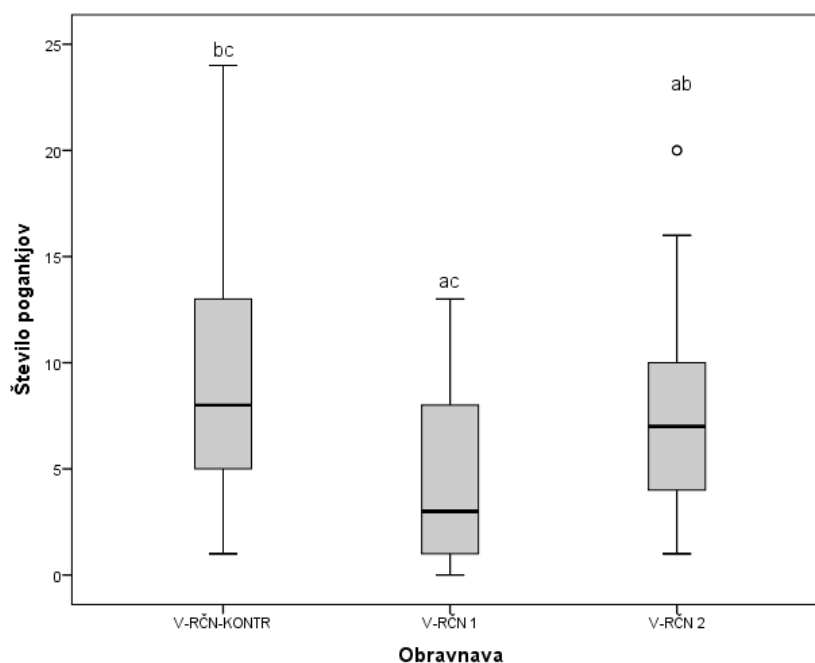


Slika 16: Premer najvišjega poganjka (mm) navadnega trsta v času vzorčenja: 6. 5., 6. 7. in 30. 8., v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trst iz neslanega okolja (V-RČN-1) in v eksperimentalni enoti navadni trst iz slanega okolja (V-RČN-2). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.)

Figure 16: Average values of the diameter of the main shoot (mm) common reed the time of sampling 6. 5., 6. 7. and 30. 8., in control unit (V-RČN-KONTR), in eksperimental unit with reed from non-salty environmental (V-RČN-1) and in eksperimental unit with reed from salty environmental (V-RČN-2). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level; n = 5 (a = 6. 5., b = 6. 7., c = 30. 8.)

Povprečni premer najvišjega poganjka merjenih trstov v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR) v času prvega vzorčenja (6. 5. 2011) je znašal 2,31 mm, v času druge meritve (7. 6. 2011) je povprečni premer znašal 3,34 mm ter ob koncu meritev 4,12 mm. Premer se je med prvim in drugim vzorčenjem povečal za 1,03 mm, med drugim in zadnjim vzorčenjem pa za 0,78 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa ni bilo razlik. V eksperimentalni enoti 1 (V-RČN-1) je povprečni premer trstov v času prvega vzorčenja znašal 1,61 mm, v času drugega vzorčenja 2,33 mm ter v času zadnjega vzorčenja 2,55 mm. Razlike v premeru med prvim in drugim vzorčenjem so bile 0,72 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem so bile te razlike zelo majhne, in sicer 0,17 mm. Statistično značilne razlike med časi vzorčenja ni bilo. V eksperimentalni enoti 2

(V-RČN-2) je povprečni premer trstov v času prvega vzorčenja znašal 1,5 mm, v času drugega vzorčenja 2,6 mm ter v času zadnjega vzorčenja 3,1 mm. Razlike v premeru med prvim in drugim vzorčenjem so bile 1,1 mm, med drugim in tretjim vzorčenjem pa so bile te razlike 0,47 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo. Najvišje število poganjkov je v povprečju dosegel navadni trst v kontrolni enoti, med eksperimentalnima enotama pa v enoti V-RČN-2. Razlike v povprečnem številu poganjkov med obravnavami so bile statistično značilne med kontrolno in obema eksperimentalnima enotama (slika 16).



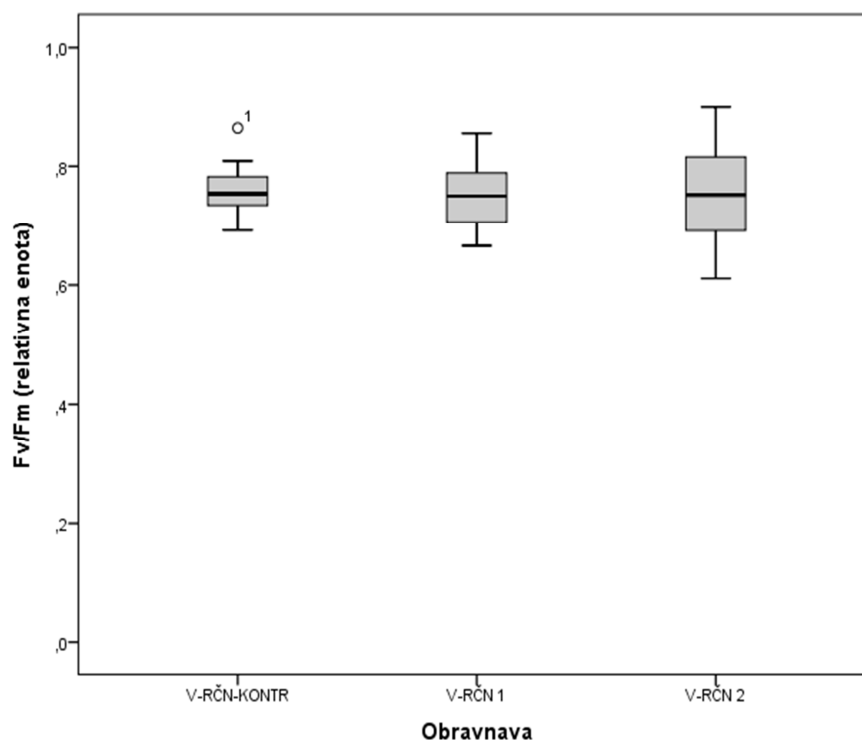
Slika 17: Povprečno število poganjkov (relativno število) navadnega trsta v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti navadni trst iz neslanega okolja (V-RČN-1) in v eksperimentalni enoti navadni trst iz slanega okolja (V-RČN-2). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, izstopajoče vrednosti, n = 85. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti (a = V-RČN-KONTR, b = V-RČN-1, c = V-RČN-2)

Figure 17: Average values of the number of shoots (relative number) common reed in control unit (V-RČN-KONTR), in eksperimental unit with reed from non-salty environmental (V-RČN-1) and in eksperimental unit with reed from salty environmental (V-RČN-2). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maksimum values, outstanding values, n = 85. Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level verjetnosti (a = V-RČN-KONTR, b = V-RČN-1, c = V-RČN-2)

4.4.1.2 Fluorescenca klorofila a

Meritve fluorescence klorofila a smo izvedli trikrat, in sicer junija ter dvakrat v avgustu 2011. Potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema (FS) II (parameter F_v/F_m) in dejansko fotokemično učinkovitost (Yield) smo merili vedno na istih petih naključno izbranih rastlinah navadnega trsta v vsaki enoti posebej.

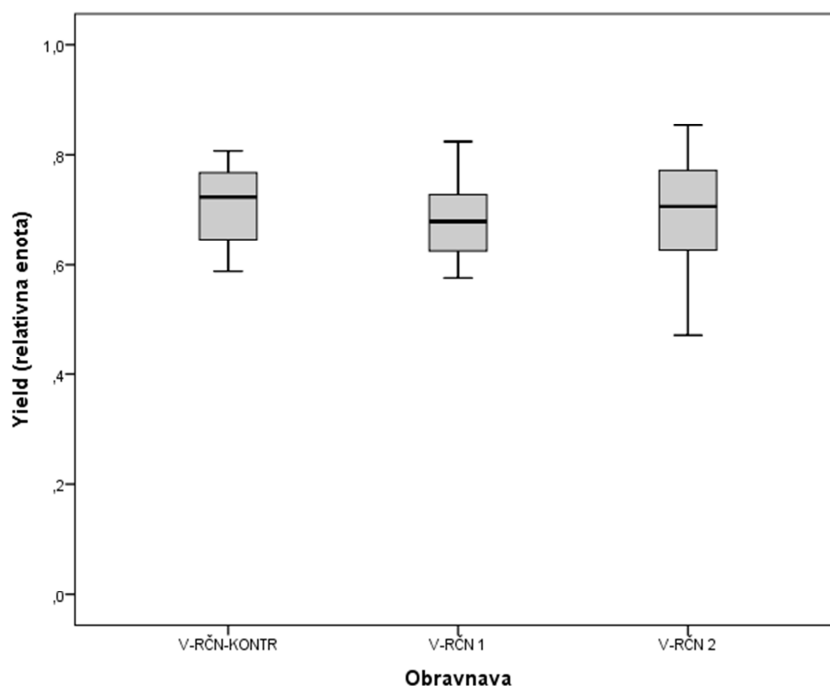
Aritmetične sredine potencialne fotokemične učinkovitosti FS II med obravnavami med seboj niso bile statistično značilno različne (slika 18), kljub temu da kontrolna enota (V-RČN-KONTR) izkazuje najvišjo povprečno izmerjeno vrednost. Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti FS II vseh obravnav so bile v juniju v povprečju višje od ostalih dveh meritev. V kontrolni enoti in drugi eksperimentalni enoti je bila najnižja izmerjena vrednost v sredini avgusta (12. 8.), ko je bila koncentracija dodane soli visoka, v razmerah visoke temperature zraka in brez padavin. Medtem ko je bila pri prvi eksperimentalni enoti najnižja dosežena vrednost konec avgusta (30. 8.) (priloga C).



Slika 18: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri navadnem trstu v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti V-RČN-1 (navadni trst iz neslanega okolja) in V-RČN-2 (navadni trst iz slanega okolja). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, $n = 15$

Figure 18: Average values of potential photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter F_v/F_m) in common reed in control unit (V-RČN-KONTR), in experimental unit V-RČN-1 (reed from non-salty environmental) and in V-RČN-2 (reed from salty environmental). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maximum values, outliers, $n = 15$

Aritmetične sredine dejanske fotokemične učinkovitosti med obravnavami se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (slika 19), kljub temu da je izmerjena povprečna vrednost v kontrolni enoti višja od obeh eksperimentalnih. Vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti v juniju so bile v povprečju višje od ostalih dveh meritev. Najnižji vrednosti sta bili izmerjeni sredi avgusta (12. 8.) v kontrolni in prvi eksperimentalni enoti, ko je bila koncentracija dodane soli visoka ter v pogojih visoke temperature zraka in brez padavin. V drugi eksperimentalni enoti pa je bila najnižja vrednost izmerjena konec avgusta (30. 8.) (priloga C).

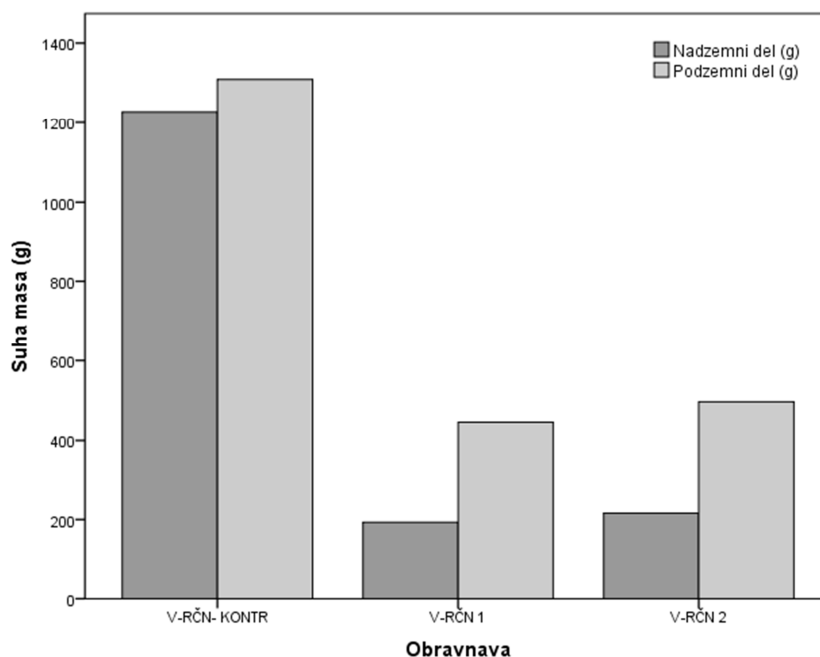


Slika 19: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter Yield) pri navadnem trstu v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti V-RČN-1 (navadni trst iz neslanega okolja) in V-RČN-2 (navadni trst iz slanega okolja). Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 15

Figure 19: Average values of the actual photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter Yield) in common reed in control unit (V-RČN-KONTR), in experimental unit V-RČN-1 (reed from non-salty environmental) and in V-RČN-2 (reed from salty environmental). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maximum values, outliers, n = 15

4.4.1.3 Suha masa

Meritve suhe biomase so potekale v decembru 2011. V tem času se je ves rastlinski material dobro posušil na sobni temperaturi, ločen na nadzemne in podzemne dele navadnega trsta. Vsota suhe biomase podzemnih delov trsta je bila večja od skupne teže suhe biomase nadzemnih delov (slika 20). Masa nadzemnih delov trsta je bila med 193,2 g v eksperimentalni enoti, zasajeni s trstom iz slanega okolja (V-RČN-2), in 1227,7 g v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR). Podobna težnja se je pokazala tudi pri podzemnih delih trsta, kjer je bila suha teža med 445,3 g v eksperimentalni enoti, zasajeni s trstom iz slanega okolja (V-RČN-2), in 1309,0 g v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR) (slika 20).



Slika 20: Vsota suhe biomase nadzemnih in podzemnih delov navadnega trsta ob koncu eksperimenta v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR) in v eksperimentalnih enotah (V-RČN 1, V-RČN 2), $n = 3$

Figure 20: The sum of the dry biomass aboveground and underground parts of an common reed at the end of the experiment in the control unit (V-RČN-KONTR) and in eksperimental units (V-RČN-1, V-RČN-2), $n = 3$

4.5 ODZIV KLONOV TOPOLA

4.5.1 Morfološke značilnosti in ekofiziološki odziv

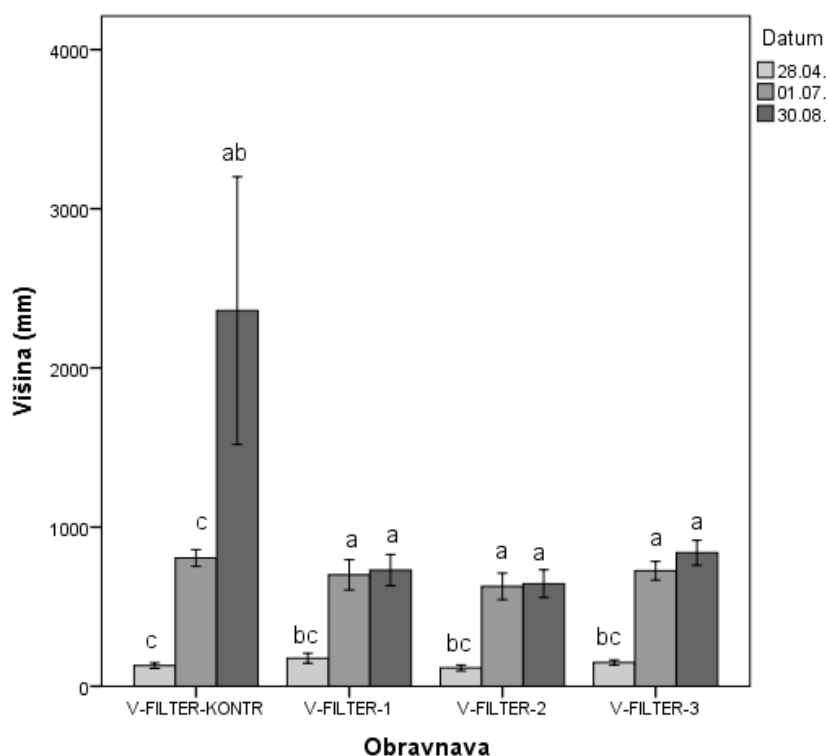
Na vseh osebkih klonov topola smo izvajali ponavljajoče se meritve višine stebela, premera in števila poganjkov. Meritve vseh parametrov so potekale vedno na istih rastlinah oz. so bile meritve izvedene na vseh rastlinah znotraj ene obravnave oz. enote. V kontrolni enoti so vsi kloni dosegli najvišji povprečni premer poganjka. Enako velja za višino poganjka in število poganjkov (preglednica 4).

4.5.1.1 Višina poganjka, premer stebela in število poganjkov

Povprečne vrednosti parametrov rasti klonov topola so bile v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) višje kot v eksperimentalnih enotah. Povprečne vrednosti premerov glavnega poganjka so bile najvišje v kontrolni enoti in najnižje v prvi eksperimentalni enoti (V-FILTER-1). Povprečne vrednosti višine glavnega poganjka so bile prav tako

najvišje v kontrolni enoti in najnižje v drugi eksperimentalni enoti (V-FILTER-2). Povprečne vrednosti številka poganjkov na eno rastlino so bile tudi najvišje v kontrolni enoti in najnižje v tretji eksperimentalni enoti (V-FILTER-3) (slika 21).

V času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) so bili kloni topolov v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) v povprečju visoki 129,4 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) so bili trsti v povprečju visoki 806,0 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 2360,31 mm. Povprečna višina navadnih trstov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 676,6 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina navadnih trstov povišala za 1554,3 mm. Statistične razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med drugim in tretjim vzorčenjem. Razlike so bile tudi med drugim in tretjim vzorčenjem. V eksperimentalni enoti 1 (V-FILTER-1) so bili kloni topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v povprečju visoki 176,0 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) so bili navadni trsti v povprečju visoki 700,0 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 729,4 mm. Povprečna višina topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 524,0 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina topolov povišala za 29,0 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Statistično značilnih razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo. V eksperimentalni enoti 2 (V-FILTER-2) so bili kloni topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v povprečju visoki 115,0 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) so bili topoli v povprečju visoki 627,2 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 644,1 mm. Povprečna višina topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 512,2 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina topolov povišala za 16,9 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo. V eksperimentalni enoti 3 (V-FILTER-3) so bili kloni topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v povprečju visoki 149,0 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) so bili topoli v povprečju visoki 725,3 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 938,4 mm. Povprečna višina topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povišala za 576,0 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa se je višina topolov povišala za 113,13 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med prvim in tretjim vzorčenjem. Statistično značilnih razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo (slika 21).

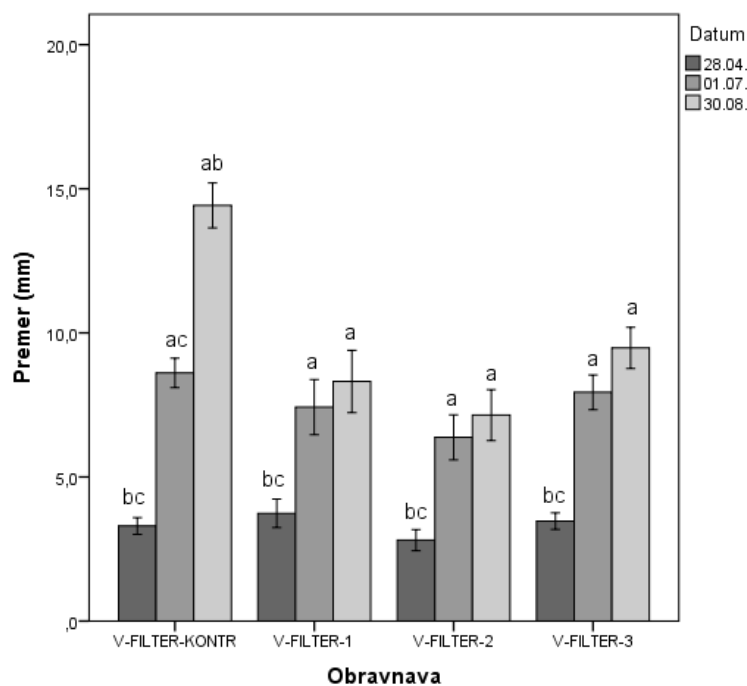


Slika 21: Višine glavnega poganjka (mm) klonov topola v času vzorčenja: 28. 4., 1. 7. in 30. 8., v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 16 (a = 28. 4., b = 1. 7., c = 30. 8.)

Figure 21: High of the main shoot (mm) of populus clones in the time of sampling 28. 4., 1. 7. and 30.8., in control unit (V-FILTER-KONTR) and in experimental units (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level; n = 16 (a = 28. 4., b = 1. 7., c = 30. 8.)

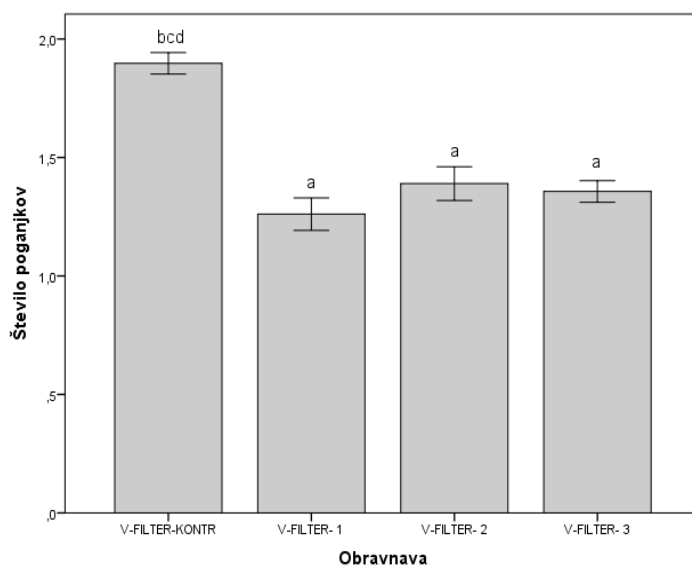
Povprečni premeri glavnega poganjka klonov topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) so bili v povprečju 3,3 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) v povprečju 8,6 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 14,4 mm. Premer poganjka topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povečal za 5,3 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa za 5,8 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med drugim in tretjim vzorčenjem. Statistično značilne razlike so bile tudi med drugim in tretjim vzorčenjem. Povprečni premeri glavnih poganjkov klonov topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v eksperimentalni enoti 1 (V-FILTER-1) so bili v povprečju 3,7 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) v povprečju 7,4 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 8,3 mm. Premer poganjka topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povečal za 3,7 mm. Med drugim in tretjim

vzorčenjem pa za 0,9 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med drugim in tretjim vzorčenjem. Statistično značilnih razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo. Povprečni premer glavnih poganjkov klonov topola v času prvega vzorčenja (28. 4. 2011) v eksperimentalni enoti 2 (V-FILTER-2) so bili v povprečju 2,8 mm, v času drugega vzorčenja (1. 7. 2011) v povprečju 6,4 mm ter na zadnji dan vzorčenja (30. 8. 2011) 7,1 mm. Premer poganjka topolov se je med prvim in drugim vzorčenjem povečal za 3,6 mm. Med drugim in tretjim vzorčenjem pa za 0,6 mm. Statistično značilne razlike so bile med prvim in drugim vzorčenjem ter med drugim in tretjim vzorčenjem. Statistično značilnih razlik med drugim in tretjim vzorčenjem ni bilo (slika 22).



Slika 22: Premer glavnega poganjka (mm) klonov topola v času vzorčenja: 28. 4., 1. 7. in 30. 8., v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike v višinah med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n= 16 (a = 28. 4., b = 1. 7., c = 30. 8)

Figure 22: Diameter of main shoot (mm) of populus clones in the time of sampling 28. 4., 1. 7. and 30. 8., in control unit (V-FILTER-CONTR) and in experimental units (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level; n=16 (a = 28.4., b = 1. 7., c = 20.8)



Slika 23: Povprečne vrednosti števila poganjkov topolov za kontrolno enoto (V-FILTER-KONTR) in vse eksperimentalne enote (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Grablje predstavljajo standardno napako, različne črke pa statistične razlike med obravnavami pri 5 % verjetnosti; n = 288 (višina, premer) ali 272 (število poganjkov) (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-1, c = V-FILTER-2, d = V-FILTER-3)

Figure 23: Average values of the high of the main shoot (mm) of populus in control unit (V-FILTER-CONTR) and in eksperimental units (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maksimum values, n = 85. Bars represents standard deviation, different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level; n = 288 (high, diameter) or 272 (number of shoots) (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-1, c = V-FILTER-2, d = V-FILTER-3)

Med obravnavami smo ugotovili statistično značilne razlike premerov glavnega poganjka med kontrolno (V-FILTER-KONTR) in vsemi eksperimentalnimi enotami. Vsi kloni so dosegli najvišje poganjke v kontrolni enoti, najnižje pa v V-FILTER-2. Med obravnavami so bile opazne statistično značilne razlike, tako med kontrolno kot med vsemi eksperimentalnimi enotami. Prav tako so bile statistično značilne razlike v višinah poganjka ugotovljene med vsemi eksperimentalnimi enotami (slika 21).

Preglednica 5: Povprečne višine glavnega poganjka in standardna napaka, premer stebela in število poganjkov, za vse klone topolov v kontrolnih (V-FILTER-KONTR) in eksperimentalnih enotah skupaj (V-FILTER-EKSP). Različna črka v vrsti pomeni statistično značilne razlike med kloni pri 5 % verjetnosti (a = Lux, b = Guardi, c = I-214, d = Vilafranca)

Table 5: Average stem high and standard error, diameter of stem and number of shoots, for all clones in control unit (V-FILTER-KONTR) and in experimental units together (V-FILTER-EKSP). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = Lux, b = Guardi, c = I-214, d = Vilafranca)

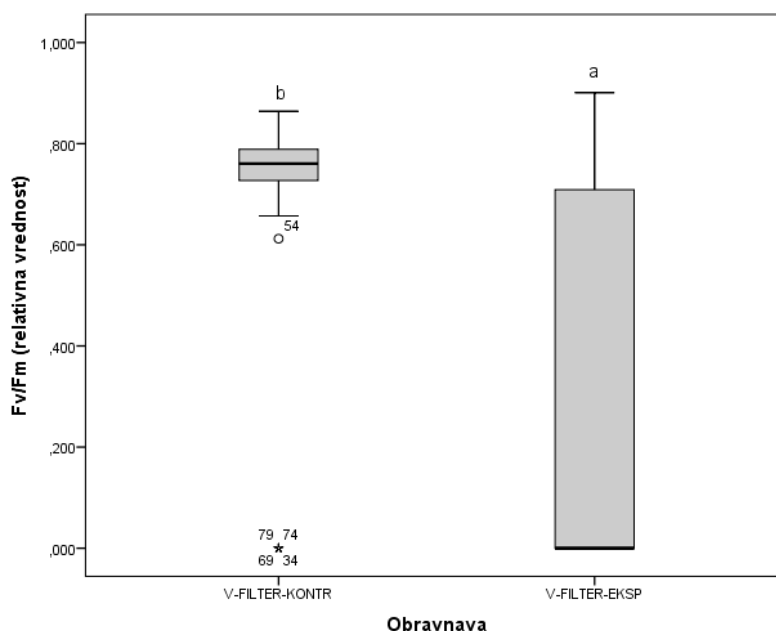
Obravnava / klon	Lux	Guardi	I-214	Vilafranca
Višina (mm)				
V-FILTER-KONTR	820,5 ± 57,2	1090,1 ± 203,3	853 ± 66,8	930,8 ± 41,2
V-FILTER-EKSP	534 ± 23,1 ^{bd}	387,8 ± 23,8 ^{acd}	568,6 ± 28,4 ^b	654,9 ± 24,7 ^{ab}
Premer (mm)				
V-FILTER-KONTR	8,9 ± 0,5	7,8 ± 0,4 ^c	10,5 ± 4,8 ^b	9,1 ± 0,5
V-FILTER-EKSP	6,2 ± 0,2 ^c	6,3 ± 0,2 ^c	8 ± 0,2 ^{abd}	7 ± 0,3 ^c
Število poganjkov				
V-FILTER-KONTR	1,7 ± 0,1 ^{bd}	2,1 ± 0,1 ^{ac}	1,5 ± 0,1 ^{bd}	2,3 ± 0,1 ^{ac}
V-FILTER-EKSP	1,5 ± 0,8 ^b	1 ± 0,1 ^{acd}	1,2 ± 0,6 ^{bd}	1,7 ± 0,8 ^{bc}

Najvišje povprečne vrednosti višine poganjka izmed vseh klonov je dosegal klon Guardi, najnižje pa klon Vilafranca. Najvišje povprečne vrednosti premera poganjka izmed vseh klonov je dosegal klon Vilafranca, najnižje pa klon I-214. Isto velja za povprečno vrednost števila poganjkov. S testom post hoc smo ugotovili razlike v povprečnih višinah poganjkov med kloni znotraj vseh eksperimentalnih enot. Pri povprečni višini poganjka so se pokazale razlike med vsemi kloni. Enako velja za povprečne vrednosti premerov in število poganjkov (preglednica 5).

4.5.1.2 Fluorescenca klorofila a

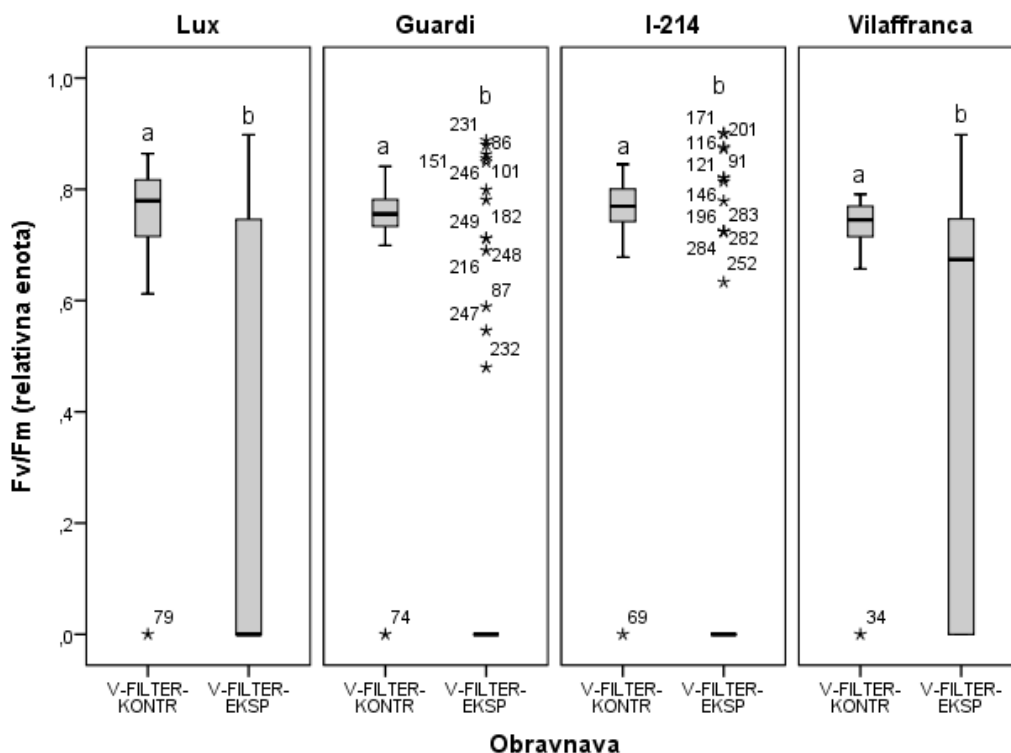
Meritve fluorescence klorofila a v sistemu V-FILTER smo izvedli petkrat, in sicer enkrat v juliju, dvakrat v avgustu in enkrat v septembru 2011. Potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema FS II (Fv/Fm) in dejansko fotokemično učinkovitost (Yield) smo merili na vseh klonih topola v vsaki enoti posebej. Vrednosti parametra Fv/Fm so bile v povprečju v vseh enotah pod mejo 0.83, kar pomeni, da so bile rastline v času meritev občasno izpostavljene prehodnemu stresu. Pri večini meritev je dejanska fotokemična učinkovitost manjša od potencialne.

Aritmetične sredine potencialne fotokemične učinkovitosti FS II med obravnavami niso bile statistično značilno različne (priloga C). Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti FS II vseh obravnav so bile v juliju v povprečju višje od vseh ostalih meritev. V kontrolni enoti in vseh eksperimentalnih enotah so bile najnižje izmerjene vrednosti dosežene proti koncu avgusta (26. 8.) (priloga C). Aritmetične sredine potencialne fotokemične učinkovitosti FS II (F_v/F_m) so bile med kontrolno in vsemi eksperimentalnimi enotami statistično značilno različne (slika 24). Prav tako so bile značilne razlike med kontrolno in eksperimentalnimi obravnavami znotraj ene vrste klona (slika 25).



Slika 24: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter F_v/F_m) pri vseh topolih v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, $n = 80$ (V-FILTER-KONTR) in $n = 240$ (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji pri 5 % verjetnosti ($a = V-FILTER-KONTR$, $b = V-FILTER-EKSP$)

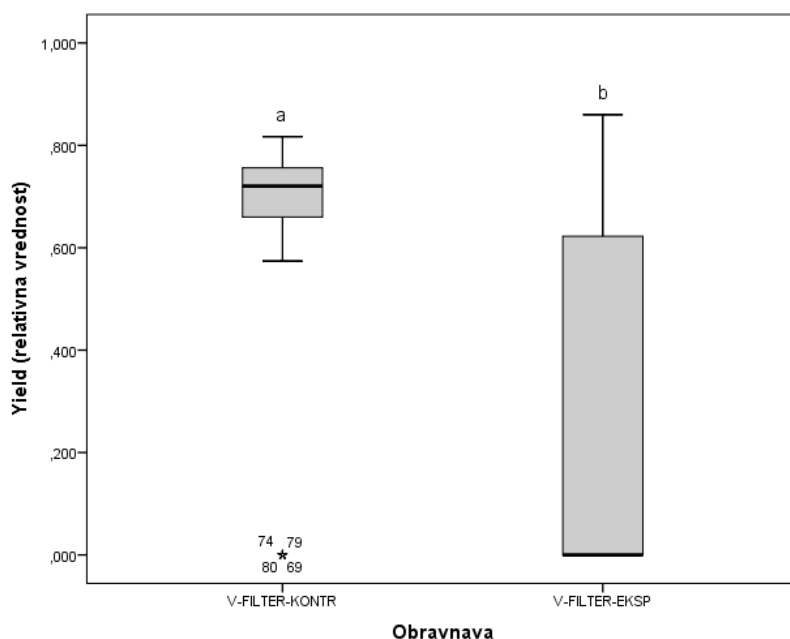
Figure 24: Average values of potential photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter F_v/F_m) in poplars in control unit (V-FILTER-KONTR), in all poplars in control unit (V-FILTER-KONTR) and in eksperimental units together (V-FILTER-EKSP). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maximum values, outliers, $n = 80$ (V-FILTER-KONTR), $n = 240$ (V-FILTER-EKSP). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level ($a = V-FILTER-KONTR$, $b = V-FILTER-EKSP$)



Slika 25: Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema FS II (parameter Fv/Fm) pri klonih topola (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 20 (V-FILTER-KONTR) in n = 60 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji znotraj ene vrste klona pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

Figure 25: Average values of potential photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter Fv/Fm) in clones of poplars (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) in control unit (V-FILTER-KONTR), in all poplars in control unit (V-FILTER-KONTR) and in experimental units together (V-FILTER-EKSP). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maximum values, outliers, n = 20 (V-FILTER-KONTR), n = 60 (V-FILTER-EKSP). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

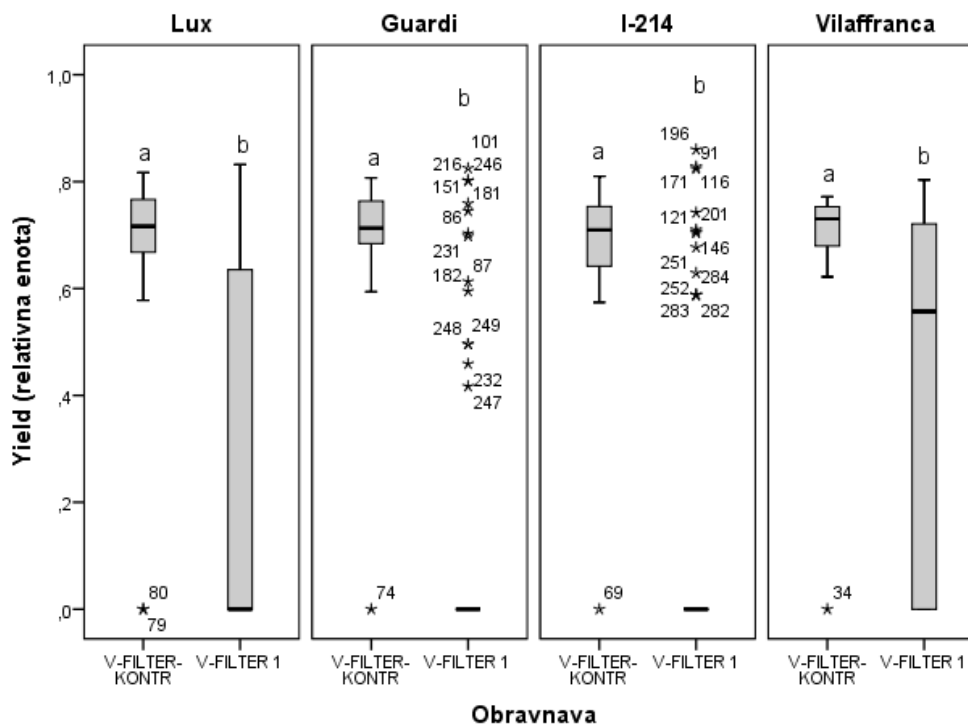
Vrednosti parametra dejanske fotokemične učinkovitosti (Yield) za sistem V-FILTER so v povprečju v vseh enotah pod mejo 0.83. Vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti FS II vseh obravnav so bile v juliju v povprečju višje od vseh ostalih meritev. V kontrolni enoti in prvi eksperimentalni enoti so bile najnižje vrednosti dosežene proti koncu avgusta (26. 8.) (slika 24, priloga C).



Slika 26: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitost fotosistema FS II (parameter Yield) pri vseh topolih v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 80 (V-FILTER-KONTR) in n = 240 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

Figure 26: Average values of actual photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter Yield) in poplars in control unit (V-FILTER-KONTR), in all poplars in control unit (V-FILTER-KONTR) and in experimental units together (V-FILTER-EKSP). Minimal values, first quartil, median, third quartil, maximum values, outliers, n = 80 (V-FILTER-KONTR), n = 240 (V-FILTER-EKSP). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

Statistično značilne razlike pri parametru Yield so se pokazale med kontrolno in eksperimentalnimi obravnavami pri vseh klonih. Vrednosti v kontrolni enoti so bile višje kot v eksperimentalni enoti (slika 26 in slika 27).



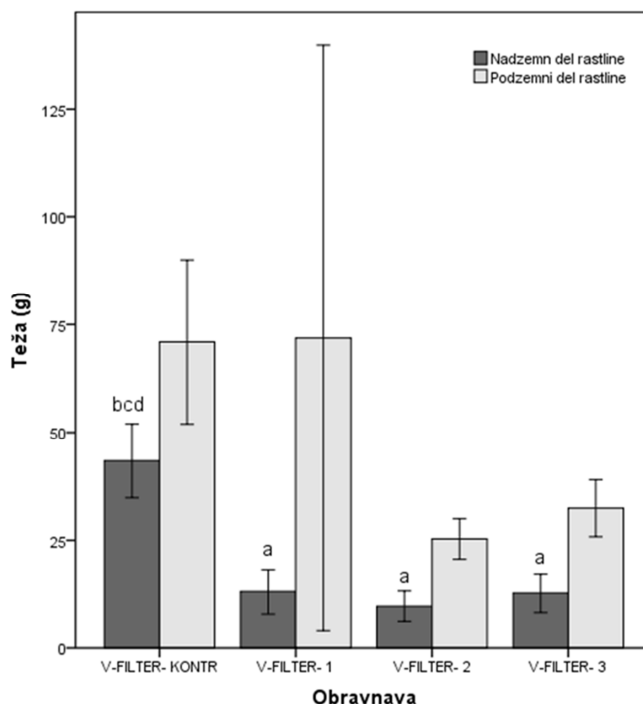
Slika 27: Povprečne vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti sistema FS II (Yield) pri klonih topola (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) v kontrolni enoti (V-FILTER-KONTR) in v eksperimentalnih enotah skupaj V-FILTER-EKSP. Minimalna vrednost, prvi kvartil, mediana, tretji kvartil, maksimalna vrednost, osamelci, n = 20 (V-FILTER-KONTR) in n = 60 (V-FILTER-EKSP). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med obravnavanji znotraj ene vrste klona pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

Figure 27: Average values of actual photochemical efficiency of photosystem FS II (parameter Fv/Fm) in clones of poplars (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) in control unit (V-RČN-KONTR), in all poplars in control unit (V-FILTER-CONTR) and in eksperimental units together (V-FILTER-EKSP). Minimal values, first quartil, mediana, third quartil, maximum values, outliers, n = 20 (V-FILTER-KONTR), n = 60 (V-FILTER-EKSP). Different superscript letters within rows indicate significant differences at the 5 % probability level (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-EKSP)

4.5.1.3 Suha masa

Meritve suhe biomase so potekale istočasno kot za navadni trst, torej v mesecu decembru 2011. Suha biomasa podzemnih delov vseh topolov iz vseh enot je bila višja od skupne teže suhe biomase nadzemnih delov (slika 28). Masa nadzemnih delov trsta je bila med 15,6 g v eksperimentalni enoti (V-FILTER 3) in 399,0 g v kontrolni enoti (V-FITLER 1-KONTR). Nadzemna suha biomasa topolov je dosegla najnižjo težo v eksperimentalni enoti (V-FILTER 3), najvišjo pa prav tako v eksperimentalni enoti (V-FILTER 2). Največ

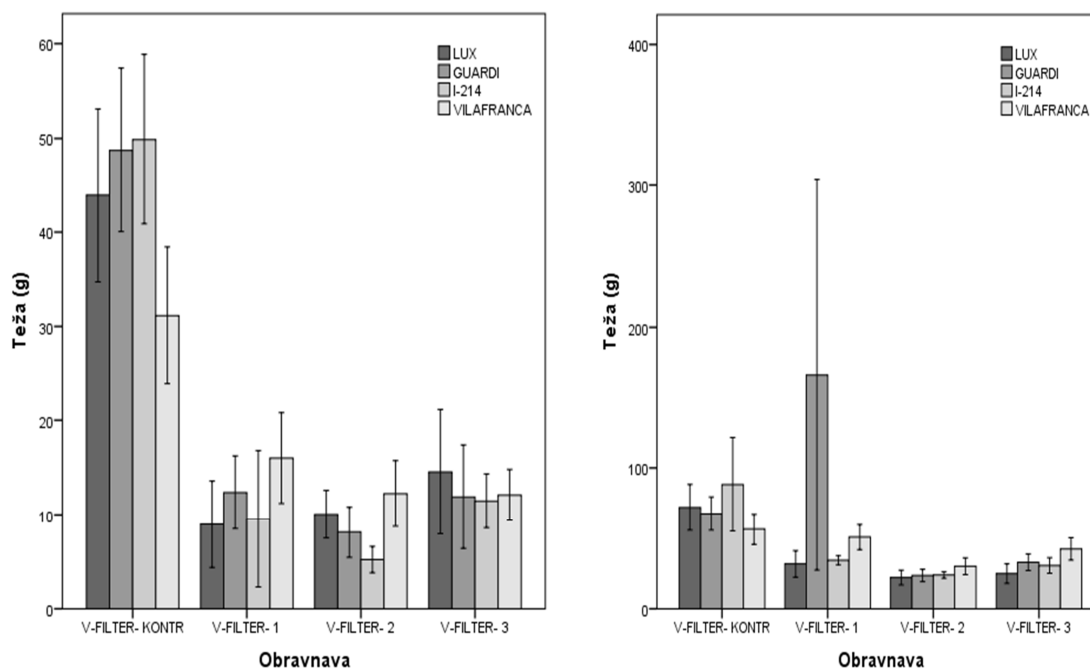
suhe biomase je v času eksperimenta pričakovano priraslo v kontrolni enoti. Najmanj biomase pa so dosegli topoli v eksperimentalni enoti 3 (V-FILTER-3) (slika 28).



Slika 28: Vsota suhe biomase nadzemnih in podzemnih delov klonov topola ob koncu eksperimenta v kontrolni enoti (V-FILTER 1-KONTR) in v eksperimentalnih enotah (V-FILTER 1, V-FILTER 2, V-FILTER 3) skupaj za vse klone topola. Grablje predstavljajo standardno napako meritev, $n = 86$ (nadzemni del) in $n = 54$ (podzemni del). Različne črke pomenijo statistično značilno razliko mase nadzemnih delov rastlin med obravnavanji pri 5 % verjetnosti (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-1, c = V-FILTER-2, d = V-FILTER-3)

Figure 28: The sum of the dry biomass aboveground and underground parts of poplars at the end of the experiment in the control unit (V-FILTER-KONTR) and in experimental units (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3), sum for all poplars. Rakes represent standard error of measurement, $n = 86$ (aboveground biomass) and $n = 54$ (underground biomass). Different superscript letters within underground biomass indicate significant differences at the 5 % probability level (a = V-FILTER-KONTR, b = V-FILTER-1, c = V-FILTER-2, d = V-FILTER-3)

V kontrolni enoti je najvišjo suho maso dosegel klon I-214, v eksperimentalnih pa klon Vilaffranca. Izmed vseh klonov topola je klon Guardi dosegel največ suhe biomase za podzemne dele rastline, to je 959,2 g. Klon Vilafranca pa je dosegel največ suhe biomase nadzemnih delov rastline, to je 530,2 g (slika 29)



Slika 29: Povprečne vrednosti suhe mase nadzemnih (levo) in podzemnih (desno) delov rastlin klonov topolov (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca). Grablje predstavljajo standardno napako, n = 12

Figure 29: Average values of the dry aboveground biomass (left) and underground parts (right) of clones of poplars (Lux, Guardi, I-214, Vilafranca) at the end of the experiment in the control unit (V-FILTER-KONTR) and in eksperimental units (V-FILTER-1, V-FILTER-2, V-FILTER-3). Rakes represent standard error, n = 12

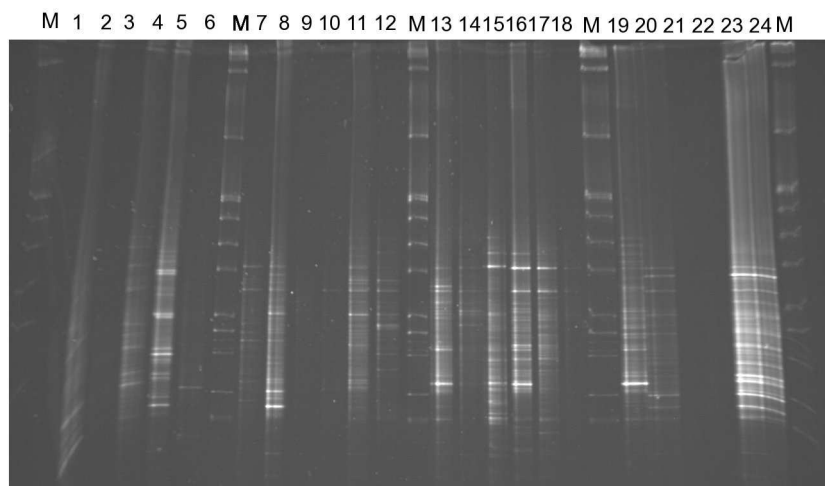
4.6 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Po pomnoževanju specifičnega odseka 16S rRNA gena, značilnega za eubakterije, smo optimizirali pogoje analize mikrobne združbe s pomočjo DGGE metode. Pri tem smo določili profil DGGE, ki se je razlikoval pri rastlinah eksperimentalnih enot (V-RČN-1, V-RČN-2, V-RČN-3), v razmerah 3 % slanosti, ter z rastlinami v kontrolnih enotah (V-RČN-KONTR), v razmerah 0 % slanosti.

Zaradi objektivnih težav pri zaključku raziskav, kot so težave z dostopom do baz podatkov o vrstah bakterij (npr. baza podatkov GenBank) ter težave z uporabo programa o analizi nukleotidnih zaporedij, izolantom nismo uspeli določiti rodove ali vrste bakterij ter poiskati bakterije, katerim so sekvence 16S rDNA naših izolantov najbolj podobne. Zaradi tega smo na podlagi gelske elektroforeze PCR produktov analiziranih vzorcev pridobili podatke o specifičnosti mikrobnih združb ter sorodnost oz. identičnost posameznih vrst iz različnih izolacij.

S pomočjo komercialnega kompleta nam je v večini primerov uspelo izolirati kvalitetno DNA, z analizo DNA z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu. S pomnoževanjem v reakciji PCR smo z elektroforezo v agaroznem gelu identificirali PCR– produkte velikosti približno 433 baznih parov (bp).

Vzorci iz rizosfere III. faze so vsebovali v gelu bakterije z določenimi fragmenti, ki na enaki višini predstavljajo zelo sorodne predstavnike združbe. Kljub temu pa je celoten profil združbe drugačen od ostalih (slika 30). To pomeni, da koreninski sistem zelo vpliva na njemu prostorsko bližje mikrobne združbe. Pri tem pa je med trsti mikrobna združba v koreninskem sistemu izredno različna z določenimi fragmenti, ki so prisotni pri vseh ostalih združbah. Ti fragmenti predstavljajo del avtohtone koreninske združbe.

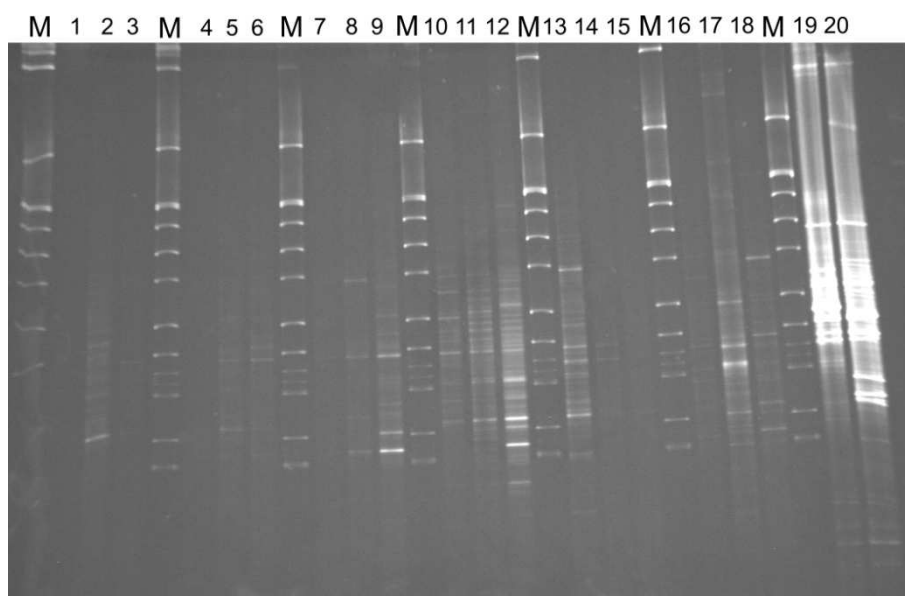


Slika 30: Profili mikrobnih združb na DGGE gelu v rizosferi rastlin navadnega trsta (M – marker; 1, 2, 3 – navadni trst pri vtoku, po treh fazah, v rizosferi prva rastlina, druga enota; 4, 5, 6 – navadni trst ob vtoku po treh fazah, v rizosferi druga rastlina, druga enota; 7, 8, 9 in 10, 11, 12 enako kot prej, le da so tu rastline na iztoku, druga rastlina, druga enota; 13–18 enako kot prej, le da je to prva enota na vtoku in 19–24 na iztoku (IFB))

Figure 30: Profiles of microbial communities in the DGGE gel in rhizosphere (M – marker; 1, 2, 3 – *Phragmites australis* at the inlet, after three phases, rhizosphere first plant, second unit; 4, 5, 6 – *Phragmites australis* at the inlet, after three phases, second plant, second unit; 13– 18– same as before, but this is first unit at inlet and 19– 24– at outlet (IFB))

V substratu v katerem ni bilo korenin trsta, je združba bolj enakomerno zastopana z manj močno poudarjenimi fragmenti, kot se je to opazilo pri trstu. Glede na višino zaustavljanja fragmentov je v substratu zastopana širša skupina mikroorganizmov. To pomeni, da je

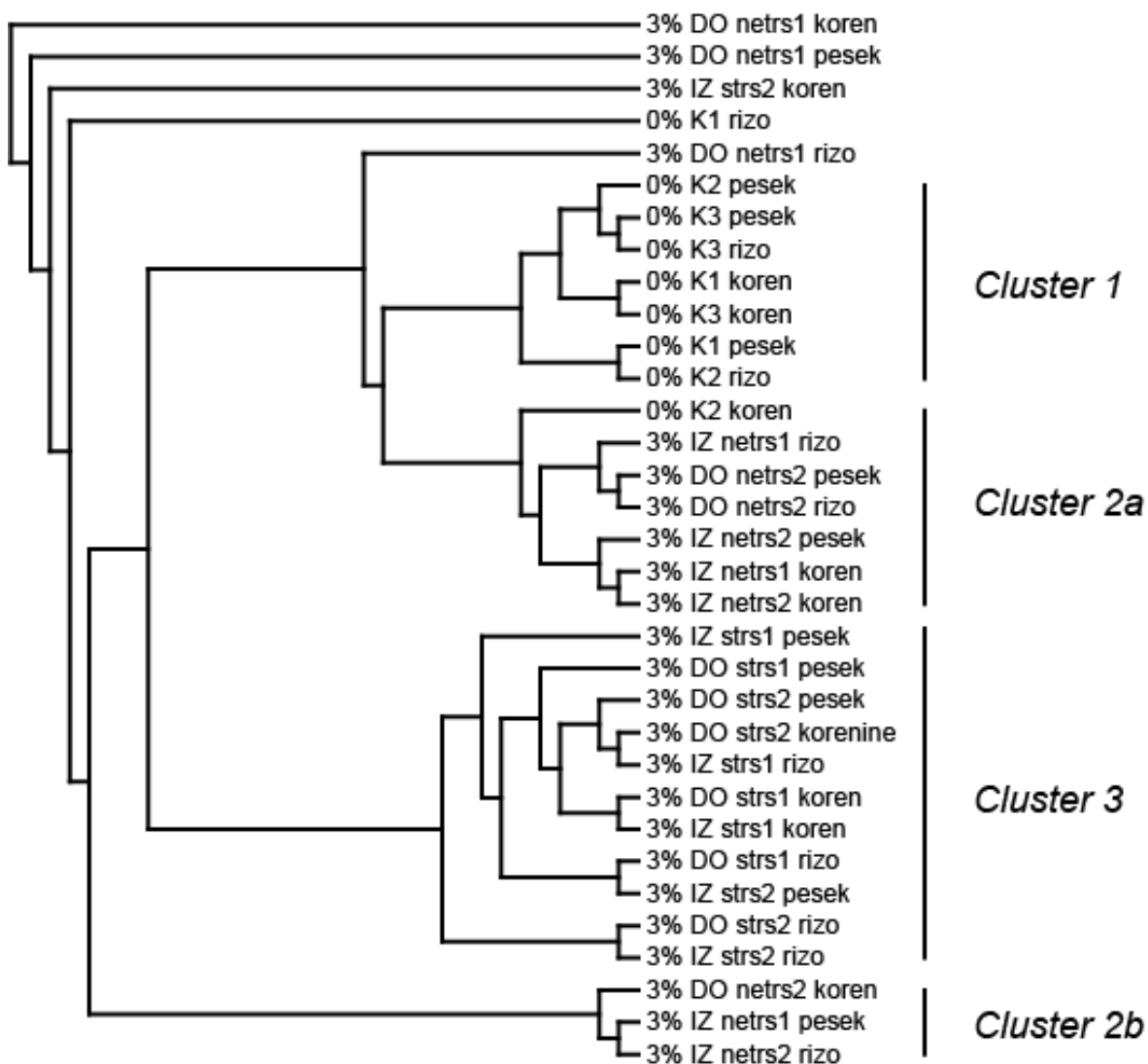
združba v rizosferi trsta bolj specifična kot v substratu. Pri tem pa so pritrjene mikrobne združbe v substratu bistveno bolj drugačne kot tiste, ki gredo v grede z dotokom vode in tiste, ki gredo z iztokom ven. Po globini se bogatost bakterijske združbe povečuje (slika 31).



Slika 31: Profili mikrobnih združb na DGGE gelu v substratu s 3 % slanostjo (M – marker; 1, 2, 3 – profil bakterijske združbe v substratu druge grede od 10 cm globine do 90 cm; 4, 5, 6 in 7, 8, 9 – drugi in tretji triplikati vzorčenja; 10 – 18 – triplikati iz prve enote; 19 in 20 – dotok in iztok v obe enoti (IFB))

Figure 30: Profiles of microbial communities in the DGGE gel in the substrate by 3 % salinity (M – marker; 1, 2, 3 – Profile of bacterial communities in the substrate of the second unit from a depth of 10cm to 90 cm, 4, 5, 6 and 7, 8, 9 – second and third triplikati sampling; 10 – 18 – triplikati first unit; 19 and 20 – inlet and outlet of the both units (IFB))

Iz primerjalnega diagrama, ki temelji na primerjavi sekvenc genov za 16S rRNA, lahko razberemo, da so izolirani sevi razporejeni v štiri osnovne skupine, ki se ujemajo v rodovih. Diagram nam kaže sorodstveno posameznost vrst iz različnih izolantov (Slika 32).



Slika 32: Primerjava povezanih mikrobnih združb; primerjava trsta iz slanega okolja (strs) in navadnega trsta iz neslanega okolja (netrs) v slanem okolju (3 %) z mešanimi trsti (K: iz slanega in neslanega okolja) in v neslanem okolju (0 %). Korenine trsta (koren), rizosfera (rizo) in substrat (pesek) odvzeti pri dotokih (DO) in iztokih (IZ) v slanem okolju in nespecifičnem neslanem kontrolnem okolju (K) (IFB)

Figure 32: Comparison of plant associated microbial communities. Salt-related (strs) species and non salt-related (netrs) species were compared in saline environment (3 %) as well as with mixed species (salt and non-salt related; K) in non-saline environment (0 %). Plant roots (koren), rhizosphere (rizo), surrounding substrate (pesek) were obtained specifically at growth container inlet (DO) and outlet (IZ) in saline environment and non-specifically in control non-saline environment (K) (IFB)

5 RAZPRAVA

Poznamo več različnih načinov uporabe rastlinskih čistilnih naprav, ki zagotavljajo visoko zmogljivost obravnave vode s povišano slanostjo (Justin s sod., 2009, Zalesny in Zalesny Jr., 2009; Justin s sod., 2010). Dodatne izboljšave sistemov lahko gredo v smeri doseganja visoke učinkovitosti čiščenja na manjših površinah, potrebnih za obravnavo specifičnih onesnaževalcev. Za obravnavo posebnih odpadnih voda se priporoča uporaba individualnih in cenovno dostopnih modularnih sistemov z različnimi principi čiščenja. Dodatne rešitve so lahko tudi v obravnavi odpadne vode s hkratno produkcijo biomase kot obliko ponovne uporabe te vode (Barbosa in sod., 2014). V nalogi preizkušena sistema V-RČN in V-FILTER sta primera enostavnejših fitoremediacijskih rešitev, kjer se čiščenje odpadne vode s povišano slanostjo in ponovna uporaba vode izvajata s pomočjo rastlin ter produkcijo biomase v modulih rastlinske čistilne naprave in vegetacijskega filtra. V sistemu je bila dosežena normativna učinkovitost čiščenja odpadne vode z uporabo naravnih čistilnih sistemov, zasajenih z makrofiti in kloni topolov, prilagojenimi na povišano slanost v vodi.

5.1 KAKOVOST VODE NA DOTOKIH IN IZTOKIH SISTEMA V-RČN IN V-FILTER

Eksperimentalne enote sistema V-RČN in V-FILTER so bile polnjene z odpadno vodo iz primarnega usedalnika centralne čistilne naprave. Dotočna voda je bila mešana s podtalno vodo, da smo zmanjšali visoke biološke obremenitve eksperimentalnih enot. Sestava dotočne vode se je skozi sezono močno spreminjala, predvsem zaradi nihanja temperature in blata v centralni čistilni napravi. Proti koncu eksperimenta, v času najvišjih poletnih temperatur, je dotočna voda postajala vse bolj koncentrirana, in sicer zaradi nižjih količin padavin in visoke evapotranspiracije. Ti vplivi so se pokazali v višji vrednosti parametrov KPK in BPK_5 na dotokih v eksperimentalnih ter kontrolnih enotah. Podobna težnja se je pokazala tudi pri usedljivih in neraztopljenih snoveh, npr. pri dušikovitih in fosforjevih spojinah (preglednica 2 in preglednica 3).

Rastlinske čistilne naprave izkazujejo učinkovitost pri zniževanju vsebnosti biološko razgradljivih snovi, odstranjevanju suspendiranih trdnih delcev, dušika in fosforja. Vučinić

in sod. (2008) navajajo, da je učinkovitost zmanjševanja obremenitev v vodi z rastlinskimi čistilnimi napravami za neusedljive snovi od 80 do 90 %, za fosfor od 26 do 60.6 %, za dušik od 22.6 do 48.5 %, za BPK₅ pa od 65 do 97 %. Podobno velja za vegetacijske filtre, saj Prochaska in Zouboulis (2003) ugotavljata, da je učinkovitost peščenega filtra pri odstranjevanju suspendiranih delcev 82 %, učinkovitost zmanjševanja KPK pa je bila od 50 do 70 %. Naraščanje KPK in BPK₅ v poskusu je na dotokih v eksperimentalnih enotah višje kot na dotokih v kontrolnih enotah. To dejstvo lahko pojasnimo z razpadom bakterij zaradi povečane osmolarnosti raztopine pri višjih koncentracijah soli (KinnCanon in Guady, 1968).

V primerjavi z eksperimentalnimi enotami je bila učinkovitost zmanjšanja KPK v kontrolnih enotah višja, predvsem zaradi negativnega učinka povišane slanosti dotočne vode na učinkovitost sistema. Proti koncu eksperimenta je KPK naraščala KPK v vseh eksperimentalnih enotah. To se ni zgodilo v kontrolni enoti, kjer je KPK ostala nizka tudi v času povišanja organske obremenitve. Do povišanja KPK na iztokih v eksperimentalnih enotah je lahko prišlo zaradi povišane slanosti vode in izpiranja Na⁻ in Cl⁻ ionov. Podobno ugotavljajo tudi Peyton in sod. (2001), Dincer in Kargi (2001) ter Campos in sod. (2002) ter navajajo, da se z večanjem koncentracije NaCl v odpadni vodi (od 8 do 45 g/l) povečuje KPK na iztoku. Prav tako opisujejo povezave med odstranjevanjem dušika iz odpadnih voda z veliko vsebnostjo amonijevega ali nitratnega dušika ter z visokimi koncentracijami soli (od 3 do 12 %). V naši raziskavi so bile vsebnosti amonijevega in nitratnega dušika v povprečju nizke, vendar so bile vrednosti v obeh sistemih na iztokih nižje kot na dotokih. Različne študije poročajo tudi o značilnem zmanjševanju učinkovitosti sistema pri povišani slanosti, predvsem nad 3 % pri rotirajočih bioloških kotaktorjih (Dincer in Kargi, 2001), ali pri slanosti, višji od 4 % za enote z aktivnim blatom (Aloui in sod., 2009). V naši raziskavi je bilo zmanjševanje učinkovitosti sistema zaznati že pri slanosti pod 3 %. Do različne občutljivosti sistema na povišano slanost lahko pride zaradi različnega trajanja prilagajanja sistema in procesa nalaganja soli v različnih eksperimentalnih enotah.

V povprečju je bil pH vode med 7 in 8 ter je v vseh enotah postopno naraščal od dotokov do iztokov. Koncentracije raztopljenega kisika so bile nizke, predvsem zaradi intenzivne

biološke razgradnje odpadne vode. Koncentracije kisika se niso statistično značilno razlikovale med dotoki in iztoki. Temperatura vode je od dotokov do iztokov rahlo naraščala v obeh sistemih, tudi zaradi vpliva temperature zraka v okolici. Izolacija vseh enot z izolacijsko folijo je nekoliko omejila segrevanje. Specifična elektroprevodnost in koncentracije Na⁻ in Cl⁻ ionov so se postopno višale od dotokov do iztokov, eksperimentalne enote pa niso izkazovale zmanjšanja Na⁻ in Cl⁻ ionov. Obseg sprememb koncentracije ionov na dotokih je bil podoben kot na iztokih, kar je najverjetneje posledica neenakomernega mešanja dotočne vode in delno nerazredčene soli v času vzorčenja, izvedenem takoj po dodajanju soli. V vseh eksperimentalnih enotah sta bili prevodnost in koncentracija Na⁻ in Cl⁻ ionov močno povezani z dodano koncentracijo soli. Povečanje koncentracij Cl⁻ in Na⁻ ionov na iztokih v primerjavi z vrednostmi na dotokih, kaže na to, da je verjetno v obeh sistemih prišlo do zadrževanja Cl⁻ in Na⁻ ionov pri nizkih koncentracijah na dotokih. Prevodnost in koncentracije ionov v kontrolnih enotah so bile za nekaj velikostnih razredov nižje, zato te vrednosti ne vplivajo na rezultate. Relativno nizko učinkovitost odstranjevanja Na⁻ in Cl⁻ ionov v rastlinski čistilni napravi je ugotovil tudi Lončar s sod. (2010) s preučevanjem poteka ionov v zasajenem odlagališču s cirkulacijo izcedne vode, ki je bila predhodno očiščena v rastlinski čistilni napravi zasajeni z navadnim trstom. Rastline imajo potencial privzema Na⁻ in Cl⁻ ionov, kar sta dokazala tudi Zalesny in Zalesny Jr. (2009) za topol ter Gorai in sod. (2011) za navadni trst, in sicer potencial zmanjševanja Na⁻ in Cl⁻ ionov v sistemu. V naši raziskavi je do zmanjšane učinkovitosti odstranjevanja in privzema ionov soli prišlo tudi zato, ker so rastline v prvem letu po osnovanju eksperimenta imele še relativno slabo razvit koreninski sistem. Dodatni razlogi so lahko tudi v morebitnem vplivu kemijskih lastnosti dodane morske soli na delovanje celotnega sistema.

5.2 ODZIV NAVADNEGA TRSTA IN KLONOV TOPOLA NA POVIŠANO SLANOST

Visoke koncentracije soli, izražene kot visoka električna prevodnost odpadne vode, lahko ovirajo procese čiščenja v rastlinskih čistilnih napravah, ki temeljijo na mikrobiološki aktivnosti. Še posebej škodljivi so nenadni dvigi slanosti (ali nenadne spremembe v slanosti dotočne vode), ki onemogočajo prilagoditev mikrobne združbe novim razmeram. Posledično učinkovitost rastlinske čistilne naprave upade.

Odziv rastlin na povišano slanost je odvisen predvsem od jakosti slanostnega stresa, genske zasnove rastlinske vrste, razvojne stopnje rastline in razmer v okolju (Jaleel in sod., 2007). Odpornost rastlin proti slanosti ni izključno povezana s prilagoditvijo na toksičnost Na⁻ in Cl⁻ ionov, ampak tudi s prilagoditvijo na sekundarne učinke slanosti (Munns, 2002). V času poteka našega poskusa se je rast rastlin zmanjševala. Navadni trst je bil v povprečju višji, imel je večji premer glavnega poganjka in večje število poganjkov v kontrolni enoti, kjer v dotočni vodi ni bilo dodane soli. V eksperimentalnih enotah se je intenzivna rast poganjkov v višino upočasnila pri 12,88 g NaCl (1,3 % slanosti). Podobno so dokazali tudi Gorai in sod. (2007, 2010) ter Pagter in sod. (2009), ki so ugotovili, da se rast navadnega trsta postopno zmanjšuje z naraščanjem koncentracij NaCl v raztopini. Munns (2002) v svoji raziskavi navaja, da je zmanjšanje rasti odvisna od obdobja rasti v slanih razmerah in da v času obravnave s povišano slanostjo navadni trst izkazuje dvofazni odziv rasti na slanost. Prva faza zmanjšanja rasti hitro izzveni, druga faza zmanjšanja rasti pa je posledica poškodbe rastline.

Topoli so poleg navadnega trsta primerne rastline za rast v okoljih s povišano slanostjo (Shannon in sod., 1999, Klomjek in Nitorisavut, 2005, Zalesny in sod., 2007; Zalesny in Bauer, 2007; Calheiros, 2010). Pri topolih je prišlo do zmanjšanja rasti v višino pri koncentraciji soli 6,2 g/l, pri koncentraciji 7,8 g/l pa se je rast v višino upočasnila. Odpornejša proti slanosti sta se izkazala kloni *Populus alba* L. cl. Villa Franca in *Populus × canadensis* Moench cl. I-214, kjer se je rast ob poviševanju slanosti skoraj popolnoma upočasnila. Rast trsta je bila nemotena tudi pri višjih koncentracijah soli.

Ob začetku raziskave smo predvidevali, da bo učinek čiščenja višji v enoti zasajeni s trstom iz slanega okolja (V-RČN 2). Vendar po koncu poskusa nismo ugotovili statistično značilnih razlik med vrednostmi KPK in BPK₅ med obema iztokoma. To pomeni, da pri učinkovitosti ni bilo zaznanih statistično značilnih razlik, kljub temu da je V-RČN-1 izkazoval malenkost višjo učinkovitost čiščenja (40,09 % za KPK in 88,92 % za BPK₅) od V-RČN-2 (37,17 % za KPK in 83,92 % za BPK₅). V primerjavi s trstom iz slanega okolja je navadni trst iz neslanega okolja je izkazoval večjo odpornost na povišano slanost, kar se je pokazalo predvsem pri zmanjševanju BPK₅ in KPK. Znano je, da je navadni trst rastlina,

prilagojena na sušo, slanost in nizke temperature (Gorai in sod., 2007; Engloner, 2009), ki uspešno raste v brakičnih in slanih močvirjih (Burdick in sod., 2001).

Učinkovitost čiščenja sistema V–RČN je podobna kot v raziskavi Calheiros in sod. (2010), kjer je učinek čiščenja v RČN, zasajeni s halofiti, dosegel od 58 do 60 % učinkovitost za KPK in od 60 do 70 % učinkovitost za BPK₅. Koncentracije soli so bile v omenjeni raziskavi nižje (elektroprevodnost 16 mS/cm) kot v naši raziskavi, kjer je elektroprevodnost ob koncu poskusa v V–RČN dosegla vrednosti tudi do 34 mS/cm. Glede na navedbe Brown in sod. (1999) so rastlinske čistilne naprave zasajene s halofiti, bolj učinkovite pri odstranjevanju hranil iz odpadne vode s povečano slanostjo. Vendar se je učinkovitost v omenjeni raziskavi zmanjšala ob podobnih koncentracijah soli kot v naši raziskavi. Brown s sodelavci (1999) je v raziskavi pri 3,5 % slanosti zaznal značilno zaviranje rasti, odstranjevanje hranil in količine dotočne vode. V naši raziskavi se je učinek čiščenja v V–RČN začel zmanjševati pri 3 % slanosti. Vzrok za to je verjetno velika koncentracija soli v dotočni vodi, kar se je izrazilo v nižji učinkovitosti čiščenja. Podoben odziv je bilo mogoče zaznati pri halofilnih bakterijah v enotah z aktivnim blatom, kjer je v pogojih povišane slanosti prav tako prišlo do zmanjšanja odstranjevanja KPK (Uygur, 2006). Relativno visoko učinkovitost sistema pri obravnavi slane odpadne vode v rastlinski čistilni napravi zasajeni s trstom, v primerjavi s sistemom s halofiti, kažeta visok prilagoditveni potencial in odpornost navadnega trsta na povišano slanost (Calheiros, 2010). Navadni trst s svojim koreninskim sistemom omogoča primerno okolje za naselitev bakterij in s tem poveča možnost preživetja pri visokih koncentracijah soli. Izbira primerne vrste rastline je bistvena tudi pri vzpostavitvi kolonij bakterij (Calheiros, 2010).

Vrednosti parametra Fv/Fm v obeh sistemih so bile v povprečju v vseh enotah (razen v kontrolni) pod mejo 0.83, kot jo navajata Björkman in Demmig (1994), kar pomeni, da so bile rastline v času meritev izpostavljene vsaj prehodnim stresnim razmeram. Po pričakovanju je bila dejanska fotokemična učinkovitost manjša od potencialne. Odklon od optimalne vrednosti (0,83) je možen kazalnik izpostavljenosti rastline stresu (Campbell in sod., 2003).

Dejanska fotokemična učinkovitost je močno odvisna od svetlobnih razmer in odraža trenutno aktivnost prenosa elektronov v fotosistem II. Dejanska fotokemična učinkovitost (parameter Yield) nakazuje dejanski proces fotosinteze v razmerah, ki jim je izpostavljena rastlina v naravi. Na dejansko fotokemično učinkovitost vplivajo okoljske razmere, ki se odražajo v trenutni motnji fotosistema II (Šraj–Kržič in Gaberščik, 2005).

Na splošno je navadni trst proizvedel več biomase kot kloni topola. *Populus* × *canadensis* Moench cl. I–214 je izkazal največji povprečni prirast nadzemne lesne biomase, izražene v suhi masi, v kontrolnih enotah. V eksperimentalnih enotah pa je bil najmanj produktiven. Največjo nadzemno biomaso je v eksperimentalnih enotah dosegel *Populus alba* L. cl. Villa Franca. Glede na ostale parametre je bilo pričakovati, da bo suha masa nadzemnih in podzemnih delov navadnega trsta ter klonov topola najvišja v kontrolnih enotah. Najnižjo maso je dosegel navadni trst iz neslanega okolja v enoti V–RČN–1. Podoben vzorec smo opazili pri klonih topola, ki so najbolj rastle v kontrolni enoti in veliko slabše v eksperimentalnih enotah, najslabše pa v drugi eksperimentalni enoti V–FILTER–2. V kontrolni enoti je najvišjo maso nadzemnega dela dosegel klon I–214, ki je bil žlahtnjen za potrebe izjemnega priraščanja debla. V eksperimentalnih enotah je v povprečju najbolj rasel klon Vilafranca, ki je po svojih značilnostih izkazoval boljšo prilagojenost na povišano slanost v tleh. Največ suhe mase korenin smo izmerili pri klonih Guardi in I–214. Sixto in sod. (2005) poročajo, da se je v njihovi raziskavi klon I–214 izkazal za zelo občutljivega na povišano slanost vode. Medtem ko za klone rodu belega topola na splošno velja, da so bolj odporni na povišano slanost in posledično bolje priraščajo v takšnih razmerah (Kuzmysky in sod., 1999).

Poraba dotočne vode je z večanjem slanosti in visokih temperatur naraščala, kar je bilo bolj očitno v sistemu V–FILTER. V času poskusa se je odstotek porabe vode spreminjal. Na začetku poskusa, tj. pri nizki slanosti, je poraba vode naraščala v obeh sistemih in je dosegla svoj maksimum ob koncu junija, ko se je 73 % in 9 % dotočne vode porabilo za evaportanspiracijo. Maksimalna poraba vode je lahko bila dosežena zaradi visoke evaportanspiracije in sončne izolacije v času visokih poletnih temperatur zraka. Kljub poletnim vremenskim razmeram v avgustu je poraba vode v obeh sistemih upadala, še posebej v V–FILTER. Do zmanjšanja porabe vode je najverjetneje prišlo zaradi naraščanja

slanosti, kar je zaviralo rast rastlin. Po navedbah Jing in sod. (2001) slanost s koncentracijo 2,3 % močno vpliva na rast makrofitov in dodatno vpliva na učinkovitost čiščenja onesnažene rečne vode v rastlinskih čistilnih napravah s površinskim ter podpovršinskim tokom. Poleg tega Jing in sod. (2001) v raziskavi navajajo, da je povečanje slanosti povzročilo popolno odmrtnje opazovanih makrofitov (*Pennisetum alopecuroides*L. In *Lpomoea reptans*). Ko so sistem ponovno zasadili z navadnimi trsti, odpornimi na povišano slanost, je učinkovitost čiščenja postopno naraščala. V naši raziskavi so trsti in topoli preživeli 3 % slanost, vendar se je navadni trst iz slanega okolja slabše odzval na pogoje povišane slanosti, kot navadni trst iz neslanega okolja.

Rezultati naše raziskave kažejo na potencial uporabe topolov in navadnega trsta v primeru čiščenja odpadnih voda z visoko slanostjo. Glede na to, da so topoli bolj občutljivi na visoke koncentracije soli kot navadni trst, je smiselno obratno zaporedje postavitve fitoremediacijskih sistemov, glede na shemo, zastavljeno v poskusih: privzem in čiščenje vode s topoli v prvi fazi ter nadaljnje čiščenje v filtru s trstom. Maksimalna koncentracija soli v odpadni vodi je v našem primeru znašala 30 g/l, končne vrednosti pa so odvisne od okoljskih dejavnikov, kot sta temperatura in količina padavin.

5.3 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Razgradnja snovi v rastlinskih čistilnih napravah (RČN) poteka v oksičnih in anoksičnih okoljih. V RČN se anaerobni in aerobni mikroorganizmi dopolnjujejo ter povečujejo učinkovitost čiščenja sistema (Langergraber, 2008). Vrhovšek in Vovk Korže (2007) sta ugotovila, da pri procesu čiščenja v RČN aerobne in anaerobne bakterije prispevajo glavni delež k čiščenju odpadne vode (80 % čiščenja). K ostalim 20 % čiščenja prispevajo rastline z vezavo mineralnih snovi (npr. fosfatov, nitratov) in drugih snovi (Vrhovšek in Vovk Korže, 2007).

Območje okoli rizosfere in rizoplana je zelo specifično okolje. Zaradi snovi, ki jih rastline izločajo skozi korenine v substrat ob njih, se sestava mikrobne populacije razlikuje od tistih v okolju brez rastlin, glede na število in vrstno sestavo. Ob primerjavi območja rizosfere in drugih območij v tleh lahko ugotovimo, da je biodiverziteteta bakterij, ki

kolonizorajo ta habitat, veliko manjša kot drugje. To pomeni, da so na tem območju aktivne močne sile selekcije. Selekcijo med bakterijami vršijo rastline s pomočjo izločanja hranljivih snovi in sekundarnih metabolitov. Tanka plast zemlje, ki je v stiku z rastlinskimi koreninami, ter površina korenin, so zelo kompleksno okolje in je zaradi izločanja rastlin v obliki aktivno izločenih ogljikovih hidratov, encimov, mukoznih snovi ter plinov, zelo ugodno okolje za rast mikroorganizmov (Matilla in sod., 2007).

Analiza mikrobnih združb v sistemu V–RČN je pokazala, da so v substratu kontrolne in eksperimentalnih enot sistema V–RČN mikrobne združbe v rizosferi navadnega trsta bolj specifične kot v substratu ob tej rizosferi. Analiza sekvenc je pokazala, da se z mestom vzročenja spreminja sestava bakterijskih združb. To dejstvo dokazuje, da so korenine navadnega trsta primerno okolje za naselitev mikrobnih združb, ki sodelujejo pri učinkovitosti čiščenja sistema. Rizosfere rastlin iz tretje faze so imele v gelu določene fragmente, ki predstavljajo zelo sorodne predstavnike združbe, vendar pa je celoten profil združbe drugačen. To pomeni, da koreninski sistem zelo vpliva na mikrobne združbe v bližini. Lin in sod. (2008) so ugotovili, da naraščanje slanosti vpliva na rast določenih vrst bakterij, kar se odraža kot sprememba v njihovi pogostosti ter sestavi mikrobne združbe. To dokazuje, da slanost vpliva na metabolizem mikroorganizmov in na pravilno delovanje ter vzdrževanje sistema. Nitorisravut in Klomjek (2005) sta ugotovila, da ima sol negativni vpliv na biološko razgradnjo organskih snovi v odpadni vodi, kar pomeni tudi zmanjšanje odstranjevanja BPK₅ ter zaviranje delovanja mikrobnih encimov in rast mikrobov.

6 ZAKLJUČKI

1. Z uporabo rastlin in na njih vezane mikrobne flore iz naravnih rastišč s povišano slanostjo pričakujemo večjo učinkovitost čiščenja odpadne vode, kot z uporabo rastlin iz rastišč, kjer koncentracije soli niso povišane.

Postavljeno hipotezo lahko na podlagi rezultatov raziskave ovržemo. Analiza sistema V-RČN, zasajenega z navadnim trstom je pokazala, da učinkovitost sistema kaže na odstranjevanje organskih onesnažil, kar se odraža v manjših vrednostih KPK ter BPK₅, kljub temu da je prišlo do zmanjšanja učinkovitosti sistema zaradi vpliva povišane slanosti dotočne vode. V-RČN sistem ni prispeval k zmanjševanju koncentracij soli v iztočni vodi. Rezultati naše raziskave dokazujejo, da enota zasajena z navadnim trstom iz slanega okolja (V-RČN-2) ne izkazuje višje učinkovitosti čiščenja kot enota zasajena s navadnim trstom iz neslanega okolja, kjer ni bil izpostavljen povečani slanosti (V-RČN-1).

2. Različni kloni topolov in navadni trst se bodo glede na rastne parametre različno odzvali na povečano koncentracijo soli.

Glede na izmerjene ekofiziološke odzive rastlin lahko postavljeno hipotezo potrdimo. Navadni trst in kloni topola so se glede na rastne parametre različno odzvali na povišano slanost. Navadni trst se je v povprečni višini, premeru in številu poganjkov močno razlikoval med kontrolno ter eksperimentalnima enotama. V kontrolni enoti je dosegel statistično značilno višje vrednosti kot v eksperimentalnih. Najnižje vrednosti je v povprečju dosegel v V-RČN-1, v enoti, zasajeni s navadnim trstom iz neslanega okolja.

3. Učinkovitost čiščenja bo povezana z izmerjenimi rastnimi parametri pri uporabljenih rastlinah.

Hipotezo lahko sprejmemo, saj so rezultati meritev organske obremenitve dotočne in iztočne vode obeh sistemov pokazali, da je zmanjševanje KPK v kontrolni enoti

bistveno večje kot v eksperimentalnih enotah, vendar pri BPK₅ teh razlik ni bilo zaznati. Sklepamo lahko, da so imele rastline, ki niso bile izpostavljene slanosti, višjo kapaciteto zmanjševanja KPK, istočasno pa so te rastline proizvedle več biomase kot rastline v razmerah povišane slanosti. Torej so bili izmerjeni rastni parametri pri rastlinah v kontrolnih enotah višji in s tem tudi učinkovitost čiščenja.

4. Zaradi visoke evapotranspiracije uporabljenih rastlin in nizke zmožnosti vezave kloridov s pomočjo rastlin ter substrata pričakujemo na iztokih povečane koncentracije soli in zmanjšanje količine vode.

V sistemu V–RČN so bile koncentracije Na in Cl ionov na vseh iztokih, tako v kontrolnih kot eksperimentalnih enotah, višje kot na dotokih. Prav tako je bila izmerjena specifična elektroprevodnost na iztokih višja kot na dotokih. Pri sistemu V–FILTER so bile koncentracije Na in Cl ionov na iztokih višje kot na dotokih. Tudi elektroprevodnost je bila na iztokih statistično značilno višja kot na obeh dotokih.

5. S pulznim vertikalnim pretokom vode skozi rastlinsko čistilno napravo in vertikalne peščene filtre lahko dosežemo večjo prezračenost sistema in s tem boljšo učinkovitost zmanjševanja organskih obremenitev.

Vsi izmerjeni parametri kvalitete vode oz. kazalniki organske obremenitve so bili na iztokih obeh sistemov nižji kot na dotokih. To pomeni, da je celotna postavitvev sistema, še posebej pa pravilna izbira rastlin, pravilna granulacija in prezračenost sistema, lahko prsipevala pri zmanjševanju amonijevega, nitratnega dušika, celotnega dušika ter KPK in BPK₅. Na vseh vzorčnih mestih so bile izmerjene povprečne vrednosti raztopljenega kisika v vodi na dotokih nižje kot na iztokih. Pomeni, da je vertikalni pretok vode čez enote rastlinske čistilne naprave in peščenega vegetacijskega filtra, bil ustrezno načrtovan in je dosegel svoj namen pri zmanjševanju organske obremenitve celotnega sistema.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

V disertaciji smo ugotavljali potencial rastlinske čistilne naprave in vegetacijskega filtra za čiščenje odpadnih voda s povešano slanostjo ter z visoko organsko obremenitvijo. Namen disertacije je bil doseči čim večjo učinkovitost čiščenja odpadnih voda in učinkovito uporabo odpadne vode. Odpadne vode se lahko porabijo za proizvodnjo biomase, predvsem s pomočjo hitrorastočih drevesnih vrst, ki imajo visoko dnevno evapotranspiracijo. Učinkovitost čiščenja odpadne vode smo ugotavljali s pomočjo ugotavljanja zmanjševanja vrednosti organskih in anorganskih obremenitev. Primernost izbire posameznih rastlinskih vrst smo spremljali s pomočjo meritev, dosežene biomase in porabe vode v času rasti.

Raziskava je potekala na poskusu, postavljenem ob Centralni čistilni napravi Ajdovščina. Poskus je bil sestavljen iz dveh eksperimentalnih vertikalnih rastlinskih čistilnih naprav (V-RČN), zasajenih z navadnim trstom (*Phragmites australis*) in treh eksperimentalnih filtrirnih enot (V-FILTER), zasajenih s štirimi različnimi kloni topola. Eksperimentalne enote smo polnili z razredčeno dotočno vodo komunalne čistilne naprave (iz primarnega usedalnika), ki smo ji postopoma dodajali raztopino morske soli. Za kontrolo smo vzpostavili dve enoti, prvo, zasajeno z navadnim trstom in drugo, zasajeno s topoli, v katero pa nismo dodajali soli. V času izvajanja poizkusa je potekalo redno odvzemanje vzorcev vode za opravljanje analiz vode. Tedensko smo spremljali rast dreves (višina, premer, število poganjkov) in merili fiziološke parametre rastlin. S pomočjo meritev transpiracije in vodnega potenciala smo spremljali spremembe vodnega režima v rastlinah ter s pomočjo fluorescence klorofila *a* vitalnost rastlin. Za pridobljene vzorce rastlin smo optimizirali postopek čim boljše izolacije DNA in RNA s pomočjo kompleta reagentov DNAid ter meritve koncentracije DNA in RNA s pomočjo naprave ter kompleta reagentov Qubit.

Rastlinske čistilne naprave (RČN) veljajo za učinkovit sistem zniževanja vsebnosti biološko razgradljivih snovi, odstranjevanja suspendiranih trdnih delcev, dušika in fosforja.

V naši raziskavi je bila učinkovitost zmanjšanja KPK v kontrolnih enotah višja v primerjavi z eksperimentalnimi enotami, predvsem zaradi vpliva slanosti na celoten sistem poskusa. KPK na iztokih je proti koncu poskusa naraščala v vseh eksperimentalnih enotah, razen v kontrolni enoti. V disertaciji smo predvidevali, da je do povišanja KPK na iztokih v eksperimentalnih enotah prišlo zaradi povišane slanosti vode in izpiranja Na⁻ in Cl⁻ ionov. Rezultati raziskave so pokazali, da je bila učinkovitost zmanjševanja v obeh sistemih za KPK v povprečju nad 40 % ter za BPK₅ nad 80 %, le da je navadni trst iz neslanega okolja bolje priraščal kot navadni trstom iz slanega okolja. Koncentracije Na in Cl ionov so bile v obeh sistemih na iztokih višje kot na dotokih. V času poskusa se je rast rastlin upočasnjevala. Pri topolih je prišlo do zmanjšanja prirastka v višino pri koncentraciji soli 6,2 g/l, pri navadnem trstu pa pri 12,88 g/l. Vrednosti parametrov Fv/Fm in Yield v obeh sistemih so bile v povprečju v vseh enotah (razen v kontrolni) pod vrednostjo 0,83, kar nakazuje, da so bile rastline vsaj občasno izpostavljene prehodnem stresu. Skupna masa suhih nadzemnih in podzemnih delov rastlin v obeh sistemih je bila v kontrolnih enotah bistveno večja od eksperimentalnih enot. Najnižjo maso je dosegel navadni trst iz neslanega okolja v enoti V-RČN-1. Ob začetku poskusa je poraba vode naraščala v obeh sistemih in je dosegla svoj maksimum ob koncu junija, ko se je 73 % in 9 % dotočne vode porabilo za evapotranspiracijo.

Rezultati naše raziskave kažejo na potencial uporabe topolov in trsta v primeru čiščenja odpadnih voda z visoko slanostjo. Navadni trst je proizvedel več biomase kot kloni topola. V kontrolni enoti vertikalnega peščenega filtra (V-FILTER-KONTR) je klon vrste *Populus × canadensis* Moench cl. I-214 v povprečju proizvedel največ nadzemne lesne biomase, izražene v suhi masi. V eksperimentalnih enotah (V-FILTER-EKSP) pa je bil najmanj produktiven. Največ nadzemne biomase je v eksperimentalnih enotah proizvedel klon *Populus alba* L. cl. Villa Franca. Na podlagi izmerjenih fizioloških parametrov rastlin je bilo pričakovati, da bo suha masa nadzemnih in podzemnih delov navadnega trsta ter klonov topola najvišja v kontrolnih enotah. Medtem ko je najnižjo maso dosegel navadni trst iz neslanega okolja v enoti V-RČN-1. Podoben vzorec smo opazili pri klonih topola. Najbolje so rasli v kontrolni enoti in veliko slabše v eksperimentalnih enotah, najslabše pa v drugi eksperimentalni enoti V-FILTER-2. V kontrolni enoti je najvišjo maso nadzemnega dela dosegel klon I-214, ki je bil selekcioniran prav za potrebe

izjemnega priraščanja debla. V eksperimentalnih enotah pa je v povprečju najbolj rasel klon Vilafranca, ki je po svojih značilnostih izkazoval boljšo prilagojenost na povišano slanost v tleh. Poraba dotočne vode je naraščala linearno z večanjem slanosti in visokih temperatur, kar pa je bilo bolj očitno v sistemu V–FILTER. V času poskusa se je odstotek porabe vode spreminjal. Na začetku poskusa, tj. pri nizki slanosti, je poraba vode naraščala v obeh sistemih in je dosegla svoj maksimum ob koncu junija, ko se je 73 % in 9 % dotočne vode porabilo za evapotranspiracijo.

Iz odvzetih vzorcev rastlin navadnega trsta, iz treh vzorčnih faz glede na lego in višini substrata, smo osamili bakterijske seve. Izolirali smo bakterijsko DNA in s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili 16S rDNA. Na ta način smo pridobili rezultate o specifičnosti ter sorodnosti posameznih mikrobnih združb za različne vzorce. Mikrobiološka analiza sistema V–RČN je pokazala, da so v substratu kontrolne in eksperimentalnih enot sistema V–RČN mikrobne združbe v rizosferi navadnega trsta bolj specifične kot v substratu ob tej rizosferi. Analiza sekvenc je pokazala, da se z mestom vzorčenja spreminja sestava bakterijskih združb. To pomeni, da so korenine navadnega trsta primerno okolje za naselitev mikrobnih združb, ki sodelujejo pri učinkovitosti čiščenja sistema. Rezultati dokazujejo, da je območje okoli rizosfere in rizoplana resnično zelo specifično okolje bakterij. Ob primerjavi območja rizosfere in drugih območij v poskusu lahko ugotovimo, da je biodiverzitet bakterij, ki kolonizirajo to okolje, veliko manjša kot drugje.

7.2 SUMMARY

The doctoral thesis researched the potential of wetlands and vegetation filters for treatment of wastewater with increased salinity and high organic load. The aim of the thesis was to maximize the efficiency of wastewater treatment, and effectively reduce the amount of wastewater. The purpose of reducing the amount of wastewater is in the re-use of water for the growth of plant biomass that can be used for energy and other purposes. The efficiency of wastewater treatment was monitored by means of a decline in the efficiency of organic and inorganic load. Appropriateness of the choice of individual plant species was monitored using measurements obtained from biomass and water consumption during growth.

The study was conducted in a pilot model at the central treatment plant Ajdovščina. The model was composed of two experimental vertical constructed wetlands (V-RČN) planted with common reed (*Phragmites australis*) and three experimental filter units (V-FILTER) planted with four different clones of poplar. The experimental units were filled with diluted wastewater from municipal wastewater treatment plant (from the primary settling tank) which was gradually loaded with salt. As a control model, two units were used, first planted with reeds and the other planted with poplars, to which salt was not added.

During the implementation of the experiment samples of water were taken regularly to carry out analyses of water. The growth of trees (height, diameter, and number of shoots) and the ecophysiology parameters were monitored weekly. Changes in the water regime in plants were monitored using measurements of transpiration and water potential and the vitality of plants using the help of fluorescence of chlorophyll. For the obtained samples of plants, we optimized the procedure for optimum isolation of DNA and RNA using DNAid kit reagents and the measurement of the concentration of DNA and RNA by using the Qubits apparatus and the kit reagents.

The results have shown that the removal efficiency of both the system for COD on average was above 40 % and BOD₅ of 80 %. Thus, common reed from non-salty environment showed greater resistance to elevated salinity, compared with the reed from the salty

environment. The concentrations of Na and Cl ions were higher at outlets than the in the inlets for both systems. During the experiment, the growth of plants decreased. In the case of poplar there was a decrease in the growth at a salt concentration of 6.2 g/l, while in the common reed at a concentration of 12.88 g/l. The values of the parameter F_v/F_m and Yield in both systems were, on average, below 0.83 in all units (except control), indicating that the plants were exposed to stress. The total mass of aboveground and belowground dry biomass was significantly higher in control units for both systems, in comparison to the experimental units. The lowest biomass was reached in common reed from non-salty environment in the unit V-RČN-1. At the beginning of the experiment, water consumption was increasing in both systems and reached its maximum in both systems at the end of June, when 73 % and 9 % of the influent water was consumed for evapotranspiration and assimilation. The results of our study suggest potential use of poplars and common reed in the case of treatment of wastewater with high salinity.

8 VIRI

- Adler A., Karacic A., Weih M. 2008. Biomass allocation and nutrient use in fast-growing woody and herbaceous perennials used for phytoremediation. *Plant Soil*, 305: 189–206
- Akratos C. S., Tsihrintzis V. A. 2007. Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of pilot – scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 29, 2: 173–191
- Allen J.A., Chambers J.L., Stine M. 1994. Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: a review. *Tree Physiology*, 14: 843–850
- Alker G.R., Godley A.R., Hallett J.E. 2002. Landfill leachate management using short rotation coppice– final technical report, Swindon, WRC: 187 str.
- Aloui F., Khoufi S., Loukil S., Sayadi S. 2009. Performances of an activated sludge process for the treatment of fish processing saline wastewater. *Desalination*, 246: 389–396
- Ashraf M. 2003. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant Science*, 165: 69–75
- Barbosa B., Costa J., Fernando A.L., Papazoglou E.G. 2014. Wastewater reuse for fiber crops cultivation as a strategy to mitigate desertification. *Industrial Crops and Products*, 68: 17–23
- Björkman O., Demmig Adams B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. V: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds). Berlin, Springer Study Edition: 17–47

- Britt C., Bullard M., Hickman G., Johnson P., King J., Nicholson F., Nixon P., Smith N., Garstang J. 2002. Bioenergy crops and bioremediation: a review. Final report. London, Department for Food, Environment and Rural Affairs- ADAS: 120 str.
- Brix H. 1993. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes and treatment performance. V: Constructed wetlands for water quality improvement. Moshiri G.A. (ed.). Boca Raton, Lewis Publishers: 9–22
- Brix H. 1987. Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants: the root–zone method. *Water Science Technology*, 19: 107–118
- Brix H. 1994. Use of constructed wetlands in water pollution control: historical development, present status, and future perspectives. *Water Science Technology*, 30, 8: 209–223
- Brix H. 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Water Science Technology*: 35, 5: 11–17
- Brisson J., Chazarenc F. 2009. Maximizing pollutant removal in constructed wetlands: should we pay more attention to macrophyte species selection? *Science Of The Total Environment*, 407: 3923–3930
- Brown J. J., Glenn E.P., Fitzsimmons K. M., Smith S.E. 1999. Halophytes for the treatment of saline aquaculture effluent. *Aquaculture*, 175: 255–268
- Burdick D.N, Buchsbaum R., Holt E. 2001. Variation in soil salinity associated with expansion of *Phragmites australis* in salt marshes. *Environment Experimental Botany*, 46: 247–261
- Calheiros C.S.C., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. 2009. Treatment of industrial wastewater with two–stage constructed wetlands planted with *Typha latifolia* and *Phragmites australis*. *Bioresource Technology*, 100, 13: 3205–3213

- Calheiros C.S.C., Teixeira A., Pires C., Franco A.R., Duque A.F., Crispim L.F.C., Moura S.C., Castro P.M.L. 2010. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. *Water Resource*, 44: 5032–503
- Campus J.L., Mosquera Corral A., Sanches M., Mendez R., Lema J.M. 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research*, 36: 2555–2560
- Campbell S., Miller C., Steven A., Stephens A. 2003. Photosynthetic responses of two temperate seagrasses across a water quality gradient using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291: 57–78
- Chen Z.H., Chen F., Cheng X.Y., Liu X.C., Zhou X.Y. 2004. Researches on macrophyte roots in the constructed wetland (A review). *Current Topics Plant Biology*, 5: 131–142
- Chen S.L., Li J.K., Wang S.S. 2002: Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress – *Forest Ecological Management*, 168: 217–230
- Ceulemans R., Scarascia Mugnozza G., Wiard B.M., Braatne J.H., Hinckley T.M., Stettler R.F., Isebrands J.G., Heilman P.E. 1992. Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. I. Clonal comparisons of 4–year growth and phenology. *Canadian Journal of Forest Research*, 22: 1937–1948
- Colemann M., Tolsted D., Nichols T., Johnson D.W., Wene G.E., Houghtaling T. 2006. Post–establishment of Minnesota hybrid poplar plantations. *Biomass and Bioenergy*, 30: 740–749
- Coleman M.D., Stanturf J.A. 2006. Biomass feedstock production systems: economic and environmental benefits. *Biomass Bioenergy*, 30: 693–695

- Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., G. Facciotto G., G. Schenone G., Delledonne M. 2000. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, 19: 978–982
- Cronk J.K., Fennessy M. S. 2001. *Wetland plants – biology and ecology*. Boca Raton, Lewis Publishers: 458 str.
- Cuevas S., Alba N., Padro A. Toleranca a la salinidad de *Populus alba* L. estudio preliminar. Pamplona, Actas III Congreso Forestal Español: 165–170
<http://www.congresoforestal.es/index.php?men=71> (marec 2015)
- Dan T. H., Quang L. N., Chiem, N.H., Brix H. 2011. Treatment of high-strength wastewater in tropical constructed wetlands planted with *Sesbania sesban*: horizontal subsurface flow versus vertical downflow. *Ecological Engineering*, 37, 5: 711–720
- Delgado S., Arroyo R., Martin R., Rodriguez J. M. 2008. PCR–DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases*, 8: 51 str.
- Dickmann D. I. 2001. An overview of the genus *Populus*. Part A. V: Poplar Culture in North America. Dickmann D. I., Isebrands J. G., Eckenwalder J. E., Richardson J. (eds.). Ottawa. NRC Research Press: 1–42
- Dincer A. R., Kargi F. 1999. Salt Inhibition of Nitrification and Denitrification in Saline Wastewater. *Environmental Technology*, 20: 1147–1153
- Dincer A. R., Kargi F. 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry*, 36: 901–906
- Eckenwalder J. E. 1984. Natural intersectional hybridization between North American species of *Populus* (*Salicaceae*) in sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*. II. Taxonomy. *Canadian Journal of Botany*, 62: 325–335

El Hamouri B., Nazih J., Lahjouj J. 2007. Subsurface–horizontal flow constructed wetland for sewage treatment under Moroccan climate conditions. *Desalination*, 215, 1–3: 153–158

Emmanuel K. V., Anand G. 2007. Reedbeds: secondary and tertiary performance for tannery and other industrial effluents. *World Leather*, 2-3: 41–43

Engloner A.I. 2009. Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*): a review. *Flora*, 204: 331–346

EUFORGEN *Populus nigra* Network: Report of the Fifth Network Meeting. 1999.
http://www.euforgen.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/EUFORGEN/538_Populus_nigra_Network.PN05.pdf (marec 2015)

Facciotto G., Schenone G. 1998. Il Pioppo fonte di energia rinnovabile. Casale Monferato: 19–26
www.populus.it/pdf/SHERWOOD_1998_GF_PIOPPO_ENERGIA_RINNOVABILE_SH_35.PDF (marec 2015)

FAO. 1980. Poplars and willows in wood production and land use. Rim, FAO: 328 str.

Faulwetter J.L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burr M.D, Brisson J., Campera A.K., Stein O.R. 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering*, 35: 987–1004

Fillion M., Brisson J., Teodorescu T. I., Sauve S., Lebreque M. 2009. Performance of *Salix viminalis* and *Populus nigra* x *Populus maximowiczii* in short rotation intensive culture under high irrigation. *Biomass and Bioenergy*, 33: 1271– 1277

Flowers T. J., Flowers S. A. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*, 78: 15– 24

- Gaberščik A., Urbanc Berčič O. 2002. Ekosistem, ki ga ustvarja igra vode. V: Jezero, ki izginja: monografija o Cerkniškem jezeru. Gaberščik A. (ed.). Ljubljana, Društvo ekologov Slovenije: 51–57
- Golombek, S.D., Ludders P. 1990. Gas exchange of *Ficus carica* in response to salinity. V: Plant Nutrition– Physiology and Applications. van Beusicher M.L. (ed.). Amsterdam, Springer: 487–493
- Gorai M., Vadel A.M., Neffati M., Khemira H. 2007. The effect of sodium chloride salinity on the growth, water status, and ion content of *Phragmites communis* Trin. Pak. International Journey of Biological Sciences, 13: 2225–2230
- Gorai M., Ennajeh M., Khemira H., Neffati M. 2010. Combined effect of NaCl–salinity and hypoxia on growth, photosynthesis, water relations and solute accumulation in *Phragmites australis* plants. Flora, 205: 462–470
- Gorai M., Ennajeh M., Khemira H., Neffati M. 2011. Influence of NaCl–salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute accumulation in *Phragmites australis*. Acta Physiologiae Plantarum, 33, 3: 963–971
- Green M. B., Upton J. 1994. Constructed reed beds: A cost effective way to polish wastewater effluents for small communities. Water Environmental Research, 66: 188–192
- Grip H., Halldin S., Lindroth A. 1989. Water– use by intensively cultivated willow using estimated stomatal parameter values. Hydrological Processes, 3, 1: 51–63
- Guidi W., Piccioni E., Bonari E. 2008. Evapotranspiration and crop coefficient of poplar and willow short–rotation coppice used as vegetation filter. Bioresource Technology, 99: 4832–4840

- Guntensbergen G.R., Stearns F., Kadlec J.A. 1989. Wetland vegetation. V: Constructed wetlands for wastewater treatment. Hammer D. A. (ed.). Chelsea, Lewis publisher: 73-88
- Haberl R., Grego S., Langergraber G., Kadlec R.H., Cicalini A.R., Dias S.M., Novais J.M., Aubert S., Gerth A., Thomas H., Hebner A. 2003. Constructed Wetlands for the Treatment of Organic Pollutants. *Journal of Soils and Sediments*, 3, 2: 109–124
- Hamoda M. F., Al-Attar I.M.S. 1995. Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment. *Water science Technology*, 31, 9: 61–72
- Hellings S.E. in Gallagher J.L. 1992. The effects of salinity and flooding on *Phragmites australis*. *Journal of Applied Ecology*, 29: 41–42
- Hinckley T. M., Brooks J. R., Cermak J., Ceulemans R., Kucera J., Meinzer F. C., Roberts D.A. 1994. Water flux in a hybrid poplar stand. *Tree Physiology*, 14: 1005–1018
- Hinteregger C, Streichsbier F. 1997. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater. *Biotechnology Letter*, 19: 1099–1102
- Isebrands J. G., Karnosky D. F. 2001. Environmental benefits of poplar culture. V: Poplar Culture in North America, Part A, Ch 6. Dickmann D. I., Isebrands J.G., Eckenwalder J. E., Richardson J. (eds.). Ottawa, NRC Research Press: 207–218
- Jaleel C. A., Gopi R., Sankar B., Manivannan P., Kishorekumar A., Sridharan R., Panneerselvam R. 2007. Alterations in germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal Botany*, 73: 190–195
- Javanshir K., Ewell K. 1993. Salt resistance of bald cypress. V: Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants. Vol. 2. Leith H., Al Masoom A. (eds.), Amsterdam, Springer: 285–291

Jing S. R., Lin Y. F., Lee D. Y., Wang T. W. 2001. Using constructed wetland systems to remove solids from highly polluted river water. *Water Science and Technology*, 1: 89–96

Jurše A., Vrhovšek D., Justin Z. M., Božič G., Gaberščik A. 2014. Effect of wastewater salinity on treatment performance of vertical constructed wetland and growth of poplars in sand filters. *Sylwan*, 158, 11: 1–15

Justin M. Z., Zupančič M. 2009. Combined Purification and Reuse of Landfill Leachate by Constructed Wetland and Irrigation of Grass and Willows. *Desalination*, 246: 157–168

Justin M. Z., Pajk N., Zupanc V., Zupančič M. 2010. Phytoremediation of Landfill Leachate and Compost Wastewater by Irrigation of Populus and Salix: Biomass and Growth Response. *Waste Management*, 30, 6: 1032–1042

Yang L., Lai C.T., Shieh W.K. 2000. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. *Water Research*, 34: 3303–3314

Kadlec R. H., Knight R. L. 1996. *Treatment wetlands*. Boca Raton, CRC Press: 893 str.

Kadlec R. H. Knight R. L. Vymazal J. Brix H. Cooper P. Haberl R. 2000. *Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation*. London, IWA Publishing: 156 str.

Kadlec R. H. Tanner C. C., Hally V. M., Gibbs M. M. 2005. Nitrogen spiralling in subsurface– flow constructed wetlands: implications for treatment response. *Ecological Engineering*, 25: 365– 381

Kadlec R. H, Wallace S. D. 2009. *Treatment wetlands*, 2nd ed. Boca Raton, Lewis publishers: 893 str.

- Kantawanichkul S., Kladprasert A., Brix H. 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecological Engineering*, 35, 2: 238–247
- Karajić M., Lapanje A., Razinger J., Zrimec A., Vrhovšek D. 2010. The effect of the application of halotolerant microorganisms on the efficiency of a pilot-scale constructed wetland for saline wastewater treatment. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 1: 129–142
- Kargi F., Dincer A. R. 1996. Enhancement of biological treatment performance of saline wastewater by halophilic bacteria. *Bioprocess Engineering*, 15: 51–58
- Kargi F., Uygur A. 1996. Biological Treatment of saline wastewater in an Aerated Percolator Unit Utilizing Halophilic Bacteria. *Environmental Technology*, 17: 325–320
- Kesaava M. E., Mbguligwe S. E. 2010. Potential of constructed wetland system for treating tannery industrial wastewater. *Water Science Technology*, 61, 4: 1043–1052
- Kietlinska A. 2003: Experiences of Constructed Wetlands for the Treatment of Nitrogen in Landfill Leachate, 59: 237–245
- Kincannon D. F., Gaudy A. F. 1968. Response of biological waste treatment systems to changes in salt concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 10: 483–496
- Kivaisi A. K. 2001. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering*, 17: 545–560
- Klomjek P., Nitorisavut S. 2005. Constructed treatment wetland: a study of eight plant species under saline conditions. *Chemosphere*, 58: 585–593

Konnerup D., Koottatep T., Brix H. 2009. Treatment of domestic wastewater in tropical subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*. *Ecological Engineering*, 35, 2: 248–257

Konnerup D., Trang N.T.D., Brix H. 2011. Treatment of fishpond water by recirculating horizontal and vertical flow constructed wetlands in the tropics. *Aquaculture*, 313, 1–4: 57–64

Kuzmisky E., Sabatti M., Scarascia G. 1999. Growth and physiology of different poplar genotypes under saline stress. II International Poplar Symposium IUFRO–INRA, Vol. 1. Rim, IUFRO: 52 str.

Krause G. H., Weis F. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313–349

Labrecque M., Teodorescu T. I. 2001. Influence of plantation site and wastewater sludge fertilization on the performance and foliar nutrient status of two willow species growth under SRIC in southern Quebec (Canada). *Forest Ecology and Management*, 150: 223–239

Langergraber G. 2006. Constructed wetlands – Introduction and principles: a presentation. Workshop on "Constructed Wetlands". Ramallah: 123 str.
http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/especiales/proyectos/medwa_docs/Report_constructed_wetlands.pdf (marec 2015)

Larsson S. 2003. Short rotation Willow biomass plantation irrigated and fertilized with wastewaters – Results from a 4-year multidisciplinary field project in Sweden, France, Northern Ireland and Greece supported by the EU–FAIR Programme (FAIR5–CT97–3947) Final Report. Sweden. European Commission: 48 str.

Lazarova V., Bahri A. 2005. *Water Reuse for Irrigation; Agriculture, Landscapes, and Turf Grass*. Boca Raton, CRS Press: 408 str.

- Loncnar M., Zupančič M., Bukovec P., Justin M.Z. 2010. Fate of saline ions in a planted landfill site with leachate recirculation. *Waste Management*, 30: 110–118
- Lefebvre O., Moletta R. 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Research*, 40, 20: 3671– 3682
- Lefebvre O., Vasudevan N., Thanasekaran K., Moletta R., Godon J. 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles*, 10, 6: 505–513
- Liang W., Wu Z.B., Cheng S.P., Zhou Q.H., Hu H.Y. 2003. Role of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system. *Ecological Engineering*, 21: 191–195
- Licht L.A., Isebrands J. G. 2005. Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass and Bioenergy*, 28, 2: 203–218
- Lin T., Wen Y., Jiang L., Li J., Yang S., Zhou Q. 2008. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. *Chemosphere*, 72: 122–128
- Lindroth A., Verwijst T., Halldin S. 1994. Water– use efficiency of willow– variation with season, humidity and biomass allocation. *Journal of Hydrology*, 156: 1–19
- Lofrano G., Meric S., Zengin G. E., Orhon D. 2013. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: A review. *Science of the Total Environment*, 461–462: 265–281
- Loncnar M., Zupančič M., Bukovec P., Justin M.Z. 2010. Fate of saline ions in a planted landfill site with leachate recirculation. *Waste Management*, 30: 110–118

Maas E.V., 1993. Salinity and citriculture. *Tree Physiology*, 12: 195–216

Marks M., Lapin B. in Randall J. 1994. *Phragmites australis* (*P. communis*): treats, management, and monitoring. *Natural Areas Journal*, 14: 285– 294

Marcar N., Crawford D., Leppert P. 1993. The potential of trees for utilisation and management of salt-affected land. V: *The productive use of saline land*. Davidson N., Galloway R. (ed.). Canberra, ACIAR: 17–22

Mauchamp A., Méthy M. 2004. Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *Phragmites australis*. *Environmental and Experimental Botany*, 51: 227–235

Mayerson L.A., Vogt K.A., Chambers R.M. 2000. Linking the success of *Phragmites* to the decoupling of ecosystem nutrient cycles. V: *Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology*. Weinstein M.P., Kreegar D.A. (eds.). Amsterdam, Kluwer Academic Press: 817– 834

Maine M.A., Suñe N., Hadad R.H., Sanchez G.C., Bonetto C. 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal Environmental Managemant*, 90: 355–363

Matilla M. A., Espinosa– Urgel M., Rodrigez– Herva J., Ramos J. L., Ramos–Gonzalez M. 2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology*, 8, 9: 179

Meers E., Tack F.M.G., Tolpe I., Michels E. 2008. Application of a full-scale constructed wetland for tertiary treatment of piggery manure: monitoring results. *Water Air Soil Pollution*, 193: 15–24

- Mirck J., Isebrands J.G., Verwijst T., Ledin S. 2005. Development of short-rotation willow coppice system for environmental purposes in Sweden. *Biomass and Bioenergy*, 28: 219–228
- Moshiri G. A. 1993. *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. Boca Raton, Lewis Publisher: 633 str.
- Mufarrege M. M., Di Luca G. A., Hadad H. R., Maine M. A.. 2011. Adaptability of *Typha domingensis* to high pH and salinity. *Ecotoxicology*, 20: 457–465
- Munns R., Termaat A. 1986. Whole-plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143–160
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239–250
- Neuman D. S., Wagner M., Braatne J.H., Howe J. 1996. Stress physiology—a abiotic. V: Stettler, R.F., Bradshaw Jr., H.D., Heilman, P.E., Hickley, T.M. (eds.), *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation, Part Ii, Ch 17*. NRC Research press— National Research Council of Canada, Ottawa: 423–458
- Nixon D.J., Stephen W., Tyrrel S.F., Brierley E. D. R. 2001. The potential for short rotation energy forestry on restored landfill caps. *Bioresource Technology*, 77: 237–245
- Pagter M., Baragato C., Brix H. 2005. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Botany*, 81: 285–299
- Pagter M., Bragato C., Malagoli M., Brix H. 2009. Osmotic and ionic effects of NaCl and Na₂SO₄ salinity on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 90: 43–51

- Pansward T., Anan C. 1999. Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimate seeds. *Water Research*, 33, 5: 1165–1172
- Parida A. K., Das A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324—349
- Peyton B.M., Mormile M.R., Petersen J.N. 2001. Nitrate reduction with *Halomonas compisalis* kinetics of denitrification at pH 9 and 12,5 % NaCl. *Water Research*, 35, 17: 4237– 4242
- Peso C., De Lucas A.I., Martinez P., Sierra R., Cuevas Y. 1997. *P.×canescens*: Genetic resources conservation in Palencia. I Congreso Hispano–Luso and II Congreso Forestal Español, 2: 177–181
- Phytoremediation Decision Tree. 1999. Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group, Phytoremediation work team: 36 str.
<http://www.cluin.org/download/partner/phytotree.pdf> (marec 2015)
- Pontailier J.Y., Ceulemans R., Guittet J. 1999. Biomass yield of poplar after five 2–year coppice rotations. *Forestry*, 72: 157–163
- Pulford I.D., Watskon C. 2003. Phytoremediation of heavy metal– contaminated land by trees– a reiew. *Enverionmental International*, 29: 529–540
- Prochaska C.A. and Zouboulis A.I. 2003. Performance of intermittently operated sand filters: a comparable study, treating wastewaters of different origins. *Water, Air an Soil Pollution*, 147: 367– 388
- Renman G., Kietlinska A. 2000. A compact constructed wetland for treatment of landfill leachate. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 27: 629–632

- Roman C.T., Niering W.A. and Warren R.S. 1984. Salt marsh vegetation change in response to tidal restriction. *Environmental Management*, 8: 141–150
- Roš M. 2001. Biološko čiščenje odpadne vode. Prvi natis. Ljubljana, GV Založba: 243 str.
- Roš M. 2002. Novi pristopi pri čiščenju odpadne vode. V: Zbornik referatov. Vodni dnevi 2002, Portorož, 3.– 4. oktober 2002. Roš M. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 1–11
- Schenone G., Facciotto G., Groppi F., Mughini G., Pari L. 1997. Short rotation woody crops for energy: the research program of ENEL (Italian Electric Company). V: Making a business from biomass in energy, environment, chemicals, fibers and materials. Overend R.P., Chornet E. (eds.). Oxford. Elsevier: 237–245
- Schultz R.C., Isenhardt T.M., Simpkins W.W., Colletti J.P. 2004. Riparian forest buffer in agroecosystems– lessons learned from the Bear Creek Watershed, central Iowa, USA. *Agroforestry*, 61: 35–50
- Singh M., Chaturvedi R., Sane P.V. 1996. Diurnal and seasonal photosynthetic characteristics of *Populus deltoides* Marsh leaves – *Photosynthetica*, 32: 11–21
- Sixto H., Grau J.M., Alba N, Alía R. 2005. Response to sodium chloride in different species and clones of genus *Populus* L. *Forestry*, 78: 93–104
- Shannon M.C., Banuelos G.S., Draper J.H., Ajwa H., Jordahl J., Licht L. 1999. Tolerance of hybrid poplar (*Populus*) trees irrigated with varied levels of salt, selenium, and boron. *International Journal of Phytoremediation*, 1: 273–288
- Shutes R. B. E. 2001. Artificial wetlands and water quality improvement. *Environment International*, 26: 441–447

- Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 18: 647–658
- Stein O.R., Hook P.B. 2005. Temperature, plants and oxygen: how does season affect constructed wetland performance?. *Environmental Science and Health*, 40: 1331–1342
- Stottmeister U., Wiessner A., Kusch P., Kappelmayer U., Kastner M., Bederski O., Muller R.A., Moormann H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22: 93–117
- Šraj Kržič N., Gaberščik A. 2005. Photochemical efficiency of amphibious plants in an intermittent lake. *Aquatic Botany*, 83: 281–288
- Tanner C.C. 2001. Plants as ecosystem engineers in subsurface– flow treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 44: 9– 17
- Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. 2003. *Wastewater Engineering – Treatment and Reuse*. Boston, Metcalf and Eddy: 1819 str.
- Tellez G.T., Nirmalakhandan N., Gardea Torresdey J.L. 1995. Evaluation of biokinetic coefficients in degradation of oilfield produced water under varying salt concentrations. *Water resource*, 29, 7: 1711–1718
- Tokuz R.Y., Eckenfelder W.W. Jr. 1979. The effect of inorganic salts on the activated sludge process performace. *Water Research*, 13: 99–104
- Trang N.T.D., Konnerup D., Schierup H.–H., Chiem N.H., Tuan L.A., Brix H. 2010. Kinetics of pollutant removal from domestic wastewater in a tropical horizontal subsurface flow constructed wetland system: effects of hydraulic loading rate. *Ecology Engeeniring*, 36, 4: 527–535
- Trošt Sedej T. 2005. *Ekologija rastlin: priročnik za vaje*. Ljubljana, Študentska založba: 81 str.

- Truu M., Juhanson J., Truu J. 2009. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science Total Environment*, 407, 13: 3958–3971
- Uredba o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo. 2012. Uradni list Republike Slovenije, 64, 2582: 6392–6407
- Uygur A. 2006. Specific nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor. *Process Biochemistry*, 41: 61–66
- Van der Putten W. H. 1997. Die-back of *Phragmites australis* in European wetlands: An overview of the European Research Programme on reed die-back and progression. *Aquatic Botany*, 59: 263–275
- Visscher J. T., Paramasivam R., Raman A., Heijnen H. A. 1987. Slow Sand Filtration for Community Water Supply. Haag, IRC- International Reference Center for Community Water Supply and Sanitation: 88 str.
- Vmazal J., Brix H., Cooper P. F., Green M.B., Haberl R. 1998. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Europe. Backhuys Publishers, Leiden: 366 str.
- Vymazal J., Kröpfelová L. 2008. Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow. Amsterdam, Springer Netherlands: 566 str.
- Vretare V., Weisner S.E.B., Strand J. A., Granéli W. 2001. Phenotypic plasticity in *Phragmites australis* as a functional response to water depth. *Aquatic Botany*, 69: 127–145
- Vrhovšek D., Vovk Korže A. 2007. Ekoremediacije. Maribor, Ljubljana, Univerza v Mariboru, Filozofska fakulteta, Mednarodni center za ekoremediacije, Limnos d.o.o.: 128 str.

Vučinić A., Vedrina D.S., Gudelj I. 2008. Mathematical Modelling and parameter estimation for the Design of Constructed Wetlands. *Strojarstvo* 50, 5: 251–258

European Commission. 2000. Water Framework Directive– 2000/60/EC: 72 str.
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32000L0060> (marec 2015)

White S.D., Ganf G.G. 2002. A comparison of the morphology, gas space anatomy and potential for internal aeration in *Phragmites australis* under variable and static water regimes. *Aquatic Botany*, 73: 115–127

WHO/UNICED. 2010. Progress on Sanitation and Drinking– water: 2010 Update, Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation: 60 str.
http://www.unwater.org/downloads/JMP_report_2010.pdf (marec 2015)

Woolard C.R., Irvine R.L. 1995. Response of a periodically operated halophilic biofilm reactor to changes in salt concentration. *Water Science Technology*, 31: 41–50

Zalesny Jr. R.S., Riemenschneider D.E., Hall R.B. 2005. Early rooting of dormant hardwood cuttings of *Populus*: analysis of quantitative genetics and genotype environment interactions. *Canadian Journal of Forest Research*, 35: 918– 929

Zalesny Jr. R.S., Wiese A.H., Bauer E.O., Riemenschneider D.E. 2006. Sapflow of hybrid poplar (*Populus nigra* L.P. maximowiczii A. Henry ‘NM6’) during phytoremediation of landfill leachate. *Biomass Bioenergy*, 30: 784–793

Zalesny J. A., Zalesny Jr. R.S., Wiese H.A., Sextone B., Hall B. R. 2007. Sodium and chloride accumulation in leaf, woody, and root tissue of *Populus* after irrigation with landfill leachate. *Environmental Pollution*: 1–9

Zalesny Jr. R.S., Bauer E.O. 2007. Evaluation of Populus and Salix continuously irrigated with landfill leachate. Genotype-specific elemental phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 9: 281–306

Zalesny J. A., Zalesny Jr. R.S. 2009. Chloride and sodium uptake potential over an entire rotation of populus irrigated with landfill leachate. *International Journal of Phytoremediation*, 11: 496–508

Zhu J. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 2: 6 str.

Žgajner Gotvajn A., Zagorc Končan J. 1996. Vrednotenje biorazgradljivosti kemikalij in odpadnih voda z vidika industrijske proizvodnje. V: *Vodni dnevi 96*, Bled, 10.–11. oktober 1996. Roš M. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 60–71

ZAHVALA

Najprej bi se želela zahvaliti somentorju prof. dr. Danijelu Vrhovšku, da me je zaposlil kot doktorsko študentko ter Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje mojega študija. Zahvaljujem se ga. Marjani Vrhovšek in bivšim sodelavcem Limnosa ter Ekoremedijjskega tehnološkega centra Celje za produktivno sodelovanje, prijetno delovno okolje, pomoč in vključitev v projektno delo, katero me je oplemenitilo z bogatimi izkušnjami. Posebej bi se želela zahvaliti mentorici ter predstojnici Katedri za ekologijo in varstvo okolja prof. dr. Alenki Gaberščik, da je sprejela vlogo mentorice in mi bila z bogatim znanjem in izkušnjami v veliko pomoč pri pripravi disertacije. Zahvaljujem se tudi za nesebično delitev raziskovalne opreme za nemoten potek poskusa. Zahvaljujem se prof. dr. Ani Plemenitaš, prof. dr. Mihaelu J. Tomanu in doc. dr. Mateji Germ za kritično oceno disertacije. Hvaležna sem prof. dr. Maji Zupančič Justin za strokovno pomoč in vzpodbudo. Za vso pomoč se zahvaljujem kolegom iz Gozdarskega inštituta Slovenije- dr. Primožu Simončiču, dr. Gregorju Božiču in dr. Mitji Ferlanu za izposojilo raziskovalno opremo, strokovne nasvete in ideje. Hvala ga. Anici Peternej in sodelavcem za pomoč pri postavitvi poskusa na Centralni čistilni napravi Ajdovščina. Hvala ekipi Inštituta za fizikalno biologijo za pomoč in strokovno vodenje pri izvedbi analiz. Posebna zahvala gre sodelavcem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano za možnost nove karierni poti, za razumevanje in prijateljstvo. Nenazadnje bi se želela zahvaliti svojim dragim staršem, bratu, starim staršem in prijateljem- brez vaše nesebične ljubezni, pomoči in vzpodbude ne bi prišla tako daleč. Hvala, da ste verjeli vame! Iz srca hvala mojemu Igorju za ljubezen, potrpežljivost in smisel življenja. Hvala, da si mi stal ob strani pri uresničevanju sanj.

PRILOGE

Priloga A

Fizikalne in kemijske lastnosti dotočne ter iztočne vode v sistemu zasajenim z navadnim trstom (V- RČN) v mS cm⁻¹, °C, mg l⁻¹ in učinkovitost čiščenja. Dotok eksperimentalnih enot D1, iztoka eksperimentalne enote I1 in I2, dotok kontrolne enote D3, iztok kontrolne enote I4. Podatki so aritmetične sredine ± SD (n = 3–15)

KPK	mg/l	Datum	30.5.	13.6.	22.6.	6.7.	26.7.	4.8.	2.9.	Učinkovitost	
V-RČN		D1	6	43,00	68,00	24	33	283	285		
	Neslan trst	I1	18	26,00	22,00	19	30	162	112		
	Slan trst	I2	6	22,00	30,00	23	33	103	141		
	Kotrola	D3	6	28,00	55,00	25	36	114	58		
		I4	16	12,00	7,00	9	10	5	18		
	Učink. po dnevih	Neslan trst		-200,00	39,53	67,65	20,83	9,09	42,76	60,70	40,09
		Slan trst		0,00	48,84	55,88	4,17	0,00	63,60	50,53	37,17
		Kontrola		-166,67	57,14	87,27	64,00	72,22	95,61	68,97	74,20
V-FILTER	EXP	D2	6	140,00	30,00	27	26	203	209		
		I3	21	11,00	15,00	19	18	89	45		
	Kotrola	D4	6	77,00	28,00	17	15	59	58		
		I5	21	11,00	12,00	5	6	5	21		
	Učink. po dnevih	EXP		-250,00	92,14	50,00	29,63	30,77	56,16	78,47	56,19
		Kotrola		-250,00	85,71	57,14	70,59	60,00	91,53	63,79	71,46
BPK5											

Priloga B

Višina glavnega poganjka (mm) navadnega trsta in klonov topola

Enota	V-RČN 1-KONT					V-RČN- 2					V-RČN- 3				
	Št. rastline/datum	1	7	13	19-neslan	25-neslan	26	32	38	44	50	51	57	63	69
6.5.	155,0	250,0	520,0	465,0	485,0	0,0	300,0	285,0	210,0	300,0	340,0	295,0	312,0	342,0	290,0
13.5.	231,0	255,0	530,0	481,0	490,0	0,0	325,0	600,0	225,0	350,0	345,0	300,0	327,0	345,0	310,0
19.5.	290,0	260,0	535,0	505,0	500,0	0,0	325,0	630,0	320,0	390,0	345,0	305,0	370,0	400,0	330,0
30.5.	300,0	280,0	440,0	510,0	600,0	0,0	340,0	640,0	370,0	400,0	355,0	330,0	420,0	480,0	350,0
3.6.	410,0	320,0	450,0	510,0	610,0	0,0	360,0	650,0	410,0	425,0	360,0	350,0	550,0	510,0	400,0
13.6.	430,0	410,0	470,0	510,0	650,0	0,0	440,0	656,0	430,0	446,0	410,0	350,0	600,0	550,0	470,0
22.6.	430,0	450,0	700,0	650,0	700,0	0,0	440,0	680,0	438,0	485,0	450,0	400,0	620,0	565,0	520,0
27.6.	430,0	500,0	740,0	670,0	710,0	0,0	440,0	680,0	450,0	500,0	470,0	420,0	635,0	570,0	560,0
6.7.	430,0	515,0	750,0	740,0	730,0	0,0	440,0	685,0	455,0	500,0	485,0	450,0	680,0	570,0	570,0
11.7.	450,0	560,0	770,0	820,0	730,0	0,0	450,0	685,0	461,0	500,0	490,0	455,0	700,0	570,0	585,0
21.7.	680,0	690,0	790,0	820,0	750,0	0,0	450,0	685,0	475,0	505,0	490,0	460,0	720,0	570,0	600,0
26.7.	820,0	800,0	1000,0	820,0	820,0	0,0	460,0	685,0	510,0	505,0	500,0	500,0	735,0	570,0	650,0
4.8.	860,0	850,0	1050,0	600,0	900,0	0,0	480,0	685,0	535,0	510,0	500,0	550,0	740,0	570,0	695,0
12.8.	900,0	990,0	1180,0	600,0	960,0	0,0	520,0	685,0	560,0	510,0	510,0	600,0	765,0	570,0	700,0
19.8.	920,0	1300,0	1280,0	610,0	1010,0	0,0	555,0	685,0	670,0	510,0	520,0	640,0	780,0	570,0	725,0
26.8.	925,0	1310,0	1300,0	610,0	1040,0	0,0	560,0	685,0	670,0	510,0	520,0	670,0	790,0	570,0	750,0
30.8.	1200,0	1310,0	1300,0	1040,0	1040,0	0,0	560,0	685,0	670,0	510,0	520,0	670,0	800,0	570,0	760,0
min	155,0	250,0	440,0	465,0	485,0	0,0	300,0	285,0	210,0	300,0	340,0	295,0	312,0	342,0	290,0
max	1200,0	1310,0	1300,0	1040,0	1040,0	0,0	560,0	685,0	670,0	510,0	520,0	670,0	800,0	570,0	760,0
povprečje	580,1	650,0	812,1	644,8	748,5	0,0	437,9	646,2	462,3	462,1	447,6	455,6	620,2	523,1	545,0

Cisterna	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT	V-F 1 KONT
Številka drevesa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilafranca	Guardi	Lux	Vilafranca	I-214	I-214	Vilafranca	Lux	Guardi	Vilafranca	I-214	Guardi	Lux
Premer (mm)	2,70	3,20	3,00	3,00	3,00	2,90	0,00	3,40	4,20	4,00	5,00	4,40	4,90	3,50	2,60	3,00
	3,10	4,28	4,52	4,81	4,16	4,50	2,03	5,58	7,08	5,63	7,32	6,01	6,16	5,71	3,08	3,22
	3,49	4,14	4,45	5,12	4,61	3,87	2,24	6,49	8,44	7,88	8,66	6,17	6,16	5,68	3,10	3,93
	3,69	5,17	5,28	5,58	4,85	4,91	3,28	6,45	8,53	6,82	9,56	6,90	7,16	6,42	3,47	4,40
	3,90	5,67	5,36	6,16	4,53	5,49	3,68	6,74	9,28	7,02	9,60	6,99	7,36	6,59	3,60	4,70
	4,03	5,79	6,21	6,42	4,75	6,33	4,19	6,90	9,32	7,85	10,27	7,20	8,14	7,32	4,19	4,95
	4,40	6,63	6,67	6,61	4,80	6,70	4,50	7,55	9,81	8,02	11,14	8,00	8,64	7,60	4,46	5,12
	5,65	7,75	7,52	7,50	7,08	9,08	5,57	8,10	10,49	8,40	11,92	8,24	10,12	9,62	4,80	5,30
	5,70	8,20	8,20	8,30	7,50	9,50	6,50	9,50	10,80	8,50	12,50	9,50	11,20	10,20	5,20	6,50
	6,00	9,10	9,90	10,10	8,80	10,50	8,00	10,90	11,60	8,70	13,30	9,80	12,30	12,20	5,60	7,20
	6,50	10,20	10,80	10,00	8,00	11,40	7,80	11,90	11,60	9,20	13,50	9,80	14,00	12,60	5,90	8,00
	7,50	11,30	13,00	11,00	11,10	13,00	9,60	12,80	11,60	9,90	14,50	9,40	14,80	14,60	6,30	8,00
	7,60	11,30	13,42	11,18	11,10	13,80	9,80	14,20	11,80	9,90	14,50	10,05	14,80	14,60	6,30	8,85
	7,90	12,10	13,50	12,00	11,10	14,20	10,00	14,50	12,10	10,00	15,00	10,30	15,50	15,00	7,00	9,00
	8,15	13,00	13,50	12,60	11,20	15,00	10,30	14,70	12,40	10,41	16,20	10,50	17,20	15,30	7,90	9,70
	8,90	13,00	15,20	13,00	11,30	16,40	11,40	15,50	13,30	11,30	16,70	12,80	18,30	17,90	7,90	10,60
9,00	13,20	16,00	13,50	11,50	16,70	11,60	16,00	13,50	11,80	17,00	13,20	19,00	18,30	7,80	11,20	
9,00	14,60	16,20	13,90	12,90	17,50	13,00	17,30	13,80	11,80	17,00	13,20	20,10	18,60	10,10	11,80	

Cisterna	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2	V-FILTER 2
Številka drevesa	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilafranca	Guardi	Vilafranca	Lux	I-214	I-214	Lux	Vilafranca	Guardi	Vilafranca	I-214	Guardi	Lux
Premer (mm)	2,00	0,00	4,70	3,60	3,60	4,40	0,00	4,70	6,30	7,00	4,30	4,00	5,70	2,30	4,60	2,60
	2,10	0,00	6,62	4,93	5,25	5,21	0,00	6,69	7,27	7,30	6,49	5,60	6,55	2,35	7,02	3,33
	2,14	0,00	6,39	5,37	5,55	5,86	0,00	7,64	8,82	8,02	7,37	5,72	7,17	2,38	7,41	4,00
	2,20	0,00	7,35	5,75	5,95	7,10	0,00	8,64	9,08	8,72	7,78	6,70	7,43	2,51	8,17	4,07
	2,40	0,00	7,45	6,44	6,70	7,23	0,00	8,86	9,53	9,17	7,83	7,40	8,46	2,80	8,81	4,80
	2,40	0,00	7,81	6,75	7,06	7,55	0,00	9,00	10,86	9,67	8,10	7,40	8,76	3,50	9,53	4,80
	2,40	0,00	8,30	6,80	8,50	8,30	0,00	10,40	10,90	10,20	8,42	7,45	9,70	3,80	9,00	4,80
	2,40	0,00	9,00	7,50	8,55	8,30	0,00	10,80	11,16	10,55	8,95	7,65	9,87	3,91	9,50	5,00
	2,40	0,00	9,50	8,00	9,00	8,50	0,00	11,00	11,50	11,00	9,00	8,00	10,50	4,80	10,50	5,10
	2,40	0,00	10,00	8,60	10,10	9,00	0,00	11,50	12,20	11,50	9,00	8,70	11,30	5,10	11,00	5,40
	2,40	0,00	10,00	8,70	10,30	9,30	0,00	11,60	12,50	11,60	9,00	8,80	11,30	5,20	11,00	5,50
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	12,50	11,60	9,00	8,80	11,80	5,20	11,00	6,00
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	12,50	11,95	9,00	8,80	11,80	5,20	11,16	6,00
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	12,50	11,95	9,00	9,00	11,80	5,20	11,16	6,00
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	12,50	11,95	9,00	9,20	11,80	5,20	11,16	6,00
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	12,80	12,50	9,20	9,20	11,80	5,20	11,16	6,00
	2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	13,80	12,50	9,70	10,00	11,80	5,20	11,16	6,00
2,40	0,00	10,00	9,00	10,30	9,60	0,00	11,60	13,80	12,50	9,70	10,00	11,80	5,20	11,16	6,00	
Cisterna	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3	V-FILTER 3
Številka drevesa	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilafranca	Guardi	I-214	Vilafranca	Lux	I-214	Vilafranca	Lux	Guardi	Vilafranca	Lux	Guardi	I-214
Premer (mm)	3,12	3,20	2,80	0,00	0,00	2,80	1,50	2,72	3,20	5,00	5,20	2,50	4,00	4,00	2,00	2,90
	3,78	4,50	3,94	0,00	0,00	3,59	2,87	3,00	4,90	7,73	6,98	3,97	5,57	5,13	2,27	3,38
	3,79	4,98	4,56	0,00	0,00	4,23	3,30	3,14	5,76	8,61	7,23	4,20	5,87	6,03	3,46	3,75
	3,85	5,62	4,66	0,00	0,00	4,39	3,72	3,50	6,07	8,80	7,30	4,23	6,46	6,53	3,80	4,80
	4,18	6,23	5,33	0,00	0,00	4,40	3,74	3,90	6,10	9,45	7,33	4,31	6,68	7,30	4,01	5,00
	4,36	7,30	5,51	0,00	0,00	4,80	4,41	4,02	6,25	9,94	7,66	4,35	7,06	7,92	4,05	5,37
	4,70	7,60	5,75	0,00	0,00	5,50	4,85	4,20	6,36	10,00	8,90	5,50	7,17	8,09	4,53	5,80
	5,20	8,80	6,50	0,00	0,00	5,50	5,00	4,20	6,36	10,20	9,52	5,50	8,60	9,70	4,70	6,00
	5,45	8,80	7,90	0,00	0,00	6,78	5,41	5,05	6,90	10,90	9,95	5,50	8,80	9,70	4,85	6,00
	6,00	8,80	7,90	0,00	0,00	7,40	5,70	5,20	7,50	11,10	10,70	5,50	8,90	9,90	5,80	6,10
	6,00	8,80	8,10	0,00	0,00	7,40	5,80	5,29	8,10	11,70	10,80	5,50	9,50	10,00	5,90	6,20
	6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,31	8,10	11,70	10,80	5,50	9,50	10,00	5,90	6,30
	6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,35	9,85	11,70	11,10	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40
	6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,40	9,85	11,80	11,10	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40
	6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,40	9,85	11,80	11,10	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40
	6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,70	9,85	12,30	11,30	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40
6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,70	9,85	12,30	11,30	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40	
6,00	9,20	8,40	0,00	0,00	7,40	6,10	5,70	9,85	12,30	11,70	5,50	9,50	10,40	5,90	6,40	
Cisterna	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4	V-FILTER 4
Številka drevesa	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilafranca	Guardi	Lux	Vilafranca	I-214	I-214	Vilafranca	Guardi	Lux	Vilafranca	I-214	Lux	Guardi

Premer (mm)	4,30	3,30	3,60	3,60	3,60	0,00	2,30	2,50	3,30	3,40	4,50	3,80	5,00	4,20	4,10	4,00
	4,92	4,76	5,16	4,26	4,55	0,00	4,27	4,17	5,32	5,31	6,48	6,49	6,67	6,50	5,96	5,25
	5,38	5,37	5,33	5,51	4,80	0,00	5,06	5,08	6,20	5,65	7,34	7,17	7,60	6,81	6,05	6,30
	5,48	5,83	6,78	6,22	4,92	0,00	5,48	5,94	6,45	5,91	7,92	8,07	7,97	7,53	7,00	6,70
	5,70	6,09	6,90	6,30	5,81	0,00	6,26	6,40	6,50	6,57	8,30	8,10	8,23	8,10	7,52	6,80
	6,00	6,31	7,63	6,40	6,30	0,00	6,57	7,00	7,94	6,85	8,30	8,17	8,37	8,56	7,60	7,00
	6,00	6,40	7,80	6,50	6,40	0,00	7,32	7,37	8,20	7,00	8,30	8,50	8,90	9,19	7,90	7,10
	6,40	6,80	8,00	6,60	7,30	0,00	7,49	7,50	8,45	7,00	8,40	8,50	9,40	9,20	8,50	8,10
	6,50	7,50	8,10	7,55	7,30	0,00	8,80	8,00	8,60	7,00	9,35	8,90	10,00	10,50	10,30	8,60
Premer (mm)	7,90	7,60	8,40	7,90	7,50	0,00	9,00	8,50	8,70	7,10	10,00	8,90	10,00	11,00	10,40	8,90
	8,20	7,10	8,50	8,00	7,80	0,00	11,50	8,70	9,60	7,30	10,10	9,20	10,60	11,50	10,50	9,50
	8,20	7,70	8,50	8,00	9,10	0,00	11,50	8,70	9,60	8,35	10,30	9,40	10,60	11,90	10,50	9,70
	8,20	8,10	8,50	8,00	9,10	0,00	11,50	9,25	9,60	8,50	10,30	9,40	10,60	11,90	10,50	9,70
	8,20	8,10	9,00	8,00	9,10	0,00	11,50	9,25	9,60	8,90	10,50	9,40	10,70	11,90	10,80	9,70
	8,20	8,10	9,20	8,00	9,10	0,00	11,50	9,50	9,70	9,40	10,70	9,50	10,90	11,90	11,03	9,80
	8,20	8,10	9,20	8,00	9,10	0,00	11,50	10,30	10,80	9,40	10,70	10,20	11,60	12,10	11,03	10,10
	8,20	8,10	9,20	8,00	9,10	0,00	11,50	10,30	10,91	9,40	10,80	10,50	11,60	12,10	11,03	10,10
	8,20	8,10	9,20	8,00	9,10	0,00	11,50	10,30	11,20	9,40	10,80	10,50	11,80	12,10	11,40	10,10

Priloga C

Povprečne vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitost fotosistema FS II (parameter Fv/Fm) pri navadnem trstu v kontrolni enoti (V-RČN-KONTR), v eksperimentalni enoti V-RČN-1 (trst iz neslanega okolja) in V-RČN-2 (trst iz slanega okolja)

Enota		V-RČN 1-KONT							V-RČN 1							V-RČN 2						
Vrsta trsa		Trs-slan			Trs-neslan				Trs-neslan							Trs-slan						
Datum meritve	Št. rastline	1	7	13	19	25	M	SE	26	32	38	44	50	M	SE	51	57	63	69	75	M	SE
27.6.	Fv/Fm	0,864	0,783	0,795	0,734	0,754	0,786	0,022	0,773	0,791	0,822	0,855	0,821	0,812	0,014	0,800	0,863	0,831	0,865	0,901	0,852	0,017
	Yield	0,797	0,807	0,764	0,772	0,687	0,765	0,021	0,817	0,737	0,720	0,703	0,824	0,760	0,025	0,745	0,825	0,773	0,854	0,828	0,805	0,020
12.8.	Fv/Fm	0,782	0,692	0,782	0,712	0,000	0,736	0,019	0,704	0,708	0,000	0,666	0,787	0,723	0,021	0,719	0,720	0,637	0,000	0,664	0,678	0,017
	Yield	0,640	0,724	0,613	0,761	0,000	0,678	0,028	0,579	0,699	0,000	0,680	0,601	0,642	0,023	0,685	0,771	0,472	0,000	0,707	0,658	0,050
30.8.	Fv/Fm	0,741	0,779	0,809	0,752	0,735	0,763	0,014	0,677	0,741	0,728	0,774	0,685	0,721	0,018	0,753	0,775	0,611	0,744	0,752	0,727	0,029
	Yield	0,588	0,776	0,687	0,755	0,589	0,679	0,040	0,576	0,583	0,739	0,669	0,649	0,643	0,030	0,592	0,685	0,551	0,762	0,598	0,638	0,038
	min	0,588	0,692	0,613	0,712	0,000			0,576	0,583	0,000	0,666	0,601			0,592	0,685	0,472	0,000	0,598		
	max	0,864	0,807	0,809	0,772	0,754			0,817	0,791	0,822	0,855	0,824			0,800	0,863	0,831	0,865	0,901		
	povpr	0,735	0,760	0,742	0,748	0,461			0,688	0,710	0,502	0,725	0,728			0,716	0,773	0,646	0,538	0,742		

Enota		V-FILTER 1 KONTR															
Vrsta klona		Lux	Guardi	I-214	Vilaf	Guardi	Lux	Vilaf	I-214	I-214	Vilaf	Lux	Guardi	Vilaf	I-214	Guardi	Lux
Datum meritve	Št. klona	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.7.	Fv/Fm	0,864	0,783	0,795	0,734	0,754	0,773	0,791	0,799	0,829	0,746	0,858	0,767	0,78	0,845	0,823	0,767

	Yield	0,797	0,807	0,764	0,772	0,687	0,817	0,737	0,81	0,731	0,733	0,728	0,773	0,688	0,801	0,681	0,769
12.8.	Fv/Fm	0,786	0,78	0,741	0,783	0,729	0,812	0,69	0,808	0,792	0,771	0,696	0,762	0,743	0,819	0,715	0,822
	Yield	0,78	0,729	0,757	0,728	0,791	0,743	0,755	0,725	0,798	0,671	0,659	0,613	0,77	0,661	0,702	0,598
19.8.	Fv/Fm	0,845	0,744	0,802	0,762	0,741	0,804	0,657	0,75	0,782	0,768	0,786	0,841	0,76	0,728	0,788	0,827
	Yield	0,693	0,79	0,694	0,772	0,779	0,578	0,659	0,574	0,731	0,622	0,764	0,754	0,746	0,651	0,746	0,769
26.8.	Fv/Fm	0,79	0,699	0,743	0,692	0,757	0,695		0,718	0,743	0,719	0,612	0,764	0,772			
	Yield	0,706	0,706	0,607	0,746	0,692	0,721		0,631	0,75	0,716	0,677	0,594	0,769			
19.8.	Fv/Fm	0,754	0,714	0,757	0,726	0,783	0,726	0,767	0,79	0,756	0,711	0,761	0,738	0,744	0,678	0,751	0,705
	Yield	0,725	0,726	0,668	0,751	0,72	0,712	0,659	0,736	0,633	0,712	0,703	0,692	0,715	0,656	0,597	
	Enota	V-FILTER 2															
	Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilaf	Guardi	Vilaf	Lux	I-214	I-214	Lux	Vilaf	Guardi	Vilaf	I-214	Guardi	Lux
Datum meritve	Št. klona	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1.7.	Fv/Fm	0	0,855	0,821	0,8	0,863	0,831	0	0,901	0,814	0,898	0,898	0	0,788	0,82	0,849	0,868
	Yield	0	0,703	0,824	0,745	0,825	0,773	0	0,828	0,704	0,803	0,778	0	0,8	0,706	0,759	0,745
12.8.	Fv/Fm	0	0,589	0	0,735	0	0,678	0,752	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yield	0	0,613	0	0,51	0	0,8	0,596	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.8.	Fv/Fm	0	0	0	0,741	0	0,775	0	0	0	0	0,589	0	0,6	0	0	0
	Yield	0	0	0	0,776	0	0,633	0	0	0	0	0,602	0	0,419	0	0	0
26.8.	Fv/Fm	0	0	0	0,741	0	0,775	0	0	0	0	0,589	0	0,6	0	0	0
	Yield	0	0	0	0,776	0	0,633	0	0	0	0	0,602	0	0,419	0	0	0
19.8.	Fv/Fm				0,68		0,75					0,866		0,684			
	Yield				0,507		0,415					0,715		0,527			
	Enota	V-FILTER 3															
	Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilaf	Guardi	I-214	Vilaf	Lux	I-214	Vilaf	Lux	Guardi	Vilaf	Lux	Guardi	I-214
Datum meritve	Št. klona	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

1.7.	Fv/Fm	0,795	0	0,9	0,755	0,88	0,815	0,807	0,779	0,873	0,706	0,874	0,69	0	0	0,888	0,842
	Yield	0,759	0	0,742	0,722	0,745	0,832	0,725	0,86	0,71	0,727	0,679	0,802	0	0	0,698	0,807
12.8.	Fv/Fm	0	0	0	0,768	0,781	0	0,8	0	0	0,817	0	0	0	0	0,48	0
	Yield	0	0	0	0,779	0,595	0	0,786	0	0	0,629	0	0	0	0	0,459	0
19.8.	Fv/Fm	0	0	0	0,767	0	0	0,739	0	0	0,624	0	0	0	0	0	0
	Yield	0	0	0	0,785	0	0	0,662	0	0	0,646	0	0	0	0	0	0
26.8.	Fv/Fm	0	0	0	0,767	0	0	0,739	0	0	0,624	0	0	0	0	0	0
	Yield	0	0	0	0,785	0	0	0,662	0	0	0,646	0	0	0	0	0	0
19.8.	Fv/Fm				0,441			0,724			0,757						
	Yield				0,58			0,383			0,565						
	Enota	V-FILTER 4															
	Vrsta klona	Lux	Guardi	I-214	Vilaf	Guardi	Lux	Vilaf	I-214	I-214	Vilaf	Guardi	Lux	Vilaf	I-214	Lux	Guardi
Datum meritve	Št. klona	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
1.7.	Fv/Fm	0,859	0,799	0,876	0,78	0	0,812										
	Yield	0,79	0,802	0,677	0,72	0	0,801										
12.8.	Fv/Fm	0	0,546	0,633	0,771	0	0	0,712	0	0,724	0	0,586	0	0,518	0	0	0,486
	Yield	0	0,417	0,629	0,654	0	0	0,768	0	0,588	0	0,678	0	0,257	0	0	0,594
19.8.	Fv/Fm	0	0,712	0	0,67	0	0	0,712	0	0,724	0,578	0,665	0	0	0	0	0,746
	Yield	0	0,496	0	0,681	0	0	0,768	0	0,588	0,557	0,636	0	0	0	0	0,634
26.8.	Fv/Fm	0	0,712	0	0,67	0	0	0,712	0	0,724	0,578	0,665	0	0	0	0	0,746
	Yield	0	0,496	0	0,681	0	0	0,768	0	0,588	0,557	0,636	0	0	0	0	0,634
19.8.	Fv/Fm				0,697			0,759			0,678	0,864		0,682			
	Yield				0,704			0,541			0,464	0,671		0,616			

PRILOGA 4

Opis postopkov mikrobiološke analize vzorcev: izolacije DNK iz čistih kultur mikobakterij vzorce, merjenje koncentracije DNK v izoliranih vzorcih, verižna reakcija s polimerazo (PCR), agarozna gelska elektroforeza, koncentriranje PCR produktov, temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE), analiza 16S rRNK nukleotidnih zaporedij

1. Izolacija DNK iz čistih kultur mikobakterij vzorcev

Smarthelix™ First DNAid Protokol za izolacijo DNK iz čistih kultur mikobakterij:

- Korak 1:

pripravili smo si sterilne 1,5 ml epice z navojem za n vzorcev. V primeru, ko smo istočasno procesirali več vzorcev, smo si v centrifugirko pripravili $n \times 400$ μ l D-stroyer pufra in dodali $n \times 4$ μ l protinaze K (20 mg/ml).

Za tekoči vzorce:

Vzeli smo 500 μ l vzorca (oz. nekaj več vzorca) in centrifugirali 3 min na 10.000xg.

Odlili smo supernatant in dodali 400 μ l D-stroyer pufra, dodali 4 μ l protinaze K, resuspendirali pelet na vorteksu.

Dodali smo sterilne steklene kroglice, vorteksirali ter nadaljevali s korakom 1.

Za trde vzorce:

Zatehtali smo približno 0,5 g trdega vzorca (natančno maso smo si zapisali) ali več, vendar končni volumen vzorca ni smel presegati 1/3 volumna epice.

Dodali smo 400 μ l D-stroyer pufra in 4 μ l protinaze K, premešali smo na vorteksu in nadaljevali s korakom 1.

V primeru, ko smo istočasno procesirali več vzorcev, smo si v centrifugirko pripravili $n \times 400$ μ l D-stroyer pufra in dodali $n \times 4$ μ l protinaze K (20 mg/ml).

Za vzorce, kateri so bili pripravljene preko filtracije, smo pred nadaljnjim korakom dodali od 300- 400 μ l fenola z namen lažjega razkroja filtra v epici.

Postopek izolacije:

1. Stresamo 2 min v SmarthelexTM Cell Distructor na 25 do 30 Hz.
2. Inkubiramo 15 min a 56°C.
3. Stresamo 2 min v SmarthelexTM Cell Distructor na 25 do 30 Hz.
4. Inkubiramo 15 min na 56°C, ponovno stresamo 2 min v SmarthelexTM Cell Distructor na 25 do 30 Hz.
5. Inkubiramo v vreli vodi 10 min.
6. Ohladimo na ST (v zamrzovalniku, 5 min) in centrifugiramo 5 min na 10.000 xg.
7. Supernatant prenesemo v nove epice (pazimo, da ne zajamemo steklenih kroglic).
8. Dodamo 3x vol B-pufra (cca 1000 μ l).
9. Vorteksiramo in prenesemo 700 μ l v DNAid kolonce (pazimo, da s pipeto ne poškodujemo membrane v kolonci), inkubiramo 1 min na ST.
10. Centrifugiramo 1 min na 16.000 xg.
11. Filtrat zavržemo, na isto DNAid kolonco dodamo še preostali vzorec, inkubiramo 1 min na ST, centrifugiramo 1 min na 16.000 xg.
12. Filtrat zavržemo in dodamo 600 μ l W-pufra.
13. Centrifugiramo 1 min na 16.000 xg.
14. Filtrat zavržemo, dodamo še 500 μ l W-pufra in centrifugiramo 5 min pri 16.000 xg.
15. Filtrat zavržemo in še enkrat centrifugiramo 1 min pri 16.000 xg.
16. Kolonce prestavimo v nove 1,5 ml epice (najbolje v safe-lock), dodamo 100 μ l E-pufra in inkubiramo 2 min na ST.

17. Centrifugiramo 1 min na 16.000 xg.

18. Eluirano DKN shranimo na -18°C.

2. Merjenje koncentracije DNK v izoliranih vzorcih

Celokupno koncentracijo izolirane DNK smo izmerili s kompletom Quanti-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) in napravo Qubit™ fluorometer (Invitrogen) po navodilih proizvajalca.

- Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pri verižni reakciji s polimerazo smo pomnoževali približno 433 bp dolg del gena za 16S rRNK. Za PCR pomnožke, ki smo jih potrebovali za TGGE, smo uporabili oligonukleotidna začetnika U986-GC in 1401r. PCR mešanica je za en vzorec vsebovala:

36,2 µl MiliQ vode

5,0 µl PCR pufra

3,0 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl oligonukleotidnega začetnika U986-GC za reamplifikacijo (10pmol/ µl)

1 µl oligonukleotidnega začetnika 1401 r (10pmol/ µl)

0,50 µl DNTP Mix (10 mM)

0,3 µl polimeraze

3 µl vzorca

Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve PCR reakcije, za reamplifikacijo izrezanih fragmentov iz TGGE gela pa dve ponovitvi PCR reakcije.

Program za PCR je bil:

predhodna denaturacija (94°C, 5 min)

5 ciklov:

denaturacija (94°C, 30 sekund)

prileganje začetnim oligonukleotidov (60°C, 30 sekund)

pomnoževanje (72°C, 4 min)

5 ciklov:

denaturacija (94°C, 30 sekund)

Prileganje začetnim oligonukleotidov (55°C, 30 sekund)

pomnoževanje (72°C, 4 min)

35 ciklov:

denaturacija (94°C, 30 sekund)

prileganje začetnim oligonukleotidov (50°C, 30 sekund)

pomnoževanje (72°C, 4 min)

Inkubacija ob zaključku programa (72°C, 7 min)

Ohlajevanje na 4°C

3. Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost izvedbe PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabili smo 1% agarozni gel. Nanj smo nanесли po 2 μ l PCR produkta, ki smo mu dodali 1 μ l 6X Loading Dye in 2 μ l 1X Sybr Green (Fluka). Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V, nato pa smo gel pogledali pod UV svetlobo v transiluminatorju (BioDoc Analyze, Biometra).

- Koncentriranje PCR produktov

PCR produkte smo skoncentrirali s posebnim sistemom (Milipore) po navodilih proizvajalca.

Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE)

Najprej smo pripravili model za vlivanje gela po navodilih proizvajalca (Biometra) (ploščo smo očistili z 70 % etanolom, na ploščo z distančnikom smo nanесли Acryl Glide (Amresco, USA), na ravno ploščo pa Polybond folijo (Biometra), na ploščo z distančniki smo namestili silikonsko tesnilo ter plošči stisnili skupaj s sponami).

Mešanico za gel smo pripravili v merilnem valju. Vanj smo zatehtali 28,8 g uree, dodali 1,5 ml 50x pufra TEA, 3 ml 40 % glicerola, 15 ml mešanice akrilamid: bisakrilamid (60:1), 12 ml formamida in dodali toliko MiliQ vode, da je končni volumen mešanice znašal 60 ml. Mešanico smo raztopili na magnetnem mešalu in s segrevanjem v topli kopeli. Ko se je vsa urea raztopila, smo mešanici dodali 102 µl TEMED in 180 µl 10 % amonijevega persulfata (APS). Premešano mešanico smo sfiltrirali skozi 0,22 µm sterilni filter (Sartorius), in jo med filtriranjem sproti točili v model za gel.

Po treh urah, ko se je gel strdil, smo model razdrli in gel prenesli na teflonsko folijo na TGGE MAXI System Controller (Biometra) tako, da je bila smer potovanja DNK vzorcev pravokotna na temperaturni gradient. Pred tem smo na teflonsko folijo nakapljali 1,5 ml 0,01 % Tritone, potem pa gel prekrili s folijo. V banjice smo nalili po 500 ml 1,25x TEA pufra in vanj in na gel namestili krpici, ki smo jih prekuhali v destilirani vodi. V jamico, ki tu poteka vzdolž celotnega gela, smo napipetirali mešanico vzorcev in TGGE barvila s skupnim volumnom 250 µl.

Program, po katerem je potekala gelska elektroforeza s pravokotnim temperaturnim gradientom je bil:

300 V, 10 min, pri 25°C

0 V, 3 min, 30-60°C (za pritrjene bakterijske združbe) ali 35-55°C (za planktonske bakterijske združbe)

300 V, 5 h, 30-60 °C ali 35-55 °C

Gel smo obarvali z 1X Sybr Green (Fluka) 30 min v temi in ga fotografirali.

4. Analiza 16S rRNK nukleotidnih zaporedij

Sekvenciranje reamplificiranih fragmetov je opravilo podjetje Macrogen (Južna Koreja). Kvalitetne sekvence smo taksonomsko uvrstili z orodjem Seqmatch v bazi podatkov RDP 10 (Ribosomal Databas Project). Za vsako našo sekvenco smo poiskali 5 filogenetsko najbolj sorodnih sekvenc in jih shranili ter jih vključili z našimi sekvencami obdelali s programom Bioedit in programskim paketom MEGA 4.0. Filogenetska drevesa smo nato izrisali z metodo povezovanja sosedov (Neighbour-joining) na podlagi Kimurinega dvoparametričnega modela, kvaliteto dreves pa smo ocenili z vezanjem (bootstrap) pri 1000 ponovitvah.