

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Polona SENEKOVIČ FERČEC

**VPLIV KOVIN Zn in Cd V FERMENTACIJSKEM
OSTANKU BIOPLINARNE NA TALNO MIKROBNO
ZDRUŽBO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Polona SENEKOVIČ FERČEC

**VPLIV KOVIN Zn IN Cd V FERMENTACIJSKEM OSTANKU
BIOPLINARNE NA TALNO MIKROBNO ZDRUŽBO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**IMPACT OF Zn and Cd METALS IN BIOGAS RESIDUE ON SOIL
MICROBIAL COMMUNITY**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Centru za pedologijo in varstvo okolja. Del analiz je bil v okviru Erasmus izmenjave izveden na Tehnični univerzi v Münchnu, na katedri za talno ekologijo (Technische Universität München, Lehrstuhl für Bodenökologie).

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec in za somentorja doc. dr. Marjetko Suhadolc in za recenzenta prof. dr. Domna Leštana.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: prof. dr. Domen Leštan
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

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

Polona Senekovič Ferčec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:63:628.3/.4:6313.46:546.47/.48(043.2)
KG	fermentacijski ostanek/stranski produkti/bioplinarne/gnojenje/potencialno toksične kovine/Zn/cink/Cd/kadmij/mikrobne združbe/tla/arheje/bakterije/glive/encimska aktivnost/številčnost/pestrost
AV	SENEKOVIČ FERČEC, Polona
SA	MANDIĆ MULEC, Ines (mentorica)/SUHADOLC, Marjetka (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	VPLIV KOVIN Zn IN Cd V FERMENTACIJSKEM OSTANKU BIOPLINARNE NA TALNO MIKROBNO ZDRUŽBO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X, 49 str., 17 pregl., 13 sl., 92 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Fermentacijski ostanek (FO) je stranski produkt proizvodnje bioplina. Zaradi bogate organske sestave je primeren za gnojenje kmetijskih površin, vendar pa vsebuje potencialno toksične kovine, ki lahko v presežku predstavljajo nevarnost za talne mikroorganizme. V magistrski nalogi smo ovrednotili vpliv različnih koncentracij kovin v FO (Zn in Cd) na strukturo, številčnost in encimsko aktivnost mikrobne združbe. FO smo dodali na površino tal v maksimalno dovoljenem odmerku glede na vsebnost N (170 kg N/ha), enak odmerek smo uporabili za kontrolno obravnavanje (mineralno gnojilo NPK). Povečano vsebnost kovin v FO smo dosegli z dodajanjem topnega Cd in Zn (10-, 100- in 1000-kratne koncentracije glede na izvorni FO). Tri mesece po dodatku FO v lončnem poskusu s tatarsko ajdo (<i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn.), smo ugotovili, da je skupna vsebnost in dostopnost kovin enaka v tleh s FO in kontrolnih tleh z dodatkom NPK. FO prav tako ni vplival na strukturo in številčnost mikrobnih združb, kot tudi ne na encimsko aktivnost. Značilen vpliv se je pokazal šele v obravnavanju s 1000-krat povečano koncentracijo kovin v FO. Skupna vsebnost kovin v tleh je v tem obravnavanju presegla zakonsko določeno opozorilno imisijsko vrednost, biodostopnost Zn se je značilno povečala. V obravnavanju s 1000-krat povečano koncentracijo kovin v FO smo zaznali značilne spremembe v strukturi bakterij (T-RFLP), zmanjšanje številčnosti arhej (qPCR) in med preučevanimi encimi vključenimi v C-, N- in P-cikel, le zmanjšano aktivnosti encima β -glukuronidaza. Rezultati so pokazali, da FO nima splošnih negativnih vplivov na talno mikrobno združbo, če so koncentracije kovin v razponu do 100- krat koncentracij kovin v izvornem FO.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 606:63:628.3/.4:6313.46:546.47/.48(043.2)
 CX biogas residues//by-products/biogas station/fertilization/potentially toxic heavy metals/Zn/zinc/Cd/cadmium/ microbial community/soil/archaea/bacteria/fungi/enzyme activity/gene abundance/diversity
 AU SENEKOVIČ FERČEC, Polona
 AA MANDIĆ MULEC, Ines (supervisor)/ SUHADOLC, Marjetka (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
 PY 2015
 TY IMPACT OF Zn AND Cd METALS IN BIOGAS RESIDUE ON SOIL MICROBIAL COMMUNITY
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO X, 49 p., 17 tab., 13 fig., 92 ref.
 LA sl
 Al sl/en
 AB The biogas residue (BR) is a byproduct of the biogas production. Due to its organic richness it is appropriate for fertilization, but potentially toxic metals that may be present could have a negative impact on soil microorganisms. In our study we evaluated the effect of BR with different concentrations of metals (Zn and Cd) on gene abundance, diversity and enzymatic activity of soil microbial community. BR was spread over the soil surface at the maximum dose allowed for N (170 kg N/ha). The same dose was used for the control treatment (mineral fertilizer NPK). The increased metal content in the BR was accomplished by adding soluble Zn and Cd (10-, 100- and 1000-fold concentration than in original BR). Three months after the pot experiment with the Tartar buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) no significant differences between BR and control (NPK) treatment were found in the total concentration, the bioavailability of the metals, as well as in the diversity, gene abundance and enzyme activity of microbial population. Significant impacts were measured only in the treatment with 1000-times higher Cd and Zn concentrations in BR. The statutory warning value of Cd and Cd total concentration were exceeded, and significant increase of Zn bioavailability was detected. Significant changes in bacterial community structure (T-RFLP), reduction of the archaeal gene abundance (qPCR) was detected. We did not detect inhibition of enzyme activities related to C-, N- and P-cycle due to metal treatment, except for β -glucuronidase activity which was significantly reduced. Results show that application of BR had no general negative effect on the soil microbial communities when the level of metals is up to 100x higher as found in the original BR.

KAZALO VSEBINE

KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOPLIN IN FERMENTACIJSKI OSTANEK.....	3
2.2 KOVINE V TLEH.....	3
2.2.1 Cink in kadmij	4
2.2.2 Biodostopnost kovin	4
2.3 MIKROORGANIZMI V TLEH.....	5
2.4 KOVINE IN MIKROORGANIZMI	6
2.4.1 Metode določanja vpliva kovin na mikroorganizme v tleh	7
2.4.2 Razvoj odporosti na kovine	8
2.5 ZAKONSKA UREDITEV VNOSA KOVIN V TLA.....	8
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 LONČNI POSKUS.....	11
3.2 PEDOLOŠKE ANALIZE VZORCA TAL IN FO	12
3.3 SKUPNA VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN	12
3.3.1 Šeststopenjska sekvenčna reakcija potencialno toksičnih kovin.....	12
3.4 MOLEKULARNE ANALIZE	13

3.4.1 Izolacija DNA.....	13
3.4.2 Merjenje koncentracije in integritete DNA	13
3.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	14
3.4.4 Razrez PCR pomnožka z restrikcijskimi endonukleazami	15
3.4.5 Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP).....	16
3.4.6 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)	16
3.5 ENCIMSKI TESTI	19
3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	21
4 REZULTATI.....	23
4.1 VPLIV FO NA LAŽJE DOSTOPNE OBLIKE C IN N V TLEH	23
4.2 VPLIV FO NA SKUPNO VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN V TLEH.....	24
4.3 VPLIV FO NA STRUKTURO TALNIH MIKROBNIH ZDRUŽB.....	26
4.4 VPLIV FO NA ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB.....	32
4.4 VPLIV FO NA ENCIMSKO AKTIVNOST	35
5 RAZPRAVA.....	37
6 SKLEPI	40
7 POVZETEK	41
8 VIRI	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Slovenska uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih (mg/kg) nevarnih snovi v tleh, ter največja dovoljena vsebnost (NDV) kovin (mg/kg) za nekatere evropske zakonodaje (Uredba o mejnih..., 1996).	9
Preglednica 2: Zakonsko določene mejne vrednosti vnosa nevarnih snovi v kmetijska zemljišča (Uredba o predelavi ..., 2013), ki velja za deklariran kompost in digestat 1. kakovostnega razreda.	10
Preglednica 3: Zaporedni koraki šeststopenjske reakcije in ocena mobilnosti ter biodostopnosti posamezne sekvence (Tessier in sod., 1979).	13
Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili pri PCR (in T-RFLP).	14
Preglednica 5: Seznam uporabljen restrikcijskih endonukleaz, ki smo jih uporabili za T-RFLP.	16
Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za skvenciranje... ..	17
Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov qPCR.	18
Preglednica 8: Na osnovi vrednosti naklona (r^2) izračunan izkoristek posamezne qPCR reakcije.	19
Preglednica 9: Seznam encimov, substratov uporabljenih pri meritvah, substratov, ki jih encimi v naravi cepijo ter organizmi, ki posamezni encim sintetizira.	20
Preglednica 10: V preglednici so zbrane koncentracije substrata in čas inkubacije za posamezni encim, ki smo jih določili smo na osnovi rezultatov pred testov.	20
Preglednica 11: Osnovne značilnosti tal uporabljenih v lončnem poskusu.	23
Preglednica 12: Sestava fermentacijaskga ostanka.	23
Preglednica 13: DOC, DON, NH_4^+ in NO_3^- v tleh po obravnavanjih.	24
Preglednica 14: Skupna vsebnost Cd in Zn po obravnavanjih.	24
Preglednica 15: Povprečne koncentracije Cd v 6-stopenjski sekvenčni reakciji po obravnavanjih.	25
Preglednica 16: Povprečne koncentracije Zn v 6-stopenjski sekvenčni reakciji po obravnavanjih.	25
Preglednica 17: Povprečno število kopij 16S rRNA arhej in bakterij in 18S rRNA gliv po obravnavanjih.	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz lončnega poskusa.....	11
Slika 2: Presečni prikaz 14-dominantnih T-RFjev arhej na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji.....	26
Slika 3: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 14-tih dominantnih T-RF fragmentov arhej v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-20 cm.	27
Slika 4: Presečni prikaz 20-dominantnih T-RFjev arhej na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji.....	28
Slika 5: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 20-tih dominantnih T-RF fragmentov bakterij v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-20 cm.	29
Slika 6: Presečni prikaz 9-dominantnih T-RFjev arhej na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji.....	30
Slika 7: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 9-tih dominantnih T-RF fragmentov gliv v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-20 cm.	31
Slika 8: Povprečno število kopij 16S rRNA arhej po obravnavanjih ob koncu poskusa. ..	32
Slika 9: Povprečno število kopij 16S rRNA bakterij po obravnavanjih ob koncu poskusa.	33
Slika 10: Povprečno število kopij 18S rRNA gliv po obravnavanjih ob koncu poskusa. ...	33
Slika 11: Primerjava povprečne številčnosti genov 16S rRNA arhej, 16S rRNA bakterij in 18S rRNA gliv.	34
Slika 12: Povprečna izmerjena aktivnost encimov ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza po obravnavanjih ob koncu poskusa.	35
Slika 13: Povprečna aktivnost encima β -glukuronidaza po obravnavanjih ob koncu poskusa.	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (w/v)	Masno volumski odstotek
4-MU	4-metilumbeliferon
λ_{em}	Valovna dolžina fluorescence
λ_{ex}	Valovna dolžina absorbcije
A_{230}	Absorbanca pri valovni dolžini 230
A_{260}	Absorbanca pri valovni dolžini 260
bp	Bazni par
BSA	Goveji serumski albumin
CEC	kationsko izmenjalna kapaciteta
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
dNTP	Deoksiribonukleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
EDTA	Etilen-diamin-tetraocetna kislina
FO	Fermentacijski ostanek
g	Sila gravitacije
LB	Luria-Bertani gojišče
M	Oznaka za enoto molarnost
m	Predpona mili (10^{-3})
mmol _c	Mili mol enovalentnih kationov
mol	Oznaka za enoto mol
MQ	Milli-Q; komercialno ime za ultra čisto vodo "Tip 1"
n	Predpona nano (10^{-9})

N_A	Avogadrova konstanta
NF	Voda brez nukleazne aktivnosti
NPK	Mineralno gnojilo
obr/min	Obrati na minuto
p	Predpona piko (10^{-12})
PBS	Fosfatni pufer
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času
Pogl.	Poglavje
Pregl.	Preglednica
RE	Restriksijska endonukleaza
rRNA	Ribosomalna ribonukleinska kislina
s	Sekunda
S.O.C.	Gojišče SOB z 20 ml 1M raztopine glukoze
ss	Suha snov
TAE	Tris acetatni pufer z EDTA
PTK	potencialno toksične kovine (težke kovine)
T-RF	Terminalni restriksijski fragment
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
T-RFLP	Polimorfizem dolžin terminalnih restriksijskih fragmentov
U	Enota za količino encima
UV	Ultravijolična svetloba
V	Oznaka za enoto volt
μ	Predpona mikro (10^{-6})

1 UVOD

V zadnjem obdobju narašča pridobivanje električne energije iz obnovljivih in okolju prijaznih energetske virov. Med te vire pridobivanja električne energije prištevamo tudi bioplinarne. Poleg bioplina, ki je glavni produkt procesa, nastaja tudi stranski produkt – fermentacijski ostanek (FO). FO, ki je zaradi sestave zelo hranilen, je potencialno primeren kot gnojilo za kmetijske površine, vendar pa lahko vsebuje tudi nevarne snovi. Ključen problem predstavljajo potencialno toksične kovine (PTK). Le-te niso biorazgradljive in se v tleh kopičijo. PTK v tleh so arzen, kadmij, krom, nikelj, kobalt, mangan, baker, svinec, selen in cink (Alloway, 2013). Pred štirimi dekadami so bile objavljene prve študije vpliva toksičnosti PTK na talne mikroorganizme, rastline in živali (Giller in sod., 2009). Kovine imajo dolgoročno potencialno nevaren vpliv na zdravje talnega ekosistema (Khan in sod., 2010). Vplivajo na mikrobne združbe v tleh in s tem na rodovitnost tal in pomembne procese v tleh, kot na primer fiksacijo dušika, razgradnjo kompleksnih organskih snovi in kroženje elementov. Nekateri poljski poskusi z onesnaženimi tlemi so pokazali, da povečana vsebnost kovin zmanjša biomaso mikrobnih združb, zmanjša encimsko aktivnost (Moreno in sod., 1999, 2003) in spremeni sestavo mikrobnih združb (Sandaa in sod., 2001). Med študijami o toksičnem vplivu kovin na mikroorganizme so velike razlike med maksimalnimi skupnimi koncentracijami kovin v tleh, ki nimajo vpliva na mikroorganizme, kot tudi minimalnimi koncentracijami z značilnim vplivom na mikrobne združbe v tleh. Prvi razlog takšnih razlik je različna biodostopnost kovin, drugi pa različna občutljivost mikroorganizmov v tleh (Giller in sod., 1998).

Tako se je v preteklem obdobju v javnosti odprlo vprašanje o primernosti uporabe fermentacijskega ostanka iz bioplinarn za namen gnojenja kmetijskih površin, t.j. zaradi vsebnosti PTK in patogenih mikroorganizmov, ter potencialne nevarnosti izpiranja nitratov (Vezjak in sod., 2011; Šalomun, 2012). S študijo želimo preveriti vpliv dodatka FO tlem na lažje dostopne oblike ogljika in dušika, skupno vsebnost in biodostopnost kovin Zn in Cd ter posledično vpliv morebitnega povečanja vsebnosti in/ali dostopnosti kovin na talno mikrobno združbo arhej, bakterij in gliv.

1.1 NAMEN DELA

V nalogi smo želeli ugotoviti vpliv dodanega FO iz izbrane bioplinarne na skupno vsebnost in dostopnost prisotnih kovin na talno mikrobno združbo.

Preveriti smo želeli tudi vplive naraščajočih vsebnosti kovin v FO (10-, 100-, 1000-krat). Preverili smo vpliv kovin na strukturo (T-RFLP) in številčnost (qPCR) arhej, bakterij in gliv; ter mikrobno aktivnost z določanjem encimov vključenih v cikel C (β -glukuronidaza, β -glukozidaza in ksilanaza), cikel N (hitinaza) in cikel P (fosfataza) v tleh.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

V nalogi smo preverili veljavnost naslednjih hipotez:

- (i) Enkratni odmerek FO bioplinarne tlem v maksimalno dovoljenem odmerku za obdelovalna zemljišča glede na vsebnost N (vnos ne sme preseči 170 kg/ha letno) statistično značilno ne poveča skupne vsebnosti kovin (Zn in Cd) v tleh.
- (ii) Zadostno povečane vsebnosti biološko dostopnih oblik kovin Zn in Cd v tleh statistično značilno spremenijo strukturo mikrobno združbo arhej, bakterij in gliv.
- (iii) Zadostno povečane vsebnosti biološko dostopnih oblik kovin Zn in Cd v tleh statistično značilno spremenijo številčnost mikrobne združbe arhej, bakterij in gliv.
- (iv) Zadostno povečane vsebnosti biološko dostopnih oblik kovin Zn in Cd v tleh statistično značilno spremenijo encimsko aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLIN IN FERMENTACIJSKI OSTANEK

Bioplin nastane med fermentacijo, ki je anaeroben večstopenjski proces razgradnje organskih substratov (živalske fekalije, energetske rastline, rastlinski in lesni material), pri katerem sodelujejo različni mikroorganizmi (Weiland, 2010). Glavni produkt je bioplin, stranski pa fermentacijski ostanek (FO). Bioplin je mešanica metana in CO₂ (Hobson, 1982), v manjših količinah vsebuje še vodikov sulfid in amonij. Metan lahko zamenja fosilna goriva, tako za proizvodnjo toplote in energije, kot tudi za pogonsko gorivo (Weiland, 2010).

Stranski produkt – FO je bogat z makro (dušik, fosfor in kalij) in mikrohranili. Zaradi hranilne sestave je potencialno primeren za gnojenje in lahko zamenja mineralna gnojila (Massi, 2012). Ker vsebuje 40 – 50 % organske snovi (Massi, 2012), pripomore k vzdrževanju in formiranju humusa v tleh (Jejčič in Poje, 2009). V primerjavi z neobdelanimi organskimi gnojili, ki se prav tako uporabljajo za gnojenje, ima FO višjo varnost in manj neprijeten vonj, saj višje temperature med fermentacijo inaktivirajo patogene mikroorganizme (Massi, 2012). Neprijeten vonj se zniža tudi do 80 % (Weiland, 2010). Poleg tega je izkoristek organske snovi zaradi homogene sestave, dostopnosti hranil in razmerja C/N boljši (Weiland, 2010). Pred uporabo je potrebno FO analizirati in slediti zastavljenemu letnemu gnojilnemu načrtu (Uredba o predelavi ..., 2013).

2.2 KOVINE V TLEH

Kovine so naravna komponenta vseh vrst tal. Količina je odvisna od geološke zgradbe in preperevanja matične podlage (Gadd, 2005). Potencialno toksične kovine (PTK) v presežku so toksične za večino organizmov (Lipman in Burgess, 1914, cit. po Giller in sod., 1998). Antropogena kontaminacija, ki ima toksičen vpliv na talne mikroorganizme, je povečini povezana z industrijsko dejavnostjo. V teh primerih vsebnost kovin močno preseže ozadje le-teh v tleh. Antropogeni vnosi kovin v tla pa so lahko tudi posledica kmetijske dejavnosti - uporaba kemičnih gnojil, bioloških gospodinjskih ostankov (Gadd, 2005) ter blata iz čistilnih naprav (Singh in Agrawal, 2008). Mikroorganizmi so sposobni razgraditi večino organskih polutantov, kar pa ne velja za kovine, ki se nalagajo in tako predstavljajo selektivni pritisk (Gomes in sod., 2010).

V tleh so lahko kovine raztopljene, vezane na organske ali anorganske snovi ali pa oborjene. Kovine v talni raztopini se pojavljajo kot kationi (Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺), ali kot kompleksi z organskimi (humusna in fulvična kislina, aromatske in alifatske komponente) ali anorganskimi (SO₄²⁻, Cl⁻, OH⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻ in CO₃²⁻) ligandi (McClean in Bledsoe, 1992). Topnost, ki je odvisna od pH vrednosti tal, redoks potenciala in deleža organske snovi,

vpliva na prenos kovin in na interakcije z bioto. Nedostopne oblike kovin so za organizme manj toksične (Gadd, 2005).

2.2.1 Cink in kadmij

Kadmij (Cd) je PTK z neznano biološko funkcijo. V naravi se pojavlja v majhnih količinah, 0,1 – 1 mg Cd kg⁻² (Mertens in Smolders, 2013). Antropogene aktivnosti vodijo v akumulacijo Cd v tleh in s tem vstop v prehranjevalno verigo. World Health Organization (WHO) je določila mejno dnevno količino Cd na 70 µg na dan (Vig in sod., 2003). Cd je lahko dostopen, zato se hitro prenese po prehranjevalni verigi in v prekomerni količini negativno vpliva na delovanje ledvic pri ljudeh (Mertens in Smolders, 2013).

Cink (Zn) ima zelo pomembno vlogo v bioloških procesih in je nujen element za žive organizme (Raulin, 1869). Vključen je v številne biokemične procese. Omogoča strukturno in katalitično funkcijo encimov (Vallee in Auld, 1990). Praviloma je v tleh med 10 – 100 mg Zn kg⁻². Tla s povišano koncentracijo Zn ne predstavljajo nevarnosti za človeka, saj fitotoksični učinek omeji prenos po prehranjevalni verigi. Potrebno pa je oceniti ekotoksikološko tveganje povišanih koncentracij Zn na talne organizme (Mertens in Smolders, 2013).

2.2.2 Biodostopnost kovin

Skupna vsebnost kovin v tleh je slab pokazatelj njihove toksičnosti za mikroorganizme (Giller in sod., 2009), pomembnejši podatek je njihova biološka dostopnost (biodostopnost). Semple je s sodelavci (2004) definiral biološko dostopno spojino v okolju, kot spojino, ki lahko v danem trenutku preide celično membrano mikroorganizma. Na njo vplivajo številni dejavniki v tleh; pH, organska snov, delež gline in železovega oksida. Največji vpliv ima pH, saj vpliva na topnost ionov. Na dostopnost vpliva še kemična oblika kovin in čas (staranje tal) (Giller in sod., 1998). Biodostopnost se s časom izpostavljenosti kovin zmanjšuje (Vig in sod., 2003). Na splošno velja, da so prosti ioni dosegljivi in imajo neposredni vpliv na toksičnost. Velika skupna vsebnost kovin ima lahko majhno biološko dostopno frakcijo (Giller in sod., 1998).

Biodostopna frakcija Zn in Cd v tleh je v veliki meri odvisna od pH vrednosti, saj nizka pH vrednost tal poviša njuno topnost (Vig in sod., 2003). Biodostopnost Cd se med tlemi razlikuje tudi do 10-krat (Mertens in Smolders, 2013). V tleh imata oba elementa oksidacijsko stanje 2⁺ in se zato vežeta na negativno nabite okside in na površino mineralov gline. Z nižanjem pH vrednosti H⁺ ioni zamenjajo vezan Cd in Zn in elementa se sprostita – postaneta topna in s tem biodostopna (Vig in sod., 2003). Poleg pH vrednosti

ima vpliv na biodostopnost tudi organska snov. Vezava kovin v tleh z manjšo vsebnostjo organskih snovi je nižja (Zeng in sod., 2011).

2.3 MIKROORGANIZMI V TLEH

Mikrobne populacije v tleh so izredno raznolike (Torsvik in sod., 1990). V tleh mikroorganizmi živijo, se razmnožujejo in odmrejo. Mikrobna številčnost (Brookes, 1995) in raznolikost je izrednega pomena za zagotavljanje stabilnega ekosistema (Walker, 1989), saj ima velik vpliv na biogeokemijske transformacije tal (Beare in sod., 1995), kamor prištevamo transformacijo dušika, fosforja, žvepla in železa (Giri in sod., 2005) ter mineralizacijo (Kamal, 2010). Tla so habitat številnih in raznovrstnih skupin mikroorganizmov, alg, bakterij, gliv in drugih. Manjši mikroorganizmi ($0,3\ \mu\text{m}$) se pojavijo posamezno, večje bakterije v rizosferi, pa se pojavljajo v manjših kolonijah, večjih mikroporah ali pa so povezane z delci tal, povečini z organo-glinenimi kompleksi (Foster, 1988). Bakterije se povezujejo v biofilme in se s tem zavarujejo pred negativnim vplivom okoljskih dejavnikov. Almas in sodelavci (2005) so pokazali, da so bakterijske celice povezane v biofilm manj občutljive na PTK (Cd in Zn), kot pa posamične celice. Aktivnost in interakcija z drugimi mikroorganizmi, večjimi organizmi ter delci tal je odvisna od stanja na mikrobem nivoju in se lahko razlikuje med mikrohabitati na izredno majhni razdalji (Wieland in sod., 2001). Mikrohabitat talnih mikroorganizmov sestavlja zunanja in notranja površina delcev tal, ki so različne velikosti in sestave (Beare in sod., 1995). Vpliv na število, sestavo in porazdeljenost mikrobnih populacij v tleh imajo dostopnost hranil, mikroklimatski pogoji ter kemijske lastnosti in sestava tal (Wolters, 1991).

Bakterije so prevladujoča (Liesack in Stackebrandt, 1992) in izredno raznolika (Raynaud in Nunan, 2014) skupina mikroorganizmov v številnih vrstah tal (Liesack in Stackebrandt, 1992). V enem gramu tal v povprečju najdemo 10^8 bakterij (Raynaud in Nunan, 2014). Lahko so autotrofne ali heterotrofne (Drews, 2011). Njihova številčnost se zmanjšuje z globino (Duineveld in sod., 2001), na številčnost pa vplivata še temperatura in vlažnost tal. V primeru izredno nizkih (arktična območja) oz. visokih (puščavska tla) temperatur lahko s tvorjenjem spor preidejo v dormanto obliko (Moreno in sod., 1986). V tleh najdemo še cianobakterije, ki za razliko od po gramu negativnih bakterij, vršijo fotosintezo (Drews, 2011) in aktinomicete (Benson, 1988).

Do nedavnega so bile arheje v tleh manj preučena skupina mikroorganizmov, saj je veljalo, da so naselile samo ekstremna okolja (Giri in sod., 2005). Kasnejše študije pa so pokazale, da imajo ekološko funkcijo tudi v neekstremnih okoljih, vključno s tlemi. V tleh so s filogenetsko analizo določili nov klaster znotraj kraljestva *Crenarchaeota*, imenovan netermofilna *Crenarchaeota* (Buckley in sod., 1998). Določili pa so tudi veliko še neizoliranih arhej (Auguet in sod., 2010). Arheje imajo velik ekološki pomen pri kroženju

dušika, saj vstopajo v prvi korak nitrifikacije – oksidacijo amonija (Leininger in sod., 2006).

Glive so prisotne v vseh vrstah tal in so zelo raznovrstna skupina mikroorganizmov. Posamezna hifa, ki je lahko eno-, dvo-, ali trijederna, sestavlja filamentozni micelij (Hawksworth, 1991), lahko so prostoživeče ali pa vezane ne korenine rastlin. Glive so heterotrofi, njihova funkcija je razgradnja kompleksnih organskih komponent rastlinskega in živalskega izvora, kot so celuloza, lignin in hitin (Vig in sod., 2003), zato ima količina in kakovost organske snovi neposreden vpliv na njihovo številčnost. Glive, v primerjavi z bakterijami in aktinomicetami, prevladujejo v tleh z nižjim pH-jem (Bolton in sod., 1993, cit. po Giri, 2005), prisotne pa so tudi v tleh z nevtralnimi in bazičnim pH-jem. Ker so glive striktni aerobi, jih najdemo samo v dobro prezračenih tleh. V vlažnih tleh se njihova številčnost precej zniža. Za glive je značilna razslojenost vrst glede na globino tal. Redko se zgodi, da bi vrsto, ki je pogostejša v nižji globini našli tudi na površju. Ta specifična porazdelitev je odvisna od dostopnosti organske snovi in od razmerja med kisikom in ogljikovim dioksidom na različnih globinah tal (Hawksworth, 1991). Številčno je gliv v tleh precej manj kot bakterij, lahko pa dosežejo višjo biomaso kot bakterije in aktinomicete skupaj (Vig in sod., 2003).

2.4 KOVINE IN MIKROORGANIZMI

Mikrobi so v kontaktu s kovinami in metaloidi v vseh okoljih, zato morajo na neki način sodelovati. Včasih v korist mikroorganizmov, drugič v njihovo škodo. Način interakcij med kovinami in prokarionti oz. evkarionti je različen. Oboji so sposobni vezati ione kovin, ki so prisotni v okolju. Vežejo jih na površino celice ali pa jih prenesejo v celico, kjer so potrebni za različne znotrajcelične funkcije (Ehrich, 1997). Samo prokarionti (eubakterije in arheje) vsebujejo organele, ki omogočajo oksidacijo (Mn(II) , Fe(II) , Co(II) , Cu(I) , AsO_2^- , Se^0 , SeO_3^{2-}) ali redukcijo (Mn(IV) , Fe(III) , Co(III) , AsO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , SeO_3^{2-}) kovin. Energijo, ki nastane med temi reakcijami pa shranijo (Summers in Sugerman, 1974). Vsi mikroorganizmi so sposobni sprejema kovin, njihove vključitve v metaloencime in s tem aktivacije encimov. Nekateri prokarionti in eukarionti sintetizirajo kisline, ki raztapljajo kovine, vezane v mineralih. Spet drugi pa sproščajo anione (sulfidi, karbonati), ki oborijo ione kovin. Nekateri prokarionti metilirajo kovine in metaloidne spojine in jih uporabijo kot donorje ali sprejemnike elektronov (Ehrich, 1997).

Če so kovine prisotne v presežku lahko imajo negativni vpliv na večino organizmov. Prvi podatki o vplivu kovin na mikroorganizme v tleh segajo na začetek 20-tega stoletja (Lipman in Burgess, 1914, cit. po Giller in sod., 1998). Mikroorganizmi so bolj občutljivi na PTK kot pa rastline in živali (Giller in sod., 1998). Glede toksičnega vpliva posameznega polutanta na mikrobne populacije velja, da če se preučevan mikrobni

parameter v 30 dneh od izpostavitve polutantu popolnoma izenači s stanjem pred izpostavitvijo, polutant ni nevaren. Vsak negativen vpliv, ki se kaže po 60 dneh izpostavitve polutantu pa predstavlja tveganje (Domsch in sod., 1983, cit. po Vig in sod., 2003).

Toksični vpliv kovin je povezan z oviranjem funkcionalnih skupin biološko pomembnih molekul, tako encimov, kot tudi transportnih sistemov za prenos esencialnih elementov in ionov. PTK se vežejo na aktivna mesta bioloških molekul in drugih celičnih enot, kar vodi v konformacijske spremembe, denaturacijo in inaktivacijo encimov ter motenje membranske integritete (Ochiai, 1987, cit. po Gadd, 1993). Kovina lahko deluje kot kofaktor in zviša aktivnost encima (Dick in Tabatabai, 1983). Cd inhibira encime z vezavo na aktivno mesto in na tak način moti metabolizem (McGrath, 1999, cit po Vig in sod., 2003). Z vezavo na ligande (fosfati, cisteinski in histidinski ostanki proteinov) pa negativno vpliva na strukturo in funkcionalost membrane (Collins in Stotzky, 1989, cit po Vig in sod., 2003).

2.4.1 Metode določanja vpliva kovin na mikroorganizme v tleh

Giller in sod. (1998) ter Brookes (1995), ki so preučevali številčnost ali aktivnost mikrobnih populacij v tleh so uporabljali metode spremljanja biomase mikrobnih populacij, funkcije mikroorganizmov (respiracija, mineralizacija in izkoristek organskega C in N, fiksacija N₂) in merjenje aktivnosti različnih encimov.

Poleg zgoraj naštetih tehnik, se uporabljajo še molekularne metode, na osnovi DNA, RNA in maščobnih kislin za sledenje vpliva kovin na mikrobne združbe v tleh. Med le-te prištevamo profiliranje deleža (%) G in C (gvanin in citozin) (Sandaa in sod., 1999b), molekularne metode iskanja prstnih odtisov DNA (T-RFLP), metodo naključnega pomnoževanja polimorfne DNA (RAPD) (Malla in Varma, 2007), elektroforezo z denaturacijskim gradientom (DGGE) (Gomes in sod., 2010) in PLFA analizo fosfolipidnih markerjev in analizo FAME (maščobna kislina metilester) (Marschner, 2007).

Rezultati študij, kjer so dodali PTK Zn in Cd, so pokazali zmanjšanje oz. nobene spremembe mikrobnih združb v tleh. Bakterije, glive in aktinomicete so različno občutljive na povišane vrednosti Zn in Cd (Giller in sod., 1998). Številni avtorji so dokazali, da tako kratkoročna kot dolgoročna izpostavljenost kovin vodi v zmanjšanje mikrobne raznovrstnosti in aktivnosti v tleh (Gadd in Griffiths, 1978; Brookes 1995; Sandaa in sod., 1999a; Gomes in sod., 2010). Povišana koncentracije kovin vodi v zmanjšano mineralizacijo ogljika, fiksacijo ogljika, transformacijo dušika, encimsko aktivnost (Giller in sod., 1998), znižanje biomase in pojav ter povečanje rezistentnih vrst (Pennanen in sod, 1996). Kontaminacija ima različen vpliv na glive in bakterije. Poročali so o zmanjšanju

aktivnosti bakterij, aktivnost gliv pa se je v nekaterih študijah celo zvišala (Rajapaksha in sod., 2004). Spremembe v številčnosti mikrobnih populacij in posledično njihova aktivnost pa lahko vplivajo na druge pomembne procese, kot je razgradnja organske snovi (Brookes, 1995) in organskih polutantov (Jansen in sod., 1994). Večina študij vpliva kovin na mikrobne združbe v tleh se osredotoča na izgubo določene funkcije, s tem pa se zamaskira vpliv na raznovrstnost mikrobnih združb, ki je prav tako pomemben (Giller in sod., 1998).

2.4.2 Razvoj odporosti na kovine

Ko govorimo o toleranci na kovine je potrebno razlikovati med razvojem nove tolerance v združbi in izborom posameznih sevov znotraj združbe, ki so bolj odporni na kovine. Mikroorganizmi so razvili številne mehanizme izogibanja, imobilizacije in izločanja kovin, ki jim omogočajo obstoj v tleh z različnimi koncentracijami kovin. Med te mehanizme prištevamo vezavo kovine na proteine, ekstracelularne polimere ali celično steno, skladiščenje znotraj celice, oblikovanje netopnih sulfidov, zmanjšan vnos kovin v celico in povišan prenos iz celice (Giller in sod., 1998; Kamal, 2010). Nekateri mikroorganizmi so celo sposobni kopičenja, imobilizacije in kristalizacije kovin (Kamal, 2010). Diaz-Ravina in Baath (1996) sta v študiji opazila razvoj rezistence, ki se je s časom izpostavitve Zn višala. Po samo 2 dneh izpostavljenosti sta izolirala tolerantne bakterijske kolonije (koncentracija 130 – 520 mg Zn kg⁻¹). Ob občutno višji koncentraciji (2080 mg Zn kg⁻¹) pa sta opazila povečano toleranco prva dva tedna in nato nobene spremembe do 28 meseca izpostavitve. Takojšen vpliv Zn je posledica smrti občutljivih bakterijskih vrst in kompetitivne prednosti in prilagoditve preživelih mikroorganizmov. Precej mikroorganizmov lahko preživi in raste v tleh s povišano koncentracijo kovin (Gadd, 2005). Čas potreben za razvoj tolerance se med vrstami razlikuje. V nekaterih študijah se kaže razvoj rezistence po nekaj dneh (Diaz-Ravina in Baath, 1996; Suhadolc, 2003), v drugih pa tudi po nekaj letih (Doelman in Hanstra, 1979, cit. po Giller in sod. 1998). Določene funkcije lahko ob izgubi ene mikrobne združbe v tleh, prevzeme druga in s tem se spregleda vpliv toksičnosti na prvotno združbo (Giller in sod., 1998).

2.5 ZAKONSKA UREDITEV VNOSA KOVIN V TLA

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so v večini evropskih držav omejili uporabo blata iz čistilnih naprav, zaradi prisotnih kovin, z namenom zmanjševanja tveganj prenosa kovin v prehranjevalno verigo. Blato iz čistilnih naprav je odpadke, ki nastane po čiščenju odpadne vode v čistilnih napravah ali nastaja kot blato ob praznjenju greznic odpadne vode iz gospodinjstev (Uredba o emisiji ..., 2008). Za blato iz čistilnih naprav so določene mejne vrednosti za koncentracijo kovin v obdelanem blatu, ki se uporabljajo v kmetijstvu

za kovino Cd 1,5 mg/kg suhe snovi in za kovino Zn 1200 mg/kg suhe snovi (Uredba o emisiji ..., 2008).

Na podlagi skupne vsebnosti kovin v tleh so bile določene tudi največje dovoljene vsebnosti kovin v tleh za pridelavo hrane in krme s stališča škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali okolje (Witter, 1992, cit. po Giller in sod., 1998). V Pregl. 1 so predstavljene največje dovoljene vrednosti PTK Zn in Cd v tleh. Med primerjanimi državami prihaja do manjših razlik.

Preglednica 1: Slovenska uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih (mg/kg) nevarnih snovi v tleh, ter največja dovoljena vsebnost (NDV) kovin (mg/kg) za nekatere evropske zakonodaje (Uredba o mejnih ..., 1996¹, Direktiva Sveta ..., 1986², VSBo ..., 1986³, Code of ..., 1993⁴).

Kovina	Slovenija ¹			EEC ²	Švica ³	Velika Britanija ⁴
	Mejna vrednost	Opozorilna vrednost	Kritična vrednost	NDV	NDV	NDV
Cd	1	2	12	1-3	0,8	3
Zn	200	300	720	150-300	200	300

V zadnjem obdobju se, ob naraščanju uporabe FO za namene gnojenja kmetijskih površin, porajajo podobna vprašanja o prekomernih vnosih potencialno nevarnih elementov. FO nastane po anaerobni razgradnji biološko razgradljivih odpadkov iz kmetijstva, gozdarstva in gospodinjskih odpadkov, uporabi se lahko tudi blato iz čiščenja odpadnih voda in čiščenja industrijskih odpadnih voda, če niso bila uporabljena sintetična sredstva (Uredba o predelavi ..., 2013). Ker lahko FO vsebuje PTK, ki se v tleh kopičijo, je zakonsko omejena uporaba FO za gnojenje. V Sloveniji velja za FO Uredba o predelavi biološko razgradljivih odpadkov in uporabi komposta in digestata (Uredba o predelavi ..., 2013). Le-ta določa, da je uporaba FO iz bioplinarn za namene gnojenje dovoljena, vendar je potrebno uporabo nadzorovati. Preden se FO uporabi za gnojenje njivskih površin, ga je potrebno analizirati. Kakovost je nadzorovana tudi s skrbno izbiro vrste in količine vhodnih substratov. Uredba določa vzorčenje vsake šarže, uporabljenega substrata in končno deklaracijo digestata oz. komposta z naslednjimi podatki: izvor, osnovne lastnosti materiala (pH, organska snov, suha snov, delež vode, električna prevodnost, specifična teža in kationska izmenjalna kapaciteta), hranila (celotni dušik, fosfor in kalij), biološki parameter (odziv rastlin in biološka stabilnost), fizikalna onesnaževala (trdni delci iz stekla, plastike ali kovin, mineralni trdi delci večji od 5 mm % suhe snovi), kemijska onesnaževala (Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Cu in Zn), higieneski vidik (*Salmonella* in *Escherichia coli*) in organska onesneževala (policiklični aromatski ogljikovodiki, poliklorirani bifenoli). Letni vnos komposta ali digestata v ali na tla ne sme presegati mejnih vrednosti letnega vnosa nevarnih snovi v tla (Pregl. 2) (Uredba o predelavi ..., 2013). Prav tako letni vnos komposta ali digestata v ali na tla ne sme povzročiti preseganja mejnih imisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh v skladu s predpisom, ki ureja mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti nevarnih snovi v tleh (Pregl. 1).

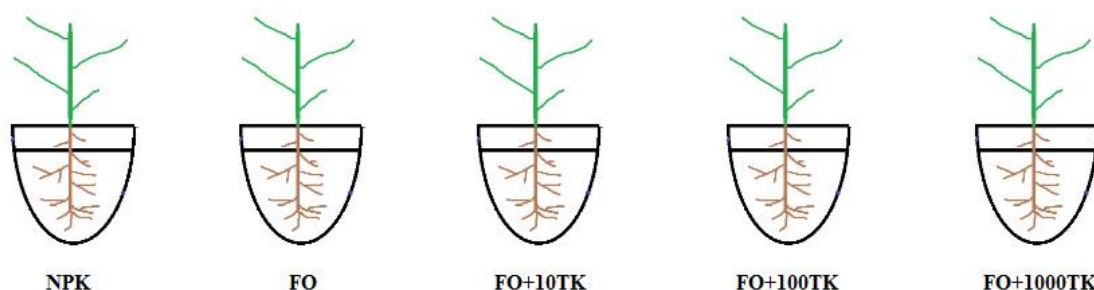
Preglednica 2: Zakonsko določene mejne vrednosti vnosa nevarnih snovi v kmetijska zemljišča (Uredba o predelavi ..., 2013), ki velja za deklariran kompost in digestat 1. kakovostnega razreda.

Nevarna snov	Mejna vrednost letnega vnosa v g/ha na leto
Kadmij in njegove spojine, izražene kot Cd	10
Baker in njegove spojine, izražene kot Cu	700
Nikelj in njegove spojine, izražene kot Ni	400
Svinec in njegove spojine, izražene kot Pb	600
Cink in njegove spojine, izražene kot Zn	3000
Živo srebro in njegove spojine, izražene kot Hg	10
Celotni krom (Cr)	60

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LONČNI POSKUS

V steklenjaku Biotehniške fakultete smo izvedli lončni poskus s tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.), v katerem smo tri mesece po dodajanju FO preverjali vpliv FO na vsebnost kovin (Zn, Cd) ter strukturo, številčnost in aktivnost talnih mikroorganizmov. Določili smo pet obravnavanj (Slika 1), vsako v štirih ponovitvah. Prvo obravnavanje je bilo kontrolno - tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, drugo obravnavanje tla z dodanim maksimalnim dovoljenim odmerkom FO, v naslednja tri obravnavanja smo v FO dodali še 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnost raztopljenih kovin (Zn in Cd) kot smo ju določili v izvornem FO (Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz lončnega poskusa. Talne vzorce petih različnih obravnavanj (NPK, FO, FO+10TK, FO+100TK in FO+1000TK) smo analizirali v 4 ponovitvah, torej smo skupaj obravnavali 20 enot vzorčenja.

Odmerek dodatkov tlem (NPK, FO) smo določili glede na maksimalno dovoljeni vnos dušika (Uredba o varstvu ..., 2009), ki znaša 170 kg N/ha. Izračunali smo, da moramo v poskusne lonce s površino 0,0361 m² dodati 0,6137 g N, kar ob analizi FO (Pregl. 12) pomeni 102 ml FO/lonec (oz. 27700 L/ha). V kontrolno obravnavanje smo dodali mineralno gnojilo NPK (N:P:K = 15:15:15) in sicer 4,1 g NPK/lonec. V obravnavanja z dodanimi kovinama smo FO dodali v vodni raztopini z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnost Zn in Cd kot smo ju določili v FO (Pregl. 12). Tla, ki smo jih odvzeli v Beli Krajini na njivski površini v globini od 0 - 20 cm, smo homogenizirali ter jih razporedili v 20 poskusnih loncev. FO in FO z eksperimentalno dodanimi raztopljenima kovinama smo dodali kapljično na površino tal, enako v vodi raztopljeno NPK gnojilo. V poskusne lonce smo 6.7.2011 posadili semena tatarske ajde. Po treh mesecih (30.9.2011) je bila ajda požeta in odvzeli smo vzorce tal. Vzorce tal smo homogenizirali po globinah (0-2 cm in 2-20 cm), del vzorcev smo zračno posušili za osnovne pedološke analize (globina tal 0-2 cm in 2-20 cm). Za molekularne analize in encimsko aktivnost smo vzorce (globina tal 0-2 cm) zamrznili v suhem ledu in nato shranili v zamrzovalniku na - 20 °C.

3.2 PEDOLOŠKE ANALIZE VZORCA TAL IN FO

Teksturo tal smo določili s sedimentacijsko pipetno metodo po ameriški teksturni klasifikaciji (ISO 11277, 2009). Vlažnost tal pa s tehniko sušenja na 105 °C do dosežene konstatne teže tal (ISO, 11456). Vrednost pH smo izmerili v 0,01 M raztopini CaCl_2 ($1:2,5 = v \text{ tal}/v \text{ CaCl}_2$) (ISO 10390, 2005). Skupni organski ogljik v tleh smo določili po slovenskem standardu (SIST ISO 14235, 1999), po Walkley-Blacku. Metoda temelji na mokri oksidaciji organskega ogljika v žvepleno kislem okolju ob dodatku oksidacijskega sredstva (dikromata). Določili smo porabo oksidacijskega sredstva, na osnovi katere smo nato izračunali maso ogljika. Po tej metodi ne določimo visoko kondenziranih oblik organskega ogljika (npr. oglje, grafit, premog) in mineralnih oblik C (karbonatov). Organski C in N smo določili s suho plamensko metodo in izmerili z elementnim analizatorjem (Elementar vario MAX instrument) (ISO 10694, ISO 13878). Topne oblik C in N smo ekstrahirali z 0,01 M raztopino CaCl_2 (ISO 10390, 2005). Topni organski C v ekstraktu (DOC) smo določili z analizatorjem (DIMATEC, Nemčija). Nitratni N ($\text{NO}_3\text{-N}$) in amonijski N ($\text{NH}_4\text{-N}$) pa fotometrično na analizatorju s kontinuiranim pretokom (Skalar Analytical, Nizozemska). Topni organski dušik (DON) smo izračunali iz razlike med skupnim N (TNb) in mineralnimi oblikami N. Rastlinam dostopna P (P_2O_5) in K (K_2O) smo določili z izmenjavo z amon-laktatom (ÖNORM L 1087, 1993). Kationska izmenjalna kapaciteta (CEC) je izražena kot seštevek izmenljivih kationov. Kationi so raztopljeni v ekstrakcijski raztopini amonacetata (NH_4OAc , pH 7), adsorbirani H^+ ioni pa z raztopino BaCl_2 (Soil Survey ..., 2004).

3.3 SKUPNA VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN

Kovini smo določali po standardu ISO 11466 (1996) s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS, Varian AA240FS). Skupno vsebnost Zn in Cd smo določali v raztopini po ekstrakciji z zlatotopko (klorovodikova kislina : dušikova kislina = 3:1).

3.3.1 Šeststopenjska sekvenčna reakcija potencialno toksičnih kovin

Ekstrakcija PTK je povzeta po skupini Tessier in sod. (1979). V šestih zaporednih ekstrakcijah se izločajo kovine glede na jakost vezave, pri čemer se v vsakem koraku uporabi močnejši reagent. Avtorji metode prve frakcije označujejo kot mobilne in biodostopne. Ostale so nemobilne (nedostopne), saj potrebujejo za izločitev bolj agresivno okolje (Pregl. 3).

Preglednica 3: Zaporedni koraki šeststopenjske reakcije in ocena mobilnosti ter biodostopnosti posamezne sekvence (Tessier in sod., 1979).

Zaporedna sekvence	Mobilnost
Lahko topne kovine (topna frakcija)	Visoka mobilnost
Izmenljive kovine	Visoka mobilnost
Kovine vezane na karbonate	Srednja mobilnost; velika odvisnost od pH vrednosti v okolju
Kovine vezane na Fe- in Mn-okside	Srednja mobilnost; pod anoksičnimi pogoji je mobilnost večja (nizek Eh)
Kovine vezane na organsko snov	Nizka mobilnost; v oksidirajočih okoljih organska snov razpade in vezane PTK se lahko sprostijo v okolje
Preostale kovine po razklopu z zlatotopko	Zelo nizka mobilnost; za PTK vezane na to frakcijo velja, da se v razumskem času ne bodo sprostile v okolje

Topno frakcijo 1 g suhih tal smo izločili z 10 ml destilirane vode po 1 uri na stresalniku (200 vrtljajev/min). Drugo frakcijo, izmenljivih ionov kovin iz talnih koloidov, smo izločili z 10 ml 1 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ po 2 urah na stresalniku (200 vrtljajev/min). Tretjo frakcijo potencialno toksičnih kovin, vezanih na karbonate, smo izločili z 10 ml 1 M NH_4OAC (pH 5) po 5-ih urah na stresalniku (200 vrtljajev/min). Izločanje PTK v talno raztopino, vezanih na Fe- in Mn-okside, je potekalo 12 ur na stresalniku (200 vrtljajev/min) v 20 ml 0,1 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (pH 2). Frakcijo, vezano na netopno organsko snov, smo izločili po segrevanju raztopine tal v 3 ml 0,02 M HNO_3 in 5 ml 30% H_2O_2 pri 85 °C, ki ji je sledila ekstrakcija s 15 ml 1 M NH_4OAC za 30 min na stresalniku (200 vrtljajev/min). Zadnjo frakcijo smo dobili po razklopu z zlatotopko (20 ml 37 % HCl in 7 ml 65 % HNO_3 za 2 uri), pri čemer so se raztopili silikati in preostanek mineralov. Po vsakem ekstrakcijskem koraku smo vzorce centrifugirali (30 minut pri 3200 x g) (Hettich, Nemčija), supernatant pa shranili na 4 °C do merjenja vsebnosti PTK (Cd in Zn) z atomskim absorpcijskim spektrometrom (AAS, Varian AA240FS), ostanek pa sprali z 8 ml destilirane vode in ga uporabili za naslednje sekvenčne reakcije.

3.4 MOLEKULARNE ANALIZE

3.4.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA iz vzorcev tal smo uporabili komercialni komplet reagentov FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, ZDA) in se držali navodil proizvajalca.

3.4.2 Merjenje koncentracije in integritete DNA

Koncentracijo DNA smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop (Peglab, Nemčija). Umerili smo z 1 µl vode brez nukleazne aktivnosti (NF) in izmerili koncentracijo vzorcem. Računalniški program je analiziral signal iz čitalca ter izračunal koncentracijo vzorca,

vrednost A_{260} , vrednost A_{280} ter razmerje A_{260}/A_{280} (merilo prisotnosti proteinov v izolatu) in A_{260}/A_{230} (merilo prisotnosti organskih spojin in kaotropnih soli v izolatu). Optimalno razmerje A_{260}/A_{280} za čisto DNA je 1,7–2,0.

3.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za pomnoževanje izolirane DNA bakterij smo uporabili komercialni komplet reagentov Taq DNA Polymerase and Taq PCR Core Kit (Qiagen, Düsseldorf, Nemčija) za arheje in glive pa reakcijsko mešanico Taq DNA Polymerase (with W-1) (Life Technologies, ZDA). Sledili smo priloženemu navodilu proizvajalcev. Začetne oligonukleotide za specifično PCR pomnoževanje 16S rRNA arhej in bakterij ter 18S rRNA gliv smo naročili pri nemškem proizvajalcu Metabion International AG (Pregl. 4).

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili pri PCR (in T-RFLP).

Genska regija in začetni oligonukletid	Zaporedje (5'→ 3')	Vir
16S rRNA arhej		
A934r-FAM	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Chin in sod. (1999)
A109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Chin in sod. (1999)
16S rRNA bakterij		
27f-FAM	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Heuer in sod. (1997)
1401r	GCG TGT GTA CAA GAC CC	Nübel in sod. (1996)
18S rRNA gliv		
nu-SSU0817-FAM	TTA GCA TTG AAT AAT RRA ATA GGA	Borneman in sod. (2000)
nu-SSU1536	AAT GCA ATG CYC TAT CCC CA	Borneman in sod. (2000)

Izolirano DNA (koncentracija med 80 in 140 ng/μl) smo uporabili kot matrico za PCR reakcijo. Za negativno kontrolo smo uporabili NF vodo, za pozitivno kontrolo pa izolirano DNA arhej, bakterij in gliv (vir: Helmholtz Institut, Department für Ökologie und Lehrstuhl für Bodenökologie). PCR reakcija je potekala v termičnem pomnoževalniku (Biometra, Nemčija). Uspešnost reakcije smo preverili z gelsko elektroforezo. Dobljene pomnožke PCR smo očistili s komercialno dostopnim kompletom QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Düsseldorf, Nemčija) in jih shranili pri 4 °C.

Reakcijska mešanica za pomnožitev 16S rRNA regije arhej je vsebovala 1X PCR pufer, vsaki deoksiribonukleotid trifosfat (dNTP) s koncentracijo 0,2 mM, 3 mM $MgCl_2$, 0,3 % goveji serumski albumin (BSA), par začetnih oligonukleotidov (Pregl. 4) s koncentracijo 10 μM in 1,25 U Taq DNA polimeraze v končnem volumnu 50 μl. Pomnoževanje 825 baznih parov dolgega zaporedja DNA arhej je optimizirano po članku Chin in sod. (1999). Reakcija je potekala v termociklu za pomnoževanje DNA z začetkom na 94 °C za 3 min, sledila je 35–kratna ponovitev temperaturnega ciklusa (94 °C za 60 s, 52 °C za 60 s, 72 °C za 90 s) in zaključek reakcije na 72 °C za 5 min.

Reakcijska mešanica za pomnožitev 16S rRNA regije bakterij je vsebovala 1X PCR pufer, vsaki dNTP s koncentracijo 0,2 mM, 0,3 % BSA, par začetnih oligonukleotidov (Pregl. 4) s koncentracijo 5 μ M in 0,25 U *Taq* DNA polimeraze v končnem volumnu 50 μ l. Pomnoževanje 1374 baznih parov dolgega zaporedja DNA bakterij je potekalo v termociklu za pomnoževanje DNA z začetkom na 94 °C za 3 min, sledila je 35–kratna ponovitev temperaturnega ciklusa (94 °C za 60 s, 57 °C za 60 s, 72 °C za 90 s) in zaključek reakcije na 72 °C za 10 min.

Reakcijska mešanica za pomnožitev 18S rRNA regije gliv je vsebovala 1X PCR pufer, vsaki dNTP s koncentracijo 0,25 mM, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,3 % BSA, par začetnih oligonukleotidov (Pregl. 4) s koncentracijo 20 μ M in 2,5 U *Taq* DNA polimeraze v končnem volumnu 50 μ l. Pomnoževanje 379 baznih parov dolgega zaporedja DNA gliv je potekalo v termociklu za pomnoževanje DNA z začetkom na 94 °C za 3 min, sledila je 35–kratna ponovitev temperaturnega ciklusa (94 °C za 45 s, 56 °C za 45 s, 72 °C za 45 s) in zaključek reakcije na 72 °C za 5 min. Temperaturni profil je povzet po članku Borneman in sod. (2000).

Pomnožke DNA po metodi PCR in qPCR smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. S tem smo preverili prisotnost in velikost elektroforeznih lis, ki predstavljajo pomnoženo regijo med izbranimi začetnima oligonukleotidoma. Pripravili smo 1% (w/v) agarozni gel v 1X pufru TAE (2M Tris, 5,7 % ledocetna kislina, 50 mM EDTA; pH 8 redčen 50-krat v destilirani vodi) z dodatkom etidijevega bromida. Tako pripravljen gel smo prenesli v elektroforezno kadičko (Peqlab, Nemčija) in prelili z 1X pufrom TAE. V žepke agaroznega gela smo nanesti vzorce z 1X nanašalnim pufrom (MBI Fermentas, ZDA). Za ovrednotenje velikosti pomnožkov smo na gel nanesti velikostni DNA standard (Roche, Švica). Elektroforeza je tekla okoli 50 minut (odvisno od velikosti gela) pri stalni napetosti 100 V (Consort E835, Belgija). Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali (Biostep Dark Hood DH-40/50, Nemčija).

3.4.4 Razrez PCR pomnožka z restrikcijskimi endonukleazami

Pomnožke PCR smo rezali z restrikcijskimi endonukleazami (RE), ki prepoznavajo točno določena restrikcijska mesta (Pregl. 5). Reakcijska mešanica je vsebovala matrično DNA, 1X reakcijski pufer (pufer 4 oz. Tango), RE (0,1 μ l *HhaI*; 1 μ l *MspI*; 1 μ l *AluI*), 1X BSA (Sigma, Nemčija) in miliQ vodo (MQ) do končnega volumna 50 μ l. Rezali smo okoli 0,4 μ g DNA. Restrikcije smo inkubirali 2 (bakterije) oz. 3 (arheje in glive) ure pri 37 °C, sledil je korak inaktivacije RE na 65 °C za 20 min. Po restrikciji smo mešanice očistili s komercialno dostopnim kompletom MinElute® Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Düsseldorf, Nemčija) in jih shranili pri -20 °C.

Preglednica 5: Seznam uporabljen restrikcijskih endonukleaz, ki smo jih uporabili za T-RFLP.

Vrsta	Restrikcijska endonukleaza	Restrikcijsko mesto (5'→3')
Arheje	<i>HhaI</i> (New England Biolabs, USA)	GCG↓C
Bakterije	<i>MspI</i> (Thermo Scientific, US)	C↓CGG
Glive	<i>AluI</i> (Fermentas, Burlington, Kanada)	AG↓CT

3.4.5 Polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)

Za analizo T-RFLP smo v mikrotitersko ploščo z 96-timi vdolbinami (Nunc Life Science, Danska) odpipetirali 1 µL inaktivirane reakcijske mešanice (koncentracija 5 ng/µl za arheje in glive ter 20 ng/µl za bakterije) in DNA standard (MapMarker-1000 Rox Size Standard) (Tech Dragov, Kitajska) v razmerju s formamidom (Life Technologies, ZDA) 1:300. Tako pripravljeno ploščo smo v termičnem pomnoževalniku denaturirali za 5 min pri 95 °C in takoj prenesli na led. Sekvenator ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Kanada) je odčitaval signale.

3.4.6 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Z metodo qPCR smo določali prisotnost in številčnost 16S ribosomalne DNA (bakterije, arheje) oz. 18S ribosomalne DNA (glive). Pred analizo qPCR smo DNA očistili s komercialno dostopnim kompletom QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Düsseldorf, Nemčija). Reakcijo smo izvedli v termociklu za pomnoževanje DNA v realnem času 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Kanada).

Standard za glive smo pripravili s kloniranjem DNA fragmenta 18S rRNA iz glive *Geotrichum candidum*. Plazmide, ki smo jih uporabili kot standard za arheje smo izolirali iz kolonij *E. coli*. Protokol za pripravo obeh standardov je opisan v naslednjih poglavjih. Standard za bakterije pa smo dobili že pripravljen (vir: Helmholtz Institut, Department für Ökologie und Lehrstuhl für Bodenökologie).

Kolonije celic arhej (pSC-A-Arc-16S) iz trdega Luria-Bertani (LB) gojišča smo prenesli v tekoče LB gojišče z dodanim ustreznim antibiotikom (kanamicin) in kulturo čez noč stresali pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo plazmide izolirali s komercialno dostopnim kompletom NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid): Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli* (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija) in se držali navodil proizvajalca.

S čistimi kulturami gliv (*Beauveria bassiana*, *Penicillium*, *Geotrichum candidum*, *Alternaria alternata*) smo naredili PCR. Na osnovi rezultatov gelske elektroforeze smo določili kulturo, ki je najprimernejša za izbrane začetne oligonukleotide (Pregl. 4).

Dobljene pomnožke PCR smo očistili s komercialno dostopnim kompletom QIAquick® Purification Kit (Qiagen, Düsseldorf, Nemčija) in jih do nadaljne obdelave shranili pri 4 °C. S tehniko ligacije smo vnesli DNA fragment v plazmidni vektor. Za postopek transformacije smo uporabili komercialno dostopen komplet TA cloning® Kit (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija) in se držali navodil proizvajalca.

Za določanje nuklotidnega zaporedja smo uporabili komercialni komplet Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ZDA). Za oba univerzalna začetna oligonukleotida za sekvenciranje (M13R in M13F) (Promega Corporation, ZDA) (Pregl. 6) je potrebno posebej pripraviti reakcijsko mešanico. Končne koncentracije reakcijske mešanice so vsebovale 30 ng DNA, 1-kratni pufer za sekvenciranje, 10 pmol začetnih oligonukleotidov in Terminator Mix do končnega volumna 5 µl. Ker smo reakcijsko mešanico delali v 5 µl nismo dodali MQ vodo.

Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za sekvenciranje.

Začetni oligonukleotid	Zaporednje (5'→ 3')
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
M13f	TGT AAA ACG ACG GCC ATG

Pomnoževanje DNA je potekalo v cikličnem termostatu (Biometra, Nemčija) s 50–kratno ponovitvijo temperaturnega cikla PCR sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij 96 °C za 10 s, 50 °C za 5 s in 60 °C za 4 min, ki jim je sledilo takojšnje ohlajanje na 4 °C do naslednjega koraka. Reakcija se prične z začetno denaturacijo na 96 °C za 1 min. PCR pomnožek smo očistili s 30 µl 100 % etanola, inkubirali na 4 °C za 15 min in centrifugirali (15 min, 2000 x g). Supernatant smo odstranili in v vsako vdolbinico odpipetirali 125 µl 70 % etanola in centrifugirali (15 min, 2000 x g). Nato smo mikrotistrsko ploščico s 96-vdolbinicami centrifugirali (30 s, 500 x g) čez glavo. Odpipetirali smo 50 µl NF in inkubirali na ledu za 15 min. Tako pripravljena plošča smo dali sekvencirati na Sekvenator Illumina HiSeq 2000 (Illumina, ZDA).

Z računalniškim orodjem BioEdit (Biological sequence alignment editor) smo obdelali zaporedje, tako da je ostal samo kvalitetno sekvenciran fragment. Poiskali smo začetna oligonukleotida, zaporedje med njima pa analizirali s pomočjo spletnega orodja Nucleotide Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Na osnovi prekrivanja zaporedja med genomi dostopnimi na tej podatkovni bazi in sekvenciranim fragmentom smo določili vrsto.

Reakcija qPCR v realnem času za arheje, bakterije in glive je potekala v termociklu za pomnoževanje DNA v realnem času (Applied Biosystem, Kanada).

Pogoji in reakcijska mešanica za qPCR arhej so bili optimizirani po članku skupine Timmers in sod. (2012). Reakcijska mešanica je vsebovala par začetnih oligonukleotidov

(Pregl. 7) s koncentracijo 0,2 μM , 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Kanada), 0,6 % BSA in okoli 20 ng matrične DNA do končnega volumna 25

μl . Ustrezno redčene vzorce smo odpipetirali v mikrotitersko ploščo in centrifugirali (1 min, 500 x g). Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji 95 °C za 10 min, 40 ciklov (95 °C za 20 s, 50 °C za 60 s, 72 °C za 30 s), signal smo merili pri 78 °C.

Pogoji in reakcijska mešanica qPCR bakterij so bili optimizirani po članku skupine Bach in sod. (2001). Reakcijska mešanica je vsebovala par začetnih oligonukleotidov (Pregl. 7) s koncentracijo 10 μM , 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Kanada), 0,6 % BSA in okoli 10 ng matrične DNA do končnega volumna 25 μl . Ustrezno redčene vzorce smo odpipetirali v mikrotitersko ploščo in centrifugirali (1 min, 500 x g). Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji 95 °C za 10 min, 40 ciklov (95 °C za 20 s, 57 °C za 30 s, 72 °C za 45 s).

Pogoji in reakcijska mešanica qPCR gliv so bili optimizirani po članku skupine Borneman in sod. (2000). Reakcijska mešanica je vsebovala par začetnih oligonukleotidov s koncentracijo 10 μM (Pregl. 7), 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Kanada), 0,6 % BSA in okoli 10 ng matrične DNA do končnega volumna 25 μl . Ustrezno redčene vzorce smo odpipetirali v mikrotitersko ploščo in centrifugirali (1 min, 500 x g). Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji 94 °C za 3 min, 40 ciklov (94 °C za 45 s, 56 °C za 45 s, 72 °C za 45 s).

Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov za qPCR.

Genska regija in začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' → 3')	Vir
16S rRNA arhej		
rSAf(i)	CCT AYG GGG CGC AGC AG	Nicol in sod. (2005)
958r	YYC GGC GTT GAM TCC AAT T	Bano in sod. (2004)
16S rRNA bakterij		
FP 16S rRNA	GGT AGT CYA YGC MST AAA GC	Bach in sod. (2001)
RP 16S rRNA	GAC ARC CAT GCA SCA CCT G	Bach in sod. (2001)
18S rRNA gliv		
nu-SSU0817	TTA GCA TTG AAT AAT RRA ATA GGA	Borneman in sod. (2000)
nu-SSU1536	AAT GCA ATG CYC TAT CCC CA	Borneman in sod. (2000)

Za preverjanje kontaminacije smo uporabili NF vodo, ki smo jo odpipetirali namesto vzorca. Reakcijska mešanica in pogoji reakcije so ostali enaki. Za kontrolni vzorec brez matrične DNA velja, da kontaminacija ni prisotna, če se pokaže krivulja najmanj 8 praznih ciklov za specifičnim signalom (Applied Biosystem, Kanada, USA) oz. po 35-tih ciklih reakcije (Bach in sod., 2001). S tem preprečimo lažno pozitivno interpretacijo rezultatov.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z redčitveno vrsto (redčitve 10^8 do 10^3) standardov. Kot standard smo uporabili plazmide, izolacija in priprava le-teh je opisana v prejšnjih

odstavkih (str. 16-17). Standard za arheje je *Methanobacterium*, za bakterije *Clavibacter michiganensis* in za glive *Geotrichum candidum*. S pomočjo spodnjih enačb smo preračunali število kopij plazmida:

$$\text{število bp plazmida} = (\text{dolžina plazmida} + \text{dolžina fragmenta}) \quad \dots(1)$$

$$\text{število kopij} = \text{koncentracija DNA} \times N_A / \text{število bp plazmida} \times M \quad \dots(2)$$

$$N_A \text{ (Avogadrova konstanta)} \quad 6,022\,141\,79(30) \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$M \text{ (molekulska masa masa 1 bp)} \quad 660 \text{ g/mol}$$

Število kopij standarda za arheje je $2,9 \cdot 10^{10}$, za bakterije $2,12 \cdot 10^{11}$ in za glive $9,6 \cdot 10^9$.

Reakcijska mešanica in pogoji za pripravo standarda za qPCR so enaki kot za vzorce. Na osnovi rezultatov meritvene krivulje smo s programsko opremo 7300 System SDS preverili uspešnost reakcije in analizirali dobljene podatke. Umeritvena krivulja je izračunana na osnovi šestih točk in štirih tehničnih ponovitvah posamezne redčitve. Zanesljivost krivulje smo preverili s ponovljivostjo pipetiranja vzorcev in z r^2 vrednostjo (statistični pokazatelj predvidljivosti napovedi ene vrednosti glede na drugo) (Pregl. 8).

Uspešnost pomnoževanja posamezne PCR reakcije smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{uspešnost} = 10^{(-1/\text{naklon}) - 1} \quad \dots(3)$$

Preglednica 8: Na osnovi vrednosti naklona (r^2) izračunan izkoristek posamezne qPCR reakcije.

Sekvenca	r^2	izkoristek (%)
16S rRNA sekvenca arhej	-3,6	89
16S rRNA sekvenca bakterij	-3,1	110
16S rRNA sekvenca gliv	-3,6	89

3.5 ENCIMSKI TESTI

V vzorcih tal smo določali aktivnost encimov vključenih v cikel C (β -glukozidaza, β -glukuronidaza, ksilanaza), cikel N (hitinaza) in cikel P (fosfataza) (Pregl. 9). Uporabili smo metodo avtorjev Marx in sod. (2001) in Pritsch in sod. (2011), ki je primerna za pH tal nad 6. Metoda temelji na cepitvi vezi med za encim specifičnim substratom in fluorescirajočo molekulo, v našem primeru 4-metilumbeliferon (4-MU). Encim sproži cepitev vezi, pri čemer se sproži močan fluorescirajoč signal, ki ga odčita detektor. Intenzivnost signala je

premo sorazmerna s količino cepljenih vezi med substratom in fluorescirajočo molekulo. Moč fluorescence je odvisna od pH-ja. Za 4-MU je optimalno območje pH med 6 in 9.

Preglednica 9: Seznam encimov, substratov uporabljenih pri meritvah, substratov, ki jih encimi v naravi cepijo ter organizmi, ki posamezni encim sintetizirajo.

Encim	Substrat (encimski test)	Substrat (v naravi)	Izvor
Fosfataza	MU-fosfat	organski fosfat	vsi organizmi
β -glukozidaza	MU-glukozid	škrob	vsi organizmi
β -glukuronidaza	MU-glukoronid	pektin	vsi organizmi
Hitinaza	MU-N-acetilglukozamid	hitin	glive
Ksilanaza	MU-ksilozid	ksilan	mikroorganizmi

Ustrezno koncentracijo substrata (Sigma Aldrich Chemicals, Francija) in čas inkubacije smo določili na osnovi testiranja vzorcev z različnimi koncentracijami substrata in časom inkubacije. Primerno koncentracijo substrata in čas inkubacije smo določili pri prehodu iz eksponentne v stacionarno fazo (Pregl. 10).

Preglednica 10: V preglednici so zbrane koncentracije substrata in čas inkubacije za posamezni encim, ki smo jih določili na osnovi rezultatov predtestov.

Substrat	Koncentracija substrata (μ M)	Čas inkubacije (min)
MU-fosfat	400	45
MU-glukozid	400	60
MU-glukoronid	600	60
MU-N-acetilglukozamid	600	120
MU-ksilopiranozid	600	60

Globoko zamrznjene ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Haierus, Kitajska) vzorce tal smo en teden klimatizirali na $14\text{ }^{\circ}\text{C}$. S tem smo se najbolj približali realnemu stanju in s tem temperaturi svežih tal, ki je za encimsko analizo najprimernejša (neobjavljeni rezultati Helmholtz Institut, Department für Ökologie und Lehrstuhl für Bodenökologie). Po enem tednu smo 400 mg tal prelili s 40 ml MQ vode in jih resuspendirali s stresanjem za 15 min. Vzorce smo prenesli v ohlajeno kopel in stresali z impulzi (VWR, ZDA) 3 min. Nato smo suspenzijo tal pipetirali ($50\text{ }\mu\text{l}$) v mikrotitersko ploščo (Nunc Life Science, Danska), dodali $100\text{ }\mu\text{l}$ substrata, plošče prenesli v temnico ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$) in jih na stresalniku (Dynatech, Nemčija) inkubirali (Pregl. 10). Po koncu inkubacije smo na vzorce odpipetirali $100\text{ }\mu\text{l}$ tris pufra ($1,25\text{ M}$, $\text{pH} > 10$) ter s tem prekinili reakcijo. Mikrotiterske plošče smo centrifugirali (5 min, $2420 \times g$ na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in izmerili fluorescenco ($\lambda_{\text{ex}} 365\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} 445\text{ nm}$) (Molecular Devices, ZDA).

Umeritveno krivuljo smo pripravili s fluorescenčnim substratom 4-MU (Sigma Aldrich Chemicals, Francija). $50\text{ }\mu\text{l}$ substrata v koncentracijah (0, 100, 200, 300, 400, in $500\text{ pmol}/100\text{ }\mu\text{L}$) in $50\text{ }\mu\text{l}$ vzorca tal (vsa obravnavanja) in $100\text{ }\mu\text{L}$ tris pufra smo odpipetirali v mikrotitersko ploščo in pomerili fluorescenco. Iz dobljenih vrednosti smo narisali grafe

linearne odvisnosti med koncentracijo substrata in fluorescenco ter na osnovi enačbe ($y = nx$) izračunali koncentracijo posameznega encima v vzorcu tal.

Koncentracijo encima v vzorcih tal smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$X1 = \text{izmerjena vrednost signala-avtofluorescenca 4-MU} / 0,4 \text{ mg suha masa tal} \quad \dots(4)$$

$$y = n \cdot x \text{ (umeritvena krivulja za 4-MU)} \quad \dots(5)$$

$$X2 = 1/n \cdot X1 \quad \dots(6)$$

$$X3 = X2/t \quad \dots(7)$$

$X1$ [emisija fluorescence mg^{-1}]

n [naklon premice umeritvene krivulje]

$X2$ [$\text{pmol MU mg tal}^{-1}$]

$X3$ [$\text{pmol MU mg tal}^{-1}\text{min}^{-1}$]

3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

V šeststopenjski sekvenčni reakciji določanja kovin Zn in Cd smo obravnavali 18 enot vzorčenja (štiri ponovitve za obravnavanja FO, FO+TK10 ter FO+TK100, obravnavanji NPK in FO+TK1000 smo pripravili v treh ponovitvah). V vse ostale teste smo vključili 5 obravnavanj v 4 ponovitvah, razlikuje se le število tehničnih ponovitev – enot vzorčenja. Tako smo v analizi DON in DOC obravnavali 60 enot vzorčenja, za mineralne oblike N pa 20. V merjenje encimske aktivnosti smo vključili največ 80 enot vzorčenja; 4 enote vzorčenja za vsako ponovitev oz. ne manj kot tri v primeru, da je bila razlika med tehničnimi ponovitvami velika. V določanje števila kopij 16S rRNA arhej in 16S rRNA bakterij smo vključili 60 enot vzorčenja, v analizo 18S rRNA gliv pa 40, pri analizi klastra za arheje, bakterije in glive smo obravnavali 20 enot vzorčenja.

Podatki so statistično obdelani s programoma R (R Core Team, 2013) in Excel. Izračunali smo geometrijsko sredino in standardne napake izmerjenih vrednosti koncentracije šeststopenjske sekvenčne reakcije preučevanih kovin (Zn in Cd) znotraj posameznega obravnavanja. Z analizo variance za poskusno zasnovo slučajne skupine (ANOVA) smo preverili, če med obravnavanji prihaja do statističnih razlik med povprečji izmerjenih vrednosti za šeststopenjsko sekvenčno reakcijo, skupno vsebnost Zn in Cd, DON, DOC mineralne oblike N, qPCR, T-RF in encime. Če je analiza variance pokazala statistično značilnost med obravnavanji, smo analizo nadaljevali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav pri stopnji značilnosti 0,05. Za spremenljivke, pri katerih predpostavka analize

variance o enakosti varianc po obravnavanjih ni bila izpolnjena, smo uporabili neparametrično Kruskal-Wallisovo analizo variance in test mnogoterih primerjav za mediane. Homogenost varianc smo preverili z Levenovim testom.

S programsko opremo GeneMapper smo analizirali T-RFLP signale na grafih, ki jih je odčital sekvenator. Najprej smo preverili, če so vsi vzorci znotraj velikostnega razreda izbranega standarda (MapMarker 1000), če vrhovi izrisanih grafov na ordinatni osi ne presegajo vrednost 30.000 ter če so signali na grafih modre ali rdeče barve. V primeru, da kateri od teh pogojev ni izpolnjen je bilo potrebno ponoviti T-RFLP. V naslednjem koraku smo združili poskusne enote posameznega obravnavanja v skupine, sovpadajoče vrhove pa poravnali. Tako pridobljene podatke smo prenesli v Excel tabelo in jih analizirali s programom T-REX (T-RFLP analysis expedited) (Culman in sod., 2008). Pravilno oblikovano datoteko smo naložili in obdelali podatke: filtrirali smo ozadje, odstranili vse terminalne restrikcijske fragmente (T-RF) krajše od 50 bp in jih poravnali. Na koncu program izdela matriko, v kateri je za vsako poskusno enoto izpisana višina vrha (če je leta prisoten) za različne velikostni fragmentov DNA (v baznih parih). Z analizo razvrščanja v skupine smo na podlagi te matrike ugotavljali, ali se kažejo razlike v DNA med različnimi obravnavanji. Matrike smo grafično predstavili z dvorazsežnim dendrogramom.

4 REZULTATI

Cilj magistrskega dela je bil določiti vpliv kovin Zn in Cd iz fermentacijskega ostanka (FO) izbrane bioplinarne na sestavo, številčnost in aktivnost mikrobnih združb v tleh. V ta namen smo poleg enkratnega odmerka FO vzorcem tal dodali FO z naraščajočima koncentracijama Zn in Cd (10-, 100- in 1000-krat povečane vsebnosti kot so v FO). Za kontrolo smo uporabili obravnavanje z mineralnim gnojilom NPK. Lastnosti tal, ki predhodno niso bila tretirana s FO ali drugimi antropogenimi viri PTK, so predstavljene v preglednici 11, lastnosti FO pa v preglednici 12. Vsebnost PTK (Zn in Cd) v mineralnem gnojilu NPK je bila pod detekcijsko mejo.

Preglednica 11: Osnovne značilnosti tal uporabljenih v lončnem poskusu.

Parameter	Izmerjena vrednost
Kemične lastnosti tal	
pH	6,1
Organska snov (%)	2,4
CEC (mmol _c /100 g tal)	14,1
C (%)	1,4
N (%)	0,2
C/N	7
Rastlini dostopni P (g P ₂ O ₅ /kg ss)	0,08
Rastlini dostopni K (g K ₂ O/kg ss)	0,24
Zn (mg/kg)	87,7
Cd (mg/kg)	0,57
Fizikalne lastnosti tal	
Tekstura tal	Meljasta ilovica
Pesek (%)	2,1
Glina (%)	23,9
Grobi melj (%)	23
Fini melj (%)	51

Preglednica 12: Sestava fermentacijanskega ostanka.

Parameter	Izmerjena vrednost
Suha snov (%)	6
Pepel (% v ss)	29,30
Organska snov (% v ss)	70,70
pH	7,7
Skupni N (g/kg ss)	103
Rastlini dostopni P (g P ₂ O ₅ /kg ss)	15
Rastlini dostopni K (g K ₂ O/kg ss)	34
Cd (mg/kg ss)	1,2
Zn (mg/kg ss)	190

4.1 VPLIV FO NA LAŽJE DOSTOPNE OBLIKE C IN N V TLEH

Tri mesece po dodatku FO tlem je bila povprečna vsebnost topnega organskega ogljika (DOC), topnega organskega dušika (DON), ter mineralnih oblik dušika (NH₄⁺ in NO₃⁻)

enaka v kontrolnih tleh (NPK) in tleh z dodatkom FO (Pregl. 13). Zanimivo pa smo določili značilno večje povprečne koncentracije DOC in DON v obravnavanju s 1000-kratno povečano vsebnostjo PTK kot sta v izvornem FO (Pregl. 13). Analiza variance je pokazala, da je povprečna koncentracija DOC v obravnavanju FO+TK1000 značilno večja od ostalih obravnavanj, kljub veliki standardni napaki. Na tako veliko standardno napako vpliva bistveno večja koncentracija v enem vzorcu tal in sicer v vseh treh tehničnih ponovitvah. Analiza variance za DON je prav tako pokazala, značilno večjo povprečno koncentracijo v obravnavanju FO+TK1000 kot v ostalih obravnavanjih (NPK, FO+10TK in FO+100TK).

Preglednica 13: DOC, DON, NH_4^+ in NO_3^- v tleh po obravnavanjih na globini tal 0-2 cm: tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je bila v izvornem FO. Prikazana so povprečja in standardne napake. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$).

	Povprečje DOC ($\mu\text{g/g tal}$)			Povprečje DON ($\mu\text{g/g tal}$)			Povprečje NH_4^+ ($\mu\text{g/g tal}$)			Povprečje NO_3^- ($\mu\text{g/g tal}$)		
NPK	103,1 $\pm$ 0,8	b		15,9 $\pm$ 0,3	b		0,2 $\pm$ 0,0	a		1,1 $\pm$ 0,1	a	
FO	108,6 $\pm$ 2,3	b		19,0 $\pm$ 2,4	a,b		1,8 $\pm$ 1,4	a		1,2 $\pm$ 0,6	a	
FO+10TK	94,1 $\pm$ 2,1	b		15,9 $\pm$ 0,3	b		1,3 $\pm$ 1,9	a		1,0 $\pm$ 0,1	a	
FO+100TK	104,2 $\pm$ 1,6	b		17,4 $\pm$ 1,2	b		1,4 $\pm$ 1,0	a		1,2 $\pm$ 0,3	a	
FO+1000TK	131,1 $\pm$ 7,2	a		23,3 $\pm$ 2,1	a		0,6 $\pm$ 0,4	a		1,5 $\pm$ 0,4	a	

4.2 VPLIV FO NA SKUPNO VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN V TLEH

Tri mesece po dodatku FO tlem je bila povprečna vsebnost Zn in Cd enaka v kontrolnih tleh (NPK) in tleh z dodatkom FO (Pregl. 14). Skupna vsebnost Zn v tleh je bila značilno večja po dodatku FO s 100- in 1000-krat povečano vsebnostjo Zn. Skupna vsebnost Cd v tleh pa je bila značilno večja le v obravnavanju FO s 1000-krat povečano vsebnostjo Cd. Povprečne skupne vsebnosti Cd in Zn v tleh niso presegle mejne imisijske vrednosti obeh kovin, t.j. 1 mg/kg za Cd in 200 mg/kg za Zn, razen v obravnavanju FO s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK, kjer v obeh primerih preseže opozorilno vrednost, ne pa tudi kritične (Pregl. 1 in 14).

Preglednica 14: Skupna vsebnost Cd in Zn po obravnavanjih na globini tal 0-2 cm: tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je bila v izvornem FO. Prikazana so povprečja in standardne napake. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$).

Obravnavanje	Cd (mg/kg)		Zn (mg/kg)	
NPK	0,5 $\pm$ 0,1	a	86,5 $\pm$ 18,4	a
FO	0,6 $\pm$ 0,0	a	78,5 $\pm$ 5,6	a
FO+10TK	0,6 $\pm$ 0,0	a	85,1 $\pm$ 8,1	a
FO+100TK	0,7 $\pm$ 0,0	a	133,1 $\pm$ 8,6	b
FO+1000TK	4,3 $\pm$ 0,5	b	614,6 $\pm$ 53,1	c

Ker skupna vsebnost PTK ni najboljši pokazatelj strupenosti preučevanih kovin mikroorganizmom, smo s 6-stopenjsko sekvenčno reakcijo ocenili njihovo (bio)dostopnost. Glede na poročanje avtorjev (Tessier in sod., 1979) sekvenčne reakcije, sta prvi dve frakciji lahko biodostopni, mobilnost naslednjih dveh pa je močno odvisna od pogojev v tleh. Rezultati kažejo, da enkratni odmerek FO ni povečal povprečne koncentracije preučevanih kovin v nobeni od frakcij sekvenčne reakcije. Prav tako dodatek kovin v 10-, 100- in 1000-krat povečani vsebnosti kot je v FO, ni značilno spremenil biodostopnosti Cd. Značilno se je povečala biodostopnost Zn in sicer le v obravnavanju z 1000-krat povečano vsebnostjo kovin. V tretji in četrti frakciji, ki veljata za manj mobilni, smo izmerili značilno večjo povprečno koncentracijo Zn in Cd v obravnavanju s 100- in 1000-krat povečano vsebnostjo kovin (Pregl. 15 in 16).

Preglednica 15: Povprečne koncentracije Cd v 6-stopenjski sekvenčni reakciji po obravnavanjih na globini tal 0-2 cm: tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Prikazana so povprečja (mg/kg) in standardne napake. Vrednosti s pisavo krepko označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Meja detekcije je 0,07 mg Cd/kg.

Obravnavanje	Cd-1.f	Cd-2.f	Cd-3.f	Cd-4.f	Cd-5.f	Cd-6.f
NPK	0	0	0	0,2±0,17	0,1±0,1	0
FO	0	0	0	0,1±0,1	0,1±0,1	0
FO+10TK	0,1±0,01	0	0	0,2±0,2	0,2±0,1	0
FO+100TK	0,1±0,01	0	0,1±0,02	0,2±0,05	0,4±0,1	0
FO+1000TK	0,1±0,01	0	0,5±0,07	0,6±0,05	2,7±0,2	0

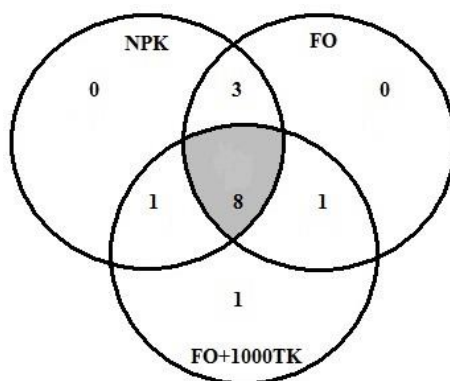
Preglednica 16: Povprečne koncentracije Zn v 6-stopenjski sekvenčni reakciji po obravnavanjih na globini tal 0-2 cm: tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Prikazana so povprečja (mg/kg) in standardne napake. Vrednosti s pisavo krepko označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Meja detekcije je 0,01 mg Zn/kg.

Obravnavanje	Zn-1.f	Zn-2.f	Zn-3.f	Zn-4.f	Zn-5.f	Zn-6.f
NPK	0	0	1,2±0,3	2,3±1,7	6,2±0,6	76,2 ±4,9
FO	0	0	0,9±0,1	1,9±0,8	6,3±0,4	68,7±1,7
FO+10TK	0	0	1,2±0,1	3,5±1,7	10,3±0,9	73,0±3,5
FO+100TK	0	0,3±0,1	5,2±0,8	11,8±5,2	33,6±5,8	83,4±5,3
FO+1000TK	0,3±0,05	3,1±0,6	70,8±8,8	94,±4,2	305,2±199	153,0±83

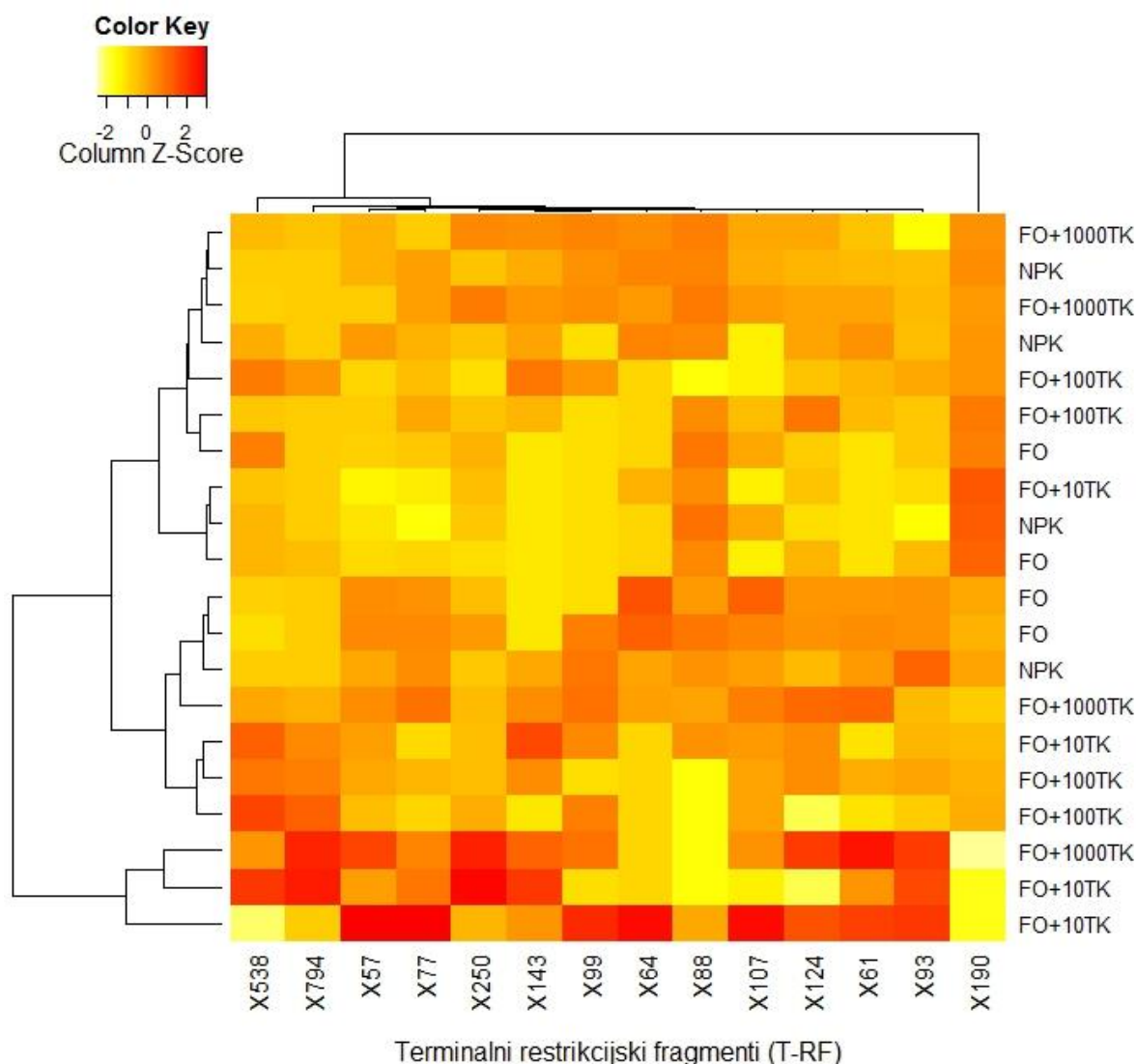
4.3 VPLIV FO NA STRUKTURO TALNIH MIKROBNIH ZDRUŽB

Tri mesece po nanosu dodatkov tlem (NPK, FO, FO+10TK, FO+100TK, FO+1000TK) smo ugotovili največji odziv na povečane koncentracije kovin v FO pri bakterijah, sledijo arheje in glive z manjšimi razlikami v strukturi (Slika 3, 5, 7). Enkratni odmerek FO tlem ne vpliva na strukturo arhej, bakterij in gliv v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem (NPK).

Določili smo 14 T-RF arhej. Dvorazsežni dendrogram arhej ne kaže očitnih razlik med obravnavanji (Slika 3). Obravnavanja s 100- in 1000-krat povečano vsebnostjo kovin se združijo, vendar to ne velja za vse ponovitve. Na dendrogramu se tudi združijo 3 ponovitve obravnavanja z dodanim FO. Analiza posameznih T-RF kaže manjše spremembe v pojavnosti in intenziteti merjenih signalov (Slika 2, 3). T-RF 538 je prisoten v vseh obravnavanjih. T-RF 250 kaže povezanost s kovinami, saj se značilno zviša intenziteta merjenega signala v obravnavanjih s 10- in 1000-krat povečano vsebnostjo Zn in Cd. Nasprotno pa intenziteta T-RF 88 in 190 z naraščajočo koncentracijo kovin pada in je v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK značilno nižja. T-RF 143 v obravnavanju z enkratnim odmerkom FO ni prisoten.



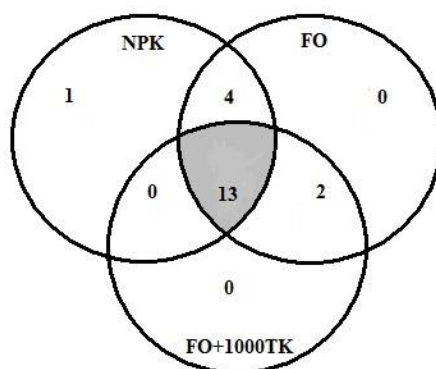
Slika 2: Presečni prikaz 14-dominantnih T-RF arhej na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji. V primerjavo smo vključili tri obravnavanja, ki se med seboj statistično značilno najbolj razlikujejo; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK (NPK), tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Za prisotnost posameznega T-RF smo upoštevali statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$) ter pojavnost signala v vseh 4 ponovitvah posameznega obravnavanja.



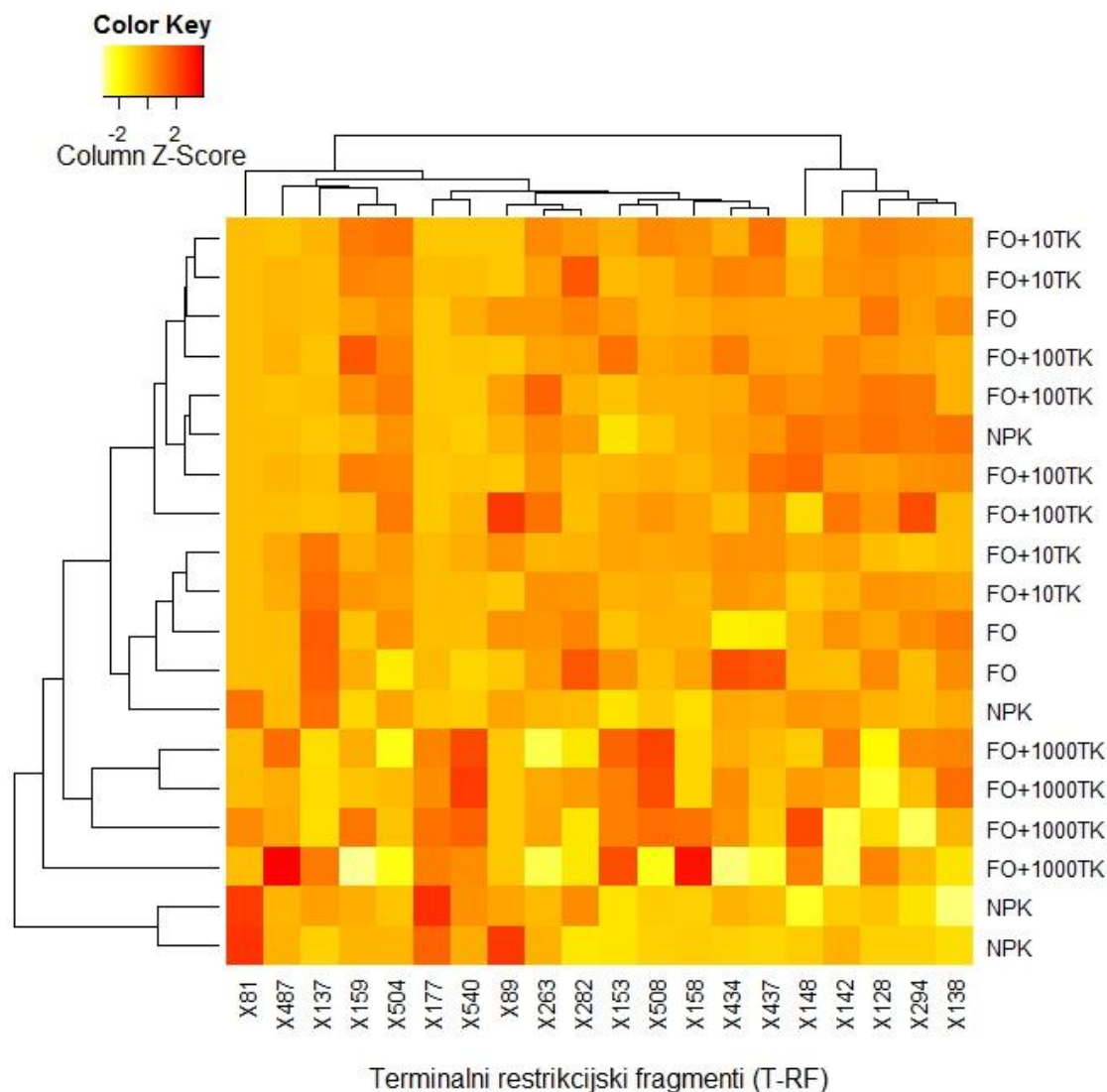
Slika 3: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 14-tih dominantnih T-RF fragmentov arhej v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-2 cm. V študijo je vključenih pet obravnavanj; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v FO. Podobnost med ponovitvami je določena z Bray-Curtis matriko. Relativne vrednosti fragmentov so opredeljene z barvno lestvico (Color Key), ki je pojasnjena z legendo na vrhu slike.

Določili smo 20 T-RF bakterij. Dendrogram bakterij (Slika 5) kaže, da se vse ponovitve s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v FO zvrstijo v eno vejo in se ločijo od ostalih obravnavanj. Podobno se združijo tudi ponovitve z 10- in 100-krat povečano vsebnostjo kovin, z vrinjeno ponovitvijo obravnavanja NPK in FO. Analiza posameznih T-RF kaže spremembe v pojavnosti in intenziteti merjenih signalov (Slika 4, 5). T-RF 153 kaže povezanost s FO in kovinami, saj ni prisotev v kontrolnem obravnavanju NPK, T-RF 81 pa ima izrazito močan signal samo v kontrolnem obravnavanju, nato smo značilno nižji signal določili še v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin, v ostalih obravnavanjih tega T-RF nismo izmerili. Intenzivnost T-RF 128, 142, 294 in 504 v odvisnosti od

naraščajoče koncentracije PTK pada, kar lahko nakazuje povezanost z bakterijskimi združbami občutljivimi na povišane koncentracije kovin. Tem T-RF smo določili značilno nižji signal v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin kot je v FO, v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem NPK.

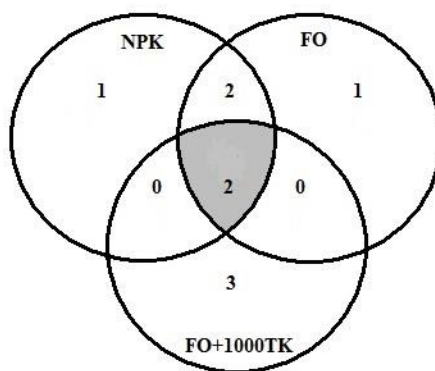


Slika 4: Presečni prikaz 20-dominantnih T-RF bakterij na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji. V primerjavo smo vključili tri obravnavanja, ki se med seboj statistično značilno najbolj razlikujejo; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK (NPK), tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Za prisotnost posameznega T-RF smo upoštevali statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$) ter pojavnost signala v vseh 4 ponovitvah posameznega obravnavanja.

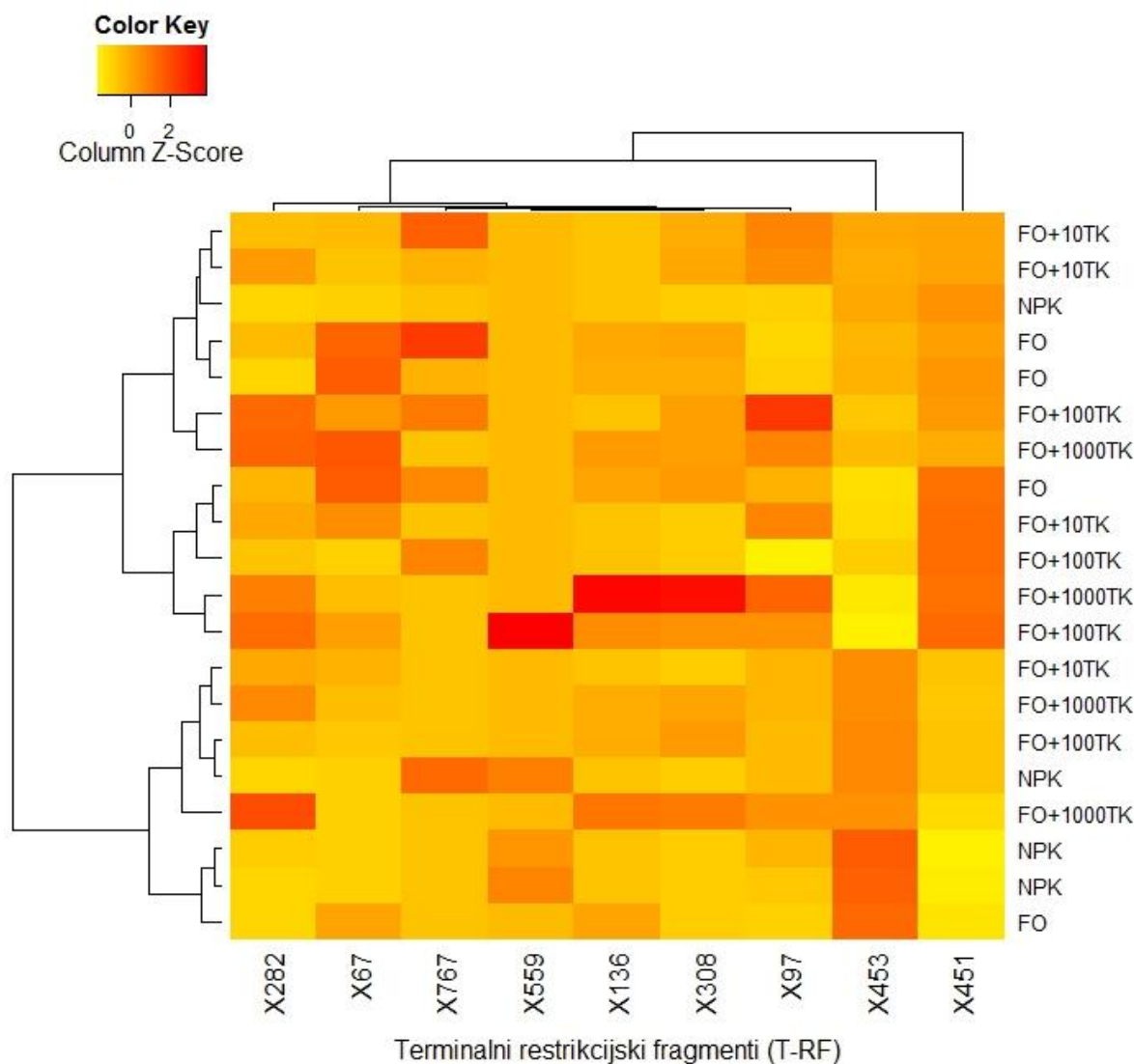


Slika 5: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 20-tih dominantnih T-RF fragmentov bakterij v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-2 cm. V študijo je vključenih pet obravnavanj; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo TK kot je v izvornem FO. Podobnost med ponovitvami je določena z Bray-Curtis matriko. Relativne vrednosti fragmentov so opredeljene z barvno lestvico (Color Key), ki je pojasnjena z legendo na vrhu slike.

Določili smo 9 T-RF gliv. Velika podobnost med obravnavanji kaže, da enkratni odmerki FO in povišane koncentracije kovin (10-, 100-, 1000-krat) nimajo očitnega vpliva na združbo gliv (Slika 7). Osem ponovitev z dodanimi kovinami se združi tesno skupaj. Analiza posameznih T-RF kaže manjše spremembe v pojavnosti in intenziteti merjenih signalov (Slika 6, 7). T-RF 451 in 453 imata zelo močan signal v vseh obravnavanjih. T-RF 67, 136 in 308 se ne pojavijo v obravnavanju NPK, T-RF 559 pa samo v tem obravnavanju. Intenzivnost signala 67 je značilno višja v obravnavanju FO. Intenzivnost signalov T-RF 97, 136, 282 in 308 narašča s koncentracijo kovin, v obravnavanjih brez dodanih kovin pa je signal nizek. Ti T-RF lahko nakazujejo na povezanost z glivnimi združbami manj občutljivimi na povišane koncentracije kovin. Pri teh T-RF smo določili značilno višji signal v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin, pri T-RF 282 pa tudi v obravnavanju s 100-krat povečano vsebnostjo kovin.



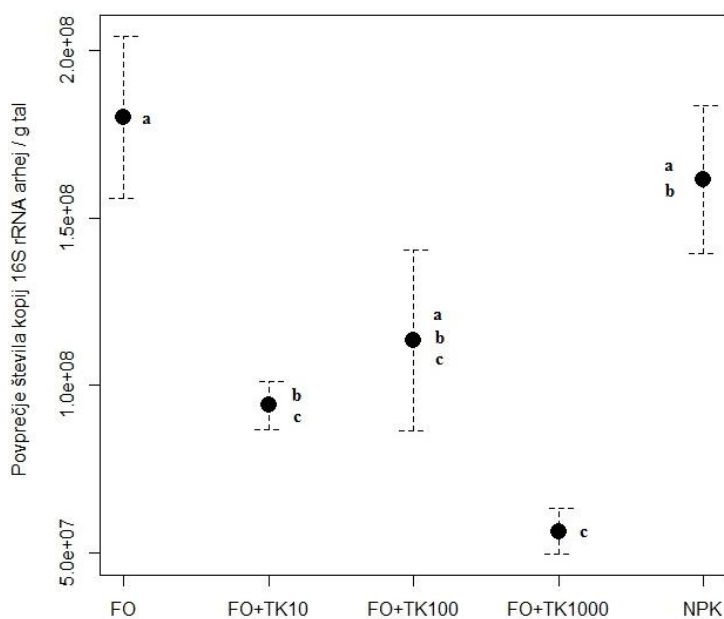
Slika 6: rešeni prikaz 9-dominantnih T-RF gliv na osnovi njihove značilne razlike in pojavnosti med obravnavanji. V primerjavo smo vključili tri obravnavanja, ki se med seboj statistično značilno najbolj razlikujejo; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK (NPK), tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Za prisotnost posameznega T-RF smo upoštevali statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$) ter pojavnost signala v vseh 4 ponovitvah posameznega obravnavanja.



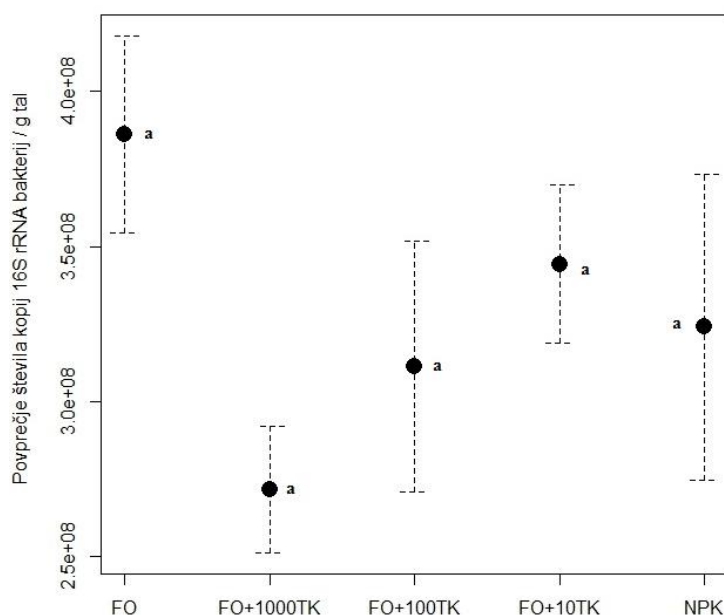
Slika 7: Dvorazsežni dendrogram je podan na osnovi relativne prisotnosti 9-tih dominantnih T-RF fragmentov gliv v odvisnosti od obravnavanj, na globini tal 0-2 cm. V študijo je vključenih pet obravnavanj; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Podobnost med ponovitvami je določena z Bray-Curtis matriko. Relativne vrednosti fragmentov so opredeljene z barvno lestvico (Color Key), ki je pojasnjena z legendo na vrhu slike.

4.4 VPLIV FO NA ŠTEVILČNOST MIKROBNIH ZDRUŽB

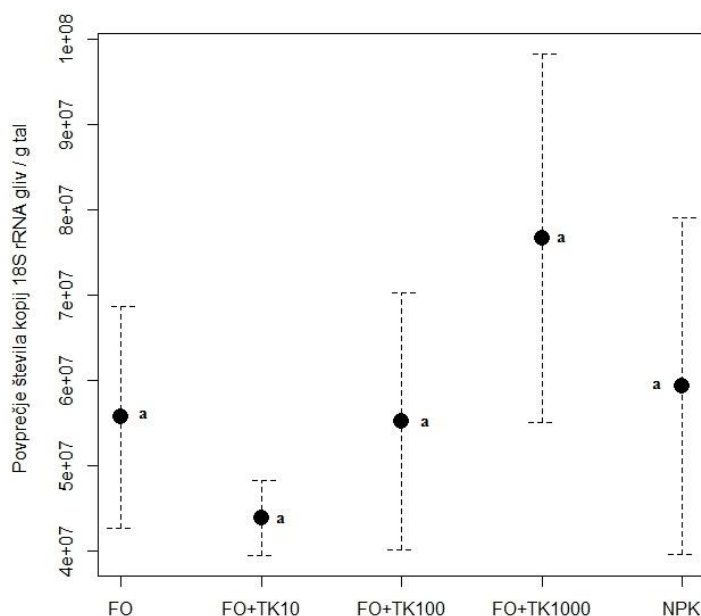
FO ni vplival na povprečno številčnost preučevanih mikrobnih združb v tleh tri mesece po nanosu (Slika 8, 9, 10), prav tako ni imel vpliva FO z do 100-krat povečano vsebnostjo kovin. Medtem, ko je 1000-krat povečana vsebnost kovin v FO negativno vplivala na številčnost arhej, značilnih razlik pri bakterijah in glivah nismo zaznali (Slika 8, 9, 10).



Slika 8: Povprečno število kopij 16S rRNA arhej po obravnavanjih ob koncu poskusa. Prikazana so povprečja s standardno napako. V študijo je vključenih pet obravnavanj, na globini tal 0-2 cm; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvirnem FO. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Izhodišče grafa se ne začne iz 0.



Slika 9: Povprečno število kopij 16S rRNA bakterij po obravnavanjih ob koncu poskusa. Prikazana so povprečja s standardno napako. V študijo je vključenih pet obravnavanj na globini tal 0-2 cm; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Izhodišče grafa se ne začne iz 0.



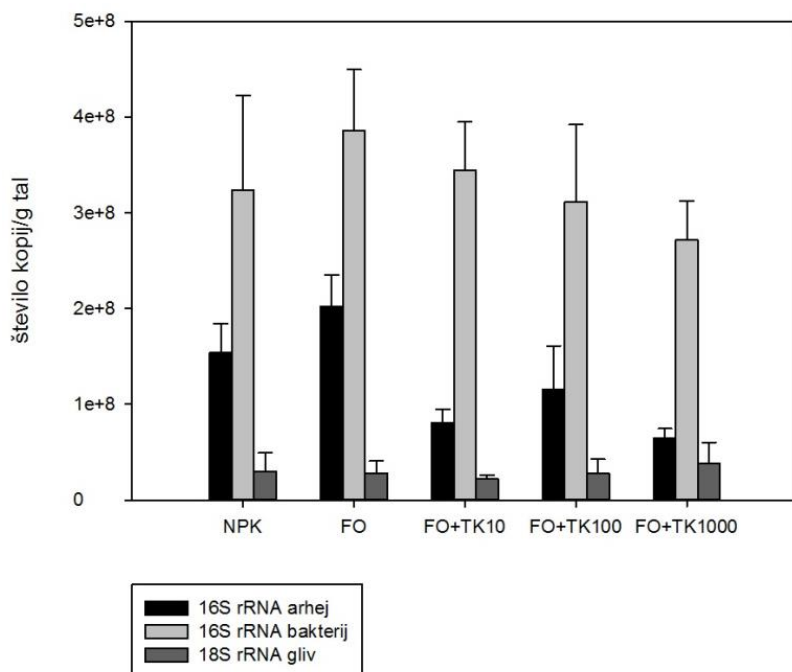
Slika 10: Povprečno število kopij 18S rRNA gliv po obravnavanjih ob koncu poskusa. Prikazana so povprečja s standardno napako. V študijo je vključenih pet obravnavanj na globini tal 0-2 cm; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Izhodišče grafa se ne začne iz 0.

V Pregl. 17 so predstavljene povprečne vrednosti in standardne napake števila kopij 16S rRNA arhej in bakterij ter 18S rRNA gliv. Različne črke predstavljajo značilne razlike med obnavljanji.

Preglednica 17: Povprečno število kopij 16S rRNA arhej in bakterij in 18S rRNA gliv po obravnavanjih na globini tal 0-2 cm: tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Prikazana so povprečja (število kopij/g tal) in standardne napake. Vrednosti z različnimi črkami označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$).

Obravnavanje	16S rRNA arhej (št. kopij/g tal)		16S rRNA bakterij (št. kopij/g tal)		18S rRNA gliv (št. kopij/g tal)	
NPK	$1,6 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	a	$3,2 \cdot 10^8 \pm 2,6 \cdot 10^7$	a	$6,0 \cdot 10^7 \pm 1,3 \cdot 10^7$	a
FO	$1,7 \cdot 10^8 \pm 2,0 \cdot 10^7$	a	$3,8 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	a	$5,6 \cdot 10^7 \pm 8,8 \cdot 10^6$	a
FO+10TK	$9,4 \cdot 10^7 \pm 7,3 \cdot 10^7$	b,c	$3,4 \cdot 10^8 \pm 1,4 \cdot 10^7$	a	$4,3 \cdot 10^7 \pm 2,9 \cdot 10^6$	a
FO+100TK	$1,2 \cdot 10^8 \pm 1,6 \cdot 10^7$	a,b	$3,1 \cdot 10^8 \pm 2,1 \cdot 10^7$	a	$5,5 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^7$	a
FO+1000TK	$5,5 \cdot 10^7 \pm 6,0 \cdot 10^6$	c	$2,7 \cdot 10^8 \pm 1,2 \cdot 10^7$	a	$7,7 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$	a

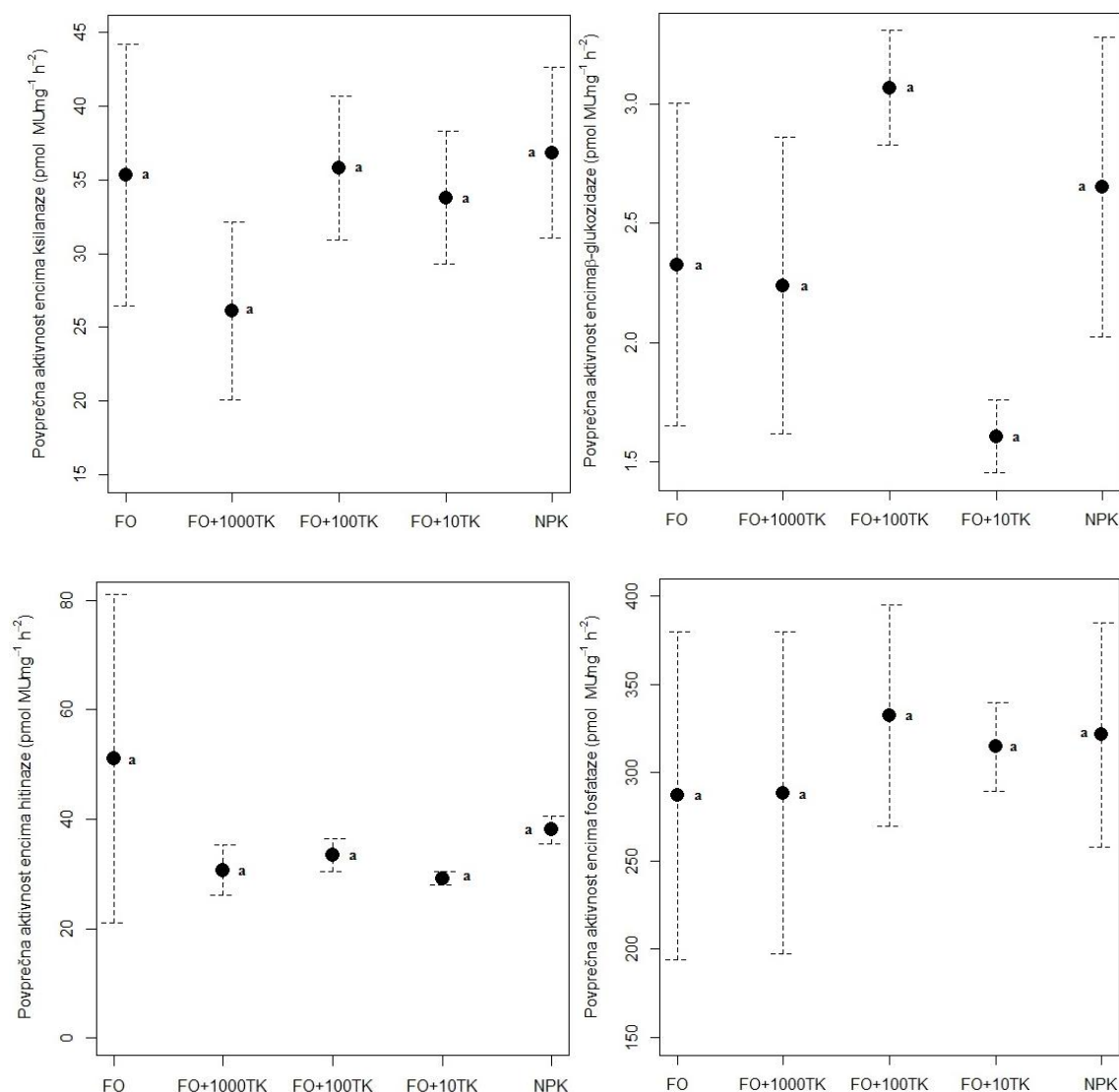
Slika 11 prikazuje primerjavo povprečnega števila kopij genov med arhejami, bakterijami in glivami. V tleh so številčno najbolj zastopane bakterije, sledijo arheje in glive.



Slika 11: Primerjava povprečne številčnosti genov 16S rRNA arhej, 16S rRNA bakterij in 18S rRNA gliv. Prikazana so povprečja s standardno napako. V študijo je vključenih pet obravnavanj; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO.

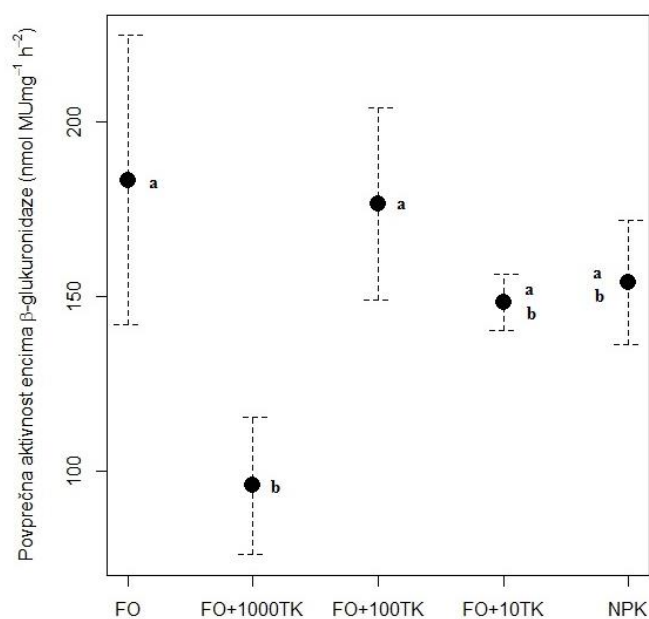
4.4 VPLIV FO NA ENCIMSKO AKTIVNOST

Tri mesece po dodatku FO tlem je bila povprečna aktivnost encimov enaka v kontrolnih tleh (NPK) in tleh z dodatkom FO (Slika 12, 13). Negativnega vpliva kovin na povprečno aktivnost encimov ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza nismo določili (Slika 12). 1000-krat povečana vsebnost kovin v FO je značilno negativno vplivala le na povprečno aktivnost encima β -glukuronidaza (Slika 13).



Slika 12: Povprečna izmerjena aktivnost encimov ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza po obravnavanjih ob koncu poskusa. V študijo je vključenih pet obravnavanj na globini tal 0-2 cm; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Prikazana so povprečja in standardne napake. Različne črke označujejo statistične razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Izhodišče vseh grafov se ne začne iz 0.

Povprečna aktivnost encima β -glukuronidaza v obravnavanju FO+TK1000 je značilno nižja kot v obravnavanjih FO in FO+10TK (Slika 13).



Slika 13: Povprečna aktivnost encima β -glukuronidaze po obravnavanjih ob koncu poskusa. V študijo je vključenih pet obravnavanj na globini tal 0-2 cm; tla z dodanim mineralnim gnojilom NPK, tla z dodanim fermentacijskim ostankom (FO) iz bioplinarne ter tla s FO z 10-, 100- oz. 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v izvornem FO. Prikazana so povprečja in standardne napake. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji po Duncanovem testu ($p < 0,05$). Izhodišče grafa se ne začne iz 0.

5 RAZPRAVA

Evropska komisija si je zadala cilj povečanja proizvodnje energije iz obnovljivih virov na 20 % do leta 2020, v primerjavi z letom 2005, ko je proizvodnja dosegala 8,5 % (EREC, 2008). V Sloveniji smo v zadnjem letu sicer beležili rahel padec v pridobivanju bioplina, ki trenutno predstavlja 3,1 % energije pridobljene iz obnovljivih virov (ARSO, 2014). Skladno bo s porastom pridobivanja bioplina naraščal stranski produkt – fermentacijski ostanek. Zaradi bogate organske sestave in hranil je FO potencialno primeren kot sredstvo za gnojenje. Vendar FO vsebuje tudi potencialno toksične kovine, ki imajo lahko v presežnih koncentracijah negativni vpliv na talni ekosistem (Giller in sod., 1998). V našo študijo smo poleg obravnavanja z izvornim FO vključili tudi obravnavanja z eksperimentalno povečano vsebnostjo kovin v FO, in sicer v koncentracijskem gradientu 10-, 100- in 1000- krat povečanih vsebnosti Zn in Cd v primerjavi z izvornim FO (1,2 mg Cd/kg in 190 mg Zn/kg ss FO). Po treh mesecih smo ovrednotili vpliv FO in kovin na številčnost, pestrost in encimsko aktivnost mikrobnih združb arhej, bakterij in gliv v tleh.

Rezultati kažejo, da enkratni maksimalno dovoljeni odmerek FO (170 kg N/kg), določen glede na količino dodanega N tlem, ni spremenil skupne vsebnosti Zn in Cd v tleh (Pregl. 14), se je pa njuna vsebnost značilno povečala v obravnavanjih s 100-krat (Zn) in 1000-krat eksperimentalno povečano vsebnostjo kovin (Cd in Zn) kot je v bila v izvornem FO. V obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin, skupna vsebnost obeh preučevanih kovin doseže zakonsko določeno opozorilno vrednost, ne pa tudi kritične. Rezultati naše študije so skladni z določili Uredbe o imisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh (Uredba o mejnih ..., 1996), saj smo le v obravnavanju FO+1000TK, kjer vsebnost Zn in Cd doseže zakonsko določeno opozorilno vrednost, izmerili negativni vpliv na merjene mikrobne parametre. Rezultati prav tako kažejo, da uporaba FO v zakonsko določenem maksimalno dovoljenem odmerku, kot tudi z 10- in 100-krat povečano vsebnostjo kovin, ne preseže zakonsko določene mejne vrednosti za posamezno kovino.

Avtorji poročajo (Giller in sod., 1998; Kashem in sod., 2007), da skupna koncentracija kovin ni najprimernejši parameter za ocenjevanje vpliva na mikroorganizme, saj je večina kovin v tleh vezanih na minerale in na organsko snov in so tako mikroorganizmom nedostopni. Zato je primernejši parameter za ocenjevanja vpliva na mikroorganizme njihova biodostopnost. Skupina Tessier in sod. (1979) je določila prvi dve frakciji sekvenčne reakcije kot najbolj mobilni in s tem biološko dostopni. V naši študiji smo 3 mesece po dodajanju FO določili značilno večjo biodostopno koncentracijo Zn (3,4 mg/kg; Pregl.16) v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK, pri Cd pa značilnih razlik v biodostopnih frakcijah med obravnavanji ni bilo. Kot so že poročali Tessier in sod. (1979), biodostopni frakciji PTK v naši študiji predstavljata majhen delež skupne koncentracije posamezne kovine, in sicer 2,3 % skupne koncentracije Cd in 0,5 % skupne koncentracije Zn.

Naši rezultati kažejo, da so bile 3 mesece po dodajanju FO, kovine že dobro vezane, saj so se značilno povečale biološko manj dostopne oblike Cd in Zn (3-, 4-, 5-frakcija za Cd in Zn 6-frakcija za Zn). Kar je skladno z rezultati Suhadolc (2003), ki poroča, da so 3 mesece po dodatku topnih oblik kovin vzorcem tal, le-te že močno vezane in je posledično njihova biodostopnost manjša, kot na začetku poskusa. Tudi avtorja Walter in Cuevas (1999) poročata, da so se biološko manj dostopne oblike Zn iz 15 % v kontrolnem obravnavanju povečale na do 60 % v obravnavanjih z večletnim dodajanjem blata iz čistilnih naprav. Enako so zaključili za kovino Cd, kjer so lažje dostopne oblike pod mejo detekcije, večino te kovine pa so izmerili v biološko nedostopni obliki (55 %).

Rezultati naše študije so pokazali jasno spremembo v strukturi bakterij (Slika 5) v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin, saj se ponovitve zvrstijo skupaj in ločijo od ostalih. V strukturi arhej in gliv smo zaznali manjše spremembe (Slika 3, 7) v odvisnosti od dodanih kovin. Podobno je tudi skupina Sandaa in sod. (1999a) zaznala spremembe v združbi arhej v odvisnosti od povečane koncentracije kovin (1,1 in 2,7 mg Cd/kg, 226 in 359 mg Zn/kg). Analiza posameznih T-RF je pokazala značilne razlike v pojavnosti in intenziteti posameznih T-RF med obravnavanji mikrobnih združb arhej, bakterij in gliv. Pri združbi bakterij smo določili dva T-RF manj v odvisnosti od kovin kar je v skladu s skupino Tipayno in sod. (2012). Ta skupina je pri populaciji bakterij v odvisnosti od povečane koncentracije Cd (1,0; 2,3; 3,2 mg Cd/kg), ne pa tudi Zn (44,6; 52,6; 102,6 mg Zn/kg), zaznala manjše število T-RF. Najmanjše število T-RF so določili v tleh z največjo koncentracijo Cd. Odsotnost fragmentov v obravnavanjih z dodanima kovinama Zn in Cd lahko nakazuje, da so mikrobi, povezani s temi T-RF, občutljivi na povečano vsebnost kovin. To lahko posledično vodi v izgubo funkcije, ki je povezanana s to skupino. Po drugi strani pa so se pri vseh preučevanih združbah pojavili T-RF, ki jih v kontrolnem obravnavanju NPK nismo zaznali in lahko kažejo na pojav in rast za kovine manj občutljivih vrst ali pa na povezanost s FO. Največ T-RF, ki kažejo pozitivno povezavo s kovinami smo določili pri združbi gliv, in sicer 33 % T-RF, ki jih v kontrolnem obravnavanju nismo določili.

Rezultati naše študije vpliva FO in koncentracijskega gradienta kovin Cd in Zn na številčnost in strukturo mikrobnih združb kažejo, da so glive najbolj odporna združba mikroorganizmov v tleh. Čeprav razlika ni statistično značilna, rezultati kažejo celo pozitiven trend med povečano koncentracijo kovin in številčnostjo kopij gena 18S rRNA. Morda bi z večjim številom ponovitev in poskusnih enot med obravnavanji ta sklep tudi potrdili. Prav tako smo določili 33 % novih T-RFjev, ki kažejo očitno povezanost s kovinami. Kljub temu na sliki dendrograma nismo videli jasne razlike med obravnavanji z dodanimi kovinami in kontrolnim obravnavanjem. Z večjim številom restrikcijskih encimov bi dobili bolj obsežen profil, ki bi morda pokazal jasne razlike. O pozitivni korelaciji med kovinami in glivami so poročali tudi drugi avtorji (Ros in sod. 2009; Rajapaksha in sod., 2004).

Na osnovi rezultatov naše študije lahko sklepamo, da dodatek FO brez eksperimentalno dodanih PTK tlem, značilno ne vpliva na številčnost preučevanih mikrobnih združb (Slika 8, 9, 10 in Pregl. 17). Dodatek kovin Zn in Cd, v 1000-krat povečani vsebnosti kot sta v FO, pa je značilno zmanjšal številčnost arhej, ne pa tudi bakterij in gliv. V nasprotju z rezultati naše študije, skupina Ros in sod. (2009) poročajo, da se je število kopij 16S rRNA bakterij v odvisnosti od povečane koncentracije Cd (6.5 mg/kg in 12.5mg/kg) zmanjšalo. Pri glivah pa poročajo o pozitivnem trendu med številčnostjo 18S rRNA in povečano koncentracijo Cd. Ker smo v naši študiji vzorčili samo enkrat, na koncu poskusa, nimamo podatkov, kaj se je zgodilo z mikrobnimi združbami takoj po dodatku FO in kovin Zn in Cd. V literaturi lahko beremo (Diaz-Ravina in Baath, 1996), da se pri najbolj občutljivih vrstah takoj (po treh dneh) pokaže odziv na akutni stres. S časom izpostavitve pa se ponovno vzpostavi ravnovesje. V prihodnje je zato za boljšo primerjavo smiselno vzorčiti tudi na začetku poskusa in spremljati časovno dinamiko odzivanja mikrobnih združb na stres. Poleg različnega odziva mikrobnih združb glede na čas izpostavitve kovinam, se s staranjem tal (Giller in sod., 1998) spreminja tudi biodostopnost kovin, kot smo diskutirali v prejšnjem odstavku (Suhadolc 2003; Walter in Cuevas, 1999)).

Iz naših rezultatov je razvidno, da dodatek FO tlem, tudi z eksperimentalno dodanima kovinama, v splošnem ni imel vpliva na aktivnost preučevanih encimov (Slika 12 in 13). Kljub poročanju številnih avtorjev (Brookes, 1995, Giller in sod., 1998, Odlare in sod. 2008), da je merjenje encimske aktivnosti primerni indikator za zgodnje odkrivanje stresnih dejavnikov v tleh, lahko slednje potrdimo le za encim β -glukuronidazo (Slika 12). Aktivnost ostalih encimov vključenih v študijo (ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza), se ni spremenila pod vplivom koncentracijskega gradienta kovin Zn in Cd. Skladno z našimi rezultati nekateri avtorji poročajo (Moreno in sod. 1999; Nannipieri in sod. 2002), da je lahko razlog nespremenjene encimske aktivnosti tvorba kompleksov med organskimi snovmi in kovinami, s čimer se zamaskira negativni vpliv kovin. Yang in sod. (2006) so preučevali vpliv mešanice kovin Zn, Cd in Pb in ugotovili, da se aktivnost fosfataze zmanjša v obravnavanjih z večjim deležem Cd in poveča v obravnavanjih v večjim deležem Zn (4-50 mg Cd/kg in 70-700 mg Zn/kg). Encimu β -glukuronidaza, smo izmerili značilno manjšo povprečno aktivnost v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin kot je v FO. Manjša aktivnost encima je lahko posledica zmanjšanja sinteze encima ali pa inhibicije njegove aktivnosti. Avtor Frey s sod (2006) prav tako poroča o manjši aktivnosti encima β -glukuronidaza (88 %) v tleh z dodanimi kovinami (okoli 300 μ g Zn/g in manj kot 1 μ g/g Cd). Zmanjšana encimska aktivnost β -glukuronidaze, ki je vključena v C-cikel, je najverjetneje razlog akumulacije DOC (Pregl. 13). V obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin smo izmerili značilno večjo koncentracijo topnega C. Na osnovi teh ugotovitev lahko sklepamo, da je bil proces mineralizacije zaradi prisotnih kovin upočasnen.

6 SKLEPI

Tri mesece po dodajanju maksimalno dovoljenega odmerka FO tlem, le-ta ni značilno vplival na skupno vsebnost ter biodostopnost kovin (Zn in Cd) v tleh, niti ni vplival na merjene mikrobne parametre – strukturo, številčnost in encimsko aktivnost mikrobnih združb.

Značilne razlike v biodostopnih frakcijah in skupni vsebnosti PTK v tleh, kot tudi v strukturi, številčnosti in aktivnosti mikrobnih združb, smo ugotovili v obravnavanju z eksperimentalno 1000-krat povečanima koncentracijama Zn in Cd v FO, medtem ko vpliva pri 10- in 100-krat povečani vsebnosti PTK v splošnem nismo zaznali.

Največji (negativni) odziv na 1000-krat povečane vsebnosti PTK kot sta v FO, je bil pri bakterijah in arhejah. Generalna bakterijska združba se je jasno spremenila, določili smo tudi značilno zmanjšanje intenzivnosti več T-RF, medtem ko do zmanjšanja številčnosti bakterijske združbe zaradi PTK ni prišlo. Obratno pa smo pri arhejah določili značilno manjše število kopij genov 16S rRNA, medtem ko so bile spremembe v strukturi združbe zaradi PTK manjše.

PTK v FO niso vplivale na generalno strukturo in številčnost gliv. Zanimiv je pojav treh novih T-RF in povečanje intenzivnosti signalov nekaterih glivnih T-RF v obravnavanju s 1000-kratnim povečanjem PTK, kar kaže na razvoj na kovine tolerantnih združb.

PTK v FO so značilno zmanjšale aktivnost encima β -glukuronidaza, ki sodeluje v procesu mineralizacije organske snovi, vendar le pri 1000-kratem povečanju vsebnosti kovin. Na ostale encime (ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza) dodatek FO in koncentracijski gradient kovin ni značilno vplival.

7 POVZETEK

Proizvodnja bioplina narašča in skladno s tem tudi stranski produkt fermentacije – fermentacijski ostanek. Zaradi bogate organske sestave je FO potencilano primeren za gnojenje, vendar pa lahko vsebuje tudi potencialno nevarne kovine. Le-te pa lahko negativno vplivajo na mikrobne združbe v tleh in posledično na kvaliteto in rodovitnost tal. V ta namen smo v nalogi želeli ovrednotiti vpliv kovin Zn in Cd v FO na skupno vsebnost in biodostopnost kovin in na talne mikrobne združbe. Preverjali smo vpliv na strukturo in številčnost arhej, bakterij in gliv, ter mikrobno aktivnost z določanjem encimov vključenih v C-, N- in P-cikel.

Zasnovali smo lončni poskus s tatarsko ajdo, v katerega smo vključili pet obravnavanj z naslenjimi dodatki tlem: mineralno gnojilo NPK (kontrolno obravnavanje), fermentacijski ostanek (FO) izbrane bioplinarne, ter FO z eksperimentalno povečano vsebnostjo Zn in Cd v koncentracijskem gradientu z 10-, 100- in 1000-krat povečane vsebnost PTK kot je v izvornem FO. Odmerek NPK in FO je bil določen glede na maksimalno dovoljeni vnos N v tla (170 kg N/ha). V poskusne lonce smo posejali tatarsko ajdo, jo po treh mesecih poželi, tla homogenizirali po globinah (0-2 cm in 2-20 cm), ter vzorce tal za molekularne analize zamrznili v suhem ledu, za kemijske analize pa zračno posušili.

Sklepali smo, da bodo zadostno povečane vsebnosti biološko dostopnih oblik Zn in Cd v tleh značilno vplivale na merjene mikrobne parametre. S T-RFLP markerji smo analizirali morebitne spremembe v strukturi, z metodo qPCR v relanem času pa spremembe v številčnosti mikrobnih združb. Z encimskimi testi smo preverjali vpliv na mikrobno aktivnost.

Rezultati naše študije kažejo, da se je skupna vsebnost Cd značilno povečala le v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK kot je v FO, skupna vsebnost Zn pa v obravnavanjih s 100- in 1000-krat povečano vsebnostjo kovin. Biodostopnost Cd se v odvisnosti od koncentracijskega gradienta PTK ni značilno spremenila, se je pa povečala biodostopnost Zn v obravnavanju z eksperimentalno 1000-krat povečano vsebnostjo kovin.

V splošnem nismo določili vpliva na merjene mikrobne parametre v obravnavanjih z do 100-krat eksperimentalno povečano vsebnostjo Zn in Cd kot je v FO. PTK v 1000-krat povečani vsebnosti kot so v FO so značilno vplivale na združbo arhej in bakterij, značilnega vpliva na združbo gliv nismo določili. Pri bakterijah se je struktura v obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo PTK bistveno spremenila. Koncentracijski gradient PTK ni očitno spremenil strukture gliv in arhej. Pri vseh preučevanih mikrobnih združbah smo izmerili značilne razlike v pojavnosti in intenziteti posameznih T-RF. Pri glivah smo tako določili 33 % T-RF, ki kažejo povezanost s kovinami. Zn in Cd v 1000-krat povečani vsebnosti kot sta v FO, sta značilno zmanjšale število kopij 16S rRNA arhej,

gradient PTK na število kopij 16S rRNA bakterij in 18S rRNA gliv ni vplival. Z encimskimi testi smo določili zmanjšano aktivnost encima β -glukuronidaza, pri ostalih preučevanih encimih (ksilanaza, β -glukozidaza, hitinaza in fosfataza) nismo izmerili spremembe encimske aktivnosti v odvisnosti od FO in povečane vsebnosti PTK. V obravnavanju s 1000-krat povečano vsebnostjo kovin smo izmerili smotilno večjo vsebnost DOC in tudi DON, kar je posledica zmanjšane aktivnosti encima β -glukuronidaza.

Rezultati študije so pokazali, da enkratni maksimalno dovoljeni odmerek FO glede na delež N značilno ne spremeni skupne vsebnosti in biodostopnosti kovin Zn in Cd in nima vpliva na DOC, v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem NPK se poveča le vsebnost DON. Enkratni dodatek FO prav tako značilno ne spremeni strukture, številčnosti in encimske aktivnosti mikrobnih združb. Na osnovi teh rezultatov lahko zaključimo, da je FO lahko primeren za gnojenje poljskih površin.

8 VIRI

- Ackland M.L., Michalczyk A. 2006. Zinc deficiency and its inherited disorders – a review. *Genes and Nutrition*, 1, 1: 41-50
- Alloway B.J. 2013. Heavy metals in soils – trace metals and metalloids in soils and their bioavailability 3. Dordrecht, Heidelberg, New York, London, Springer: 3465-466
- Almas A.R., Mulder J., Bakken L.R. 2005. Trace metal exposure of soil bacteria depends on their position in the soil matrix. *Environmental Science and Technology*, 39: 5927–5932
- ARSO. 2014. Obnovljivi viri energije
http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=643 (januar 2015)
- Auguet J-C., Barberan A., Casamayor E.O. 2010. Global ecological patterns in uncultured archaea. *The ISME Journal*, 4: 182-190
- Bach H.J., Hartmann A., Schlöter M., Munch J.C. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 2: 173-182
- Bano N., Ruffin S., Ransom B., Hollibaugh J.T. 2004. Phylogenetic composition of arctic ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2: 781-789
- Beare M.H., Coleman D.C., Crossley D.A. Jr., Hendrix P.F, Odum E.P. 1995. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*, 170, 1: 5–22
- Benson D.R. 1988. The genus *Frankia*: actinomycetes symbionts of plants. *Microbiology Science*, 5, 1: 9–12
- Borneman J., Hartin R.J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4356-4360
- Brookes P.C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19, 4: 269-279
- Buckley D. H., Graber J. R, Schmidt T. M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 11: 4333–4339
- Chin K.J., Lukow T., Conrad R. 1999. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 6: 2341-2349
- Code of good agricultural practice for the protection of soil. 1993. Maff, Welsh office

agriculture department publication, PB 0617

- Culman S.W., Bukowski R., Gauch H.G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D.H. 2008. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10:171
- Diaz-Ravina M., Baath E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 8: 2970-2977
- Dick W.A., Tabatabai M.A. 1983. Activation of soil pyrophosphatase by metal ions. *Soil Biology and Biochemistry*, 15, 3: 359–363
- Direktiva Sveta z dne 12. junija 1986 o varstvu okolje, zlasti tal, kadar se blato iz čistilnih naprav uporablja v kmetijstvu. 1986. Uradni list Evropskih skupnosti, L 181/6: 265-268
- Drews G. 2011. The evolution of cyanobacteria and photosynthesis. V: Bioenergetic processes of cyanobacteria. Peschek G.A., Obinger C., Renger G. (ur.) Heidelberg, London, New York, Springer: 265-284
- Duineveld B.M., Kowalchuk G.A., Keijzer A., van Elsas J.D., van Veen J.A. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragment coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 172–178
- EREC. 2008. Renewable energy technology roadmap 20% by 2020. European renewable energy council
http://www.erec.org/fileadmin/erec_docs/Documents/Publications/Renewable_Energy_Technology_Roadmap.pdf (januar 2015)
- Ehrlich H.L. 1997. Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 687-692
- Foster R.C. 1988. Microenvironment of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 3: 189–203
- Frey B., Stemmer M., Widmer F., Luster J., Sperison C. 2006. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1745-1756
- Gadd G.M., Griffiths A.J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4, 4:303-317
- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25–60
- Gadd G.M. 2005. Microorganisms in toxic metal-polluted soils. V: Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Buscot F. in Varma A. (ur.). Berlin, Springer: 325-356
- Giller K.E., Witter E., McGrath S. 1998. Toxicity of heavy metals to

- microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10/11: 1389-1414
- Giller K. E., Witter E., McGrath S. P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 10: 2031-2037
- Giri B., Giang P.H., Kumari R., Prasad R., Varma A. 2005. Microbial diversity in soils. V: *Microorganisms in soils: roles in genesis and function*. Buscot F., Varma A. (eds.). Springer: 19-49
- Gomes N.C.M., Landi L., Smalla K., Nannipieri P., Brookes P.C., Renella G. 2010. Effects of Cd- and Zn-enriched sewage sludge on soil bacterial and fungal communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 6: 1255–1263
- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of diversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95: 641–655
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 8: 3233-3241
- Hobson P.N. 1982. Biogas production from agricultural wastes. V: *New trends in research and utilization of solar energy through biological systems*. Mislin H., Bachofen R. (ur.). Basel, Birkhäuser Basel: 134-137
- ISO 10390. Soil quality - determination of pH. 2005. Švica: 7 str.
- ISO 10649. Soil quality - determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). 1995. Švica: 7 str.
- ISO 11274. Soil quality - determination of the water retention characteristic - laboratory methods. 1998. Švica: 20 str.
- ISO 11464. Soil quality - pretreatment of samples for physico-chemical analysis. 2006. Švica: 11 str.
- ISO 13878. Determination of total nitrogen content by dry combustion (elemental analysis). 1987. Švica: 5 str.
- Jansen E., Michels M., van Til M., Doelman P. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 3: 177-184
- Jejčič V., Poje T. 2009. Biogas regions - bioplin v kmetijstvu: informacije za proizvodnjo bioplina v Sloveniji. Kmetijski inštitut Slovenije: 20 str.
- Kamal S. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals. V: *Soil heavy metals*. Varma A., Prasad R. (ur.). Berlin, Springer: 31-63
- Kashem M.A., Singh B.R., Kondo T., Imamul Huq S.M., Kawai S. 2007. Comparison of

- extractability of Cd, Cu, P and Zn with sequential extraction in contaminated and non-contaminated soils. *Environmental Science and Technology Journal*, 4: 169-176
- Khan S., Hesham A.L., Qiao M., Rehman S., He J.Z. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 2: 288-296
- Leininger S., Urich T., Schlöter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806-809
- Liesack W., Stackebrandt E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of Bacteriology*, 174, 15: 5072–5078
- Malla R., Varma A. 2007. Use of short oligonucleotide primers in random amplified polymorphic DNA techniques for species identification. V: *Advanced techniques in soil microbiology*. Varma A., Oelmüller R. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 237-246
- Marschner P. 2007. Soil microbial community structure and function assessed by FAME, PLFA and DGGE — Advantages and limitations. V: *Advanced techniques in soil microbiology*. Varma A., Oelmüller R. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 181-200
- Marx M.C., Wood M., Jarvis S.C. 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 12-13: 1633-1640
- Massi E. 2012. Fuel cells in the waste-to-energy chain. V: *Anaerobic digestion*. Stephan J., McPhail J.S., Cigotti V., Moreno A. (ur.). London, Springer: 47-63
- McLean J.E., Bledsoe B.E. 1992. Behavior of metals in soils. V: *EPA - environmental assessment sourcebook*. Boulding J. R. (ur.). Michigan, Ann Arbor Press: 19-55
- Mertens J., Smolders E. 2013. Zinc. V: *Heavy metals in soils – trace metals and metalloids in soils and their bioavailability 3*. Alloway B.J. (ur.). Dordrecht, Heidelberg, New York, London, Springer: 465-466
- Moreno J., Loper G.J., Vela G.R. 1986. Survival of *Azotobacter* spp. in dry soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 1: 123–125
- Moreno J.L., Hernandez T., Garcia, C. 1999. Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biology and Fertility of Soils*, 28, 3: 230–237
- Moreno J.L., Garcia C., Hernandez T. 2003. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *European Journal of Soil Science*, 54, 2: 377-386
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003.

- Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670
- Nicol G.M., Tscherko D., Embley T.M., Prosser J. I. 2005. Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. *Environmental Microbiology*, 7, 3: 337-347
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 78, 19: 5636-56434
- Odlare M., Pell M., Svensson K. 2008. Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Management*, 28: 1246-1253
- ÖNORM L 1087. 1993. Chemical analysis of soils: determination of plant-available phosphate and potassium by calcium-acetate-lactate. Österreichisches Normungsinstitut: 4 str.
- Pennanen T., Frostegard A., Fritze H., Baath E. 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 420-428
- Pritsch K., Courty P.E., Churin J-L., Cloutier-Hurteau B., Ali M.A., Damon C., Duchemin M., Egli S., Ernst J., Fraissinet-Tachet L., Kuhar F., Legname E., Marmesse R., Müller A., Nikolova P., Peter M., Plassard C., Richard F., Schlöter M., Seloss M-A., Franc A., Garbaye J. 2011. Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*, 21,7: 589-600
- Rajapaksha R., Tobor-Kaplon M., Baath E. 2004. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2966-2973
- Raynaud X., Nunan N. 2014. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*, 9, 1: e4242, doi: 10.1371/journal.pone.0087217: 9 str.
- Ros M., Pascual J.A., Moreno J.L., Hernandez M. T., Garcia C. 2009. Evaluation of microbial community, activity, abundance and structure in a semiarid soil under cadmium pollution at laboratory level. *Water, Air and Soil Pollution*, 203: 229-242
- Sandaa R-A., Enger O., Torsvik V. 1999a. Abundance and diversity of archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 8: 3293-3297
- Sandaa R., Torsvik V., Enger V., Daae F.L., Castberg T., Hahn D. 1999b. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 3: 237-251

- Sandaa R.A., Torsvik V., Enger O. 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 3: 287-295
- Semple K., Doick K., Jones K., Burauel K., Craven A., Harms H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, 38, 12: 228-231
- Singh R.P., Agrawal M. 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28, 2: 347–358
- SIST ISO 14235. Kakovost tal - določevanje organskega ogljika z oksidacijo v kromžvepleni kislini; modificiran brez zunanega segrevanja. 1999. Švica: 5 str.
- Soil survey laboratory methods manual. 2004. R. Burt (ur.). USDA: 1031 str.
- Summers A.P., Sugarman L.I. 1974. Cell-free mercury(II) reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 119, 1: 242-249
- Suhadolc M. 2003. The fate of herbicide isoproturon in soils contaminated with lead, zinc, and cadmium. Doktorsko delo, Biotehniška fakulteta
- Šalamun A. 2012. Bioplinarne: nas rešujejo ali zastrupljajo? Alpe Adria Green Wordpress
<http://alpeadriagreen.wordpress.com/2012/10/15/bioplinarne-nas-reujejo-ali-zastrupljajo> (september 2013)
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51, 7: 844-851
- Timmers R.A., Rothballer M., Strik D. P. B. T. B, Engel M., Schulz S., Schlöter M., Hartmann A., Hamelers B., Buisman C. 2012. Microbial community structure elucidates performance of *Glyceria maxima* plant microbial fuel cell. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 2: 537–548
- Tipayno S., Kim C., Sa T. 2012. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Applied Soil Ecology*, 61: 137-146
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. l. RS, št. 68-577/69
- Uredba o emisiji pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov. 2008. Ur. l. RS, št. 62/08
- Uredba o varstvu voda pred onesnaženjem z nitrati iz kmetijskih virov. 2009. Ur. l. RS, št. 113/09
- Uredba o predelavi biološko razgradljivih odpadkov in uporabi komposta ali digestata. 2013. Ur. l. RS št. 99/13
- Valle B.L., Auld D.S. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and

other preteins. *Biochemistry*, 29: 5647-59

- Vezjak B., Flajšman B., Lut D., Kajfež Bogataj L., Hanžek M., Omladič L. 2011. Bioplinarne so v Sloveniji za zdaj zlorabljen energetski projekt. *Dnevnik*, v rubriki pisma bralcev
<https://www.dnevnik.si/1042431999/mnenja/odprta-stran/1042431999>
(januar, 2015)
- Vig K., Megharaj M., Sethunathan N., Naidu R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research* 8, 1: 121-135
- VSBo – Ordinance relating to pollutants in soil of June 9, 1986. 1986. Swiss Federal Office of Environment, Forests and Landscape, SR 814.12: 26 str.
- Zeng F., Ali S., Zhang H., Ouyang Y., Qiu B., Wu F., Zhang G. 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental Pollution*, 159: 84-91
- Walter I., Cuevas G. 1999. Chemical Fraction of heavy metals in a soil amended with repeated sewage sludge application. *The Science of Total Environment*, 226: 113-119
- Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 4: 849-860
- Wieland G., Neumann R., Backhaus H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizosphere in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 12: 5849–5854
- Wolters V. 1991. Soil invertebrates – effects on nutrient turnover and soil structure: a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 154, 6: 389–402
- Yang Z., Liu S., Zheng D., Feng S. 2006. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Science*, 18, 6: 1135-1141

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Marjetki Suhadolc za idejo, zasnovo in izvedbo lončnega poskusa ter za vse analitske metode, ki so bile opravljene na Centru za pedologijo in varstvo okolja. Zahvaljujem se ji tudi, ker je omogočila izvedbo tega dela in za vse nasvete, popravke in pomoč pri pisanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se dr. Viviane Radl, ki me je sprejela na Helmholtz inštitutu in usmerjala tekom molekularnih analiz.

Za pregled naloge in komentarje se zahvaljujem prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Za pomoč pri statistični analizi se zahvaljujem doc. dr. Damijani Kastelec.

Zahvalila bi se dr. Xii Dong in dr. Jeganu Sekar za vse nasvete in ideje pri izvedbi molekularnih analiz.

Zahvaljujem se tudi Likarjevemu skladu in izmenjavi Erasmus za prejeti štipendiji.

Zahvaljujem se staršem in sestri za podporo in vzpodbudo skozi celoten študij.

Hvala tudi Anžetu.