

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša CESAR

**PREUČEVANJE BAKTERIJSKIH IN GLIVNIH
ZDРUŽB TAL V VINOGRADIH Z EKOLOŠKO
PRIDELAVO GROZDJА**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša CESAR

**PREUČEVANJE BAKTERIJSKIH IN GLIVNIH ZDРUŽB TAL V
VINOGRADIH Z EKOLOŠKO PRIDELAVO GROZDJА**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**ANALYSIS OF BACTERIAL AND FUNGAL COMMUNITIES IN
SOIL OF ORGANIC VINEYARDS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Kapilarna elektroforeza je bila opravljena na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo Oddelka za zootehniko, ostalo delo je bilo opravljeno na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Matevža Likarja in za somentorja prof. dr. Blaža Stresa.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Matevž LIKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Blaž STRES
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Marjetka SUHADOLC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko 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.

Tjaša Cesar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.26:631.46:634.8(043.2)
KG mikrobnna ekologija/ekološki vinograd/talna mikrobnna združba/mikrobnna pestrost/mikrobnna aktivnost/ARISA/FDA
AV CESAR, Tjaša, dipl. mikrobiol.
SA LIKAR, Matevž (mentor)/STRES Blaž (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2016
IN PREUČEVANJE BAKTERIJSKIH IN GLIVNIH ZDRUŽB TAL V VINOGRADIH Z EKOLOŠKO PRIDELAVO GROZDJA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XII, 59, [5] str., 11 pregl., 13 sl., 4 pril., 118 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Preučevali smo vpliv različnih kemijskih in fizikalnih dejavnikov tal na pestrost, strukturo in aktivnost bakterijske ter glivne združbe v tleh vinogradov. Vzorčili smo zgornji sloj tal (do 15 cm) v treh ekoloških vinogradih, starih 3 (EKO3), 10 (EKO10) in 35 let (EKO35) ter v 35 let starem konvencionalnem vinogradu (KON), v Vipavski dolini (Šempas). Tla ekoloških vinogradov in konvencionalnega vinograda so se med seboj razlikovala v teksturi in pH. Ugotovili smo, da ta dva dejavnika verjetno najbolj vplivata na strukturo mikrobnne združbe tal, saj so se mikrobnne združbe izolirane iz tal vinogradov EKO v statistični analizi DAPC dobro ločile od mikrobnih združb tal iz vinograda KON. Analiza DAPC je dobro ločila tudi mikrobnne združbe tal iz vinograda EKO3, ki je bil ob zasaditvi prekopan in ob vzorčenju še ni imel zelenega pokrova, od mikrobnih združb tal starejših ekoloških vinogradov s trajno ozelenitvijo. V tleh EKO3 je bila izmerjena tudi najnižja mikrobnna aktivnost. Domnevamo, da je na razlike v strukturi in aktivnosti mikrobnne združbe tal vinograda EKO3 vplivala manjša vsebnost organske snovi in dostopnega fosforja. Vzorec z največjo mikrobnno pestrostjo, ki smo jo ocenili s Shannonovim indeksom, je pripadal vinogradom EKO35 in KON, vzorec z najnižjim indeksom pa vinogradu EKO10. Opazili smo tudi, da je znotraj vinogradov mikrobnna pestrost zelo variabilna in da v tleh med vrstnim in medvrstnim prostorom ni značilnih razlik v pestrosti in aktivnosti mikrobnne združbe. Bakterijska in glivna združba tal so se v vseh vinogradih, razen v vinogradu EKO10, na okoljske dejavnike odzivale različno, pri čemer je bila bakterijska združba na njih verjetno bolj občutljiva.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.26:631.46:634.8(043.2)
CX microbial ecology/organic vineyard/soil microbial community/
microbial diversity/microbial activity/ARISA/FDA
AU CESAR, Tjaša
AA LIKAR, Matevž (supervisor)/STRES Blaž (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2016
TI ANALYSIS OF BACTERIAL AND FUNGAL COMMUNITIES IN SOIL OF
ORGANIC VINEYARDS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XII, 59, [5] str., p., 11 tab., 13 fig., 4 ann., 118 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We studied the impact of different chemical and physical soil factors on diversity,
structure and activity of bacterial and fungal communities in vineyard soil. Soil
microorganisms within 15 cm of soil depth were screened from three organic
vineyards, ages 3 (EKO3), 10 (EKO10) and 35 (EKO35) and from the 35 years old
conventional vineyard (KON), all in the Vipava valley (Šempas). EKO vineyards
and a vineyard KON were distinguished from each other in soil texture and pH.
These two factors had presumably the largest impact on the structure of microbial
communities in soil, as the soil microbial communities in vineyards EKO were well
separated from the vineyard KON by statistical analysis DAPC. The same analysis
also separated soil microbial communities in the vineyard EKO3, which soil was
tilled at grapevine planting and not fully covered with plants at sampling, from soil
communities in older ecological vineyards with permanent vegetation cover. The
lowest microbial activity was also measured for soil in EKO3. In our opinion, the
activity and structure of microbial communities in EKO3 was affected by lower
content of organic matter and available phosphorus. A soil sample with the highest
microbial diversity, which was estimated by Shannon index, belonged to the
vineyard EKO35 and KON, and a sample with the lowest index to vineyard
EKO10. We have also observed high variability in diversity indices within
vineyard, but no significant differences in soil microbial diversity and activity
between row and inter row space. In all vineyards, except in the vineyard EKO10,
bacterial and fungal soil communities responded differently on environmental
factors, whereby bacterial communities were probably more sensitive to it than
fungal.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJSAVE IN SIMBOLI	X
KAZALO PRILOG	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VINOGRADNIŠTVO NA SLOVENSKEM	3
2.1.1 Vipavska dolina.....	3
2.2 KONVENCIONALNO IN EKOLOŠKO VINOGRADNIŠTVO	4
2.2.1 Konvencionalno vinogradništvo	4
2.2.2 Ekološko vinogradništvo	4
2.3 ZNAČILNOSTI TAL	6
2.4 MIKROORGANIZMI V TLEH.....	6
2.4.1 Bakterije.....	7
2.4.2 Glive	8
2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na strukturo, pestrost in aktivnost mikrobne združbe v tleh	9
2.4.3.1 Okoljski pogoji.....	9
2.4.3.2 Talne lastnosti	9
2.4.3.3 Oskrba tal.....	10
2.4.3.4 Gnojila	10
2.4.3.5 Fitofarmacevtska sredstva.....	11
2.5 METODE ZA DOLOČITEV STRUKTURE IN PESTROSTI MIKROBNE ZDRUŽBE	12
2.5.1 Metoda ARISA.....	12
2.6 DOLOČITEV AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE S FDA.....	14
3 MATERIAL IN METODE	15

3.1 MATERIAL	15
3.2 OPIS OBRAVNAVANIH VINOGRADOV IN VZORČENJE TAL	17
3.3 DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL	20
3.3.1 Določanje tekture tal	20
3.3.2 Določanje aktivne in potencialne kislosti tal	20
3.3.3 Določanje vsebnosti vode v tleh	21
3.3.4 Določanje skupne organske snovi v tleh	21
3.3.5 Določanje vsebnosti rastlinam dostopnega fosforja ($\text{PO}_4\text{-P}$)	21
3.3.6 Določanje skupne vsebnosti kovin v tleh	22
3.4 EKSTRAKCIJA DNA	22
3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA	23
3.6 IZVEDBA METODE ARISA	23
3.6.1 Verižna reakcija s polimerazo	23
3.6.2 Ločevanje fluorescentno označenih ITS regij s kapilarno elektroforezo	25
3.6.3 Analiza rezultatov ARISA	25
3.6.3.1 Shannonov indeks pestrosti	25
3.6.3.2 perMANOVA in beta pestrost	26
3.6.3.3 DAPC	26
3.6.3.4 Analiza uspešnosti razlikovanja med vinogradi z DAPC	27
3.6.3.5 Prokrustova analiza	27
3.6.3.6 Mantelov test	27
3.7 DOLOČANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCIN DIACETATOM	28
4 REZULTATI	30
4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL	30
4.1.1 Tekstura tal	30
4.1.2 pH tal	30
4.1.3 Vsebnost vode v tleh	30
4.1.4 Organska snov v tleh	30
4.1.5 Rastlinam dostopne vsebnosti fosforja ($\text{PO}_4\text{-P}$) v tleh	31
4.1.6 Skupna vsebnost kovin v tleh	31
4.2 KONCENTRACIJA IN ČISTOST IZOLIRANE DNA	32
4.3 DOLŽINA FRAGMENTOV ITS REGIJ	33
4.4 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE ZNOTRAJ VINOGRADOV	33
4.4.1 Pestrost glivne združbe	33

4.4.2 Pestrost bakterijske združbe	34
4.5 PRIMERJAVA PESTROSTI MIKROBNE ZDRUŽBE MED VINOGRADI	35
 4.5.1 Primerjava pestrosti mikrobne združbe tal v vrsti in prostoru med vrstami.....	36
4.6 PRIMERJAVA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE MED VINOGRADI....	37
 4.6.1 Struktura glivne združbe.....	37
 4.6.2 Struktura bakterijske združbe	38
 4.6.3 Uspešnost analize DAPC.....	39
4.6.3.1 Glivna združba	39
4.6.3.2 Bakterijska združba	40
 4.6.4 Primerjava strukture mikrobne združbe glede na lokacijo vinograda	40
4.7 PRIMERJAVA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE	42
4.8 AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE V TLEH	43
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
 5.1 RAZPRAVA	44
 5.1.1 Primerjava bakterijske in glivne združbe v tleh znotraj vinograda	44
 5.1.2 Primerjava bakterijske in glivne združbe tal glede na vrsto in medvrstni prostor v vinogradu.....	44
 5.1.3 Primerjava bakterijske in glivne združbe tal med vinogradi.....	45
 5.1.4 Primerjava strukture glivne združbe z bakterijsko združbo v tleh vinogradov.....	47
 5.2 SKLEPI.....	48
6 POVZETEK	49
7 VIRI	50
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opis obravnavanih vinogradov EKO3, EKO10, EKO35 in KON (način pridelave grozdja, starost vinograda, vrsta in količina gnojila, pogostost gnojenja, vrsta fitofarmacevtskih sredstev (FFS), število škropljenj s FFS, obdelava tal).....	17
Preglednica 2: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje glivne DNA.....	24
Preglednica 3: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje bakterijske DNA.....	24
Preglednica 4: Skupne vsebnosti kovin v tleh obravnavanih vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in KON (K-kalij, Ca-kalcij, Cr-krom, Mn-mangan, Fe-železo, Ni-nikelj, Cu-baker, Zn-cink, Pb-svinec). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako (n = 35). Različne črke prikazujejo lastnosti, ki so statistično značilno različne ($p < 0,05$).....	32
Preglednica 5: Analiza perMANOVA za glivno in bakterijsko združbo glede na vinograd (število permutacij = 999).....	35
Preglednica 6: Test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin glivne in bakterijske združbe glede na vinograd (število permutacij = 999).....	36
Preglednica 7: Analiza perMANOVA glivne in bakterijske združbe glede na položaj znotraj vinograda (vrsta ali medvrstni prostor) (število permutacij = 999).....	36
Preglednica 8: Test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin glivne in bakterijske združbe glede na položaj znotraj vinograda (vrsta ali medvrstni prostor) (število permutacij = 999).....	37
Preglednica 9: Stopnja uspešnosti (%) pravilne razvrstitve neznanih vzorcev glivnih združb v ustrezen vinograd na podlagi diskriminantnih funkcij pridobljenih z metodo diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC)	40
Preglednica 10: Stopnja uspešnosti (%) pravilne razvrstitve neznanih vzorcev bakterijskih združb v ustrezen vinograd na podlagi diskriminantnih funkcij pridobljenih z metodo diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC)	40
Preglednica 11: Rezultati Mantelovega testa distančnih matrik (Bray-Curtisov indeks) med glivno in bakterijsko združbo za posamezen vinograd (št. permutacij = 1000).....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema analize ARISA in RISA; izolacija skupne DNA iz vzorca (1), pomnoževanje ITS regij bakterij (2) in gliv (3) s PCR, končni prikaz rezultatov v obliki elektroferograma (4) ali na gelu (5) (povzeto po Community Fingerprinting, 2012).....	13
Slika 2: Hidroliza fluorescein diacetata (FDA) do fluoresceina (Green in sod., 2006).....	14
Slika 3: Satelitski posnetek mesta vzorčenja vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in vinograda KON (Google Maps, 2016).....	18
Slika 4: Shema vzorčenja	19
Slika 5: Umeritvena krivulja za izračun mikrobne aktivnosti s fluorescein diacetatom.	29
Slika 6: Lastnosti tal obravnavanih vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in KON glede na vzorčeno mesto v vinogradu (vrsta/medvrsta): (A) delež vsebnosti vode, (B) pH, (C) delež organske snovi, (D) koncentracija PO ₄ -P. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n = 35). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike (p < 0,05).	31
Slika 7: Toplotni graf indekov pestrosti Shannon (H) za glivno združbo znotraj posameznih vinogradov: a) vinograd EKO10, b) vinograd EKO35, c) vinograd EKO3, d) vinograd KON. Osi predstavljajo fizično razdaljo (m) , merjeno od vzorca 1, s koordinatami (0,0).....	34
Slika 8: Toplotni graf indekov pestrosti Shannon za bakterijsko združbo znotraj posameznih vinogradov: a) vinograd EKO10, b) vinograd EKO35, c) vinograd EKO3, d) vinograd KON. Osi predstavljajo fizično razdaljo (m) , merjeno od vzorca 1, s koordinatami (0,0).....	35
Slika 9: Raztreseni graf diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC) za glivno združbo s centroidi vsakega vinograda.	38
Slika 10: Raztreseni graf diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC) za bakterijsko združbo s centroidi vsakega vinograda.	39
Slika 11: Ordinacijski diagram (RDA) Prokrustove analize vpliva fizične razdalje med vinogradi na strukturo glivne združbe. Črne pike ponazarjajo ordinacijo glivne združbe, konice puščic ordinacijo fizičnih razdalj med vinogradi in dolžina puščic velikost prokrustovih ostankov.	41
Slika 12: Ordinacijski diagram (RDA) Prokrustove analize vpliva fizične razdalje med vinogradi na strukturo bakterijske združbe. Črne pike ponazarjajo ordinacijo bakterijske združbe, konice puščic ordinacijo fizičnih razdalj med vinogradi in dolžina puščic velikost prokrustovih ostankov.	42
Slika 13: Koncentracije fluoresceina ($\mu\text{g/g}$) v vzorcih tal glede na celoten vinograd, vrsto, in medvrstni prostor. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike (p < 0,05). Prikazana so povprečja in standardne napake.	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

6-FAM	fluorescentno barvilo 6-karboskifluorescein
AM	arbuskularno mikorizne glive (angl. Arbuscular Mychorizae)
ANOVA	analiza variance (angl. Analysis of Variance)
ARISA	avtomatizirana analiza notranje prepisane regije ribosomske DNA (angl. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
C ₆ H ₈ O ₆	askorbinska kislina
Ca(OH) ₂	kalcijev hidroksid, gašeno apno
CO ₂	ogljikov dioksid
CuSO ₄	bakrov sulfat
DA	diskriminantna analiza (angl. Discriminant Analysis)
DAPC	diskriminatna analiza glavnih komponent (angl. Discriminant Analysis of Principal Components)
DF	diskriminantna funkcija (angl. Discriminant Function)
DGGE	gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (angl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat (angl. Deoxyribonucleotid Triphosphate)
DSE	temno septirani endofiti (angl. Dark Septate Endophyte)
EKO3	ekološki vinograd, 3 leta v ekološki obdelavi
EKO10	ekološki vinograd, 10 let v ekološki obdelavi
EKO35	ekološki vinograd, 35 let v ekološki obdelavi
FDA	fluorescein diacetat
H	Shannonov indeks pestrosti
ITS	notranje prepisane regije ribosomske DNA (angl. Internal Transcribed Spacer)
JOE	fluorescentno barvilo 6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifluorescein
K ₂ HPO ₄	dikalijev fosfat
K(SbO) x C ₄ H ₄ O ₆ x 1/2H ₂ O	antimon kalijev tartrat
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat
KON	konvencionalen vinograd, star 35 let
MgCl ₂	magnezijev klorid
N ₂	dušik
NH ₃	amonijak

NH_4^+	amonijev ion
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	amonijev heptamolibdat
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	natrijev pirofosfat
NaHCO_3	natrijev hidrogenkarbonat
PCA	analiza glavnih komponent (angl. Principal Component Analysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
perMANOVA	permutacijska multivariatna analiza varianc (angl. Permutational Multivariate Analysis of Variance)
$\text{PO}_4\text{-P}$	dostopni fosfat
RISA	analiza notranje prepisane regije ribosomske DNA (angl. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)
RDA	redundančna analiza (angl. Redundancy Analysis)
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kislina (angl. Ribosomal Deoxyribonucleic Acid)
<i>rrn</i>	genomski lokus genov, ki kodirajo ribosomske ribonukleinske kislino
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (angl. Single-Strand Conformation Polymorphism)
TBE	tris borat EDTA
T-RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (angl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
XRFS	rentgenska fluorescenčna spektrometrija (angl. X-ray Fluorescence Spectrometry)

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Fizikalno-kemijske lastnosti tal preučevanih vinogradov s povprečnimi vrednostmi in standardno napako (n = 35).

PRILOGA B: Gelska elektroforeze pomnožkov ITS regij ARISA PCR glivnih talnih združb vinograda EKO10 (vzorci združb Z30, Z31, Z32, Z33, Z34, Z35 in negativna kontrola).

PRILOGA C: Gelska elektroforeze nekaterih pomnožkov ITS regij ARISA PCR bakterijskih talnih združb v vinogradu KON (vzorci Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7).

PRILOGA D: Preglednica enosmerne analize varianc (ANOVA) s post hoc testom Tukey HSD mikrobne aktivnosti med posameznimi vinograji.

1 UVOD

Tla so najbolj heterogen ekosistem, tako biološko, fizikalno kot kemijsko. Raziskovalci predvidevajo, da je v enem gramu tal več kot 10^4 različnih vrst bakterij in več kot 10^6 različnih vrst gliv (Fierer in sod., 2007). Glive in bakterije so tudi najstevilčnejši organizmi v tleh, za katere je značilno, da vertikalno (v globino) in horizontalno niso razporejeni homogeno, temveč jih je na nekaterih mestih več, nekje manj. Razlog za to so različni biološki in fizikalni dejavniki, kot je dostopnost hranil, vsebnost vode v tleh, pH, izločki rastlinskih korenin, toksične spojine, plenilci in številni drugi. Pričakovali bi lahko, da bi bili združbi mikroorganizmov, ki sta bili vzorčeni blizu skupaj, bolj podobni, kakor združbi iz bolj oddaljenih vzorčenih mest. Vendar pa temu ni nujno tako, saj je lahko v sestavi mikrobnih združb, ki so med seboj oddaljeni le nekaj centimetrov, več razlik, kakor med populacijami oddaljenih več kilometrov. Za razporeditev mikrobnih združb so torej ključni okoljski pogoji (McArthur, 2006).

Mikroorganizmi v tleh skrbijo za kroženje hranil, razgrajevanje organske snovi, urejanje strukture tal in razgradnjo potencialno škodljivih učinkovin. Pomembni so tudi za uspešno rast in razvoj rastlin, saj mikroorganizmi, kot so mikorizne glive omogočajo rastlinam lažji dostop do hranil in vode ter jih varujejo pred patogenimi mikroorganizmi. Pomembne so tudi dušik fiksirajoče bakterije, ki dušik iz atmosfere pretvorijo v amonij, ki ga rastline vgradijo v svojo biomaso. To je še posebno pomembno v ekološkem kmetijstvu, kjer je prepovedano gnojenje z dušikovimi mineralnimi gnojili in so dušik fiksirajoče bakterije pomemben vir dušika za rastline.

Poleg že naštetih dejavnikov na mikrobeno združbo v tleh vplivajo tudi antropogeni dejavniki, ki so prisotni v kmetijstvu, kot so gnojenje, mehanska obdelava tal, zatravljenje površin in škropljenje s fitofarmacevtskimi sredstvi. Osredotočili smo se na bakterijske in glivne združbe v tleh ekoloških vinogradov. Vinogradništvo je namreč v Sloveniji zelo priljubljeno, pri čemer je vedno več vinogradov z ekološkim načinom pridelave grozdja. Velik tradicionalen in gospodarski pomen ima vinogradništvo tudi v vinorodnem okolišu Vipavske doline, ki je po površini vinogradov na drugem mestu v Sloveniji.

1.1 NAMEN DELA

Naš namen dela je bil preučiti strukturo, pestrost in aktivnost mikrobne združbe tal v vinogradih z ekološko in konvencionalno pridelavo grozdja. Osredotočili smo se na glivno in bakterijsko združbo, ki so v tleh od ostalih mikroorganizmov najpogosteje prisotni. Strukturo in pestrost mikrobne združbe smo določili z metodo ARISA, v kateri smo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi v PCR reakciji pomnožil ITS regije DNA glivnih in bakterijskih mikroorganizmov. Mikrobnou aktivnost smo analizirali z uporabo reagenta fluorescein diacetat, ki ob prisotnosti encimov hidrolizira do fluoresceina in pri tem spremeni barvo.

Zanimalo nas je ali se lastnosti talne mikrobne združbe razlikujejo glede na lokacijo znotraj posameznega vinograda in kakšne so razlike v mikrobeni združbi in kemijsko-fizikalnih lastnostih med vinograji, ki so različno stari.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- 1.) Pestrost bakterijske in glivne združbe tal znotraj vinogradov bo zelo variabilna.
- 2.) Pestrost in aktivnost mikrobne združbe se bo v tleh pod vinsko trto (v vrsti trsov) razlikovala od pestrosti v tleh med vrstami trsov (v medvrstnem prostoru).
- 3.) Na strukturo bakterijske in mikrobne združbe vpliva starost vinograda.
- 4.) Pestrost bakterijske in glivne združbe se na okoljske pogoje odziva podobno.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINOGRADNIŠTVO NA SLOVENSKEM

Pridelava grozdja in vina je bila že od nekdaj pomembna kmetijska dejavnost. Prvi nasadi prave vinske trte (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) so se pojavili že v 4. tisočletju pr.n.št. v Egiptu in Mezopotamiji in nato še v Grčiji (Domine, 2003). Od tam se je vinska trta z Etruščani razširila na območje Rima in nato s pomočjo Rimljjanov poselila celo Evropo (Callec, 2004). Tako se je vinogradništvo v 4. stoletju pr.n.št. razširilo tudi na današnje slovensko ozemlje (Cunja, 1995).

V Sloveniji so vinogradniki po zadnjem popisu vinogradov iz leta 2015 obdelovali 15.688 ha vinogradov, kar predstavlja 3,4 % vseh kmetijskih zemljišč v uporabi. Obseg obdelanih vinogradov je vsako leto manjši in se je tako v zadnjih 10 letih zmanjšal za 4,9 % (Pridelava ..., 2016). Še posebno zaskrbljujoče je, da te površine niso več v kmetijski obdelavi, ampak se zaraščajo in opuščajo. Vedno manj je tudi obnovljenih vinogradov, zaradi česar prevladujejo starejši vinogradi, ki so stari več kot 10 let (Površina vinogradov ..., 2016).

2.1.1 Vipavska dolina

Vipavska dolina leži na zahodu Slovenije, med Trnovskim gozdom in planoto Nanos ter Krasom (Hrvatin, 2013). Spada v vinorodno deželo Primorska in je drugi največji vinorodni okoliš v Sloveniji po površini vinogradov, kjer so leta 2015 obdelali 2244,7 ha vinogradov (Površina, število ..., 2016). Zanjo je značilno submediteransko podnebje, z zmerno vročimi poletji in milimi zimami. Povprečna letna temperatura je 12 °C. Spada med bolj namočene predele Slovenije, saj v povprečju dobi približno 1500 mm padavin na leto. Glede na mesečno razporeditev padavin, jih je največ spomladi in jeseni, najmanj pa februarja in julija (Povzetki ..., 2014). Za Vipavsko dolino je značilna burja, to je močan, hladen in večinoma suh severovzhodni veter, ki pa se menja s toplim jugozahodnim vetrom, mornikom (Podnebje, 2005). Vipavska dolina je deležna veliko sončnih žarkov, saj ima v povprečju preko 2200 ur sončnega obsevanja, kar je nad slovenskim povprečjem (Povzetki ..., 2014). Vinogradniki največ pridelajo rdečega grozdja sorte 'Merlot', pa tudi 'Cabernet sauvignon' in 'Barbera'. Med belimi prevladuje sorte 'Rebula', 'Beli Pinot' in 'Sauvignon'. Posebnost Vipavske doline sta avtohtoni sorti 'Pinela' in 'Zelen'. Vinogradi so v veliki večini (65 %) urejeni v terase. Delež ozelenjenih vinogradov v Vipavski dolini se je v zadnjem desetletju zelo povečal, a je kljub temu delež še vedno med manjšimi v Sloveniji, kjer je okrog 80 % vinogradniških tal zatravljenih, v Vipavski dolini pa le okrog 55 % (Mavrič Štrukelj in sod., 2012).

2.2 KONVENCIONALNO IN EKOLOŠKO VINOGRADNIŠTVO

Najbolj razširjen način pridelave grozdja je konvencionalno vinogradništvo, vedno več vinogradnikov pa se odloča za ekološko pridelavo, kar kažejo tudi podatki statističnega urada Republike Slovenije, saj se je od leta 2006 do leta 2015 površina ekoloških vinogradov povečala za 4 krat (Analiza ..., 2016).

2.2.1 Konvencionalno vinogradništvo

Za konvencionalno vinogradništvo je značilna intenzivna uporaba vseh kemično sintetiziranih pripravkov za varstvo vinske trte ter za zatiranje plevela, ki so na seznamu registriranih fitofarmacevtskih sredstev (FFS) (Seznam registriranih ..., 2016). Za zaščito in zdravljenje glivnih okužb vinske trte se poleg bakrovih in žveplovih pripravkov, uporabljam FFS, katerih pogoste aktivne snovi so ditiokarbamat, triazol in morfolin. Za zaščito pred škodljivimi žuželkami je dovoljena uporaba sintetičnih insekticidov (npr. piretroidi, organski fosforjevi estri, neonikotinoidi), za zatiranje plevela v vinogradu se lahko uporabljam herbicidi, med katerimi prevladuje aktivna snov glifosat. Vse naštete učinkovine, razen bakrovih in žveplovih pripravkov, so v ekološkem vinogradništvu prepovedane (Seznam FFS ..., 2016; Seznam registriranih ..., 2016).

Za gnojenje rastlin se lahko uporabljam vsa mineralna gnojila. To so spojine, ki se jih dodaja tlom ali rastlinam, z namenom izboljšanja rasti, povečanja pridelka, izboljšanje kakovosti pridelka ali rodovitnosti tal in so proizvedena industrijsko (Gnojila, 2016). Med njimi je dovoljena uporaba lahko topnih mineralnih gnojil, kot so dušikova, ki so v ekološki pridelavi prepovedana (Uredba sveta ..., 2007).

2.2.2 Ekološko vinogradništvo

Ekološko vinogradništvo je način trajnostnega kmetijstva, ki temelji na ravnotesju med človekom, živalmi, rastlinami in tlemi. Kot že zgoraj omenjeno, je za zaščito vinske trte prepovedana uporaba kemično sintetiziranih FFS in lahko topnih mineralnih gnojil, poleg tega tudi gensko spremenjenih organizmov ter proizvodov iz takih organizmov (Integrirana ..., 2016).

V primeru glivne okužbe vinske trte lahko ekološki vinogradniki uporabijo fitofarmacevtska sredstva, ki so na seznamu FFS dovoljenih v ekološki pridelavi (Seznam FFS ..., 2016). Tako kot v konvencionalnem vinogradništvu se najpogosteje uporabljam bakrovi in žveplovi pripravki, ki so v vinogradništvu prisotni že od konca 19. stoletja (Duplay in sod. 2014). Uporaba bakrovih pripravkov je skozi leta naraščala, kar se sedaj kaže v akumulaciji bakra v tleh vinogradov. Tako so v tleh vinogradov v Franciji, občini

Bordeaux, izmerili kar 800 mg/kg skupnega bakra (Brun in sod., 1998). V mediteranskem območju je izmerjena koncentracija nižja, in sicer 71-160 mg/kg (Rusjan in sod., 2007), kar je še vedno višje od dovoljene mejne vrednosti, ki je 60 mg/kg suhih tal (Uredba o mejnih ..., 1996). Največ bakra so našli v tleh pod trtami in najmanj v medvrstnem prostoru vinograda (Mackie in sod., 2013). Baker je v tleh slabo topen, zaradi česar ga je največ v zgornjih delih tal in se z globino njegova koncentracija znižuje (Weingerl, 2010; Duplay in sod., 2014; Ninkov in sod., 2014). Kljub temu obstaja možnost, da se s padavinami ali erozijo izpere v globlje predele tal in kontaminira površinske vode (Duplay in sod., 2014). V tleh je prisotna tudi frakcija mobilnega bakra, ki je dostopna organizmom. Taka oblika bakra v visokih koncentracijah lahko povzroči stres na makrofavno, mikroorganizme, encimsko aktivnost in postane fitotoksična (Hinojosa in sod., 2010).

Pri uporabi žveplovih pripravkov so žveplova močljiva zrnca učinkovita le 5-6 dni. Zaradi tega je v ekološkem vinogradništvu potrebno škropiti pogosteje kot v konvencionalnem, kjer imajo sintetična fitofarmacevtska sredstva daljšo karenco (Gustav in Miklavc, 2001). Zaradi kopičenja bakra in slabšega delovanja žvepla, se pojavljajo zahteve za zamenjavo tovrstnih škropiv z novimi formulacijami z nižjo vsebnostjo bakra ali z drugimi sredstvi. Kot fungicid se zato uporabljam tudi pripravki iz mikroorganizmov, kot sta glivi *Aureobasidium pullulans* in *Ampelomyces quisqualis*. Učinkovit fungicid je tudi kalijev hidrogenkarbonat. Med insekticidi je dovoljena uporaba FFS, ki temelji na podlagi rastlinski izločkov (piretrin, azadirahitin), mineralov (kalijeve soli maščobnih kislin), olj (olje navadne ogrščice, parafinsko olje) ter mikroorganizmov (bakterija *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, gliva *Beauveria bassiana*, virus insekta *Cydia pomonella*) (Seznam FFS,..., 2016). Za krepitev in zaščito rastlin se uporabljam tudi sredstva, ki niso zapisana v registru FFS. To je na primer ekstrakt koromača in njivske preslice (Žežlina in sod., 2010).

Za gnojenje rastlin in izboljšanje tal se v ekološkem kmetijstvu daje prednost organskim gnojilom (hlevski gnoj) iz ekološke pridelave v potrebnem obsegu, ki je določen na podlagi kemijsko-fizikalnih analiz tal in gnojilnega načrta. Prepovedana je uporaba lahko topnih mineralnih gnojil, kot so dušikova gnojila. V primeru, če z organskimi gnojili, biodinamični pripravki in oskrbo tal ni mogoče zadovoljiti potreb rastlin po hranilih, se lahko uporabijo težko topna mineralna gnojila (npr. surovi fosfati, kalijeva sol, kalcijev sulfat) in ostali dodatki, ki so zapisani v Prilogi I Uredbe komisije (ES) št. 889 (2008).

2.3 ZNAČILNOSTI TAL

Tla so preperela plast, ki pokriva zemeljsko površino. So ena izmed najbolj mikrobnost pestrih okolij na Zemlji, saj so neizmerno fizikalno, kemijsko in biološko heterogena. Vsebujejo številne mikrohabitante z različnimi fizikalno-kemijskimi gradienti in okoljskimi pogoji, ki omogočajo rast različnim talnim organizmom (Torsvik in Øvreås, 2002). Sestavljena so iz anorganske mineralne snovi, zraka in vode ter iz organske snovi. Glede na velikost mineralnih delcev, so tla razdeljena v teksturne razrede. Po ameriški teksturni klasifikaciji poznamo 3 osnovne skupine delcev: delce premera med 0,1 in 2 mm (pesek), delce med 0,002 mm in 0,1 mm (melj) ter delce, ki so manjši od 0,002 mm (glina) (Maier in Pepper, 2009). Med organsko snov spada živa biomasa (živali, mikroorganizmi in korenine rastlin), mrtve in razgradljive organske snovi (npr. ogljikovi hidrati, lipidi, proteini, lignin) ter stabilne organske spojine humusa (huminske kisline, fulvo kisline, humin). Humus je heterogena, zelo stabilna, visokomolekularna organska snov, ki nastaja s humifikacijo iz razgradljive odmrle rastlinske biomase in mikrobnih izločkov. V tleh poteka tudi mineralizacija, pri čemer se iz biomase sproščajo mineralne snovi, CO_2 , H_2O in amonij. Ključni pri razgradnji in mineralizaciji organske snovi so talni mikroorganizmi, ki organsko snov uporabljajo kot vir energije in hranil (Maier in Pepper, 2009).

2.4 MIKROORGANIZMI V TLEH

V tleh največji delež žive biomase predstavljajo mikroorganizmi. Delimo jih na evkarionte in prokarionte. Med evkarionte spadajo glive, mikroalge in praživali, med prokarionte pa bakterije in arheje. Kot vir ogljika in energije za rast lahko izkoriščajo organske snovi (kemoheterotrofi), CO_2 in anorganske snovi (kemoavtotrofi) ali CO_2 in svetloba (fotoavtotrofi). Mikroorganizmi so sposobni preživeti v aerobnih in anaerobnih pogojih. Ker imajo izredno raznolik metabolizem in so prilagojeni na izrabo različnih virov energije, jih lahko najdemo v vseh nišah tal, ki omogočajo življenje (Madigan in sod., 2009). V okolju niso razporejeni naključno in enakomerno, ampak jih najdemo strukturirane v skupine, v porah mikroagregatov, velikosti 2-20 μm . Pore mikroorganizmom zagotavljajo dostop do vode, hranil in kisika ter jim nudijo zaščito pred predatorji (Torsvik in Øvreås, 2002). Njihova prostorska porazdelitev je zelo heterogena in je posledica raznolikih lastnosti tal, obdelave tal in podnebnih sprememb. Tako je lahko v enem vzorcu tal enako ali celo več razlik v strukturi mikrobne združbe, kot jih je v tleh, ki so narazen več kilometrov (Frey, 2015).

V tleh so mikroorganizmi zelo pomembni, ker omogočajo kroženje hranil in mineralizacijo organske snovi v oblike, ki so dostopne rastlinam. Zato je pomembno, da je poleg ustrezne količine hranil v tleh tudi veliko različnih mikroorganizmov, saj brez njih, rastlina slabše privzema hranila (Madigan in sod., 2009). Sodelujejo tudi pri nastajanju strukture tal.

Večina (80-90 %) jih je pritrjenih na površine delcev tal. Med rastjo proizvajajo eksopolisaharide, ki skupaj zlepijo sosednje delce tal v strukturne mikroaggregate, s čimer tla postanejo bolj prepustna in rahla (Maier in Pepper, 2009).

2.4.1 Bakterije

Najstevilčnejši talni organizmi so bakterije, in sicer je v enem gramu tal 10^8 - 10^9 bakterij oziroma verjetno še več, saj vseh ne znamo gojiti. Prevladajo predvsem aerobne heterotrofne bakterije. Najpogosteje bakterije (10^6 - 10^8 celic/gram tal), so filamentozne bakterije iz debla Actinobacteria, ki jih imenujemo aktinomicete. Morfološko so, zaradi celic, ki se razvijajo v filamente in hife, podobne miceliju gliv, zaradi česar jih velikokrat obravnavajo kot posebna skupina bakterij. Značilnost aktinomicet je sposobnost razgradnje kompleksnih organskih molekul, kot so hitin, celuloza in hemiceluloza. Zaradi njihovega produkta geosmin ima zemlja svoj karakteristični vonj. Eden izmed glavnih rodov aktinomicet je *Streptomyces*. Poleg aktinomicet so v tleh med številčnejšimi prisotne tudi bakterije iz rodu *Arthrobacter*, *Pseudomonas* in *Bacillus* (Maier in Pepper, 2009).

Bakterije v tleh skrbijo za razgradnjo odmrle organske snovi in za fiksacijo dušika iz zraka. Prav slednje je v ekološkem kmetijstvu zelo pomembno, saj je prepovedano vnašanje dušičnih gnojil. Več kot 100 različnih vrst prostoživečih bakterij je sposobnih dušik iz zraka (N_2) pretvoriti v amonij (NH_4^+). To sta na primer aerobni *Azotobacter* in anaerobni *Clostridium*. Najbolj učinkovite so simbiotske bakterije *Rhizobium*, ki živijo v sožitju v rizosferi (prostor ob koreninah) rastlin metuljnic. V 1 letu lahko iz zraka fiksirajo kar 200-300 kg/ha dušika. Simbioza *Rhizobium* – metuljnica poteka v posebnih tvorbah v koreninskih celicah, nodulih, ki nastanejo po vstopu bakterije v korenino. Tako lahko rastlina direktno privzame amonij in ga vgradi v svoje celice (Maier, 2009).

Pri mikrobiološki razgradnji organske snovi nastanejo sladkorji, organske kisline in preproste organske spojine. Te lahko bakterije vključijo v celične stene ali pa se z nadaljnjo degradacijo sprostijo kot CO_2 , H_2O , NH_3 ali kot druge anorganske snovi. CO_2 nato rastline s fotosintezo fiksirajo in ogljik vgradijo v svojo biomaso. Pri tem med drugimi sodelujejo nitrifikatorji, ki amonij oksidirajo do biološko dostopnega nitrata, metanotrofi, ki oksidirajo metan in bakterije, ki oksidirajo žveplo (*Thiobacillus denitrificans*) ali železo (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) (Maier, 2009).

2.4.2 Glive

Poleg bakterij se v tleh nahajajo tudi aerobne glive, in sicer je v enem gramu tal 10^5 - 10^6 celic. Kljub manjšem številu, glive zaradi svoje velikosti (velikost hife 2-10 µm) običajno predstavljajo večji delež skupne mikrobne biomase v tleh. Kvasovke, ki imajo anaerobni metabolizem so v tleh prisotne v manjšem številu, in sicer do 10^3 celic v enem gramu tal. Glive so v tleh zelo pomembne zaradi kroženja hrani in razgradnje organske snovi. Ena izmed najbolj pogostih rodov v tleh sta *Aspergillus* in *Penicillium*, ki sta tudi pomembna pri tvorjenju strukture tal, saj glive s hifami fizično ujamejo delce tal. Poleg razgradnje kompleksnih molekul, kot so lignin in celuloza, so glive sposobne tudi razgradnje onesnaževalcev. Take so glive bele trohnobe (*Phanerochaete crysosporium*). V tleh pa se najdejo tudi patogene glive rastlin, kot so *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. in *Rhizoctonia* spp. (Maier in Pepper, 2009).

Najpomembnejše za rastline so mikorizne glive, ki so z rastlinami v mutualističnem odnosu, kar pomeni, da imata obe, gliva in rastlina od tega korist. Glive služijo kot podaljšek koreninskega sistema, s čimer rastlini pomagajo, da iz tal privzame čim več hrani, še posebno fosfor, ki je slabše dostopen. Glive tako lovijo hrani iz manj koncentriranih območij in jih z aktivnim transportom prenesejo do rastline. Služijo lahko tudi kot skladisce hrani. Rastlina glivo oskrbuje z ogljikovimi spojinami, večinoma s sladkorji. Mikorizne glive so postale endemične v skoraj vseh tleh in tvorijo obširne mreže glivnih hif, ki med seboj povezujejo rastline različnih vrst. Še več, isti koreninski sistem lahko okužijo glive različnih vrst. Poznamo številne vrste mikoriznih gliv. Ene izmed njih so arbuskularno mikorizne glive (AM) oziroma endomikorizne glive, ki se nahajajo v notranjosti rastlinskih korenin. Za njih so značilni vezikli in arbuskuli, ki sodelujejo pri shranjevanju in prenosu hrani med glivo in rastlino. Glavna skupina AM gliv so iz redu *Endogonales* (Maier in Pepper, 2009).

Pogoste prisotne mikorizne glive, ki živijo v različnih življenjskih okoljih, od arktičnih do tropskih, so temno septirani endofiti (angl. Dark Septate Endophyte; DSE). To so askomicetne glive, katerih hife se v koreninah razraščajo inter- in intracelularno, so septirane in vsebujejo temen pigment melanin. Temno obarvani so tudi mikrosklerociji, gosti prepleti gilvnih hif, ki jih DSE glive tvorijo v koreninskih celicah. Skupaj z ostalimi mikoriznimi glivami kolonizirajo različne vrste rastlin, tudi nemikorizne. Take rastline so sposobne večjega privzema hrani in vode, so bolj odporne na sušo ter visoke temperature. Poleg tega so DSE glive sposobne zaščititi rastline proti herbivorom in rastlinskim patogeni. Vseeno njihova vloga še vedno ni povsem razjasnjena, saj v nekaterih raziskavah pozitivnih učinkov na rastline niso opazili (Mandyam in Jumpponen, 2005).

AM glive imajo pomembno vlogo v vinogradu, saj številni prejmejo malo vode in so zasajeni na manj plodnih tleh (Schreiner, 2005). Inokulacija korenin vinske trte z AM

glivami je povezana s povečano rastjo (Linderman in Davis, 2001), toleranco na sušo in privzem hranil (Schreiner, 2005). Najpogosteje korenine trte kolonizirajo glice iz rodu *Glomus* (Likar in sod., 2013), pa tudi *Paraglomus/Archaeospora* in *Scutellospora* (Schreiner in Mihara, 2009).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na strukturo, pestrost in aktivnost mikrobne združbe v tleh

Sestava mikrobne združbe je v kompleksnem ekosistemu, kot so tla, zelo dinamična, saj tla zajemajo številne mikrohabitante z različnimi fizikalno-kemijskimi gradienti in okoljskimi pogoji, ki omogočajo življenje različnim vrstam mikroorganizmov. Dejavniki, ki vplivajo na sestavo mikrobne združbe in aktivnost so biotski in abiotski. Med biotske uvrščamo tekmovanje organizmov za hranilne snovi, med abiotske pa na primer pH, redoks potencial, dostopnost vode, temperaturo, vsebnost organske snovi in prisotnost težkih kovin (Maier in Pepper, 2009). Med abiotskimi ima velik vpliv na mikrobno združbo tudi velikost talnih delcev, na katere so pritrjene bakterije (Sessitsch in sod., 2001).

2.4.3.1 Okoljski pogoji

Vpliv okoljskih pogojev, kot sta temperatura in vsebnost vode, lahko spremljamo preko letnih časov. Smit in sod. (2001) je ugotovil, da se bakterijska biomasa med letom ne spremeni signifikantno. Dokazal pa je zmanjšan delež hitro-rastočih bakterij v zimskem času in povečan v poletnem času. Vpliv temperature na bakterijsko in glivno združbo v vinogradniških tleh avtor študije Corneo in sod. (2013) ni opazil, razlike so bile le v številnosti mikroorganizmov, in sicer jih je bilo manj pozimi, ko so bile temperature tal okoli 0 °C. V tleh z večjo količino vode, je povečan delež po Gramu pozitivnih in sulfat reducirajočih bakterij in znižan delež po Gramu negativnih bakterij in gliv (Drenovsky in sod., 2010).

2.4.3.2 Talne lastnosti

Velikost talnih delcev, ki določajo teksturo tal, ima velik vpliv na dostopnost vode in hranil ter posledično na mikrobno združbo (Lauber in sod., 2008). Večja mikrobna pestrost je v tleh z majhnimi delci (melj in glina), kot pa v tleh z večjimi delci (pesek). Tako je večina mikrobne združbe specifična glede na velikost delcev. V tleh z največjim deležem melja in gline prevladujejo bakterije razreda Holophaga, Acidobacterium in Prosthecobacter, v peščenih tleh pa bakterije iz razreda Alphaproteobacteria (Sessitsch in sod., 2001).

Vsak mikroorganizem najbolje raste v določenem območju pH. Organizmi, ki optimalno rastejo pri nizkih pH (pod 6) so acidofili, tisti, ki rastejo pri pH nad 9 pa alkalofili (Madigan in sod., 2009). Glive so bolj tolerantne na spremembe pH kot bakterije, saj lahko rastejo v širšem območju vrednosti pH (Rousk in sod., 2010). Na mikroorganizme lahko pH vpliva tudi indirektno, preko drugih abiotiskih dejavnikov v tleh, kot je dostopnost organskega ogljika, hranil in težkih kovin (Rousk in sod., 2009).

2.4.3.3 Oskrba tal

V vinogradništvu se za boljšo rodovitnost in zračnost tal uporablja mehanično obdelovanje tal (prekopavanje, rahljanje tal), trajna ozelenitev (setev travno-deteljnih mešanic ali naravna ozelenitev), začasna ozelenitev (podorine) ali kombinacija naštetih (vsaka druga vrsta) (Tehnološka ..., 2013). Z mehanskim obdelovanjem se zgornje in spodnje plasti tal premešajo, zaradi česar se koncentracije ogljika razredčijo, kar lahko zmanjša aktivnost združbe in mineralizacijo organske snovi v obdelanih tleh (Kandeler in sod., 2005). Poleg tega so ugotovili, da mehansko obdelovanje povzroči prekinitev glivnih hif ter rasti rastlin (Evans in Miller, 1990). V obdelanih kmetijskih površinah prevladujejo predvsem po Gramu pozitivne bakterije, manj pa je gliv, kar še dodatno kaže na večjo občutljivost glivnih hif (Drenovsky in sod., 2010). Učinki dolgotrajne mehanske obdelave so lahko prisotni na sestavo mikrobne združbe tudi desetletja po opustitvi obdelave tal (Buckley in Schmidt, 2003).

Trajna in začasna ozelenitev tal preprečuje erozijo zaradi vode ali vetra, zmanjša potrebo po gnojenju (Ruiz-Colmenero in sod., 2013) in s tem tudi strošek oskrbe vinograda. Raziskave kažejo, da je v zatravljenih tleh mikrobna biomasa večja in struktura mikrobne združbe drugačna kakor v obdelovanih, pri čemer je mikrobna združba povezana z večjo vsebnostjo organskega ogljika v tleh (Rejec, 2016). V zatravljenih tleh je višja tudi aktivnost mikrobne združbe in številčnost bakterij in gliv (Moreno in sod., 2009; Mathew in sod., 2012). Podobne učinke ima zatravljenost tudi na pestrost AM gliv, ki živijo v simbiozi z rastlinami (Lumini in sod., 2010).

2.4.3.4 Gnojila

Vrsta in količina organskih substratov, ki jih vnesemo v tla kot gnojila, zelo vplivajo na številčnost mikrobnih skupin, pestrost in aktivnost. Dolgoročno organsko gnojenje namreč izboljša kakovost tal in s tem tudi poveča mikrobno aktivnost (Böhme in sod., 2005; Chu in sod., 2007; Freitas in sod., 2011) ter pestrost v tleh (Zhang in sod., 2012). Poveča se tudi mikrobna biomasa, medtem ko nanjo mineralna gnojila nimajo vpliva (Peacock in sod., 2001; Stark in sod., 2007; Zhang in sod., 2012). Podatki o sestavi mikrobne združbe so različni, saj so v nekaterih študijah ugotovili, da v tleh z organskimi gnojili prevladujejo glive (Zhang in sod., 2012) in po Gramu negativne bakterije (Peacock in sod., 2001;

Böhme in sod., 2005; Zhang in sod., 2012), v drugih raziskavah pa po Gramu pozitivne bakterije (Sessitsch in sod., 2001; Chu in sod., 2007; Zhong in sod., 2010).

2.4.3.5 Fitofarmacevtska sredstva

Kot že omenjeno v poglavju o varstvu vinske trte, ima lahko baker, ki je pogosta učinkovina FFS v vinogradništvu, negativne učinke na rast mikroorganizmov. V raziskavah so ugotovili, da lahko zmanjša mikrobno biomaso (Parat in sod., 2002) in aktivnost v tleh (Brandt in sod., 2010). Vpliv na pestrost in sestavo mikrobne združbe ni povsem dokazan, saj v raziskavah Ellis in sod. (2003) in Mackie in sod. (2013) povezave med bakrom in pestrostjo niso ugotovili, v drugih študijah pa se strinjajo, da prisotnost bakra zmanjša mikrobno pestrost in spremeni njeno strukturo (Smit in sod., 1997; Tom-Petersen in sod., 2003; Brandt in sod., 2010). Kontaminacija vinogradniških tal z bakrom je heterogena, saj lahko v tleh nastanejo vroče točke s povečano vsebnostjo bakra. Nekatere študije so dokazale, da so se mikroorganizmi sposobni vročim točkam izogniti, oziroma, da je v teh točkah prisotnih več mikroorganizmov, ki so tolerantni na kovine (Yamamoto in sod., 1985; Jacobson in sod., 2007). V tleh, ki so manj onesnažena z bakrom, prevladujejo po Gramu pozitivne bakterije, v tleh, ki so bolj onesnažena pa po Gramu negativne bakterije (Dell'Amico in sod., 2008).

Med sintetičnimi FFS, ki so v ekološki pridelavi grozdja prepovedani, je najmanj strupen mankozeb (ditiokarbamat) (Komárek in sod., 2010), medtem ko propikonazol (triazol) lahko povzroči zmanjšanje mikrobne biomase v tleh (Ekelund in sod., 2000; Sukul, 2006). Glede tebukonazola (triazol) so rezultati raziskav različni, saj nekatere ugotavljajo, da ta učinkovina nima učinka na mikrobno biomaso in strukturo bakterijske združbe (Bending in sod., 2007), v drugih raziskavah pa so ugotovili, da zmanjšuje število nitrifikatorskih bakterij, dušik fiksirajočih bakterij in število gliv (Cycoń in sod., 2006).

Med FFS spadajo tudi herbicidi, ki se uporabljajo za zatiranje plevela v vinogradu. V primeru, ko so tla zatravljena in jih enkrat na leto obdelamo s kemijskimi metodami (glifosat), je v tleh nižja aktivnost talnih encimov (β -glukozidaza, dehidrogenaza), vendar pa to ne vpliva na skupno aktivnost mikroorganizmov. Večji vpliv imajo herbicidi na mikrobno združbo, če jih uporabljam v obdelovanih tleh, saj je v primerjavi z drugimi načini oskrbe tal, aktivnost in pestrost mikrobne združbe nižja (Moreno in sod., 2009).

2.5 METODE ZA DOLOČITEV STRUKTURE IN PESTROSTI MIKROBNE ZDRUŽBE

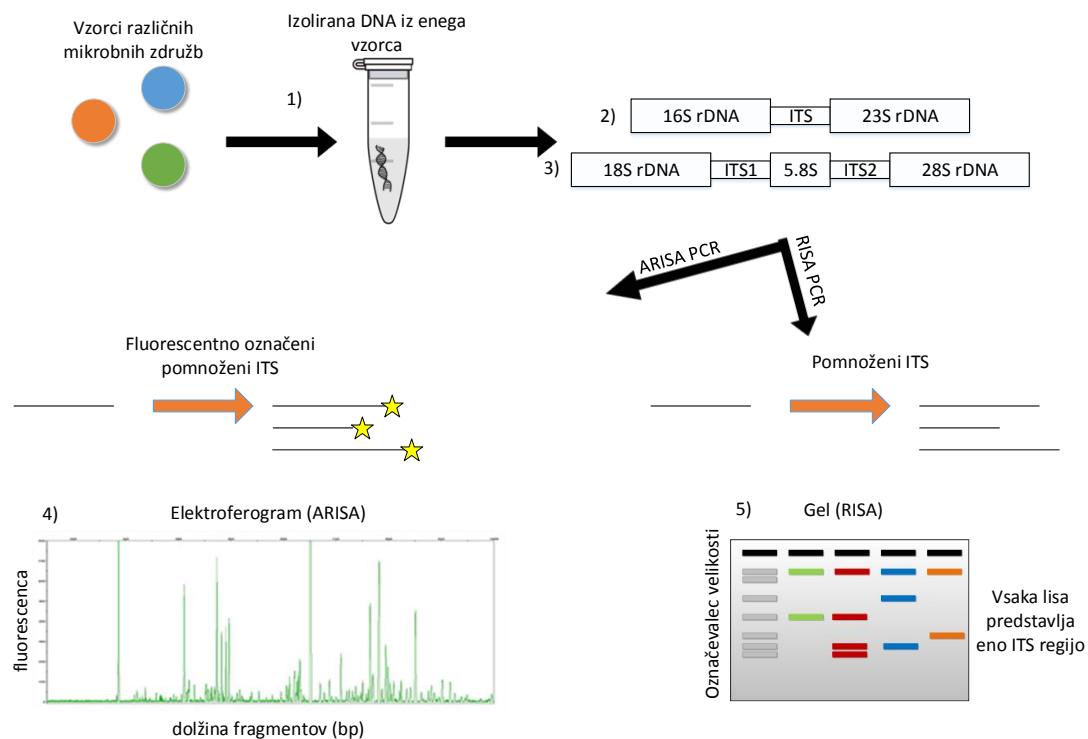
Klasične metode za analizo mikrobnih združb temeljijo na gojenju mikroorganizmov na različnih gojiščih. Vendar z njimi ne moremo pridobiti informacij o številčnosti vseh vrst mikroorganizmov in o pestrosti mikrobne združbe, saj znamo gojiti manj kot 1 % talnih bakterij (Pepper in sod., 2009). Zato se za analizo strukture mikrobne združbe v tleh pogosto uporablajo molekularne tehnike, ki temeljijo na direktni izolaciji skupne talne DNA in pomnoževanju označevalnega gena z verižno reakcijo s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction; PCR). Za karakterizacijo kompleksnih mikrobnih združb okoljskih vzorcev se rutinsko uporablja analizo polimorfizma dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (angl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP) (Widmer in sod., 2001) in avtomatizirano analizo rRNA intergenskih vmesnikov (angl. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis; ARISA). Poleg teh dveh metod sta za preučevanje talnih združb uspešni tudi gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (angl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE) in enoverižni konformacijski polimorfizem (angl. Single-Strand Conformation Polymorphism; SSCP) (Ranjard in sod., 2001). Metodi T-RFLP in ARISA sta visoke ločljivosti, s katerima lahko preučujemo vzorce mikrobne združbe z veliko pestrostjo. Obe ločita podobno, vendar je ARISA za določitev pestrosti velikega števila vzorcev hitrejša, cenejša in manj tehnično zahtevna metoda, kakor T-RFLP, ki se jo večkrat uporablja za filogenetsko določitev talnih mikroorganizmov (Hartmann in sod., 2005).

2.5.1 Metoda ARISA

ARISA je avtomatizirana različica metode RISA, ki temelji na pomnoževanju notranje prepisanih regij ribosomske DNA (angl. Internal Transcribed Spacer; ITS), ki se med vrstami mikroorganizmov razlikujejo po dolžini in zaporedju nukleotidov. Metodo sta prvič opisala Fisher in Triplett, leta 1999, ko sta preučevala pestrost in strukturo bakterijske združbe v vodnih okoljih. Bakterijska ITS regija leži na operonu *rrn*, med genoma, ki kodirata malo podenoto (16S) in veliko podenoto (23S) ribosomske RNA (rRNA). Uspešno se uporablja tudi za preučevanje glivnih združb. Glive imajo na jedrni ribosomski DNA (rDNA) dve ITS regiji, ITS1 in ITS2, ki sta med genoma, ki kodirata malo podenoto (18S) in veliko podenoto (28S) rRNA ter sta med seboj ločeni z genom, ki kodira 5.8S rRNA (ITS1 – 5.8 rRNA – ITS2). Ker se regije ITS med posameznimi vrstami mikroorganizmov razlikujejo po sekvenci in dolžini, saj so bakterijske regije velike 200-1200 bp in glivne 390-890 bp, jih lahko uporabljamo za tipizacijo mikrobnih združb na vrstnem nivoju (Ranjard in sod., 2001).

Potek metode ARISA je prikazan na sliki 1. Princip metode je pomnoževanje ITS regij izolirane DNA s PCR, pri čemer uporabimo fluorescentno označene začetne oligonukleotide, ki so komplementarni ohranjenim regijam v genu za 16S rRNA in 23S rRNA pri bakterijah, oziroma 18S rRNA in 28S rRNA pri glivah. Dobljeni produkti PCR so različno dolgi fluorescentno označeni fragmenti, ki jih nato kapilarna elektroforeza loči po velikosti in izmeri intenziteto fluorescence. Rezultat je v obliki elektroferograma, na katerem so izrisani različni vrhovi, ki skupaj sestavljajo značilen profil mikrobne združbe v posameznem vzorcu. Vsak vrh pripada najmanj enemu predstavniku te združbe, kar pomeni, da čim več je vrhov, večja je pestrost združbe. Višina vrhov oziroma intenziteta fluorescence prikazuje številčnost določenega organizma v združbi. Višji je vrh, bolj dominanten je organizem v združbi (Fisher in Triplett, 1999).

ARISA se od osnovne metode RISA razlikuje po uporabi fluorescentno označenih začetnih oligonukleotidov v PCR reakciji in po elektroforezi v avtomatiziranem sistemu (slika 1), kar omogoča hitrejšo analizo večjega števila vzorcev (Ranjard in sod., 2001), boljšo ločljivost in ponovljivost (Ciesielski in sod., 2013).

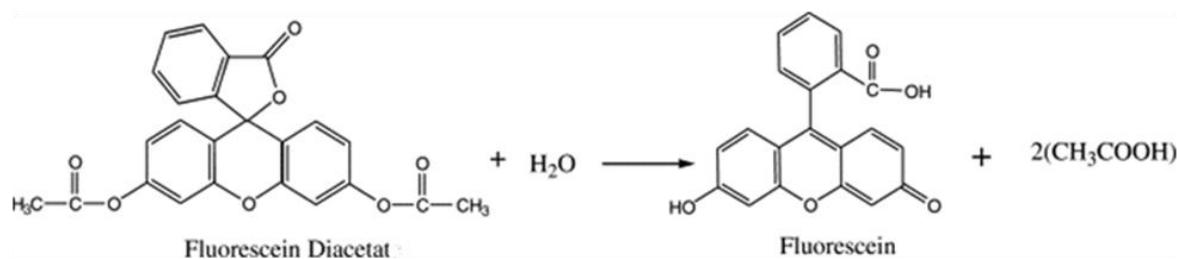


Slika 1: Shema analize ARISA in RISA; izolacija skupne DNA iz vzorca (1), pomnoževanje ITS regij bakterij (2) in gliv (3) s PCR, končni prikaz rezultatov v obliki elektroferograma (4) ali na gelu (5) (povzeto po Community Fingerprinting, 2012).

Omejitev metode ARISA je, da lahko podceni pestrost, saj imajo lahko nesorodni mikroorganizmi enako dolge ITS regije. Lahko pa se zgodi ravno nasprotno, da so v genomu enega mikroorganizma ITS regije različnih dolžin, kar vodi v preveliko oceno bogatosti (Kovacs in sod., 2010). Poleg tega ne omogoča identifikacije mikroorganizmov, ki prevladujejo v mikrobnih združbah, kakor je to možno z T-RFLP ali RISA (Hartmann in sod., 2005).

2.6 DOLOČITEV AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE S FDA

Skupna mikrobna aktivnost kaže kakšen je izkoristek razgradnje organske snovi v naravnih habitatih, kjer približno 90 % energije v tleh kroži preko talnih mikroorganizmov. Ocenimo jo lahko z encimskimi testi, s katerimi določimo prisotnost encimov v tleh, katerih vir so mikroorganizmi. Fluorescein diacetat (30,60-diacetyl fluorescein; FDA) je brezbarvna spojina, ki jo različni prosti (eksoencimi) in membransko vezani encimi, kot so proteaze, lipaze in esteraze, hidrolizirajo do rumeno-zelenega produkta, fluoresceina (slika 2), ki absorbira pri valovni dolžini 490 nm in ga lahko spektrofotometrično izmerimo. Koncentracija nastalega fluoresceina je linear na mikrobni aktivnosti. Encimi, ki hidrolizirajo FDA so vključeni v razgradnjo različnih snovi. Večinoma jih proizvajajo glavni mikrobni razkrojevalci, bakterije in glive (Green in sod., 2006). Metoda se sicer uporablja že od leta 1982, ko sta Schnürer in Rosswall z njo določila aktivnost v tleh in slami, vendar ni bila primerna za vse vrste tal. Zato sta jo Adam in Duncan (2001) izpopolnila, s čimer je metoda postala preprosta, hitra in dovolj občutljiva za detekcijo hidrolize FDA v širokem spektru tal.



Slika 2: Hidroliza fluorescein diacetata (FDA) do fluoresceina (Green in sod., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

a) Reagenti:

- dH₂O
- dNTP (Thermo FisherScientific, Inc.; ZDA)
- Agaroza, AgaroseforRoutine Use (Sigma-Aldrich; Nemčija)
- BSA (Thermo FisherScientific, Inc; ZDA)
- GeneRuler™ DNA Laddermix 1kb, #sm0313 (MBI Fermentas; Litva)
- KH₂PO₄ (MerckKgaA; Nemčija)
- K₂HPO₄ (Kemika; Hrvaska)
- Fluorescein diacetat (Alfa Aesar; Nemčija)
- Fluorescein (Sigma-Aldrich; Nemčija)
- Kloroform (MerckKgaA; Nemčija)
- Metanol (MerckKgaA; Nemčija)
- Deioniziran formamid (MerckKgaA; Nemčija)
- GeneScan™ – 1000 ROX™ Size standard (Thermo Fisher Scientific; ZDA)

b) Naprave:

- Tehnica (Domel, d.o.o.; Slovenija)
- Vrtinčnik Vortex EV-100, Tehnica (Domel, d.o.o.; Slovenija)
- Homogenizator Minilys® (Bertin Technologies; ZDA)
- Aparat za verižno reakcijo s polimerazo Minicycler™ (MJ Research; ZDA)
- Laminarij (Iskra; Slovenija)
- Elektroforezni sistem (AmershamBioscience; Velika Britanija)
- Mikrovalovna pečica Supratonic M752 (Miele; Nemčija)
- UV-Transluminator s fotoaparatom (UVI-tel; Velika Britanija)
- Vodna kopel (Inko, Zagreb; Hrvaska)
- Digestorij (Brest Engineering)
- Centrifuga Sigma (Sigma Laborzentrifugen; Nemčija)
- Spektrofotometer UV-1800 (SHIMADZU; Japonska)
- Kapilarna elektroforeza ABI PRISM 3100, AppliedBiosystems® (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- pH meter SevenEasy (Mettler Toledo; Švica)
- Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- Si(Li) detektor (EG&ORTEC, ZDA)
- Kadmijev vir rentgenske svetlobe (Isotope Products Laboratories, ZDA)

- c) Kompleti:
 - PowerSoil®Isolation Kit (MOBIO Laboratories; ZDA)
- d) Pufri in druge raztopine:
 - TBE pufer
 - Etidijev bromid (Sigma-Aldrich; Nemčija)
- e) Encimi:
 - Taq Pol s pripadajočim 10X pufrom in MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- f) Začetni oligonukleotidi za glivno DNA (White in sod., 1990; Gardens in Bruns, 1993):
 - ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3', Tm = 61,5°C
 - ITS1-F fluor. 5'[JOE]CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA 3', Tm = 56,6°C
- g) Začetni oligonukleotidi za bakterijsko DNA (Kovacs in sod., 2010; dopolnjeno po ARB SILVA, 2013):
 - BITSr 5'CYG AAT RGG GRA RCC 3', Tm = 48°C
 - BITSf FAM 5'TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT 3', Tm = 61,6°C

3.2 OPIS OBRAVNAVANIH VINOGRADOV IN VZORČENJE TAL

Vzorčenje je potekalo septembra 2013, v spodnji Vipavski dolini, v naselju Šempas, občina Nova Gorica (GPS koordinate: 45°55'36.8«N, 13°44'34.1«E).

Vzorčili smo 4 vinograde (slika 3). Njihov opis je v preglednici 1.

Preglednica 1: Opis obravnavanih vinogradov EKO3, EKO10, EKO35 in KON (način pridelave grozja, starost vinograda, vrsta in količina gnojila, pogostost gnojenja, vrsta fitofarmacevtskih sredstev (FFS), število škropljenj s FFS, obdelava tal).

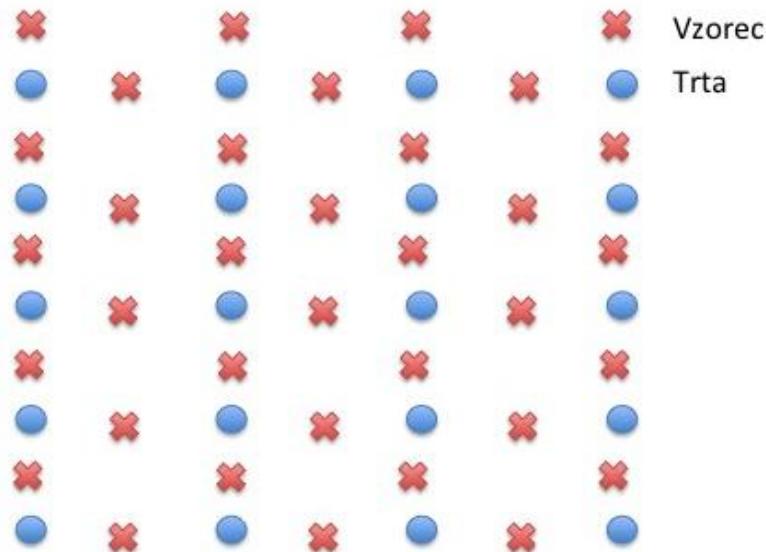
Opis vinogradov	Vinograd EKO3	Vinograd EKO10	Vinograd EKO35	Vinograd KON
Način pridelave	ekološki	ekološki	ekološki	konvencionalen
Starost vinograda	3 leta	10 let	35 let	35 let
Vrsta gnojila	hlevski gnoj	hlevski gnoj	hlevski gnoj	hlevski gnoj in mineralna gnojila
Količina gnojila	2-3 kg na trto	2-3 kg na trt	2-3 kg na trto	2-3 kg hlevskega gnoja na trto; količina mineralnih gnojil glede na gnojilni načrt
Pogostost gnojenja	ob sajenju trte	ob sajenju trte in na vsake 4 leta	ob sajenju trte in na vsake 4 leta	ob sajenju trte (hlevski gnoj) in vsako leto spomladji (mineralna gnojila)
FFS	FFS dovoljena v ekološki pridelavi (bakrovi in žveplovi pripravki) in pripravki na bazi rastlinskih izvlečkov (kopriv, kamilice, komarčka itd.)	FFS dovoljena v ekološki pridelavi (bakrovi in žveplovi pripravki) in pripravki na bazi rastlinskih izvlečkov (kopriv, kamilice, komarčka itd.)	FFS dovoljena v ekološki pridelavi (bakrovi in žveplovi pripravki) in pripravki na bazi rastlinskih izvlečkov (kopriv, kamilice, komarčka itd.)	FFS, ki so zapisana v registru dovoljenih sredstev (večina dovoljenih v integrirani pridelavi)
Število škropljenj / leto	11-12	11-12	11-12	7-9
Obdelava tal	ob sajenju trt so bila tla prekopana	ob sajenju trt so bila tla prekopana	ob sajenju trt so bila tla prekopana	prvih 10 let po sajenju so bila tla obdelana
Trajna ozelenitev	ne	da (od 3. leta starosti naprej)	da (od 3. leta starosti naprej)	da (od 10. leta starosti naprej)

Vsi vinogradi so med seboj oddaljeni maksimalno 335 m. Glede na pedološko karto Slovenije (merilo 1:25.000) sklepamo, da ima vinograd KON evtrična rjava tla, na starejšem ilovnatem aluviju, vinogradov EKO pa evtrična rjava tla, na eocenskem flišu (Digitalna ..., 2016).



Slika 3: Satelitski posnetek mesta vzorčenja vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in vinograda KON (Google Maps, 2016)

Vzorčili smo med trtami v eni vrsti (pet vzorcev na vrsto) in med vrstami (pet vzorcev med dvema vrstama) (slika 4). Znotraj vrste smo vzorčili pri vsaki peti trti, tj. 4-5 m oddaljenosti. Pri vzorčenju med vrstami smo izpustili eno vrsto, razen pri vinogradu EKO35, kjer smo zaradi goste postavitve (1 m), izpuščali dve vrsti. Tako smo v vsakem vinogradu zbrali 35 vzorcev tal oz. skupno 140 vzorcev (označba Z1 – vzorec 1, Z2 – vzorec 2...). Vsaka ploskev ima približno velikost 400 m^2 .



Slika 4: Shema vzorčenja

Vzorci tal so bili pobrani iz globine 0-15 cm skupaj z rastlinsko biomaso. Zemlja za analize bakterijskih in glivnih združb je bila takoj prenesena na -20 °C. Zemlja za analizo mikrobnene aktivnosti in fizikalno-kemijskih reakcij je bila prenesena na +4 °C.

3.3 DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL

Fizikalno-kemijske lastnosti tal smo določili za vsak vzorec posebej in nato iz njih določili povprečno vrednost in standardno napako za vsak vinograd posebej. Pred analizami smo vzorce tal posušili na zraku in v terilnici strli. Nato smo jih presejali skozi sito z odprtinami premera 2 mm.

3.3.1 Določanje tekture tal

Teksturo tal obravnavanih vinogradov smo določili z metodo sedimentacije (Kassem in Nannipieri, 1995). Vzorcu tal smo najprej dodali natrijev pirofosfat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) in pustili čez noč na stresalniku. Suspenzijo smo pretresli skozi sito in sprali z destilirano vodo, da so na situ ostali samo delci večji od 0,2 mm, ki smo jih prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič. Ostali suspenzioni smo dodali destilirano vodo do 1000 mL, pretresli in valj s suspenzijo postavili na mizo. Po 44 sekundah usedanja delcev smo iz globine 10 cm odvzeli 10 mL suspenzije in jo prenesli na tehtič. Dobili smo prvo frakcijo, oziroma delce < 0,05 mm. Valj smo ponovno stresali in po 4 minutah in 27 sekundah ponovili vzorčenje, da smo dobili drugo frakcijo z delci < 0,02 mm. Še tretjič je sledilo stresanje valja in nato vzorčenje po 7 urah in 35 minutah usedanja delcev, pri čemer smo dobili tretjo frakcijo, z delci < 0,002 mm. Vse tehtiče s frakcijami in delci iz sita smo posušili v pečici pri 105 °C ter nato stehtali, da smo dobili maso posameznih frakcij v 10 mL vzorca. Izračunali smo deleže posameznih frakcij. Na podlagi ameriškega teksturnega trikotnika smo na osnovi deležev peska, melja in gline določili teksturni razred.

3.3.2 Določanje aktivne in potencialne kislosti tal

Določali smo aktivno in potencialno kislost talnega vzorca. Aktivna kislost je dejanska kislost talne suspenzije, potencialna pa vključuje še lahko izmenljive vodikove ione (H^+), ki so vezani na talne koloide. Za aktivno kislost smo posušeni vzorec tal zmešali z destilirano vodo (1:2, v/v) in eno uro inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo pH določili s pH elektrodo. Potencialno kislost smo izmerili enako kot aktivno, le da smo namesto destilirane vode uporabili 1M KCl.

3.3.3 Določanje vsebnosti vode v tleh

Količina vode v tleh je odvisna od vremenskih razmer in letnih časov, zaradi česar lahko določimo le kakšno je trenutno vodno stanje tal. Metoda je povzeta po Kassem in Nannipieri (1995). V stehtano petrijevko smo zatehtali 10 g vzorca tal in ponovno stehtali. Nato smo vzorec pri 105 °C sušili in ponovno stehtali. Dobili smo maso (m) posušenega vzorca. Vsebnost vode smo izračunali po enačbi $((m_{tal} - m_{suhih\ tal})/m_{suhih\ tal}) * 100$.

3.3.4 Določanje skupne organske snovi v tleh

Organsko snov smo določali spektrofotometrično s postopkom povzetem po Kandeler (1995), ki temelji na mokri oksidaciji. Metodo smo izvajali v digestoriju. V erlenmajerico smo zatehtali 0,5-2 g posušenega vzorca tal in dodali 20 mL raztopine kalijevega dikromata (0,33 M) ter premešali. Pazljivo smo dodali 15 mL koncentrirane žveplove kisline in pustili mirovati 2-3 ure. Nato smo mešanico razredčili z destilirano vodo do 100 mL, premešali in inkubirali čez noč pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo z destilirano vodo 1 mL vzorca raztopine razredčili do 25 mL in premešali. Za umeritveno krivuljo smo na enak način pripravili standardne raztopine z deležem organske snovi 0, 2, 4, 6 in 8 %. S spektrofotometrom smo vzorcem in standardom izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm. Delež organske snovi (%) smo izračunali iz umeritvene krivulje, pri čemer smo upoštevali zatehtano maso vzorca tal.

3.3.5 Določanje vsebnosti rastlinam dostopnega fosforja (PO₄-P)

Vsebnost dostopnega orto-fosfata smo določali z metodo ekstrakcije z natrijevim hidrogenkarbonatom (NaHCO₃) in spektrofotometrično pri valovni dolžini 660 nm (Olsen in Sommers, 1982).

V stekleničko smo zatehtali 2 g vzorca tal in dodali 40 mL ekstrakcijske raztopine 0,5 M NaHCO₃ s pH 8,5, zaprli ter 30 min stresali na stresalniku. Mešanice so takoj prefiltrirali skozi filtrirni papir v nove stekleničke. Sledilo je spektrofotometrično določanje fosforja. V epruveto so odpipetirali 3 mL prefiltriranega ekstrakta in dodali 9 mL destilirane vode, 3 mL askorbinsko-amonmolibdatnega reagenta ter dobro premešali. Askorbinsko-amonmolibdatni reagent smo dobili tako, da smo v vodi raztopljen amonijev heptamolibdat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O), antimon kalijev tartrat (K(SbO) x C₄H₄O₆ x ½H₂O) in žveplovo kislino (H₂SO₄) zmešali skupaj z askorbinsko kislino (C₆H₈O₆). Po 10 min reakcije vzorca z reagentom, smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri valovni dolžini 660 nm. Za umeritveno krivuljo smo po istem postopku izmerili absorbanco standardnim raztopinam PO₄-P, s koncentracijami 0,0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L

in 4,0 mg/L. Koncentracijo fosforja smo nato izračunali iz umeritvene krivulje in jo izrazili v mg/kg tal.

3.3.6 Določanje skupne vsebnosti kovin v tleh

Skupne vsebnosti kovin (kalij, kalcij, krom, mangan, železo, nikelj, baker, cink, svinec) v vzorcih tal smo določili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRFS). Iz vsakega vzorca tal smo najprej pripravili tabletko. Naredili smo jo iz 0,5 g presejanega in v terilnici zmletega talnega vzorca ter s pomočjo nerjavečega modela za tabletke in hidravlične stiskalnice. Pripravljen vzorec smo nato analizirali z fluorescenčnim spektrometrom, ki je bil sestavljen iz Si (Li) detektorja z 25 mm debelim berilijevim oknom. Za vzbuditev fluorescence smo uporabili kadmijev (^{109}Cd , 300 MBq, 22,1 keV) obročast radioizotopni vir rentgenske svetlobe. Energijska ločljivost spektrometra je bila 175 eV pri 5,9 keV. Meritev spektra vsakega vzorca smo opravljali 3000 s in jih nato analizirali s programom AXIL (Van Espen in Jansen, 1993). Kvantitativno analizo spektrov smo izvedli z računalniškim programom QAES (Kump in sod., 2007). Za zagotovitev natančno opravljene analize elementov z XRFS smo uporabili standardni referenčni material NIST SRM 1573a, CRM 129 in OU-10.

Rezultate analiziranih fizikalno-kemijskih lastnosti smo med seboj primerjali s statističnim testom enosmerna ANOVA in testom Tukey HSD. Statistično značilne so bile lastnosti s stopnjo značilnosti $p < 0,05$. Statistične analize smo izvedli s statističnim programom IBM SPSS Statistics 23.0

3.4 EKSTRAKCIJA DNA

Ekstrakcijo skupne mikrobne DNA smo izvedli s kompletom PowerSoil[®]DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije DNA smo preverili agarozno elektroforezo v 1 % gelu z etidijevim bromidom. Agarozo (0,4 g) smo raztopili v 40 mL 0,5X TBE pufra in v ohlajeno raztopino dodali 1,5 μL etidijevega bromida ter vlili v modelček. Na strjen agarozni gel smo nanesli 5 μL vzorca in 1,5 μL 1 kb lestvice DNA. Do gladine gela smo dolili 0,5X TBE pufer in začeli z elektroforezo. Ta je potekala 30 min pri električni napetosti 100 V. Ekstrakte smo do pomnoževanja s PCR shranili na -20°C .

3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA

Koncentracijo in čistost DNA smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop 1000 (ThermoScientific) v 1,5 µL alikvotih. Umerili smo z raztopino C6 (10 mM Tris) iz kompleta PowerSoil®DNA Isolation Kit. Čistost DNA smo merili glede na razmerje absorbance 260/280 in 260/230 s pomočjo programa ND_1000 V3.7.1, ki nam je določil tudi koncentracijo DNA v ng/µl.

3.6 IZVEDBA METODE ARISA

Strukturo mikrobne združbe smo določili z metodo ARISA, ki vključuje pomnoževanje regij ITS s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi. Pomnožene produkte smo nato analizirali na kapilarni elektroforezi.

3.6.1 Verižna reakcija s polimerazo

Za ARISA smo potrebovali fluorescentno označene pomnožke regij ITS. Zato smo glivno DNA pomnožili z začetnim oligonukleotidom ITS4 in z začetnim oligonukleotidom ITS1-F fluor., ki je na 5' koncu označen s fluorokromom JOE (Sigma).

PCR mešanica (25 µL) je vsebovala naslednje reagente:

- 2,5 µL 10X PCR pufer
- 2,5 mM MgCl₂
- 200 µM dNTP
- 0,5 µM ITS1-F
- 0,5 µM ITS4
- 0,75 U Taq polimeraza
- Sterilna destilirana voda do 12,5 µL
- 12,5 µL izolirane DNA

V PCR mešanico kontrolnih vzorcev smo namesto izolirane DNA dodali sterilno vodo. Pomnoževanje je potekalo z napravo PCR po programu napisanim v preglednici 2.

Preglednica 2: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje glivne DNA.

Stopnja PCR reakcije	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	2	1
Denaturacija	95	1	35
Vezava začetnih oligonukleotidov	62	1	35
Podaljševanje	72	1	35
Končno podaljševanje	72	10	1
Ohranjaje produkta	4	/	/

Bakterijsko DNA smo po programu (preglednica 3) pomnožili z začetnim oligonukleotidom BITSr in BITSf-FAM, ki je bil na 5' koncu označen s fluorokromom 6-FAM.

PCR mešanica (25 µL) za bakterijsko združbo je vsebovala:

- 2,5 µL 10X pufer
- 2,5 mM MgCl₂
- 20 mg/L BSA (za vinograd 1 in 4), oz. 200 mg/L BSA (za vinograd 2 in 3)
- 200 µM dNTP
- 0,2 µM BITSf-FAM
- 0,2 µM BITSr
- 1 U Taq pol
- 5 µL izolirane DNA

Preglednica 3: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje bakterijske DNA.

Stopnja PCR reakcije	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	94	5	1
Denaturacija	94	0,5	30
Vezava začetnih oligonukleotidov	54	0,75	30
Podaljševanje	72	1,5	30
Končno podaljševanje	72	7	1
Ohranjaje produkta	4	/	/

Pomnoževanje smo preverili z gelsko elektroforezo, kjer smo poleg vzorcev na 1 % agarozni gel z etidijevim bromidom nanesli tudi negativno kontrolo (namesto izolirane DNA smo dodali destilirano vodo) in 1 kb DNA lestvico. Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V. Nato smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in fotografirali.

- Optimizacija PCR

Za boljšo pomnožitev DNA smo ekstrahirane vzorce 10 ali 100-krat redčili, s čimer smo zmanjšali inhibitorno delovanje možnih nečistoč na pomnoževanje DNA. V PCR mešanico za pomnoževanje bakterijske DNA smo dodali tudi goveji serumski albumin (BSA), ki deluje protiinhibitorno in pospešuje pomnoževanje DNA (Kreader, 1996).

3.6.2 Ločevanje fluorescentno označenih ITS regij s kapilarno elektroforezo

Produkte PCR ($2 \mu\text{L}$) smo zmešali z $8 \mu\text{L}$ deioniziranega formamida in $0,5 \mu\text{L}$ DNA standarda ROX 1000. Nato smo vzorce 2 min pri 95°C denaturirali in jih takoj ohladili na ledu. Po standardnih pogojih proizvajalca smo po $2,5 \mu\text{L}$ denaturiranih vzorcev elektrokinetično injicirali v kapilarno elektroforezo ABI PRISM 3100.

3.6.3 Analiza rezultatov ARISA

Po kapilarni elektroforezi smo dobili elektroferogram, ki smo ga s programom GeneMapper pregledali in pretvorili v matriko $m \times n$ elementov $a_{i,j}$, kjer i predstavlja vzorec in j dolžino fragmenta. Element v i-ti vrstici in j-tem stolpcu tako predstavlja intenziteto fluorescence, ki jo oddaja fragment j v vzorcu i. Fragmente, ki so bili krajsi od 50 bp smo izločili, saj bi lahko interferirali z začetnimi oligonukleotidi. Prav tako smo izločili tudi fragmente, katerih fluoresanca ni presegala dvakratno standardno deviacijo vrednosti fluorescence v bazni liniji. Podatke smo analizirali s statističnimi testi, ki so dosegljivi znotraj programskega paketa R (R Development Core Team, 2009) z dodatnim paketom Vegan (Oksanen in sod., 2010).

3.6.3.1 Shannonov indeks pestrosti

Za določitev pestrosti mikrobne združbe v posameznem sistemu (vinograda) smo v programu R izračunali Shannonov indeks pestrosti (H) in ga na območju posameznega vinograda umestili v ustrezeno vzorčno mesto. Shannonov indeks je mera za pestrost na ravni združb, ki se je v ekologiji najbolj uveljavil. Upošteva število različnih vrst in njihovo pogostost. Če so v vzorcu organizmi ene vrste, je vrednost H enaka nič. Maksimum doseže takrat, ko vsak osebek v vzorcu pripada različni vrsti (Robič, 2000).

3.6.3.2 perMANOVA in beta pestrost

Za analizo pestrosti med vinogradi in pestrosti med vrsto ter medvrstnim prostorom, smo uporabili neparametrični test permutacijske multivariatne analize varianc (angl. Permutational Multivariate Analysis of Variance; perMANOVA). Podatke o intenziteti fluorescence in dolžini fragmentov vsakega vinograda smo najprej z metodo Bray-Curtisove različnosti pretvorili v matriko razdalj. Matrike vseh 4 vinogradov smo nato analizirali s testom perMANOVA, pri čemer smo uporabili 999 permutacij, ki so bile ugnezdeni glede na lokacije vinogradov. Analizo varianc smo izvedli s funkcijo adonis, programskega paketa R Vegan.

Preverili smo tudi kakšna je verjetnost, da so izračunani rezultati res posledica razlik v razpršenosti različnih spremenljivk med vinogradi in ne posledica naključja v sestavi vinograda. Za to smo uporabili test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin, funkcijo betadisper v paketu R Vegan, ki nam je ocenil beta pestrost. Ta nam pove kakšna je vrstna pestrost med posameznimi vzorci znotraj vsakega vinograda.

3.6.3.3 DAPC

Za preučevanje genetske strukture biološke populacije smo uporabili diskriminantno analizo glavnih komponent (angl. Discriminant Analysis of Principal Components; DAPC), ki je sestavljena iz dveh korakov: analize glavnih komponent (angl. Principal Component Analysis; PCA) in diskriminantne analize (angl. Discriminant Analysis; DA). Je metodološki pristop, ki povzame vse sposobnosti analize DA, brez njenih omejitev (Jombart in sod., 2010). Za analizo smo uporabili R paket adegent.

Najprej smo podatke s pristopom PCA transformirali. PCA metoda ima sposobnost v kratkem času določiti strukturo populacije iz velike podatkovne zbirke. Zagotovi nam, da spremenljivke niso povezane in da je število spremenljivk manjše od števila analiziranih vzorcev. PCA lahko uporabimo za katere koli genetske podatke, ne da bi pri tem prišlo do izgube genetskih informacij. PCA iz spremenljivk oblikuje nove spremenljivke, t.i. glavne komponente, ki opisujejo skupno varianco prvotne množice podatkov. Ker pa PCA povzema celotno variabilnost populacije, kar vključuje razlike tako med skupinami kot tudi znotraj skupin, temu sledi še multivariatna metoda DA, ki glavne komponente razdeli v gruče, klastre glede na njihove genetske razlike. Pri tem maksimira razlike med skupinami in zanemari razlike znotraj skupin. To naredi tako, da poišče linearno kombinacijo merjenih spremenljivk oz. diskriminantno funkcijo (angl. Discriminant Function; DF), ki vnaprej določene skupine med seboj maksimalno loči in nato z najmanjšo napako posamezne enote uvrsti v skupine. Diskriminantne funkcije so določene tako, da prva najbolj loči med skupinami (ima največjo lastno vrednost), vsaka naslednja pa ima vedno manj ločevalne moči. V praksi tako želimo, da je diskriminantnih funkcij čim manj.

Diskriminantne spremenljivke omogočajo grafični prikaz, ki vizualno predstavi razlike med skupinami in nam poda oceno genetske strukture populacije. Z metodo DAPC tako dosežemo najboljšo diskriminacijo posameznikov v skupine (Jombart in sod., 2010).

3.6.3.4 Analiza uspešnosti razlikovanja med vinogradi z DAPC

Da smo preverili kako dobro je DAPC ločil vinograde med seboj smo uporabili ločitveni test DAPC. Najprej smo iz vsakega vinograda odstranili 9 vzorcev (način cik-cak) in preostale analizirali z DAPC. Nato smo z odstranjenimi preverili, s kakšno uspešnostjo je funkcija DA sposobna uvrstiti neznane vzorce v posamezno skupino (vinograd).

3.6.3.5 Prokrustova analiza

S Prokrustovo analizo smo želeli preučiti ali so rezultati, ki smo jih dobili z analizo DAPC povezani z lokacijo posameznega vinograda. Prokrustova analiza temelji na iskanju najboljšega prileganje dveh podatkovnih matrik. Med tem ko je ena matrika fiksna (tarčna matrika), se druga s translacijam, zrcaljenjem in rotacijam spreminja, tako, da se čim bolj ujema s fiksno matriko (Lisboa in sod., 2014). V našem primeru smo za tarčno matriko uporabili matriko s podatki o mikrobeni združbi (matrika X) in jo uporabili v ordinaciji redundančne analize (angl. Redundancy Analysis; RDA). Primerjali smo jo z RDA ordinacijo matrike fizičnih razdalj med vinogradi (matrika Y). Pri tem smo uporabili Prokrustovo analizo (funkcija PROTEST), ki nam je transformirala matriko Y, tako da je bila razlika vsote kvadratov ostanka med pripadajočim homolognimi koordinatami med matrikama X in Y najmanjša. Če je ta razlika visoka, je povezava med dvema podatkovnima matrikama šibka in obratno (Lisboa in sod., 2014). Za analize smo uporabili R paket Vegan.

3.6.3.6 Mantelov test

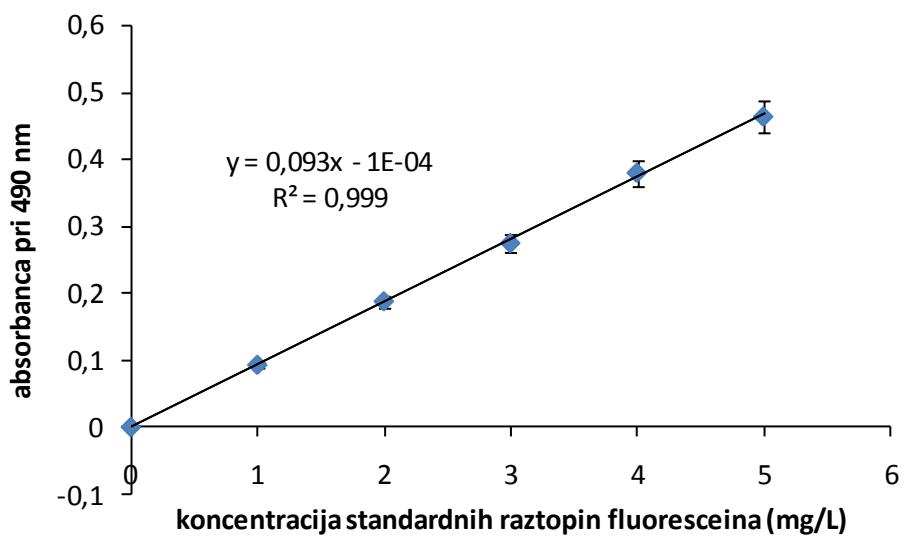
Želeli smo preveriti ali so med glivno in bakterijsko združbo genetske razdalje. V ta namen smo z Mantelovim korelačanskim testom primerjali distančni matriki (za ekološko relevantno razdaljo smo uporabili Bray-Cutrisov indeks različnosti) obeh združb za vsak vinograd posebej. Uporabili smo 1000 permutacij. Test smo izvedli s programom R, paket Vegan.

3.7 DOLOČANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI S FLUORESCEIN DIACETATOM

Mikroben aktivnost s fluorescein diacetatom (FDA) smo merili po prirejenim protokolom po Adamu (Adam in Duncan, 2000). Postopek temelji na barvni reakciji. Prosti in membransko vezani encimi hidrolizirajo brezbarvni FDA do končnega rumenogobravnega produkta fluoresceina, ki ga lahko spektrofotometrično izmerimo. Enemu gramu presejanega vzorca ($d = 2$ mm) smo dodali 7,5 mL 60 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7,6) ter za začetek reakcije 0,1 mL raztopine 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FDA. Negativne kontrole niso vsebovale FDA. Po 20 minutni inkubaciji na 30 °C smo v digestoriju dodali 7,5 mL mešanice kloroform/metanol (2:1) in ročno premešali, s čimer smo ustavili nadaljnji potek reakcije. Vsebino stekleničke smo 3 min pri 2000 obr./min centrifugirali in supernatant prefiltrirali v stekleno epruveto ter s spektrofotometrom filtratu izmerili absorbanco pri 490 nm. Delali smo v 3 ponovitvah.

Ker smo bili omejeni s količino zemlje smo si za to analizo izbrali 20 vzorcev iz vsakega vinograda (skupaj 80 vzorcev). Za negativne kontrole smo si izbrali 5 vzorcev iz vsakega vinograda (na vogalih vinograda in na sredini).

Za vsak vinograd posebej smo od izmerjene absorbance vzorca odsteli povprečje absorbanc negativnih kontrol in koncentracijo nastalega fluoresceina izračunali iz umeritvene krivulje (slika 5). Za to smo iz standardne raztopine 20 μg fluoresceina mL^{-1} pripravili standardne raztopine fluoresceina v koncentracijah 1-5 mg/L in jim izmerili absorbanco pri 490 nm. Končne koncentracije smo izrazili v $\mu\text{g}/\text{g}$ zemlje. Vpliv različne obdelave vinogradov in položaj vzorca v vinogradu (vrsta/medvrstni prostor) na mikroben aktivnost v tleh, smo ocenili z dvosmerno analizo variance (angl. Analysis of Variance; ANOVA), kjer je prva neodvisna spremenljivka predstavljal posamezen vinograd in druga spremenljivka položaj vzorca v vinogradu. Da bi izvedeli med katerimi vinograji je mikroben aktivnost statistično značilna, smo izvedli enosmerno ANOVA in test Tukey HSD. Statistično značilne so bile mikroben aktivnosti s stopnjo značilnosti $p < 0,05$. Statistične analize smo izvedli s statističnim programom IBM SPSS Statistics 23.0.



Slika 5: Umeritvena krivulja za izračun mikrobne aktivnosti s fluorescein diacetatom.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL

Rezultati analiziranih fizikalno-kemijskih lastnosti tal obravnavanih vinogradov veljajo za tla do globine 15 cm.

4.1.1 Tekstura tal

Teksturni razred na območju vinogradov EKO10, EKO35 in EKO3 je peščena ilovica, medtem ko je teksturni razred na območju vinograda KON ilovica. V tleh vseh vinogradov prevladuje delež peska, pri čemer ga je v tleh vinograda EKO3 70,1 %, v tleh ostalih vinogradov pa 49,3-56,1 %. Najmanjši delež v teksturi tal predstavlja glina in sicer v EKO vinogradih 6,1-7,9 % ter v KON 11,3 %. Razlike v teksturi tal vrste in medvrstnega prostora so zanemarljive.

4.1.2 pH tal

Ko govorimo o pH tal, običajno mislimo na aktivno kislost. Najvišjo vrednost pH tal (slika 6B) do globine 15 cm je bila izmerjena za vinograd EKO10 in EKO3 (pH 7,4). Tla v vinogradu EKO35 so bila nevtralna (pH 6,9), medtem, ko so tla v vinogradu KON kisla, saj je pH 5,9. Potencialna kislost vseh tal je po pričakovanjih nižja, in sicer v ekoloških vinogradih za približno 0,6 enote ter v konvencionalnem za eno enoto. Znotraj posameznega vinograda razlike v pH med vrsto in medvrstnim prostorom niso bile statistično značilne.

4.1.3 Vsebnost vode v tleh

Povprečna vlažnost tal v vseh vinogradov je 21,5 % (slika 6A). Najnižjo vrednost imajo tla v vinogradu EKO3 (15,3 %) in največjo v vinogradu KON (25,7 %). Delež vode v ostalih dveh vinogradih se ne razlikuje statistično značilno in znaša $22,5 \pm 0,4$ %. Prav tako ni statistično značilnih razlik med vrsto in medvrstnim prostorom znotraj posameznega vinograda ($p < 0,05$).

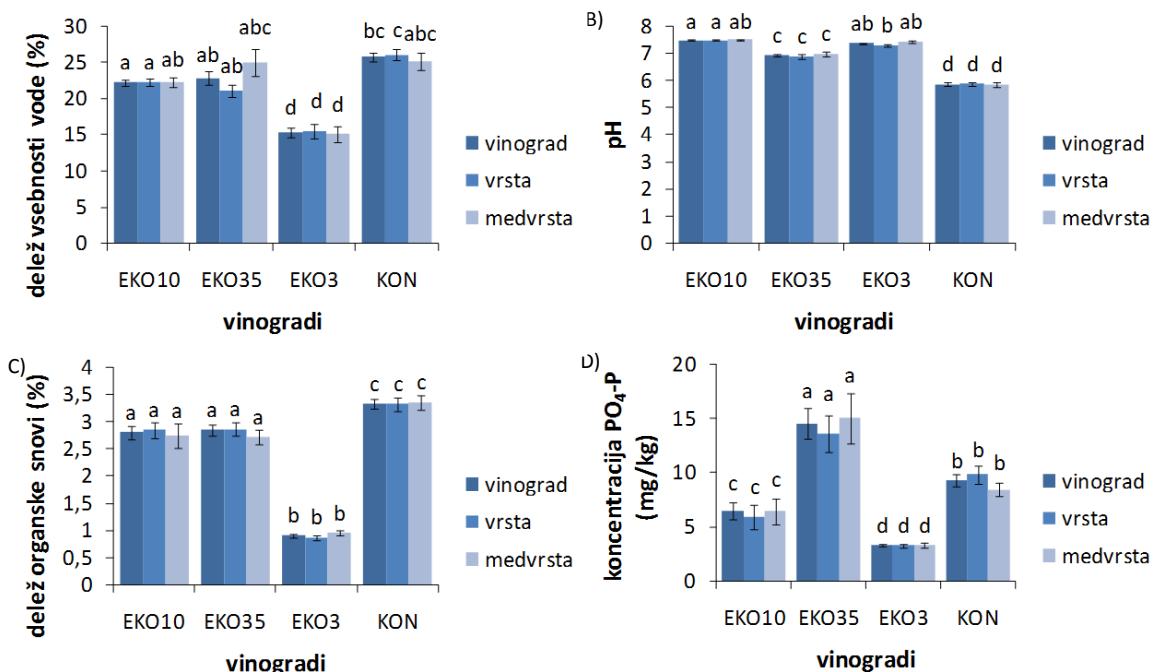
4.1.4 Organska snov v tleh

V tleh vinograda EKO10 in EKO35 se koncentracija organske snovi statistično značilno ne razlikuje in znaša 2,8 % (slika 6C). Najnižja koncentracija je bila izmerjena v tleh

vinograda EKO3 (0,9 %), najvišja pa v tleh vinograda KON (3,3 %). Koncentracije organske snovi v tleh se med vrsto in medvrstnim prostorom v vseh vinogradih statistično značilno ne razlikujejo.

4.1.5 Rastlinam dostopne vsebnosti fosforja ($\text{PO}_4\text{-P}$) v tleh

Tla v vinogradih so različno razpoložljiva s fosforjem (slika 6D). Največ dostopnega fosforja je na razpolago v vinogradu EKO35 (14,5 mg/kg suhih tal) in KON (9,2 mg/kg). Najmanjša koncentracija fosforja se nahaja v tleh vinograda EKO3 (3,3 mg/kg suhih tal). Razlike v koncentraciji v tleh vrste in medvrstnega prostora niso statistično značilne.



Slika 6: Lastnosti tal obravnavanih vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in KON glede na vzorčeno mesto v vinogradu (vrsta/medvrsta): (A) delež vsebnosti vode, (B) pH, (C) delež organske snovi, (D) koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake ($n = 35$). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike ($p < 0,05$).

4.1.6 Skupna vsebnost kovin v tleh

Skupne vsebnosti analiziranih kovin v tleh so prikazane v preglednici 4. Največja vsebnost skupnega kalija je v tleh vinograda EKO3, medtem ko se koncentracije kalija v tleh ostalih vinogradov ne razlikujejo statistično značilno. Prav tako se med vinogradi statistično

značilno ne razlikujejo koncentracije kalcija v tleh. Vsa vzorčena tla imajo podobno koncentracijo kroma, in sicer 0,4 mg/g. Največ mangana je v tleh vinograda EKO35 (2,7 mg/g). Razlike v koncentracijah med ostalimi vinogradi niso statistično značilne. V vinogradu EKO3 je sicer koncentracija železa najvišja in v vinogradu EKO10 najnižja, vendar če v obzir vzamemo tudi standardno napako, so koncentracije v vseh vinogradih podobne. Enake velja tudi za tla glede vsebnosti niklja. Najnižje koncentracije bakra smo izmerili v tleh vinograda EKO3 (0,16 mg/g) in se statistično značilno razlikujejo od koncentracij v tleh vseh ostalih vinogradov. Razlike med koncentracijami bakra v tleh vinogradov EKO10, EKO35 in KON niso statistično značilne. Prav tako med vinogradi niso statistično značilne razlike koncentracij cinka (Zn) in svinca (Pb). Koncentracija Zn v tleh znaša 0,13 mg/g in koncentracija Pb 0,07 mg/g.

Preglednica 4: Skupne vsebnosti kovin v tleh obravnavanih vinogradov EKO10, EKO35, EKO3 in KON (K-kalij, Ca-kalcij, Cr-krom, Mn-mangan, Fe-železo, Ni-nikelj, Cu-baker, Zn-cink, Pb-svinec). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako ($n = 35$). Različne črke prikazujejo lastnosti, ki so statistično značilno različne ($p < 0,05$).

Analizirane kovine	EKO10	EKO35	EKO3	KON
K (mg/g)	15,0 ± 2,5 ^a	15,3 ± 3,1 ^a	21,4 ± 2,5 ^b	18,6 ± 2,8 ^{ab}
Ca (mg/g)	9,3 ± 1,6 ^a	12,1 ± 6,2 ^a	10,3 ± 2,7 ^a	6,9 ± 1,4 ^a
Cr (mg/g)	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,08 ^a
Mn (mg/g)	1,4 ± 0,3 ^a	2,7 ± 0,3 ^b	1,6 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,2 ^a
Fe (mg/g)	37,4 ± 1,4 ^c	42,7 ± 1,3 ^{ab}	44,8 ± 1,6 ^a	40,3 ± 1,5 ^b
Ni (mg/g)	0,12 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,03 ^a	0,08 ± 0,02 ^a
Cu (mg/g)	0,29 ± 0,09 ^a	0,28 ± 0,08 ^a	0,16 ± 0,04 ^b	0,27 ± 0,05 ^a
Zn (mg/g)	0,13 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,02 ^a
Pb (mg/g)	0,06 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,01 ^a

4.2 KONCENTRACIJA IN ČISTOST IZOLIRANE DNA

Povprečna koncentracija izolirane DNA se med vinogradi statistično značilno razlikuje. Z enosmerno analizo varianc s post hoc testom Tukey HSD smo ugotovili, da se v tleh vinogradov EKO10 in KON, koncentracija DNA ne razlikuje statistično značilno ($p > 0,05$), medtem ko je v tleh ostalih dveh vinogradov statistično značilna. V vinogradu EKO10 in KON je tako koncentracija izolirane DNA $10,5 \pm 0,6 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Najvišjo smo izmerili v tleh vinograda EKO35 ($19,0 \pm 2,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$), najnižjo pa v tleh vinograda EKO3 ($2,4 \pm 0,4 \text{ ng}/\mu\text{L}$), kjer je bila pri nekaterih vzorcih koncentracija pod mejo detekcije. Kljub temu, smo ob dodatku BSA, ITS regije uspešno pomnožili.

Čistost izolirane DNA smo določili z razmerjem A260/A280 in A260/230. Pri vinogradih EKO10, EKO35 in KON je bila čistost zadovoljiva ($A260/A280 = 1,9 \pm 0,1$). V vzorcih vinograda EKO3 je bila čistost slabša ($A260/A280 = 1,3 \pm 0,4$), kar je verjetno posledica nizke koncentracije izolirane DNA.

4.3 DOLŽINA FRAGMENTOV ITS REGIJ

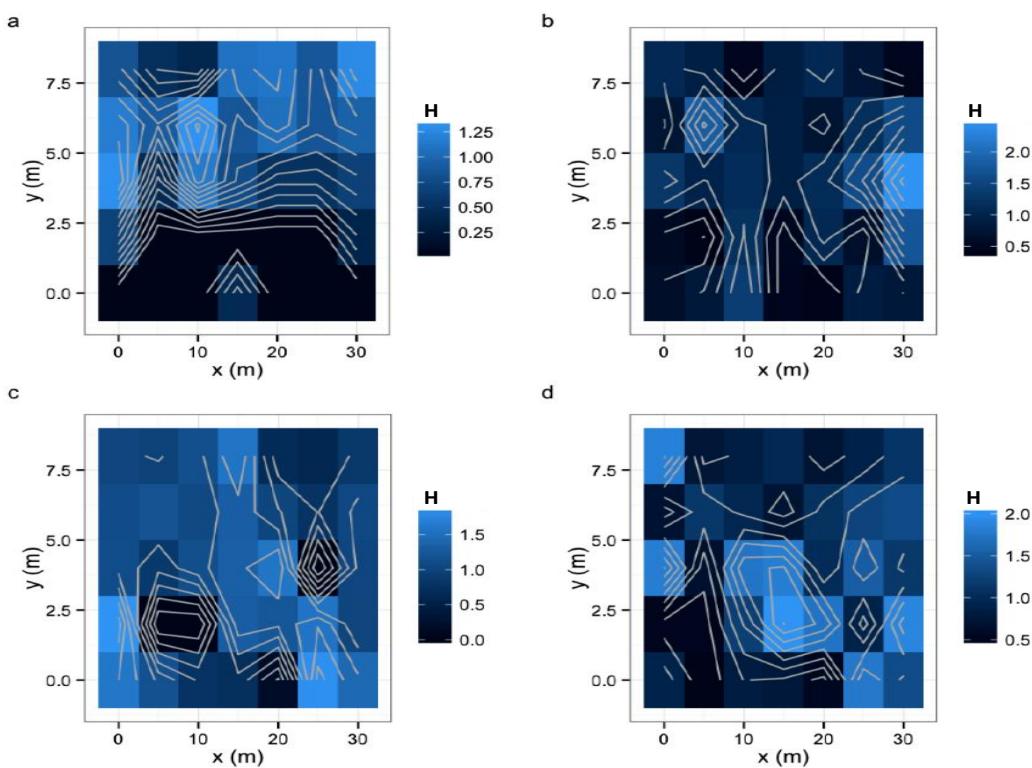
Dolžino produktov ARISA PCR smo preverili z gelsko elektroforezo. Pomnoženi fragmenti glivnih ITS regij so bili veliki 500-1000 bp, bakterijske ITS regije pa 500-1500 bp. Del vzorcev s pomnoženo regijo ITS za glivne združbe so predstavljeni v prilogi B in za bakterijske združbe v prilogi C.

4.4 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE ZNOTRAJ VINOGRADOV

Kakšna je pestrost mikroorganizmov vsakega vzorca znotraj posameznega vinograda smo ugotavljali z določitvijo Shannonovega indeksa pestrosti, ki smo ga umestili v ustrezeno vzorčno mesto (slika 7 in slika 8). Večji kot je Shannonov indeks, večja je pestrost in obratno.

4.4.1 Pestrost glivne združbe

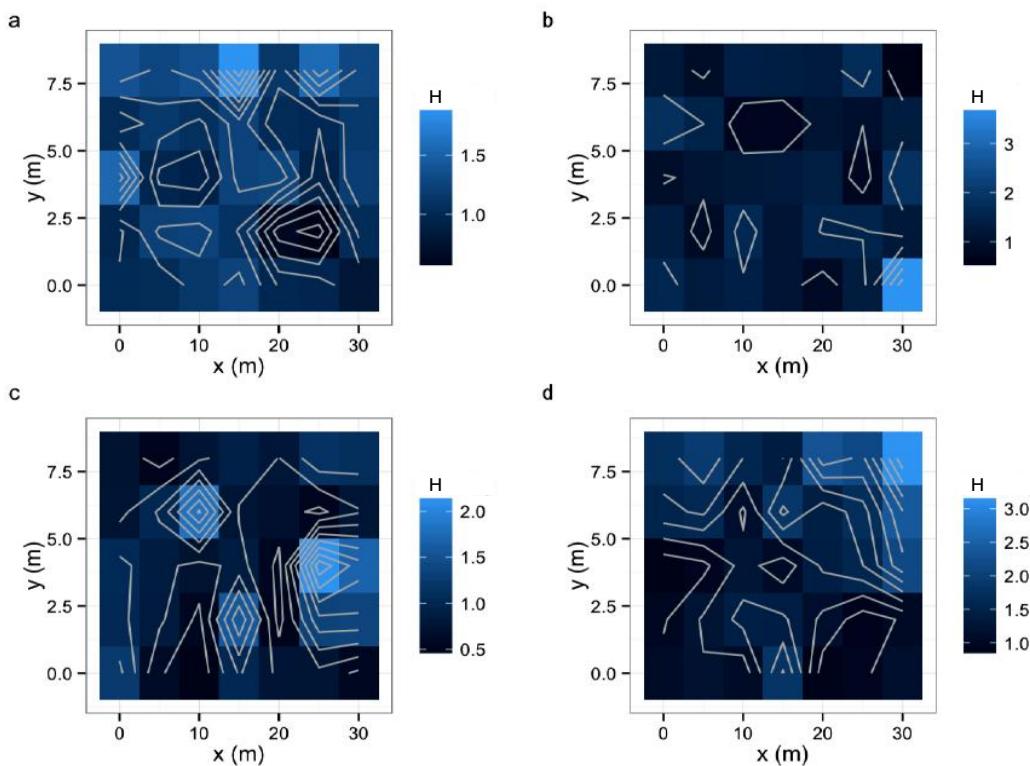
Na sliki 7 so prikazani Shannonovi indeksi pestrosti glivne združbe v vsakem vzorcu tal različnih vinogradov. Najvišji indeks pestrosti je bil izračunan za vzorec tal iz vinograda EKO35 (max $H = 2,5$), ki je tudi najstarejši od vseh vzorčenih in iz vinograda KON (max $H = 2,1$), ki ga obdelujejo konvencionalno. Najmanjša pestrost (max $H = 1,3$) je bila določena v vinogradu EKO10. Edino v tem vinogradu so nekateri vzorci, ki se nahajajo blizu skupaj, imeli podoben indeks pestrosti, medtem ko so pri preostalih prisotne le posamezne točke z veliko ali majhno pestrostjo.



Slika 7: Toplotni graf indeksov pestrosti Shannon (H) za glivno združbo znotraj posameznih vinogradov: a) vinograd EKO10, b) vinograd EKO35, c) vinograd EKO3, d) vinograd KON. Osi predstavljajo fizično razdaljo (m), merjeno od vzorca 1, s koordinatami (0,0).

4.4.2 Pestrost bakterijske združbe

Z razliko od glivne združbe je pestrost bakterijske združbe bolj razgibana (slika 8). V vinogradih je namreč prisotnih več posameznih mest z visoko pestrostjo in več otokov z nizko pestrostjo bakterijske združbe kot glivne združbe. V vzorcih tal, ki se nahajajo na vogalih vinograda EKO35 in KON je pestrost visoka ($H > 3$). V vinogradu EKO10 in EKO3 tako visokega indeksa ni, saj je tu maksimalni indeks 2. Opazimo pa lahko, da je vinograd EKO3 najbolj razgiban glede raznolikosti, ker ima več mest z visokim in nizkim indeksom.



Slika 8: Toplotni graf indeksov pestrosti Shannon za bakterijsko združbo znotraj posameznih vinogradov: a) vinograd EKO10, b) vinograd EKO35, c) vinograd EKO3, d) vinograd KON. Osi predstavljajo fizično razdaljo (m), merjeno od vzorca 1, s koordinatami (0,0).

4.5 PRIMERJAVA PESTROSTI MIKROBNE ZDRUŽBE MED VINOGRADI

Z analizo perMANOVA smo preverjali kakšna je pestrost mikrobnih združb med vinogradi. Ugotovili smo, da se pestrost tako glivne kot bakterijske združbe med vinogradi statistično značilno razlikuje ($p < 0,05$) (preglednica 5).

Preglednica 5: Analiza perMANOVA za glivno in bakterijsko združbo glede na vinograd (število permutacij = 999).

Vir variance	Prostostne stopnje	Vsota kvadratov	Srednja vrednost kvadratov	Vrednost F	R ²	Vrednost p
Glivna združba						
Vinograd	3	1,48	0,49	4,16	0,1	0,001
Ostanki	116	13,74	0,12		0,9	
Vsota vrednosti	119	15,22			1	
Bakterijska združba						
Vinograd	3	1,06	0,35	8,44	0,2	0,001
Ostanki	128	5,36	0,04		0,8	
Vsota vrednosti	131	6,42			1	

Ne moremo pa izključiti, da so ti rezultati pridobljeni naključno, saj je test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin (funkcija betadisper) pokazal visoko pestrost med vzorci znotraj posameznega vinograda (preglednica 6), kar bi lahko vplivalo na rezultat analize perMANOVA. Pestrost mikrobnih združb je bila namreč statistično značilna že med samimi vzorci tal znotraj istega vinograda ($p < 0,05$).

Preglednica 6: Test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin glivne in bakterijske združbe glede na vinograd (število permutacij = 999).

Vir variance	Prostostne stopnje	Vsota kvadratov	Srednja vrednost kvadratov	Vrednost F	Vrednost p
Glivna združba					
Skupine	3	0,54	0,18	6,03	0,00
Ostanki	116	3,46	0,03		
Bakterijska združba					
Skupine	3	0,39	0,13	19,42	0,00
Ostanki	128	0,86	0,01		

4.5.1 Primerjava pestrosti mikrobne združbe tal v vrsti in prostoru med vrstami

Dodatno smo želeli preveriti, ali se mikrobna pestrost tal v vrsti razlikuje od pestrosti v medvrstnem prostoru znotraj vinograda.

Pri glivni in bakterijski združbi je analiza perMANOVA pokazala, da ni značilnih razlik v pestrosti mikrobne združbe med vrsto in medvrstnim prostorom, saj je pri obeh vrstah združb $p > 0,05$ (preglednica 7), kar pomeni, da je ničelna hipoteza (H_0 = ni razlik v varianci med vrsto in potjo) statistično značilna.

Preglednica 7: Analiza perMANOVA glivne in bakterijske združbe glede na položaj znotraj vinograda (vrsta ali medvrstni prostor) (število permutacij = 999).

Vir variance	Prostostne stopnje	Vsota kvadratov	Srednja vrednost kvadratov	Vrednost F	R ²	Vrednost p
Glivna združba						
Položaj	1	0,07	0,07	0,51	0,0	0,85
Ostanki	118	15,15	0,13		1,0	
Vsota vrednosti	119	15,22			1,0	
Bakterijska združba						
Položaj	1	0,02	0,02	0,50	0,0038	0,86
Ostanki	130	6,40	0,05		0,9962	
Vsota vrednosti	131	6,42			1,0	

Tudi test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin je pokazal, da ni razlik v variancah med posameznimi vzorci vrste in medvrstnega prostora znotraj vinogradov ($p > 0,05$) (preglednica 8).

Preglednica 8: Test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin glivne in bakterijske združbe glede na položaj znotraj vinograda (vrsta ali medvrstni prostor) (število permutacij = 999).

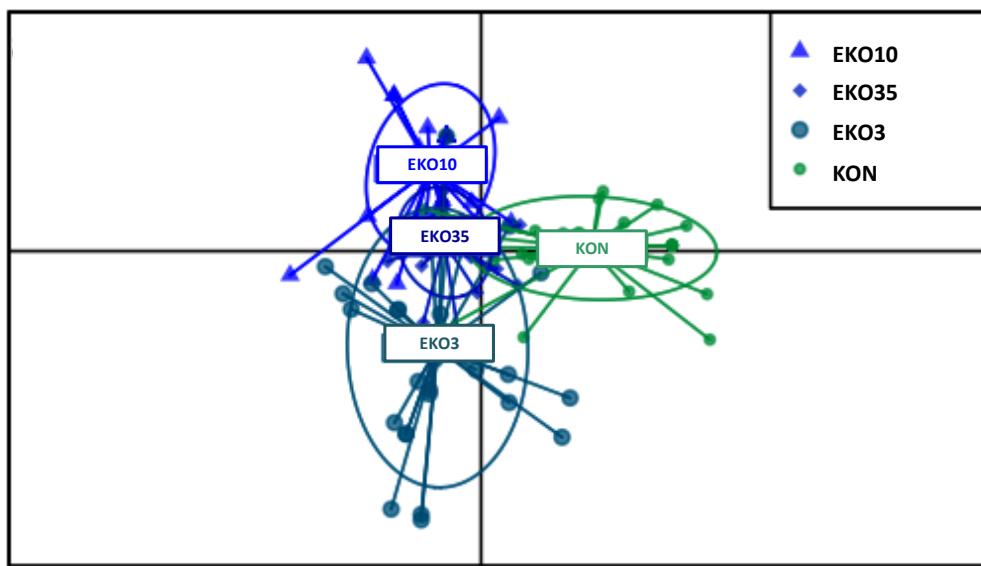
Vir variance	Prostostne stopnje	Vsota kvadratov	Srednja vrednost kvadratov	Vrednost F	Vrednost p
Glivna združba					
Skupine	1	0,05	0,05	1,41	0,25
Ostanki	118	3,95	0,03		
Bakterijska združba					
Skupine	1	0	0	0,01	0,94
Ostanki	130	1,36	0,01		

4.6 PRIMERJAVA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE MED VINOGRADI

Za primerjavo strukture mikrobne združbe med vinogradi smo uporabili metodo DAPC, ki nam je grafično prikazala kako se vinogradi med seboj ločijo glede na genetsko strukturo glivne (slika 9) in bakterijske združbe (slika 10). DAPC je razlikoval vinograde z različnimi stopnjami uspešnosti.

4.6.1 Struktura glivne združbe

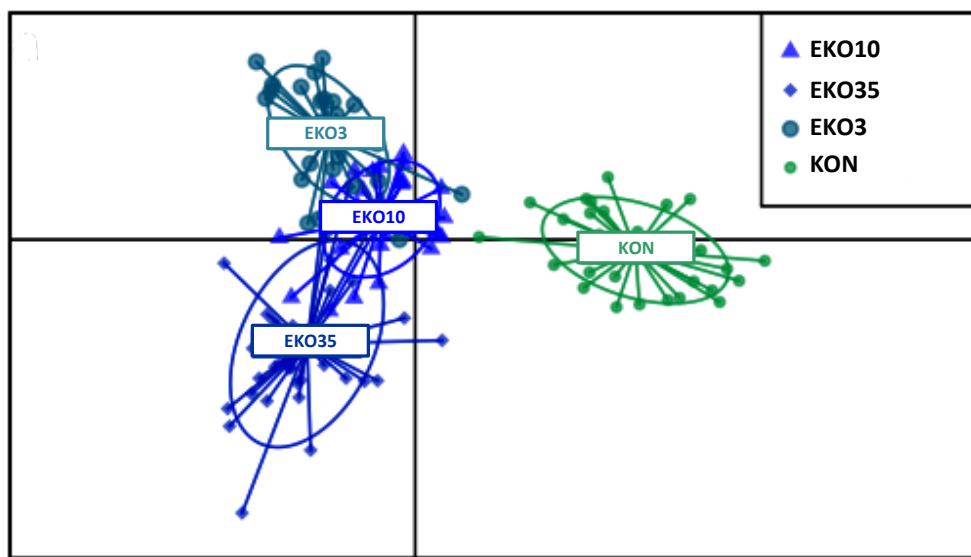
Pri glivni združbi nam je DAPC določil 2 diskriminantni funkciji (DA), ki imata visoko lastno vrednost. Diskriminantna funkcija 1 z lastno vrednostjo 53,3 je dobro ločila vinograd KON od ostalih vinogradov. Tako so si vinogradi EKO10, EKO35 in EKO3 po strukturi med seboj podobni, vinograd KON pa je različen. Diskriminantna funkcija 2, ki ima lastno vrednost 43,3 je uspešno ločila vinograd EKO10 in EKO3 od preostalih dveh. DAPC je pokazal veliko prekrivanje vinograda EKO35 z ostalimi vinogradi. Tudi obe DA sta vinograd EKO35 najslabše ločili od preostalih. Po strukturi glivne združbe se torej vinograda EKO3 in KON najbolj razlikujeta od ostalih dveh, vinograd EKO35 pa je ostalim najbolj podoben.



Slika 9: Raztreseni graf diskriminantne analize glivnih komponent (DAPC) za glivno združbo s centroidi vsakega vinograda.

4.6.2 Struktura bakterijske združbe

DAPC je pri primerjavi bakterijske združbe (slika 10) vinograde ločil z višjo stopnjo kot pri glivni združbi, tako smo dobili jasnejše ločitve med vinogradi, kar kaže višja lastna vrednost prve DA, ki znaša 307,3. Ta nam je zelo dobro ločila vinograd KON od preostalih treh, kar pomeni, da se struktura bakterijske združbe v tleh vinograda KON zelo razlikuje od strukture preostalih vinogradov. Manj uspešno je prva DA ločila vinograd EKO10 od vinograda EKO35 in EKO3, kar kaže, da so si ti vinogradi po strukturi podobni. Druga DA z lastno vrednostjo 96,1 je med seboj uspešno ločila vinograda EKO35 in EKO3.



Slika 10: Raztreseni graf diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC) za bakterijsko združbo s centroidi vsakega vinograda.

4.6.3 Uspešnost analize DAPC

4.6.3.1 Glivna združba

V preglednici 9 so predstavljeni rezultati uspešnosti razvrščanja neznanih vzorcev v ustrezen vinograd za glivno združbo. In sicer vidimo, da je funkcija DA manj uspešno ustrezno uvrstila vzorce iz vinograda EKO10 in EKO35. 56 % vzorcev iz vinograda EKO10 je funkcija DA pravilno uvrstila, 33 % vzorcev je uvrstila v vinograd EKO35 in 11 % vzorcev v vinograd KON. Še manj uspešna je bila pri razvrščanju vzorcev iz vinograda EKO35, kjer je pravilno uvrstila le 33 % vzorcev, poleg tega je enak delež uvrstila tudi v vinograd KON. Preostale vzorce je uvrstila v vinograd EKO10 in vinograd EKO3. Iz tega lahko sklepamo, da sta si vinograd EKO10 in EKO35 po strukturi glivne združbe podobna. Pri ostalih dveh vinogradih je stopnja uspešnosti višja. V vinograd EKO3 je bilo pravilno uvrščenih 67 % vzorcev, 22 % jih je DA uvrstila v vinograd EKO35 in 11 % vzorcev v vinograd KON. Najbolj uspešno je DA uvrstila vzorce iz vinograda KON, kjer je skoraj vse (89 %) uvrstila v ustrezen vinograd. Preostali del vzorcev iz vinograda EKO pa je bil uvrščen v vinograd EKO35.

Preglednica 9: Stopnja uspešnosti (%) pravilne razvrstitev neznanih vzorcev glivnih združb v ustrezen vinograd na podlagi diskriminantnih funkcij pridobljenih z metodo diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC).

Vinograd	Stopnja uspešnosti (%)			
	EKO10	EKO35	EKO3	KON
EKO10	56	22	0	0
EKO35	33	33	22	11
EKO3	0	11	67	0
KON	11	33	11	89

4.6.3.2 Bakterijska združba

Malo bolje je DAPC razvrstil vzorce glede na strukturo bakterijske združbe (preglednica 10). V vinogradu EKO35 in EKO3 je pravilno uvrstil 56 % vzorcev. Ostale je uvrstil v sosednje vinograde. 22 % vzorcev iz vinograda EKO35 je uvrstil v vinograd EKO10 in enak delež vzorcev v vinograd EKO3. Vzorci iz vinograda EKO3 pa so bili uvrščeni v vinograd EKO10 in EKO35.

Zelo uspešno je ločil vinograda EKO10 in KON, saj je 89 % vzorcev iz posameznega vinograda uvrstil v ustrezen vinograd. 11 % vzorcev iz vinograda EKO10 je uvrstil v vinograd EKO3 in enak odstotek vzorcev iz vinograda KON je uvrstil v vinograd EKO10.

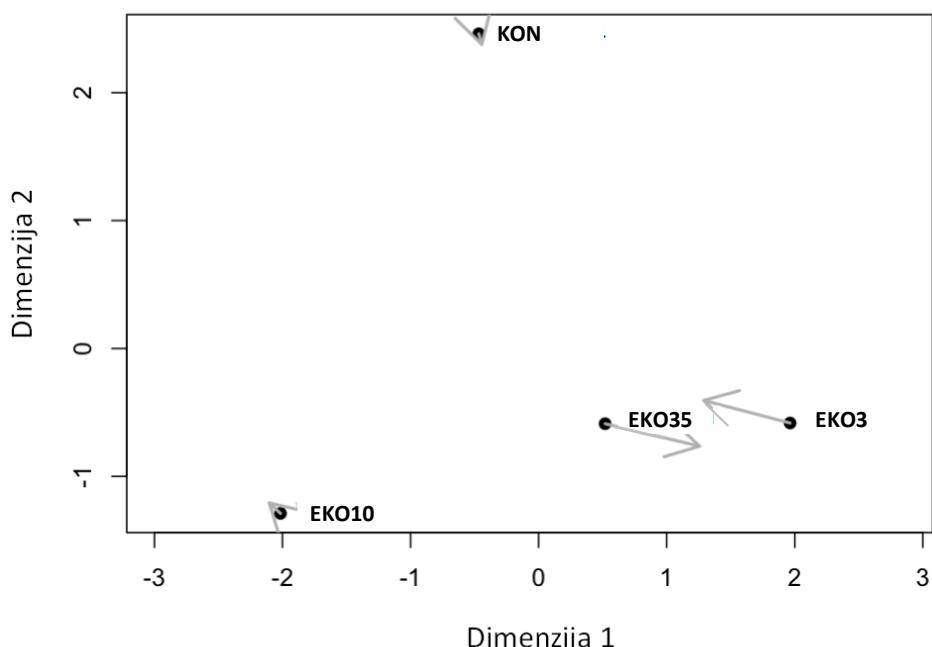
Preglednica 10: Stopnja uspešnosti (%) pravilne razvrstitev neznanih vzorcev bakterijskih združb v ustrezen vinograd na podlagi diskriminantnih funkcij pridobljenih z metodo diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC).

Vinograd	Stopnja uspešnosti (%)			
	EKO10	EKO35	EKO3	KON
EKO10	89	22	22	11
EKO35	0	56	22	0
EKO3	11	22	56	0
KON	0	0	0	89

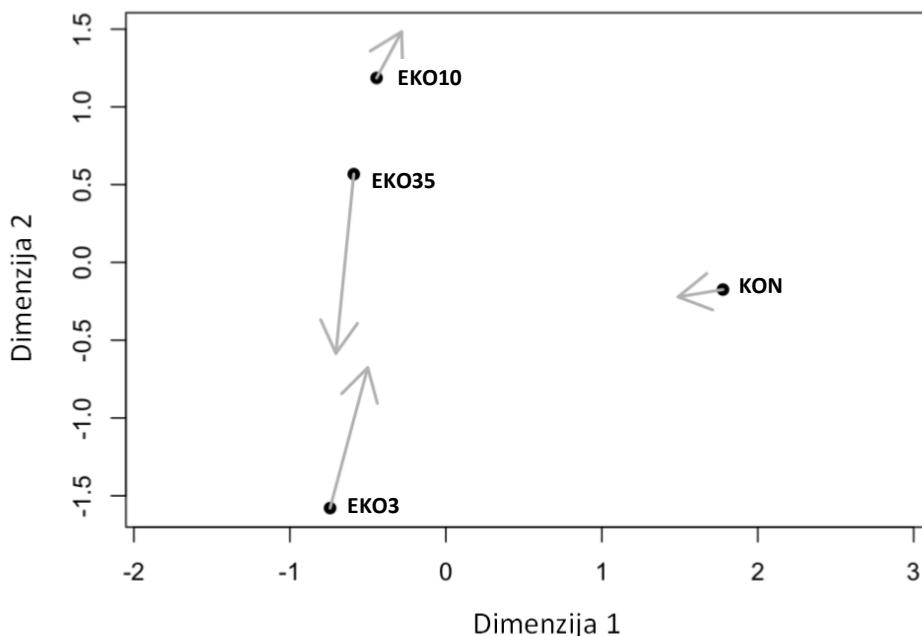
4.6.4 Primerjava strukture mikrobne združbe glede na lokacijo vinograda

Analiza Prokrustes je pokazala, da fizična razdalja med vinograji nima signifikantnega vpliva na strukturo mikrobne združbe. Rezultati so prikazani v obliki ordinacijskega diagrama (slika 11 in slika 12), kjer pika ponazarja podatke iz matrike mikrobne družbe, konec puščice podatke iz matrike fizičnih razdalj med vinograji in dolžina puščica velikost ostankov (neujemanje med ordinacijskima diagramoma). Pri glivni in bakterijski združbi imata vinograda EKO10 in KON najmanjše prokrustove ostanke, kar pomeni, da sta med

seboj in ostalima dvema vinogradoma dobro ločena v obeh ordinacijah (združba in razdalja). Nasprotno, je analiza vinogradoma EKO35 in EKO3 določila velike prokrustove ostanke, kar kaže, da je kljub majhni fizični razdalji med vinogradoma, mikrobnna združba v teh dveh vinogradih različna in da na njuno združbo v tleh lokacija vinograda nima vpliva.



Slika 11: Ordinacijski diagram (RDA) Prokrustove analize vpliva fizične razdalje med vinogradi na strukturo glivne združbe. Črne pike ponazarjajo ordinacijo glivne združbe, konice puščic ordinacijo fizičnih razdalj med vinogradi in dolžina puščic velikost prokrustovih ostankov.



Slika 12: Ordinacijski diagram (RDA) Prokrustove analize vpliva fizične razdalje med vinogradi na strukturo bakterijske združbe. Črne pike ponazarjajo ordinacijo bakterijske združbe, konice puščic ordinacijo fizičnih razdalj med vinogradi in dolžina puščic velikost prokrustovih ostankov.

4.7 PRIMERJAVA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE

Rezultati Mantelovega testa (preglednica 11), ki smo ga izvedli s primerjavo Bray-Curtisovih matrik neenakosti med glivno in bakterijsko združbo, so pokazali, da je v vinogradih EKO35, EKO3 in KON korelacija med združbama statistično neznačilna ($p > 0,05$), v vinogradu EKO10 pa statistično značilna ($p < 0,05$).

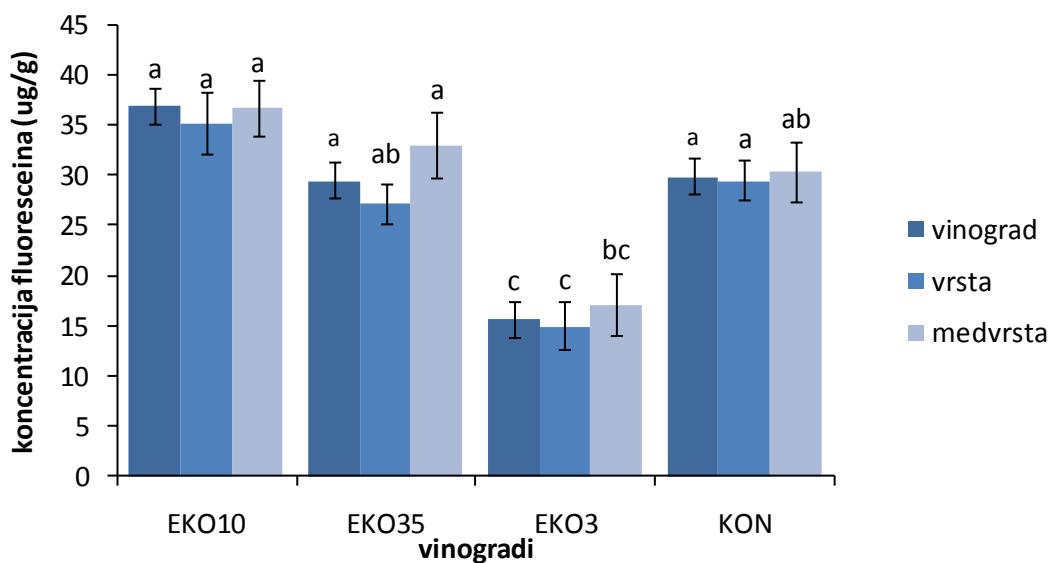
Preglednica 11: Rezultati Mantelovega testa distančnih matrik (Bray-Curtisov indeks) med glivno in bakterijsko združbo za posamezen vinograd (št. permutacij = 1000).

Obravnavani vinogradi	Mantelov R	Vrednost p
EKO 10	0,12	0,03
EKO 35	0,03	0,34
EKO 3	0,07	0,22
KON	0,03	0,7

4.8 AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE V TLEH

Mikrobsko aktivnost smo določili spektrofotometrično z merjenjem koncentracije fluoresceina, ki nastane po hidrolizi FDA. Koncentracija fluoresceina je linearna z mikrobsko aktivnostjo.

Dvosmerna analiza variance (ANOVA) je pokazala, da se mikrobske aktivnosti tal razlikujejo med vinogradi ($p < 0,05$) (Priloga D). In sicer smo z enosmerno ANOVA s testom Tukey HSD ugotovili, da se mikrobska aktivnost v tleh vinograda EKO3 statistično pomembno razlikuje od preostalih vinogradov, saj je $p < 0,05$. Tu smo tudi izmerili najnižjo koncentracijo fluoresceina, ki je bila za približno polovico nižja kakor pri ostalih vinogradih (slika 13). Najvišjo koncentracijo smo izmerili v tleh vinograda EKO10 (36,3 $\mu\text{g/g}$), vendar ni statistično značilna. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik med vrsto in medvrstnim prostorom ($p > 0,05$), kar pomeni, da je mikrobska aktivnost neodvisna od mesta v vinogradu.



Slika 13: Koncentracije fluoresceina ($\mu\text{g/g}$) v vzorcih tal glede na celoten vinograd, vrsto, in medvrstni prostor. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike ($p < 0,05$). Prikazana so povprečja in standardne napake.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Primerjava bakterijske in glivne združbe v tleh znotraj vinograda

V preteklih raziskavah so ugotovili, da mikroorganizmi v tleh niso razporejeni enakomerno, temveč so organizirani v skupine, vroče točke, kjer so okoljski pogoji najbolj ugodni za njihovo rast (Torsvik in Øvreås, 2002). To velja tudi za naše vzorčene mikrobne združbe. Na podlagi Shannonovega indeksa pestrosti, s katerim smo ocenili biološko pestrost v eni mikrobnii združbi (v enem talnem vzorcu), smo namreč ugotovili, da je pestrost znotraj posameznega vinograda zelo variabilna. Pri tem nismo opazili nobenega specifičnega vzorca, ki bi nam povedal v katerem predelu vinograda je pestrost večja ali manjša. Tako je v vsakem vinogradu več mest, ki imajo zelo visoko ali zelo nizko mikrobeno pestrost. Bolj variabilno talno pestrost smo opazili pri bakterijski združbi, kjer je bilo v vinogradih prisotnih več točk z visoko ali nizko mikrobeno pestrostjo kot pri glivni združbi. Visoko mikrobeno pestrost znotraj vinogradov nam je pokazal tudi test multivariatne homogenosti razpršenosti skupin, ki nam je ocenil, da se mikrobne združbe statistično značilno razlikujejo med posameznimi vzorci. To smo pričakovali, saj o visoki heterogenosti mikrobnih združb v manjšem območju tal poročajo številne raziskave (Vos in sod., 2013), pri čemer se mikrobne združbe tal med seboj razlikujejo celo na milimetrski skali (Grundmann, 2004). Vrednosti izmerjenih indeksov bakterijske in glivne pestrosti so podobne indeksom mikrobeno pestrosti v tleh kmetijskih zemljišč (Babujia in sod., 2014; Zhong in sod., 2010) in naravnih kopenskih ekosistemov (Fierer in Jackson, 2006).

5.1.2 Primerjava bakterijske in glivne združbe tal glede na vrsto in medvrstni prostor v vinogradu

Pestrost in aktivnost bakterijske ter glivne združbe tal se med vrsto in medvrstnim prostorom ni razlikovala. V skladu s tem so tudi vse analizirane fizikalno-kemijske lastnosti tal, ki se prav tako glede na lokacijo vzorčenja (vrsta/medvrstni prostor) statistično značilno ne razlikujejo. Pričakovali smo ravno nasprotno, saj se v vrstah obravnavanih vinogradov izvajajo drugačni agrotehnični ukrepi (uporaba FFS in gnojil), kot v medvrstnem prostoru. Fitofarmacevtska sredstva se uporabljam samo v vrstah vinogradov za zaščito vinske trte. Kljub temu se vsebnost skupnega bakra, ki se ga največkrat uporablja za zaščito vinske trte pred glivnimi okužbami, v tleh vrste in medvrstnega prostora ne razlikuje. Nasprotno so sicer ugotovili v raziskavi Mackie in sod. (2013). Razlog za to je lahko zanos kapljic bakrovega pripravka pri škropljenju v medvrstni prostor, saj ne moremo preprečiti zanašanja fitofarmacevtskih sredstev izven ciljnega območja tretiranja. Pri tem moramo poudariti, da so izmerjene koncentracije

skupnega bakra v tleh vseh obravnavanih vinogradov višje od vsebnosti v mediteranskih vinogradih (Rusjan in sod., 2007; Likar in sod., 2015) in celo višje od opozorilne emisijske vrednosti (100 mg/kg) (Uredba o mejnih ..., 1996), kar kaže na kopičenje bakra v tleh. Ker je vsebnost skupnega bakra zelo visoka, sklepamo, da je le-ta vplival tudi na mikrobne združbe tal (Mackie in sod., 2013), saj je strupenost bakra za bakterije v čisti kulti lahko vidna že pri celokupni koncentraciji 0,05 mg/kg (Sato in sod., 1986), na bakterijsko združbo v tleh pa pri koncentraciji 10 mg/kg (Maliszewska in sod., 1985).

Gnojenje se izvaja samo v vrstah ob trtah in ne tudi v medvrstnem prostoru. Kljub temu se pestrost in aktivnost mikrobne združbe tal v vrstah ni razlikovala glede na tla medvrstnega prostora. Vpliva mineralnih gnojil na mikrobne združbe tal, niso ugotovili že v raziskavah Peacock in sod. (2001) in Stark in sod. (2007). V vinogradih EKO, kjer se vinske trte gnoji z organskimi gnojili (hlevski gnoj), smo pričakovali, da bo v tleh vrste višja vsebnost skupne organske snovi kakor v tleh medvrstnega prostora, a se kljub temu vsebnosti statistično značilno niso razlikovale. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da so lastnosti tal in posledično pestrost ter aktivnost mikrobnih združb v obravnavanih vinogradih neodvisne od ukrepov, ki se jih izvaja v vrstah vinogradov.

5.1.3 Primerjava bakterijske in glivne združbe tal med vinogradi

Pri primerjavi strukture mikrobne združbe tal med vinogradi, smo ugotovili, da se mikrobnia združba v tleh vinograda KON najbolj razlikuje od mikrobnih združb ostalih vinogradov. To velja za bakterijsko in za glivno združbo. Vinograd KON je sicer konvencionalen, vendar je bolj usmerjen v ekstenzivno vinogradništvo, pri čemer poskuša upoštevati tudi smernice integriranega vinogradništva, ki je vmesna stopnja med ekološko in konvencionalno pridelavo grozja (Integrirana ..., 2016). Razlike v strukturi mikrobne združbe ne moremo pripisati drugačnemu načinu pridelave grozja, saj na podlagi pedološke karte Slovenije sklepamo, da imajo obravnavni ekološki vinogradi drugačen tip tal kakor konvencionalen (Digitalna ..., 2016). To pa lahko vpliva tudi na pH (Cerdà, 1999) in posledično na sestavo mikrobne združbe (Fierer in Jackson, 2006; Rousk in sod., 2010). Vrednost pH tal je namreč v vinogradu KON v povprečju za 1,5 enote nižja kot v tleh ekoloških vinogradov, zaradi česar je verjetno struktura mikrobne združbe v tleh vinograda KON drugačna kakor v tleh ekoloških vinogradov. Vrednost pH lahko vpliva tudi na aktivnost mikroorganizmov (Rousk in sod., 2009), vendar pa naši rezultati tega ne kažejo, saj razlika v aktivnosti mikrobne združbe med vinogradom KON in EKO35 ni statistično značilna. pH tal ne vpliva na mikrobnio združbo samo direktno, ampak lahko tudi preko ostalih lastnosti tal, kot je aktivnost encimov, dostopnost hrani, lastnosti organskega ogljika in vsebnosti vode (Rousk in sod., 2009).

Razlika v strukturi mikrobnih združb tal med vinogradi bi bila lahko tudi zaradi različne tekture tal. Vinograd KON ima namreč ilovnata tla, vinogradi z oznako EKO pa peščeno ilovnata. Velikost delcev ne vpliva samo na strukturo mikrobne združbe, temveč lahko tudi na biomaso in pestrost mikroorganizmov tal, ki je večja v frakcijah z manjšimi talnimi delci (Sessitsch in sod., 2001). Večja mikrobna pestrost bi torej morala biti v tleh vinograda KON in najmanjša v tleh vinograda EKO3, ki je imel v tleh najvišji delež peska. Vendar zaradi visoke variabilnosti mikrobnih združb znotraj posameznega vinograda, ki je vplivala na rezultate statističnega testa, ne moremo trditi, da so se vinogradi med seboj razlikovali tudi po mikrobnii pestrosti tal.

Struktura in aktivnost bakterijske in glivne združbe je bila v tleh najmlajšega vinograda (EKO3) drugačna kakor v tleh najstarejšega ekološkega vinograda (EKO35). V slednjem so prisotne tudi točke z najvišje izmerjenim indeksom mikrobne pestrosti. Kljub temu, da ležita drug ob drugim, je njuna mikrobna združba različna, kar je potrdila tudi analiza Prokrustes. Različno mikrobno združbo tal med vinogradoma EKO3 in EKO35 smo pričakovali, saj so vinograd EKO3 ob zasaditvi prekopali, kar je verjetno povzročilo prerazporeditev organske snovi in hranil, kot tudi mikroorganizmov (Kandeler in sod., 2005). Poleg tega tudi tri leta od zasaditve, tla še niso bila popolnoma zatravljena, saj je bilo prisotnih le nekaj zelnatih trajnic. Rastlinska pestrost je bila tako manjša kakor v vinogradu EKO35, ki je imel po celotni površini zeleni pokrov. Razlika v strukturi in nižji aktivnosti mikrobne združbe v tleh vinograda EKO3 je tako verjetno posledica nižje vsebnosti organske snovi v tleh zaradi manjše količine rastlinskih ostankov in nižje vsebnosti razpoložljivega fosforja, ki se je v vinogradu EKO3 zaradi obdelave tal verjetno razredčil (Kuramae in sod., 2011; Moreno in sod., 2009; Mathew in sod., 2012; Rejec, 2016). Na spremembo v mikrobeni združbi kaže tudi nižja koncentracija izolirane DNA iz vzorcev tal vinograda EKO3. Višja mikrobna pestrost v tleh najstarejšega vinograda je verjetno povezana z višjo rastlinsko pestrostjo (Lopez in sod., 2014), vendar pa tega ne moremo zagotovo trditi, saj so v tleh vinograda EKO10, ki ima prav tako zeleni pokrov in podobne lastnosti tal kot vinograd EKO35, indeksi mikrobne pestrosti najnižji od vseh obravnavanih vinogradov.

Vinograd EKO3 lahko smatramo kot ekosistem, ki je na začetku sekundarne sukcesije. To je vrsta ekološke sukcesije, procesa obnove ekosistema, ki nastane po motnji, katera je delno spremenila vrstno in funkcionalno sestavo združbe (manjši požari v naravi, oranje njiv) (Cline in Zak, 2015). Vinograd EKO35 je to stopnjo že presegel in so se med organizmi v tleh in rastlinami verjetno že vzpostavile stabilne interakcije. Da ekološka sukcesija vpliva tudi na mikroorganizme in ne samo na rastline, ki so bile pogost predmet raziskav o sukcesiji, so potrdile tudi novejše študije (Kuramae in sod., 2011; Lozano in sod., 2014; Cline in Zak, 2015). Vinograd EKO10 lahko predstavlja ekosistem, ki je na vmesni stopnji sukcesije med začetno stopnjo in stopnjo na kateri je vinograd EKO35. Zato bi pričakovali, da bo struktura mikrobne združbe podobna strukturi v tleh obeh vinogradov

EKO3 in EKO35. To velja samo za bakterijsko združbo, medtem ko je struktura glivne združbe v tleh vinograda EKO10 najbolj podobna združbi tal vinograda EKO35, od združbe EKO3 pa je najbolj ločena.

5.1.4 Primerjava strukture glivne združbe z bakterijsko združbo v tleh vinogradov

Bakterijsko združbo je test DAPC pri primerjavi vinogradov glede na strukturo boljše ločil kakor glivno združbo, kar kaže, da je bakterijska združba tal v primerjavi z glivno, bolj občutljiva na abiotske in biotske dejavnike, oz. se nanje hitreje odzove. Bakterije naj bi bile bolj občutljive na spremembo v pH tal (Lauber in sod., 2008), saj so tolerantne na spremembe v ožjem spektru pH kot glive (Rousk in sod., 2010). Ugotovili smo, da se v vseh vinogradih, razen v EKO10, glivna združba tal na dejavnike, ki vplivajo na mikrobnost pestrost odziva drugače kakor bakterijska združba. Dejavniki, ki imajo večji vpliv na bakterijsko združbo kot na glivno, so poleg pH, še prisotnost težkih kovin (Rajapaksha in sod., 2004), vsebnost vode v tleh (Singh in sod., 2009) in pomanjkanje dušika (Carney in sod., 2007). Obratno pa na glivno združbo bolj vpliva obdelava tal (Hendrix in sod., 1986; Drenovsky in sod., 2010).

V magistrski nalogi smo preučevali mikrobeno združbo tal do globine 15 cm, kjer je številčnost in aktivnost mikroorganizmov največja (Frey, 2015). Kljub temu, bi bilo zanimivo, analizirati tudi globlje predele, saj večina korenin vinske trte dosega globino 20-50 cm (Mullins in sod. 1992). Mikrobeno združbo bi lahko preučili še podrobneje, tako da bi z določitvijo značilnega nukleotidnega zaporedja določili vrste bakterij in gliv, ki v združbi prevladujejo in poskušali ugotoviti kakšen vpliv ima ekološka pridelava grozdja na bakterije, ki fiksirajo dušik in na mikorizne glive, ki pomagajo rastlinam pri privzemuhranil. Možnost bi bila tudi preučitev združbe arhej, ki so v tleh sicer manj številčne, vendar imajo prav tako pomembno vlogo pri kroženju ogljika in dušika v tleh, še posebno aerobne krenarheje (Herrmann in sod. 2008).

5.2 SKLEPI

- Pestrost bakterijske in glivne združbe se med vinogradi razlikuje, vendar pa so velike razlike v pestrosti tudi znotraj posameznega vinograda. Tako so v posameznem vinogradu prisotne točke z zelo visoko in zelo nizko mikrobnou pestrostjo tal.
- Razlike v mikrobnii pestrosti in aktivnosti tal med vrsto in medvrstnim prostorom v vinogradu niso statistično značilne, prav tako tudi ne razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih tal.
- Na strukturo bakterijske in glivne združbe ima največji vpliv pH in tekstura tal.
- Struktura glivne in bakterijske združbe je v tleh najstarejšega ekološkega vinograda različna od strukture v tleh najmlajšega vinograda, ki je brez zelenega pokrova. V slednjem je izmerjena tudi najnižja mikrobna aktivnost.
- Bakterijska in glivna združba tal se na okoljske dejavnike odzivata različno.

6 POVZETEK

Najbolj številčen in pester ekosistem so tla. V njih je največ bakterij in gliv, pri čemer jih je v 1 gramu prsti lahko tudi več kot 10^4 različnih vrst. Tako velika pestrost je potrebna, če želimo, da so tla rodovitna, saj so mikroorganizmi ključni pri razgradnji organske snovi in mineralizaciji, s čimer omogočajo vračanje hranil nazaj v tla, da jih rastline lahko porabijo za svojo rast. Velika pestrost pa je tudi dokaz, da je v tleh veliko mikrolokacij, v katerih prevladujejo različni okoljski pogoji, na katere se morajo organizmi prilagoditi, če želijo preživeti. Tudi zaradi poseganja človeka v naravo, so se fizikalno-kemijske lastnosti tal spremenile in posledično vplivale na sestavo združbe mikroorganizmov, ki v takem okolju funkccionirajo. Tak primer je vinogradništvo, ki je v Vipavski dolini zelo pogosta kmetijska dejavnost. Pri tem veliko veljavno dobiva ekološka pridelava grozdja.

V naši raziskavi smo preučevali pestrost, aktivnost in strukturo bakterijske in glivne združbe v zgornjem sloju tal (do 15 cm) ekoloških vinogradov, ki so različno stari in v konvencionalnem vinogradu, ki ima drugačno teksturo in pH. Ugotovili smo, da je mikrobna pestrost znotraj posameznega vinograda zelo različna in da so prisotne točke, kjer je pestrost zelo visoka ali zelo nizka. Mikrobna pestrost in aktivnost se kljub drugačnim vinogradniškim ukrepom (gnojenje, škropljenje) v vrsti ne razlikuje od tal v medvrstnem prostoru, kakor tudi ne fizikalno-kemijske lastnosti tal. Pri primerjavi vinogradov med seboj smo opazili, da je struktura mikrobne združbe v tleh konvencionalnega vinograda drugačna kakor v tleh ostalih vinogradov, kar je verjetno posledica razlik v talnih lastnostih, posebno pH in tekture tal. Ne moremo pa trditi, da je to razlog zaradi različne pridelave grozdja. Vpliv na strukturo mikrobne združbe ima verjetno tudi starost vinograda, saj se je najmlajši vinograd po strukturi mikrobne združbe tal dobro ločil od najstarejšega. Pri tem pa je glavni razlog še ne popolnoma zarasla površina z zelnatimi trajnicami po obdelavi tal in razredčitev organske in mineralne snovi. Med seboj so se boljše ločile strukture bakterijskih združb, kakor glivnih, na podlagi česar menimo, da so bakterije bolj občutljive na abiotiske in biotske dejavnike. Poleg tega smo tudi ugotovili, da razen v vinogradu EKO10 med bakterijsko in glivno združbo tal ni statistično značilne korelacijske, kar pomeni, da se združbi na okoljske dejavnike odzivata različno.

V tem magistrskem delu smo dokazali, da so tla biološko zelo heterogen ekosistem in da na bakterijske ter glivne združbe vplivajo lastnosti tal, še posebno pH in tekstura tal. Zanimivo bi bilo še raziskati kako spremembe v lastnostih tal in mikrobnih združbah vplivajo na biološke procese v tleh ter posledično na rodnost vinske trte in kakovost grozdja ter vina.

7 VIRI

Adam G., Duncan H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 943-951

Analiza stanja ekološkega kmetijstva. 2016. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Republika Slovenija.

www.mkgp.gov.si/si/delovna_področja/kmetijstvo/ekolosko_kmetovanje/analiza_stanja_ekoloskega_kmetovanja/ (6.6.2016)

ARB SILVA. 2013.

<http://www.arb-silva.de/> (november 2013)

Babujia L.C., Silva A.P., Nogueira M.A., Hungria M. 2014. Microbial diversity in an Oxisol under no-tillage and conventional tillage in southern Brazil. *Revista Ciência Agronômica*, 45, 5: 863-870

Bending G.D., Rodríguez-Cruz M.S., Lincoln S.D. 2007. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere*, 69: 82-88

Böhme L., Langer U., Böhme F. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109: 141-152

Brandt K.K., Frandsen R.J.N., Holm P.E., Nybroe O. 2010. Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 748-757

Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C. 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102: 151-161

Buckley D.H., Schmidt T.M.. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5: 441-452

Callec C. 2004. The complete encyclopedia of wine. Lisse, Rebo International: 320 str.

Carney K.M., Hungate B.A., Drake B.G., Megonigal J.P. 2007. Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 4990-4995

Cerdà A. 1999. Parent material and vegetation affect soil erosion in eastern Spain. *Soil Science Society of America Journal*, 63: 362-368

- Chu H., Lin X., Fujii T., Morimoto S., Yagi K., Hu J., Zhang J. 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2971-2976
- Ciesielski S., Bułkowska K., Dabrowska D., Kaczmarczyk D., Kowal P., Mozejko J. 2013. Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic archaea changes in an anaerobic digester. *Current Microbiology*, 67: 240-248
- Cline L.C., Zak D.R. 2015. Soil microbial communities are shaped by plant-driven changes in resource availability during secondary succession. *Ecology*, 96: 3374-3385
- Community Fingerprinting. 2012. Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/Community_Fingerprinting (15.6.2016)
- Corneo P.E., Pellegrini A., Cappellin L., Roncador M., Chierici M., Gessler C., Pertot I. 2013. Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS Microbiology Ecology*, 84: 588-602
- Cunja R. 1995. Prispevek arheologije k zgodovini vinske trte in vina. V: Dežela refoška: vinogradništvo in vinarstvo slovenske Istre. Darovec D. (ur.). Koper, Zgodovinsko društvo za južno Primorsko in Primorske novice: 37-98
- Cycoń M., Piotrowska-Seget Z., Kaczyńska A., Kozdrój J. 2006. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology*, 15: 639-646
- Dell'Amico E., Mazzocchi M., Cavalca L., Allievi L., Andreoni V. 2008. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiological Research*, 163: 671-683
- Digitalna pedološka karta v merilu 1:25.000, Šempas z okolico. 2016. Infrastrukturni center za pedologijo in varstvo okolja; Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano; Geodetska uprava republike Slovenije (izpis iz baze podatkov)
- Domine A. 2003. Wine. Köln, Könemann: 928 str.
- Drenovsky R.E., Steenwerth K.L., Jackson L.E., Scow K.M. 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecology and Biogeography*, 19: 27-39
- Duplay J., Semhi K., Errais E., Imfeld G., Babcsanyi I., Perrone T. 2014. Copper, zinc, lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): The impact of cultural practices. *Geoderma*, 230-231: 318-328
- Ekelund F., Westergaard K., Soe D. 2000. The toxicity of the fungicide propiconazole to soil flagellates. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 70-77

- Ellis R.J., Morgan P., Weightman A.J., Fry J.C. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3223-3230
- Van Espen P.J., Jansen K.H. 1993. Spectrum evaluation. V: *Handbook of X-ray spectrometry*. Van Grieken R.E., Markowicz A.A. (eds.). New York, M. Decker: 181-293
- Evans B.Y.D.G., Miller M.H. 1990. The role of the external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist*, 114: 65-71
- Fierer N., Breitbart M., Nulton J., Salamon P., Lozupone C., Jones R., Robeson M., Edwards R.A., Felts B., Rayhawk S., Knight R., Rohwer F., Jackson R.B. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7059-7066
- Fierer N., Jackson R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 626-631
- Fisher M.M., Triplett E.W. 1999. Automated Apporach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4630-4636
- Freitas N.D.O., Yano-Melo A.M., Silva F.S.B.D., Melo N.F.D., Maia L.C. 2011. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. *Scientia Agricola*, 68: 223-229
- Frey S.D. 2015. Chapter 8 – The Spatial Distribution of Soil Biota. V: *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Paul E.A. (ed.). 4th ed. Elsevier: 223-241
- Gardens M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- Gnojila. 2016. Kmetijski inštitut Slovenije.
http://kis.dev.splet1.si21.com/Gnojila/Gnojila_1/ (26.5.2016)
- Google Maps. 2016.
<http://maps.google.com/> (22.5.2016)
- Green V.S., Stott D.E., Diack M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 693-701
- Grundmann G.L. 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity-the size of a clone. *FEMS*

Microbiology Ecology, 48, 2: 119-127

Gustav M., Miklavc J. 2001. Ekološko varstvo vinske trte. V: Ekološko kmetijstvo. Bavec M. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 448 str.

Hartmann M., Frey B., Kölliker R., Widmer F. 2005. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: Comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. Journal of Microbiological Methods, 61: 349-360

Hendrix P.F., Parmelee R.W., Crossley D., Coleman D.C., Odum P., Groffman P.M. 1986. Detritus Food in Webs and Conventional Agroecosyste No-tillage. BioScience, 36: 374-380

Herrmann M., Saunders A.M., Schramm A. 2008. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. Applied and Environmental Microbiology, 74: 3279-3283

Hinojosa B.M., Carreira J.A., García-Ruiz R., Rodríguez-Maroto J.M., Daniell T.J., Griffiths B.S. 2010. Plant treatment, pollutant load, and soil type effects in rhizosphere ecology of trace element polluted soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 970-981

Hrvatin M. 2013. Flišne pokrajine. V: Kras Trajnostni razvoj kraške pokrajine. Luthar O., Dobrovoljc H., Pavšek M., Mulec J., Fridl J., Babij V., (ur.). Ljubljana, Založba ZRC: 46 str.

Integrirana pridelava. 2016. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Republika Slovenija.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/integrirana_pridelava
(25.5.2016)

Jacobson A.R., Dousset S., Andreux F., Baveye P.C. 2007. Electron microprobe and synchrotron X-ray fluorescence mapping of the heterogeneous distribution of copper in high-copper vineyard soils. Environmental Science and Technology, 41: 6343-6349

Jombart T., Devillard S., Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics, 11: 94, doi: 10.1186/1471-2156-11-94: 15 str.

Kandeler E., Stemmer M., Gerzabek M.H. 2005. Role of Microorganisms in Carbon Cycling in Soils. V: Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Buscot F., Varma A. (eds.). Nemčija, Springer: 139-153

Kandeler E. 1995. Organic matter by wet combustion. V: Methods in soil biology. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (eds.). Berlin, Springer

Heidelberg: 397-398

Kassem A., Nannipieri P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. London, Academic Press: 576 str.

Komárek M., Čadková E., Chrastný V., Bordas F., Bollinger J.C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. Environment International, 36: 138-151

Kovacs A., Yacoby K., Gophna U. 2010. A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. Research in Microbiology, 161: 192-197

Kreader C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1102-1106

Kump P., Nečemer M., Vogel-Mikuš K., Rupnik Z., Ponikvar D., Pelicon P., Pongrac P., Simčič J., Budnar M. 2007. Improvement of the XRF quantification and enhancement of the combined applications by EDXRF and Micro PIXE. V: First research co-ordination meeting under coordinated research project on “Unification of nuclear spectrometries: integrated techniques as a new tool for materials research”: report: Vienna, 16-20 April, 2007. IAEA, Vienna: 91-95

Kuramae E., Gamper H., Van Veen J., Kowalchuk G. 2011. Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. FEMS Microbiology Ecology, 77: 285-294

Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biology and Biochemistry, 40: 2407-2415

Likar M., Hančević K., Radić T., Regvar M. 2013. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast. Mycorrhiza, 23: 209-219

Likar M., Vogel-Mikuš K., Potisek M., Hančević K., Radić T., Nečemer M., Regvar M. 2015. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. Science of the Total Environment, 505: 724-731

Linderman R.G., Davis E.A. 2001. Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. American Journal of Enology and Viticulture, 52: 8-11

Lisboa F.J.G., Peres-Neto P.R., Chaer G.M., Da Conceição Jesus E., Mitchell R.J., Chapman S.J., Berbara R.L.L. 2014. Much beyond Mantel: Bringing procrustes association metric to the plant and soil ecologist's toolbox. PLoS ONE, 9, 6:

- e101238, doi: 10.1371/journal.pone.0101238: 9 str.
- Lozano Y.M., Hortal S., Armas C., Pugnaire F.I. 2014. Interactions among soil, plants, and microorganisms drive secondary succession in a dry environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 78: 298-306
- Lumini E., Orgiazzi A., Borriello R., Bonfante P., Bianciotto V. 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology*, 12: 2165-2179
- Mackie K.A., Müller T., Zikeli S., Kandeler E. 2013. Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 65: 245-253
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edition. San Francisco, ZDA, Pearson Education: 1061 str.
- Maier R.M., Pepper I.L. 2009. Earth environments. V: *Environmental Microbiology*. Mayer R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (eds.). 2nd ed. Elsevier: 57-81
- Maier R.M. 2009. Biogeochemical Cycling. V: *Environmental Microbiology*. Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (eds.). 2nd ed. Elsevier: 287-318
- Maliszewska W., Dec S., Wierzbicka H., Woźniakowska A. 1985. The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil micro-organisms. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 37: 195-215
- Mandyam K., Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53: 173-189
- Mathew R.P., Feng Y., Githinji L., Ankumah R., Balkcom K.S. 2012. Impact of No-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012: 1-10
- Mavrič Štrukelj M., Brdnik M., Hauptman S., Štabuc R., Novak E., Martinčič J., Škvarč A. 2012. Vinogradniške razmere v Sloveniji danes. V: *Zbornik referatov 4 slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Nova Gorica, Slovenija, 25. in 26. 1. Rusjan D. (ur.)*. Ljubljana: 207-216
- McArthur J.V. 2006. *Microbial Ecology: an evolutionary approach*. Oxford, Academic Press: 432 str.
- Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Cañizares R., Castro J., Benítez E. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 131: 333-339
- Mullins M.G., Bouquet A., Williams L.E. 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge,

Cambridge University Press: 239 str.

Ninkov J., Vasin J., Milic S., Sekulic P. 2014. Copper content and distribution in vineyard soils of central Serbia. Eurasian Journal of Soil Science, 3: 131-137

Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Wagner H. 2010. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-5.
<http://CRAN.R-project.org/package=vegan> (november 2014)

Olsen S.R., Sommers L.E. 1982. Phosphorus. V: Methods of Soil Analysis Part 2. Page A.L., Miller R.H. (eds.). 2nd ed. Madison, Agronomy Monograph 9, ASA and SSSA: 403-430

Parat C., Chaussod R., Lévéque J., Dousset S., Andreux F. 2002. The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. European Journal of Soil Science, 53: 663-669

Peacock A.D., Mullen M.D., Ringelberg D.B., Tyler D.D., Hedrick D.B., Gale P.M., White D.C. 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. Soil Biology and Biochemistry, 33: 1011-1019

Pepper I.L., Gerba C.P., Maier R.M. 2009. Detection, Enumeration and Identification. V: Environmental Microbiology. Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (eds.). 2nd ed. Elsevier: 137-154

Podnebje. 2005. Turistično informacijski center Ajdovščina.
http://www.tic-ajdovscina.si/?vie=cnt&str=5_slo (10.6.2016)

Površina vinogradov in število sadik po starostnih razredih, vinorodne dežele in okoliši, Slovenija, 2009 in 2015. 2016. Statistični urad Republike Slovenije.
http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1528313S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/06_15283_popis_vinogradov/&lang=2 (24.5.2016).

Površina, število vinogradov in število sadik po: vinorodna dežela in okoliš, velikostni razredi, meritve , leto. 2016. Statistični urad Republike Slovenije.
<http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (15.6.2016)

Povzetki klimatoloških analiz; letne in mesečne vrednosti za postajo Bilje v obdobju 1991-2006. 2014. Agencija Republike Slovenije za okolje.
<http://www.ars.si/vreme/podnebje/Bilje06.pdf> (7.6.2016)

Pridelava grozdja v vinogradih (ha, število trt, t, t/ha, kg/trto), Slovenija, letno. 2016.
http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502406S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (24.5.2016)

R Development Core Team. 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing.
<https://www.r-project.org/> (november 2014)

Rajapaksha R.M.C.P., Bååth E., Ba E. 2004. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2966-2973

Ranjard L., Poly F., Lata J.C., Mougel C., Thioulouse J., Nazaret S. 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4479-4487

Rejec M. 2016. Struktura talnih mikrobnih združb v odvisnosti od načina obdelave vinogradniških tal. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 53 str.

Robič D. 2000. Različno razumevanje in pomen biodiverzitete v ekologiji, posebno v fitocenologiji. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 63: 47-93

Ruiz-Colmenero M., Bienes R., Eldridge D.J. Marques M.J. 2013. Vegetation cover reduces erosion and enhances soil organic carbon in a vineyard in the central Spain. *Catena*, 104: 153-160

Rousk J., Baath E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G., Knight R., Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4: 1340-1351

Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1589-1596

Rusjan D., Strlič M., Pucko D., Korošec-Koruza Z.. 2007. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma*, 141: 111-118

Sato C., Schnoor J.L., McDonald D.B. 1986. Characterization of effects of copper, cadmium and nickel on the growth of *Nitrosomonas Europaea*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 403-416

Schreiner R.P., Mihara K.L. 2009. The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera L.*) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia*, 101: 599-611

Schreiner R.P. 2005. Mycorrhizas and mineral acquisition in grapevines. V: Proceedings of the Soil Environment and Vine Mineral Nutrition Symposium. Christensen L.P., Smart D.R. (eds.). American Society for Enology and Viticulture: 49-60

Sessitsch A., Weilharter A., Martin H., Kirchmann H., Kandeler E., Gerzabek M.H. 2001. Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4215-4224

Seznam FFS, dovoljenih v ekološki pridelavi. 2016. Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin; Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/FFS_sezn.asp?L=1&S=2 (7.6.2016)

Seznam registriranih fitofarmacevtskih sredstev. 2016. Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin; Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. <http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/index.htm> (2.11.2016)

Singh B.K., Dawson L.A., Macdonald C.A., Buckland S.M. 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology*, 41: 239-248

Smit E., Leeflang P., Gommans S., Van Den Broek J., Van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2284-2291

Smit E., Leeflang P., Wernars K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 23: 249-261

Stark C., Condron L.M., Stewart A., Di H.J., O'Callaghan M. 2007. Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes. *Applied Soil Ecology*, 35: 79-93

Sukul P. 2006. Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 320-326

Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozja. 2013. Ljubljana, Ministrstvo Republike Slovenije za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. http://www.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/Integrirana_pridelava/TN_IPG_2012.pdf (7.6.2016)

Tom-Petersen A., Leser T.D., Marsh T.L., Nybroe O. 2003. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 46: 53-62

Torsvik V., Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245

Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. l. RS. št. 68/96

Uredba komisije (ES) št. 889/2008 z dne 5. septembra 2008 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 834/2007 o ekološki pridelavi in označevanju ekoloških proizvodov glede ekološke pridelave, označevanja in nadzora. 2008. Ur. l. Evropske unije št. 250/1

Uredba sveta (ES) št. 834/2007 z dne 28. junija 2007 o ekološki pridelavi in označevanju ekoloških proizvodov in razveljavitvi Uredbe (EGS) št. 2092/91. 2007. Ur. l. Evropske unije št. 189/1

Vos M., Wolf A.B., Jennings S.J., Kowalchuk G.A. 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiology Reviews, 37, 6: 936-954

Weingerl V. 2010. Copper and Zinc Accumulation in Vineyard soils Treated with Cu and Zn Containing Phytopharmaceuticals. International Journal of Sanitary Engineering Research, 4: 14-24

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). London, Academic Press: 315-322

Widmer F., Fließbach A., Laczkó E., Schulze-Aurich J., Zeyer J. 2001. Assessing soil biological characteristics : a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses. Soil Biology & Biochemistry, 33: 1029-1036

Yamamoto H., Kadzunori T., Toshiharu U. 1985. Fungal flora of soil polluted with copper. Soil Biology and Biochemistry, 17: 785-790

Zhang Q.C., Shamsi I.H., Xu D.T., Wang G.H., Lin X.Y., Jilani G., Hussain N., Chaudhry A.N. 2012. Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure. Applied Soil Ecology, 57: 1-8

Zhong W., Gu T., Wang W., Zhang B., Lin X., Huang Q., Shen W. 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. Plant and Soil, 326: 511-522

Žežlina I., Škvarč A., Rusjan D., Trdan S. 2010. The efficacy of different spraying programs against two fungal pathogens in organic grape production. Journal of Plant Diseases and Protection, 117: 220-225

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so v kakršnikoli obliki pomagali pri nastajanju te magistrske naloge. Še posebej se zahvaljujem mentorju doc. dr. Matevžu Likar za vse napotke, razlage in spodbudne besede pri pisanju in delu v laboratoriju. Prav tako se zahvaljujem somentorju prof. dr. Blažu Stres za opravljene kapilarne elektroforeze in nasvete pri izvedbi bakterijskega dela analiz.

Za kritičen pregled naloge se zahvaljujem recezентki doc. dr. Marjetki Suhadolc.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin za dobro vzdušje v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre moji družini in najbližnjim prijateljem za motivacijo, prijazne besede in potrpežljivost med samim študijem.

PRILOGA A

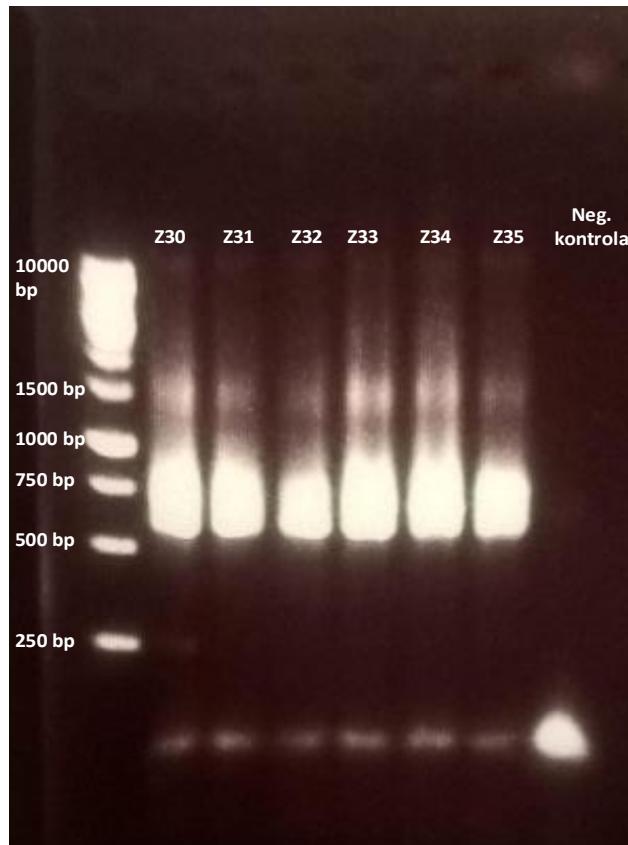
Fizikalno-kemijske lastnosti tal preučevanih vinogradov s povprečnimi vrednostmi in standardno napako (n = 35).

Delež peska (P), delež grobega peska (GP), delež finega peska (FP), delež melja (M), delež grobega melja (GM), delež finega melja (FM), delež gline (G); koncentracije dostopnega fosforja (P) in skupna vsebnost kovin (K-kalij, Ca-kalcij, Cr-krom, Mn-mangan, Fe-žezezo, Ni-nikelj, Cu-baker, Zn-cink, Pb-svinec). Različne črke prikazujejo lastnosti, ki so statistično značilno različne (p<0,05).

Lastnosti tal	EKO10	EKO35	EKO3	KON
Tekstura tal	peščena ilovica	peščena ilovica	peščena ilovica	ilovica
P (%)	56,1 ± 1,1 ^a	54,1 ± 1,3 ^b	70,1 ± 1,7 ^c	49,3 ± 1,0 ^d
GP (%)	29,6 ± 1,0 ^a	17,3 ± 0,9 ^b	51,9 ± 2,2 ^c	21,8 ± 0,5 ^d
FP (%)	26,5 ± 0,8 ^a	36,8 ± 1,2 ^b	18,2 ± 0,9 ^c	27,5 ± 0,9 ^a
M (%)	37,9 ± 0,9 ^a	38,0 ± 1,1 ^a	22,5 ± 1,2 ^b	39,4 ± 1,0 ^a
GM (%)	13,3 ± 0,7 ^b	10,2 ± 0,8 ^a	5,8 ± 0,9 ^c	10,4 ± 0,6 ^a
FM (%)	24,6 ± 0,5 ^b	27,8 ± 0,7 ^a	16,7 ± 1,3 ^c	29,0 ± 0,6 ^a
G (%)	6,1 ± 0,4 ^a	7,9 ± 0,6 ^b	7,4 ± 0,6 ^b	11,3 ± 0,4 ^c
Aktivna kislost	7,48 ± 0,02 ^a	6,91 ± 0,06 ^b	7,35 ± 0,04 ^a	5,85 ± 0,06 ^c
Potencialna kislost	6,94 ± 0,01 ^a	6,17 ± 0,09 ^b	6,75 ± 0,05 ^c	4,91 ± 0,06 ^d
Vsebnost vode (%)	22,1 ± 0,4 ^b	22,8 ± 1,0 ^b	15,3 ± 0,7 ^c	25,7 ± 0,6 ^a
Razpoložljivi P (mg/kg)	6,44 ± 0,82 ^a	14,51 ± 1,39 ^b	3,29 ± 0,15 ^c	9,23 ± 0,57 ^d
Organska snov (%)	2,8 ± 0,1 ^a	2,84 ± 0,09 ^a	0,90 ± 0,04 ^b	3,33 ± 0,09 ^c
K (mg/g)	15,0 ± 2,5 ^a	15,3 ± 3,1 ^a	21,4 ± 2,5 ^b	18,6 ± 2,8 ^{ab}
Ca (mg/g)	9,3 ± 1,6 ^a	12,1 ± 6,2 ^a	10,3 ± 2,7 ^a	6,9 ± 1,4 ^a
Cr (mg/g)	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,08 ^a
Mn (mg/g)	1,4 ± 0,3 ^a	2,7 ± 0,3 ^b	1,6 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,2 ^a
Fe (mg/g)	37,4 ± 1,4 ^c	42,7 ± 1,3 ^{ab}	44,8 ± 1,6 ^a	40,3 ± 1,5 ^b
Ni (mg/g)	0,12 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,03 ^a	0,08 ± 0,02 ^a
Cu (mg/g)	0,29 ± 0,09 ^a	0,28 ± 0,08 ^a	0,16 ± 0,04 ^b	0,27 ± 0,05 ^a
Zn (mg/g)	0,13 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,02 ^a
Pb (mg/g)	0,06 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,01 ^a

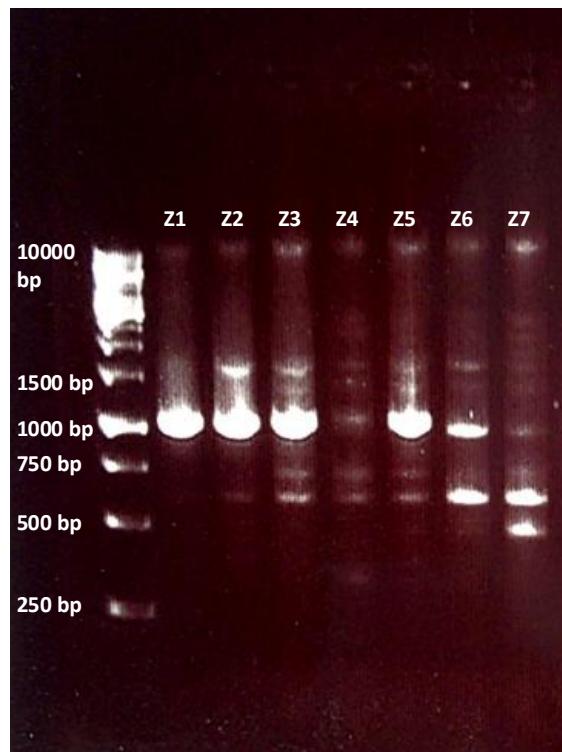
PRILOGA B

Gelska elektroforeze pomnožkov ITS regij ARISA PCR glivnih talnih združb vinograda EKO10 (vzorci združb Z30, Z31, Z32, Z33, Z34, Z35 in negativna kontrola).



PRILOGA C

Gelska elektroforeze nekaterih pomnožkov ITS regij ARISA PCR bakterijskih talnih združb v vinogradu KON (vzorci Z1, Z2 Z3, Z4, Z5, Z6, Z7).



PRILOGA D

Preglednica enosmerne analize varianc (ANOVA) s post hoc testom Tukey HSD mikrobnne aktivnosti med posameznimi vinograji.

(I) vinograd	(J) vinograd	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	Standardna napaka	Statistična značilnost	95% Interval zaupanja	
					Spodnja meja	Zgornja meja
EKO10	EKO35	6,3714	2,54686	0,068	-0,3270	13,0698
	EKO3	20,2733*	2,54686	0,000	13,5749	26,9717
	KON	5,9752	2,54686	0,097	-0,7232	12,6736
EKO35	EKO10	-6,3714	2,54686	0,068	-13,0698	0,3270
	EKO3	13,9019*	2,54686	0,000	7,2035	20,6003
	KON	-0,3962	2,54686	0,999	-7,0947	6,3022
EKO 3	EKO10	-20,2733*	2,54686	0,000	-26,9717	-13,5749
	EKO35	-13,9019*	2,54686	0,000	-20,6003	-7,2035
	KON	-14,2982*	2,54686	0,000	-20,9966	-7,5998
KON	EKO10	-5,9752	2,54686	0,097	-12,6736	0,7232
	EKO35	0,3962	2,54686	0,999	-6,3022	7,0947
	EKO3	14,2982*	2,54686	0,000	7,5998	20,9966

*. Razlika srednjih vrednosti je statistično značilna pri $p < 0,05$.