

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž REJEC

**STRUKTURA TALNIH MIKROBNIH ZDRUŽB V
ODVISNOSTI OD NAČINA OBDELAVE
VINOGRADNIŠKIH TAL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž REJEC

**STRUKTURA TALNIH MIKROBNIH ZDРUŽB V ODVISNOSTI OD
NAČINA OBDELAVE VINOGRADNIŠKIH TAL**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**SOIL MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION IN
DEPENDANCE ON VINEYARD SOIL MANAGEMENT**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija programa druge stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Centru za pedologijo in varstvo okolja. Del analiz je bilo izvedenih na Katedri za genetiko, biotehnologijo, žlahtnjene rastlin.

Komisija za študijska in študentska vprašanja Študija biotehnologije BF je dne 3.2.2014 sprejela temo in za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Natašo Štajner, za somentorico doc. dr. Marjetko Suhadolc, za recenzentko pa prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Nataša ŠTAJNER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Matjaž Rejec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 631.427:631.46:579.26 (043.2)
KG	mikrobnega ekosistema/ zatravljenost medvrstnega prostora/ kakovost tal/ mikrobnega biomasa/ pestrost/ TRFLP/ qPCR
AV	REJEC, Matjaž
SA	ŠTAJNER, Nataša (mentorica) / SUHADOLC, Marjetka (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	SESTAVA TALNIH MIKROBNIH ZDRUŽB V ODVISNOSTI OD NAČINA OBDELAVE VINOGRADNIŠKIH TAL
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XI, 53, [10] str, 11 pregl., 13 sl., 9 pril., 82 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V magistrski nalogi smo preverili učinke načina obdelave medvrstnega prostora na kakovost tal. Primerjali smo tla dveh sosednjih vinogradov v Medani – Goriška Brda, kjer različna obdelava tal poteka že 20 let. Dolgoletna zatravljenost (ZV) je, v primerjavi z obdelovanim (OV) medvrstnim prostorom, vplivala na povečanje vsebnosti skupnega organskega ogljika v tleh (+100 %), ter topnih oblik organskega ogljika (+97 %) in dušika (+243 %). Ugotovili smo, da skupna zaloga ogljika in dušika do globine 30 cm v ZV znaša $81,1 \text{ t C ha}^{-1}$ in $8,6 \text{ t N ha}^{-1}$, v OV pa $40,8 \text{ t C ha}^{-1}$ in 5 t N ha^{-1} . Večja vsebnost organske snovi v ZV je značilno vplivala na povečanje obstojnosti strukturnih agregatov (+134 %), sposobnost tal za zadrževanje vode, kationsko izmenjalno kapaciteto, ter preskrbljenost s hranili. Značilna razlika med ZV in OV je tudi v mikrobnem biomasi, ter sestavi, pestrosti in številčnosti mikrobnih združb. Mikrobnega biomasa je največja v zgornjih 10 cm tal, 650 v ZV in 135 mg mikrobnega C kg ⁻¹ suhih tal v OV. Način obdelave in globina tal vplivata na sestavo in pestrost mikrobnih združb (TRFLP), in sicer imata največji vpliv na glive. Z dolgoletno zatravljenostjo se je značilno povečala številčnost bakterij in krenarhej (qPCR). V obeh vinogradih so najštevilčnejše bakterije, sledijo glive in krenarheje. Dokazali smo pozitivni vpliv dolgoletnega zatravljenja na pomembne kazalce kakovosti tal, v prihodnje pa bi bilo potrebno oceniti še vpliv na mikrobnno pogojene procese v tleh, kot tudi na kakovost pridelka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 631.427:631.46:579.26 (043.2)
CX	microbial ecology/permanent grass cover/ microbial biomass/ soil quality/ diversity / TRFLP/ qPCR
AU	REJEC, Matjaž
AA	ŠTAJNER, Nataša (supervisor)/SUHADOLC Marjetka (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Programme in Biotechnology
PY	2016
TI	SOIL MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION IN DEPENDANCE ON VINEYARD SOIL MANAGEMENT
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XI, 53, [10] p., 13 tab., 11 fig., 9 ann., 82 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>In this study effects of vineyard inter row space soil management on soil quality was evaluated. Soils of two adjacent vineyards in Medana - Goriška Brda were analysed after 20 years of different soil management. Permanent vegetation cover (ZV), compared to tilled (OV) inter row space, increased total soil organic carbon (+100 %), dissolved organic carbon (+97 %) and dissolved nitrogen (+243 %) contents. Total stock of organic carbon and nitrogen within 30 cm of soil depth was in ZV 81,1 t C ha⁻¹ and 8,6 t N ha⁻¹, and in OV 40,8 t C ha⁻¹ and 5 t N ha⁻¹. Higher soil organic matter content in ZV, in comparison to OV, significantly increased aggregate stability (+134 %), water holding capacity, cation exchange capacity and nutrient availability. Difference between ZV and OV was also significant in soil microbial biomass content, composition, diversity and abundance of microbial domains. Most of microbial biomass was in the top 10 cm, 650 and 135 mg microbial C kg⁻¹ of d.m. soil in ZV and OV, respectively. Both, soil management and depth influenced microbial composition and diversity (TRFLP) with most pronounced changes in fungi domain. Permanent vegetation cover significantly increased the abundance of bacteria and crenarchaea in soil (qPCR). In both vineyards bacteria was most abundant, following by fungi and crenarchaea. We have shown positive long-term impact of permanent vegetation on the important soil quality indicators, while impacts on microbialy mediated soil processes and on the crop quality needs to be further investigated.</p>

KAZALO VSEBINE	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
KAZALO PRILOG.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 VINOGRADNIŠTVO IN OBDELAVA TAL.....	3
2.2 KAKOVOST TAL.....	4
2.3 ORGANIZMI V TLEH	6
2.3.1 Bakterije	7
2.3.2 Arheje.....	8
2.3.3 Glive	9
2.3.4 Dejavniki ki vplivajo na združbe mikroorganizmov v tleh	9
2.4 ORGANSKA SNOV V TLEH	10
2.5 DUŠIKOV CIKEL V TLEH.....	11
2.6 METODE V MIKROBNI EKOLOGIJI	13
3 MATERIALI IN METODE DELA	15
3.1 MATERIALI IN OPREMA.....	15
3.2 METODE.....	17
3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev	17
3.2.2 Fizikalne lastnosti tal	19
3.2.2.1 Delež suhe snovi.....	19
3.2.2.2 Volumska gostota tal	19
3.2.2.3 Tekstura in delež skeleta.....	19
3.2.2.4 Sposobnost tal za zadrževanje vode – poljska kapaciteta.....	19
3.2.2.5 Določanje obstojnosti strukturnih agregatov	20
3.2.3 Kemijske lastnosti tal	21

3.2.3.1 pH tal	21
3.2.3.2 Rastlinam dostopni fosfor in kalij	21
3.2.3.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta	21
3.2.3.4 Delež skupnega ogljika (TC) in dušika (TN)	21
3.2.3.5 Določanje mineralnega ogljika (Min C).....	22
3.2.3.6 Delež organskega ogljika in organske snovi	22
3.2.3.7 Določanje skupnega topnega ogljika in dušika	22
3.2.4 Mikrobiološke metode	22
3.2.4.1 Določanje mikrobne biomase	22
3.2.4.2 Izolacija skupne DNK iz vzorca tal.....	24
3.2.4.3 Analiza sestave mikrobnih združb s pomočjo polimorfizma terminalno označenih restriktivskih fragmentov (TRFLP).....	24
3.2.4.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	27
3.3 OBDELAVA REZULTATOV	29
4 REZULTATI	30
4.1 OBSTOJNOST STRUKTURNIH AGREGATOV IN KEMIJSKE LASTNOSTI TAL V ODVISNOSTI OD OBDELAVE	31
4.2 VSEBNOSTI OGLJIKА IN DUŠIKA V TLEH V ODVISNOSTI OD OBDELAVE	33
4.3 MIKROBNA BIOMASA V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL	35
4.4 SESTAVA, PESTROST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL.....	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	40
5.1 RAZPRAVA	40
5.1.1 Vpliv dolgoletne zatravljenosti tal na vsebnost organske snovi in mikrobno biomaso	40
5.1.2 Vpliv dolgoletne zatravljenosti tal na mikrobno sestavo, pestrost in številčnost.....	41
5.1.3 Vpliv dolgoletne zatravljenosti na kakovost tal	42
5.1.4 Vpliv obdelave na trto in njen pridelek	43
5.2 SKLEPI	44
6 POVZETEK	45
7 VIRI	47
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Potencialni kazalci kakovosti tal	5
Preglednica 2: Stopnje obstojnosti strukturnih agregatov	20
Preglednica 3: Sekvence začetnih oligonuleotidov za TRFLP	25
Preglednica 4: Pogoji PCR reakcij	25
Preglednica 5: Pogoji encimskega razreza	26
Preglednica 6: Sekvence začetnih oligonukleotidov za qPCR	27
Preglednica 7: Pogoji qPCR reakcij	28
Preglednica 8: Delež skeleta in volumska gostota tal v zatravljenem (ZV) in obdelanem vinogradu (OV).	30
Preglednica 9: Tekstura in deleži posameznih frakcij talnih delcev v zatravljenem (ZV) in obdelanem vinogradu (OV).	30
Preglednica 10: Poljska kapaciteta, kationska izmenjevalna kapaciteta ter delež bazičnih kationov tal.....	32
Preglednica 11: Rastlinam dostopne vsebnosti P in K, ter pH tal v zatravljenem (ZT) in obdelovanem (OV) vinogradu.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska klasifikacija družine vinikovk	3
Slika 2: Shema časovne dinamike potreb trte po dušiku in sproščanja N iz tal	4
Slika 3: Vpliv pestrosti talnih organizmov na funkcionalno redundanco. Elipse predstavljajo skupine organizmov	6
Slika 4: Filogenetsko drevo življenja	7
Slika 5: Dušikov cikel in z njim povezani geni, najpogosteje uporabljeni pri molekularnih analizah v mikrobeni ekologiji.....	12
Slika 6: Prikaz principa delovanja TRFLP metode s ključnimi tehnologijami	14
Slika 7: Fotografija preučevanih vinogradov in talnega profila na lokaciji na dan vzorčenja.....	18
Slika 8: Satelitski posnetek preučevanih vinogradov v Medani z mikrolokacijami vzorčenja (Google maps, 2015)	18
Slika 9: Obstojnost strukturnih agregatov v vodi, 8mm frakcija po 10 minutah namakanja.....	31
Slika 10: Vsebnosti ogljika in dušika ter njuno razmerje v odvisnosti od globine in obdelave vinogradniških tal.....	34
Slika 11: Vsebnost mikrobnega biomasnega ogljika in skupne talne DNK v odvisnosti od globine in obdelave vinogradniških tal.	35
Slika 12: Analiza glavnih komponent seta TRFLP podatkov bakterijske 16S rDNAK (A), arhejske 16S rDNAK (B), ter glivne ITS rDNAK (C)	38
Slika 13: Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na število terminalnih fragmentov in število bakterij (BAC), gliv (FUN), krenarhej (CRENA).....	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S	gen za ribosomalno RNK
A	adenin
AM	arbuskularne glice angl. Arbuscular Mycorhizae
BSA	goveji serumski albumin angl. Bovine Serum Albumine
bp	bazni pari
C	citozin
CaCl ₂	kalcijev klorid
CEC	kationska izmenjevalna kapaciteta angl. Cation Exchange Capacity
CFE	fumigacija z kloroformom in ekstrakcija angl. Chloroform Fumigation Extraction
CO ₂	ogljikov dioksid
C/N	razmerje med ogljikom in dušikom
CVPO	Center za pedologijo in varstvo okolja
DEPC	dietilpirokarbonat
DNK	deoksiribonukleinska kislina dNTP
DOC	Topni organski ogljik ang. Dissolved Organic Carbon
DON	Topni organski dušik ang. Dissolved Organic Nitrogen
EC	elektrokemičen detektor angl. Electrochemical Cell
EM	ektomikorizne glice angl. Ectomycorrhizae
FAM	6-fluorescein amidite
G	gvanin
G ⁻	gram negativne bakterije
G ⁺	gram pozitive bakterije
hao	gruča genov za encim hidroksilamin oksidoreductazo
IPG	Integrirana pridelava grozdja
ITS	notranja prepisana regija, angl. Internal Transcribed Spacer
k _{EC}	koeficient uspešnosti pobitja mikroorganizmov med fumigacijo
MgCl ₂	magnezijev klorid
MGI	meljasto glinena ilovica
MI	meljasta ilovica
MM	reakcijska mešanica angl. Master Mix
NDIR	nerazpršeni infrardeči detektor, angl. Non-Dispersive Infra-Red sensor
MI	meljasta ilovica
MM	reakcijska mešanica angl. Master Mix

NH ₄ ⁺	amonijev ion
NO ₃ ⁻	nitratni ion
NO ₂ ⁻	nitritni ion
NO	dušikov monoksid
N ₂ O	didušikov oksid
OV	obdelovan vinograd
PCR	verižna reakcija s polimerazo, angl. Polymerase Chain Reaction
PLFA-	Phospholipid-derived Fatty Acids
RNK	ribonukleinska kislina
qPCR	kvantitativni PCR
SN	standardna napakaverižna reakcija s polimerazo, angl. Polymerase Chain Reaction
SDS	natrijev dodecil sulfat, angl. Sodium Dodecyl Sulfate
SMC	mikrobeni biomasni ogljik ang. Soil Microbial Carbon
T	timidin
TAE	tris acetatni EDTA pufer, angl. Tris Acetate EDTA
TN	skupni dušik angl. Total Nitrogen
TOC	skupni topni organski ogljik, angl. Total Organic Carbon
TRFLP	polimorfizem dolžine končnih restrikcijskih fragmentov, angl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
PK	Poljska kapaciteta, t.j. sposobnost tal za zadrževanje vode, angl. Water Holding Capacity
ZV	zatravljen vinograd

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na vsebnost organske snovi v tleh, skupnega ogljika (TC) in dušika (TN), njuno razmerje (TC/TN), skupnega organskega ogljika (TOC), skupnega mineralnega ogljika (min. C), topnih oblik organskega ogljika (DOC) in dušika (DON), njunega razmerja (DOC/DON) skupnega topnega dušika (TNb) in skupnih oblik amonijskega (NH_4) in nitratnega (NO_3) dušika.

Priloga B: Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na mikrobeni biomasni ogljik, količino izolirane DNK, število terminalnih fragmentov bakterij krenarhej in gliv ter število kopij bakterijske, krenarhejske in glivne ribosomalne regije DNK.

Priloga C: Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov bakterijske 16S regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.

Priloga D: Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov krenarhejske 16S regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.

Priloga E: Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov glivne ITS regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.

Priloga F: Založenost tal z ogljikom in dušikom na hektar

Priloga G: Medsebojne odvisnosti spremenljivk – linearna regresija

Priloga H: Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na obstojnost strukturnih agregatov, sposobnost tal za zadrževanje vode, kationsko izmenjevalno kapaciteto, pH, delež baz, vsebnost fosforja in kalija.

Priloga I: Delež organske snovi v preučevanem vinogradu pred 15 leti in trenutnim stanjem

1 UVOD

Tla, rastni medij Zemlje, predstavljajo biološko in kemijsko najbolj raznolik del planeta. Procesi degradacije tal povzročajo zmanjšanje kakovosti tal ali celo njihovo izgubo. Zaskrbljenost zaradi degradacije tal narašča, saj so tla zaradi počasnega nastajanja dejansko neobnovljivi zemeljski vir. Svet evropskih skupnosti opredeljuje osem procesov degradacije tal. Ti so erozija, zmanjšanje vsebnosti organske snovi in biološke pestrosti tal, onesnaževanje, zasoljevanje, zbijanje tal, pozidava, zemeljski usadi in poplave (Predlog ..., 2006).

Tla so kompleksen, dinamičen in predvsem živ sistem. Osnovni gradniki bioloških sistemov so organske molekule, ki v tleh izvirajo iz rastlinskega opada. Organske molekule, na različnih stopnjah razgradnje in povezanosti z mineralnim delom, pa predstavljajo organsko snov tal. Organska snov tal je bistvenega pomena za ohranjanje rodovitnosti in kakovosti tal. Pozitivno vpliva na zračnost in poroznost tal, infiltracijo in zadrževanje vode, ter na vsebnost in zadrževanje hrani. Vpliva tudi na biomaso, številčnost in pestrost talnih organizmov. Kakovostna tla izboljšujejo lastnosti pridelka ter zmanjšujejo vpliv okoljskih stresnih dejavnikov nanj.

Vinogradništvo je najpomembnejša gospodarska dejavnost Goriških Brd in zaseda največji delež kmetijskih površin. Tla v Goriških Brdih so erozijsko ranljiva zaradi matične podlage, talnih lastnosti in reliefa. S primerno obdelavo tal lahko erozijo preprečujemo, ter tako ohranjamo pridelovalno sposobnost kmetijskih površin in hkrati ohranjamo ostale funkcije tal. Številne raziskave so dokazale pozitiven vpliv zatravljenosti v vinogradih in drugih trajnih nasadih za preprečevanje procesov degradacije tal (Olson in sod., 2013; Abdalla in sod., 2013; Ruiz-Colmenero in sod., 2011). Z zatravljanjem vinograda sprožamo akumulacijo organske snovi v tleh. To so na lokaciji v Medani dokazali tudi Suhadolc in sod., (2000). Izsledki raziskav so se dobro implementirali v prakso, saj se delež površin zatravljenih vinogradov v Goriških brdih povečuje. Leta 2001 je znašal le 18 odstotkov, leta 2006 68 odstotkov, danes pa ta delež presega 80 odstotkov (Register ..., 2015).

S ponovnim vzorčenjem na isti lokaciji v Medani smo žeeli raziskave še poglobiti s širšim naborom metod za določanje kakovosti tal. V raziskovalni nalogi smo uporabili fizikalne in kemijske metode za določanje osnovnih pedoloških parametrov kakovosti tal. Mikrobična pestrost, razlike v sestavi in številčnost mikroorganizmov pa smo določili s pomočjo biotehničkih molekularnih metod. Za določanje mikrobne biomase smo izbrali metodo kloroformove fumigacijske ekstrakcije in količino skupne izolirane DNK. Določanje mikrobne pestrosti in sprememb v sestavi smo izvedli z metodo polimorfizma dolžine končnih restrikcijskih fragmentov (TRFLP ang. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) bakterijskega in arhejskega gena za 16S rDNK in glivne ITS regije. Metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) pa smo uporabili za določanje števila mikroorganizmov iz domen bakterij, krenarhej in gliv.

1.1 NAMEN DELA

Naš namen je bil z analizo izbranih fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti tal ugotoviti vpliv dolgoletnega zatravljenja medvrstnega prostora na kakovost tal. Posebno pozornost smo namenili biološkim parametrom kakovosti tal in sicer mikrobeni biomasi, sestavi in številčnosti posameznih mikrobnih domen.

Preučevali smo sosednja vinograda rebule na evtričnih rjavih tleh v Medani v Goriških Brdih s podobnimi geološkimi, klimatskimi in hidrološkimi lastnostmi. Oba vinograda sta bila pod enako rabo in tehnologijo najmanj 5 let, preden so vinograd na eni izmed lokacij zatravili. Tla na obeh lokacijah smo vzorčili po 20 letih spremenjene obdelave, v nadaljevanju zatravljen (ZV) in obdelovan vinograd (OV).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- (i) Vsebnost organske snovi in hranil bo večja v ZV kot v OV, razlike bodo z globino manjše.
- (ii) Biomasa in pestrost mikrobnih združb arhej, bakterij in gliv bo večja v ZV v primerjavi z OV.
- (iii) Številčnost mikrobnih združb krenarhej, bakterij in gliv, bo v ZV večja kot v OV.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 VINOGRADNIŠTVO IN OBDELAVA TAL

Za družino vinikov je značilna rast na oporo s pomočjo vitic.

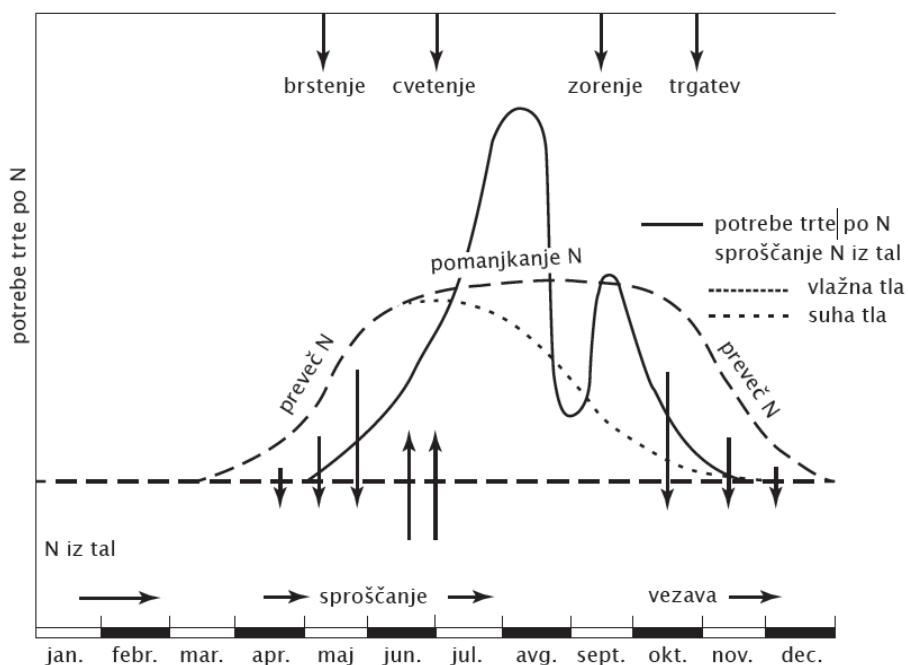


Slika 1: Taksonomska klasifikacija družine vinikov

Kljub veliki vrstni pestrosti je 90 odstotkov pridelanega grozja sad vrste *Vitis vinifera* L., saj jo odlikujejo izjemna rodnost, dobre organoleptične lastnosti ter toleranca na apnenec in sušo. V zadnjih letih pa pridobivajo na pomenu nove sorte – križanci ameriške in evrazijske vrste. Te so manj dovzetne za glivične bolezni kot sta oidij in peronospora. Cilj žlahtniteljev je bil iz ameriških vrst prenesti odpornost na glivične okužbe ter ohraniti dobre organoleptične lastnosti evrazijskih vrst (Slika 1).

Koreninski sistem vinske trte zaseda do 100 m², sega do 30 m globoko in do 10 m na široko. Večina vitalnih - absorbirajočih koreninskih poganjkov je skoncentriranih na globini do 1 m. (Keller, 2010). Trta dobro raste tudi na siromašnih tleh, saj za svojo rast ne potrebuje veliko hranil. Pretirano gnojenje povzroča slabšo kvaliteto grozja ter poveča dovzetnost za bolezni. Vsekakor pa je potrebno poznati preskrbljenost tal z makro in mikroelementi, kajti le tako lahko zagotovimo dobro rodnost in poskrbimo, da vračamo v tla hranila, katera smo s pridelkom odvezeli iz vinograda. Trta je najbolj občutljiva na pretirano gnojenje z dušikom. Potreba po dušiku je v začetni fazи rasti zagotovljena iz zalog v lesu in koreninah, kjer se je akumuliral v prejšnji rastni sezoni. Sprejem dušika iz talne raztopine se začne takoj po cvetenju in doseže največjo vrednost konec julija, ko dosežejo jagode velikost graha. V zatravljenih vinogradih je v času velikih potreb trte po dušiku, priporočljivo mulčenje travne ruše s tem povečamo sproščanje dušika iz travne biomase (Slika 2). Na ta način omogočimo sproščanje/mobilizacijo in mineralizacijo dušika ter preprečimo, da bi naravna vegetacija tekmovala za hranila. Na ta način lahko ob zadostni prisotnosti humusa (min 3 % za težka tla) zadostimo potrebam trte po dušiku. Fosfor in kalij zelo počasi potujeta po talnem horizontu, zato je med globljim prekopavanjem potrebno založno gnojenje glede na kemijske analize tal. Najpomembnejši pogoj za pravilno prehranjenost trte je zagotavljanje

dobrih zračno vodnih razmer za talne organizme, ki mineralizirajo hranila ter tako zagotavljajo prehranjenost skromne trte (Mihelič in sod., 2010).



Slika 2: Shema časovne dinamike potreb trte po dušiku in sproščanja N iz tal (Mihelič in sod., 2010)

Medvrstni prostor v vinogradniških tleh je lahko trajno ali kraktkotrajno ozelenjen, zastiran s pomočjo naravnih ali umetnih zastirk ali gol – obdelovan. Po tehnoloških navodilih za intergriano pridelavo grozdja (IPG) v Sloveniji je v času od 1. novembra do fenološke faze B-C (odpiranje brstov) prepovedana vsaka obdelava tal, tla morajo biti v tem obdobju prekrita s travno rušo ali organsko zastirko. Tla v vinogradu lahko pridelovalci vključeni v IPG zastirajo le z organskimi zastirkami (slama, lubje, sekanci, kompost,...) ali naravno ozelenitvijo. Od začetka fenološke faze B-C do 31.10. je na primorskem dovoljena plitka obdelava tal (podrahlanje, kultiviranje) a se pri tem mora ohranjati groba struktura tal, prepovedana je obdelava s frezo. Uporaba herbicidov je dovoljena le v pasu pod trtami, ta pas ne sme presegati 25 odstotkov površine vinograda. Ti ukrepi preprečujejo erozijo tal v zimskih mesecih in zagotavljajo ohranjanje strukture in biološke aktivnosti tal – kakovosti tal med vegatacijsko dobo (Tehnološka ..., 2015).

2.2 KAKOVOST TAL

Kakovost tal je možno ovrednotiti s tremi skupinami kazalcev – fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi. Vsi ti parametri nam opisujejo posamezne lastnosti tal, ki jih moramo povezovati in vrednotiti z vidika delovanja tal. Glede na direktivo evropske komisije so glavne funkcije tal pridelava hrane in druge biomase, skladiščenje ogljika, hranil in vode, regulacija

toplogrednih plinov, razgradnja in vezava onesnažil. Hkrati so tla vir biotske pestrosti, temelj večine človeških dejavnosti, ter arhiv geološke ter arheološke dediščine (Predlog..., 2006).

Med fizikalne kazalce kakovosti prištevamo globino tal, teksturo, skelet, poroznost, volumsko gostoto, poljsko kapaciteto, obstojnost strukturnih agregatov in druge. Kemijski kazalci so količina organske snovi, pH, električna prevodnost, kationska izmenjevalna kapaciteta, vsebnost in dostopnost hranil ter drugi. Biološki kazalci temeljijo na količini, aktivnosti in pestrosti talne flore, favne, mikroorganizmov ter metabolnih ciklov in pripadajočih encimov (Preglednica 1) (Sharma, in sod., 2010; Suhadolc, 2013).

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

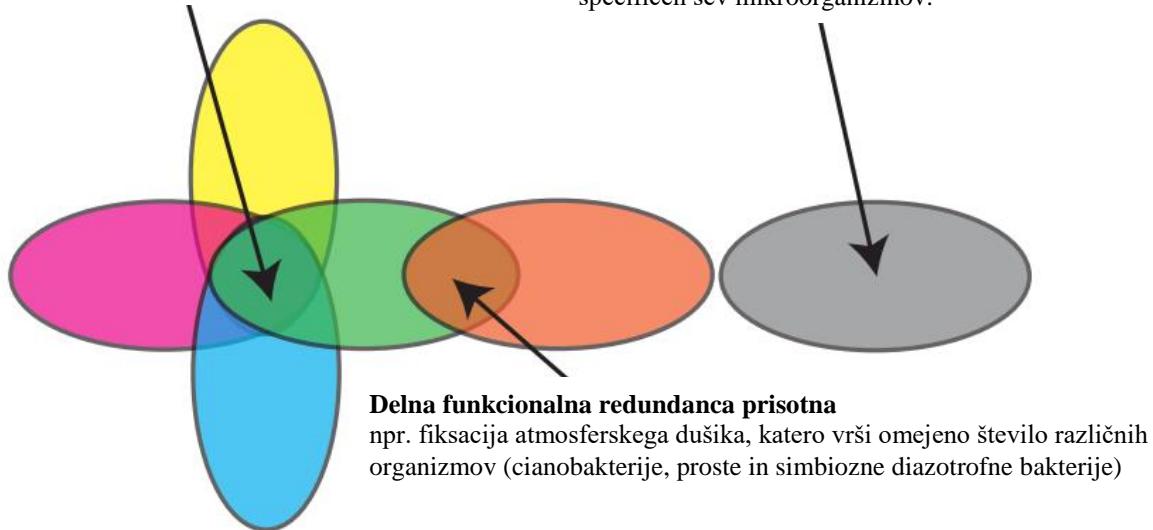
Fizikalni kazalci	Kemijski kazalci	Biološki kazalci
- globina tal	- pH	Biomasa
- tekstura	- vsebnost organske snovi	- mikrobnna biomasa (SIR, PLFA, CFE, DNK, ...)
- volumska gostota	- založenost s hranili in dostopnost	- talne živali (deževniki, nematode, ...)
- skelet (delež in velikost)	- C/N razmerje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

Kakovostna tla se lahko vrednoti tudi z vidika sposobnosti ohranjanja njihovih funkcij ob spremenjenih pogojih v tleh zaradi človeških in/ali okoljskih dejavnikov (European ..., 2010). Večja pestrost talnih mikroorganizmov zagotavlja funkcionalno redundanco (*ang. redundancy*). Tako ob izgubi določene skupine organizmov njihovo funkcijo prevzame druga skupina, katera je spremembo v okolju preživila. V primeru manjše pestrosti, funkcionalna redundanca ni prisotna, zato je nevarnost izgube funkcije ob spremembji okoljskih pogojev večja (npr. suša, onesnaženje, ...) (Slika 3).

Primer izgube funkcionalnosti so arbuskularne mikorizne (AM) glice in dušik fiksirajoče bakterije, katerih koristne storitve v številnih agroekosistemih niso več prisotne, saj jih namesto njih izvaja človek z dovajanjem hranil. Rastline tako ne potrebujejo več uslug mikroorganizmov ter zaprejo dotok koreninskih eksudatov, ki so prehranjevali le te (Werner in Kiers, 2014).

Visoka stopnja funkcionalne redundance.
npr. razgradnjo enostavnih organskih molekul
vrši veliko število različnih vrst talnih
mikroorganizmov.

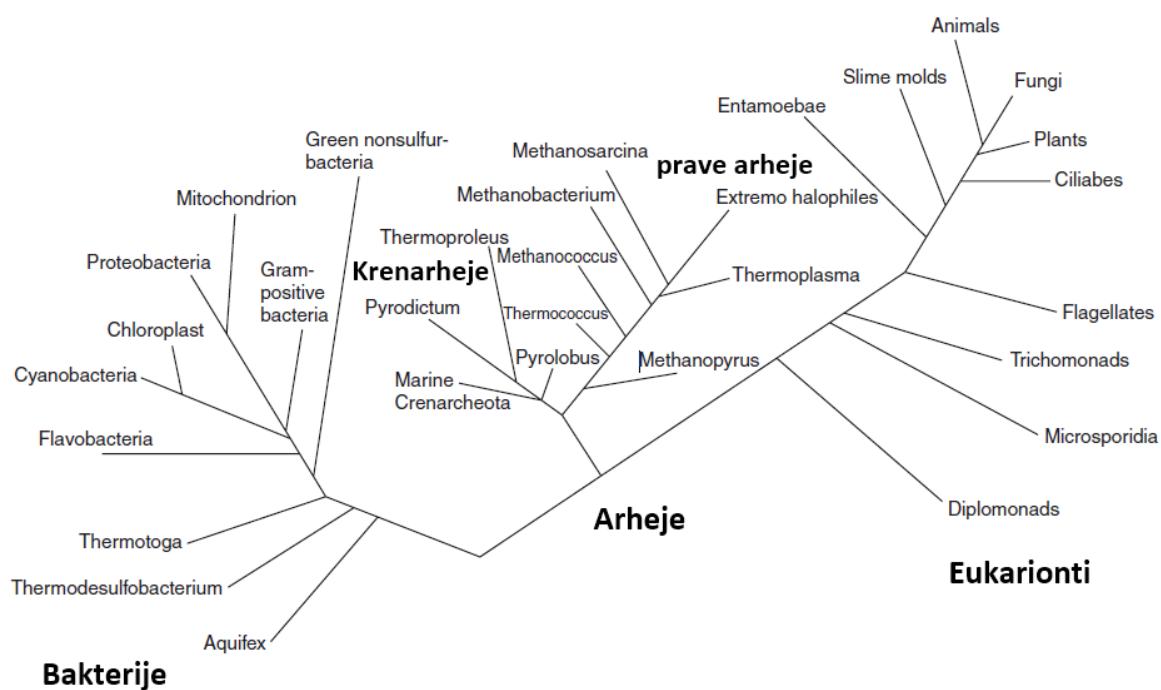
Funkcionalna redundanca ni prisotna
npr. razgradnja težko razgradljivih aromatskih
ogljikovodikov, za katero encim poseduje le
specifičen sev mikroorganizmov.



Slika 3: Vpliv pestrosti talnih organizmov na funkcionalno redundanco. Elipse predstavljajo skupine organizmov (European ..., 2010)

2.3 ORGANIZMI V TLEH

Tla so osnovna komponenta ekosistema in podpirajo zelo širok spekter življenjskih oblik, te pa opravljajo veliko število za ekosistem pomembnih funkcij. Organizme v tleh lahko razdelimo na talne živali in talne mikroorganizme. Talne živali so pomembni kazalci kakovosti tal in jih delimo na mikrofavno (praživali), mezofavno (nematode, pršice, skakači, ...), makrofavno (deževniki, mravlje, polži, ličinke insektov, ...) in megafavno (talni vretenčarji). Talne živali so pomembne za premeščanje organske snovi in seljenje mikroorganizmov na nove lokacije (Plaster, 2009).



Slika 4: Filogenetsko drevo življenja (Barton in Northup, 2011)

Mikroorganizmi predstavljajo največji delež žive biomase tal, v grobem jih lahko delimo na prokarionte (bakterije in arheje) ter eukarionte (glive, alge in praživali) (Slika 4). Glavna funkcija talnih mikroorganizmov je recikliranje. Njihovo veliko razmerje med površino in volumnom jim omogoča hitro privzemanje hranil in posledično hitro rast. Razgrajujejo organske molekule, tvorijo strukturne aggregate ter s svojimi funkcijami omogočajo kroženje osnovnih hranil (C, H, N, O, P, S) in energije v kopenskih ekosistemih. S svojo prisotnostjo vplivajo na rast in prehrano rastlin ter pojavnost rastlinskih patogenov. Okoljski in antropogeni dejavniki lahko povzročijo spremenjanje življenjskega okolja talnih mikroorganizmov, kar pa posledično vpliva na sestavo mikrobnih združb (Paul, 2015).

2.3.1 Bakterije

Bakterije so enocelični organizmi, velikosti med $0,2 - 2 \mu\text{m}$, brez celičnih organelov. Običajno rastejo v kolonijah in so različnih oblik (okrogle, paličaste, zavite in vijačne). Nekatere se povezujejo v verige, druge tvorijo mrežaste sestave podobne glivnim. V tleh so najbolj razširjene in najbolj številčne med mikroorganizmi. Po biomasi dominirajo v nevtralnih bazičnih tleh, zaraščenih s travami. Zaradi svoje majhnosti so manj občutljive na obdelavo tal, zato dominirajo na oranah tleh (Plaster, 2009). Skupno število bakterijskih celic na gram tal je med 10^7 in 10^{10} (Raynaud in Nunan, 2014)

Metabolno so bakterije najbolj raznoliki organizmi in lahko izrabljajo različne vire energije, zaradi česar lahko zasedajo veliko različnih ekoloških niš in opravljajo različne funkcije. Večina bakterij v tleh je kemoheterotrofnih, ki porabljajo za svojo rast lahko razgradljive topne organske molekule. Aktinomicete so poleg ostalih bakterij pomembne za razgradnjo kompleksnejših organskih ostankov rastlin in živali, hkrati pa so prilagojene na talno okolje z nižjo vodno aktivnostjo, ne prenašajo pa kislih tal. Kemoavtotrofne bakterije uporabljajo reducirane anorganske spojine (amonij, vodik, sulfit,...) ter jih v metabolizmu oksidirajo. To jim služi kot vir energije za fiksacijo ogljika v svojo biomaso. Med kemoavtotrofne mikroorganizme prištevamo tudi amonij oksidirajoče (nitrifikatorske) bakterije. Njihova rast je sicer precej počasnejša od heterotrofnih bakterij, vendar izvajajo pomembno ekološko funkcijo v ciklu dušika in drugih elementov. Večina bakterij je aerobnih, nekatere pa uporabljajo tudi nitrat in sulfat kot sprejemnik elektronov namesto kisika (Aislabie in Deslippe, 2012).

2.3.2 Arheje

Arheje prav tako kot bakterije spadajo med prokarionte, a se od bakterij razlikujejo. Talne arheje lahko delimo na domeni proteoarchaeota in euriarchaeota. Zgradba celične membrane je za razliko od bakterijske zgrajena iz fosfolipidov z eterskimi vezmi med lipidom in glicerolom, in ne esterskimi kot pri bakterijah. Lipidi celične membrane arhej sestavljajo večinoma razvezjani izoprenoidi z vključki ciklopropana ali cikloheksana. Pri nekaterih ekstremofilnih arhejah pa se namesto lipidnega dvosloja formira fosfolipidni monosloj teretaetrov. Od bakterijskih celic se arhejske razlikujejo tudi po celični steni, saj ta ne vsebuje peptidoglukana ampak pseudomurein, parakristalinične proteine in druge glikoproteine. Te lastnosti omogočajo arhejam življenje v ekstremnih pogojih, kot so nizki in visoki pH-ji ter pri visokih temperaturah. Arheje imajo tako kot bakterije krožno DNK, a ja ta pri nekaterih arhejah kondenzirana s histoni in ne z girazo, hkrati pa je na krožnem kromosому več mest za replikacijo, medtem ko je pri bakterijah samo eno. Prav tako so arheje po mehanizmu prepisa genov v RNK bližje eukarionskim celicam, kot bakterijskim (Paul, 2015).

Raziskovanje arhej nas je pripeljalo do spoznanj o njihovi vlogi pri kroženju ogljika in dušika. Metanogene arheje so striktni anaerobi in sodelujejo z bakterijami pri anaerobni razgradnji organske snovi. Prek redukcije/cepitve acetata na metan in ogljikov dioksid, sodelujejo v ciklu ogljika. V cikel dušika kot tudi ogljika pa se vključujejo aerobne krenarheje. Zaradi svojega aerobnega miksotropnega metabolizma lahko v tleh opravljajo več funkcij od bakterij, vendar so pri presnovi od njih počasnejše (Karlsson in sod., 2012). Krenarheje posedujejo gene za oksidacijo amonija – *amo* gene (Treusch in sod., 2005), medtem ko prave arheje (metanogene) vsebujejo *nif* gene za njegovo fiksacijo (Santos in sod., 2012).

2.3.3 Glive

Glive so eukariontski heterotrofni mikroorganizmi. Imajo celično steno zgrajeno iz glukana in hitina. Razen enoceličnih kvasovk je značilna rast večine gliv v obliki hif, te pa tvorijo micelij. Filamentozna rast jim omogoča premostitev zračnih žepov v tleh, zaradi česar so manj občutljive na zmanjšano vodno aktivnost. Razmnožujejo se s pomočjo spor, ki so lahko spolne ali nespolne (Paul, 2015).

Glive v ekosistemu opravljajo veliko funkcij, za tvorbo in rodovitnost tal so zlasti pomembni saprotrofi, mikorize in lišaji. Lišaji so dokaz, kako močne so simbolične interakcije med glivami in fotosintetskimi organizmi. Sposobni so fiksacije C in N v biomaso tudi pri ekstremnih pogojih, kot so sušne in mrzle površine kamnin, kjer pomembno prispevajo pri tvorbi tal iz matične kamine. Glive lišajem priskrbijo vodo in v njej raztopljeni mineralni hrani, v zameno pa prejemajo v fotosintezi sintetizirane organske molekule. Takšne simbolične interakcije so prisotne tudi med višjimi rastlinami in glivami. Primer so AM glive, katere prodirajo znotraj rastlinske celice in tvorijo le manjše micelije, medtem ko ektomikorizne (EM) glive naseljujejo medcelični prostor. Te so še posebej pomembne za komunikacijo med rastlinami, ki so povezane z micelijem. EM glive so saprofiti ter si zaradi interakcije z rastlinami lahko prvoščijo sintezo energetsko bolj potratnih encimov, kateri razkrajajo težje razgradljive organske molekule. Izločanje teh encimov na koncih hif jim omogoča penetracijo v organske molekule kot sta hitin, lignin ter v organo-mineralne komplekse kot je humus. V okolje se sproščajo lažje razgradljive organske molekule, ki jih porablja prokarionti in druge glive. S tem povečujejo biomaso in raznovrstnost mikroorganizmov v tleh. Glive povzročajo zlepjanje talnih delcev prek formacije hif in z izločanjem njihovih celičnih komponent. Tvorijo se stabilne strukture, te pa pozitivno vplivajo na kakovost tal (Paul, 2015).

2.3.4 Dejavniki ki vplivajo na združbe mikroorganizmov v tleh

V poglavju o kakovosti tal smo se dotknili sposobnosti talnih mikroorganizmov na prilaganje okoljskim in antropogenim dejavnikom (Slika 3). Tla so biološko zelo pester in heterogen ekosistem, saj so razlike med posameznimi talnimi agregati na isti lokaciji lahko večje kot v primerjavi z več kilometrov oddaljenim vzorcem (Paul, 2015). Ta heterogenost populacij mikroorganizmov je posledica dejstva, da so tla (pedosfera) najbolj kompleksen habitat na zemlji.

Pedosfera je preplet delovanja živilih organizmov (biosfere), matične podlage (litosfere), vode (hidrosfere), atmosfere in podnebja, ti dejavniki pa so umeščeni v časovni okvir. Glavni medsebojno odvisni dejavniki, ki vplivajo na lastnosti mikrohabitata in s tem v njih živečih mikroorganizmov, so temperatura in njena nihanja, dosegljivost vode, pH in redoks potencial, matična kamnina, globina ter prisotna biota.

Vemo, da je v tleh z manj vode več gliv in aktinobakterij, medtem ko je v mokrih tleh več anaerobnih in sulfat reducirajočih bakterij (Paul 2015). Obdelava tal sproža zmanjšanje biomase gliv, hkrati pa poveča biomaso G⁺ bakterij (Drenovsky in sod., 2010). Zaradi hipnega vnosa velike količine organske snovi, obdelava tal sproža razrast hitro metabolizirajočih mikroorganizmov (r-strategist), pri čemer v biomasi dominirajo bakterije nad arhejami. V stabilnem – zatravljenem talnem ekosistemu se oblikujejo stabilni talni agregati, tako se poveča heterogenost mikrokokolij, ta pa omogočajo soobstoj več različnih kolonij mikroorganizmov, oblikuje se več trofičnih spletov. Tako je spodbujena povečana pestrost mikroorganizmov (Coleman in sod., 2004). Globina tal značilno vpliva na številčnost G⁻ baterij, gliv in enoceličarjev, saj so ti dominantni v zgornjih plasteh, z globino pa se poveča delež G⁺ bakterij, aktinobakterij in arhej (Fierer in sod., 2003). Poslošeno lahko rečemo, da so bakterijske populacije v primerjavi z arhejami in glivami bolj občutljive na pH tal. Večja bakterijska pestrost in biomasa je tako prisotna v nevtralnih tleh (Fierer in Jackson, 2005). Na glivne in arhejske populacije močneje vpliva C/N razmerje. Glive so številčnejše v tleh z višim C/N razmerjem, arheje pa pri nižjem (Bates in sod., 2011)

Posamezne rastlinske vrste in rodovi lahko prav tako vplivajo na mikroorganizme v tleh. Na primer stročnice, zaradi svojih velikih potreb po fosforju, spodbujajo rast AM gliv, ker so ga te sposobne dovajati rastlini (Scheublin in sod., 2004). Pri nekaterih vrstah trav dolgotrajna rast na istem območju sproža povečanje števila svojih patogenov in na ta način preprečuje invazivnost posameznih vrst. V primeru tujerodne vrste učinek ni prisoten, saj v tleh ni prisotnih specifičnih mikroorganizmov, ki bi invazivnost preprečevali (Rout in Callaway, 2012).

2.4 ORGANSKA SNOV V TLEH

Organska snov tal so živi organizmi in vsi njihovi ostanki na različnih stopnjah razgradnje in repolimerizacije v humus. Vsebnost organske snovi v tleh je odvisna od vnosa (primarne produkcije in gnojenja) in izgub (razgradnje in respiracije) C-molekul v ekosistemu. Rastline s svojim primarnim in sekundarnim metabolizmom asimilirajo iz okolja hranila (C, H, N, O, P, S), ki se z rastlinskimi ostanki in eksudati ponovno vračajo v tla.

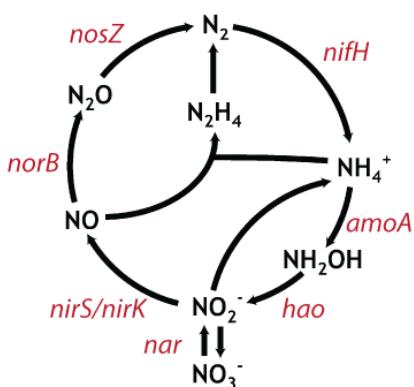
Najmanjši delež organske snovi v tleh predstavljajo živi organizmi, sledijo razgradljive organske spojine, največji delež organske snovi pa predstavljajo stabilne organske spojine – humus. Organska snov tal izvira iz bioloških organskih molekul, katerih osnova so polimeri ogljika, vezani z ostalimi, za življenje pomembnimi, elementi. V največji meri se organska snov formira iz rastlinskih ostankov, ki ga razkrajajo talni heterotrofni organizmi. Rastlinska biomasa je večinoma sestavljena iz ogljikovih hidratov, kot so sladkorji, škrob, celuloza, hemiceluloza in lignin, manjši delež pa predstavljajo lipidi in proteini. Proteini vsebujejo tudi večje deleže dušika in žvepla (Plaster, 2009).

Organske ostanke v tleh najprej naselijo mikroorganizmi, kateri porabljajo za svojo rast lahko dostopne oblike hranil v raztopini (sladkorje in aminokisline). Talna mezo- in makrofavna začne jesti in trgati opad, naseljen z mikroorganizmi. Obstojnejši polimeri izgubljajo svojo strukturo in s tem se poveča dostopnost ostalih hranil za mikroorganizme. S tem so razpadle tudi tiste težje dostopne organske molekule, ostajajo le še težje razgradljive organske molekule kot je lignin. Delno razgrajeni lignin, aromatski monomeri in alifatske verige se v oksidiranem stanju povezujejo med seboj. Hkrati se v procesu repolimerizacije te oksidirane molekule povezujejo z prisotnimi dušik vsebujočimi peptidi in aminokislinami. Tvori se z dušikom bogat, kompleksen in kemijsko težko določljiv polimer – humus. Humus je stabiliziran prek formacije organomineralnih kompleksov. V tleh se namreč povezuje z minerali gline in amorfnih oksidov. Hkrati se tvorijo različne talne strukture, ki so posledica dipolnih interakcij, van der Waals-ovih sil, ionskih vezi, vodikovih vezi hidrofobnih interakcij in substitucij (Berg in McClaugherty, 2008).

2.5 DUŠIKOV CIKEL V TLEH

Dušik je glavni limitirajoči element za rast rastlin in mikroorganizmov v tleh. Največ se ga v tleh nahaja vezanega v organsko snov (~97 %), ostalo je mineralni dušik. Še ne humificirana organska snov deluje kot skladišče dušika, saj se presežki dušika lahko imobilizirajo prek repolimerizacije v humus, med njegovo razgradnjo pa se dušik sprošča. Imobilizacija dušika v tleh je pogojena s C/N razmerjem. V primeru dodajanja organskih ostankov z razmerjem nad 30:1 se pojavlja imobilizacija dušika, mineralizacija pa se sproži z dodatki, ki imajo C/N razmerje manjše od 20:1. To je posledica mikrobne rasti, katera za svojo rast porablja ogljik in dušik v razmerju 24:1 (Plaster, 2009).

Dušik se v naravi pojavlja v obliki reduciranih molekul kot npr. amonijak (NH_4), organsko vezan v obliki aminov pa tudi v oksidiranem stanju - vodotopni nitrit (NO_2) in nitrat (NO_3). V atmosferi je dušik prisoten kot inertna molekula N_2 ali kot toplogredni plin dušikov oksid (N_2O) ter strupeni dušikov monoksid (NO). Mikrobne metabolne poti omogočajo kroženje dušika med različnimi trofičnimi nivoji in neživo naravo. Mikroorganizmi igrajo pri tem pomembno vlogo, saj posedujejo metabolne poti, encime in gene, ki pretvarjajo dušikove spojine za svoje rastne potrebe.



Slika 5: Dušikov cikel in z njim povezani geni, najpogosteje uporabljeni pri molekularnih analizah v mikrobiologiji (Bowen, 2015).

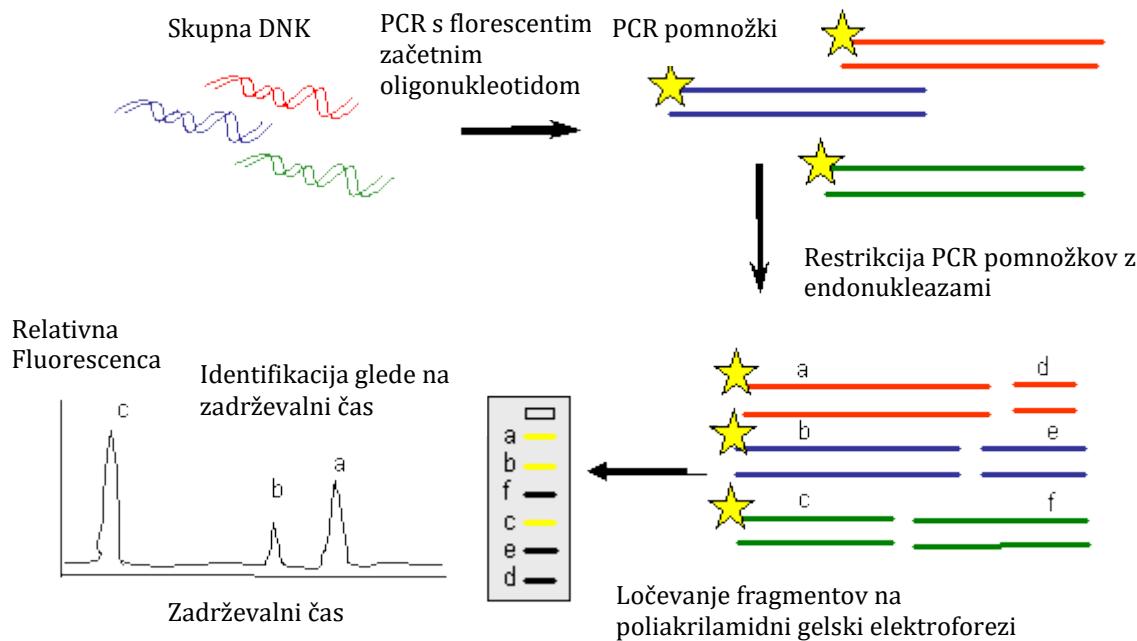
Dušikov cikel delimo na fiksacijo atmosferskega dušika, nitrifikacijo in dentrifikacijo. Biološka fiksacija atmosferskega dušika poteka v anoksičnih razmerah in s pomočjo encimskega kompleksa nitrogenaze, kateri je kodiran z *nif* genom. To sposobnost posedujejo tako simbolične kot tudi prosto živeče bakterije in metanogene arheje. Nastaja amonijak, kateri je lahko porabljen za rast drugih mikroorganizmov. V tleh se oksidira prek nitrita do nitrata (nitrifikacija), ki ga rastline porabijo za primarno produkcijo biomolekul (Ferguson, 1998). Prvi korak nitrifikacije poteka s pomočjo membransko vezanega encimskega kompleksa amonijak monooksigenaze (gen *amo*), ki ob prisotnosti kisika kot sprejemnika elektronov pretvarja amonijak v hidroksilamin. Periplazemska hidroksiamin oksidaza (HAO) pa tega oksidira do nitrita in vode. Oksidacija do nitrata poteka z encimom nitrit oksidaza, ta v svojem aktivnem centru vsebuje vezan molibden in je zelo podoben encimu nitrat reduktazi, kateri sodeluje pri procesu denitrifikacije.

V anoksičnih razmerah postane molekula nitrata sprejmljiva za elektrone in nadomesti kisik kot oksidant. Denitrifikacijo večinoma opravljajo heterotrofni mikroorganizmi, ki za vir elektronov uporabljajo organske spojine pa tudi anorganske, kot sta vodikov sulfid in vodik. Denitrifikacija je sestavljena iz štirih redukcijskih reakcij, pri čemer iz nitrata nastane plinska didušikova molekula. Redukcijo nitrata je sposobno opraviti veliko mikroorganizmov, ki vsebujejo gen za nitrat reduktazo (*nar* in *nap*) - membransko vezan ali periplazemski encim. Redukcija nitrita do dušikovega oksida poteka na nitrit reduktazi, katera ima v aktivnem centru bakrov ion (gen *nirK*) ali pa citokrom (gen *nirS*) (Kandeler in sod., 2006). Dušikov oksid je v presežku toksična molekula, saj lahko poškoduje DNK. Redukcija NO do didušikovega oksida (N₂O) je pomembna funkcija denitrifikatorjev kot tudi nekaterih patogenih nedenitrifikatorjev. Ti vsebujejo membransko vezan dimerni encim dušikov oksid reduktaza, katerega kodira gen *norB* (Heylen in sod., 2007). Cikel dušika je sklenjen z encimom didušikov oksid reduktaza, kateri je kodiran z genom *nosZ*, produkt redukcije pa je atmosferska molekula didušika (Slika 5).

2.6 METODE V MIKROBNI EKOLOGIJI

Razvoj molekularnih tehnik, na podlagi direktne ekstrakcije DNK in RNK iz kompleksnih talnih vzorcev, je omogočil natančnejši vpogled v delovanje in biološko sestavo talnega ekosistema. V mikrobeni talni ekologiji danes prevladujejo metode osnovane na ekstrakciji DNA in reakciji z polimerazo. Z molekularnimi metodami so bili tako razkriti mikroorganizmi, ključni za kroženje ogljika, dušika, fosforja, ... bili taksonomsko uvrščeni, hkrati se je s tem odprla možnost za raziskovanje preostalih 90 do 99 odstotkov negojenih mikroorganizmov.

Mikrobeni ekologiji je leta 1997 dobila nov zagon s pojavom molekularne metode TRFLP – dolžinski polimorfizem fluorescentno označenih terminalnih fragmentov. TRFLP (Slika 6) izkorišča tehnologije pomnoževanja odsekov DNK (genov) s pomočjo verižne reakcije s polimerazo, fluorescentno označevanje začetnih oligonukleotidov, rezanje pomnožkov s pomočjo endonukleaznih encimov ter ločevanje dolžine fragmentov DNK s pomočjo elektroforeze (Liu in sod., 1997). Metoda je uporabna za določanje značilnega vzorca DNK organizmov (ang. fingerprinting), ta je posledica različnega zaporedja nukleotidov. S to metodo je tako mogoče relativno poceni in enostavno preučevati sestavo talnih mikrobenih združb (Bloem in sod., 2005). Izbor začetnih oligonukleotidov je pogojen s specifičnostjo pomnoževanja želenega odseka genoma. Prav tako mora zadostiti tudi kriteriju univerzalnosti, saj se mora takšen začetni oligonukleotid nalegati na čim bolj ohranljeno regijo znotraj želene skupnosti mikroorganizmov. Težave pri izbiri se pojavitjo tudi z neželenim prileganjem na organizme iz drugih domen življenja (Paul, 2015). Za pomnoževanje lahko uporabimo za posamezno domeno več različnih začetnih oligonukleotidov naenkrat (glive, bakterije in arheje), vendar morajo biti različno označeni (Singh in sod., 2006). Sedaj metodo TRFLP vse bolj nadomešča masovno sekvenčiranje pomnožkov tarčnih genov, saj se je količina sekvenč v genomske knjižnice povečala s pojavom cenejšega sekvenčiranja in spletnih, javno dostopnih, knjižnic sekvenč.



Slika 6: Prikaz principa delovanja TRFLP metode s ključnimi tehnologijami (Wiki biomine, 2015).

Uporaba verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) omogoča relativno kvantifikacijo različnih funkcijskih in identifikacijskih genov, ki jih nosijo mikroorganizmi. Pogosto se to metodo uporablja za kvantifikacijo genov vključenih v cikel dušika, kot tudi za kvantifikacijo funkcijsko pomembnih arbuskularnih in ektomikoriznih gliv. Pri omenjeni metodi pa je problematika običajno povezana z ekstrakcijo DNK iz tal, ker je običajno na voljo premajhna količina vzorca (0,25-2 g), da bi bil le-ta reprezentativen (Paul, 2015). Hkrati je ta metoda občutljiva na inhibicijo zaradi soekstrakcije talnih huminskih kislin skupaj z DNK, zato so pred kvantifikacijo potrebni dodatni postopki čiščenja DNK, ti pa lahko zmanjšujejo reprezentativnost rezultatov (Wang in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE DELA

V raziskavi smo preučili vpliv 20-letne različne obdelave medvrstnega prostora (trajna zatravitev / obdelava tal) na kakovost tal dveh sosednjih vinogradov v Medani v Goriških Brdih.

Priprava vzorcev in laboratorijske meritve so bile opravljene na Katedri za pedologijo in varstvo okolja, kvantifikacija izbranih genov je bila opravljena na Katedri za genetiko in žlahtnjenje rastlin - Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete. Ločevanje terminalnih fragmentov TRFLP analize je potekalo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete.

3.1 MATERIALI IN OPREMA

- Naprave
 - nerjaveča sita: 8 mm, 4 mm, 2 mm, 1 mm, 0,5mm
 - tehnicka XA60/220/X (RADWAG Wagi Elektroniczne; Poljska)
 - tehnicka PS 3500.R2 (RADWAG Wagi Elektroniczne; Poljska)
 - mokra sejlnica Eijkelpamp (Eijkelpamp Agrisearch Equipment; Nizozemska)
 - sušilnica WTB (BINDER GmbH; Nemčija)
 - vakuumski rotacijski črpalka 1V 10G (IEVT d.d.; Slovenija)
 - centrifuga Rotanta 96S, Hettich Zentrifugen (Andreas Hettich GmbH & Co.KG; Nemčija)
 - analizator vario TOC cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Nemčija)
 - stresalnik HS 260 control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Nemčija)
 - dispenzer dispensette III 50 ml (BRAND GmbH & Co. KG; Nemčija)
 - centrifuga Mikro 200, Hettich Zentrifugen (Andreas Hettich GmbH & Co.KG; Nemčija)
 - homogenizator Mini beadbeater (Bio Spec Products Inc.; ZDA)
 - centrifuga Excentric 322A, Tehnicka (Domel, d.o.o.; Slovenija)
 - vrtinčnik Vortex-genie 2 (MO Bio Laboratories Inc; ZDA)
 - mini centrifuga MC6 (SARSTEDT AG & Co; Nemčija)
 - spektrofotometer NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - napajalnik za elektroforezo PowerPac HV (BIO RAD Laboratories, Inc: ZDA)
 - kadička za elektroforezo Agagel midi-wide (Biometra GmbH; Nemčija)
 - transiluminator TI2 (Biometra GmbH; Nemčija)
 - aparat za verižno reakcijo s polimerazo T-personal (Biometra GmbH; Nemčija)

- kapilarna elektroforeza ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- naprava za PCR v realnem času 7500 fast real-time PCR systems, Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- cilindri za vzorčenje
- Programska oprema
 - T-rex (Culman,in sod., 2009)
 - GeneMapper (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - MS Excel (Microsoft, ZDA)
 - MS Office (Microsoft, ZDA)
 - R (The R Foundation)
 - Tinn R
- Kemikalije
 - suhi led
 - NaOH
 - CaCl₂
 - natronsko apno (soda lime)
 - aluminijev oksid - drobci za vretje
 - kloroform LiChrosolv® (Merck KGaA; Nemčija)
 - HCl
 - agarozna sklopnica
 - etidijev bromid
 - MgCl₂
 - dNTP mix (Qiagen N.V.; Nizozemska)
 - goveji serumski albumin
 - TAE pufer 10x (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - Tango pufer 10x (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - formamid
 - 6x DNK barvilo
 - 0,1 % DEPC voda
 - Standard TIC/TOC/TNb
- Biološki reagenti:
 - encim MspI 10U/μl, Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - encim HhaI 10U/μl, Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - encim AluI 10U/μl, Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - encim GoTaq® G2 Flexi DNK Polymerase 5U/μl (Promega corp.; ZDA)
 - DNK lestvica 100bp, Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
 - oligonukleotidi: B27f - FAM, 1401r, A109f, A934r - FAM, ITS1f - FAM, ITS4r (Jena Bioscience GmbH; Nemčija)
 - oligonukleotidi: 1F, 2R, CrenamoA616r48x, 19F (Sigma-Aldrich Co. LLC.; ZDA)

- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- GeneScan ROX 500 size standard (Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA)
- Kompleti
 - PowerSoil® DNK Isolation Kit (MO Bio Laboratories Inc; ZDA)
 - QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen N.V.; Nizozemska)
 - MinElute® Reaction Cleanup Kit (Qiagen N.V.; Nizozemska)

3.2 METODE

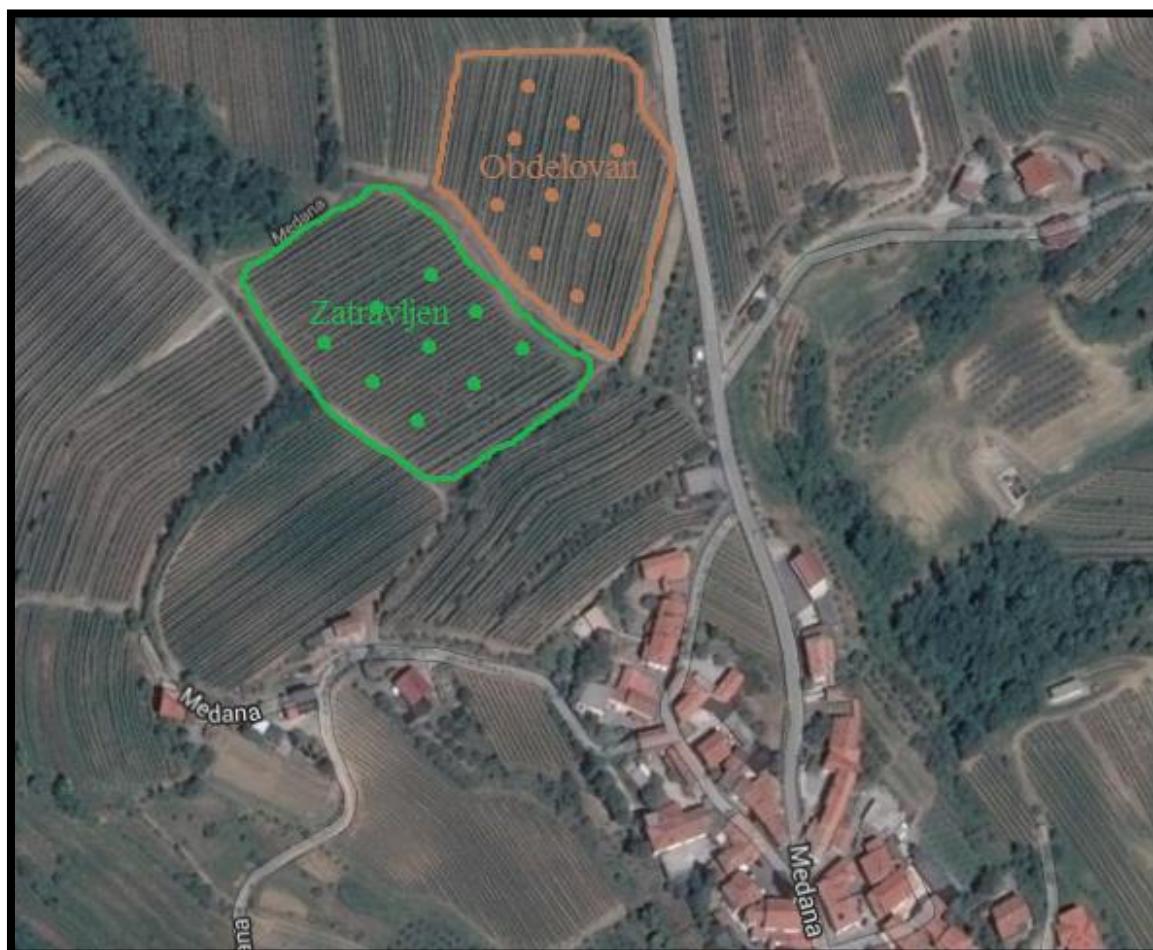
3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev

Vzorčenje je potekalo v torek, 8. aprila 2014 v dveh sosednjih vinogradih v Medani - Goriška Brda (Slika 7 in 8). Vreme je bilo spremenljivo, delno jasno, temperatura zraka je bila 21°C, zemlje pa 16°C.

Vsak vinograd smo razdelili na tri bloke (zgornja, srednja, spodnja vrsta) in vzorčili v 3 ponovitvah (mikrolokacijah) v treh globinah: 0-10cm, 10-20cm in 20-30cm.. Na vsaki mikrolokaciji smo odvzeli porušen in neporušen vzorec tal. Porušen talni vzorec ene mikrolokacije je predstavljal združen vzorec 5 sond po posameznih globinah. Neporušene talne vzorce smo odvzeli s Kopeckyevimi cilindri. Skupno smo odvzeli 54 porušenih (2 vinograda × 3 bloki × 3 ponovitve (mikrolokacije) × 3 globine) ter 36 neporušenih (2 vinograda × 3 bloki × 3 ponovitve × 2 globini) vzorcev. Vzorčenje je najprej potekalo v ZV, nato v OV. Vrečke s talnimi vzorci smo takoj prenesli v hladilne torbe.



Slika 7: Fotografija preučevanih vinogradov in talnega profila na lokaciji na dan vzorčenja.A - prikaz stanja zatravljenega medvrstnega prostora in B - obdelanega medvrstnega prostora; C - talni profil



Slika 8: Satelitski posnetek preučevanih vinogradov v Medani z mikrolokacijami vzorčenja (Google maps, 2015)

Naslednji dan smo vzorce ročno razdrobili in presejali skozi 2mm sito, jih homogenizirali ter razdelili glede na vrsto raziskav. Vzorce, namenjene izolaciji DNK, smo napolnili v centrifugirke ter jih postavili na suhi led (-80 °C), da smo zaustavili metabolno aktivnost. Kasneje smo jih prestavili v zamrzovalno skrinjo na -20 °C. Vzorce za določevanje mikrobne biomase smo zamrznili na -20 °C. Vzorce za fizikalno kemijske analize smo takoj za 24h postavili v sušilnik na 35-40 °C ter jih shranili v kartonskih škatlicah. Neporušene vzorce smo do analiz shranili zaprte na hladnjem.

3.2.2 Fizikalne lastnosti tal

3.2.2.1 Delež suhe snovi

Delež suhe snovi smo izmerili tako, da smo zatehtali vlažne vzorce v tehtič, jih 48 ur sušili na 110 °C ter ponovno stehtali suhe vzorce. Delež suhe snovi smo izračunali iz razmerja med suhim in vlažnim vzorcem

3.2.2.2 Volumska gostota tal

Volumsko gostoto smo določali po standardu (ISO 11272, 1993). Neporušene vzorce volumna 100 cm³ smo posušili na 110 °C ter jim določili maso. Volumsko gostoto smo izračunali po formuli (1):

$$Volumska\ gostota\ tal = \frac{skupna\ masa\ cilindra - masa\ obroča}{volumen\ cilindra} \quad \dots (1)$$

3.2.2.3 Tekstura in delež skeleta

Teksturni razred naših vzorcev smo določali s standardno sedimentacijsko metodo (ISO 11277, 1998), katera izkorišča različne sedimentacijske čase, ki so pogojeni z velikostjo delcev - STOKES-ov zakon. Za uspešnost izvedbe metode je potrebno zagotoviti popolno disperzijo talnih delcev, kar dosežemo z dodatkom natrijevega pirofosfata in dolgotrajnim stresanjem (4 ure). Deleže posameznih delcev dobimo z odpipetiranjem iz globine 10 cm vodnega stolpca po določenem času (44 sek – grobi melj, 4 min 27 sek – fini melj, 7 ur 35 min – glina). Nato odpipetirane frakcije sušimo, grobi pesek pri sejanju ostane na situ, medtem ko fini pesek dobimo z odštetjem mas ostalih delcev. Glede na masne deleže smo določili teksturni po ameriškem teksturnem trikotniku.

Masni delež skeleta smo določali iz neporušenih vzorcev. Te smo najprej razdrobili in jih presajali čez 2 mm sito. Ostanek na situ (skelet) smo stehtali ter določili masni delež skeleta glede na celotno maso neporušenega vzorca.

3.2.2.4 Sposobnost tal za zadrževanje vode – poljska kapaciteta

Sposobnost tal za zadrževanje vode smo določali po standardni metodi (ISO 11274, 1998) s pomočjo Richardovega tlačnega ekstraktorja pri tlaku -0,33 bar. Večji kot je tlak v posodi, več vode se iztisne iz neporušenega vzorca tal. Neporušene vzorce tal smo navlaževali do nasičenja, ter jih nato postavili na porozno keramično ploščo, da lahko odteka voda, iztisnjena zaradi konstantno vzdrževanega tlaka -0,33 bar. Ko voda preneha odtekati, vzorce

previdno stehtamo ter nato posušimo in ponovno tehtamo. Iz razlike v masah izračunamo masni delež vode pri izbranem tlaku.

3.2.2.5 Določanje obstojnosti strukturnih agregatov

Metoda mokrega sejanja:

Metodo smo izvedli po navodilih proizvajalca (Eijkenkamp). Neporušene vzorce smo najprej vzeli iz cilindrov, jih ročno razdrobili, odstranili skelet ter presejali skozi 8 mm sito. Vzorce smo prestavili v steklene petrijevke, kjer so se 2 dni sušili na sobni temperaturi pod sesalno roko. Nato smo posušene vzorce sejali skozi 4 mm, 2 mm, 1 mm in 0,5 mm sito ter posamezne frakcije tehtali. Za določanje obstojnosti strukturnih agregatov smo izbrali frakciji z velikostjo agregatov 2-4 mm in 1-2 mm. Zatehtali smo 4 g vzorca v zgornje posodice s sitastim dnom. V spodnje posodice smo natočili toliko destilirane vode, da so bili vzorci med mokrim sejanjem ves čas pod vodo. Pred začetkom mokrega sejanja smo vse vzorce hkrati navlažili, tako da smo jih pomočili v vodo, dvignili ter počakali 7 minut. Mokro sejanje v vodi je potekalo 3 minute, nato smo spodnje posodice zamenjali s posodicami z raztopino 0,05 M NaOH, mokro sejanje je potekalo še 20 minut. V kolikor so na situ strukturni agregati še ostali, smo jih rahlo ročno razdrobili z okroglo paličico. Kar je ostalo na situ (skelet in koreninice) smo stehtali in odšteli od zatehte. Posodice z vodo in 0,05 M NaOH, v katerih so bili razpadli agregati (delci tal) smo postavili v sušilnik na 110 °C dokler ni vsa voda izparela. Delež obstojne frakcije smo izračunali po formuli (2).

$$\text{Delež obstojne frakcije} = \frac{\text{neto masa v NaOH}}{\text{neto skupna masa}} \times 100 \% \quad \dots (2)$$

Metoda po Sekeri:

Neporušene vzorce smo vzeli iz cilindrov ter jih ročno narahlo začeli razpolavljati, tako da smo dobili strukturne aggregate velikosti 6 – 8 mm. Te smo položili v večje petrijevke ter previdno dolili deionizirano vodo, tako da smo aggregate prekrili. Namakali smo jih 10 minut z vmesnim rahlim krožnim mešanjem, nakar smo določili stopnjo obstojnosti agregatov glede na podano preglednico 2.

Preglednica 2: Stopnje obstojnosti strukturnih agregatov

Stopnja	Delež razpadlih strukturnih agregatov
1	strukturni agregati so v glavnem nerazpadli
2	razpadlo je manj kot 50% strukturnih agregatov
3	razpadlo je 50% strukturnih agregatov
4	razpadlo je več kot 50% strukturnih agregatov
5	večina aggregatov je razpadla
6	vsi aggregati so razpadli, nastala je suspenzija

3.2.3 Kemijske lastnosti tal

3.2.3.1 pH tal

pH tal smo izmerili v raztopini 0,01 M kalcijevega klorida po standardni metodi ISO 10390, 2005. Vzorec tal smo prelili s petkratnim volumnom kalcijevega klorida in dobro premešali. Umerjanje pH metra smo izvedli s pomočjo dveh pufernih raztopin vrednosti 4 in 7. pH v suspenziji smo izmerili po 2 urah, suspenzijo smo pred tem dobro premešali.

3.2.3.2 Rastlinam dostopni fosfor in kalij

Rastlinam dostopni fosfor in kalij smo merili po metodi z amon-laktatno ekstrakcijo po Egner-Rirhm - Domingo (Grčman in Zupan, 2010). Ekstrakcijo smo pripravili iz 5 g vzorca, ki smo ga prelili s 100 ml AL raztopine, namestili na stresalnik z nastavitevijo 200 obratov/minuto, 2 uri. Vsebnost fosforja smo določili spektrofotometrično na inštrumentu Perkin Lambda pri 580 nm z razvojem modre barve v 10 ml ekstraktu. Modra barva je posledica dodatka 1 ml raztopine amonhepta molibdata in 1 ml redukcijskega sredstva. Po potrebi smo ekstrakt razredčili s 15 ml vode. Modro barvo tvori reducirani ion fosfor-molibdatnega kompleksa. Koncentracijo kalija v ekstraktu merimo direktno na plamenskem emisijskem spektrofotometru (FLAPO 40) pri valovni dolžini 767 nm. Za obe meritvi smo pripravili umeritveni krivulji iz redčitev standardnih raztopin.

3.2.3.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta

Kationska izmenjevalna kapaciteta v vseh vzorcih tal je bila določena v laboratoriju CVPO (Grčman in Zupan, 2010). Vsota kislo delujočih kationov je bila določena po ekstrakciji z BaCl_2 (Melichova metoda), vsota bazičnih kationov pa po ekstrakciji z amonacetatom. Bazične katione smo merili na plamenskem emisijskem spektrofotometru (K^+ in Na^+) in atomskem absorpcijskem spektrofotometru (Ca^{2+} in Mg^{2+}). Kationska izmenjalna kapaciteta tal je bila izračunana kot vsota kislih in bazičnih kationov.

3.2.3.4 Delež skupnega ogljika (TC) in dušika (TN)

Deleža skupnega ogljika in dušika sta bila določena s suho oksidacijo na instrumentu Vario MAX (Elementar, Nemčija). V sežigni koloni se ogljik in dušik uplinita, čistilne kolone vežejo vodo, halogene in žveplo. Adsorpcijska kolona veže CO_2 , dušik gre direktno na analizator, nato se adsorpcijska kolona segreje in sprosti CO_2 , ki gre na analizator. Zračno suhe vzorce smo natehtali v teflonsko posodico ter jih postavili na avtomatski podajalnik vzorcev.

3.2.3.5 Določanje mineralnega ogljika (Min C)

Delež mineralnega ogljika smo določali s pomočjo Scheiblerjevega aparata po slovenskem standardu ISO 10693, 1995. Iz masnega odstotka karbonatov smo izračunali delež mineralnega ogljika po formuli (3)

$$\text{Mineralni } C = w_{CaCO_3} \times 0,12 \quad \dots (3)$$

3.2.3.6 Delež organskega ogljika in organske snovi

Delež organskega ogljika smo izračunali iz razlike izmerjenega skupnega ogljika in mineralnega ogljika. Delež organske snovi smo izračunali s pomočjo povprečnega deleža (58 %), ki predstavlja ogljik v organski snovi po formuli (4) (Rowell, 1994).

$$\text{Delež organske snovi} = \text{Delež organskega } C / 0,58 \quad \dots (4)$$

3.2.3.7 Določanje skupnega topnega ogljika in dušika

Topne oblike ogljika in dušika smo določali iz posušenih vzorcev tal. Najprej smo natehtali 4 g vzorca v 50 ml centrifugirko ter dodali 40 ml 0,01 M CaCl₂. Vzorce smo stresali horizontalno 2 uri na 200 obratih min⁻¹. Sledilo je 5 minutno centrifugiranje vzorcev na swing out centrifugi z nastavitevijo 4500 obratov min⁻¹. Ekstrakte smo zamrznili na -20 °C do analize z VarioTOC cube analizatorjem (Elementar, Nemčija).

Ekstrakte vzorcev smo pred analizo odtajali 30 min na sobni temperaturi. 10 ml vzorca smo prepipetirali v stekleno vialo, zakisali z 100 µl 10 % HCl in s tem odstranili anorganski ogljik ter vialo pokrili z aluminijasto folijo. Viale smo postavili na avtomatski podajalnik vzorcev. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz petih redčitev 500 ppm založne standardne raztopine ogljika in dušika v razmerju 10:1. Iz strmine premice smo določili koeficient, katerega smo uporabili za preračun vrednosti vzorcev. Uplinjanje in oksidacija vzorca sta potekala pri 850°C, nastali CO₂ in NO_x so bili detektirani s pomočjo plinskega infrardečega (NDIR) in elektrokemičnega (EC) detektorja.

3.2.4 Mikrobiološke metode

3.2.4.1 Določanje mikrobine biomase

Za določanje mikrobnega biomasnega ogljika smo uporabljali prilagojeno metodo fumigacijske ekstrakcije (Beck in sod., 1997). Metoda je osnovana na standardni lizi celic s pomočjo kloroformovih par, kar sproži povečano vsebnost bioloških molekul v ekstraktu - ta pa je sorazmerna z vsebnostjo živilih celic.

Vzorci tal za določevanje biomasnega C so bili presejani (2 mm) in zamrznjeni na -20 °C v roku 2 dni po vzorčenju. Vzorce v zaprtih vrečkah smo postavili na sobno temperaturo 24 ur pred začetkom analize. Zatehtali smo dvakrat po 8 g tal, v 50 ml centrifugirko in v 50 ml stekleno čašo. V centrifugirke smo takoj z dispenzerjem dodali 40 ml 0,01M CaCl₂ ter stresali 2 uri z 200 obrati min⁻¹.

Fumigacija je potekala v odsesovalni komori (digestoriju). Na dno eksikatorja z ventilom, smo najprej postavili mokre brisače. Steklene čaše z vzorci smo postavili krožno ob robu eksikatorja, skupaj z 20 g natronskega apna (soda lime). Pred začetkom fumigacije smo v eksikator postavili čašo z drobci za boljše vrenje, katere smo prelili s približno 20 ml kloroforma brez etanola. Zračno črpalko smo vklopili v električni tok, izhodno cev namestili v digestorij, sesalno cev pa nataknili na ventil eksikatorja. Ventil smo pustili odprt (sesanje) dokler ni kloroform burno zavrel. Vretje smo vzdrževali 2 minuti z odpiranjem ventila. Ventil smo po 2 minutah pustili zaprt, atmosfera v eksikatorju je ostala zasičena s kloroformovimi parami. Eksikator smo pokrili z aluminijasto folijo ter inkubirali 24 ur.

Pred prezračevanjem smo odstranili čašo s kloroformom, še pred tem pa spustili zrak v eksikator. Prezračevanje je potekalo 15 min z izmenjujočim sesanjem ter spuščanjem sobnega zraka v eksikator, s čimer smo odstranili kloroformove pare. Fumigirane vzorce smo presuli v 50 ml centrifugirke ter čaše z vzorci splagnili s 40 ml 0,01 M CaCl₂, s katerim smo prelili vzorce v centrifugirki. Sledilo je stresanje pri 200 obratih min⁻¹, 2 uri.

Tako pri nefumigiranih kot tudi fumigiranih vzorcih je po stresanju sledilo centrifugiranje na 4500 obratih/min, 5 minut. Supernant smo odpipetirali v 50 ml plastične stekleničke s pokrovčkom ter ekstrakte zamrznili na -20 °C do analize z VarioTOC cube analizatorjem. Kvantifikacija topnih oblik ogljika in dušika je potekala na isti način kot v točki 3.2.3.7

Količino mikrobnega ogljika smo izračunali iz razlike izmerjenega topnega organskega ogljika (DOC) med fumigiranim in nefumigiranim ekstraktom organskega ogljika po formuli (5). Pri tem k_{EC} (0,45) predstavlja koeficient uspešnosti pobitja mikroorganizmov v tleh med fumigacijo in je standardna za večino tal.

$$Mikrobeni\ C = (DOC_{fumigiran\ vzorec} - DOC_{nefumigiran\ vzorec})/k_{EC} \quad \dots (5)$$

3.2.4.2 Izolacija skupne DNK iz vzorca tal

Vzorce smo pred začetkom ekstrakcije odtajali (30 minut na sobni temperaturi). DNK smo ekstrahirali s pomočjo kita PowerSoil® DNK Isolation (Proizvajalec, Država). Najprej smo natehtali 0,25 g tal v PowerBead Tube. Te vsebujejo delce za disperzijo zemlje ter pufer, ki razgrajuje humusne molekule in hkrati varuje DNK pred razgradnjo. V isto centrifugirko smo dodali 60 ml raztopine C1, ki vsebuje anionski detergent natrijev dodecil sulfat (SDS), kateri pomaga pri lizi celične membrane. Vzorci so bili nameščeni v Beadbeating napravo, kjer so bili stresani 1 minuto na srednji stopnji. Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na $10.000 \times g$. Supernatant (400-500 μl) je bil prenešen v 2 ml centrifugirko.

V centrifugirko smo dodali 250 μl C2 raztopine ter inkubirali 5 min na 4°C. Raztopina C2 vsebuje patentirano mešanico (PIR) tiamin hidroklorida, tiamin pirofosfata, 1,3-ditiazol-2-propanona, dibromida in piridoksamina. Te molekule pomagajo pri precipitaciji humusnih in fluvičnih kislin, ki inhibirajo reakcije s polimerazo. Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na $10.000 \times g$. 600 μl supernatanta smo prenesli v novo 2 ml centrifugirko ter mu dodali 200 μl C3 (PIR mešanica) raztopine ter inkubirali 5 min na 4 °C.

Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na $10.000 \times g$ ter prenos 750 μl supernatanta v novo centrifugirko, kamor smo dodali 1,2 ml raztopine C4. Raztopina C4 vsebuje visoko koncentracijo soli kot koatropno sredstvo, ta omogoča boljšo vezavo DNK na silicijev oksid. Po mešanju smo prenesli 650 μl mešanice v centrifugirko s spin filtrom, ki vsebuje membrano s silicijevim oksidom. Sledilo je 1 minutno centrifugiranje na $10.000 \times g$. Slednje smo ponovili še 2×, da smo porabili celotno mešanico. Na membrano vezano DNK smo dodatno očistili z raztopino C5, ki vsebuje etanol. Po 30 s centrifugiranju na $10.000 \times g$ smo odlili supernatant ter ponovno centrifugirali 30 min na $10.000 \times g$, s tem smo se znebili vse raztopine C5. Spin filter smo prenesli v čisto centrifugirko ter na sredino membrane previdno dodali 37 μl raztopine C6, katera je po centrifugiranju (30 s, $10000 \times g$) sprala DNK iz membrane.

Uspešnost ekstrakcije smo določali spektrofotometrično z meritvijo koncentracije DNK na instrumentu NanoDrop 2000 UV-Vis. Meritev je potekala na 260 nm, 280 nm in 230 nm valovne dolžine, s tem smo ugotovili tudi prisotnost nečistoč – beljakovin in organskih topil. Ekstrakte DNK smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalni skrinji na – 20 °C.

3.2.4.3 Analiza sestave mikrobnih združb s pomočjo polimorfizma terminalno označenih restrikcijskih fragmentov (TRFLP)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Sestavo mikrobnih združb smo določevali posebej za bakterije, arheje in glive. Pomnoževanje specifičnih genskih regij je zato potekalo v treh različnih PCR reakcijah. V

vsaki reakciji je bil eden od dveh začetnih oligonukleotidov označen s fluorokromom 5'-florescein amiditom (5-FAM). Osnovno zmes smo pripravili tako, da smo najprej preračunali količine posameznega reagenta glede na število vzorcev, nato smo v centrifugirko odpipetirali vse reagente razen polimeraze in jih mešali v vrtinčniku. Nazadnje smo dodali še polimerazo ter premešali s pipetiranjem. Odpipetirali smo 3 µl izolirane DNK na dno PCR traka in nato dodali 47 µl osnovne zmesi z elektronsko pipeto brez dotikanja sten. Negativno kontrolo smo izvedli s 3 µl vode namesto DNK.

Preglednica 3: Sekvence začetnih oligonukleotidov za TRFLP

Tarčni gen	Začetni oligonukleotid	Vir
Bakterijski 16S rDNK	B27F - FAM(5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3')	Muyzer in sod., 1993
Arhejski 16 rDNK	A109 F (5'-ACGGCTCAGTAACACGT-3') A934 R - FAM(5'-AGGAATTGGCGGGGGAGCA-3')	Grosskopf in sod., 1998; Stahl in sod., 1991
Glivna ITS regija	ITS1 F - FAM(5'-TCCGTAGGTGAAACCTTGCAG-3') ITS4 R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	White in sod., 1990

PCR reakcija je potekala v Biometrini T-personal napravi pod pogoji, navedenimi v preglednici 4.

Preglednica 4: Pogoji PCR reakcij

Bakterijski 16S rDNK	Arhejski 16S rDNK	Glivni ITS	
<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>
Sterilna voda	26,5 µl	Sterilna voda	18,5 µl
5x GoTaq® flexi pufer	10 µl	5x GoTaq® flexi pufer	10 µl
BSA	5 µl	BSA	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl	MgCl ₂ 25 mM	6 µl
dNTP 2 mM	1 µl	dNTP 2 mM	5 µl
B27F – FAM 10pmol/µl	1 µl	A109F 10 pmol/µl	1 µl
1401R 10 pmol/µl	1 µl	A934R – FAM 10 pmol/µl	1 µl
TAQ polimeraza 5 U/µl	0,5 µl	TAQ polimeraza 5 U/µl	0,5 µl
1. 95°C 4 min	MM	1. 94°C 3 min	MM
2. 94°C 1 min	Σ 47 µl	2. 94°C 1 min	Σ 47 µl
3. 57°C 1 min	+3 µl	3. 52°C 1 min	+3 µl
4. 72°C 1,5 min	DNK	4. 72°C 1,5 min	DNK
5. 72°C 10 min		5. 72°C 10 min	
6. 4°C neskončno		6. 4°C neskončno	
Koraki 2., 3., in 4. se ponovijo 29x		Koraki 2., 3., in 4. se ponovijo 35x	
		1. 95°C 3 min	MM
		2. 95°C 1 min	Σ 47 µl
		3. 55°C 1 min	+3 µl
		4. 72°C 1,5 min	DNK
		5. 72°C 10 min	
		6. 4°C neskončno	
		Koraki 2., 3., in 4. se ponovijo 30x	

Za čiščenje PCR produkta smo uporabili QIAquick® PCR Purification Kit. Po navodilih proizvajalca smo volumnu PCR reakcijske mešanice najprej dodali 5-kratni volumen PB pufra, ki vsebuje visoko koncentracijo soli. Po mešanju smo prenesli vzorce na QIAquick

kolono, centrifugirali na 10.000 x g 1 minuto ter zavrgli supernatant. Dodali smo 750 µl PE pufra, ki vsebuje etanol. Centrifugirali smo pri istih pogojih ter odlili supernatant. Centrifugiranje smo opravili še enkrat, da smo se znebili čim več PE pufra. QIAquick kolono smo prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko ter dodali 12 µl EB pufra, s katerim spiramo DNK iz kolone s centrifugiranjem 1 min na 10.000 x g. Koncentracijo DNK smo preverili spektrofotometrično. Očiščene ekstrakte DNK smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalni skrinji na – 20 °C.

Uspešnost pomnoževanja smo preverili na 1,15 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili v Shott steklenici. Najprej smo natehtali 1,65 g agaroze, jo prelimi s 110 ml 1 × TAE pufra ter mešanico raztopili v mikrovalovni pečici. Vročo raztopino smo vlili v elektforetski model, vstavili glavniček ter počakali 30 minut. Med tem časom smo pripravili mešanico pomnožkov DNK (5 µl) in DNK barvila (3 µl) na parafilmu. Strjen gel smo vstavili v elektforetsko kadičko, v kateri je bilo toliko TAE pufra, da je prelil vstavljen gel. Odstranili smo glavniček ter skupaj s 100 bp DNK lestvico zmešane vzorce prenesli na dno žepkov. Kadičko smo pokrili s pokrovom, nastavili pogoje elektroforeze (30 min, 300 mA, 150 V) ter jo zagnali. Po elektroforezi smo DNK lise barvali s etidijevim bromidom v temnici (30 min) ter jih vizualizirali s pomočjo UV transiluminatorja.

Restrikcijo smo izvedli s pomočjo treh različnih endonukleaznih encimov. Najprej smo pripravili osnovno zmes v centrifugirki ter jo z elektronsko pipeto po 20 µl prenesli v PCR trakove. Nato smo dodali 10 µl PCR DNK, zmešali, centrifugirali ter postavili v PCR napravo pod navedenimi pogoji.

Preglednica 5: Pogoji encimskega razreza

Bakterijski 16S rDNK	Arhejski 16S rDNK	Glivni ITS	
<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>
Sterilna voda	16 µl	Sterilna voda	17 µl
10x Tango pufer	2 µl	10x Tango pufer	2 µl
encim MspI C^CGG	1 µl	encim HhaI GCG^C	1 µl
10 U/µl		10 U/µl	
encim AluI AG^CT	1 µl	encim AluI AG^CT	1 µl
10 U/µl		10 U/µl	
1. 37°C 5 ur	MM	1. 37°C 5 ur	MM
2. 80°C 20 min	Σ 20 µl	2. 80°C 20 min	Σ 20 µl
3. 4°C neskončno	+10 µl	3. 4°C	+10 µl
	DNK	neskončno	DNK

Za čiščenje PCR produkta smo uporabili MinElute® Reaction Cleanup Kit. Restrikte encimske reakcije smo najprej prenesli v 1,5 ml centrifugirke, kamor smo dodali 300 µl ERC pufra, ki vsebuje visoko koncentracijo kaotropnih soli. Po mešanju smo vzorce prenesli na MinElute kolono, centrifugirali na 10.000 × g, 1 minuto ter zavrgli supernatant. Nato smo

dodali 730 µl PE pufra, kateri vsebuje etanol. Centrifugirali smo pri istih pogojih ter odlili supernatant. Centrifugiranje smo ponovili še enkrat, da se znebimo čim več PE pufra. MinElute kolono smo prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko ter dodali 12 µl EB pufra, s katerim speremo DNK iz kolone s centrifugiranjem 1 min na 10.000 × g. Koncentracijo DNK smo preverili spektrofotometrično. Očiščene ekstrakte DNK smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalni skrinji na – 20 °C.

Priprava vzorca za kapilarno elektroforezo:

Osnovno mešanico smo pripravili v centrifugirki iz 11 µl formamida in 0,4 µl ROX 50-500 bp velikostnega standarda za 1 vzorec. Na mikrotitersko ploščo smo prenesli 11,4 µl osnovne mešanice ter dodali 1 µl očiščene DNK po restrikciji. Mikrotitesko ploščo smo pokrili s samolepilno aluminijasto folijo ter jo poslali na analizo.

Kapilarna gelska elektroforeza:

Pred začetkom smo vzorce denaturirali 2 minuti na 90°C ter centrifugirali. Glede na izbran GeneScan 500 ROX dye Size Standard (Thermo Fisher) in 5-FAM označene začetne oligonukleotide, je kalibracija potekala na matriki DS-32. Iniciranje je potekalo 60 sekund pri napetosti 2 kV, ločevanje fragmentov pa 80 minut pri napetosti 4,8 kV.

3.2.4.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Za kvantifikacijo bakterij, krenarhej in gliv smo uporabili metodo PCR reakcije v realnem času, saj omogoča sledenje količine nastalega PCR produkta prek SYBR™ Green reporterske vezave na dvoverižno DNA.

Pred začetkom kvantifikacije genov v posameznih vzorcih smo opravili test inhibicije, da smo ugotovili primerno redčitev izolirane DNA vzorcev, pri kateri inhibicija ni več prisotna. Najprej smo pripravili združen vzorec vseh DNA izolatov tako, da smo vsakemu odvzeli po 1 µl ter jih združili v centrifugirki. Nato smo pripravili serijo 4x redčitev z DEPC vodo ter redčitve standardnega števila kopij vseh treh preučevanih domen, pridobljenih iz transformiranih celic *E. coli* seva JM 109 (Promega). Zatem smo pripravili načrt razporeditve vzorcev na plošči ter preračunali količine reagentov, potrebnih za osnovno mešanico.

Preglednica 6: Sekvene začetnih oligonukleotidov za qPCR

Tarčni gen	Začetni oligonukleotid	Dolžina	Vir
Bakterijska 16S rRNA	341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')	193 bp	Muyzer in sod., 1993
	534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3')		
Krenrhejska 16S rRNA	771F (5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3')	220 bp	Ochsenreiter in sod., 2003
	975R (5'-GCCATCCATCTGTATGTCCA-3')		
Glivna ITS regija	ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3')	330 bp	White in sod., 1990
	ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')		

Preglednica 7: Pogoji qPCR reakcij

Bakterijska 16S rDNK		Krenarhejski 16S rDNK		Glivna ITS a	
<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>	<i>komponenta</i>	<i>volumen</i>
0,1% DEPC voda	9 µl	0,1% DEPC voda	9 µl	0,1% DEPC voda	9 µl
3% BSA	0,5 µl	3% BSA	0,5 µl	3% BSA	0,5 µl
Power SYBR® Green	12,5 µl	Power SYBR® Green	12,5 µl	Power SYBR® Green	12,5 µl
341F 10 pmol/µl	0,5 µl	771F 10 pmol/µl	0,5 µl	ITS3F 10 pmol/µl	0,5 µl
534R 10 pmol/µl	0,5 µl	975R 10 pmol/µl	0,5 µl	ITS4R 10 pmol/µl	0,5 µl
DNK 1-8 ng/µl	2 µl	DNK 1-8 ng/µl	2 µl	DNK 1-8 ng/µl	2 µl
1. 95°C 15 min	MM	1. 95°C 15 min	MM	1. 95°C 10 min	MM
2. 95°C 15 s	Σ 23 µl	2. 95°C 15 s	Σ 23 µl	2. 94°C 45 s	Σ 23 µl
3. 60°C 30	+2 µl	3. 55°C 30	+2 µl	3. 55°C 45 s	+2 µl
4. 72°C 30 s	DNK	4. 72°C 30 s	DNK	4. 72°C 45 s	DNK
5. 80°C 15 s		5. 80°C 15 s		5. 95°C 15 s	
6. 95°C 15 s		6. 95°C 15 s		6. 60°C 30 s	
7. 78°C 1 min		7. 78°C 1 min		7. 95°C 15 s	
8. 95°C 15 s		8. 95°C 15 s		Koraki 2., 3., in 4.	
Koraki 2., 3., 4. in 5. se ponovijo 35x		Koraki 2., 3., 4. in 5. se ponovijo 40x		se ponovijo 40x	

Za test inhibicije smo odpipetirali 1 µl mešanice redčene DNK in 1 µl redčenega standarda v dno iste vdolbinice ter to ponovili za kombinacijo različnih redčitev. Z elektronsko pipeto smo nato dodali še 23 µl osnovne mešanice. Glede na rezultate testa smo izbrali 16 kratno redčitev DNK, saj pri tej redčitvi inhibicija ni bila več prisotna. To redčitev smo uporabljali pri vseh vzorcih za kvantifikacijo izbranih DNK regij.

Poleg vzorcev smo v mikrotitrsko ploščo nanašali redčitve standardov s poznanim številom kopij ter negativno kontollo, pri kateri smo namesto DNK uporabili DEPC vodo. Po končanem nanašanju smo preverili, da v vdolbinicah ni bilo prisotnih mehurčkov, sicer smo jih odstranili s čistim pipetnim nastavkom. Vsebino smo premešali z rahlim tapkanjem ter čez mikrotitesko ploščo nalepili prozorno folijo. Sledilo je 10 sekundno centrifugiranje na 1000 rpm. Ploščo smo vstavili v napravo ABI 7500 fast (Applied Biosystems®) ter nastavili parametre reakcije. Posameznim vdolbinicam smo dodelili tarčno DNK ter pripadajoč program vpisali poznano število kopij redčitvam standarda, na podlagi katerih je bilo določeno število kopij v vzorcih. Po končani reakciji smo preverili standardno krivuljo ter izpustili tiste ponovitve redčitev standardov, ki so najbolj izstopale, tako da smo dosegli učinkovitost nad 90 %. Za preračun števila kopij na gram suhih tal smo uporabili formulo (6).

$$\text{Število kopij na gram suhih tal} = \frac{\text{št.kopij} \times \text{rečitev}}{\text{volumen vzorca}} \times \frac{\text{volumen spiranja kolone}}{\text{masa suhih tal}} \quad \dots (6)$$

3.3 OBDELAVA REZULTATOV

Vse dobljene rezultate kemijskih, fizikalnih in molekularnih analiz smo vnesli v excel datoteko, kjer smo oblikovali tabelo, ki smo jo uporabili za statistično obdelavo podatkov v programu R. Iz podatkov smo naprej izračunali povprečja blokov – 3 vzorcev iz posameznega medvrstnega prostora ter nato iz teh povprečij izvedli dvosmerno analizo variance (ANOVA). Za ugotavljanje razlik obravnavanj (obdelava in globina) smo uporabili test mnogoterih primerjav - Tukey HSD. Pri vseh analizah smo upoštevali 5 % stopnjo tveganja. Statistično značilne razlike med razredi smo označili v rezultatih z različnimi malimi črkami pri $p < 0,05$.

Podatke TRFLP analize, pridobljene s kapilarno elektroforezo, smo najprej ročno pregledali v programu GeneMapper, kjer smo sprejeli ali zavrnili posamezne vzorce glede na kromatogram in ROX standard. Podatke o dolžini in intenziteti terminalnih fragmentov smo izvozili v obliki tabele, iz katere smo nato v spletnem programu T-REX pripravili matrico po obravnavanjih za vnos v program R. Izločili smo fragmente s fluorescenco nižjo od 100 enot in krajše od 50 bp. Za ugotavljanje razlik v sestavi mikrobnih združb smo uporabili metodo UPGMA (metoda neponderirane aritmetične sredine) in metodo glavnih komponent (PCA) v programu R in TinnR s knjižnicami ade4, vegan, gplots in Rcdmr.

4 REZULTATI

Na območju preučevanih vinogradov so evtrična rjava tla na matični podlagi eocenskega flisa (Slika 7C). Talni profil med izbranimi sosednjima vinogradoma nam je razkril sosledje naslednjih talnih horizontov: v prvih 0-8 cm je prisoten humusno akumulativni A horizont, kambični Bv horizont sega od 8 do 28 cm, globje so tla pomešana z matično kamnino (BvC horizont), C horizont se začne na globini 38 cm in sega do +80 cm. Med talnimi horizonti so jasno razvidni prehodi.

Preglednica 8: Delež skeleta in volumska gostota tal v zatravljenem (ZV) in obdelanem vinogradu (OV). Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake ($\pm SN$).

Obravnavanje	Delež skeleta %	Volumska gostota g cm^{-3}
ZV 0-10	$14,8 \pm 2,7$ b	$1,34 \pm 0,02$ b
ZV 10-20	$21,0 \pm 4,0$ ab	$1,47 \pm 0,05$ ab
ZV 20-30	$29,2 \pm 6,9$ ab	$1,56 \pm 0,04$ a
OV 0-10	$28,5 \pm 5,7$ ab	$1,37 \pm 0,02$ b
OV 10-20	$35,8 \pm 7,6$ ab	$1,46 \pm 0,05$ ab
OV 20-30	$51,4 \pm 18,0$ a	$1,48 \pm 0,02$ ab

Povprečna volumska gostota je $1,47 \text{ g cm}^{-3}$ na celotni globini tal (0-30 cm). Globina tal statistično značilno vpliva na njen volumski gostotu, sama obdelava pa na volumski gostoto ne vpliva. V zgornjih 0-10 cm ZV volumska gostota znaša $1,36 \text{ g cm}^{-3}$, v spodnjih 20-30 cm pa $1,52 \text{ g cm}^{-3}$. Da delež skeleta narašča z globino, smo lahko videli že iz profila, po meritvah v laboratoriju ga je bilo največ prisotnega na spodnji globini obdelanega vinograda (Preglednica 8).

Preglednica 9: Tekstura in deleži posameznih frakcij talnih delcev v zatravljenem (ZV) in obdelanem vinogradu (OV). Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake ($\pm SN$).

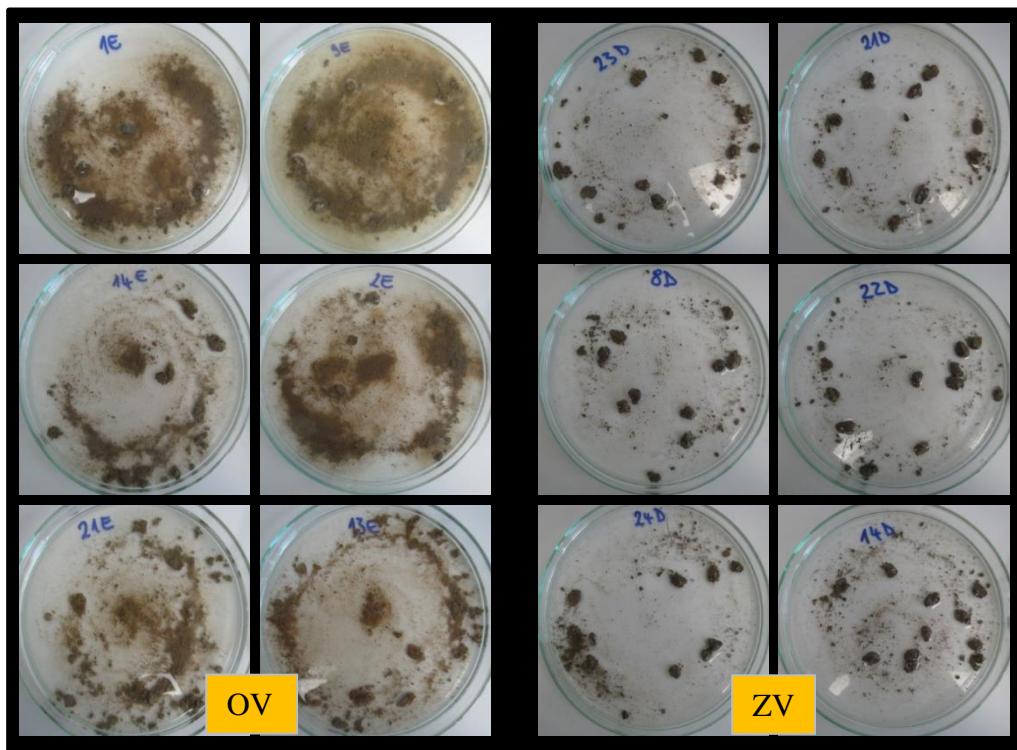
Obravnavanje	Glina %	Pesek %	Grobi melj %	Fini melj %
ZV 0-10	$27,4 \pm 0,8$ b	$13,3 \pm 1,0$ a	$16,7 \pm 0,7$ ab	$42,7 \pm 1,1$ a
ZV 10-20	$32,3 \pm 0,8$ a	$11,6 \pm 1,1$ a	$14,6 \pm 1,2$ ab	$41,6 \pm 0,8$ ab
ZV 20-30	$33,3 \pm 0,4$ a	$11,9 \pm 2,0$ a	$13,3 \pm 1,0$ ab	$41,6 \pm 1,0$ ab
OV 0-10	$32,9 \pm 1,0$ a	$12,7 \pm 0,3$ a	$13,5 \pm 0,2$ ab	$40,4 \pm 0,1$ abc
OV 10-20	$36,1 \pm 1,6$ a	$12,4 \pm 0,9$ a	$11,7 \pm 0,4$ b	$39,5 \pm 0,4$ bc
OV 20-30	$36,3 \pm 0,9$ a	$14,3 \pm 1,7$ a	$11,3 \pm 0,9$ b	$38,1 \pm 0,6$ c

Teksturni razred je na območju obhod vinogradov meljasto glinena ilovica (MGI). Največji delež v teksturi tal predstavlja melj (54,1 %), od tega velik delež fini melj (40,6 %), sledi

glina (do 36,3 %), manj je peska (12,7 %) (Preglednica 9). Med obdelavama in globinami ni večjih razlik v deležih posameznih delcev.

4.1 OBSTOJNOST STRUKTURNIH AGREGATOV IN KEMIJSKE LASTNOSTI TAL V ODVISNOSTI OD OBDELAVE

Struktura tal je dobro izražena. V zgornjem A horizontu je oreškasta ter prehaja z globino (Bv, Bc) v poliedrično. Strukturni agregati so v ZV veliko bolj stabilni kot v OV. To je jasno razvidno iz slike 8 (metoda po Sekeri). Z metodo mokrega sejanja smo ugotovili, da je delež obstojnih strukturnih agregatov 2 mm frakcije na globini 0-10 cm znašal 95,6 % pri ZV in 40,96 % pri OV. Obe preizkušeni metodi sta primerljivi, saj smo v lestvici po Sekeri (Preglednica 2) določili visoko stabilnost talnih agregatov ZV (vrednosti 1- 2), v OV pa so skoraj vsi agregati razpadli (vrednosti 5-6).



Slika 9: Obstojnost strukturnih agregatov v vodi, 8mm frakcija po 10 minutah namakanja. OV – obdelovan vinograd; ZV – zatravljen vinograd.

Način obdelave tal vpliva na kationsko izmenjevalno kapaciteto (CEC) tal, kar lahko razberemo iz preglednice 10, vendar pa te razlike niso bile statistično značilne. CEC je v zgornjih 0-10 cm ZV večja kot v OV (39,8 v primerjavi z 31,2 mmol_c 100 g⁻¹). Na CEC je imel velik vpliv delež organske snovi tal, ta se ob upoštevanju linearnega modela, ta poveča za 1,9 mmol_c 100g⁻¹ tal ob povečanju deleža organske snovi za 1 % (priloga H). Delež

bazičnih kationov se med vinogradoma značilno razlikuje le na spodnji globini (94,2 % v ZV in 86,3 % v OV), največ je kalcija (med 78 in 92 %).

Preglednica 10: Poljska kapaciteta, kationska izmenjevalna kapaciteta ter delež bazičnih kationov tal v zatravljenem (ZV) in obdelanem vinogradu (OV). Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake ($\pm SN$).

Obravnavanje	Poljska kapaciteta (PK) %	Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) mmol./100g	Delež bazičnih kationov (V vrednost) %
Z*	24,3 \pm 0,8 a*	39,0 \pm 1,1 a*	92,9 \pm 1,2 a*
ZV 0-10	27,0 \pm 1,0 a	39,8 \pm 3,1 a	90,5 \pm 2,9 ab
ZV 10-20	23,2 \pm 0,6 a	39,0 \pm 0,9 ab	94,1 \pm 1,1 a
ZV 20-30	22,8 \pm 0,7 a	38,1 \pm 1,7 ab	94,2 \pm 1,7 a
O*	21,6 \pm 1,5 a*	30,3 \pm 0,9 b*	87,3 \pm 0,5 b*
OV 0-10	21,0 \pm 2,1 a	31,2 \pm 0,9 ab	88,1 \pm 0,7 ab
OV 10-20	22,6 \pm 1,8 a	29,8 \pm 2,4 b	87,4 \pm 1,3 ab
OV 20-30	21,2 \pm 4,5 a	29,8 \pm 1,2 b	86,3 \pm 0,7 b

Največjo poljsko kapaciteto (PK), t.j. sposobnost za zadrževanje vode smo določili v zgornjih 0-10 cm ZV, kjer je znašala 27,0 %, na isti globini OV pa 21,0 % (Preglednica 10), vendar pa razlika ni bila statistično značilna. V ZV smo zaznali zmanjševanje PK z globino tal, vendar prav tako to ni bilo statistično značilno.

Tla imajo v obeh vinogradih nevtralen pH. Vsebnost rastlinam dostopnega fosforja je na globini 0-10 cm ZV večja od OV (40,5 v primerjavi z 15,9 mg 100 g⁻¹ tal). Vsebnost fosforja se z globino zmanjšuje v obeh vinogradih. Tla ZV so dobro preskrbljena s fosforjem, tudi na globini 20 - 30 cm (16,9 mg na 100 g tal), medtem ko je preskrbljenost tal s fosforjem v OV pod 10 cm nezadostna (Preglednica 11).

Preglednica 11: Rastlinam dostopne vsebnosti P in K, ter pH tal v zatravljenem (ZT) in obdelovanem (OV) vinogradu. Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake ($\pm SN$).

Obravnavanje	pH	P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g
Enota		mg/100g	mg/100g
Z*	7,2	32,6 \pm 6,8 a*	24,5 \pm 3,1 a*
ZV 0-10	6,9	40,5 \pm 6,2 a	31,9 \pm 3,5 a
ZV 10-20	7,2	40,4 \pm 9,1 a	23,4 \pm 2,9 ab
ZV 20-30	7,3	16,9 \pm 2,3 ab	18,4 \pm 1,2 b
O*	7,1	9,5 \pm 1,7 b*	16,4 \pm 1,4 b*
OV 0-10	7,2	15,9 \pm 0,3 ab	22,0 \pm 0,6 ab
OV 10-20	7,2	5,8 \pm 0,3 b	13,9 \pm 0,3 b
OV 20-30	7,1	6,7 \pm 1,1 b	13,4 \pm 0,3 b

Rastlinam dostopnega kalija je na globini 0-10 cm v ZV več kot v OV (31,9 v primerjavi z 22,0 mg 100 g⁻¹ tal). Vsebnost kalija z globino pada pri obeh vinogradih, tako ga je na globini

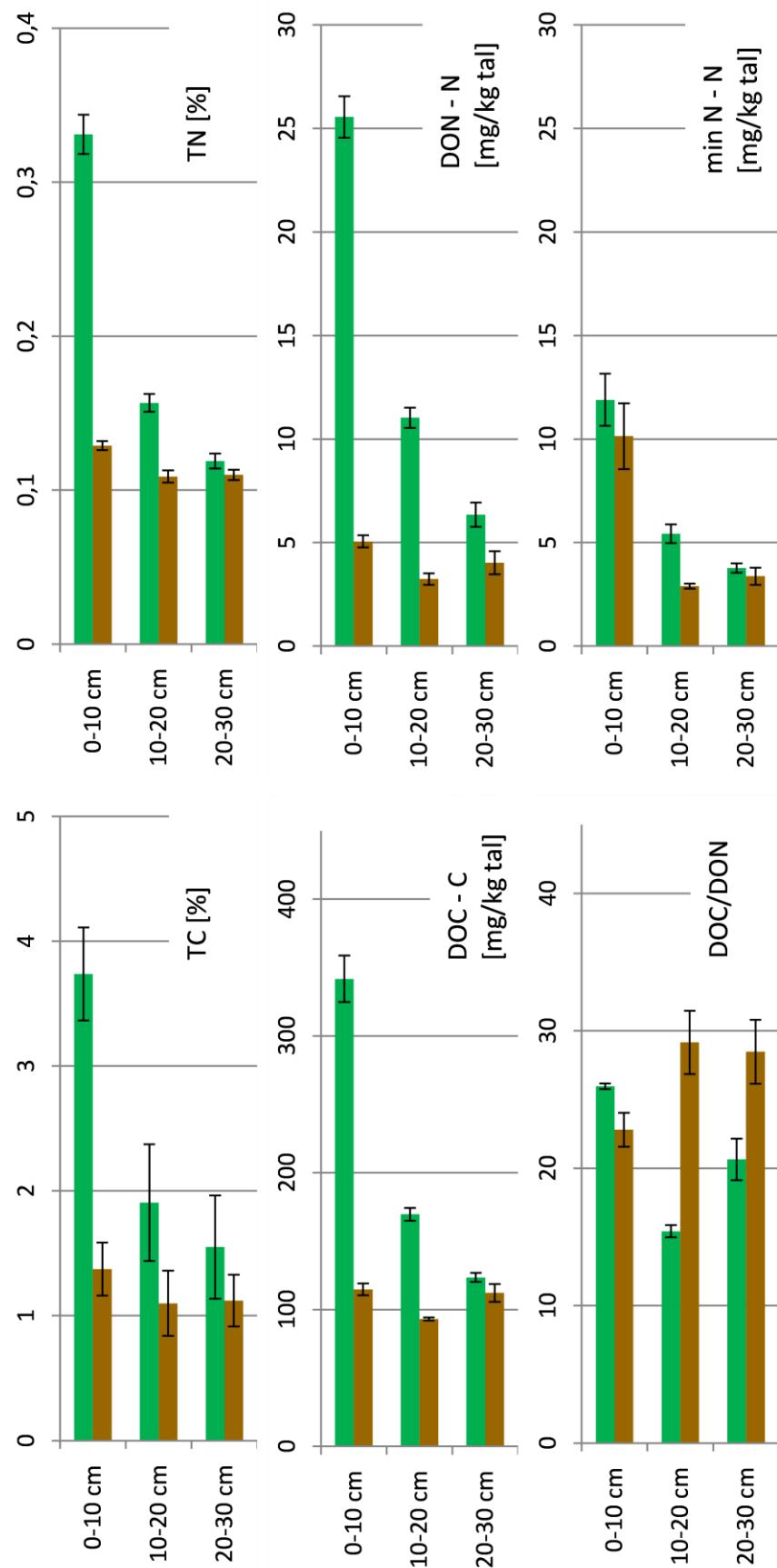
0-10 cm za 30 % več kot globje v tleh. ZV je s kalijem v dobro do čezmerno preskrbljen, OV pa srednje dobro preskrbljen (Preglednica 11). V povprečju je vsebnost fosforja in kalija večja v ZV v primerjavi z OV (Priloga H).

4.2 VSEBNOSTI OGLJIKA IN DUŠIKA V TLEH V ODVISNOSTI OD OBDELAVE

Vsebnost skupnega ogljika (TC) in organskega ogljika (TOC) je v zgornjih 0-10 cm ZV 3 krat večja kot v OV (Slika 10, Priloga A). Vsebnosti mineralnega C (CaCO_3) so bile v obeh vinogradih neodvisne od globine vzorčenja, povprečna vrednost je v ZV znašala 0,48 %, v OV pa 0,24 % (Priloga A). Največji delež TOC je v zgornjih 0-10 cm ZV (3,33 %), vsebnosti se z globino zmanjšujejo na 1,14 % na globini 10-20 cm in 0,99 % na globini 20-30 cm. Podobno so tla ZV vsebovala tudi značilno več skupnega dušika (TN) na globini 0-10 cm (0,33 %) v primerjavi z OV (0,13 %). Vsebnost skupnega dušika v ZV z globino značilno pada, medtem ko je delež dušika v OV med preučevanimi globinami primerljiv (Slika 10). Skupna zaloga ogljika in dušika do globine 30 cm znaša v ZV $81,1 \text{ t TOC ha}^{-1}$ in $8,6 \text{ t TN ha}^{-1}$; v OV pa $40,8 \text{ t TOC ha}^{-1}$ in 5 t TN ha^{-1} (Priloga F).

Organskih topnih oblik ogljika (DOC) je značilno več v ZV kot OV (Slika 10). Največja vsebnost DOC je v zgornjih 0-10 cm ZV ($341,8 \text{ mg kg}^{-1}$ tal), ki pa se z globino zmanjšuje ($169,6 \text{ mg kg}^{-1}$ tal na globini 10-20 cm in $123,5 \text{ mg kg}^{-1}$ tal na globini 20-30 cm). V OV ni razlik v DOC med globinami vzorčenja in znaša v povprečju $106,6 \text{ mg kg}^{-1}$ tal v 0-30 cm globine tal. Vsebnost skupnega topnega organskega dušika (DON), prikazana na sliki 10, kaže podoben trend kot DOC. Največji delež DON je v zgornjih 0-10 cm ZV ($25,55 \text{ mg kg}^{-1}$ tal), vsebnosti se z globino zmanjšujejo na $11,03 \text{ mg kg}^{-1}$ tal na globini 10-20 cm in $6,35 \text{ mg kg}^{-1}$ tal na globini 20-30 cm. V OV je vsebnost DON manjša, hkrati tu ni značilnih razlik po globinah in znaša med 3 in 5 mg kg^{-1} tal (Priloga A). Skupna zaloga topnih oblik ogljika in dušika do globine 30 cm znaša v ZV $0,9 \text{ t DOC ha}^{-1}$ in $0,061 \text{ DON t ha}^{-1}$; v OV pa $0,46 \text{ t DOC ha}^{-1}$ in $0,018 \text{ DON t ha}^{-1}$ (Priloga F).

Razmerje med skupnim ogljikom (TC) in dušikom (TN) je bilo med 10 in 12, brez razlik med obravnavanji (Priloga A). Razmerje topnih organskih oblik ogljika (DOC) in dušika (DON) je bilo v ZV med 15 in 26, v OV pa je bilo razmerje širše in sicer med 21 in 29 (Slika 10).

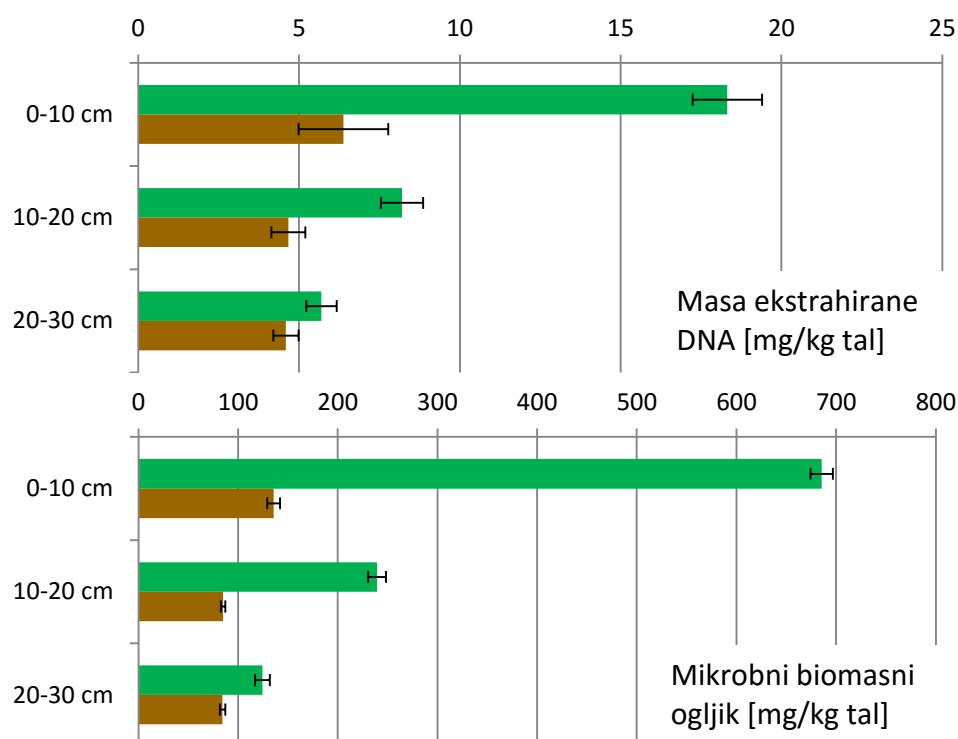


Slika 10: Vsebnosti ogljika in dušika ter njuno razmerje v odvisnosti od globine in obdelave vinogradniških tal
 (zeleni barva – zatravljen, rjava barva - obdelovan vinograd).

Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake.

4.3 MIKROBNA BIOMASA V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL

Mikrobnega biomase določena z metodo kloroformne fumigacije in ekstrakcije v CaCl_2 je pokazala statistično značilne razlike med ZV in OV (Slika 11). Tla zgornjih 0-10 cm ZV so v povprečju vsebovala 649,7 mg mikrobnega C kg^{-1} tal, medtem ko so tla v OV na isti globini vsebovala 134,5 mg mikrobnega C kg^{-1} tal. Vsebnost mikrobsne biomase v ZV z globino pada bolj kot pri OV. Skupna zaloga mikrobsnega biomasnega C je do globine 30 cm 1,45 tone ha^{-1} , medtem ko ga je v OV 0,44 t ha^{-1} (Priloga F).



Slika 11: Vsebnost mikrobsnega biomasnega ogljika in skupne talne DNK v odvisnosti od globine in obdelave vinogradniških tal. (rjava barva - obdelovan, zelena barva - zatravljen vinograd). Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p=0,05$. Prikazana so povprečja in standardne napake.

Podoben trend, kot pri vsebnosti mikrobsne biomase, lahko vidimo tudi pri količini ekstrahirane DNK na sliki 11. Globina vzorčenja značilno vpliva na količino DNK pri ZV, medtem ko pri OV takšen upad ni značilen. Na globini 0-10 cm ZV je masa DNK znašala $18,32 \mu\text{g g}^{-1}$ tal, v OV na isti globini pa $6,38 \mu\text{g g}^{-1}$ tal. Pri obeh obdelavah je variabilnost količine ekstrahirane DNK večja pri zgornji globini vzorčenja.

Medsebojno odvisnost mikrobsnega biomasnega ogljika in mase skupne izolirane DNK smo preverili z linearnim modelom. Ugotovili smo močno medsebojno odvisnost, saj nam model pojasni približno 95% variance mase izolirane DNK (priloga G).

Linearni regresijski model nam pokaže tudi močno statistično značilnost zveze med deležem organske snovi, topnim ogljikom in dušikom ter vsebnostjo mikrobnega biomasnega ogljika. Iz koeficiente lahko predpostavimo, da bi se nam povečala vsebnost mikrobnega biomasnega ogljika za $131,2 \text{ mg C kg}^{-1}$ tal, če bi se nam povečala vsebnost organske snovi za 1 %. Ob povečanju topnih oblik ogljika za 1 mg kg^{-1} tal bi se nam po modelu povečala mikrobnna biomasa za $2,31 \text{ mg C kg}^{-1}$ tal pri ogljiku, medtem ko bi se nam ob povečanju DON za 1 mg kg^{-1} mikrobnja biomasa povečala za $18,2 \text{ mg C kg}^{-1}$ tal pri dušiku (priloga G).

4.4 SESTAVA, PESTROST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB V ODVISNOSTI OD OBDELAVE TAL

Na podlagi relativnih deležev terminalno označenih fragmentov (TRF) smo spremljali spremembe v sestavi splošne združbe bakterij, arhej in gliv (Slika 12, Priloge C, D, E). Ugotovili smo, da obdelava medvrstnega prostora značilno vpliva na sestavo združb talnih mikroorganizmov, vendar je ta vpliv različen med posameznimi domenami. Pričakovano, glede na stratifikacijo organske snovi in spremenjene talne lastnosti v ZV, smo ugotovili močnejši vpliv globine na sestavo mikrobnih združb v ZT v primerjavi z OV.

Pri bakterijah smo največjo razliko v sestavi združbe med vinogradoma določili v zgornjih 10 cm (Slika 12). Razlika se nato z globino manjša, tako sta si združbi bakterij na globini 20-30 cm med vinogradoma že precej podobni. Sestava bakterij med zgornjima dvema globinama OV je podobna, ter se razlikuje od spodnje na globini 20-30 cm.

Pri arhejah smo zaznali najmanjši vpliv obdelave medvrstnega prostora na sestavo združbe (Slika 12). Vpliv obdelave na razliko v sestavi arhej je še najbolj zaznati v zgornjih dveh globinah. Spodaj so si združbe med seboj že zelo podobne. V ZV ima globina večji vpliv na sestavo arhej v primerjavi z vplivom pri OV.

Obdelava tal ima največji vpliv na sestavo gliv (Slika 12). Združbe v OV so si po vseh treh globinah zelo podobne, medtem ko smo v ZV določili razlike v sestavi gliv med posameznimi globinami vzorčenja. Sestava gliv zgornjih 10 cm ZV je različna tako od združb gliv spodnjih globin ZV, kot tudi od sestave gliv prisotne v OV.

Za oceno pestrosti splošnih mikrobnih združb bakterij, arhej in gliv smo primerjali število terminalno označenih fragmentov (TRF) (Slika 13, Priloga B). Obdelava tal v splošnem ni vplivala na število fragmentov, razen pri glivah, kjer smo v ZV izmerili večje število fragmentov na globini 10-30 cm v primerjavi z OV.

Obdelava tal ni imela vpliva na bakterijsko pestrost, je pa nanjo vplivala globina vzorčenja. Na globini 20-30 cm obeh vinogradov je bila večja bakterijska pestrost, saj smo dobili več TRF-jev v primerjavi z zgornjo globino vzorčenja (Slika 13, Priloga B in D). Na pestrost

arhej nista vplivali niti obdelava niti globina. Na glivno pestrost pa sta vplivali tako obdelava kot tudi globina vzorčenja.

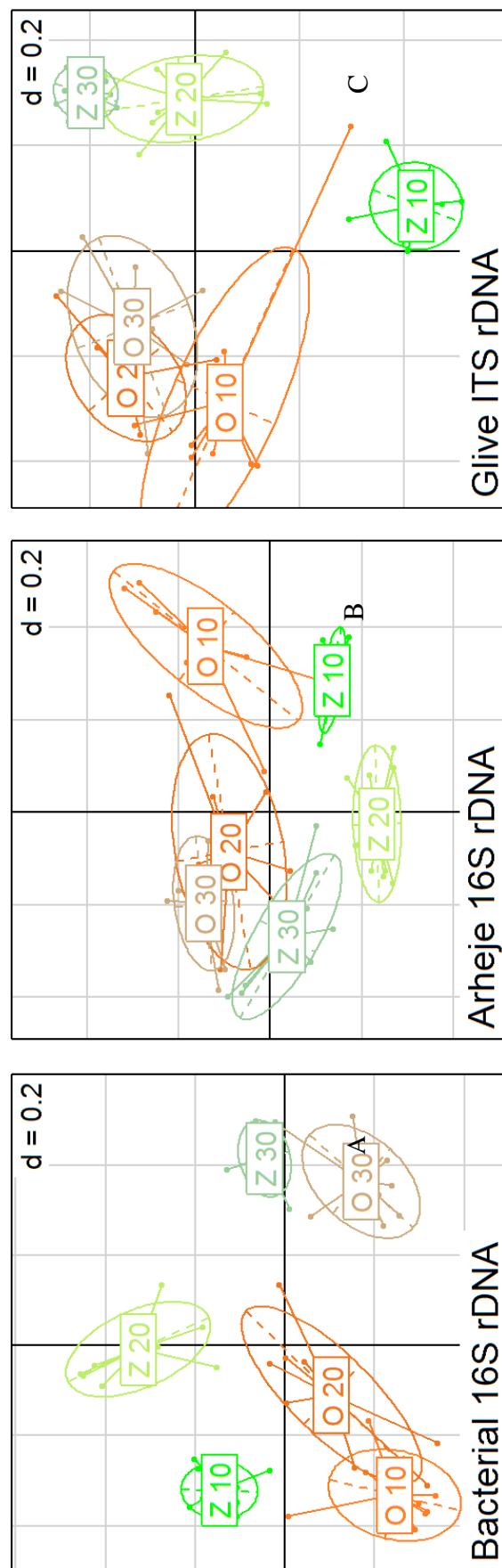
Za določanje številčnosti posamezne domene mikroorganizmov smo uporabili metodo PCR v realnem času (qPCR). Z njo smo določali število kopij ribosomalne regije (16S/ITS) prek izbire specifičnih začetnih oligonukleotidov za posamezno domeno. Številčno je bilo največ bakterij, sledile so glive, najmanj je bilo arhej (Slika 13).

Statistično značilno različno število bakterij smo zaznali le na globini 0-10 cm, tu je v ZV bilo $1,2 \times 10^{10}$, v OV pa $4,6 \times 10^9$ kopij bakterijske 16S DNK. Obdelava medvrstnega prostora je torej zmanjšala število bakterij. Številčnost bakterij je z globino padalo le v ZV, medtem ko v OV ni bilo razlik v številčnosti bakterij po globinah (Slika 13).

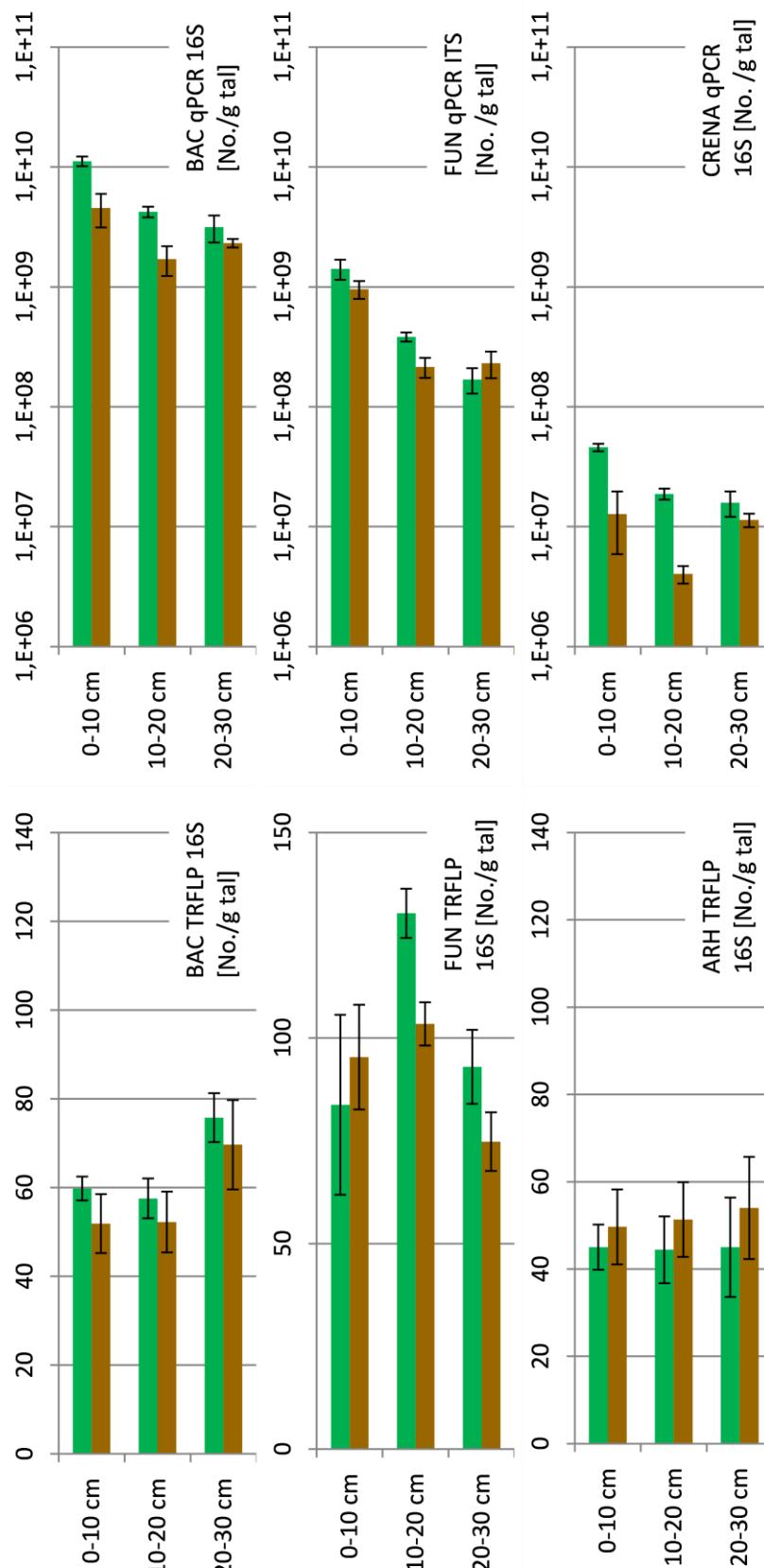
Podobno kot pri bakterijah je bila statistično značilna razlika v številu krenarhej med ZV in OV le na zgornjih 0-10 cm globine vzorčenja, tu je bilo v ZV $4,6 \times 10^7$, v OV pa $1,3 \times 10^7$ kopij krenarhejske 16S DNK/ g tal. Kot pri bakterijah, je tudi pri krenarhejah obdelava medvrstnega prostora povzročila zmanjšanje njihove številčnosti (Slika 13).

Na številčnost gliv, obdelava medvrstnega prostora vinograda ni imela vpliva. Številčnost gliv je znašala med 1,7 in $14,1 \times 10^8$ kopij/g tal. Značilne razlike pa so se pojavile po globinah vzorčenja. Vpliv globine je večji v ZV, kar je razvidno iz slike 13, tu je bilo na globini 0- 10 cm $1,4 \times 10^9$, na globini 20-30 cm pa $1,7 \times 10^8$ kopij ITS DNK g^{-1} tal (Slika 13).

Z linearnim modelom smo ugotovili odvisnost številčnosti mikroorganizmov od mase DNK, mikrobnega biomasnega ogljika in organske snovi tal. Povečanje organske snovi za 1 % bi, ob upoštevanju modela, povzročilo povečano število kopij bakterijske 16S DNK za $2,1 \times 10^9$, krenarhejske 16S DNK za $8,6 \times 10^6$ in glivne ITS DNK za $2,7 \times 10^7$ na gram tal (Priloga G).



Slika 12: Analiza glavnih komponent seta TRFLP podatkov bakterijske 16S rDNK (A), arhejske 16S rDNK (B), ter glijive ITS rDNK (C).
Bližina elips, ki obkrožajo ponovitve posameznega obravnavanja, kažejo na podobnost med obravnavanjem.
Obdelana tla so na sliki označena z veliko črko O, zatravljena pa s črko Z. Spodnje meje globine vzorcenja so označene s številkami za črko, npr. Z-10 označuje globino 0-10 cm.



Slika 13: Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na število terminalnih fragmentov in število bakterij (BAC), gliv (FUN), krenarjev (CRENA) (zelena barva - zatravljen, rjava barva – obdelan vinograd).
 Globina vzorčenja je podana na y osi. Prikazana so povprečja in standardne napake.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv dolgoletne zatravljenosti tal na vsebnost organske snovi in mikrobnega biomasa

Po pričakovanju smo v tleh ZV izmerili več organske snovi kot v OV (Priloga A), z največjimi razlikami v zgornjih 10 cm tal. Večjo vsebnost organske snovi in stratifikacijo le te v ZV so pred 15 leti na isti lokaciji ugotovili že Suhadolc in sod. (2000). Vsebnost organske snovi se je v tem času malenkost povečala, saj so imela tla v zgornjih 10 cm zatravljenega vinograda 5,75 % organske snovi, v spodnjih globinah pa se je delež organske snovi zmanjšal. V obdelovanem vinogradu se je vsebnost organske snovi v 15 letih v zgornjih 10 cm zmanjšala iz 2,4 % na 1,95 %. Prav tako se je zmanjšala vsebnost organske snovi tudi na spodnjih globinah obdelovanega vinograda (Priloga I).

Vendar pa Suhadolc in sod. (2000) niso raziskali nadaljnega vpliva povečane vsebnosti organske snovi na ostale parametre kakovosti tal. Z našo raziskavo smo dokazali večjo kationsko izmenjevalno kapaciteto, večjo sposobnost tal za zadrževanje vode ter večjo obstojnost strukturnih agregatov v ZV v primerjavi z OV (Preglednica 10, Slika 9). Dobljeni rezultati so skladni s podobno raziskavo v centralni Španiji (Ruiz-Colmenero in sod., 2013), kjer je 4 letna zatravljenost vinograda povečala vsebnost organskega ogljika in obstojnost talnih strukturnih agregatov. Vsebnost organskega ogljika je sicer v briškem zatravljenem vinogradu v povprečju večja (3,3 %), v primerjavi s španskim (0,9 %). Vzrok za to je najverjetneje razlika v klimatskih pogojih (temperature, padavine).

Zatravljenost in globina tal značilno vplivata na vsebnost topnih organskih oblik ogljika (DOC) in dušika (DON) (Slika 10, Priloga A). Rezultati so skladni z ugotovitvami Suhadolc in sod. (2000), saj se vsebnosti vročevodno določenega ogljika dobro ujemajo z našim seštevkom mikrobnega biomasnega ogljika in topnega organskega ogljika, ki je lahko približek le temu (990mg C kg^{-1} – naša raziskava, 900mg C kg^{-1} – Suhadolc in sod. (2000)). Topne oblike organskega ogljika in dušika so vir hranil za mikroorganizme, kar potrjujejo tudi rezultati naše študije. V obeh vinogradih smo namreč zaznali značilno linearno povezavo med vsebnostjo organske snovi, DOC in DON ter mikrobeno biomaso (Priloga G).

Vpliv zatravljenosti na mikrobeno biomaso in povečano bakterijsko pestrost so dokazali tudi Moreno in sod. (2009) v oljčniku. Povečanje števila mikroorganizmov lahko vpliva na povečanje števila koristnih predatorskih nematod v ZV (Rahman in sod., 2009), te se hrani z manjšimi nematodami, tudi rastlinskimi paraziti in tako nudijo njihovo biološko kontollo. Vpliv povečane mikrobene biomase in posledično nematod vpliva pozitivno tudi na sproščanje mineralnega dušika iz mikrobene biomase (Neher, 2001).

Dolgoletna zatravljenost v primerjavi z obdelovanim medvrstnim prostorom povečuje zalogo C v tleh. V naši raziskavi smo dokazali da je potencial za skladiščenje ogljika v tleh ZV še enkrat večji v primerjavi z OV. Skupna zaloga organskega ogljika je bila v ZV $81,1 \text{ t ha}^{-1}$ v OV pa $40,8 \text{ t ha}^{-1}$ v globini do 30 cm.

5.1.2 Vpliv dolgoletne zatravljenosti tal na mikrobno sestavo, pestrost in številčnost

V naši raziskavi smo ugotovili, da je sestava mikroorganizmov odvisna od obdelave tal in globine (Slika 12), kar je skladno z ugotovitvami drugih avtorjev (Peixoto in sod. 2006, Feng in sod., 2003). Iz analize razlik v sestavi bakterij, arhej in gliv lahko sklepamo, da je združba arhej najmanj občutljiva na vpliv obdelave in globine. Sestava bakterijskih združb se razlikuje med obdelavama, a se učinek obdelave z globino zmanjšuje. Sestava glivne združbe pa se v primerjavi z bakterijsko in arhejsko najbolj spremeni z obdelavo, kar je pričakovano. Glivne združbe so bolj občutljive na obdelavo tal (oranje, ripanje, branjanje,...), saj se s temi posegi pretrga glivni micelij. Lumini in sod (2009) so na primer s sekvinciranjem 18S ribosomske RNK dokazali, da se v obdelanem vinogradu zmanjša raznolikost arbuskularnih mikoriznih gliv v primerjavi z neobdelanim.

Večjo mikrobno pestrost smo pričakovali v dolgoletno zatravljenem vinogradu, predvsem zaradi stabilnejšega okolja (brez obdelave tal) in večje pestrosti vegetacije, ki omogoča večjo heterogenost talnih mikrookolij, v katerih lahko soobstajajo raznolike mikrobne združbe (Plaster, 2009). Našo hipotezo smo potrdili za združbi bakterij in gliv ter ovrgli za arhejsko. Združba arhej je bolj stabilna v okolju in se manj odziva na motnje v ekosistemih v primerjavi z bakterijsko in glivno, kar so poročali tudi Kaurin in sod. (2015). Z metodo TRFLP smo v ZV določili v povprečju treh globin značilno večje število terminalnih fragmentov bakterijske 16S ribosomalne regije in glivne ITS ribosomalne regije, medtem ko je bilo število arhejskih fragmentov večje v OV (Slika 13, Priloga B). Pestrost mikrobnih združb se z globino ni zmanjšala, kar je v neskladju z našimi pričakovanji in raziskavami v naravnih sistemih, kjer so največjo pestrost zaznali na globini 0-10 cm, tako v travniških tleh (Potthoffa in sod, 2006), kot tudi gozdnih (Eilers in sod., 2012). V kitajskem nasadu jabolk so največjo bakterijsko pestrost zaznali v zgornjih 10 cm, manjšo pa na spodnjih dveh, hkrati pa je bila v tej študiji presenetljivo večja pestrost zaznana v obdelovanih tleh v primerjavi z naravno vegetacijo (Jiao in sod., 2014).

Vzrok za neskladja med študijami je lahko, poleg različne rabe tal in okoljskih pogojev, tudi uporaba različnih metod. Kitajski raziskovalci so za ocenjevanje pestrosti uporabljali Biolog Eco-plate plošče, metoda temelji na spremeljanju porabe različnih substratov. Poraba različnih substratov za rast je dober indikator določene funkcije in metabolizma mikroorganizmov. Slabost te metode je, da z njo zajamemo le del mikrobne populacije, običajno tiste hitreje rastoče, in tiste ki so sposobne reducirati tetrazolijevno barvilo. Tako dobimo fiziološko sliko le dela mikrobne populacije (Stefanowicz 2006). Podobno ima tudi

TRFLP metoda določene pomanjkljivosti, ki temeljijo na omejitvah ekstrakcije DNK ter nespecifičnosti začetnih oligonukleotidov in endonukleaz. Določevanje skupne pestrosti mikroorganizmov prek števila terminalnih fragmentov tako lahko ne odraža dejanske pestrosti v talnem vzorcu, saj posamezni terminalni fragmenti v splošnem ne predstavljajo vrste ali rodu. S to metodo zato običajno podcenimo vrstno mikrobeno pestrost (Plassart in sod., 2012). Kljub temu pa je TRFLP metoda še posebej uporabna za ugotavljanje razlik v sestavi mikroorganizmov za kompleksne vzorce kot so talni (Kuske in sod., 2002), ne more pa zelo podrobno določati razlik, kot jih sekvenciranje (Orcutt in sod., 2009).

Tla trajno zatravljenega medvrstnega prostora vinogradu imajo večjo mikrobeno biomaso v primerjavi z obdelovanim (Slika 11). Dokazali smo linearno povezavo med mikrobeno biomaso in številčnostjo bakterij, krenarhej in gliv določeno z metodo qPCR (Priloga G). Število kopij genov izbranih filogenetskih markerjev je tako lahko kazalec mikrobenne biomase posamezne domene mikroorganizmov oziroma njihove številčnosti. Vendar moramo biti pri tem zadržani, saj je mikrobena populacija lahko precenjena zaradi večjega števila kopij ribosomalne DNK v posamezni celici (Blagodatskaya in Kuzjakov, 2013). Hkrati pa moramo tudi upoštevati, da ekstrakcija DNK iz tal ni 100 odstotno učinkovita in s tem številčnost mikrobenne populacije podcenjena (Plassart in sod., 2012). Tla ZV vsebujejo več mikrobenne biomase, kar je glavni vzrok za večje število zaznanih pomnožkov ribosomalne DNK oz. ITS regije mikroorganizmov. Največ kopij smo zaznali iz domene bakterij, sledijo glive, najmanj pa je bilo krenarhejskih, kar je skladno z rezultati triletnje študije različnih kmetijskih tal na Nizozemskem (Silva in sod., 2012). Glede na odvisnost sestave (TRFLP) glivnih populacij od obdelave in globine tal (Slika 12), bi pričakovali, da njihova številčnost sledi podobnemu trendu, torej, da v OV ni značilne stratifikacije po globini, medtem ko je v ZV ta prisotna. Tega trenda pa nismo zaznali, saj je številčnost glivne ITS dobro stratificirana po globini tako v ZV kot tudi OV (Slika 13).

5.1.3 Vpliv dolgoletne zatravljenosti na kakovost tal

Kakovost tal je mogoče opredeliti s fizikalnimi, kemičnimi in biološkimi kazalci. Kakovostna tla zagotavljajo tako pridelavo rastlin, kot tudi ohranjajo ostale ekološke funkcije opredeljene v Predlogu direktive EU parlamenta in sveta (2006). Zadostna vsebnost organske snovi je bistven parameter kakovostnih tal. V Goriških Brdih, kjer prevladujejo teksturno težka tla z večjo vsebnostjo gline in finega melja, je z ustreznou vsebnostjo organske snovi v tleh mogoče omiliti tudi negativne lastnosti težjih tal, kot so zaskorjenost, počasna infiltracija, težja obdelava (Mihelič in sod., 2010).

Na vprašanje, kako vpliva način obdelave medvrstnega prostora v vinogradih na kakovost tal, smo v naši študiji dobili jasne odgovore. Z dolgoletno zatravljenostjo vinogradniških tal so se značilno povečali vsebnost organske snovi v tleh (Slika 10, Priloga A), obstojnost strukturnih agregatov (Slika 9) in poljska kapaciteta za zadrževanje vode v tleh

(Preglednica 11), posledično je manjše tveganje za sušo, ter vodno in vetrno erozijo tal, ki sta ena izmed ključnih procesov degradacije tal. Tla z večjo vsebnostjo organske snovi imajo tudi večjo vsebnost in dostopnost hranil (Preglednica 10 in 11), kar je še posebej pomembno z vidika rodovitnosti tal in gnojenja. Z zatravitvijo se je povečala tudi mikrobnna biomasa tal ter pestrost združbe bakterij in gliv (Slika 11 in 13, Priloga B). To predpostavlja večjo funkcionalno redundanco in s tem večjo kakovost tal (European ..., 2010).

5.1.4 Vpliv obdelave na trto in njen pridelek

Kljud temu, da v naši raziskavi nismo obravnavali vpliva obdelave tal na lastnosti trte in njenega pridelka, pa je smiselno povzeti izsledke nekaterih drugih raziskav. Na ta način osmislimo namen zatravitve, ki je najbolj pomemben iz vidika pridelovalca grozdja, kletarja in prodajalca vina. Trajna zatravljenost zmanjša bujnost trte (Mercenaro in sod., 2014), saj travna ruša tekmuje s trto za hranila in vodo. Posledica zmanjšane bujnosti trte je večja zračnost krošnje, ta pa pozitivno vpliva na preprečevanje razvoja glivnih bolezni (Valdes-Gomez, in sod., 2008). Vpliv trajne zatravljenosti na pridelek sicer še ni povsem jasen in je verjetno odvisen tudi od pedoklimatskih razmer, kot načina vzgoje, saj so rezultati raziskav pokazali zmanjšan pridelek (Ruiz-Colmenero in sod., 2011; Tesic in sod., 2007) ali pa je bil pridelek nespremenjen (Monteiro in Lopez, 2007; Mercenaro in sod., 2014).

Trajna zatravljenost tal vpliva na večjo količino in pestrost talnih mikro in makro organizmov. Ti lahko sprožajo sistemsko inducirano odpornost rastlin prek povečanega sekundarnega metabolizma rastline (Chen in sod., 2006). Sekundarni metabolizem vinske trte je osnova za aromatiko grozdja. Številne raziskave so potrdile povečano pestrost in vsebnost polifenolov v grozdju kot posledico zatravljenosti vinograda (Lee in Steenwerth, 2013; Mercenaro in sod., 2014; Monteiro in Lopez, 2007) in vinu (Xi in sod., 2011).

5.2 SKLEPI

- Tla trajno zatravljenega medvrstnega prostora v vinogradu vsebujejo več organske snovi, imajo večjo obstojnost strukturnih agregatov in večjo sposobnost zadrževanja vode, kar zmanjšuje erozijske procese in ranljivost na sušo. Takšna tla imajo tudi večjo vsebnost rastlinam lažje dostopnih oblik dušika, fosforja in kalija, kar je pomembno upoštevati pri gnojenju vinogradov.
- Tla trajno zatravljenega medvrstnega prostora vinogradu imajo tudi večjo mikrobno biomaso v primerjavi z obdelovanim. Ugotovili smo povezavo med vsebnostjo mikrobne biomase in vsebnostjo skupne izolirane DNK, kot tudi številčnostjo bakterij, arhej in gliv.
- V tleh obeh vinogradov so najbolj številčne bakterije, sledijo glice, najmanj je krenarhej. Globina vzorčenja najbolj vpliva na številčnost glic manj pa na številčnost bakterij in krenarhej, v povprečju je bilo v ZV več bakterij in krenarhej v primerjavi z OV. Razlika v številčnosti glic med obdelavama ni bila značilna.
- Obdelava medvrstnega prostora vinograda in globina tal vplivata na sestavo in pestrost združb bakterij in glic, medtem ko vpliva na sestavo združbe arhej, z našimi metodami nismo zaznali.
- Potrebne so nadaljnje raziskave s katerimi bi preverili kako spremenjena kakovost tal in sestava mikrobnih združb zaradi dolgoletne zatravljenosti medvrstnega prostora vplivata na procese v tleh, lastnosti pridelka in vina.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo preučili vpliv dolgoletne zatravljenosti medvrstnega prostora v vinogradu na kakovost tal. Za preučevanje smo izbrali sosednja vinograda rebule v Medani v Goriških Brdih, s podobnimi pedološkimi, geološkimi, klimatskimi in hidrološkimi lastnostmi. Oba vinograda sta bila pod enako rabo in tehnologijo najmanj 5 let, preden so vinograd na eni izmed lokacij zatravili (v nadaljevanju trajno zatravljen vinograd (ZV) in obdelovan vinograd (OV)). Tla na obeh lokacijah smo vzorčili v letu 2013, po 20 letih spremenjene obdelave tal. Uporabili smo fizikalne, kemische in biološke metode za določanje osnovnih pedoloških parametrov kakovosti tal, kot tudi molekularne metode, s katerimi smo določali sestavo, pestrost in številčnost talnih mikrobnih združb.

Tla obeh vinogradov so bila pedogenetsko podobna, uvrstili smo jih med evtrična rjava tla na flišu, s podobnim pH in teksturo (meljasto glinena ilovica, z visokim deležem finega melja in gline (skupaj čez 70 % - (Preglednica 9)). Značilne razlike v talnih lastnostih zaradi dolgoletne različne obdelave vinogradov smo zaznali že z enostavnim testom obstojnosti strukturnih agregatov v vodi (Slika 9). Talni strukturni agregati zatravljenega vinograda so bili zelo obstojni (96 %), medtem ko so agregati obdelovanega vinograda v vodi razpadali (41 % obstojnih). Poleg tega so imela tla ZV v primerjavi z OV večjo sposobnost za zadrževanje vode (poljsko kapaciteto) kot tudi kationsko izmenjevalno kapaciteto v celotnem profilu vzorčenja (Preglednica 10). V splošnem je bil zatravljen vinograd boljše preskrbljen s fosforjem in kalijem, medtem ko smo v obdelovanem vinogradu ugotovili nezadostno preskrbljenost tal s fosforjem predvsem na spodnjih dveh globinah (~ 6 mg/100 g tal) (Preglednica 11, Priloga I).

Zatravljen vinograd je bil boljše preskrbljen tudi z organsko snovjo. Največje razlike v vsebnosti organske snovi so se pojavljale v zgornji globini vzorčenja, globje so bile razlike med vinogradoma manjše (Slika 10, Priloga A). Ugotovili smo, da skupna zaloga ogljika in dušika do globine 30 cm v zatravljenem vinogradu znaša $81,1 \text{ t C ha}^{-1}$ in $8,6 \text{ t N ha}^{-1}$, v obdelovanem pa $40,8 \text{ t C ha}^{-1}$ in 5 t N ha^{-1} (Priloga F). To kaže na pozitivno vlogo trajne zatravljenosti vinograda z vidika akumulacije organske snovi. Vpliv organske snovi se je odražal tudi v večji mikrobnii biomasi, saj je bila količina le-te 3 krat večja na hektar v zatravljenem vinogradu kot v obdelovanem. To se je odražalo tudi pri večji količini skupne izolirane DNK (Slika 11, Priloga B).

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti ali zatravljenost vpliva tudi na sestavo, pestrost in številčnost mikrobnih združb bakterij, arhej in gliv. V splošnem smo ugotovili, da obdelava medvrstnega prostora vpliva na sestavo in številčnost združb talnih mikroorganizmov, a je ta vpliv različen med posameznimi domenami mikroorganizmov (Slika 13). Razlike med zatravljenim in obdelovanim vinogradom smo s TRFLP metodo ugotovili v sestavi in pestrosti združb gliv in bakterij (Priloga B). V zatravljenem vinogradu smo ugotovili večjo

pestrost teh dveh domen mikroorganizmov, združba arhej pa je na obdelavo in globino najmanj občutljiva – značilne razlike v sestavi nismo zaznali.

Največ kopij ribosomalne DNK smo s pomočjo qPCR določili iz domene bakterij, teh je bilo med 11 in $4,5 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ tal (Slika 13, Priloga B). Število kopij gliv je bilo 10-krat manjše (10^8 g^{-1} tal), krenarhej pa še $100 \times$ manj. Številčnost bakterij, krenarhej in gliv je izrazito padala z globino, v povprečju smo zaznali v zatravljenem vinogradu več bakterij in krenarhej, medtem ko pri glivah ni bilo značilnih razlik.

Naša raziskava je dokazala pozitivne učinke več kot 20 letne zatravljenosti medvrstnega prostora vinograda na kakovost tal z vidika večine fizikalnih, kemijskih in bioloških parametrov. V prihodnje bi bilo zanimivo raziskati tudi učinke različne obdelave medvrstnega prostora na mikrobnno pogojene procese v tleh in kakovost grozdja in vina.

7 VIRI

- Abdalla M., Osborne B., Lanigan G., Forristal D., Williams M., Smith P., Jones M. 2013. Conservation tillage systems: a review of its consequences for greenhouse gas emissions. *Soil Use and Management*, 29, 2: 199-209
- Aislabie J., Deslippe J. R. 2012. Soil microbes and their contribution to soil services. V: *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends*. Dymond JR (eds.). (str. Lincoln, Manaaki Whenua Press: 143-161
- Barton L. L., Northup. D. E. 2011. *Microbial Ecology*. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc: 440 str.
- Bates S., Berg-Lyons D., Caporaso J., Walters W., Knight R., Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *International Society for Microbial Ecology*, 5: 908-917
- Beck T., Joergensen R., Kandeler E., Makeschin F., Nuss E., Oberholzer H., Scheu S. 1997. An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 7: 1023-1032
- Berg B., McClaugherty C. 2008. *Plant litter*. 2nd ed.. Berlin, Springer: 338 str.
- Blagodatskaya E., Kuzjakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology & Biochemistry*, 67: 192-211
- Bloem J., Hopkins D. W., Benedetti A. 2005. *Microbiological methods for assessing soil quality*. Oxfordshire, Cambridge, CABI Publishing: 320 str.
- Bowen J. L., Weisman D., Yasuda M., 2013. FunFrame: A functional gene ecological analysis pipeline. *Bioinformatics*. 29, 9: 1212-1214
- Chen H., Jones A. D., Howe G. A. 2006. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580: 2540–2546
- Coleman D. C., Crossley D. J., Hendrix P. F. 2004. *Fundamentals of soil ecology*. 2nd ed. London: Elsevier Academic press: 408 str.
- Culman S., Bukowski R., Gauch H., Cadillo-Quiroz H., Buckley D. 2009. T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10: 171, doi: 10.1186/1471-2105-10-171: 10 str.
- Drenovsky R. E., Steenwerth K., Jackson L. E., Scow K. M. 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities *Global Ecology and Biogeography*, 19, 1: 27-39

Eilers K. G., Debenport S., Anderson S., Fierer N. 2012. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 50: 58-65

European Atlas of Soil Biodiversity. 2010. Jeffery S., Gardi C., Jones A., Montanarella L., Marmo L., Miko L., Ritz K., Peres G., Römbke J. and van der Putten W. H. (eds.). European Commission, Luxembourg, Publications Office of the European Union: 128 str.

Feng Y., Motta A., Reeves D., Burmester C., van Santen E., Osborne J. 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 12: 1693-1703

Ferguson S. J. 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 2: 182-193

Fierer N., Jackson R. B. 2005. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 3: 626-632

Fierer N., Schimel J., Holden P. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1: 167-176

Google maps.
<http://google.maps.si> (11.4.2015)

Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 960-969

Grčman H., Zupan M. 2010. Praktična Pedologija. Ljubljana, Center za pedologijo in varstvo okolja: 53 str.

Heylen K., Vanparijs B., Gevers D., Wittebolle L., Boon N., Vos P. D. 2007. Nitric oxide reductase (norB) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (nir) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 9, 4: 1072-1077.

Helgason B.L., Walley F.L., Germida J.J. 2009. Fungal and bacterial abundance in long-term no-till and intensive-till soils of the Northern Great Plains. *Soil Science Society of America Journal*, 73: 120-127

ISO 10390. Soil quality - determination of pH. 2005: 7 str.

ISO 10693. Soil quality - determination of carbonate content – Volumetric method. 1995: 7 str.

ISO 11272. Soil quality - determination of dry bulk density. 1993: 10 str.

ISO 11274. Soil quality - determination of the water retention characteristic, laboratory methods. 1998: 20 str.

ISO 11277. Soil quality - Determination of particle size distribution in mineral soil - Method by sieving and sedimentation. 2009: 34 str.

Jiao K., Qin S., Lyu D., Lyu D., Liu L. 2014. Red clover intercropping of apple orchards improves soil microbial community functional diversity. *Acta agriculturae Scandinavica*, 63, 5: 466-472

Kandeler E., Deiglmayr K., Tscherko D., Bru D., Philippot L. 2006. Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Applied And Environmental Microbiology*, 72, 9: 5957-5962

Karlsson A. E., Johansson T., Bengtson P. 2012. Archaeal abundance in relation to root and fungal exudation rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 8, 2: 305-311

Kaurin A., Mihelič R., Kastelec D., Schloter M., Suhadolc M., Grčman H. 2015. Consequences of minimum soil tillage on abiotic soil properties and composition of microbial communities in a shallow Cambisol originated from fluvioglacial deposits. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 5: 1-11

Keller M. 2010. Science of grapevines: anatomy and physiology. Washington, Elsevier Inc.: 400 str.

Kuske C. R., Ticknor L. O., Miller M. E., Dunbar J. M., Davis J. A., Barns S. M., Belnap J. 2002. Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1854-1863

Lee J., Steenwerth K. L. 2013. 'Cabernet Sauvignon' grape anthocyanin increased by soil conservation practises. *Scientia Horticulturae*, 159: 128-133

Liu W.-T., Marsh T., Cheng H., Forney L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment lenght polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4516-4522

Lumini E., Orgiazzi A., Borriello R., Bonfante P., Bianciotto V. 2009. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology*, 12, 8: 2165-2179

Mercenaro L., Nieddu G., Pulina P., Porqueddu C. 2014. Sustainable management of an intercropped Mediterranean vineyard. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 192: 95-104

Mihelič R., Jurij Čop M. J., Štampar F., Majer D., Tojniko S., Vršič S. 2010. Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 182 str.

- Monteiro A., Lopez C. M. 2007. Influence of cover crop on water use and performance of vineyard in Mediterranean Portugal. *Agriculture Ecosystem & Environment*, 121, 4: 336-342
- Mongomery D. R. 2007. Soil erosion and agricultural sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 33: 13268-13272
- Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Canizares R. J., C., 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, 3-4: 333-339
- Murphy B. W. 2014. Soil Organic Matter and Soil Function - Review of the Literature and Underlying Data. Canberra, Department of the Environment.
<http://www.environment.gov.au/system/files/resources/20051db1-51ba-49e1-9758-66bd2c8c1cc5/files/soil-organic-matter.docx> (11. 5 2014)
- Murugan R., Koch H.-J., Joergensen R. G. 2013. Long-term influence of different tillage intensities on soil microbial biomass, residues and community structure at different depths. *Biology and Fertility of Soils*, 50, 3: 487-498
- Muyzer G., Waal E. C., Uitterlinden A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Neher D.A., 2001. Nematode communities as ecological indicators of agroecosystem health. V: Agroecosystem Sustainability: Developing Practical Strategies. Stephen, R.G. (eds.). London, CRC Press: 105-119
- Ochsenreiter T. D. S., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 5, 9: 787-797
- Olson K. R., Ebelhar S. A., Lang J. M. 2013. Effects of 24 years of conservation tillage systems on soil organic carbon and soil productivity. *Applied and Environmental Soil Science*, Hindawi, 2013: id. 617504, doi:10.1155/2013/617504: 10 str.
- Orcutt B., Brad Bailey B., Staudigel H., Tebo B. M., EdwardsK. J. 2009. An interlaboratory comparison of 16S rRNA gene-based terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing methods for assessing microbial diversity of seafloor basalts. *Environmental Microbiology*. 11, 7: 1728-1735
- Pastorelli R., Vignozzi N., Landi S., Piccolo R., Orsini R., Seddaiu G., Pagliai M. 2013. Consequences on macroporosity and bacterial diversity of adopting a no-tillage farming system in a clayish soil of Central Italy. *Soil Biology & Biochemistry*, 66: 78-93
- Paul, E. A. 2015. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. 3rd ed. Oxford: Elsevier Inc.: 552 str.

- Peixoto R., Coutinho H., Madari B., Machado P., Rumjanek N., Van Elsas J., Rosado A. 2006. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil and Tillage Research*, 90, 1-2: 16-28
- Plassart P., Terrat S., Thomson B., Griffiths R., Dequiedt S., Lelievre M., Ranjard L. 2012. Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS ONE* 7, 9: e44279. doi:10.1371/journal.pone.0044279: 8 str.
- Plaster E. J. 2009. *Soil Science and Management*. 6th ed. New York, Delmar Cengage Learning: 544 str.
- Potthoffa M., Steenwerthb K. L., Jacksona L. E., Drenovsky R. E., Scow K. M., Joergensen R. G. 2006. Soil microbial community composition as affected by restoration practises in California grassland. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 7: 1851-1860
- Predlog: Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi okvira za varstvo tal in spremembi Direktive 2004/35/ES /* KOM/2006/0232 končno - COD 2006/0086 */. Bruselj, 22.9.2006. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=CELEX:52006PC0232&from=EN> (7.9.2015)
- Rahman L., Whitelaw-Weckert M. A., Hutton R. J., Orchard B. 2009. Impact of floor vegetation on the abundance of nematode trophic groups in vineyards. *Applied Soil Ecology*, 24: 96-106
- Raynaud X., Nunan N. 2014. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*, 9, 1: e87217: 9 str.
- Register kmetijskih gospodarstev. 2015. Ljubljana, Ministerstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (izpis iz baze podatkov, 15.3. 2015)
- Rout M. E., Callaway R. M. 2012. Interactions between exotic invasive plants and soil microbes in the rhizosphere suggest that 'everything is not everywhere'. *Annals of Botany*, 110, 2: 213–222
- Rowell D. 1994. *Soil science: methods and applications*. Essex, England: Longman Scientific & Technical: 360 str.
- Ruiz-Colmenero M., Bienes R., Marques M. 2011. Soil and water conservation dilemmas associated with the use of green cover in steep vineyards. *Soil & Tillage Research*, 110: 211-223
- Ruiz-Colmenero M., Bienes R., Eldridge D., Marques M. 2013. Vegetation cover reduces erosion and enhances soil organic carbon in a vineyard in the central Spain. *Catena*, 104: 153-160

- Santos P. C., Fang Z., Mason S. W., Setubal J. C., Dixon R. 2012. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. Bio Med Central Genomics, 13: doi:10.1186/1471-2164-13-162: 12 str.
- Scheublin T. R., Ridgway K. P., Young J. P., Heijden M. G. 2004. Nonlegumes, Legumes, and Root Nodules Harbor Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities. Applied and Environmental Microbiology, 70, 10: 6240-6246
- Sharma S. K., Ramesh A., Sharma M. P., Joshi O. P., Govaerts B., Steenwerth K. L., Karlen D. L. 2010. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. V: Biodiversity, biofuels, agroforestry and conservation agriculture. Lichfouse E. (eds.). 5. Dijon, Springer: 317-358
- Silva M. C., Dias A. C., Elsas J. D., Salles J. F. 2012. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. PLoS ONE, 7, 12: e51554. DOI: 10.1371/journal.pone.0051554: 10 str.
- Singh B. K., Nazaries L., Munro S., Anderson I. C., Campbell C. D. 2006. Use of Multiplex Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid and Simultaneous Analysis of Different Components of the Soil Microbial Community. Applied and Environmental Microbiology, 72, 11: 7278-7285
- Stahl D.A., Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). New York, John Wiley and Sons Ltd: 205-248
- Stefanowicz A. 2006. The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. Polish Journal of Environmental Studies, 15, 5: 669-676
- Suhadolc M., 2013. Biotski indikatorji kakovosti tal. V: Novi izzivi v agronomiji 2013: zbornik simpozija. Zreče, 2013. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo: 50-55
- Suhadolc M., Hodnik A., Leskošek M. 2000. Ekstrakcija C in N z vročo vodo - metoda za določanje oskrbljenosti tal s humusom V: Zbornik simpozija Novi izzivi v poljedelstvu. Moravske toplice, 2000. Ljubljana, Slovensko Agronomsko Društvo: 209-213
- Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozdja 2015. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/integrirana_pridelava/tehnolska_navodila/ (14.3.2016)
- Tesic D., Keller M., Hutton R. J. 2007. Influence of vineyard floor management practices on grapevine vegetative growth, yield and fruit composition. American Journal of Enology and Viticulture, 58, 1: 1-11
- Treusch A., Leininger S., Kletzin A., Schuster SC., Klenk H.-P., Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated

mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7 12: 1985-1995

Valdes-Gomez H., Fermaud M., Roudet J., Calonnec A., Gary C. 2008. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop Protection*, 27, 8: 1174-1186

Wang Y., Hayatsu M., Fujii T. 2012. Extraction of Bacterial RNA from Soil: Challenges and Solutions. *Microbes and Environments*, 27, 2: 111-121

Werner G. D., Kiers E. T. 2014. Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytologist*, 205, 4: 1437-1442

White T., 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* M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky, T. White (eds.). San Diego, Academic Press: 315-322

BioMineWiki 2009. Molecular approaches for microbial community analysis: Length separation.
http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_12.htm (11.3.2016)

Xi Z., Tao Y., Zhang L., Li H. 2011. Impact of cover crops in vineyard on aroma compound of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon wine. *Food Chemistry*, 127, 2: 516-522

ZAHVALA

V času opravljanja magistrske naloge so mi bile nekatere osebe še posebej v pomoč.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Metki SUHADOLC, mentorici doc. dr Nataši ŠTAJNER in mladi raziskovalki dr. Aneli KAURIN za vso strokovno podporo pri laboratorijskem delu in pripravi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC za temeljito in komentarjev polno recenzijo. Hkrati se zahvaljujem vsem sodelavcem na Centru za pedologijo in varstvo okolja za strokovne nasvete in pomoč pri postavitvi in izvedbi mojih poizkusov v laboratoriju. Posebna zahvala gre tudi dr. Sandri DRAŠČEK za lektoriranje.

Hvala, Urška, za spodbujanje, podporo, poljubčke in vsa slastna kosila v času študija.

Iskrena hvala staršem, sestram in starim staršem za podporo in motivacijo, ki me je gnala skozi celotno študijsko obdobje.

Hvala tudi prijateljem in sošolcem za vse zabavne debate, lepe izlete in nasvete.

PRILOGA A

Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na vsebnost organske snovi v tleh, skupnega ogljika (TC) in dušika (TN), njuno razmerje (TC/TN), skupnega organskega ogljika (TOC), skupnega mineralnega ogljika (min. C), topnih oblik organskega ogljika (DOC) in dušika (DON), njunega razmerja (DOC/DON) skupnega topnega dušika (TNb) in skupnih oblik amonijskega (NH_4) in nitratnega (NO_3) dušika. Razmerje C/N je izračunano iz skupnega in topnih oblik ogljika in dušika. Statistično značilne razlike med razredi so prikazane z malimi črkami pri $p = 0,05$. Oznaka * označuje povprečje vseh treh globin v posamezni obdelavi.

Obravnavanje	Organska snov	TC	TN	TOC	min. C	TC/TN	DOC	DOC/DON
Enota	% ± SN	% ± SN	% ± SN	% ± SN	% ± SN		mg kg⁻¹ ± SN	
Z*	3,30 ± 0,63 a*	2,40 ± 0,35 a*	0,20 ± 0,03 a*	1,912 ± 0,36a	0,4778 ± 0,072a	12 a*	211,6 ± 33,6 a*	16 b*
Z 0-10	5,75 ± 0,19 a	3,74 ± 0,12 a	0,33 ± 0,013 a	3,334 ± 0,11a	0,4333 ± 0,12a	11 a	341,8 ± 17,0 a	13 c
Z10-20	2,43 ± 0,11b	1,91 ± 0,16 b	0,16 ± 0,006 b	1,141 ± 0,063b	0,4667 ± 0,13a	11 a	169,6 ± 4,7 b	15 bc
Z 20-30	1,71 ± 0,05cd	1,55 ± 0,14 bc	0,12 ± 0,005 c	0,991 ± 0,029cd	0,5333 ± 0,17a	12 a	123,5 ± 3,27 c	19 bc
O*	1,64 ± 0,08b*	1,20 ± 0,05 b*	0,12 ± 0,004 b*	0,9507 ± 0,049b	0,2444 ± 0,044b	10 b*	106,6 ± 4,12 b*	26 a*
O 0-10	1,95 ± 0,06c	1,37 ± 0,07 bc	0,13 ± 0,06 bc	1,128 ± 0,034c	0,2333 ± 0,033a	11 a	114,7 ± 4,39 c	23 ab
O 10-20	1,46 ± 0,08d	1,10 ± 0,09 c	0,11 ± 0,004 c	0,8442 ± 0,045d	0,2667 ± 0,12a	10 a	93,07 ± 1,22 c	29 a
O 20-30	1,52 ± 0,06cd	1,12 ± 0,07 c	0,11 ± 0,003 c	0,8798 ± 0,034cd	0,2333 ± 0,088a	10 a	112,1 ± 6,6 c	28 a
Obravnavanje	TNb	NH ₄ -N	NO ₃ -N	DON				
Enota	mg kg⁻¹ ± SN	mg kg⁻¹ ± SN	mg kg⁻¹ ± SN	mg kg⁻¹ ± SN				
Z*	21,45 ± 4,17 a*	3,99 ± 1,46	2,71 ± 0,76	14,31 ± 5,78				
Z 0-10	37,45 ± 2,04 a	6,84 ± 0,19 a	4,19 ± 0,28 a	25,55 ± 0,33 a				
Z10-20	16,76 ± 0,83 b	3,16 ± 0,07 b	2,29 ± 0,07 ab	11,03 ± 0,50 b				
Z 20-30	10,12 ± 0,80c	1,98 ± 0,04 b	1,64 ± 0,08 b	6,35 ± 0,20 c				
O*	9,578 ± 1,49 b*	2,89 ± 1,37	2,38 ± 0,92	4,11 ± 0,53				
O 0-10	15,2 ± 1,34 b	5,63 ± 0,04 a	4,22 ± 0,22 a	5,06 ± 0,10 cd				
O 10-20	6,137 ± 0,17 c	1,39 ± 0,04 b	1,36 ± 0,01 b	3,24 ± 0,10 d				
O 20-30	7,4 ± 0,94 c	1,66 ± 0,09 b	1,56 ± 0,06 b	4,03 ± 0,18 cd				

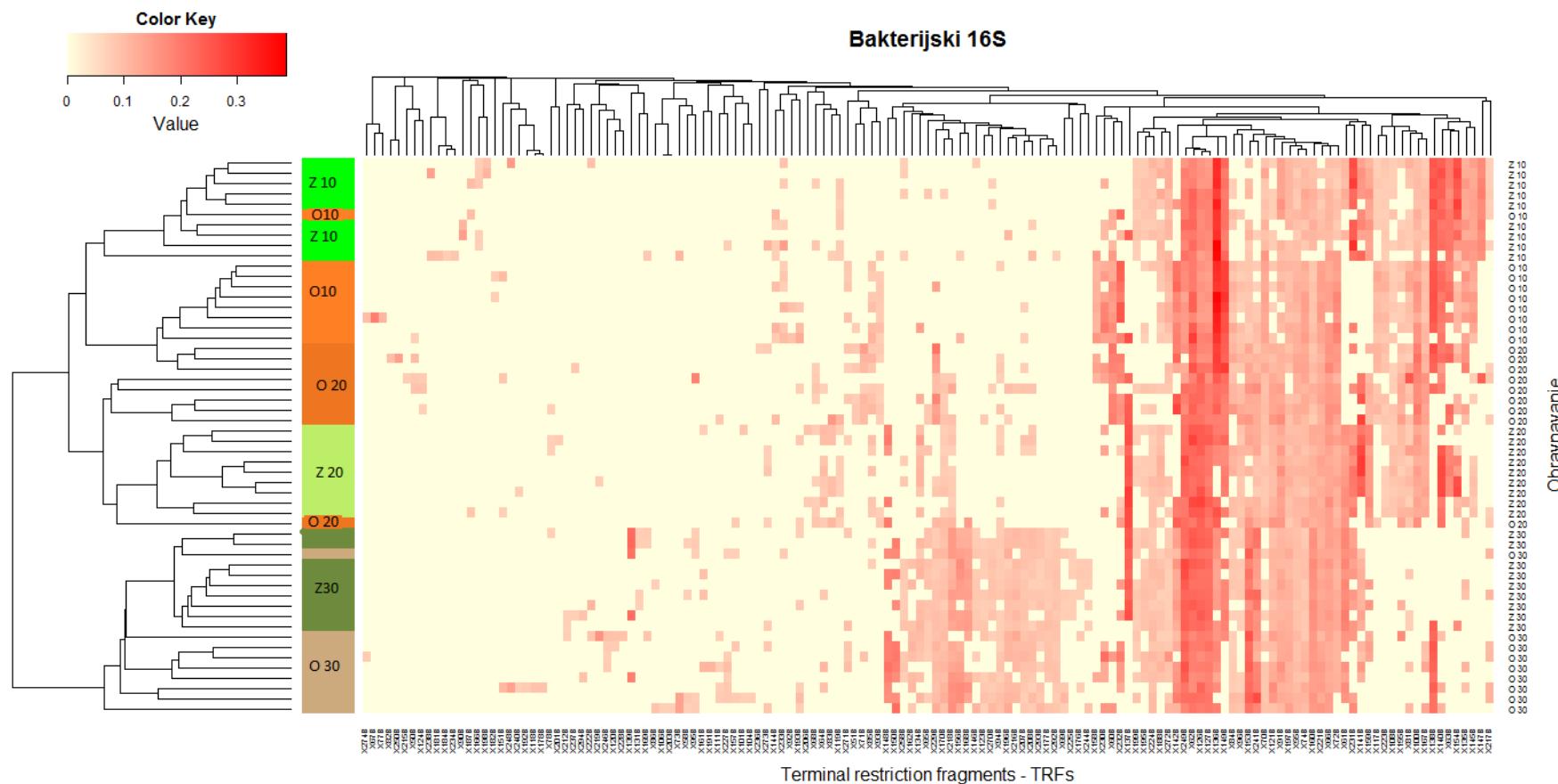
PRILOGA B

Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na mikrobeni biomasni ogljik, količino izolirane DNK, število terminalnih fragmentov bakterij krenarhej in gliv ter število kopij bakterijske, krenarhejske in glivne ribosomalne regije DNK. Statistično značilne razlike med razredi so prikazane z malimi črkami pri $p = 0,05$. Oznaka * označuje povprečje vseh treh globin v posamezni obdelavi.

Obravnavanje	Masa ekstrahirane DNK	Mikrobeni biomasni C	Število bakterijskih terminalnih fragmentov	Število krenarhejskih terminalnih fragmentov	Število glivnih terminalnih fragmentov	Število kopij bakterijske 16S DNK	Število kopij krenarhejske 16S DNK	Število glivne ITS DNK
Enota	µg/g tal	mg/kg tal	število	število	število	število/g tal	število/g tal	število/g tal
Z*	$10,74 \pm 2,0$ a*	$344,4 \pm 78,7$ a*	$64,37 \pm 2,98$ a*	$45,26 \pm 2,19$ a*	$102,4 \pm 7,94$ a*	$(6,183 \pm 1,32) \times 10^9$ a*	$(26,84 \pm 5,04) \times 10^6$ a*	$(6,552 \pm 2,07) \times 10^8$ a*
0-10	$18,32 \pm 1,7$ a	$649,7 \pm 44,5$ a	$59,78 \pm 1,54$ bc	$46,33 \pm 2,91$ a	$83,78 \pm 11,22$ bc	$(11,17 \pm 1,04) \times 10^9$ a	$(45,93 \pm 3,31) \times 10^6$ a	$(14,13 \pm 2,67) \times 10^8$ a
10-20	$8,207 \pm 0,62$ b	$239,4 \pm 4,1$ b	$57,56 \pm 0,91$ bc	$44,44 \pm 2,28$ a	$130,3 \pm 0,33$ a	$(4,23 \pm 0,434) \times 10^9$ b	$(18,76 \pm 1,99) \times 10^6$ b	$(3,833 \pm 0,331) \times 10^8$ bc
20-30	$5,697 \pm 0,86$ b	$144,1 \pm 14,9$ bc	$75,78 \pm 2,15$ a	$45 \pm 6,55$ a	$93 \pm 4,73$ bc	$(3,143 \pm 0,793) \times 10^9$ b	$(15,84 \pm 3,79) \times 10^6$ b	$(1,69 \pm 0,404) \times 10^8$ c
O*	$5,214 \pm 0,54$ b*	$102,7 \pm 9,1$ b*	$57,93 \pm 3,49$ b*	$51,67 \pm 1,76$ a*	$91,19 \pm 4,61$ b*	$(2,858 \pm 0,615) \times 10^9$ b*	$(9,382 \pm 2,45) \times 10^6$ b*	$(4,664 \pm 1,32) \times 10^8$ a*
0-10	$6,378 \pm 1,5$ b	$134,5 \pm 9,5$ c	$51,89 \pm 0,11$ c	$49,67 \pm 3,18$ a	$95,33 \pm 5,48$ bc	$(4,557 \pm 1,42) \times 10^9$ b	$(12,78 \pm 6,87) \times 10^6$ b	$(9,543 \pm 1,61) \times 10^8$ ab
10-20	$4,671 \pm 0,26$ b	$84,66 \pm 8,2$ c	$52,22 \pm 2,90$ c	$51,33 \pm 1,35$ a	$103,4 \pm 2,23$ b	$(1,704 \pm 0,473) \times 10^9$ b	$(4,024 \pm 0,671) \times 10^6$ b	$(2,147 \pm 0,409) \times 10^8$ c
20-30	$4,594 \pm 0,40$ b	$88,81 \pm 8,8$ c	$69,67 \pm 5,83$ ab	$54 \pm 4,53$ a	$74,78 \pm 1,13$ c	$(2,313 \pm 0,187) \times 10^9$ b	$(11,34 \pm 1,47) \times 10^6$ b	$(2,303 \pm 0,572) \times 10^8$ c

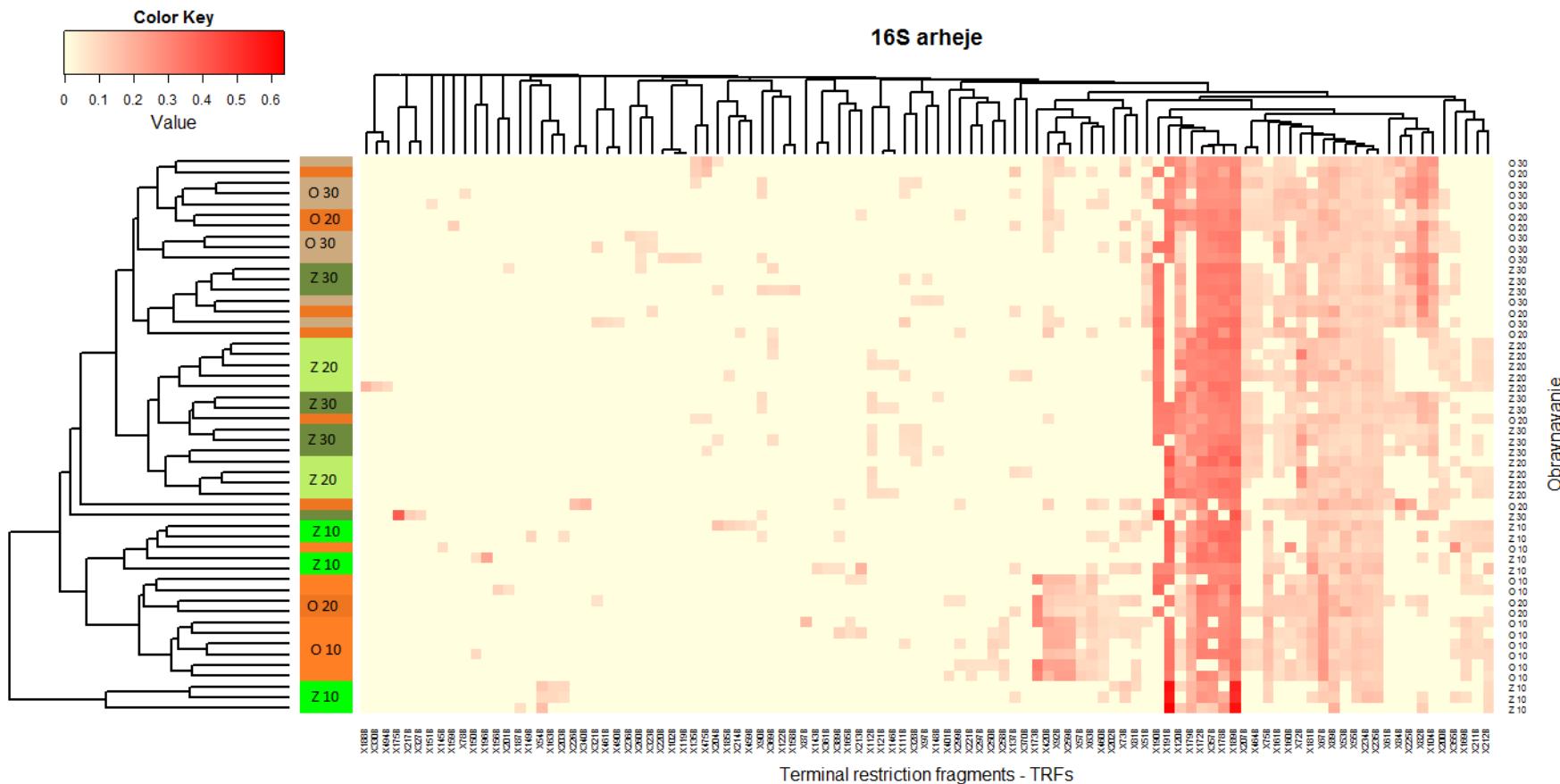
PRILOGA C

Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov bakterijske 16S regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.



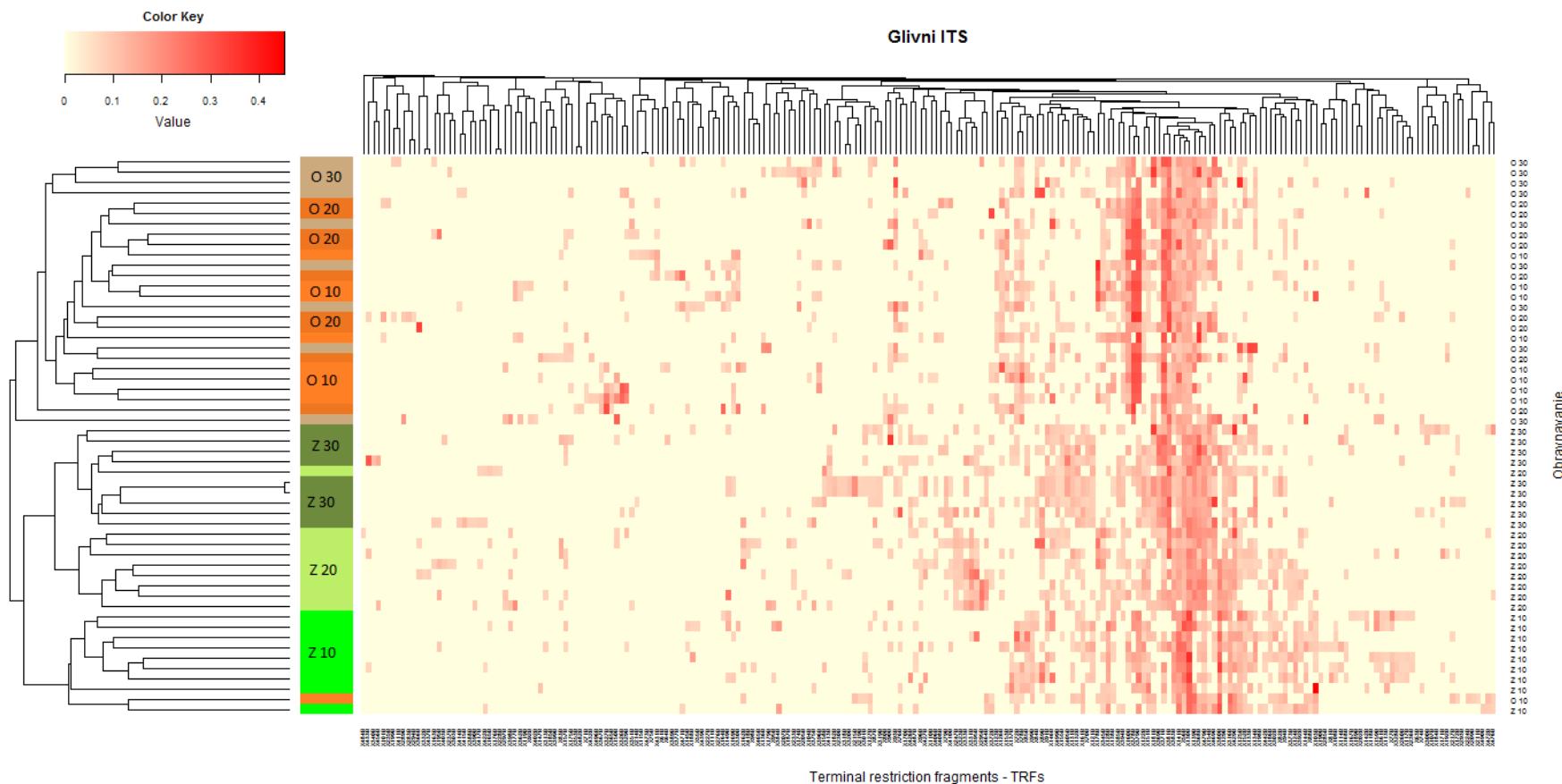
PRILOGA D

Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov krenarhejske 16S regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.



PRILOGA E

Toplotna karta z dendrogrami grupiranja fragmentov glivne ITS regije DNK. Intenziteta barve predstavlja relativni delež višine signala posameznega fragmenta po kapilarni elektroforezi.



PRILOGA F

Založenost tal z ogljikom in dušikom na hektar

	TOC* [t/ha]	TN* [t/ha]	DOC* [t/ha]	DON* [t/ha]	SMB-C* [t/ha]
ZV 0-10 cm	44,7	4,4	0,458	0,0343	0,872
ZV 10-20 cm	20,8	2,3	0,25	0,0163	0,353
ZV 20-30 cm	15,5	1,9	0,193	0,0100	0,226
OV 0-10 cm	15,5	1,8	0,158	0,0070	0,184
OV 10-20 cm	12,4	1,6	0,135	0,0047	0,124
OV 20-30 cm	13,0	1,6	0,165	0,0060	0,131
ZV vsota	81,1	8,6	0,90	0,061	1,45
OV vsota	40,8	5,0	0,46	0,018	0,440

*TC – skupni ogljik; TN – skupni dušik; DOC – topni organski ogljik, DON – topni organski dušik; SMC – mikrobeni biomasni ogljik

PRILOGA G

Medsebojne odvisnosti spremenljivk – linearna regresija

Priloga G1: Vpliv organske snovi, deleža gline in deleža finega melja na kationsko izmenjevalno kapaciteto (CEC) tal.

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Delež organske snovi	1,875	0,299	0,0188
Delež glinenih delcev	-0,895	0,312	0,016
Delež finega melja	1,688	0,362	0,0083

Priloga G2: Vpliv organske snovi, skupnega topnega ogljika, skupnega topnega dušika in sposobnosti tal za zadrževanje vode (WHC) na vsebnost mikrobnega biomasnega ogljika

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Delež organske snovi	131,2	0,987	$2,0 \times 10^{-16}$
Skupni topni ogljik	2,31	0,986	$2,8 \times 10^{-16}$
Skupni topni dušik	18,2	0,947	$1,2 \times 10^{-11}$
WHC	28,27	0,277	0,0248

Priloga G3 Vpliv mikrobnega biomasnega ogljika na maso izolirane DNK iz tal.

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Mikrobeni biomasni ogljik	0,0245	0,953	$4,49 \times 10^{-12}$

Priloga G4: Vpliv deleža organske snovi, mikrobnega biomasnega ogljika in mase izolirane DNK na število kopij bakterijske 16S ribosomalne regije DNK.

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Delež organske snovi	$2,069 \times 10^9$	0,867	$2,03 \times 10^{-8}$
Mikrobeni biomasni ogljik	$0,0157 \times 10^9$	0,873	$1,41 \times 10^{-8}$
Masa izolirane DNK	$0,653 \times 10^9$	0,950	$7,3 \times 10^{-12}$

Priloga G5: Vpliv deleža organske snovi, mikrobnega biomasnega ogljika in mase izolirane DNK na število kopij glivne ITS ribosomalne regije DNK.

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Delež organske snovi	$0,266 \times 10^9$	0,642	$6,41 \times 10^{-5}$
Mikrobeni biomasni ogljik	$0,00198 \times 10^9$	0,622	$10,2 \times 10^{-5}$
Masa izolirane DNK	$0,0828 \times 10^9$	0,685	$2,22 \times 10^{-5}$

Priloga G6: Vpliv deleža organske snovi, mikrobnega biomasnega ogljika in mase izolirane DNK na število kopij krenarhejske 16S ribosomalne regije DNK.

Neodvisna spremenljivka	koeficient β	R ²	Sig.
Delež organske snovi	$8,635 \times 10^6$	0,842	$8,3 \times 10^{-8}$
Mikrobeni biomasni ogljik	$0,0664 \times 10^6$	0,869	$1,81 \times 10^{-8}$
Masa izolirane DNK	$2,70 \times 10^6$	0,910	$8,55 \times 10^{-10}$

PRILOGA H

Vpliv obdelave in globine vinogradniških tal na obstojnost strukturnih agregatov, sposobnost tal za zadrževanje vode, kationsko izmenjevalno kapaciteto, pH, delež baz, vsebnost fosforja in kalija. Statistično značilne razlike med razredi so prikazane z malimi črkami pri $p = 0,05$. Oznaka * označuje povprečje vseh treh globin v posamezni obdelavi.

Obravnavanje	Obstojnost strukturnih agregatov	Sposobnost zadrževanja vode (WHC)	Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC)	pH	Delež baz	P ₂ O ₅	K ₂ O
Enota	% ± SN	% ± SN	mmol _c /100g ± SN		% ± SN	mg/100g ± SN	mg/100g ± SN
Z*		24,32 ± 0,77a*	39,00 ± 1,1 ^{a*}	7,2	92,92 ± 1,20 a*	32,6 ± 6,8 a*	24,5 ± 3,1 a*
Z 0-10	95,6 ± 1,0 a	26,97 ± 0,97a	39,83 ± 3,1 a	6,9	90,47 ± 2,94 ab	40,5 ± 6,2 a	31,9 ± 3,5 a
Z10-20		23,22 ± 0,59a	39,03 ± 0,9 ab	7,2	94,13 ± 1,08 a	40,4 ± 9,1 a	23,4 ± 2,9 ab
Z 20-30		22,76 ± 0,68a	38,13 ± 1,7 ab	7,3	94,17 ± 1,70 a	16,9 ± 2,3 ab	18,4 ± 1,2 b
O*		21,61 ± 1,5a*	30,28 ± 0,86 ^{b*}	7,1	87,27 ± 0,54 b*	9,5 ± 1,7 b*	16,4 ± 1,4 b*
O 0-10	40,96 ± 3,6 b	21,01 ± 2,1a	31,23 ± 0,93 ab	7,2	88,1 ± 0,74 ab	15,9 ± 0,27 ab	22,0 ± 0,59 ab
O 10-20		22,64 ± 1,8a	29,77 ± 2,4 b	7,2	87,37 ± 1,33 ab	5,8 ± 0,27 b	13,9 ± 0,32 b
O 20-30		21,19 ± 4,5a	29,83 ± 1,2 b	7,1	86,33 ± 0,65 b	6,7 ± 1,1 b	13,4 ± 0,29 b

PRILOGA I

Delež organske snovi v preučevanem vinogradu pred 15 leti in trenutnim stanjem

Obravnavanje/Delež organske snovi [%]	Suhadolc (2000)	Δ	Trenutno stanje (Rejec, 2016)
ZV 0-10	5,7	+ 0,1	5,8
ZV 10-20	2,9	- 0,5	2,4
ZV 20-30	2,4	- 0,5	1,7
OV 0-10	2,4	- 0,4	2,0
OV 10-20	2,4	- 0,9	1,5
OV 20-30	1,7	- 0,2	1,5