

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Doroteja REPIČ

**AKTIVNOST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNE ZDRUŽBE V
RAZLIČNIH GLOBINAH BARJANSKIH TAL**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ACTIVITY AND ABUNDANCE OF MICROBIAL COMMUNITY IN
DIFFERENT DEPTHS OF PEAT-LAND SOIL**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije iz dne 16. 6. 2006 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. David Stopar.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspor
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 zootehniko

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podatke za vsebnost vode v tleh, ki smo jih uporabili sta izmerila dr. Blaž Stres in Peter Korpar.

Doroteja Repič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 631.46+579.26(043)=163.6
KG mikrobiologija tal/mokrišča/tla/Ljubljansko barje/mikrobne združbe/vsebnost vode v tleh/mikrokozmi/sposobnost zadrževanja vode/WHC/število mikroorganizmov/mikrobna aktivnost /s substratom inducirana respiracija/SIR/dehidrogenazna aktivnost/DHA
AV REPIČ, Doroteja
SA MANDIČ-MULEC, Ines (mentorica)/STRES, Blaž (somentor)/STOPAR, David (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN AKTIVNOST IN ŠTEVILČNOST MIKROBNE ZDRUŽBE V RAZLIČNIH GLOBINAH BARJANSKIH TAL
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 59 str., 1 pregl., 19 sl., 70 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Barja so mokrišča z visoko biološko raznolikostjo, so naravne čistilne naprave za tla in vodo, zadrževalniki odvečne vode in področja, ki zaradi zastajanja vode, akumulirajo organsko snov. Zaradi izkoriščanja v kmetijske namene so to ogroženi ekosistemi, katere danes v številnih državah skušajo ohraniti ali obnoviti. Podoben trend velja za slovensko Ljubljansko barje. Poskusno polje na Ljubljanskem barju je na območju z ohranjeno šoto, ki sega do globine treh metrov in z dvema tipoma šotnih tal, ki se razlikujeta po vsebnosti organske snovi (HC- visokoorganska; in LC-nizkoorganska). V okviru diplomske naloge smo uporabili podatke meritev vsebnosti vode v talnem profilu Ljubljanskega barja od avgusta 2005 do avgusta 2006. Vsebnost vode v zgornjih slojih HC in LC tal se je razlikovala predvsem v območju med 40 in 70 cm, kjer je bila gostota tal različna in so bila LC tla bolj suha kot HC tla. Na vsebnost vode v različnih slojih barjanskih tal je vplivala vsebnost organske snovi in nivo podtalnice in sicer je bila korelacija pozitivna v obeh primerih. Šotna tla tipa HC iz treh različnih globin (0 – 30 cm, 100 – 120 cm, 140 – 160 cm) smo inkubirali 156 dni pri različnih temperaturi (sobna T:20-22 °C in 4 °C) in pri različni vsebnosti vode v tleh (100 % WHC in 75 % WHC). Število mikroorganizmov smo določili s štetjem pod epifluorescenčnim mikroskopom, njihovo aktivnost smo spremljali z metodama s substratom inducirane respiracije (SIR) in z dehidrogenazno aktivnostjo (DHA). Število mikroorganizmov se med inkubacijskim poskusom ni signifikantno spreminjalo in je nihalo med 2×10^6 in 6×10^6 . Število v spodnjih slojih je bilo nižje ne glede na čas inkubacije. SIR in DHA sta bili največji v zgornjem sloju (0 – 30 cm), medtem ko so bile vrednosti v spodnjih slojih nižje. SIR je pri 100 % WHC s časom upadel, DHA pa narasel. Pri nizki temperaturi (4 °C) inkubacije se je število celic spreminjalo le znotraj enega velikostnega reda. Aerobna aktivnost (SIR) se je zmanjšala, anaerobna (DHA) pa povečala. Sezonskih sprememb v številu celic nismo ugotovili. Septembra je bila v primerjavi z marcem aerobna aktivnost manjša, anaerobna pa večja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 631.46+579.26(043)=163.6
CX soil microbiology/wetlands/soil/Ljubljana Marsh/microbial community/soil water content/microcosms/water holding capacity/WHC/number of microorganisms/microbial activity/substrate induced respiration/SIR/dehydrogenase activity/DHA
AU REPIČ, Doroteja
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/ STRES, Blaž (co-advisor), STOPAR, David (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI ACTIVITY AND ABUNDANCE OF MICROBIAL COMMUNITY IN DIFFERENT DEPTHS OF PEAT-LAND SOIL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 59 p., 1 tab., 19 fig., 70 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Peat-lands are wetlands of high biological diversity, natural treatment plants for soils and water, access water containers and areas of accumulation of organic matter due to water logging. They became endangered ecosystems due to exploitation for the agricultural purposes and are nowadays being restored. A similar trend applies for the Ljubljana Marsh. The experimental field on Ljubljana Marsh is in an area of preserved peat up to three meters deep and encompasses two types of peat soil differing in organic matter content (HC – high organic and LC – low organic). In this thesis we analyzed measurements of water content in the soil profile of Ljubljana Marsh collected from August 2005 to August 2006. Water content in the top layers of HC and LC soils differed in the depth from 40 to 70 cm, where the types of soils differed in their bulk density and the LC soil was drier than HC soil. The water content in different layers of peat-land soil is influenced by organic matter content and the water table level. The correlation was positive in both cases. The HC type of peat soil from three different depths (0 – 30 cm, 100 – 120 cm, 140 – 160 cm) was incubated for 156 days at different temperatures (room T:20-22°C and 4 °C) and at two different water contents (100 % WHC and 75 % WHC). The number of microorganisms was counted under epifluorescent microscope and their activity was measured by methods of substrate induced respiration (SIR) and dehydrogenase activity (DHA). The number of microorganisms did not change significantly during the incubation and fluctuated between 2×10^6 in 6×10^6 . The numbers in the bottom layers were lower at all times. SIR and DHA were higher in the upper layer (0 – 30 cm) compared to the bottom layers. SIR of the upper layer at 100 %WHC decreased with time and DHA increased. At low temperature (4 °C) the number of microorganisms changed inside one order of magnitude the aerobic activity (SIR) increased and the anaerobic (DHA) decreased. There were no seasonal changes in the number of microorganisms the aerobic activity was lower and the anaerobic activity was higher in September than in March.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1. NAMEN.....	2
1.2. HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MOKRIŠČA	3
2.1.1 Šotno barje	5
2.1.2 Šota.....	5
2.1.3 Ljubljansko barje	6
2.1.4 Poskusno polje.....	8
2.2 MIKROBIOLOGIJA TAL	10
2.2.1 Vzorčenje tal	11
2.2.2 Lastnosti tal.....	12
2.2.3 Mikroorganizmi v tleh.....	15
3 METODE IN MATERIALI	19
3.1 MERITVE VSEBNOSTI VODE V TLEH VZDOLŽ PROFILA VISOKOORGANSKIH (HC) IN NIZKOORGANSKIH (LC) TAL.....	19
3.2 EKSPERIMENTALNO POLJE IN VZORČENJE TAL	19
3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL.....	20
3.3.1 Vlažnost tal.....	20
3.3.2 Sposobnost zadrževanja vode v tleh.....	20
3.3.3 pH.....	20
3.4 POTEK INKUBACIJSKEGA POSKUSA.....	21
3.5 ŠTEVILO IN AKTIVNOST MIKROORGANIZMOV V TLEH.....	23
3.3.1 Štetje mikroorganizmov pod epifluorescenčnim mikroskopom	23

3.3.2 S substratom inducirana respiracija (SIR)	23
3.3.3 Dehidrogenazna aktivnost (DHA)	24
3.4 MATERIALI	25
4 REZULTATI	27
4.1 ANALIZA PODATKOV SEZONSKEGA NIHANJA VSEBNOSTI VODE V TLEH V TALNEM PROFILU DVEH TIPOV TAL LJUBLJANSKEGA BARJA	27
4.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PROFILA HC TAL LJUBLJANSKEGA BARJA.....	30
4.3 DINAMIKA ŠTEVILA IN AKTIVNOSTI MIKROORGANIZMOV V PROFILU VISOKOORGANSKIH (HC) TAL LJUBLJANSKEGA BARJA MED INKUBACIJO PRI SOBNI TEMPERATURI IN PRI ZASIČENOSTI Z VODO	31
4.3.1 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na število mikroorganizmov v različnih slojih barjanskih tal	31
4.3.2 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na število mikroorganizmov v različnih slojih tal Ljubljanskega barja	33
4.3.3 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na mikrobnost aktivnost v različnih slojih barjanskih tal merjen z metodo s substratom inducirane respiracije (SIR)	34
4.3.4 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na aktivnost mikroorganizmov merjeno s SIR v različnih slojih tal Ljubljanskega barja	35
4.3.5 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na dehidrogenazno aktivnost (DHA) v različnih slojih barjanskih tal	36
4.3.6 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na aktivnost mikroorganizmov merjeno z DHA v različnih slojih tal Ljubljanskega barja	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1 RAZPRAVA.....	38
5.2 SKLEPI.....	45
6 POVZETEK	47
7 VIRI	49
ZAHVALA	58

KAZALO PREGLEDNIC

	STR.
Preglednica 1: pH, temperatura, vlažnost in WHC tal za različne globine barjanskih tal v dveh časih vzorčenja	31

KAZALO SLIK

	STR.
Slika 1: Šotni mah <i>Sphagnum</i> (Quinty in Rochefort, 2003.)	6
Slika 2: Gostota HC in LC tal na različnih globinah tal Ljubljanskega barja (Stres in Korpar, 2006a)	9
Slika 3: Nivo podtalnice v visokoorganskih (HC) in nizkoorganskih (LC) tleh Ljubljanskega barja merjen od avgusta 2005 do septembra 2006 (Hacin, 2006)	9
Slika 4: Mesečna količina padavin in povprečna mesečna temperature od avgusta 2005 do septembra 2006 izmerjeni na meteorološki postaji Ljubljana-Bežigrad (SURS, 2007a; SURS, 2007b)	10
Slika 5: Cev vstavljena v barjanska tla do globine 160 cm na poskusnem polju v Tomišlju (Stres, 2008)	15
Slika 6: Redukcija TTC v TTF (V and V Pharma Industries, 2006)	18
Slika 7: Shematični prikaz poteka poskusa	22
Slika 8: Odvisnost absorbance rztopine TTF v acetonu od njene koncentracije	25
Slika 9: Vlažnost HC tal skozi profil barjanskih tal v obdobju od septembra 2005 do septembra 2006 merjena z Diviner 2000	27
Slika 10: Vlažnost LC tal skozi profil barjanskih tal v obdobju od septembra 2005 do septembra 2006 merjena z Diviner 2000	28
Slika 11: Volumetrična vsebnost vode v odvisnosti od nivoja podtalnice za različne globine HC barjanskih tal merjena z napravo Diviner 2000 (Podatki: Stres in Korpar, 2006b; Hacin, 2006)	29
Slika 12: Volumetrična vsebnost vode v odvisnosti od nivoja podtalnice za različne globine HC barjanskih tal merjena z napravo Diviner 2000 (Podatki: Stres in Korpar, 2006b; Hacin, 2006)	29
Slika 13: Primerjava volumetrične vsebnosti vode merjene skozi leto v LC in HC tleh za različne globine barjanskih tal (Podatki: Stres in Korpar, 2006b)	30

- Slika 14:** Sprememba števila celic v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi pri različnih globinah barjanskih tal 32
- Slika 15:** Število celic v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi s številom celic v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C 33
- Slika 16:** Sprememba mikrobne aktivnosti merjene s SIR v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi, pri različnih globinah barjanskih tal 34
- Slika 17:** Mikrobna aktivnost merjena s SIR v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi mikrobno aktivnostjo merjeno s SIR v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C 35
- Slika 18:** Sprememba mikrobne aktivnosti merjene z DHA v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi, pri različnih globinah barjanskih tal 36
- Slika 19:** Mikrobna aktivnost merjena z DHA v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi mikrobno aktivnostjo merjeno z DHA v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C 37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DHA – dehidrogenazna aktivnost (angl.: DeHydrogenase Activity)

HC – visokoorganski (angl.: High Carbon)

LC – nizkoorganski (angl.: Low Carbon)

SIR – s substratom inducirana respiracija (angl.: Substrate Induced Respiration)

TKN – celotni dušik po Kjeldahlu (angl.: Total Kjeldahl Nitrogen)

TTC – 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (angl.: Triphenil Tetrazolium Chlorid)

TTF – 2,3,5-trifeniltetrazolium formazan (angl.: Triphenil Tetrazolium Formazan)

WHC – sposobnost zadrževanja vode (angl.: Water Holding Capacity)

1 UVOD

Barja so mokrišča z visoko biološko raznolikostjo in s pomembnimi naravnimi funkcijami, kot so: čiščenje vode, skladiščenje organskega C, shranjevanje vode (Bragg, 2002). To so specifični ekosistemi, kjer je zaradi zastajanja vode produkcija biomase večja od razgradnje kar vodi do akumulacije organske snovi (Moore, 1995).

Ljubljansko barje je najjužneje ležeče nizko barje v Evropi. Tla Ljubljanskega barja so organsko zelo bogata in večinoma vsebujejo šoto (Martinčič, 2003). V preteklosti je Ljubljansko barje utrpelo veliko škode, s kopanjem kanalov za odtok vode tla osušili, tako da je barje nehalo nastajati. Vse to pa je dodatno spremljalo še požiganje površinskih plasti za pridobivanje obdelovalnih površin in obsežno rezanje šote za kurjavo.

Zaradi prej omenjenih pomembnih lastnosti barij so postala nekatera propadajoča barja del programov obnavljanja. Tudi Ljubljansko barje, ki je v sklopu varovanih območij Natura 2000, je postalo tarča raziskav z namenom ohranjanja oziroma obnove tega ekosistema. Najpogostejši način obnove barij je dvig podtalnice, ki omogoči vzpostavitev anaerobnih pogojev in zmanjša hitrost razgradnje organskega materiala. Ker so bila barja največkrat uporabljena za kmetijske namene, lahko takšni ukrepi povzročijo veliko škodo s spiranjem nitratov in fosfatov v podtalnico. Zato je potrebno ugotoviti kateri procesi potekajo v tem ekosistemu in kako bodo naša dejanja nanje vplivala.

Najpomembnejši vpliv na biološke, fizikalne in kemijske lastnosti tal imajo mikroorganizmi s svojim metabolizmom (Madigan, 2000). Kljub dejstvu, da so ravno mikroorganizmi glavni dejavniki razgradnje organske snovi, se o njihovi aktivnosti in številu v profilu tal Ljubljanskega barja ve zelo malo. Zato smo se v tem diplomskem delu osredotočili na merjenje aktivnosti mikroorganizmov na različnih globinah barjanskih tal ter skušali ugotoviti kako nanjo vpliva sprememba temperature in vlažnosti.

1.1. NAMEN

Mikrobnae biomasa vzdolž talnega profila Ljubljanskega barja do sedaj še ni bila preučevana. Namen naše diplomske naloge je bil ugotoviti aktivnost in številčnost mikroorganizmov v reprezentativnih vzorcih talnega profila Ljubljanskega barja ter vpliv temperature in vsebnosti vode nanje. Hkrati smo želeli prikazati tudi podatke o vsebnosti vode na različnih globinah tal Ljubljanskega barja za obdobje enega leta.

1.2. HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- Vsebnost vode v barjanskih tleh se bo z globino večala ter bo odvisna od vremenskih razmer in nivoja podtalnice.
- Število mikroorganizmov se bo z globino manjšalo in se med inkubacijo ne bo signifikantno spreminjalo.
- Mikrobna aktivnost tal se bo vzdolž profila tal manjšala in se med inkubacijo ne bo signifikantno spreminjala.
- Z nasičenjem z vodo se bo mikrobna aktivnost zgornjega sloja tal zmanjšala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MOKRIŠČA

Mokrišča so okolja na prehodu med popolnoma kopenskim in popolnoma vodnim ekosistemom (Mitsch in Gosselink, 2000). Prevladujoč faktor, ki določa naravo razvoja tal, rastlin in živali, ki živijo na tej površini, je zastajajoča voda.

Glede na raznolikost mokriščnih ekosistemov je bilo predlaganih veliko klasifikacijskih shem. Po Cowardinu in sod. (1979) ločimo 5 mokriščnih sistemov: morski, estuarski, rečni, jezerski in močvirski. V slednjega uvrščamo vsa mokrišča, ki niso pod vplivom plimovanja in so v veliki meri pokrita s površinskim rastjem – drevesa, grmičevje, mah. Ta sistem vsebuje več razredov, ki jih ločimo glede na vrsto podlage ali večinsko vegetacijo na površju. Razredi močvirnih mokrišč imajo lahko kamnito ali neutrjeno dno, vodno posteljo, neutrjeno obrobje, mahovnato-lišajsko, površinsko, goščavnato-grmičasto ali gozdno rastje.

Mokrišča so pomembni ekosistemi, saj nudijo življenjski prostor številnim pomembnim in ogroženim rastlinskim in živalskim vrstam, ki so se prilagodile na tako specifičen življenjski prostor, hkrati pa imajo veliko ekonomsko, kulturno, znanstveno in rekreacijsko vrednost (Thorsell in sod., 1997). Poleg ekološke vrednosti imajo mokrišča tudi naravovarstvene naloge. So sistemi za regulacijo količine in kakovosti vode, saj šota, mikrobi in rastline delujejo kot naravni filtri, zadržujejo anorganska hranila in uspešno preprečujejo erozijo tal (Bragg, 2002). V kontekstu globalnega segrevanja so občutljiva in hkrati odporna na klimatske spremembe, hranijo znatne količine ogljika in neposredno vplivajo na koncentracije toplo-grednih plinov v ozračju (Belyea in Clymo, 2001). Poleg vsega tega so tudi najučinkovitejša v zadrževanju odtekajočih voda, saj začasno shranjujejo vodo deževja, taljenja snega in izlivov podtalnice in jo postopoma sproščajo v obliki odtekanja, izhlapevanja in ponovnega napajanja podtalnice (Bragg, 2002).

Kljub pomembnosti mokrišč v vodnem ciklu, ciklu ogljika in dušika ter bogati biološki raznovrstnosti, ki jo podpirajo, je prišlo v preteklosti v Evropi do obsežne izgube teh ekosistemov. Že stoletja se človeške naselbine kopičijo ob obalnih nižinah in poplavnih

ravninah, da izkoristijo prednosti, ki jih ponujajo ravna tla, vodni promet in obilica vode in hrane (Jones, 2001). Sladkovodna mokrišča zmernega pasu so bila tarča krčenj, izsuševanj in evtrofikacije. Te grožnje skupaj z dodatnimi negativnimi vplivi klimatskih sprememb uničujejo mokriščne ekosisteme (Verhoeven, 2003).

Trenutno ocenjujejo, da mokrišča obsegajo približno 269 milijonov hektarjev Evrope in s tem pokrivajo 11 % površin. Več kot 92 % (približno 250 hektarjev) je kopenskih mokrišč, morskih ali obalnih mokrišč je zgolj 1,8 % (približno 5 milijonov hektarjev) in nadaljnjih 0.7 % (približno 2 hektarja) pa umetnih mokrišč (Nivet in Fraiser, 2001). Zbiranje novejših informacij nam daje osnovo za opis statusa in glavnih groženj posameznih tipov mokrišč. Izguba biološke raznovrstnosti je posledica krčenja območij in poslabšanja stanja mokrišč. Dejavniki, odgovorni za izgubo in degradacijo so preusmeritve in zaježitve tokov rek, odklopitev poplavnih površin mokrišč od poplavnih tokov, evtrofikacija, onesnaževanje, paša, žetev, globalno segrevanje, vdor eksotičnih rastlin in praksa zasipavanja, zaježovanja in izsuševanja. V bolj mokrih območjih je izsuševanje ravnin uničilo velike površine mokrišč. V sušnejših predelih pa namakalno poljedelstvo neposredno tekmuje za vodo z mokriščem. Široko razširjena evtrofikacija skupaj z vplivom invazivnih vrst zmanjšuje pestrost (Brinson in Malvarez, 2002).

Mokrišča so najučinkovitejša pod naravnimi pogoji, kadar ne izgubijo svoje funkcije zaradi izsuševanja in zasipavanja, osamitve od rek in poplavnih ravnin z gradnjo umetnih nasipov (Bragg, 2002). Za učinkovito ohranjanje in obnavljanje mokrišč je potreben kompleksen, interdisciplinaren in posvetovalen pristop, ki bo zajel vsa področja (Jones, 1997). Z napačnimi odločitvami lahko ogrozimo preostanek mokrišč in povečamo negativne učinke slabe rabe. Proučevanje mokriščnih ekosistemov je odkrilo tesno povezavo med organskimi komponentami in vodo, kar pomeni, da je nemogoče razumeti povezavo ogljika in dušika brez znanja o hidrologiji. Številne pobude in projekti, se ukvarjajo ravno z odkrivanjem takšnih povezav. Nekateri izmed teh so Natura 2000 (EC,), Ramsar (Ramsar Convention Secretariat, 2006) in Prowater (Meissener in Leinweber, 2004).

2.1.1 Šotno barje

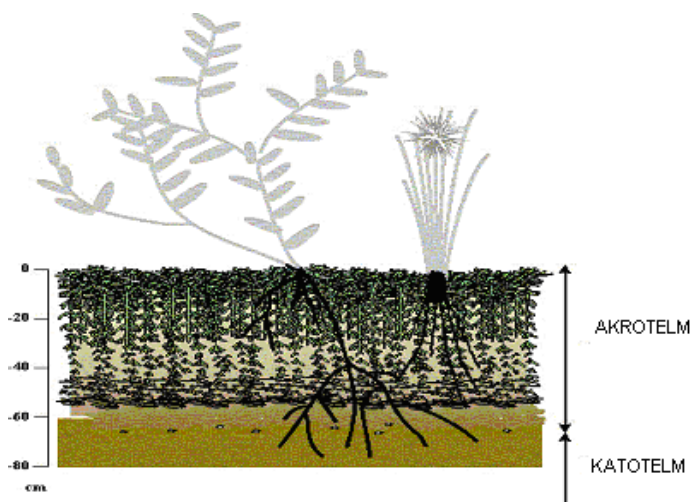
Šotno barje je mokrišče, kjer se je na površju naravno nakopičil sloj šote. V osnovi vsa šotna barja ločimo v dva tipa, ki se med sabo ločita glede na oskrbo z vodo – nizka in visoka barja (Moore, 1995).

Na nizkem barju, včasih imenovanem tudi travniško ali reotrofično barje, je prevladujoče rastje šašje, trstje, grmičevje in drevje, katerega nerazgrajeni ostanki sestavljajo šoto črne barve. Zalogo vode napajajo obrobna gorovja in podtalnica z nevtralnimi pH in zmernimi količinami hranil. Z debeljenjem plasti šote rastline počasi izgubijo stik s podtalnico in zaradi pomanjkanja vode pojenjajo v rasti. Kadar zadostna količina padavin zagotavlja dovolj hrane za ohranjanje prepojenosti z vodo tudi nad višino podtalnice, pa se pojavijo vrste, ki so prilagojene za rast v razmerah z manj hranili in nizkim pH. Na površini začnejo rasti in odmirati šotni mahovi, ki tvorijo rjavo šoto. Tako se iz nizkega barja počasi razvije visoko barje, imenovano tudi mahovnato ali ombrotrofično barje. Barja so že po naravi okolja z veliko količino vode in posledica prepojenosti tal z vodo je tudi zmanjšana respiracija mikrobov. Zaradi velike primarne produkcije – nekatera barja bi lahko po produktivnosti primerjali z gozdom – in zmanjšane aerobne razgradnje se začne kopičiti šota (Moore, 1995).

2.1.2 Šota

Glavni tvorci visokih barij so šotni mahovi rodu *Sphagnum*, ki jih je po različnih štetjih od 100 do 350 vrst (Bryan, 1955). Šotni mahovi imajo veliko sposobnost zadrževanja vode, svojo suho težo lahko s črpanjem vode povečajo za 20- do 25-krat, hkrati pa lahko v primeru suše vodo porabljajo zelo omejeno. Sposobnost zadrževanja vode imajo celice hialocite, s spiralno odebeljenimi celičnimi stenami in porami, ki imajo vlogo rezervoarja. Poleg zadrževanja vode so učinkoviti tudi v pridobivanju hranil iz padavin. Hranila iz vode dobijo z izmenjavo ionov. Posledica tega sistema je tudi lahko zakisanje tal (Clymo, 1963).

Šota visokega barja je zgrajena iz dveh slojev, akrotelma in katotelma (Slika 1). Akrotelm je zgornji sloj, ki je večino leta dvignjen nad podtalnico. Je zračen in v njem poteka oksidacija organskega materiala, vendar je ta razgradnja le delna (ostanki rastlin so prepoznavni). Katotelm pa leži pod nivojem podtalnice v anaerobnem okolju. V tem sloju je razgradnja šote do 1000 krat počasnejša (Belyea in Clymo, 2001) kar vodi do kopičenja šote. Poleg anaerobnih razmer zaradi zasičenosti z vodo, na slabo razgradnjo vpliva tudi zakisanje tal. Čeprav zraste šotni mah od 5 do 20 mm na leto, zraste šota le za 0,5 do 1 mm, saj se pod lastno težo neprestano seseda (Quinty in Rochefort, 2003). Hitrost in stopnja razgradnje šote sta odvisni od njene sestave in zasičenosti z vodo. V vlažnih pogojih raste hitreje in je manj razgrajena kot v suhih.



Slika 1: Šotni mah *Sphagnum* (Quinty in Rochefort, 2003)

Šoto nizkega barja najdemo pod visokim barjem. Poznamo dva tipa šote nizkega barja – lesnata šota in trstična šota. Lesnata šota vsebuje večinoma ostanke dreves, trav in šašje, je relativno prepustna in ima pH okoli 5. Trstična šota vsebuje veliko trstja, je zelo gosta, manj prepustna za vodo in tudi manj kisl.

2.1.3 Ljubljansko barje

Ljubljansko barje je predel južnega dela dna ljubljanske kotline. Nastajati je začelo v začetku pleistocena, ko se je začelo območje ugrezati. Ljubljanica in okoliške reke so v

kotlino odlagale prod in fino zrnate usedline, podlaga je postala nepropustna in ravnina je dobila močvirni značaj. Po koncu ledenih dob je tu nastalo plitvo jezero, po izginotju letega pa močvirje in barje.

Ljubljansko barje so skušali osušiti že v rimskih časih, da bi lahko njegovo bogato zemljo izkoriščali za kmetijstvo. Prvi resni poizkus osušitve pa je bila izgradnja Gruberjevega prekopa (1772-1780), ki je skupaj z izkopavanjem kanalov in jarkov za odtok vode, urejanjem cest, požiganjem površin ter rezanjem šote povzročila izgubo večjega dela visokega barja. Danes je Ljubljansko barje po večini nizko barje z ostanki visokega barja (Peterlin, 1971).

Barja danes zaradi njihovega velikega ekološkega pomena postajajo vedno pomembnejša in so mnoga v programih obnavljanja. Največkrat uporabljena metoda za ohranjanje in obnovo barij je dvig podtalnice, ki ima lahko negativne posledice. Ker so nekatere površine Ljubljanskega barja dolga leta služile kot kmetijske površine, lahko v tleh najdemo veliko dušika in fosforja. Z dvigom podtalnice lahko povzročimo vnos fosforja ali dušika v podtalnico in tako naredimo veliko škode zaradi onesnaženja vode (Hacin in sod. 2004; Baum in sod, 2003).

Za obnovitev Ljubljanskega barja je potrebno raziskati procese, ki v njem potekajo in potem pravilno postopati. V zadnjih letih so bile izvedene številne raziskave, v okviru katerih so proučevali preprečevanje difuznega onesnaževanja podtalnice s fosforjem (Meissner in Leinweber, 2004), okoljske gradiente in mikrobno aktivnost (Hacin s sod, 2004), vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe (Zajec, 2004; Kraigher in sod. 2006), vodni režim (Hacin, 2004) in druge ekološke, mikrobiološke in naravovarstvene vidike, ki so pomembni za ohranjanje tega pomembnega ekosistema.

Večina do sedaj opravljenih raziskav mikrobne aktivnosti in pestrosti je bile usmerjenih na mikrobna dogajanja v vrhnjem sloju tal, to je zgornjih 30 cm. Vendar to ni dovolj, saj je aktivnost in številčnost mikroorganizmov v globljih slojih prav tako pomembna. Spodnji sloji tal so prepojeni z vodo in v njih potekajo pomembni procesi značilni za anoksična okolja, kot so fermentacija organskih snovi, redukcija nitrata, mangana, železa in sulfata

ter metanogeneza. Zato smo v tem diplomskem delu želeli preučiti tudi globlje plasti tal Ljubljanskega barja, pri čemer smo se osredotočili na številčnost in aktivnost mikroorganizmov v profilu tal do globine 160 cm.

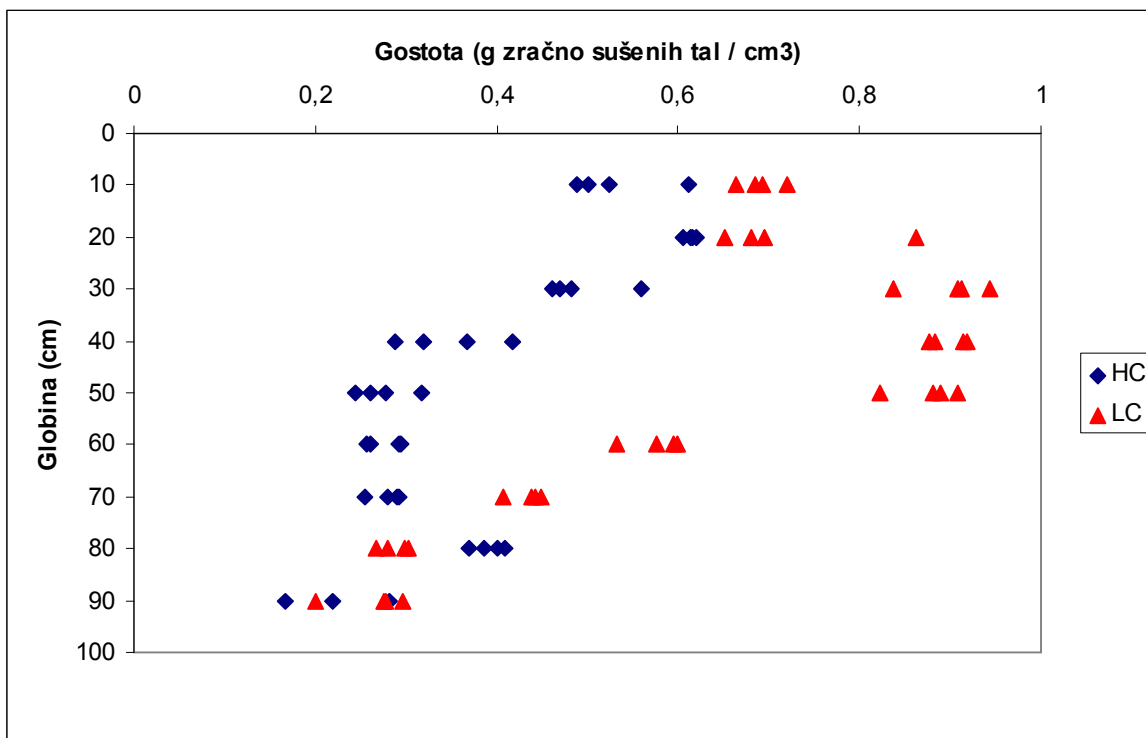
Ljubljansko barje se nahaja južno od Ljubljane (45°58'N, 14°28'E) in pokriva približno 16000 ha površine. Povprečna letna temperatura je 10 °C, povprečna letna količina padavin znaša 1400 mm. Večino pokrivajo travniške površine (65 %) in polja koruze (25 %), manjši del predstavlja zaščiten močvirnat gozd in predeli visokega barja. (Kraigher in sod., 2006).

2.1.4 Poskusno polje

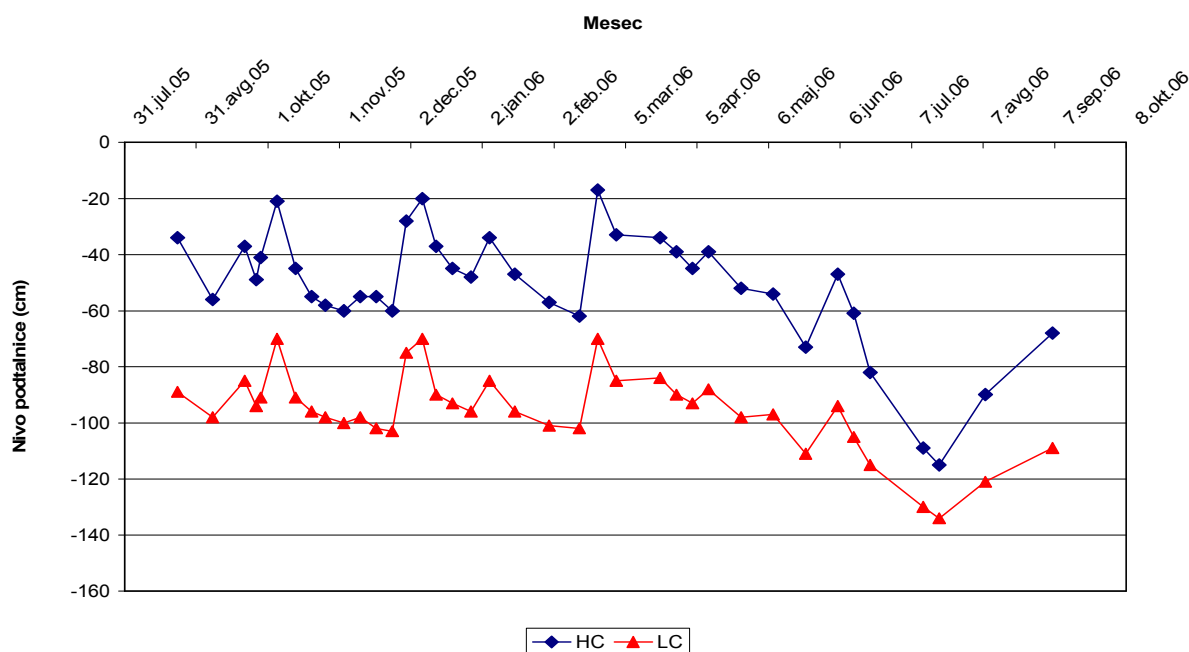
Poskusno polje na Ljubljanskem barju je v Tomišlju na območju z ohranjeno šoto, ki sega do globine 3 metrov. Polje je veliko 1 ha in je na eni strani omejeno z odvodnim jarkom s prelivno pregrado, ki zagotavlja različne nivoje podtalnice na njivskih in travniških površinah. Del polja predstavljajo LC, oziroma organsko mineralna tla z rečnimi glinenimi nanosi z nižjo vsebnostjo organske snovi (14-20%), del pa predstavljajo visokoorganska (HC) šotna tla brez glinenih nanosov in z dvakrat večjo vsebnostjo organske snovi (27 – 40 %) (Hacin in sod., 2001; Hacin in sod., 2004).

HC in LC tla se vzdolž profila razlikujejo v gostoti (slika 2). Največja razlika med obema tipoma tal je v slojih od 30 do 60 cm, kjer je gostota LC tal do trikrat večja, kot pri HC tleh. V zgornjih slojih od 0 do 20 cm imajo LC tla le nekoliko večjo gostoto od HC tal, od globine 70 cm navzdol je gostota tal približno enaka.

HC in LC tipa tal se razlikujeta tudi v nivoju podtalnice (Slika 3). V LC tleh niha na globini med 70 in 100 cm skozi vse leto, razen v poletnih mesecih, ko nivo podtalnice pade pod 100 cm. Na koncu julija se podtalnica spusti skoraj 140 cm pod površje. Nivo podtalnice v HC tleh niha podobno kot v LC tleh, vendar je v skoraj vseh meritvenih točkah skozi leto višji za okoli 50 cm. Razlika v nivoju se zmanjša poleti, ko v HC tleh nivo podtalnice julija pade do skoraj 120 cm globine in znaša razlika le še okoli 20 cm.

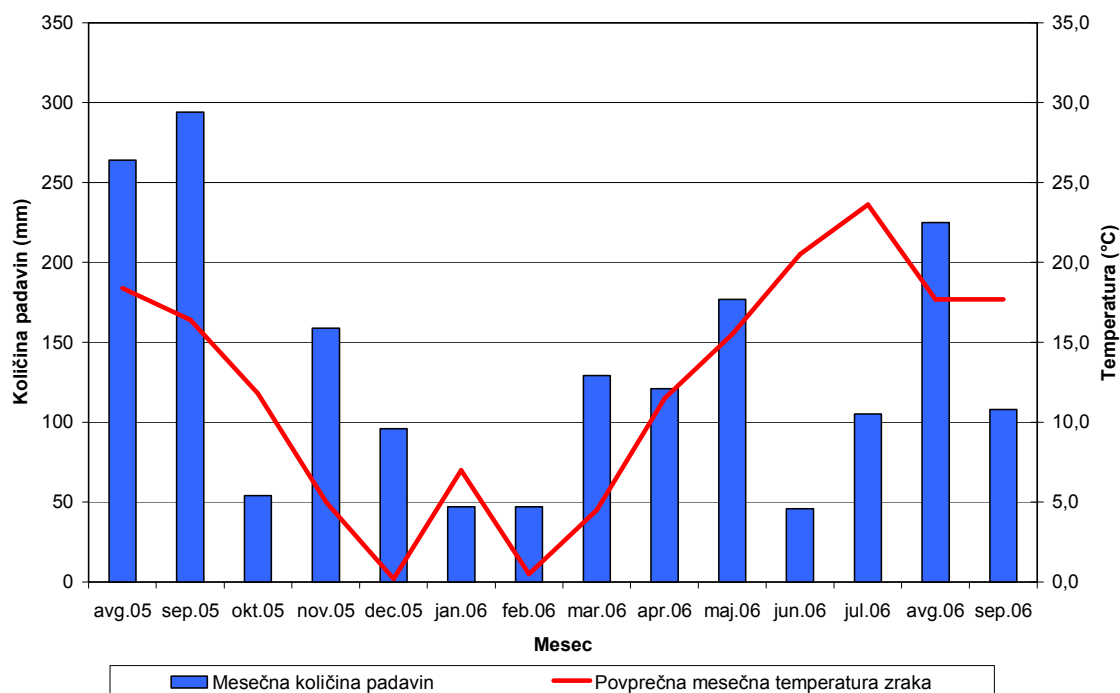


Slika 2: Gostota HC in LC tal na različnih globinah tal Ljubljanskega barja (Stres in Korpar, 2006a)



Slika 3: Nivo podtalnice v visokoorganskih (HC) in nizkoorganskih (LC) tleh Ljubljanskega barja merjen od avgusta 2005 do septembra 2006 (Hacin, 2006)

Skupna mesečna količina padavin v obdobju od avgusta 2005 do avgusta 2006 se giblje od manj kot 50 mm do 300 mm. Najmanj padavin je bilo v oktobru 2005, januarju in februarju ter juniju in juliju 2006; največ padavin (nekoliko manj kot 300 mm) je bilo avgusta in septembra 2005 ter avgusta 2006. Novembra, decembra, marca, aprila, maja in septembra 2006 je bila količina padavin med 100 in 160 mm. Temperatura zraka se je skozi leto gibala med okoli 0 in 24 °C. V poletnih mesecih je bila povprečna temperatura blizu 20 °C, v zimskem obdobju je bila povprečna temperatura malo nad ničlo. Spomladi 2006 je temperatura začela naraščati in se je do poletja dvignila nad 20 °C (SURS, 2007a,b)



Slika 4: Mesečna količina padavin in povprečna mesečna temperature od avgusta 2005 do septembra 2006 izmerjeni na meteorološki postaji Ljubljana-Bežigrad (SURS, 2007a; SURS, 2007b)

2.2 MIKROBIOLOGIJA TAL

Tla so zelo kompleksen sistem za katerega so značilni različni biološki, kemijski in fizikalni procesi, ki so pod velikim vplivom okoljskih dejavnikov. Mikroorganizmi v tleh sodelujejo pri razgradnji in kroženju hranil (Alef in Nannipieri, 1995).

Ohranjanje metabolne sposobnosti talne mikroflore je osnovna zahteva za kakršenkoli koncept zaščite, bioremediacije in rekultivacije tal. Zato sta biokemija in mikrobiologija tal danes pomembni področji okoljskih znanosti.

O naravi mikrobnih združb v profilu tal vemo zelo malo, saj je večina študij mikrobiologije tal osredotočenih na površinskih 25 cm tal, kjer je gostota mikroorganizmov največja. Vse uporabljene metode za oceno mikrobne biomase, so pokazale, da je mikrobna gostota različnih vrst tal v globini dveh metrov za 10 do 100 krat manjša od tiste na površini. Zaradi majhne gostote in nizke aktivnosti so mikrobi v globinah obravnavani kot nepomembni. A talni profili so večinoma globoki nekaj metrov, kar celokupno pomeni veliko število mikroorganizmov in kar je pomembnejše, njihova potencialna aktivnost teh je ravno tako velika ali pa še večja kot aktivnost mikrobov na površini (Fierer in sod, 2003). Združbe v globljih slojih se razlikujejo od tistih na površini, zato o njihovih funkcijah ne moremo enostavno sklepati iz podatkov površinskih slojev tal. Ti mikroorganizmi igrajo pomembno vlogo pri diagenezi tal, ekologiji, biogeokemiji, razgradnji onesnaževal in vzdrževanju kakovosti vode (Fierer in sod., 2003). Globinska mikrobiologija tal neposredno vpliva na kemično sestavo podtalnice s procesom diageneze, raztapljanja in usedanja. Zato je potrebno bolje razumeti genotipsko raznolikost in metabolno aktivnost mikroorganizmov pod površjem, da bi lahko bolje kvantitativno ocenili njihov vpliv na transformacijo in degradacijo naravnih in umetnih spojin tekom prehoda skozi različne globine (Taylor in sod., 2002).

2.2.1 Vzorčenje tal

Kvantitativno in reprezentativno vzorčenje mikroorganizmov iz okoljskih vzorcev je nujno za razumevanje delovanja ekosistemov. Tla so še posebno težaven medij, saj je poleg tega, da so organske in mikrobiološke lastnosti v njih zelo heterogene, potrebno pretrgati tudi mnoge sile (elektrostatske, vandervalsove, fizično ujetost), da zmanjšamo povezave med tlemi in celicami in omogočimo ekstrakcijo celic. Kadar ekstrahiramo mikroorganizme iz tal, s kombiniranjem fizikalnih in kemijskih procesov razdremo delce tal, da se čim večji del bakterijske populacije, ki je bila pritrjena na gline in huminske kisline ali ujeta v

agregate, sprosti v tekočo fazo. Tudi po fizikalni in kemijski obdelavi lahko še vedno veliko celic ostane povezanih s tlemi (Taylor in sod., 2002). Kljub temu lahko sklepamo o relativnih razlikah med vzorci, kadar so ti obdelani na enak način.

Inkubacija v mikrokozmi, kjer ekstrakcija celic iz vzorcev ni potrebna, odziv mikroorganizmov pa merimo z drugimi metodami je veliko primernejša za kompleksne medije kakršna so tla.

2.2.2 Lastnosti tal

2.2.2.1 pH tal

Protonska aktivnost v tleh vpliva na vse biokemijske transformacije, na strukturo združbe in aktivnost mikrobov. Ponavadi jo podamo kot vrednost pH, ki je definirana kot negativen logaritem koncentracije vodikovih ionov. Pove nam nekaj o kislosti oziroma bazičnosti tal in je ena izmed osnovnih značilnosti, ki jih pri tleh določamo (Alef in Nannipieri, 1995). Za večino mikroorganizmov in rastlin so hranila najbolj dostopna v območju pH med 6 in 7. Talni pH močno vpliva na topnost mineralov in hranil, na biokemijske lastnosti znotraj celičnih in zunaj celičnih encimov, na sam gradient med zunanostjo in notranostjo celic in na obliko amonijskega dušika ter topnost CO₂. Tla poskusnega polja Ljubljanskega barja imajo pH med 6,5 in 6,9 (Hacin in sod., 2004; Kraigher in sod., 2006)

2.2.2.2 Voda v tleh

Sposobnost zadrževanja vode v tleh (Water Holding Capacity – WHC) je količina vode, ki jo je določena vrsta tal sposobna zadržati. 100 % WHC predstavlja največjo maso vode, ki jo je sposoben zadržati 1 g tal in je odvisna od teksture tal (Alef in Nannipieri, 1995). WHC se uporablja za zagotavljanje enake stopnje vlažnosti tal v poskusih, kar zagotavlja podobne pogoje za mikrobo, saj količina vode močno vpliva na zračnost tal in dostopnost hranil, s tem pa tudi na mikrobno rast in metabolno aktivnost. Za tla Ljubljanskega barja je značilna visoka kapaciteta zadrževanje vode, ki je posledica strukture šotnih tal. Povezana je

s količino organske snovi in v zgornjem sloju (0 – 30 cm) tal znaša $1,7 \text{ g}_{\text{vode}}/\text{g}_{\text{tal}}$ (Hacin in sod., 2001; Zajec, 2004; Kraigher in sod., 2006).

Vlažnost tal opisuje trenutno količino vode v tleh in je ena izmed najbolj spreminjajočih se komponent tal. Odvisna je od sestave tal, vremenskih razmer, letnega časa, temperature, odtoka in pokritosti z rastlinami. V tleh se voda zadrži na dva načina, z adsorpcijo na površino ali v prostorih med delci tal (Madigan in sod., 2003). Voda ima v tleh več različnih funkcij. Je pomemben faktor v procesu tvorbe tal. V mrzlih podnebjih voda v razpokah kamenin zmrzne in se razširi, tako se lahko del kamenine odkruši. Ko se voda zopet stali, odnese te delčke s seboj. V toplejših klimah pa voda pripomore k nastajanju prsti z raztapljanjem. Od vode v tleh je odvisna tudi temperatura tal, saj ima tekoča voda večjo toplotno kapaciteto, kot zrak ali zemlja. Zaradi vode v tleh je potrebno več energije, da se zemlja segreje ali ohladi, zato se temperatura tal spreminja počasneje kot temperatura zraka. Količina vode vpliva tudi na pH, redoks potencial in koncentracijo plinov (O_2 , CO_2) v tleh.

Predvsem pa je voda eden izmed glavnih dejavnikov, ki vplivajo na mikrobno aktivnost v tleh. Tate in Terry (1980) sta ugotovila, da je vlažnost ponavadi limitni faktor za mikrobno aktivnost, saj se je v poskusih s povečanjem vlažnosti povečala tudi mikrobna aktivnost. Orchard in Cook (1983) sta razlike v mikrobni aktivnosti med bolj in manj mokrimi tlemi pripisala dostopnosti substrata. V vodi so raztopljeni minerali in organske snovi potrebni za njihovo rast. Ko voda pronica skozi tla prinese hranilne snovi do mikroorganizmov.

Griffiths in sod. (2003) so pokazali, da so bakterijske združbe v tleh odporne proti vodnemu stresu in ta vpliva zgolj na fiziološko stanje združbe in ne na njeno sestavo. Majhna dostopnost vode lahko inhibira mikrobno aktivnost z zniževanjem vodnega potenciala in zmanjšanjem hidratacije in aktivnosti encimov (Stark in Firestone, 1995), vpliva na osmotski status celic in posredno na dostopnost substratov, difuzijo plinov, pH tal, temperaturo, stres rastlin in s tem rizodepozicijo. Zhou in sod. (2001) so postavili hipotezo, da lahko manjša vsebnost vode celo poveča raznolikost združbe v tleh, saj pomanjkanje vode v tleh prepreči gibanje mikroorganizmov in prosto difuzijo hranil, kar posledično pripelje do prostorske izolacije mikrobnih populacij. V zgornjih slojih tal se

vsebnost vode spreminja in je ponavadi nizka. Po dežju voda omogoči prosto difuzijo hranil in poveča kompeticijo. Ko je povezanost talnih delcev prekinjena, nastanejo okolja, kjer lahko preživijo mikrobne vrste, ki bi bile v nasičenih tleh zaradi kompeticije za hranila s strani bolj prilagojenih vrst nekonkurenčne.

Za šotna barja, ki jih napaja podtalnica, je njen nivo pomemben dejavnik, ki vpliva na aktivnost mikroorganizmov. Primer takega barja je tudi Ljubljansko barje. Nivo podtalnice določa mejo med aerobnim in anaerobnim okoljem in s tem vpliva na procese razgradnje šote. Nivo podtalnice v histosolih vpliva na spiranje nutrientov, kot so C, N in P iz tal. Martin in sod. (1997) so ugotovili, da nivo podtalnice sicer ni vplival na sproščanje NH_4^+ -N in TKN (Total Kjeldahl Nitrogen), se je pa z višjim nivojem podtalnice povečalo sproščanje NO_3^- in P. Visoke koncentracije NO_3^- v pornih vodah osušenih šotnih barij so posledica prezračevnosti šote in naknadne mineralizacije in nitrifikacije organskega N. Ti procesi so še posebej intenzivni v primeru nizkega nivoja podtalnice ali velikih sprememb v nihanju nivoja podtalnice, ki je značilen za razgrajeno šoto s spremenjenimi hidravličnimi lastnostmi.

Redne tedenske meritve nivoja podtalnice na poskusnem polju v Tomišlju opravljajo že od leta 1999 s pomočjo mreže 24 piezometrov, postavljenih na obeh straneh jarka v razdalji 25 m eden od drugega. Piezometri segajo do globine 3 m do same polžarice. Nivo podtalnice pri visokoorganskih tleh niha med 30 in 120 cm globine, nad 30 cm podtalnica večino leta ne seže, tla globlje od 120 cm pa so pod vodo skozi vse leto (Hacin, 2004). To lahko vidimo tudi na sliki 5, ki prikazuje cev, ki je bila zakopana v tleh na poskusnem polju Ljubljanskega barja. Kjer je rja najizrazitejša, vemo da je bilo menjavanje oksičnih in anoksičnih pogojev najpogostejše, torej je v tem območju skozi leto podtalnica najbolj nihala.



Slika 5: Cev vstavljena v barjanska tla do globine 160 cm na poskusnem polju v Tomišlju (Stres, 2008)

2.2.3 Mikroorganizmi v tleh

Mikrobne združbe v tleh so ene izmed najbolj kompleksnih, raznolikih in pomembnih komponent biosfere (Atlas in Bartha, 1993). Čeprav mikroorganizmi zavzemajo manj kot 0,5 % mase tal, vplivajo na biološke, fizikalne in kemijske lastnosti tal, saj je 60 – 80 % celotnega metabolizma v tleh posledica mikroflore (Soil organic matter, 2004). Talni mikroorganizmi sodelujejo pri kroženju elementov, kot so C, H, N, O, P in S v tleh (Madigan in sod., 2000). Procesi razgradnje živalskih in rastlinskih ostankov, tvorba humusa in huminskih kislin, amonifikacija, nitrifikacija, denitrifikacija, razgradnja celuloze in hemiceluloze sprostito hranila za rastline in skrbijo za ravnovesje fizikalnih in kemijskih lastnosti tal.

Hkrati so mikroorganizmi v tleh odgovorni tudi za emisije toplogrednih plinov (ogljikovega dioksida CO₂, metana CH₄ in didušikovega oksida N₂O) (Brake in sod.,

1999). CO₂ z dihanjem proizvajajo vsa živa bitja in ga avtotrofi porabljajo z asimilacijo. CH₄ mikroorganizmi proizvajajo z metanogeno razgradnjo organskih snovi in porabljajo z oksidacijo. Prav tako mikroorganizmi vodijo procese denitrifikacije in nitrifikacije, ki lahko vodijo do nastanka N₂O. Organski material je potreben za dihanje, metanogenezo in denitrifikacijo, zato so šotna tla, bogata z organsko snovjo, ugodna okolja za nastanek toplogrednih plinov.

2.2.3.1 Število mikroorganizmov

Številne metode, ki vključujejo gojenje mikroorganizmov so manj zanesljive kot metode direktnega štetja pod mikroskopom. Kombiniranje fizikalnih in kemijskih procesov razdre delce tal in sprosti del bakterijske populacije, ki je bila pritrjena na gline in huminske kisline ali ujeta v agregate, v tekočo fazo. Nekatere vrste imajo večjo sposobnost pritrjevanja kot druge in s tem otežujejo ekstrakcijo. Tudi če ekstrahiramo velik in reprezentativen delež vrst, njihovo nadaljnje gojenje določajo prehranske in rastne zahteve posameznih vrst. Uporaba različnih selektivnih gojišč, vključno s tistimi, ki jih uporabljamo za ugotavljanje metabolne raznolikosti talnih mikrobnih združb, običajno zajamejo relativno majhen delež bakterij. Trenutna ocena bakterij, ki jih lahko gojimo, je 1 – 10 % (Atlas in Bartha, 1993). V te analize niso zajete tiste bakterije, ki so sicer žive, a jih ne znamo gojiti (VBNC – viable but not culturable).

Že od leta 1970 je štetje mikroorganizmov pod epifluorescenčnim mikroskopom ena glavnih tehnik neposrednega določanja števila mikroorganizmov v tleh. V principu znan volumen suspenzije s celicami razmažemo po znani površini objektnega stekelca, jih pobarvamo s fluorescenčnim barvilom in jih preštejemo pod mikroskopom na znani površini. Akridin oranž je barvilo, ki fluorescira zeleno, kadar se veže na DNK in oranžno, kadar se veže na RNK. Mrtve celice ne sintetizirajo RNK zato se obarvajo zeleno. V primerjavi z gojitvenimi tehnikami, ki zaznajo le od 1 – 10 % vseh prešteti bakterij je ta metoda veliko bolj občutljiva (Madigan in sod., 2000). V splošnem je znano, da v 1 gramu tal najdemo od 10⁸ do 10⁹ bakterij. Williams in Crawford (1983) sta z direktnim štetjem pod epifluorescenčnim mikroskopom pokazala, da šotna tla vsebujejo 10⁸ bakterij na ml suspenzije barjanskih tal ne glede na globino iz katere so bili odvzeti vzorci.

2.2.3.2 Aktivnost mikroorgaizmov

2.2.3.2.1 S substratom inducirana respiracija

Metoda s substratom inducirane repiracije (SIR) uporablja fiziološki odgovor organizmov na dodatek substrata - dihanje, kot oceno mikrobnega biomasnega ogljika. Z dodatkom lahko dostopnega ogljika hitro pospešimo dihanje prisotnih mikroorganizmov, povečana hitrost dihanja pa ostane stabilna še nadaljnjih 6 do 8 ur. Anderson in Domsch (1978) sta predlagala, da je največja hitrost dihanja med lag fazo takoj po dodatku substrata značilna za začetno mikrobno populacijo. Z razvojem fumigacijsko inkubacijske metode za merjenje mikrobnega ogljika v tleh sta metodo SIR kalibrirala. Predpostavke metode so :

- odgovor SIR različnih organizmov je razmeroma konstanten,
- večina mikroorganizmov v združbi se bo v času merjenja odzvala,
- glukoza je primeren substrat za indukcijo maksimalnega odgovora,
- prispevek k mikrobnemu ogljiku tistih mikrobov, ki glukoze ne porabljajo je zanemarljivo majhen.

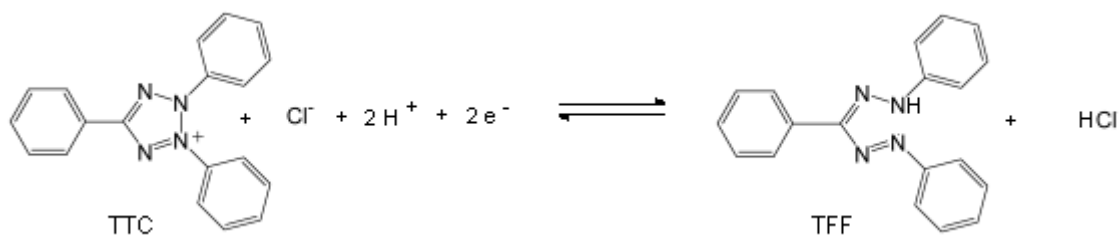
Metoda s substratom inducirane respiracije ima določene pomanjkljivosti. Tla morajo biti dovolj vlažna, da se bo dodan substrat raztopil in ne bo difuzijskih ovir. Različna vsebnost vode v vzorcih lahko vpliva na mikrobno respiracijo, zato je neprimerno primerjati aktivnost mikroorganizmov v tleh z različno vsebnostjo vode. Pri meritvah vzorcev tal z različno vsebnostjo vode, uporabljamo prilagojeno metodo s substratom inducirane respiracije. Iz vzorcev tal naredimo talno suspenzijo v razmerju 1 g tal 2 ml vodne raztopine glukoze, tako so vsi vzorci enako namočeni in vlažnost tal ni več spremenljivka, ki bi vplivala na rezultat (West in Sparling, 1986)

2.2.3.2.2 Dehidrogenazna aktivnost

Mikrobna oksidacija organskih snovi je vezana na elektronsko transportno verigo v membrani, katere končni sprejemnik je kisik. Z delovanjem z NAD povezanih dehidrogenaz različni substrati oddajo elektrone molekuli NADH in ti elektroni so vneseni

v dihalno verigo s flavoproteinom NADH dehidrogenazo. Drugi substrati dihalne verige so dehidrogenirani preko s flavinom povezanih dehidrogenaz, na primer, sukcinatna dehidrogenaza, acil-CoA dehidrogenaza, ki spustijo elektrone v verigo preko ubikinonov (Alef in Nannipieri, 1995).

Že v 30ih letih prejšnjega stoletja je postalo jasno, da bi lahko merili eno ali več encimskih aktivnosti v dihalni verigi, ki bi služila kot pokazatelj celotnih oksidacijskih aktivnosti v celici. Tako je postala dehidrogenazna aktivnost v tleh mera za celotno mikrobo aktivnost. Ena pogosteje uporabljenih metod za oceno dehidrogenazne aktivnosti v tleh temelji na 2,3,5-trifeniltetrazolium kloridu (TTC), kot umetnemu akceptorju elektronov. TTC je vodotopen in deluje kot prejemnik elektronov za več dehidrogenaz. Dehidrogenaze ga reducirajo v rdeče obarvan 2,3,5-trifeniltetrazolium formazan (TTF) (Slika 6), ki ni vodotopen. Z redukcijo se spremeni absorpcijski vrh kar lahko merimo kolorimetrično (Alef in Nannipieri, 1995).



Slika 6: Redukcija TTC v TTF (V and V Pharma Industries, 2006)

TTC in TTF sta občutljiva na svetlobo zato vse meritve potekajo v temi. Kisik zavira redukcijo TTC, zato je potrebno poskuse izvajati v enakih testnih stekleničkah za primerjavo rezultatov iz različnih testov. Pred testom je potrebno odstraniti vidne rastlinske in živalske ostanke saj imajo rastline in živali aktivne dehidrogenaze (Alef in Nannipieri, 1995).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 MERITVE VSEBNOSTI VODE V TLEH VZDOLŽ PROFILA VISOKOORGANSKIH (HC) IN NIZKOORGANSKIH (LC) TAL

Na poskusnem polju v Tomišlju so od septembra 2005 do septembra 2006 v tedenskih presledkih z napravo Diviner 2000 merili tudi volumetrično vsebnost vode do globine 110 cm (Blaž Stres). Na poskusnem polju so bili nameščeni trije kanali na področju HC in trije kanali na področju LC, v katere so spustili Diviner, ki je zabeležil procent vode v tleh do globine 110 cm v razmiku 10 cm. V okviru te diplomske naloge smo pridobljene podatke analizirali.

Diviner 2000 je prenosna naprava, ki za merjenje vode v profilu tal uporablja princip frekvenčne reflektometrije. Volumetrična vlažnost tal je merjena kot odgovor na spremembo v dielektrični konstanti tal. Kapacitivnost (razmerje med električnim nabojem in električnim potencialom prevodnega materiala) se večja s številom molekul vode v tleh. Električni dipoli molekul vode se odzovejo na obrat polja senzorjev kapacitorja tako, da se sprostijo. Odgovori kapacitivnostnih senzorjev znotraj profila tal z visoko korelacijo odgovarjajo dinamiki volumetrične vlažnosti tal.

3.2 EKSPERIMENTALNO POLJE IN VZORČENJE TAL

Vzorci tal smo odvzeli marca in septembra 2004 na poskusnem polju v Tomišlju. Povprečna temperatura zraka marca 2004 je bila 5 °C, septembra pa 15,6 °C (julija in avgusta pa je povprečna temperatura zraka segla čez 20 °C) (SURs, 2007b). Vzorčili smo visokoorganska tla. V transektu 10 metrov smo tla vzorčili s korerjem (pripravo za vzorčenje tal vzdolž njihovega profila) na štirih mestih. Jemali smo tla iz treh različnih globin. Tla odvzeta iz enakih globin smo združili v skupen vzorec in jih shranili v plastične vrečke. Pred vsakim vzorčenjem smo korer sprali z destilirano vodo. Globino odvzetih tal smo vnaprej določili glede na podatke nihanja podtalnice (Hacin, 2004). In sicer, tla v globini 0 – 30 cm so tla, do katerih podtalnica večji del leta ne seže; 100 – 120 cm so tla, kjer nivo podtalnice skozi leto niha; tla na globini 140 – 160 cm pa so poplavljeni skozi

vse leto. V laboratoriju smo tla homogenizirali s presajanjem skozi sito z velikostjo por 6,3 mm in jih do uporabe shranili na 4 °C

3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI TAL

3.3.1 Vlažnost tal

Za določitev vlažnosti tal naših vzorcev smo v suho stekleno petrijevko, ki smo jo predhodno stehtali, zatehtali približno 40 g svežih homogeniziranih tal in jih čez noč sušili v pečici pri 105 °C. Suha tla smo ponovno stehtali in iz razlike izračunali maso vode, ki je izhlapela. Delali smo v dveh ponovitvah in iz formule $((m_{\text{tal}} - m_{\text{suhih tal}})/m_{\text{suhih tal}})$ izračunali povprečno vlažnost v naših tleh. Vlažnost smo izrazili v g vode na g suhih tal.

3.3.2 Sposobnost zadrževanja vode v tleh

Na dno Kopetckijevih lončkov smo položili plast papirnate brisače in vse skupaj potopili v vodo. Tako navlaženo cedilo smo stehtali in dodali približno 30 g tal in vse skupaj stehtali. Potem smo lončke potopili v čašo z destilirano vodo, pokrili z aluminijasto folijo in pustili preko noči. Kopetckijeve lončke smo odcejali do točke, ko se teža ni več spreminjala. Zadnje meritve uporabili za izračun sposobnosti zadrževanja vode. Uporabili smo formulo $(m_{\text{vode v tleh}} / m_{\text{vode v namočenih tleh}}) \times 100$. Delali smo v dveh ponovitvah.

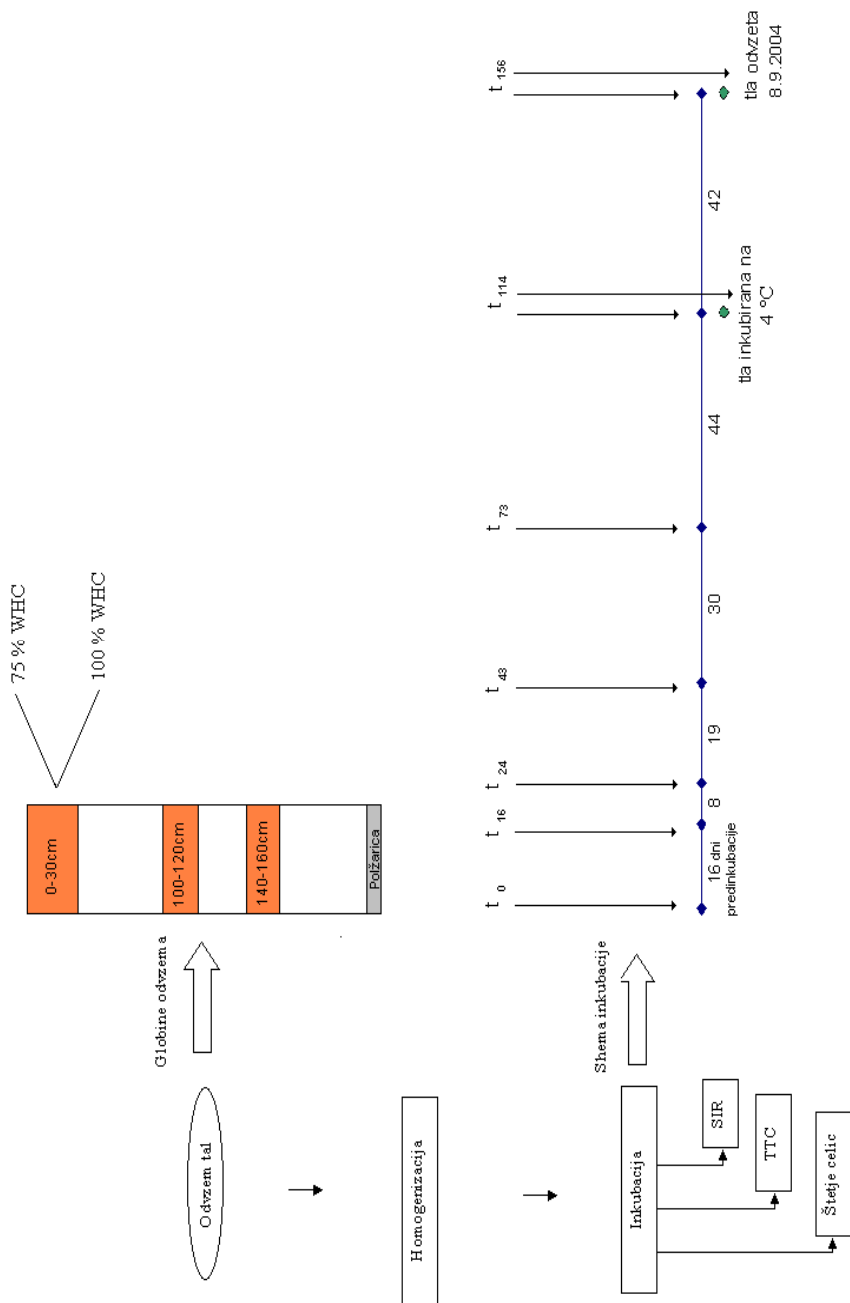
3.3.3 pH

Za določitev pH tal smo v čašo zatehtali 5 g tal in dolili 12 ml dH₂O. Vse skupaj smo premešali in pustili stati eno uro, nato smo tekočino prelili v drugo stekleničko. Okvirno vrednost pH smo določili z lakmusovim papirjem, nato smo pH natančno določili s pH-metrom. Delali smo v treh ponovitvah.

3.4 POTEK INKUBACIJSKEGA POSKUSA

Inkubacijski poskus smo izvedli z vzorci visokoorganskih (HC) tal, ki smo jih odvzeli v marcu, 2004. Po odvzemu in homogenizaciji smo vzorcem tal iz vsake globino določili vlažnost, da smo lahko izračunali koliko gramov vode vsebuje 1 gram tal in kakšna je sposobnost zadrževanja vode (WHC) vzorčenih tal. Te podatke smo potrebovali za izračun 100 % WHC in količine vode, ki smo jo dodali, da smo dosegli želeno vlažnost. Vzorce za inkubacijo smo pripravili v 25 50 ml mikrokozmov, tako da smo po vsakem času inkubacije (0, 16, 24, 43, 73, 114 in 156 dni od nastavitve poskusa) žrtvovali tri ponovitve za vsako različico inkubacijskega poskusa in inkubirana tla analizirali. Vsako eksperimentalno centrifugirko smo s tlemi napolnili do vrha in jo pokrili z gumijastim pokrovčkom. Vzorce tal iz globino 0 – 30 cm smo inkubirali pri dveh različnih vlažnostih, eno pri vlažnosti kot smo jo izmerili v izhodnih vzorcih (75 % WHC) in drugo pri 100 % WHC, kjer smo tla dodatno navlažili z destilirano vodo do 100 % WHC. Vzorce iz globine 100 – 120 cm in vzorce iz globine 140 – 160 cm smo inkubirali le pri 100% WHC. Tla smo inkubirali pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi in v časovnih presledkih 0, 16, 24, 43, 73, 114 in 156 dni od nastavitve poskusa, merili spremembe pH, števila mikrobov in aktivnosti mikrobov, s substratom inducirane respiracije (SIR) in z metodo dehidrogenazne aktivnosti (DHA). Vzoredno, smo na začetku inkubacije shranili vzorce tal na 4 °C in izmerili zgoraj naštete parametre po 114 dneh.

V okviru te raziskave smo analizirali tudi začetno stanje za zgoraj naštete parametre v svežih vzorcih tal, odvzetih v marcu in v svežih tleh, ki smo jih vzorčili v septembru 2004. Vzorčenje v septembru smo izvedli zato, da smo preverili vpliv dejavnikov okolja v naravi na merjene parametre. Shematski prikaz poskusa kaže Slika 7.³



Slika 7: Shematični prikaz poteka poskusa

3.5 ŠTEVILO IN AKTIVNOST MIKROORGANIZMOV V TLEH

3.3.1 Štetje mikroorganizmov pod epifluorescenčnim mikroskopom

V 15 ml centrifugirke smo zatehtali 1 g tal in dodali 9 ml 0,85 % NaCl in 1 ml 37 % formaldehida. Tako fiksirane vzorce smo do analize hranili na 4 °C. Pred uporabo smo centrifugirko temeljito pretresli in počakali da so se grobi delci posedli. Potem smo iz epruvete odvzeli 1 ml suspenzije in jo spravili v Eppendorf cenrifugirko. Objektno stekelce smo razmastili z etrom in nanj narisali krog z znano površino. Po njem smo razmazali 10 µl suspenzije, pustili, da se posuši in razmaz fiksirali nad ognjem. Nato smo to dodali kapljico barvila akridin oranž, pokrili z krovnim stekelcem, nanj kanili kapljico imerzijskega olja in pod epifluorescenčnim mikroskopom šteli obarvane celice. Na vsakem objektnem stekelcu smo prešteli 10 vidnih polj, ki smo jih izbrali naključno. Število mikrobnih celic na gram tal smo izračunali po formuli: $\text{Število celic} = (N \times FM \times R \times 10) / bd$; pri čemer je N število prešteti celic v števni mrežici, FM faktor mikroskopa, R redčitev in bd gostota tal (g/cm^3). Zaradi razlike v gostoti tal smo rezultate preračunali na cm^3 tal. Graf gostote tal je v prilogi 1.

3.3.2 S substratom inducirana respiracija (SIR)

S substratom inducirana respiracija (SIR) je pogosto uporabljena metoda za določanje mikrobne biomase v tleh. Temelji na predpostavki, da je povečana hitrost respiracije, po dodatku substrata, sorazmerna mikrobni biomasi v tleh in sicer: največja hitrost s substratom inducirane respiracije, 1 ml CO₂ na uro, ustreza 40 mg mikrobne biomasega ogljika. S substratom inducirana respiracija izvajana v blatu (soil slurry SIR) je bolj učinkovita zaradi boljše razporeditve substrata in poenotenosti pogojev, saj je tehnika odvisna od vlažnosti tal, naše globine pa se v tem razlikujejo.

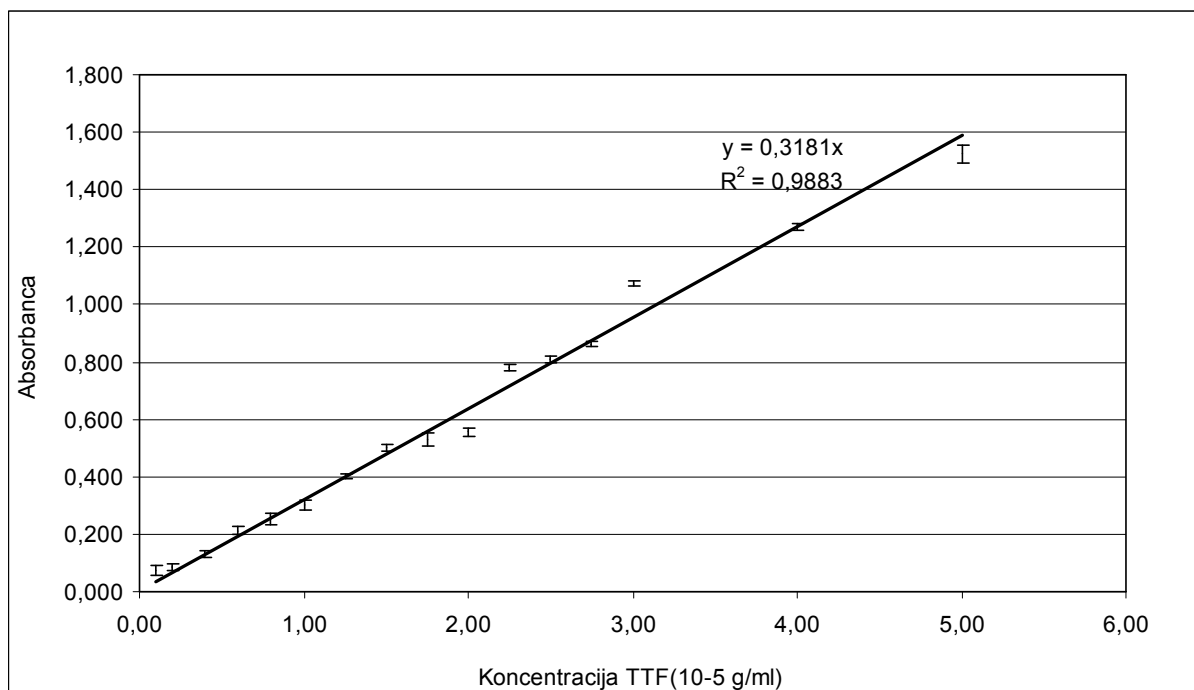
Delali smo v dveh ponovitvah. V penicilinke smo zatehtali 2 g tal, v prvo smo dodali 4 ml dH₂O, ki je služila za kontrolo, v drugo pa smo v vodo dodali glukozo, tako da je bila končna koncentracija 40 mg glukoze na 1 g tal. Penicilinke smo stresali 3 ure pri 100 rpm. Po končanem stresanju smo s plinskim kromatografom (Becker Gas Chromatograph,

model 417) izmerili koncentracijo CO₂ v plinski fazi obeh penicilin. Kontrolo smo odšteli od vzorca in celotno količino sproščenega CO₂ v posodi izračunali po formuli: $V(\text{CO}_2) = C \times (V_p + V_t \times \alpha)$, kjer je C koncentracija CO₂, V_p volumen plinske faze, V_t volumen tekoče faze in α Bunsenov koeficient topnosti plinov v vodi – za CO₂ znaša 0,758. Odziv SIR smo podali v ml CO₂ sproščenega v 1 uri iz 1 cm³ tal.

3.3.3 Dehidrogenazna aktivnost (DHA)

Mikrobno aktivnost smo ocenili z dehidrogenazno aktivnostjo, ki temelji na modificirani metodi po Thalmannu (Brodie in sod., 2002). V 50 ml centrifugirke smo zatehtali 5 g tal in dolili 5 ml raztopine TTC v Tris HCl pufru (0,1M; pH=7,7) v koncentraciji 8 mg/ml in jih dali inkubirati za 24 ur v temi pri 28°C na stresalniku pri 100 rpm. Po inkubaciji smo dolili 40 ml acetona, močno premešali in dali inkubirati še za 2 uri in premešali na vsakih 10 minut. Po dveh urah smo supernatant prelili v Eppendorf centrifugirke, za vsak vzorec dve centrifugirki, in centrifugirali 5 minut pri 6000 rpm. Supernatant smo prelili v kivete in s fotometrom (fotometer MA 9510 Iskra, Slovenija) izmerili absorbanco pri 540 nm. Celotno mikrobno aktivnost smo izrazili kot g nastalega TTF na cm³ tal.

Umeritveno krivuljo smo naredili tako, da smo pripravili 16 znanih koncentracij raztopine TTF v acetonu (0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 4,00; 5,00 x 10⁻⁵ gTTF/ml) in izmerili absorbanco pri 540 nm v 5 ponovitvah. Povprečja smo nanesti na graf in izračunali enačbo premice (Slika 8).



Slika 8: Odvisnost absorbance rztopine TTF v acetonu od njene koncentracije

Tris HCl pufer (0,1 M; pH=7,7) smo pripravili tako, da smo v 1 l dH₂O vmešali 11,44 g Tris HCl in 3,32 g Tris Base.

3.4 MATERIALI

- destilirana voda
- korer Eikelkamp (Nemčija)
- plastične vrečke
- pH lističi (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- formaldehid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- etanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- akridin oranž (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- imerzijsko olje (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- Tris Base (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

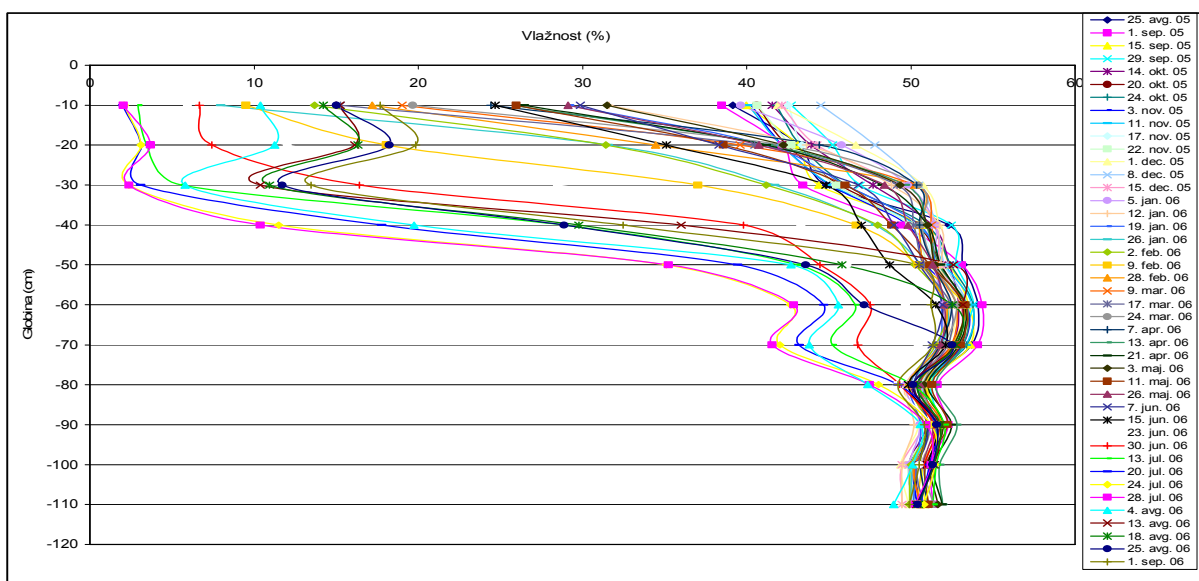
- Tris HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- TTF (2,3,5-triphenyl formazan (TPF), Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- acetone (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

4 REZULTATI

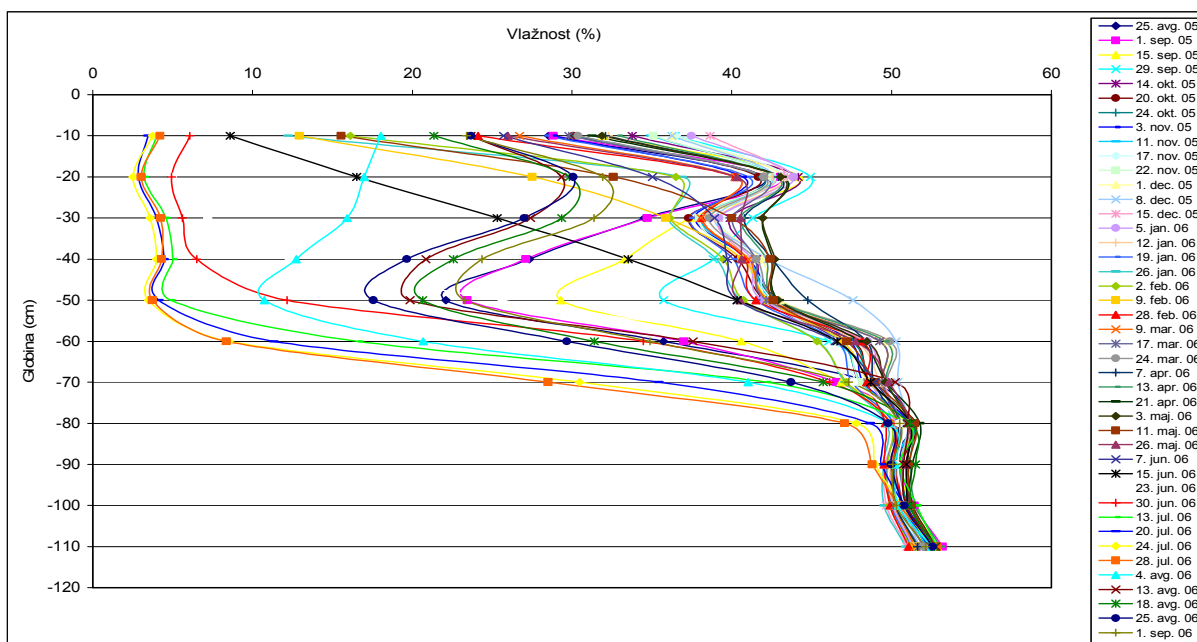
4.1 ANALIZA PODATKOV SEZONSKEGA NIHANJA VSEBNOSTI VODE V TLEH V TALNEM PROFILU DVEH TIPOV TAL LJUBLJANSKEGA BARJA

Od septembra 2005 do septembra 2006 so vzdolž profila barjanskih tal na poskusnem polju v Tomišlju na šestih točkah z Divinerjem 2000 tedensko merili vlažnost visokoorganskih (HC) in nizkoorganskih (LC) tal (Stres in Korpar 2006b). V okviru te diplomske smo pridobljene podatke obdelali

Iz grafov na slikah 9 in 10 vidimo, da je v talnem profilu nizkoorganskih tal (LC) vzorec vsebnosti vode v globljih plasteh (od 80 do 110 cm) ter v zgornjih plasteh 0 – 20 cm podoben tistemu pri profilu visoko organskih tal (HC). Opazna razlika v vsebnosti vode obeh profilov tal se kaže predvsem v slojih od 30 do 80 cm. V teh slojih je vsebnost vode nižja v LC kot v HC in sicer se giblje v obdobju med oktobrom in julijem v območju od 38 do 45 %, zimskega minimuma ni, razen v zgornjih 10 cm. Poleg tega je v LC tleh poletni minimum pod 5% vode in zajame tudi plasti tal do 50 cm globine, medtem ko smo v območju HC tako nizke vrednosti izmerili le do globine 30 cm.

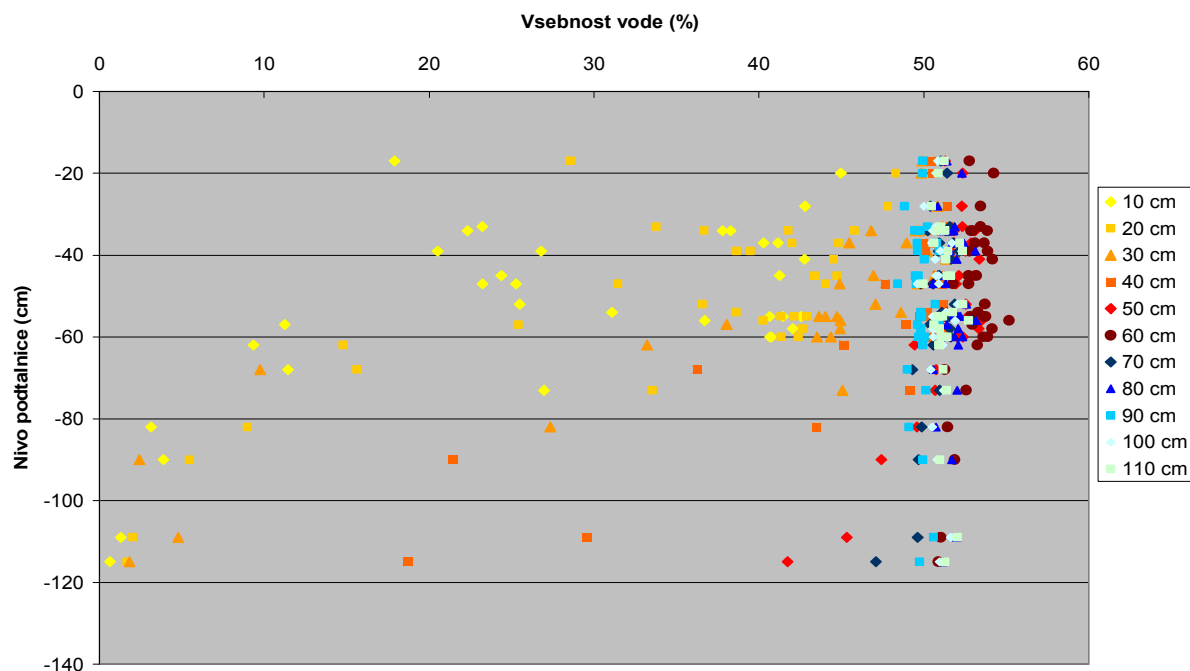


Slika 9: Vlažnost HC tal skozi profil barjanskih tal v obdobju od septembra 2005 do septembra 2006 merjena z Diviner 2000

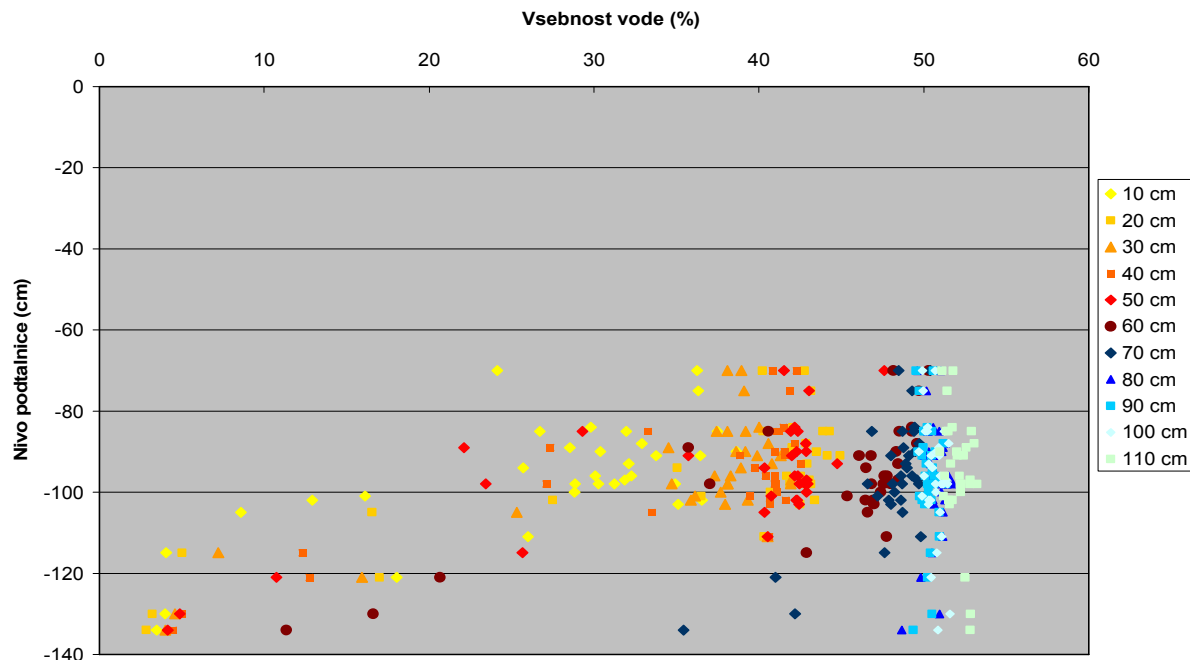


Slika 10: Vlažnost LC tal skozi profil barjanskih tal v obdobju od septembra 2005 do septembra 2006 merjena z Diviner 2000

Primerjava podatkov sezonskega nihanja podtalnice (Hacin, 2006) in vsebnosti vode v tleh (Stres in Korpar, 2006b) (sliki 11 in 12) pokaže, da podtalnica in vsebnost vode nista direktno povezani. Vlažnost v HC tleh močno niha na globinah od 0 do 30 cm tudi pri majhnih spremembah podtalnice, medtem ko v globljih slojih (50 – 110 cm) ostaja vlažnost nespremenjena tudi ob intenzivnem nihanju nivoja podtalnice. V LC tleh opazimo podobno povezavo med nivojem podtalnice in vlažnostjo tal, le da je nihanje v vsebnosti vode intenzivnejše do globine 60 cm

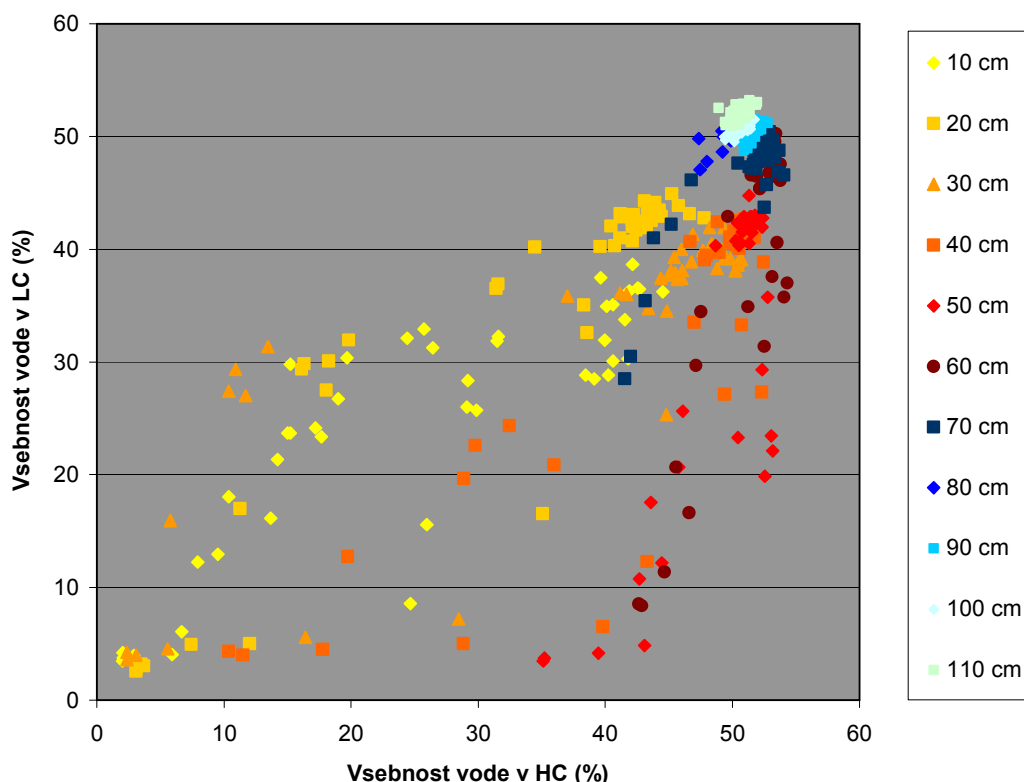


Slika 11: Volumetrična vsebnost vode v odvisnosti od nivoja podtalnice za različne globine HC barjanskih tal merjena z napravo Diviner 2000 (Podatki: Stres in Korpar, 2006b; Hacin, 2006)



Slika 12: Volumetrična vsebnost vode v odvisnosti od nivoja podtalnice za različne globine LC barjanskih tal merjena z napravo Diviner 2000 (Podatki: Stres in Korpar, 2006b; Hacin, 2006)

Primerjava vsebnosti vode v HC in LC tleh pokaže heterogenost glede na globino in tip tal (Slika13). V zgornjem (0 – 30 cm) sloju tal vsebnost vode niha podobno pri obeh tipih tal in je v določenih točkah celo za 5 – 10 % višja v LC kot v HC tleh. Obratno sliko dobimo v globini od 40 do 70 cm, kjer je vsebnost vode očitno višja v HC tleh v primerjavi z LC tlemi in korelacija ni več linearna. Od globine 80 cm navzdol se vsebnost vode v obeh tipih tal ne spreminja



Slika 13: Primerjava volumetrične vsebnosti vode merjene skozi leto v LC in HC tleh za različne globine barjanskih tal (Podatki: Stres in Korpar, 2006b)

4.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PROFILA HC TAL LJUBLJANSKEGA BARJA

Vzorčenje tal na poskusnem polju Ljubljanskega barja smo izvedli 18. marca in 8. septembra 2004. Temperatura tal je bila v marčevskih vzorcih od 5 – 6 °C in se z globino ni veliko spremenila. Temperatura septembrskih vzorcev tal je bila višja, od 15 do 17 °C. pH naših vzorcev je bil skoraj nevtralen. Vlažnost tal se je z globino višala tako pri

marčevskih kot septembrskih vzorcih. Vendar so bila tla septembra vseeno bolj suha kot marca. V marčevskih vzorcih smo izmerili zasičenost tal z vodo na globinah 100 – 120 cm in 140 – 160 cm, medtem, ko je bil zgornji sloj tal zasičen z vodo le 75 %. Tla, ki smo jih vzorčili septembra so vsebovala manj vode. Vidimo tudi, da je bila globina 100 – 120 cm z vodo zasičena le 77 % kar je 15 % manj kot marca.

Preglednica 1: pH, temperatura, vlažnost in WHC tal za različne globine barjanskih tal v dveh časih vzorčenja

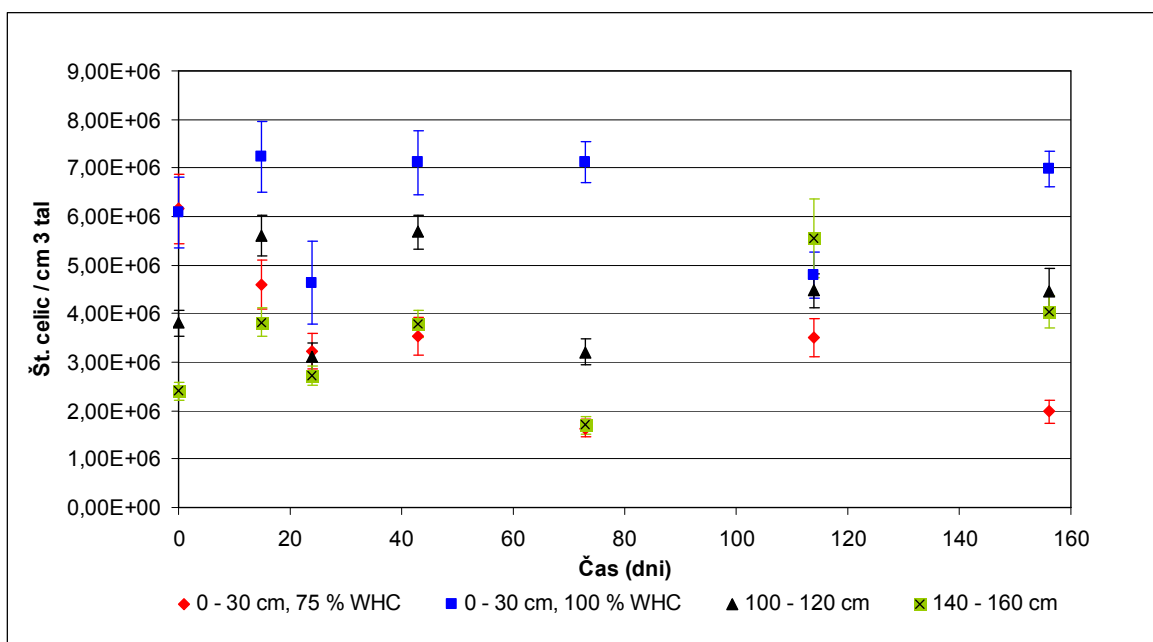
	pH	T (°C)	Vlažnost (g H ₂ O/ g suhih tal)	100 % WHC (g H ₂ O/g suhih tal)
Tla vzorčena 18.3.2004				
Globina 0 – 30 cm	6,8	5	1,35	1,80
Globina 100 – 120 cm	6,7	5	3,87	4,16
Globina 140 – 160 cm	6,5	6	4,27	3,91
Tla vzorčena 8.9.2004				
Globina 0 – 30 cm	6,2	15	1,24	1,80
Globina 100 – 120 cm	6,4	17	3,20	4,16
Globina 140 – 160 cm	6,6	17	4,02	3,91

4.3 DINAMIKA ŠTEVILA IN AKTIVNOSTI MIKROORGANIZMOV V PROFILU VISOKOORGANSKIH (HC) TAL LJUBLJANSKEGA BARJA MED INKUBACIJO PRI SOBNI TEMPERATURI IN PRI ZASIČENOSTI Z VODO

4.3.1 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na število mikroorganizmov v različnih slojih barjanskih tal

V poskusu smo primerjali vzorce barjanskih tal iz treh globin: 0 – 30 cm, 100 – 120 cm in 140 – 160 cm. Vzorec 0 – 30 cm smo inkubirali pri dveh različnih vlažnostih; pri naravni, 75 % WHC in pri 100 % WHC. Vzorca iz globine 100 – 120 cm in 140 – 160 cm sta imela 100 % WHC. Vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi. Število mikroorganizmov smo določili s štetjem pod epifluorescenčnim

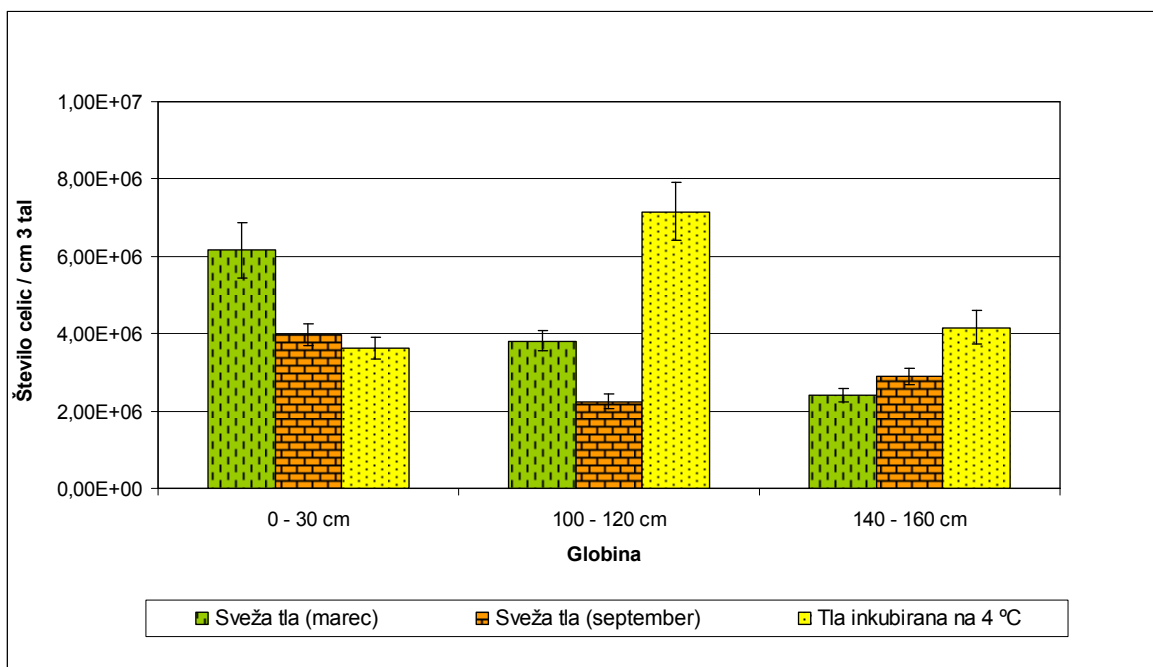
mikroskopom. Ugotovili smo, da število mikroorganizmov z globino upada. Število mikroorganizmov je bilo v vzorcu 0 – 30 cm pri 75 % WHC na začetku inkubacije 6×10^6 na cm^3 tal. V času inkubacije je število mikroorganizmov nihalo. V vzorcih iz globine 0 – 30 cm pri 100 % WHC se je število celic med inkubacijo gibalo med 5×10^6 in 7×10^6 na cm^3 tal. V globljih slojih tal je bilo število mikroorganizmov manjše in sicer v sloju 100 – 120 cm od 3×10^6 do 5×10^6 na cm^3 tal; v sloju 140 – 160 cm pa od 2×10^6 do 4×10^6 na cm^3 tal. Na koncu inkubacije je bilo število podobno kot na začetku ($p > 0,95$), oziroma je celo nekoliko naraslo, razen na globini 0 – 30 cm pri 75 % WHC, kjer se je število mikroorganizmov znižalo od 6×10^6 na 2×10^6 na cm^3 tal. Opazen je bil tudi padec v številu mikroorganizmov po 30 dneh inkubacije pri vzorcih iz vseh globin.



Slika 14: Sprememba števila celic v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi pri različnih globinah barjanskih tal

4.3.2 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na število mikroorganizmov v različnih slojih tal Ljubljanskega barja

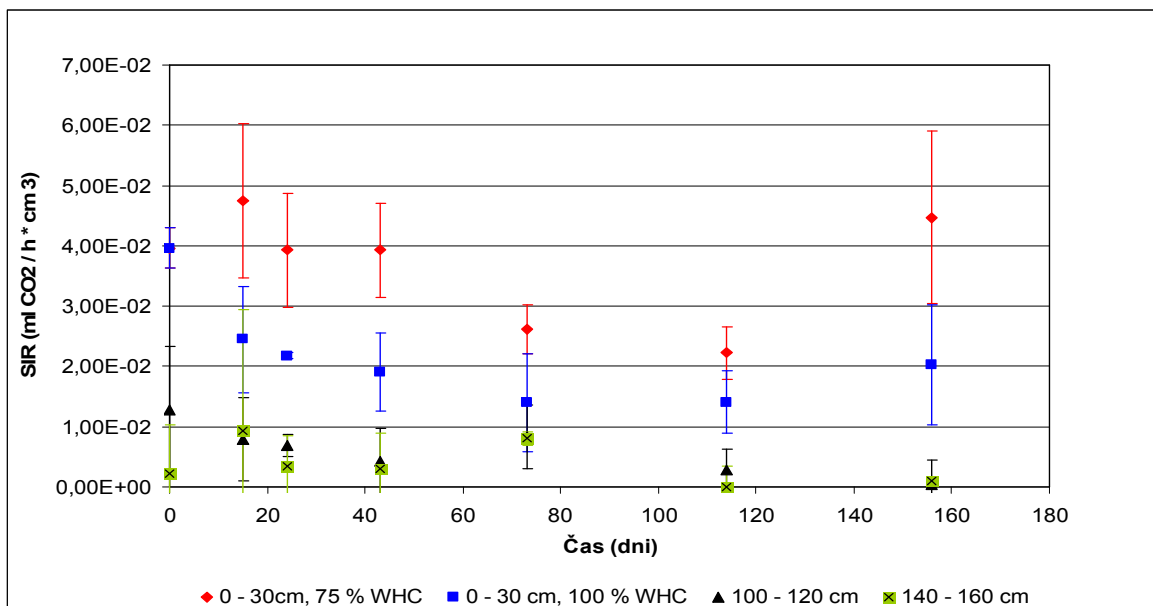
V okviru tega poskusa smo ugotavljali vpliv inkubacije tal pri nizki temperaturi (4 °C) v primerjavi z izpostavljenostjo tal poletnim vremenskim nihanjem v naravi. Rezultati so pokazali, da se je število mikroorganizmov v marčevskih tleh inkubiranih pri 4 °C razlikovalo od tistega na začetku inkubacije. V sloju tal 0 – 30 cm je po 114 dnevih inkubacije število padlo skoraj na polovico (od 6×10^6 na $3,6 \times 10^6$ na cm^3 tal). V slojih 100 – 120 cm in 140 – 160 cm pa se je v primerjavi z začetnim stanjem skoraj podvojilo. Poleg tega se število mikroorganizmov v tleh spreminjalo tudi v odvisnosti od časa vzorčenja. Največjo spremembo smo izmerili v zgornjem sloju tal od 0 – 30 cm, kjer se je število mikroorganizmov v septembrskih tleh znižalo skoraj za polovico v primerjavi z številom v marčevskih tleh. Nekoliko manjši septembrski upad smo izmerili v sloju med 100 in 120 cm, medtem ko je bilo število mikrobov najbolj stabilno v sloju med 140 in 160 cm.



Slika 15: Število celic v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi s številom celic v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C

4.3.3 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na mikrobno aktivnost v različnih slojih barjanskih tal merjen z metodo s substratom inducirane respiracije (SIR)

Ugotovili smo, da je bila mikrobna aktivnost podana kot SIR na začetku in na koncu inkubacije signifikantno ($p > 0,95$) višja v zgornjem sloju tal v primerjavi z obema spodnjima (100 – 120 in 140 – 160 cm) slojema tal in sicer je v zgornjem sloju tal bila $3,96 \times 10^{-2}$ ml CO₂ / h * cm³ tal medtem ko sta izmerjeni vrednosti za spodnji sloj $1,27 \times 10^{-2}$ in $2,21 \times 10^{-3}$ ml CO₂ / h * cm³ tal. Čeprav je mikrobna aktivnost tekom inkubacije nihala, se je ta razlika ohranila pri večini meritvenih točk. Vpliv visoke vlažnosti in s tem vpliv anoksičnih razmer se je pokazal v blagem upadu mikrobne aktivnosti v anoksičnih razmerah, vendar proti koncu inkubacije razlike med tlemi inkubiranimi pri 75 % WHC in pri 100 % WHC niso bile več signifikantne. Najbolj očiten padec aktivnosti v anoksičnih tleh je bil v prvih 16 dneh inkubacije. Sloja 100 – 120 cm in 140 – 160 cm se nista bistveno razlikovala v mikrobni aktivnosti, ki se s časom inkubacije ni signifikantno spreminjala in je bila nižja v začetku in tudi na koncu inkubacije v primerjavi z zgornjim slojem tal.

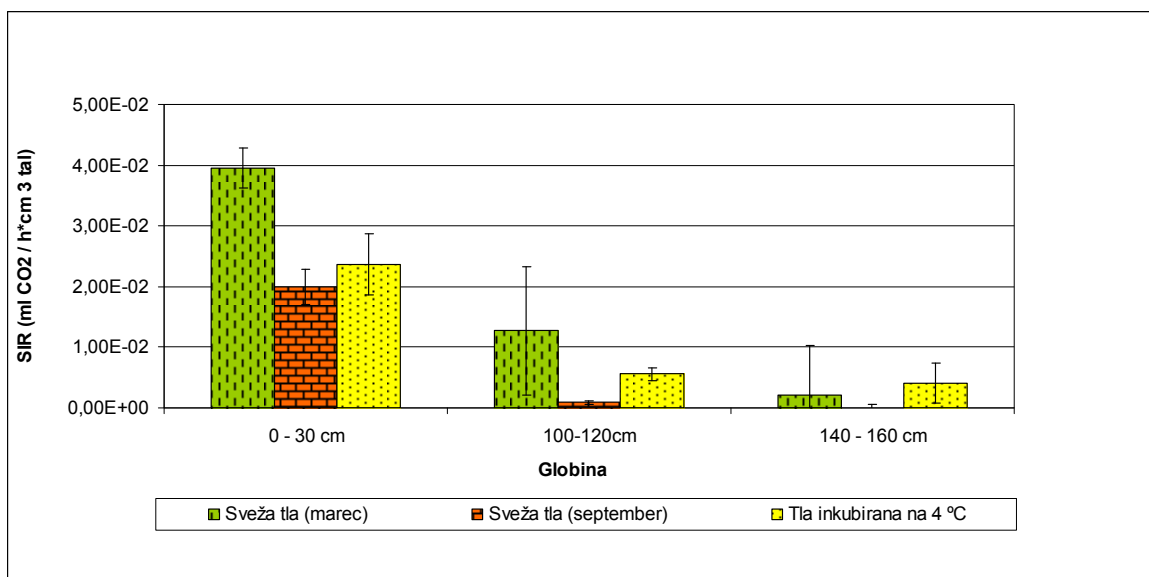


Slika 16: Sprememba mikrobne aktivnosti merjene s SIR v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi, pri različnih globinah barjanskih tal

4.3.4 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na aktivnost mikroorganizmov merjeno s SIR v različnih slojih tal Ljubljanskega barja

Mikrobna aktivnost v svežih tleh izražena kot SIR je z globino padala ne glede na čas vzorčenja in je bila na splošno nižja v septembrskih vzorcih tal v primerjavi z marčevskimi vzorci. Upad aktivnosti je bil posebej očitno med zgornjim in srednjim slojem tal, saj se je aktivnost z globino zmanjšala skoraj 23 krat.

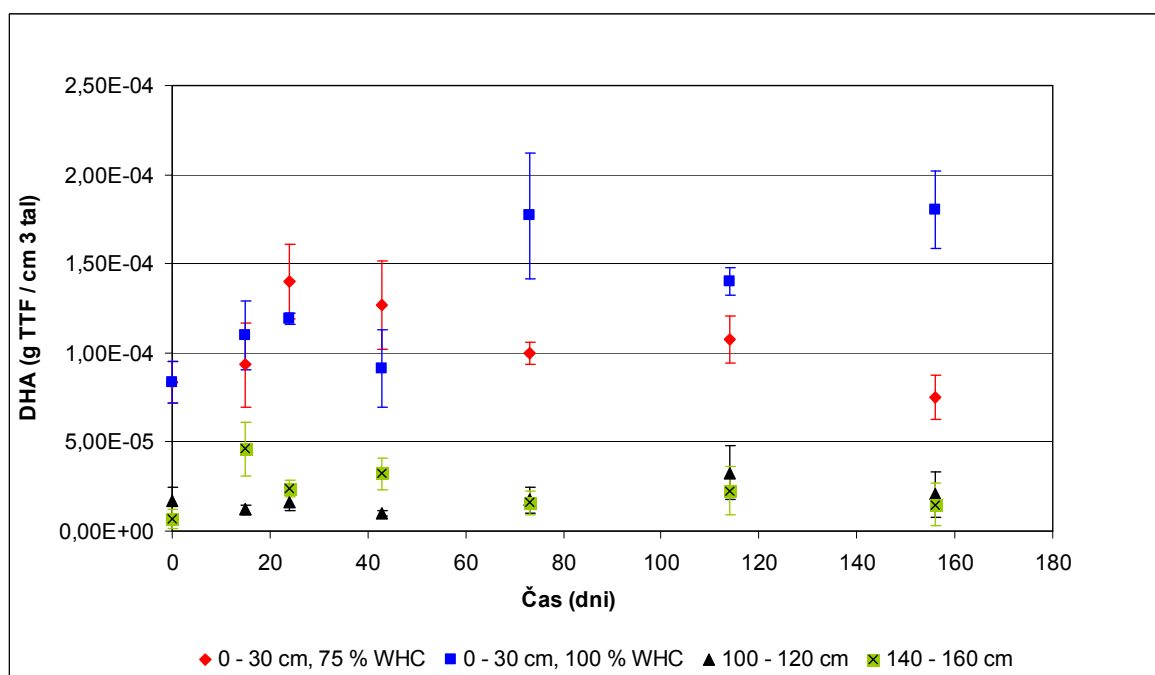
Inkubacija tal iz globine 0 – 30 cm 114 dni pri temperaturi 4 °C je pripeljala do znižanja mikrobne aktivnosti skoraj za polovico, medtem ko inkubacije spodnjih slojev tal pri 4 °C ni signifikantno ($p > 0,95$) vplivala na SIR.



Slika 17: Mikrobna aktivnost merjena s SIR v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi mikrobno aktivnostjo merjeno s SIR v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C

4.3.5 Vpliv inkubacije HC tal pri sobni temperaturi in pri popolni zasičenosti z vodo na dehidrogenazno aktivnost (DHA) v različnih slojih barjanskih tal

Podobno, kot so pokazali že rezultati merjenja SIR, je tudi ocena mikrobne aktivnosti s pomočjo redukcije TTC, ki podaja dehidrogenazno aktivnost v talnih vzorcih, pokazala, da je mikrobna aktivnost v zgornjem sloju tal signifikantno višja ($p > 0,99$) kot v obeh spodnjih slojih tal (100 – 120 in 140 – 160 cm). In sicer je bila izmerjena aktivnost med 0 in 30 cm $8,36 \times 10^{-5}$ g TTF / cm³ tal, medtem ko je bila aktivnost v sloju tal 100 do 120 cm $1,67 \times 10^{-5}$ g TTF / cm³ tal in v sloju tal 140 – 160 cm $7,15 \times 10^{-6}$ g TTF / cm³ tal. Rezultati so torej pokazali, da med spodnjima slojema ni signifikantnih razlik med začetkom in koncem inkubacije po 156 dneh. V vzorcih tal, ki so bili inkubirani pri 100 % WHC je prišlo po 70 dneh inkubacije do pospešenega povečevanja dehidrogenazne aktivnosti, ki je na koncu inkubacije dosegla vrednosti $1,20 \times 10^{-4}$ g TTF / cm³ tal, kar je bilo različno od meritev SIR, ki so bile v navlaženih vzorcih tal nižje kot v tleh zgornjega sloja pri 75 % WHC.

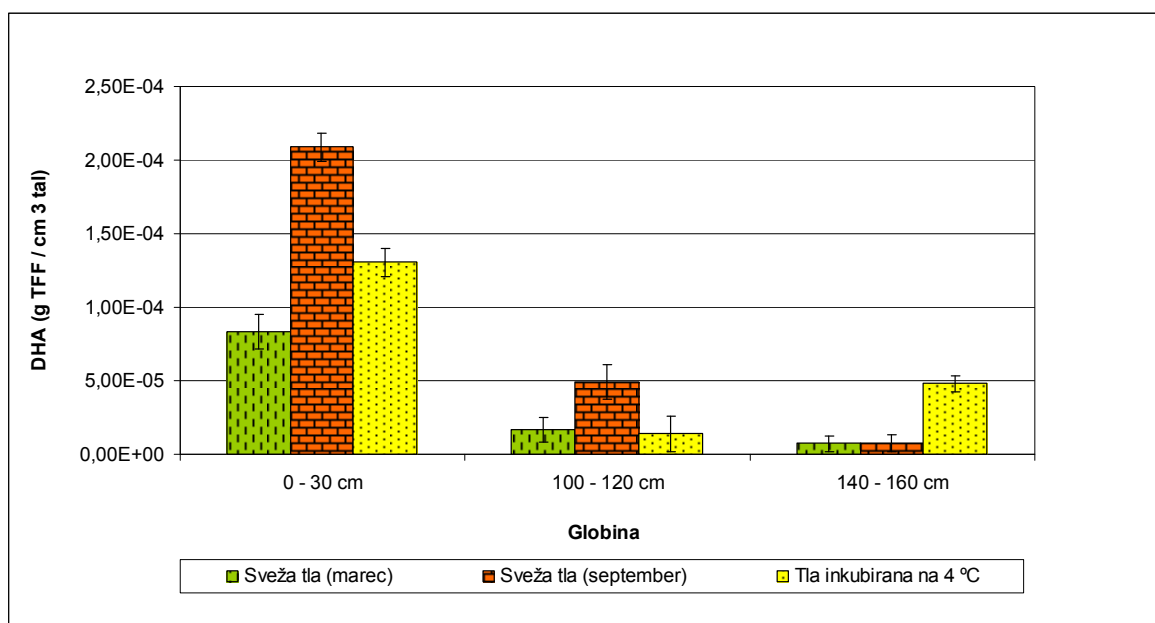


Slika 18: Sprememba mikrobne aktivnosti merjene z DHA v času inkubacije pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi, pri različnih globinah barjanskih tal

4.3.6 Vpliv časa vzorčenja in inkubacije vzorcev pri nizki temperaturi na aktivnost mikroorganizmov merjeno z DHA v različnih slojih tal Ljubljanskega barja

Nadalje so naši rezultati pokazali, da je dehidrogenazna aktivnost (DHA), ne glede na čas vzorčenja višja v zgornjem sloju tal v primerjavi z obema spodnjima slojema in se je v zgornjem (0 – 30 cm) sloju tal spreminjala s časom vzorčenja. DHA je bila nižja v marčevskih vzorcih ($8,36 \times 10^{-5}$ g TTF / cm³ tal), medtem ko je v septembrskih vzorcih dosegla vrednosti $2,09 \times 10^{-4}$ g TTF / cm³ tal.

Podoben trend smo opazili tudi v srednjem sloju tal, medtem ko se DHA v najglobljem sloju tal ni spreminjala s časom vzorčenja. Zanimivo je, da se je DHA v tleh inkubiranih 114 dni pri 4 °C signifikantno povečala v slojih 0 – 30 cm in 140 – 160 cm ($p > 0,95$) in dosegla vrednosti $1,31 \times 10^{-4}$ g TTF / cm³ tal oziroma $4,79 \times 10^{-5}$ g TTF / cm³ tal, medtem ko v sloju tal 100 – 120 cm inkubacija pri 4 °C ni signifikantno vplivala na DHA.



Slika 19: Mikrobna aktivnost merjena z DHA v tleh odvzetih iz različnih globin poskusnega polja marca v primerjavi mikrobno aktivnostjo merjeno z DHA v svežih tleh odvzetih septembra in v tleh inkubiranih 114 dni pri temperaturi 4 °C

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Barje je ekosistem, kjer zaradi zastajanja vode pride do vzpostavitve anaerobioze v talnem profilu. V anaerobnem okolju je razgradnja organske snovi zaradi pomanjkanja elektronskih akceptorjev veliko počasnejša (Bossio in Scow, 1995) in se zato kopiči. Dolgotrajno kopičenja nerazgrajene šote je v tleh ustvarilo veliko zalogo ogljika. V zadnjih stoletjih pa so človeški posegi (izsuševanje za pridobivanje zemlje, eutrofikacija zaradi gnojenja, rezanje šote) močno spremenili naravne procese razvoja barja. Zaradi izsuševanja so barja veliko manj časa zalita z vodo in v tem času prihaja do aerobne razgradnje nakopičene organske snovi in sproščanja ogljikovega dioksida, ki je skupaj z metanom in didušikovim oksidom eden izmed glavnih toplogrednih plinov. Metan in didušikov oksid nastajata v anaerobnih slojih tal. Zaradi vpliva toplogrednih plinov na globalno segrevanje in velikega prispevka mokrišč k nastajanju le-teh se v zadnjih letih veliko ukvarjajo z ohranjanjem in obnavljanjem mokrišč. Eden izmed načinov je dvig nivoja podtalnice, ki pa ima lahko druge negativne učinke na okolje, kot je na primer vnos dušika in fosforja v podtalnico, kar lahko povzroči eutrofikacijo (Belyea in Clymo, 2001). Hidrologija vpliva na fizikalne, kemične in biološke procese v šotnih barjih in je zato mogoče najpomembnejši proces, ki regulira njihovo funkcijo, razvoj in značilno bigeokemijo (Weiss in sod., 2006).

Primarni viri vode v mokriščih kakršno je Ljubljansko barje so podtalnica in padavine. Izgube pa potekajo z evapotranspiracijo in odtokom podtalnice (DEQ, 2001). S podrobnejšo analizo podatkov meritev podtalnice neposredno pred dežjem in dan po dežju Hacin (2004) ugotavlja, da se v obdobju brez padavin nivo podtalnice v Ljubljanskem barju v povprečju zniža za 2 – 3 cm na dan, ne glede na letni čas, kar pomeni, da so izgube vode z odtokom verjetno pomembnejše od izgub z evapotranspiracijo. V obdobju obilnejših padavin (>30 mm) pa se nivo podtalnice dvigne za približno toliko cm, kot znaša količina padavin. Torej so padavine najpomembnejši dejavnik za ohranjanje nivoja podtalnice.

Iz analize meritev vlažnosti tal na različnih globinah Ljubljanskega barja in nivoja podtalnice med septembrom 2005 in septembrom 2006 lahko ugotovimo, da vsebnost vode niha glede na vremenske razmere in nivo podtalnice. Najbolj očitno je bilo to julija, ko se je zaradi pomanjkanja padavin in visokih temperatur, vlažnost tal zmanjšala tudi v slojih do globine 80 cm. Vsebnost vode v tleh je odvisna tudi od gostote tal. Stres in Korpar (2006a) ugotavljata, da je gostota tal v HC tleh v primerjavi z LC tlemi nižja v globljih slojih tal (30 – 70 cm), medtem ko je od 0 do 20 cm podobna pri obeh tipih tal. Nihanje vlažnosti v zgornjih slojih (0 – 30 cm) je v HC in LC tleh zato skozi leto podobno, pri čemer je vsebnost vode v LC tleh nekoliko nižja. Velik upad v vsebnosti vode opazimo pozimi, preden se začne sneg topiti, še večjega pa poleti, po dolgem obdobju brez padavin in visokih temperatur. Ker podtalnica do teh slojev večino leta ne seže in so LC tla malo bolj gosta kot HC, bi lahko sklepali, da je vsebnost vode v njih odvisna od vremenskih razmer in gostote tal. Primerjava slojev 40, 50, 60 in 70 cm HC in LC obeh tipov tal pokaže, da se vlažnosti precej razlikujejo. Gostota LC tal je v teh slojih tudi do 3-krat večja kot HC tal zato imajo posledično manjšo vsebnost vode. Verjetno so zaradi tega bolj podvrženi vremenskim razmeram kot HC tla. V slojih globljih od 80 cm je vlažnost konstantna skozi vse leto tako v HC kot v LC tleh iz česar lahko sklepamo, da vremenske razmere na te globine ne vplivajo.

Trije dejavniki: vsebnost organske snovi, nivo podtalnice in vremenske razmere vplivajo na vsebnost vode v različnih slojih barjanskih tal in so med seboj povezani. Posredno in neposredno povezavo med vlažnostjo tal ter mikrobno biomaso in aktivnostjo ugotavlja več avtorjev. Medtem ko Tate in Terry (1980) poudarjata, da je vlažnost pogosto limitni dejavnik za mikrobno aktivnost, pa Griffiths in sod. (2003)^b poudarjajo, da so mikroorganizmi v tleh dobro prilagojeni na spremembe v vlažnosti tal. Ker vsebnost vode v tleh vpliva na širok spekter mikrobnih lastnosti, le-te ne moremo direktno povezati s spremembo v strukturi združbe. Vlažnost močno vpliva na fizikalne in kemijske lastnosti tal kot so zračnost, redoks potencial in pH in tako posredno vpliva na mikrobne populacije v tleh (Tate, 1979; Prado in Airoidi, 1999; Barros in sod., 1994). Tate (1979), Brzezinska in sod. (1998) in Griffiths in sod. (2003) ugotavljajo, da je omejujoči faktor v visokoorganskih šotnih tleh kisik in je zato aktivnost mikrobnih združb odvisna od nivoja podtalnice, ki predstavlja mejo med aerobnim in anaerobnim okoljem.

V poskusu smo proučevali odziv mikroorganizmov v različnih globinah visokoorganskih barjanskih tal na inkubacijo pri povišani temperaturi, kot modelni poletni temperaturi in na popolno zasičenost zgornjega sloja tal (0 – 30 cm) z vodo. Število mikroorganizmov smo določili s štetjem pod epifluorescenčnim mikroskopom, njihovo aktivnost pa smo določili z metodama s substratom inducirane respiracije in z merjenjem dehidrogenazne aktivnosti.

Najprej smo določili lastnosti vzorcev tal: vlažnost, pH, temperaturo in WHC. Po pričakovanju se je vlažnost tal z globino večala, saj marca nivo podtalnice niha med 20 in 40 cm globine (Hacin, 2004) in sta spodnja sloja (100 – 120 cm in 140 – 160 cm) pod vodo, sloj 0 do 30 cm pa ne. Spodnja sloja tal (100 – 120 cm in 140 – 160 cm) sta imela 100 % WHC. pH zgornjega sloja (0 – 30 cm) je skoraj nevtralen, kar se sklada s predhodnimi podatki (Kraigher, 2006 in Zajec, 2004). pH v nižjih slojih barjanskih tal rahlo pade. Temperatura tal se nekoliko zviša z globino in je bila v vseh slojih približno trikrat višja v septembru v primerjavi z marcem. Vlažnost se je višala z globino, čeprav je bila septembra nižja v primerjavi z marčevskimi vzorci. To lahko pripišemo suhemu poletju in visoki trenutni temperaturi v času septemberskega vzorčenja.

pH smo merili tudi med inkubacijskim poskusom in se v času ni bistveno spreminjal. Ker so tla zelo kompleksni medij z mnogimi mikronišami, ki se lahko med seboj zelo razlikujejo, predpostavljamo, da spremembe pH v tleh, ki so manjše od 0,5 bistveno ne vplivajo na mikrobne procese in da sprememba pH na naše rezultate verjetno ni bistveno vplivala. Največjo spremembo, pH je padel za približno 1 enoto, smo izmerili po 15 dneh in bi jo lahko pripisali prilagoditvi na spremembo temperature in anaerobioze (Nareth in Sahrawat, 1998).

Kot ugotavljajo že Tate (1979) in Dickinson in sod. (1974) najdemo žive mikroorganizme v vseh slojih tal in se njihovo število v splošnem z globino manjša (Vinther in sod., 1999 in Taylor in sod., 2002). Na mikrobno biomaso v šoti vplivata pH in dostopnost organske snovi, nerazgrajena šota zadrži več hranil in tako vzdržuje večjo mikrobno biomaso (Baum in sod., 2003; Groffman in Hanson, 1996). V globljih slojih so zaradi anaerobioze kompleksne organske snovi rastlinskega materiala težje razgradljive in je dostopnost

ogljika in dušika zato manjša, torej je zaradi manj hranil posledično manjša tudi mikrobna biomasa.

Inkubacija vzorcev pri sobni temperaturi je pokazala, da število celic v vseh slojih tal niha. Največje spremembe smo izmerili v zgornjem sloju tal. V sloju 0 – 30 cm, ki smo ga inkubirali pri naravni vlažnosti je število upadlo od 6×10^6 na 2×10^6 , medtem ko je v teh tleh inkubiranih pri 100 % WHC število celic ostalo približno enako. Število mikroorganizmov se prav tako ni signifikantno spremenilo med inkubacijo spodnjih slojev tal. Kepner in Pratt (1993) ugotavljata, da na osnovi razlik v številu celic prešteti pod epifluorescenčnim mikroskopom, ki so manjše od enega reda velikosti, ne moremo oceniti razlike v številu mikroorganizmov v tleh, zato iz naših podatkov sklepamo, da se število mikroorganizmov v naših vzorcih tekom inkubacije ni bistveno spreminjalo.

Podobno bi lahko trdili za okoljske vzorce in vzorce, ki smo jih inkubirali na 4 °C. Število mikroorganizmov je v zgornjem sloju 0 – 30 cm pri 75 % WHC padlo na skoraj polovico. V obeh spodnjih slojih pa se je število podvojilo. Vendar so bile spremembe v številu celic znotraj enega velikostnega reda. Tako bi lahko trdili, kot ugotavljata Rogers in Tate (2001), da je mikrobna biomasa v tleh neodvisna od letnega časa

Aktivnost mikroorganizmov v barjanskih tleh smo merili z dvema metodama; z metodo s substratom inducirane respiracije (SIR) in z metodo sledenja dehidrogenazne aktivnosti (DHA). Čeprav se metoda s SIR ponavadi uporablja za določanje mikrobne biomase v tleh, Brake in sod. (1999) ugotavlja, da ni popolnoma jasno ali se lahko ta metoda, s katero merimo količino izločenega CO₂ in le tega koreliramo z mikrobno biomaso, uporablja tudi za anaerobna organska tla. Tem ugotovitvam se pridružujejo tudi druge raziskave, ki neučinkovitost metode SIR v visokoorganskih tleh pripisujejo drugačnim združbam mikroorganizmov. Kot trdijo Anderson in Domsch (1978), Brake in sod. (1999) ter Wardle in Ghani (1995) metoda s SIR poudarja tisti del mikrobne populacije, ki se na dodatek glukoze odzove z večjo hitrostjo respiracije skoraj takoj (r-strategisti). Rastopina glukoze se hitro razporedi v tleh in jo mikroorganizmi porabijo takoj (Thomsen in sod., 1999). Rastlinski ostanki v anaerobnih šotnih tleh zahtevajo drugačen prehranjevalni slog in zato v šotnih tleh najdemo veliko večje populacije K-strategistov, ki se na dodano glukozo ne

odzovejo takoj ali se na njo sploh ne odzovejo. Fisk in sod. (2003) ugotavljajo, da so lahko odstopanja med izdihanim CO₂ in mikrobno biomaso pri šotnih tleh posledica treh dejavnikov. Prvi dejavnik je že omenjena mikrobna populacije, ki verjetno ni v celoti sposobna metabolizirati glukoze. Razmerje med mikroorganizmi, ki so sposobni hitro metabolizirati glukozo in tistimi, ki je niso, je v šotnih tleh manjše kot v drugih vrstah tal, saj so zaradi drugih poti procesiranja ogljika v zasičenih šotnih tleh namnožene mikrobne populacije z manjšo splošno kapaciteto za hitro porabljanje glukoze. Drug razlog za nezanesljivost CO₂ kot indikatorja biomase je lahko dejstvo, da je razmerje med izdihanim ogljikom in ogljikom shranjenim v biomaso odvisno od dostopnosti ogljika v tleh. Tako lahko pride v tleh z nizko vsebnostjo lahko dostopnega ogljika pri populaciji mikroorganizmov izpostavljenih stresu do shranjevanja glukoznega ogljika namesto njegove takojšnje porabe. Kot tretjo možno razlago manjše mineralizacije ogljika pa Fisk in sod. (2003) navajajo, da je zaradi izpostavljenosti okoljskim stresom mikrobna populacija manj aktivna in ima manjšo sposobnost asimilacije hitro dostopnih hranil. Manjša mikrobna aktivnost v šotnih tleh odraža stresno naravo tega okolja, kjer so mikroorganizmi soočeni z nižjimi temperaturami, pH, pomanjkanjem lahko dostopnih hranil in pogosti anaerobiozi. Zaradi vseh zgoraj omenjenih ugotovitev smo metodo SIR uporabili kot relativno mero aerobne mikrobne aktivnosti in ne za oceno mikrobne biomase.

Ko primerjamo številčnost bakterij v različnih slojih barjanskih tal in njihovo aktivnost vidimo, da se odziv s SIR med sloji tal razlikuje. Spodnja sloja v odzivu s SIR med seboj lepo korelirata, vendar bi glede na podobno število mikroorganizmov v vseh treh slojih, pričakovali podoben odziv s SIR. V globljih slojih je odziv s SIR nižji, kar navaja na sklep, da je v spodnjih slojih manj mikroorganizmov sposobnih hitrega odziva na glukozo. Tudi ko primerjamo namočen in nenamočen sloj med 0 in 30 cm vidimo, da se število in aktivnost merjena s SIR ne ujemajo. V sloju inkubiranem pri 75 % WHC se nista bistveno spreminjali. V zgornjem sloju, inkubiranem pri 100 % WHC oziroma v anaerobnih pogojih se je aktivnost merjena s SIR zmanjšala, kljub temu, da je v tem sloju število mikroorganizmov v grobem enako, kot v sloju inkubiranem pri 75 % WHC. Iz primerjave lahko sklepamo, da so med inkubacijo v anaerobnih pogojih svojo aktivnost obdržali

mikroorganizmi, ki se na dodano glukozo niso sposobni odzvati tako kot tisti, ki so bili inkubirani pri nižji vlažnosti.

Da se v zgornjem sloju barjanskih tal mikrobna aktivnost spreminja glede na čas vzorčenja, ugotavljajo že Kraigher in sod. (2006), ki to razliko pripisujejo vsebnosti vode, saj bi v primeru, da bi bila aktivnost odvisna od temperature morala biti aktivnost mikroorganizmov večja pri višji, septemski, temperaturi. Tudi naši rezultati pokažejo septembra signifikantno manjšo aktivnost od tiste marca, kar bi lahko bilo posledica nižje vlažnosti tal. Hkrati vidimo, da je mikrobna aktivnost merjena s SIR največja v zgornjem sloju tal, ne glede na čas vzorčenja. Podobno korelacijo smo izmerili pri vzorcih v sloju 0 – 30 cm, inkubiranih pri 4 °C, kjer se je verjetno zaradi nizkih temperatur zmanjšala aktivnost mikroorganizmov. V spodnjih slojih nismo izmerili signifikantnih sprememb v aktivnosti mikroorganizmov.

Mikrobno aktivnost smo spremljali tudi z merjenjem dehidrogenazne aktivnosti (DHA). Dehidrogenaze so prisotne v vseh mikroorganizmih in so znotrajcelični encimi zato z večjo verjetnostjo odražajo aktivnost celic, kot kakšen drug encim, ki ga lahko najdemo tudi prostega v tleh. Ocena DHA naj bi odražala oksidativno aktivnost tal in s tem število aktivnih bakterij (Taylor in sod., 2002). Tudi s to metodo smo ugotovili, da aktivnost mikroorganizmov z globino pada in je v spodnjih slojih (100 – 120 cm in 140 – 160 cm) skoraj zanemarljiva. Glede na ujemanje SIR in DHA v teh slojih ter dokaj visoko oceno števila mikroorganizmov, bi lahko sklepali, da so mikroorganizmi v spodnjih slojih tal veliko manj aktivni kot v zgornjem sloju. Ker se njihova aktivnost skozi inkubacijo ne spreminja se očitno ne odzivajo niti na povišano temperaturo.

Brzezinska in sod. (1998) ugotavlja tesno povezavo med DHA, zračnim statusom tal in temperaturo. Glavni faktor ki določa DHA je zračni status tal. Dobro zračna tla imajo redoks potencial višji kot 300 mV in nizke koncentracije Fe^{2+} . Povečana vsebnost vode z zapolnitvijo zračnih por v tleh zmanjša zračnost tal ter tako spremeni status tal iz oksičnih v anoksična. V poplavljenih tleh je prisotni kisik hitro izčrpan, redoks potencial pade, porabljati se začnejo drugi sprejemniki elektronov (nitrat, mangan, železo, sulfat in ogljikov dioksid) in tako pride do premika v populaciji od aerobnih k anaerobnim

mikroorganizmom. Anaerobni metabolizem inducira znotrajcelične dehidrogenaze in tako se poveča DHA. Povišana temperatura zviša dehidrogenazno aktivnost posredno, saj poveča potrebo po kisiku in tako še pospeši transformacijo v redoks stanju. Signifikantno večjo produkcijo formazana v sistemih inkubiranih pri anaerobnih pogojih ugotavljajo tudi Ross (1971) ter Tate in Terry (1980), Casida (1977) pa pripisuje zmanjšano DHA manjši vlažnosti.

Ko primerjamo DHA v obeh različicah zgornjega dela barjanskih tal vidimo da je prišlo pri tleh namočenih do 100 % WHC do significantne razlike. Ker smo z zasičenjem tal z vodo dosegli anaerobiozo se je tako, kot ugotavljajo Brzezinska in sod. (1998), povečala dehidrogenazna aktivnost, kljub temu, da se število mikroorganizmov ni significantno spremenilo. Ko primerjamo rezultate SIR in DHA zgornjega sloja tal vidimo, da je verjetno prišlo do spremembe v aktivnosti združbe in je tekom inkubacije v tleh sloja 0 – 30 cm namočenih do 100 % WHC postal aktiven tisti del populacije mikroorganizmov z anaerobnim metabolizmom.

Kljub temu da Frankenburger in Dick (1983) trdita, da DHA korelira z mikrobno respiracijo merjeno preko sproščanja CO₂ iz tal, ki jim je bila dodana glukoza, naši rezultati tega niso potrdili. DHA je odvisna tudi od prisotnosti drugih elektronskih akceptorjev, saj se TTC ne bo reduciral dokler niso porabljeni vsi alternativni akceptorji. Takšne neskladnosti med redukcijo TTC in hitrostjo dihanja, ki so lahko posledica dejstva, da je TTC kot akceptor uporabljen šele, ko so izčrpani vsi drugi elektroski akceptorji ugotavljajo tudi Alef in Nannipieri (1995) ter Taylor in sod. (2002).

Sezonske spremembe v aktivnosti in številčnosti mikroorganizmov, kot posledico sprememb v bakterijskih populacijah omenjajo že Bardgett in sod. (1999), Rogers in Tate (2001) ter Kraigher in sod. (2006). Kot vidimo iz rezultatov se je v naših vzorcih DHA povečala septembra, ko je bila temperatura višja kot marca in po inkubaciji pri 4 °C. O razlogu za povečanje aktivnosti ne moremo sklepati.

Glede na spremembe v aktivnosti mikroorganizmov, ki smo jih izmerili tekom inkubacije bi bilo v prihodnosti zanimivo pogledati kako se v takšnem poskusu spreminja struktura mikrobnih združb in le to korelirati s premikom združbe iz aerobne v anaerobno.

5.2 SKLEPI

- Zgornje sloje barjanskih tal (0 – 30 cm) le redko doseže podtalnica zato je vsebnost vode v tleh Ljubljanskega barja v veliki meri odvisna od količine padavin in temperature zraka.
- Vsebnost vode v srednjih slojih barjanskih tal je v največji meri odvisna od njihove gostote, ki vpliva na količino vode v tleh. Odvisna je tudi od količine padavin in temperature zraka, ki vplivata na napajanje tal in izparevanje vode iz tal.
- Nizkoorganska tla so v srednjih slojih (40, 50, 60 in 70 cm) bolj gosta in lahko zadržijo manj vode, zato so ti sloji tal bolj občutljivi na obdobja z manj padavinami in visokimi temperaturami, kot isti sloji visokoorganskiha tal.
- pH barjanskih tal je približno nevtralen in se ne spreminja glede na čas in globino vzorčenja ter spremembo temperature.
- Število in aktivnost mikroorganizmov v barjanskih tleh z globino padata in se v spodnjih slojih (100 – 120 cm in 140 – 160 cm) med inkubacijo pri sobni in pri nizki temperaturi (4 °C) ne spreminjata. Prav tako v teh slojih ni signifikantnih razlik glede na čas vzorčenja
- Aktivnost mikroorganizmov v zgornjem sloju (0 – 30 cm) barjanskih tal je odvisna od vsebnosti vode. Aktivnost mikroorganizmov merjena s metodo substratom inducirane respiracije (SIR) v anaerobnih pogojih (pri 100 % WHC) med inkubacijo pade, dehidrogenazna aktivnost (DHA) pa naraste.

- Pri nizki temperaturi inkubacije (4 °C) se v zgornjem sloju barjanskih tal (0 – 30 cm) število mikroorganizmov in SIR zmanjšata, medtem ko se poveča dehidrogenazna aktivnost.

6 POVZETEK

Barja so mokrišča z visoko biološko raznolikostjo in s pomembnimi naravnimi funkcijami. So specifični ekosistemi, za katere je značilno začasno zastajanje vode in vzpostavitev anaerobioze. Zaradi anaerobnih razmer je razgradnja biomase počasnejša kot njeno nastajanje, kar vodi do akumulacije organske snovi. Zaradi izkoriščanja rodovitne zemlje in rezanja šote za kurjavo je prišlo v preteklosti do krčenj teh ekosistemov. Danes pa zaradi pomembnih ekoloških funkcij barij, kot so čiščenje vode, skladiščenje organskega ogljika in shranjevanja vode, skušajo le ta ohranjati in obnavljati.

Ljubljansko barje je najjužneje ležeče nizko barje v Evropi. Poskusno polje na njem je na območju z ohranjeno šoto, ki lahko sega tudi do globine treh metrov. Del polja predstavljajo organsko mineralna tla z rečnimi glinenimi nanosi z nižjo vsebnostjo organske snovi, del pa predstavljajo visokoorganska tla brez glinenih nanosov in z dvakrat večjo vsebnostjo organske snovi.

V naši diplomski smo se ukvarjali z dvema dejavnikoma barjanskih tal z vsebnostjo vode z mikrobno združbo v njih. Za določitev vsebnosti vode so skozi leto v tedenskih intervalih z napravo Diviner 2000 merili procent vode v visoko in nizkoorganskih tleh, mi pa smo v okviru te diplomske naloge podatke obdelali.

Za ugotavljanje števila in aktivnosti mikroorganizmov na treh različnih globinah barjanskih tal in njihovo spremembo na povišano temperaturo smo izvedli 156 dni trajajoč inkubacijski poskus v mikrokozmih pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi. Število mikroorganizmov smo določili s štetjem pod epifluorescenčnim mikroskopom, njihovo aktivnost pa smo sledili z metodama s substratom inducirane respiracije in z dehidrogenazno aktivnostjo.

Ko smo primerjali vsebnost vode v visoko in nizkoorganskih tleh smo ugotovili, da se vzorci nihanja vsebnosti vode v tleh skozi leto, razlikujejo predvsem v slojih na globinah od 40 do 70 cm. V zgornjih slojih tal, v katerih vlažnost skozi leto najbolj niha, je vsebnost vode tako HC kot LC tal približno enaka, v slojih nižjih od 80 cm pa vlažnost tal ne niha

več in ostaja konstanta skozi vse leto. Ker podtalnica do zgornjih slojev (0 – 30 cm) večino leta ne seže, lahko sklepamo, da je nihanje vlažnosti posledica vremenskih razmer, v največji meri padavin in temperatur. Razlog za veliko razliko v vsebnosti vode med HC in LC tlemi v slojih od 40 do 70 cm je razlika v njihovi gostoti. Nizkoorganska tla so veliko gostejša in zato vsebujejo manj vode. Ker vsebujejo manj vode in podtalnica do njih večino leta ne seže, so bolj podvržena vremenskim vplivom kot HC tla.

Vsi trije dejavniki: vsebnost organske snovi, nivo podtalnice in vremenske razmere skupaj vplivajo na vsebnost vode v različnih slojih barjanskih tal in so med seboj povezani. Vlažnost tal pa vpliva na mikrobno biomaso in aktivnost posredno in neposredno. Posredno lahko vpliva na topnost in dostopnost substratov, difuzijo plinov, pH tal, temperaturo, rizodepozicijo in na raznolikost združbe. Dostopnost vode pa lahko inhibira mikrobno aktivnost z zniževanjem vodnega potenciala in s tem zmanjšanje hidratacije in aktivnosti encimov ter tako neposredno vpliva na fiziološki status bakterij.

Z inkubacijskim poskusom v mikrokozmi smo ugotovili, da število celic med inkubacijo pri sobni temperaturi, kot modelni poletni temperaturi, niha, vendar se bistveno ne spremeni. Aktivnost merjena tako z SIR kot s TTC je bila največja zgornjem sloju. Z zasičenjem zgornjega sloja z vodo se je aerobna aktivnost merjena s SIR zmanjšala, medtem ko se je anaerobna aktivnost merjena z DHA povečala.

Inkubacija odvzetih vzorcev pri 4 °C je pokazala, da se aktivnost merjena s SIR zmanjša, dehidrogenazna pa poveča. Bistvenih sezonskih sprememb v številu celic nismo izmerili, izmerili pa smo razliko v aktivnosti in sicer je bila septembra aerobna aktivnost manjša in anaerobna večja glede na spomladansko aktivnost.

7 VIRI

Alef K., Nannipieri P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, San Diego, Academic Press: 576 str.

Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1978. A physiological method for quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 215-221

Atlas R.M., Bartha R. 1993. *Microbial ecology – fundamentals and application*. 4th ed. Redwood City, The Benjamin/Cummings Publishing co.: 694 str

Bardgett R.D., Lovell R.D., Hobbs P.J., Jarvis S.C. 1999. Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 7: 1021 - 1030

Barros N., Gomez-Orellana I., Feijóo S., Balsa R. 1995. The effect of soil moisture on soil microbial activity studied by microcalorimetry. *Thermochimica Acta*, 249: 161-168

Baum C., Leinweber P., Schlichting A. 2003. Effects of chemical conditions in re-wetted peats on temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology*, 22: 167-174

Belyea L.R., Clymo R.S. 2001. Feedback control of the rate of peat formation. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences*, 268, 1473: 1315-1321

Bossio D.A., Fleck J.A., Scow K.M., Fujii R. 2006. Alteration of soil microbial communities and water quality in restored wetlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1223-1233

Bossio D.A., Scow K.W. 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 11: 4043-4050

Bragg O.M. 2002. Hydrology of peat-forming wetlands in Scotland. *Science of the Total Environment*, 294, 1-3: 111-129

Brake M., Höper H., Joergensen R.G. 1999. Land use-induced changes in activity and biomass of microorganisms in raised bog peats at different depths. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1489-1497

Brinson M.M., Malvárez A.I. 2002. Temperate freshwater wetlands: types, status, and threats. *Environmental Conservation*, 29, 2: 115-133

Brodie E., Edwards S., Clipson N. 2002. Bacterial community dynamics across floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystems. *Microbial Ecology*, 44: 260-270

Bryan V.S. 1955. Chromosome studies in the genus *Sphagnum*. *Bryologist*, 58, 1: 16-39

Brzezinska M., Stepniewska Z., Stepniewski W. 1998. Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 13: 1783-1790

Casida L.E. 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 6: 630-636

Charman D. 2002. Peatlands and environmental change. London, New York, J. Wiley & Sons: 301 str.

Clymo R.S. 1965. Experiments on the breakdown of *Sphagnum* in two bogs. *Journal of Ecology*, 53: 747-758.

Cowardin L.M., Carter V., Golet F.C., La Roe E.T. 1979. Classification of wetlands and deepwater habitats in the United States. U.S. Reston, National Wetlands Research Centre (December 1979) <http://www.nwrc.usgs.gov/wdb/pub/others/79-31.pdf> (september 2006): 144 str.

DEQ – Department of Environmental Quality. 2001. MDEQ Wetland identification manual. Michigan, MDEQ – Michigan Department of Environmental Quality (2001) <http://www.deq.state.mi.us/documents/deq-water-wetlands-idmanualchap2.pdf> (avgust 2006): 8 str.

Dickinson C.H., Wallace B., Given P.H. 1974. Microbial activity in Florida Everglades peat. *New Phytology*, 73: 107-113

EC – European Commission. Good management practice for Natura 2000. Brussels, European Commission. http://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/management/gp/wetlands_intro.html (avgust 2006): 2 str.

EEA – European Environment Agency. 2003. Wetlands in the EEA's third assessment of Europe's environment. Gland, The Ramsar Convention Secretariat. (June 2003) http://www.ramsar.org/wn/w.n.eea_3d_assessment.htm (avgust 2006): 2 str.

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

Fisk M.C., Ruether K.F., Yavitt J.B. 2003. Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 591-602

Frankenberger W.T.Jr., Dick W.A. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and microbial indices in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 47, 5: 945-951

Geister I. 1995. Ljubljansko barje. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 199 str.

Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J. 2003. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 12: 6961-6968

Groffman P.M., Hanson G.C. 1996. Variation in microbial biomass and activity in four different wetland types. *Soil Science Society of America Journal*, 60: 622-629

Hacin J. 2006. Meritve nivoja podtalnice na poskusnem polju Ljubljanskega barja v Tomišlju v visokoorganskih in nizkoorganskih tleh. Neobjavljeni podatki. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo: 1 str.

Hacin J. 2004. Opredelitev vodnega režima v bodočem krajinskem parku Ljubljansko barje. Raziskovalni projekt. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45 str.

Hacin J., Stres B., Mahne I. 2004. Environmental gradients and microbial activity in the fens of Ljubljana marsh. V: *Microbial planet: sub-surface to space: ISME 10: Mexico 2004: 10th International Symposium on Microbial Ecology ISME-10, Cancun, Mexico, August 22-27, 2004: book of abstracts. Cancun, International Society for Microbial Ecology*: str. 40

Jager G., Bruins E.H. 1975. Effect of repeated drying at different temperatures on soil organic matter decomposition and characteristics, and on the soil micro flora. *Soil Biology and Biochemistry*, 7, 2: 153-159

Jones T. 1997. *Wetland Conservation in Europe - A Question of Priorities*. Gland, The Ramsar Convention Secretariat. (September 1997)

http://www.ramsar.org/wn/w.n.europe_abstract.htm (avgust 2006): 4 str.

Jones T. 2001. The role of wetlands in river basin management. Implementing the EU Water Framework Directive: A Seminar Series on Water, 9-10 nov. 2000, Brussels. , The Ramsar Convention Secretariat. (September 2001)

<http://assets.panda.org/downloads/sem2-syn-en.pdf> (avgust 2006): 22 str.

Kepner R.L.Jr., Pratt J.R. 1993. Effects of sediments on estimates of bacterial density. Transactions of the American Microscopical Society, 112, 4:316 – 330

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

Kramer E. 1905. Das Laibacher Moor. Das Grosste und interessanteste Moor Ostereichs in naturwissenschaftliher, kulturtechnischer und landwirkschaften Beziehung. Laibach, I. Kleinmayr & F. Bamberg: 205 str.

Ljubljansko barje. 2006. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za varstvo narave.

http://www.zrsvn.si/slo/lj/lj_ljubljansko.asp (maj 2006): 1 str.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, Prentice-Hall: 991 str.

Martinčič A. 2003. Barje na Ljubljanskem barju – nekdaj, včeraj, danes in jutri. Proteus, 65,6: 247-256

Meissner R., Leinweber P. 2004. Program for the prevention of diffuse pollution with phosphorus from degraded and re-wetted peat soils. Leipzig, UFZ – Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Soil Science: 159 str.

Mitsch W.J., Gosselink J.G. 2000. Wetlands. 3rd ed. New York, John Wiley: 920 str.

Moore P.D. 1995. Biological processes controlling the development of modern peat-forming ecosystems. *International Journal of Coal Geology*, 28: 99-110

Narteh L.T., Sahrawat K.L. 1998. Influence of flooding on electrochemical and chemical properties of West African soils. *Geoderma*, 87, 3-4: 179-207

Nivet C., Frazier S. 2001. Status of national wetland inventories in Europe: Update on a Pan-European meta-wetland inventory project: Workshop 3 "Wetland inventory and assessment". Gland, The Ramsar Convention Secretariat. (October 2001), http://www.ramsar.org/mtg/mtg_reg_europe2001_3nivet_e.doc (avgust 2006): 2 str.

Orožen Adamič M. 1998. Ljubljansko barje. V: Slovenija, pokrajine in ljudje. Sestavek v knjigi. Perko D., Orožen-Adamič M. (ur.), Ljubljana, Maladinska knjiga: 735 str.

Peterlin S. 1971. Nekoč je bilo Ljubljansko barje. *Proteus*, 33: 425-429

Prado A.G.S., Airoidi C. 1999. The influence of moisture on microbial activity of soils. *Thermochimica Acta* 332: 71-74

Quinty F., Rochefort L. 2003. Peatland restoration guide. 2nd ed. Québec, Canadian Sphagnum Peat Moss Association and New Brunswick Department of Natural Resources and Energy (February 2005) http://www.gret-perg.ulaval.ca/en_tourbiere.html (avgust 2006): 8 str.

Ramsar Convention Secretariat. 2006. The Ramsar Convention manual: a guide to the Convention on wetlands (Ramsar, Iran, 1971). 4th ed. Gland, Ramsar Convention Secretariat. (2006) http://www.ramsar.org/lib/lib_manual2006e.htm (avgust 2006): 90 str

Rogers B.F., Tate R.L.(III). 2001. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1389-1401

Ross D.J. 1971. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pastures. *Soil Biology and Biochemistry*, 2: 97-110

Soil organic matter. 2004. Washington, Washington State University, Tree Fruit Research and Extension Center (July 2004)

<http://soils.tfrec.wsu.edu/mg/organic.htm> (januar 2006): 2 str.

Stark J.M., Firestone M.K. 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 218-221

Stres B. 2008 Slika cevi, ki je bila vstavljena v barjanska tla na poskusnem polju Ljubljanskega barja. Osebno dopisovanje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo: 1 str.

Stres B., Korpar P. 2006a. Gostota tal vzdolž profila barjanskih tal. Neobjavljeni podatki. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo: 1 str.

Stres B., Korpar P. 2006b. Vsebnost vode vzdolž profila barjanskih tal merjena od avgusta 2005 do septembra 2006. Neobjavljeni podatki. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo: 12str.

SURS – Statistični Urad Republike Slovenije. 2007a. Skupne letne in mesečne padavine po meteoroloških postajah, Slovenija. SI-Stat podatkovni portal, Ljubljana, SURS – Statistični Urad Republike Slovenije

http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156102S&ti=Skupne+letne+in+mese%20E8ne+padavine+po+meteorolo%9Akih+postajah%2C+Slovenija&path=../Database/Okolje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2 (januar 2008): 2 str.

SURS – Statistični Urad Republike Slovenije. 2007b. Povprečne letne in mesečne temperature zraka po meteoroloških postajah, Slovenija. SI-Stat podatkovni portal, Ljubljana, SURS – Statistični Urad Republike Slovenije

http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=Povpre%28ne+letne+in+mese%28ne+temperature+zraka+po+meteorolo%29Akih+postajah%2C+Slovenija&path=../Database/Okolje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2 (januar 2008): 2 str.

Tate R.L. 1979. Microbial activity in organic soils as affected by soil depth and crop. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 6: 1085-1090

Tate R.L., Terry R.E. 1980. Variation in microbial activity in histosols and its relationship to soil moisture. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 2: 313- 317

Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 387-401

Thomsen I.K., Schjønning P., Jensen B., Kristensen K., Christensen B.T. 1999. Turnover of organic matter in differently textured soils II. Microbial activity as influenced by soil water regimes. *Geoderma*, 89: 199-218

Thorsell J., Ferster Levy R., Sigaty T. 1997. A global overview of wetlands and marine protected areas on the world heritage list. Gland, IUCN – International Union for Conservation of Nature. (September 1997)
<http://www.unep-wcmc.org/wh/reviews/wetlands/2.htm> (avgust 2006): 47 str.

Tsuboya T., Takagi K., Takahashi H., Kurashige Y., Tase N. 2001. Effect of pore structure on redistribution of subsurface water in Sarobetsu Mire, northern Japan. *Journal of Hydrology*, 252:100-115

V and V Pharma Industries. 2006. Laboratory reagents. Mumbai, V and V Pharma Industries <http://www.vandvpharma.com/laboratory-reagents.html> (avgust 2006): 1 str.

Vinther F.P., Eiland F., Lind A.M., Elsgaard L. 1999. Microbial biomass and numbers of denitrifiers related to macropore channels in agricultural and forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 603-611

Wardle D.A., Ghani A. 1995. Why is the strength of relationships between pairs of methods for estimating soil microbial biomass often so variable. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 6: 821-828

Weiss R., Shurpali N.J., Sallantaus T., Laiho R., Laine J. Alm J. 2006. Simulation of water table level and peat temperatures in boreal peatlands. *Ecological Modelling*, 192: 441-456

Williams R.T., Crawford R.L. 1983. Microbial diversity of Minnesota peatlands. *Microbial Ecology*, 9, 3: 201-214

Zajec N. 2004. Vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 47 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec za vse popravke, pozitivne kritike ter nenehne spodbudne besede, skrb in prijaznost, ki mi jih je naklonila tekom pisanja te diplomske naloge.

Veliko zahvalo sem dolžna tudi somentorju dr. Blažu Stresu, za pomoč pri izvajanju praktičnega dela, uvajanje v samostojno delo v laboratoriju, vse odgovore na moja vprašanja, razsvetljenja in za kritične pripombe, ki so izboljšale to diplomsko delo. Hvala tudi za vse podatke, ki mi jih je posredoval in sem jih lahko uporabila v tej diplomski nalogi

Najlepša hvala prof. dr. Stoparju za strokovno recenzijo.

Zahvala gre tudi prof. dr. Ivanu Mahnetu, ki mi je omogočil, da sem diplomsko delo opravljala na Katedri za mikrobiologijo.

Najlepše se zahvaljujem tudi vsem na katedri za mikrobiologijo, da so z mano delili prostor, čas in izkušnje, da sem se lahko od njih naučila novih stvari. Hvala tudi za dobro družbo in obilico dobre volje, ki sem jo bila deležna pri izvajanju praktičnega dela. Posebna zahvala gre tudi Simoni za njeno praktično pomoč in vsevednost.

Hvala lepa tudi Janezu Hacinu za vse posredovane podatke, ki sem jih potrebovala.

Zahvalila bi se tudi vsem cimram in prijateljem, ki so me obdajali tekom študija in poskrbeli, da kljub temu, da je bil dolg, ni bil nikoli dolgočasen. Kaj bi človek brez prijateljev!

Nenazadnje gre največja zahvala tudi moji mami Ireni, za vso podporo in razumevanje, ki sem ju dobila med mojim (pre)dolgim študijem. Hvala, da veš, da življenje ni cilj, ampak pot in mi pustiš, da hodim po njej, kot si želim sama.