

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Živa OSTAŠEVSKI

**VPLIV REMEDIACIJE INDUSTRIJSKO
ONESNAŽENIH TAL S SPIRANJEM Z EDTA NA
AKTIVNOST IN STRUKTURO MIKROBNE
ZDRUŽBE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Živa OSTAŠEVSKI

**VPLIV REMEDIACIJE INDUSTRIJSKO ONESNAŽENIH TAL S
SPIRANJEM Z EDTA NA AKTIVNOST IN STRUKTURO
MIKROBNE ZDRUŽBE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF REMEDIATION OF INDUSTRIALLY
CONTAMINATED SOIL USING EDTA WASHING ON MICROBIAL
COMMUNITY ACTIVITY AND STRUCTURE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo, na Katedri za pedologijo in varstvo okolja.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij Oddelka za biotehnologijo z dne 13.07.2016 je bila za mentorja diplomskega dela imenovana doc. dr. Marjetka Suhadolc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Marjetka Suhadolc
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Tjaša Danevčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo 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.

Živa Ostaševski

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 631.453:631.461:502.175(043.2)
KG	čiščenje tal/onesnaženost tal/remediacija/EDTA/mikrobne združbe
AV	OSTAŠEVSKI Živa
SA	SUHADOLC, Marjetka (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VPLIV REMEDIACIJE INDUSTRIJSKO ONESNAŽENIH TAL S SPIRANJEM Z EDTA NA AKTIVNOST IN STRUKTURO MIKROBNE ZDRUŽBE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 61 str., 10 pregl., 16 sl., 65 vir.
IJ	sl
JI	sl/ en
AI	Potencialno strupene kovine (PSK) so med najpogostejšimi onesnaževalci tal. Pranje tal z ligandom EDTA učinkovito odstrani PSK iz tal. Medtem ko je vpliv remediacije na kemijske in fizikalne lastnosti tal že dobra raziskana, še vedno ostaja slabo pojasnjen vpliv remediacije na aktivnost in strukturo mikrobnih združb. Z analizo izbranih fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti tal smo želeli ugotoviti vpliv spiranja tal z EDTA na kakovost tal. Za namen naloge smo uporabili onesnažena vrtna tla iz naselja Žerjav v Mežiški dolini s povečanimi vsebnostmi Pb, Zn in Cd (originalna tla) ter remediirana tla (10, 30 in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal). Postavili smo dva poskusa: v prvem smo postavili mikrokozme v steklenih kozarcih s konstantnimi pogoji (T, vlaga), v drugem smo v rastlinjaku v talne kolone posadili sadike kitajskega zelja in redno zalivali. Remediacija onesnaženih tal je pozitivno vplivala na mikrobno biomaso v kolonskem poskusu, predvsem zaradi vpliva rastlin, v mikrokozmih se je jasno pokazal negativen vpliv EDTA. Številčnost mikrobnih združb v mikrokozmih se v remediiranih tleh ni bistveno spremenila; statistično značilno razliko je bilo zaznati le pri 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal za število bakterij. Statistična ocena za T-RFLP podatke za 16S rRNK in glivni fragment ITS je pokazala jasno razliko med onesnaženimi tlemi in remediiranimi tlemi na začetku kolonskega poskusa. Na koncu eksperimenta pa so si bile bakterijske in glivne združbe v različnih obravnavanjih bolj podobne. V obeh poskusih se kažejo negativni vplivi PSK in/ali EDTA na mikrobno aktivnost, ki smo jo merili posredno z aktivnostjo talnih encimov: dehidrogenaz, fosfataz in β-glukozidaz. Vendar je vpliv remediacije na encimsko aktivnost zaradi velike variabilnosti med rezultati še nejasen.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 631.453:631.461:502.175(043.2)

CX soil washing/soil contamination/remediation/EDTA/microbial community

AU OSTAŠEVSKI Živa

AA SUHADOLC, Marjetka (mentor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology

PY 2016

TI IMPACT OF REMEDIATION OF INDUSTRIALLY POLLUTED SOIL USING EDTA WASHING ON MICROBIAL COMMUNITY ACTIVITY AND STRUCTURE

DT Graduation thesis (university studies)

NO X, 61 p., 10 tab., 16 fig., 65 ref.

LA sl

AL sl/ en

AB Potentially toxic metals (PTM) are among the most common soil contaminants. Soil washing with EDTA effectively removes toxic metals from contaminated soil. While the effects of remediation on the chemical and physical soil properties are well studied, the effects of remediation on the activity and structure of microbial communities remain poorly understood. We studied the effects of soil washing with EDTA on soil quality with analysis of selected physical, chemical and biological properties of the soil. For the purpose of this thesis, we used contaminated garden soil from Žerjav in Mežiška Dolina, with elevated concentrations of Pb, Zn and Cd (original soil) and remediated soil (10, 30 and 60 mmol EDTA kg⁻¹ dry soil). We set up two experiments: microcosms in glass jars with constant conditions (T, humidity) and soil columns in the greenhouse, where we planted seedlings of Chinese cabbage and watered regularly. Remediation of contaminated soil had a positive impact on the microbial biomass in column experiment, mainly due to the impact of the plant, in microcosms, however, the negative impact of EDTA was clearly demonstrated. In microcosms, the abundance of microbial communities in the remediated soil didn't change significantly; a statistically significant difference for the number of bacteria was observed only at 60 mmol EDTA kg⁻¹ dry soil. At the beginning of the column experiment, a clear difference between the contaminated and remediated soil was detected in statistical evaluation of T-RFLP data for 16S rRNA and fungal ITS fragment. At the end of the experiment, bacterial and fungal communities from different treatments were more similar. In both experiments, the negative effects of PSK and/or EDTA on microbial activity, measured indirectly by the activity of soil enzymes: dehydrogenases, phosphatases and β- glucosidases were detected. However, the impact of remediation on the enzyme activity due to the high variability between the results remains still unclear.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TLA IN POSLEDICE ONESNAŽENOSTI	3
2.2 REMEDIACIJA TAL	4
2.3 KAKOVOST TAL.....	8
2.4 TALNI MIKROORGANIZMI	9
2.4.1 Bakterije	10
2.4.2 Glive.....	10
2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na združbe mikroorganizmov v tleh	11
3 METODE IN MATERIALI	13
3.1 IZBOR LOKACIJE IN REMEDIACIJA TAL.....	13
3.2 LASTNOSTI ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TAL	14
3.2.1 Standardna pedološka analiza tal	14
3.2.2 Določanje skupnih vsebnosti kovin	15
3.2.3 Dostopnost kovin	15
3.2.3.1 Frakcionacija kovin	16
3.2.3.2 Biodostopnost želodčne in črevesne faze.....	17
3.2.3.3 Vsebnost kovin v kitajskem zelju.....	17
3.3 OPIS POSKUSOV.....	18
3.3.1 Mikrokozmi v kozarcih.....	18
3.3.2 Kolonski poskus v rastlinjaku	19
3.4 ANALITSKE METODE	20
3.4.1 Vsebnost vode v tleh	20
3.4.2 Sposobnost tal za zadrževanje vode	21
3.4.3 Vrednost pH.....	22
3.4.4 Encimske aktivnosti v tleh	22
3.4.4.1 Dehidrogenazna aktivnost.....	22

3.4.4.2	Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost	23
3.4.4.3	β -glukozidazna aktivnost.....	23
3.4.5	S substratom (glukozo) inducirana respiracija.....	24
3.4.6	Mikrobiološke metode.....	24
3.4.6.1	Izolacija skupne DNK iz vzorca tal.....	24
3.4.6.2	Merjenje koncentracij in elektroforeza.....	26
3.4.6.3	Čiščenje DNK	27
3.4.6.4	Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)	28
3.4.6.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	31
3.4.6.6	Priprava in izolacija standardov	32
3.5	OBDELAVA REZULTATOV	33
4	REZULTATI	34
4.1	LASTNOSTI ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TAL	34
4.1.1	Sposobnost tal za zadrževanje vode	34
4.1.2	Vrednost pH.....	34
4.2	AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE	36
4.2.1	Dehidrogenazna aktivnost	36
4.2.2	Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost	37
4.2.3	β -glukozidazna aktivnost	39
4.2.4	S substratom inducirana respiracija (SIR)	40
4.3	MIKROBNA BIOMASA	42
4.4	SESTAVA, PESTROST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB	44
4.4.1	Številčnost mikrobnih združb	44
4.4.2	Struktura in pestrost mikrobnih združb	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	47
5.1	MIKROBNA BIOMASA	47
5.2	AKTIVNOST MIKROBNIH ZDRUŽB.....	48
5.3	ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB V MIKROKOZMIH	51
5.4	STRUKTURA IN PESTROST MIKROBOV V KOLONSKEM POSKUSU	51
5.5	SKLEPI.....	51
6	POVZETEK.....	53
7	VIRI.....	55
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Potencialni kazalci kakovosti tal (Suhadolc, 2013).....	9
Preglednica 2: Rezultati standardne pedološke analize originalnih tal in tal remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol kg ⁻¹ suhih tal).....	15
Preglednica 3: Skupne koncentracije kovin določene z zlatotopko v originalnih tleh in tleh remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal). Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$) (Jelusic in sod., 2013).....	15
Preglednica 4: Frakcionacija Pb, Zn in Cd v originalnih tleh in tleh opranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal). Rezultati so podani kot povprečje šestih ponovitev $\pm$ SD in kot celotna odstranjena količina iz vseh frakcij (%). Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$). Kratica LOQ označuje vrednosti, ki so pod mejo zaznave (za Zn 0.01 mg L ⁻¹ , za Cd 0.02 mg L ⁻¹ in za Pb 0.1 mg L ⁻¹) (Jelusic in sod., 2013).	16
Preglednica 5: Koncentracije Pb, Zn in Cd v želodčni in črevesni fazi pridobljene z metodo PBET (fiziološki ekstrakcijski test) v originalnih tleh in tleh opranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal) ob koncu kolonskega poskusa s kitajskim zeljem. Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$). Kratica LOQ označuje vrednosti, ki so pod mejo zaznave (za Zn 0.01 mg L ⁻¹ , za Cd 0.02 mg L ⁻¹ in za Pb 0.1 mg L ⁻¹) (Jelusic in sod., 2013).....	17
Preglednica 6: Delež potencialno toksičnih kovin odstranjen iz tal z uporabo različnih koncentracij EDTA, koncentracije Pb, Zn in Cd v koreninah in listih <i>B. rapa</i> , translokacija potencialno toksičnih kovin (TF) in biokoncentracijski faktorji (BCF) v kolonskem poskusu. Rezultati so podani kot povprečje šestih ponovitev $\pm$ SE Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$) (Jelusic in sod., 2013).	18
Preglednica 7: Pogoji reakcij PCR	29
Preglednica 8: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za qPCR	31
Preglednica 9: Pogoji reakcij qPCR	32
Preglednica 10: Vrednosti pH za originalna tla in tla remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol kg ⁻¹ suhih tal) v mikrokozmi in v kolonskem poskusu. Rezultati so podani kot povprečje treh ponovitev.	35

KAZALO SLIK

Slika 1: S kovinami močno onesnaženo naselje Žerjav v Mežiški dolini. V ospredju so vrtovi in stanovanjske hiše ter v ozadju nekdanja topilnica svinca (Jelušič, 2014).	13
Slika 2: Shema pilotnega obrata za spiranje tal z EDTA (Voglar in Leštan 2012).	14
Slika 3: Kolonski poskus v rastlinjaku s testnimi rastlinami kitajskega zelja (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i> Hanelt.)	20
Slika 3: Oprema za določanje vsebnosti vlage v tleh: eksikator (levo) in pečica za sušenje vzorcev tal (desno).....	21
Slika 4: Komora za določanje vodno zadrževalnih lastnosti tal (levo) in obročki na keramični plošči, napolnjeni s tlemi, ki je nasičena z vodo (desno)	22
Slika 6: NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	26
Slika 7: Dehidrogenazna aktivnost v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, p < 0,05).	36
Slika 8: Aktivnost kislih fosfataz v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med aktivnostjo kislih fosfataz v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, p < 0,05).	37
Slika 9: Aktivnost bazičnih fosfataz v originalnih tleh in tleh remidiiranih z 10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, 30 mM mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med aktivnostjo bazičnih fosfataz v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, p < 0,05).	38
Slika 10: Aktivnost β- glukozidaz v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih	

- ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med β -glukozidazno aktivnostjo v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$). 39
- Slika 11: S substratom inducirana respiracija v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 1. teden, M - 6. teden in M - 22. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med respiracijo v originalnih tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$). 40
- Slika 12: Mikrobna biomasa (v dsDNA koncentraciji g⁻¹ suhih tal) v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$). 42
- Slika 13: Mikrobna biomasa (v dsDNA koncentraciji g⁻¹ suhih tal) v zgornjem 1 cm sloju originalnih tal in v tleh remediiranih z EDTA na začetku (teden 0) in na koncu (teden 7) kolonskega poskusa z rastlinami kitajskega zelja (*B. rapa*). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$). 43
- Slika 14: Povprečno število kopij bakterijskih 16S rRNA genov v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$). 44
- Slika 15: Povprečno število kopij glivnih genov ITS v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$). 45
- Slika 16: Analiza glavnih komponent seta T-RFLP podatkov bakterijske 16S rRNA (levo) in glivne regije ITS (desno). Bližina elips, ki obkrožajo ponovitve posameznega obravnavanja, kažejo na podobnost med obravnavanji. 46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PSK	potencialno strupene kovine
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
PCR	(ang. the polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo
T-RFLP	(ang. terminal restriction length polymorphism) polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov
SIR	(ang. substrate induced respiration) s substratom inducirana respiracija
PBET	(ang. physiologically based extraction test) fiziološko osnovan ekstrakcijski test
AAS	(ang. atomic absorption spectroscopy) atomska absorpcijska spektrometrija
PNG	p- nitrofenil glukozid
PNP	p-nitrofenilfosfat
MUB	(ang. modified universal buffer) univerzalni modificiran pufer

1 UVOD

Tla so najbolj temeljni in osnovni vir, tako za ljudi kot tudi za ostalo kopensko življenje. Predstavljajo biološko in kemijsko najbolj raznolik del planeta ter so omejen in pretežno neobnovljiv vir. V primeru zlorabe so nagnjena k hitri degradaciji, ki povzroči zmanjšanje kakovosti tal ali celo njihovo izgubo. Evropska unija je zato sprejela tematsko strategijo za varstvo tal, v kateri opredeljuje osem procesov degradacije tal; erozija, zmanjšanje vsebnosti organske snovi in biološke pestrosti tal, onesnaževanje, zasoljevanje, zbijanje tal, pozidava, zemeljski usadi in poplave (Progress in management ..., 2007).

V Evropi naj bi bilo več kot 2.5 milijonov potencialno onesnaženih zemljišč; od tega jih je več kot 14 % onesnaženih. Med najpogostejšimi onesnaževalci tal so poleg olja potencialno strupene kovine (PSK) (Progress in management ..., 2007). Težke kovine so v tleh sicer naravno prisotne in se nahajajo v sledovih, vendar pa so se ponekod zaradi antropogenih dejavnosti nakopičile do koncentracij, ki škodijo rastlinam in živalim ter celotnemu ekosistemu. Za razliko od organskih onesnažil se ne razgradijo in vztrajajo v tleh še dolgo po onesnaženju (Chibuike in Obioram, 2014).

Z remediacijo tal se izboljša kakovost tal in preprečuje tveganja, ki ga potencialno toksične kovine predstavljajo v tleh za ljudi in okolje. Najbolj razširjene in raziskane tehnike remediacije tal onesnaženih s PSK so tehnike imobilizacije, fitoremediacije in pranja tal. Slednja je zelo učinkovita pri odstranjevanju PSK, saj se jo lahko zaradi hitre kinetike, enostavnosti delovanja in ekonomske učinkovitosti uporabi za večje površine (Wuana in Okieimen, 2011; Wei in sod., 2011). Pranje tal z ligandi ima manjši vpliv na spremembe pedoloških lastnosti in ohrani biološke lastnosti tal. Najobetavnejši med ligandi je EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), predvsem zaradi visoke učinkovitosti odstranitve kovin iz tal, relativno dostopne cene in zmožnosti ponovne uporabe – recikliranja v postopku (Jelušič, 2014).

Kakovost tal je definirana kot sposobnost specifičnega tipa tal, da deluje znotraj omejitev naravnega ali upravljanega ekosistema in vzdržuje produktivnost rastlin in živali, ohranja ali izboljšuje kvaliteto vode in zraka ter podpira zdravje človeka in bivalnega okolja (Seybold in sod., 1997). Pri ocenjevanju kakovosti tal so biološki parametri še posebej pomembni, ker se organizmi na spremembe rabe tal, okoljskih pogojev ali onesnaženje, odzovejo veliko hitreje kot večina kemijskih in fizikalnih parametrov. Pri tem so zelo uporabni kazalci mikroorganizmi, saj opravljajo ključne funkcije pri razgradnji organske snovi, kroženja hranil in ohranjanju strukture tal.

Namen diplomskega dela je bil z analizo izbranih fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti tal ugotoviti vpliv spiranja tal z EDTA na kakovost tal. Vpliv remediacije na

kemijske in fizikalne lastnosti tal je že dodobra raziskan, še vedno pa ostaja slabo pojasnjen vpliv remediacije na aktivnost mikrobnih združb (Udovič in Leštan, 2012). V diplomski nalogi smo se zato osredotočili na preučevanje bioloških parametrov kakovosti tal in sicer mikrobni biomasi, njeni aktivnosti ter sestavi in številčnosti posameznih mikrobnih domen.

V raziskavi smo uporabili s težkimi kovinami onesnažena vrtna tla iz naselja Žerjav v Mežiški dolini, kjer so še do nedavnega več stoletij kopali in talili svinčevo in cinkovo rudo. Posledično je zemlja v dolini, vključno z 6600 ha kmetijskih zemljišč, onesnažena predvsem s svincem pa tudi s Zn, Cd in As (Voglar in Leštan, 2012).

Spiranje onesnaženih tal z EDTA naj ne bi imelo škodljivega vpliva na kakovost in funkcionalnost tal. Nasprotno, zaradi odstranjevanja kovin, se izboljšajo pogoji za talne organizme in s tem kakovost tal.

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- Aktivnost mikrobnih združb v remediiranih tleh bo večja kot v onesnaženih tleh.
- Mikrobna biomasa v remediiranih tleh bo večja kot v onesnaženih tleh.
- Številčnost mikrobnih združb bakterij in gliv bo večja v remediiranih tleh kot v onesnaženih tleh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TLA IN POSLEDICE ONESNAŽENOSTI

Tla so najbolj temeljni in osnovni vir tako za ljudi kot tudi za ostalo kopensko življenje. Nudijo nam hrano, gorivo in vlakna. Funkcije tal so številne in poleg prehranske varnosti in kvalitete okolja, ki sta bistvena za obstoj človeštva, vključujejo še globalne klimatske spremembe (ponor za CO₂ in CH₄, kopičenje ogljika v tleh in organizmih, zmanjšanje nitrifikacije itd.), biodiverziteto (mikrobna biodiverziteta, ohranjanje flore in favne itd.), urbanizacijo (infrastruktura, rekreacija, odlaganje odpadkov itd.), kvaliteto voda (filtriranje onesnažil, čiščenje vode, zadrževanje sedimentov in snovi itd.) ter proizvodnjo surovin za biogoriva (Blanco-Canqui in Lal, 2008).

Z vidika časovne skale človeka so tla omejen in pretežno neobnovljiv vir. So harmonično organiziran dinamičen sistem, ki je v primeru zlorabe nagnjen k hitri degradaciji. Rodovitne površine so omejene in predstavljajo manj kot 11 % kopnega dela zemeljskega površja, vendar s hrano oskrbujejo več kot 6 bilijonov ljudi, pri stopnji rasti 1,3 % na leto (Blanco-Canqui in Lal, 2008). Podatek, da vsako leto po vsem svetu nepovratno izgubimo vsaj 24 milijard ton tal je zato zelo zaskrbljujoč; še posebej ob dejstvu, da je za izoblikovanje 2 centimetrov vrhnje plasti tal lahko potrebnih več kot 500 let (Jones in sod., 2005).

Evropska unija je zaradi izjemnega pomena tal in potrebe po preprečevanju njihove nadaljnje degradacije, sprejela tematsko strategijo za varstvo tal ter izpostavila naslednje probleme: erozija, zmanjšanje količine organske snovi, zasoljevanje, zbijanje tal, zemeljski usadi, pozidava, zmanjšanje biološke raznovrstnosti in onesnaževanje tal (Sporočilo komisije svetu ..., 2006). V diplomski nalogi smo se osredotočili na onesnaževanje, in sicer na onesnaževanje tal s potencialno strupenimi kovinami (PSK), ki so poleg olja najpogostejši onesnaževalci tal. V Evropi naj bi bilo več kot 2.5 milijonov potencialno onesnaženih zemljišč; od tega jih je več kot 14 % onesnaženih in so potrebni remediacije (Soil contamination ..., 2015). Glede na projekcije obstaja možnost, da se bo do leta 2050 število onesnaženih zemljišč povečalo za več kot 50 % (Progress in management ..., 2007).

Težke kovine so v talnem okolju, zaradi pedogenetskih procesov preperevanja matične osnove tal, naravno prisotne. Navadno se nahajajo v sledovih (<1000 mg kg⁻¹) in so redko toksične, lahko pa se zaradi geoloških in predvsem antropogenih aktivnosti (rudarjenje in taljenje rude, industrija, promet, uporaba gnojil in pesticidov, proizvodnja baterij, odlaganje odpadkov itd.) povečajo do koncentracij, ki škodijo rastlinam in živalim (Chibuike in Obioram, 2014). Najpogostejše so tla onesnažena s svincem (Pb), kromom

(Cr), arzenom (As), cinkom (Zn), kadmijem (Cd), bakrom (Cu), živim srebrom (Hg) in nikljem (Ni) (Wuana in Okieimen, 2011).

Nekatere težke kovine, kot sta npr. Cu in Zn, so nujno potrebne za fiziološke življenjske procese (so npr. sestavni del metaloenzimov), vendar je prevelika akumulacija v živih organizmih vedno škodljiva. Na splošno toksične kovine povzročajo inaktivacijo encimov, poškodujejo celice, tako da delujejo kot antimetaboliti, ali tvorijo precipitate ali kelate z esencialnimi metaboliti (Sobolev in Begonia, 2008; Wuana in Okieimen, 2011).

Pb, Cr, As, Cd in Hg se smatrajo kot sistemski toksini, ki povzročijo škodo številnim organom že pri nizkih koncentracijah izpostavitve, klasificirani so tudi kot človeški karcinogeni (Tchounwou in sod., 2012). Težke kovine se za razliko od organskih onesnažil ne razgradijo kemijsko ali s pomočjo mikrobov in vztrajajo v tleh še dolgo po onesnaženosti; npr. svinec naj bi imel zadrževalni čas v tleh od 150 do 5000 let. Medtem se lahko izpirajo v podtalnico, s prašnimi delci prenašajo po zraku ali vstopijo in kopičijo v prehranski verigi, s čimer resno ogrožajo zdravje ljudi in ekosistema (Wuana in Okieimen, 2011; Tchounwou in sod., 2012; Sobolev in Begonia, 2008).

V Sloveniji predstavljata enega od glavnih načinov antropogenega vnosa težkih kovin v okolje rudarstvo in predelava rude. Med bolj znanimi kraji je Mežiška dolina, kjer so v celotnem obdobju rudarjenja pridobili okoli 19 milijonov ton svinčeve in cinkove rude. Na kritično onesnaženem območju Mežiške doline izstopajo zlasti visoke vsebnosti svinca (Pb) in kadmija (Cd), povišane pa so tudi vsebnosti cinka, molibdena in arzena. Povprečne vsebnosti za Pb, Cd in Zn znašajo: 878 mg/kg (Pb), 6,2 mg/kg (Cd) in 854 mg/kg (Zn). Vrednosti Pb presegajo slovensko povprečje za več kot 20-krat in skupaj s Zn presegajo kritične vrednosti: 530 mg/kg (Pb) in 720 mg/kg (Zn). To pomeni, da tla zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali na okolje, niso primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode. Vsebnosti Cd presegajo opozorilne vrednosti (2 mg/kg) in pomenijo pri določenih vrstah rabe tal verjetnost škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali na okolje (Gosar in Šajn, 2006).

2.2 REMEDIACIJA TAL

Z remediacijo tal se izboljša kakovost tal in preprečuje tveganja, ki ga potencialno toksične kovine predstavljajo v tleh za ljudi in okolje. Zaradi nerazgradljivosti težkih kovin, metode remediacije temeljijo predvsem na spreminjanju njihove mobilnosti in transporta v tleh. Izbira najbolj primerne metode je odvisna od lastnosti tal, dostopnosti območja, vrste in koncentracije potencialno toksičnih kovin in končne uporabe onesnaženega območja oz. zahtevane stopnje očiščenja tal, ki jo določata zakonodaja in raba tal (Mulligan in sod., 2001; Leštan, 2002).

Čiščenje tal lahko poteka na mestu onesnaženja (*in situ*) ali pa se onesnažena tla izkoplje in šele nato začne s postopki čiščenja (*ex situ*). *In situ* čiščenje je precej cenejše, vendar tudi dolgotrajnejše od *ex situ* (Leštan, 2010). Po načinu obdelave tal ločimo fizikalno, kemijsko in biološko obdelavo onesnaženih tal.

Fizikalna remediacija vključuje predvsem metode zamenjave tal in termalno desorpcijo. V metodi zamenjave tal se delno ali v celoti zamenja onesnažena tla s čistimi, s ciljem razredčiti onesnažilo in povečati kapaciteto tal v okolju. Učinkovito se lahko izolira tla in ekosistem ter tako zmanjša učinek na okolje, vendar je metoda delovno obsežna, draga in primerna za zelo onesnažena tla majhnih površin. Termalna desorpcija temelji na hlapnosti onesnažila (npr. Hg, As) in posledično zajema segrevanje onesnaženih tal s paro, mikrovalovi ali infrardečim obsevanjem. Hlapne težke kovine se nato zbere in odstrani z uporabo vakumskega negativnega pritiska ali nosilnega plina. Prednost te tehnologije je v enostavnem procesu, prenosnih napravah in ponovni uporabi remedrirane zemlje. Faktorji, ki omejujejo uporabo te tehnologije so drage naprave in dolg desorpcijski čas (Qayyum in sod., 2015).

Kemijska remediacija zajema spiranje s kemikalijami, kemijsko stabilizacijo, elektrokinetično remediacijo in vitrifikacijo. Za spiranje onesnaženih tal s kemikalijami se uporablja vodo, reagente in ostale tekočine ali plin, ki lahko sperejo onesnažilo iz tal. Preko izmenjave ionov, precipitacije, adsorpcije in kelacije, se težke kovine prenesejo iz tal v tekočo fazo in se jih potem zbere iz odcednih vod. Za spiranje tal se v glavnem uporablja anorganska topila, kelatne ligande in površinsko aktivne snovi. Pri kemijski stabilizaciji se v onesnažena tla doda reagente ali materiale, kot so glina, kovinski oksidi, biomateriali itd., ki s težkimi kovinami tvorijo netopne ali težko gibljive, nizko toksične snovi, kar zmanjša migracijo težkih kovin v vodo, rastline in ostale okoljske medije (Qayyum in sod., 2015).

Elektrokinetična remediacija je nova tehnologija, ki vključuje elektrokinetično gibanje nabitih delcev suspendiranih v raztopini tal, sproženo z električnim gradientom. Tarčne kovine se lahko odstrani s precipitacijo na elektrodah. Primerna je za slabo prepustna tla in ima prednost enostavne namestitve in upravljanja ter majhnih stroškov, remediacijo okolja doseže pri ohranitvi originalnega ekotopa. Za odstranjevanje težkih kovin se jo kombinira tudi z ostalimi metodami kot je npr. elektrokinetična-mikrobna remediacija. Vitrifikacija je proces v katerem se tla segreje od 1400 do 2000 °C, organske snovi pri tem izhlapijo ali se razgradijo. Po ohlajanju talina tvori steklen, kristalinični produkt, ki obdaja težke kovine in tako prepreči njihovo migracijo. Metoda je zelo učinkovita, vendar potrebuje veliko energije za taljenje, zato je draga in omejena za uporabo (Qayyum in sod., 2015; Leštan in sod., 2008).

Biološka remediacija vključuje fitoremediacijo, bioremediacijo in remediacijo s kombiniranjem. Pri fitoremediaciji se uporablja žive zelene rastline za fiksacijo ali

adsorpcijo onesnažil in čiščenje onesnažil ali zmanjšanje oz. izničenje njihovega tveganja. Trije glavni tipi fitoremediacije so: fitostabilizacija, fitovolatilizacija in fitoekstrakcija. Fitoekstrakcija je najbolj razširjena in v javnosti zelo priljubljena zelena tehnologija remediacije. Učinkovita je le za tla, ki so onesnažena s specifičnimi in manj problematičnimi toksičnimi kovinami in metaloidi, npr. Ni, Zn in As, ki jih rastline zlahka privzamejo, in je znano katere rastline so sposobne hiperakumulacije in dajo dovolj visoko biomaso (Qayyum in sod., 2015).

Mikroorganizmi ne morejo razgraditi ali uničiti težkih kovin, medtem ko lahko vplivajo na njihovo migracijo in transformacijo s spreminjanjem njihovih fizičnih in kemijskih lastnosti. Mehanizmi vključujejo ekstracelularno kompleksiranje, precipitacijo, oksidacijsko-redukcijske reakcije in intracelularno akumulacijo. Ta tehnologija temelji na spodbujanju rasti specifične mikroflore ali mikrobne združbe, ki izvira iz onesnaženega mesta in je sposobna opraviti želene aktivnosti (Qayyum in sod., 2015; Singh in sod., 2014).

V remediaciji tal se lahko uporablja tudi nekatere nižje živali, ki težke kovine adsorbirajo, jih razgradijo, migrirajo in s tem odstranijo ali inhibirajo njihovo toksičnost. Npr. deževniki lahko učinkovito akumulirajo Pb, akumulacija narašča skupaj s koncentracijami Pb (Qayyum in sod., 2015).

Najbolj razširjene in raziskane tehnike čiščenja tal onesnaženih s PSK so tehnike imobilizacije, fitoremediacije in pranja tal. Slednja je zelo učinkovita pri odstranjevanju PSK, saj se jo lahko zaradi hitre kinetike, enostavnosti delovanja in ekonomske učinkovitosti uporabi za večje površine (Wuana in Okieimen, 2011).

Med pranjem tal se v procesu fizične separacije talni delci, ki vsebujejo večino onesnažila, ločijo od glavnine talnih frakcij, pri kemijski ekstrakciji se onesnažila odstranijo iz tal z vodno raztopino in nato zberejo iz raztopine na trden substrat. Za pranje tal se najpogosteje uporablja kisline in ligande (Wuana in Okieimen, 2011; Wei in sod., 2011).

Za zdravje in funkcionalnost tal kislinska metoda ni najprimernejša, ker kisli pogoji v tleh negativno vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti tal in biološke parametre. Kisline namreč močno raztapljajo karbonate ter druga mesta v tleh, sposobna vezave kovin in izmenjajo kovine iz talnih koloidov s H^+ ioni (Leštan in sod., 2008).

Pranje tal z ligandi ima manjši vpliv na spremembe pedoloških lastnosti in ohrani biološke lastnosti tal (Jelušič, 2014). Ti odstranijo PTE iz trdnih faz tal tako, da z njimi tvorijo močne vodotopne komplekse. Na izbiro primerne liganda pomembno vplivata ekstrakcijski potencial, kar pomeni da mora ligand tvoriti močne in stabilne komplekse s kovinami pri različnih vrednostih pH, in selektivnost liganda za elemente, ki jih želimo

odstraniti. Dejavniki, ki jih upoštevamo pri izbiri, so še možnost ponovne uporabe liganda v primeru recikliranja, nizek redoks potencial in toksičnost ter sprejemljiva cena (Voglar, 2013).

Pred izvedbo te metode je potrebno za vsa tla določiti optimalne remediacijske pogoje glede na lastnosti onesnaženih tal (vrsta onesnaženosti in vsebnost drugih onesnaževalcev, vsebnost organske snovi, tekstura, mineralna zgradba, pH, koncentracije Ca, Mg in Fe, CEC), onesnaževalce (vrsta in koncentracija PSK, fizikalno-kemijske oblike, dostopnost v tleh in frakcionacija v talni matriki) in tehnologije procesa (izbira in koncentracija liganda, čas ekstrakcije, pH pralne raztopine, razmerje tla-pralna raztopina in izbira elektrolita) (Jelušič, 2014).

Za zadostno odstranitev onesnažil je potrebno uporabiti presežno koncentracijo liganda, ker PSK tekmujejo za vezavna mesta na ligandu z drugimi ioni, kot so Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} in Al^3 . Pri tem pride v tleh tudi do odstranitve koristnih hranil, kot so Mn, Fe in Ca, ki jih je potrebno vrniti v očiščena tla. Velika vsebnost organskih snovi - velike humusne molekule, ki imajo visoko afiniteto do PSK, s katerimi tvorijo v vodi netopne komplekse, zmanjšujejo učinkovitost remediacije (Voglar, 2013; Jelušič, 2014).

Zaradi visoke učinkovitosti odstranitve kovin iz tal, relativno dostopne cene in zmožnosti ponovne uporabe – recikliranja v postopku, je najobetavnejši ligand EDTA (etilendiamintetraocetna kislina). Je neselektiven ligand, ki poleg tarčnih PSK veže tudi druge katione ter v manjši meri razbija strukturo tal, raztaplja organsko snov, okside in talne minerale in s tem posredno v talno raztopino sprošča kovinske ione. Njegova zelo pomembna lastnost je slaba razgradljivost, ki je zaželen pri tehnologiji pranja tal, kjer se ligand reciklira. (Voglar, 2013). V poskusih, kjer so preučevali vpliv kontaktnega časa liganda in talne matrike v vodni raztopini na učinkovitost ekstrakcije, so ugotovili, da povečevanje koncentracije EDTA nad zahtevami tal (koncentracija dostopnih divalentnih kationov) nima nobenega dodatnega učinka (Voglar, 2013; Jelušič, 2014).

Vsebnost PSK v tleh po remediaciji tal z EDTA po metodi opisani in uporabljeni v diplomski nalogi, se zmanjša tudi za 80 % (Voglar, 2013). PSK, ki v tleh preostanejo, so verjetno prisotne v kemijsko stabilnih mineralnih oblikah in so vezane na nelabilne talne frakcije. Tako so manj mobilne in biodostopne ter s tem manj toksične v primerjavi s prvotnimi pogoji pred remediacijo. Poraja pa se vprašanje ali je zmanjšana mobilnost in biodostopnost presežka kovin v tleh trajen ali le začasen dosežek remediacije tal (Leštan in sod., 2008). Tla so dinamična struktura, zato bi lahko po remediaciji številni abiotični (klimatski, hidrološki, itd.) in biotični (mikroorganizmi in favna) dejavniki tal, sprožili prehajanje presežka kovin iz manj v bolj mobilne in dostopne oblike ter s tem spremenili stanje toksičnosti (Leštan in sod., 2008).

2.3 KAKOVOST TAL

Kakovost tal je definirana kot sposobnost specifičnega tipa tal, da deluje znotraj omejitev naravnega ali upravljanega ekosistema in vzdržuje produktivnost rastlin in živali, ohranja ali izboljšuje kvaliteto vode in zraka ter podpira zdravje človeka in bivalnega okolja. Funkcije tal zajemajo procese vzdrževanja življenja, kot so pritrjevanje rastlin in zalaganje s hranili, zadrževanje vode, prevodnost in vzdrževanje talnih prehranskih mrež ter funkcije regulacije okolja, kot so kroženje hranil, vir mikrobne pestrosti, remediacija onesnažil in odstranjevanje težkih kovin (Bruggena, 2000; Seybold in sod., 1997).

Kakovost tal je kombinacija inherentnih in dinamičnih lastnosti tal. Spremembe inherentnih lastnosti tal so neodvisne od uporabe ozemlja in načina upravljanja in zajemajo lastnosti, ki so se vzpostavile v tleh tekom tisočletij (npr. tekstura tal, vrsta gline itd.). Spremembe v dinamičnih lastnostih (npr. organska snov, struktura tal, hitrost infiltracije itd.) so odvisne tako od načina upravljanja z ozemljem, kot tudi od inherentnih lastnosti tal. Npr. vsebnost organske snovi v tleh je odvisna od načinov obdelovanja zemlje in vrste rastlin, ki rastejo na njih, vendar je celokupna vsebnost organske snovi omejena s teksturo tal in podnebjem (inherentne značilnosti) (De la Rosa in Sobral, 2008; Karlen in sod., 2003).

Osnovni pokazatelji kakovosti tal so fizikalne, kemijske in biološke lastnosti tal (Preglednica 1). Vsi ti parametri nam opisujejo posamezne lastnosti tal, ki jih moramo povezovati in vrednotiti z vidika delovanja tal. Nabor in ustreznost kazalnikov za oceno kakovosti tal je odvisen od vrste in uporabe tal, njihove funkcije in dejavnikov, ki prispevajo k njihovem nastanku ter od obsega ocene.

Med fizikalne kazalce kakovosti tal prištevamo teksturo tal, globino tal in koreninski sistem, volumsko gostoto, infiltracijo, poljsko kapaciteto, vsebnost vode, temperaturo tal in druge. Kemijski kazalci so celokupna koncentracija C in N, pH, električna prevodnost, anorganski N, P, koncentracija K in drugi. Biološki kazalci temeljijo na količini, aktivnosti in pestrosti talne flore, favne, mikroorganizmov ter metabolnih ciklov in pripadajočih encimov (Burns in sod., 2005; Seybold in sod., 1997; Suhadolc, 2013). Pri ocenjevanju kakovosti tal so biološki parametri še posebej pomembni, ker se organizmi na spremembe uporabe ozemlja, okoljskih pogojev ali onesnaženje, odzovejo veliko hitreje kot večina kemijskih in fizikalnih parametrov. Pri tem so zelo uporabni indikatorji mikroorganizmi, saj opravljajo ključne funkcije pri razgradnji organske snovi, kroženja hranil in ohranjanju strukture tal.

Večina fizikalno-kemijskih dejavnikov je povezana z inherentno kakovostjo tal, medtem ko so biološki in nekateri fizikalni dejavniki v povezavi z dinamično kakovostjo tal.

Preglednica 1: Potencialni kazalci kakovosti tal (Suhadolc, 2013)

Fizikalni kazalci	Kemijski kazalci	Biološki kazalci
- globina tal - tekstura - volumska gostota - skelet (delež in velikost) - struktura in obstojnost agregatov - sposobnost tal za zadrževanje vode (poljska kapaciteta) - poroznost - hitrost infiltracije - hidravlična prevodnost - mehanska upornost - globina korenin	- pH - vsebnost organske snovi - založenost s hranili in dostopnost - C/N razmerje - kationska izmenjevalna kapaciteta in delež baz - vsebnost onesnažil (anorganskih in organskih ter njihova dostopnost) - karbonati - električna prevodnost - slanost	Biomasa - mikrobna biomasa (SIR, PLFA, CFE, DNK, ...) - talne živali (deževniki, nematode, ...) - vegetacija (pridelek) Pestrost - vrstna (vegetacija, živali, mikroorganizmi – DNK, PLFA) - funkcionalna pestrost (vezana na kroženje C in N, razgradnjo org. onesnažil, ...) Aktivnost - dihanje (respiracija) - encimska aktivnost - hitrost razgradnje - potencialna mineralizacija N, nitrifikacija, denitrifikacija

2.4 TALNI MIKROORGANIZMI

Tla so dinamična mešanica organskih in mineralnih delcev različnih velikosti ter živih organizmov in njihove odmrle biomase. Talni organizmi predstavljajo živo organsko snov. Delimo jih na talne živali, ki so pomembne za premeščanje organske snovi in selitve mikroorganizmov na nove lokacije ter talne mikroorganizme, ki so najpomembnejši razgrajevalci odmrle biomase rastlin in živali.

Na prisotnost različnih vrst organizmov močno vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti tal (količina in kakovost organske snovi, temperatura, pH, prezračenost, itd.) in so specifične za posamezne tipe tal. Največ organizmov se nahaja predvsem v zgornji 30 cm plasti tal, kjer je na razpolago največ hrane in je plinska faza tal dovolj bogata s kisikom. V zelo bogatih tleh lahko število posameznih osebkov talnih živali doseže do 100,000 na kvadratni meter, 1 gram tal predstavlja habitat več kot 10^{10} - 10^{11} bakterijam, 6.000–50.000 različnim mikrobnim vrstam in do 200 m hif gliv (Leštan, 2002).

Mikroorganizme delimo na prokariote (bakterije in arheje) ter eukariote (glive, alge in praživali), v tleh so najpogostejši predstavniki bakterije in glive. Njihova osnovna vloga v ekosistemu je recikliranje. Veliko razmerje med površino in volumenom jim omogoča hitrejšo izrabo virov. Skupaj z rastlinami imajo največji vpliv na kroženje snovi in tok energije skozi kopenske ekosisteme ter s tem tudi na število drugih organizmov v tleh in na rodovitnost tal. Vplivajo na preperevanje mineralnih komponent tal in nastajanje tal, razgrajujejo številna organska onesnažila in druge umetne snovi, fiksirajo dušik, vplivajo

na pojavnost rastlinskih patogenov in opravljajo še vrsto drugih funkcij (Leštan, 2002; Horner-Devine in sod., 2004).

2.4.1 Bakterije

Bakterije so najbolj razširjeni organizmi v tleh. So prokarionti velikosti od 0,2 do 2 μm . Običajno rastejo v kolonijah in so različnih oblik (okrogle, paličaste, zavite in vijajne). Bakterije imajo izjemno raznolike metabolizme, ki so prilagojeni izrabi skoraj vseh možnih virov energije, zato jih najdemo v vseh ekoloških nišah, ki omogočajo življenje (Leštan, 2002; Aislabie in Deslippe, 2013).

Najbolj zastopana skupina bakterij v tleh so bakterije reda aktinomicet (Actinomycetales), ki so G⁺ aerobne bakterije. Pomembno prispevajo k razgrajevanju in mineralizaciji organskih ostankov v tleh in so dobro prilagojene na talno okolje z nižjo vodno aktivnostjo, občutljive pa so na nizek pH. Kemoavtotrofnim bakterijam predstavljajo vir energije reducirane anorganske spojine (amonij, vodik, sulfit, žveplo...), ki jih v metabolizmu oksidirajo, kot vir ogljika pa jim služi CO₂. Med kemoavtotrofne mikroorganizme prištevamo tudi nitrifikatorske bakterije, ki kot vir energije uporabljajo oksidacijo amonija. Ta nastaja v tleh pri razkroju živalske in rastlinske biomase v procesu amonifikacije. Nitrifikatorji rastejo precej počasneje od heterotrofnih bakterij, vendar izvajajo pomembno ekološko funkcijo v ciklu dušika in drugih elementov. Večina bakterij je aerobnih, saj je razgradnja organske snovi z anaerobno respiracijo energetsko manj ugodna kot aerobna, zato poteka samo, če v tleh ni kisika. V tleh, predvsem na površini tal najdemo tudi cianobakterije, ki so fotoavtotrofne bakterije. Ker za rast potrebujejo le svetlobo, vodo, CO₂ in osnovne mineralne snovi, so primarni kolonizatorji golih tal brez prsti. Kjer ni vegetacije in je malo padavin, pogosto tvorijo površinsko skorjo in s tem stabilizirajo tla ter vsaj deloma preprečijo erozijo tal zaradi vetra (Leštan, 2002; Aislabie in Deslippe, 2013).

2.4.2 Glive

Glive so eukariotski heterotrofni mikroorganizmi in so večinoma striktni aerobi. Sestavljajo večino talne mikrobne biomase. Imajo celično steno zgrajeno iz glukana in hitina. Večinoma so saprofiti in se prehranjujejo z odmrlo rastlinsko biomaso, ki se nabira na površini tal. Razmnožujejo se s pomočjo spor, ki so lahko spolne ali nespolne. Razen enoceličnih kvasovk je značilna rast večine gliv v obliki hif, ki tvorijo micelij. Micelij zaseda veliko prostornino tal in proizvaja velik nabor zunajceličnih encimov. Ti delujejo na organsko snov v tleh in povzročijo sproščanje hranil in energije, ki jo glive potrebujejo za rast. Proizvajajo tudi polikarboksilne kisline (npr. citrsko in oksalno), ki raztapljajo

fosfatne minerale, s čimer postanejo viri P v tleh biološko dostopni (Leštan, 2002; Aislabie in Deslippe, 2013).

Za talni ekosistem so še posebej pomembni saprotrofi, mikorize in lišaji. Mikorizne glive živijo v simbiozi s koreninami rastlin. Rastline pridobijo predvsem večjo površino koreninskega sistema in s tem povečano možnost absorpcije hranil, predvsem fosfatov in vode. Mikorizne glive pridobivajo ustrezna hranila neposredno iz koreninskih izločkov. Delijo se na arbuskularne glive (AM) in ektomikorizne glive (EM). AM kolonizirajo približno 80 % rastlinskih vrst in prevladujejo med zelnatimi vrstami, vključno z mnogimi pomembnimi poljščinami. Njihove hife prodirajo v rastlinske celice in tvorijo manjše micelije. Nasprotno EM naseljujejo medcelični prostor rastlinskih korenin in si izbirajo nespecifične gostiteljske rastline. Imajo obsežen micelij in pogosto tvorijo obsežne, kompleksne podtalne povezave, poznane kot mikorizne mreže. Te se pojavljajo v vseh večjih kopenskih ekosistemih in omogočajo snovem, kot so ogljik, hranila, voda, obrambni signali in alelokemikalije, da se prenašajo med rastlinami. Nekatere zelene alge in cianobakterije skupaj z nekaterimi glivami tvorijo simbiotske združbe – imenovane lišaji. Glive nudijo algam zatočišče in jih varujejo pred sevanjem in dehidracijo ter priskrbijo v vodi raztopljena hranila, alge v zameno glive preskrbujejo s hrano. Alge so sposobne fiksacije C in N v biomaso tudi pri ekstremnih pogojih, kot so sušne in mrzle površine kamnin, kjer pomembno prispevajo pri tvorbi tal iz matične kamnine (Leštan, 2002; Aislabie in Deslippe, 2013).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na združbe mikroorganizmov v tleh

Določanje razlogov za tako obsežno raznolikost mikrobnih združb v tleh še vedno predstavlja velik izziv. Ena izmed teorij pravi, da nanjo vplivajo številni dejavniki: prostorska izolacija mikrobov v tleh, ki zmanjša direktne interakcije tekmovalnosti, količina in raznolikost hrane in energijskih virov ter čas, oz. dejstvo da so današnje mikrobne združbe rezultat več kot 3.5 milijonov let evolucije (Aislabie in Deslippe, 2013).

Bakterijske združbe izražajo biogeografske vzorce, katerih podobnost se z geografsko razdaljo manjša (Martiny in sod., 2011). Beta diverziteta, ki je raznolikost v sestavi združb, bi lahko bila pogojena s pogoji okolja. Glede na tradicionalni pogled so talni mikrobi prisotni povsod, okolje pa določa kateri organizmi so pogosti. Ta pogled nakazuje, da na strukturo mikrobnih združb v tleh vplivajo tako biotski kot abiotski dejavniki, vključno s tipom tal, sestavo mineralov in teksturo, dostopnostjo hranil (C, N, P), vlago in prisotnostjo kisika ter s tem povezanimi rastlinskimi združbami. Vendar nedavne raziskave kažejo, da ima največji vpliv na bakterijske združbe v tleh pH tal (Lauber in sod., 2009), medtem ko na sestavo glivnih združb pH nima tako velikega vpliva (Rousk in sod., 2010). V nasprotju s tradicionalnim pogledom obstaja še en dejavnik - omejitev razširjenosti, ki pojasni vzorce v beta diverziteti. Nekateri dokazi kažejo, da za organizme, ki so pogosti v bakterijskih

mikrobnih združbah obstaja večja verjetnost, da bodo bolj razširjeni (Nemergut in sod., 2011).

Na strukturo mikrobnih združb pričakovano vpliva tudi raba tal in gospodarjenje z zemljišči, saj vplivajo na lastnosti tal. V travniških tleh so našli več bakterijskih debel kot v gozdnih tleh (Nacke in sod., 2011). Dodatek dušika tlem je povzročil povečanje relativne zastopanosti bakterijske kopiotrofne taksonomske skupine, medtem ko je bil učinek pri oligotrofni taksonomski skupini ravno obraten (Fierer in sod., 2012; Ramirez in sod., 2012).

Klimatske spremembe vplivajo na mikrobne združbe posredno z višjimi temperaturami tal in neposredno z učinki, kot so spremembe v rastlinski združbi ali lastnostih tal. Npr. dolgoročno segrevanje je hkrati zmanjšalo enakomernost (merilo raznolikosti) bakterijskih in povečalo enakomernost glivnih združb (Deslippe in sod., 2012)

Obstaja čedalje več dokazov, ki kažejo, da so mikroorganizmi veliko bolj občutljivi na težke kovine kot talne živali ali rastline, ki rastejo na istih tleh. Že večkrat se je pokazalo, da so bakterije na povečane koncentracije težkih kovin v tleh bolj občutljive kot glive (Doelman, 1985; Hiroki, 1992). Učinki določenih kovin na talne mikrobe so odvisni od številnih lastnosti tal: pH, vsebnosti organske snovi, gline in železovih oksidov, ... Izmed teh ima pH največji vpliv. Le-ta namreč zelo vpliva na topnost in speciacijo kovin v tleh, kar se odraža predvsem v vsebnosti kovin v talni raztopini. Z vsako zmanjšano enoto pH se koncentracija kovin, kot so Zn, Ni in Cd poveča za približno dvakrat (Christensen, 1984; Sanders in sod., 1986). Nižje vrednosti pH v onesnaženih tleh, naj bi povečale negativni učinek na bakterije, ne pa tudi na glive (Pečiulyte in Dirginčiute-Volodkiene, 2009). Toksične koncentracije težkih kovin povzročijo poškodbe encimov ali pa spremenijo konformacijske strukture nukleinskih kislin in proteinov, ki posledično postanejo neaktivni. Posledica teh učinkov je motnja integritete mikrobne celične membrane ali uničenje celotne celice. Tvorijo lahko tudi precipitate ali kelate z esencialnimi metaboliti (Lenart-Boroń in Boroń, 2014).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 IZBOR LOKACIJE IN REMEDIACIJA TAL

V raziskavi smo uporabili s težkimi kovinami onesnažena vrtna tla iz naselja Žerjav v Mežiški dolini, ki se uvršča na seznam najbolj onesnaženih krajev v Sloveniji. Tu so še do nedavnega več stoletij kopali in talili svinčevo in cinkovo rudo, zato je zemlja v dolini, vključno s 6600 ha kmetijskega zemljišča, onesnažena predvsem s svincem kot tudi s Zn, Cd in As (Voglar in Leštan, 2012).

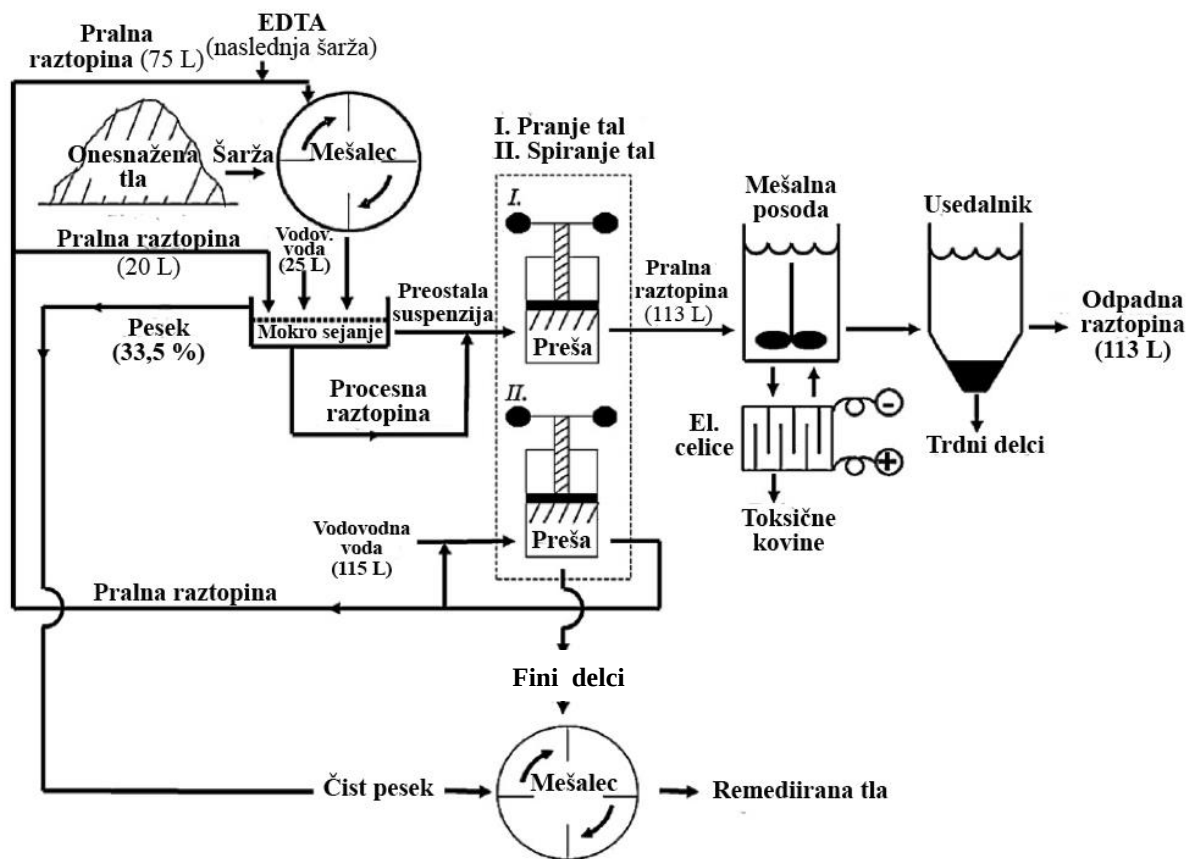
Za namen širše raziskave je bila izvedena remediacija zgornje 30 cm plasti tal izkopane na zasebnem zelenjavnem vrtu ($x=489,300$ m in $y=152,300$ m, koordinatni sistem Gaub-Krüger) (Jelušič, 2014; Voglar, 2013; Potočnik, 2012).



Slika 1: S kovinami močno onesnaženo naselje Žerjav v Mežiški dolini. V ospredju so vrtovi in stanovanjske hiše ter v ozadju nekdanja topilnica svinca (Jelušič, 2014).

Remediacija onesnažene zemlje je potekala po metodi pranja tal z vodno raztopino $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Voglar, Leštan 2012) v koncentracijah 10, 30 in 60 mmol kg^{-1} suhih tal. 75 kg zemlje se je v betonskem mešalniku 2 uri tretiralo s 75 L raztopine EDTA. Mešanico se je precedilo skozi sito s porami premera 2-mm, da se je odstranilo večje delce (pesek in skelet) in tla obdelalo s filtrno prešo, da se je talna suspenzija ločila od pralne raztopine tal. Mobilne oblike težkih kovin se je odstranilo tako, da se je tla spiralo z vodo, dokler v odcedni vodi ni bilo več prisotnega Pb, Zn in Cd.

Sledil je še zadnji postopek elektrolitske razgradnje pralne raztopine, v katerem je raztopina tekla skozi elektrolitske celice, ki so bile opremljene z grafitno anodo in nerjavno jekleno katodo. Pri tem skozi raztopino steče približno 120 A visok električni tok, pri čemer se kovinski kompleks z EDTA v procesu oksidacije razgradi, težke kovine pa se izločijo iz raztopine z elektrodepozicijo na katodo in obarjanjem.



Slika 2: Shema pilotnega obrata za spiranje tal z EDTA (Voglar in Leštan 2012).

3.2 LASTNOSTI ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TAL

3.2.1 Standardna pedološka analiza tal

Standardno pedološko analizo tal je opravil Center za pedologijo in varstvo okolja (CPVO) Biotehniške fakultete. Originalna tla so imela visoko vsebnost karbonatov (70.7 %) in teksturo meljaste ilovice, z vsebnostjo 45 % peska, 52 % melja in 3.3 % glin. Spodaj so podane ostale pedološke lastnosti originalnih tal in tal remedriranih z različnimi koncentracijami EDTA (Preglednica 2).

Preglednica 2: Rezultati standardne pedološke analize originalnih tal in tal remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol kg⁻¹ suhih tal).

Izbrane lastnosti tal	Originalna tla	Remediirana tla		
		10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal
pH (CaCl ₂)	6.9	7.1	7.1	7.0
Organska snov (%)	7.0	10.2	9.2	8.7
Dušik (%)	0.43	0.54	0.45	0.43
Fosfor (mg/100 g tal)	40.4	51.7	47.8	45.4
Kalij (mg/100 g tal)	6.1	8.1	6.9	7.6
Kationska izmenjalna kapaciteta (mmol _c /100 g tal)	31	32	31	32
Karbonati (%)	70.7	58.9	65.6	67.3

3.2.2 Določanje skupnih vsebnosti kovin

Preglednica 3: Skupne koncentracije kovin določene z zlatotopko v originalnih tleh in tleh remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal). Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$) (Jelusic in sod., 2013).

Kovina	Koncentracija v originalnih tleh (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Koncentracija v remediiranih tleh (mg kg ⁻¹ suhih tal)		
		10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal
Pb	^a 1378±107	^b 898±41	^c 564±11	^d 323±7
Zn	^a 578±38	^a 561±8	^a 513±7	^b 412±4
Cd	^a 8.5±0.6	^b 4.6±0.1	^a 3.6±6.1	^d 2.8±0.1

Skupna koncentracija kovin v tleh se je, kot je bilo pričakovano, manjšala z uporabo večjih koncentracij EDTA za spiranje tal v postopku remediacije (Preglednica 3).

3.2.3 Dostopnost kovin

Dostopnost kovin smo določali s frakcionacijo kovin (Preglednica 4), s fiziološkim ekstrakcijskim testom PBET (Preglednica 5), ter s sprejemom kovin v kitajsko zelje (Preglednica 6).

3.2.3.1 Frakcionacija kovin

Preglednica 4: Frakcionacija Pb, Zn in Cd v originalnih tleh in tleh opranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal). Rezultati so podani kot povprečje šestih ponovitev ± SD in kot celotna odstranjena količina iz vseh frakcij (%). Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$). Kratica LOQ označuje vrednosti, ki so pod mejo zaznave (za Zn 0.01 mg L⁻¹, za Cd 0.02 mg L⁻¹ in za Pb 0.1 mg L⁻¹) (Jelusic in sod., 2013).

Frakcije	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Remediirana tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)		
		10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal
Pb				
1	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
2	^a 14.2±0.2	^b 11.1±1.1	^c 10.0±0.1	^c 9.6±0.1
3	^a 496±21.8	^b 277±10.7	^c 160±2.6	^d 68.8±7.2
4	3.5±0.2	4.8±0.5	1.8±0.1	LOQ
5	^a 493±4.3	^b 368±32.0	^c 254±27.4	^d 153±8.6
6	^a 241±6.7	^b 168±10.9	160±4.5	103±5.6
% odstranjene količine	90.5	92.2	104	104
Zn				
1	^a 0.8±0.1	^{ab} 0.8±0.1	^a 0.7±0.1	^b 1.0±0.0
2	^a 7.0±0.3	^b 1.9±0.1	^b 1.7±0.0	^c 1.4±0.0
3	^a 118±16.6	^b 68.5±3.1	^c 34.3±0.5	^c 24.7±0.4
4	^a 18.9±0.2	^b 9.3±0.5	^c 4.8±0.0	^d 3.2±0.1
5	^a 174±3.3	^a 178±10.1	^b 136±10.9	^b 114±20.4
6	^a 244±6.6	^b 290±5.5	^b 291±7.2	^a 255±9.5
% odstranjene količine	97.4	97.6	91.5	97.0
Cd				
1	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
2	^a 1.2±0.0	^b 1.0±0.0	^b 1.0±0.0	^b 1.0±0.0
3	^a 5.8±0.1	^b 2.2±0.0	^c 1.7±0.0	^d 1.0±0.0
4	0.5±0.0	LOQ	LOQ	LOQ
5	^a 2.3±0.0	^b 1.6±0.2	^b 1.6±0.1	^c 1.2±0.1
6	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
% odstranjene količine	115	104	117	112

1 – v talni raztopini; 2 – izmenljiva; 3 – vezana na karbonate; 4 – vezana na Fe- in Mn-okside; 5 – vezana na organsko snov; 6 – frakcija preostanka

Pred remediacijo je bila večina Zn (do 64 %) najdena v preostali frakciji, enkapsulirana znotraj netopnih talnih mineralov in težko odstranjena tudi pod močnimi kislimi, reducirajočimi ali oksidirajočimi pogoji sheme frakcionacije. Večji del Pb je bil vezan na karbonate (46 %) in na organsko snov (33 %), medtem ko je bila večina Cd vezana na nestabilno karbonatno talno frakcijo (do 45 %). Po remediaciji je bila velika večina PSK

najdena v vezani, stabilni obliki (vezana na organske in preostale talne frakcije) (Preglednica 4).

3.2.3.2 Biodostopnost želodčne in črevesne faze

Biodostopnost Pb iz želodčne in črevesne faze se je zmanjšala z večanjem koncentracije EDTA. Biodostopnost Zn v originalnih tleh, v primerjavi z remediiranimi tlemi je značilno večja. Koncentracija EDTA uporabljena za pranje tal ni imela statistično značilnega učinka na biodostopnost Zn (Preglednica 5).

Preglednica 5: Koncentracije Pb, Zn in Cd v želodčni in črevesni fazi pridobljene z metodo PBET (fiziološki ekstrakcijski test) v originalnih tleh in tleh opranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal) ob koncu kolonskega poskusa s kitajskim zeljem. Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$). Kratica LOQ označuje vrednosti, ki so pod mejo zaznave (za Zn 0.01 mg L⁻¹, za Cd 0.02 mg L⁻¹ in za Pb 0.1 mg L⁻¹) (Jelusic in sod., 2013).

PBET	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Remediirana tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)		
		10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal
Pb				
Želodčna faza	^a 333 ± 29	^a 286 ± 33	^b 145 ± 58	^b 81.8 ± 9.9
Črevesna faza	^a 172 ± 40.6	^a 169 ± 51	^b 159 ± 28	^b 35.8 ± 12.8
Zn				
Želodčna faza	^a 183 ± 18	^b 67.9 ± 1.5	^b 65.3 ± 10.0	^b 66.8 ± 23.2
Črevesna faza	^a 78.3 ± 16.8	^b 37.9 ± 4.7	^b 31.6 ± 4.1	^b 30.1 ± 6.8
Cd				
Želodčna faza	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
Črevesna faza	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ

3.2.3.3 Vsebnost kovin v kitajskem zelju

Remediacija tal ($p < 0.05$) je v koreninah *B. rapa* značilno zmanjšala koncentracije Pb in Cd, v malo manjši meri tudi Zn. Na splošno so se koncentracije PSK v koreninah zmanjševale sorazmerno z večanjem koncentracije EDTA, uporabljene za remediacijo tal; izjema je Zn v obravnavanju tal s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal. Kljub zmanjšanju koncentracij v koreninah, so koncentracije PSK v listih *B. rapa* po remediaciji ostale skoraj nespremenjene (Preglednica 6).

Preglednica 6: Delež potencialno toksičnih kovin odstranjen iz tal z uporabo različnih koncentracij EDTA, koncentracije Pb, Zn in Cd v koreninah in listih *B. rapa*, translokacija potencialno toksičnih kovin (TF) in biokoncentracijski faktorji (BCF) v kolonskem poskusu. Rezultati so podani kot povprečje šestih ponovitev $\pm$ SE Črke označujejo statistično značilne razlike med različnimi obravnavanji (Duncan, $p < 0.05$) (Jelusic in sod., 2013).

	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Remedrirana tla (mg kg ⁻¹ suhih tal)		
		10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal
Pb				
odstranjen iz tal (%)	-	35	59	77
listi (mg kg ⁻¹)	^a 15.0±8.1	^a 17.5±12.1	^a 11.5±4.5	^a 16.9±8.4
korenine (mg kg ⁻¹)	^a 107±34.2	^b 53.6±18.3	^c 22.0±7.8	^c 13.8±1.9
TF (listi/korenine)	0.16	0.46	0.61	1.26
BCF (korenine/tla)	0.08	0.06	0.04	0.04
BCF (listi/tla)	0.01	0.02	0.02	0.05
Zn				
odstranjen iz tal (%)	-	3	11	29
listi (mg kg ⁻¹)	^a 120±25.7	^a 126±35.9	^a 115±16.3	^a 126±36.2
korenine (mg kg ⁻¹)	^a 272±31.0	^{bc} 173±34.3	^c 164±34.3	^{ab} 225±31.1
TF (listi/korenine)	0.44	0.77	0.74	0.57
BCF (korenine/tla)	0.47	0.31	0.32	0.55
BCF (listi/tla)	0.21	0.22	0.22	0.31
Cd				
odstranjen iz tal (%)	-	45	60	72
listi (mg kg ⁻¹)	^a 2.5±1.3	^a 3.1±1.5	^a 2.2±1.1	^a 3.5±1.9
korenine (mg kg ⁻¹)	^a 9.6±3.6	^b 2.1±0.3	^b 1.6±0.5	^b 2.1±0.6
TF (listi/korenine)	0.28	1.45	1.41	1.91
BCF (korenine/tla)	1.14	0.45	0.45	0.75
BCF (listi/tla)	0.3	0.68	0.60	1.23

3.3 OPIS POSKUSOV

Za namen diplomske naloge smo postavili mikrokozme v steklenih kozarcih in kolonski poskus v rastlinjaku.

3.3.1 Mikrokozmi v kozarcih

Za vzpostavitev mikrokozmov smo uporabili standardne kozarce za vlaganje s prostornino 720 mL, premerom 8 cm in višino 13 cm. Imeli smo vzorce tal iz štirih različnih obravnavanj: originalna tla (kontrola) in tla sprana z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal). Iz homogenega vzorca tal iz vsakega obravnavanja smo natehtali po 100 g suhih tal na mikrokozem ter tla navlažili na 80 % zadrževalne kapacitete. Za posamezno obravnavanje smo napolnili 12 mikrokozmov; načrtovali smo tri vzorčenja in štiri ponovitve na obravnavanje. Skupno smo imeli torej 48 kozarcev,

napolnjenih s tlemi. Kozarce smo pokrili s parafilmom, v katerega smo v enakomernem razmaku naredili majhne luknjice, zato da je bila omogočena izmenjava zraka. Sledila je trimesečna inkubacija pri temperaturi 22 °C.

Med inkubacijo smo enkrat tedensko preverjali vsebnost vode v tleh. Vsak kozarec oz. mikrokozem smo, preden smo ga napolnili s tlemi, stehtali. Ker smo točno vrednost natehtanih tal za posamezen mikrokozem zabeležili, smo lahko izračunali koliko mora tehtati posamezen mikrokozem s tlemi vred, da bodo imela tla 80 % zadrževalne kapacitete. Med inkubacijo je voda iz tal izhlapevala, zato smo morali maso vode nadomestiti z dolivanjem destilirane vode.

Vsak mesec smo razdrli 4 mikrokozme posamezne skupine in na vzorcu tal opravili meritve pH, teste encimske aktivnosti in metodo s substratom inducirane respiracije (SIR) ter izvedli izolacijo skupne DNK in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR).

3.3.2 Kolonski poskus v rastlinjaku

Kolonski poskus s testnimi rastlinami kitajskega zelja (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* Hanelt.) je potekal 7 tednov, v rastlinjaku Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Imeli smo 24 poskusnih talnih kolon, ki smo jih napolnili s 3640 kg suhih tal. Testirali smo 4 različna obravnavanja tal, v šestih ponovitvah: originalna onesnažena tla, ki so služila kot kontrola in tla oprana z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30, 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal). Za preprečevanje spiranja talnih delcev smo na dno vsake poskusne valjaste posode oz. kolone namestili plastično mrežo s porami premera 0,2 mm. Skozi to mrežo smo v drugo plastično posodo speljali PVC cevko, po kateri je iz kolone odtekala odcedna voda. V vsako posodo smo posadili 1 rastlino 3 tedne starih sadik kitajskega zelja ter rastline zalili vsak teden s 500 mL destilirane vode. Opis poskusa je povzet po članku *Functioning of metal contaminated garden soil after remediation* (Jelusic in sod., 2013).

Tla smo vzorčili iz vrhnjega sloja talnih kolon (1 cm) na začetku in koncu poskusa. Od vsake kolone smo odvzeli približno 100 g tal. Vzorcem tal smo določili vsebnost vode in izvedli meritve pH, teste encimske aktivnosti, metodo s substratom inducirane respiracije (SIR), izolacijo skupne DNK ter metodo polimorfizma dolžin terminalnih restriksijskih fragmentov (T-RFLP).



Slika 3: Kolonski poskus v rastlinjaku s testnimi rastlinami kitajskega zelja (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* Hanelt.)

3.4 ANALITSKE METODE

3.4.1 Vsebnost vode v tleh

Vzorcem onesnaženih in remediiranih presejanih tal smo določili vsebnost vode tako, da smo v laboratoriju stehali tehtiče, zatem še tehtiče skupaj z vzorcem tal, nato smo vzorce 24 ur sušili v pečici (sušilniku) pri temperaturi 105 °C. Po 24 urah smo vzorce vzeli iz sušilnika, jih ohladili v eksikatorju in stehali. Rezultat smo izrazili kot razmerje med težo vode v tleh in težo trdne snovi (relativna vlažnost):

$$\% H_2O = \frac{\text{masa svežega vzorca tal} - \text{masa suhega vzorca tal}}{\text{masa suhega vzorca tal}} \times 100 \quad \dots (1)$$



Slika 4: Oprema za določanje vsebnosti vlage v tleh: eksikator (levo) in pečica za sušenje vzorcev tal (desno).

3.4.2 Sposobnost tal za zadrževanje vode

Poljsko kapaciteto tal predstavljajo tla, ko iz njih odteče vsa gravitacijska voda in ostane le kapilarna in higroskopsko vezana voda (Suhadolc in sod., 2005). Poljska kapaciteta tal je odvisna od velikosti talnih delcev ter vsebnosti organske snovi v tleh. Večji kot je delež manjših delcev, kot sta melj in glina, večja je sposobnost tal za zadrževanje vode.

Vodno zadrževalne lastnosti tal smo določali z uporabo visokotlačne komore, s katero lahko iz vzorcev iztiskamo vodo pri izbranih tlakih od 0,05 do 15 barov (ISO 11274, 1998).

Na podlagi podatkov o volumski gostoti suhega vzorca tal (g/cm^3) in volumna obročkov (cm^3), v katerega damo vzorce tal, smo izračunali potrebno maso suhih tal in to preračunali na maso svežih tal za vsako obravnavo posebej. Natehtane vzorce smo prenesli na keramično ploščo znotraj vsakega obročka (v treh ponovitvah). Vzorce smo nato nasičili z vodo tako, da smo počasi dodajali deionizirano vodo na keramično ploščo toliko časa, dokler se na površini ni prikazal tanek film vode. Da so se uravnotežili, smo jih pustili mirovati 48 ur. Keramično ploščo smo vstavili v visokotlačno komoro in jo dobro zaprli. Nastavili smo izbrani tlak (0,33 bar) in pustili, da je vsa voda iztekla skozi odtočne cevke. Vzorce smo nato vzeli iz posode, jih stehali, sušili 24 ur pri temperaturi $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ponovno stehali. Razlika v masi je predstavljala količino vode v vzorcu.

Iz meritev pri določanju trenutne vsebnosti vode (poglavje 3.4.1) in meritev maksimalne količine zadržane vode smo določili maso svežih tal ($m_{\text{sveža tla}}$), maso suhih tal ($m_{\text{suha tla}}$) in maso celokupne zadržane vode ($m_{\text{zadržana voda}}$). Največjo maso vode, ki jo lahko zadrži gram suhih tal ali sposobnost tal za zadrževanje vode (100 % WHC; *ang.* «water holding capacity») smo izračunali po enačbi:

$$100\% \text{ WHC} = \frac{\text{masa zadržane vode}}{\text{masa suhih tal}} \quad \dots (2)$$



Slika 5: Komora za določanje vodno zadrževalnih lastnosti tal (levo) in obročki na keramični plošči, napolnjeni s tlemi, ki je nasičena z vodo (desno)

3.4.3 Vrednost pH

Vrednost pH talnih vzorcev smo določali po metodi, ki jo opisujeta Kalra in Maynard (1991) s pomočjo steklene elektrode v 1:2 (v/v) suspenziji tal in 0,01 M kalcijevega klorida. 10 g zračno suhih in presejanih tal (< 2 mm) smo natehtali v 50 mL čašo in prelili z 0,01 M raztopine CaCl_2 (v razmerju 1:2 v/v), ki smo jo pripravili z raztapljanjem 1,47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 1 L dH_2O . Vzorec smo nekaj časa pustili mirovati, da so se tla prepojila z raztopino, nato smo ga v 30 minutah 4-5x temeljito premešali (mešali smo po 10 s). Zatem smo vzorec pustili mirovati približno pol ure, da so se trdi delci posedli in nato v suspenziji izmerili pH s pomočjo vnaprej umerjenega pH metra. Vsako meritev smo ponovili trikrat in nato upoštevali povprečje teh treh meritev.

3.4.4 Encimske aktivnosti v tleh

Encimska aktivnost je kemijska lastnost tal z direktnim biološkim izvorom. Ta aktivnost je posledica prisotnosti mnogih tipov encimov, ki so prisotni v tleh in v mikroorganizmih (Sobolev in Begonia, 2008).

3.4.4.1 Dehidrogenazna aktivnost

Dehidrogenazno aktivnost onesnažene in remediirane zemlje smo določili po metodi, ki jo opisuje Thalmann (1968). Metoda temelji na procesu redukcije trifeniltetrazolijevega klorida (TTC) v trifenilformazan (TPF).

2,5 grama vlažnih tal (vsebnost vode približno 80 % w/w) smo natehtali v 60 mL reakcijske epruvete, prelili z 2,5 mL 0,02 M raztopine TTC in premešali. Zaprte epruvete

smo v temi inkubirali 24 h pri temperature 37 °C. Slepí vzorec smo pripravili na isti način, vendar brez dodatka tal. Nastali TPF smo izlužili z dodajanjem 20 mL acetona in ponovnim inkubiranjem v temi (2 h, 30 °C). Epruvete smo v rednih intervalih pretresli. Po poteku inkubacije smo talne suspenzije filtrirali skozi Whatmanov filter s porami premera 2 µm in spektrofotometrično izmerili TPF v filtratu pri valovni dolžini 546 nm. Rezultate smo podali kot povprečen nastali TPF v µg g⁻¹ suhih tal s standardno napako.

3.4.4.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost

Določanje aktivnosti kislih in bazičnih fosfomonoesteraz smo izvedli po metodi Tabatabaia in Bremnerja (1969), ki temelji na določanju p-nitrofenola, ki se sprosti po inkubaciji tal s p-nitrofenilfosfatom (PNP). En gram svežih tal smo natehtali v 50 mL erlenmajerice in dodali 0,25 mL toluena, 4 mL univerzalnega modificiranega pufra (MUB z vrednostjo pH 6,5 za kisle oz. pH 11 za bazične fosfataze ter 1 mL 15 mM raztopine PNP.

Zaprte vzorce smo stresali 1 uro pri temperature 37 °C. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 1 mL 0,5 M CaCl₂ ter 4 mL 0,5 M NaOH. Reakcijsko mešanico smo premešali in gravimetrično filtrirali preko Whatmanovega filtra s porami premera 2 µm. Filtratu smo izmerili absorpcijo pri valovni dolžini 400 nm. Kontrole smo pripravili po enakem postopku, le da smo dodali 1 mL 15 mM p-nitrofenilfosfatne raztopine po inkubaciji na stresalniku. Rezultate smo izražali kot nastali p- nitrofenol v µg g⁻¹ suhih tal in jih podali kot povprečno vrednost meritev s standardno napako.

3.4.4.3 β- glukozidazna aktivnost

Princip metode določanja β- glukozidazne aktivnosti v tleh (Eivazi in Tabatabai, 1988) temelji na določanju nastalega p-nitrofenola po inkubaciji tal (1 h pri temperature 37 °C) s p- nitrofenil glukozidom (PNG) kot substratom.

En gram svežih tal smo natehtali v 50 mL erlenmajerico, prelili z 0,25 mL toluena, 4 mL modificiranega pufra (MUB, pH 6,5) in 1 mL PNG ter po mešanju inkubirali 1h pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 1 mL 0,5 M raztopine CaCl₂ in 4 mL Tris pufra (pH 12). Suspenzijo smo premešali in takoj prefiltrirali skozi Whatmanov filter s porami premera 2 µm. Intenziteto barve smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 400 nm. Kontrolo smo pripravili na enak način, s to razliko, da smo dodali substrat PNG po inkubaciji in pred CaCl₂ in Tris pufrom. Rezultate smo izražali kot nastali p- nitrofenol v µg g⁻¹ suhih tal in jih podali kot povprečno vrednost meritev s standardno napako.

3.4.5 S substratom (glukoza) inducirana respiracija

Za določanje s substratom (z glukozo) inducirane respiracije (SIR) v svežih tleh smo uporabljali komercialno opremo OxiTop Control (WTW, Wilhelm, Germany). Sistem meri porabo kisika pri mikrobih posredno, z določanjem upada pritiska v steklenih posodah zaradi vezave izločenega ogljikovega dioksida na natrijev hidroksid.

V steklene posode smo natehtali 50g suhih tal. Nato smo tlem dodali sterilno raztopino glukoze v taki količini, da smo zagotovili koncentracijo 40 $\mu\text{mol/g}$ in vlažnost tal 90 % poljske kapacitete.

V plastično posodo smo odmerili 20 mL 25 % NaOH, jo postavili v stekleno posodo z natehtanimi tlemi in posode zaprli s posebnimi plastičnimi nastavki za merjenje tlaka. Kozarce smo inkubirali 24 h pri temperaturi 20 °C v temnem prostoru.

SIR smo izmerili manometrično, z alkalno (25 % NaOH) absorpcijo CO₂, ki je nastal v času inkubacije (Zimakowska-Gnoinska in Bech, 2000). Rezultati so podani v μmol proizvedenega CO₂ v 1 g tal po 24 h inkubacije pri temperature 20 °C kot povprečne vrednosti meritev s standardno napako.

3.4.6 Mikrobiološke metode

3.4.6.1 Izolacija skupne DNK iz vzorca tal

Za izolacijo DNK iz talnih vzorcev smo uporabili komercialno dostopen kit BIO101 FastDNA Spin Kit for Soil Isolation Kit (MP-Biomedicals) in postopali po navodilih proizvajalca. Pred začetkom ekstrakcije smo vzorce odtajali (30 min na sobni temperaturi).

Reagenti:

- mikrocentrifuga
- vorteks
- centrifugirke Lysing Matrix E
- mikrocentrifugirke (2.0 mL in 1.5 mL)
- SPIN Modules
- Catch Tubes
- pufer Natrijev fosfat
- pufer MT
- raztopina za precipitacijo proteinov
- Binding Matrix Suspension
- koncentriran SEWS-M (Salt Ethanol Wash)
- DES (DNase/Pyrogen-Free Water)

Protokol:

- 500 mg vzorca smo natehtali v Lysing Matrix E Tube, ki vsebuje mešanico keramičnih in silikatnih delcev za učinkovito lizo vseh prisotnih mikroorganizmov v vzorcu tal.
- Dodali smo 978 μ l pufru natrijevega fosfata in 122 μ l pufra MT, ki ščitita nukleinske kisline in služita kot medij, v katerem so topne nukleinske kisline in proteini.
- Vzorec smo dali v homogenizator (stresalnik) za 1 minuto in nastavili na hitrost 5,5.
- Sledilo je 30 sekundno centrifugiranje na $14.000 \times g$, pri čemer so se celični ostanki združili v pelet. Dobili smo dve fazi: zgornja faza je bila supernatant z DNK in proteini, medtem ko je spodnja faza vsebovala matriks, celične ostanke in tla.
- Supernatant smo prenesli v čisto 1,5 mL mikrocentrifugirko in mu dodali 250 μ l raztopine za precipitacijo proteinov.
- Sledilo je kratko mešanje na vorteksu (par sekund) in nato še 5 minutno centrifugiranje na $14.000 \times g$.
- Supernatant smo prenesli v čisto 2 mL mikrocentrifugirko ter dodali 1 mL raztopine Binding Matrix Suspension, ki smo jo pred uporabo dobro pretresli.
- Mikrocentrifugirko smo dali za 2 minuti na stresalnik in zatem pustili na stojalu (3 minute), da se je Binding Matrix z vezano DNK polegel.
- Po preteku časa smo previdno odstranili 500 μ l supernatanta (brez Binding Matrixa) in ga zavrgli.
- V preostali raztopini supernatanta smo resuspendirali Binding Matrix in nato 600 μ l te raztopine odpipetirali v Spin Filter centrifugirko.
- Centrifugirko smo za 1 min centrifugirali na $14.000 \times g$.
- Tekočino, ki se je nabrala v Catch Tube smo odlili stran.
- V Spin Filter smo odpipetirali še preostanek raztopine z Binding Matrix-om in 1 minuto centrifugirali na $14.000 \times g$.
- Tekočo vsebino v Catch Tube smo zopet zavrgli.
- Za spiranje nečistoč smo v Spin Filter dodali 500 μ l SEWS-M in nežno resuspendirali pelet z uporabo sile tekočine iz nastavka pipete.
- Centrifugirali smo 1 minuto pri $14.000 \times g$.
- Tekočo vsebino v Catch Tube smo zavrgli in še enkrat centrifugirali 2 minuti pri $14.000 \times g$.
- Spin Filter smo nato prestavili v čisto Catch Tube in na sobni temperaturi pustili vsebino sušiti na zraku (5 minut).
- Po preteku časa smo nežno resuspendirali Binding Matrix v 80 μ l DES.
- Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na $14.000 \times g$.
- Spin Filter smo zavrgli, raztopine istih vzorcev pa prenesli v eno mikrocentrifugirko.

- DNK smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalni skrinji pri temperaturi – 20 °C.

3.4.6.2 Merjenje koncentracij in elektroforeza

Uspešnost ekstrakcije smo določali spektrofotometrično z merjenjem koncentracije DNK na inštrumentu NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca.



Slika 6: NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer

Spektrofotometrično merjenje koncentracij poteka na podlagi absorbance vzorca pri valovnih dolžinah 260 nm (A_{260}), 280 nm (A_{280}) in 230 nm (A_{230}). DNK absorbira UV svetlobo pri 260 in 280 nm, aromatski proteini pri 280 nm. Razmerja vrednosti pri različnih valovnih dolžinah uporabljamo kot merilo čistosti DNK vzorca; merilo prisotnosti proteinov v izolatu je razmerje med A_{260} in A_{280} , medtem ko je merilo za prisotnost soli organskih spojin v izolatu razmerje med A_{260} in A_{230} . Optimalno razmerje A_{260}/A_{280} za čisto DNK je 1,8–2,0, razmerje A_{260}/A_{230} pa 2,0–2,2.

Čistost izolacije smo dodatno preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1,3 % (w/v) agarozni gel v 1x pufu TAE (10x Tris-Acetate-EDTA; Fisher Scientific, ZDA). V erlenmajerico smo natehtali 1,5 g agaroze, dodali 110 mL pufra TAE in premešali. Mešanico smo nato raztopili v mikrovalovni pečici. Gel smo pustili hladiti 2 min, nato smo ga prelili v model in vstavili glavniček. Morebitne nastale mehurčke smo odstranili s

pipetnim nastavkom in počakali 30 min, da se je gel strdil. Gel smo nato prenesli v kadico za elektroforezo in jo napolnili s pufrom do oznake.

Na gel smo nanесли DNK vzorce (7 μ l), ki smo jim dodali 3 μ l nanašalnega barvila DNA Loading Dye (Thermo Scientific) ter dolžinski lestvici 100 bp in 1000 bp (Thermo Scientific). Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforetski napravi (BioRad, ZDA) 45 min pri stalni napetosti 150 V in toku 300 mA. Po končani elektroforezi smo dali gel v kopel z dodatkom etidijevega bromida ($0,05 \mu\text{l ml}^{-1}$) za 30 min. Elektroforetske vzorce smo opazovali z UV transiluminatorjem Biometra TI 2 (Sigma-Aldrich, ZDA) in jih fotografirali s pomočjo digitalnega fotoaparata (Cannon, ZDA).

3.4.6.3 Čiščenje DNK

Merjenje koncentracije dsDNA z Nanodropom je pokazalo zelo nizko razmerje A_{260}/A_{230} (pod 0,55) glede na normalne vrednosti (1,8-2,2), kar je kazalo na prisotnost koizoliranih kontaminantov v naših vzorcih. Zato smo se odločili za metodo čiščenja DNK s fenolno ekstrakcijo (Powell in Gannon, 2002).

Reagenti:

- fenol
- pufer TE, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 24:1 (v/v) kloroform-izoamil acetat
- 3 M kalijev acetat, pH 5.5
- mikrocentrifugirke

Protokol:

- Za denaturacijo proteinov smo reakcijski mešanici z DNK dodali ekvivalenten volumen fenola ter nežno premešali na vorteksu.
- Organsko fazo smo od vodne faze, v kateri se je nahajala DNK, ločili z 1 minutnim centrifugiranjem pri 8.000 rpm.
- Vodno fazo smo nato previdno odstranili v čisto mikrocentrifugirko ter dodali ekvivalentno količino 24:1 (v/v) kloroform-izoamil alkohola, ki odstrani fenol v celoti.
- Za precipitacijo DNK smo dodali 0.1 volumna 3M Na-acetata (pH 5.5) in 2 volumna čistega etanola.
- Sledila je inkubacija pri temperaturi -80°C (30 min).
- Po preteku časa smo vzorec centrifugirali 10 min na 10.000 rpm.
- Nato smo previdno odstranili etanol in še enkrat sprali z 1 mL 70 % (v/v) etanola, ki odstrani odvečne soli in druge neželene snovi.
- Pelete smo sušili na zraku toliko časa, da je izhlapel ves etanol.
- Na koncu smo pelete raztopili v 0,5 mL DES (DNase/Pyrogen-Free Water) in očiščenim vzorcem spektrofotometrično izmerili koncentracije z uporabo NanoDrop-a.

3.4.6.4 Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)

Za določanje pestrosti in strukture mikrobnih združb smo uporabili kvantitativno molekularno metodo T-RFLP (ang. terminal restriction length polymorphism), ki omogoča enostavno analizo velikega števila vzorcev.

Prvi korak v analizi T-RFLP je namnoževanje gena, ki nas zanima, z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR); pri tem sta eden ali oba izmed začetnih oligonukleotidov označena s fluorescentnim markerjem. Sledi razrez gena z restrikcijskimi encimi in nato ločitev fragmentov s kapilarno elektroforezo. Končne restrikcijske fragmente (T-RF), ki so označeni s fluorescentnim markerjem se zazna z avtomatizirano tehniko DNK sekvenciranja. Vsak T-RF je zabeležen kot vrh na elektroferogramu, kjer sta višina vrha in površina določena z jakostjo fluorescentnega signala, ki je odvisen od količine T-RF v vzorcu. Za določanje dolžine fragmentov oz. T-RF profila, je potrebno uporabiti velikostni standard (referenčne fragmente znanih dolžin) (Caffaro-Filho in sod., 2007).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Sestavo mikrobnih združb smo določali posebej za bakterije in glive, zato je pomnoževanje specifičnih genskih regij potekalo v dveh različnih reakcijah PCR. V vsaki izmed reakcij je bil eden izmed začetnih oligonukleotidov označen s fluorokromom 5-fluorescein fosforamidit (5-FAM).

Za pomnoževanje fragmentov DNK bakterij in gliv smo uporabili neredčene vzorce DNK, katerih koncentracije niso presegale $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. Za pomnoževanje bakterijskega gena 16S rRNA smo uporabili univerzalni par začetnih oligonukleotidov B27f-FAM (5-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) in 1401r (5-CGG TGT GTA CAA GAA GAC CC-3) (Lane in sod., 1991). Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala 3 μl matrične DNK in 47 μl Master Mix-a. Osnovno zmes Master Mix smo pripravili tako, da smo najprej preračunali količine posameznega reagenta glede na število vzorcev in jih nato vse, razen polimeraze, odpipetirali v centrifugirko. Master mix je tako vseboval 0,04 mM vsakega izmed deoksiribonukleotidov (dNTP) (Qiagen, Nemčija), 0,4 μM oligonukleotidnih začetnikov (Jena bioscience, Nemčija), 1x pufer PCR, 1 mM MgCl_2 in 0,3 % govejega serumskega albumina (BSA) (Sigma-Aldrich). Nazadnje smo dodali še 2,5 U DNK polimeraze Taq (Promega, ZDA) ter premešali s pipetiranjem. Na dno traka PCR smo odpipetirali 3 μl izolirane DNK in dodali 47 μl osnovne zmesi, pri čemer smo bili zelo previdni, da se ne bi s pipetnim nastavkom dotaknili sten. Negativno kontrolo smo izvedli s 3 μl vode namesto DNK. Pomnoževanje DNK je potekalo v napravi za PCR (Biometra, Nemčija), pod pogoji, navedenimi v preglednici 2.

Glivno regijo ITS smo pomnožili z uporabo univerzalnih glivnih začetnih oligonukleotidov ITS1f-FAM (5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3) in ITS4r (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) (White in sod., 1990). Mešanica PCR v končnem volumnu 50 μ l, je vsebovala 0,2 mM vsakega izmed dNTP (Qiagen), 0,2 μ M vsakega izmed oligonukleotidnih začetnikov (Jena Bioscience), 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 U DNA polimeraze GoTaq (Promega), 0,3 % BSA (Sigma Aldercht) in 3 μ l matrične DNK. DNK smo pomnožili v napravi za PCR pod pogoji navedenimi v preglednici 7.

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

Preglednica 7: Pogoji reakcij PCR

Bakterijski 16S rRNK		Glivni ITS	
<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>
Sterilna voda	26,5 μ l	Sterilna voda	21,5 μ l
5x pufer	10 μ l	5x pufer	10 μ l
BSA 3%	5 μ l	BSA	5 μ l
$MgCl_2$ 25 mM	2 μ l	$MgCl_2$ 25 mM	3 μ l
dNTP 2 mM	1 μ l	dNTP 2 mM	5 μ l
B27F – FAM 10pmol/ μ l	1 μ l	ITS1F – FAM 10 pmol/ μ l	1 μ l
1401R 10 pmol/ μ l	1 μ l	ITS4R 10 pmol/ μ l	1 μ l
TAQ polimeraza 5 U/ μ l	0,5 μ l	TAQ polimeraza 5 U/ μ l	0,5 μ l
1. 95 °C 4 min	MM	1. 95 °C 3 min	MM
2. 94 °C 1 min	Σ 47 μ l	2. 95 °C 1 min	Σ 47 μ l
3. 57 °C 1 min	+3 μ l	3. 55 °C 1 min	+3 μ l
4. 72 °C 1,5 min	DNK	4. 72 °C 1,5 min	DNK
5. 72 °C 10 min		5. 72 °C 10 min	
6. 4 °C neskončno		6. 4 °C neskončno	
Koraki 2., 3., in 4. se ponovijo 29x		Koraki 2., 3., in 4. se ponovijo 30x	

Čiščenje pomnožkov PCR

Pomnožke PCR smo očistili z uporabo komercialnega kita MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). Po navodilih proizvajalca smo najprej v 50 μ l pomnožka PCR dodali 250 μ l vezavnega pufru in dobro premešali. Mešanico smo nanesti na kolono s filtrom in centrifugirali 1 min pri 13000 rpm. Tekočino v zbirni mikrocentrifugirki, kjer se je nahajal vezavni pufer smo zavrgli, v kolono s filtrom smo nanesti pufer za spiranje, ki vsebuje 100 % etanol. Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na 10.000 x g. Tekočino v zbirni mikrocentrifugirki smo zavrgli in centrifugirali še 1 min. Kolono s filtrom smo prestavili v novo sterilno mikrocentrifugirko, dodali 15 μ l elucijskega pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) za spiranje DNK iz kolone ter centrifugirali 1 min na 10.000 x g. Na koncu smo filter zavrgli, koncentracije očiščenih pomnožkov PCR smo izmerili spektrofotometrično z uporabo NanoDropa. Očiščene ekstrakte DNK smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalni skrinji pri temperaturi – 20 °C.

Rezanje pomnožkov PCR z restrikcijsko endonukleazo in čiščenje restriktov

Rezanje pomnožkov PCR smo izvedli s pomočjo dveh različnih restrikcijskih encimov (RE), ki prepoznavata točno določena restrikcijska mesta: *MspI* (C↓CGG) in *AluI* (AG↓CT) (Fermentas, ZDA). Reakcijska mešanica je vsebovala 10 µl matrične DNK, 10x reakcijski pufer in 10 U posameznega encima v končnem volumnu 32 µl. Sledila je 5 urna inkubacija pri temperaturi 37 °C v napravi PCR in nato inaktivacija RE pri temperaturi 95 °C 20 min.

Po rezanju smo encime odstranili s komercialno dostopnim kompletom MinElute Reaction Cleanup Kit, po navodilih proizvajalca (Qiagen, Nemčija) in jih shranili pri temperaturi -20 °C. Protokol je bil enak čiščenju pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo.

Kapilarna gelska elektroforeza

Za izvedbo kapilarne gelske elektroforeze je bilo potrebno pripraviti vzorce. V mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami (Applied Biosystems, ZK) smo odpipetirali 1 µl očiščenega restrikta PCR in mu dodali 11 µl formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) ter 0,4 µl internega standarda Genescan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems). Po 5 min denaturaciji pri temperaturi 94 °C smo vzorce ohladili na ledu in poslali na Oddelek za zootehniko na Rodico, kjer so izvedli postopek kapilarne elektroforeze. Uporabljen je bil avtomatski sekvenator ABI 3130XL (Applied Biosystems), ki zazna le fluorescentno vezane fragmente in jim določi dolžino na podlagi internega dolžinskega standarda ter intenziteto fluorescentnega signala.

Za analizo profilov T-RFLP iz pridobljenih podatkov, smo uporabili bioinformacijski program GeneMapper verzije 4.0 (Applied Biosystems). Pri analizi smo upoštevali le fragmente (T-RFje) dolge med 50 in 500 bp. Vrhove manjše od velikosti 35 bp nismo upoštevali, zato da smo se izognili detekciji dimerov začetnih oligonukleotidov. Vse TRF-je z enoto fluorescence manj kot 50, nismo vključili v analizo podatkov.

Nadalje smo iz teh podatkov s pomočjo spletno dostopnega programa T-REX verzije 1 rev. 14 (Culman in sod., 2009) pripravili matriko podatkov, ki smo jo uporabili kot osnovo za analizo v programu R (R Core Team, 2013). Rezultate smo interpretirali ob upoštevanju domneve, da število fragmentov predstavlja število različnih taksonomskih skupin v mikrobni združbi, medtem ko višina vrhov elektroferogramov relativni delež posamezne mikrobne populacije.

3.4.6.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

V zadnjih letih se je metoda qPCR izkazala kot zelo obetavno orodje za preučevanje talnih mikrobnih združb, zato se danes na široko uporablja v mikrobni ekologiji za določanje števila genov in/ali kopij, ki so prisotni v vzorcih iz okolja. Metoda temelji na detekciji reporterske molekule v realnem času; fluorescenca le-te narašča z akumulacijo pomnožka PCR v ciklih pomnoževanja. V primerjavi z drugimi metodami za analizo združb je edinstvena v tem, da je enostavna in zelo občutljiva ter omogoča hitro, vendar kvantitativno oceno številčnosti specifičnih filogenetskih skupin mikroorganizmov v tleh (Fierer in sod., 2005; Smith in Osborn, 2009).

Kvantifikacija celotne bakterijske in glivne združbe je potekala z uporabo univerzalnih molekularnih markerjev 16S rRNK in ITS. Količini nastalega pomnožka PCR smo sledili s pomočjo SYBR Green barvila, katerega intenziteto fluorescentnega signala smo izmerili na aparaturi za qPCR ABI Viia7 Software (Applied Biosystems). Najprej smo naredili načrt razporeditve vzorcev na mikrotitrski plošči in preračunali količine reagentov za osnovno mešanico. Reakcijska mešanica je vsebovala 2 µl matrične DNK s koncentracijo 1 ng/µl in 13 µl mešanice Master Mix. Master mix je vseboval par začetnih oligonukleotidov (Preglednica 8) s koncentracijo 1 µM (za bakterijski 16S rRNK in glivni ITS), 1x ABsolute QPCR SYBR Green Rox mix (blue) (Thermo Scientific) in 250 ng bakteriofaga T4gp32 (MP Biomedicals, ZDA). Za standardno umeritveno krivuljo smo pripravili 10-kratne redčitve posameznih plazmidnih standardov od 10^2 do 10^7 kopij µl⁻¹. Postopek priprave plazmidnih standardov je opisan pod točko 3.4.6.6. Reakcijska mešanica za vzorce in standard je bila enaka.

Preglednica 8: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za qPCR

Tarčni gen	Začetni oligonukleotid	Dolžina	Vir
Bakterijska 16S rRNK	341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3')	193 bp	Muyzer in sod., 1993
Glivna regija ITS	ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	330 bp	White in sod., 1990

Na optično ploščo (Applied Biosystem) smo nanegli vzorce, standarde in negativno kontrolo, pri kateri smo namesto DNK uporabili DEPC vodo, ter jim dodali reakcijsko mešanico. Vzorce smo nanašali brez tehničnih ponovitev znotraj plošče, medtem ko smo standarde in negativno kontrolo nanegli v dveh ponovitvah. Po končanem nanašanju smo čez mikrotitrsko ploščo nalepili prozorno folijo in na kratko mešali na vorteksu (10s), nato še centrifugirali na 1000 rpm (10s). Ploščo smo vstavili v napravo ABI 7500 fast (Applied Biosystems®) ter nastavili parametre reakcije, ki so prikazani v Preglednici 9. Vsako ploščo smo ponovili 2-krat. Analizo produktov qPCR smo izvedli z ABI Viia7 Software. V

primeru slabše učinkovitosti (učinkovitost manjša od 70 % in R^2 manjši od 0,95) smo naredili dodatno ponovitev plošče.

Preglednica 9: Pogoji reakcij qPCR

Bakterijska 16S rRNK		Glivna ITS	
<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>
0,1% DEPC voda	2 µl	0,1% DEPC voda	2 µl
T4gp32	0,5 µl	T4gp32	0,5 µl
Power SYBR® Green	7,5 µl	Power SYBR® Green	7,5 µl
341F 10 pmol/µl	1,5 µl	ITS3F 10 pmol/µl	1,5 µl
534R 10 pmol/µl	1,5 µl	ITS4R 10 pmol/µl	0,5 µl
DNK 1 ng/µl	2 µl	DNK 1 ng/µl	2 µl
1. 95 °C 15 min	MM	1. 95 °C 10 min	MM
2. 95 °C 15 s	Σ 13 µl	2. 94 °C 45 s	Σ 13 µl
3. 60 °C 30	+2 µl	3. 55 °C 45 s	+2 µl
4. 72 °C 30 s	DNK	4. 72 °C 45 s	DNK
5. 80 °C 15 s		5. 95 °C 15 s	
6. 95 °C 15 s		6. 60 °C 30 s	
7. 78 °C 1 min		7. 95 °C 15 s	
8. 95 °C 15 s		Koraki 2., 3., in 4.	
Koraki 2., 3., 4. in 5.		se ponovijo 40x	
se ponovijo 35x			

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

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

3.4.6.6 Priprava in izolacija standardov

Transformacija kompetentnih celic

Priprava plazmidnih standardov je potekala na institutu INRA, Dijon v Franciji, kjer so za transformacijo uporabili kompetentne celice *E. coli*, seva JM 109 (Promega). Tarčne odseke za 16S rRNK in glivni ITS se je pomnoževalo z navadnim postopkom PCR. Kompetentnim celicam *E. coli* se je dodalo ligacijsko reakcijo, ki je vsebovala očiščeni pomnožek PCR (insert) in plazmidni pGEM-T Easy vektor (Promega). Po transformaciji se je celice nanese na trdno gojišče LB z ampicilinom, IPTG in X-Galom za modro-belo selekcijo. Celice, ki so imele uspešno vstavljen plazmid z insertom, so tvorile bele kolonije. Te kolonije se je nato še naprej namnožilo v tekočem gojišču LB z ampicilinom. Namnoževanje celic, tako v trdem kot v tekočem gojišču LB, je potekalo čez noč pri temperaturi 37 °C. Za izolacijo plazmida z insertom se je uporabil kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švica). Koncentracija plazmida je bila izmerjena fluorimetrično, z uporabo kita Quant-iT DNA Assay Kit.

Na podlagi izmerjene koncentracije DNK se število kopij plazmidnega standarda izračuna po spodnji enačbi. Pri tem upoštevamo predpostavko, da je povprečna molekulska masa dvoverižne DNK 660 g mol⁻¹ ter pri izračunu uporabimo Avogadrovo število (6,02 x 10²³) in dolžino plazmida z vstavljenim tarčnim fragmentom.

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

3.5 OBDELAVA REZULTATOV

Vse pridobljene podatke smo analizirali s pomočjo programov GeneMapper, Microsoft Excel-a in programa R. Stopnja tveganja pri kateri so bili rezultati obravnavani kot statistično značilni je bila 0,05. Uporabili smo statistični metodi analiza variance (ANOVA) in Duncan test.

4 REZULTATI

V okviru diplomske naloge smo postavili dva poskusa: v prvem smo postavili mikrokozme v steklenih kozarcih s konstantnimi pogoji (T, vlaga), v drugem smo v rastlinjaku v talne kolone posadili sadike kitajskega zelja in redno zalivali. Uporabili smo onesnažena vrtna tla iz naselja Žerjav v Mežiški dolini s povečanimi vsebnostmi Pb, Zn in Cd (originalna tla) ter tla remediirana z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal).

4.1 LASTNOSTI ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TAL

Naša študija je del širše raziskave. Jelušič in sod. (2013) so ugotovili, da je bila skupna vsebnost kovin največja v originalnih tleh (neremediiranih) in se je v postopku remediacije manjšala z uporabo večjih koncentracij EDTA (10, 30 in 60 mmol kg⁻¹ EDTA) za spiranje tal (Preglednica 3). V originalnih tleh so bile PSK najdene predvsem v preostali frakciji, vezane na karbonate in organsko snov. Po remediaciji je bila velika večina PSK v tleh najdena v vezani, stabilni obliki (Preglednica 4). Biodostopnost PSK iz želodčne in črevesne faze je bila večja v originalnih tleh in se je na splošno zmanjševala z večanjem koncentracije EDTA (Preglednica 5). Remediacija tal je v koreninah *B. rapa* značilno zmanjšala koncentracije Pb in Cd, v malo manjši meri tudi Zn. Na splošno so se koncentracije PSK v koreninah zmanjševale sorazmerno z večanjem koncentracije EDTA, uporabljene za remediacijo tal, koncentracije PSK v listih pa so po remediaciji ostale skoraj nespremenjene (Preglednica 6).

Remediirana tla so imela rahlo višji pH od originalnih tal. Vsebnost organske snovi je bila v remediiranih tleh večja, vsebnost karbonatov manjša. Vrednosti dušika, fosforja in kalija so bile na splošno večje v remediiranih tleh, medtem ko se vrednosti kationske izmenjalne kapacitete med originalnimi in remediiranimi tlemi niso bistveno razlikovale (Preglednica 2).

4.1.1 Sposobnost tal za zadrževanje vode

Vrednosti poljske kapacitete tal so znašale za originalna (neoprana) tla 30 % in za remediirana tla 28 % (10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal), 33 % (30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal) ter 30 % (60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal).

4.1.2 Vrednost pH

Preglednica 10 prikazuje vrednosti pH tal v mikrokozmih med poskusom. Kontrolna mežiška tla v mikrokozmih so bila ves čas poskusa nevtralna. Tla, ki so bila tretirana z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal so imela v primerjavi z originalnimi tlemi višjo vrednost pH in

so bila alkalna. Tekom poskusa se je njihova vrednost pH manjšala in v zadnjem tednu dosegla nevtralno vrednost pH. Tla tretirana s 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal so imela ob prvem vzorčenju (3. teden) prav tako alkalno vrednost pH, ki se je nato tekom poskusa zmanjševala. Vrednost pH tal tretiranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal je bila nevtralna že ob drugem vzorčenju (8. teden; pH 7,2) in je bila enaka ob koncu poskusa (12. teden). Tla tretirana s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal so bila ves čas poskusa zmerno alkalna; vrednost pH se je v 8-tednu rahlo zmanjšala in imela ob zadnjem vzorčenju ponovno enako vrednost.

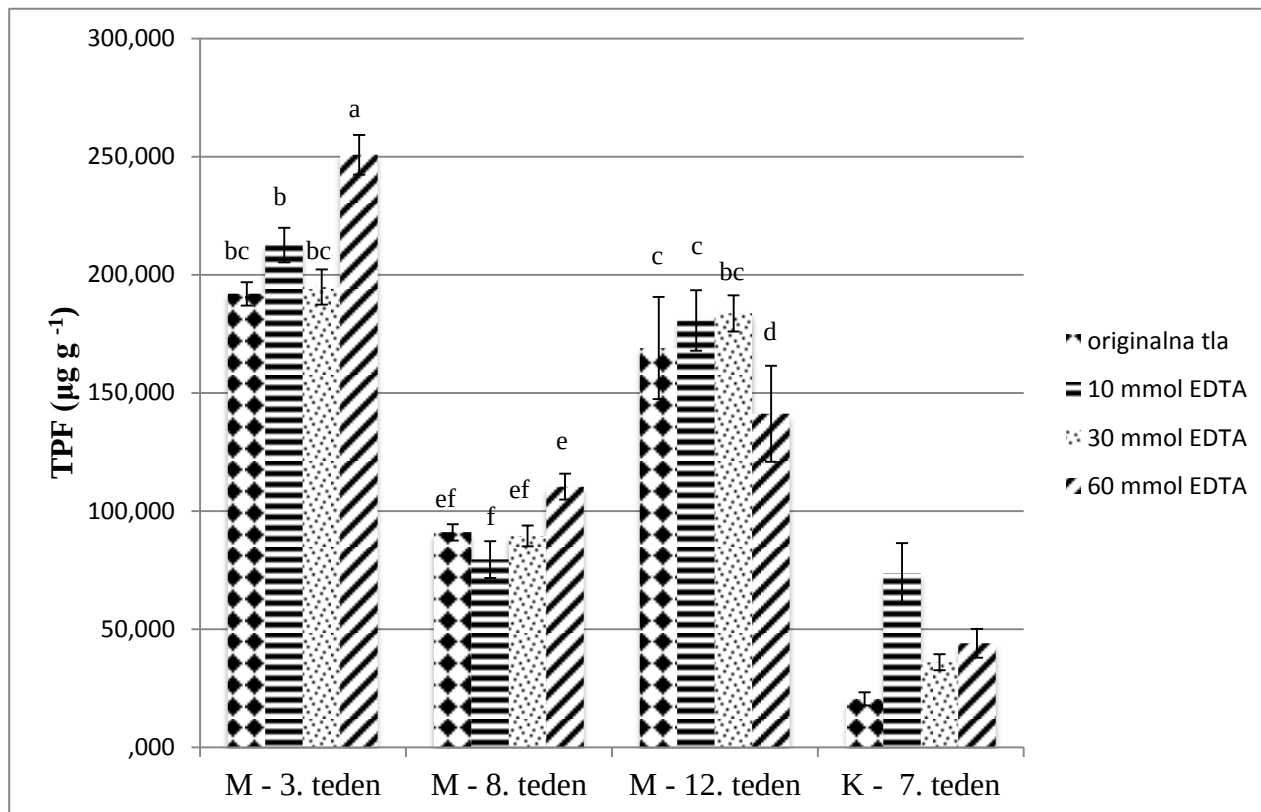
Na koncu kolonskega poskusa je bila vrednost pH originalnih tal nevtralna. V primerjavi z originalnimi tlemi se je v vseh tleh tretiranih z EDTA pH vrednost zvišala na zmerno alkalno (7,3 - 7,6). Porast je bil najizrazitejši v tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal (Preglednica 10).

Preglednica 10: Vrednosti pH za originalna tla in tla remediiranih z različnimi koncentracijami EDTA (10, 30 in 60 mmol kg⁻¹ suhih tal) v mikrokozmi in v kolonskem poskusu. Rezultati so podani kot povprečje treh ponovitev.

Obravnavanje	Mikrokozmi			Kolonski poskus
	3. teden	8. teden	12. teden	konec poskusa
Originalna tla	7,2	6,9	7,2	7,1
10 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	7,5	7,3	7,2	7,6
30 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	7,5	7,2	7,2	7,3
60 mmol EDTA kg ⁻¹ suhih tal	7,5	7,3	7,3	7,5

4.2 AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE

4.2.1 Dehidrogenazna aktivnost



Slika 7: Dehidrogenazna aktivnost v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo v tleh med različnimi obravnavami v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$).

Mikrokozmi

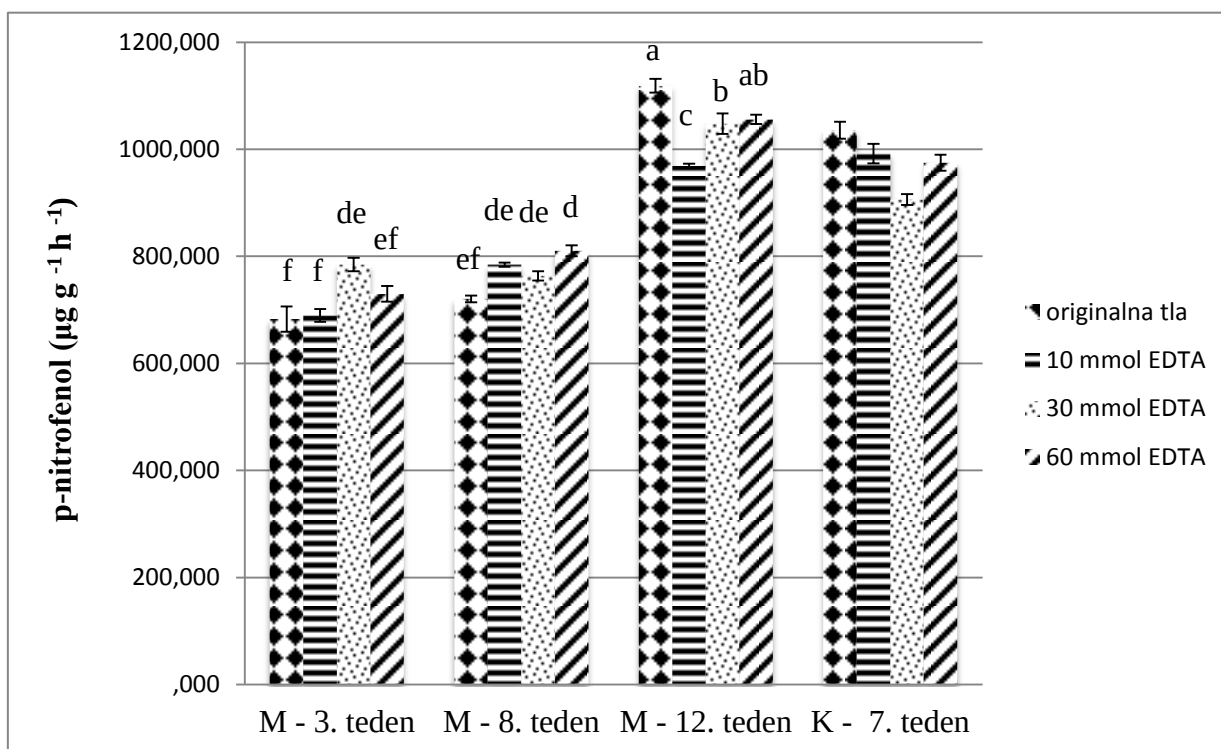
Dehidrogenazna aktivnost se je tekom poskusa v mikrokozmih zelo spreminjala (slika 7). Obravnavanje (originalna tla ali tla tretirana z različnimi koncentracijami EDTA) nima statističnega vpliva ($p=0.09$), medtem ko ga čas vzorčenja ($p<2.2\cdot10^{-6}$) in interakcija obravnavanja z vzorčenjem ($p=4.8\cdot10^{-4}$) imajo. V 8. tednu je dehidrogenazna aktivnost izrazito upadla; najmanjša je bila v originalnih tleh ($91,01 \pm 3,47 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal) in največja v tleh tretiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($110,31 \pm 5,51 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal). Do 12. tedna se je aktivnost povečala, vendar je bila v vseh obravnavanih tleh še vedno manjša kot na začetku poskusa (3. teden); največja je bila v tleh tretiranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($183,64 \pm 7,65 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal) in najmanjša v tleh tretiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($183,64 \pm 7,65 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal).

Kolonski poskus s kitajskim zeljem

Vrednosti dehidrogenazne aktivnosti so bile ob koncu kolonskega poskusa zelo majhne, še posebej v originalnih tleh ($20,50 \pm 2,73 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal), v tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal so bile vrednosti največje in več kot dvakrat večje v primerjavi z vrednostmi v originalnih tleh ($73,66 \pm 12,82 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ suhih tal) (Slika 7).

4.2.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost

4.2.2.1 Kisle fosfataze



Slika 8: Aktivnost kisljih fosfataz v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, 30 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal in 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med aktivnostjo kisljih fosfataz v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$).

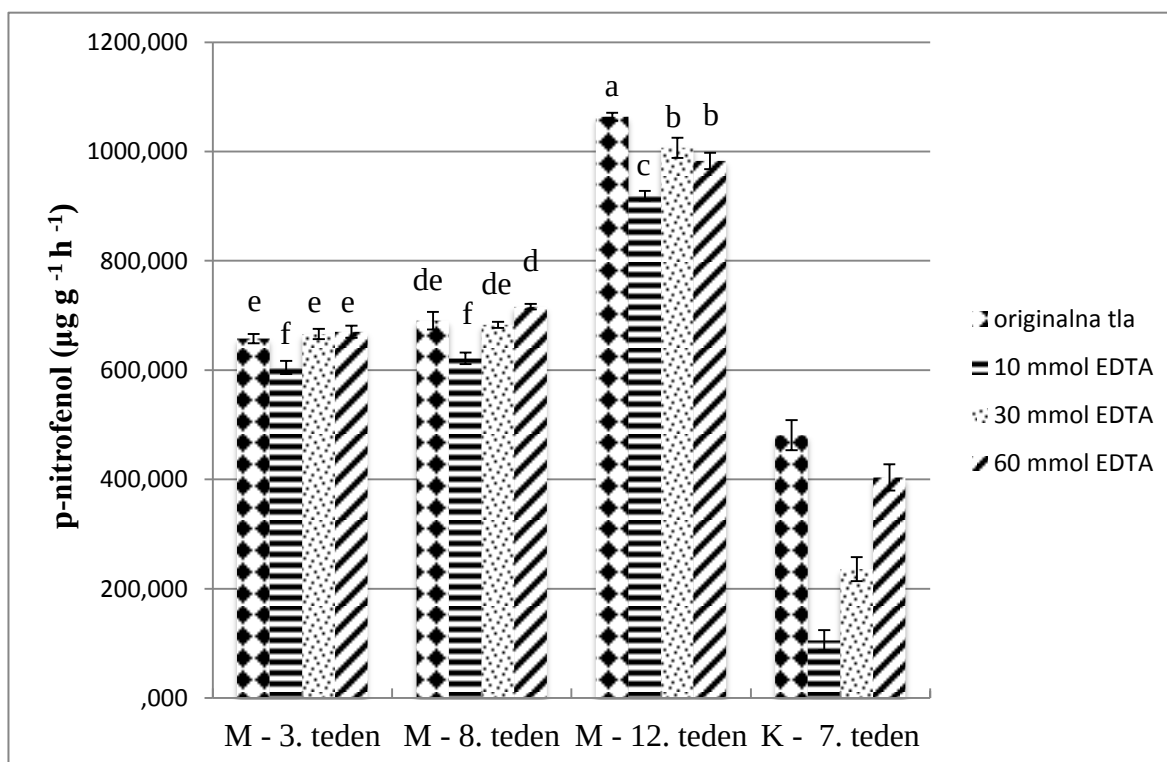
Mikrokozmi

Za mikrokozme je analiza vrednosti aktivnosti kisle fosfataze pokazala, da obstajajo statistične razlike, tako med različnimi obravnavanji tal (originalna tla in tla tretirana z različnimi koncentracijami EDTA; $p=0,024$), kot tudi med časi vzorčenja (3, 8 in 12. teden; $p<2,2\cdot 10^{-16}$). Interakcija med obravnavanjem in časom vzorčenja je statistično značilna ($p=3,6\cdot 10^{-4}$).

Kolonski poskus s kitajskim zeljem

Aktivnost kislih fosfat az v kolonah z rastlinami je bila ob koncu poskusa v originalnih tleh večja ($1035,59 \pm 15,88 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$), kot v remediiranih tleh (od $906,25 \pm 10,14$ do $991,95 \pm 18,49 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$). Zelo velikih razlik med obravnavanji torej ni moč zaznati, sicer je bila najmanjša aktivnost kislih fosfat az izmerjena v tleh tretiranih s 30 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($906,25 \pm 10 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) (Slika 8).

4.2.2.2 Bazične fosfataze



Slika 9: Aktivnost bazičnih fosfat az v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, 30 mM mmol EDTA kg^{-1} suhih tal in 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med aktivnostjo bazičnih fosfat az v tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$).

Mikrokozmi

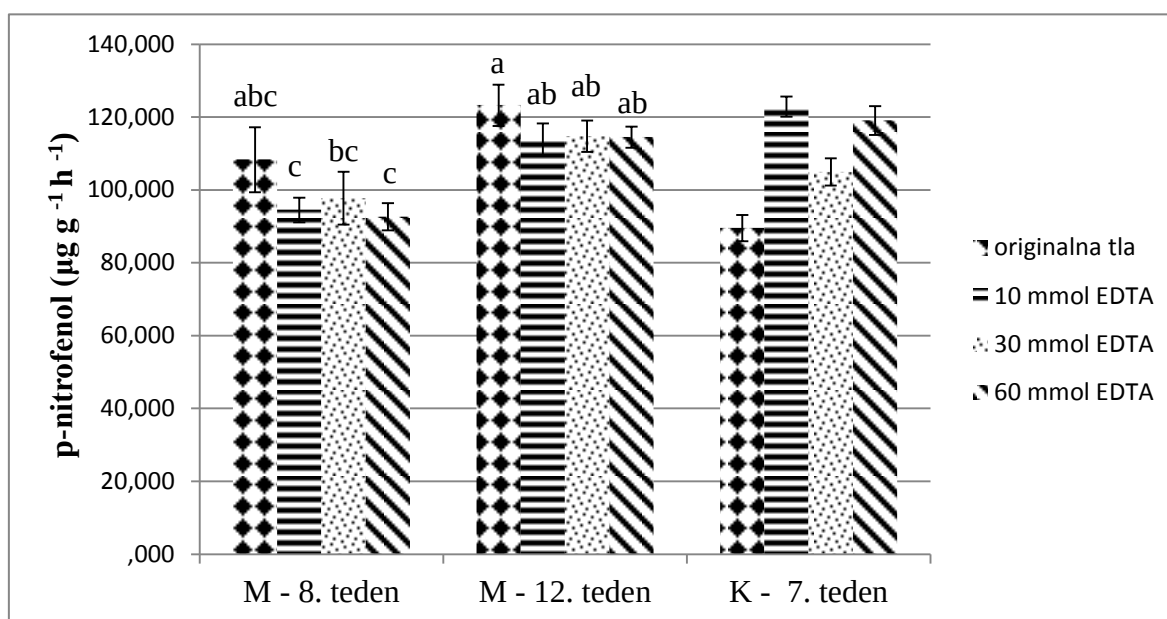
V aktivnosti bazičnih fosfat az je bilo moč zaznati zelo velik vpliv vseh spremenljivk. Statistično značilne razlike so se pokazale pri različnih obravnavanjih tal (originalna tla in tla tretirana z različnimi koncentracijami EDTA; $p=4.54 \cdot 10^{-11}$), pri različnih časih vzorčenja (3, 8 in 12. teden; $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$) in pri interakciji med tema dvema spremenljivkama ($p=4.8 \cdot 10^{-4}$). Aktivnost je bila v 12. tednu bistveno večja ($919,34 \pm 8,80$ do $1063,55 \pm 7,56 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) v primerjavi s 3. in 8. tednom ($604,72$

$\pm 12,11$ do $716,13 \pm 4,72 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$). Največja aktivnost je bila v 12. tednu v originalnih tleh ($1063,55 \pm 7,56 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) in najmanjša v tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($919,34 \pm 8,8 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$).

Kolonski poskus s kitajskim zeljem

Aktivnost bazičnih fosfataz ob koncu rastlinskega poskusa (7. teden) je bila največja v originalnih tleh ($481,21 \pm 27,51 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$), malo manjša je bila v tleh tretiranih s 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($403,80 \pm 23,88 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$). Izrazito manjši sta bili aktivnosti v tleh tretiranih s 30 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($236,04 \pm 21,98 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) in z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($105,70 \pm 18,29 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) (Slika 9).

4.2.3 β -glukozidazna aktivnost



Slika 10: Aktivnost β -glukozidaz v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, 30 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal in 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 3. teden, M - 8. teden in M - 12. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev (mikrokozmi) in šestih ponovitev (kolonski poskus) $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med β -glukozidazno aktivnostjo v tleh med različnimi obravnavami v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$).

Mikrokozmi

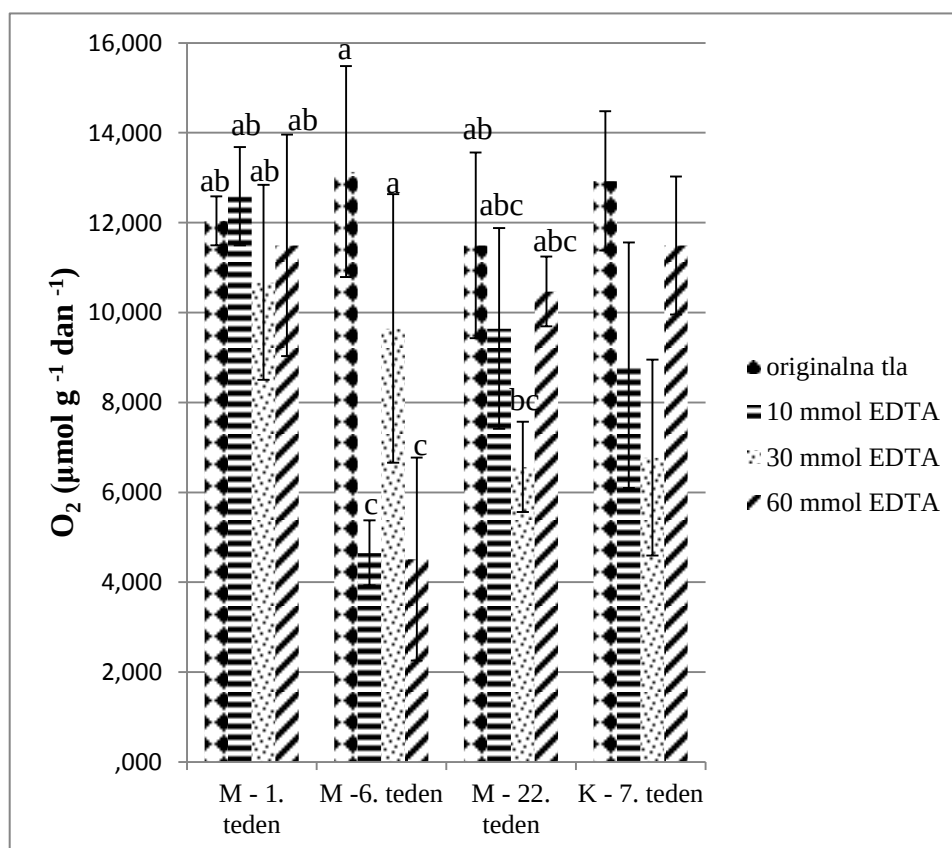
Zaradi problemov tekom izvajanja testa za aktivnost β -glukozidaz in nezadostne količine tal za njegovo ponovitev, meritev v 3. tednu poskusa mikrokozmov nismo pridobili. Statistične razlike za ostala vzorčenja se kažejo v različnih časih vzorčenja ($p < 0,0001$), medtem ko niti obravnavanje niti interakcija obravnavanja s časom vzorčenja nimata

vpliva na aktivnost ($p > 0.05$). V 12. tednu je bila aktivnost β -glukozidaz v originalnih tleh malo višja ($123,24 \pm 5,68 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) v primerjavi z aktivnostjo v remediiranih tleh (od $183,86 \pm 4,36$ do $114,75 \pm 4,29 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$), sicer večjih razlik v aktivnosti glede na obravnavanje v 12. tednu ni mogoče zaznati.

Kolonski poskus s kitajskim zeljem

V kolonskem poskusu je bila aktivnost β -glukozidaz v originalnih tleh ($89,94 \pm 3,61 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) manjša v primerjavi z aktivnostjo v tleh, ki so bila oprana z EDTA (od $104,91 \pm 3,72$ do $122,87 \pm 2,73 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$). Največja aktivnost je bila v tleh opranih z $10 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($122,87 \pm 2,73 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) malo manjša je bila v tleh opranih s $60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($119,05 \pm 3,93 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$), najmanjša v tleh opranih s $30 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($104,91 \pm 3,72 \mu\text{g p-nitrofenola g}^{-1} \text{ suhih tal h}^{-1}$) (Slika 10).

4.2.4 S substratom inducirana respiracija (SIR)



Slika 11: S substratom inducirana respiracija v originalnih tleh in tleh remediiranih z $10 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal, $30 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal in $60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (M - 1. teden, M - 6. teden in M - 22. teden) ter v kolonskem poskusu (K - 7. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med respiracijo v originalnih tleh med različnimi obravnavanji v poskusu mikrokozmov (Duncan, $p < 0,05$).

Mikrokozmi

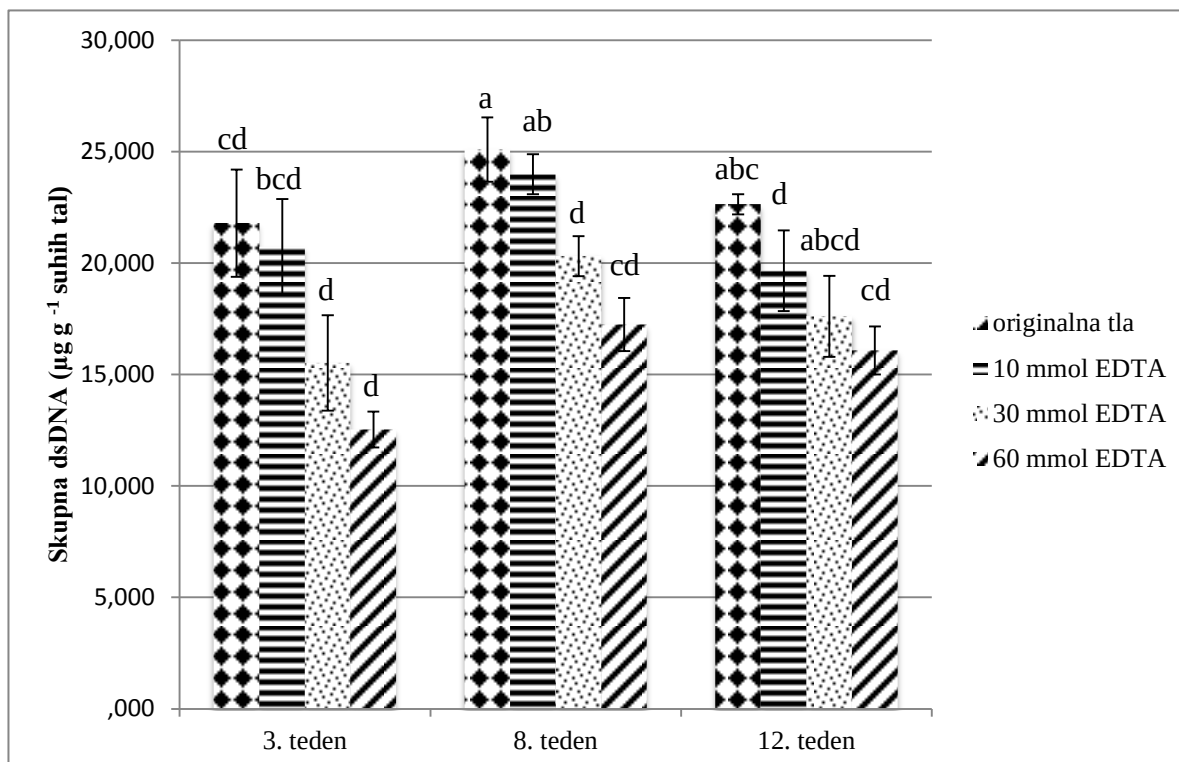
Variabilnost meritev z glukozo inducirane respiracije je bila zelo velika (Slika 11). Z glukozo inducirana respiracija se je v poskusu mikrokozmov v originalnih tleh, v primerjavi s 1. tednom ($12,04 \pm 0,55 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$) v 6. tednu rahlo povečalo ($13,14 \pm 2,35 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$) in v 22. tednu spet zmanjšalo ($11,49 \pm 2,07 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$). V remediiranih tleh se je dihanje v 6. tednu zmanjšalo, nato spet povečalo. Najbolj se je zmanjšalo v 6. tednu v tleh tretiranih z $10 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($4,65 \pm 0,72 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$) in $60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($4,52 \pm 2,26 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$). Prav pri teh obravnavah (30 in $60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal) se je potem v 22. tednu dihanje bistveno povečalo: $9,65 \pm 2,23 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$ ($10 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal) in $10,47 \pm 0,78 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$ ($60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal). Obravnavanje tal na respiracijo ni statistično značilno vplivalo ($0.05 < p < 0.1$), prav tako ne čas vzorčenja ($p = 0.059$), niti interakcija časa z obravnavanjem ($p = 0.074$).

Kolonski poskus s kitajskim zeljem

V kolonskem poskusu so bile vrednosti najvišje v originalnih tleh ($12,93 \pm 1,55 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$), sledila je respiracija v tleh opranih s $60 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($11,49 \pm 1,54 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$), najmanjše vrednosti so bile v tleh opranih s $30 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ suhih tal ($6,77 \pm 2,88 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suhih tal dan}^{-1}$) (Slika 11).

4.3 MIKROBNA BIOMASA

Mikrokozmi

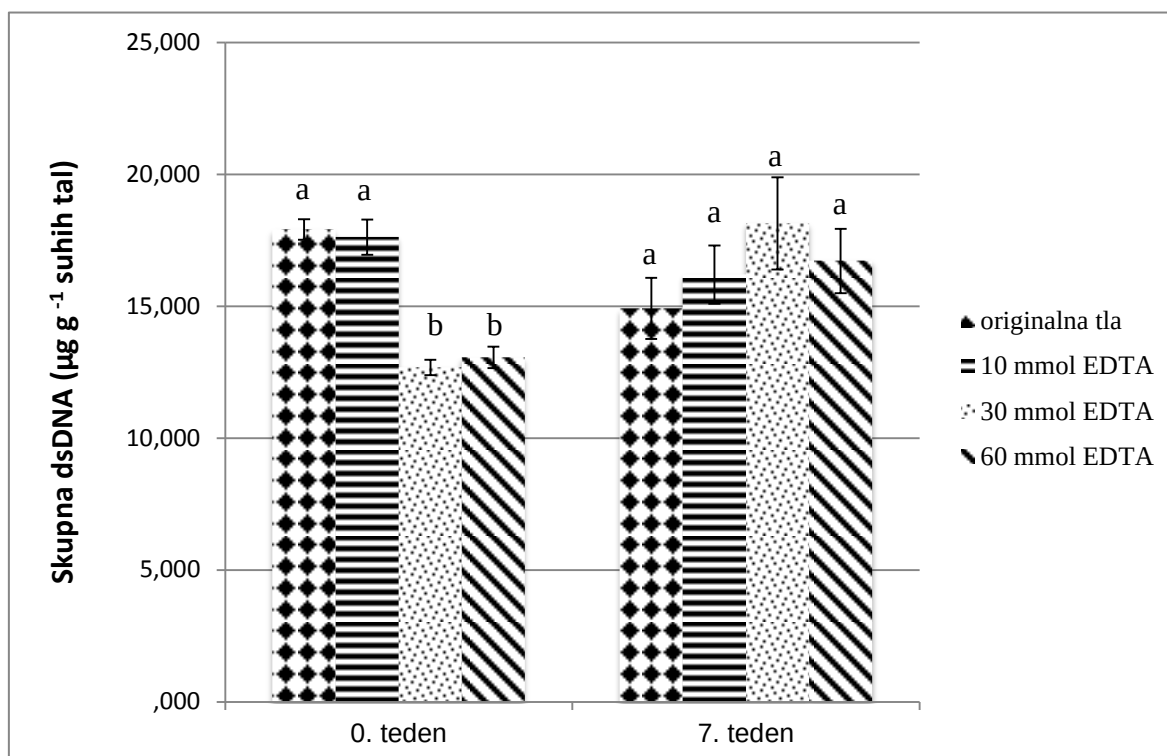


Slika 12: Mikrobnа biomasa (v dsDNA koncentraciji g^{-1} suhih tal) v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, 30 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal in 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev $\pm$ SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$).

Na začetku poskusa mikrokozmov je bila mikrobnа biomasa, ki smo jo ocenili kot skupno talno DNK, v originalnih tleh večja ($21,79 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$ suhih tal) kot v tleh tretiranih s 30 ($15,25 \pm 1,30 \mu\text{g/g}$ suhih tal) in 60 mmol EDTA kg^{-1} suhih tal ($12,53 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ suhih tal). Takšen trend se je kazal skozi celotni poskus; vrednosti skupne DNK so se manjšale skupaj z višanjem koncentracij EDTA, ki so bile uporabljenе za pranje tal. Tekom poskusa se je mikrobnа biomasa v originalnih tleh v 8. tednu povečala ($25,09 \pm 1,45 \mu\text{g/g}$ suhih tal), nato se je v 12. tednu spet zmanjšala ($22,64 \pm 0,45 \mu\text{g/g}$ suhih tal). Prav tako se je mikrobnа biomasa v remediiranih tleh v 8. tednu povečala ter nato v 12. tednu spet zmanjšala (Slika 12).

Na mikrobnо biomasо so statistično značilno vplivali tako čas vzorčenja ($p=0.0066$) kot obravnavanje (originalna tla ali tla oprana z različnimi koncentracijami EDTA) ($p=0.0036$) in interakcija časa vzorčenja z obravnavanjem ($p=0.026$).

Kolonski poskus



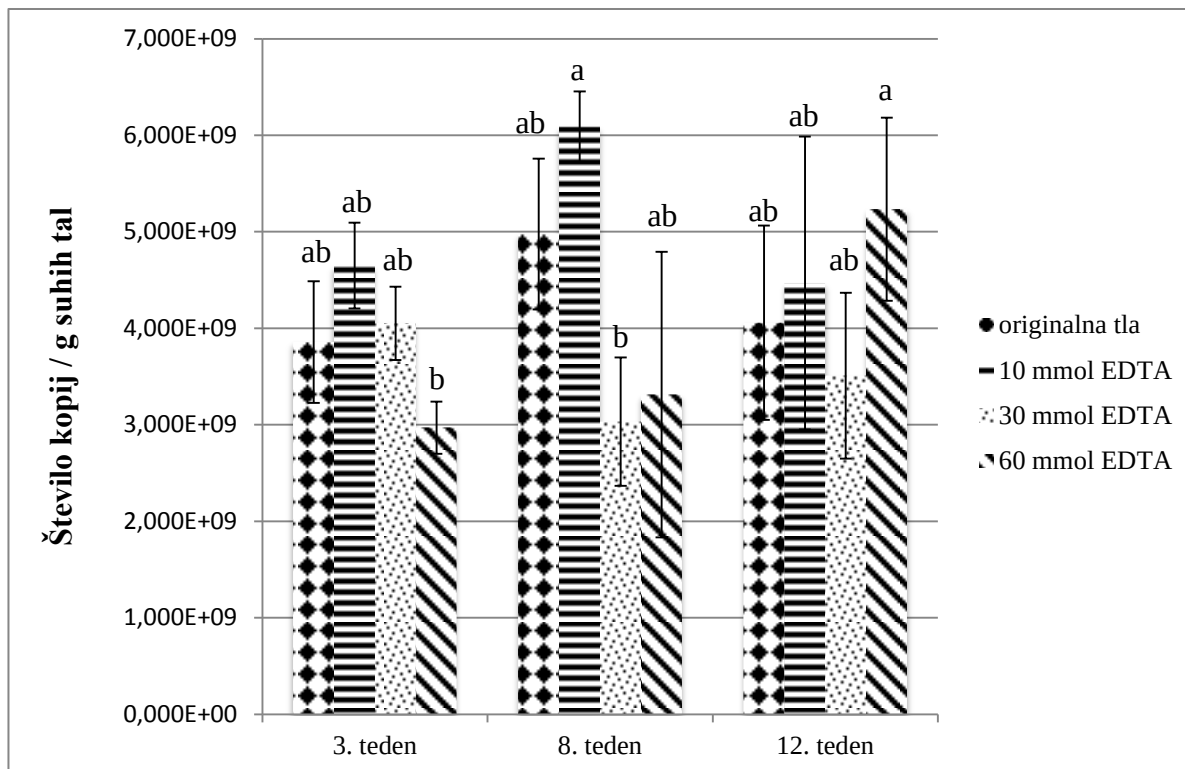
Slika 13: Mikrobna biomasa (v dsDNK koncentraciji g⁻¹ suhih tal) v zgornjem 1 cm sloju originalnih tal in v tleh remidiiranih z EDTA na začetku (teden 0) in na koncu (teden 7) kolonskega poskusa z rastlinami kitajskega zelja (*B. rapa*). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na Duncanov test ($p < 0,05$).

Na začetku kolonskega poskusa so bile vrednosti skupne DNK v zgornjem sloju tal v originalnih tleh značilno večje ($17,91 \pm 0,39 \mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal) kot v tleh tretiranih s 30 ($12,68 \pm 0,29 \mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal) in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($13,06 \pm 0,41 \mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal). Po sedmih tednih poskusa ni bilo zaznati statistično značilnih razlik. Sicer so se vrednosti DNK v originalnih tleh in tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal zmanjšale ($14,91 \pm 0,39$ in $16,20 \pm 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal) (Slika 13).

4.4 SESTAVA, PESTROST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB

4.4.1 Številčnost mikrobnih združb

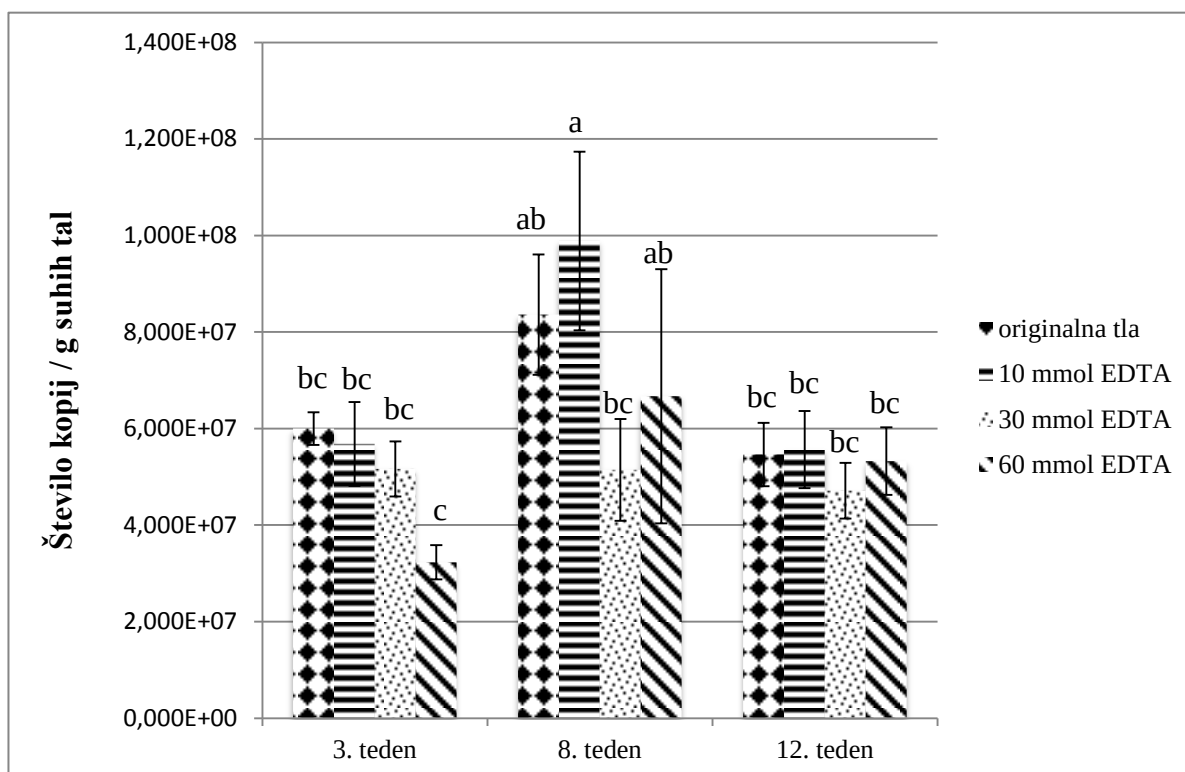
Bakterije



Slika 14: Povprečno število kopij bakterijskih 16S rRNA genov v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavami glede na Duncanov test ($p < 0,05$).

Število kopij bakterijskega gena 16S rRNA se je v poskusu mikrokozmov iz 3. tedna na 8. teden v vseh tleh, razen tleh opranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal povečalo, nato zopet zmanjšalo. Največ bakterij je bilo v 3. tednu v tleh opranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, tako v tretjem ($4,65 \cdot 10^9$ kopij/g suhih tal) kot v osmem tednu ($6,09 \cdot 10^8$ kopij/g suhih tal), v 12. tednu se je značilno povečalo število bakterij v tleh tretiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($5,23 \cdot 10^9$ kopij/g suhih tal) (Slika 14). V poskusu mikrokozmov ni bilo moč zaznati statistično značilnega različnega števila bakterij pri nobeni od spremenljivk ($p < 0,05$).

Glive

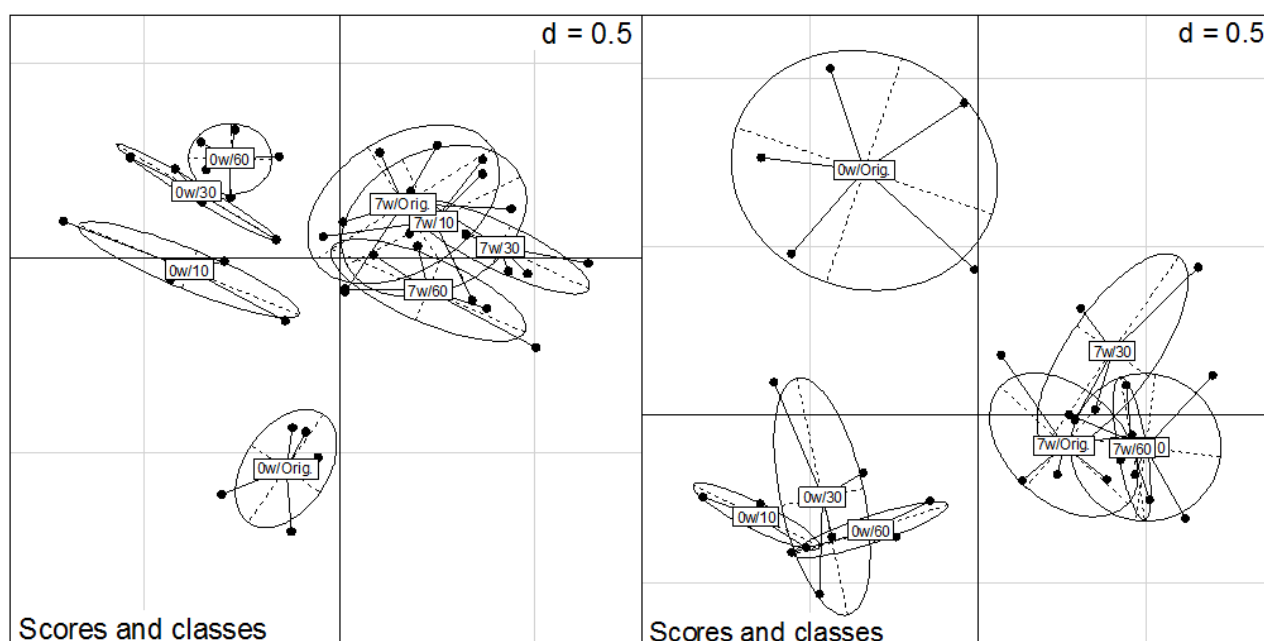


Slika 15: Povprečno število kopij glivnih genov ITS v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, v poskusu mikrokozmov ob različnih časih vzorčenja (3. teden, 8. teden in 12. teden). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih ponovitev ± SE. Črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavami glede na Duncanov test ($p < 0,05$).

Analiza varianc je pokazala statistično značilne razlike za interakcije obravnavanja s časom vzorčenja za število glivnih fragmentov ITS. Število kopij glivnih fragmentov ITS se je iz 3. tedna na 8. teden v vseh tleh povečalo, nato upadlo. V 3. tednu poskusa je bilo največje število fragmentov v originalnih tleh ($6,00 \cdot 10^7 \pm 3,36 \cdot 10^6$ kopij/g suhih tal) in bistveno manjše v tleh remediiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($3,23 \cdot 10^8 \pm 3,54 \cdot 10^6$ kopij/g suhih tal). V 8. tednu je bilo največ fragmentov v tleh opranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($9,89 \cdot 10^7 \pm 1,85 \cdot 10^7$ kopij/g suhih tal), v primerjavi s 3. tednom je zelo poraslo tudi število fragmentov v tleh opranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal ($6,67 \cdot 10^7 \pm 2,63 \cdot 10^7$ kopij/g suhih tal). V zadnjem tednu poskusa so bile vrednosti fragmentov približno enake v vseh tleh, razen v tleh tretiranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, kjer se tekom poskusa število fragmentov ni bistveno spreminjalo (Slika 15).

4.4.2 Struktura in pestrost mikrobnih združb

Analiza podatkov za T-RFLP za bakterijske gene 16S rRNK in glivne fragmente ITS na začetku kolonskega eksperimenta je pokazala jasno razliko med originalnimi tlemi in tlemi remediiranimi z EDTA. Po sedmih tednih eksperimenta so si bile bakterijske in glivne združbe v različnih obravnavanjih bolj podobne (Slika 16). Število različnih T-RF-jev v vsakih izmed tal je bilo med 23 in 28 za bakterijsko združbo in med 21 in 33 za glivno. Statistika ni pokazala nobenih značilnih razlik med obravnavanji in časi vzorčenja.



Slika 16: Analiza glavnih komponent seta T-RFLP podatkov bakterijske 16S rRNK (levo) in glivne regije ITS (desno). Bližina elips, ki obkrožajo ponovitve posameznega obravnavanja, kažejo na podobnost med obravnavanji.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Vpliv remediacije na kemijske in fizikalne lastnosti tal je že dodobra raziskan, še vedno pa ostaja slabo pojasnjen vpliv remediacije na aktivnost mikrobnih združb. V diplomski nalogi smo se zato osredotočili na preučevanje bioloških parametrov kakovosti tal, ki so bila remediirana z metodo spiranja tal z ligandom EDTA; raziskovali smo vpliv na mikrobno biomaso, njeno aktivnost ter sestavo in številčnost posameznih mikrobnih domen.

5.1 MIKROBNA BIOMASA

V mikrokozmi se kaže trend padanja mikrobne biomase sorazmerno z višanjem koncentracije EDTA uporabljene za tretiranje tal (Slika 12), kljub temu da se v tleh tretiranih z višjo koncentracijo EDTA dostopnost toksičnih kovin zmanjšuje (Preglednice 4, 5 in 6), zato bi pričakovali ravno obraten trend – večanje mikrobne biomase. Ugotavljamo, da gre bodisi za neposreden bodisi posreden negativen vpliv EDTA na mikroorganizme. O negativnih učinkih EDTA na bioto tal so že poročali (Grčman, 2001; Hu, 2003; Mühlbachová, 2011). EDTA izraža protibakterijsko delovanje in vpliva na zunanjo membrano tako, da odstranjuje kalcijeve in magnezijeve dvovalentne katione in s tem povzroči občutno zmanjšanje lipopolisaharida. Zaradi tega so celice zelo občutljive na delovanje mnogih snovi, kot so detergenti, proteaze, lipaze in lizocimi (Oviedo in sod., 2003). Henneken in sod. (1995) so jasno pokazali popolno inhibicijo bakterijske združbe s prosto EDTA. EDTA in Pb, ki sta ostala v tleh in ju z remediacijo nismo uspeli odstraniti, bi lahko tvorila tudi EDTA-Pb komplekse, ki so slabo razgradljivi in zelo dobro topni v vodi. To seveda poveča tveganje za negativne učinke na okolje in s tem tudi na mikroorganizme (Epelde in sod., 2008). Večja koncentracija EDTA odstrani iz tal več koristnih hranil, kot so Mn, Fe in Ca, ter s tem neposredno vpliva na mikroorganizme. Jelušič in Leštan (2014) sta zabeležila približno 4-krat manjše koncentracije Mn v remediiranih tleh. Mn je potreben mikroorganizmom kot element v sledovih za številne celične funkcije in lahko služi kot antioksidant, varuje nekatere bakterije pred sevanjem in napadi virusov ali pred toksičnostjo težkih kovin (Epelde in sod., 2008).

Prav tako se kaže negativen vpliv EDTA na mikroorganizme na začetku kolonskega poskusa, medtem ko se na koncu poskusa njegov vpliv vidno zmanjša in znotraj obravnavanj značilnih razlik ni. Eden izmed vzrokov za to bi lahko bil ugoden vpliv rastlin, ki so bile posajene v vsa tla v tednu 0, na rizosfero. S procesom rizodepozicije se sprostijo znatne količine produktov fotosinteze, kot so eksudati, sluzi, izločki in spojine, ki se sproščajo iz odmrlih oz. umirajočih se odstranjenih celic, ter plini kot sta CO₂ in etilen. Odvisno glede na vrsto rastline, starost in okoljske pogoje, lahko predstavljajo rizodepoziti do 40 % celotnega fiksiranega dušika. Povprečno se 17 % celotnega fiksiranega dušika

sprosti skozi korenine. Ta znatna sprostitev ogljikovih hidratov iz korenin rastlin v tla stimulira gostoto in aktivnost mikrobne združbe, ki je v bližnji okolici korenin, vpliva tudi na fizikalno-kemijske lastnosti bolj oddaljenih območij v okolici (Lemanceau in sod., 2006). K povečanju mikrobne biomase v sedmem tednu kolonskega poskusa bi lahko prispevala tudi povečana razgradnja EDTA, ki bi lahko služila mikroorganizmom kot vir hrane; v primerjavi z mikrokozmi, kjer do razgradnje verjetno še ni prišlo. Henneken in sod. (1995) so pokazali sposobnost mešane mikrobne združbe, da razgradi EDTA, če je kompleksirana z ekvimolarnimi količinami kalcijevih ali magnezijevih ionov.

5.2 AKTIVNOST MIKROBNIH ZDRUŽB

Aktivnost talnih mikrobov smo merili posredno z aktivnostjo talnih encimov: dehidrogenaz, fosfataz in β -glukozidaz.

Dehidrogenazna aktivnost (DHA) v mikrokozmih se je s časom zelo spreminjala; v primerjavi s tretjim tednom je bila v osmem tednu bistveno manjša, nato se je v dvanajstem tednu zopet povečala (Slika 7). Ti rezultati ne sovpadajo z rezultati o količini mikrobne biomase, ki je bila v osmem tednu, v primerjavi s tretjim tednom v vseh tleh večja (Slika 12) in bi zato podobno pričakovali tudi pri DHA. DHA namreč kaže metabolično sposobnost tal, njena aktivnost naj bi bila sorazmerna mikrobni biomasi v tleh. Zmanjšanje njene aktivnosti v tleh bi lahko bila posledica zmanjšanja števila anaerobnih bakterij, ki proizvedejo največ dehidrogenaz. Večina mikroorganizmov, ki so odgovorni za proizvodnjo DHA ima namreč raje anaerobne pogoje in pripada skupini obligatnih anaerobov (Wolińska in Stępniewska, 2012). Tukaj gre morda za posredni vpliv EDTA ali kovin; za kateri dejavnik gre, je na podlagi rezultatov pridobljenih v našem poskusu težko določiti.

DHA v tleh tretiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal je bila na koncu poskusa najmanjša in značilno različna od ostalih tal (Slika 7). Habitati z visoko stopnjo onesnaženja s kovinami kažejo manjše število mikrobov (Sobolev, 2008), zato smo večjo aktivnost pričakovali v tleh z najmanjšimi koncentracijami kovin. O negativnem vplivu na dehidrogenazno aktivnost remediiranih tal s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal sta poročala tudi Jelušič in Leštan (2014). Leštan in Udovič (2012) sta dobila enake rezultate kot mi; aktivnost dehidrogenaz je bila v tleh remediiranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal večja v primerjavi z aktivnostjo v originalnih (s težkimi kovinami onesnaženih) tleh. Tukaj gre morda za zapoznili neposredni toksični učinek EDTA na mikroorganizme ali posredni učinek EDTA z odstranitvijo za mikroorganizme koristnih hranil iz tal. Pravo nasprotje temu rezultatu je DHA aktivnost istih tal v tretjem tednu, ki je bila največja in zelo velika glede na ostala tla. Morda je bilo v teh tleh prisotnih več mikroorganizmov, ki so se lažje spopadali z začetnim stresom in večjo koncentracijo EDTA, ali so bili pogoji v tleh bolj

anaerobni in tako bolj ugodni za anaerobne bakterije, ki največ prispevajo k dehidrogenazni aktivnosti.

Aktivnost dehidrogenaz je bila ob koncu kolonskega poskusa večja v vseh remediiranih tleh (10, 30 in 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal), izrazito večja je bila v tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal (Slika 7). Zagotovo predstavlja velik del razloga takšnih rezultatov ugoden vpliv rastlin na mikroorganizme, ki so jih še dodatno razbremenile s problemom soočanja s toksičnimi težkimi kovinami. Uporaba EDTA pri remediaciji tal ima velik vpliv na akumulacijo Pb v kitajskem zelju (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) (Chen in sod., 2004). V poskusu, ki so ga izvedli, se je v primeru uporabe EDTA, v rastlini akumuliralo bistveno več Pb. Zanimivo je, da je bila dehidrogenazna aktivnost v tleh tretiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal bistveno višja kot v ostalih remediiranih tleh. Morda je bil vzrok manjše dehidrogenazne aktivnosti v ostalih tleh ta, da je po remediaciji ostalo več EDTA, ki negativno vpliva na mikroorganizme. Kot posledica tega so bila tla remediirana z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal bolj ugodna za mikroorganizme kot tla sprana z višjimi koncentracijami EDTA, ki so sicer vsebovala manj PSK.

Aktivnost kislih fosfataz v kolonskem poskusu je bila večja v originalnih tleh in tleh remediiranih z 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal (Slika 8). Prav tako je bil v teh tleh večji sprejem kovin v rastline (Preglednica 4), kar bi lahko kazalo na zmanjšanje vpliva kovin na mikroorganizme zaradi večjega sprejema kovin v rastlino. Toksične kovine namreč negativno vplivajo na fosfatazno aktivnost (Khan, 2010). Druga možnost je negativen vpliv EDTA, tako na mikroorganizme kot tudi kisle fosfataze. Ko merimo aktivnost fosfataz je pomembno, da se zavedamo, da je izmerjena encimska aktivnost odvisna tudi od aktivnosti stabiliziranih ekstracelularnih encimov, saj najdemo fosfataze (v nasprotju z dehidrogenazami) tako v celicah kot prosto v tleh (Nannipieri in sod., 2011). Obstaja torej tudi možnost, da so vrednosti v originalnih tleh večje zaradi negativnega vpliva EDTA na v tleh prisotne fosfataze; EDTA je dober inhibitor bazičnih fosfataz (Dean, 2002).

V poskusu z mikrokozmi prevladuje negativen vpliv kovin na aktivnost kislih fosfataz. Rezultati kažejo splošen trend večanja encimske aktivnosti sorazmerno s količino EDTA uporabljeno za remediacijo tal. Razlika je le v zadnjem (12. tednu), kjer je bila večja dehidrogenazna aktivnost v originalnih tleh. Nannipieri in sod. (2011) so ugotovili, da s Cd onesnažena tla niso imela vpliva na aktivnost kislih fosfataz in sestavo mikrobne združbe; najverjetneje zaradi fizioloških prilagoditev in ne selekcije na kovine odpornih bakterij. Tudi v našem primeru bi lahko bil to eden izmed razlogov zakaj je bila aktivnost večja v originalnih tleh.

Aktivnost bazičnih fosfataz v mikrokozmih je bila dokaj podobna v 3. in 8. tednu, medtem ko je v 12. tednu izrazito narasla; na koncu poskusa (12. teden) je bila največja v originalnih onesnaženih tleh. Razlog za manjšo aktivnost v remediiranih tleh bi lahko bil

negativen vpliv EDTA (Slika 9). V kolonskem poskusu se je v remediiranih tleh aktivnost bazičnih fosfataz večala sorazmerno z večanjem koncentracije EDTA in manjšanjem vsebnosti oz. dostopnosti PSK. Največja aktivnost bazičnih fosfataz je bila v onesnaženih tleh. Rezultati kažejo, da so bili pogoji za delovanje teh encimov bistveno boljši v originalnih tleh, kot v remediiranih.

V poskusu z mikrokozmi je bila aktivnost β -glukozidaz večja v originalnih tleh, vendar ni bilo značilnih razlik (Slika 10). Rahlo zmanjšanje v aktivnosti bi lahko pripisali vplivu EDTA. O negativnem vplivu spiranja tal z EDTA na β -glukozidazno aktivnost so že poročali (Leštan in Udovič, 2012; Jelušič in Leštan, 2014). Višja koncentracija PSK tudi v našem primeru v poskusu z mikrokozmi očitno ni vplivala oz. je imela zelo majhen vpliv na aktivnost β -glukozidaz. Podobno so ugotovili v raziskavi, kjer so proučevali vpliv Cd, Cu in Pb na različne encimske aktivnosti v gozdnih tleh in prišli do zaključkov, da imajo ti elementi zelo majhen učinek na aktivnost β -glukozidaze ali pa sploh nimajo (Effron in sod., 2004).

Zanimivo je, da je bil v kolonskem poskusu trend aktivnosti β -glukozidaz ravno obraten; aktivnost je bila večja v remediiranih tleh. Ali prihaja do razlik zaradi vsebnosti PSK je nejasno, saj je zelo velika razlika med aktivnostjo v originalnih tleh in aktivnostjo v tleh tretiranih z le 10 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, kjer ni značilne razlike v dostopnosti Pb, ki ima na mikroorganizme največji vpliv. Sicer se v primerjavi z mikrokozmi tukaj pozna ugoden vpliv rastlin, kar potrjuje opažanja, da je aktivnost β -glukozidaz ponavadi večja v tleh z visoko vsebnostjo lahko razgradljivega organskega materiala; v ohranjenih tleh in v tleh, kjer rastejo rastline. V tleh, ki so degradirana in imajo nizko vsebnost organskega materiala, bo zaradi zmanjšanja aktivnosti encima manj enostavnih sladkorjev za mikrobno populacijo (de Almeida, 2015), kar bo zaviralo rast mikrobov. β -glukozidaze so namreč encimi, ki so zadolženi za razgradnjo celuloze v glukozo, ki predstavlja pomemben vir energije za mikroorganizme.

SIR oz. s substratom inducirana respiracija je bila zelo variabilna tekom poskusa in nanjo nista vplivala niti obravnavanje niti čas. Na splošno je bila respiracija v obeh poskusih najmanjše v tleh tretiranih s 30 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal in največje v onesnaženih tleh (Slika 11). Metoda s SIR poudarja tisti del mikrobne populacije, ki se na dodatek glukoze odzove z večjo hitrostjo respiracije skoraj takoj - to so t.i. r-strategisti. Raztopina glukoze se v tleh hitro razporedi in mikroorganizmi jo takoj porabijo (Thomsen in sod., 1999). Nasprotno se k-strategisti na dodano glukozo ne odzovejo takoj ali se na njo sploh ne odzovejo. Razlike v naših rezultatih lahko med drugim torej nakazujejo tudi prisotnost mikrobnih združb, ki imajo bistveno drugačen odziv na glukozo.

5.3 ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB V MIKROKOZMIH

Statistično značilne razlike v številu bakterij ni bilo mogoče zaznati pri nobeni od spremenljivk (obravnavo, čas vzorčenja) (Slika 14), medtem ko so se pokazale razlike za interakcije obravnavanj s časom vzorčenja za število glivnih fragmentov ITS (Slika 15). Številčnost bakterij se s časom ni bistveno spreminjala. Statistično značilna razlika se kaže v tleh remediiranih s 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal, kjer se število kopij bakterij iz tretjega na dvanajsti teden poveča, kar se zgodi tudi z encimskimi aktivnostmi (kisle in bazične fosfataze, β -glukozidaze, dehidrogenaze), ki so na koncu poskusa večje. Na splošno se število kopij bakterij v osmem tednu poveča, nato spet rahlo pade. Razlog za to bi lahko bil pomanjkanje hrane.

Za število glivnih fragmentov ITS so se pokazale razlike za interakcije obravnavanj s časom vzorčenja. Podobno kot pri bakterijah se je število fragmentov ITS v osmem tednu povečalo, nato padlo. Tudi tukaj gre najverjetneje za pomanjkanje hranil. Na koncu je bilo v tleh večje število bakterij kot gliv in tudi razmerje bakterij in gliv je bilo večje v primerjavi s 3. tednom poskusa. To lahko kaže na to, da so se pogoji po remediaciji s časom bistveno izboljšali za bakterije. Večja variabilnost števila fragmentov ITS s časom in med obravnavanji, v primerjavi s številom kopij bakterij, kaže tudi na večjo občutljivost gliv v teh tleh na spremembe v okolju.

5.4 STRUKTURA IN PESTROST MIKROBOV V KOLONSKEM POSKUSU

Statistična ocena za T-RFLP podatke za gen 16S rRNK in glivni fragment ITS je pokazala jasno razliko med onesnaženimi tlemi in remediiranimi tlemi na začetku kolonskega poskusa. Večje koncentracije EDTA uporabljene za remediacijo imajo očitno večji vpliv na bakterijsko kot na glivno združbo (Slika 16). Po sedmih tednih eksperimenta so si bile bakterijske in glivne združbe v različnih obravnavanjih bolj podobne. Število različnih T-RF-jev v vsakih izmed tal je bilo za mikrobne združbe v rangi od 23 do 28 in med 21 do 33 za glive z nobenimi statističnimi razlikami med obravnavanji ali časi vzorčenja. T-RFLP metoda ni najbolj optimalna, ker kaže samo na splošno združbo. Remediacija zagotovo vpliva na določene specialne skupine mikroorganizmov, ki jih s to tehniko ne moremo zaznati. Za bolj podrobno analizo mikrobnih združb bi morali izbrati druge tehnike, kot je npr. sekvenciranje DNK, ki bi nam lažje pojasnile naše rezultate.

5.5 SKLEPI

- Vpliv remediacije na aktivnost združb je nejasen. Na koncu so bile v mikrokozmi vse encimske aktivnosti resda največje v originalnih tleh, vendar večina rezultatov ni dala statistično značilnih razlik. V kolonskem poskusu, kjer se je povsod zaznal

vpliv rastlin, so bile po pričakovanjih na koncu poskusa nekatere encimske aktivnosti večje v remediiranih tleh. V obeh poskusih se kažejo negativni vplivi PSK in/ali EDTA. Za bolj jasne rezultate bi morali aktivnosti spremljati dalj časa.

- Remediacija onesnaženih tal je pozitivno vplivala na mikrobno biomaso v kolonskem poskusu, predvsem zaradi vpliva rastlin, medtem ko se je v mikrokozmi (brez rastlin) jasno pokazal negativen vpliv EDTA.
- Številčnost mikrobnih združb v mikrokozmi se v remediiranih tleh ni bistveno spremenila; statistično značilno razliko je bilo zaznati le pri 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal za število bakterij. Statistična ocena za T-RFLP podatke za gen 16S rRNA in glivni fragment ITS je pokazala jasno razliko med onesnaženimi tlemi in remediiranimi tlemi na začetku kolonskega poskusa. Po sedmih tednih eksperimenta so si bile bakterijske in glivne združbe v različnih obravnavanjih bolj podobne.

6 POVZETEK

V Evropi naj bi bilo več kot 2.5 milijonov potencialno onesnaženih zemljišč; od tega jih je več kot 14 % onesnaženih. Med najpogostejšimi onesnaževalci tal so poleg olja potencialno strupene kovine (PSK). Ponekod so se zaradi antropogenih dejavnosti nakopičile do koncentracij, ki škodijo rastlinam in živalim ter celotnemu ekosistemu. Za razliko od organskih onesnažil se ne razgradijo in vztrajajo v tleh še dolgo po onesnaženju. S čiščenjem oz. remediacijo tal se izboljša kakovost tal in preprečuje tveganja, ki ga potencialno toksične kovine predstavljajo v tleh za ljudi in okolje.

Zelo učinkovita metoda odstranjevanja PSK je pranje tal, saj se jo lahko zaradi hitre kinetike, enostavnosti delovanja in ekonomske učinkovitosti uporabi za večje površine. Pranje tal z ligandi ima manjši vpliv na spremembe pedoloških lastnosti in ohrani biološke lastnosti tal. Najobetavnejši med ligandi je EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), predvsem zaradi visoke učinkovitosti odstranitve kovin iz tal, relativno dostopne cene in zmožnosti ponovne uporabe – recikliranja v postopku.

Pri ocenjevanju kakovosti tal po postopku remediacije so še posebej pomembni biološki parametri, ker se organizmi na spremembe rabe tal, okoljskih pogojev ali onesnaženje, odzovejo veliko hitreje kot večina kemijskih in fizikalnih parametrov. Pri tem so zelo uporabni indikatorji mikroorganizmi, saj opravljajo ključne funkcije pri razgradnji organske snovi, kroženja hranil in ohranjanju strukture tal.

V raziskavi smo uporabili s težkimi kovinami onesnažena vrtna tla iz naselja Žerjav v Mežiški dolini, ki se uvršča na seznam najbolj onesnaženih krajev v Sloveniji.

Za ocenitev aktivnosti mikrobnih zružb smo uporabili nabor encimskih testov ter metodo s substratom inducirane respiracije (SIR ang. Substrate Induced Respiration). Mikrobno pestrost, razlike v sestavi in številčnost mikroorganizmov smo preučevali s pomočjo molekularnih metod. Za določanje mikrobne biomase smo izvedli izolacijo skupne DNK, mikrobno pestrost in spremembe v sestavi pa smo določili z metodo polimorfizma dolžine končnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP ang. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) bakterijskega gena za 16S rRNK in glivne regije ITS. Za določanje števila mikroorganizmov iz domen bakterij in gliv smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

Skupna koncentracija kovin v tleh se je manjšala z uporabo večjih koncentracij EDTA za spiranje tal v postopku remediacije. Pred remediacijo je bila večina Zn (do 64 %) najdena v preostali frakciji, večji del Pb je bil vezan na karbonate (46 %) in na organsko snov (33 %), večina Cd na nestabilno karbonatno talno frakcijo (do 45 %). Po remediaciji je bila velika večina PSK najdena v vezani, stabilni obliki (vezana na organske in preostale talne frakcije). Biodostopnost Pb iz želodčne in črevesne faze se je zmanjšala z večanjem

koncentracije EDTA. Biodostopnost Zn v originalnih tleh, v primerjavi z remediiranimi tlemi je bila značilno večja, vendar koncentracija uporabljene EDTA nanjo ni imela vpliva. Remediacija tal je v koreninah *B. rapa* značilno zmanjšala koncentracije Pb in Cd, v malo manjši meri tudi Zn, medtem ko so koncentracije PSK v listih po remediaciji ostale skoraj nespremenjene.

Remediacija onesnaženih tal je pozitivno vplivala na mikrobno biomaso v kolonskem poskusu, predvsem zaradi vpliva rastlin, v mikrokozmih se je jasno pokazal negativen vpliv EDTA.

Številčnost mikrobnih združb v mikrokozmih se v remediiranih tleh ni bistveno spremenila; statistično značilno razliko je bilo zaznati le pri 60 mmol EDTA kg⁻¹ suhih tal za število bakterij. Statistična ocena za T-RFLP podatke za 16S rRNA in glivni fragment ITS je pokazala jasno razliko med onesnaženimi tlemi in remediiranimi tlemi na začetku kolonskega poskusa. Po sedmih tednih eksperimenta so si bile bakterijske in glivne združbe v različnih obravnavanjih bolj podobne.

Vpliv remediacije na aktivnost združb je nejasen. Na koncu so bile v mikrokozmih vse encimske aktivnosti resda največje v originalnih tleh, vendar večina rezultatov ni dala statistično značilnih razlik. V kolonskem poskusu so bile na koncu poskusa nekatere encimske aktivnosti večje v remediiranih tleh. Tukaj se je zaznal ugoden vpliv rastlin zaradi procesa rizodepozicije in prevzema PSK iz tal, s čimer so rastline še dodatno razbremenile mikroorganizme s problemom soočanja s toksičnimi težkimi kovinami. V obeh poskusih se kažejo negativni vplivi PSK in/ali EDTA. Za bolj jasne rezultate bi morali aktivnosti spremljati dalj časa.

7 VIRI

- Aislabie J., Deslippe J. R. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. V: Ecosystem Services in New Zealand – conditions and trends. Dymond J. R. (ur.). Lincoln, Manaaki Whenua Press: 143-161
- Blanco-Canqui H., Lal R. 2008. Principles of Soil Conservation and Management. Springer Science & Business Media: 601 str.
http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/Projects/Soil_Atlas/Download/Atlas.pdf (20. jun. 2016)
- Bruggena A.H.C., Semenovb A.M. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 15: 13–24
- Caffaro-Filho R.A., Fantinatti-Garboggini F., Durrant L.R. 2007. Quantitative analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 4: 736-738
- Chen Y., Xiangdong L., Zhenguo S. 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextracion process. *Chemosphere*, 57, 3: 187-196
- Chibuike G.U., Obiora S.C. 2014. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/752708> (16. jun. 2016)
- Christensen T.H. 1984. Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH, and calcium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 21: 105-114
- De Almeida R.F., Naves E.R., da Mota R.P. 2015. Soil quality: enzymatic activity of soil β -glucosidase. *Global Journal of Agricultural Research and Reviews*, 3, 2: 146-150
- De la Rosa D., Sobral R. 2008. Soil quality and methods for its assessment. V: Land Use and Soil Resources. Braimoh A.K., Vlek P.L.G. (ur.). Springer, Netherlands: 167–200
- Dean R. L. 2002. Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 6: 401-407

- Deslippe J.R., Hartmann M., Simard S., Mohn W.W., 2012. Long term warming alters arctic soil microbial communities. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology, Ecology* 82, 2: 303-315
- Doelman P. 1985. Resistance of soil microbial communities to heavy metals. V: *Microbial communities in soil*. Jensen V. in sod. (ur.). London, Elsevier: 369–384
- Effron D., De la Horra A.M., Defrieri R.L., Fontanive V., Palma R.M. 2004. Effect of cadmium, copper, and lead on different enzyme activities in a native forest soil. *Communications in soil science and plant analysis*, 35, 9-10: 1309-1321
- Epelde L., Becerril J. M., Hernández-Allica J., Barrutia O., Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology*, 39, 3: 299-310
- Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7: 4117-4120
- Fierer N., Lauber C.L., Ramirez K.S., Zaneveld J., Bradford M.A. 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 6, 5: 1007–1017
- Giller K.E., Witter E., Mcgrath S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10: 1389-1414
- Gosar M., Šajn R. 2006. Kovinski rudniki in okolje (nekateri slovenski primeri). *RMZ - Materials and Geoenvironment*, 52, 3: 571-579
http://www.rmz-mg.com/letniki/rmz52/rmz52_0571-0579.pdf (3. jun. 2016)
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil*, 235, 1: 105-114
- Henneken L., Nortemann B., Hempel D.C. 1995. Influence of physiological conditions on EDTA degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44:190-197
- Hiroki M. 1992. Effects of heavy metal contamination on soil microbial populations. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38, 1: 141–147

- Horner-Devine M. C., Carney K. M., Bohannon B. J. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271, 1535: 113–122
- Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B. F. 2003. Nitrification inhibition by ethylenediamine-based chelating agents. *Environmental engineering science*, 20, 3: 219-228
- ISO 11274. Soil Quality – Determination of the water retention characteristic. 1998: 20 str.
- Jelušič M. 2014. Kakovost in funkcioniranje onesnaženih vrtnih tal po remediaciji. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 116 str.
- Jelusic M., Grcman H., Vodnik D., Suhadolc M., Lestan D. 2013. Functioning of metal contaminated garden soil after remediation. *Environmental pollution*, 174: 63-70
- Jelusic M., Lestan D. 2014. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part I: toxicity hazards and impact on soil properties. *Science of the Total Environment*, 475, 132-141
- Jones A., Montanarella L., Jones R. 2005. Soil atlas of Europe. Luxembourg, European Commission European Soil Bureau Network, Office for official publications of the European Communities: 128 str.
- Kalra Y.P, Maynard D.G. 1991. Methods manual for forest soil and plant analysis. Information Report NOR-X-313. Canada, 116 str.
- Karlen D.L., Ditzler C.A., Andrews S.S. 2003. Soil quality: why and how?. *Geoderma*, 114, 3: 145-156
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental microbiology*, 75, 15: 5111-5120
- Lemanceau P., Offre P., Mougél C., Gamalero E., Dessaux Y., Moënne-Loccoz Y., Berta G. 9 Plant–Microbe Interactions and Soil Quality, 9.1 Microbial ecology of the rhizosphere. 2006. V: *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. Bloem J., Hopkins D. W., Benedetti A. (ur.). CABI: 228-230
- Lenart-Boroń A., Boroń P. 2014. The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils - a review. V: *Environmental Risk*

- Assessment of Soil Contamination. Hernandez-Soriano M.C. (ur.). Rijeka, InTech: 759-783
- Leštan D. 2002. Ekopedologija, študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 286 str.
- Leštan D., Luo C.L., Li X.D. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153, 1: 3-13
- Martiny J.B., Eisen J.A., Penn K., Allison S.D., Horner-Devine M.C. 2011. Drivers of bacterial β -diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19: 7850-7854
- Mühlbachová G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecological Engineering*, 37, 7: 1064-1071
- Nacke H., Thürmer A., Wollherr A., Will C., Hodac L., Herold N., in sod. 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils. *Public Library of Science one*, 6, 2: e17000
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017000> (2. avg. 2016)
- Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. *Phosphorus in action. V: Soil Biology*, 26. Bünemann E., Oberson A., Frossard E. (ur.). Berlin, Springer: 215-243
- Nemergut D.R., Costello E.K., Hamady M., Lozupone C., Jiang L., Schmidt S., in sod. 2011. Global pattern in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology* 13, 1: 135–144
- Pečiulyte D., Dirginčiute-Volodkiene V. 2009. Effect of long-term industrial pollution on soil microorganisms in deciduous forests situated along a pollution gradient next to a fertilizer factory. 1. Abundance of bacteria, actinomycetes and fungi. *Ekologija*, 55, 1: 67-77
- Potočnik A. 2012. Vpliv pranja tal z različnimi odmerki EDTA na pridelek kitajskega kapusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* Hanelt.), vsebnost Pb, Zn, in Cd v listih in koreninah ter odcednih vodah. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 40 str.

- Powell R., Gannon F. 2002. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. Oxford Practical Approach Series. Oxford University Press, UK.
http://www.avivasysbio.com/media/pdf/protocols/protocol_phenol_extraction_and_ethanol_ppt_of_dna.pdf (2. jul. 2016)
- Progress in management of contaminated sites. 2007. European Environment Agency.
<http://www.eea.europa.eu/downloads/3317ce15ea77ed41a9753f4781b1dcca/1441389594/progress-in-management-of-contaminated-1.pdf> (16. jun. 2016)
- Qayyum S., Khan I., Meng K., Zhao Y., Peng C. 2015. Remediation technologies for heavy metals contaminated soil. Journal of International Academic Research for Multidisciplinary, 3, 11.
https://www.researchgate.net/publication/290157595_REMEDIATION_TECHNOLOGIES_FOR_HEAVY_METALS_CONTAMINATED_SOIL (4. jun. 2016)
- Ramirez K.S., Craine J.M., Fierer N. 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. Global Change Biology, 18, 6: 1918–1927
- Rousk J., Bååth E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G. in sod. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. The International Society for Microbial Ecology Journal, 4, 10: 1340–1351
- Sanders J.R., McGrath S.P., Adams T.M. 1986. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37, 10: 961-968
- Seybold C. A., Mausbach M. J., Karlen D. L., Rogers H. H. 1997. Quantification of soil quality. V: Soil Processes and the Carbon Cycle. Lal R. in sod. (ur.). Advances in Soil Science, CRC Press: 387-404
- Singh R., Singh P., Sharma R. 2014. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 4, 1: 1-6
- Smith C.J., Osborn A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR) based approaches in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology, 67, 1: 6-20
- Sobolev D., Begonia M.F.T. 2008. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as

evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5, 5: 450-456

Soil contamination widespread in Europe. 2015. European Environment Agency.
<http://www.eea.europa.eu/downloads/2b988171c96f42cf9ac76c692049ad3b/1466520331/soil-contamination-widespread-in-europe.pdf> (16. jun. 2016)

Soil Survey laboratory methods manual, 1992. Soil Survey Investigations Report No. 42, Version 2.0

Sporočilo komisije svetu, evropskemu parlamentu, evropskemu ekonomsko-socialnemu odboru in odboru regij. Tematska strategija za varstvo tal. 2006. Komisija Evropskih skupnosti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0231:FIN:SL:PDF>
10.8.2016 (18. jun. 2016)

Suhadolc M. 2013. Biotski indikatorji kakovosti tal. V: Novi izzivi v agronomiji 2013: zbornik simpozija. Zreče, 2013. Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 50-55

Suhadolc M., Ruprecht J., Zupan M. 2005. Priročnik za vaje iz pedologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo. Center za pedologijo in varstvo okolja: 38 str.

Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 3: 387-401

Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. V: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Luch, Andreas (ur.). Springer Basel, 101: 133-164

Thomsen I.K., Schjøning P., Jensen B., Kristensen K., Christensen B.T. 1999. Turnover of organic matter in differently textured soils II. Microbial activity as influenced by soil water regimes. *Geoderma*, 89, 3: 199-218

Udovic M., Lestan D. 2012. EDTA and HCl leaching of calcareous and acidic soils polluted with potentially toxic metals: remediation efficiency and soil impact. *Chemosphere*, 88, 6:718-24

- Voglar D. 2013. Uporaba elektrokemijskih procesov pri remediaciji tal, onesnaženih s kovinami. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 115 str.
- Wang G., Koopmans G.F., Song J., Temminghoff E.J., Luo Y., Zhao Q., Japenga J. 2007. Mobilization of heavy metals from contaminated paddy soil by EDDS, EDTA, and elemental sulfur. *Environmental geochemistry and health*, 29, 3: 221-235
- Wei J., Tao T., Zhi-Ming L. 2011. Removal of heavy metal from contaminated soil with chelating agents. *Open Journal of Soil Science*, 1: 70-76
http://file.scirp.org/pdf/OJSS20110200009_45030096.pdf (23. jun. 2016)
- Wuana R. A., Okieimen F. E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network Ecology*, 2011
<http://dx.doi.org/10.5402/2011/402647> (22. jun. 2016)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Metki Suhadolc za vso pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela in pri pisanju diplomske naloge, za vse tople in prijazne vzpodbude v trenutkih negotovosti ter dragocene strokovne, kot tudi življenjske nasvete.

Zahvaljujem se tudi mladi raziskovalki dr. Aneli Kaurin za svetovanje in pomoč pri laboratorijskem delu ter za vse pogovore in "prave" besede, ki so me v trenutkih časovne stiske napolnile z energijo in zaupanjem.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je ves čas stala ob strani, me vzpodbujala in mi omogočila, da sem lahko diplomsko nalogo dokončala.