

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška ZADEL

**STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE IN  
MINERALIZACIJA MODELNE ORGANSKE SNOVI  
PO REMEDIACIJI S KOVINAMI ONESNAŽENIH  
TAL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška ZADEL

**STRUKTURA MIKROBNE ZDРUŽBE IN MINERALIZACIJA  
MODELNE ORGANSKE SNOVI PO REMEDIACIJI S KOVINAMI  
ONESNAŽENIH TAL**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AND MODEL ORGANIC  
MATTER MINERALIZATION AFTER REMEDIATION OF METAL  
CONTAMINATED SOIL**

M.SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

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 prakse izveden na inštitutu Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Nemčija v raziskovalni skupini Umweltgenomik.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Domna Leštana, za somentorico doc. dr. Marjetko Suhadolc in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Član:                prof. dr. David Stopar  
                        Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Urška ZADEL

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

|    |   |
|----|---|
| ŠD | Du2   |
| DK | UDK 631.4:631.453:502.521(043.2)  |
| KG | mineralizacija/potencialno toksične kovine/Pb/svinec/Cd/kadmij/Zn/cink/mikrobne združbe/tla/bakterije/glive/arheje/encimska aktivnost/struktura/pestrost  |
| AV | ZADEL, Urška  |
| SA | LEŠTAN, Domen (mentor)/SUHADOLC, Marjetka (somentorica)   |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101   |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  |
| LI | 2016  |
| IN | STRUKTURA MIKROBNE ZDRUŽBE IN MINERALIZACIJA MODELNE ORGANSKE SNOVI PO REMEDIACIJI S KOVINAMI ONESNAŽENIH TAL   |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  |
| OP | XII, 69 str.,13 pregl., 19 sl., 174 vir.  |
| IJ | sl  |
| JI | sl/en   |
| AI | Potencialno toksične kovine (PTK) v Evropi in svetu predstavljajo eno glavnih onesnažil in številna področja so zaradi presežnih koncentracij PTK potrebna remediacije. Kot uspešna metoda odstranjevanja PTK iz tal se je izkazalo pranje tal z vodno raztopino liganda etilendiamin tetraacetat (EDTA). Da bi ugotovili vpliv remediacijskega postopka na strukturo mikrobnih združb in delovanje tal, smo v magistrski nalogi primerjali: (i) originalna tla (Orig) s povečanimi vsebnostmi PTK; (ii) sveže remediirana tla (R-svež), 2 meseca po remediaciji; ter (iii) starana remediirana tla (R-star), 1 leto po remediaciji. Izbrana onesnažena tla (Orig) so vsebovala $4359 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ , $1901 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ in $26 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ . S pranjem tal s 120 mM EDTA so se skupne vsebnosti Pb in Cd znatno zmanjšale (Pb za 67 % in 69 % ter Cd za 61 % in 61 % v zaporedju R-svež in R-star), vsebnosti Zn pa manj (6 % oz. 18 %), spremenila se je tudi porazdelitev PTK med frakcijami tal. V sveže remediiranih tleh so bile vsebnosti lahko dostopne frakcije Pb in Cd značilno večje kot v Orig in R-star tleh. Zaradi remediacijskega postopka se je spremenila tekstura ter s tem nekatere lastnosti tal: Povečale so se koncentracije organskega C (6,7, 8,2 oz. 6,8 %, podano v zaporedju Orig, R-svež in R-star tla), mikrobne biomase ( $260,3, 303,0$ in $207,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), nitrata (104,5, 141,6 in $233,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ), kationska izmenjalna kapaciteta in sposobnost tal za zadrževanje vode. Hitrost mineralizacije modelne organske snovi (koruze) v tleh smo spremeljali v 28-dnevнем mikrokozem poskusu, kjer smo z IRMS-GC merili nastali $\text{CO}_2$ in njegovo izotopsko sestavo. V kontrolnih tleh, t.j. brez dodane koruze, je mineralizacija potekala najhitreje v svežih remediiranih tleh in najpočasneje v originalnih tleh, ob dodatku koruze pa se tla v hitrosti mineralizacije niso razlikovala med seboj. V sveže remediiranih tleh smo zaradi večje vsebnosti organske snovi izmerili največjo mikrobeno biomaso kot tudi povečano encimsko aktivnost (celbiohidrolaz, $\beta$ -glukozidaz in ksilozidaz). Po remediaciji se je spremenila struktura in pestrost (T-RFLP) glivnih in bakterijskih združb, nismo pa opazili razlik v združbah arhej. Zaključujemo, da se razgradnja modelne organske snovi po pranju z EDTA ni spremenila – kljub spremembam v strukturi mikrobnih združb razlik v mineralizaciji dodane organske snovi nismo ugotovili. V nadalnjih študijah je potrebno raziskati vpliv pranja tal še na druge mikrobne pogojene procese, kot je na primer cikel N. |

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

|    |  |
|----|--|
| DN | Du2  |
| DC | UDC 631.4:631.453:502.521(043.2)   |
| CX | mineralization/potentially toxic metals/Pb/led/Cd/cadmium/Zn/zinc/microbial community/soil/bacteria/fungi/archaea/enzyme activity  |
| AU | ZADEL, Urška   |
| AA | LEŠTAN, Domen (supervisor)/SUHADOLC, Marjetka (co-advisor)   |
| PP | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  |
| PB | University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programm in Biotechnology  |
| PY | 2016   |
| TI | MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AND MODEL ORGANIC MATTER MINERALIZATION AFTER REMEDIATION OF METAL CONTAMINATED SOIL   |
| DT | M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  |
| NO | XII, 69 p., 13 tab., 19 fig., 174 ref.   |
| LA | sl   |
| AL | sl/en  |
| AB | Potentially toxic metals (PTM) are among the most important pollutants in Europe and worldwide, causing many locations to be in need for remediation. Soil washing with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) water solution has been demonstrated as a very successful remediation method. In order to assess influences of remediation on microbial communities and soil function, this thesis compared: (i) original soil (Orig), with high PTM concentrations; (ii) freshly remediated soil (R-svež), soil after 2 months past remediation; and (iii) altered remediated soil (R-star) 1 year after remediation. The selected contaminated soil contained 4359 mg Pb kg <sup>-1</sup> , 1901 mg Zn kg <sup>-1</sup> and 26 mg Cd kg <sup>-1</sup> . Remediation with 120 mM EDTA significantly decreased total Pb and Cd concentrations (Pb for 67 % and 69 %, Cd for 61 % and 61 % for R-svež and R-star, respectively), but less Zn was removed (6 % and 18 %). Further, distribution of PTM between soil fractions was changed. In comparison to original and altered remediated soil, concentrations of bioavailable Pb and Cd in fresh remediated soil were elevated. Beside that, soil remediation changed soil texture and accordingly some soil properties: Concentrations of organic C were increased (6,7; 8,2 and 6,8 % for Orig, R-svež and R-star, respectively), as well as microbial biomass (260,3, 303,0 in 207,9 µg g <sup>-1</sup> ), nitrate (104,5, 141,6 in 233,0 µg g <sup>-1</sup> ), cation exchange capacity and soil water holding capacity. In a 28-day microcosm experiment, mineralization of easily degradable organic matter (maize) was monitored with CO <sub>2</sub> concentration measurements (IRMS-GS) and its isotopic structure. In control soil, i.e. without added maize, the highest rate of mineralization was measured in freshly remediated soil and the lowest in the original soil. However, after maize addition there were no differences measured in mineralization between the soils. The highest microbial biomass and also increased enzymatic activity (cellobiohydrolase, β-glucosidase and xylosidase) were observed in freshly remediated soil due to the highest organic matter content. Further, microbial structure and diversity (T-RFLP) of fungal and bacterial communities changed after remediation but on the contrary, no differences were detected in archaeal community structure. In conclusion, EDTA washing did not influence model organic matter mineralization – despite the changes in microbial communities we determined no differences in mineralization of added organic matter. In future, the effect of EDTA washing on other microbial functions (such as e.g. N-cycle) should be investigated. |

## KAZALO VSEBINE

|  | str.      |
|--|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)  | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)  | IV        |
| KAZALO VSEBINE   | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC  | VII       |
| KAZALO SLIK  | VIII      |
| KAZALO PRILOG  | X         |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI   | XI        |
| <b>1 UVOD</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 NAMEN NALOGE   | 2         |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE   | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1 ONESNAŽENJE S KOVINAMI   | 3         |
| <b>2.1.1 Obnašanje kovin v tleh</b>  | 4         |
| <b>2.1.2 Onesnaženost tal s kovinami v Sloveniji</b>   | 5         |
| 2.2 REMEDIACIJA TAL  | 7         |
| <b>2.2.1 Pranje tal z raztopino EDTA</b>   | 7         |
| 2.3 ORGANSKA SNOV TAL IN MINERALIZACIJA  | 8         |
| <b>2.3.1 Organska snov tal</b>   | 9         |
| <b>2.3.2 Razgradnja organske snovi</b>   | 10        |
| 2.3.2.1 Encimski sistem, vključen v razgradnjo rastlinskih ostankov  | 11        |
| <b>2.3.3 Sprožilni učinek</b>  | 12        |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>  | <b>14</b> |
| 3.1 TLA  | 14        |
| 3.2 ANALIZE TAL  | 15        |
| <b>3.2.1 Standardna pedološka analiza</b>  | 15        |
| 3.2.1.1 Suha snov tal  | 16        |
| 3.2.1.2 Merjenje pH  | 16        |
| 3.2.1.3 Skupni organski C v tleh   | 16        |
| 3.2.1.4 Skupna vsebnost N v tleh   | 16        |
| 3.2.1.5 Izračun C/N razmerja   | 16        |
| 3.2.1.6 Topne oblike C in N  | 17        |
| 3.2.1.7 Mikrobnna biomasa  | 17        |
| 3.2.1.8 Rastlinam dostopna K in P  | 17        |
| 3.2.1.9 Kationska izmenjalna kapaciteta tal  | 17        |
| 3.2.1.10 Tekstura tal  | 18        |
| 3.2.1.11 Vodno zadrževalne lastnosti tal   | 18        |
| <b>3.2.2 Določanje kovin Pb, Zn, Cd, Mn, Fe</b>  | 18        |
| <b>3.2.3 Frakcionacija kovin v tleh</b>  | 18        |
| 3.3 MIKROKOZEM POSKUS  | 19        |
| <b>3.3.1 Mineralizacija organske snovi</b>   | 20        |
| <b>3.3.2 Analiza dolžinskih polimorfizmov terminalnih restrikcijskih fragmentov<br/>(Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP))</b> | 20        |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| 3.3.2.1      | Sočasna ekstrakcija DNK in RNK                                     | 21 |
| 3.3.2.2      | Reverzna transkripcija izolirane RNK                               | 22 |
| 3.3.2.3      | Verižna reakcija s polimerazo (PCR)                                | 22 |
| 3.3.2.4      | Razrez PCR pomnožkov z restrikcijskim endonukleazami               | 24 |
| 3.3.2.5      | Priprava plošče in analiza T-RFLP                                  | 24 |
| <b>3.3.3</b> | <b>Encimska aktivnost</b>  | 25 |
| 3.4          | STATISTIČNA ANALIZA  | 27 |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI</b>   | 28 |
| 4.1          | VPLIV REMEDIACIJE NA SKUPNO VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN           | 28 |
| 4.2          | VPLIV REMEDIACIJE NA FIZIKANO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL               | 30 |
| 4.3          | VPLIV REMEDIACIJE NA MINERALIZACIJO ORGANSKE SNOVI                 | 31 |
| <b>4.3.1</b> | <b>Vsebnost mikrobnega C ter skupnih in dostopnih oblik C in N</b> | 34 |
| 4.4          | VPLIV REMEDIACIJE NA STRUKTURU MIKROBNE ZDRUŽBE                    | 37 |
| 4.5          | VPLIV REMEDIACIJE NA ENCIMSKO AKTIVNOST                            | 45 |
| 4.6          | VPLIV REMEDIACIJE NA TALNE PARAMETRE                               | 47 |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>  | 49 |
| 5.1          | VPLIV REMEDIACIJE NA LASTNOSTI TAL                                 | 49 |
| 5.2          | MINERALIZACIJA ORGANSKE SNOVI V ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TLEH   | 50 |
| 5.3          | STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE IN FUNKCIJA TAL            | 52 |
| <b>6</b>     | <b>SKLEPI</b>  | 57 |
| <b>7</b>     | <b>POVZETEK</b>  | 58 |
| <b>8</b>     | <b>VIRI</b>  | 60 |

**ZAHVALA**  
**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

|  |    |
|--|----|
| Preglednica 1: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti nevarnih snovi v tleh za kovine, ekstrahirane z zlatotopko .....  | 6  |
| Preglednica 2: Aktivnost celulaz na različnih substratih.....  | 12 |
| Preglednica 3: Postopek šeststopenjske sekvenčne ekstrakcije in ocena mobilnosti posameznih frakcij.....   | 19 |
| Preglednica 4: Program termobloka za reverzno transkripcijo vzorcev RNK. ....  | 22 |
| Preglednica 5: Sestava PCR mešanic za pomnoževanje odsekov DNK arhej (Arh), bakterij (Bac) in gliv (Gliv). .....   | 23 |
| Preglednica 6: Programi termobloka za PCR reakcijo 16S rRNK genov arhej (Arh) in bakterij (Bak) ter ITS regije gli (Gliv).....   | 23 |
| Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za encimsko restrikcijo PCR pomnožkov .....   | 24 |
| Preglednica 8: Celulaze, katerih aktivnost smo določali v vzorcih mikrokozm poskusa, substrati, s katerimi smo jih določali, njihove koncentracije in čas inkubacije encimskega testa..... | 25 |
| Preglednica 9: Shema pipetiranja inkubacijskih raztopin za merjenje encimske aktivnosti v črni mikrotitrski plošči. .....  | 26 |
| Preglednica 10: Vsebnost kovin, določena z ekstrakcijo z zlatotopko, podana za originalna, sveže remediirana in starana remediirana suha tla. ....   | 28 |
| Preglednica 11: Frakcionacija kovin v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh z metodo sekvenčnih ekstrakcij. ....   | 29 |
| Preglednica 12: Tekstura tal in vodno-zadrževalne lastnosti tal za originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla.....   | 30 |
| Preglednica 13: Kemijske lastnosti originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tal. ....  | 31 |

## KAZALO SLIK

str.

|  |    |
|--|----|
| Slika 1: Shema ogljikovega cikla, ki ponazarja kroženje ogljika med tlemi, rastlinami in atmosfero, pri čemer pomembno vlogo igrajo mikroorganizmi.....  | 9  |
| Slika 2: Shema sprememb v tleh po dodatku sveže organske snovi. ....   | 13 |
| Slika 3: Procesna shema pranja tal z recikliranim EDTA in procesno raztopino.....  | 15 |
| Slika 4: Sproščanje CO <sub>2</sub> -C v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh brez dodanega ogljika (kontrole).....   | 32 |
| Slika 5: Producija CO <sub>2</sub> -C, merjena v ng CO <sub>2</sub> -C h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> suhih tal, v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh z dodano korozo (+C) .....   | 33 |
| Slika 6: Povečana stopnja mineralizacije talne organske snovi zaradi dodatka sveže organske snovi (koruze), podana relativno na povprečno produkcijo CO <sub>2</sub> -C v kontrolnih tleh brez dodane koruze (t.i. relativni sprožilni učinek) .....   | 34 |
| Slika 7: Vsebnosti DOC in Cmik v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh, brez dodatka (kontrola) in z dodano korozo (+C) .....  | 35 |
| Slika 8: Koncentracije TDN, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> in NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih kontrolnih tleh in tleh z dodano korozo (+C) .....  | 36 |
| Slika 9: Vsebnosti DNK v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh v <b>A:</b> kontrolnih vzorcih in <b>B:</b> z dodatkom koruze (+C) na začetku mikrokozm eksperimenta (dan 0), 13. dan in končni, 28. dan.....   | 37 |
| Slika 10: Prikaz relativne zastopanosti (%) restriktijskih fragmentov glivne ITS rRNK regije po T-RFLP analizi za <b>A:</b> kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in <b>B:</b> za vzorce z dodano korozo (+C).....   | 39 |
| Slika 11: Restriktijski fragmenti glede na tip tal, <b>A:</b> Diagonalna diskriminantna analiza restriktijskih fragmentov glivne ITS regije rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. <b>B:</b> Kalibriran dvodimenzionalni diagram (biplot) za diagonalno diskriminantno analizo restriktijskih fragmentov glivne ITS regije rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je narejena za restriktijske fragmente 264 bp, 274 bp in 385 bp..... | 40 |
| Slika 12: Prikaz relativne zastopanosti (%) restriktijskih fragmentov gena za bakterijsko 16S rRNK po T-RFLP analizi za <b>A:</b> kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in <b>B:</b> za vzorce z dodano korozo (+C).....   | 41 |
| Slika 13: <b>A:</b> Diagonalna diskriminantna analiza restriktijskih fragmentov bakterijske 16S rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. <b>B:</b> Kalibriran dvodimenzionalni diagram (biplot) za diagonalno diskriminantno analizo restriktijskih fragmentov bakterijske 16S  |    |

|  |    |
|--|----|
| rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je narejena za restrikcijske fragmente 183 bp, 397 bp in 508 bp.....   | 42 |
| Slika 14: Prikaz relativne zastopanosti (%) restrikcijskih fragmentov gena za arhejsko 16S rRNK po T-RFLP analizi za <b>A</b> : kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in <b>B</b> : za vzorce z dodano korozo (+C).....            | 43 |
| Slika 15: Pestrost glivnih združb kot število različno dolgih restrikcijskih fragmentov glivne ITS rRNK regije po analizi T-RFLP na dan 0, 13 in 28 glede na tip tal ( <b>A</b> ) in obravnavanje ( <b>B</b> ). .....  | 44 |
| Slika 16: Pestrost bakterijskih združb kot število različno dolgih restrikcijskih fragmentov gena za bakterijsko 16S rRNK po analizi T-RFLP na dan 0, 13 in 28 glede na tip tal ( <b>A</b> ) in obravnavanje ( <b>B</b> ). .....   | 44 |
| Slika 17: Celobiohidrolazna, $\beta$ -glukozidazna in ksilozidazna encimska aktivnost v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih kontrolnih tleh in tleh z dodano korozo (+C), izmerjena na dan 0, 2, 6, 13 in 28 trajanja mikrokozem poskusa.....                           | 46 |
| Slika 18: Multivariatna analiza talnih parametrov, <b>A</b> : Analiza glavnih komponent (PCA) prikazuje medsebojno odvisnost talnih parametrov. <b>B</b> : Diagonalna diskriminantna analiza parametrov z interakcijo tal in obravnavanja kot skupinsko spremenljivko. ....                  | 47 |
| Slika 19: Kalibrirani dvodimenzionalni diagram (biplot) diagonalne diskriminantne analize talnih parametrov z interakcijo tal in obravnavanja kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je prikazana za talni parameter $\text{NO}^{3-}$ in celobiohidrolazno encimsko aktivnost (CEL). ..... | 48 |

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Mineralizacija organske snovi – delež ogljika, ki se je mineraliziral iz koruze oz. iz tal.

Priloga B: Koncentracije DNK in RNK, izolirane med mikrokozm poskusom.

Priloga C: Zastopanost glivnih restrikcijskih fragmentov po analizi T-RFLP.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|               |   |
|---------------|---|
| % SS          | odstotek suhe snovi   |
| $\mu$         | predpona mikro ( $10^{-6}$ )  |
| bp            | bazni par   |
| cDNK          | komplementarna deoksirobonukleinska kislina                                     |
| CEC           | kationska izmenjevalna kapaciteta (ang. cation exchange capacity)               |
| CEL           | celobiohidrolaza  |
| $C_{mik}$     | oznaka za koncentracija mikrobne biomase  |
| DEPC          | dietilpirokarbonat  |
| DNK           | deoksiribonukleinska kislina  |
| dNTP          | deoksiribonukleotid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)                          |
| DOC           | topen organski ogljik (ang. dissolved organic carbon)                           |
| DON           | topen organksi dušik (ang. dissolved organic nitrogen)                          |
| EDTA          | etilendiamin tetraacetat  |
| EPK           | efektivna poljska kapaciteta  |
| FAM           | 6-karboksifluorescein   |
| HEX           | heksakloro-fluorescein  |
| IRMS          | masni spektrometer razmerja izotopov (ang. Isotope ratio mass spectrometer)     |
| IRMS-GC       | masni spektrometer razmerja izotopov sklopljen s plinskim kromatografom         |
| ITS           | regija notranjih distančnikov ribosomske DNK (ang. internal transcribed region) |
| LOQ           | meritev pod mejo kvantifikacije (ang. limit of quantitation)                    |
| m             | masa  |
| M             | oznaka za enoto molarnost   |
| $m$           | predpona mili ( $10^{-3}$ )   |
| $mmol_c$      | mili mol enovalentnih kationov  |
| MUF           | 4-metilumbeliferon  |
| N             | oznaka za enoto normalna koncentracija  |
| n             | predpona nano ( $10^{-9}$ )   |
| $N_{mineral}$ | mineralni dušik   |
| NTA           | nitrolotriocetna kislina  |
| Orig          | originalna tla  |
| Orig+C        | originalna tla z dodano korozo  |
| PAH           | policiklični aromatski ogljikovodik (ang. Polycyclic aromatic hydrocarbon)      |
| PCB           | poliklorirani bifenil (ang. Polychlorinated biphenyl)                           |
| PCR           | verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)                  |
| PK            | poljska kapaciteta (ang. Water holding capacity)                                |
| Pregl.        | preglednica   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| PTE               | potencialno toksični elementi  |
| PTK               | potencialno toksične kovine  |
| RE                | restriktivna endonukleaza  |
| RNK               | ribonukleinska kislina   |
| rRNK              | ribosomska ribonukleinska kislina  |
| R-star            | starana remediirana tla  |
| R-star+C          | starana remediirana tla z dodano koruzo  |
| R-svež            | sveže remediirana tla  |
| R-svež+C          | sveže remediirana tla z dodano koruzo  |
| TAE               | Tris acetatni pufer z EDTA   |
| TDN               | skupen topni dušik (ang. total dissolved nitrogen)   |
| TV                | točka venenja (ang. Wilting point)   |
| TNS               | ekstrakcijski pufer (Tris-HCl, NaCl, SDS)  |
| TOC               | skupni organski ogljik (total organic carbon)  |
| TRF               | terminalni restriktivni fragmenti  |
| T-RFLP            | Dolžinski polimorfizem terminalnih restriktivnih fragmentov (ang. Terminal restriction fragment length polymorphism) |
| Tris              | 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol  |
| USGS 40           | referenčni material, ogljikovi in dušikovi izotopi v L-glutaminski kislini   |
| V-PDB             | standard za izotopsko sestavo ogljika in kisika (ang. Vienna Pee Dee Belemnite)                                      |
| w:v               | masno-volumsko razmerje  |
| XYL               | ksilozidaza  |
| β-glu             | β-glukozidaza  |
| λ <sub>em</sub>   | valovna dolžina fluorescence   |
| λ <sub>ex</sub>   | valovna dolžina absorpcije   |
| δ <sup>13</sup> C | mera za razmerje stabilnih izotopov <sup>13</sup> C: <sup>12</sup> C, podana v promilih (%)                          |

## 1 UVOD

Onesnaženje tal s potencialno toksičnimi elementi je v Evropi in svetu močno prisoten in zaskrbljujoč problem. Po ocenah je onesnaženih kar 340 000 lokacij, ki so nujno potrebne remediacije (European commission, 2009). Ena glavnih onesnažil predstavlja potencialno toksične kovine (PTK), katerih vir onesnaženja je predvsem kovinska industrija. Dolgotrajna rudniška in topilniška dejavnost je svoj pečat pustila tudi v zgornji Mežiški dolini, kjer vsebnosti Pb, Cd in Zn precej presegajo kritične imisijske vrednosti (Uredba ..., 1996).

Mikroorganizmi pomembno pripomorejo h kompleksnim talnim procesom, kot so na primer biogeokemični cikli elementov, ter s tem posledično na preskrbo rastlin s hranili in rodovitnost tal (Barillot in sod., 2013). Povečane vsebnosti PTK v tleh imajo na mikroorganizme lahko negativne vplive, kot so zmanjšana encimska aktivnost, mikrobna biomasa (Lee in sod., 2002), velikost in struktura mikrobnih združb (Konopka in sod., 1999) ter zmanjšana funkcionalna pestrost mikrobnih združb, ki se odraža v izgubi specifičnih funkcij (Kandeler in sod., 1996; Suhadolc in sod., 2000; Suhadolc in sod., 2004). Pri tem je bolj kot skupna vsebnost kovin v tleh, pomembna njihova biodostopnost (Checkao in sod., 1987; Vig in sod., 2003; Suhadolc in sod., 2004).

Samo zmanjšanje onesnaževanja žal ne vodi tudi do zmanjšanja PTK v tleh. Kovine namreč niso kemično niti biološko razgradljive in se v tleh kopijo (Popescu in sod., 2013). Ker tla z močno povečanimi vsebnostmi PTK (t.j. nad kritičnimi imisijskimi vrednostmi (Uredba ..., 1996) niso primerna za pridelavo hrane in krme, je v zadnjem času potekalo intenzivno odkrivanje metod za čiščenje tal in njihov povratek v stanje pred onesnaženjem. Remediacija tal s kemijsko-fizikalnimi metodami, kot je izpiranje tal z vodnimi raztopinami ligandov, je precej učinkovita metoda odstranjevanja PTK iz tal (Jelušič s sod., 2013). Med njimi se je za najbolj učinkovito izkazalo pranje tal z vodno raztopino EDTA. Vendar pa s pranjem tal poleg PTK izperemo tudi potrebna hranila (Zhang in sod., 2010) in spremenimo fizikalno-kemijske lastnosti tal (Tsang in sod., 2007). Vse to pa lahko močno vpliva na mikrobne združbe, ki naseljujejo talni ekosistem in pomembno pripomorejo k njegovi funkciji.

V naši študiji smo se tako osredotočili na delovanje talnih mikroorganizmov pred in po pranju tal z EDTA. Kot pomembno funkcijo tal smo za preučevanje izbrali proces mineralizacije organske snovi, ter kot modelno organsko snov uporabili koruzno biomaso (*Zea mays*), saj je to v Sloveniji najbolj razširjena poljščina (Poročilo o delu ..., 2011). Spremljali pa smo tudi spremembe v strukturi in aktivnosti mikrobnih združb bakterij, gliv in arhej.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Z nalogo smo želeli ugotoviti vpliv remediacijskega postopka na strukturo in delovanje talne mikrobne združbe. V poskusu smo primerjali originalna (Orig), neremediirana tla s povečanimi vsebnostmi PTK; sveže remediirana tla (R-svež), 2 meseca po remediaciji; ter starana remediirana tla (R-star), 1 leto po remediaciji.

V prvem delu naloge smo ugotavljali vpliv remediacije na fizikalno-kemijske lastnosti tal ter skupne vsebnosti in dostopne oblike PTK. V drugem delu pa smo preiskovana tla primerjali glede na hitrost mineralizacije lahko razgradljive organske snovi, strukturo mikrobnih združb bakterij, gliv in arhej ter njihovo encimsko aktivnost.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V nalogi smo preverili naslednje hipoteze:

1. Izpiranje tal z vodno raztopino liganda EDTA, poleg skupne vsebnosti in dostopnosti kovin, spremeni tudi fizikalno-kemijske lastnosti tal, pomembne za funkcioniranje talnih mikrobnih združb.
2. Mikrobna združba, ki se razvije v remediiranih tleh, se razlikuje od mikrobne združbe v originalnih tleh.
3. Razlike v strukturi in velikosti mikrobne združbe se odrazijo v mikrobeni mineralizaciji organske snovi, posebno takoj po remediaciji.
4. V staranih remediiranih tleh se vzpostavi mikrobna združba, sposobna hitre mineralizacije organske snovi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ONESNAŽENJE S KOVINAMI

Tla so vrhnja plast zemeljske skorje med kamninami in površino, sestavljajo pa jih mineralni delci, organske snovi, voda, zrak in živi organizmi (Zakon o varstvu okolja, 2006). Tla shranjujejo večino kemijskih elementov, ki se pojavljajo v okolju, ter v terestričnem sistemu predstavljajo njihov zadnji in ključni ponor. Vendar pa tla nimajo neomejene zadrževalne kapacitete za te elemente. Če jo presežemo, tvegamo resne okoljske posledice, vključno s povečano mobilnostjo v talnem sistemu, ter prenose v prehranjevalno verigo (Adriano, 1986).

Kovine so v okolju naravno prisotne in ne pomenijo nujno onesnaženja. Osnovno načelo toksikologije, ki ga je osnoval že Paracelsus (1493-1541) pravi, da je vsaka snov, vključno z ogljikom ter vsemi elementi in njihovimi derivati, lahko toksična, če je doza dovolj velika. Tako tudi toksičnost kovin močno variira od kovine do kovine in od organizma do organizma, čiste kovine pa so same po sebi zelo redko toksične (Duffus, 2002). Nekatere so za organizme esencialnega pomena. Esencialne kovine so v majhnih koncentracijah (nekaj mikro- ali miligramov na dan) nujne za biološke in biokemijske procese v organizmih, v katerih sodelujejo kot kofaktorji in aktivatorji encimov. Vendar pa se v presežnih koncentracijah bioakumulirajo in postanejo toksične (Stankovic in sod., 2014, Nagajyoti in sod., 2010). Za rastline esencialne kovine so Cu, Co, Fe, Mn, Mo in Zn, za živali pa poleg teh še Cr, F, Ni, Se, Sn in V (Adriano, 1986). Neesencialne kovine (Pb, Cd, As, Hg, (Cr)) nimajo biološke funkcije in so za organizme toksične, preko bioakumulacije pa lahko povzročajo toksičnost tudi pri organizmih, višje v prehranjevalni verigi (Stankovic in sod., 2014).

Prav zaradi tega potencialno toksične kovine (PTK) med drugimi onesnažili predstavljajo enega glavnih razlogov za skrb. Njihova obstojnost in zmožnost bioakumulacije sta zelo visoki, in to predvsem zato, ker so PTK iz antropogenih virov mnogo bolj mobilni kot nativni (iz pedogenih ali litogenih virov) (Kaasalainen in Yli-Halla, 2003). Kopičenje kovin v tleh je zaskrbljujoče iz več vidikov: njihovo fitotoksično delovanje na rastline zavira rast pridelka, negativno vplivajo na varnost hrane in seveda zdravje okolja ter talnih organizmov (Nagajyoti in sod., 2010), saj z esencialnimi kovinami tekmujejo za vezavna mesta na encimih in membranskih proteinih (Stankovic in sod., 2014), se vežejo na makromolekule, kot so DNK, RNK in proteini ter katalizirajo nastanek radikalov (Kamal in sod., 2010). Esencialne in neesencialne PTK lahko prehajajo v organizem z vdihovanjem prašnih delcev, s kontaminirano hrano in vodo, preko ran in z geofagijo, namernim ali nemernim zaužitjem tal. Posledice zastrupitve s kovinami pri ljudeh so odvisne od doze in časa izpostavljenosti, najpogosteje pa se kažejo kot obolenja kosti (Cd), ledvic (Cd, Pb), možganov in nevralnega sistema (Pb, Tl), srčno-žilne bolezni (As, Cd, Cr, Pb), rakava obolenja (As, Cd, Cr) ter negativni vplivi na sposobnost reprodukcije in razvoja ploda (Cd, Pb, Zn) (Oliver, 1997). Mikroorganizmi se, kot tudi drugi organizmi, med seboj razlikujejo po občutljivosti na toksičnost kovin. Dovolj velika koncentracija lahko zaradi motenj esencialnih funkcij povzroči takojšnjo smrt celic in postopoma tudi zmanjšanje velikosti mikrobne populacije zaradi manjše viabilnosti in kompetentnosti celic. To pa ni le akutni učinek povišane koncentracije kovin. V primerjavi z neonesnaženimi območji, se zmanjšana

mikrobnja biomasa in spremenjena struktura mikrobnih združb pojavljata tudi na dolgotrajno onesnaženih območjih z nizko stopnjo onesnaženosti (Giller in sod., 1998). Posledice zmanjšane mikrobne združbe ali njene aktivnosti se odrazijo v številnih osnovnih funkcijah, kot so nižja bazalna respiracija in sposobnost za mineralizacijo organskega C iz različnih substratov, med njimi tudi odmrlih rastlinskih ostankov, mineralizacija N, nitrifikacija, denitrifikacija in fiksacija N, zmanjšana pa je tudi encimska aktivnost (Bååth, 1989). Pri tem je lahko zmanjšana sinteza encimov ali pa jih kovine inhibirajo z maskiranjem aktivnih skupin, denaturacijo proteina, vplivajo na encimsko konfiguracijo ali za vezavo na encimu tekmujejo z aktivatorskimi kovinskimi ioni (Tyler, 1981).

Naravna vsebnost PTK v tleh je močno odvisna od mineralne sestave matične kamnine in procesa preperevanja, ki spreminja matično kamnino v tla (Adriano, 2001). Pod naravne vire PTK v tleh prištevamo še vulkanske izbruhe in gozdne požare. Vendar pa se je vsebnost PTK v tleh v zadnjih desetletjih znatno povečala zaradi antropogene dejavnosti. Antropogeni prispevek je za kar nekajkrat večji od naravnega (Hooda, 2010).

Večina dokumentiranih antropogenih primerov onesnaženja s kovinami izhaja iz rudarske industrije, talilništva in livarstva, saj so jalovina, pepel in aerosoli vir visokih koncentracij potencialno toksičnih elementov (Nagajyoti in sod., 2010; Favas in sod., 2011), onesnaževanje s kovinami pa se na območju rudarske dejavnosti ne preneha po izčrpanju talnih mineralov, kar se navadno zgodi po 5 do 15 letih, temveč se nadaljuje še več sto ali tisoč let po izčrpanju teh neobnovljivih zalog (Peplow, 1999). Vir kovin v tleh je lahko tudi kmetijstvo (primesi v gnojilih in fitofarmecevtskih sredstvih), neustrezeno odlaganje industrijskih odpadkov in emisije iz termoelektrarn (Hooda, 2010; Adriano, 1986, 2001).

### **2.1.1 Obnašanje kovin v tleh**

Kovine se v tleh pojavljajo v eni ali več od naštetih kemijskih oblik: 1) raztopljeni v talni raztopini, 2) adsorptivno vezani na izmenjalna mesta organskih ali anorganskih komponent., 3) ujeti ali fiksirani v talnih koloidih, 4) precipitirani skupaj z drugimi komponentami tal, ali 5) inkorporirani v biološki material. Kemijska oblika elementov bistveno določa njihovo dostopnost rastlinam in živalim ter obnašanje v okolju, kot tudi toksičnost (Adriano, 1986). Prosti joni v raztopini npr. veljajo za najbolj reaktivne v smislu reakcij s trdno fazo (Degryse in sod., 2009). Mobilnost kovin in tako biodostopnost navadno določa njihov potencial k vezavi na druge minerale, vezava pa je močno odvisna tudi od lastnosti tal in kemijskih karakteristik talne raztopine (Committee in sod., 2003), prevdsem pH, kationske izmenjevalne kapacitete (CEC), vsebnosti organske snovi, tekture tal ter vsebnosti in tipa glinenih mineralov, Fe, Al in Mn oksidov ter redoks potenciala (Adriano, 1986). Razporeditev kovin v različne faze uravnava naslednje reakcije: a) adsorpcija in desorpcija, b) obarjanje in raztapljanje, c) formacija površinskih kompleksov, d) jonska izmenjava, e) prodiranje v kristalne strukture mineralov ter f) biološka mobilizacija in imobilizacija (Chao, 1984).

Prehod med izmenljivo (dostopno) in neizmenljivo (stabilno) frakcijo je dolgotrajen proces (leta ali dlje). Dominantne reaktivne površine za vezavo kovin v tleh predstavljajo železovi oksihidroksidi in karbonati, talna organska snov pa jih veže reverzibilno in tako omeji

fiksacijo na železove oksihidrokside. Fiksacija kovin je močno odvisna od pH (od pH odvisna difuzija v oksihidrokside in difuzija/koprecipitacija karbonatov) (Committee in sod., 2003). V raztopini se prosti joni in joni v kompleksih z organskimi ali anorganskimi ligandi lahko adsorbirajo na površino talnih delcev, organsko snov, (hidr)okside ali glinene minerale. Začetne reakcije adsorpcije so hitre (minute, ure), sledijo pa jim počasne adsorpcijske reakcije (dnevi, leta). Tako so kovine postopoma v tleh vedno manj mobilne (Degryse in sod., 2009). Počasna adsorpcija na talne delce lahko zmanjša biodostopnost kovin, za večino dvovalentnih kationov namreč velja, da adsorbirani delež močno presega delež kovin, ki ostane v raztopini. Sicer počasne reakcije sorpcije nimajo večjega vpliva na delež adsorbiranih kovin, močno pa vplivajo na koncentracijo raztopine. Najpomembnejše reakcije adsorpcije in mobilizacije kovin so sprecifična sorpcija, kationska izmenjava in precipitacija (karbonatov, fosfatov). Pri nizkih koncentracijah kovin, se te vežejo pretežno s sprecifično sorpcijo. Ko pa je presežena meja topnosti mineralov, ki vežejo kovine, se kovine oborijo (Buekers, 2007). Na mobilizacijo kovin v tleh vplivajo še spremembe v kislosti, jonski jakosti talne raztopine, redoks potencialu ter formacija kompleksov (Pickering, 1986).

### **2.1.2 Onesnaženost tal s kovinami v Sloveniji**

Tla v Sloveniji veljajo za onesnažena takrat, kadar vsebujejo toliko škodljivih snovi, da se zmanjša njihova samoočiščevalna sposobnost, poslabšajo fizikalne, kemijske in biotične lastnosti, zavirata ali preprečujeta rast in razvoj rastlin, onesnažuje podtalnica ozira na rastline, ali je zaradi škodljivih snovi tako drugače okrnjena trajna rodovitnost tal (Uredba ..., 1990). Podzakonski akt, ki ureja vsebnost nevarnih snovi v tleh, razen za radioaktivne snovi, pa je Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih\* vrednostih nevarnih snovi v tleh (Uredba ..., 1996). Ta omogoča vrednotenje onesnaženosti tal v treh stopnjah (Pregl. 1) in tako postopno ter pravočasno ukrepanje, če je katera od vrednosti presežena.

- Mejna imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni takšno obremenitev tal, da se zagotavljajo življenske razmere za rastline in živali, in pri kateri se ne poslabšuje kakovost podtalnice ter rodovitnost tal. Pri tej vrednosti so učinki ali vplivi na zdravje človeka ali okolje še sprejemljivi.
- Opozorilna imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni pri določenih vrstah rabe tal verjetnost škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali okolje.
- Kritična imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, pri kateri zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na človeka in okolje onesnažena tla niso primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode.

Preglednica 1: Mejne, opozorilne in kritične imisijске vrednosti nevarnih snovi v tleh za kovine, ekstrahirane z zlatotopko (razen Cr<sup>6+</sup>), podane v mg kg<sup>-1</sup> (Uredba ..., 1996)

| Nevarna snov                   | Mejna vrednost<br>(mg/kg suhih tal) | Opozorilna vrednost<br>(mg/kg suhih tal) | Kritična vrednost<br>(mg/kg suhih tal) |
|--------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| <b>Cd in njegove spojine</b>   | <b>1</b>                            | <b>2</b>                                 | <b>12</b>                              |
| Cu in njegove spojine          | 60                                  | 100                                      | 300                                    |
| Ni in njegove spojine          | 50                                  | 70                                       | 210                                    |
| <b>Pb in njegove spojine</b>   | <b>85</b>                           | <b>100</b>                               | <b>530</b>                             |
| <b>Zn in njegove spojine</b>   | <b>200</b>                          | <b>300</b>                               | <b>720</b>                             |
| celotni Cr                     | 100                                 | 150                                      | 380                                    |
| šestivalentni Cr <sup>6+</sup> |                                     |  | 25                                     |
| Hg in njegove spojine          | 0,8                                 | 2  | 10                                     |
| Co in njegove spojine          | 20                                  | 50                                       | 240                                    |
| Mo in njegove spojine          | 10                                  | 40                                       | 200                                    |
| As in njegove spojine          | 20                                  | 30                                       | 55                                     |

\* Imisija snovi v tleh je gostota posamezne nevarne snovi v tleh in se izraža v miligramih ali mikrogramih na kilogram suhih tal.

Rezultati vzorčenj v okviru projekta Raziskave onesnaženosti tal Slovenije (ROTS) so pokazali, da tla v Sloveniji večinoma niso močno onesnažena (Zupan in sod., 2008). Izjemne pa so posamezna področja: Jesenice in Celje sta onesnažena s kovinami zaradi kovinsko-predelovalne industrije, Idrija zaradi rudnika živega srebra, Litijo onesnažujeta nekdanji rudnik in topilnica svinca. Zaradi dolvodnega izpljavljanja kovin, najdemo vzdolž reke Soče in v Tržaškem zalivu povečane vrednosti živega srebra ter svinca, cinka in kadmija vzdolž reke Drave. Na območju Kopra je v tleh sadovnjakov in vinogradov povečana vsebnost bakra zaradi dolgoletne rabe sredstev za varstvo rastlin, ob glavnih cestah velikih mest pa je zaradi prometnih izpuhov povečana vsebnost talnega svinca. Na Koprskem in Goriškem so presežene opozorilne vrednosti za nikelj in krom, vendar ne zaradi antropogenega delovanja, ampak zaradi naravnega procesa preperevanja flišne kamninske osnove. Med najbolj onesnažena območja tal pa spada Mežiška dolina, ki jo je prizadela dolgoletna rudniška in topilniška dejavnost ter ji pustila tla, onesnažena s svincem, cinkom in kadmijem, ki krepko presegajo kritično imisijsko vrednost (Porocilo o okolju ..., 2009; Suhadolc in sod., 2010). V Žerjavu so odkrili tudi onesnaženje tal, ki so bila izven dosega emisij tamkajšnje talilnice. Vzrok je deponija jalovine, na kateri se med izdelavo gramoza, drugih gradbenih surovin in njihovim transportom povzroča prašenje finih delcev in onesnaževanje okolice preko zraka (Zupan in sod., 2009).

Leta 2008 so se v Zgornji Mežiški dolini pričeli sanacijski ukrepi. Osredotočeni so bili na območja, ki so bila zaradi onesnaženosti na prioritetni listi, in na območja, kjer so bile v krvi otrok izmerjene povečane vsebnosti svinca. Sanacija je obsegala prekrivanje makadamskih površin z asfaltom in zamenjavo onesnažene zemlje na površinah, namenjenim otrokom (Zupan in sod., 2009).

## 2.2 REMEDIACIJA TAL

Obstajajo štiri možnosti, kako lahko ravnamo z onesnaženimi tlemi:

- Pustimo tla onesnažena in omejimo njihovo uporabo,
- onesnažilo imobiliziramo na mestu in izvajamo monitoring, da pravočasno preprečimo potencialne prenose onesnažila (zrak/voda/rastline),
- odstanimo onesnažena tla in jih shranimo na posebni deponiji ali pa
- odstranimo onesnažilo iz tal na samem mestu onesnaženja (*in situ*) ali tla izkopljemo in očistimo drugod (*ex situ*) (Abumaizar in Smith, 1999).

Za odstranjevanje onesnažil uporabljamo različne postopke remediacijskih tehnik (remediatio, -onis (lat.): zdraviti, odpravljati), ki jih izbiramo glede na lastnosti območja in tal, koncentracijo in vrsto onesnažila ter rabo tal (Mulligan in sod., 2001). Velikokrat se za bolj učinkovito odstranitev onesnažil remediacijske metode med seboj tudi kombinirajo. Pri izbiri metode pa ne gre zanemariti stroškovnega vidika, saj prav cena velikokrat pogojuje samo izvedbo remediacije (Khan in sod., 2004).

Pranje tal je enostavna in učinkovita metoda za odstranjevanje kovin, adsorbiranih v tleh (Ahn in sod., 2009), kar v glavnem kontrolirata procesa kationske izmenjave in specifične sorpcije (Cline in Reed, 1995). Temelji na ločevanju talnih delcev po velikosti in kemični ekstrakciji z vodnimi raztopinami surfaktantov, mineralnih kislin ali kelatorjev (Leštan in sod., 2008). Navadno se ga izvede *ex situ* (v reaktorju ali na koloni), tako da se onesnažena tla izkoplje, večje delce, kot so kamni in prodniki, spere z vodo in vrne v okolje, z ekstrakcijsko raztopino pa obdela frakciji melja in gline, ki navadno zadržujeta največje vsebnosti onesnažila. Polutant se izolira in odstrani ali razgradi, očiščena tla spere z vodo, da se odstrani rezidualni kontaminant in ekstrakcijsko sredstvo, ter se jih končno vrne na mesto izkopa (Abumaizar in Smith, 1999; Peters, 1999). Ta metoda je primerna za odstranjevanje kovin, delno hlapnih organskih snovi, PAH-ov, pesticidov in PCB-jev (Baziar in sod., 2013).

Uporaba vodnih raztopin surfaktantov in mineralnih kislin pri pranju tal sta že v polni uporabi, medtem ko so tehnologije pranja tal z uporabo kelatorjev še večinoma v fazi razvoja (Leštan in sod., 2008). Kisline raztapljajo karbonate in druge talne frakcije, na katere so adsorbirane kovine in izmenjujejo PTK iz površine talnih delcev, vendar pa z raztpljanjem mineralov močno spremenijo lastnosti tal in pospešijo mobilnost onesnažila (Abumaizar in Smith, 1999). Z ekonomskega stališča manj primerni kelatorji so ligandi z dvema ali več elektron donorskimi skupinami, ki tako lahko med ligandom in kovinskим ionom vzpostavijo več kot eno vez (Cline in Reed, 1995). Kelatorji iz trdne faze tal desorbirajo kovine in z njimi tvorijo močne vodotopne komplekse, te pa iz tal lahko odstranimo z uporabo tehnik pranja tal (Leštan in sod., 2008).

### 2.2.1 Pranje tal z raztopino EDTA

Med sintetičnimi aminopolikarboksilatnimi kelatorji se pri *ex situ* remediaciji najpogosteje uporablja EDTA in njegovi homologi, saj lahko interagirajo z večino toksičnih kovin (Begum in sod., 2012). Pri ekstrakciji kovin zelo uspešen EDTA je lahko dostopen in

relativno cenovno ugoden (Leštan in sod., 2008), odlikuje pa ga tudi visoka termodinamična stabilnost nastalih kovinskih kompleksov, dobra topnost kompleksov in navadno nizka adsorpcija kelatorja in njegovih kompleksov v tla (Mahvi in sod., 2005). Z razvojem metode je sedaj omogočen tudi recikel kelatorja kot tudi čiščenje in ponovna uporaba pralne ratopine kot procesne vode (Voglar in Lestan 2013; Pociecha in Lestan 2012).

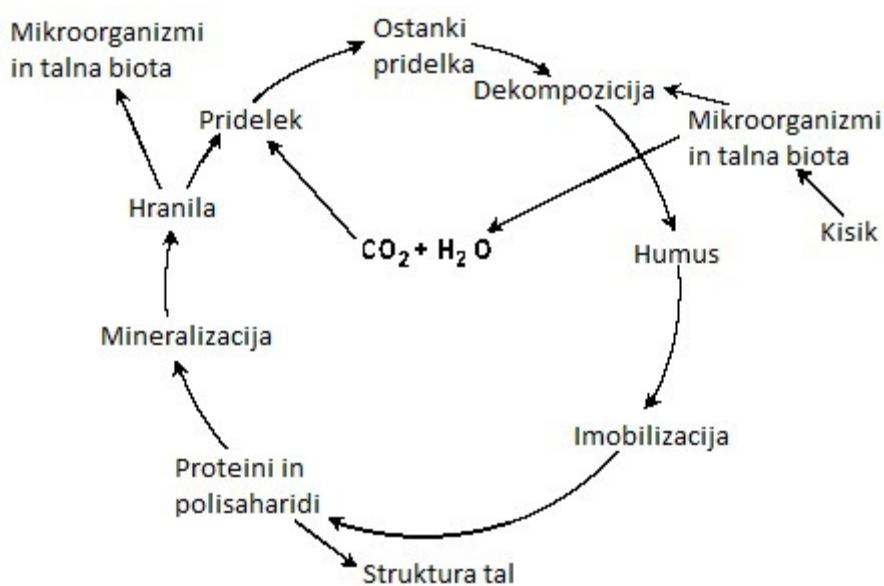
PTK v tleh navadno niso popolnoma dostopni za kelatorje. Z EDTA lahko iz tal ekstrahiramo bolj mobilne/biodostopne kemične oblike PTK, ki jih v postopku remediacije nadalje tretiramo, ne moremo pa ekstrahirati PTK, vezanih na silikatno talno frakcijo. Ti po remediaciji ostanejo v tleh in se nahajajo v kemično stabilnih mineralnih oblikah, vezani na nelabilno talno frakcijo. Kot taki so manj mobilni, manj biodostopni in zato tudi manj toksični v primerjavi s stanjem pred remediacijo (Leštan in sod., 2008; Udovic in Lestan, 2012). Ker pa so tla dinamičen sistem, na katerega vplivajo številni biotski (mikroorganizmi, rastline) in abiotični dejavniki (podnebni, hidrološki), se poraja vprašanje, ali je zmanjšana mobilnost in biodostopnost rezidualnih PTK v tleh trajna ali le začasna posledica remediacije tal (Leštan in sod., 2008).

Rezidualni EDTA, ki po poranju tal ostane v tleh, tako poraja številna ekološka vprašanja. Ker se EDTA uporablja predvsem v vodnih aplikacijah, obstaja nevarnost, da PTK, s katerimi tvori močne komplekse, izpira v podtalnico in pitno vodo, poleg tega pa je v okolju zelo obstojen (Egli, 2001). Sam EDTA se sicer ni izkazal kot toksičen (za *Photobacterium phosphoreum*, Microtox bioassay) in zaradi ekstremne kelatorkse kapacitete tudi ni smiselno navajati njegove toksičnosti v prosti anionski obliki. Nasprotno je kompleksiran s PTK kar 52 do 7700-krat bolj toksičen (odvisno od vrste kovine v kompleksu). Na toksičnost pa ne vpliva stabilnost kompleksov s PTK, temveč toksičnost in lastnosti same kovine. Železo na primer tvori zelo stabilen kompleks z EDTA, njegova toksičnost pa se je vseeno za kar trikrat povečala, medtem ko kompleksacija ni vplivala na toksičnost Cd in je celo znižala toksičnost Zn in Pb (Sillanpää in Oikari, 1996).

Kljudno je, da zelo dobrimi rezultati, ki jih EDTA dosega pri pranju tal (Voglar in Lestan, 2014), je potrebno preučiti učinke pranja tal tudi na mikrobne združbe in delovanje tal.

### 2.3 ORGANSKA SNOV TAL IN MINERALIZACIJA

Ogljik v naravi neprestano kroži med rastlinami, tlemi in atmosfero (Slika 1). V ogljikovem ciklu gre za neprestane transformacije organskih in anorganskih ogljikovih spojin: Rastline najprej s fotosintezo ogljik vežejo v organsko snov, ko pa odmrejo, odmrli rastlinski material v tleh pospeši biološko aktivnost. Tam se med razgradnjo organske snovi sproščajo energija, voda, hranila in CO<sub>2</sub>, ki se sprošča v atmosfero. Iz razgrajenega materiala se v procesu humifikacije sintetizirajo bolj kompleksne spojine, večina organske snovi pa se v procesu mineralizacije popolnoma razgradi do CO<sub>2</sub> in enostavnih molekul. Odvečna hranila mikroorganizmi pri tem sproščajo v talno raztopino, kjer so zopet dostopna rastlinam (Bot in Benites, 2005).



Slika 1: Shema ogljikovega cikla, ki ponazarja kroženje ogljika med tlemi, rastlinami in atmosfero, pri čemer pomembno vlogo igrajo mikroorganizmi (Bot in Benites, 2005: 5)

### 2.3.1 Organska snov tal

Organsko snov tal sestavljajo živi mikroorganizmi, različno razgrajeni rastlinski, živalski ostanki in ostanki mikroorganizmov, njihovi eksudati ter stabilizirane kompleksne organske spojine – humus (Bronick in Lal, 2005; Zech in sod., 1997). Ker je njen največji delež rastlinskega izvora, je sestava talne organske snovi odvisna od rastlinskih vrst in delov rastlin iz katerih nastaja (Berg in McClaugherty, 2008). Talna organska snov je nehomogena in jo sestavljajo številne spojine, zato pogosto za njeno določitev uporabljam analizo vsebnosti organskega C (Weil in Magdoff, 2004).

Organsko snov tal delimo na kemijsko nedefinirane huminske in kemijsko definirane nehuminske snovi. Slednje predstavljajo snovi s prepoznavnimi fizičnimi in kemičnimi lastnostmi, kot so ogljikovi hidrati, proteini, peptidi, aminokisline, maščobe, voski in organske kisline z nizko molekulsko maso (Schnitzer, 1975). V tleh so relativno neobstojne, saj se nekatere (sladkorji, nizkomolekularni fenoli, K, Mn) hitro raztopijo in izperejo iz organske snovi, porabljajo pa jih tudi hitro rastoči mikroorganizmi. Večje molekule, kot so celuloza, hemiceluloza in lignin, se razgrajujejo bolj počasi (Berg in McClaugherty, 2008).

Organska snov v tleh vrši številne pomembne funkcije. Huminske snovi prispevajo k rodotvornosti tal in skladiščijo ogljik na daljši rok, pri razgradnji nastale organske kisline pa prispevajo k preperevanju mineralnih tal. Organska snov je vključena v kroženje rastlinskih hranil, saj predstavlja njihov rezervoar in po mineralizaciji oskrbuje z N, P in S in drugimi hranili. Pri tem nastanejo tudi drugi vmesni produkti, ki kot vir energije in hranil služijo različnim mikrobnim populacijam, kar krepi raznolikost mikrobne združbe. Organska snov vpliva na puferno kapaciteto tal in pomaga pri zadrževanju vode, povečuje tvorbo stabilnih strukturnih agregatov in njihovo obstojnost ter povečuje sposobnost tal za zadrževanje hranil.

(CEC) (Berg in McClaugherty, 2008; Vaughan in Ord, 1985; Bot in Benites, 2005). Med razgradnjo organske snovi se v ozračje sproščajo pomembne količine CO<sub>2</sub>, zato je nastajanje in stabilnost humusa pomembno tudi iz okoljevarstvenega vidika (Schlesinger in Andrews, 2000).

### 2.3.2 Razgradnja organske snovi

Mineralizacija in imobilizacija organske snovi sta osnovna procesa vseh talnih heterotrofov, ki organski material izkoriščajo za pridobivanje energije in ogljika (Robertson in Groffman, 2007). Popolna razgradnja organske snovi poteče v aerobnih pogojih med aerobnim dihanjem in jo lahko ponazorimo z Enačbo 1, kjer CH<sub>2</sub>O predstavlja generičen organski material. Vendar pa organska snov poleg ogljika vsebuje tudi druga anorganska in mineralna hranila (npr. amonij, sulfat), ki se tako poleg CO<sub>2</sub> sproščajo pri razgradnji (Kirchman, 2012).



Ključen proces v prehranskem ciklu je pretvorba hranil, organsko vezanih v odmrlo biomaso, v enostavne, topne oblike, ki jih lahko privzamejo mikroorganizmi in rastline. To konverzijo vršijo mikroorganizmi, ki odmrlo organsko snov izkoriščajo primarno kot vir energije in ogljika za rast, kot stranski produkt pa sproščajo oz. mineralizirajo in imobilizirajo hranila (Robertson in Groffman, 2007) ter sintetizirajo metabolite (enostavne organske kisline, polisaharide, pigmente, ekstracelularne encime) (Sollins in sod., 1996).

Razgradnja organske snovi vključuje procese depolimerizacije in oksidacije, ki večje molekule (ogljkovi hidrati, poliaromatske snovi, lipidi in proteini), bodisi znotrajcelične ali v talni raztopini, razgradijo v manjše, manj kompleksne molekule, kot so karboksilne kisline, aminokisline in CO<sub>2</sub> (Sollins in sod., 1996). Berg in Matzner (1997) sta razgradnjo organske snovi razčlenila v tri faze in fazo nastanka humusa. V zgodnji fazi najprej poteka razgradnja topnih snovi ter snovi z nizko molekulsko maso. Sledi jim hemiceluloza, posebno tista z veliko vsebnostjo arabinana, nato dominira razgradnja celuloze, na koncu, ko zmanjka lahko razgradljivih snovi, pa prevladuje razgradnja lignina. Na to stopnjo povečana koncentracija makrohranil (N, P, S), ki so glavna limitirajoča hranila mikroorganizmov, deluje stimulativno, močan je vpliv klime, na vzorec razgradnje pa najverjetneje vpliva ureditev komponent v organskih vlaknih – mikroorganizmi namreč najprej razgradijo bolj dostopne ogljkovodike v zunanji strukturi. V pozni fazi, ko je organska snov že delno razgrajena, hitrost njene razgradnje določa hitrost razgradnje lignina. Dušik na razgradnjo lignina deluje zaviralno tako, da zavira *de novo* sintezo lignolitičnih encimov in reagira z ligninskimi ostanki, da tvori bolj odporne aromatske spojine. Vpliv klime je praktično ničen. Nerazgradljivih, stabilnih snovi v substratu je vedno več in v predhumusni fazi (humus-near) se stopnja razgradnje približa nuli (Berg in McClaugherty, 2008). Hitrost razgradnje s časom upada zaradi spremjanja razgrajajočega substrata, koncentracija slabše razgradljivih snovi (npr. lignina) in tudi dušika se namreč povečuje. Spremenja pa se tudi mikrobna združba, saj preživijo lahko le tisti mikroorganizmi, ki so sposobni tekmovati za substrat z določeno kemijsko sestavo (Berg, 2000). Med razgradnjo s kondenzacijo fenolov, ligninskih ostankov in privzetih hranil nastajajo tudi nove organske spojine. Vodotopne novonastale snovi

(DOC) se izperejo iz substrata, a lahko ostanejo v tleh, če se vključijo v humus ali adsorptivno vežejo na glinene delce. Stabilni ostanki pa tvorijo humus (Berg in McClaugherty, 2008).

Za sintezo proteinov, nukleinskih kislin in drugih celičnih komponent mikroorganizmi poleg ogljika potrebujejo tudi druga hranila, predvsem dušik, ki se med razgradnjo in mineralizacijo organske snovi sprošča v obliki amonijaka in drugih enostavnih, topnih molekul (Robertson in Groffman, 2007). Mineralizacija pomeni transformacijo organsko vezanih elementov (C, N, P, S) v anorganske komponente ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}^{4+}$ ,  $\text{NO}^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Če je organska snov bogata z dušikom, praviloma to pomeni C:N razmerje  $< 25:1$ , mikroorganizmi po privzemu ogljika zlahka zadostijo tudi svojo potrebo po dušiku, viške pa sproščajo v talno raztopino in mineralizacija organske snovi se nadaljuje. Če pa dušika v organski snovi primanjkuje (C:N  $> 25:1$ ), je mikroorganizmi ne morejo popolnoma razgraditi, saj za sintezo encimov potrebujejo dušik. Tako morajo dodaten topen dušik imobilizirati iz okolice, kar pa pomeni, da se količina rastlinam dostopnega dušika v talni raztopini zmanjšuje (Robertson in Groffman, 2007).

### 2.3.2.1 Encimski sistem, vključen v razgradnjo rastlinskih ostankov

Največji delež rastlinske biomase (35-50 %) predstavljajo celulozna vlakna, ki so v celični steni v matriks vključena skupaj z drugimi strukturnimi biopolimeri, primarno s hemicelulozo in ligninom. Koruzo (*Zea mays*) v polni zrelosti sestavlja približno 22 % surove vlaknine, 34 % hemiceluloze, 24 % celuloze, 5 % lignina, 33 % škroba, 3% surovega pepela, 3 % sladkorjev, 7 % surovih beljakovin, 2 % surove maščobe, C/N pa znaša 46 (predstavljeni so odstotki suhe mase) (Amon in sod., 2007). Največji del koruznice morfološko predstavljajo stebla (24 %), ki smo jih v našem poskusu uporabili kot modelno organsko snov (Verbič in sod., 1995).

Pri razgradnji celuloze sodelujejo tri glavne skupine hidrolitičnih encimov. To so endoglukanaze, eksoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze. Endoglukanaze (1,4- $\beta$ -D-glukan-4-glukanohidrolaze, EC 3.2.1.4) imajo v aktivnem mestu katalitične domene navadno brazdo ali razpoko, v katero se prilega kateri koli del celulozne verige. Ko prekrijejo celulozno verigo tako s cepljenjem naključnih glikozidnih vezi proizvaja različno dolge oligosaharide in tako nove nereducirajoče konce, ki so substrat za eksoglukanaze (celobiohidrolaze). Na reducirajočih ali nereducirajočih koncih celulozne verige dulujejo eksoglukanaze, njihovo aktivno mesto ima namreč obliko tunela in tako lahko verigo sprejmejo le preko njenih koncov. Med eksoglukanaze sodita skupina celobiohidrolaz (1,4- $\beta$ -D-glukan celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91), ki iz  $\beta$ -glukana odceplja disaharid celobiozo in skupina celodekstrinaz (1,4- $\beta$ -D-glukan glukanohidrolaze, EC 3.2.1.74), ki iz  $\beta$ -glukana ali celodekstrina odceplja glukozo. Končno  $\beta$ -glukozidaze ( $\beta$ -glukozid glukohidrolaze, EC 3.2.1.21) hidrolizirajo celobiozo in druge vodotopne oligosaharide (trioze in tetroze) do glukoze. Vsi trije tipi encimov delujejo sinergistično, kar jim omogoča razgradnjo tako kristalinične kot amorfne oblike celuloze (Pregl. 2) (Bayer in sod., 2006; Eriksson in Wood, 1985, cit. po Eriksson, 1990; Lynd in sod., 2002; Schwarz, 2001).

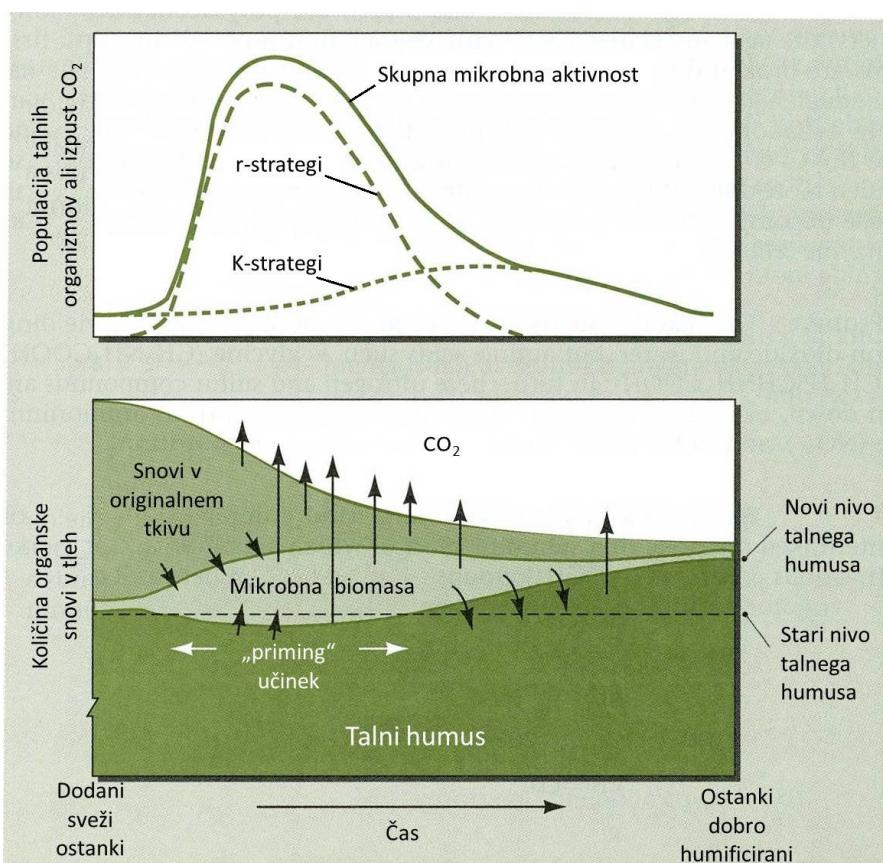
Ker je celična stena rastlin kompozit tako celuloze kot hemiceluloze in ker v naravi teh dveh tipov polisaharidov ne moremo zlahka ločiti, se morajo mikrobeni sistemi spopadati z obema hkrati. Tako so pri razgradnji netopne celuloze tudi hemicelulaze nujni sodelavci celulaz.  $\beta$ -D-ksilozidaze (EC 3.2.1.37) spadajo med hemicelulaze in iz nereducirajočega konca hidrolizirajo ksilo-oligosaharide (večinoma dimerne ksilobioze) do ksiloze. Številne ksilozidaze pa poleg  $\beta$ -ksilozidov hidrolizirajo tudi  $\beta$ -glikozide,  $\beta$ -galaktozide in  $\alpha$ -arabinozide ter delujejo na raznovrstnih substratih. Ti encimi so lahko intra- ali ekstracelularni (Bayer in sod., 2006).

Preglednica 2: Aktivnost celulaz na različnih substratih (Wood in Garcia-Campayo, 1991)

| Encim                | Kristalinična celuloza | Amorfna celuloza | Celulozni oligosaharidi | Celobioza |
|----------------------|------------------------|------------------|-------------------------|-----------|
| Celobiohidrolaze     | počasi                 | zelo aktivno     | aktivno                 | ne        |
| Endoglukanaze        | ne                     | zelo aktivno     | aktivno                 | ne        |
| $\beta$ -glukozidaze | ne                     | ne               | aktivno                 | aktivno   |

### 2.3.3 Sprožilni učinek

Mineralizacijo organske snovi v tleh lahko pospeši ali zavre interakcija med mikrobeno biomaso in dodanim/sveže odmrlim organskim materialom. V številnih študijah so po dodatku lahko razgradljive organske snovi v tla zasledili povečano razgradnjo talne organske snovi kot sproščanje talnega  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  ali  $\text{NO}_3^-$  v primerjavi z mineralizacijo v tleh brez organskega dodatka. Pojav, ki je v angleški literaturi poimenovan *priming effect*, pomeni kratkotrajne, a močno vidne spremembe v razgradnji talne organske snovi, ki jo povzročijo razmeroma majhne spremembe v tretiranju tal in jih pripisujemo povečani mikrobeni biomasi ali njihovi aktivnosti. Med sprožilnim učinkom se v zelo kratkem času v tla sprostijo ali se imobilizirajo velike količine C, N in drugih hranil. Pri pozitivnem sprožilnem učinku je mineralizacija pospešena, poznamo pa tudi negativni sprožilni učinek, pri katerem se hitrost mineralizacije upočasni. Poteka namreč imobilizacija, zaradi katere dodani C ali N ni dostopen. Pri pozitivnem sprožilnem učinku se takoj po dodatku lahko razgradljivih snovi mikrobena razgradnja skokovito poveča, a ne pride do sprememb v razgradnji talne organske snovi ali mikrobeni biomase, kar imenujemo vidni sprožilni učinek (*apparent priming*). Šele čez čas pa se v znatenem obsegu spremeni razgradnja organske snovi tal (sprememba toka  $\text{CO}_2$ ), čemur pravimo pravi sprožilni učinek (*real priming*) (Slika 2). Tako tudi po tem, ko je dodani substrat že izčrpan, nekateri mikroorganizmi ostanejo aktivni in naprej razgrajujejo organsko snov tal (humus) (Kuzyakov in sod., 2000; Kuzyakov, 2010).



Slika 2: Shema sprememb v tleh po dodatku sveže organske snovi. Puščice ponazarjajo izmenjavo ogljika. Med začetno hitro razgradnjo organske snovi se večina ogljika sprosti kot  $\text{CO}_2$ , nekaj pa se ga vključi v mikrobnato biomaso, njene produkte in potencialno v humus. Pospešena mikrobnata aktivnost pospeši tudi razgradnjo stabilne organske snovi tal (humusa), kar imenujemo sprožilni učinek (*priming effect*). Na koncu procesa pa je raven humusa glede na začetno stanje večja (Brady in Weil, 2008: 502).

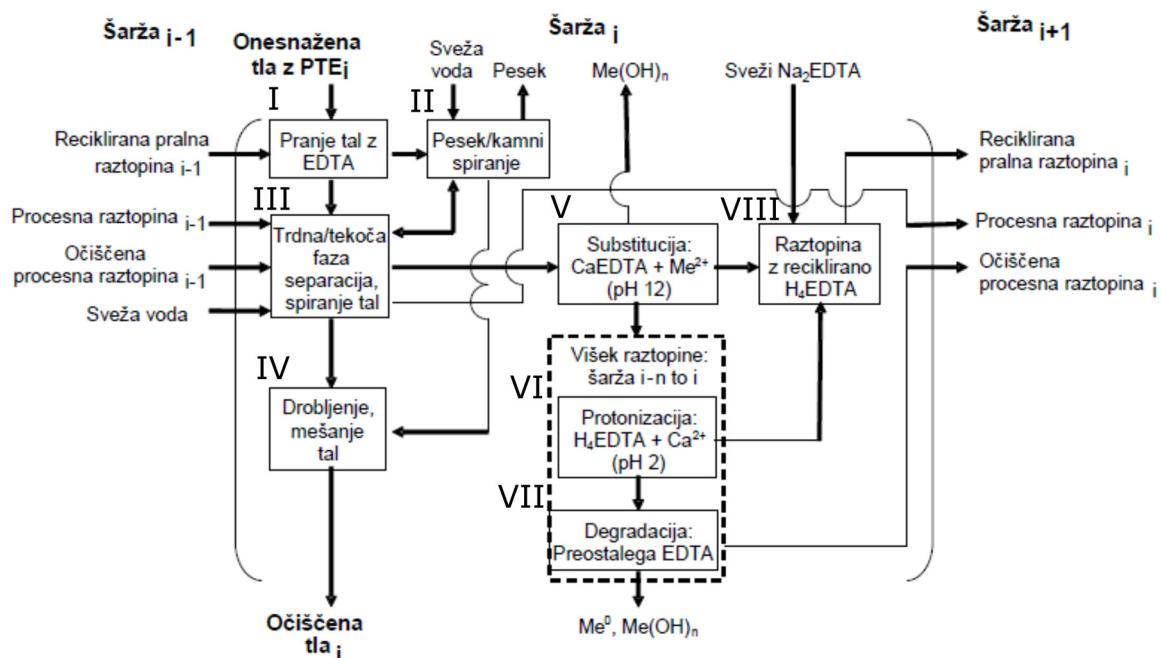
Vendar pa je sprožilni učinek najbrž še precej bolj kompleksen. V literaturi namreč lahko zasledimo veliko nasprotujočih si izsledkov raziskav. Predvsem presenetljivo je dejstvo, da je dodatek lahko razgradljivih snovi v tla, npr. glukoze, fruktoze in mineralnih hranil, povzročil ničen ali zelo majhen učinek na mineralizacijo talne organske snovi v primerjavi z ljljko, celulozo in pšenično slamo. Slednje namreč zaradi svoje polimerne strukture skladiščijo manj lahko dostopne energije in bi zato pričakovali tudi manjši »priming«. Tako Fontaine in sod. (2003) predlagajo razumevanje sprožilnega učinka z vidika tekme za energijo in hranila med mikroorganizmi, ki so specializirani za razgradnjo sveže organske snovi in tistih, ki razgrajujo polimerno organsko snov tal. Po dodatku sveže organske snovi namreč veliko specializiranih mikroorganizmov raste hitro in razgrajuje samo lahko dostopno svežo organsko snov, ki se v tla sprošča po razpadu mikrobnih, koreninskih in živalskih celic ter izpiranju topne organske snovi med razgradnjo. Na drugi strani pa mikroorganizmi, ki rastejo počasi, s proizvodnjo ekstracelularnih encimov razgrajujo bolj obstojne polimerne substrate, ki se v tleh zadržujejo dalj časa, razgradnja celuloze npr. traja nekaj tednov, in tako prispevajo predvsem k razgradnji talne organske snovi (Slika 2).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 TLA

V poskusu obravnavana originalna tla (Orig), onesnažena s Pb, Cd in Zn, izhajajo zelenjavnega vrta v Mežiški dolini, vzorčenega leta 2010, ki se nahaja v neposredni bližini nekdanje talilnice svinca ( $x = 489399$  m,  $y = 152300$  m, po Gauß-Krügerjevem koordinatnem sistemu). Vzorčena je bila zgornja 30 cm plast tal. Tla so bila do remediacije shranjena na prostem pod streho. Orig tla, remediirana 1 leto pred poskusom smo poimenovali starana remediirana tla (R-star), Orig tla, remediirana 2 meseca pred poskusom, pa sveže remediirana tla (R-svež).

Remediacija je potekala z metodo pranja tal s kelatnim ligandom etilendiamin tetraacetatom (EDTA) v osmih korakih, kot poročata Voglar in Lestan (2014) in je shematično prikazana na Sliki 3: (I) Ekstrakcija tal s 120 mmol raztopino EDTA  $\text{kg}^{-1}$ . 30 kg suhih tal smo ekstrahirali s 30 L raztopine kelata, pri čemer je bil uporabljen recikliran EDTA. Ekstrakcija tal je potekala v mešalcu betona 2 h; (II) Procesno goščo smo presejali skozi 2 mm sito in tako izločili večje kamenje, ki smo ga izprali najprej s procesno (korak (III)) in nato čisto vodovodno vodo ter ga zavrgli; (III) Ločevanje faz je potekalo v filtrni stiskalnici. Trdno fazo med ploščami filtrne stiskalnice smo sprali z 80 L vode, najprej z očiščeno procesno vodo in na koncu s čisto vodovodno vodo, da smo iz tal izprali vse potencialno toksične kovine, vezane na EDTA; (IV) Bloke remediiranih tal smo odstranili iz filtrne stiskalnice, jih z mlinom zmleli in presejali skozi 5 mm sito; (V) Procesno vodo iz koraka (III) smo naalkalili z dodatkom apna ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) do pH 12, pri čemer je prišlo do substitucije PTK s Ca, in precipitirane kovinske hidrokside odstranili s centrifugiranjem. Del procesne vode se je nato porabil za pripravo reciklirane raztopine za spiranje (korak (VIII)), del pa se je v sledečih korakih uporabilo za recikel EDTA in procesne vode; (VI) Kisla precipitacija (pH 1,8-2,2) EDTA zaradi dodatka  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , filtracija in sušenje omogočijo recikel večine kelata iz procesne vode ( $\text{H}_4\text{EDTA}$ ); (VII) Preostali manjši delež EDTA v procesni vodi smo oksidativno razgradili v elektrolitski celici z uporabo elektrokemijskih naprednih oksidacijskih procesov (ENOP), pri čemer se je EDTA oksidiral s hidroksilnimi radikalji ( $\cdot\text{OH}$ ), PTK pa so se oborile na grafitno katodo. Precipitirane PTK in grafit smo odstranili s filtracijo, posušili in preden smo jih zavrgli, stabilizirali z bitumnom, skupaj s peletom iz koraka (V). Očiščena procesna voda se tako nadalje uporablja za spiranje tal v koraku (III); (VIII) Ker zaradi absorpcije v tla v koraku (I) in oksidativne degradacije v koraku (VII) tekom procesa izgubljamo EDTA, ga moramo v raztopini za spiranje nadomestiti s svežim  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , da ohranjamo učinkovitost, podobno sveži 120 mmol  $\text{kg}^{-1}$  raztopini EDTA.



Slika 3: Procesna shema pranja tal z recikliranim EDTA in procesno raztopino (Voglar, 2013: 95)

Ker je bila v procesu remediacije pri R-star tleh peščena frakcija po koraku (II) nazaj primešana remediiranim tlem, pri R-svež tleh pa ne, smo Orig, R-star in R-svež tla presejali skozi 2 mm sito, da smo jih izenačili glede na vsebnost skeleta.

Orig in R-star tla so bila uporabljena v lončnem poskusu (Jelusic in sod., 2014b), pri katerem je bilo v vsak lonec z 8 kg suhih tal posejanih 20 semen špinače (*Spinacia oleracea*). Lonce so redno zalivali s približno 1800 mL vodovodne vode na teden. Po 45 dneh rasti v rastlinjaku so špinačo poželi in tla tedensko zalivali še šest mesecev, nadaljnje štiri mesece pa niso bila zalivana. Tla v poskusu niso bila gnojena.

### 3.2 ANALIZE TAL

Na Katedri za pedologijo in varstvo okolja na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete smo izvedli standardno pedološko analizo tal, z ekstrakcijo z zlatotopko določili vsebnost svinca, cinka, kadmija, mangana in železa ter s sekvenčnimi ekstrakcijami kovin ocenili dostopnost kovin v tleh. Določanje topnih oblik ogljika in dušika, merjenje encimske celulazne aktivnosti in analiza Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) pa so potekali na inštitutu Environmental genomics raziskovalnega centra Helmholtz Zentrum München, Nemčija.

#### 3.2.1 Standardna pedološka analiza

Pred določanjem osnovnih pedoloških lastnosti tal smo vzorce Orig, R-star in R-svež tal zračno posušili in jih presejali skozi 2 mm sito (ISO 11464, 2006).

### 3.2.1.1 Suha snov tal

Za določanje odstotka suhe snovi v tleh (% SS) smo tla zatehtali v steklene posodice in jih sušili na 105 °C do konstantne mase. Vzorce smo nato ohladili v eksikatorju, jih ponovno stehitali ter po spodnji enačbi izračunali odstotek suhe snovi v tleh (Enačba 2) (ISO 11465, 2003).

$$\% \text{ SS} = \frac{m(\text{suh vzorec})}{m(\text{svež vzorec})} \times 100 \quad \dots (2)$$

### 3.2.1.2 Merjenje pH

Analizo smo izvedli na podlagi standarda ISO 10390, 2005. Aktivnost H<sup>+</sup> ionov smo merili elektrometrično v suspenziji tal z raztopino 0,01 M CaCl<sub>2</sub> v volumskem razmerju 1:2,5 (tla:CaCl<sub>2</sub>).

### 3.2.1.3 Skupni organski C v tleh

Količino skupnega organskega ogljika v tleh (% org. C) smo določili z modificirano metodo mokre oksidacije po Walkley-Blacku (SIST ISO 14235, 1999). Metoda temelji na oksidaciji organske snovi v žvepleno kislem okolju ob dodatku oksidacijskega sredstva (kalijev dikromat) in redukciji do kromovega sulfata. Glede na vsebnost nastalega kromovega sulfata smo nato izračunali količino organskega ogljika v tleh. Po tej metodi ne določimo visoko kondenziranih oblik organskega ogljika in mineralnih oblik (karbonatov). Analizo smo izvedli v treh ponovitvah.

### 3.2.1.4 Skupna vsebnost N v tleh

Skupni dušik v tleh (% skupni N) smo določali po Kjeldahlovem postopku mokre oksidacije (SIS ISO 11261, 1996). Ta temelji na razgradnji organske snovi ob segrevanju talnega vzorca in žveplove kisline, pri čemer se v organski snovi vezan dušik reducira do amonijaka, ta pa se veže v amonsulfat. V Kjeldahlovi destilacijski aparaturi amonsulfat nato destiliramo ob dodatku natrijevega hidroksida. Pri tem se sprošča amoniak, ki ga zajamemo v borovo kislino. Destilat titriramo z raztopino žveplove kisline znane molarnosti in na osnovi porabe titranta izračunamo vsebnost skupnega dušika.

### 3.2.1.5 Izračun C/N razmerja

Razmerje ogljika in dušika v talnih vzorcih smo s pomočjo spodnje Enačbe 3 izračunali kot produkt deleža v talnih vzorcih določenega organskega ogljika in deleža ogljika v organski snovi (faktor), ki smo ga delili z deležem celokupnega dušika, določenega v talnih vzorcih.

$$C/N = \frac{\% \text{ org. C} \times 0,579}{\% \text{ skupni N}} \quad \dots (3)$$

### 3.2.1.6 Topne oblike C in N

Topne oblike C in N smo ekstrahirali z 0,01 M raztopnino CaCl<sub>2</sub> v razmerju tla:CaCl<sub>2</sub> = 1:5 (w:v) (DIN ISO 14240-2, 1999-10) in shranili na -18 °C do meritve. Topni organski ogljik (DOC in δ<sup>13</sup>C-DOC) smo v ekstraktih določili s tekočinskim kromatografom-IRMS (LC IsoLink in MAT 253, Thermo Fisher Scientific, Nemčija) po protokolu, modificiranem po Krummen in sod. (2004) ter Marx in sod. (2009). Kot izotopske standarde smo uporabili saharozo (sladkor), benzojsko kislino (organska kislina) in fenilalanin (aminokislina) z znanimi δ<sup>13</sup>C vrednostmi. Ti laboratorijski standardi so bili vključeni v vse meritve v rednih intervalih in v različnih koncentracijah C. Laboratorijski standardi so bili kalibrirani s sistemom IRMS/EA proti različnim mednarodnim standardom. Skupni topni dušik (TDN), nitratni (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), nitritni (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) in amonijski dušik (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) pa smo določili z analizatorjem s kontinuiranim pretokom (Skalar Analytical, Nizozemska).

### 3.2.1.7 Mikrobnna biomasa

Mikrobnno biomaso (C<sub>mik</sub>) smo določili z metodo kloroformne fumigacije z ekstrakcijo (DIN ISO 14240-2, 1999-10). Fumigacija s kloroformom (CHCl<sub>3</sub>) povzroči lizo mikrobnih celic in tako iz njih sprosti organske snovi. Kot opisano zgoraj za topne oblike C in N (3.2.1.6), je fumigaciji sledila ekstrakcija vzorcev s CaCl<sub>2</sub> (0,01 M, w:v = 1:5) in meritve DOC in δ<sup>13</sup>C-DOC s tekočinskim kromatografom-IRMS. Z izračunom razlike v DOC med fumigiranimi in nefumigiranimi vzorci (uporabljeni meritve za DOC, 3.2.1.6) smo določili vsebnost mikrobnega ogljika (Enačba 4). DOC<sub>f</sub> označuje ekstrahirani C po fumigaciji, DOC<sub>nf</sub> pred fumigacijo, k<sub>EC</sub> pa faktor ekstrakcije za C<sub>mik</sub> z vrednostjo 0,45.

$$C_{mik} = \frac{(DOC_f - DOC_{nf})}{k_{EC}} \quad \dots (4)$$

### 3.2.1.8 Rastlinam dostopna K in P

Lahko dostopni kalij (K<sub>2</sub>O) in fosfor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) smo določili z amon-laktatno metodo (ÖNORM L 1087, 1993). Najprej smo K in P ekstrahirali z amon-laktatno ekstrakcijsko raztopino (0,1 M amonlaktat in 0,4 M ocetna kislina, pH 3,7) in nato P določili kolorimetrično (PerkinElmer Lambda 25), K pa plamensko fotometrično (FLAPO 40). Meritve smo izvajali v treh ponovitvah.

### 3.2.1.9 Kationska izmenjalna kapaciteta tal

Ocene kationske izmenjevalne kapacitete v tleh smo podali kot vsoto bazično in kislo delujočih kationov. Izmenljive bazične katione (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) smo določali z uporabo amonacetatne ((NH<sub>4</sub>OAc, pH 7) ekstrakcije, pri kateri kationi iz ekstrakcijske raztopine izmenjajo katione, vezane na sorptivni del tal, ti pa tako prehajajo v talno raztopino. Sledi kvantitativno določanje kationov v ekstrakcijski raztopini. Za določanje izmenljivih kislo delujočih kationov smo tla tretirali z ekstrakcijsko raztopino BaCl<sub>2</sub> in trietanolamina (TEA)

pri pH 8, pri čemer je prišlo do substitucije H<sup>+</sup> ionov iz sorptivnega dela tal z Ba<sup>2+</sup> ioni, ter deloma tudi do substitucije Al<sup>3+</sup> ionov. Preostanek baze smo titrirali s solno kislino (HCl) (Soil survey ..., 2004).

### 3.2.1.10 Tekstura tal

Teksturo tal smo v treh ponovitvah določali po sedimentacijski pipetni metodi (ISO 11277, 2009). Ta metoda temelji na hitrosti usedanja delcev različnih velikosti v stoječi vodi. Teoretična osnova je Stokesov zakon, ki podaja zvezo med hitrostjo usedanja delcev in njihovo velikostjo. Sedimentaciji suspenzije sledi kvalitativno določanje utežnih deležev posameznih velikostnih skupin s tehtanjem (Suhadolc in sod., 2007).

### 3.2.1.11 Vodno zadrževalne lastnosti tal

Kapaciteto tal za zadrževanje vode smo merili v svežih homogeniziranih vzorcih tal, pripravljenih za mikrokozem poskus. Vzorce smo najprej navlažili do nasičenja z 48 urnim namakanjem v deionizirani vodi. Določili smo masni odstotek vode pri dveh matričnih potencialih, -0,33 (pF = 2,48) in -15 bar (pF = 4,2). Matrični potencial -0,33 bar predstavlja poljsko kapaciteto tal (PK), ko iz njih odteče vsa gravitacijska voda, ostane pa kapilarno in higroskopsko vezana voda. Točko venenja (TV) predstavlja matrični potencial -15 bar. Takrat se voda nahaja le v najmanjših mikroporah in rastline zaradi pomanjkanja njim dostopne vode trajno ovenijo. Razlika med temo dvema točkama označuje rastlinam dostopno vodo. Vodno zadrževalne lastnosti tal smo določali z uporabo visokotlačne komore s tlačno membrano, ki omogoča iztiskanje vode pod različnimi tlaki. Za izvedbo smo uporabili modificiran postopek standarda ISO 11274, 1998.

## 3.2.2 Določanje kovin Pb, Zn, Cd, Mn, Fe

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

### 3.2.3 Frakcijacija kovin v tleh

Frakcijacijo/porazdelitev kovin Pb, Cd in Mn v talnih frakcijah smo določili z modificirano šeststopenjsko Tessierjevo metodo sekvenčnih ekstrakcij (Leštan in sod., 2003). Prve frakcije avtorji označujejo kot šibkeje vezane na talne delce in zato mobilne ter biodostopne, medtem ko zadnjim frakcijam pripisujejo močnejšo vezavo na talne delce in tako tudi relativno nemobilnost in nedostopnost (Pregl. 3). V analizi smo tako vsako frakcijo tal ekstrahirali z reagentom, ki ponazarjajo vse ostrejše okoljske pogoje.

Preglednica 3: Postopek šeststopenjske sekvenčne ekstrakcije in ocena mobilnosti posameznih frakcij (Tessier in sod., 1979)

| Talna frakcija        | Ocena mobilnosti   | Ekstrakcijska raztopina   | Pogoji                                       |
|-----------------------|--|---|--|
| I) Vodotopna          | Močno mobilna  | 10 mL H <sub>2</sub> O  | 20 °C, 1 h, 200 rpm                          |
| II) Izmenljiva        | Močno mobilna  | 10 mL 1M MgNO <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O  | 20 °C, 2 h, 200 rpm                          |
| III) Karbonatna       | Srednje mobilna,<br>odvnisna od pH<br>okolja                       | 10 mL 1M NH <sub>4</sub> OAc (pH 5)   | 20 °C, 5 h, 200 rpm                          |
| IV) Fe- in Mn-oksidna | Srednje mobilna,<br>povišana v<br>anoksičnih pogojih<br>(nizek Eh) | 20 mL 0.1M NH <sub>2</sub> OH-HCl (pH 2)  | 20 °C, 12 h, 200 rpm                         |
| V) Organska           | Nizko mobilna,<br>povišana v<br>oksidirajočih<br>okoljih           | 3 mL 0,02 M HNO <sub>3</sub> + 5 mL 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>15 mL 1 M NH <sub>4</sub> OAc | 85 °C, 3 h segrevanje<br>20 °C, 2 h, 200 rpm |
| VI) Ostanek           | Zelo nizko<br>mobilen, kristalno<br>vezan                          | 21 mL HCl (37 %) + 7 ml HNO <sub>3</sub> (65 %)   | 2 h, segrevanje                              |

Kovine Pb, Cd in Mn smo ekstrahirali iz 1g zračno suhih tal, presejanih skozi 2 mm sito po postopku v Pregl. 3. Po vsakem koraku smo vzorce centrifugirali 30 min na 3200 x g, ekstrakte pa shranili na 4 °C do analize z atomskih absorpcijskim spektrometrom (AAS, Varian AA240FS). Ostanek smo sprali z 8 mL deionizirane vode in ga uporabili v naslednjem sekvenčnem koraku. Kontrolo meritev smo zagotovili s slepimi vzorci in standardnim referenčnim materialom. S primerjavo vsote koncentracij Pb, Cd oz. Mn v vseh šestih frakcijah s celokupno koncentracijo kovin po razklopu v zlatotopki smo izračunali delež kovin, ekstrahiranih s sekvenčnimi ekstrakcijami.

### 3.3 MIKROKOZEM POSKUS

Z mikrokozem poskusom smo merili hitrost mineralizacije organske snovi v Orig, R-svež in R-star tleh, in sicer z meritvami koncentracije z dihanjem nastalega CO<sub>2</sub> in izotopske sestave vzorcev. Opravili smo tudi pet vzorčenj mikrokozma in v vzorcih določili delež suhe snovi, mikrobiotsko (C<sub>mik</sub>), topne oblike C in N (DOC, TDN, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), aktivnost encimov C-cikla in strukturo mikrobnih združb z analizo T-RFLP. Poskus smo izvedli na inštitutu Helmholtz Zentrum Muenchen, v raziskovalni skupini Okoljska genomika (Environmental genomics), Nemčija.

R-svež tla so bila remediirana dva meseca pred začetkom mikrokozmu eksperimenta. V tem času smo Orig, R-svež in R-star tla kondicionirali in uravnnavali na podobno vsebnost vode. Štiri dni pred začetkom mikrokozma poskusa pa smo vlažnost tal uravnali na 70 % poljske kapacitete tal (PK). 6. dan poskusa se je vsebnost vode v tleh povečala na okrog 80 % PK in do konca poskusa upadala nazaj na začetno raven.

Kot organsko snov, ki smo jo dodali vzorcem v poskusu, smo uporabili tri posušena (105 °C preko noči) in s krogličnim mlinom zmleta steba koruze (*Zea mays*), nabранa 10 dni pred začetkom poskusa na posestvu Scheyern, Nemčija. Vsebovala so 2,90 ± 0,03 % N, 42,3 ±

0,4 % C, C/N razmerje je znašalo  $14,6 \pm 0,2$  in  $\delta^{13}\text{C} -12,49 \pm 0,06\text{ ‰}$  V-PDB. Kot kontrolna tla smo uporabili Orig, R-svež in R-star tla brez dodatka koruze.

Mikrokozm poskus smo izvedli v 30 mL steklenih vialah, kamor smo zatehtali 10 g suhih tal. K petim ponovitvam vsakega tipa tal smo, glede na splošno kmetijsko prakso v Sloveniji in delež ogljika v koruzi, primešali 30 mg koruze. Preostalih pet ponovitev vsakega tipa tal brez dodane koruze nam je služilo za kontrolo. Volumen tal smo uravnali na 10 mL, da smo se približali gostoti tal v Mežiški dolini ( $1,3 \text{ g cm}^{-3}$ ). Viale smo položili na mrežo eksikatorja, pod katero smo za ohranjanje vlage dali čašo z vodo in ga pokrili z aluminijasto folijo, ki smo jo vsak dan za nekaj ur odkrili, da ni prišlo do anaerobnih razmer. Mikrokozem poskus je potekal 28 dni na  $14^\circ\text{C}$ .

Opravili smo 5 vzorčenj tal tekom mikrokozemu poskusa (dan 0, 2, 6, 13 in 28), kjer dan 0 sicer pomeni vzorčenje tik po dodatku koruze, praktično pa so bile meritve izvedene približno pol dneva po dodatku. Analize talnih parametrov smo opravili na svežih tleh, za T-RFLP analizo in analizo encimske aktivnosti pa smo vzorce tal zamrznili na  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.3.1 Mineralizacija organske snovi

Hitrost mineralizacije organske snovi v mikrokozmu smo spremljali z meritvami koncentracije nastalega  $\text{CO}_2$  in njegove izotopske sestave. Zastopanost  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$  in koncentracije  $\text{CO}_2$  smo merili z masnim spektrometrom izotopskih razmerij (IRMS, delta plus, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Nemčija), sklopljenim s plinskim kromatografom. Steklene viale iz mikrokozma smo najprej prepahali z zrakom, da smo osvežili atmosfero, jih neprodušno zaprli z gumijasto septo in jih inkubirali ( $14^\circ\text{C}$ ) na posebnem pladnju, sklopljenim z vzorčevalnikom CombiPAL autosampler (CTC, Zwingen, Švedska). Kot izotopski standard je bil uporabljen  $\text{CO}_2$  z znano izotopsko sestavo, raztopljen v heliju. Ta  $\text{CO}_2$  je bil s sistemom z dvojnim dovodom kalibriran proti mednarodnim  $\text{CO}_2$  standardom RM 8562, RM 8563 in RM 8564 (IAEA, Dunaj). Meritve smo izvedli na dan 0, 1, 3, 4, 5, 6, 9, 13, 16, 20, 23 in 27 pri 30 naključno izbranih vzorcih hkrati. Ob predpostavki, da ves  $\delta^{13}\text{C}$  v sproščenem  $\text{CO}_2$  prihaja iz tal in iz dodane koruze, smo določili tudi delež  $\text{CO}_2$ , ki se je mineraliziral iz koruze (Enačba 5) oz. iz tal (Enačba 6). Pri določanje koncentracij  $\text{CO}_2$  smo porabili tri interne standarde, kot izotopski standard pa je bil uporabljen  $\text{CO}_2$  z znano izotopsko sestavo, raztopljen v heliju.

$$\text{relativni delež } \text{CO}_2 \text{ iz koruze} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{+\text{C}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{kont.}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{koruza}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{kont.}}} \quad \dots (5)$$

$$\text{relativni delež } \text{CO}_2 \text{ iz tal} = (1 - (\text{relativni delež } \text{CO}_2 \text{ iz koruze})) \quad \dots (6)$$

$\delta^{13}\text{C}_{+\text{C}}$  ..... vrednost  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$  v vzorcu z dodano korupo

$\delta^{13}\text{C}_{\text{kont.}}$  ..... vrednost  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$  v kontroli brez dodane koruze

$\delta^{13}\text{C}_{\text{koruza}}$  ... vrednost  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$  koruze

### **3.3.2 Analiza dolžinskih polimorfizmov terminalnih restrikcijskih fragmentov (Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP))**

Analiza dolžinskih polimorfizmov terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) je molekularna metoda, s katero lahko ocenimo genetske razlike med skupinami organizmov. Kot naznanja že samo ime, meri dolžinske polimorfizme terminalnih restrikcijskih fragmentov, nastalih s pomnoževanjem v verižni reakciji s polimerazo (Polymerase chain reaction, PCR) genetskega markerja. Uporabi se lahko kateri koli marker, ki ima konzervirane sekvene domen in je primeren za aplikacijo z oligonukleotidnimi začetniki. Najpogosteje je v uporabi visoko konzerviran filogenetski marker 16S rRNK, ki je zaradi relativno velike podatkovne baze njegovih sekvenc idealen kandidat. Po izbiri oligonukleotidnih začetnikov in PCR pomnoževanju izbranega genetskega markerja pa sledi restrikcija s skrbno izbrano restrikcijsko endonukleazo. Ta proizvaja terminalne fragmente, ki jim velikost določamo na sekvenčnih gelih/gelih za sekvenciranje visoke resolucije ( $\pm 1$  baza). Dimenzioniranje poteka na avtomatiziranih sistemih z digitalnim rezultatom, kot so ABI gelski ali kapilarni elektroforezni sistemi. Uporaba fluorescentno označenih oligonukleotidnih začetnikov omejuje analizo samo na terminalne fragmente, nastale med restrikcijo, njihovo dimenzioniranje pa je zelo natančno zaradi uporabe velikostnega markerja, ki vsebuje od vzorca različen fluorofor in je vključen pri detekciji skozi celotno analizo.

Analiza T-RFLP sestoji iz več korakov. Najprej smo ekstrahirano DNA pomnožili v PCR reakciji s fluorescentno označenim oligonukleotidnim začetnikom in pomnožke nato razrezali z restrikcijskim encimom, specifičnim za arheje, bakterije in glive. Fragmente smo nato ločili na gelu za sekvenciranje in odčitano fluorescenco obdelali s programsko opremo (Genemapper, T-REX).

#### **3.3.2.1 Sočasna ekstrakcija DNK in RNK**

Sočasno ekstrakcijo DNK in RNK smo izvedli pri treh vzorčenjih mikrokozma (dan 0, 13 in 28) po modifiranim Luedersovem protokolu (Lueders in sod., 2004). Sočasno ekstrakcijo smo izvajali na ledu. Liza vzorcev tal je potekala v tubici Lysing Matrix E (MP biomedicas) z ekstrakcijskim pufom NaPO<sub>4</sub> (150 mM, pH 8) in TNS (pH 8) ter 30 s homogenizirali (bead beating) (Precellys 24 lysis and homogenization, Bertin technologies, Francija) pri hitrosti 5,5 ms<sup>-1</sup>. DNK in RNK smo iz supernatanta ekstrahirali z mešanico fenol:kloroform:izoamilni alkohol (25:24:1, pH 8) in ekstrakcijo za boljšo uspešnost ponovili z mešanico kloroform/izoamilni alkohol (24:1). Supernatant z ekstraktom DNK/RNK smo precipitirali s PEG (2 h). Pelet smo nato sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, etanol previdno odpipetirali in pelet sušili v vakuumski centrifugri (Speed Vac concentrator, Nemčija) 3-5 min. Ekstrakt DNK/RNK smo resuspendirali v 50 µL DEPC vode in inkubirali 30 min na sobni temperaturi. Koncentracijo kokestahirane DNK/RNK smo izmerili z NanoDropom 1000 (Peqlab biotechnologie, Nemčija) in ga shranili na -20 °C.

Za separacijo in čiščenje DNK in RNK smo uporabili AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. DNK, ki se je zadržala na membrani AllPrep spin kolonic, smo

do čiščenja DNK shranili na 4 °C in najprej izvedli čiščenje RNA. Ta se je nahajala v eluatu, ki se je izločil skozi AllPrep spin kolonice. Za manjšo kontaminacijo z DNK smo opravili še digestijo z DNazo I (Qiagen), s katero smo eluat z RNK inkubirali na membrani kolonice RNeasy mini 20 min. RNK smo po čiščenju raztopili v 30 µL DEPC vode, DNK pa v 100 µL pufra EB in na NanoDropu izmerili njune koncentracije. V RNK vzorcih smo preverili potencialno kontaminacijo z DNK s PCR reakcijo (glivni oligonukleotidni začetniki, poglavje 3.2.6.3). Vzorce smo shranili na -80 °C.

### 3.3.2.2 Reverzna transkripcija izolirane RNK

Za sintezo cDNA smo uporabili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. Reverzno transkripcijo smo izvajali po programu termobloka v Pregl. 4.

Preglednica 4: Program termobloka za reverzno transkripcijo vzorcev RNK

| Korak       | 1      | 2       | 3     | 4    |
|-------------|--------|---------|-------|------|
| Temperatura | 25 °C  | 37 °C   | 85 °C | 4 °C |
| Čas         | 10 min | 120 min | 5 s   | ∞    |

### 3.3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

V vzorcih DNA (izolirane koncentracije 32-158 ng µL<sup>-1</sup>) smo pomnoževali 16S rRNK gen arhej in bakterij ter gen za ITS regijo (internal transcribed region) gliv. Za pomnoževanje bakterijske 16S rRNK regije smo uporabili par oligonukleotidnih začetnikov (Metabion International, Nemčija):

- **27f-FAM** (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3') in
- **1401r** (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'),

za 16S rRNK gen arhej smo uporabili par oligonukleotidnih začetnikov (Metabion International, Nemčija):

- **109f-FAM** (5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3') in
- **934r** (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCCT-3'),

za glivno ITS regijo pa oligonukleotidna začetnika (Metabion International, Nemčija):

- **ITS1f-FAM** (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') in
- **ITS4r-HEX** (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

PCR reakcije smo izvajali z neoznačenimi levimi in s fluorescentno značko (FAM) označenimi desnimi oligonukleotidnimi začetniki, da smo pomnožke kasneje v sekvenčni reakciji lahko detektirali. Le pri pomnoževanju glivne genske regije smo uporabili tudi leve fluorescentno označene (HEX) oligonukleotidne začetnike. V reakcijski mešanici za PCR reakcijo (Pregl. 5) smo uporabili komercialni kompleti reagentov TopTaq DNA Polymerase (Qiagen, Nemčija) in mešanico deoksiribonukleotid trifosfatov (dNTP) (Thermo Scientific, Nemčija). V PCR reakciji smo uporabili 20-krat redčeno DNK pri PCR arhej in bakterij, pri PCR glivne regije DNK nismo redčili.

Preglednica 5: Sestava PCR mešanic za pomnoževanje odsekov DNK arhej (Arh), bakterij (Bac) in gliv (Gliv)

| Reagent                       | Arh 16S rRNK | Bac 16S rRNK | Gliv ITS rRNK |
|-------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>Pufer</b>                  | 1x           | 1x           | 1x            |
| <b>Coral Load Concentrate</b> | 1x           | 1x           | 1x            |
| <b>Q-Sol</b>                  | 0,5x         | 0,5x         | /             |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>       | 3 mM         | /            | 1 mM          |
| <b>dNTP</b>                   | 0,2 mM       | 0,1 mM       | 0,2 mM        |
| <b>F oligonuk. začetnik</b>   | 10 pmol      | 10 pmol      | 10 pmol       |
| <b>R oligonuk. začetnik</b>   | 10 pmol      | 10 pmol      | 10 pmol       |
| <b>TopTaq</b>                 | 1,25 U       | 2,5 U        | 1,25 U        |
| <b>Končni volumen</b>         | <b>50 µL</b> | <b>50 µL</b> | <b>50 µL</b>  |

50 µL PCR mešanico, ki je vsebovala 10-20 ng matrične DNK, smo inkubirali v cikličnem termobloku (PeqSTAT 96 universal, Peqlab biotechnologie, Nemčija) po programih, prikazanih v Pregl. 6. Vsaki reakciji smo vedno dodali po tri negativne kontrole (DEPC voda).

Preglednica 6: Programi termobloka za PCR reakcijo 16S rRNK genov arhej (Arh) in bakterij (Bak) ter ITS regije gli (Gliv)

| Korak/Temperatura, čas      | Arh 16S rRNK  | Bak 16S rRNK  | Gliv ITS rRNK |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Začetek</b>              | 94 °C, 3 min  | 94 °C, 3 min  | 94 °C, 4 min  |
| <b>Denaturacija</b>         | 94 °C, 60 s   |               |               |
| <b>Prileganje</b>           | 62 °C, 60 s   | x 20          |               |
| <b>Podaljševanje</b>        | 72 °C, 60 s   |               |               |
| <b>Denaturacija</b>         | 94 °C, 60 s   | 94 °C, 60 s   | 94 °C, 45 s   |
| <b>Prileganje</b>           | 52 °C, 60 s   | x 10          | 55 °C, 45 s   |
| <b>Podaljševanje</b>        | 72 °C, 60 s   | 72 °C, 60 s   | x 32          |
| <b>Končno podaljševanje</b> | 72 °C, 10 min | 72 °C, 10 min | 72 °C, 5 min  |
| <b>Pavza</b>                | 4 °C, ∞       | 4 °C, ∞       | 4 °C, ∞       |

Po PCR reakciji smo vzorce analizirali z agarozno gelsko elektroforezo, da smo preverili prisotnost in jakost elektroforetskih lih po pomnoževanju 16S oz. ITS regije. 2 % agarozni gel smo pripravili v 1x TAE pufru (2 M Tris, 50 mM EDTA, 5,7 % ledocetna kislina, pH 8, 50-krat redčen) in dodali etidijev bromid (0,03 µL/mL). Ker je etidijev bromid fotosenzitiven, prav tako pa tudi fluorescentne značke oligonukleotidnih začetnikov, smo vse nadaljnje korake izvajali v temi. Gel smo prenesli v elektroforetsko kadičko, ga prelili z 1x TAE pufrom in v žepke gela nanesli vzorce, negativne kontrole in velikostni marker (1 kb, Fermentas). Elektroforezo (Consort E835, 300 V-500 mA) smo pustili teči 35 min pri 120 V. Agarozni gel smo nato prenesli v transiluminator (Gel documentation system, Biostep dark hood DH-40/50, Felix 600) in ga fotografirali ter preverili, ali so elektroforetske lise vidne pri vseh vzorcih. Za vzorce z manjkajočimi in zelo slabo vidnimi lisami smo PCR reakcijo ponovili.

Po agarozni gelski elektroforezi smo vzorce čistili s QIAquick PCR Purification Kitom z uporabo vakuumski črpalke (vacuum manifold, Qiagen), da smo odstranili ostanke reagentov iz PCR reakcije. Postopali smo po navodilih proizvajalca. PCR produkte smo po čiščenju raztopili v 30 µL EB pufra in z NanoDropom pomerili koncentracijo DNA. Do nadaljevanja smo vzorce shranili na -20 °C.

### 3.3.2.4 Razrez PCR pomnožkov z restriktijskim endonukleazami

Pomnožene in očiščene fragmente smo razrezali s specifičnimi restriktijskimi endonukleazami (RE):

- S *Hha I* pomnožene fragmente arhej (restriktijsko mesto: 5'...GCG↓C...3'),
- z *MspI* fragmente bakterij (restriktijsko mesto: 5'...C↓CGG...3'),
- s *HpyCH4IV* fragmente gliv (restriktijsko mesto: 5'...A↓CGT...3').

Restriktijsko mešanico smo pripravili na ledu, kot je opisano v Pregl. 7. Do končnega volumna smo jo dopolnili z DEPC vodo. Restriktijsko reakcijo smo inkubirali 3 h (arheje, bakterije) oz. 2 h (glive) na 37 °C ter reakcijo inaktivirali z 20 min na 65 °C.

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za encimsko restriktijsko reakcijo PCR pomnožkov. Za fragmente arhej (Arh) smo uporabili pufer Buffer4 (Thermo Scientific) in encim *HhaI* (New England Biolabs), za bakterije (Bak) Tango Buffer (Thermo Scientific) in encim *MspI* (Thermo Scientific), za glive (Gliv) pa Cut Smart Buffer (New England Biolabs) in encim *HpyCH4IV* (New England Biolabs). Pri arhejah in bakterijah smo uporabili BSA (New England Biolabs).

| Reagent               | Arh                 | Bak                 | Gliv                |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Pufer</b>          | 1x Buffer4          | 1x Tango Buffer     | 1x Cut Smart Buffer |
| <b>BSA</b>            | 1x                  | 1x                  | /                   |
| <b>RE</b>             | 0,2 µL              | 0,2 µL              | 1 µL                |
| <b>PCR pomnožek</b>   | 200-400 ng/reakcijo | 200-400 ng/reakcijo | 200-400 ng/reakcijo |
| <b>Končni volumen</b> | <b>25 µL</b>        | <b>25 µL</b>        | <b>25 µL</b>        |

Po restriktijski razrezani fragmenti smo očistili z MinElute Reaction Cleanup Kitom (Qiagen, Nemčija) z uporabo vakuumski črpalke po navodilih proizvajalca in jih raztopili v 10 µL EB pufra. Koncentracijo razrezanih fragmentov smo izmerili z NanoDropom in jih do nadaljevanja shranili na -20 °C.

### 3.3.2.5 Priprava plošče in analiza T-RFLP

Za T-RFLP analizo smo razrezane PCR pomnožke razredčili na 4 ng µL<sup>-1</sup> in jih po 1 µL odpipetirali v mikrotitrsko ploščo za sekvenciranje (96 luknjic). Pripravili smo 1:500 (v/v) raztopino internega velikostnega markerja (MapMarker 1000 Rox Size Standard, Bio-Ventures, Tennessee) v Hi-Di formamidu (Applied Biosystems, Kanada) in jo dodali vzorcem na plošči. V termobloku smo ploščo z vzorci denaturirali 5 min na 95 °C in jo takoj postavili na led. Signale fluorescentno označeneih terminalnih restriktijskih fragmentov (T-

RF) smo odčitali s kapilarnim sekvenatorjem (ABI 3730 48 DNA Analyzer, Life Technologies, Nemčija).

### 3.3.3 Encimska aktivnost

Pri vsakem vzorčenju mikrokozm eksperimenta smo določali tudi aktivnost treh encimov C-cikla:  $\beta$ -glukozidaz, celobiohidrolaz in ksilozidaz. Uporabili smo fluorescentno metodo (Radl in sod., 2005), temeče na analogu substrata, ki se mu po encimski cepitvi spremeni fluorescensa, kar lahko merimo. Uporabili smo substrate, ki temeljijo na 4-metilumbeliferonu (MUF), ta pa je vezan na določene sladkorje. Medtem, ko molekula substrata ne fluorescira, pa sam MUF daje močen fluorescenten signal (na svetlobi razpada, zato z njim rokujemo v temi), po tem, ko endonukleaza odcepi sladkorno molekulo. Pri MUF-substratih je povečanje fluorescence proporcionalno deležu MUF, ki se sprosti po encimski cepitvi substrata. V testu smo uporabili naslednje substrate: 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glukozid (MUF- $\beta$ -D-glukozid) za določanje  $\beta$ -glukozidazne aktivnosti, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -celobiozid (MUF- $\beta$ -D-celobiozid) za določanje celobiohidrolazne aktivnosti in 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-ksilopiranozid (MUF- $\beta$ -D-ksilopiranozid) za določanje ksilozidazne aktivnosti (Pregl. 8). Ker je fluorescensa močno odvisna od pH (merjenje MUF optimalno pri pH > 9), smo inkubacijo z encimom sicer izvajali pri pH tal, pred merjenje fluorescence pa smo vzorce naalkalili.

Koncentracijo substrata v encimskem testu smo določili s saturacijsko krivuljo, in sicer za vsaka tla posebej. Tako smo namreč določili koncentracijo (Pregl. 8), pri kateri je substrat saturiran in ga je dovolj, da encimski test do konca poteka brez inhibicij (prehod eksponentne v stacionarno fazo). Določili smo tudi optimalni čas inkubacije, po katerem se razvije dovolj močna fluorescensa, primerena za merjenje (Pregl. 8).

Preglednica 8: Celulaze, katerih aktivnost smo določali v vzorcih mikrokozm eksperimenta, substrati, s katerimi smo jih določali, njihove koncentracije in čas inkubacije encimskega testa

| Encim                | Substrat                       | Koncentracija substrata [ $\mu$ M] | Čas inkubacije [h] |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| $\beta$ -glukozidaza | MUF- $\beta$ -D-glukozid       | 400                                | 2                  |
| Celobiohidrolaza     | MUF- $\beta$ -D-celobiozid     | 400                                | 2                  |
| Ksilozidaza          | MUF- $\beta$ -D-ksilopiranozid | 600                                | 1,5                |

Encimsko aktivnost smo merili v talni suspenziji, ki smo jo pripravili za vse tri tipe tal (Orig, R-svež., R-star) iz zamrznjenih (-80 °C) vzorcev iz mikrokozm poskusa. En teden pred izvedbo encimskega testa smo vzorce počasi odtajali na ledu in jih klimatizirali na 14 °C, da smo se približali stanju in temperaturi tal pred zamrzovanjem. Če je odstotek vode v tleh precej odstopal od 70 % poljske kapacitete, smo tla navlažili. Talno suspenzijo smo pripravili iz 0,5 mg tal in 40 mL miliQ vode, 15 min stresali na prekucnem mešalniku in 3 min suspendirali v ohlajeni ultrasonični kopeli. Večje talne delce smo odstranili s filtriranjem skozi filter iz blaga. 50  $\mu$ L talne suspenzije smo nato odpipetirali v črno mikrotitrsko ploščo in ji v klimatizirani sobi (21 °C) dodali 100  $\mu$ L substrata ter v stresalniku za mikrotitrsko ploščo (Dynatech, Nemčija) v temi inkubirali 1,5 h oz. 2 h. Encimsko reakcijo smo nato ustavili s 100  $\mu$ L pufra Tris (1 M, pH > 10) (Pregl. 9). Delce talne suspenzije smo s kratkim

centrifugiranjem (2420 x g, 5 min, 20 °C) posedli in nato merili fluorescenco (SpectraMax Gemini EM microplate reader, Molecular devices, USA) pri  $\lambda_{\text{ex}}$  365 nm (širina zdrsa 5 nm) in  $\lambda_{\text{em}}$  450 nm (širina zdrsa 5 nm).

Da smo lahko moč fluorescentnega signala preračunali v koncentracijo MUF (velja za linearno odvisnost), smo naredili kalibracijsko krivuljo. Različne organske molekule v tleh namreč lahko reagirajo z elektroni molekule MUF in tako spreminjač moč fluorescentnega signala (dušenje ali autofluorescenco). Za vsak tip tal oz. za vsako mikrotitrsko ploščo z vzorci smo naredili svojo kalibracijsko krivuljo. Pripravili smo jo iz seta redčitev MUF v 2-metoksietanolu (0, 100, 200, 300, 400, 500 in 600 pmol ( $100 \mu\text{L}^{-1}$ ) in jih odpipetirali po 100  $\mu\text{L}$ /luknjico ter dodali 50  $\mu\text{L}$  talne suspenzije na luknjico. Nadaljnji koraki – inkubacija, dodatek stop pufra Tris, centrifugiranje in merjenje fluorescence so enaki in so se izvajali hkrati s tretiranimi vzorci.

Z upoštevanjem kalibracijske krivulje in autofluorescence substrata smo iz fluorescenc vzorcev izračunali encimsko aktivnost v pmol MUF ( $\text{mg suhih tal})^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Enačbe 7-10).

$$X_1 = \text{izmerjena fluorescenza vzorca} \quad \dots (7)$$

$$X_2 = \frac{X_1 - \text{autofluorescenza substrata}}{0,5 \text{ mg} \times \text{suha masa tal}} \quad \dots (8)$$

$$X_3 = \frac{(X_2 - n)}{k} \quad \dots (9)$$

$$X_4 = \frac{X_3}{t_{\text{inkubacije}}} \quad \dots (10)$$

X<sub>2</sub> ... fluorescenza vzorca ( $\text{mg suhih tal})^{-1}$

n ..... začetna vrednost kalibracijske krivulje

k ..... naklon kalibracijske krivulje

X<sub>4</sub> ... encimska aktivnost [pmol MUF ( $\text{mg suhih tal})^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]

Preglednica 9: Shema pipetiranja inkubacijskih raztopin za merjenje encimske aktivnosti v črni mikrotitrski plošči

| Raztopina                            | Vzorec [ $\mu\text{L}$ ] | Kalibracijska krivulja [ $\mu\text{L}$ ] | Avtofluorescenza mikrotitrske plošče [ $\mu\text{L}$ ] |
|--------------------------------------|--------------------------|--|--|
| Talna suspenzija                     | 50                       | 50                                       |  |
| milliQ voda                          |                          |  | 150  |
| Kalibracijske raztopine MUF          |                          | 100                                      |  |
| Prenos v klimatizirano sobo na 21 °C |                          |  |  |
| Substrat                             | 100                      |  |  |
| Stop pufer Tris                      | 100                      | 100                                      | 100  |

### 3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili programa R (R Core Team, 2013). Talne parametre (Pregl. 11) in aktivnosti encimov celobiohidrolaz,  $\beta$ -glukozidaz in ksilozidaz smo analizirali z enosmernim ANOVA testom za analizo varianc in Duncanovim testom. Razlike med rezultati smo smatrali za signifikantne pri  $p < 0,05$ . Če pri analizi točke venenja pri izvebi ANOVE enakih varianc ni uspela prikazati nobena transformacija, smo uporabili permutacijski test in nato t-test za pare.

Rezultate talnih parametrov med mikrokozem poskusom smo zbrali v matriki s 150 vrsticami (vzorci) in 273 kolonami (spremenljivke). Vzorce smo razvrstili glede na tri eksperimentalne faktorje: tla (Orig, R-svež, R-star; vsaka tla 50 vzorcev), obravnavanje (dodatek koruze (+C) in kontrola brez dodatka; vsako tretiranje 75 vzorcev) in čas vzorčenja (dan 0, 2, 6, 13, 28; v analizi DNK, RNK in TRF samo dan 0, 13, 28; vsaka časovna točka 30 vzorcev). Za analizo talnih parametrov: odstotek WHC, TOC, DOC, C<sub>mik</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, TDN, DNK in RNK ter encimsko aktivnost CEL, XYL in  $\beta$ -glu smo uporabili univariatni ANOVA in LSD test (with multiple test correction). Kot faktorje smo uporabili tip tal, obravnavanje in čas vzorčenja, izključili smo osamelec R-star+C v času 0 in za mejo signifikantnosti uporabili  $p < 0,01$ . Rezultati za nitrit so bili binerizirani (glede na vrednosti pod in nad mejo detekcije) in analizirani s kontingenčnim Fisherjevim testom.

Vse talne parametre in encimske aktivnosti smo primerjali v multivariatni analizi in jih prikazali z analizo glavnih komponent (PCA) in diagonalno diskriminantno analizo.

Rezultate mineralizacije oz. produkcije CO<sub>2</sub> med mineralizacijo v mikrokozm poskusu smo logaritmirali in analizirali z enosmernim ANOVA testom.

Signale T-RFLP analize smo najprej analizirali s programom GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems). Preverili smo, če je bila detekcija velikostnega standarda (MapMarker 1000) pravilna, če so vsi vzorci znotraj razreda izbranega velikostnega standarda in ali moč fluorescence ne presega vrednosti 30000. Če kateri od teh pogojev ni bil izpolnjen, smo analizo T-RFLP ponovili. Nato smo podatke o vzorcih in izmerjenih signalih uredili v tabelo in prenesli v program T-REX (Culman in sod., 2009), kjer smo filtrirali ozadje, v izogib primer-dimerom odstranili restriktijske fragmente (TRF), krajše od 50 bp, jih poravnali in določili relativno zastopanost višin vrhov za vsak TRF v obravnavanju. Podatki so bili nato transformirani s Hellingerjevo transformacijo in v nadaljnjo statistično analizo vključeni le tisti z relativno zastopanostjo  $> 0,01$  v vsaj enem vzorčnem času. Statistično analizo smo začeli z multivariatnim ANOVA testom – permutacijsko multivariatno analizo varianc na podlagi matrik razdalj (ang. distance matrices) in zaradi velikega števila spremenljivk nadaljevali z diagonalno diskriminantno analizo. Za izbiro spremenljivk smo uporabili univariatni ANOVA test s Holmovo metodo. Pestrost mikrobnih združb smo prav tako analizirali z multivariatnim testom.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV REMEDIACIJE NA SKUPNO VSEBNOST IN DOSTOPNOST KOVIN

V naši študiji smo uporabili močno onesnažena tla iz Mežiške doline (Orig) in sicer s  $4359 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb,  $1901 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn in  $26 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd (Pregl. 10). Po remediaciji s  $120 \text{ mM}$  raztopino EDTA se je vsebnost kovin v tleh znatno zmanjšala, in sicer koncentracija Pb za 67 % v sveže remediiranih tleh (R-svež) in 69 % v staranih remediiranih tleh (R-star) ter koncentracija Cd za 61 % v obojih remediiranih tleh. Remediacija je odstranila le malo presežnega Zn, saj se je njegova koncentracija po remediaciji zmanjšala za samo 6 % oz. 18 % v R-svež oz. R-star tleh. Vsebnosti Mn so bile po remediaciji manjše, koncentracije Fe pa se niso spremenile.

Preglednica 10: Vsebnost kovin, določena z ekstrakcijo z zlatotopko, podana za originalna, sveže remediirana in starana remediirana suha tla,  $n = 3$ .

| Tla    | Pb (mg/kg)                  | Zn (mg/kg)                  | Cd (mg/kg)                  | Mn (mg/kg)                | Fe (mg/kg)                    |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Orig   | <sup>a</sup> $4359 \pm 140$ | <sup>a</sup> $2901 \pm 144$ | <sup>a</sup> $25,7 \pm 0,9$ | <sup>a</sup> $710 \pm 22$ | <sup>a</sup> $29316 \pm 1482$ |
| R-svež | <sup>b</sup> $1453 \pm 3$   | <sup>a</sup> $2719 \pm 42$  | <sup>b</sup> $10,5 \pm 0,0$ | <sup>b</sup> $323 \pm 11$ | <sup>a</sup> $30648 \pm 668$  |
| R-star | <sup>b</sup> $1345 \pm 16$  | <sup>b</sup> $2383 \pm 50$  | <sup>b</sup> $10,1 \pm 0,1$ | <sup>b</sup> $330 \pm 4$  | <sup>a</sup> $30387 \pm 817$  |

<sup>a, b, c</sup> Statistično različni rezultati, Duncanov test ( $p < 0,05$ ).

S sekvenčnimi ekstrakcijami smo določili dostopnost kovin Pb in Cd tako, da smo jih glede na njihovo moč vezave na talne delce razporedili v šest frakcij. Po remediaciji se je koncentracija ekstrahiranih kovin v vseh talnih frakcijah zmanjšala ali ostala nespremenjena, razen v prvi (I) frakciji R-svež tal (Pregl. 11). V prvi, vodotopni frakciji, so se koncentracije kovin pomembno zmanjšala v R-star tleh, Cd celo pod mejo določljivosti, zanimivo pa so se koncentracije kovin v R-svež tleh glede na Orig tla statistično značilno povečale (Pb, Cd). Iz izmenljive (II.) frakcije so se kovine med remediacijo izprale: Koncentracija Pb v R-star tleh se je zmanjšala pod mejo določljivosti, v R-svež tleh se ni spremenila, medtem ko so bile koncentracije Cd v obojih remediiranih tleh nižje od vrednosti v originalnih tleh. V zadnji (VI.), najmanj dostopni frakciji, so bile koncentracije Cd po pranju tal z EDTA večje za okrog 40 %. Pb je bil pred remediacijo in po njej skoncentriran v frakciji, vezani na organsko snov (V. frakcija), Cd v frakciji, vezani na karbonate (III. frakcija), le v R-svež tleh pa v V. frakciji.

Preglednica 11: Frakcionacija kovin v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh z metodo sekvenčnih ekstrakcij, n = 3

| Tla/frakcija      | I) Vodo-topna            | II) Izmenljiva           | III) Karbonatna            | IV) Fe-in Mn-             | V) Organska                 | VI) Ostanek               | % ekstrahiranih          |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Pb (mg/kg)</b> |                          |                          |                            |                           |                             |                           |                          |
| Orig              | <sup>b</sup> 3,26 ± 0,08 | <sup>a</sup> 2,7 ± 0,4   | <sup>a</sup> 1336,9 ± 63,6 | <sup>a</sup> 13,6 ± 0,3   | <sup>a</sup> 2647,3 ± 115,2 | <sup>a</sup> 253,1 ± 5,4  | <sup>a</sup> 95,7 ± 1,2  |
| R-svež            | <sup>a</sup> 26,8 ± 1,8  | <sup>a</sup> 3,1 ± 0,3   | <sup>b</sup> 293,3 ± 4,7   | <sup>b</sup> 1,7 ± 0,3    | <sup>b</sup> 909,8 ± 33,9   | <sup>b</sup> 197,3 ± 6,5  | <sup>a</sup> 98,6 ± 2,6  |
| R-star            | <sup>c</sup> 0,7 ± 0,1   | LOQ                      | <sup>b</sup> 310,1 ± 3,8   | <sup>b</sup> 1,6 ± 0,2    | <sup>b</sup> 817,1 ± 26,8   | <sup>c</sup> 160,7 ± 7,1  | <sup>a</sup> 95,9 ± 2,7  |
| <b>Cd (mg/kg)</b> |                          |                          |                            |                           |                             |                           |                          |
| Orig              | LOQ                      | <sup>a</sup> 1,08 ± 0,01 | <sup>a</sup> 14,5 ± 0,4    | <sup>a</sup> 2,57 ± 0,02  | <sup>a</sup> 6,3 ± 0,5      | <sup>b</sup> 2,3 ± 0,7    | <sup>b</sup> 104,0 ± 6,3 |
| R-svež            | 1,30 ± 0,04              | <sup>b</sup> 0,23 ± 0,01 | <sup>c</sup> 2,55 ± 0,03   | <sup>c</sup> 0,42 ± 0,00  | <sup>b</sup> 4,0 ± 0,2      | <sup>a</sup> 3,23 ± 0,06  | <sup>a</sup> 110,6 ± 0,6 |
| R-star            | LOQ                      | <sup>c</sup> 0,14 ± 0,01 | <sup>b</sup> 3,73 ± 0,07   | <sup>b</sup> 0,53 ± 0,01  | <sup>b</sup> 3,7 ± 0,1      | <sup>a</sup> 3,2 ± 0,3    | <sup>a</sup> 112,1 ± 0,9 |
| <b>Mn (mg/kg)</b> |                          |                          |                            |                           |                             |                           |                          |
| Orig              | <sup>a</sup> 0,22 ± 0,03 | <sup>a</sup> 7,8 ± 0,2   | <sup>a</sup> 132,2 ± 43,6  | <sup>a</sup> 242,9 ± 21,5 | <sup>a</sup> 169,6 ± 5      | <sup>b</sup> 176,9 ± 15,9 | <sup>a</sup> 94,3 ± 12,9 |
| R-svež            | <sup>a</sup> 0,26 ± 0,02 | <sup>c</sup> 3,05 ± 0,09 | <sup>b</sup> 27,5 ± 2,8    | <sup>b</sup> 13,2 ± 0,7   | <sup>b</sup> 55,1 ± 1,6     | <sup>a</sup> 238,9 ± 4,3  | <sup>a</sup> 104,9 ± 3,9 |
| R-star            | LOQ                      | <sup>b</sup> 3,85 ± 0,09 | <sup>b</sup> 27,9 ± 1,6    | <sup>b</sup> 22,1 ± 2,0   | <sup>b</sup> 54,9 ± 0,9     | <sup>a</sup> 247,5 ± 4,2  | <sup>a</sup> 108,1 ± 1,6 |

a, b, c ... statistično različni rezultati, Duncanov test ( $p < 0,05$ )  
 LOQ ... meritve pod mejo določljivosti

#### 4.2 VPLIV REMEDIACIJE NA FIZIKANO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL

Pranje tal z EDTA je močno vplivalo na številne lastnosti tal (Pegl. 12 in 13). V primerjavi z originalnimi tlemi so se namreč spremenile vse lastnosti, določene s standardno pedološko analizo. Remediacijski postopek je spremenil razmerje med količino peska, melja in gline v tleh (Pegl. 12). V remediiranih tleh se je zmanjšal odstotek peska (za 17 in 12,4 % v R-svež in R-star tleh), medtem ko se je delež finega melja povečal (za 11,7 in 10,6 %).

Delež zadržane vode se je po remediaciji povečal (Pegl. 12). Tako pri vodnem potencialu -0,33 bar (PK), kot tudi pri -15 bar smo izmerili večjo vsebnost vode v remediiranih kot v originalnih tleh, kar je še posebno izrazito pri TV v R-svež tleh. Rastlinam dostopna voda ali efektivna poljska kapaciteta (EPK) pa se je tako v R-svež tleh zmanjšala.

Preglednica 12: Tekstura tal in vodno-zadrževalne lastnosti tal za originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla. Podane so povprečne vrednosti in standardni odklon, n = 3.

| Lastnost tal                  | Metoda                         | Orig                    | R-svež                  | R-star                  |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Glina (<0,002 mm) [%]         |                                | <sup>a</sup> 12,7 ± 0,9 | <sup>a</sup> 13,2 ± 1,0 | <sup>a</sup> 14,3 ± 0,2 |
| Fini melj (0,002-0,02 mm) [%] |                                | <sup>b</sup> 26,6 ± 4,5 | <sup>a</sup> 38,3 ± 2,4 | <sup>a</sup> 37,2 ± 2,4 |
| Grobi melj (0,02-0,05 mm) [%] | Sedimentacijska pipetna metoda | <sup>a</sup> 17,3 ± 3,2 | <sup>a</sup> 22,2 ± 1,3 | <sup>a</sup> 17,5 ± 2,7 |
| Pesek (0,05-2,00 mm) [%]      |                                | <sup>a</sup> 43,4 ± 1,0 | <sup>c</sup> 26,4 ± 2,1 | <sup>b</sup> 31,0 ± 1,2 |
| Teksturni razred              |                                | I                       | MI                      | MI                      |
| PK (w %)                      | -0,33 bar,                     | <sup>c</sup> 35,2 ± 0,1 | <sup>a</sup> 41,3 ± 0,4 | <sup>b</sup> 37,2 ± 0,1 |
| TV (w %)                      | -15 bar                        | <sup>b</sup> 14,6 ± 0,1 | <sup>a</sup> 34,1 ± 2,7 | <sup>b</sup> 15,9 ± 0,2 |
| EPK (w %)                     |                                | 20,6 ± 0,2              | 7,2 ± 3,1               | 21,3 ± 0,3              |

<sup>a, b, c</sup> Označujejo statistično različne rezultate, Duncanov test ( $p < 0,05$ ), za analizo točke venenja smo uporabili permutacijski test in t-test za pare.

Postopek remediacije je vplival tudi na kemijske lastnosti tal, še posebno R-svež tal (Pegl. 13). pH tal je bil v remediiranih tleh višji kot v originalnih, vendar še vedno v nevtralnem območju. V R-svež tleh smo izmerili tudi večjo vsebnost organske snovi kot v Orig in R-star tleh. Prav tako smo v remediiranih tleh glede na originalna izmerili večjo vsebnost skupnega N ter rastlinam lahko dostopnega P in K, predvsem v R-svež tleh. Tudi CEC je bila v remediiranih tleh večja, tako se je izmenjalo več bazičnih kationov (Ca, K, Na).

Preglednica 13: Kemijske lastnosti originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tal. Podane so povprečne vrednosti in standardni odklon, n = 3.

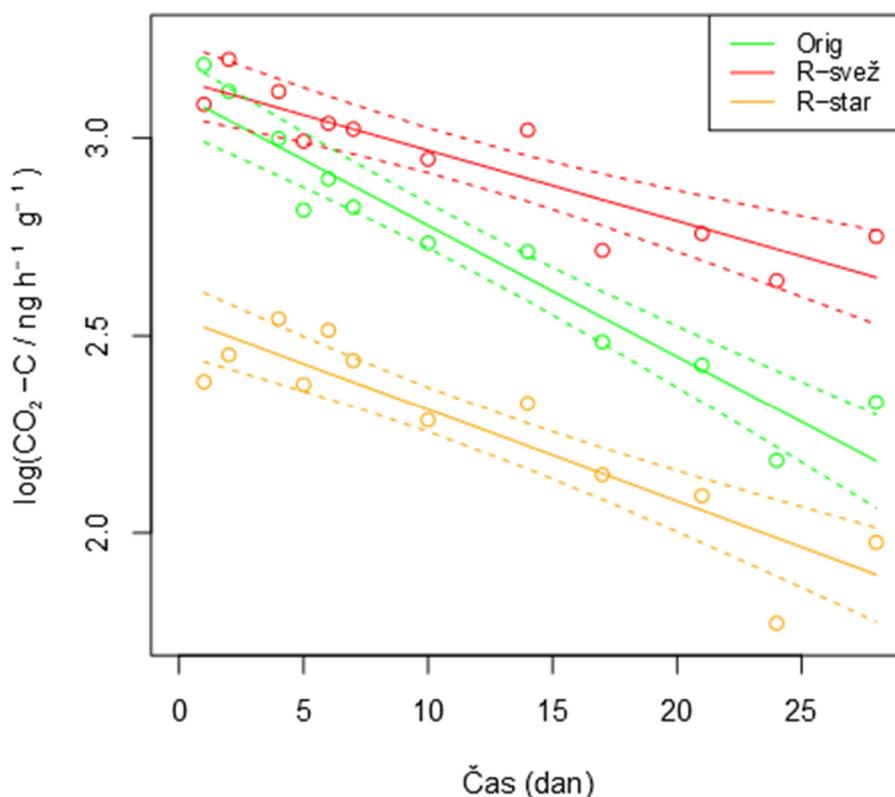
| Lastnost tal                                 | Metoda  | Orig                      | R-svež                    | R-star                    |
|--|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| pH   | v raztopini CaCl <sub>2</sub>   | <sup>b</sup> 7,0 ± 0,01   | <sup>a</sup> 7,2 ± 0,01   | <sup>a</sup> 7,2 ± 0,01   |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [mg/100 g tal] | Amon-laktatna metoda po   | <sup>b</sup> 106 ± 3      | <sup>a</sup> 134,1 ± 2,4  | <sup>a</sup> 128 ± 5      |
| K <sub>2</sub> O [mg/100 g tal]              | Egner-Riehm-Domingu   | <sup>c</sup> 13,3 ± 0,6   | <sup>a</sup> 21,2 ± 0,6   | <sup>b</sup> 14,3 ± 0,6   |
| N <sub>skupni</sub> [%]                      | Mokra oksidacija po Kjeldahlu (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )                     | <sup>c</sup> 0,50         | <sup>a</sup> 0,56         | <sup>b</sup> 0,52         |
| Organski C [%]                               | Mokra oksidacija po Walkley-Blacku (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) | <sup>b</sup> 6,7 ± 0,0    | <sup>a</sup> 8,2 ± 0,3    | <sup>b</sup> 6,8 ± 0,0    |
| C/N  |   | <sup>a</sup> 8            | <sup>a</sup> 8            | <sup>a</sup> 8            |
| Ca [mmol <sub>c</sub> /100g tal]             |   | <sup>c</sup> 18,27 ± 0,05 | <sup>b</sup> 22,19 ± 0,02 | <sup>a</sup> 25,30 ± 0,30 |
| Mg [mmol <sub>c</sub> /100g tal]             |   | <sup>a</sup> 4,91 ± 0,04  | <sup>c</sup> 4,20 ± 0,08  | <sup>b</sup> 4,50 ± 0,08  |
| K [mmol <sub>c</sub> /100g tal]              | Kationska izmenalna kapaciteta (CEC)  | <sup>c</sup> 0,21 ± 0,00  | <sup>a</sup> 0,39 ± 0,01  | <sup>b</sup> 0,28 ± 0,00  |
| Na [mmol <sub>c</sub> /100g tal]             |   | <sup>c</sup> 0,26 ± 0,01  | <sup>a</sup> 3,90 ± 0,10  | <sup>b</sup> 2,84 ± 0,04  |
| H [mmol <sub>c</sub> /100g tal]              | - amonacetatna ekstrakcija,   | <sup>a</sup> 4,00 ± 0,40  | <sup>a</sup> 3,90 ± 0,20  | <sup>a</sup> 3,60 ± 0,20  |
| S [mmol <sub>c</sub> /100g tal]              | - ekstrakcija z BaCl <sub>2</sub>   | <sup>c</sup> 23,63 ± 0,06 | <sup>b</sup> 32,90 ± 0,40 | <sup>a</sup> 32,87 ± 0,06 |
| V [%]  |   | <sup>c</sup> 85,60 ± 1,00 | <sup>b</sup> 88,50 ± 0,70 | <sup>a</sup> 90,01 ± 0,60 |
| CEC [mmol <sub>c</sub> /100g tal]            |   | <sup>c</sup> 27,60 ± 0,30 | <sup>b</sup> 34,60 ± 0,20 | <sup>a</sup> 36,50 ± 0,20 |

<sup>a, b, c</sup> Statistično različni rezultati, Duncanov test ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3 VPLIV REMEDIACIJE NA MINERALIZACIJO ORGANSKE SNOVI

V mikrokozem poskusu smo spremljali mikrobeno aktivnost z merjenjem mineralizacije organske snovi v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh. Vzorcem tal smo dodali koruzno biomaso (zmleta koruzna stebla, +C), kontrolna tla so bila brez dodane koruze.

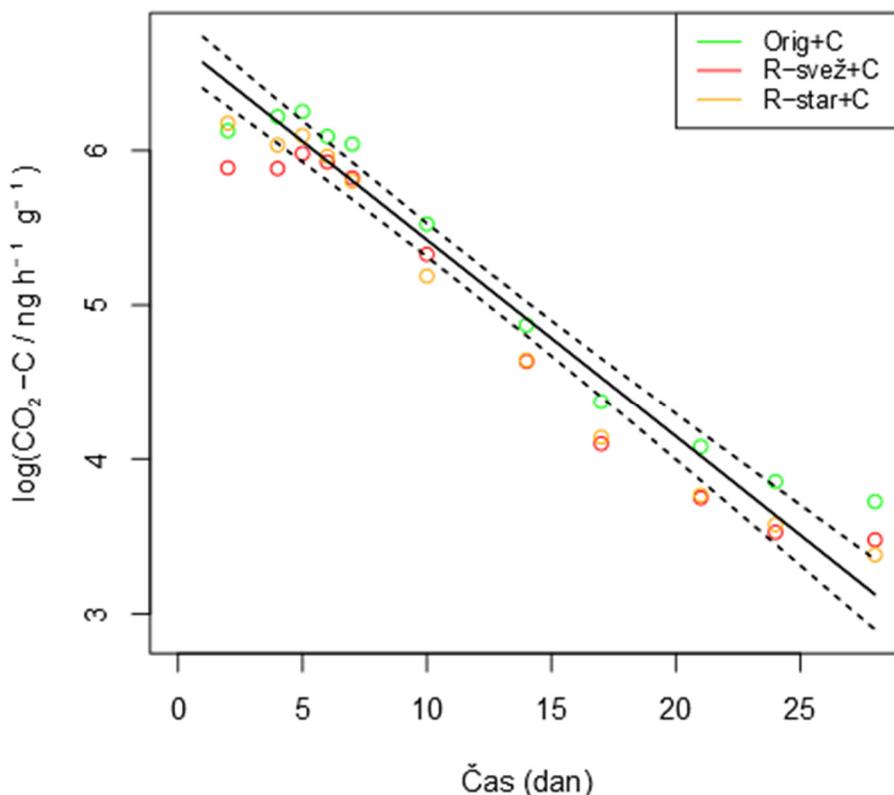
Hitrost mineralizacije organske snovi smo spremljali 27 dni in sicer prek merjenja sproščenega CO<sub>2</sub>-C (Sliki 4 in 5). Dan 0 pomeni meritve, izvedene približno pol dneva po dodatku koruze. V kontrolnih tleh se sproščanje CO<sub>2</sub>-C med obravnavanjem značilno razlikuje (Slika 4). Ugotovili smo značilno interakcijo med obravnavanimi tlemi (Orig, R-svež in R-star) in časom vzorčenja, tako lahko časovni potek sproščenega CO<sub>2</sub>-C za vsaka obravnavana tla opišemo s svojo linearno funkcijo:  $y = 3,147 - 0,018x$  (R-svež),  $y = 3,111 - 0,033x$  (Orig) in  $y = 2,546 - 0,023x$  (R-star). Orig in R-svež tla so imela na dan 1 enako hitrost mineralizacije, vendar so se zatem razlike povečevale. Največjo hitrost mineralizacije so dosegla R-svež tla s sicer najbolj položno premico, najpočasneje pa je mineralizacija potekala v R-star tleh (Slika 4).



Slika 4: Sproščanje  $\text{CO}_2\text{-C}$  v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh brez dodanega ogljika (kontrole), v 27. dneh trajanja mikrokozem poskusa. Prikazane so logaritemsko transformirane povprečne vrednosti ( $n = 5$ ) in prirejen linearni model s 95 % intervalom zaupanja.

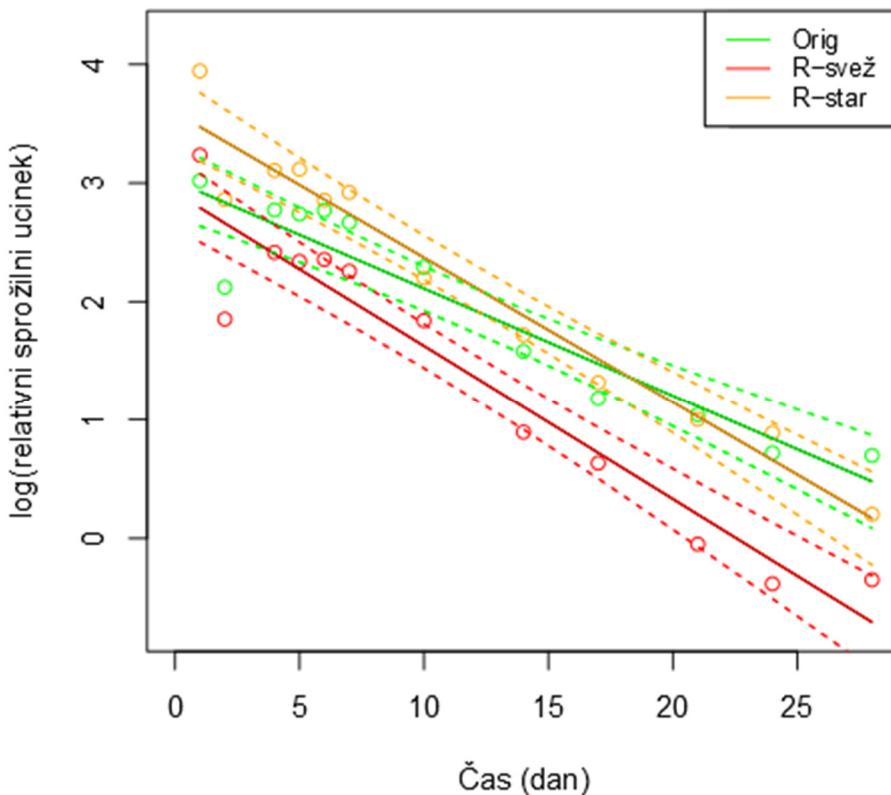
V tleh z dodano korozo je bila hitrost mineralizacije organske snovi značilno večja kot v kontrolnih tleh, ni pa statistično značilnega vpliva obravnavanih tal na nastajanje  $\text{CO}_2\text{-C}$  (Slika 5). Mineralizacija je torej v vseh treh obravnavanih tleh potekala enako hitro. Sproščanje  $\text{CO}_2\text{-C}$  je 1. dan glede na začetno stanje (dan 0, približno  $1400 \text{ ng CO}_2\text{-C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) skokovito upadla pod  $500 \text{ ng CO}_2\text{-C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  in se od 4. dneva dalje nižala, da je po 27. dneh dosegala le 2,7 %, 2,5 % oz. 2,2 % začetne stopnje mineralizacije v Orig+C, R-svež+C oz. R-star+C tleh.

V začetku poskusa se je večinski delež sproščenega  $\text{CO}_2\text{-C}$  mineraliziral iz koruze, največ iz Orig tal, medtem ko je po 3. dnevu eksperimenta večina mineraliziranega  $\text{CO}_2\text{-C}$  prihajala iz tal (Priloga A). To je razvidno tudi iz poteka mineralizacije, saj se je hitrost mineralizacije v tleh z dodano korozo med 4. in 23. dnevom eksperimenta zmanjševala linearno ( $y = 6,697 - 0,128x$ ), medtem ko lahko v začetku poskusa opazimo najprej močan padec v hitrosti mineralizacije in nato plato (Slika 5). Sklepamo, da je dinamika povezana s preferenčnim substratom, ki so ga mikroorganizmi porabljali pri mineralizaciji. Na koncu poskusa (27. dan) hitrosti ne moremo več opisati z linearnim upadom. Predvidevamo, da je bila hitrost mineralizacije takrat blizu minimuma, saj se je hitrost mineralizacije zelo malo ali se ni (R-svež) spremenjala. Podoben trend se nakazuje tudi v kontrolnih tleh brez dodatka koruze (Slika 4).



Slika 5: Producija  $\text{CO}_2\text{-C}$ , merjena v  $\text{ng CO}_2\text{-C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhih tal, v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh z dodano koruzo (+C), v 27. dneh trajanja mikrokozm eksperimenta. Prikazane so logaritemsko transformirane povprečne vrednosti ( $n = 5$ ) in prirejen linearni model za 4.-23. dan s 95 % intervalom zaupanja.

S primerjavo ogljika, ki se je mineraliziral iz tal v obravnavanju z dodano koruzo in povprečno produkcijo  $\text{CO}_2\text{-C}$  v kontrolnih tleh, brez dodane koruze, smo opazili precejšnje povečanje stopnje mineralizacije talnega ogljika zaradi dodatka sveže organske snovi, kar kaže na t.i. sprožilni učinek (Slika 6). V poskusu se je tako v Orig+C tleh mineraliziralo 30,0 mg C, v R-star+C tleh 25,8 mg C in v R-svež+C 24,1 mg C, kljub temu, da smo v poskus s koruzo dodali le 12,7 mg C. To povečanje mineralizacije talne organske snovi zaradi dodatka sveže organske snovi je bilo statistično značilno glede na obravnavana tla in je s časom upadal. Logaritmiram vrednostim povečanja stopnje mineralizacije lahko priredimo linearni model, ki opisuje njegov potek od 4. do 23. dne poskusa. Ker je interakcija obravnavanih tal s časom vzorčenja statistično značilna, lahko vsaka obravnavana tla opišemo s svojo linearno funkcijo:  $y = 3,017 - 0,091x$  (Orig),  $y = 2,437 - 0,123x$  (R-star) in  $y = 2,290 - 0,130x$  (R-svež). V začetku so se vrednosti povečane mineralizacije gibale okrog 500-600  $\text{ng CO}_2\text{-C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , ob koncu poskusa pa so znašale le okrog 10-20  $\text{ng CO}_2\text{-C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . Sprožilni učinek je bil največji v R-star tleh, vendar se je po 9. dneh izenačil z Orig tlemi. Sprožilni učinek dodane organske snovi na mineralizacijo talnega C je bil najmanjši v R-svež tleh.



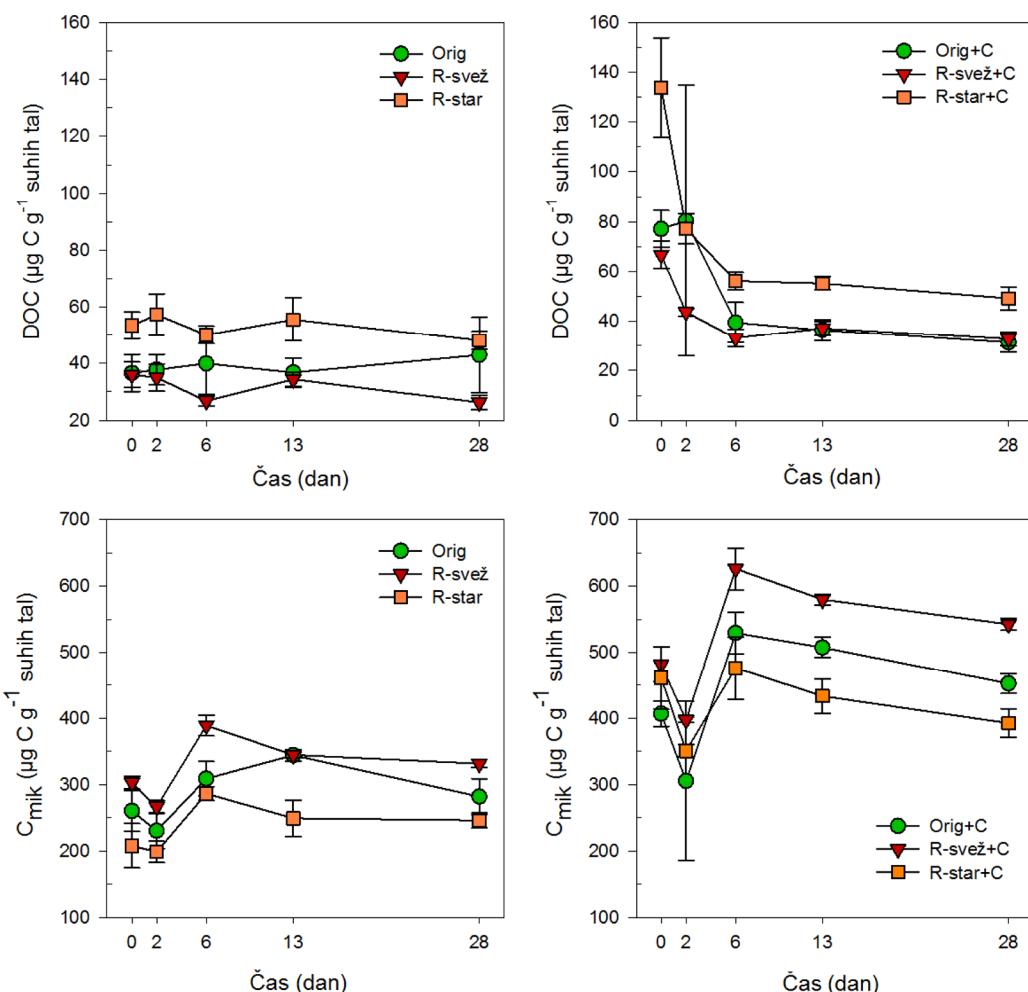
Slika 6: Povečana stopnja mineralizacije talne organske snovi zaradi dodatka sveže organske snovi (koruze), podana relativno na povprečno produkcijo CO<sub>2</sub>-C v kontrolnih tleh brez dodane koruze (t.i. relativni sprožilni učinek) v 27. dneh trajanja mikrokozem poskusa v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh. Prikazane so logaritemsko transformirane povprečne vrednosti ( $n = 5$ ) in prizeten linearni model s 95 % intervalom zaupanja.

#### 4.3.1 Vsebnost mikrobnega C ter skupnih in dostopnih oblik C in N

V mikrokozem poskusu smo v talnih vzorcih, poleg sproščanja CO<sub>2</sub>, spremljali tudi vsebnost skupnega topnega ogljika, mikrobnega C, skupnega topnega dušika, amonija, nitrata in nitrita.

Remediacija je vplivala tudi na koncentracije topnega organskega ogljika (DOC), saj so se tla med sabo statistično značilno razlikovala glede na ta parameter. Največje vsebnosti DOC smo izmerili v R-star in najmanjše v R-svež tleh. Dodatek koruze je glede na kontrolo povečal izmerjene vrednosti DOC, saj smo s tem vnesli njegov dodaten vir, ki pa se je s časom porabljal (Slika 7).

Pranje tal z EDTA je vplivalo na vsebnost mikrobnega ogljika (C<sub>mik</sub>), ki se je med obravnavanimi tlemi statistično značilno razlikoval. Največ C<sub>mik</sub> smo izmerili v R-svež in najmanj v R-star tleh. Na C<sub>mik</sub> je značilno vplival dodatek koruze, v tleh z dodano koruzzo smo izmerili večjo mikrobnou biomoso. C<sub>mik</sub> se je značilno spremenjal tudi s časom, posebno izrazito je bilo povečanje mikrobnene biomase 6. dan poskusa (Slika 7).

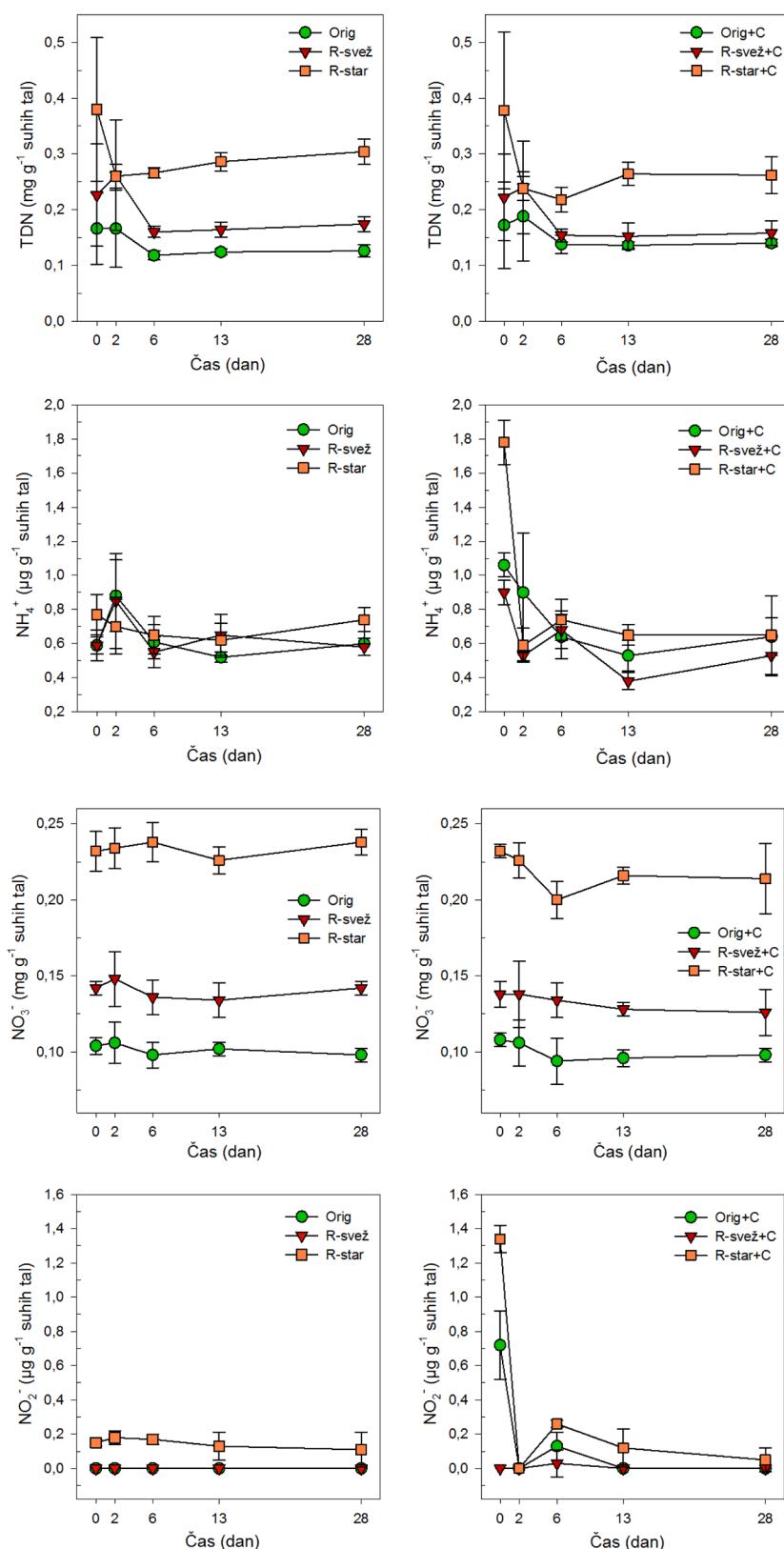


Slika 7: Vsebnosti DOC in Cmik v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh, brez dodatka (kontrola) in z dodano korozo (+C) v 28-dnevnom mikrokozemu poskusu. Prikazana so povprečja in standardni odkloni,  $n = 5$ .

Statističnih razlik v skupnem topnem dušiku ( $TDN = DON + N_{mineral}$ ) med tlemi ni, saj so se vsebnosti  $TDN$  v obravnavanih tleh v času različno spremajale. Zanimivo pa je, da so ves čas poskusa največje vsebnosti v R-star, tako v kontrolnih tleh, kot v tleh z dodano korozo (Slika 8). V obravnavanih tleh smo izmerili značilno različne koncentracije sproščenega nitrata ( $NO_3^-$ ), največje v R-star in najmanjše v Orig tleh, ki se med poskusom v splošnem niso dosti spremajale, kot tudi ne glede na obravnavanje (Slika 8).

V vsebnostih amonijskega iona ( $NH_4^+$ ) se tla med seboj statistično ne razlikujejo. Vendar pa medtem, ko so bile izmerjene vrednosti amonija v kontrolnih tleh precej konstantne, so v tleh z dodano korozo s časom upadale (Slika 8).

Izmerjene koncentracije  $NO_2^-$  so bile majhne, kar 69 % meritev je bilo pod mejo detekcije. V kontrolnih vzorcih so bile vsebnosti nitrita nad mejo detekcije določene le v R-star tleh. Po dodatku koruze so vrednosti nitrita ostale največje v R-star+C tleh, sicer pa smo vrednosti nad mejo detekcije izmerili le v dveh (Orig) oz. eni (R-svez) časovni točki (Slika 8).

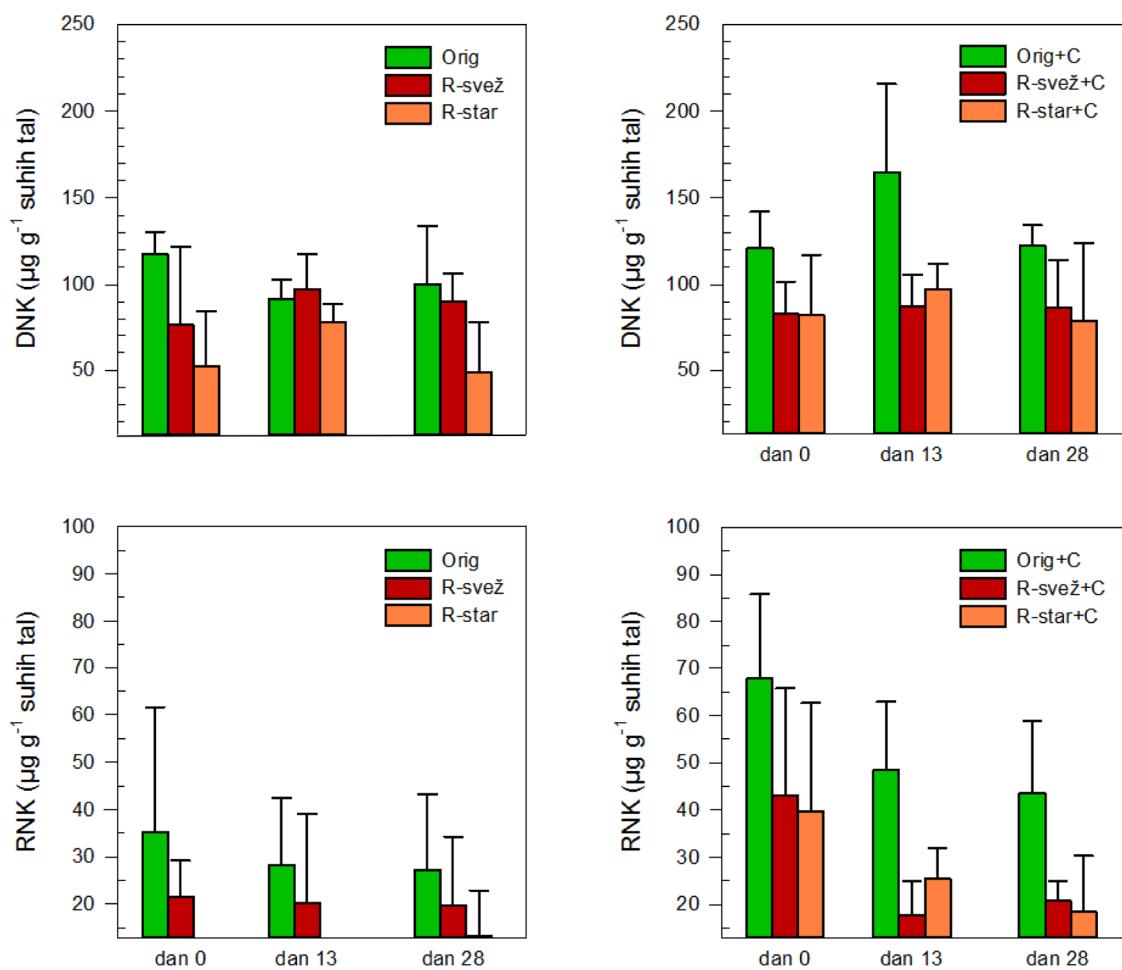


Slika 8: Koncentracije TDN,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2^-$  v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih kontrolnih tleh in tleh z dodano korozo (+C) v 28-dnevnom mikrokozm eksperimentu. Ročaji prikazujejo standardni odklon,  $n = 5$ .

#### 4.4 VPLIV REMEDIACIJE NA STRUKTURO MIKROBNE ZDRUŽBE

Za analizo strukture mikrobne združbe v originalnih ter svežih in staranih remediiranih tleh smo uporabili analizo polimorfizma dolžin končnih fragmentov restrikcije (T-RFLP) gena za 16S oz. ITS regijo rRNK, ki smo jo za ekstrakcijo DNK izvedli v treh vzorčnih časih, in sicer na dan 0, dan 13 in na koncu mikrokozem eksperimenta, 28. dan. Ta tri vzorčenja smo izbrali glede na rezultate meritev mineralnih oblik N in testov encimske aktivnosti, ki so se pri teh vzorčenjih najbolj razlikovali med seboj.

Obravnavana tla se v izmerjenih koncentracijah DNK in RNK med sabo šibko razlikujejo ( $p = 0,067$  oz.  $0,138$ ), in sicer glede na interakcijo med obravnavanimi tlemi in obravnavanjem, ki je mejno značilna (Priloga B). To pomeni, da so se koncentracije DNK in RNK v obravnavanih tleh po dodatku koruze različno spremenile, vendar je iz grafov razvidno, da so se nesignifikantno povečale (Slika 9).

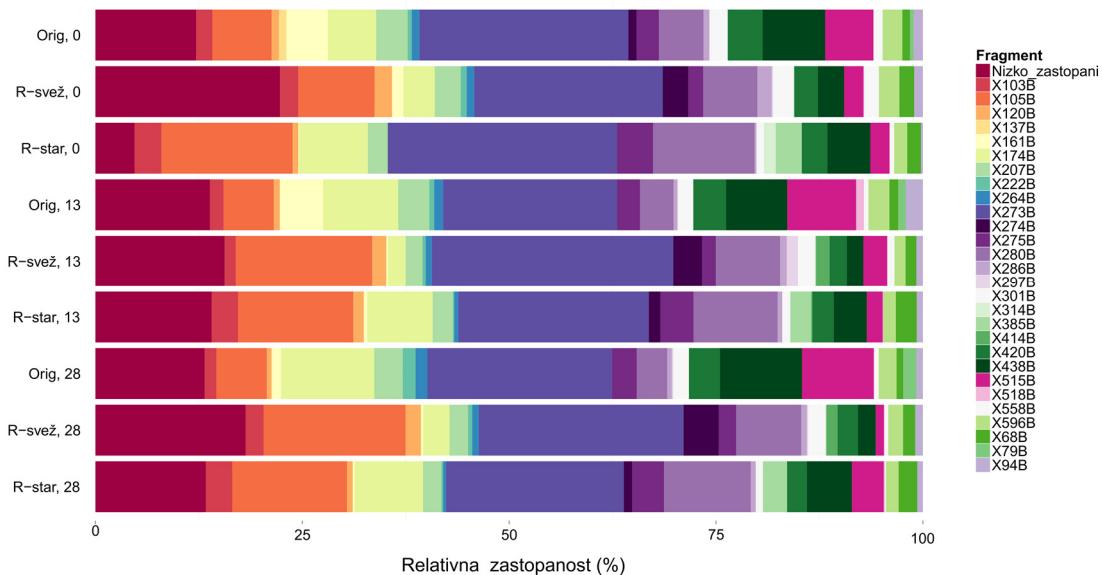


Slika 9: Vsebnosti DNK v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh v **A:** kontrolnih vzorcih in **B:** z dodatkom koruze (+C) na začetku mikrokozem eksperimenta (dan 0), 13. dan in končni, 28. dan. Prikazana so povprečja in standardni odkloni,  $n = 5$ .

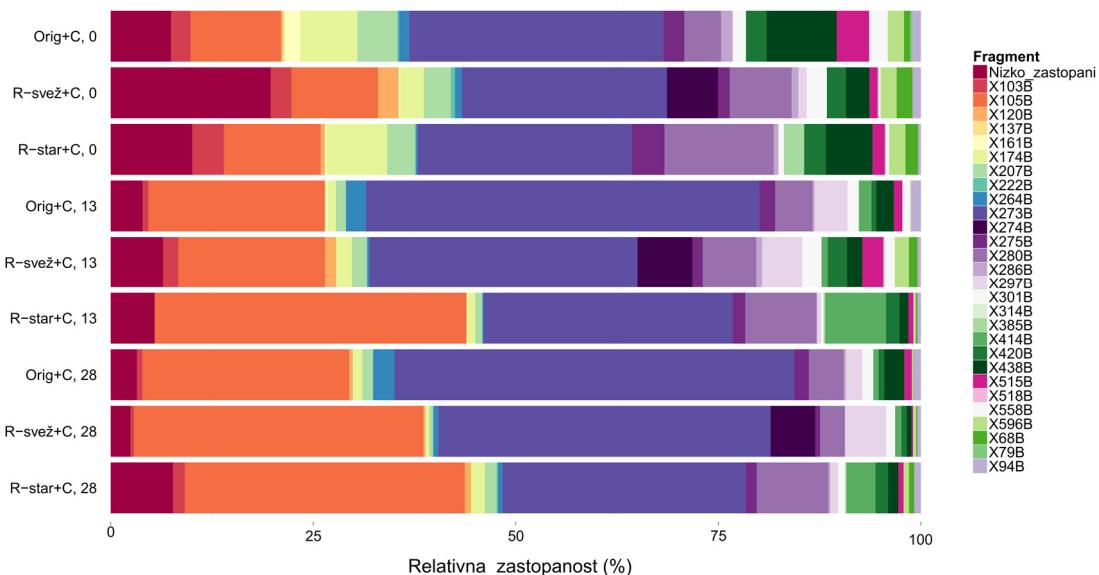
Zastopanost glivnih, bakterijskih in arhejskih združb (Slika 10, 11, 12, 13, 14) v Orig, R-svež in R-star tleh smo ocenili na podlagi prisotnosti terminalnih restrikcijskih fragmentov (TRF), ki smo jih detektirali po restrikciji 16S rRNA ali ITS regije, pomnožene s PCR. Pestrost mikrobnih združb pa smo ocenili kot število različnih restrikcijskih fragmentov po restrikciji.

Glivne združbe v obravnavanih tleh se med seboj razlikujejo, tako v sestavi TRF kot njihovi številčnosti. V kontrolnih tleh smo detektirali povprečno 47 različnih TRF, po dodatku koruze pa 30. V vseh obravnavanih tleh tekom trajanja mikrokozem poskusa opazimo izginjanje nekaterih restrikcijskih fragmentov in pojavljanje novih (Slika 10). Z diagonalno diskriminantno analizo smo določili TRF, ki signifikantno vplivajo na razlike v strukturi mikrobnih združb med obravnavanimi tlemi (Slika 11). Najbolj se tla med seboj razlikujejo glede na relativne zastopanosti fragmentov dolžin 264, ki prevladujejo v Orig tleh, 274, ki prevladujejo v R-svež tleh ter fragmenta 385 in 280 bp, ki smo ju glede na ostala tla veliko izmerili v R-star tleh (Slika 11). Razlike v glivni združbi so se tekom mikrokozem poskusa pojavile tudi med tlemi z dodano koruzo in kontrolnimi tlemi (Priloga C).

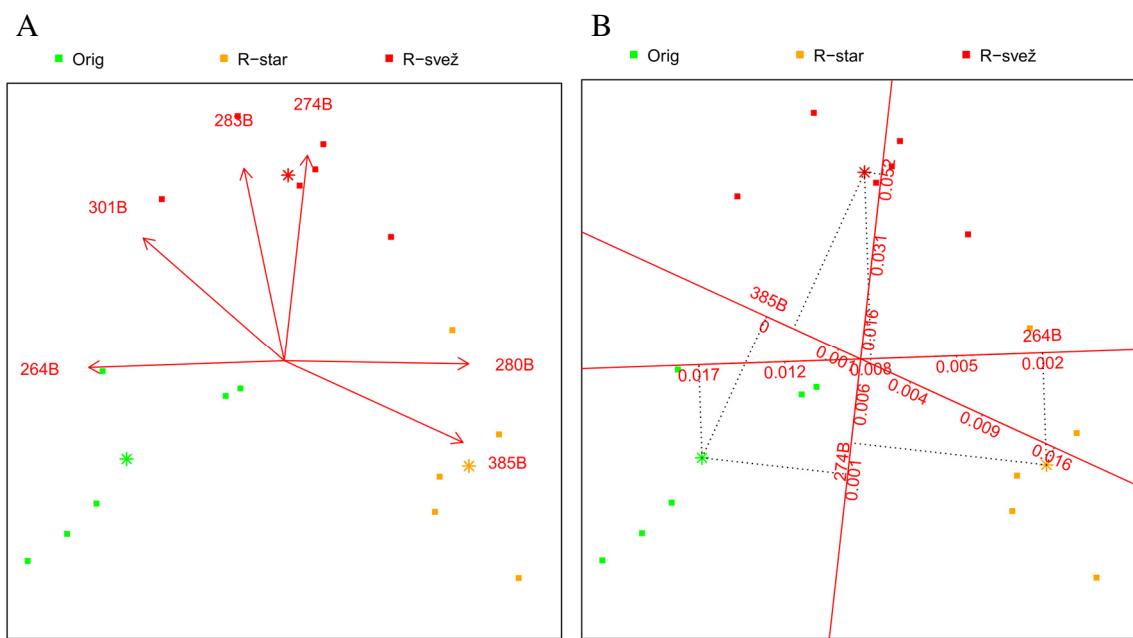
A



B

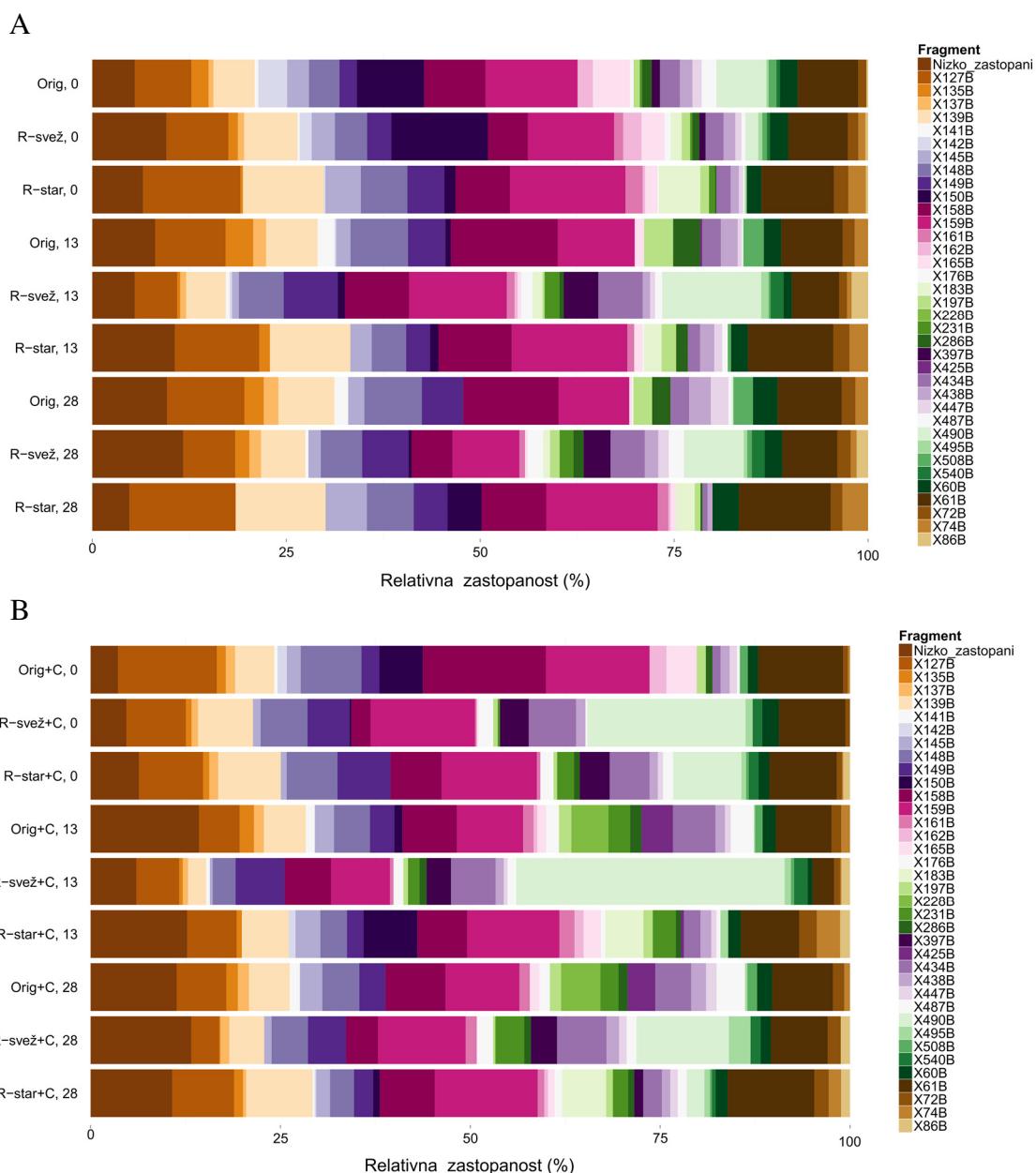


Slika 10: Prikaz relativne zastopanosti (%) restriktijskih fragmentov glivne ITS rRNK regije po T-RFLP analizi za **A**: kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in **B**: za vzorce z dodano koruzo (+C). Vrednosti 0, 13 in 28 označujejo čas vzorčenja v dnevih. Prikazani so restriktijski fragmenti z relativno zastopanostjo  $\geq 3\%$ . Vsak restriktijski fragment je označen s svojo barvo.

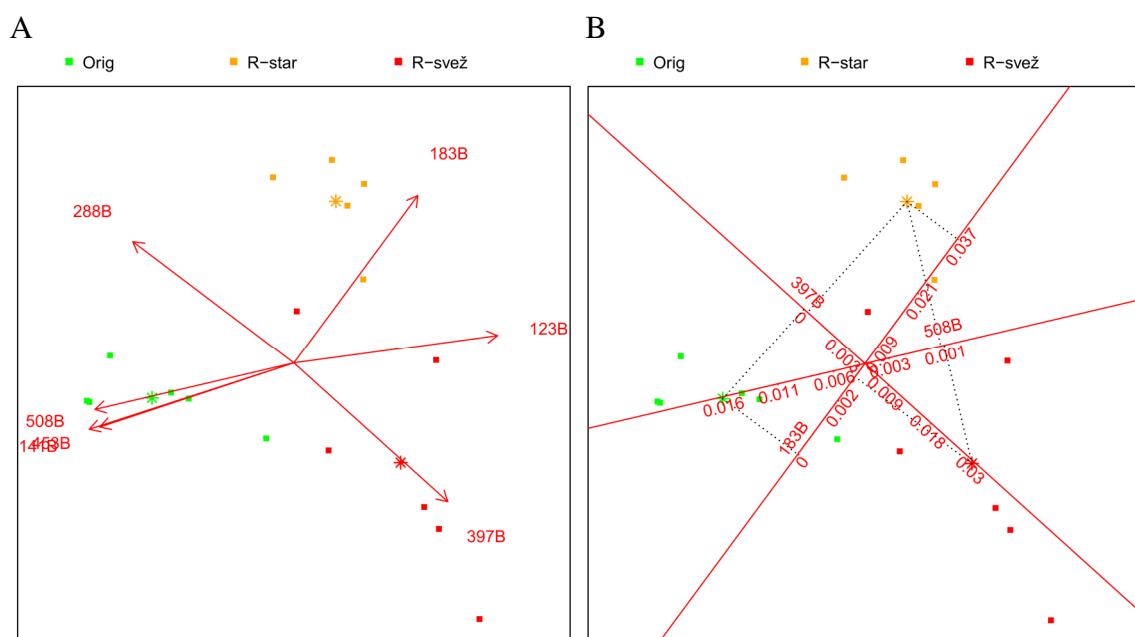


Slika 11: Restriktijski fragmenti glede na tip tal, **A:** Diagonalna diskriminantna analiza restriktijskih fragmentov glevne ITS regije rRNA s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Prikazani so samo signifikanti ( $p < 0,05$ ) fragmenti. **B:** Kalibriran dvodimenzionalni diagram (biplot) za diagonalno diskriminantno analizo restriktijskih fragmentov glevne ITS regije rRNA s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je narejena za restriktijske fragmente 264 bp, 274 bp in 385 bp.

Bakterijske združbe se med obravnavanimi tlemi razlikujejo (Slika 12). V kontrolnih tleh smo določili povprečno 26 TRF, medtem ko smo jih v tleh z dodano korozo detektirali povprečno 29 TRF. Z diagonalno diskriminantno analizo smo določili influenčne TRF, ki pomenijo razliko v stрукtri mikrobnih združb med obravnavanimi tlemi (Slika 13). Močni razlikovalni dejavniki so nekateri TRF, ki se v obravnavanih tleh razlikujejo po zastopanosti (Slika 13 A), predvsem fragmenti dolžin 508, 141, 453, ti prevladujejo v Orig tleh (Slika 13 A in B), fragmenti dolžin 183 bp prevladujejo v R-star in fragmenti z dolžino 397 bp, ki prevladujejo v R-svež tleh (Slika 13 A in B).



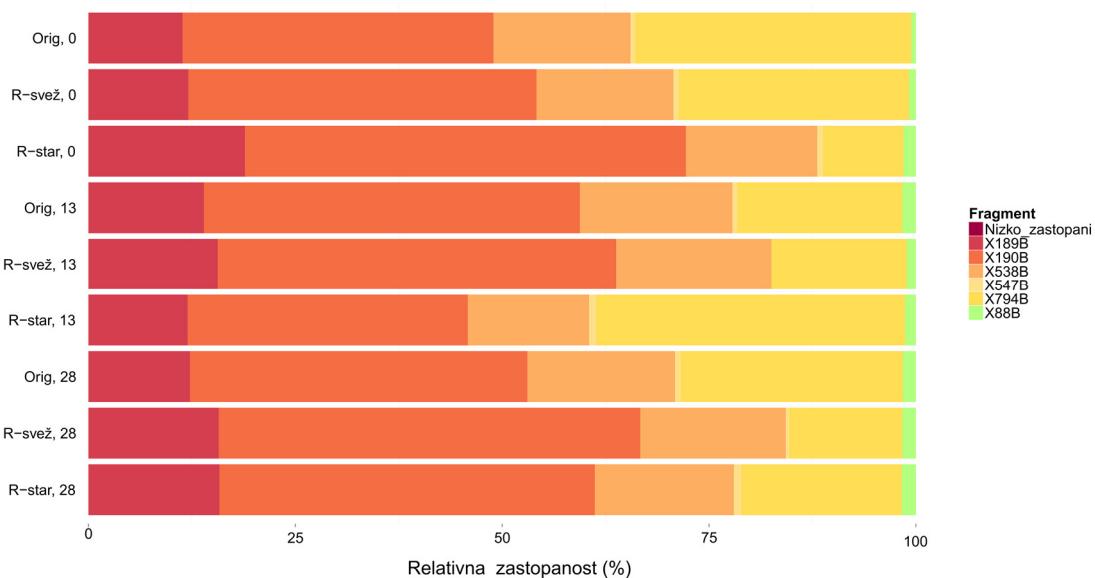
Slika 12: Prikaz relativne zastopanosti (%) restriktijskih fragmentov gena za bakterijsko 16S rRNK po T-RFLP analizi za **A**: kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in **B**: za vzorce z dodano koruzo (+C). Vrednosti 0, 13 in 28 označujejo čas vzorčenja v dnevih. Prikazani so restriktijski fragmenti z relativno zastopanostjo  $\geq 3\%$ . Vsak restriktijski fragment je označen s svojo barvo.



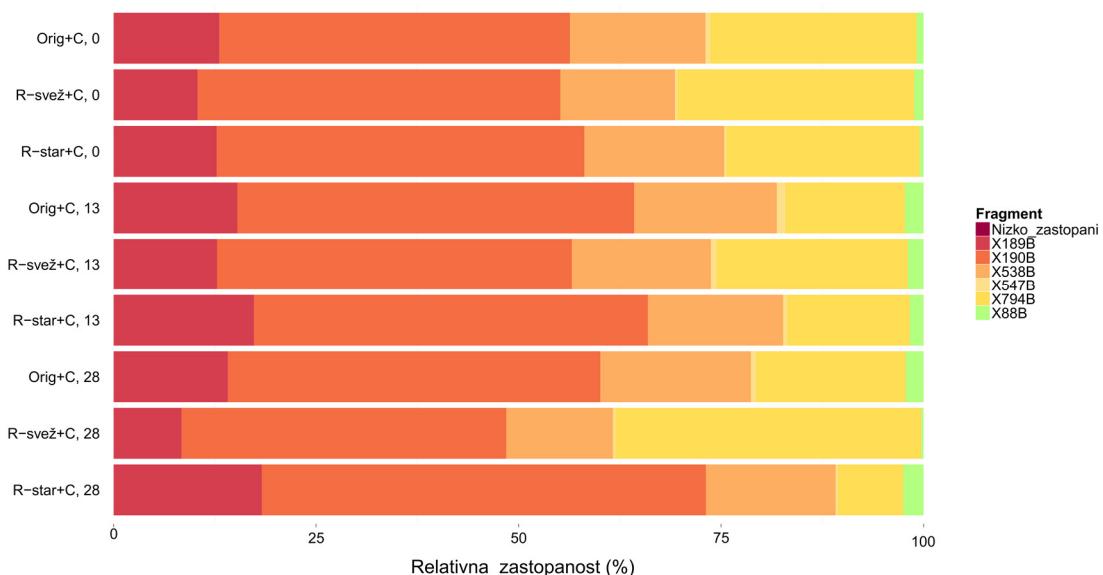
Slika 13: **A:** Diagonalna diskriminantna analiza restriktijskih fragmentov bakterijske 16S rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Prikazani so samo signifikantni ( $p < 0,05$ ) fragmenti. **B:** Kalibriran dvodimenzionalni diagram (biplot) za diagonalno diskriminantno analizo restriktijskih fragmentov bakterijske 16S rRNK s tipom tal kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je narejena za restriktijske fragmente 183 bp, 397 bp in 508 bp.

Arheje so v naši T-RFLP analizi izkazale zelo majhno raznolikost združb v originalnih in obojih remediiranih tleh. Detektirali smo le 6 različnih restriktijskih fragmentov. Po dodatku koruze se je sicer nekoliko, vendar statistično neznačilno, spremenila zastopanost nekaterih fragmentov, recimo fragmentov z dolžinama 190 in 794 bp. Sicer pa se združbe arhej med seboj niso razlikovale ne glede na tip tal, ne glede na čas vzorčenja, niti glede na obravnavanje (Slika 14).

A

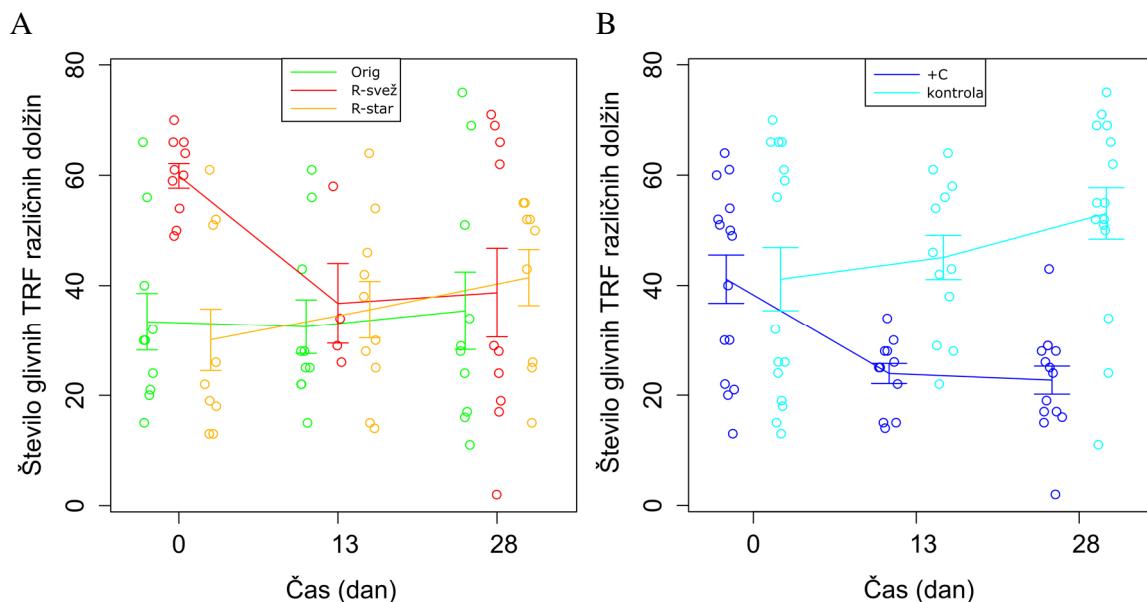


B

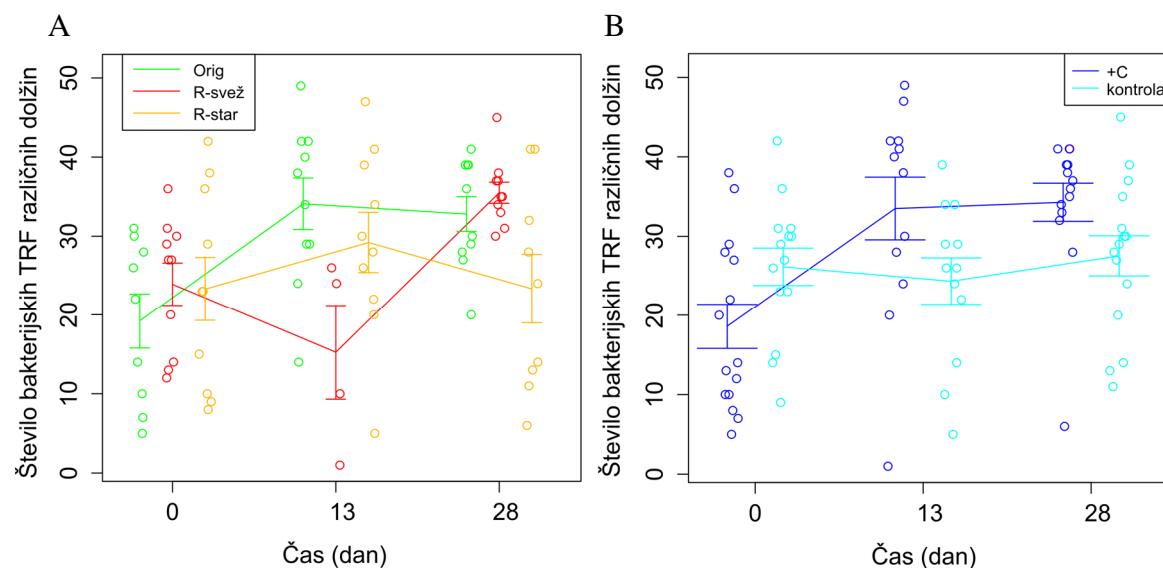


Slika 14: Prikaz relativne zastopanosti (%) restriktijskih fragmentov gena za arhejsko 16S rRNK po T-RFLP analizi za A: kontrolne vzorce brez dodatka koruze (originalna, sveže remediirana in starana remediirana tla) in B: za vzorce z dodano koruzo (+C). Vrednosti 0, 13 in 28 označujejo čas vzorčenja v dnevih. Prikazani so restriktijski fragmenti z relativno zastopanostjo  $\geq 1\%$ . Vsak restriktijski fragment je označen s svojo barvo.

Če spremljamo število TRF v času, kot grobo oceno spremenjanja pestrosti mikrobnih združb tekom mikrokozem poskusa, v obravnavanih tleh opazimo različno spremenjanje pestrosti tako glivnih kot bakterijskih združb (Sliki 15 A in 16 A), pestrost arhej pa se tekom poskusa ni spremenjala. Na pestrost je vplival tudi dodatek koruze. Število glivnih TRF v tleh z dodano korozo je bilo glede na kontrolna tla manjše (Slika 15 B), zanimivo pa je bilo pri bakterijskih združbah nasprotno, število bakterijskih TRF se je ob dodatku koruze povečalo (Slika 16 B).



Slika 15: Pestrost glivnih združb kot število različno dolgih restriktijskih fragmentov glivne ITS rRNK regije po analizi T-RFLP na dan 0, 13 in 28 glede na tip tal (A) in obravnavanje (B). Ročaji prikazujejo 1 standardno napako povprečja, število replikatov je n = 5.

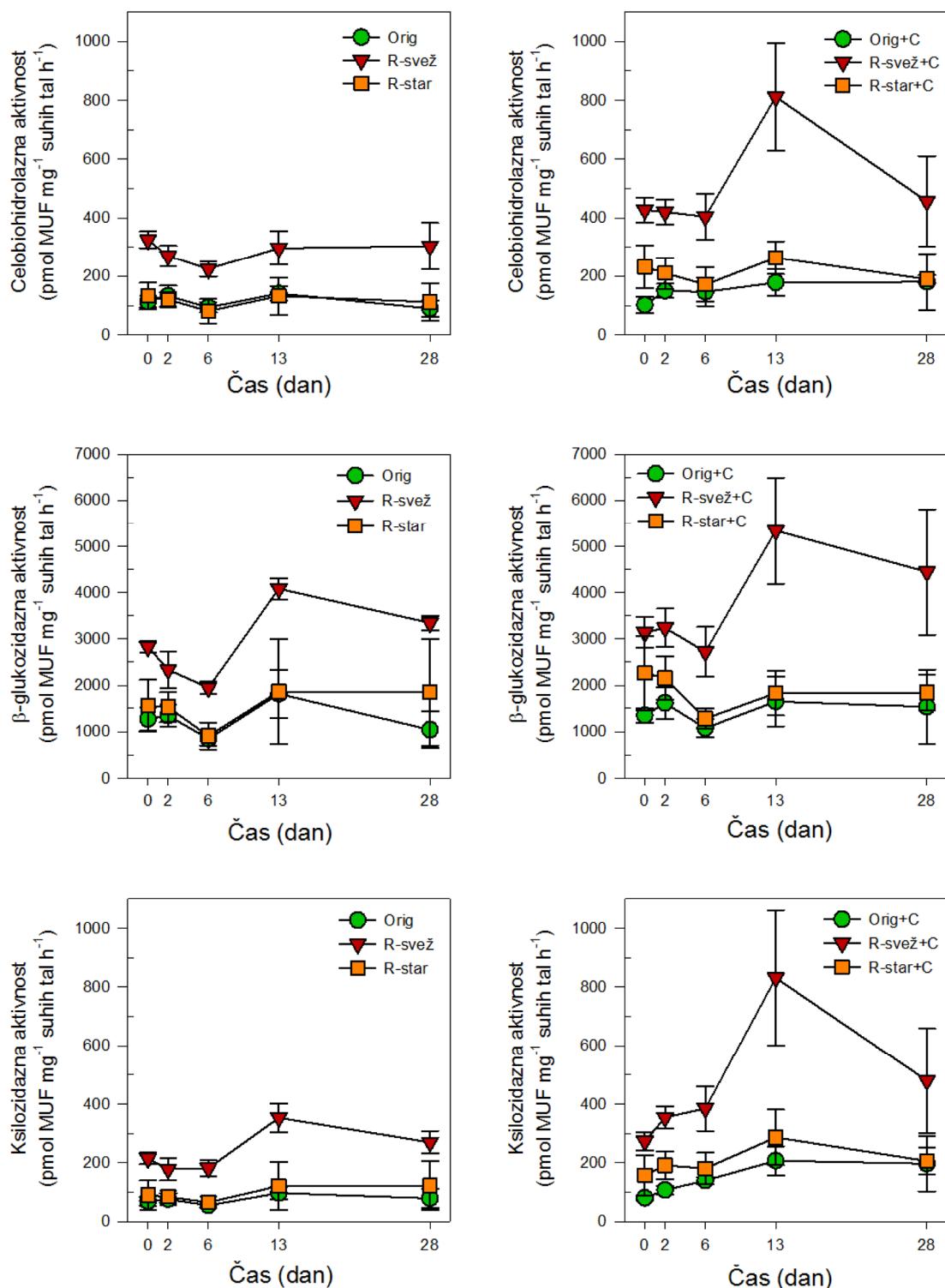


Slika 16: Pestrost bakterijskih združb kot število različno dolgih restriktijskih fragmentov gena za bakterijsko 16S rRNK po analizi T-RFLP na dan 0, 13 in 28 glede na tip tal (A) in obravnavanje (B). Ročaji prikazujejo 1 standardno napako povprečja, število replikatov je n = 5.

#### 4.5 VPLIV REMEDIACIJE NA ENCIMSKO AKTIVNOST

Kot pokazatelj mikrobiološke aktivnosti v originalnih in remediiranih tleh smo merili aktivnost encimov C-cikla, ki sodelujejo pri razgradnji lahko razgradnjive organske snovi v tleh. Merili smo aktivnost celobiohidrolaz (CEL),  $\beta$ -glukozidaz ( $\beta$ -glu) in ksilozidaz (XYL).

Multivariatna analiza je pokazala na podobno dinamiko vseh treh skupin encimov tekom poskusa (Slika 18). Obravnavana tla se med seboj statistično razlikujejo v CEL in XYL aktivnosti, največje encimske aktivnost smo izmerili v R-svež tleh, medtem ko je bila ta v Orig in R-star tleh manjša (Slika 17). Glede na kontrolna tla smo večjo encimsko aktivnost izmerili v tleh z dodano koruzo (Sliki 17 in 19), največje vrednosti 13. dan poskusa. Med merjenimi encimi so največjo aktivnost izkazale  $\beta$ -glukozidaze s skoraj 10-krat višjo aktivnostjo kot CEL in XYL.

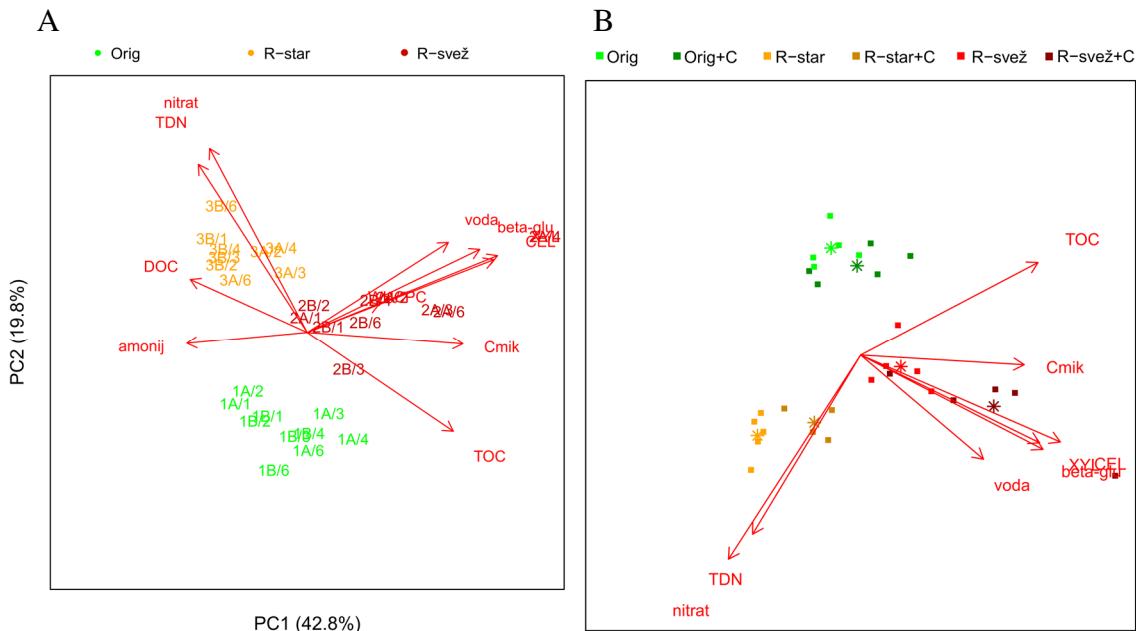


Slika 17: Cellobiohidrolazna, β-glukozidazna in ksilozidazna encimska aktivnost v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih kontrolnih tleh in tleh z dodano korozo (+C), izmerjena na dan 0, 2, 6, 13 in 28 trajanja mikrokozem poskusa. Ročaji označujejo standardni odklon, n = 5.

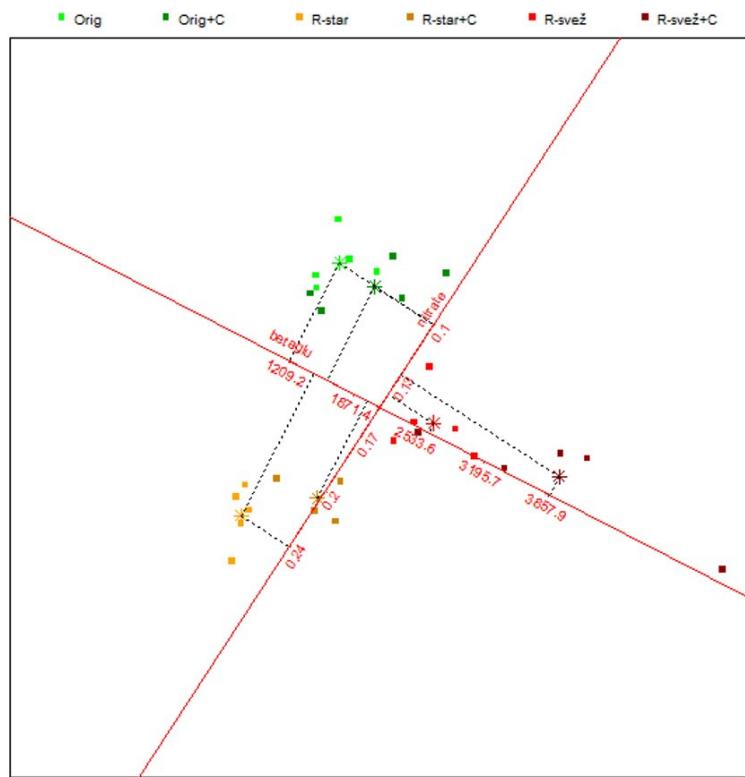
#### 4.6 VPLIV REMEDIACIJE NA TALNE PARAMETRE

Z multivariatno analizo smo analizirali vse merjene parametre, spremeljane med mikrokozem poskusom, in med njimi ugotovili značilne razlike (Slika 18 A). Močno korelirane encimske aktivnosti (CEL, XYL in  $\beta$ -glu) in vsebnost vode v tleh so imele največji vpliv v R-svež tleh v primerjavi z Orig in R-star tlemi. TDN in  $\text{NO}_3^-$  sta med seboj tudi močno povezana parametra in sta največje vrednosti dosegla v R-star, srednje v R-svež in najmanjše v Orig tleh. Obravnavana tla se glede na merjene talne parametre med seboj razlikujejo, prav tako pa se kontrolna tla razlikujejo od tal z dodano koruzo, kar lahko razberemo na diagramu diagonalne diskriminantne analize (Slika 18 B) in dvodimenzionalnem diagramu, kalibriranem za parametra nitrat in celobiohidrolazno aktivnost (Slika 19).

Vzorec R-star+C, vzorčni čas 0, je bil glede na talne parametre DOC, TDN,  $\text{NH}_4^+$  in  $\text{NO}_3^-$  osamelec in je bil zato iz statistične analize izključen. Prav tako je bil izključen talni parameter nitrit, saj se je 69 % meritev nahajalo pod mejo detekcije.



Slika 18: Multivariatna analiza talnih parametrov, **A:** Analiza glavnih komponent (PCA) prikazuje medsebojno odvisnost talnih parametrov. **B:** Diagonalna diskriminantna analiza parametrov z interakcijo tal in obravnavanja kot skupinsko spremenljivko. Prikazane so samo signifikantne spremenljivke ( $p < 0,05$ ).



Slika 19: Kalibrirani dvodimenzionalni diagram (biplot) diagonalne diskriminantne analize talnih parametrov z interakcijo tal in obravnavanja kot skupinsko spremenljivko. Kalibracija je prikazana za talni parameter  $\text{NO}_3^-$  in cellobiohidrolazno encimsko aktivnost (CEL).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 VPLIV REMEDIACIJE NA LASTNOSTI TAL

Vzorec tal iz Mežiške doline, uporabljen v naši raziskavi, je bil močno onesnažen s PTK in sicer s  $4358,9 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb,  $25,7 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd in  $2900,7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn. Po pranju tal s  $120 \text{ mM}$  raztopino EDTA so se vsebnosti kovin v tleh občutno zmanjšale (Pregl. 10), in sicer koncentracije Pb za 67 % in 69 %, koncentracije Cd za 61 % in 61 % ter koncentracije Zn za samo 6 % in 18 % (v zaporedju R-svež in R-star tla). EDTA ima namreč do Zn manjšo afiniteto za tvorjenje koordinacijskih vezi, poleg tega pa so Jelusic in sod. (2014b) pokazali, da se Zn v istih tleh, kot so bila uporabljena v našem poskusu, nahaja predvsem v nedostopni rezidualni talni frakciji in ga je zato težko ekstrahirati. Ker je EDTA neselektivni kelator, lahko poleg kovin iz tal odstrani tudi katione, ki so za rast esencialnega pomena (Mn, Fe, Ca, Mg, Al) (Zhang in sod., 2010). Podobno, kot poročajo Jelusic in sod. (2014b), se je po remediaciji pomembno zmanjšala vsebnost esencialnega mikrohranila Mn, in sicer za 55 % in 54 % v R-svež in R-star tleh, vsebnost Fe pa je ostala nespremenjena.

Bolj kot skupna vsebnost kovin v tleh, sta pomembni njihova dostopnost in mobilnost ter posledično prenos v organizme. Ena glavnih lastnosti EDTA pa je prav povečevanje teh dveh parametrov (Zhang in sod., 2010). S sekvenčnimi ekstrakcijami smo določili razporeditev kovin Pb, Cd in Mn v šestih frakcijah originalnih in remediiranih tal (Pregl. 11). Po remediaciji se je zmanjšala vsebnost kovin v skoraj vseh frakcijah. V prvi, vodotopni frakciji, ki je tudi biodostopna, so bile vsebnosti Pb in Cd v R-svež tleh značilno večje v primerjavi z Orig tlemi in R-star tlemi. Spiranje z EDTA namreč povzroči prerazporeditve kovin med frakcijami, lahko celo iz stabilne rezidualne frakcije (Zhang in sod., 2010). Vsebnosti PTK v dostopni frakciji lahko zmanjšamo s temeljitejšim spiranjem tal med remediacijskim procesom (Jelusic in sod., 2013). Med remediacijo so se najbolj izprale kovine, vezane na Fe in Mn okside (IV. frakcija), Pb in Cd pa sta bila sicer pred in tudi po pranju tal z EDTA vezana predvsem na karbonate (III. frakcija) in organsko snov (V. frakcija).

Remediacijski postopek je spremenil teksturo tal (Pregl. 12), zmanjšal je odstotek peska (za 17,0 in 12,4 % v zaporedju R-svež, R-star) in povečal odstotek finega melja (za 11,7 in 10,6 %). Do izgub peščene frakcije je prišlo v 2. koraku remediacijskega postopka, ko smo procesno goščo presejali skozi 2 mm sito. Prav tako bi med postopkom lahko prišlo do razapljanja karbonatov (Jelusic in sod., 2014b). Povečanje organske snovi (za 1,5 % v R-svež) in N (za 0,06 in 0,02 % v R-svež in R-star) po remediaciji bi lahko pripisali vezavi EDTA na negativno nabito površino talnih delcev in organske snovi (Jez in sod., 2016). Remediacija je tako s spremembom deležev finega melja in organske snovi tal statistično značilno povečala sposobnost tal za zadrževanje vode, t.j. poljsko kapaciteto tal (Pregl. 12). Povečanje sposobnosti tal za zadrževanje vode je posebno izrazito pri R-svež tleh, kar lahko pojasnimo z močno povečanim deležem organske snovi po remediaciji. Iz literature je znano, da se ob povečanju organske snovi v tleh poveča tudi sposobnost tal za zadrževanje vode (Guenet in sod., 2011). V R-svež tleh smo ugotovili tudi močno povečanje deleža vode pri TV, kar se je odrazilo v zmanjšanju rastlinam dostopne vode (EPK) (Slika 12). Hudson (1994) poroča, da se ob dodatku organske snovi (povečanje iz 0,5 na 3 %) rastlinam dostopna voda več kot podvojila, in sicer se je voda, zadržana pri poljski kapaciteti veliko

bolj povečala glede na vodo, zadržano pri točki venenja, kar je v nasprotju z našimi rezultati. Domnevamo, da je remediacijski postopek (kemijska in mehanska obdelava) vplival na lastnosti ponovno oblikovanih strukturnih agregatov in mikropornega prostora, kar je posledično vplivalo na TV. V remediacijskem postopku so strukturni agregati namreč v raztopini razpadli, z mletjem tal in naknadnim ribanjem skozi sito pa smo jih ponovno oblikovali.

## 5.2 MINERALIZACIJA ORGANSKE SNOVI V ORIGINALNIH IN REMEDIIRANIH TLEH

Med mikrokozem poskusom smo spremljali hitrost mineralizacije v Orig, R-svež in R-star tleh z merjenjem hitrosti sproščanja CO<sub>2</sub>-C v kontrolnih tleh in v tleh z dodano korozo (+C) (Slika 7). Hitrost mineralizacije se je med Orig, R-svež in R-star tlemi razlikovala v kontrolnem obravnavanju (brez dodane koruze). Največja hitrost mineralizacije je bila v R-svež, srednja v Orig in najmanjša v R-star tleh. Hitrost mineralizacije sovpada s številčnostjo mikroorganizmov, saj smo največ mikrobne biomase (C<sub>mik</sub>) izmerili v R-svež, srednje v Orig in najmanj v R-star tleh (Slika 7). Kakor je znano iz literature, se ob večji razpoložljivosti organske snovi mikrobna biomasa poveča (Chander in Joergensen 2008; Pascual in sod., 2000; Zech in sod., 1997). Razlog za večje sproščanje CO<sub>2</sub>-C v R-svež tleh bi bili lahko tudi ostanki EDTA po pranju tal. Jez in sod. (2016) so ugotovili, da je ostankov EDTA v tleh s časom vedno manj, kar bi lahko bila posledica vezave na talne delce, ali pa njegove mikrobne razgradnje, kar bi se tudi odrazilo v večji mikrobni aktivnosti in respiraciji. Mühlbachova (2011) vpliv EDTA v onesnaženih ornih tleh primerja s stresom, navadno povzročenim s presežnimi koncentracijami kovin, ki povečajo mikrobno respiracijo. Poleg tega pa bi na višjo respiracijo lahko vplivale z EDTA mobilizirane kovine (Pb in Cd), ki smo jih v dostopni frakciji R-svež tal izmerili tudi v našem poskusu.

V tleh z dodano korozo se je sproščanje CO<sub>2</sub>-C tekom mikrokozem poskusa zmanjševalo (Slika 4 in 5), saj se je substrat porabljal, dodan pa ni bil nov vir C (Doelman in Haanstra, 1984). Hitrost mineralizacije dodane koruze je bila v vseh obravnavanih tleh enaka (Slika 5). Na mineralizacijo dodane koruze tako niso vplivale niti skupne vsebnosti kovin, koncentracije Pb in Cd so bile namreč v remediiiranih tleh občutno manjše (Pregl. 10), niti povečane koncentracije Pb in Cd v biodostopni frakciji R-svež tal (Pregl. 11). Tudi Pérez de Mora in sod. (2005) poročajo, da koncentracija topnih PTK ne kaže direktnega vpliva na stopnjo mineralizacije. Po drugi strani pa tudi dodatek EDTA v tla, onesnažena s Pb, Zn in Cu, ni imel signifikantnega vpliva na sproščanje CO<sub>2</sub>, mikrobno biomaso in ATP (Chander in Joergensen, 2008). To pomeni, da je bil dodatek organskega C zadosten stimulus za izenačenje mikrobne aktivnosti v Orig in obojih remediiiranih tleh, kljub razlikam v lastnostih tal ter razlikam v biomasi in strukturi mikrobnih združb. Podobno so Konopka in sod. (1999) pokazali, da so bile v tleh z gradientom dodanega Pb (0,00039 do 48 mmol kg<sup>-1</sup> tal), kljub razlikam v strukturi, mikrobne združbe sposobne aktivne mineralizacije <sup>14</sup>C-glukoze. Naši rezultati potrjujejo, da razgradnjo lahko razgradljive organske snovi v tleh izvaja velik spekter filogenetsko različnih mikroorganizmov oziroma so bili ti v obravnavanih tleh dobro zastopani in odporni na spremenjene talne pogoje. Razlog, da mineralizacija v R-svež tleh, kjer smo izmerili največjo mikrobno biomaso, ob dodatku

koruze ni bila še hitrejša, je morda v različni strukturi mikrobnih združb ali negativnem vplivu biodostopnih kovin.

Po pričakovanjih, je v tleh z dodano korozo mineralizacija potekala hitreje kot v kontrolnih tleh (Sliki 4 in 5), dodatek koruze pa je sprožil tudi mineralizacijo talne organske snovi, o čemer poročajo tudi številne druge študije (Engelking in sod., 2007; Fontaine in sod., 2004, 2007; Schaeffer in Evans, 2005; Shen in Bartha, 1997). Za razlogo tako imenovanega sprožilnega učinka, t. j. pospešene mineralizacije talnega organskega C, je možnih več mehanizmov. Prvi je potreba po N, ki jo spodbudi dodatek sveže organske snovi. Mikroorganizmi lahko z energijo, ki jo pridobijo z mineralizacijo sveže organske snovi, sintetizirajo encime, s katerimi nato dostopajo do N shranjenega v talni organski snovi (Guenet in sod., 2012). V našem poskusu do omejene preskrbljenosti z N ni prišlo, nasprotno smo opazili akumulacijo  $\text{NO}_3^-$  v vseh obravnavanih tleh (Slika 8). Z drugim mehanizmom dodana organska snov pospeši rast mikroorganizmov in s tem produkcijo ekso-encimov, ki razgrajujejo dodani substrat in sveže mikrobne ostanke, poleg tega pa naj bi bili sposobni mineralizirati tudi talni C (Fontaine in sod., 2003, 2004). Povečana encimska aktivnost v tleh z dodano korozo, predvsem v R-svež tleh (Slika 18), kaže na pospešeno razgradnjo organske snovi glede na kontrolna tla, ki je v našem poskusu trajala celoten čas poskusa (Slika 5). Podobno Engelking in sod. (2007) poročajo, da je povečano sproščanje  $\text{CO}_2$  po dodatku celuloze trajalo več kot 30 dni, v nasprotju z nekaterimi študijami, ko je sprožilni učinek trajal manj časa (Fontaine in sod., 2003; Kuzyakov in sod., 2000).

Vsebnost mikrobne biomase ( $C_{\text{mic}}$ ) je po naših meritvah močno korelirana s hitrostjo mineralizacije. Največjo koncentracijo  $C_{\text{mic}}$  smo izmerili v R-svež, najmanjšo pa v R-star tleh (Slika 7) in tudi mineralizacija v kontrolnih tleh je potekala najhitreje v R-svež tleh in najpočasneje v R-star tleh (Slika 4). Ob dodatku koruze so se koncentracije mikrobnega ogljika povečale, prav tako pa tudi hitrost mineralizacije. Koncentracije  $C_{\text{mic}}$  pa ne odsevajo stanja v tleh ob dodatku koruze, neglede na razlike v  $C_{\text{mic}}$  je mineralizacija v vseh tleh potekala enako hitro (Slika 5). Povečane koncentracije  $C_{\text{mic}}$  v vseh obravnavanih tleh smo opazili šele od 6. dne dalje. Kot odgovor na dodatek lahko razgradljivega substrata mikroorganizmi namreč povečajo metabolno aktivnost (npr. dihanje) v roku nekaj minut do nekaj ur, razmnoževanje pa se lahko začne šele nekaj ur ali dni kasneje (Blagodatskaya in Kuzyakov, 2013).

$C_{\text{mic}}$  je bolj občutljiv kazalec kakovosti tal kot vsebnost organske snovi, saj se na spremembe odziva hitreje in močneje (Pascual in sod., 2000). Vendar pa smo v poskusu med tlemi izmerili tudi razlike v topnem organskem dušiku (DOC), čigar porabljjanje vodi v mikrobno imobilizacijo, kot tudi mineralizacijo talnega C in N (Tian in sod., 2010). V tleh z dodano korozo smo v začetku poskusa izmerili večje koncentracije DOC kot v kontrolnih tleh (Slika 7), kar je pričakovano, saj odmrli rastinski ostanki vsebujejo veliko topnega organskega C v celulozi, proteinih in polisaharidih (Aoyama, 1996; Boyer in Groffman, 1996). Zmanjševanje koncentracije DOC v tleh z dodano korozo nakazuje hitrejše porabljjanje topnega organskega C zaradi pospešene mineralizacije in mikrobne rasti, medtem ko so bile v kontrolnih tleh vsebnosti DOC relativno konstantne (Slika 7), ter hitrost mineralizacije občutno manjša. Med stopnjo mineralizacije C in koncentracijo DOC so znane pozitivne korelacije, kar pomeni, da je DOC substrat za produkcijo  $\text{CO}_2$ , ki nastaja med mineralizacijo, relativno s porabo C (Cook in Allan, 1992; Lundquist in sod., 1999). To se sklada z našimi

rezultati, vendar je poraba DOC v R-star+C tleh nekoliko manjša (Slika 7), kljub temu, da je mineralizacija potekala v vseh tleh enako hitro (Slika 5).

S tem, ko mikroorganizmi porabljajo labilni/lahko dostopni C, energijo porabljajo za rast, dostopni N pa imobilizirajo (Schaeffer in Evans, 2005). Ali se bo N s porabljanjem organske snovi sproščal (mineralizacija) ali se bo dodatni anorganski N asimiliral (imobilizacija) določata dva pomembna dejavnika: 1) Rast mikrobne biomase na enoto porabljenega substrata in 2) C/N razmerje substrata (Hooker in Stark, 2008). Porabljanje substrata povečajo dostopna hranila in organska snov ter optimalna vsebnost vode v tleh (del Giorgio in Cole, 1998; Six in sod., 2006), vse to pa se bolj kot v mineralizaciji odrazi v večji imobilizaciji N (Hooker in Stark, 2008). Takoj po dodatku lahko dostopnega substrata, kot je celuloza, med hitro rastjo mikroorganizmov namreč nastane veliko mikrobnih ostankov (Joergensen in sod., 1995b), v manjši meri odmrle mikrobne biomase in v večji meri eksencimov, v katere se transportira večina imobiliziranega N (Engelking in sod., 2007). V naši raziskavi pa smo nasprotno s pričakovanji o večji imobilizaciji N, ki naj bi sledila večjim koncentracijam dostopnega C, izmerili akumulacijo  $\text{NO}_3^-$  tekom celotnega poskusa, največ v R-star in najmanj v Orig tleh v obeh obravnavanjih (Slika 8). Podobno Hooker in Stark (2008) poročata, da se je večje sproščanje N po dodatku svežih odmrlih organskih ostankov najverjetneje pojavilo zaradi razgradnje substratov z nizkim C/N razmerjem, kar je sprožilo mineralizacijo. Topne komponente rastlinskih ostankov se sproščajo v zgodnjih fazah razgradnje, medtem ko se polimeri, kot je celuloza, z večjim C/N razmerjem razgrajujejo počasneje v kasnejših fazah (Hooker in Stark, 2008). Ker pa je do največje akumulacije  $\text{NO}_3^-$  prišlo v remediiranih, najmanjša pa je bila v Orig tleh, je možno tudi, da je pranje tal z EDTA vplivalo na N-cikel in nitrifikacijo.

Ne smemo zanemariti, da smo mikrobni C ter dostopne oblike C in N ekstrahirali z 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ , zato moramo upoštevati, da so izmerjene vrednosti Cmik, DOC, TDN,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2$  podcenjene. Glede na ekstrakcijo s  $\text{K}_2\text{SO}_4$  lahko s  $\text{CaCl}_2$  ekstrahiramo manj (tretjino) DOC, rezultata pa sta sicer signifikantno korelirana (Joergensen, 1995a). Razlika v DOC med fumigiranimi in nefumigiranimi vzorci pa je skoraj identična, zato pri izračunu ekstrahiranega organskega C v mikrobeno biomaso lahko uporabimo isti faktor. Tudi vrednosti ekstrahiranega amonija so podcenjene, a dobro korelirane z vrednostmi ekstrakcije s  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Joergensen, 1995a).

### 5.3 STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE IN FUNKCIJA TAL

V Orig in tudi remediiranih tleh so bile PTK še vedno prisotne in kljub temu je v vseh obravnavanih tleh ob dodatku koruze mineralizacija potekalo enako hitro, encimska aktivnost pa je bila v R-svež tleh celo največja (Slike 5 in 19). Po dosedaj znanih dokazih, so majhne koncentracije elementov v sledovih stimulatorne za rast mikroorganizmov, večje koncentracije pa nanje delujejo toksično – najpogosteje gre za zmanjšanje mikrobne rasti, sposobnosti razgradnje organske snovi in encimske aktivnosti (Kabata-Pendias in Pendias, 2000). Doelman je povzel izsledke številnih študij o učinkih različnih koncentracij PTK na mikrobeno aktivnost v tleh: Cd in Zn sta se, poleg Hg in Ni, izkazala za toksična pri manjših koncentracijah kot druge kovine, saj inhibirata talno respiracijo že pri koncentracijah  $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ , vedno pa pri  $\leq 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  suhih tal. Pb jo zavre pri koncentracijah  $\leq 100 \text{ mg kg}^{-1}$ .

<sup>1</sup>, vedno pa pri  $\leq 10000 \text{ mg kg}^{-1}$  suhih tal. Za Zn, Fe in Mn lahko posplošimo, da se največje koncentracije, potrebne za številne mikroorganizme (glive, bakterije, aktinomicete), nahajajo okrog  $100 \mu\text{M}$ , v tem rangu pa so tudi inhibitorne koncentracije teh elementov za vegetativno rast in sekundarni metabolizem mikroorganizmov (Kabata-Pendias in Pendias, 2000). V našem poskusu so bile koncentracije skupnih vsebnosti kovin večje od spodnje meje navedenih, zato predvidevamo, da so bolj kot skupne vsebnosti za mineralizacijo in encimsko aktivnost pomembne biodostopne kovine. Kot smo pokazali s frakcionalno ekstrakcijo kovin (Pregl. 11), sta bila Pb in Cd pred in tudi po remediaciji najbolj akumulirana v slabo mobilni III. in V. frakciji, kjer sta bila vezana na karbonate in organsko snov. V Orig in R-star tleh so bile koncentracije Pb in Cd v biodostopnih frakcijah (I. in II.) majhne, zato smo tudi pričakovali dobro zastopano in aktivno mikrobno združbo, kljub temu, da veljajo Orig tla za onesnažena. V R-svež tleh bi sicer zaradi največ razpoložljive organske snovi pričakovali največjo hitrost mineralizacije tudi ob dodatku koruze, vendar je možno, da so jo povečane koncentracije Pb in Cd v biodostopni frakciji do neke mere zmanjšale. Suhadolc in sod. (2004) so na primer dokazali, da je povečanje biodostopnosti PTK značilno zmanjšalo stopnjo razgradnje in mineralizacije herbicida izoproturona.

V vseh obravnavanih tleh smo določili različno relativno zastopanost glivnih in bakterijskih TRF (Slike 14, 15, 16 in 17), kar kaže na to, da originalna tla in tla po remediaciji naseljujejo različne glivne in bakterijske združbe. Ker imajo tudi R-star tla različen T-RFLP profil od drugih tal sklepamo, da se po remediaciji, predvsem zaradi spremenjenih talnih fizikalno-kemijskih lastnosti, začnejo razvijati druge glivne in bakterijske združbe, kot v Orig tleh. Podobno Eichorst in Kuske (2012) poročata, da so sestava tal in talni pogoji velikega pomena za oblikovanje bakterijskih in glivnih združb, saj zaradi različne velikosti in rastnih oblik naseljujejo različne talne niše. Ker se na dodatek organskega materiala odzovejo različne mikrobne združbe, ki so ga sposobne presnoviti, bi bila njihova zastopanost lahko tudi odgovor na enako hitrost mineralizacije v obravnavanih tleh ob dodatku koruze v mikrokozem. Po poročanjih so se na dodatek celuloze odzvale različne bakterijske in glivne združbe in tako spremenile mikrobno strukturo, na kar je močno vplivala predvsem vsebnost organske snovi, nitrata in pH (Eichorst in Kuske, 2012), ki so bili tudi v našem primeru po remediaciji precej spremenjeni (Pregl. 12 in 13). Da je dodatek organskega C v mikrokozem že sam po sebi velik selektivni faktor mikrobnih združb so pokazali tudi Nakatsu in sod., (2005), ki so ugotovili, da so se spremembe v strukturni mikrobnih združb zgodile predvsem zaradi stimulatornega vira glukoze ali ksilena in ne zaradi dodatka kovine (Pb ali Cr). Kakorkoli pa posledic onesnaženja tal s kovinami na mikrobno združbo ni lahko predvideti, saj se na eni strani zmanjša aktivnost določenih mikrobnih vrst, na drugi pa poveča toleranca drugim (Kabata-Pendias in Pendias, 2000).

Pri T-RFLP analizi arhej smo detektirali le 6 različnih TRF, ki so bili prisotni v vseh obravnavanih tleh (Slika 16). Raznolikost združb arhej se ni spremenjala niti s časom niti z dodatkom koruznega materiala. Sicer so študije talnega ekosistema odkrile zastopanost arhej med 0 in 10 % vseh 16S rRNK sekvenč v različnih ekosistemih in okrog 1 % v ornih tleh (Bates in sod., 2011), pa vse do 38 % mikrobne populacije (Kemnitz in sod., 2007). Čeprav so s qPCR izmerili visoko zastopanost arhej (38 %), pa je T-RFLP analiza v kislih gozdnih tleh razkrila le 4 različne TRF (Kemnitz in sod., 2007). Sicer so združbe arhej v tleh pogosto precej stabilne in so prilagojene na spremenjajoče okoljske dejavnike, omejena hranila in nizek pH (Ollivier in sod., 2011).

Pestrost mikrobnih združb, ki smo jo ocenili kot število različnih unikatnih TRF (Liu in sod., 1997), se je v obravnavanih tleh tekom mikrokozem poskusa različno spreminjala. Zanimivo je dodatek organske snovi v tla pestrost glivnih združb zmanjšal, bakterijska pestrost pa se je povečala (Sliki 16 B in 17 B). Tiedje in sod. (1999) so predlagali, da med najpomembnejše faktorje, ki vodijo sestavo mikrobnih združb sodijo različni viri ogljika iz rastlinskih ostankov, vpliv rizosfere in razične kemijske reakcije v talnem okolju, posebno talni pH in ključna hranila. Glede na vrsto dodanega substrata tako spodbudimo specifične skupine gliv in bakterij, ki so sposobne najbolje izkoristiti dodani vir ogljika (Pérez-de-Mora in sod., 2006). Na specializacijo mikrobnih združb glede na dodani substrat kaže zmanjšanje glivnih združb na sredini poskusa, ko se je povečala mikrobna biomasa. Drugačna strategija bakterij pa se odraža v povečanju pestrosti hkrati s povečanjem mikrobnih zastopanosti ob dodatku lahko razgradnjive organske snovi. Grčman in sod. (2001) poročajo, da so v primerjavi z bakterijami glive bolj občutljive na EDTA ali povečano biodostopnost kovin, ki jo ta povzroča, česar z našim poskusom sicer ne moremo potrditi. Večjo odpornosti bakterij pa pripisujejo njihovemu bolj raznolikemu metabolizmu, ki jim omogoča večje prilagajanje na spremenjene okoljske pogoje.

Vsaka analizna metoda ima svoje prednosti, vedno pa s seboj prinaša tudi napako meritve. Za primerjavo strukture in pestrosti mikrobnih združb predstavnikov vseh treh domen: gliv, bakterij in arhej v originalnih in remediiranih tleh smo uporabili metodo T-RFLP. S to metodo smo kvantificirali variabilnost v genu za malo podenoto (16S) ribosomske RNK in ITS regiji, katere rezultat je bil rRNK odtisu mikrobnih združb. Metoda T-RFLP je zelo uporabna pri velikem številu vzorcev in kvantifikaciji razlik v pestrosti in strukturi visoko kompleksnih talnih združb. Slabost te metode je, da podcenjuje diverzitet mikrobnih združb, saj lahko razloči le omejeno število elektroforetskih lis (*bands*), navadno 100 na gel. Druga slabost je, da si mikrofone vrste lahko delijo filotipe. Rezultat T-RFLP metode pa je močno odvisen ne samo od variabilnosti markerskega gena, temveč tudi od izbire restriktivnega encima. Nizka izmerjena raznolikost arhejskih družb bi tako lahko bila tudi posledica občutljivosti izbrane metode. Vendar pa metoda zagotavlja robusten indeks mikrobnih pestrosti, ki je navadno skladen s tistem iz klonskih knjižnic (Fierer in Jackson, 2006). Nezanemarljivo dejstvo je tudi, da smo v poskusu uporabili nesteriliziran organski material, s katerim bi v mikrokozme z dodanim C lahko vnesli tudi dodatne mikroorganizme. Vendar so se razmerja v mikrobeni biomasi med tlemi ohranila tudi po dodatku koruze, razlik pa nismo opazili niti v pestrosti mikrobnih združb, zato ta vpliv najverjetneje ni značilen. Dinamiko koncentracij DNK naj bi odsevale spremembe v mikrobeni biomasi med rastjo (Blagodatskaya in Kuzyakov, 2013), vendar pa je uspešnost ekstrakcije DNK in RNK močno odvisna od tipa tal in inhibitornih snovi v njih, ki zmanjšujejo njeno uspešnost. Glede na to, da so se koncentracije dostopnih PTK, vsebnost organske snovi in druge pedološke lastnosti tal po remediaciji precej spremenile, je to najverjetneje tudi vplivalo na uspešnost sočasne ekstrakcije DNK/RNK (Slika 11, Priloga B). Kot merilo koncentracije mikrobeni biomase smo tako upoštevali  $C_{mik}$ , ki se široko uporablja za ocenjevanje kakovosti tal (Gil-Sotres in sod., 2005).

EDTA je v številnih študijah izkazal fitotoksičen vpliv na rast in fiziološke procese rastlin, kot so kitajsko zelje (*Brassica rapa*), črna detelja (*Trifolium pratense*) (Grčman in sod., 2001), plazeča detelja (*Trifolium repens* L.) (Zupanc in sod., 2014) in sončnica (*Helianthus*

*annuus*) (Chen in Cutright, 2001), kot tudi negativen vpliv na talne mikroorganizme. Preprečil je razvoj arbuskularne mikorize, opazili so toksičen vpliv na glive, ki so ga izmerili kot zmanjšano viabilnost mikroorganizmov (Grčman in sod., 2001), zmanjšano kolonizacijo korenin graha (*Pisum sativum*) z mikoriznimi glivami ter splošno upad mikrobne biomase (Mühlbachova, 2011) in spremembo mikrobne združbe (Jelusic in sod., 2013, 2014a). Kot navajajo avtorji, bi to lahko bile posledice toksičnosti samega kelatorja ali njegovih kompleksov s kovinami, med tretiranjem nezadostno sprnih iz tal, pomanjkanje in fitodostopnost mikrohranil (Cu, Fe, Mn), ki se sperejo med remediacijo in spremenjene fizikalne lastnosti tal zaradi postopka pranja tal. Medtem ko Jelusic in sod. (2013) poročajo o obnovitvi mikrobnih združb v 7 tednih po pranju tal z EDTA, pa naši rezultati prav v teh tleh (R-star), kjer smo v 1 letu po remediaciji pričakovali mikrobeno obnovitev, kažejo najmanjšo vsebnost mikrobne biomase, kot tudi majhno pestrost mikrobnih združb (Slike 7, 17 in 18). Vendar pa je v tleh s stimulacijo dodanega organskega C vseeno potekala aktivna mineralizacija, enako kot Orig in R-svež tla (Slika 5). Podobno so z dodatkom gnoja in šote (Zupanc in sod., 2014) izboljšali rast rastlin na remediiranih tleh, z gnojili (N, K, Mn in Mg) pa so delno obnovili tudi neto fotosintezno aktivnost, prevodnost listnih rež in transpiracijo pri špinači (*Spinacia oleracea L.*) (Jelusic in sod., 2014b). Različni mikroorganizmi so namreč sposobni opravljati enake funkcije in ko se mikrobeta združba zaradi drugačnih okoljskih vplivov spremeni, prevzamejo nihovo vlogo v ekosistemu drugi mikroorganizmi (funkcionalna redundanca). Generalno, so encimski sistemi, ki jih proizvajajo različni mikroorganizmi za hidrolizo določenega polisaharida celične stene, sestavljeni iz podobnih encimov iz istih družin, kljub temu, da so ti sistemi med bolj kompleksnimi (od nekaj pa do več kot 20 različnim encimov) (Warren, 1996).

Encimska aktivnost daje pomemben podatek o mineralizaciji v tleh, saj so mikroorganizmi esencialni pri kroženju hranil, celulazni sistem pa je primarnega pomena za razgradnjo celuloznih materialov v tleh. Organizmi, ki razgrajujejo celulozo, navadno razgrajujejo tudi hemicelulozo, zato celulaze in hemicelulaze štejemo kot komponente sistema za razgradnjo rastlinske celične stene (Warren, 1996). Dinamika merjenih encimov (celobiohidrolaz,  $\beta$ -glukozidaz in ksilozidaz) je bila v vseh obravnavanih tleh zelo podobna (Slika 19).  $\beta$ -glukozidaze pa so izkazale največjo aktivnost (Slika 19), v talnem C ciklu igrajo namreč zelo pomembno vlogo, saj so s hidrolizo celobioze ključne pri regulaciji hitrosti mikrobne razgradnje celuloze do glukoze (Pérez de Mora in sod., 2005) in produkciji za mikroorganizme lahko dostopnega DOC. Največjo  $\beta$ -glukozidazno aktivnost smo izmerili v R-svež tleh, saj se produkcija teh encimov navadno poveča, če se v tleh poveča vsebnost organske snovi in mikrobeno biomase, kot so ugotovili s primerjavo kratkoročnih sprememb v organski snovi med dvema kmetijskima praksama (Lagomarsino in sod., 2009).

Kovinski ioni lahko inhibirajo encimske reakcije tako, da reagirajo s proteinsko aktivno skupino encima ali pa reagirajo s kompleksom encim-substrat (Deng in Tabatabai, 1995). Bolj kot od skupnih, pa je encimska aktivnost odvisna od biodostopnih PTK (Aguilar in sod., 2004). Zato je presenetljivo, da se povečane koncentracije Pb in Cd v prvi (Pb in Cd) ter drugi (Pb) biodostopni frakciji R-svež tal niso odražale v zmanjšani encimski aktivnosti, ampak je bila ta, nasprotno, največja (Slika 19). V študijah, kjer so merili encimske aktivnosti različnih encimov, zaključujejo, da zaradi nekonsistentnih odgovorov encimske aktivnosti za onesnaženje s PTK ni mogoče definirati markerskega encima (Majer in sod., 2002). Naša opažanja se skladajo tudi s poročanjem Pérez de Mora in sod. (2005), ki so

ugotovili, da  $\beta$ -glukozidazna aktivnost pozitivno korelirana s  $C_{mik}$ , niso pa odkrili negativne korelacije s koncentracijami kovin (Cd, Zn, Cu) v talni raztopini. Po njihovih opažanjih je na  $\beta$ -glukozidazno aktivnost najbolj vplivala vrsta dodanega organskega materiala. V našem eksperimentu je bila podobno, z encimsko aktivnostjo pozitivno korelirana koncentracija  $C_{mik}$  in vsebnost vode v tleh (Slika 10), ki sta se 6. dan poskusa, tako kot encimske aktivnosti, precej povečali (Slika 7 in 19). Zato sklepamo, da sta to glavna parametra, ki sta vplivala na encimsko aktivnost v našem poskusu. Udovic in Lestan (2012) po remediaciji z EDTA v tleh iz Mežiške doline opažata zmanjšanje mikrobne aktivnosti ( $\beta$ -glukozidaze, dehidrogenaze, kisle fosfataze), ki jo pripisujeta povečanju pH, ki ima sicer na mikrobno aktivnost velik vpliv. pH se je po remediaciji povečal tudi v našem eksperimentu, vendar je bilo povečanje kljub signifikantnosti precej majhno (za 0,19 oz. 0,17), da bi mu lahko pripisovali biološki pomen. Metem ko tudi nekatere druge študije poročajo, da EDTA zmanjšuje mikrobno aktivnost in porabljanje substrata na Biolog ploščah (Ultra in sod., 2005), pa druge kažejo, da prisotnost EDTA v tleh, dolgoročno onesnaženih z visokimi in nizkimi koncentracijami Pb, Cd, Zn in Cu, nima vpliva na mikrobno biomaso, niti na mineralizacijo C (Chander in Joergensen 2008).

## 6 SKLEPI

Remediacija tal z vodno raztopino liganda EDTA je spremenila tako skupno vsebnost in biodostopnost kovin, kot tudi fizikalno-kemijske lastnosti tal.

Mikrobne združbe gliv in bakterij, ki so se razvile v remediiranih tleh, se razlikujejo od združb v originalnih tleh, česar pa nismo dokazali za arheje.

Remediacija s kovinami onesnaženih tal ni vplivala na mineralizacijo modelne organske snovi (koruze), ne v svežih ne v staranih remediiranih tleh, kljub različni strukturi in velikosti mikrobnih združb. V prihodnje bi bilo potrebno raziskati vpliv remediacije tal na fiziološko/filogenetsko ozek proces, ki ga izvaja omejeno število različnih organizmov.

Remediacija je vplivala na mineralizacijo v kontrolnih tleh brez dodatka organske snovi (koruze). Najverjetneje zaradi različne vsebnosti organske snovi ter različne mikrobske strukture in zastopanosti v obravnavanih tleh.

## 7 POVZETEK

Potencialno toksične kovine (PTK) v Evropi in svetu predstavljajo eno glavnih onesnažil. V Sloveniji je eno takšnih območij zgornja Mežiška dolina, ki je zaradi nekdanje rudarske in talilniške dejavnosti onesnažena s Pb, Zn in Cd. Ker kovine niso razgradljive in se v tleh kopijo, lokacije s presežnimi koncentracijami PTK predstavljajo tveganje za zdravje okolja in človeka. Najbolj uporabljana *ex situ* remediacijska metoda je pranje tal z vodno raztopino EDTA, ki je tudi zelo uspešna pri odstranjevanju presežnih PTK iz tal. Vendar pa lahko poleg PTK iz tal izpere tudi rastlinam in mikroorganizmom potrebna hranila ter spremeni fizikalno-kemijske lastnosti tal. Z nalogo smo zato želeli preveriti vpliv remediacijskega postopka na fizikalno-kemijske lastnosti tal, skupne vsebnosti in dostopne oblike PTK ter strukturo in delovanje talne mikrobne združbe, ki je esencialnega pomena pri kroženju hrani.

Zasnovali smo mikrokozem poskus, v katerem smo primerjali originalna tla, onesnažena s 4359 Pb, 1901 Zn in 26 mg kg<sup>-1</sup> Cd, z remediiranimi tlemi (120 mM EDTA): sveže remediiranimi (2 meseca po remediaciji) in staranimi remediiranimi tlemi (1 leto po remediaciji). Tlem smo kot modelno organsko snov dodali zmleto koruzo, za kontrolo pa smo uporabili tla brez dodane koruze. V 28-dnevnom mikrokozmu poskusu smo z IRMS-GC merili sproščanje CO<sub>2</sub> in njegovo izotopsko sestavo, merili pa smo tudi vsebnost mikrobne biomase, DOC, TDN, amonija, nitrata in nitrita. Aktivnost mikroorganizmov smo spremljali s testi encimske aktivnosti celobiohidrolaz, β-glukozidaz in ksilozidaz ter s T-RFLP analizo preverili spremembe v strukturi mikrobnih združb in zastopanosti posameznih TRF.

Rezultati so pokazali, da je bilo z remediacijo odstranjenega le malo presežnega Zn (6 % oz. 18 %), koncentracije Pb in Cd v svežih in staranih remediiranih tleh pa so se znatno zmanjšale (Pb za 67 % in 69 % ter Cd za 61 %, podano za sveža in starana remediirana tla). Remediacija je vplivala na razporeditev kovin v talnih frakcijah, zanimivo je, da se je povečala koncentracija Pb in Cd v lahko dostopni frakciji sveže remediiranih tal. Remediacija je močno vplivala tudi na talne parametre, spremnila se je tekstura tal, povečala vsebnost organskega C, skupnega N, dostopnih hrani (P, K), CEC in sposobnost tal za zadrževanje vode.

Med mikrokozem poskusom je v kontrolnih tleh najhitrejša mineralizacija potekala v sveže remediiranih tleh in najpočasnejšo v originalnih tleh, ob dodatku koruze pa se tla v hitrosti mineralizacije niso razlikovala med seboj, kljub največjim vsebnostim organske snovi, mikrobne biomase in encimske aktivnosti v svežih remediiranih tleh. Vpliv remediacije na talni sistem potrjujejo tudi spremembe v strukturi in pestrosti mikrobnih združb gliv in bakterij, ki so se razlikovale v vseh obravnavanih tleh. Razlik v združbah arhej nismo zaznali, saj so arheje v tleh precej stabilne in so se sposobne prilagajati spremenjajočim okoljskim dejavnikom.

V splošnem naši rezultati kažejo, da v tla dodani substrat spodbudi aktivnost mikroorganizmov, ki so ga sposobni izkoristiti kot vir ogljika. Razgradnjo lahko razgradljive organske snovi pa v tleh vrši velik spekter filogenetsko različnih mikroorganizmov, ki so dobro zastopani ob spremembi talnih pogojev. Glavni parametri, ki so vplivali na mineralizacijo v našem poskusu, so bili vsebnost organske snovi, mikrobne biomase in vode

v tleh. Na mineralizacijo koruze v sveže remediiranih tleh so morda vplivale povečane koncentracije Pb in Cd v dostopni frakciji tal, in bi bila sicer zaradi največje vsebnosti organske snovi in mikrobne biomase mineralizacija še hitrejša, morda pa gre učinek pripisati spremembam s strukturi mikrobnih združb. Sicer negativnih vplivov EDTA na mineralizacijo lahko dostopne organske snovi, kljub razlikam v strukturi mikrobnih združb in spremenjenih talnim fizikalno-kemijskim lastnostim, nismo ugotovili. V nadalnjih študijah pa bi bilo dobro natančneje raziskati učinek remediacije z EDTA na cikel N in druge procese, ki so specifični za filogenetsko ožji spekter mikroorganizmov.

## 8 VIRI

- Abumaizar R. J., Smith E. H. 1999. Heavy metal contaminants removal by soil washing. *Journal of Hazardous Materials*, B70: 71-86
- Aguilar J., Dorronsoro C., Fernández E., Fernández J., García I., Martín F., Simón M. 2004. Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: evolution in time. *Environmental Pollution*, 132: 395–401
- Ahn C. K., Park D., Woo S. H., Park J. M. 2009. Removal of cationic heavy metal from aqueous solution by activated carbon impregnated with anionic surfactants. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 2-3: 1130-1136
- Amon T., Amon B., Kryvoruchko V., Zollitsch W., Mayer K., Gruber L. 2007. Biogas production from maize and dairy cattle manure - influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118: 173-182
- Aoyama M. 1996. Fractionation of water-soluble organic substances formed during plant residue decomposition and high performance size exclusion chromatography of the fractions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 42, 1: 31-40
- Bååth E. 1989. Effects of heavy metals in soils on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution*, 47: 335-379
- Barillot C. D: C., Sarde C.-O., Bert V., Tarnaud E., Cochet N. 2013. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology*, 63: 471-476
- Bates S. T., Berg-Lyons D., Caporaso J. G., Walters W. A., Knight R., Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal*, 5: 908-917
- Bayer E., Shoham Y., Lamed R. 2006. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. V: The prokaryotes. Vol. 2: Ecophysiology and biochemistry. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 578-617
- Baziar M., Mehrasebi M. R., Assadi a., Fazli M. M., Maroosi M., Rahimi F. 2013. Efficiency of non-ionic surfactants - EDTA for treating TPH and heavy metals from contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 11: 41-46
- Begum Z., Rahman I. M. M., Tate Y., Sawai H., Maki T., Hasegawa H. 2012. Remediation of toxic metal contaminated soil by washing with biodegradable aminopolycarboxylate chelants. *Chemosphere*, 87: 1161-1170
- Berg B. 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*, 133: 13-22
- Berg B., McClaugherty C. 2008. Plant litter: decomposition, humus formation, carbon sequestration. 2nd edition. Berlin Heidelberg, Springer: 338 str.

- Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Chemistry*, 67: 192-211
- Bot A., Benites J. 2005. The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food production. Rome, FAO Soils Bulletin: 78 str.
- Boyer J. N., Groffman P. M. 1996. Bioavailability of water extractable organic carbon fractions in forest and agricultural soils profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 6: 783-790
- Brady N. C., Weil R. R. 2008. The nature and properties of soils. 14th ed., revised. Upper Saddle river, Prentice Hall: 975 str.
- Bronick C. J., Lal R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124: 3-22
- Buekers J. 2007. Fixation of cadmium, copper, nickel and zinc in soil: kinetics, mechanisms and its effect on metal bioavailability. *Dissertationes de agricultura*. Katholieke universiteit Leuven, Facultet Bio-ingenieurswetenschappen: 158 str.
- Chander K., Joergensen R. G. 2008. Decomposition of Zn-rich *Arabidopsis halleri* litter in low and high metal soil in the presence and absence of EDTA. *Water Air and Soil Pollution*, 188: 195–204
- Chao T. T. 1984. Use of partial dissolution techniques in geochemical exploration. *Journal of Geochemical Exploration*, 20: 101-135
- Checkai R. T., Corey R. B., Helmke P. A. 1987. Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil*, 99: 335-345
- Chen H., Cultright T. 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 45: 21-28
- Cline S. R., Reed B. E. 1995. Lead removal from soils via bench-scale soil washing techniques. *Journal of Environmental Engineering*, 121, 10: 700-705
- Committee on bioavailability of contaminants in soils and sediments, Water science and technology board, Division on earth and life studies, National research council. 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, tools, and applications. Processes. Washington, DC, The National Academies Press: 420 str.
- Cook B. D., Allan D. L. 1992. Dissolved organic carbon in old field soils: Total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 6: 585-594
- Culman S. W., Bukowski R., Gauch H. G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D. H. 2009. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10: 171

- Degryse F., Smolders E., Parker D. R. 2009. Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications – a review. European Journal of Soil Science, 60: 590-612
- del Giorgio P. A., Cole J. J. 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. Annual Review of Ecology and Systematics, 29: 503-541
- Deng S. P., Tabatabai M. A. 1995. Cellulase activity of soils: effect of trace elements. Soil Biology and Biochemistry, 27, 7: 977-979
- DIN ISO 14240-2. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der mikrobiellen Biomasse. 1999: 10 str.
- Doelman P., Haanstra L. 1984. Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. Plant and Soil, 79: 317-327
- Duffus J. H. 2002. "Heavy metals" – a meaningless term? (IUPAC technical report). Pure and Applied Chemistry, 74, 5: 793-807
- Egli T. 2001. Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92, 2: 89-97
- Einchorst S. A., Kuske C. R. 2012. Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. Applied and Environmental Microbiology, 78: 2316-2327
- Eriksson K. E. L. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Science and Technology, 24, 1: 79-101
- European commission, Joint research centre. 2014. Progress in the management of contaminated sites in Europe. JRC reference reports. Luxembourg, Publications Office of the European Union: 68 str.
- Favas P. J. C., Pratas J., Gomes M. E. P., Calla V. 2011. Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. Journal of Geochemical Exploration, 111: 160-171
- Fierer N., Jackson R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS, 103, 3: 626-631
- Fontaine S., Bardoux G., Abbadie L., Mariotti A. 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. Ecology Letters, 7: 314-320
- Fontaine S., Barot S., Barré P., Bdioui N., Mary B., Rumpel C. 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. Nature Letters, 450: 277-281
- Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? Soil Biology and Biochemistry, 35: 837-843

- Giller K. E., Witter E., McGrath S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30,10: 1389-1414
- Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda C., Leirós M. C., Seoane S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 877-887
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil*, 235: 105-114
- Guenet B., Juarez S., Bardoux G., Abbadie L., Chenu C. 2012. Evidence that stable C is as vulnerable to priming effect as is more labile C in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 52: 43-48
- Guenet B., Juarez S., Bardoux G., Pouteau V., Cheviron N., Marrauld C., Abbadie L., Chenu C. 2011. Metabolic capacities of microorganisms from a long-term bare fallow. *Applied Soil Ecology*, 51: 87-93
- Hooker T. D., Stark J. M. 2008. Soil C and N cycling in three semiarid vegetation types: Response to an in situ pulse of plant detritus. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2678-2685
- Hudson B. D. 1994. Soil organic matter and available water capacity. *Journal of Soil and Water Conservation*. 49, 2: 189-194
- ISO 10390. Soil quality - determination of pH. 2005: 7 str.
- ISO 11274. Soil quality - determination of the water retention characteristic - laboratory methods. 1998: 20 str.
- ISO 11277. Determination of particle size distribution in mineral soil material - method by sieving and sedimentation. 2009: 30 str.
- ISO 11464. Soil quality - pretreatment of samples for physico-chemical analysis. 2006: 11 str.
- ISO 11465. Soil quality - determination of dry matter and water content on a mass basis - gravimetric method. 1993: 3 str.
- Jelusic M., Grcman H., Vodnik D., Suhadolc M., Lestan D. 2013. Functioning of metal contaminated garden soil after remediation. *Environmental Pollution*, 174: 63-70
- Jelusic M., Vodnik D., Macek I., Lestan D. 2014a. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part II: Can remediated soil be used as a plant substrate? *The Science of the Total Environment*, 475: 142-152
- Jelusic M., Vodnik D., Lestan D. 2014b. Revitalization of EDTA-remediated soil by fertilization and soil amendments. *Ecological Engineering*, 73: 429-438

- Jez E., Lestan D. 2016. EDTA retention and emissions from remediated soil. *Chemosphere*, 151: 202-209
- Joergensen R. G. 1995a. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: extraction with 0,01 M CaCl<sub>2</sub>. *Agribiological Research*, 48: 319-324
- Joergensen R. G., Schmaedeke F., Windhorst K., Meyer B. 1995b. Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 1137-1143
- Kaasalainen M., Yli-Halla M. 2003. Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environmental Pollution*, 126: 225-233
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 2000. Trace elements in soils and plants, 3. izdaja. CRC Press, ZDA: 432 str.
- Kamal S., Prasad R., Varma A. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals V: Soil biology, volume 19. Soil Heavy metals. Sherameti I., Varma A. (eds.) Verlag Berlin Heidelberg, Springer: 31-63
- Kandeler F., Kampichler C., Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 23, 3: 299-306
- Kemnitz D., Kolb S., Conrad R. 2007. High avundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *Federation of European Microbiological Societies*, 60: 442-448
- Khan F. I., Husain T., Hejazi R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71: 95-122
- Kirchman D. L. 2012. Processes in microbial ecology. Oxford, University press: 312 str.
- Konopka A., Zakharova T., Bischoff M., Oliver L., Nakatsu C., Turco R. F. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5: 2256-2259
- Krummen M., Hilkert A. W., Juchelka D., Duhr A., Schluter H. J., Persch R. 2004. A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 2260-2266
- Kuzyakov Y. 2010. Priming effects: Interaction between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 1363-1371
- Kuzyakov Y., Friedel J. K., Stahl K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1485-1498
- Lagomarsino A., Moscatelli M. C., Di Tizio A., Marcinelli R., Grego S., Marinari S. 2009. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Maeiterranean environment. *Ecological Indicators*, 9, 3: 518-527

- Lee I.-S., Kim O. K., Chang Y.-Y., Bae B., Kim H. H., Baek K. H. 2002. Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 5: 406–411
- Leštan D., Grčman H., Zupan M., Bačac N. 2003. Relationship of soil properties to fractionation of Pb and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and sediment contamination*, 4, 12: 507-522
- Leštan D., Luo C., Li X. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental pollution*, 153: 3-13
- Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4516-4522
- Lueders T., Manefield M., Friedrich M. W. 2004. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 6, 1: 73-78
- Lundquist E. J., Jackson L. E., Scow K. M. 1999. Wet-dry cycles affect dissolved organic carbon in two California agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1031-1038
- Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 66, 3: 506-577
- Mahvi A. H., Mesdaghinia A. R., Naghipoor D. 2005. Comparison of heavy metals extraction in contaminated soils by various concentrations of EDTA. *Journal of Biological Science*, 8, 8: 1081-1085
- Majer B. J., Tscherko D., Paschke A., Wennrich P., Kundi M., Kandeler E., Knasmüller S. 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research*, 515: 111-124
- Mühlbachova G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecological Engineering*, 37: 1064-1071
- Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193-207
- Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216
- Nakatsu C. H., Carmosini N., Baldwin B., Beasley F., Kourtev P., Konopka A. 2005. Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7679-7689

- Oliver M. A. 1997. Soil and human health: a review. European Journal of Soil Science, 48: 573-592
- Ollivier J., Töwe S., Bannert A., Hai B., Kast E.-M., Mayer A., Su M. X., Kleineidam K., Schloter M. 2011. Nitrogen turnover in soil and global change. Federation of European Microbiological Societies, 78: 3-16
- ÖNORM L 1087. Chemical analysis of soils: determination of plantavailable phosphate and potassium by calcium-acetate-lactate. 1993. Österreichisches Normungsinstitut: 4 str.
- Pascual J. A., Garcia C., Hernandez T., Moreno J. L., Ros M. 2000. Soil microbial activity as biomarker of degradation and remediation process. Soil Biology and Biochemistry, 32: 1877-1883
- Peplow D. 1999. Environmental impacts of mining in Eastern Washington. Center for water and watershed studies, fact sheet. University of Washington, Seattle: 2 str.
- Pérez de Mora A., Ortega-Calvo J., Cabrera F., Majadejón E. 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after "in situ" remediation of a heavy metal-contaminated soil. Applied Soil Ecology, 28: 125-137
- Pérez-de-Mora A., Burgos P., Madejón E., Cabrera F., Jaeckel P., Schloter M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. Soil Biology and Biochemistry, 38: 327-341
- Peters R. W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 66: 151-210
- Pickering W. F. 1986. Metal ion speciation – soils and sediments (a review). Ore Geology Reviews, 1,1: 83-146.
- Popescu I., Biasioli M., Ajmone-Marsan F., Stanescu R. 2013. Lability of potentially toxic elements in soils affected by smelting activities. Chemosphere, 90: 820-826
- Poročilo o delu 2010. 2011. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 256 str.
- Poročilo o okolju v Republiki Sloveniji 2009. 2010. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor RS: 363 str.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Dunaj, Avstrija  
<http://www.R-project.org/> (18. 11. 2013)
- Radl V., Pritsch K., Munch J. C., Schloter M. 2005. Structural and functional diversity of microbial communities from a lake sediment contaminated with trembolone, an endocrine-disrupting chemical. Environmental Pollution, 137: 345-353
- Robertson G. P., Groffman P. M. 2007. Nitrogen transformation. V: Soil microbiology, biochemistry and ecology. Paul E. A. (ed.). New York, Springer: 341-364

- Schaeffer S. M., Evans R. D. 2005. Pulse additions of soil carbon and nitrogen affect soil nitrogen dynamics in an arid Colorado Plateau shrubland. *Oecologia*, 145: 425-433
- Schlesinger W. H., Andrews J. A. 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48: 7-20
- Schnitzer M. 1975. Humic substances: chemistry and reactions. V: Soil organic matter. *Developments in soil science*, 8. Schnitzer M., Khan S. U. (eds.). Amsterdam, Elsevier science publishers B. V.: 1-64
- Schwarz W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 634-649
- Shen J., Bartha R. 1997. Priming effect of glucose polymers in soil-based biodegradation tests. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 8: 1195-1198
- Sillanpää M., Oikari A. 1996. Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using Microtox bioassay. *Chemosphere*, 32, 8: 1485-1497
- SIST ISO 11261. Soil quality - determination of total nitrogen - modified Kjeldahl method. 1996. Švica: 9 str.
- SIST ISO 11466. Kakovost tal - ekstrakcija elementov v sledovih, topnih v zlatotopki. Slovenski inštitut za standardizacijo. 1996: 6 str.
- SIST ISO 14235. Kakovost tal - določevanje organskega ogljika z oksidacijo v kromžvepleni kislini; modificirana brez zunanjega segrevanja. 1999. Švica: 5 str.
- Six J., Frey S. D., Thien R. K., Batten K. M. 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America*, 70: 555-569
- Soil survey laboratory methods manual. 2004. R. Burt (ur.). USDA: 1031 str.
- Sollins P., Homann P., Caldwell B. A. 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, 74: 65-105
- Stankovic S., Kalaba P., Stankovic A. R. 2014. Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry Letters*, 12: 63-84
- Suhadolc M., Rupreht J., Zupa M. 2007. Študijsko gradivo za vaje pri predmetu nauk o tleh. Visokošolski strokovni študij agronomije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo, CPVO: 56 str.
- Suhadolc M., Schloter M., Schroll R., Bergmüller C., Bolta Š. V., Lobnik F., Leštan D. 2000. Fate of isoproturon in two heavy metal contaminated soils in a microcosm experiment. *Fresenius Environmental Bulletin*, 9, 11: 691-700
- Suhadolc M., Schroll R., Gattinger A., Schloter M., Munch J. C., Lestan D. 2004. Effects of modified Pb-, Zn-, and Cd-availability on the microbial communities and on the degradation of isoproturon in a heavy metal contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1943-1954

- Suhadolc M., Sušnik A., Lobnik F., Kajfež Bogataj L., Gregorič G., Bergant K. 2010.  
Izzivi Slovenije na področju suš in degradacije tal: Uresničevanje ciljev Konvencije ZN o boju proti degradaciji/dezertifikaciji tal (UNCCD). El. knjiga. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 75 str.  
[http://meteo.arso.gov.si/uploads/probase/www/agromet/product/document/sl/IZZIVI\\_SI\\_ovenije\\_na\\_podrocju\\_sus\\_in\\_degradacije\\_tal.pdf](http://meteo.arso.gov.si/uploads/probase/www/agromet/product/document/sl/IZZIVI_SI_ovenije_na_podrocju_sus_in_degradacije_tal.pdf) (oktober 2014)
- 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
- Tian L., Dell E., Shi W. 2010. Chemical composition of dissolved organic matter in agroecosystems: Correlations with soil enzyme activity and carbon and nitrogen mineralization. *Applied Soil Ecology*, 46: 426-435
- Tiedje J. M., Asuming-Brempong S., Nüsslein K., Marsch T. L., Flynn S. J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109–122
- Tsang D. C. W., Zhang W., Lo I. M. C. 2007. Copper extraction effectiveness and soil dissolution issues of EDTA-flushing of artificially contaminated soils. *Chemosphere*, 68: 234-243
- Tyler T. G. 1981. Heavy metals in soil biology and biochemistry. V: *Soil biochemistry*. Paul E. A., Ladd J. N. (eds.). Marcel Dekker, New York: 371-404
- Udovic M., Lestan D. 2012. EDTA and HCl leaching of calcareous and acidic soils polluted with potentially toxic metals: Remediation efficiency and soil impact. *Chemosphere*, 88: 718-724
- Ultra Jr. V. U., Yano A., Iwasaki K., Tanaka S., Kang Y., Sakurai K. 2005. Influence of chelating agent addition on copper distribution and microbial activity in soil and copper uptake by brown mustard (*Brassica juncea*). *Soil Science and Plant Nutrition*, 51: 193–202
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. l. RS, št. 68/96
- Uredba o ugotavljanju onesnaženosti kmetijskih zemljišč in gozda. 1990. Ur. l. RS, št. 6/90
- Vaughan D., Ord B. G. 1985. Soil organic matter - a perspective on its nature, extraction, turnover and role in soil fertility. V: *Soil organic matter and biological activity*. Vaughan D., Malcolm R. E. (eds.). Dordrecht, Kluwer academic publishers: 4-36
- Verbič J., Stekar J. M. A., Resnik-Čepon M. 1995. Rumen degradation characteristics and fibre composition of various morphological parts of different maize hybrids and possible consequences for breeding. *Animal Feed Science and Technology*, 54: 133-148
- 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

- Voglar D. 2013. Uporaba elektrokemijskih procesov pri remediaciji tal, onesnaženih s kovinami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 115 str.
- Voglar D., Lestan D. 2014. Chelant soil-washing technology for metal-contaminated soil. Environmental Technology, 35: 1389-1400
- Warren R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annual Review of Microbiology, 50: 183-212
- Weil R. R., Magdoff F. 2004. Significance of soil organic matter to soil quality and health. V: Soil organic matter in sustainable agriculture. Magdoff F., Weil R. R. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 1-43
- Wood T. M., Garcia-Campayo V. 1991. Enzymology of cellulose degradation. V: Physiology of biodegradative microorganisms. Ratledge C. (ed.). Netherlands, Springer: 147-161
- Zakon o varstvu okolja. 2006. Ur l. RS, št. 39/06
- Zech W., Senesi N., Guggenberger G., Kaiser K., Lehmann J., Miano T. M., Miltner A., Schroth G. 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. Geoderma, 79: 117-161
- Zhang W., Huang H., Tan F., Wang H., Qui R. 2010. Influence of EDTA washing on the species and mobility of heavy metals residual in soils. Journal of Hazardous Materials 173: 369-376
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 63 str.  
[http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/Publikacija%20Raziskave%20onesna%C5%BEenosti%20tal%20Slovenije%20\(1989-2007\).pdf](http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/Publikacija%20Raziskave%20onesna%C5%BEenosti%20tal%20Slovenije%20(1989-2007).pdf) (november 2014)
- Zupan M., Grčman H., Tič I., Lobnik F., Šporar M., Kralj T. 2009. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije v letu 2008, 1. del: Poročilo o vsebnosti Cd, Pb in Zn v tleh v letu 2008 v Zgornji Mežiški dolini - Ukrep 2.9 programa za izbojšanje kakovosti okolja v Zgornji Mežiški dolini. Biotehniška fakulteta, Ljubljana: 55 str.  
[http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/ROTS2008\\_1.del.pdf](http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/ROTS2008_1.del.pdf) (november 2014)
- Zupanc V., Kastelec D., Lestan D., Grcman H. 2014. Soil physical characteristics after EDTA washing and amendment with inorganic and organic additives. Environmental Pollution, 186: 56-62

## ZAHVALA

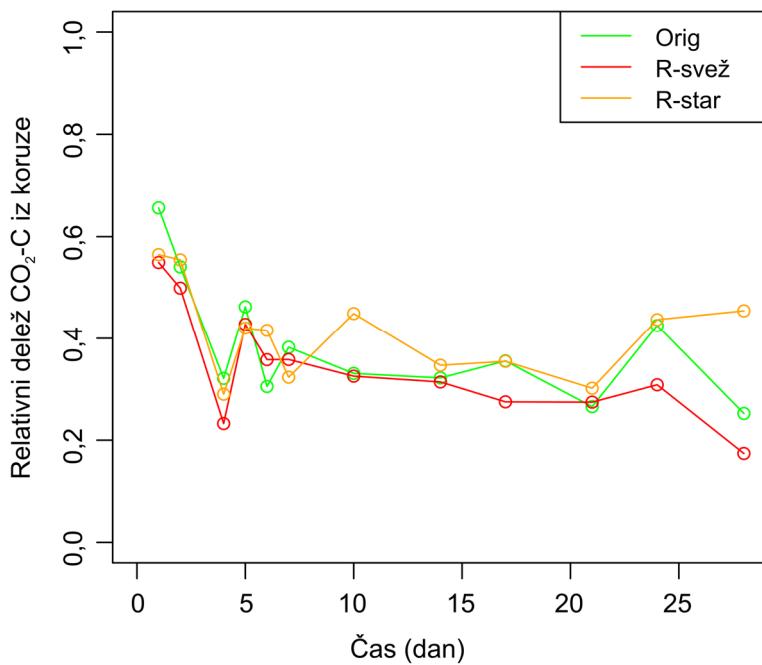
Naj se najprej zahvalim prof. dr. Domnu Leštanu, ki mi je omogočil izvajanje naloge. Posebna zahvala gre doc. dr. Marjetki Suhadolc za samo zasnova in omogočeno izvedbo poskusa, sodelovanje z laboratorijem v Münchenu, spremljanje ter tisoč in en uporaben nasvet. Hvala prof. dr. Michaelu Schloterju, ki je omogočil izvajanje poskusa v raziskovalni skupini Environmental genomics na inštitutu Helmholtz Zentrum München. Dr. Viviane Radl se zahvaljujem, da me je na inštitutu tako prijazno sprejela ter budno bdela nad delom, opravljenim tam. Seveda nebi šlo brez Franza Bueggerja, ki je strokovno upravljal z MS ter nam pomagal s svojimi nasveti in številnimi malimi triki. Dr. Gerhardu Welzlu se zahvaljujem za cenjeno podporo v statističnih operacijah. Nenazadnje hvala prof. dr. Davidu Stoparju za natančen in premišljen pregled naloge.

Poleg strokovnega spremljanja, pa mi je ogromno pomenila tudi čustvena in moralna opora, ki sem jo tekom celotnega študija in izvedbe magistrske naloge nesebično prejemala od svoje družine – Mateje, Danila in Tine. Zahvala gre prijateljem, ki so mi stali ob strani. Anja in Jerica, hvala za kave in brezmejne debaten, kovanja inovativnih načrtov, dekanja, hvala za prijateljstvo. Marko Sine, hvala ti za vse spodbude, krasen je občutek, da nekdo verjame vate. In hvala Aneju, ne samo zato, ker je rešil moje nemaloštevilne računalniške zagate, ampak predvsem, ker ga zanima, kakšen je bil moj dan.

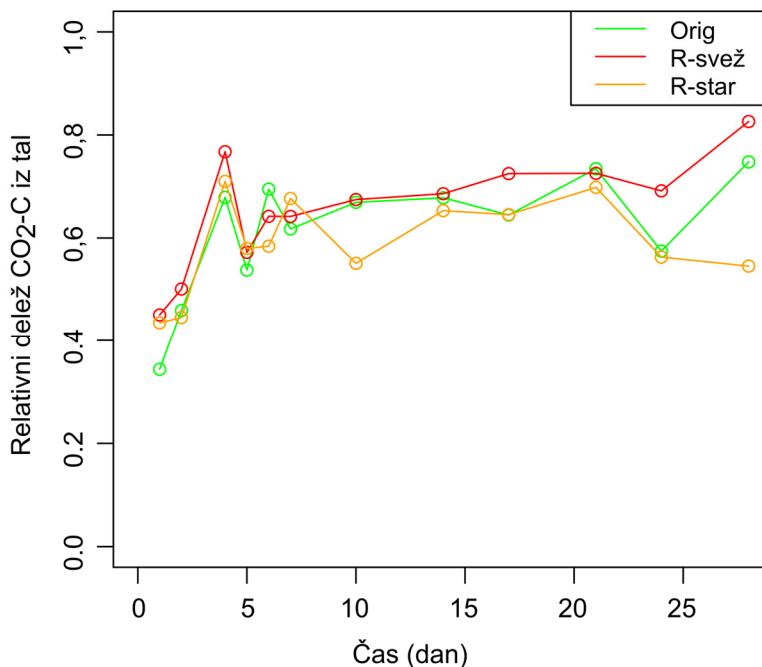
Experientia est optima rerum magistra. (*lat.* pregovor)

## PRILOGA A

Mineralizacija organske snovi – delež ogljika, ki se je ob dodatku koruze mineraliziral iz koruze oz. iz tal.



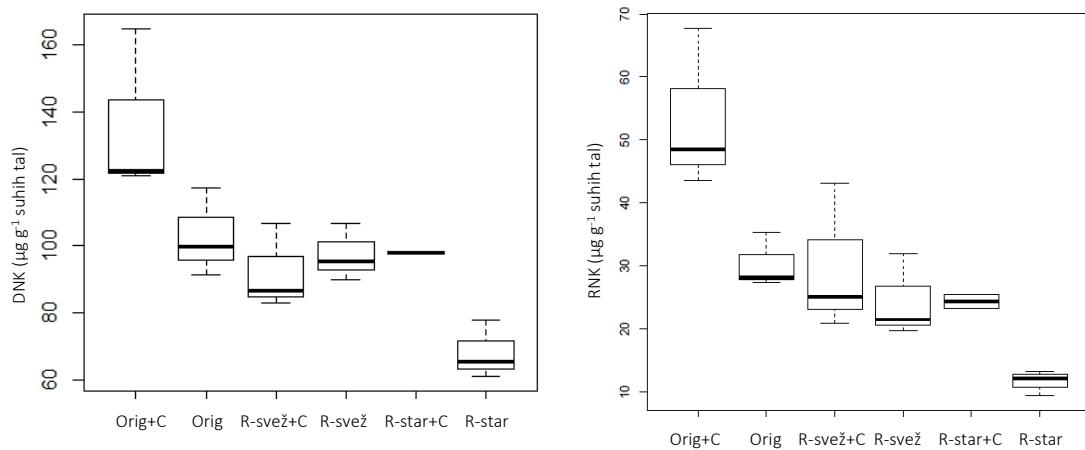
A.1: Delež ogljika, ki se je med mikrokozem poskusom mineraliziral iz koruze v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh. Prikazane so povprečne vrednosti,  $n = 5$ .



A.2: Delež ogljika, ki se je med mikrokozem poskusom ob dodatku koruze mineraliziral iz tal v originalnih, sveže remediiranih in staranih remediiranih tleh. Prikazane so povprečne vrednosti,  $n = 5$ .

## PRILOGA B

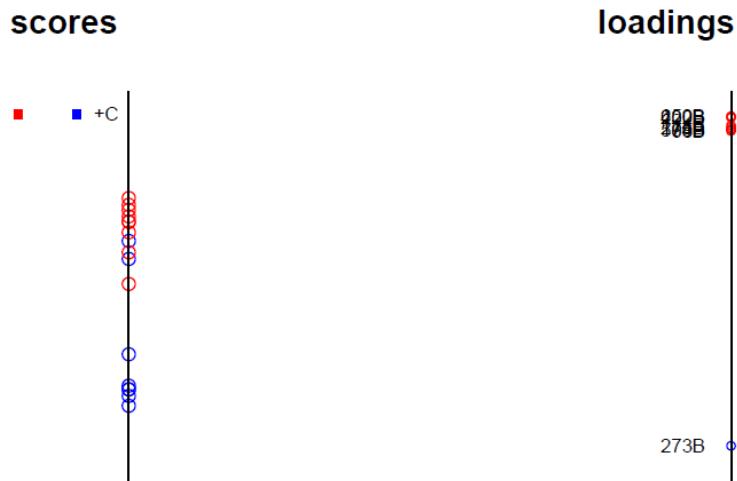
Koncentracije DNK in RNK, izolirane med mikrokozem poskusom.



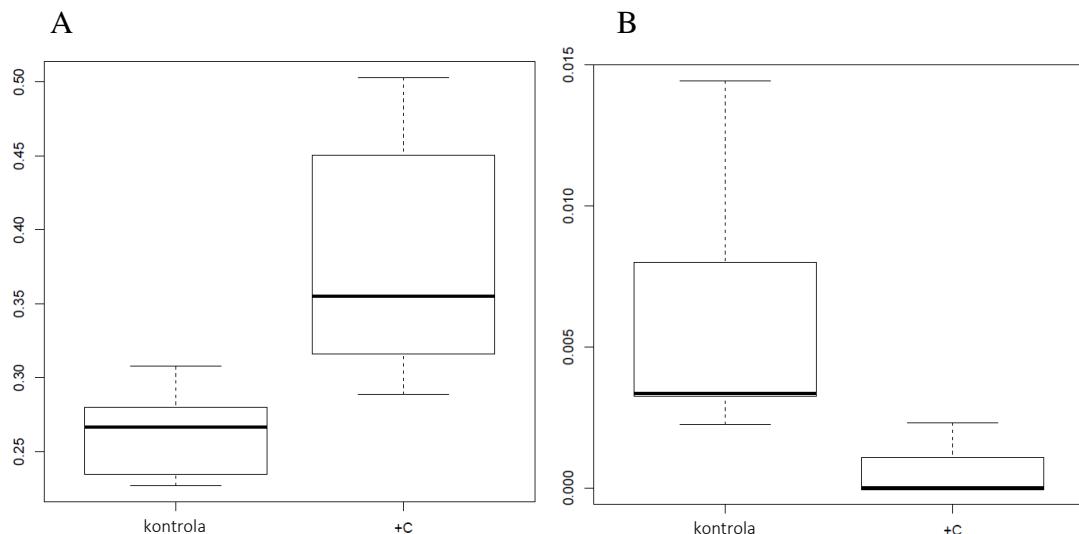
B.1: Koncentracije izolirane DNK in RNK, ki jih prikazujejo šibke razlike v interakciji med tlemi in obravnavanjem (+C ali brez dodatka organske snovi). Podatke smo statistično obdelali z enosmernim ANOVA testom. Za potrebe statistične analize je bil izključen osamelec staranih remediiranih tal z dodano koruzo (R-star+C) v času 0. n = 5.

## PRILOGA C

Zastopanost glivnih restrikcijskih fragmentov po analizi T-RFLP



C.1: Diagonalna diskriminantna analiza restrikcijskih fragmentov glivne ITS regije rRNK z obravnavanjem kot skupinsko spremenljivko. Modro so obarvani fragmenti iz talmih vzorcev z dodano koruzo (+C), rdeče pa fragmenti iz vzorcev brez dodatka. Prikazani so samo signifikantni ( $p < 0,05$ ) fragmenti: 273, 68, 174, 596, 275, 114, 420, 202 in 650 bp.



C.2: Škatla z ročaji za zastopanost glivnih restrikcijskih fragmentov A: (OTU) 273 bp in B: 650 bp glede na obravnavanje (dodatek koruze ali brez dodatka). +C označuje obravnavanje z dodatkom koruze.