

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Levin Pal

**MIKROBNA AKTIVNOST IN STRUKTURA DENITRIFIKATORJEV
V TLEH LJUBLJANSKEGA BARJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MICROBIAL ACTIVITY AND STRUCTURE OF DENITRIFIER
COMMUNITY IN THE LJUBLJANA MARSH SOIL**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

S tem diplomskim delom želim zaključiti univerzitetni študij mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije iz dne 27.5.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Blaž Stres in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: dr. Blaž Stres,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo,

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Strukturo mikrobnih združb je ugotovila dr. Mirna Mrkonjić-Fuka.

Levin Pal

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 631.46 + 579.64 (043)=863
KG mikrobiologija tal/Ljubljansko barje/mikrobne združbe/denitrifikacija/ekologija/
emisija toplogrednega plina

AV PAL, Levin
SA MANDIČ-MULEC, Ines (mentor)/STRES, Blaž (somentor)/AVGUŠTIN, Gorazd
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2007
IN AKTIVNOST IN STRUKTURA DENITRIFIKATORJEV V TLEH
LJUBLJANSKEGA BARJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 64 str., 3 pregl., 16 sl., 60 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Ljubljansko barje leži v Sloveniji, južno od Ljubljane. Je nizko šotno barje, ki je redno izpostavljeno sezonskim spremembam vsebnosti vode v tleh in temperature tal. Proučevali smo vpliv vodnega in temperaturnega režima na število in aktivnost denitrifikatorjev ter emisije toplogrednih plinov (CH_4 , CO_2 in N_2O) v šotnih tleh Ljubljanskega barja. Tla smo inkubirali 17 tednov v mikrokozmih ter jih izpostavili štirim različnim okoljskim razmeram; A(45 % WHC, 28 °C)- suho poletje, B(90 % WHC, 28 °C)- vlažno poletje, C(45 % WHC, 4 °C)- suha zima in D(90 % WHC, 4 °C)- vlažna zima. Med inkubacijo so bili ob časih 0, 3, 6, 9 in 12 tednov ovrednoteni najbolj verjetno število denitrifikatorjev, potencialna denitrifikacijska encimska aktivnost in struktura mikrobnih združb denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja. Emisije toplogrednih plinov smo merili enkrat tedensko. Ugotovili smo, da vsebnost vode v tleh in temperatura inkubacije nista signifikantno vplivali na obseg združb denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja, zaznali pa smo spremembe denitrifikacijskega potenciala tal v odvisnosti od teh dveh okoljskih dejavnikov. Emisije CO_2 so pozitivno korelirale s temperaturo tal, vsebnost vode v tleh pa ni vplivala na količino sproščenega CO_2 . Emisije CH_4 so se pojavile po sedmih tednih inkubacije v razmerah vlažnega poletja, v mikrokozmih B(90 % WHC, 28 °C). Emisije N_2O pri 28 °C in 90 % WHC (razmere vlažnega poletja) so trajale prvih pet tednov inkubacije, nato so do konca inkubacije ostale nizke. Razmere »vlažne zime« v mikrokozmi D(90 % WHC, 4 °C) so zaradi stalne produkcije N_2O skozi vseh 17 tednov inkubacije prispevali največji toplogredni učinek.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 631.46 + 579.64 (043)=863
CX soil microbiology/Ljubljana marsh/microbial community/denitrification/ecology/
greenhouse gas emission

AU PAL Levin
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/STRES, Blaž (co-advisor)/AVGUŠTIN,
Gorazd (reviewer)
PP University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PB SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PY 2007
TI MICROBIAL ACTIVITY AND STRUCTURE OF DENITRIFIER COMMUNITY
IN THE LJUBLJANA MARSH SOIL
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 64 p., 3 tab., 16 fig., 60 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The Ljubljana marsh fen peatland is located south of Ljubljana, Slovenia and is
regularly exposed to seasonal variations in soil water content and soil temperature.
We analysed the effects of four water and temperature regimes on number and
activity of denitrifiers and on greenhouse gas emissions (CH₄, CO₂ and N₂O) in
Ljubljana marsh peat soil. The soil was incubated in microcosms for 17 weeks and
exposed to four environmental conditions; A(45 % WHC, 28 °C)- dry summer, B(90
% WHC, 28 °C)- wet summer, C(45 % WHC, 4 °C)- dry winter and D(90 % WHC,
4 °C)- wet winter. During the course of incubation most probable number estimates
of denitrifier abundance, potential denitrification enzyme activity and microbial
community structure were determined after 0, 3, 6, 9 and 12 weeks of incubation.
The gas emissions were measured weekly. Results show that moisture and
temperature of incubation have no significant effect on abundance of denitrifier
microbial community, but these two environmental parameters affect soil potential
denitrification activity. The CO₂ emissions positively correlated with soil
temperature but were not affected by soil moisture. The CH₄ emissions were
detected only in microcosms B(90 % WHC, 28 °C) after 7 weeks of incubation.
Under static incubation at 28 °C and 90 % WHC (wet summer conditions) N₂O
emissions peaked during the first month and remained low for the rest of
incubation. Wet winter conditions in microcosms D(90 % WHC, 4 °C) exhibited
highest greenhouse effect due to constant production of N₂O at all times during 17
weeks of incubation.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Slovarček.....	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	3
1.1.1 Namen	3
1.1.2 Hipoteze	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 PROCESI V KROŽENJU OGLJIK A IN DUŠIKA	4
2.1.1 Kroženje ogljika	5
2.1.2 Kroženje dušika	6
2.2 MIKROBNE ZDRUŽBE DENITRIFIKATORJEV V TLEH	11
2.3 LJUBLJANSKO BARJE	13
2.3.1 Značilnosti šotnih tal Ljubljanskega barja	13
2.3.2 Dejavniki okolja na Ljubljanskem barju	14
2.3.3 Eksperimentalno polje	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 POSKUS V MIKROKOZMIH	16
3.1.1 Vzorčenje in priprava tal	16
3.1.2 Zastavitev inkubacijskega eksperimenta v mikrokozmi	17
3.1.3 Razdiranje mikrokozmov	17
3.1.4 Opis mikrokozmov	19
3.1.5 Vzdrževanje zelene vsebnosti vode v tleh v mikrokozmi	20
3.2 OPTIMIZACIJA IN OPIS METOD	21
3.2.1 Ugotavljanje vsebnosti vode v tleh in WHC tal	22
3.2.2 Ugotavljanje obsega združbe denitrifikatorjev	23
3.2.3 Razvoj primerne metode za merjenje N_2 v plinski fazi epruvet Hungate	27
3.2.4 Merjenje potencialne encimske aktivnosti denitrifikatorjev (DEA)	30
3.2.5 Merjenje emisij toplogrednih plinov	33
4 REZULTATI	36
4.1 REZULTATI OPTIMIZACIJE METOD	36
4.1.1 Zaznavanje N_2 in N_2O v plinski fazi epruvet Hungate z metodo MPN	36
4.1.2 Optimizacija merjenja potencialne denitrifikacijske encimske aktivnosti	37
4.2 WHC IN VSEBNOST VODE V TLEH	37
4.3 OBSEG ZDRUŽBE DENITRIFIKATORJEV	38
4.3.1 Primerjava metode MPN na mikrotitrskih ploščah z metodo MPN v epruvetah Hungate	38
4.3.2 Obseg združbe denitrifikatorjev med inkubacijo tal v mikrokozmi	39
4.4 POTENCIALNA DENITRIFIKACIJSKA AKTIVNOST (dea)	40
4.4.1 Maksimalna denitrifikacijska encimska aktivnost svežih tal pri 4 °C in 28 °C	40
4.4.2 DEA skozi inkubacijo tal v mikrokozmi	41
4.5 EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV	42
4.5.1 Emisije N_2O	42

4.5.2	Emisije CO₂	43
4.5.3	Emisije CH₄	44
4.5.4	Povprečne dnevne količine produkcije toplogrednih plinov in njihov prispevek h globalnem segrevanju v odvisnosti od vremenskih razmer na Ljubljanskem barju	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	SKLEPI	55
6	POVZETEK.....	56
7	VIRI.....	58

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev mikrokozmov s tlemi Ljubljanskega barja v posamezne inkubacijske veje na osnovi vsebnosti vode v tleh in temperature tal.	17
Preglednica 2: Bunsenovi koeficienti in molski volumni plinov N_2O , CH_4 in CO_2 pri 4 °C in 28 °C (Stopar in sod., 2006).....	35
Preglednica 3: Povprečna dnevna količina produkcije posameznih plinov CO_2 , CH_4 in N_2O in prispevek k učinku tople grede, ocenjena na površino enega hektarja (ha), iz 10-11 cm debelega sloja tal Ljubljanskega barja, inkubiranega v mikrokozmih pod vplivom štirih različnih vremenskih razmer v tleh.	45

str.

KAZALO SLIK

Slika 1: Dušikov krog (Atlas in Bartha, 1998: 415, Madigan in sod, 2003: 663).....	6
Slika 2: Organizacija anaerobne elektronske transportne verige pri <i>Pseudomonas stutzeri</i> (Zumft, 1997: 580).	9
Slika 3: Pretvorbe mineralnih oblik dušika v tleh. Poti nastanka N_2O z denitrifikatorji in kemoavtotrofnimi nitrifikatorji, ki so sposobni denitrifikacije (Wrage in sod., 2001: 1727).	9
Slika 4: Potek eksperimenta z mikrokozmi.....	18
Slika 5: Mikrokozem, v kakršnem smo inkubirali tla.	19
Slika 6: Način vzorčenja plinske faze epruvet Hungate po inkubaciji.....	29
Slika 7: Umeritvena krivulja za ugotavljanje koncentracije N_2O iz s plinsko kromatografijo izmerjene površine pika.	31
Slika 8: Priprava mikrokozma za merjenje emisij.	33
Slika 9: Polnjenje plinotesno zaprtih stekleničk z volumnom 2ml (vial) s plinskim vzorcem in izenačevanje nadtlaka v teh stekleničkah z zunanjim tlakom.	34
Slika 10 : Primerjava dveh izvedb metode za ugotavljanje najbolj verjetnega števila celic denitrifikatorjev v gramu suhih tal.....	38
Slika 11: Logaritemska vrednost števila denitrifikatorjev v gramu suhih tal Ljubljanskega barja v odvisnosti od časa in razmer inkubacije v mikrokozmi.	39
Slika 12: Maksimalna denitrifikacijska encimska aktivnost svežih tal Ljubljanskega barja pri 4 °C in 28 °C.	40
Slika 13: DEA- potencialna denitrifikacijska aktivnost tal Ljubljanskega barja v odvisnosti od časa in razmer inkubacije v mikrokozmi.	41
Slika 14: Emisije N_2O med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov.	42
Slika 15: Emisije CO_2 med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov.	43
Slika 16: Emisije CH_4 med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov.	44

SLOVARČEK

DEA – potencialna denitrifikacijska encimska aktivnost (Denitrification Enzyme Activity)

DNRA – disimilativna redukcija nitrata do amonija

MPN – najbolj verjetno število (Most Probable Number)- v tem diplomskem delu se nanaša na najbolj verjetno število denitrifikatorjev.

N_2O – dušikov oksidul

N_2OR – reduktaza dušikovega oksidula (encim)

NAR – reduktaza nitrata (encim)

NH_3 – amoniak

NH_4^+ - amonij

NIR – reduktaza nitrita (encim)

NO – dušikov monoksid

NOR- reduktaza dušikovega monoksida (encim)

NO_2^- - nitrit

NO_3^- - nitrat

ppm – (parts per milion) število delcev v milionu delcev

WHC – (Water Holding Capacity) kapaciteta tal za zadrževanje vode

% WHC – vsebnosti vode v tleh, izražena kot odstotni delež glede na celotno kapaciteto tal za zadrževanje vode

1 UVOD

Ljubljansko barje je okoli 150 km² velika ravnica med Ljubljano in Krimom ter Pijavo Gorico in Vrhniko. V Sloveniji in tudi v Evropi je Ljubljansko barje priznано kot področje z nadpovprečno vrednostjo naravne dediščine (Tome, 2000). Kljub majhnemu deležu močvirij, barij in šotišč, je Ljubljansko barje predvsem na račun mokrotnih travnikov največje mokrišče v Sloveniji. Mokrišča so tista, ki med vsemi habitatnimi tipi najhitreje izginjajo, predvsem zaradi širjenja naselij in kmetijskih površin (Premelč, 2006).

Človek je z naseljevanjem, kmetovanjem in rezanjem šote Ljubljansko barje skoraj popolnoma preoblikoval, še posebej od leta 1825 naprej z izgradnjo mreže izsuševalnih jarkov in kanalov v skupni dolžini preko 600 km. Nivo podtalnice je od leta 1953 reguliran s Plečnikovimi zapornicami na reki Ljubljanici, zato je močvirnata narava Ljubljanskega barja danes dokaj nerazpoznavna, vseeno pa je nivo podtalne vode visok in redno prihaja do poplav, ki so povezane s padavinami (Hacin in sod., 2001; Čeak, 2005; Premelč, 2006; Zupanc, 2006).

Mikrobna aktivnost v tleh doseže optimum pri temperaturah med 25 °C in 37 °C (Parton in sod., 1993). Ob povišani mikrobni aktivnosti prihaja do višjih emisij CO₂ (Madigan in sod., 2003). Denitrifikacijo regulirajo predvsem trije dejavniki okolja; anoksičnost, prisotnost dušikovih oksidov za respiracijo in dostopnost vira ogljika (Paul in Clark, 1996; Zumft, 1997). V anoksičnih razmerah poleg denitrifikacije prihaja tudi do metanogeneze (Madigan in sod., 2003). Ker voda zapolni talne pore in iz tal izpodrine zrak, se posledično dostopnost kisika zmanjša (Atlas in Bartha, 1998), zato naj bi bila tla z višjo vsebnostjo vode bolj anoksična od tal z nižjo vsebnostjo vode.

Na Ljubljanskem barju se zaradi spleta sezonsko spremenljivih dejavnikov okolja; temperatur ozračja (ARSO, 2007b), padavin (ARSO, 2007a) in nivoja podtalnice (Hacin in sod., 2001; Hacin in sod., 2004); v tleh spreminjata temperatura in vsebnost vode (Repič, 2007).

V tem diplomskem delu smo izvajali eksperiment z mikrokozmi, pri katerem smo šotna tla Ljubljanskega barja umetno, z regulacijo temperature in vsebnosti vode v tleh, za sedemnajst tednov izpostavili štirim vrstam razmer:

- povprečnim razmeram dveh značilnih letnih časov, suhega poletja in vlažne zime ter
- razmeram dveh ekstremnih podnebnih scenarijev, vlažnega poletja in suhe zime, ki se v naravi; tako poleti kot pozimi; lahko pojavita občasno za krajše obdobje.

Spremljali smo velikost in aktivnost mikrobnih združb denitrifikatorjev v tleh ter emisije toplogrednih plinov: metana (CH_4), ogljikovega dioksida (CO_2) in dušikovega oksidula (N_2O).

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

1.1.1 Namen

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv dejavnikov okolja (temperature in vsebnosti vode v tleh) na aktivnost in strukturo denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja. Poleg spremljanja emisij N_2O , ki nastaja kot posledica denitrifikacijske aktivnosti, smo med istim eksperimentom merili še emisije CO_2 in CH_4 ter ugotavljali, pri katerih razmerah je toplogredni učinek tal največji.

1.1.2 Hipoteze

Predpostavili smo, da se bo talna mikrobna združba na spremembe okolja odzvala s spremembami v aktivnosti, velikosti in strukturi, ki naj bi se odražale v emisijah toplogrednih plinov (CO_2 , CH_4 in N_2O), številu denitrifikatorjev (MPN) in potencialni denitrifikacijski aktivnosti (DEA), in sicer:

- Tla, inkubirana v mikrokozmi, naj bi imela pri višji vsebnosti vode (90 % WHC) višje MPN, višjo DEA in proizvajala več N_2O in CH_4 kot pri nižji vsebnosti vode v tleh (45 % WHC).
- Tla, inkubirana v mikrokozmi, naj bi imela pri višji temperaturi (28 °C) višje MPN, višjo DEA in proizvajala več CO_2 , CH_4 in N_2O od tal, inkubiranih pri nižji temperaturi (4 °C).

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROCESI V KROŽENJU OGLJIKA IN DUŠIKA

V tleh poteka hkrati več različnih mikrobnih procesov s katerimi se akumulirana organska snov razgrajuje. Ko se kisik (O_2) porabi, aerobna respiracija ni več možna. V anoksičnih razmerah si sledijo respiracije z alternativnimi elektronskimi akceptorji; nitratom, železom, manganom, sulfatom in ogljikovim dioksidom (Paul in Clark, 1996). Čeprav so denitrifikatorji tudi fakultativni anaerobi, do denitrifikacije lahko pride šele, ko v okolju zmanjka O_2 in se za respiracijo začne uporabljati nitrat (NO_3^-) kot alternativni elektronski akceptor (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003).

Za mikroorganizme, ki denitrificirajo, je značilno, da so heterotrofni, zato je za denitrifikacijo poleg dostopnosti dušika ravno tako pomembna dostopnost organskega ogljika ter razmerje med ogljikom in dušikom v organski snovi v tleh. Ob denitrifikaciji se iz tal sproščajo plini NO , N_2O in N_2 (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003). N_2O je plin z življenjsko dobo 120 let in pomembnimi vplivi na okolje. V primerjavi z CO_2 , je N_2O 310-krat močnejši toplogredni plin. V stratosferi reagira s O_2 , pri čemer nastane dušikov oksid (NO), ki uničuje ozonski plašč. Uporaba umetnih gnojil v novejši zgodovini je vzrok vedno večjim emisijam N_2O (Baede in sod., 2001).

Sproščanje CO_2 iz tal je posledica mikrobnih respiracij in fermentacij. Emisije CH_4 so značilne za tla, v katerih je večina elektronskih akceptorjev že reduciranih. Takrat iz produktov fermentacij in respiracij nastaja CH_4 (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003). CO_2 in CH_4 sta pomembna toplogredna plina, katerih hitrost izmenjave med tlemi in atmosfero kontrolira temperatura, vsebnost vode v tleh in druge fizikalno- kemijske lastnosti tal (Peterjohn in sod., 1994; Bowden in sod., 1998). Povečana talna respiracija, kot posledica spremenjene globalne temperature in padavin, lahko na pojav tople grede vpliva po principu pozitivne povratne zanke (Raich in Schlesinger, 1992).

2.1.1 Kroženje ogljika

Ogljik je prisoten v atmosferi, tleh, oceanih in ostalih vodnih okoljih, sedimentih, kamninah ter biomasi. Ogljik v obliki CO_2 pride v tla s fiksacijo, z razgradnjo organske snovi pa se vrača v atmosfero. Del odmrle biomase je težje razgradljiv in se v tleh kopiči kot humus. Pri mikrobni razgradnji organsko vezanega ogljika v tleh iz kompleksnih organskih spojin nastajajo vedno enostavnejše. Ob respiracijah in fermentacijah se sproščata CO_2 in H_2 , ki sta substrata za hidrogenotrofno metanogenezo. Metanogeneza je lahko acetoklastična, ko metan (CH_4) nastaja iz acetata. CH_4 se zaradi hlapnosti dviguje po vertikalnem profilu tal in doseže oksične cone, kjer ga metanotrofi oksidirajo v CO_2 . Polisaharidi, proteini in maščobe v tleh se v končni fazi razgradijo do CO_2 in CH_4 (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003).

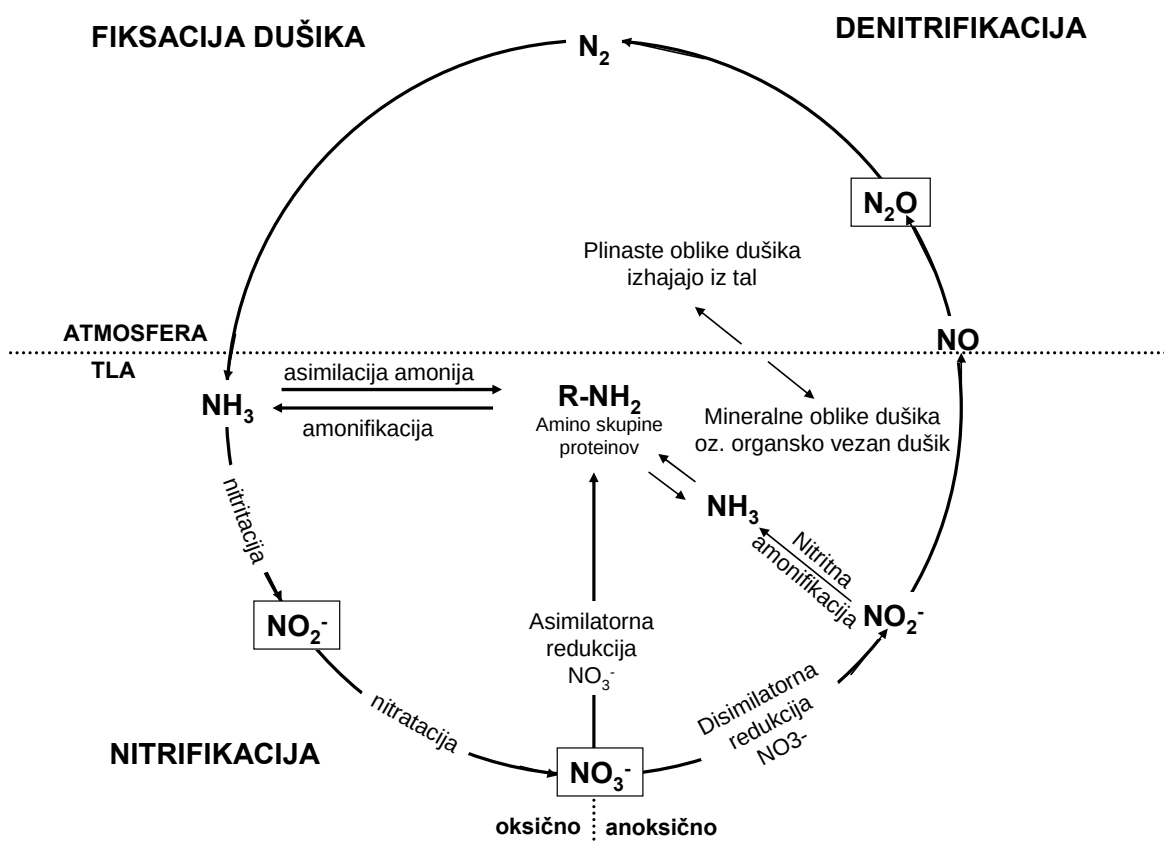
Že Kucera in Kirkham (1971) sta trdila, da se za merjenje talne respiracije lahko uporabijo kar talne emisije CO_2 . Pri tem se sicer zanemarijo nekatere anaerobne respiracije, reakcije med ogljikovimi kislinami in hitrosti difuzije CO_2 , vendar je hitrost talne respiracije vseeno dober parameter za vrednotenje mikrobne aktivnosti in s tem hitrosti razgradnje organske snovi v tleh.

Sproščanje CO_2 iz šotnih tal je v površinskih slojih večje v primerjavi z globljimi sloji (Hogg in sod., 1992; Andersen in sod., 2006). Emisije CH_4 so večje iz globinskih slojev šotnih tal kot površinskih. Med emisijami CH_4 in CO_2 po globini tal je bila ugotovljena negativna korelacija (Francez in sod., 2000). Višje temperature so močno povečale razgradnjo v šotnih tleh, ki so se sušila, so pa imele zelo majhen vpliv na stalno poplavljen tla. Šota iz globljih slojev je bila zelo odporna proti razgradnji tudi ob toplih, aerobnih razmerah, zato naj globalno segrevanje ne bi vplivalo na izgubljanje ogljika iz šotnih tal, če ta niso izsuševana (Hogg in sod., 1992).

Waddington in sod. (2004) so ob restavraciji šetišč z dvigom podtalnice uspešno zmanjšali emisije CO_2 in CH_4 iz tal, saj restavrirana šetišča ponavadi zaradi obrabljenosti tal proizvajajo celo manjše emisije CO_2 in CH_4 , kot naravna (Francez in sod., 2000; Waddington in sod., 2004; Andersen in sod., 2006).

2.1.2 Kroženje dušika

79 % atmosfere sestavlja plin dušik (N_2). Atmosfera je tudi največji in najpomembnejši rezervoar dušika. Velik, neaktiven rezervoar dušika predstavlja amonij, ki je vezan v kamninah in sedimentih. Relativno stabilen rezervoar dušika lahko predstavlja tudi stabilizirana organska snov v tleh ali humus. Mineralizacija humusa poteka zelo počasi, tudi po več stoletij, in samo z mineralizacijo postane dušik iz humusa dostopen živim organizmom (Atlas in Bartha, 1998).



Slika 1: Dušikov krog (Atlas in Bartha, 1998: 415, Madigan in sod, 2003: 663)

V tla dušik prihaja s fiksacijo atmosferskega dušika in jih zapušča z denitrifikacijo. Poleg kroženja med atmosfero in tlemi poteka še lokalno kroženje dušika v tleh (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003).

Z mikrobno fiksacijo se plinasti dušik reducira do amonija, NH_3 , ki se lahko asimilira v mikrobno biomaso, ali pa vstopi v proces nitrifikacije. Nitritacijske bakterije NH_3 oksidirajo do nitrita (NO_2^-), nitratacijske pa do nitrata (NO_3^-). Nastali NO_3^- je na voljo za asimilativno oz. disimilativno redukcijo nazaj do amonija, ali pa se z denitrifikacijo dušik iz tal vrača nazaj v atmosfero v obliki plinov (NO , N_2O in N_2) (Madigan in sod., 2003).

2.1.2.1 Vrste redukcije nitrata

Asimilatorna redukcija nitrata je v tleh omejena z nizkimi koncentracijami $\text{NH}_4^+\text{-N}$ v organski snovi. Disimilatorna redukcija nitrata do amonija (DNRA), tako kot asimilatorna redukcija nitrata producira NH_4^+ , vendar je podobno kot respiratorna denitrifikacija regulirana s O_2 . DNRA za tla ni tako značilna, kot za okolja, kjer je delež organske snovi glede na dostopnost elektronskih akceptorjev visok (vamp goveda, nekateri sedimenti in anaerobni reaktorji za presnovo odpadnega blata) (Tiedje in sod., 1982).

Nitratno respiracijo (redukcijo nitrata v nitrit) vršijo mnogi mikroorganizmi. Prvi korak ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) je enak kot pri DNRA in je vezan na elektronsko transportno verigo, naslednji koraki DNRA pa ne sledijo. Pri rodu *Klebsiella* pride do kopičenja NO_2^- , kadar je NO_3^- limiten. Če je limiten ogljik, nastaja NH_4^+ (Cole in Brown, 1980, cit po Tiedje, 1994).

Pri nerespiratorni denitrifikaciji se NO_2^- in NO_3^- prav tako pretvorita do dušikovih plinov, vendar pri tem ne pride do rasti mikroorganizma. (Tiedje, 1994) Nerespiratorne denitrifikacije so sposobne nekatere bakterije, ki asimilirajo nitrat, kvasovke, filamentozne glive in organizmi v asociaciji z rastlinami in živalmi (Bleakley in Tiedje, 1982). Nerespiratorna denitrifikacija je pomembna v aerobnih razmerah, v suhih tleh, kjer na ta način nastaja N_2O (Tiedje, 1994).

Kemodenitrifikacija je nebiološka produkcija dušikovih plinov. Do kemične redukcije NO_2^- v NO pride v tleh, ki so kisl (pH $\leq$ 5). Poleg NO , pri kemodenitrifikaciji v manjših količinah nastajata še N_2O in N_2 . NO_3^- lahko oksidira organski dušik, pri čemer nastaja N_2 . Reakcija bi lahko bila pomemben vir atmosferskega NO med taljenjem zamrznjenih tal in vlaženjem suhih tal (Tiedje, 1994; Paul in Clark., 1996)

2.1.2.2 Disimilatorna respiratorna denitrifikacija- prava denitrifikacija

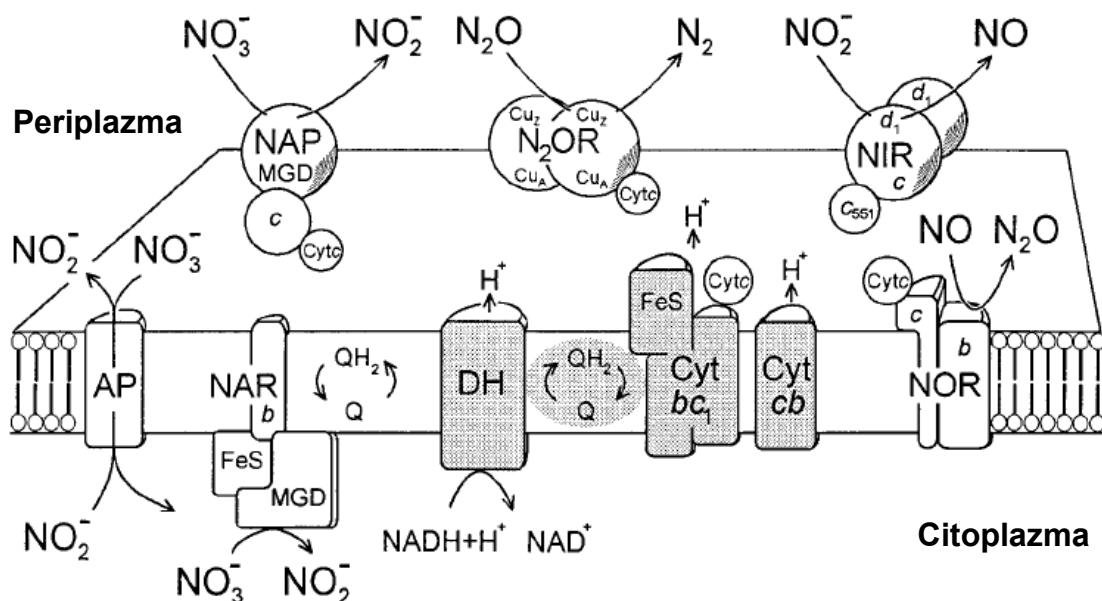
Denitrifikacija je definirana kot katerikoli proces, pri katerem se nitrat ali nitrit pretvorita v dušikove pline. Poznamo več procesov, ki producirajo NO, N₂O in N₂, npr. nitrifikacijo, disimilatorno redukcija nitrata do amonija, kemodenitrifikacijo in ostale nerespiratorne procese. Denitrifikacija je poleg rastlinske asimilacije in pronicanja (leaching) eden od treh najpomembnejših načinov izgub nitrata iz tal. Po mnogih avtorjih (Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995; Paul in Clark, 1996; Zumft, 1997; Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003) je denitrifikacija (disimilatorna respiratorna denitrifikacija) anoksičen mikrobni proces, pri katerem je elektronski transport sklopljen z redukcijo dušikovih oksidov. Pravi denitrifikatorji, npr. *Paracoccus denitrificans* in *Pseudomonas stutzeri* nitrat s pomočjo denitrifikacijskih encimov, reduktaz nitrata (NAR), nitrita (NIR), dušikovega oksida (NOR) in dušikovega oksidula (N₂OR), pretvorijo v plinaste produkte in pri tem rastejo (Zumft, 1997; Madigan in sod., 2003).

Definicija respiratornega denitrifikatorja (Mahne in Tiedje, 1995; Tiedje, 1994):

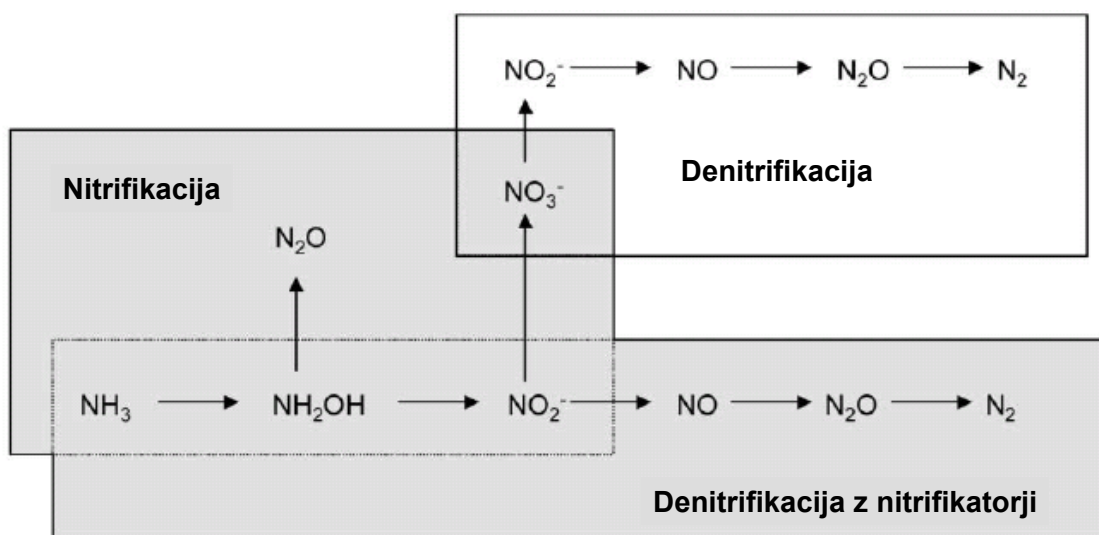
- Produkcija dušikovih plinov (NO, N₂O in N₂) je pospešena;
- Nastajata predvsem N₂ in N₂O, ki sta produkta redukcije NO₃⁻ ali NO₂⁻;
- Hitrost rasti je višja, kot če bi elektroni iz NO enostavno odtekali;
- Prisotne so disimilatorna reduktaza NO₂⁻ (NIR), reduktaza NO (NOR) in ponavadi še reduktaza N₂O (N₂OR).

2.1.2.3 Denitrifikacija z nitrifikatorji

V mnogih študijah se pojavlja besedna zveza »denitrifikacija nitrifikatorjev« (nitrifier denitrification). Pri nitrifikaciji ob prisotnosti kisika iz NH₄⁺ nastane hidroksilamin (NH₂OH). Sledi oksidacija NH₂OH v NO₂⁻ in nato v NO₃⁻. Preko intermediatov, NH₂OH in NO₂⁻, lahko kemično pride do nastanka N₂O (kemodenitrifikacija). Poleg tega so nekateri nitrifikatorji zmožni prave denitrifikacije. Pogoji za nastanek denitrifikacije z nitrifikatorji je navadno nizka koncentracija O₂ in morda tudi nižji pH ter razpoložljivost NH₄⁺ (Wrage in sod., 2004). Delež N₂O, ki ga prispevajo nitrifikatorji v primerjavi z denitrifikatorji, je manjši, če je v tleh manj amonija (Avrahami in sod., 2002).



Slika 2: Organizacija anaerobne elektronske transportne verige pri *Pseudomonas stutzeri* (Zumft, 1997: 580). Osenčena področja predstavljajo komponente aerobne dihalne verige: kompleks reduktaze NADH (DH), kinonskegi cikel (Q, QH₂), kompleks citokroma bc₁ (Cyt bc₁) in terminalni oksidazni kompleks, citokrom cb (Cyt cb). Denitrifikacijski sistem sestavljajo respiratorna reduktaza nitrata (NAR), reduktaza nitrita (NIR), reduktaza NO (NOR), in reduktaza N₂O (N₂OR). Pri *P. stutzeri* obstaja še perioplazemska reduktaza nitrata (NAP). Citokromi tipa c (Cyt c in Cyt c₅₅₁) sprejemajo elektrone iz kompleksa Cyt bc₁ in jih prenašajo na NIR, NOR in N₂OR. Nitrit, ki nastaja iz nitrata s citoplazemsko reduktazo nitrata (NAR), se s pomočjo nitrata/nitrit antiporterja (AP) izvaža v perioplazmo (Zumft, 1997: 580).



Slika 3: Pretvorbe mineralnih oblik dušika v tleh. Poti nastanka N₂O z denitrifikatorji in kemoavtotrofnimi nitrifikatorji, ki so sposobni denitrifikacije (Wrage in sod., 2001: 1727).

2.1.2.4 Dušikovi plini, ki se sproščajo v atmosfero

V tleh raztopljen amonij (NH_4^+), ki se sprošča ob aerobni razgradnji organskega materiala, je hitro recikliran oz. se v rastlinah in mikroorganizmih hitro pretvori v aminokisline. Ker je NH_4^+ v obliki amoniaka (NH_3) hlapen, se ga nekaj tudi izgubi iz sistema. Pri $\text{pH} \geq 8$ začne NH_3 hlapeti. Globalno gledano predstavljajo emisije NH_3 15 % izgub dušika v atmosfero, ostali delež predstavljata pretežno N_2 in N_2O . (Madigan in sod., 2003)

Pri denitrifikaciji nastaja N_2O predvsem kot intermediat, preden ga reduktaza N_2O spremeni v N_2 . Na količino emisij N_2O vplivata pH tal in koncentracija O_2 . Pri nizkem pH in nepopolni anoksičnosti se emisije N_2O povečajo (Wrage in sod., 2001; Morkved in sod., 2007). Povečane emisije N_2O iz tal so značilne tudi pri nizkih temperaturah. Izmerjeno je bilo, da večina N_2O pri nizkih temperaturah nastane z denitrifikacijo, manjši del pa ob nitrifikaciji oziroma kemodenitrifikaciji. Emisije N_2O torej povzroča neaktivnost encima reduktaze N_2O (N_2OR) pri nizkih temperaturah. Vpliv nizkih temperatur ter zmrzovanja in odtajanja tal na aktivnost N_2OR še ni dobro pojasnjen. Nekateri avtorji domnevajo, da led fizično uniči strukturo encima, vendar to ne drži v vseh primerih (Morkved in sod., 2006). Primerjava treh zgornjih slojev (0-30cm) tal iz geografsko različnih delov Evrope (Nemčije, Finske in Švedske) je pokazala, da je pri nemških in finskih tleh pri temperaturi 0°C N_2OR dokaj neaktivna, medtem ko pri švedskih tleh skoraj nemoteno deluje (Holtan-Hartwig in sod., 2002).

Emisije N_2O iz tal narastejo, če obstaja razpoložljiv vir ogljika ali mineralnega dušika. Dodatek amonija (NH_4^+) ali nitrata (NO_3^-) povzroči povečanje emisij N_2O . Še večje emisije povzročita NH_4^+ in NO_3^- , dodana skupaj (Azam in sod., 2002). Med odmrzovanjem tal se iz rastlinja sproščajo lahko razgradljive oblike ogljika in takrat emisije N_2O narastejo (Morkved in sod., 2006). Večja dostopnost ogljika poveča mikrobno aktivnost, ob kateri se s strani aerobnih mikroorganizmov iz tal intenzivno porablja O_2 , kar povzroči anoksičnost tal in s tem ugodne razmere za denitrifikacijo. Anoksična mikrookolja nastanejo celo v dobro aeriranih tleh. Tudi dobro aerirana tla vsebujejo denitrifikacijske encime in proizvajajo N_2O , dokler ne zmanjka vira ogljika oz. nitrata. Povečana mikrobna aktivnost je torej odgovorna za večje emisije N_2O (Azam in sod., 2002).

2.2 MIKROBNE ZDRUŽBE DENITRIFIKATORJEV V TLEH

Organizmi, ki denitrificirajo, so večinoma heterotrofni, obstajajo pa tudi kemolitotrofni, fotolitotrofni in diazotrofni denitrifikatorji. Nekatere vrste *Propionibacterium*, ki denitrificirajo, so obligatno fermentativne bakterije, nekatere vrste *Bacillus* pa fakultativno fermentativne. *Thiobacillus denitrificans* oksidira elementarno žveplo in reducira nitrat (Paul in Clark, 1996).

Bakterije, zmožne denitrifikacije, so razširjene po filogenetsko različnih vejah. Cheneby in sod. (2000) so na podlagi analize treh različnih obdelovanih tal ugotovili, da je v površinskem sloju tal več ($4 \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$ suhih tal) denitrifikatorjev, kot jih je v globinskih slojih tal ($4 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$ suhih tal). Z ARDRA (angl. amplified ribosomal DNA restriction analysis) so ugotovili, da so nekateri bakterijski izolati geografsko razširjeni, drugi pa so specifični za določena tla. Prav tako se struktura združbe denitrifikatorjev v tleh lahko po nekaj letih spremeni. Delno sekvenciranje genov za 16SrRNA je pokazalo, da denitrifikatorji v tleh spadajo v pet pomembnejših rodov: *Burkholderia-Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas-Frateuria*, *Bacillus* in *Streptomyces* (Cheneby in sod., 2000). Na vzorcih tal iz šestih različnih lokacij so s kvantitativno RT-PCR (angl. real time polymerase chain reaction) reakcijo ugotovili, da se število kopij gena *nosZ* giblje med 10^5 in 10^7 g^{-1} suhih tal, število kopij 16S rRNA pa se giblje med 10^8 in 10^9 g^{-1} suhih tal (Henry in sod., 2006). Število denitrifikatorjev na gram suhih tal sovпада s številom kopij gena *nirK*, ki so jih ugotovili s kvantitativno RT-PCR (Henry in sod., 2004).

Na osnovi razlik v maščobno-kislinskih profilih, v tleh, ki so se razlikovala po vegetaciji in načinu obdelave, so bili predstavniki mikrobnih združb različni. Od 27. taksonov je bilo samo 12 taksonov prisotnih v obeh tipih tal. Število denitrifikatorjev v teh tleh je, ne glede na režim obdelovanja in vrsto vegetacije, znašalo okoli $2 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$ suhih tal. Različne združbe denitrifikatorjev v tleh prispevajo različne količine toplogrednega plina N_2O v atmosfero (Cavigelli in Robertson, 2001).

S primerjavo RFLP (angl. »restriction fragment length polymorphysm) profilov gena *nosZ* (gen za N_2OR), izoliranega iz kultiviranih in nekultiviranih tal, so ugotovili, da je raznolikost denitrifikatorjev v kultiviranih tleh višja, kot v nekultiviranih (Stres in sod., 2004). Strukturi mikrobnih združb denitrifikatorjev travniških in gozdnih tal, ugotovljeni s T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorfism) gena *nosZ* (gen za reduktazo N_2O) sta se razlikovali. Če so travniška tla za štiri leta prenesli v gozd in obratno, je struktura mikrobnih združb denitrifikatorjev za vsaka tla ostala značilna, tudi DEA travniških tal je še vedno bila višja od DEA gozdnih tal. Vse to kaže, da so mikrobne združbe denitrifikatorjev dokaj neobčutljive za spremembe okolja. (Boyle in sod., 2006)

Realna denitrifikacijska aktivnost denitrifikatorjev v tleh ni nujno v korelaciji z denitrifikacijskim potencialom, ki ga imajo tla, dokazana pa je bila pozitivna korelacija denitrifikacijskega potenciala s pH tal, mikrobno biomaso in dehidrogenazno aktivnostjo. Količina dodanega umetnega gnojila spremeni aktivnost združb denitrifikatorjev v tleh; zmerno gnojenje poveča denitrifikacijski potencial tal, prekomerno gnojenje pa ga zmanjša (Šimek in sod., 2000).

2.3 LJUBLJANSKO BARJE

2.3.1 Značilnosti šotnih tal Ljubljanskega barja

Šotna tla v splošnem nastajajo, ko se odmrli rastlinska biomasa v ekosistemu kopiči hitreje, kot se razgrajuje. Organska snov se tako v šotnih tleh akumulira. Vsebnost organskega materiala v šotnih tleh Ljubljanskega barja je še danes visoka in se giblje med 14 in 40 % organske snovi (Hacin in sod., 2001). Za tla Ljubljanskega barja je značilna velika kapaciteta za zadrževanje vode (WHC- water holding capacity). V mnogih študijah, tudi na Ljubljanskem barju (Hacin in sod., 2001, Kraigher in sod., 2006) so zaznali pozitivno korelacijo WHC tal s količino ogljika in dušika v tleh, ki velja tudi pri različnih teksturnih skupinah tal (Bauer in Black, 1992, Gonzalez-Prieto in Villar, 2003). Agregacija organske snovi v tleh vpliva na prezračevnost tal in infiltracijo vode ter je glavni pokazatelj kvalitete tal (Carter, 2002, Franzluebbers, 2002). V tleh Ljubljanskega barja je voda bogata z minerali, predvsem s kalcijem, Takšna nizka barja so praviloma nevtralna ali rahlo alkalna (pH 6.5-7.5) (Hacin in sod., 2004).

Sistematsko izsuševanje je povzročilo, da je prave barjanske šote na Ljubljanskem barju vedno manj (Zupanc, 2006). Vrhnji sloj tal Ljubljanskega barja je postal bolj prezračen, posledično se organski material mikrobno hitreje razgrajuje. Vsebnost vode in temperatura ozrača vplivata na mikrobno aktivnost. Izhlapevanje vode povzroči, da je poleti mikrobna aktivnost nižja, kot spomladi. Poplavljen tla (≥ 100 % WHC) sčasoma postanejo anoksična in mikrobna razgradnja se upočasni. V suhih tleh pa je delež mikrobom dostopne vode zmanjšan, kar spet upočasni razgradnjo (Kraigher in sod., 2006).

Mikrobna aktivnost v tleh na eksperimentalnem polju je v splošnem višja v tleh z več organske snovi (Kraigher in sod., 2006). Mineralizacija dušika je odvisna od sezonske dinamike in je proporcionalna količini organskega ogljika in dušika (Hacin in sod., 2001). Na osnovi analize genov za 16S rRNA so ugotovili, da se struktura bakterijske združbe s temperaturo in vsebnostjo vode v barjanskih tleh ne spreminja bistveno, kljub spremembam v aktivnosti (Kraigher in sod., 2006). Tla Ljubljanskega barja vsebujejo med 10^8 in 10^9 kopij gena za 16S rRNA, okoli 10^8 kopij gena *narG* (gen za NAR) med 10^6 in 10^7 kopij *nirK* (gen za NIR) in okoli 10^6 kopij *nosZ* (gen za N₂OR) (Henry in sod., 2006).

2.3.2 Dejavniki okolja na Ljubljanskem barju

Za Ljubljansko barje, ki je pod vplivom celinskega podnebja, so značilne spremembe v temperaturah ozračja čez leto. Predvsem pozimi prihaja do temperaturnega obrata, pri katerem se hladnejši in vlažen zrak zadržuje v nižjih plasteh. Poletja so sončna in razmeroma vroča (MOL, 2005). Temperatura ozračja na Ljubljanskem barju poleti- junija, julija in avgusta- presega 25 °C, pozimi pa se decembra, januarja in v začetku februarja giblje okoli 4 °C (ARSO, 2007b). Kljub višji temperaturi ozračja poleti povprečna temperatura zgornjega (0-30 cm) sloja tal znaša okoli 20 °C. Pozimi imajo tla ponavadi podobno temperaturo kot ozračje, okoli 2 °C. (Repič, 2007).

Osrednje dele Ljubljanskega barja zajemajo redne poplave, ko voda prekrije okoli 13 % celotne površine. Ob izrednih poplavah je pod vodo skoraj 50 % celotne površine Ljubljanskega barja. Poplave so najpogostejše ob spomladanskem in jesenskem deževju ter pozimi in so odvisne od količine padavin v povirjih Ljubljanice in njenih pritokov (Perko in Orožen, 1998). Letno pade cca. 1400mm padavin (ARSO, 2007). Delež gravitimetrične vsebnosti vode v tleh glede na celotno kapaciteto za zadrževanje vode v zgornjem sloju tal (% WHC) se na Ljubljanskem barju v sezoni giblje v skladu z nivojem podtalnice, padavinami in temperaturami. Nivo podtalnice je najvišji (okoli 0,5 m pod površjem tal) v obdobju med oktobrom in aprilom, medtem ko avgusta doseže najnižje vrednosti (do 1,75 m pod površjem tal) (Hacin in sod., 2004). Vsebnost vode v tleh takoj po koncu zime, ko se sneg tali in so temperature še nizke, znaša okoli 90 % WHC, poleti pa je daljše obdobje suše, ko vsebnost vode znaša 45 % WHC (Repič, 2007).

Na račun poletnih deževij, trajajočih do tri tedne, lahko za krajša obdobja (nekaj dni ali tednov) na Ljubljanskem barju nivo podtalnice in vsebnost vode v tleh narasteta tudi poleti. Sicer je tako visoka in več mesecev trajajoča vsebnost vode v tleh značilna spomladi, jeseni in pozimi (Repič, 2007), ko so temperature nižje. Razmere pri dlje trajajočih visokih vsebnostih vode bi se poleti v tleh Ljubljanskega barja vzpostavile ob dvigu podtalnice (renaturacija barja) ali pa spomladi in jeseni kot posledica globalnega segrevanja, saj obstaja verjetnost, da se bo v obdobju 2001 do 2090 ozračje segrelo za 3 °C do 12 °C (Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005b).

Empirični modeli za ocenjevanje letnih količin padavin z določeno gotovostjo napovedujejo, da bodo zime v Sloveniji bolj suhe, kot so sedaj, slabše pa opišejo bodoče stanje padavin čez leto (Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005a).

2.3.3 Eksperimentalno polje

Poskusno polje na Ljubljanskem barju je v Tomišlju na območju z ohranjeno jezersko šoto. Polje je veliko 1 ha in je na eni strani omejeno z drenažnim jarkom. Plast šote je debela do 2,5 m. Glede na vsebnost organske snovi in glin se tla delijo na dva tipa (Hacin in sod., 2001; Hacin in sod., 2004).

En del polja, ki se nahaja bližje drenažnemu jarku, predstavlja organsko mineralna tla s fluvialnimi glinenimi nanosi z nižjo vsebnostjo organske snovi (14-20 %), drugi del polja pa so globoka organska tla. Ta del je 100 m oddaljen od drenažnega jarka, je brez glinenih depozitov in vsebuje do enkrat več organske snovi (27-40 %). Zgornji sloj (0-30-60 cm) na organskih tleh predstavlja do različne stopnje preperelo šoto (Hacin in sod., 2001; Hacin in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUS V MIKROKOZMIH

Inkubacija tal je potekala v mikrokozmi, ki smo jih izpostavili štirim različnim tipom okoljskih razmer in je trajala 17 tednov. Med eksperimentom smo primerjali vpliv temperature in vsebnosti vode v tleh na obseg združbe denitrifikatorjev in potencialno denitrifikacijsko encimsko aktivnost. Ob tem smo merili tudi emisije treh toplogrednih plinov didušikovega oksida (N_2O), ogljikovega dioksida (CO_2) in metana (CH_4).

3.1.1 Vzorčenje in priprava tal

Vzorčili smo z organsko snovjo bogatejša tla na delu eksperimentalnega polja v Tomišlju na Ljubljanskem barju. Površina vzorčenja je bila kvadratna, s stranico 10 m. Iz točk, enakomerno porazdeljenih v mreži 10 m x 10 m, smo odvzeli 100 sredic, dolžine 15 cm, s premerom 7 cm in z ohranjeno vertikalno strukturo tal ter vso vegetacijo.

Homogenizacija tal je potekala v laboratoriju. Za lažje presejanje smo tla predhodno sušili pri sobni temperaturi na 42 % WHC. Korenine in ostanke žive, s prostim očesom vidne, rastlinske in živalske biomase smo iz tal odstranjevali pred in med sejanjem s sitom s 5 mm porami. Vsa presejana tla smo dobro premešali med seboj, da smo dobili homogeno maso tal, ki smo jo shranili pri 4 °C.

S tlemi smo napolnili 120 mikrokozmov. V vsakega smo dali natančno 400 g homogeniziranih tal z 42 % WHC, kar bi predstavljalo 226 g zračno suhih tal, sušenih pri 60 °C. Tla v mikrokozmi smo navlažili do 45 % WHC in začeli s predinkubacijo mikrokozmov pri 28 °C in 45 % WHC. Predinkubacija je trajala 12 dni.

3.1.2 Zastavitev inkubacijskega eksperimenta v mikrokozmi

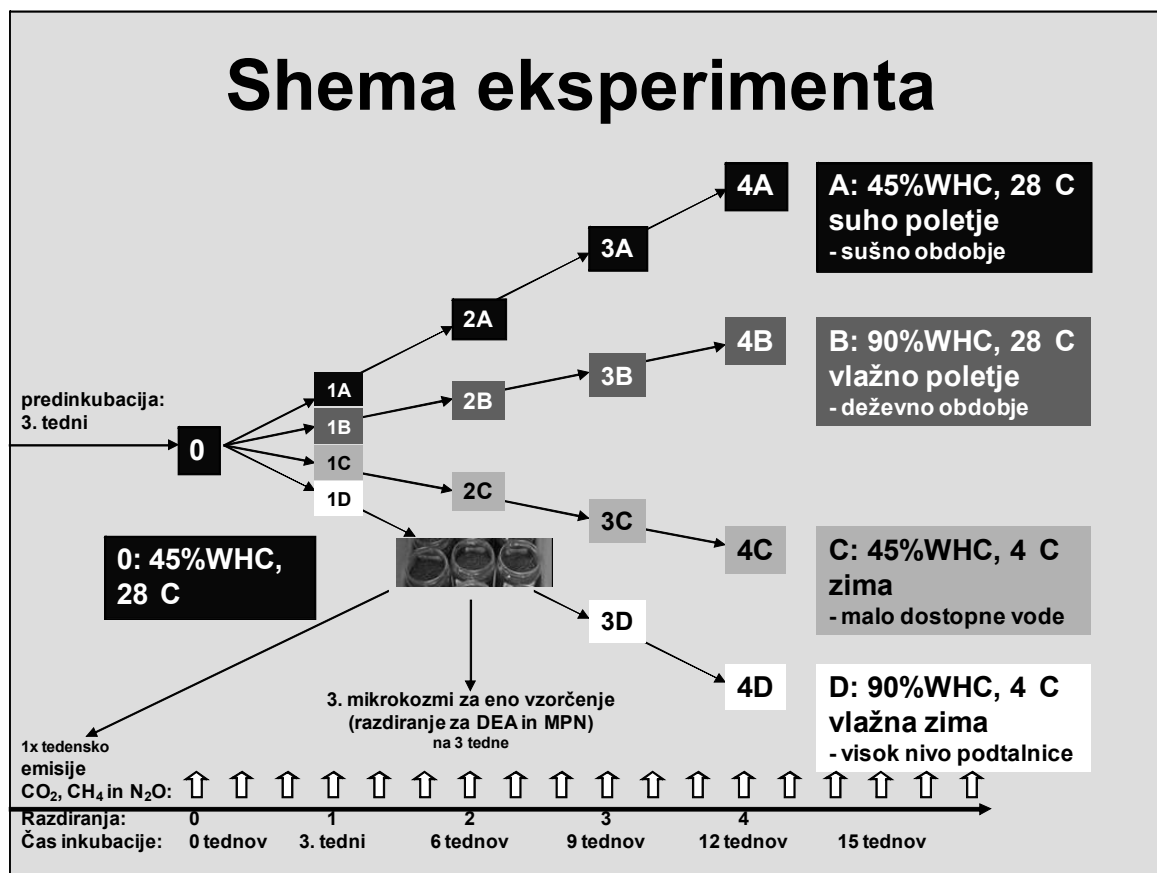
Po končani predinkubaciji smo v mikrokozmi s tlemi vzpostavili štiri tipe okoljskih razmer. Varirali smo dva parametra, temperaturo in vsebnost vode v tleh v skladu s sezonskimi ekstremi v naravi. Sledila je 17-tedenska inkubacija v temi, pri izbranih razmerah za vsako vejo tal.

Preglednica 1: Razdelitev mikrokozmov s tlemi Ljubljanskega barja v posamezne inkubacijske veje na osnovi vsebnosti vode v tleh in temperature tal.

Parametra, ki določata tip podnebnih razmer v tleh		Poimenovanje podnebnih razmer v tleh	Inkubacijska veja tal v mikrokozmi
Temperatura	Vsebnost vode		
Poletje (28 °C)	sušno obdobje (45 % WHC)	suho poletje	A (45 % WHC, 28 °C)
	deževno obdobje (90 % WHC)	vlažno poletje	B (90 % WHC, 28 °C)
Zima (4 °C)	brez padavin (45 % WHC)	suha zima	C (45 % WHC, 4 °C)
	s padavinami (90 % WHC)	vlažna zima	D (90 % WHC, 4 °C)

3.1.3 Razdiranje mikrokozmov

Takoj po predinkubaciji in nato med inkubacijo smo na vsake tri tedne razdrli po tri naključno izbrane mikrokozme iz vsake inkubacijske veje ter za vsak mikrokozem ugotovili vsebnost vode v tleh, potencialno denitrifikacijsko aktivnost (DEA) in najbolj verjetno število (MPN) denitrifikatorjev.



Slika 4: Potek eksperimenta z mikrokozmi. Po preinkubaciji tal smo v mikrokozmi vzpostavili štiri tipe okoljskih razmer, pri katerih smo nato 17 tednov inkubirali mikrokozme. V času inkubacijskega eksperimenta smo 12-14 tednov, na vsake tri tedne, ugotavljali obseg združbe denitrifikatorjev (MPN) in potencialno denitrifikacijsko encimsko aktivnost (DEA). Emisije toplogrednih plinov smo merili enkrat tedensko in smo jih merili celih 17 tednov inkubacije.

Razdiranje treh ponovitev mikrokozmov iz iste veje inkubacije:

- ugotovitev gravimetrične vsebnosti vode v tleh
 - za vsak mikrokozem v treh ponovitvah
- MPN denitrifikatorjev
 - za vsak mikrokozem na eni mikrotitrski plošči (8 ponovitev/redčitev)
 - za vsak mikrokozem ena serija epruvet Hungate (5 ponovitev/redčitev)
- DEA
 - za vsak mikrokozem pet ponovitev

3.1.5 Vzdrževanje želene vsebnosti vode v tleh v mikrokozmih

Vsaj enkrat tedensko smo s tehtanjem mikrokozmov preverjali vsebnost vode v tleh. Če so se tla posušila, smo dolili destilirano vodo, da so tla, skupaj z mikrokozmom, imela enako maso, kot na začetku inkubacije. Tako smo v mikrokozmih vzdrževali konstanten % WHC.

Preden smo mikrokozme napolnili s tlemi, smo ugotovili maso praznega mikrokozma (m_K). Ker smo v vsak mikrokozem dali 400 g tal z 42 % WHC ($VL_{(vlažnost)} = 0,77 \text{ g/g}$), je bilo v vsakem mikrokozmu 226 g zračno suhih tal. Za 45 % WHC so morala tla skupaj z vodo tehtati 411 g, za 90 % WHC pa 596 g. Izračunali smo, koliko mora tehtati mikrokozem s tlemi (m_{K+T}), da bo v njem 45 % ($m_{45 \%}$) oz. 90 % WHC ($m_{90 \%}$).

- $m_{45 \%}$ - masa mikrokozma s tlemi s 45 % WHC
 - $m_{90 \%}$ - masa mikrokozma s tlemi z 90 % WHC
 - m_K – masa praznega mikrokozma
- $m_{45 \%} = m_{K+T45 \%} = m_K + 411 \text{ g}$**
- $m_{90 \%} = m_{K+T90 \%} = m_K + 596 \text{ g}$**
- enačbi veljata samo, če je v mikrokozmu 226 g suhih tal

Mikrokozmi, še posebej tisti pri 28 °C, so se hitreje sušili, zato smo jih pokrili, vendar ne zatesnili. Z narobe obrnjenimi pokrovčki smo jih inkubirali v kartonskih škatlah, pokritih z aluminjasto folijo, da bi bile izgube vode čim manjše. Pri tako inkubiranih mikrokozmih so izgube vode znašale med 1ml in 10ml na teden ($\Delta \% \text{ WHC} \leq 2 \%$) pri 28 °C, medtem ko so mikrokozmi pri 4 °C v enem tednu izgubili manj kot 1ml vode.

3.2 OPTIMIZACIJA IN OPIS METOD

Metode, ki smo jih uporabljali med samim eksperimentom, smo za hitrejše delo in pridobitev čimbolj natančnih rezultatov prej preizkusili in jih optimizirali.

Ker je za interpretacijo rezultatov podatek o masi suhih tal ključnega pomena, smo vsebnost vode v tleh ugotavljali tekom celotnega eksperimenta. Na začetku eksperimenta smo ovrednotili tudi kapaciteto tal za zadrževanje vode (WHC- water holding capacity).

Skozi celotno inkubacijo tal v mikrokozmi smo primerjali izvedbo metode najbolj verjetnega števila (MPN) celic denitrifikatorjev na mikrotitrskih ploščah z izvedbo v epruvetah Hungate. Pri delu z epruvetami Hungate nam je uspelo skoraj popolnoma avtomatizirati postopek odčitavanja rezultatov.

Pri DEA smo naleteli na težave z velikimi odstopanji rezultatov, pridobljenih med paralelkami istega vzorca tal.

Spremembam v aktivnosti in številu denitrifikatorjev ter emisijah toplogrednih plinov smo sldili s plinsko kromatografijo (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies). V plinski kromatograf je bila nameščena kolona J & V Scientific (GS-Carbon Plot, 30m x 0,530mm) in metanizator. Detektor FID (flame ionization detector) zaznava količino CH₄, detektor ECD (electron capture detecor) pa količino N₂O v vzorcu. CO₂ gre po ločbi na koloni na metanizator, ki ga spremeni v CH₄. Detektor FID tako zazna tudi v CH₄ spremenjen CO₂. Signal iz detektorjev se procesira glede na jakost in trajanje in odraža določeno površino pika posameznega plina. Površino pika programska oprema, preko programiranih umeritvenih krivulj za vsak plin, pretvori v koncentracije plinov ppm (parts per milion) za CH₄ in N₂O ter v % za CO₂.

3.2.1 Ugotavljanje vsebnosti vode v tleh in WHC tal

3.2.1.1 Vsebnost vode v tleh

Gravimetrična vsebnost vode v tleh (VL) je mera, ki pove, koliko gramov vode (m_{H_2O}) je v 1g suhih tal (m_{st}). Ugotavljanje vsebnosti vode v tleh smo vedno izvedli vsaj v treh ponovitvah. V suhe plastične tehtiče, ki smo jih prej stehtali (m_{teht}), smo zatehtali točno 30 g tal. Nato smo tla s tehtiči sušili do konstantne teže pri 60 °C (tla so bogata z organsko snovjo, zato se sušenje pri višjih temperaturah odsvetuje). Posušena tla skupaj s tehtiči smo ponovno stehtali ($m_{st+teht}$) in izračunali vsebnost vode v tleh po formuli:

• VL- gravimetrična vsebnost vode v tleh • m_{H_2O} – masa vode v tleh • m_{st} – masa suhih tal • m_{teht} – masa tehtiča • $m_{st+teht}$ – masa suhih tal s tehtičem $VL_{(vlažnost\ tal)} = m_{H_2O} / m_{st} = (30\ g - m_{st}) / m_{st} = (30\ g - (m_{st+teht} - m_{teht})) / (m_{st+teht} - m_{teht})$ • enačba velja, če pred sušenjem tal v tehtič dodamo točno 30g tal
--

3.2.1.2 Kapaciteta tal za zadrževanje vode (WHC)

WHC je največja masa vode, ki jo en gram tal lahko zadrži. WHC smo ovrednotili v šestih ponovitvah. V kovinske cilindre, s cedilom na dnu, smo pogrnili nekaj slojev papirnate brisače. Potem smo cilindre popolnoma zmočili in ugotovili maso mokrih cilindrov z brisačo (m_c). Nato smo dodali tla z znano vsebnostjo vode (VL), tako da so le ta segala 2 cm pod rob cilindra. Cilindre s cedilom, brisačo in tlemi smo še enkrat stehtali (m_{c+t}), nato smo jih čez noč namakali v posodi z destilirano vodo. Naslednji dan smo cilindre s tlemi, prepojenimi z vodo, odcejali. Odtekanje vode smo spremljali s tehtanjem na 60 minut (m_{c+t+H_2O}). Ko se je masa z vodo nasičenih tal v cilindru (m_{c+t+H_2O}) ustalila, smo ta podatek uporabili za izračun WHC (m_{st} smo izračunali iz začetne vsebnosti vode v tleh).

WHC tal smo ovrednotili samo na začetku eksperimenta, vsebnost vode v tleh smo izmerili ob vsakokratni analizi vzorcev in jo izrazili v odstotnem deležu kapacitete za zadrževanje vode v tleh (% WHC).

- VL – vsebnost vode v tleh, preden smo cilindre namočili v vodi
 - m_c – masa mokrega cilindra z brisačo
 - m_{c+t} – masa mokrega cilindra z brisačo skupaj s tlemi, preden smo jih namočili v vodi
 - m_{c+t+H_2O} – masa z vodo nasičenih tal skupaj s cilindrom
 - m_{st} – masa suhih tal v cilindru: $m_{st} = m_{tal} / (VL + 1) = (m_{c+t} - m_c) / (VL + 1)$
- WHC = $m_{H_2O} / m_{st} = (m_{c+t+H_2O} - m_{c+t} + VL \cdot m_{st}) / m_{st}$**
- % WHC = $(VL / WHC) \cdot 100 \%$**

3.2.2 Ugotavljanje obsega združbe denitrifikatorjev

Število denitrifikatorjev v tleh smo ugotavljali z metodo MPN (most probable number), ki smo jo izvajali na mikrotitrskih ploščah in v epruvetah Hungate. Metoda deluje po principu redčenja suspenzije istih tal v več ponovitvah in zaznavanja prisotnosti denitrifikatorjev v posameznih redčitvah po inkubaciji. Nacepljene mikrotitrške plošče in epruvete Hungate smo 1 mesec inkubirali v temi pri 28 °C v anoksičnih razmerah.

Po inkubaciji smo prešteli število pozitivnih luknjic na mikrotitrskih ploščah oz. pozitivnih epruvet Hungate.

3.2.2.1 Sestava gojišča:

Gojišče za denitrifikatorje (D30):

Nutrient broth, Difco	1g
KNO ₃	0,22g
Na-sukcinat	0,5g
Na-acetat	0,5g
Deionizirana voda	1000ml
pH	6,5 – 6,8

3.2.2.2 Suspenzija tal

V 150-ml stekleničko smo zatehtali 10 g tal in dolili 90 ml gojišča D30. Predpostavili smo, da je razmerje masa tal : masa suspenzije tal = 1 : 10. Suspenzijo tal smo 30 min horizontalno stresali pri 150 obr/min. Takoj po stresanju smo začeli s sterilnim redčenjem vzorcev na mikrotitrskih ploščah in v epruvetah Hungate.

3.2.2.3 MPN na mikrotitrskih ploščah

Vsaka vrstica mikrotitrške plošče ima 12 luknjic in vsak stolpec ima 8 luknjic. V vsako luknjico mikrotitrške plošče smo prenesli 180 μ l gojišča D30.

Suspenzijo tal smo nalili v sterilno petrijevko. Nato smo z osem-kanalno pipeto prenesli 30 μ l suspenzije v vseh 8 luknjic prvega stolpca. Z novimi sterilnimi nastavki pipete smo premešali vsebino luknjic in 30 μ l prenesli v vsako luknjico naslednjega stolpca. S prenašanjem po 30 μ l suspenzije tal iz luknjic enega stolpca v luknjice naslednjega stolpca mikrotitrške plošče je v vsaki od osmih vrstic nastala redčitvena vrsta v osmih ponovitvah. Tako nacepljene mikrotitrške plošče smo štiri tedne anoksično inkubirali v temi pri 28 °C.

Po inkubaciji smo odčitali rezultate v posameznih luknjicah. Prisotnost nitrata v luknjici je negativen rezultat. Prisotnost nitrita oz. odsotnost nitrata in nitrita sta pozitivna rezultata.

Reagent SA+NEDA obarva nitrit (NO_2^-) v luknjici vijolično (pozitiven rezultat). Če se gojišče ob dodatku SA+NEDA ne obarva, dodamo cink. Cink reducira še prisoten nitrat (NO_3^-) do nitrita (NO_2^-), zato vijolično barvo gojišča sedaj predstavlja nitrat (negativen rezultat). Če se ob SA+NEDA in cinku luknjica sploh ne obarva, pomeni, da se je ves nitrat preko nitrita reduciral do plinastih produktov (pozitiven rezultat).

3.2.2.4 MPN v epruvetah Hungate

V vsako od epruvet Hungate smo nalili 9 ml gojišča D30 in jih vse, zaprte z gumijastimi čepi in plastičnimi zamaški, avtoklavirali. Naprej smo z njimi delali pazljivo in sterilno.

Pripravili smo redčitveno vrsto po 9 ml gojišča D30 v epruvetah Hungate do redčitve 10^{-9} . Pri tem smo upoštevali, da so tla v suspenziji že 10x razredčena. V prvo epruveto Hungate z 9 ml gojišča smo dali 1 ml suspenzije tal (redčitev 10^{-2}), iz te epruvete prenesli 1 ml redčitve v naslednjo epruveto Hungate (redčitev 10^{-3}) ... do redčitve 10^{-9} , nato pa smo z 1 ml vsake redčitve iz redčitvene vrste inokulirali nadaljnjih 5 epruvet Hungate z 9 ml gojišča D30. Tako smo dobili serijo redčitev istega vzorca v razponu od 10^{-3} do 10^{-10} v petih ponovitvah v epruvetah Hungate.

Zamašene inokulirane epruvete Hungate smo preko gumijastih čepov priklopili na sistem za izmenjavo atmosfere. Vsako epruveto Hungate smo vakuumirali 3-krat po 2 minuti in po vsakem vakuumiranju dodali N_2 do nadtlaka 1 bar. Nato smo notranji nadtlak epruvet Hungate izenačili z zunanjim tlakom. Tlak smo izenačili tako, da smo skozi čep epruvete Hungate prebodli iglo, na katero je bilo nameščeno z vodo napolnjeno ohišje injekcijske brizge brez potisnega bata. Skozi vodno fazo v ohišju injekcijske brizge so prehajali plinski mehurčki, dokler notranji tlak epruvete Hungate ni bil izenačen z zunanjim tlakom (izenačevanje tlakov je analogno kot pri plinotesno zaprtih stekleničkah z volumnom 2ml (vialah) (slika 9 na str.34).

V anoksično (N_2) atmosfero epruvet Hungate smo nato z 1ml siringo dodali 0,5ml acetilena ($0,5\text{ml}_{\text{acetilena}}/5,5\text{ ml}_{\text{plinske faze}} = 9,1\%$ acetilena v atmosferi epruvete Hungate). Inkubacija epruvet Hungate je trajala štiri tedne pri 28°C .

Anoksično atmosfero z acetilenom smo vzpostavili iz istih razlogov, kot pri merjenju DEA. Denitrifikacija je striktno anoksičen proces. Acetilen inhibira delovanje reduktaze N_2O , zato ob denitrifikaciji ne nastaja N_2 , ampak N_2O (Tiedje, 1994). Tega smo ugotovili s plinsko kromatografijo (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies, ECD detektor).

Pozitiven rezultat velja takrat, ko se v N_2O pretvori več kot 20 % dušika iz gojišča. Izračunali smo, da se za pozitiven rezultat ovrednoti koncentracija N_2O , ki je višja od 4596 ppm v plinski fazi epruvete Hungate.

Nastali N_2O smo merili avtomatizirano s plinotesno zaprtimi stekleničkami ($V = 2$ ml), ki so vsebovale po inkubaciji nastalo plinsko fazo v epruveti Hungate (glej 3.2.3.3.3).

3.2.2.5 Izračun MPN

Obseg združbe denitrifikatorjev smo podali kot logaritemsko vrednost števila celic denitrifikatorjev v enem gramu suhih tal. Število smo ugotovili s pomočjo računalna Bam-MPN (Blodgett, 2006).

Z računalom bam-MPN izračunamo najbolj verjetno število (MPN) celic denitrifikatorjev v gramu suhih tal. Bam-MPN.xls je računalniški program, v katerega moramo vnesti podatke:

- Masa suhih tal v luknjici mikrotitrne plošče oz. v epruveti Hungate določene redčitve
 - o Da jo izračunamo, potrebujemo naslednje podatke:
 - Vsebnost vode v tleh
 - Koncentracija začetne suspenzije tal ($\sim 10 \text{ g}_{\text{tal}} / 100 \text{ ml}_{\text{suspenzije}}$)
 - Količina suspenzije, ki jo prenašamo med luknjicami ($30 \mu\text{l}$)/epruvetami (1 ml)
 - Količina gojišča v luknjicah ($180 \mu\text{l}$) oz. epruvetah (9 ml)
- Število vseh ponovitev ene redčitve
 - o 8 luknjic na mikrotitrski plošči
 - o 5 epruvet Hungate
- Število pozitivnih luknjic v določeni redčitvi
 - o Od 0 do 8 za mikrotitrne plošče
 - o Od 0 do 5 za epruvete Hungate

Ko vnesemo potrebne podatke, nam računalno bam-MPN izračuna najbolj verjetno število celic denitrifikatorjev v enem gramu suhih tal. Poleg tega poda rezultat tudi v logaritemski vrednosti s standardnim odklonom.

3.2.3 Razvoj primerne metode za merjenje N_2 v plinski fazi epruvet Hungate

Pred inkubacijskim eksperimentom v mikrokozmi smo testirali naslednje načine merjenja koncentracije N_2O :

- Inkubacija v epruvetah Hungate z Durhamovimi cevkami
- Ročno brizganje vzorcev na kolono plinskega kromatografa
- Avtomatizirano nanašanje vzorcev v kolono plinskega kromatografa
 - o s plinotesno zaprtimi stekleničkami, v katerih so se vzorci inkubirali
 - o s plinotesno zaprtimi stekleničkami, v katerih je bilo 0,8ml tekoče faze in kapljica formaldehida
 - o s plinotesno zaprtimi stekleničkami, ki so vsebovale le plinsko fazo posamezne epruvete Hungate

3.2.3.1 Inkubacija v epruvetah Hungate z dodanimi Durhamovimi cevkami

Epruvete Hungate so bile pripravljene na enak način, kot že opisano (glej 3.2.2.4), le da smo jim pred avtoklaviranjem dodali Durhamove cevke. Pozitiven rezultat je predstavljal nastanek plinskega mehurčka v Durhamovi cevki epruvete Hungate.

3.2.3.2 Ročno brizganje plinske faze epruvet Hungate na kolono plinskega kromatografa

Z 1 ml injekcijsko brizgo z zapornim ventilom in iglo smo skozi gumijast čep posamezne epruvete Hungate odvzeli 50 μ l plinske faze in vsebnost N_2O v plinski fazi ugotovili s plinskim kromatografom. Metoda se je izkazala kot časovno zelo zamudna, zato smo se odločili meritve avtomatizirati.

3.2.3.3 Avtomatizirana plinska kromatografija vzorcev

Za avtomatizirano analizo smo uporabili plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2$ ml) (tip: Agilent 8425). Opremljene so s pokrovom s silikonsko membrano. Na plinski kromatograf je možno naložiti do 100 stekleničk, ki jih aparat avtomatsko analizira.

3.2.3.3.1 Plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2\text{ml}$), v katerih so se vzorci inkubirali

Ena od možnosti, ki smo jih preizkusili, je bila, da smo celotne redčitvene vrste inkubirali v plinotesno zaprtih stekleničkah ($V = 2\text{ ml}$), namesto v epruvetah Hungate. V posamezno stekleničko smo dali 0,45 ml gojišča in prenašali po 0,05 ml. Zatesnjene stekleničke z anaerobno atmosfero in acetilenom smo inkubirali na enak način, kot epruvete Hungate, nato smo jih naložili na avtomatski vzorčevalnik plinskega kromatografa in izmerili koncentracijo N_2O v plinski fazi.

3.2.3.3.2 Plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2\text{ml}$) s tekočo in plinsko fazo iz epruvet Hungate in 10 % formaldehidom

Po inkubaciji smo iz epruvet Hungate z 10 ml brizgo in iglo skozi čep potegnili 0,8ml tekoče faze in kolikor se je še dalo plinske faze (v epruveti Hungate je ob tem nastajal vakuum). Vzorec tekoče in plinske faze iz epruvete Hungate smo prenesli v plinotesno zaprto stekleničko ($V = 2\text{ ml}$) ter dodali 0,08ml formaldehida (10 %). Stekleničke smo naložili na plinski kromatograf in izmerili koncentracijo N_2O v plinski fazi po izenačenju notranjega nadtlaka v steklenički z zunanjim (Slika 9 na str. 34).

3.2.3.3.3 Plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2\text{ml}$) s plinsko fazo epruvet Hungate

Plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2\text{ml}$) smo predhodno 1 min vakuumirali.

Z 10 ml injekcijsko brizgo z zapornim ventilom smo iz epruvete Hungate prenesli vso plinsko fazo v vakuumirano stekleničko (Slika 6). Steklenička je tako vsebovala samo plinsko fazo iz epruvete Hungate. Pred analizo smo nadtlake plinskih vzorcev v stekleničkah izenačili z zunanjim tlakom (Slika 9 na str. 34).



Slika 6: Način vzorčenja plinske faze epruvet Hungate po inkubaciji.

3.2.4 Merjenje potencialne encimske aktivnosti denitrifikatorjev (DEA)

DEA (denitrification enzyme activity) je mera za količino dušika, ki se v eni uri in v enem gramu suhih tal pretvori v N_2O .

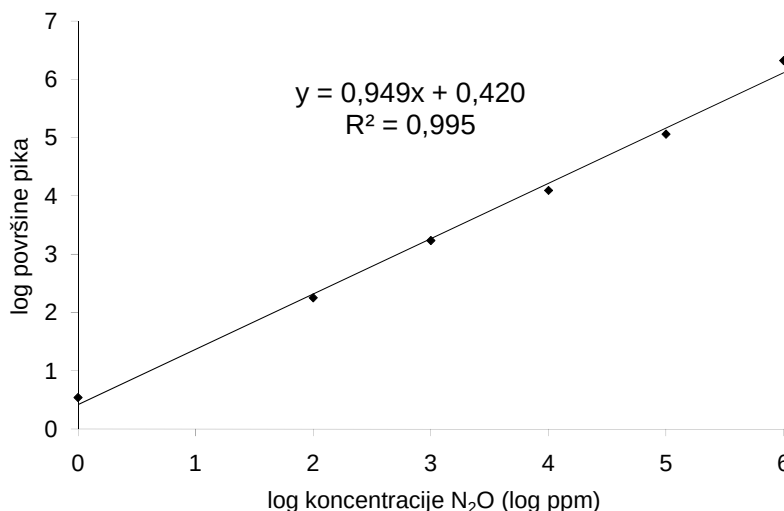
Znotraj posameznega vzorca smo DEA merili v petih ponovitvah, saj smo ugotovili, da je delo v treh ponovitvah premalo natančno. Rezultat smo podali kot povprečje petih ponovitev s standardnim odklonom od povprečja v $\mu g_{N_2O-N}/(g_{st} \cdot h)$.

V posamezno 150 ml sterilno stekleničko smo prenesli 10 g tal znane vsebnosti vode in jih zalili s 40 ml sterilnega gojišča (5 mM glukoza, 5 mM nitrat, pH 6,5-6,8). Stekleničke smo z gumijastimi zamaški in aluminijastimi pokrovčki zaprli ter jim izmenjali atmosfero z N_2 (Sistem za izmenjavo atmosfere: vakumska črpalka Vacumbrand MZ2 in Dušik 5,0-Messer Slovenija).

Anoksično atmosfero smo vzpostavili s tremi vakuumiranjmi (3x po 3 min) za vsako stekleničko. Med in po treh zaporednih vakuumiranjih je sledil dodatek N_2 v atmosfero stekleničke do nadtlaka 1 bar. Nato smo notranji nadtlak stekleničke izenačili z zunanjim tlakom ter dodali 12 ml acetilena (~10 %). Izenačevanje tlakov je tako kot pri plinotesno zaprtih stekleničkah ($V = 2$ ml) in epruvetah Hungate potekalo s pomočjo ohišja 10 ml injekcijske brizge brez potisnega bata, v kateri je bila nalita voda (Slika 9 na str. 34).

Vse stekleničke s suspenzijo tal in anoksično atmosfero z 10 % acetilena v N_2 so se 1,5 h stresale pri 28 °C na 200 obr / min (stresalnik Tehtnica, tip: Vibromix 403 EVT). Med stresanjem smo v 30-minutnih intervalih vzorčili po 50 μ l plinske faze in s plinsko kromatografijo (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies) na detektorju ECD ugotavljali površino pika N_2O v plinski fazi stekleničk v času inkubacije.

3.2.4.1 Umeritvena krivulja plinskega kromatografa za N₂O



Slika 7: Umeritvena krivulja za ugotavljanje koncentracije N₂O iz s plinsko kromatografijo izmerjene površine pika.

Za umeritveno krivuljo smo 150 ml stekleničke vakuumirali in v njih dodali N₂ ter izenačili nadtlake v stekleničkah z zunanjim tlakom. Iz plinske faze stekleničk smo nato z injekcijsko brizgo odvzeli točno določeno količino N₂ in jo izmenjali z enako količino 100 % N₂O, da smo v stekleničkah vzpostavili atmosfero z znanimi koncentracijami N₂O (ppm). Delali smo v treh ponovitvah za vsako koncentracijo N₂O. Vzorce tako pripravljenih plinskih faz smo prenesli v plinotesno zaprte stekleničke (V = 2ml) in s plinsko kromatografijo izmerili površine pika pri določenih koncentracijah N₂O. Rezultate smo logaritimizirali in naredili umeritveno krivuljo logaritemske vrednosti koncentracije N₂O v odvisnosti od logaritemske vrednosti površine pika N₂O.

3.2.4.2 Izmerjeni podatki in izračun DEA

Za izračun rezultatov smo vse volumne izrazili v mililitrih, vse mase v gramih, koncentracije plina v ppm (parts per milion = $\mu\text{l/l}$) in čase v urah (h). Za vsak čas meritve (0, 30, 60 in 90 min) smo imeli pet ponovitev meritev N_2O v plinski fazi v ppm. Nastajajoči N_2O se raztaplja v vodni fazi, zato smo z uporabo Bunsenovega koeficienta (α) izračunali še koncentracijo N_2O v vodni fazi stekleničke za temperaturo inkubacije. Iz podatkov o količini nastalega N_2O v stekleničkah med inkubacijo smo z linearno regresijo ugotovili koeficient naklona premice (k). Za izračun DEA smo potrebovali še podatke o volumnu plinske (V_g) in vodne faze (V_l) ter masi suhih tal v steklenički (m_{st}).

- $m_{st} = m_{tal} / (VL + 1) = 10 \text{ g} / (VL + 1) [\text{g}]$
 - o m_{st} smo izračunali iz vsebnosti vode v tleh (VL), ki smo jih dali v stekleničko
 - o $VL = m_{\text{H}_2\text{O}} / m_{st} = (m_{tal} - m_{st}) / m_{st}$
- $V_g = m_{\text{zalita steklenička}} - m_{\text{steklenička+tla}} [\text{ml}]$
 - o ob koncu merjenja smo stekleničko s tlemi skupaj s čepom in zamaškom stehtali ($m_{\text{steklenička+tla}}$), dolili destilirano vodo do roba stekleničke, jo zaprli in spet stehtali ($m_{\text{zalita steklenička}}$).
- $V_l = V_{\text{gojišča}} + m_{\text{H}_2\text{O}} = V_{\text{gojišča}} + VL \cdot m_{st} [\text{ml}]$
- Ostalo:
 - o Ker iz dveh NO_3^- nastane ena molekula N_2O , koeficient k pomnožimo z 2 in dobimo količino $\text{ppm}_{\text{N}_2\text{O}}/\text{h}$. Če $2k \cdot 10^{-6}$ množimo z volumnom plina v vzorcu » $2k \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha \cdot V_l)$ «, dobimo količino v $\text{ml}_{\text{N}_2\text{O-N}}/\text{h}$
 - o Molska masa N_2O ($M_{\text{N}_2\text{O}}$) je 44 g/mol , 1 mol plina pri 28°C zaseda $22710,2 \text{ ml}$ (izračunano po plinski enačbi), Bunsenov koeficient: $\alpha_{28^\circ\text{C}(\text{N}_2\text{O})} = 0,508$

Izračun DEA:

$$\text{DEA} = 2k \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha \cdot V_l) / m_{st} [\text{ml}_{\text{N}_2\text{O-N}}/\text{g}_{st} \cdot \text{h}]$$

$$\text{DEA} = (2k \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha \cdot V_l) / m_{st}) \cdot (14 \cdot 10^6 \mu\text{g/mol}) / (22710,2 \text{ ml/mol}) [\mu\text{g}_{\text{N}_2\text{O-N}}/\text{g}_{st} \cdot \text{h}]$$

3.2.5 Merjenje emisij toplogrednih plinov

Emisije toplogrednih plinov smo merili 17 tednov 1 krat tedensko v treh ponovitvah direktno iz mikrokozmov med inkubacijskim eksperimentom, pri katerem smo merili tudi MPN denitrifikatorjev in DEA. Z merjenjem smo nadaljevali še tri do štiri tedne po končanih meritvah DEA in MPN.

3.2.5.1 Priprava mikrokozmov in postopek merjenja emisij

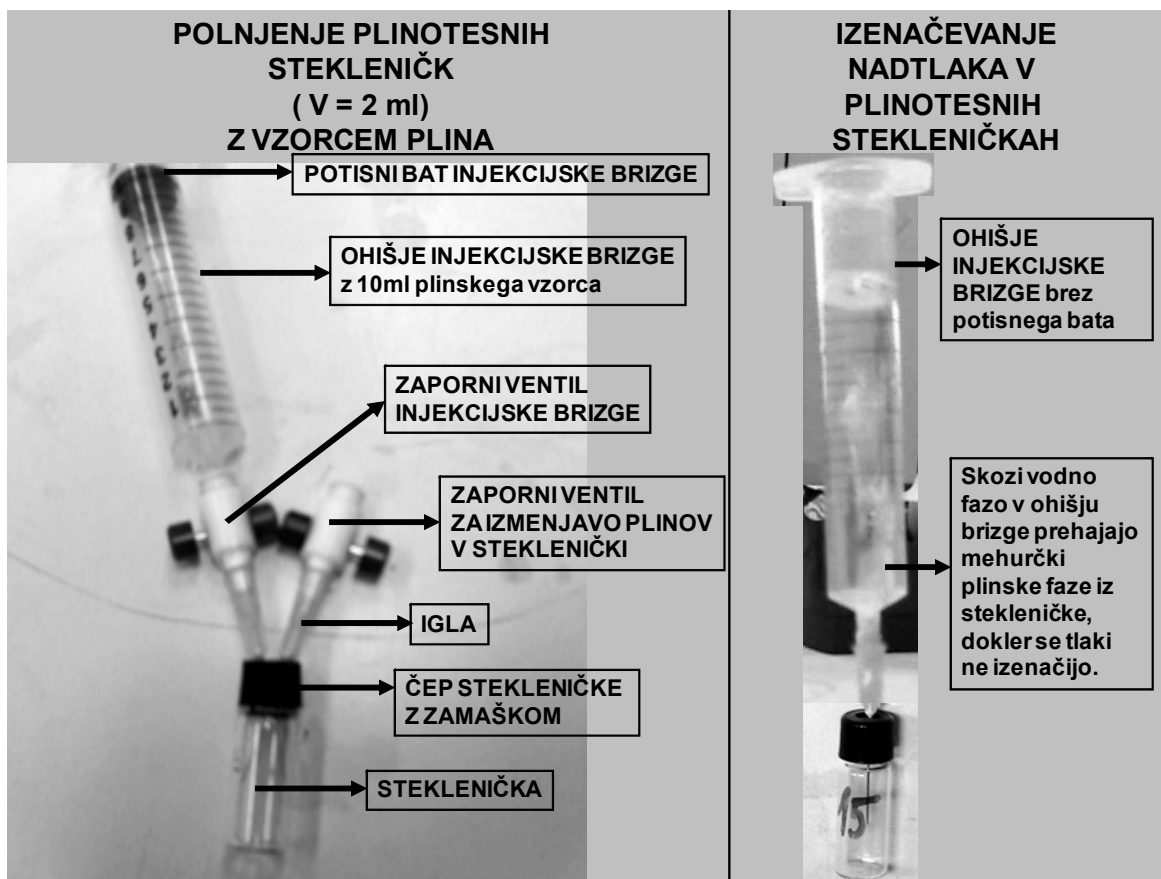


Slika 8: Priprava mikrokozma za merjenje emisij.

Za merjenje emisij toplogrednih plinov smo pokrovčke mikrokozmov priredili tako, da smo v njih izvrtali luknjo, premera 0,5 cm, na katero smo z dvokomponentnim lepilom nalepili silikonsko membrano. Mikrokozme smo tesno zaprli s pokrovčkom s silikonsko membrano. Za še boljše tesnenje smo navoj, kamor se navije pokrovček, prej ovili s teflonskim trakom.

Za čas 0 min (zračna koncentracija) smo tri plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2\text{ ml}$) napolnili z zrakom iz okolice odprtih mikrokozmov. Ob časih 30, 60 in 90 minut po zaprtju mikrokozma smo skozi silikonsko membrano na pokrovčku mikrokozma odvzeli 10 ml plinske faze in jo prenesli v stekleničko (Slika 9).

3.2.5.2 Običajno polnjenje plinotesno zaprtih stekleničk ($V = 2\text{ ml}$) s plinskim vzorcem



Slika 9: Polnjenje plinotesno zaprtih stekleničk z volumnom 2ml (vial) s plinskim vzorcem in izenačevanje nadtlaka v teh stekleničkah z zunanjim tlakom.

3.2.5.3 Izračun emisij

Postopek izračuna emisij je analogen izračunu DEA (3.2.4.1). Rezultate smo podali kot število molov posameznega plina (CO_2 , CH_4 ali N_2O) ki so v eni uri nastali iz grama suhih tal.

Linearni koeficient ($\Delta C_g/\Delta t$) spremembe koncentracije plina (C_g) v odvisnosti od časa inkubacije (**0, 30, 60, 90 min**) se izračuna iz meritev koncentracij za vsak plin. Vsak izmed merjenih plinov ima drugačen Bunsenov koeficient (α). Upoštevati je treba tudi vpliv temperature inkubacije na Bunsenove koeficiente in na spremembo molskega volumna plina (V_m) pri 4 °C in pri 28 °C.

Preglednica 2: Bunsenovi koeficienti in molski volumni plinov N₂O, CH₄ in CO₂ pri 4 °C in 28 °C (Stopar in sod., 2006).

Plini	Temperatura			
	4 °C		28 °C	
	Bunsenov koeficient (α)	Volumen mola plina pri sobnem tlaku V_m [l/mol]	Bunsenov koeficient (α)	Volumen mola plina pri sobnem tlaku V_m [l/mol]
N ₂ O	1,06	22,74	0,51	22,71
CH ₄	0,05		0,03	
CO ₂	1,42		0,71	

V vsakem mikrokozmu je bilo 226 g suhih tal (m_{st}), pri tistih s 45 % WHC je bil volumen vodne faze (V_l) enak 185 ml, pri onih z 90 % WHC pa 370 ml. Volumen plinske faze (V_g) je za mikrokozme s 45 % WHC znašal okoli 410 ml, za mikrokozme z 90 % WHC pa približno 200 ml. V_g smo natančno ugotovili po merjenju emisij. Stehtali smo mikrokozme s tlemi (m_{K+T}), jim nato dolili destilirano vodo do roba ter še enkrat stehtali (m_{K+T+H_2O}).

$$V_g = m_{K+T+H_2O} - m_{K+T} \text{ [1g dH}_2\text{O} = 1\text{ml}]$$

Izračun emisij (E_g):

$$C_g = \text{ppm}_{N_2O, CH_4} \cdot 10^{-6} = \%CO_2 \cdot 10^{-2}$$

$$E_g \text{ [ml}_{plina}/h] = \Delta C_g/\Delta t \cdot (V_g + \alpha V_l)$$

$$E_g \text{ [mol}_{plina}/g_{st} \cdot h] = E_g \text{ [ml}_{plina}/h] / (V_m \cdot m_{st})$$

Pri izračunu smo upoštevali, da se je volumen plinske faze v mikrokozmu (V_g) ob vsakem odvzemu plina zmanjšal za 10ml.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI OPTIMIZACIJE METOD

4.1.1 Zaznavanje N_2 in N_2O v plinski fazi epruvet Hungate z metodo MPN

V epruvetah Hungate smo preizkusili izvedbo metode MPN z Durhamovimi cevkami, vendar se v Durhamovih cevkah lahko tvorijo mehurčki plinov, ki niso produkt denitrifikacije, v takšni meri, da bi rezultati lahko bili lažno pozitivni, zato je primernejša direktna detekcija plinastih produktov denitrifikacije (Mahne in Tiedje, 1995), ki smo jo izvajali s plinsko kromatografijo plinske faze v epruvetah Hungate.

Da bi se izognili prenašanju plinske faze iz epruvet Hungate v plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2$ ml), smo preizkusili inkubacijo vzorcev v plinotesno zaprtih stekleničkah, namesto v epruvetah Hungate. Volumni posameznih redčitev v plinotesno zaprtih stekleničkah so bili zaradi majhnosti stekleničk ($V = 2$ ml) 20x manjši (0,5 ml) v primerjavi s tistim iz epruvet Hungate (10ml). Izmenjava atmosfere v takšnih stekleničkah je bila težavna. Že med ponovitvami istega vzorca so bili rezultati slabo primerljivi. Ravno zaradi majhnih volumnov suspenzije tal v gojišču in majhne plinske faze plinotesno zaprtih stekleničk lahko prihaja do večjih napak pri redčitvah in je tudi možnost kontaminacije vzorcev večja.

Odločili smo se za prenašanje plinskih in tekočih vzorcev iz epruvet Hungate v plinotesno zaprte stekleničke ($V = 2$ ml). Plinska faza epruvete Hungate znaša 5 ml. Da bi zagotovili bolj natančne rezultate, smo iz posamezne epruvete Hungate v stekleničko prenesli 0.9 ml tekočine in s tem zmanjšali plinsko fazo v steklenički. Dodatek formaldehida je zaustavil morebitno nadaljnjo celično rast v steklenički. Postopek priprave vzorcev je trajal dobro uro za 75 plinskih vzorcev. Rezultati so bili zadovoljivi.

Postopek s predhodnim vakuumiranjem plinotesno zaprtih stekleničk in prenašanjem zgolj plinske faze se je izkazal kot najbolj enostaven in zanesljiv postopek priprave vzorcev plinske faze epruvet Hungate za ugotavljanje števila denitrifikatorjev v tleh, zato smo ga

uporabljali skozi celoten eksperiment. V vakuumirane stekleničke smo dodali samo 5 ml plinske faze epruvet Hungate in nato izenačili tlake.

Prednosti priprave vzorcev plinske faze epruvet Hungate z vakuumiranimi plinotesno zaprtimi stekleničkami ($V = 2\text{ml}$):

- zelo dobra primerljivost rezultatov z ročno izmerjenimi vrednostmi,
- v primerjavi z dodajanjem zdravju škodljivega fomaldehida je ta način tudi hitrejši, saj smo za prenos plinske faze iz 75. epruvet Hungate v stekleničke potrebovali 30 min,
- čiščenje stekleničk po uporabi ni bilo potrebno

4.1.2 Optimizacija merjenja potencialne denitrifikacijske encimske aktivnosti (DEA)

Po prirejeni (brez dodatka kloramfenikola) originalni proceduri (Tiedje (1994) za ugotavljanje DEA so bili standardni odkloni izmerjenih vrednosti dokaj veliki ($\sim 17\%$). Tiedje (1994) navaja, da je taka variacija posledica nepopolne anaerobioze v stekleničkah, ali pa nehomogene porazdelitve združb denitrifikatorjev v tleh. Da bi odpravili problem nepopolne anoksičnosti, smo za polovico zmanjšali količino suspenzije tal in gojišča v stekleničkah (namesto 20 g tal in 80 ml gojišča smo uporabili 10 g tal in 40 ml gojišča), posledično pa povečali volumen plinske faze (iz 70 ml na 110 ml). S tem smo omogočili popolnejšo izmenjavo atmosfere z N_2 ter izboljšali mešanje in delovanje acetilena med stresanjem. Izmerjene potencialne denitrifikacijske aktivnosti (DEA) so bile dokaj visoke. To je možno, saj so tla Ljubljanskega barja sama po sebi bogata z organskim ogljikom (Hacin in sod., 2001). Izračunali smo, da bi se pri tako visokih DEA iz gojišča z 1 mM koncentracijo nitrata in glukoze (Tiedje, 1994) po 90. min. ves nitrat porabil, zato smo gojišče pripravili s 5 krat višjo koncentracijo nitrata in glukoze. Da bi rešili problem nehomogene porazdelitve denitrifikatorjev v tleh, smo DEA merili v petih ponovitvah.

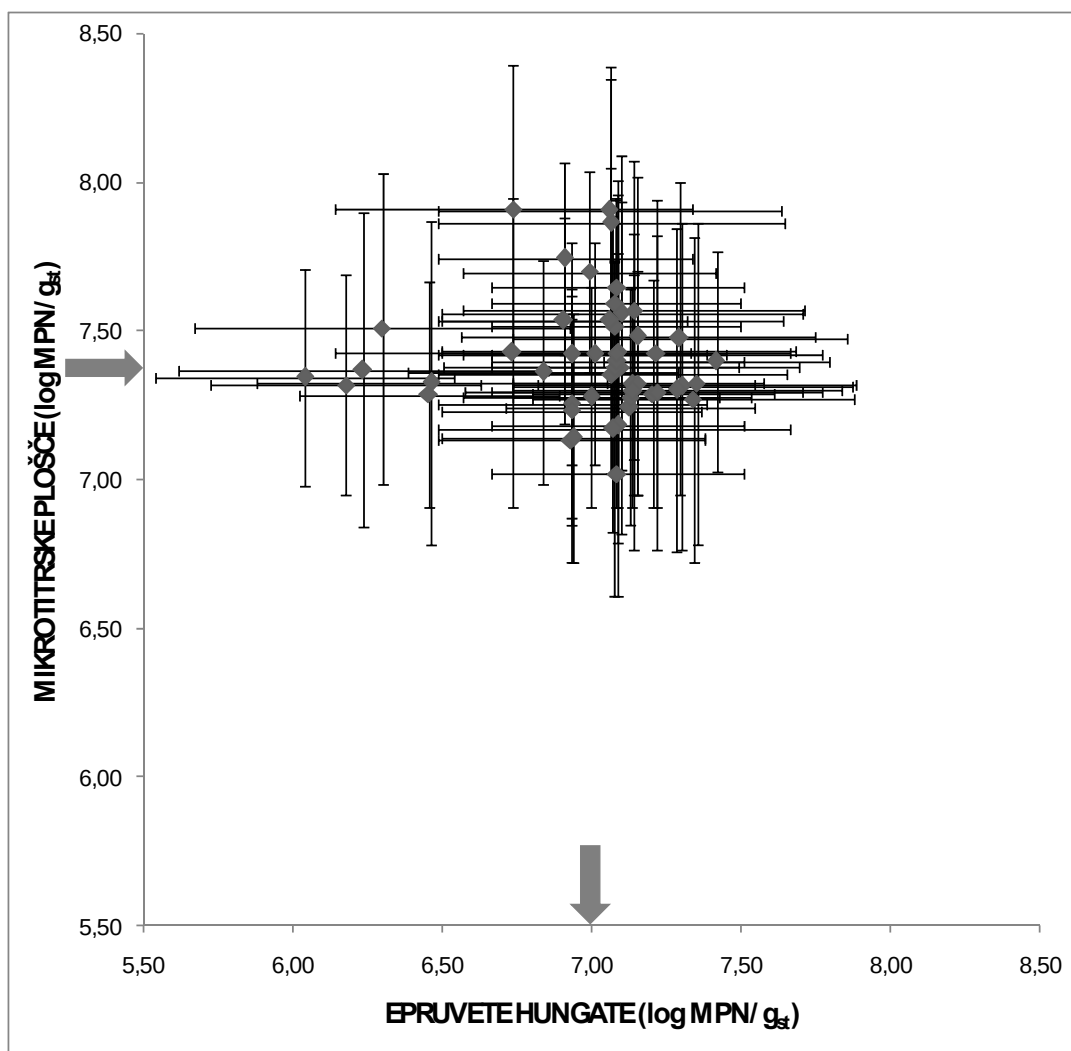
4.2 WHC IN VSEBNOST VODE V TLEH

100 % WHC za organska tla je znašala	$1,82 \pm 0,02 \text{g}_{\text{vode}}/\text{g}_{\text{suhih tal}}$
Vsebnost vode v tleh na poskusnem polju na dan vzorčenja	$1,04 \pm 0,02 \text{g}_{\text{vode}}/\text{g}_{\text{suhih tal}}$
Preden smo tla napolnili v mikrokozme, so imela	$0,77 \pm 0,03 \text{g}_{\text{vode}}/\text{g}_{\text{suhih tal}}$

4.3 OBSEG ZDRUŽBE DENITRIFIKATORJEV

Obseg združbe denitrifikatorjev za vsako od treh ponovitev znotraj ene inkubacijske veje mikrokozmov smo ugotovili na mikrotitrskih ploščah in v epruvetah Hungate. Rezultat smo izrazili kot logaritemsko vrednost števila celic denitrifikatorjev v enem gramu suhih tal.

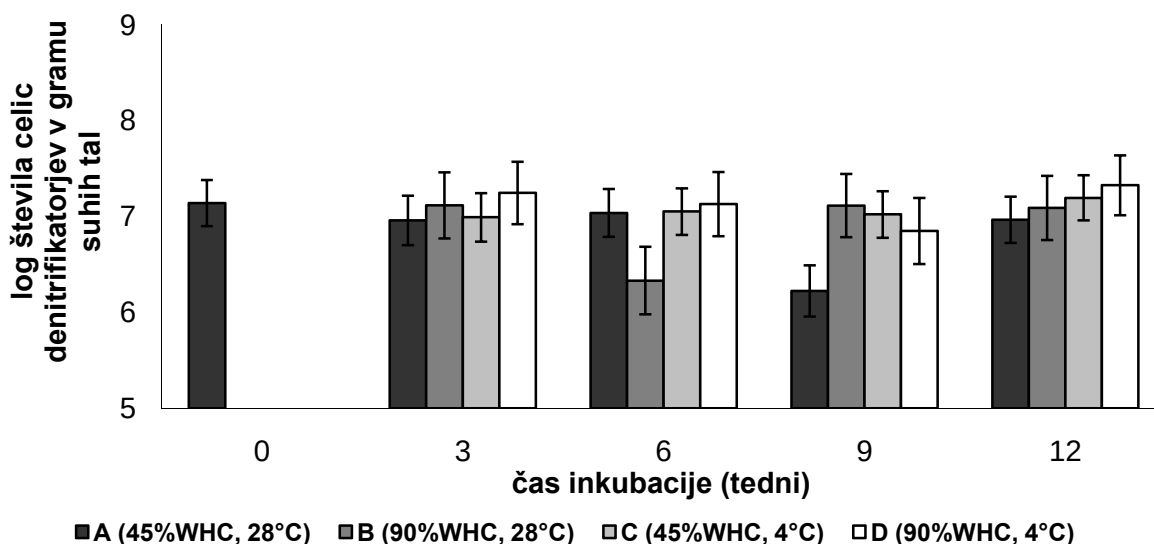
4.3.1 Primerjava metode MPN na mikrotitrskih ploščah z metodo MPN v epruvetah Hungate



Slika 10 : Primerjava dveh izvedb metode za ugotavljanje najbolj verjetnega števila celic denitrifikatorjev v gramu suhih tal na 51. vzorcih tal. Z osjo y je podana odvisnost $\log \text{MPN/g}_{\text{st}}$ mikrotitrskih plošč od $\log \text{MPN/g}_{\text{st}}$ v epruvetah Hungate (os x). S sivima puščicama sta na vsaki osi označeni povprečni vrednosti MPN/g_{st} za posamezno izvedbo metode MPN.

Obe izvedbi metode ugotavljanja najbolj verjetnega števila (MPN) celic denitrifikatorjev smo med seboj primerjali na vzorcih tal iz 51. mikrokozmov. Povprečno število denitrifikatorjev v gramu suhih tal, pridobljeno z epruветami Hungate, je znašalo $(1,7 \pm 1,4) \cdot 10^7$, z mikrotitrskimi ploščami pa $(4,1 \pm 3,1) \cdot 10^7$. Rezultati, ki smo jih dobili z uporabo mikrotitrskih plošč, so bili za $(2,4 \pm 3,5) \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$ suhih tal višji v primerjavi z epruветami Hungate.

4.3.2 Obseg združbe denitrifikatorjev med inkubacijo tal v mikrokozmi



Slika 11: Logaritemska vrednost števila denitrifikatorjev v gramu suhih tal Ljubljanskega barja v odvisnosti od časa in razmer inkubacije v mikrokozmi. Rezultati so podani kot povprečna logaritemska vrednost števila MPN s pripadajočim standardnim odklonom iz treh mikrokozmov, pridobljena z uporabo epruвет Hungate (pet vzporednih redčitvenih vrst za en mikrokozem).

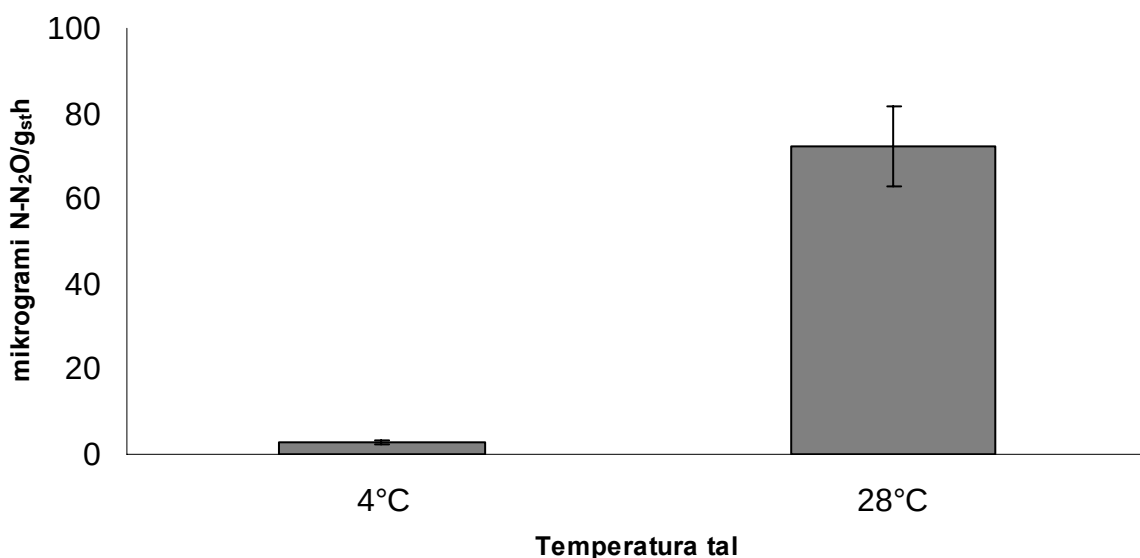
Število celic denitrifikatorjev v gramu suhih tal je pri razmerah v inkubacijskih vejah mikrokozmov A (45 % WHC, 28 °C) in B (90 % WHC, 28 °C) nihalo med $10^{6,2 \pm 0,3}$ in $10^{7,1 \pm 0,3}$, medtem ko je v vejah mikrokozmov C (45 % WHC, 4 °C) in D (90 % WHC, 4 °C) skozi vso inkubacijo znašalo $10^{7,1 \pm 0,3}$ celic denitrifikatorjev na gram suhih tal.

Nihanje v številu denitrifikatorjev smo zaznali z epruветami Hungate, z mikrotitrskimi ploščami pa ga nismo zaznali. Število denitrifikatorjev je v inkubacijski veji tal v mikrokozmi B (90 % WHC, 28 °C) po šestih tednih padlo (iz $1,3 \cdot 10^7$ na $1,6 \cdot 10^6$), pri

veji A (45 % WHC, 4 °C) pa po devetih tednih inkubacije in se nato v obeh primerih med nadaljevanjem inkubacije ustalilo nazaj na $1,3 \cdot 10^7$.

4.4 POTENCIALNA DENITRIFIKACIJSKA AKTIVNOST (DEA)

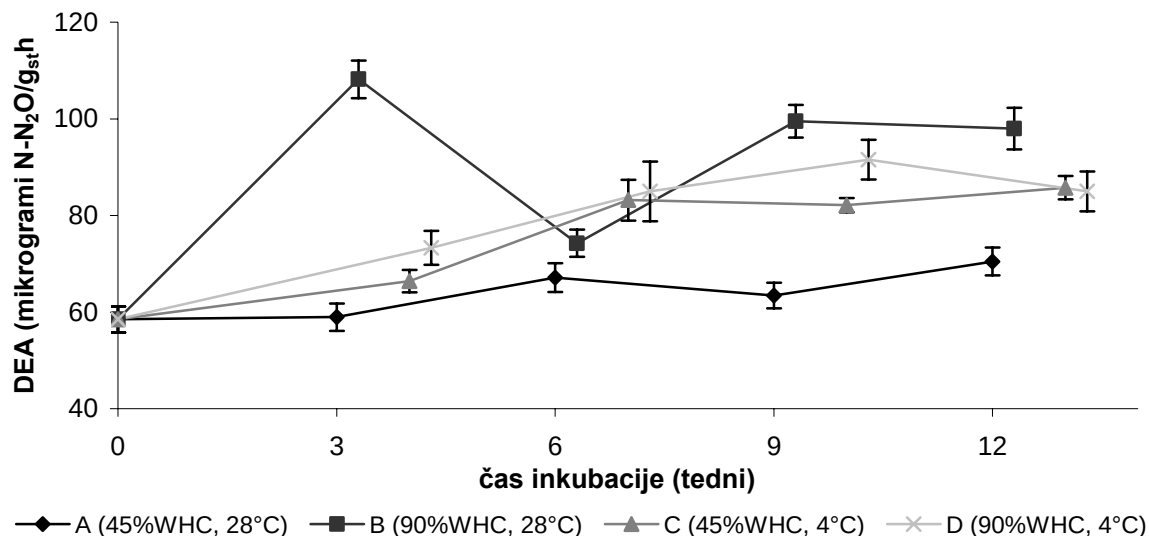
4.4.1 Maksimalna denitrifikacijska encimska aktivnost svežih tal pri 4 °C in 28 °C



Slika 12: Maksimalna denitrifikacijska encimska aktivnost svežih tal Ljubljanskega barja pri 4 °C in 28 °C. Delali smo v petih ponovitvah, rezultati so podani kot povprečje petih ponovitev s pripadajočim standardnim odklonom in so izraženi kot količina dušika v mikrogramih, ki se v eni uri v enem gramu suhih tal ob 10 % acetilenu v atmosferi pretvori v N₂O.

Za ugotavljanje maksimalne denitrifikacijske encimske aktivnosti pri 28 °C smo uporabili postopek za merjenje DEA. Za ugotavljanje maksimalne encimske aktivnosti denitrifikatorjev pri 4 °C smo postopek DEA priredili tako, da smo stekleničke s suspenzijo tal in anoksično N₂ atmosfero z 10 % acetilenom stalno stresali pri 4 °C. Maksimalna denitrifikacijska encimska aktivnost za uporabljen sloj svežih tal je bila pri 28 °C 25x višja, kot pri 4 °C.

4.4.2 DEA skozi inkubacijo tal v mikrokozmih

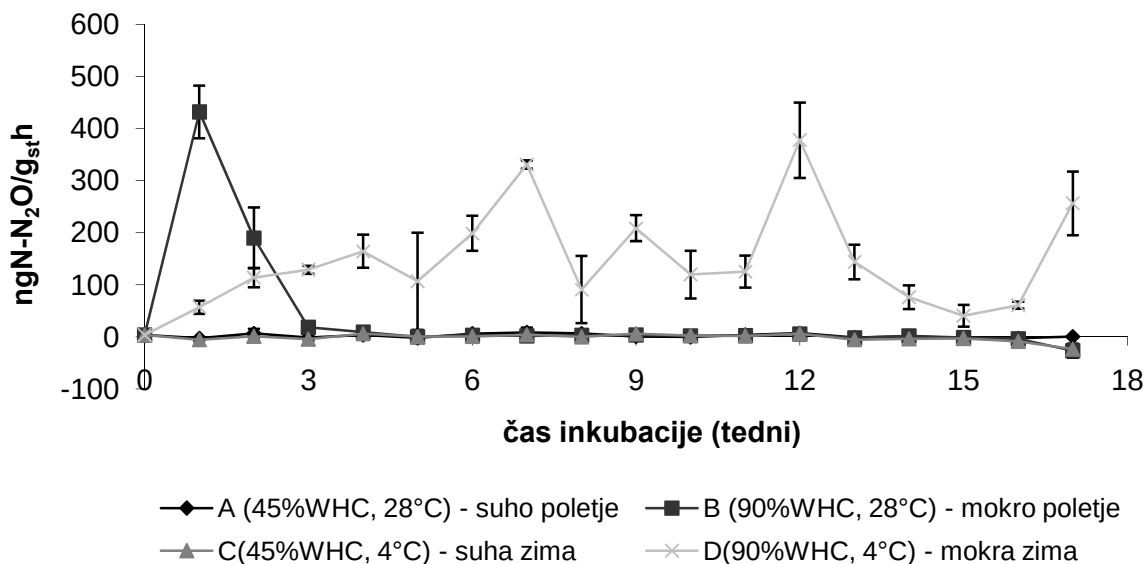


Slika 13: DEA- potencialna denitrifikacijska aktivnost tal Ljubljanskega barja v odvisnosti od časa in razmer inkubacije v mikrokozmih. Rezultati so podani kot količina dušika v mikrogramih, ki se ob prisotnosti 10 % acetilena v eni uri in v enem gramu suhih tal pretvori v N₂O in so povprečje treh ponovitev mikrokozmov, znotraj katerih smo vsakega analizirali v petih ponovitvah (3x5 ponovitev), s pripadajočimi standardnimi odkloni.

V vseh štirih inkubacijskih vejah tal v mikrokozmih je bila DEA po 14. tednih inkubacije višja, kot na začetku. Vlažna tla pri 28 °C iz inkubacijske veje B (90 % WHC, 28 °C) so na koncu inkubacije imela najvišjo DEA, suha tla pri 28 °C iz veje A (45 % WHC, 28 °C) pa najnižjo DEA ($x_{A(povp.)} = 70,5$; $x_{B(povp.)} = 98,0$; $s_d = 7,4$; $t = 13,67$; $t_{0,0005} (15) = 4,42$). Tla, inkubirana pri 4 °C iz vej C (45 % WHC, 4 °C) in D (90 % WHC, 4 °C) so imela po 14. tednih višjo DEA od tal iz veje A in nižjo, vendar podobno, DEA kot tla iz veje B ($x_{D(povp.)} = 85,0$; $x_{B(povp.)} = 98,0$; $s_d = 10,71$; $t = 4,23$; $t_{0,0005} (15) = 4,42$). V inkubacijski veji suhih tal pri 28 °C v mikrokozmih A(45 % WHC, 28 °C) se je DEA po 12. tednih inkubacije povišala iz $58 \pm 3 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$ na $70 \pm 3 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$. DEA v inkubacijski veji vlažnih tal pri 28 °C v mikrokozmih B (90 % WHC, 28 °C) je v primerjavi z ostalimi tremi vejami najhitreje narasla in že v prvih treh tednih dosegla maksimum ($108 \pm 4 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$). Med 3. in 9. tednom inkubacije je DEA vlažnih tal pri 28 °C padla na $74 \pm 3 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$, in se nato povišala na $98 \pm 4 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$ ter taka ostala do konca inkubacije. Pri inkubacijskih vejah tal v mikrokozmih C (45 % WHC, 4 °C) in D (90 % WHC, 4 °C) je bil odziv združb denitrifikatorjev enak ne glede na vsebnost vode v tleh. V obeh vejah je DEA do 8. tedna inkubacije postopoma naraščala in se ustalila pri $85 \pm 4 \mu\text{g}_{\text{N-N}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{st}}\text{h}$.

4.5 EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV

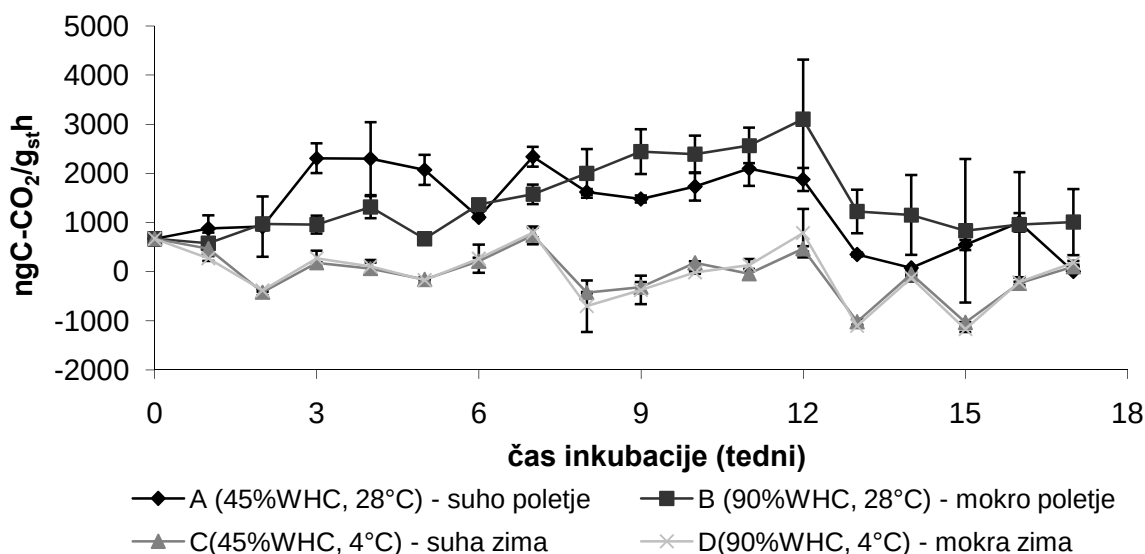
4.5.1 Emisije N₂O



Slika 14: Emisije N₂O med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov. Rezultati so podani kot povprečja s pripadajočimi standardnimi odkloni treh meritev emisij N₂O in so izraženi v nanogramih N-N₂O/g_{st}•h.

Emisije N₂O iz inkubacijskih vej mikrokozmov A (45 % WHC, 28 °C) in C (45 % WHC, 4 °C), kjer so bila tla suha, so bile zelo nizke v primerjavi z emisijami N₂O iz vlažnih tal. V vlažnih tleh pri 28 °C iz inkubacijske veje mikrokozmov B (90 % WHC, 28 °C) so emisije N₂O že po enem tednu inkubacije dosegle maksimum, 430 ± 50 ng(N₂O-N)/g_{st}h, nato so do tretjega tedna inkubacije strmo padale, po petih tednih inkubacije pa ni bilo več emisij N₂O. V vlažnih tleh pri 4 °C iz inkubacijske veje mikrokozmov D (90 % WHC, 4 °C) so emisije N₂O počasneje naraščale, vendar so trajale vseh 17 tednov inkubacije. Od 5. do 17. tedna inkubacije so emisije N₂O nihale med 10 in 450 ng(N₂O-N)/g_{st}h. V povprečju so se emisije N₂O iz vlažnih tal pri 4 °C gibale med 100 in 200 ng(N₂O-N)/g_{st}h.

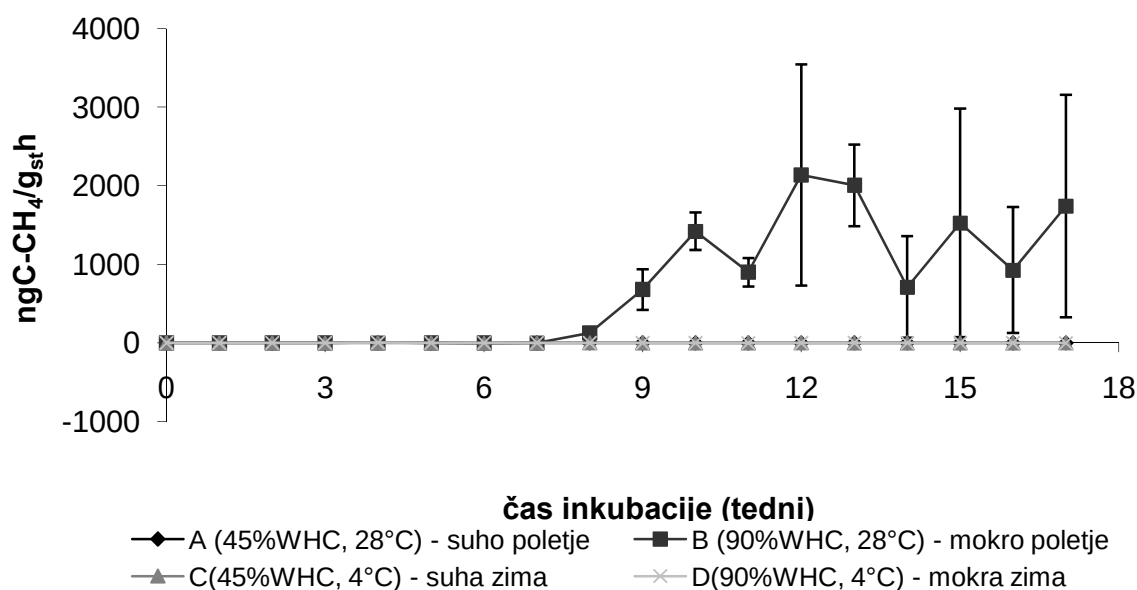
4.5.2 Emisije CO₂



Slika 15: Emisije CO₂ med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov. Rezultati so podani kot povprečja s pripadajočimi standardnimi odkloni treh meritev emisij CO₂ in so izraženi v nanogramih C-CO₂/g_{st}·h

Emisije CO₂ iz tal, inkubiranih pri 28 °C, so skozi 17-tedensko inkubacijo ne glede na vsebnost vode v tleh v povprečju znašale 1400 ± 500 ng(CO₂-C)/g_{st}·h. Emisije CO₂ iz tal pri 4 °C so bile mnogo nižje od emisij CO₂ pri 28 °C. Pri 4 °C so emisije CO₂ bile v okviru eksperimentalne napake enake nič (-50 ± 150) ng(CO₂-C)/g_{st}·h.

4.5.3 Emisije CH₄



Slika 16: Emisije CH₄ med 17-tedensko inkubacijo tal v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vodnih in temperaturnih režimov. Rezultati so podani kot povprečja s pripadajočimi standardnimi odkloni treh meritev emisij CH₄ in so izraženi v nanogramih C-CH₄/g_{st}·h

V tleh iz inkubacijske veje mikrokozmov B (90 % WHC, 28 °C) je po sedmih tednih prišlo do emisij metana v velikostih od 50 do 3160 $\text{ng}(\text{CH}_4\text{-C})/\text{g}_{\text{st}}\cdot\text{h}$. V vseh vejah inkubacije, razen v B(90 % WHC, 28 °C), so bile emisije metana v okviru eksperimentalne napake na meji detekcije.

4.5.4 Povprečne dnevne količine produkcije toplogrednih plinov in njihov prispevek h globalnem segrevanju v odvisnosti od vremenskih razmer na Ljubljanskem barju

Iz povprečne molske količine posameznega plina na uro na gram suhih tal v celotni 17-tedenski inkubaciji, mase suhih tal in površine tal v mikrokozmu smo za vsako posamezno vejo mikrokozmov izračunali emisijo plina na površino tal v kg/ha·dan in pripadajoči standardni odklon. Potencialni prispevek h globalnemu segrevanju je izražen v merah IPCC (2001) (Baede in sod., 2001), ki predpostavljajo, da je toplogredni učinek 1 kg CH₄ ekvivalenten toplogrednemu učinku 23 kg CO₂, učinek 1 kg N₂O pa je ekvivalenten toplogrednemu učinku 310 kg CO₂.

Preglednica 3: Povprečna dnevna količina produkcije posameznih plinov CO₂, CH₄ in N₂O in prispevek k učinku tople grede, ocenjena na površino enega hektarja (ha), iz 10-11 cm debelega sloja tal Ljubljanskega barja, inkubiranega v mikrokozmi pod vplivom štirih različnih vremenskih razmer v tleh.

Inkubacijska veja mikrokozmov	Vremenske razmere v tleh Ljubljanskega barja	Dnevna količina nastalega plina v mikrokozmih [kg _{plina} /ha·dan]			Skupni prispevek vseh treh plinov h globalnemu segrevanju, izražen kot ekvivalentna količina CO ₂ [kg/ha·dan] (Baede in sod., 2001)
		CO ₂	CH ₄	N ₂ O	
A (45 % WHC, 28 °C)	običajno poletje	51,3 ± 8,7	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	70 ± 46
B (90 % WHC, 28 °C)	poletje z dvignjeno podtalnico	56,6 ± 19,0	9,7 ± 5,6	1,2 ± 0,3	634 ± 235
C (45 % WHC, 4 °C)	suha zima	-1,4 ± 2,6	0,1 ± 0,1	-0,1 ± 0,1	-17 ± 34
D (90 % WHC, 4 °C)	običajna zima	-1,8 ± 5,9	0,0 ± 0,0	4,9 ± 1,1	1518 ± 352

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Poskusno polje v Tomišlju na Ljubljanskem barju vsebuje dva tipa tal; visoko organska tla in organsko mineralna tla. Ker je mikrobna aktivnost v splošnem večja v tleh z več organske snovi (Kraigher in sod., 2006), smo za naš eksperiment uporabili visoko organska tla, ki imajo tudi več organskega ogljika in dušika kot organsko mineralna tla ter višjo kapaciteto za zadrževanje vode v tleh (Hacin in sod., 2001).

V mikrokozmihih s tlemi smo umetno vzpostavili povprečne razmere dveh značilnih letnih časov, poletja in zime, ter dva ekstremna podnebna scenarija, vlažno poletje in suho zimo, ki se v naravi pojavita redko in običajno za krajše obdobje (Repič, 2007). Pri tleh v normalnih poletnih oz. zimskih razmerah so nas zanimale predvsem razlike med začetnim stanjem tal in končnim stanjem tal po treh mesecih. Ekstremna scenarija vlažnega poletja in suhe zime bosta morda v prihodnosti kot posledica globalnega segrevanja ozračja pogostejša in dlje trajajoča (Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005a; Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005b), zato smo se tu osredotočili na spremembe tekom celotnega eksperimenta.

Spremembe v tleh smo vrednotili preko odziva mikrobnih združb denitrifikatorjev ter s tem povezanih emisij toplogrednih plinov. Sledili smo spremembam v številu (MPN) in potencialni encimski aktivnosti denitrifikatorjev (DEA) ter emisijah toplogrednih plinov (N_2O , CO_2 in CH_4). DEA je hkrati tudi mera za količino trenutno sintetiziranih denitrifikacijskih encimov v tleh in odraža odziv denitrifikatorjev na okoljske razmere v tleh (Tiedje, 1994) ter naj bi bila v pozitivni korelaciji s pH tal, mikrobno biomaso in mikrobno aktivnostjo (Šimek in sod., 2000) ter dostopnostjo organske snovi v tleh (Paul in Clark 1998).

Za ugotavljanje najbolj verjetnega števila (MPN) denitrifikatorjev v tleh smo uporabljali dve izvedbi metode MPN, ki sta se med seboj razlikovali tudi v načinu zaznavanja pozitivnega rezultata. V epruvetah Hungate smo sledili emisiji plina N_2O , na mikrotitrskih ploščah pa smo sledili porabi oz. nastanku NO_3^- oz. NO_2^- .

Zaznavanje plinastih produktov denitrifikacije pri ugotavljanju MPN v epruvetah Hungate je temeljilo na enakem principu kot metoda za merjenje DEA. Denitrifikacija je definirana kot produkcija plinov (N_2O in N_2 iz NO_3^- ali NO_2^-), zato je prisotnost nastalih dušikovih plinov direkten dokaz za denitrifikacijo (Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995). V epruvetah Hungate smo reduktazo N_2O inhibirali z acetilenom, zato je izmerjena količina N_2O posredovala podatek o vsoti N_2 in N_2O . Tehnika inhibicije reduktaze N_2O z acetilenom se za merjenje denitrifikacije v tleh splošno uporablja (Bollmann in Conrad, 1997).

Prisotnost oz. odsotnost nitrita v luknjicah anoksično inkubiranih mikrotitrskih plošč bi lahko bila posledica denitrifikacije ali pa tudi nekaterih drugih procesov, npr. nitratne respiracije in disimilativne redukcije nitrata do amonija (DNRA), zato bi lahko na mikrotitrskih ploščah prišlo tudi do lažno pozitivnih rezultatov. Število celic denitrifikatorjev na gram suhih tal, ugotovljeno z mikrotitrskimi ploščami, je bilo višje (10^7 do 10^8) v primerjavi s tistim iz epruvet Hungate (10^6 do 10^7). Pri obeh izvedbah se je v večini ponovitev (88 % pri epruvetah Hungate in 77 % pri mikrotitrskih ploščah) gibalo bližje 10^7 g^{-1} suhih tal. Število celic denitrifikatorjev, ocenjeno z obema izvedbama metode MPN, se med 12-tedensko inkubacijo tal pri različnih razmerah ni statistično značilno spreminjalo, razen pri mikrokozmih A v 9. tednu in v mikrokozmih B v 6. tednu inkubacije, prav tako nismo opazili statistično značilnih odstopanj v razliki med rezultati omenjenih izvedb. Tako je bila razlika v povprečju logaritemske vrednosti ocen najbolj verjetnega števila denitrifikatorjev z metodo MPN iz mikrotitrskih plošč in epruvet Hungate pri stopnji značilnosti 0,05 statistično značilna ($t = 4,32$; $t_{0,025}(50) = 2,31$; $p = 0,01$).

Kljub statistično značilni razliki med obema ocenama obsega združbe denitrifikatorjev, pridobljenima z epruvetami Hungate ($\sim 2 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$ suhih tal) in na mikrotitrskih ploščah ($\sim 4 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$ suhih tal), je iz vidika mikrobne ekologije uporaba mikrotitrskih plošč popolnoma zadovoljiva za hitro oceno obsega združbe denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja (slika 10 na str. 39). Fiziološko pravilnejša tehnika za oceno obsega združb denitrifikatorjev pa je metoda MPN z epruvetami Hungate.

V vzorcih tal pri razmerah suhega poletja v mikrokozmi A(45 % WHC, 28 °C) je bila razlika v DEA ob začetku in koncu inkubacije najmanjša. V vzorcih tal pod vplivom drugih vremenskih razmer pa je po dvanajstih tednih DEA narasla, zato sklepamo, da vremenski razmere v suhem poletju najmanj ugodno vplivajo na denitrifikacijsko aktivnost združb denitrifikatorjev v tleh. To potrjujejo tudi zanemarljivo nizke emisije N_2O in naraščanje koncentracije nitrata v tleh (Resman, 2007). V suhih tleh je koncentracija kisika višja, kar zavira denitrifikacijo, difuzija NO_3^- in lahko dostopnega organskega ogljika do anoksičnih con v tleh pa je omejena zaradi nizke vsebnosti vode. Emisije CO_2 iz tal so bile vseskozi visoke. Za tipične poletne razmere je bila torej značilna visoka mikrobna aktivnost in mineralizacija organske snovi do CO_2 , ob kateri se je organsko vezan dušik mikrobno pretvarjal do raztopljenih anorganskih oblik; NH_4^+ , NO_2^- in NO_3^- . Očitno denitrifikacija v tleh v suhem poletju ni bila dominanten proces, ampak je nitrifikacija potekala hitreje, zato je količina nitrata s časom naraščala. Suhe poletne razmere so sicer zavirale sam proces denitrifikacije, vendar na število denitrifikatorjev (MPN) v tleh niso imele signifikantnega vpliva. Denitrifikacija je fakultativno anoksičen proces (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003; Paul in Clark, 1996), zato sklepamo, da so denitrifikatorji za respiracijo prednostno uporabljali O_2 . Ker nitrata niso uporabljali, je bila količina sintetiziranih denitrifikacijskih encimov (DEA) manjša, ocena velikosti združbe pa se ni spremenila. Iz tega sklepamo, da so denitrifikatorji, ki so v večini fakultativni anaerobni heterotrofi (Paul in Clark 1996), v suhih poletnih razmerah aktivni, vendar ne denitrificirajo.

Za poletja na Ljubljanskem barju so značilna tudi po več tednov trajajoča deževja (Repič, 2007), kar smo proučevali z inkubacijo tal v mikrokozmi B(90 % WHC, 28 °C). V obdobju treh tednov se je iz takih tal hitro porabil ves nitrat, DEA pa je skozi čas inkubacije naraščala. Glede na emisije CO_2 v razmerah vlažnega poletja, ki so bile enako visoke kot v razmerah suhega poletja, lahko sklepamo, da vsebnost vode v tleh Ljubljanskega barja signifikantno ne vpliva na hitrost razgradnje organske snovi. V razmerah vlažnega poletja se dostopnost kisika močno zmanjša, kar je razvidno iz porabe nitrata in vedno večje količine sintetiziranih denitrifikacijskih encimov (DEA) v prvih treh tednih, zato sklepamo, da se je nitrat porabljal kot alternativni elektronski akceptor za denitrifikacijo. Prav tako to potrjujejo visoke emisije N_2O v prvih treh tednih inkubacije tal

pri vlažnih poletnih razmerah. Tudi Azam in sod. (2002) navajajo, da večja dostopnost ogljika poveča mikrobno aktivnost, pri tem se v tleh intenzivno porablja O_2 s strani aerobnih mikroorganizmov, kar poveča anoksičnost tal in omogoči nastanek ugodnih razmer za denitrifikacijo.

Razmere vlažnega poletja, daljši od treh tednov, bi se v tleh poleti pojavili kot posledica renaturacije Ljubljanskega barja z dvigom podtalnice ali pa spomladi kot posledica globalnega segrevanja (Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005a; Kajfež-Bogataj in Bergant, 2005b). V takih razmerah se je do šestega tedna inkubacije nitrat iz tal popolnoma porabil (Resman, 2007), emisij N_2O ni bilo več, DEA je po šestih tednih inkubacije padla, v nadaljevanju inkubacije pa se je ustalila na vrednost, podobno vrednosti izpred treh tednov inkubacije. Pomanjkanje nitrata v tleh je verjetno predstavljalo nekakšen šok, ki so ga združbe denitrifikatorjev v nadaljevanju inkubacije nekako premostile, morda tudi z uporabo alternativnih elektronskih sprejemnikov. Ker DEA pozitivno korelira z dostopnostjo organske snovi (Paul in Clark, 1996), prav tako tudi emisije N_2O (Azam in sod., 2002; Morkved in sod., 2006), je možno, da je bil padec DEA po šestih tednih inkubacije tal mikokozmov B(90 % WHC, 28 °C) posledica trenutne nedostopnosti lahko razgradljivega organskega materiala. V nadaljevanju inkubacije se je slednji morda pojavil zaradi preklopa mikrobne združbe na druge tipe respiracij (npr. Fe^{3+}). V času inkubacije pri 28 °C je občasno prišlo tudi do manjših nihanj v številu denitrifikatorjev, za kar pa nimamo eksperimentalne razlage. Nitrat kot alternativni elektronski akceptor pri mikrobnih respiracijah se je po šestih tednih inkubacije pri razmerah vlažnega poletja v mikrokozmih B(90 % WHC, 28 °C) popolnoma porabil. Verjetno je po tem obdobju na razpolago ostalo malo drugih alternativnih elektronskih akceptorjev, saj je po sedmih tednih inkubacije že prišlo do emisij CH_4 (Slika 16 na str. 44), ki so trajale vse do konca sedemnajst-tedenske inkubacije tal pri razmerah vlažnega poletja. Ob emisijah CH_4 so do dvanajstega tedna inkubacije vseeno naraščale tudi talne emisije CO_2 , ki so bile v povprečju 2x višje od emisij CH_4 . Iz globljih slojev tal naj bi prihajalo več CH_4 , iz površinskih slojev tal pa več CO_2 in manj CH_4 (Hogg in sod., 1992, Francez in sod., 2000, Andersen in sod., 2006). Tla iz inkubacijske veje B(90 % WHC, 28 °C) so se po sedmih tednih inkubacije začela obnašati kot globlji sloji tal v naravi.

Peterjohn in sod. (1994) navajajo, da z vsebnostjo vode v gozdnih tleh emisije CO₂ linearno padajo, medtem ko Bowden in sod., (1998) ugotavljajo, da emisije CO₂ z vsebnostjo vode gozdnih tal naraščajo do 90 % WHC, pri višjih vsebnostih vode pa drastično padejo. Waddington in sod. (2004) so ugotovili, da je za emisije CO₂ iz šotnih tal optimalen 92 % WHC. V šotnih tleh Ljubljanskega barja smo ugotovili, da večmesečna izpostavljenost tal dvema naravnima ekstremoma vsebnosti vode v tleh ni vplivala na količino producirane CO₂ (Slika 15 na str. 43).

Encimska aktivnost je po osnovnih termodinamskih zakonitostih pri nižjih temperaturah nižja, saj je pri nižjih temperaturah sprememba proste energije (ΔG) kemijskih reakcij manj negativna, kar zmanjša spontanost kemijskih reakcij (Nelson in Cox, 2000), zato lahko sklepamo, da so mikrobni procesi pri nižjih temperaturah počasnejši, kar je splošno znano (Atlas in Bartha, 1998; Madigan in sod., 2003) in velja tudi za Ljubljansko barje. To smo dokazali z eksperimentom, pri katerem smo primerjali maksimalno denitrifikacijsko aktivnost svežih tal Ljubljanskega barja pri 4 °C in pri 28 °C (Slika 11 na str. 40). Pri istem številu sintetiziranih denitrifikacijskih encimov in v prebitku glukoze in nitrata v vzorcu svežih tal je bila denitrifikacijska encimska aktivnost pri 28 °C 25x višja od te aktivnosti pri 4 °C.

Tudi druge encimske aktivnosti v tleh so pri nižjih temperaturah nižje, zato je pri nižjih temperaturah nizka tudi splošna mikrobna aktivnost, ki jo zaznavamo preko emisij CO₂. Talne emisije CO₂ vzorcev pri 4 °C so bile v primerjavi z emisijami CO₂ pri 28 °C zelo nizke (Slika 15 na str. 43). Na splošno lahko emisije CO₂ s temperaturo celo eksponentno padajo (Raich in Schlesinger, 1992; Peterjohn in sod., 1994; Bowden in sod., 1998). Kljub temu, da je bila mikrobna aktivnost v tleh mikrokozmov C(45 % WHC, 4 °C) in D(90 % WHC, 4 °C) pri 4 °C nizka, se MPN denitrifikatorjev v tleh ni spremenil, DEA pa je s časom inkubacije naraščala ne glede na vsebnost vode v tleh in po dvanajstih tednih dosegla skoraj enake vrednosti kot DEA v razmerah vlažnega poletja B(90 % WHC, 28 °C). Zanimivo je, da vsebnost vode pri 4 °C ni vplivala na DEA, torej je bila količina sintetiziranih denitrifikacijskih encimov oz. potencialna denitrifikacijska aktivnost kljub nizki splošni mikrobni aktivnosti enako visoka.

V mikrokozmih C(45 % WHC, 4 °C) smo vzdrževali zimske razmere z nizko vsebnostjo vode, ki se v naravi vzpostavijo, kadar je nivo podtalnice nizek. Koncentraciji nitrata in nitrita sta skozi vso inkubacijo tal ostajali enaki (Resman, 2007), prav tako ni bilo zaznavnih emisij N_2O , CO_2 niti emisij CH_4 . Glede na nizko mikrobno aktivnost v tleh in nizko aktivnost denitrifikacijskih encimov pri 4 °C pa tudi glede na dejstvo, da denitrifikacija ponavadi poteče, če so tla navlažena nad 60 % WHC (Paul in Clark, 1998) sklepamo, da v suhih tleh pri 4 °C mikrokozmov C(45 % WHC, 4 °C) ni prihajalo do denitrifikacije v večji meri. Zato je še posebej zanimivo, da je bila DEA mikrokozmov C(45 % WHC, 4 °C) višja od DEA mikrokozmov A(45 % WHC, 28 °C) in podobna kot v mikrokozmi D(90 % WHC, 4 °C), kjer smo zaznali emisije N_2O . Obema vejama mikrokozmov A(45 % WHC, 28 °C) in C(45 % WHC, 4 °C) je bila skupna stalna prisotnost nitrata (Resman, 2007) in podobna dostopnost O_2 , razlikovali pa bi se lahko po dostopnosti organskega ogljika zaradi razlik v hitrosti metabolizma pri različnih temperaturah. Najverjetneje je v tleh mikrokozmov C(45 % WHC, 4 °C) na razpolago ostajalo več lahko dostopnega organskega materiala, kot v mikrokozmi A(45 % WHC, 28 °C). Paul in Clark (1998) povzemata, da je denitrifikacijski potencial odvisen od količine organskega materiala v tleh, še bolj pa korelira s količino lahko dostopnega organskega materiala, kar bi obrazložilo visoko DEA v mikrokozmi C(45 % WHC, 4 °C) v primerjavi z mikrokozmi A(45 % WHC, 28 °C).

Višja vsebnost vode v tleh pri 4 °C v mikrokozmi D(90 % WHC, 4 °C) je pozitivno vplivala na emisije N_2O , tako kot pri 28 °C, produkcija N_2O pa je trajala skozi vso inkubacijo tal mikrokozmov D(90 % WHC, 4 °C), kar ni bilo značilno za tla mikrokozmov B(90 % WHC, 28 °C). DEA tal mikrokozmov D(90 % WHC, 4 °C) je naraščala, medtem ko je NEA (potencialna nitrifikacijska encimska aktivnost) padala (Resman, 2007). Zato sklepamo, da so bile emisije N_2O pri 4 °C večinoma posledica denitrifikacije. Da so talne emisije N_2O pri nižjih temperaturah v veliki meri posledica denitrifikacije, so Morkved in sod., 2006 ugotovili z uporabo radioaktivno označenih oblik dušika.

Kljub temu, da smo ugotovili, da je bila pri 4 °C mikrobna aktivnost nizka, je v tleh mikrokozmov D(90 % WHC, 4 °C) koncentracija nitrata celo naraščala, vsota celokupnih emisij N₂O pa je presegala količino v tleh raztopljenega nitrata in nitrita. To pomeni, da je bilo doseženo neko dinamično ravnovesje, v katerem je nitrat v tleh nastajal in izginjal s podobno hitrostjo. Iz podatkov o Bunsenovih koeficientih pri različnih temperaturah je razvidno, da se O₂ pri 4 °C bolje raztaplja v vodni fazi tal, kot pri 28 °C, zato se v tleh pri 4 °C, tudi če so vlažna, vzpostavi več oksičnih con, v katerih bi lahko potekala nitrifikacija, s katero sta v tleh nastajala nitrat in nitrit.

Pojav višjih emisij N₂O kot posledica denitrifikacije pri nizkih temperaturah je poznan v različnih tleh. Z inkubacijo tal ob acetilenu in brez acetilena ter merjenju emisij N₂O pri različnih temperaturah se je na več po geografskem poreklu različnih vzorcih tal potrdilo, da so emisije N₂O pri nizkih temperaturah višje (Holtan-Hartwig in sod., 2002). Zaradi nizke mikrobne aktivnosti je v tleh ostajalo več lahko dostopnega organskega materiala in O₂ (Azam in sod., 2002). Reduktaza N₂O denitrifikatorjev je inhibirana pri nižjih koncentracijah O₂, kot ostali denitrifikacijski encimi (Knowles, 1982; Wrage in sod., 2001). Prisotnost nitrata in lahko dostopnega organskega ogljika skozi vso inkubacijo vlažnih tal pri 4 °C mikrokozmov D(90 % WHC, 4 °C) bi lahko bili vzrok za stalne emisije N₂O.

Šimek in sod. (2000) so ugotovili, da DEA ni v korelaciji z realnimi denitrifikacijskimi aktivnostmi, ampak odraža korelacijo z mikrobno biomaso in aktivnostjo v tleh, medtem ko Tiedje (1994) navaja, da DEA odraža okoljsko preteklost mesta vzorčenja in realne denitrifikacijske aktivnosti. Korelacije med DEA in mikrobno aktivnostjo, ocenjeno preko emisij CO₂ iz tal, nismo našli, smo pa opazili povezavo med nizkimi emisijami CO₂ pri 4 °C in nizko denitrifikacijsko aktivnostjo pri 4 °C v anoksičnih razmerah ob prisotnosti 5 mM glukoze in 5 mM nitrata. Povezavo med številom in aktivnostjo denitrifikatorjev v tleh ter ostalo mikrobno biomaso, ocenjeno s tehniko SIR (substratno inducirane respiracije) smo opazili po dvanajstih tednih inkubacije. SIR je bila pri vseh štirih inkubacijskih vejah tal približno enaka (Resman 2007), ravno tako so po dvanajstih tednih inkubacije DEA vseh štirih inkubacijskih vej tal v mikrokozmih bile podobne in prav tako se število denitrifikatorjev v tleh tekom različnih inkubacij tal ni spremenilo.

Emisije toplogrednega plina CO_2 v tleh Ljubljanskega barja so bile pri poletnih temperaturah višje, kot pri zimskih, medtem ko so bile emisije toplogrednega plina N_2O , ki ima 310x višji toplogredni potencial kot CO_2 (Baede in sod., 2001), prisotne v vlažnih tleh in višje pri zimskih temperaturah inkubacije. Samo iz vlažnih tal, inkubiranih pri poletnih temperaturah v mikrokozmih B(90 % WHC, 28 °C) je po sedmih tednih inkubacije prišlo še do emisij CH_4 , ki ima 23x višji toplogredni potencial od CO_2 (Baede in sod., 2001). Kljub temu, da so tako suha kot vlažna tla Ljubljanskega barja pri 28 °C v mikrokozmih A(45 % WHC, 28 °C) in B(90 % WHC, 28 °C) proizvajala enako količino toplogrednega plina CO_2 , so imela vlažna tla mikrokozmov B(90 % WHC, 28 °C) do 10x višji toplogredni potencial predvsem na račun emisij N_2O v prvih treh tednih inkubacije tal. Najvišji toplogredni učinek, ki je bil posledica stalnih emisij N_2O , so imela tla, ki smo jih inkubirali pri tipičnih zimskih razmerah na Ljubljanskem barju v mikrokozmih D(90 % WHC, 4 °C).

Ob poletnih padavinah lahko vsebnost vode v tleh na Ljubljanskem barju naraste iz 45 % WHC na 90 % WHC (Repič, 2007), podobno, kot se je zgodilo v mikrokozmih B(90 % WHC, 28 °C) takoj po predinkubaciji. Visoka vsebnost vode (pojav anoksičnih con v tleh), prisotnost NO_3^- in dostopnost organskega ogljika so povzročili visoke emisije N_2O dokler se ves NO_3^- (Resman, 2007) v tleh ni porabil. Glede na to, da od tretjega do sedemnajstega tedna inkubacije emisij N_2O ni bilo več, sklepamo, da bi bil poletni doprinos k globalnemu segrevanju ob stalni poplavljenosti Ljubljanskega barja, npr. ob dvigu podtalnice (renaturaciji), manjši, prav tako pa bi te razmere inhibirale pronicanje nitrata v globlje sloje tal oz. v podtalnico.

Strukture mikrobnih združb denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja iz objektivnih razlogov nismo uspeli opazovati. Med pripravami na eksperiment z mikrokozmi smo se posvečali optimizaciji metod za merjenje obsega in aktivnosti združb denitrifikatorjev. Med samim inkubacijskim eksperimentom zaradi izvedenega obsega dela nismo uspeli proučiti strukture mikrobnih združb. Vzorce tal inkubiranih mikrokozmov, ki smo jih ob vsakem razdiranju sproti shranjevali na -20 °C, je vzporedno analizirala dr. Mirna Mrknonijć Fuka. Rezultati njenih analiz so pokazali, da se profili T-RFLP bakterijskih, arhejskih in denitrifikacijskih (*nosZ*) združb, inkubiranih pri različnih razmerah- A(45 % WHC, 28 °C), B(90 % WHC, 28 °C), C(45 % WHC, 4 °C) in D(90 % WHC, 4 °C)- ob koncu inkubacije medsebojno niso signifikantno razlikovali (>90 % podobnost) (Stres in sod., 2007).

5.1 SKLEPI

- Denitrifikatorji v tleh Ljubljanskega barja so zelo dobro prilagojeni na ekstremne razmere, kot so daljša izpostavljenost suši in nizkim temperaturam, saj se velikost populacije tudi v razmerah, neugodnih za denitrifikacijo, večinoma signifikantno ni spremenila. Tako smo ovrgli hipotezo, da temperatura in vsebnost vode v tleh vplivata na obseg združbe denitrifikatorjev.
- Pri temperaturi 28 °C je bil denitrifikacijski potencial (DEA) po 12. tednih inkubacije v suhih tleh (45 % WHC) signifikantno nižji od denitrifikacijskega potenciala vlažnih tal (90 % WHC). Pri nižji temperaturi inkubacije (4 °C) ni bilo razlik v denitrifikacijskem potencialu suhih (45 % WHC) in vlažnih (90 % WHC) tal Ljubljanskega barja, kar ni bilo v skladu z našimi pričakovanji.
- Največji toplogredni učinek so imela tla v zimskih razmerah z visoko vsebnostjo vode (90 % WHC, 4 °C), predvsem na račun stalne produkcije N₂O, kar delno ovrže hipotezo, da naj bi bile emisije toplogrednih plinov CO₂, CH₄ in N₂O višje pri višji temperaturi (28 °C) inkubacije tal.
- Mikrobna aktivnost v tleh Ljubljanskega barja, ocenjena preko emisij CO₂, je neodvisna od vsebnosti vode v tleh, je pa močno regulirana s temperaturo tal.
- Le pri razmerah inkubacije tal v razmerah vlažnega poletja (90 % WHC, 28 °C) smo po sedmih tednih inkubacije zaznali emisije CH₄, ki so trajale vse do konca 12 tedenske inkubacije.
- Kljub statistično signifikantni razliki med ocenama obsega združbe denitrifikatorjev, pridobljenima z epruvetami Hungate in na mikrotitrskih ploščah, je iz vidika mikrobne ekologije z uporabo mikrotitrskih plošč mogoče zadovoljivo opisati obseg združbe denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja.

6 POVZETEK

V tem diplomskem delu smo izvajali eksperiment z mikrokozmi, pripravljenimi iz tal Ljubljanskega barja, pri katerem smo proučevali vplive dveh temperatur; nizke (4 °C) in visoke (28 °C), ter dveh vsebnosti vode; nizke (45 % WHC) in visoke (90 % WHC); na obseg in aktivnost združbe denitrifikatorjev. Ob tem smo merili emisije treh toplogrednih plinov; CH₄, CO₂ in N₂O in ugotavljali, katera od štirih kombinacij vodnega in temperaturnega režima ima največji toplogredni učinek. Strukturo združbe denitrifikatorjev ob posameznih vzorčenjih tal pri istem eksperimentu je analizirala dr. Mirna Mrkonlič-Fuka.

Glede na to, da je denitrifikacija negativno regulirana predvsem s prisotnostjo O₂ v okolju, ki je odvisna od vsebnosti vode v tleh, smo predpostavili, da se bo talna mikrobna združba na spremembe okolja odzvala s spremembami v aktivnosti in velikosti, ki naj bi se odražale v emisijah toplogrednih plinov (CO₂, CH₄ in N₂O), številu denitrifikatorjev (MPN) in potencialni denitrifikacijski encimski aktivnosti (DEA). Pričakovali smo, da bosta nižja temperatura in nižja vsebnost vode v tleh negativno vplivali tako na število in aktivnost denitrifikatorjev, kot tudi na emisije CH₄, CO₂ in N₂O. Prav tako naj bi se inkubacija tal pri različnih razmerah vplivala na strukturo združbe denitrifikatorjev.

Homogenizirana organska tla iz eksperimentalnega polja v Tomišlju na Ljubljanskem barju so se po 12 dnevni predinkubaciji 17 tednov inkubirala v mikrokozmi pri štirih različnih razmerah; A(45 % WHC, 28 °C)- suho poletje, B(90 % WHC, 28 °C)- vlažno poletje, C(45 % WHC, 4 °C)- suha zima in D(90 % WHC, 4 °C)- vlažna zima. Razmere vlažnega poletja in suhe zime sta redna sezonska ekstrema, ki se v naravi pojavita za krajše obdobje (nekaj tednov). Med inkubacijo smo prvih 12 tednov na tri tedne ugotavljali število in aktivnost denitrifikatorjev v tleh in vseh 17 tednov enkrat tedensko merili emisije toplogrednih plinov.

Obseg združbe denitrifikatorjev smo ugotavljali z dvema izvedbama metode najbolj verjetnega števila celic (MPN); na mikrotitrskih ploščah in v epruvetah Hungate. Za ugotavljanje obsega združbe denitrifikatorjev je primernejša metoda v epruvetah Hungate,

vendar smo tudi z mikrotitrskimi ploščami dobili zadovoljive rezultate. Potencialno aktivnost združbe denitrifikatorjev (DEA- denitrifikacijska encimska aktivnost) smo ugotavljali z metodo po Tiedje, 1994 brez dodatka kloramfenikola. Metodo je bilo potrebno za tla Ljubljanskega barja optimizirati. Emisije toplogrednih plinov smo merili s plinsko kromatografijo iz mikrokozmov, ki smo jih za 90 min zaprli s pokrovom, skozi katerega je bilo možno jemati vzorce plinske faze.

Ugotovili smo, da je obseg združbe denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja neodvisen od vsebnosti vode v tleh in temperature inkubacije tal, medtem ko so se potencialne denitrifikacijske encimske aktivnosti odzivale na dejavnike okolja. Emisije N_2O so bile po pričakovanjih višje v tleh z višjo vsebnostjo vode (pri 90 % WHC). Pri inkubacijski veji mikrokozmov B(90 % WHC, 28 °C) so emisije N_2O trajale prvih 5 tednov inkubacije, nato pa so padle. Tla, inkubirana v razmerah D(90 % WHC, 4 °C) so med inkubacijo proizvedla največ N_2O in so na račun emisij N_2O imela najvišji toplogredni učinek. Emisije CO_2 so bile neodvisne od vsebnosti vode v tleh, vendar mnogo višje pri 28 °C, kot pri 4 °C. Emisije CH_4 so se pojavile samo v tleh, ki so se inkubirala pri 90 % WHC in 28 °C.

Na eksperimentalnem polju pred eksperimentom in v laboratoriju, v času eksperimenta, v tla Ljubljanskega barja nismo dodajali umetnih gnojil, iz tal pa je bila odstranjena s prostim očesom vidna rastlinska in živalska biomasa, zato so bile emisije toplogrednih plinov in z njimi povezan toplogredni učinek izključno posledica mikrobne aktivnosti, predvsem denitrifikacijske. Visok toplogredni potencial tal Ljubljanskega barja v zimskih razmerah z visoko vsebnostjo vode torej ni bil posledica človekove aktivnosti.

7 VIRI

Andersen R., Francez A-J., Rochefort L. 2006. The physicochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1375-1387

ARSO- Agencija Republike Slovenije za okolje. 2007a. Padavine Črna vas. Ljubljana, ARSO- Agencija Republike Slovenije za okolje.
http://www.arso.gov.si/cd/izbrani_meteo_podatki/padavine/P195.html (maj 2007): 1 str.

ARSO- Agencija Republike Slovenije za okolje. 2007b. Temperaturna postaja Ljubljana-Bežigrad. Ljubljana, ARSO- Agencija Republike Slovenije za Okolje.
http://www.arso.gov.si/cd/izbrani_meteo_podatki/klima/P192.html (maj 2007):1 str.

Atlas R.M., Bartha R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4thed. Menlo Park, California, Addison Wesley Longman Limited: 414-417

Avrahami S., Conrad R., Braker G. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5685-5692

Azam F., Müller C., Weiske A., Benckiser G. 2002. Nitrification and denitrification as sources of atmospheric nitrous oxide - role of oxidizable carbon and applied nitrogen. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 54-61

Baede A.P.M., Ahlonsou E., Ding Y., Schimel S. 2001. The climate system V: Climate change 2001: Working group I: The Scientific Basis: The climate system overview. Bolin B., Pollonais S.(ed). Geneva (Switzerland), IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change. http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/040.htm (maj 2007): 3 str.

Bauer A., Black A. 1992. Organic carbon effects on available water capacity of three soil textural groups. *Soil Science Society of America Journal*, 56: 248-254

Bleakley B.H., Tiedje J.M. 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1342-1348

Blodgett R. 2006. Bacteriological analytical manual online: most probable number from serial dilutions. Rockville, United States, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> (maj 2007):13 str.

Bollmann A., Conrad R. 1997. Enhancement by acetylene of the decomposition of nitric oxide in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1057-1066

Boyle S.A., Rich J.J., Bottomley P.J., Cromack K.Jr., Myrold D.D. 2006. Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 870-878

Bowden R.D., Newkirk K.M., Rullo G.M. 1998. Carbon dioxide and methane fluxes by a forest soil under laboratory-controlled moisture and temperature conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1591-1597.

Carter M.R. 2002. Soil quality for sustainable land management: Organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agronomy Journal*, 94: 38-47

Cavigelli M.A., Robertson G.P. 2001. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 297-310

Cheneby D., Philippot L., Hartmann A., Henault C., Germon J.C. 2000. 16SrDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 34: 121-128

Cole J.A., Brown C.M. 1980. Nitrite reduction to ammonium by fermentative bacteria: A short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters* 7: 65-72. Cit. po: Tiedje J.M. 1994. Denitrifiers. V: *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties*. Weaver R.W. (ed.). Madison, Soil Science Society of America: 245-267

Čeak B. 2005. Ljubljansko barje – Ekorina vrnitev. *Gea*, 3: 14-21

Fazzolari E., Nicolardot B., Germon J.C. 1998. Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in repacked soil cores. *European Journal of Soil Biology*, 34: 47-52

Francez A.J., Gogo S., Josselin N. 2000. Distribution of potential CO₂ and CH₄ productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany. *European Journal of Soil Biology*, 36: 161-168

Franzluebbers A.J. 2002. Water infiltration and soil structure related to organic matter and its stratification with depth. *Soil & Tillage Research*, 66: 197-205

Gonzalez-Prieto S. J., Villar M. C. 2003. Soil organic N dynamics and stand quality in *Pinus radiata* pinewoods of the temperate humid region. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1395-1404

Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to organic matter content and watertable level. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 503-509

Hacin J., Čop J., Železnik B., Jamnik B. 2004. Opredelitev vodnega režima v bodočem krajinskem parku Ljubljansko barje. Raziskovalni projekt. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 45 str.

Henry S., Baudoin E., Lopez-Gutierrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 327–335

Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK* and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5181-5189

Hogg E.H., Lieffers V.J., Wein R.W. 1992. Potential carbon losses from peat profiles: effects of temperature, drought cycles, and fire. *Ecological Applications*, 2: 298-306

Holtan-Hartwig L., Dorsch P., Bakken L.R. 2002. Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N₂O production and reduction. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1797–1806

Kajfež-Bogataj L., Bergant K. 2005b. Kakšno bo podnebje v Sloveniji v tem stoletju. *Ujma*, 19: 218-223

Kajfež-Bogataj L., Bergant K. 2005a. Podnebne spremembe v Sloveniji in suša. *Ujma*, 19: 37-41

Knowles R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46: 43-70

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 91-143

Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., Van Elsas J.D., Mandić-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2762-2771

Kucera C.L., Kirkham R.D. 1971. Soil respiration studies in tallgrass prairie in Missouri. *Ecology*, 52: 912-915

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New York, Pearson Education: 1019 str.

Mahne I., Tiedje J.M. 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1110-1115

Morkved P.T., Dorsch P., Henriksen T.M., Bakken L.R. 2006. N₂O emissions and product ratios of nitrification and denitrification as affected by freezing and thawing. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 3411–3420

Morkved P.T., Dorsch P., Bakken L.R. 2007. The N₂O product ratio of nitrification and its dependance on long-term changes in soil pH. *Soil Biology and Biochemistry*: online maj 2007

Nelson D.L., Cox M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth publishers: 249-249

Parton W.J., Scarlock M.O., Ojima D.S., Gilmanov T.G., Scholes R.J., Schimel D.S., Kirchner, T., Moya E.G., Kamnalrut A., Kinyamario J.I. 1993. Observations and modeling of biomass and soil organic-matter dynamics for the grassland biome worldwide. Global Biogeochemical Cycles, 7: 785-809

Paul E.A., Clark F.E. 1996. Soil microbiology and biochemistry. 2nd ed. London, Academic Press: 25, 199-215

Perko D., Orožen Adamič M. 1998. Slovenija: pokrajine in ljudje. Ljubljana, Mladinska knjiga: 736 str.

Peterjohn T.W., Melillo M.J., Steudler A.P., Newkirk K.M., Bowles P.F., Aber D.J. 1994. Responses of trace gas fluxes and N availability to experimentally elevated soil temperatures. Ecological Applications, 4: 617-625

MOL- Mestna Občina Ljubljana. 2005. Podnebje. Ljubljana, Mestna Občina Ljubljana.
<http://www.ljubljana-tourism.si/si/turizem/splosno/vreme/podnebje/default.html>
(maj 2007): 1 str.

Premelč M. 2006. Strokovna podlaga predlaganega krajinskega parka Ljubljansko barje. Diplomsko delo. Ljubljana, Filozofska Fakulteta, Oddelek za geografijo: 71str.

Raich J.W., Schlesinger W.H. 1992. The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. Chemical and Physical Meteorology, 44B: 81-99

Resman. L., 2007. Diplomsko delo. Vpliv dejavnikov okolja na dinamiko nitrifikatorjev in na emisije toplogrednih plinov v mikrokozmi tal Ljubljanskega barja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 62 str.

Repič D. 2007. Aktivnost in številčnost mikrobnih združb v različnih globinah tal. Diplomsko delo v pripravi. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije.

Stopar, D., Stres B., Mahne I. 2006. Praktikum iz mikrobne ekologije. Laboratorijske vaje za mikrobiologe. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. <http://www.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/kompendijekologi2004.pdf> (maj 2007) 71 str.

Stres B., Mahne I., Avguštin G., Tiedje J.M. 2004. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. Applied and Environmental Microbiology, 70: 301-309

Stres B., Mrkonjić-Fuka M., Danevčič T., Pal L., Resman L., Leskovec S., Mandić-Mulec I. 2007. Impact of temperature and water- content on the activity, abundance and diversity

of soil nitrifying and denitrifying bacteria in a drained Ljubljana marsh grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*. Članek v pripravi.

Šimek M., Cooper J.E., Picek T., Šantručkova H. 2000. Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 101-110

Tiedje J.M. 1994. Denitrifiers. V: *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties*. Weaver R.W. (ed.). Madison, Soil Science Society of America: 245–267

Tiedje, J.M., Sextone A.J., Myrold D.D., Robinson J.A. 1982. Denitrification: Ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 569-583

Tome D. 2000. Pogoji naravovarsveno in/ali ekonomsko sprejemljive košnje travnikov na Ljubljanskem barju. Ljubljana, Nacionalni Inštitut za Biologijo: 51 str.

Waddington J.M., Rotenberg P.A., Warren F.J. 2004. Peat CO₂ production in a natural and cutover peatland: Implications for restoration. *Biogeochemistry* 54: 115-130

Wrage N., Velthof G.L., van Beusichem M.L., Oenema. O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 1723-1732

Wrage N., Velthof G.L., Oenema. O., Laanbroek H.J. 2004. Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira briensis*: a cautionary tale. *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 13-18.

Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 533-616

Zupanc B. 2006. Ljubljansko barje – krajinski park. Ljubljana: Glasilo Mestne občine Ljubljana, 11, 3: 29-30

ZAHVALE:

V ZVEZI Z NASTAJANJEM TEGA DIPLOMSKEGA DELA SE ZAHVALJUJEM

prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za organizacijo, podporo, dobre predloge, prijaznost in skrb pri delu,

dr. Blažu Stresu, za zastavitev eksperimenta in potrpežljivo razkrivanje teoretičnih, praktičnih in računskih ozadij, ki vodijo do rezultatov,

dr. Tjaši Danevčič za vse, kar se tiče plinske kromatografije, na kateri je bila osnovana velika večina meritev,

Simoni Leskovec za materiale in en kup koristnih praktičnih nasvetov pri delu,

Lari Resman, da nama je uspelo,

vsem ostalim iz Katedre za mikrobiologijo, Oddelka za Živilstvo, za dobro družbo v laboratoriju,

odličnim pedagogom in mikrobnim ekologom iz Biotehnične fakultete, med katere sodijo tudi **prof. dr. David Stopar** (predsednik komisije za to diplomsko delo), **prof. dr. Gorazd Avguštin** (recenzent), **prof. dr. Ines Mandić-Mulec** (mentorica) in **dr. Blaž Stres** (somentor),

Petru Palu za lektoriranje diplomske naloge,

Petri Pivk za večkratno nesebično pomoč pri delu in

Goranu Žlahtiču za izdelavo posebnega ventilatorja za sušenje tal v mikrokozmi.

V ZVEZI Z OSTALIM SEM HVALEŽEN

mami **Tončki**, očetu **Petru**, sestri **Evi**, moji number one ženi **Aniti**,

vsem **prijateljem, sorodnim dušam in sorodnikom.**

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Levin Pal

**MIKROBNA AKTIVNOST IN STRUKTURA
DENITRIFIKATORJEV V TLEH LJUBLJANSKEGA
BARJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE