

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lara RESMAN

**VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA DINAMIKO NITRIFIKATORJEV
IN NA EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV V MIKROKOZMIH TAL
LJUBLJANSKEGA BARJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON NITRIFIERS
DYNAMIC AND ON GREENHOUSE GASES EMISSIONS IN
LJUBLJANA MARSH SOIL MICROCOSMS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 27.5.2005 in 28.3.2007 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Blaž Stres in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Blaž STRES

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 4.6.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Lara Resman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
UDK 631.46+579.26(043)=863
KG mikrobiologija tal/Ljubljansko barje/tla/nitrifikacija/nitrifikacijske bakterije/
potencialna nitrifikacijska aktivnost/število nitrifikatorjev/emisije toplogrednih
plinov/CO₂/N₂O/CH₄/temperatura/vlažnost/navlaževanje/izsuševanje
AV RESMAN, Lara
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentor)/STRES, Blaž (somentor)/AVGUŠTIN, Gorazd
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2007
IN VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA DINAMIKO NITRIFIKATORJEV IN NA
EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV V MIKROKOZMIH TAL
LJUBLJANSKEGA BARJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 63 s., 5 pregl., 15 sl., 56 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V laboratorijskem eksperimentu z mikrokozmi tal Ljubljanskega barja smo
proučevali vpliv štirih različnih kombinacij vsebnosti vode v tleh in temperature na
število in aktivnost nitrifikatorjev ter na aktivnost splošne heterotrofne mikrobne
združbe. Ugotavljali smo tudi vpliv kratkotrajnega navlaževanja oziroma
izsuševanja tal v mikrokozmi na emisije toplogrednih plinov CO₂, N₂O in CH₄.
Vzorčili smo decembra 2005 na poskusnem polju v Tomišlju na delu travnika, kjer
imajo tla visok delež organske snovi. Ugotovili smo, da se število nitrifikatorjev ni
spremenilo v odvisnosti od razmer inkubacije. Nitrifikacijska encimska aktivnost je
bila najvišja po dvanajsttedenski inkubaciji pri visoki temperaturi in nizki vsebnosti
vode v tleh (28 °C, 45 % WHC) ter najnižja pri visoki temperaturi in visoki
vsebnosti vode v tleh (28 °C, 90 % WHC). Nizka temperatura (4 °C) pri visoki in
nizki vsebnosti vode v tleh (45 % in 90 % WHC) ni imela signifikantnega vpliva na
aktivnost. Različne razmere inkubacije so povzročile sicer majhne a signifikantne
razlike v aktivnosti splošne heterotrofne mikrobne združbe ugotavljane s substratno
inducirano respiracijo (SIR). Emisije CO₂ so se z naraščanjem vsebnosti vode v tleh
in višjo temperaturo povečale, dosegle maksimum pri 80 % WHC in pri višji
vsebnosti vode v tleh upadle. Emisije N₂O so z večanjem vlage v tleh naraščale in so
bile pri 28 °C višje kot pri 4 °C. CH₄ smo zaznali le pri 28 °C po dvanajsttedenski
inkubaciji mikrokozmov in je izginil takoj, ko so se tla posušila na 85 % WHC.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
UDC 631.46+579.26(043)=863
CX soil microbiology/Ljubljana marsh/soil/nitrification/nitrifying bacteria/potencial nitrifying activity/number of nitrifiers/greenhouse gases emissions/CO₂/N₂O/CH₄/temperature/moisture/rewetting/drying
AU RESMAN, Lara
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/STRES Blaž (coadvisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON NITRIFIERS DYNAMICS AND ON GREENHOUSE GASES EMISSIONS IN LJUBLJANA MARSH SOIL MICROCOSMS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 63 p., 5 tab., 15 fig., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this diploma thesis the effects of four different moisture and temperature combinations on the abundance and activity of nitrifiers and general heterotrophic microbial community was examined in the laboratory experiment with drained Ljubljana marsh soil microcosms. The effects of short term soil microcosm rewetting and drying on the greenhouse gas emissions were also explored. Soil sampling took place in December 2005 at Tomišelj, on the section of the experimental field where the soil is rich with organic matter. Overall, the abundance of nitrifiers appeared not to be affected by incubation conditions. Nitrifying enzyme activity was highest during twelve-week incubation at high temperature and low soil water content (28 °C, 45 % WHC), and lowest at high temperature and high soil water content (28 °C, 90 % WHC) conditions. At 4 °C and 45 % or 90 % WHC nitrifying enzyme activity was not significantly effected. Different conditons did not result in significant difference in general heterotrophic microbial activity as measured by substrate-induced respiration. The CO₂ emissions were positively correlated with temperature and soil water content, peaking at 80 % WHC. The N₂O emission rates were also positively correlated with soil water content and temperature. The CH₄ was detected only at 28 °C after twelve-week microcosms incubation. Its emissions diminished as soil water content dropped below 85 % WHC.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZA	2
1.1.1 Namen	2
1.1.2 Hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DUŠIKOV CIKEL, NITRIFIKACIJA IN NITRIFIKATORJI	3
2.1.1 Dušik in dušikov cikel	3
2.1.2 Nitrifikacija	5
2.1.2.1 Avtotrofna nitrifikacija – aerobna in anaerobna	5
2.1.2.2 Heterotrofna nitrifikacija	8
2.1.3 Nitrifikacijske bakterije –ekologija	8
2.1.4 Nitrat in nitrit - okolje, kmetijstvo in zdravje	8
2.2 EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV - CO ₂ , N ₂ O in CH ₄	10
2.3 LJUBLJANSKO BARJE	14
2.3.1 Eksperimentalno polje in dosedanje ugotovitve	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 VZORČENJE IN PRIPRAVA TAL	16
3.2 VSEBNOST VODE V TLEH	17
3.3 SPOSOBNOST ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)	17
3.4 OPIS EKSPERIMENTA V MIKROKOZMIH	18
3.4.1 Mikrokozmi	18
3.4.2 Simulacija sezon barja	19
3.4.3 Shema eksperimenta in razdiranje mikrokozmov	20

3.4.4	Vzdrževanje vsebnosti vode v tleh	21
3.4.5	Ugotavljanje števila nitrifikatorjev z metodo najverjetnejšega števila (MPN)	21
3.4.5.1	Priprava in odčitavanje MPN	21
3.4.5.2	Izračun MPN	22
3.4.6	Ugotavljanje potencialne nitrifikacijske encimske aktivnosti z metodo NEA	23
3.4.6.1	Izvedba NEA	23
3.4.6.2	Ugotavljanje koncentracije NO_3^- -N, NO_2^- -N in NH_4^+ -N	23
3.4.6.3	Izračun NEA	24
3.4.7	Vpliv navlaževanja/izsuševanja tal v mikrokozmi na emisije toplogrednih plinov CO_2, N_2O in CH_4	25
3.4.7.1	Navlaževanje mikrokozmov po predinkubaciji	26
3.4.7.2	Navlaževanje ali izsuševanje mikrokozmov po dvanajsttedenski inkubaciji	26
3.4.7.3	Merjenje emisij CO_2 , N_2O in CH_4	26
3.4.7.4	Ugotavljanje volumna plinske faze mikrokozma	28
3.5	AKTIVNOST SPLOŠNE HETEROTROFNE MIKROBNE ZDRUŽBE MERJENA S TEHNIKO SIR (S SUBSTRATOM INDUCIRANA RESPIRACIJA)	29
3.6	RAZTOPINE IN PUFRI	29
4	REZULTATI	31
4.1	UGOTAVLJANJE WHC	31
4.2	UGOTAVLJANJE MPN	32
4.3	UGOTAVLJANJE NEA	33
4.3.1	Razmere inkubacije A (28 °C, 45 % WHC)	33
4.3.2	Razmere inkubacije B (28 °C, 90 % WHC)	33
4.3.3	Razmere inkubacije C (4 °C, 45 % WHC)	34
4.3.4	Razmere inkubacije D (4 °C, 90 % WHC)	34
4.4	SPREMLJANJE KONCENTRACIJ NITRATA IN NITRITA V MIKROKOZMIH	35
4.5	VPLIV NAVLAŽEVANJA/IZSUŠEVANJA TAL V MIKROKOZMIH NA EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV	36

4.5.1	Emisije CO ₂	36
4.5.2	Emisije N ₂ O	37
4.5.3	Emisije CH ₄	38
4.6	MERJENJE AKTIVNOSTI SPLOŠNE HETEROTROFNE MIKROBNE ZDRUŽBE S SUBSTRATOM INDUCIRANO RESPIRACIJO	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK	54
7	VIRI	55
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Dušikove spojine in njihova oksidacijska stanja (Madigan in sod., 2000)	3
Preglednica 2: Razdelitev mikrokozmov s tlemi Ljubljanskega barja v posamezne skupine inkubacije na osnovi vlažnosti in temperature tal.	19
Preglednica 3: Sestava gojišča za ugotavljanje števila nitrifikatorjev.	22
Preglednica 4: Sestava gojišča za ugotavljanje aktivnosti nitrifikatorjev.	23
Preglednica 5: Bunsenovi koeficient in volumni plinov N ₂ O, CO ₂ in CH ₄ pri temperaturi 4 °C in 28 °C.	27

KAZALO SLIK

		str.
Slika 1	Dušikov cikel	5
Slika 2	Tok elektronov in pridobivanje energije pri <i>Nitrosomonas</i> .	7
Slika 3	Oksidacija nitrita do nitrata pri nitratacijskih bakterijah.	8
Slika 4	Homogenizacija tal.	16
Slika 5	Mikrokozem za inkubacijo tal in meritve emisij toplogrednih plinov.	18
Slika 6	Shema eksperimenta.	20
Slika 7	Prikaz navlaževanja in izsuševanja mikrokozmov za merjenje emisij toplogrednih plinov.	25
Slika 8	Merjenje emisij CO ₂ , N ₂ O in CH ₄ .	28
Slika 9	MPN nitrifikatorjev - logaritem števila celic na gram suhih tal med dvanajsttedensko inkubacijo mikrokozmov v različnih razmerah	32
Slika 10	Nitrifikacijska encimska aktivnost (NEA) - hitrost proizvodnje (NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻) -N (mg) na uro na gram suhih tal med dvanajsttedensko inkubacijo mikrokozmov v različnih razmerah	34
Slika 11	Vsebnost nitratno-nitritnega dušika v mikrokozmi med dvanajsttedensko inkubacijo.	35
Slika 12	Emisije CO ₂ .	39

Slika 13	Emisije N_2O .	40
Slika 14	Emisije CH_4 .	41
Slika15	S substratom inducirana respiracija po dvanajstih tednih inkubacije mikrokozmov v štirih različnih razmerah inkubacije.	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
dH ₂ O	deionizirana voda
MPN	najverjetnejše število bakterijskih celic
NEA	nitrifikacijska encimska aktivnost
NH ₄ ⁺ - N	amonijski dušik
NO ₂ ⁻ - N	nitritni dušik
NO ₃ ⁻ - N	nitratni dušik
SIR	s substratom inducirana respiracija
WHC	sposobnost za zadrževanje vode v tleh

1 UVOD

Ljubljansko barje je najjužneje ležeče nizko barje v Evropi, kjer so tla organsko zelo bogata, saj večinoma vsebujejo šoto (Martinčič, 2003). Ker šotišča shranjujejo ogromne količine organskega ogljika, so zelo pomembni ekosistemi in sprememba njihove funkcije ima lahko globalne posledice, kot so na primer povišane emisije toplogrednih plinov. Številne raziskave so pokazale, da na mineralizacijo ogljika vplivajo nivo podtalnice, temperatura in mikroorganizmi, ki so glavni dejavniki biogeokemičnih procesov v tleh (Kraigher in sod., 2006).

Dušik je drugi najpogostejši element v celicah, takoj za ogljikom. Nekatere glavne redoks pretvorbe dušika v naravi izvajajo le mikroorganizmi, zato je vpletenost mikrobov v dušikov cikel izrednega pomena. Nitrifikacija je biološka oksidacija amonija NH_4^+ do nitrita NO_2^- in nitrata NO_3^- (Madigan in sod., 2000; Atlas in Bartha, 1998). V proces nitrifikacije sta vpleteni dve skupini bakterij – nitritacijske (oksidirajo amonij do nitrita) in nitratacijske (oksidirajo nitrit do nitrata) (Madigan in sod., 2000).

Ogljikov dioksid CO_2 , dušikov oksidul N_2O in metan CH_4 so pomembni toplogredni plini, katerih pomemben vir so tudi tla. Skupaj prispevajo več kot 70 % h globalnemu segrevanju Zemlje. CO_2 in CH_4 izhajata iz tal kot končna produkta razgradnje organskega materiala, pri čemer je CH_4 produkt anaerobnega metabolizma (Shrestha in sod., 2004; Van den Pol in sod., 1999a). N_2O je vmesni produkt denitrifikacije in pod določenimi pogoji v manjši meri tudi nitrifikacije. N_2O lahko nastaja tudi med disimilatorno redukcijo nitrata do amonija in s kemo-denitrifikacijo (Stevens, 1998; Chatskikh in sod., 2005). Sprememba rabe in način obdelovanja tal ter sekanje gozdov so nekateri antropogeni vzroki, ki povzročajo globalno naraščanje koncentracij toplogrednih plinov. Kot odziv na globalne spremembe temperature znanstveniki predvidevajo povečano razgradnjo talne organske snovi v tleh in posledično povečane emisije toplogrednih plinov, funkcija tal kot ponora toplogrednih plinov pa naj bi se zmanjšala (Shrestha in sod., 2004).

Ljubljansko barje je v zmernem pasu, kjer so značilni štirje letni časi: suho poletje, vlažna zima ter jesen in pomlad. Vzorce tal smo inkubirali v laboratoriju v steklenih kozarcih v

štirih razmerah, ki so simulirale suho poletje, vlažno poletje, suho zimo in vlažno zimo. Zanimalo nas je, kako dvanajsttedenska inkubacija (trajanje ene sezone) v uporabljenih razmerah vpliva na aktivnost in število nitrifikatorjev. Ugotavljali smo tudi vpliv navlaževanja in izsuševanja talnih vzorcev na emisije treh toplogrednih plinov (ogljikovega dioksida, dušikovega oksidula in metana) in aktivnost splošne heterotrofne mikrobne združbe v tleh po dvanajsttedenski inkubaciji.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZA

1.1.1 Namen

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti spremembe v aktivnosti in številu nitrifikacijskih bakterij med dvanajsttedensko simulacijo štirih različnih razmer temperature in vsebnosti vode v barjanskih tleh v laboratorijskem modelnem sistemu mikrokozmov. Dodatno smo ugotavljali vpliv enomesečnega vlaženja oziroma sušenja tal na emisije treh toplogrednih plinov CO_2 , N_2O ter CH_4 pri temperaturah 28 in 4 °C. Rezultati bodo pripomogli k boljšemu razumevanju odziva mikrobne združbe tal Ljubljanskega barja na spremembe v okolju.

1.1.2 Hipoteze

Predpostavili smo:

- da bo nitrifikacijska aktivnost večja pri višji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh (večja dostopnost kisika),
- da bo povečanje nitrifikacijske aktivnosti sovpadalo s porastjo števila nitrifikatorjev in obratno
- da bodo emisije toplogrednih plinov višje pri višji temperaturi in višji vsebnosti vode v tleh
- da bo aktivnost splošne heterotrofne mikrobne združbe po dvanajsttedenski inkubaciji višja pri variantah inkubiranih pri višji temperaturi in nižja pri variantah z večjo vsebnostjo vode v tleh

2 PREGLED OBJAV

2.1 DUŠIKOV CIKEL, NITRIFIKACIJA IN NITRIFIKATORJI

2.1.1 Dušik in dušikov cikel

Dušik je drugi najpogostejši element v celicah, takoj za ogljikom. Povprečna bakterijska celica ga vsebuje 12 % suhe teže. Je pomemben element amino kislin, nukleinskih kislin in drugih celičnih komponent. V naravi se pojavlja v organskih in anorganskih oblikah. Večina v naravi dostopnega dušika je v anorganskih oblikah kot amonijak (NH_3), amonijev ion (NH_4^+), nitrat (NO_3^-) ali N_2 . Večina bakterij uporablja amonij kot preferenčni vir dušika, nekatere lahko uporabljajo nitrat. N_2 pa služi kot vir dušika bakterijam, ki fiksirajo dušik (Madigan in sod., 2000).

N_2 v atmosferi (79 %) je velik in počasi krožeč rezervoar dušika. Zelo velik rezervoar dušika so tudi kamnine in sedimenti, kjer je dušik vezan in nedostopen. V soleh se pojavljajo amonijeve, nitratne in nitritne ioni – dušik v tej obliki je v vodi dobro topen in hitro kroži. Majhen, vendar aktiven rezervoar pa predstavlja organska snov – dušik postane organizmom dostopen skozi proces mineralizacije (Atlas in Bartha, 1998).

Preglednica 1: Dušikove spojine in njihova oksidacijska stanja (Madigan in sod., 2000)

Komponenta	Oksidacijsko stanje
Organski dušik ($\text{R} - \text{NH}_2$)	-3
Amonij (NH_3)	-3
Dušikov plin (N_2)	0
Dušikov oksidul (N_2O)	+1
Dušikov oksid (NO)	+2
Nitrit (NO_2^-)	+3
Dušikov dioksid (NO_2)	+4
Nitrat (NO_3^-)	+5

Dušik je element z oksidacijskimi stanji od -3 do +5. V vsakem od teh stanj je drugačna anorganska molekula (preglednica 1). Med oksidacijo teh anorganskih molekul se sprošča kemična energija, ki postane dostopna mikrobom (Madigan in sod., 2000).

Nekatere glavne redoks pretvorbe dušika v naravi izvajajo le mikroorganizmi, zato je vpletenost mikrobov v dušikov cikel izrednega pomena. Glavni procesi dušikovega cikla so (Madigan in sod., 2000):

- Fiksacija dušika

Atmosferski dušik lahko fiksira relativno majhno število bakterij, ki pa imajo toliko večji ekološki pomen, saj vračajo dušik iz atmosfere nazaj v tla in vodo v obliki, ki je dostopna drugim organizmom. Proces, ki je energetsko zahteven, opišemo z enačbo $N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$. Izvajajo ga prostoživeče cianobakterije, rod *Azotobacter* in simbiotske bakterije rodov *Rhizobium* in *Frankia*.

- Amonifikacija in asimilacija

Amonifikacija je proces, s katerim bakterije organski dušik vezan na primer v beljakovinah in urei, pretvorijo v amonijak, ki je pri nevtralnem pH v obliki amonijevega iona NH_4^+ . Asimilacija je proces privzemanja različnih oblik dušika s strani mikroorganizmov ali rastlin, pri čemer se dušik vedno veže v organsko spojino.

- Nitrifikacija

je oksidacija NH_3 do NO_3^- . Je glavni proces pretvorbe dušika v suhih, dobro prezračenih in nevtralnih tleh in ga izvajajo nitrifikacijske bakterije. Poteka v dveh stopnjah: $2NH_3 + e^- + 3O_2 \rightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 2H^+$ in $2NO_2^- + O_2 \rightarrow 2NO_3^-$. Prvo reakcijo izvajajo bakterije rodov kot je *Nitrosomonas*, drugo pa na primer *Nitrobacter*.

- Denitrifikacija

Nekatere bakterije, na primer vrste iz rodov *Pseudomonas* in *Bacillus*, lahko uporabljajo nitrat kot terminalni elektronski akceptor pri anoksični respiraciji: $2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- \rightarrow$

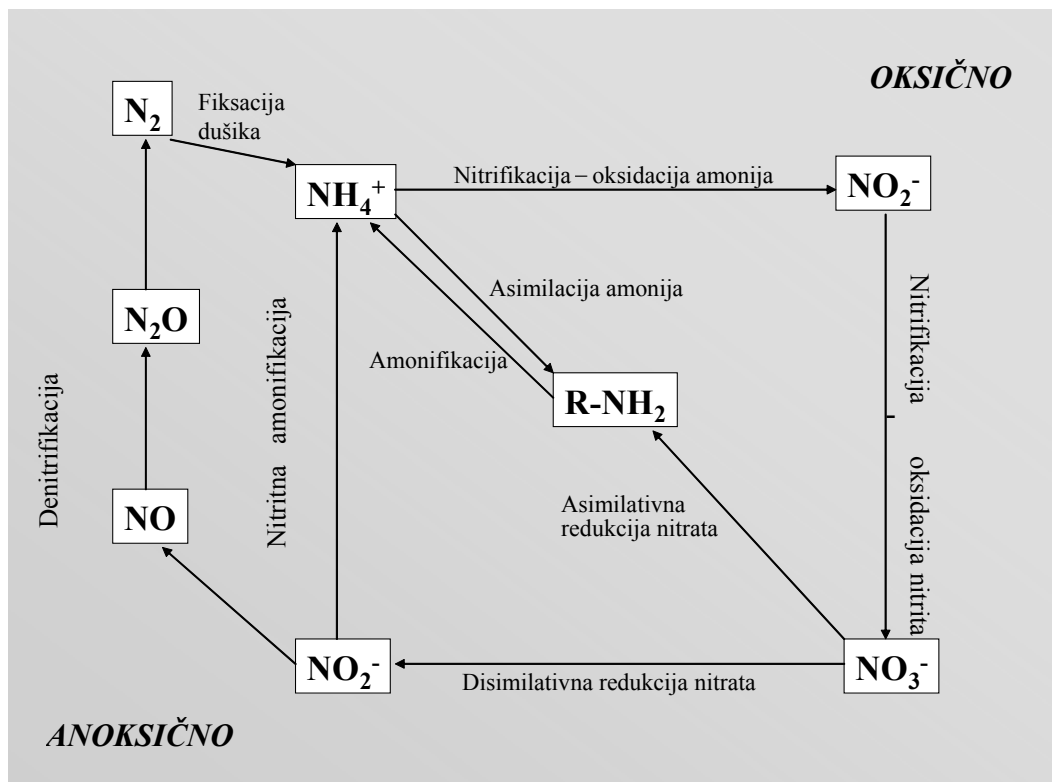
$N_2 + 6H_2O$. S tem procesom se fiksirani dušik povrne nazaj v atmosfero kot N_2 ali pa N_2O . Proces je pomemben pri čiščenju odpadnih voda, saj odstanjuje nitrat iz vode.

- Disimilativna redukcija nitrata (DRNA)

je proces, kjer fakultativne anaerobne bakterije kot sotiste iz rodov *Alcaligenes*, *Escherichia* in *Aeromonas* v odsotnosti kisika uporabijo kot terminalni akceptor elektronov nitrat in ga pretvorijo do nitrita, le-tega pa izločijo v okolje (Atlas in Bartha, 1998). Plinaste oblike dušika pri tem procesu ne nastanejo.

- Anamoks – anaerobna oksidacija amonija

V tem avtotrofnem procesu, ki so ga odkrili šele pred nedavnim, se amonij pretvori v plinasti dušik z nitritom kot akceptorjem elektronov. Izvajata ga vsaj dva rodova planktomicet. Proces je celo bolj energetsko ugoden kot običajna aerobna oksidacija amonija in poteka po enačbi: $NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$. Uporaba anamoksa v čiščenju odpadnih voda bi znižala stroške za 90 % in je zato obetajoča alternativa konvencionalnim sistemom (Jetten in sod., 2001).



Slika 1: Dušikov cikel (Atlas in Bartha, 1998)

2.1.2 Nitrifikacija

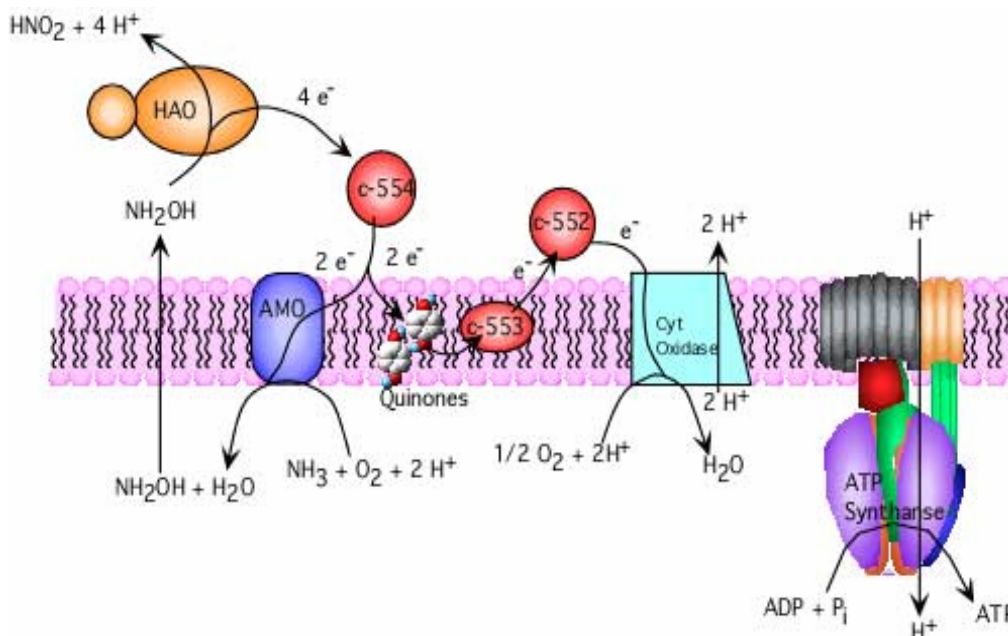
2.1.2.1 Avtotrofna nitrifikacija – aerobna in anaerobna

Nitrifikacija je biološka oksidacija amonija NH_4^+ do nitrata NO_3^- preko nitrita NO_2^- . Aerobne kemolitotrofne nitrifikacijske bakterije uporabljajo amonij in nitrit kot donorja elektronov. Te bakterije so pomembni organizmi v tleh in vodi, saj prispevajo h globalnem kroženju dušika (Madigan in sod., 2000; Atlas in Bartha, 1998). Nitrifikatorji pretvorijo najbolj reducirano obliko dušika (NH_4^+) v najbolj oksidirano obliko (NO_3^-). in tako povežejo amonifikacijo in denitrifikacijo. Nimajo direktnega vpliva na skupen 'proračun' dušika, ampak enostavno spremenijo oksidacijsko stanje tega elementa (Prosser, 1989, cit. po Prinčič 2000).

Prvo stopnjo oksidacije amonija do nitrita izvajajo skupina nitritacijskih bakterij (predpona *Nitroso*-), drugo stopnjo oksidacije nitrita do nitrata pa nitratacijske bakterije (predpona *Nitro*-). Oba procesa sta tesno povezana in običajno ne prihaja do kopičenja nitrita. Energijo, ki jo bakterije dobijo pri nitrifikaciji, porabijo za asimilacijo CO_2 s Kalvinovim ciklom. Proces ni energetsko zelo učinkovit – za fiksacijo enega mola CO_2 se mora oksidirati 35 molov NH_4^+ oziroma kar 100 molov NO_2^- (Madigan in sod., 2000; Atlas in Bartha, 1998). To razloži počasno rast in nizek rastni donos nitrifikatorjev. Nekateri nitrifikatorji pa lahko rastejo tudi miksotrofno z enostavnimi organskimi spojinami kot so piruvat, acetat in format, kot akceptor elektronov pa jim služi kisik in včasih tudi nitrit (Koops in Müller, 1992).

Oksidacija amonija do nitrita je dvostopenjski proces. Poglavitni encim prve stopnje je membransko vezana amonij monooksigenaza (AMO), ki katalizira reakcijo $\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$. Nato pa periplazemski encim hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO) oksidira hidroksilamin do nitrita po enačbi: $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$. Elektrona, ki ju potrebuje za delovanje amonij monooksigenaza, le-ta dobi od hidroksilamin oksidoreduktaze. Zato na vsako oksidirano molekulo amonija do nitrita prideta do kisika na koncu dihalne verige le dva elektrona, kar pomeni majhen donos

produciranih ATP. (Madigan in sod., 2000). $\Delta G^{\circ'}$ za obe reakciji skupaj je -66 kcal/mol oziroma -277,2 kJ/mol (Atlas in Bartha, 1998).

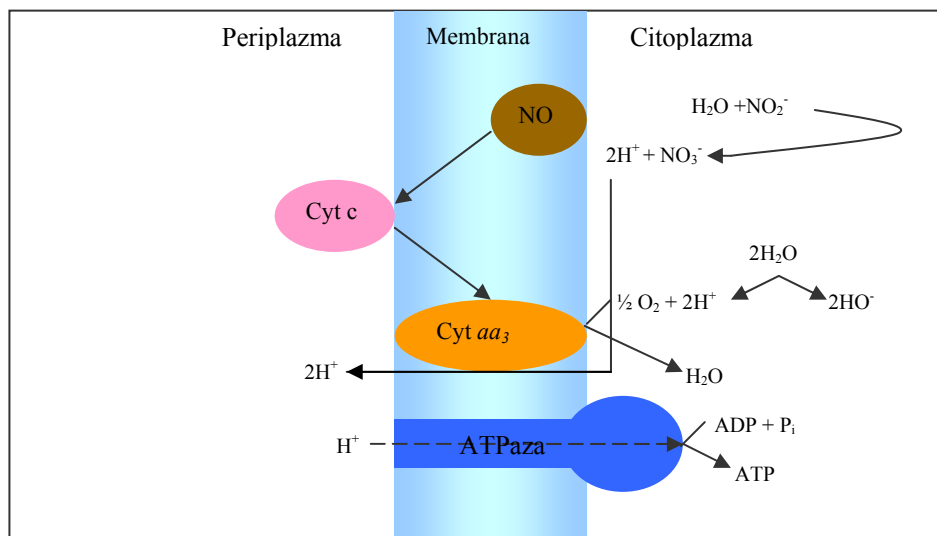


Slika 2: Tok elektronov in pridobivanje energije pri *Nitrosomonas*. V oksidacijo amonija do nitrita sta vpletena dva encima – amonij monooksigenaza (AMO) in hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO) (Microbiology..., 2007).

Nitratacijske bakterije uporabljajo za oksidacijo nitrita do nitrata encim nitrit oksidazo. Elektroni potujejo po zelo kratki elektronski transportni verigi do terminalne oksidaze na kisik. Nastane le zelo malo energije in zato rastejo nitrifikacijske bakterije zelo počasi (Madigan in sod., 2000). $\Delta G^{\circ'}$ reakcije je -17 kcal/mol oziroma -71,4 kJ/mol (Atlas in Bartha, 1998).

Odkrili pa so tudi alternativni mehanizem oksidacije amonija pri rodu *Nitrosomonas*, ki poteka v anaerobnih razmerah. *Nitrosomonas eutropha* lahko oksidira amonij v odsotnosti raztopljenega kisika tako, da nadomesti kisik z dušikovim dioksidom NO_2 ali pa njegovim dimerom dušikovim tetraoksidom N_2O_4 ($\text{NH}_3 + \text{N}_2\text{O}_4 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}$). Kot intermediata nastaneta pri tem procesu hidroksilamin NH_2OH in dušikov oksid NO . Slednji se ne pretvori več naprej, hidroksilamin pa se oksidira do nitrita, ki se delno uporabi kot akceptor elektronov pri nastanku didušikovega plina N_2 ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$

$\text{HNO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ in $\text{HNO}_2 + 3\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow 0.5 \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). NO_2 v naravnem okolju v anoksičnih razmerah ni na razpolago v visokih koncentracijah, zato so anaerobni oksidatorji amonija odvisni od njegovega transporta iz oksičnih plasti (Schmidt in sod., 2002). *Nitrosomonas* je sposoben tudi anaerobne denitrifikacije z molekularnim vodikom ali enostavnimi organskimi spojinami kot donorji elektronov (Schmidt in sod., 2002).



Slika 3: Oksidacija nitrita do nitrata pri nitratacijskih bakterijah. NO – nitrit oksidaza, Cyt *c* – citokrom *c*, Cyt aa_3 – citokrom aa_3 (Madigan in sod., 2000).

2.1.2.2 Heterotrofna nitrifikacija

Mnoge filogenetsko nesorodne bakterije in glive so sposobne heterotrofne nitrifikacije, procesa, ki vključuje oksidacijo tako anorganskih kot organskih dušikovih spojin. V nasprotju z avtotrofno nitrifikacijo pa heterotrofna oksidacija amonija ni povezana s celično rastjo. Poznani sta dve poti heterotrofne oksidacije amonija (De Boer in Kowalchuk, 2001).

Prvo pot uporabljajo bakterije kot so *Paracoccus denitrificans*, *Thiosphaera pantotropha*, *Pseudomonas putida* in *Alcaligenes faecalis*. Te bakterije imajo encime za oksidacijo amonija in hidroksilamina, ki močno spominjajo na encime avtotrofnih nitrifikatorjev. Nekateri od teh, npr. *Thiosphaera pantotropha*, kombinirajo nitrifikacijsko aktivnost z aerobno denitrifikacijo in na ta način pridobijo redukcijske ekvivalente (NADH) v

razmerah, ki ovirajo respiracijo s kisikom, zato imajo ti organizmi prednost pred drugimi, ko primanjkuje hranil. Tisti, ki aerobne denitrifikacije niso zmožni, izkoriščajo nastale dušikove okside za inhibicijo rasti kompetitivnih mikroorganizmov (De Boer in Kowalchuk, 2001).

Druga pot heterotrofne oksidacije amonija je nitrifikacija, ki jo izvajajo glive. Predvidevajo reakcijo dušikovih spojin s hidroksilnimi radikali, ki nastanejo ob hkratni prisotnosti vodikovega peroksida in superoksida. Takšne razmere nastanejo ob lizi celic in degradaciji lignina, ko glive sprostijo oksidaze in peroksidaze v okolje (De Boer in Kowalchuk, 2001)

2.1.3 Nitrifikacijske bakterije –ekologija

Kemolitotrofne nitrifikacijske bakterije so odkrili v mnogih ekosistemih, od sladkih in slanih voda, sistemov za čiščenje odplak do skal in zidov. Našli so jih tudi v ekstremnih habitatih pri visokih temperaturah in tudi v tleh Antarktike. Čeprav je optimalni pH za rast nitrifikatorjev 7.6-7.8, so jih odkrili tudi v okoljih s pH okrog 4, na primer v kislih tleh in tudi v okoljih kot so slana jezera s pH vrednostmi okrog 10. Zanimivo je tudi, da so sicer aerobne nitrifikatorje našli tudi v anoksičnih okoljih (Schmidt in sod., 2002).

2.1.4 Nitrat in nitrit - okolje, kmetijstvo in zdravje

Nitrat se v tleh lahko reducira do N_2O in N_2 s procesom denitrifikacije, lahko ga prevzamejo organizmi z asimilatorno redukcijo, nekateri mikroorganizmi ga uporabijo kot sprejemnik elektronov in ga oksidirajo v amonij (DNRA), lahko se izpira iz tal ali pa se v njih akumulira (del Prado in sod., 2006). Čeprav v tleh prisoten nitrat hitro asimilirajo rastline, se zaradi svoje topnosti izpira iz tal (Madigan in sod., 2000). Povečana koncentracija nitrata lahko vodi v eutrofikacijo okolja in zakisanje tal. Nepopolna redukcija nitrata z denitrifikacijo pa vodi do nastanka N_2O , ki je toplogredni plin (Bouwman, 1990).

Nitrifikacija v kmetijstvu ni koristen proces, saj amonij iz gnojil pretvori v hitro mobilen nitrat, ta pa se hitro spere iz tal in za rastline ni več dostopen. Amonij pa se nasprotno veže na minerale glin in ostane v tleh. Zato so začeli v amonijeva gnojila dodajati inhibitorje nitrifikacije (Madigan in sod., 2000). Eden takšnih inhibitorjev je nitrapirin (2-kloro-6-(triklorometil) piridin), ki kelira bakrove komponente v encimih oksidacije amonija (Powell in Prosser, 1986). Uporaba nitrapirina je tako pripomogla k učinkovitejšemu gnojenju in zmanjšala onesnaževanje vode zaradi spiranja nitrata s kmetijskih površin (Madigan in sod., 2000).

Po zaužitju z nitratom onesnažene hrane in pitne vode, fakultativno anaerobne komenzalne bakterije v slini v ustni votlini nitrat pretvorijo v nitrit, le ta pa se v kislem želodcu spremeni v dušikov oksid in skupaj lahko povzročita methemoglobijo pri dojenčkih. Nitrit se lahko pretvori tudi v kancerogene N-nitrozamine, ki lahko povzročijo želodčni rak (Lundberg in sod., 2004). Nedavne študije so pokazale, da je pri komenzalnih bakterijah metabolizem nitrata v nitrit in nadaljna formacija biološko aktivnih oksidov lahko koristna. Pri nižjih pH vrednostih je nitrit protoniran v dušikovo kislino HNO_2 , ki nadalje razpade v različne aktivne dušikove intermediate, ki imajo antimikrobno aktivnost proti številnim bakterijam in glivam. Poleg želodca in ustne votline so dokazali antimikrobni vpliv nitrita tudi v urinu in pri infekcijah kože (Lundberg in sod., 2004).

2.2 EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV - CO_2 , N_2O in CH_4

Za mokrišča z visoko vsebnostjo organske snovi, med katera spadajo tudi šotišča, so značilne anaerobne razmere, nizka stopnja mineralizacije organske snovi in vloga kopenskega ponora ogljika in dušika. Kljub temu, da šotišča zavzemajo nekaj manj kot 3 % kopnega, pa vsebujejo kar 30 % svetovnih kopenskih rezerv ogljika in dušika. Velike površine šotišč izkoriščajo v kmetijske in gozdarske namene ter jih izsušujejo. Posledično se je povečala mineralizacija organskih snovi, zato so šotišča postala pomemben vir toplogrednih plinov (Augustin in sod., 1998).

V obliki CO₂ lahko ogljik kroži med atmosfero in tlemi. Rastlinje privzema CO₂ iz atmosfere s fotosintezo, mikrobnna razgradnja humusa pa ga vrača nazaj v atmosfero. Razgradnja fotosintetsko fiksiranega ogljika poteka z mikroorganizmi. Pri tem nastajata plina metan (CH₄) z metanogenimi arhejami in CO₂ kot produkt aerobnih in anaerobnih bakterijskih respiracij ter fermentacije (Madigan in sod., 2000).

Globalno gledano je talna respiracija pomemben vir ogljikovega dioksida. Organska snov tal je zelo občutljiva na klimatske spremembe, zato naj bi dvig temperature in sprememba padavin vplivala na ogljikov cikel (Curiel-Yuste in sod., 2005). V sušnih razmerah dež močno stimulira emisije CO₂ iz tal. Pojav pripisujejo ciklom mikrobne umrljivosti zaradi suše in hitre ponovne rasti preživelih celic po ponovni dostopnosti vode na nutrientih umrlih. Druga razlaga je, da ob vlaženju izsušenih tal razpadajo talni agregati in sprostijo se do tedaj fizično ujeta organska snov, ki jo mikrobi hitro mineralizirajo (Curiel-Yuste in sod., 2005).

Metan je drugi najpogostejši toplogredni plin, takoj za CO₂ (Shestra in sod., 2004). Nastaja z mikrobnim procesom – metanogenezo, ki je lahko acetoklastična (metan nastaja iz acetata) ali pa poteče redukcija CO₂ z H₂. Metanogeneza poteče samo v striktno anoksičnih razmerah. Metan se hitro dviguje po vertikalnem profilu tal in tako pride v področja bogata s kisikom, kjer ga metanotrofi oksidirajo do CO₂. Metanogene arheje so prisotne v vseh okoljih na Zemlji, vendar je produkcija metana pomembna predvsem v anoksičnih okoljih, kot so na primer močvirja in barja, prebavila prežvekovalcev ter sedimenti (Madigan in sod., 2000). Globalno gledano prispevajo mokrišča 10 – 28 % vseh svetovnih emisij CH₄ (Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999a).

Na produkcijo CH₄ v tleh vplivajo: prezračenost tal, prisotnost alternativnih elektronskih akceptorjev, tip in količina dostopne organske snovi ter velikost populacije metanogencev (Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999b). Metanogenci zahtevajo za produkcijo metana anoksične razmere; prisotnost alternativnih akceptorjev elektronov, kot so na primer nitrat, sulfat in Fe³⁺, daje prednost izrabi prisotnega vodika in acetata bakterijam, ki uporabljajo te elektronske akceptorje z višjim redoks potencialom kot ga ima CO₂ (Achnich in sod., 1995; Madigan in sod., 2000). Pomembni okoljski dejavniki emisij CH₄

iz tal so temperatura (vpliva na kinetiko mikrobne nastajanja in porabe CH_4), višina podtalnice (deluje kot meja med aerobnim in anaerobnim) in vegetacija (transport CH_4 , substrat za metanogence) (Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999a). Sezonsko so opazili najvišje emisije poleti, najnižje pa pozimi (Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999a). Emisije upadejo z upadanjem podtalnice, za kar predvidevajo več vzrokov: porast koncentracij drugih elektronskih akceptorjev – O_2 , NO_3^- in SO_4^{2-} ; upadanje substata za metanogence; upadanje števila metanogencev. Na primer, če naraste temperatura tal pri 20 cm globine za 2 °C, se količina emisij CH_4 zviša za celih 50 %, če pa povišamo nivo podtalnice za 5 cm pa to povzroči 45-50 % povečanje emisij (Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999a).

N_2O je močan toplogredni plin. Njegova koncentracija v atmosferi narašča približno 0,25 % na leto. Glaven vir N_2O v atmosferi je mikrobna produkcija; preko 70 % antropogenih emisij N_2O izvira iz kmetijskih obdelovalnih površin in pašnikov (Pihlatie in sod., 2004; del Prado in sod., 2006). Kot intermediat denitrifikacije nastaja tudi NO , ki je zelo reaktiven plin, ki skupaj z NO_2 tvori NO_x – dušikove okside, odgovorne za nastanek kislega dežja. Dušikovi oksidi katalizirajo tudi fotokemični nastanek troposferskega ozona, ki je eden izmed toplogrednih plinov troposfere ter tako posredno vplivajo na efekt tople grede (del Prado in sod., 2006; Ehhalld in sod., 2001). Glavni vir NO v troposferi je antropogenega izvora zaradi industrije in transporta, velik delež pa je biogenega izvora in se sprošča iz tal in rastlin (Ludwig in sod., 2001; del Prado in sod., 2006).

N_2O nastane pri nitrifikaciji, denitrifikaciji, disimilativni redukciji nitrata in kemo - denitrifikaciji. Ker so tla mozaik aerobnih in anoksičnih con, simultano potekajo v njih različni procesi nastanka N_2O in ves N_2O se meša v enem bazenu, iz katerega potem uhaja v atmosfero ali pa je podvržen redukciji do N_2 z denitrifikacijo. Avtotrofni nitrifikatorji lahko producirajo N_2O na dva načina – nekateri ga proizvedejo pri redukciji NO_2^- pri omejenem dostopu O_2 , lahko pa nastane tudi iz intermediatov oksidacije NH_4^+ z različnimi reakcijami. Denitrifikacija je mikrobni proces, kjer se NO_3^- reducira do N_2O ali N_2 . Heterotrofni denitrifikatorji so dominantni organizmi odgovorni za ta proces v tleh, pri katerem je NO_3^- terminalni sprejemnik elektronov, organski ogljik donor elektronov in proces teče v anoksičnih razmerah. Splošno znana pot denitrifikacije je: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow$

$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. NO običajno ni prosti intermediat, medtem ko je N_2O prost in obigaten intermediat za nastanek N_2 . Ta lahko nastane tudi iz N_2O , ki je nastal v tleh z drugimi procesi. Disimilatorno redukcijo nitrata do amonija NH_4^+ (DNRA) izvajajo fermentativne bakterije v tleh in sedimentih. Reducirajo lahko NO_2^- do N_2O ali do NH_4^+ niso pa zmožne pretvorbe N_2O v N_2 . Kemo-denitrifikacija poteka, ko se NO_2^- , intermediat nitrifikacije, denitrifikacije in DNRA, kopiči in v reakciji z organskimi spojinami tvori N_2 ali N_2O . Predvidevajo, da so za redukcijo NO_2^- odgovorne fenolne in amino skupine organskih spojin. Je pomemben vir N_2O , če je talni $\text{pH} < 5$ (Stevens in Laughlin, 1998; Ludwig in sod., 2001). N_2O se bodisi sprošča v atmosfero ali pa se raztopi v vodi talnih por in vstopa v podtalnico (Chatskikh in sod., 2005).

Na procese nastanka N_2O vpliva veliko dejavnikov. Med najpomembnejša spadata temperatura in vsebnost vode v tleh, drugi pa so še vsebnost mineralnih oblik dušika (NO_3^- , NH_4^+ , gnojenje), vsebnost organske snovi (vsebnost organske snovi v tleh, gnojenje z organskimi gnojili), pH, tekstura tal (skupaj z vsebnostjo vode v tleh vpliva na prezračenost in dostopnost oziroma odsotnost O_2), raba tal (vrsta posevka, obdelovalna praksa) in tip ekosistema (gozd, travnik, njiva, barje...) (Chatskikh in sod., 2005; Pihlatie in sod., 2004; del Prado in sod., 2006). Velik vpliv ima vsebnost vode v tleh. Dodajanje vode zelo suhim tlem običajno povzroči močan porast emisij N_2O . Predvidevajo, da se mikrobná združba, ki je bila pod stresom pomanjkanja vode, prebudi in emisije narastejo (na primer po poletni nevihti), če pa se dodajanje vode ponavlja, pa se emisije zaradi pomanjkanja hranil začnejo manjšati. Ugotovili so tudi, da emisije drastično padejo, ko se vsebnost vode v tleh približa saturaciji (Ludwig in sod., 2001). Temperatura je najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na nitrifikacijo in denitrifikacijo (Chatskikh in sod., 2005). Številne raziskave so pokazale porast emisij N_2O z naraščanjem temperature tal. To je posledica dejstva, da encimski procesi naraščajo eksponentno z naraščanjem temperature, če drugi faktorji (vsebnost vode v tleh, substrat...) niso limitni (Ludwig in sod., 2001).

2.3 LJUBLJANJSKO BARJE

Ljubljansko barje leži južno od Ljubljane in pokriva približno 16000 ha površine oziroma 0,8 % slovenskega ozemlja (Hacin in sod., 2001). Ta več kot 200 m globoka udornina je nastala pred dvema milijonoma let na stičišču alpskega in dinarskega sveta. Barje leži v zmernem pasu za katerega so značilni štirje letni časi, od katerih vsak traja približno tri mesece. Letna količina padavin znaša približno 1400 mm (ARSO, 2007a), povprečna letna temperatura pa je 10 °C (ARSO, 2007b). Od leta 1825 so Ljubljansko barje sistematično izsuševali s sistemom jarkov za odvajanje podtalnice. Do 19. stoletja, ko so se začela na Barju obsežna melioracijska dela, je močno narasla plast šote, ki pa so jo v 19. stoletju porezali za kurjavo in potrebe vrtničarstva, večina njegove površine pa je danes kmetijsko obdelana. Travniki predstavljajo 65 % površine, polja 25 %, manjši del pa je zaščiteno področje (Hacin in sod., 2001). Ostanke visokega barja so le še v okolici Bevk (Goričica in Kostanjevica) in Kozlerjeva gošča, ki ima status gozdnega rezervata in je največji (20 ha) velik gozdnat ostanek visokega barja. Vrhnja plast tal vsebuje od 20-60 % organske snovi, zato veljajo ta tla za ena najbolj rodovitnih v Sloveniji (Hacin in sod., 2001).

2.3.1 Eksperimentalno polje in dosedanje ugotovitve

Eksperimentalno polje je v Tomišlju in je veliko 1 ha. Sprva je bilo namenjeno proučevanju vpliva višine podtalnice na mineralizacijo šote – znano je namreč, da hitrost mineralizacije šote lahko uravnavamo z regulacijo nivoja podtalnice, mineralizacijo pa pospešuje tudi obdelovanje tal (Göttlich, 1990). V našem eksperimentu smo obravnavali le del travnika z višjo vsebnostjo ogljika v tleh (27-40 %) (Hacin in sod., 2001).

Za barjanska tla je značilna velika sposobnost zadrževanja vode (WHC- angl. Water Holding Capacity). Delež gravitimetrične vsebnosti vode v tleh glede na celotno sposobnost zadrževanja vode v zgornjem sloju tal (% WHC) se v sezoni giblje v skladu z nivojem podtalnice, padavinami in temperaturami. Povprečna temperatura zgornjega sloja tal (0-30 cm) je pozimi daljše obdobje (od decembra do marca) med 0 °C in 5 °C, poleti pa se od junija do septembra giblje blizu 20 °C (Repič, 2007). Nivo podtalnice je najvišji (okoli 0,5 m pod površjem tal) v obdobju med oktobrom in aprilom, medtem ko avgusta

doseže najnižje vrednosti (ekstremno do 1,75 m pod površjem tal) (Hacin in sod., 2004b). Tla imajo takoj po zimi, ko se sneg tali in so temperature še nizke, okoli 90 % WHC, poleti pa je avgusta daljše obdobje suše, ko imajo tla 45 % WHC (Repič, 2007). Barjanska tla z visokim deležem ogljika imajo WHC $1,7 \pm 0,2$ g vode na gram suhih tal (Kraigher in sod., 2006).

S pomočjo poljskih in laboratorijskih poskusov je bilo do sedaj ugotovljeno, da je stopnja mineralizacije organskega dušika proporcionalna deležu organskega ogljika v tleh in je najvišja pri višini podtalnice 40-60cm (Hacin in sod., 2004a). Mikrobna aktivnost v barjanskih tleh je odvisna od vsebnosti vode in višine podtalnice in je višja pri večji vsebnosti vode. V poletnem času kljub višjim temperaturam zaradi pomanjkanja vode aktivnost pade. Na mikrobno aktivnost vpliva tudi sposobnost tal za zadrževanje vode (WHC), ki vpliva na dostopnost hranil in prezračenost tal. Optimalne razmere za aktivnost aerobnih organizmov so med 50 % in 70 % WHC, pri večjih vrednostih WHC pa pride do pomanjkanja kisika. Struktura bakterijske mikrobne združbe v tleh Ljubljanskega barja je ne glede na sezonska nihanja (vsebnost vode in spremembe temperature) dokaj stabilna (Kraigher in sod., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

V zastavljenem eksperimentu smo v mikrokozmi ugotavljali vpliv vsebnosti vode v tleh in temperature tal Ljubljanskega barja na obseg združbe nitrifikatorjev v tleh, merili smo potencialno nitrifikacijsko encimsko aktivnost in ugotavljali vpliv navlaževanja in izsuševanja tal ob koncu posamezne sezone na emisije toplogrednih plinov. Na koncu inkubacijskega eksperimenta smo določili še s substratom inducirano respiracijo.

3.2 VZORČENJE IN PRIPRAVA TAL

Vzorčenje tal je potekalo 13.12.2005 na travniku na delu eksperimentalnega polja v Tomišlju, kjer tla vsebujejo visok delež (27-40 %) organske snovi. Površje je bilo pokrito s približno 5 cm debelo snežno odejo. V mreži 10x10 m smo odvzeli 100 sredic na globini 0-30 cm premera 3-4 cm z vegetacijo vred. Nabrali smo približno 70 kg tal.

V laboratoriju smo tla najprej osušili pri 28 °C toliko (na približno 60 % WHC), da smo jih lahko homogenizirali skozi sito s premerom luknjic 5mm (slika 4). Iz tal smo odstranili ostanke s prostim očesom vidne rastlinske in živalske biomase. Talne agregate smo zdrobili z drobilcem (IHP Žalec). Vsa presejana in zdrobljena tla smo zmešali v en homogen vzorec. Temu smo določili vsebnost vode in sposobnost za zadrževanje vode (WHC).



Slika 4: Homogenizacija tal. Na zraku posušena tla smo homogenizirali skozi sito, ki ima luknjice premera 5 mm.

3.2 VSEBNOST VODE V TLEH

Opisuje trenutno vodno stanje tal in se v naravi spreminja v odvisnosti od vremenskih razmer in letnih časov (padavine, sušna obdobja, temperatura) (Weaver, 1994). V stehtane tehtiče smo zatehtali 30 g svežega vzorca tal in posušili pri 65 °C. Po sušenju smo tehtiče s suhimi tlemi ponovno stehtali in odšteli maso tehtiča, da smo dobili maso suhih tal. Razlika v masi tal in masi suhih tal je masa vode, ki je izhlapela med sušenjem. Delali smo v treh ponovitvah.

Vsebnost vode v tleh smo izračunali po formuli:

$$\text{Vsebnost vode v tleh} = (m_{\text{tal}} - m_{\text{suhih tal}}) / m_{\text{suhih tal}} = m_{\text{vode}} / m_{\text{suhih tal}}$$

3.4 SPOSOBNOST ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)

Sposobnost zadrževanja vode močno vpliva na mikrobno aktivnost, ker vpliva na prezračenost tal in dostopnost hranil. 100 % WHC predstavlja največjo maso vode, ki jo je sposoben zadržati 1 g tal. Različni deleži WHC (npr. 40 %, 50 % ali 60 % WHC) se uporabljajo za zagotavljanje enake stopnje vsebnosti vode v tleh v eksperimentih (Weaver, 1994).

Na dno kovinskih cilindrov smo dali plast papirnate brisače, navlažili in stehtali. Dodali smo vzorec tal in ponovno stehtali. Cilindre z vzorcem smo potopili v vodo, pokrili z aluminijasto folijo in inkubirali v vodni kopeli čez noč. Naslednji dan smo cilindre pokrili z aluminijasto folijo, da smo preprečili izhlapevanje vode, jih dali na odcejanje in vsako uro tehtali do konstantne teže. Zadnje meritev smo uporabili kot podatek pri računanju mase v tleh zadržane vode. Delali smo v treh ponovitvah.

WHC vzorca smo izračunali po formuli:

$$\text{WHC} = (m_{\text{v tleh zadržane vode}} + m_{\text{nevezane vode}}) / m_{\text{suhih tal}}$$

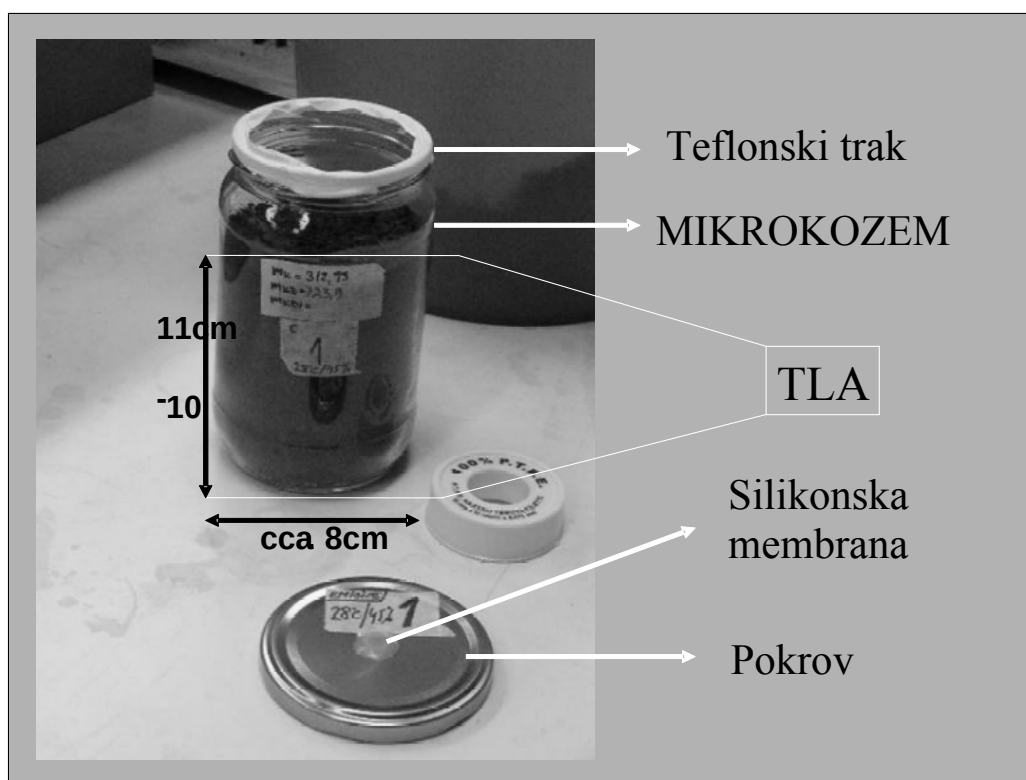
Maso v tleh zadržane vode smo opredelili kot 100 % WHC.

3.4 OPIS EKSPERIMENTA V MIKROKOZMIH

3.4.1. Mikrokozmi

Iz približno 70 kg homogenega vzorca tal smo zatehtali po 400 g tal na mikrokozem. Napolnili smo 120 mikrokozmov, tla navlažili na 45 % WHC in jih dali na predinkubacijo 10 dni pri 28 °C, v temi. Niti med predinkubacijo niti pozneje v tla nismo dodajali nobenih hranil.

Za mikrokozme smo uporabili standardne kozarce za vlaganje s prostornino 720 ml, premerom 8 cm in višino 13 cm. Kozarci imajo na vrhu navoj, kamor lahko privijemo pokrovček. V pokrovčke, ki smo jih uporabljali za merjenje emisij smo izvrtali luknje in z dvokomponentnim lepilom pritrčili silikonske membrane (slika 6).



Slika 5: Mikrokozem za inkubacijo tal in meritve emisij toplogrednih plinov. Med inkubacijo so bili mikrokozmi odprti. Za merjenje emisij toplogrednih plinov smo mikrokozme tesno zaprli s pokrovčkom s silikonsko membrano (septo). Za popolno tesnenje smo navoj, kamor se navije pokrovček, prej ovili s teflonskim trakom. Skozi silikonsko membrano smo lahko jemali vzorce plinske faze (Pal, 2007).

3.4.6 Simulacija sezon barja

Barje ima štiri sezone – suho toplo poletje, ki traja tri mesece, vlažno mokro zimo, ki prav tako traja 3 mesece ter dve prehodni obdobji, jesen in pomlad (Repič, 2007).

Po 10 dnevni predinkubaciji pri 28 °C in 45 % WHC smo mikrokozme razdelili v štiri skupine in jih izpostavili različnim razmeram (preglednica 2):

- skupina A pri 28 °C in 45 % WHC je simulirala običajno sezono - suho poletje,
- skupina B pri 28 °C in 90 % WHC manj verjetno sezono - vlažno poletje,
- skupina C pri 4 °C in 45 % WHC prav tako manj verjetno sezono - suho zimo,
- skupina D pri 4 °C in 90 % WHC pa običajno sezono - vlažno zimo.

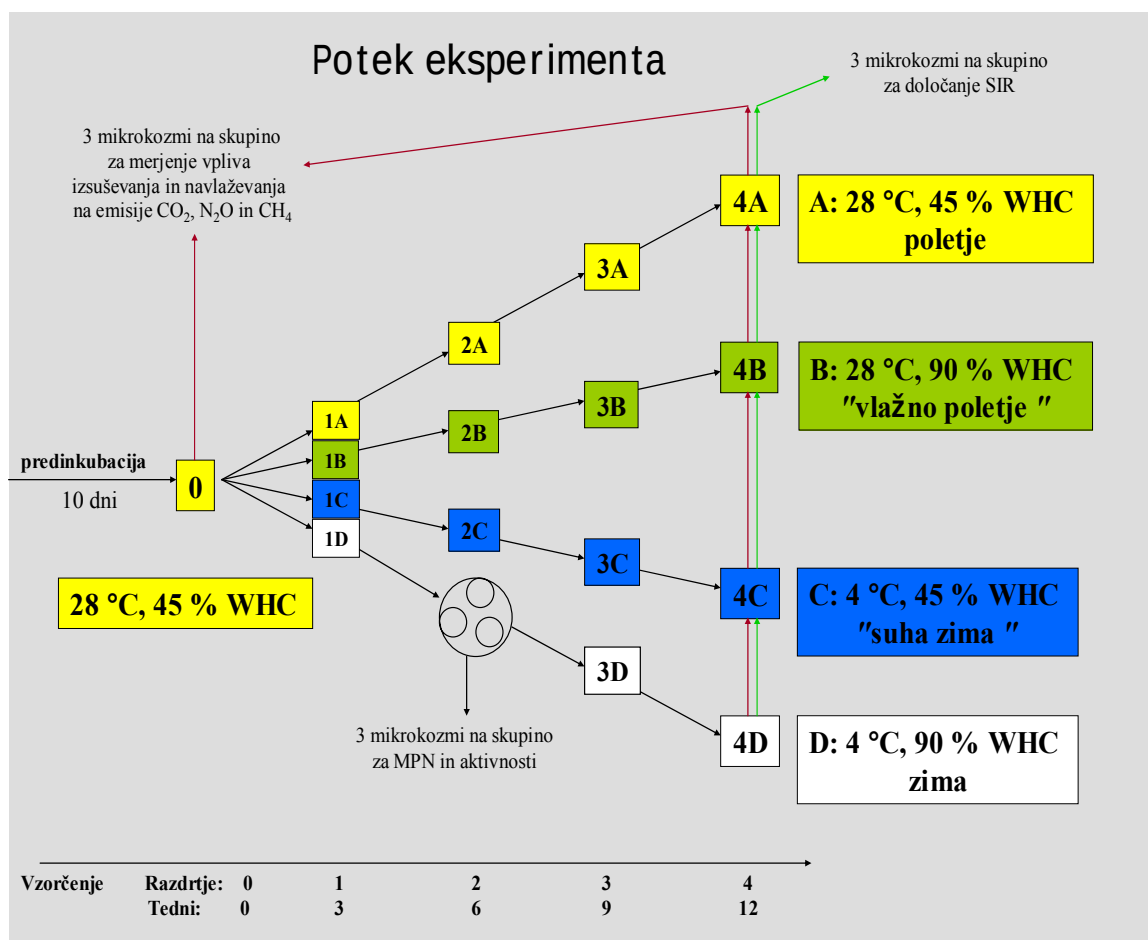
Mikrokozmom v razmerah B (28 °C, 90 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) smo dolili toliko destilirane vode, da so tla v njih dosegla točno 90 % WHC, 45 % WHC v razmerah A (28 °C, 45 % WHC) in C (4 °C, 45 % WHC) pa smo vzdrževali kot je opisano v točki 3.4.4.

Preglednica 2: Razdelitev mikrokozmov s tlemi Ljubljanskega barja v posamezne skupine glede na vsebnost vode v tleh in temperaturo tal.

Parametra, ki določata tip podnebnih razmer v tleh		Poimenovanje podnebnih razmer v tleh	Skupina inkubacije tal v mikrokozmih
Temperatura tal	Vsebnost vode v tleh		
28 °C (poletje)	45 % WHC (sušno obdobje)	poletje	A (28 °C, 45 % WHC)
	90 % WHC (deževno obdobje)	"mokro poletje"	B (28 °C, 90 % WHC)
4 °C (zima)	45 % WHC (brez padavin)	"suha zima"	C (4 °C, 45 % WHC)
	90 % WHC (padavine - sneg)	zima	D (4 °C, 90 % WHC)

3.4.3. Shema eksperimenta in razdiranje mikrokozmov

Prvič smo razdrli mikrokozme po 10 dnevni predinkubaciji, nato pa smo jih razdirali vsake 3 tedne 12-14 tedenske inkubacije. Mikrokozme v razmerah A (28 °C, 45 % WHC) in B (28 °C, 90 % WHC) smo razdrli prvi teden, v razmerah C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) pa en teden za njima.



Slika 6: Shema eksperimenta.

Med dvanajsttedensko inkubacijo smo vsake tri tedne razdrli 3 mikrokozme posamezne skupine in v tleh določili MPN nitrifikatorjev in nitrifikacijsko encimsko aktivnost (NEA).

Vzporedno smo izvedli ob času t_0 in t_{12} tednov še podeksperimente, s katerimi smo merili vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja ali izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije toplogrednih plinov CO₂, N₂O in CH₄. Prvi podeksperiment je potekal takoj po predinkubaciji mikrokozmov ob času t_0 , ostali štirje pa ob času t_{12} . Pri vsakem podeksperimentu smo porabili tri mikrokozme. Na koncu dvanajsttedenske inkubacije smo izmerili še mikrobo aktivnost z metodo s substratom inducirane respiracije (SIR) v vseh štirih skupinah inkubacije.

Pri enem razdiranju smo porabili 3 mikrokozme posamezne skupine. Tla iz posameznega mikrokozma smo stresli na pladenj ter jih premešali. Porabili smo jih za:

- ugotavljanje nitrifikacijske encimske aktivnosti – NEA (angl. Nitrification Enzyme Activity) – 3 ponovitve na mikrokozem,
- ugotavljanje števila nitrifikatorjev po metodi najverjetnejšega števila - MPN (angl. Most Probable Number) – 1 mikrotitrna plošča na mikrokozem,
- ugotavljanje vsebnosti vode v tleh po postopku opisanem v točki 3.3 – 3 ponovitve na mikrokozem.

3.4.4. Vzdrževanje vsebnosti vode v tleh

Vsebnost vode v tleh smo med inkubacijo preverjali dvakrat tedensko. Vsak kozarec/mikrokozem smo, preden smo ga napolnili s tlemi, stehtali. Ker smo v vsakega dali točno 400 g tal s 45 % WHC, smo vedeli tudi količino suhih tal v mikrokozmu. Izračunali smo, koliko mora tehtati posamezen mikrokozem s tlemi vred, da bodo tla v njem imela 45 % oziroma 90 % WHC. Med inkubacijo je voda iz tal izhlapevala, še posebej iz tistih pri 28 °C. Manjkajočo maso vode smo nadomestili z dolivanjem destilirane vode. Med inkubacijo smo imeli mikrokozme le toliko pokrite, da smo preprečili močno izhlapevanje, izmenjava zraka pa je bila omogočena.

3.4.5 Ugotavljanje števila nitrifikatorjev z metodo najverjetnejšega števila (MPN)

3.4.6.1 Priprava in odčitavanje MPN

Metoda temelji na principu redčenja vzorca tal in gojenja mikroorganizmov v redčenem vzorcu v selektivnem gojišču za določeno skupino mikroorganizmov (Woomer, 1994), v našem primeru nitrifikatorjev. V 500 ml steklenico smo zatehtali 10 g vzorca tal, dolili 90 ml raztopine $MgSO_4$ (1 g/l) in stresali vodoravno 20 min pri 150 obratih na minuto. 40 μ l suspenzije stresanih tal smo nacepili v serijo prvih osem luknjic na mikrotitrski plošči z 8x12 luknjicami, v katere smo predhodno dodali 180 μ l selektivnega gojišča za ugotavljanje števila nitrifikatorjev (preglednica 3).

Preglednica 3: Sestava gojišča za ugotavljanje števila nitrifikatorjev. Sestavine smo zmešali z destilirano vodo do volumna 1000 ml, uravnali pH z 2 % K_2CO_3 na 7.0-7.4, razlili v 500 ml steklenice, pokrili z vatnimi zamaški in aluminijasto folijo ter avtoklavirali pri 121 °C 20 min.

Kemikalija	Koncentracija stock raztopine (g/100 ml)	Volumen stock raztopine na 1 l gojišča
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	10.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.34	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.0	1.0
Bromtimol modro	0.04	5.0
KH_2PO_4 (0.2M)	2.72	7.5
Kelirano železo		1.0
Mikroelementi		1.0

Vsebinsko prvih osmih luknjic smo premešali s sterilnimi nastavki avtomatske pipete in 40 µl prenesli v serijo naslednjih osem luknjic. Postopek smo ponovili še 10x. Nacepljene mikrotitrne plošče smo inkubirali aerobno 4 tedne v temi pri 28 °C. Po inkubaciji smo ugotavljali prisotnost nitrata in/ali nitrita, ki sta dokaz za aktivnost nitrifikatorjev. V vsako luknjico smo dodali kapljico reagenta SA+NEDA (vsebuje sulfonilamid in naftiletildiamin), ki daje v reakciji z nitritom rožnato obarvano azo spojino. Če je prisoten nitrat, le-tega s cinkom reduciramo do nitrita, ki nato z reagentom SA+NEDA tvori rožnato obarvano spojino.

3.4.6.2 Izračun MPN

Najprej smo iz podatkov o masi stresanih tal (10 g), volumnu dodanega pufru (90 ml), volumnu gojišča v luknjicah mikrotitrne plošče (180 µl) in volumnu nacepljene suspenzije (40 µl) izračunali inokulum v gramih tal na luknjico po prenosu suspenzije v serijo naslednjih osem luknjic. Ta podatek smo skupaj s podatkom o številu ponovitev (8 luknjic na vrstico) in podatkom o številu pozitivnih luknjic v vrstici (0 do 8) vstavili v t.i. MPN računalno, excelov makro Bam-MPN (Blodgett, 2006). Rezultat poda najbolj verjetno število nitrifikatorjev v enem gramu suhih tal, poda pa tudi rezultat v logaritemski vrednosti s standardnim odklonom.

3.4.6 Ugotavljanje potencialne nitrifikacijske encimske aktivnosti z metodo NEA

Metoda NEA omogoča merjenje nitrifikacijske encimske aktivnosti v tleh. Ta je prenosorazmerna količini nitrifikacijskih encimov v tleh. Ugotavljali smo jo kot količino nitratnega in nitritnega dušika, ki nastane v eni uri na gram suhih tal v prisotnosti založne koncentracije amonija, tako da ta ne predstavlja več limitnega faktorja.

3.5.6.1 Izvedba NEA

Delali smo v treh ponovitvah na mikrokozem. V 1000 ml steklenico smo zatehtali 40 g vzorca, zalili z 200 ml gojišča za ugotavljanje aktivnosti nitrifikatorjev (preglednica 4) ter stresali na 28 °C pri 150 obratov na minuto.

Preglednica 4: Sestava gojišča za ugotavljanje aktivnosti nitrifikatorjev. Sestavine smo premešali z destilirano vodo do volumna 1000 ml, uravnali pH na 7.0-7.4, razlili v 500 ml steklenice, pokrili z vatnimi zamaški in alu folijo ter avtoklavirali pri 121 °C 20 min.

Kemikalija	Koncentracija stock raztopine (g/100 ml)	Volumen stock raztopine v 1 l gojišča
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	10.0
K ₂ HPO ₄ (0.2M)	3.48	4.0
KH ₂ PO ₄ (0.2 M)	2.72	1.0

Ob časih 0, 2, 4, 6 in 8 ur smo odvzeli 10 ml suspenzije in jo prenesli v steklene centrifugirke ter centrifugirali 10 minut pri 5000 obratih na sekundo. Supernatant smo shranili v plastičnih epruvetkah pri -20 °C.

3.5.6.2 Ugotavljanje koncentracije NO₃⁻-N, NO₂⁻-N in NH₄⁺-N:

Vzorčke smo odtalili, jih ponovno premešali in ugotovili koncentracije (NO₃⁻+NO₂⁻)-N, NO₂⁻-N in NH₄⁺-N z avtomatskim analizatorjem (The continuous-flow analyser, Floxsys, Alliance instruments). Ta nam je podal koncentracije (c) v mg na liter. Količino nitratnega dušika NO₃⁻-N smo ugotovili tako, da smo od količine skupnega nitratno-nitritnega dušika (NO₃⁻+NO₂⁻)-N odšteli koncentracijo NO₂⁻-N.

Na isti način smo ugotovili tudi začetne koncentracije NO_2^- -N in NO_3^- -N v časih razdiranja mikrokozmov (spremljanje koncentracij nitrata in nitrita v tleh skozi dvanajsttedensko inkubacijo v različnih razmerah).

3.5.6.3 Izračun NEA

Ker so bile količine nitritnega dušika NO_2^- -N zelo majhne, smo nitrifikacijsko encimsko aktivnost izračunali iz podatkov o koncentraciji skupnega nitratno-nitritnega dušika ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N po postopku:

Maso skupnega nitratno-nitritnega dušika ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N smo izračunali:

$$m[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}] = c[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}] \cdot V_{\text{vodne faze}} / 1000$$

Pri tem je: $V_{\text{vodne faze}} = V_{\text{gojišča}} + V_{\text{vode v tleh}}$.

Volumen vode v tleh je: $V_{\text{vode v tleh}} = m_{\text{suhih tal}} \cdot \text{vsebnost vode v tleh}$

Masa suhih tal je: $m_{\text{suhih tal}} = m_{\text{vlažnih tal}} / (\text{povprečna vsebnost vode v tleh} + 1)$.

Koncentracija $c[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}]$ je podana v mg na liter, maso $m[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}]$ smo izračunali v mg, volumni $V_{\text{vodne faze}}$, $V_{\text{gojišča}}$ in $V_{\text{vode v tleh}}$ so v ml, vsebnost vode v tleh smo podali kot g_{vode} na $g_{\text{suhih tal}}$, pri čemer ima 1g vode volumen 1ml, masi $m_{\text{suhih tal}}$ in $m_{\text{vlažnih tal}}$ pa sta v g.

Nato smo v Excelu iz podatkov o masi $m[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}]$ (y) in času t (0, 2, 4, 6, 8 h) (x) s pomočjo funkcije linest izračunali hitrost nastanka ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N (k) v $\text{mg}[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}]$ na uro:

$$k = [n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)] / [n((\sum x^2)) - (\sum x)^2]$$

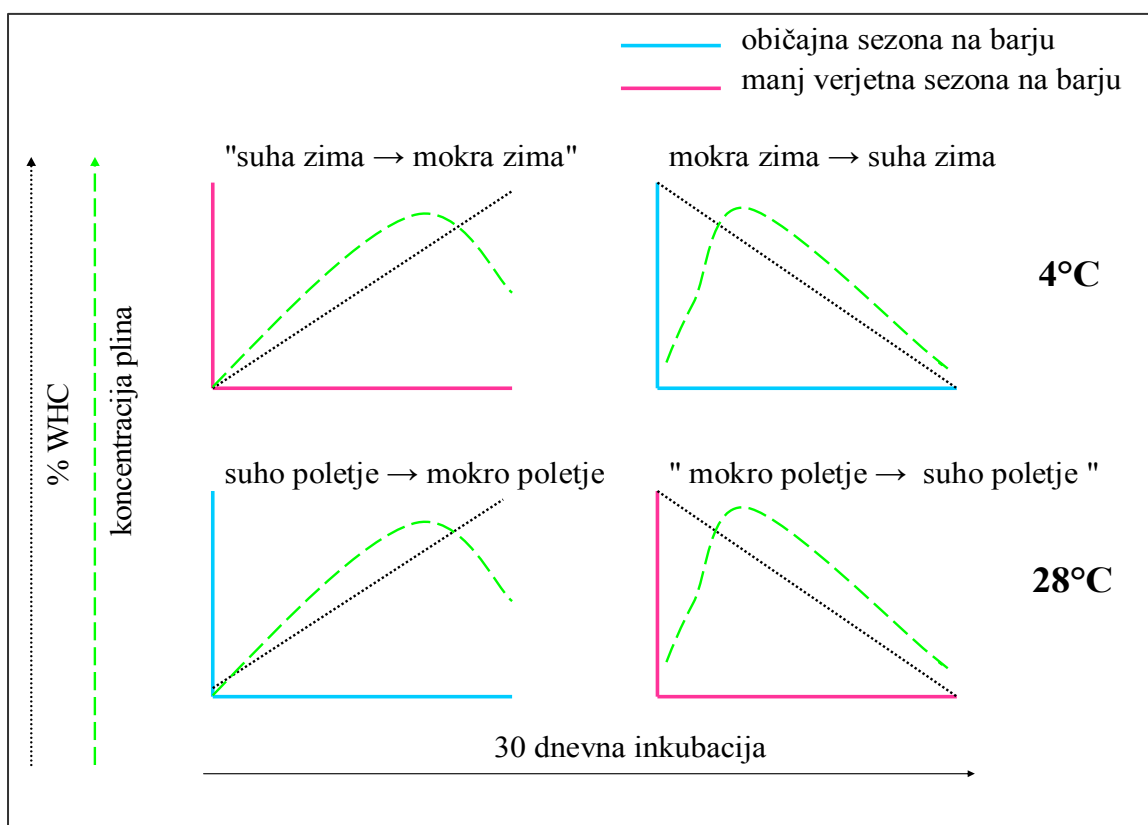
Pri tem je n število točk (x,y).

Hitrost smo delili z maso suhih tal in rezultat prikazali kot nitrifikacijsko encimsko aktivnost (NEA) našega vzorca v $\text{mg}[(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}]$ na uro na gram suhih tal:

$$\text{NEA} = k / m_{\text{suhih tal}}$$

3.4.7 Vpliv navlaževanja/izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije toplogrednih plinov CO₂, N₂O in CH₄

Vzporedno z razdiranjem mikrokozmov smo proučevali vpliv navlaževanja (simulacija jesenskih padavin) ali izsuševanja (simulacija spomladanske suše) tal v mikrokozmih na emisije treh toplogrednih plinov – CO₂, N₂O in CH₄. Prvi podeksperiment merjenja emisij je potekal na začetku eksperimenta takoj po predinkubaciji ob času t_0 tednov. Drugi del je potekal po 12 tednih inkubacije vzorcev v izbranih razmerah eksperimentalnih sezon.



Slika 7: Prikaz navlaževanja in izsuševanja mikrokozmov za merjenje emisij toplogrednih plinov.

Takoj po predinkubaciji ob času t_0 tednov smo tri mikrokozme 30 dni postopoma navlaževali po shemi suho poletje → mokro poletje. Po 12 tednih inkubacije pa smo iz vsake skupine inkubacije vzeli 3 mikrokozme in jih 30 dni postopoma navlaževali ali izsuševali. Mikrokozme skupine A (28 °C, 45 % WHC) smo navlaževali po shemi suho poletje → mokro poletje, tiste iz skupine B (28 °C, 90 % WHC) smo izsuševali po shemi "mokro poletje → suho poletje", tiste iz skupine C (4 °C, 45 % WHC) smo navlaževali po shemi "suha zima → mokra zima", tiste iz skupine D (4 °C, 90 % WHC) pa smo izsuševali po shemi mokra zima → suha zima. Trikrat tedensko smo merili emisije toplogrednih plinov CO₂, N₂O in CH₄.

3.4.7.1 Navlaževanje mikrokozmov po predinkubaciji

Po 10 dnevni predinkubaciji ob času t_0 tednov smo tri naključno izbrane mikrokozme postopoma navlaževali 30 dni iz 45 % na 90 % WHC pri 28 °C po shemi suho poletje → mokro poletje (slika 7). 3x tedensko smo merili emisije CO₂, N₂O in CH₄.

3.4.7.2 Navlaževanje ali izsuševanje mikrokozmov po dvanajsttedenski inkubaciji

Po dvanajsttedenski inkubaciji smo si izbrali po tri mikrokozme iz vsake skupine inkubacije A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC). Postopoma smo jih navlaževali ali izsuševali 30 dni ter 3x tedensko merili emisije CO₂, N₂O in CH₄ (sliki 6 in 7). Tiste iz skupine A (28 °C, 45 % WHC) smo postopoma navlaževali do 90 % WHC po shemi suho poletje → mokro poletje. Mikrokozme iz skupine B (28 °C, 90 % WHC) smo postopoma izsuševali do 45 % WHC po shemi "mokro poletje → suho poletje". Tiste iz skupine C (4 °C, 45 % WHC) smo postopoma navlaževali do 90 % WHC po shemi "suha zima → mokra zima". Mikrokozme iz skupine D (4 °C, 90 % WHC) pa smo postopoma izsuševali do 45 % WHC po shemi mokra zima → suha zima (slika 7). Tla pri 4 °C smo najprej poskusili izsuševati s pomočjo silikagela, ker pa je proces potekal prepočasi, smo uporabili za izsuševanje ventilator.

3.4.7.3 Merjenje emisij CO₂, N₂O in CH₄

Mikrokozme namenjene merjenju vpliva navlaževanja ali izsuševanja smo plinotesno zaprli s teflonskim trakom in s pokrovčkov s silikonskimi membranami (septe) (slika 8a). Inkubirali smo jih pri pripadajoči temperaturi 4 °C ali 28 °C. Ob časih 0, 30, 60 in 90 min smo z brizgo odvzeli 10 ml plinske faze ter jo vbrizgali v plinotesno zaprte stekleničke s prostornino 2 ml - viala (Agilent 8425) (slika 8b). Količine CO₂, CH₄ in N₂O v plinski fazi smo izmerili s plinskih kromatografom (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies). Plinotesno zaprte stekleničke, v katerih smo predhodno izenačili pritisk z zračnim, smo naložili na avtomatsko roko plinskega kromatografa, ki je avtomatsko jemal iz vsake stekleničke posebej 50 µl plinske faze in analiziral koncentracije plinov. Z ECD (angl. Electron Capture Detector) detektorjem je zaznal površino pika N₂O, s FID (angl.

Flame Ionization Detector) detektorjem pa še koncentraciji CO₂ in CH₄. Rezultate je glede na umeritveno krivuljo podal v odstotkih.

Celotno količino plina v mikrokozmi smo izračunali po formuli:

$$M = C_g \cdot (V_g + V_l \cdot \alpha)$$

Pri tem je:

M – celotna količina plina v mikrokozmu (ml),

C_g – izmerjena koncentracija plina v plinski fazi (%),

V_g – volumen plinske faze mikrokozma (ml) (glej 3.4.7.4),

V_l – volumen tekoče faze mikrokozma (ml),

α – Bunsenov koeficient topnosti plinov

V_l smo izračunali iz podatkov o masi suhih tal v mikrokozmu, ki smo jo odšteli od mase vlažnih tal in mikrokozma skupaj. Vsak izmed merjenih plinov ima drugačen Bunsenov koeficient (α). Upoštevati je treba še vpliv temperature inkubacije na Bunsenove koeficiente topnosti plinov v vodni fazi. Poleg tega je volumen enega mola plina (V_m) po plinski enačbi malce drugačen pri 4 °C, kot pri 28 °C (preglednica 5).

Preglednica 5: Bunsenovi koeficient in volumni plinov N₂O, CO₂ in CH₄ pri temperaturi 4 °C in 28 °C (Stopar in sod., 2006).

Plini	Temperatura			
	4 °C		28 °C	
	Bunsenov koeficient (α)	Volumen mola plina pri sobnem tlaku V _m [l/mol]	Bunsenov koeficient (α)	Volumen mola plina pri sobnem tlaku V _m [l/mol]
N ₂ O	1,06	22,73	0,51	24,70
CH ₄	0,05		0,03	
CO ₂	1,42		0,71	

Iz celotne količine plina M smo izračunali množino plina n v molih po enačbi (V_m je volumen mola plina, glej preglednica 5):

$$n = M / V_m$$

Da smo dobili maso $\text{CO}_2\text{-C}$, $\text{N}_2\text{O-N}$ in $\text{CH}_4\text{-C}$ (m) smo množino plina (n) pomnožili z molsko maso elementa C ali N (M_m). Le-te znašajo 12,001 g/mol za $\text{CO}_2\text{-C}$ in $\text{CH}_4\text{-C}$ ter 28,014 g/mol za $\text{N}_2\text{O-N}$:

$$m = M_m \cdot n$$

Rezultat emisij CO_2 smo izrazili kot $\mu\text{g CO}_2\text{-C}$ na gram suhih tal na uro, emisij N_2O kot ng $\text{N}_2\text{O-N}$ na gram suhih tal na uro in emisij CH_4 kot ng $\text{CH}_4\text{-C}$ na gram suhih tal na uro.



(a)



(b)

Slika 8: Merjenje emisij CO_2 , N_2O in CH_4 . (a) Mikrokozem za merjenje emisij. (b) Brizga z zapornim ventilom za odvzem plinske faze in plinotesno zaprta steklenička s prostornino 2 ml (viala).

3.4.7.4 Ugotavljanje volumna plinske faze mikrokozma

Mikrokozem z zemljo smo po končanem poskusu najprej stehali potem pa smo dolili vodo do roba in še enkrat stehali. Razlika v masi je enaka volumnu plinske faze (V_g) v ml.

3.6 AKTIVNOST SPLOŠNE HETEROTROFNE MIKROBNE ZDRUŽBE MERJENA S TEHNIKO SIR (S SUBSTRATOM INDUCIRANA RESPIRACIJA)

Po dvanajsttedenski inkubaciji smo iz vsake veje inkubacije – A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) – vzeli tri mikrokozme in v tleh s tehniko SIR (angl. Substrate Induced Respiration) izmerili aktivnost mikrobne združbe. Iz mikrokozma smo po 20 g tal zatehtali v šest 125 ml stekleničk. Tla treh stekleničk smo zalili z 20 ml raztopine glukoze (20 g glukoze / 1000 ml), ostale tri stekleničke so predstavljale kontrolo – zalili smo jih z 20 ml destilirane vode. Ob časih 0, 45 in 90 minut po zalitvi tal, smo s plinskim kromatografom (Becker Gas Chromatograph, Model 417) izmerili % CO₂ v plinski fazi. Stopnjo s substratom inducirane respiracije smo izrazili kot ml CO₂ na gram suhih tal na uro. Ker so bila tla inkubirana pri različnih vsebnostih vode v tleh, kar vpliva na vsebnost CO₂ v vzorcu tal, smo od vrednosti induciranih respiracij odšteli vrednosti CO₂ iz kontrolnih stekleničk brez dodatka glukoze.

3.6 RAZTOPINE, PUFRI in KEMIČALIJE

➤ SA+NEDA reagent za ugotavljanje nitrita pri MPN:

- sulfanilamid (Fluka) 10 g
- koncentrirana fosforna kislina (Fluka) 100 ml
- N-10 naftiletilendiamid dihidroklorid (Fluka) 0,5 g
- deionizirana voda 1000 ml

➤ Pufer MgSO₄ za talno suspenzijo pri MPN:

- MgSO₄ (Merck) 1 g
- deionizirana voda 1000 ml

➤ Raztopina glukoze za SIR:

- glukoza (Kemika) 20 g
- deionizirana voda 1000 ml

➤ Stock raztopina keliranega železa za gojišče za ugotavljanje števila nitrifikatorjev:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,246 g
- EDTA (Sigma) 0,331 g
- deionizirana voda 100 ml

➤ Stock raztopina mikroelementov za gojišče za ugotavljanje števila nitrifikatorjev:

- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Kemika) 0,01 g
- MnCl_2 (Merck) 0,02 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 0,0002 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,01 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Zorka – Šabac) 0,002 g
- deionizirana voda 100 ml

➤ Druge uporabljene kemikalije:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Kemika)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Zorka – Šabac)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- bromtimol modro (Riedel)
- KH_2PO_4 (Merck)
- K_2HPO_4 (Merck)

4 REZULTATI

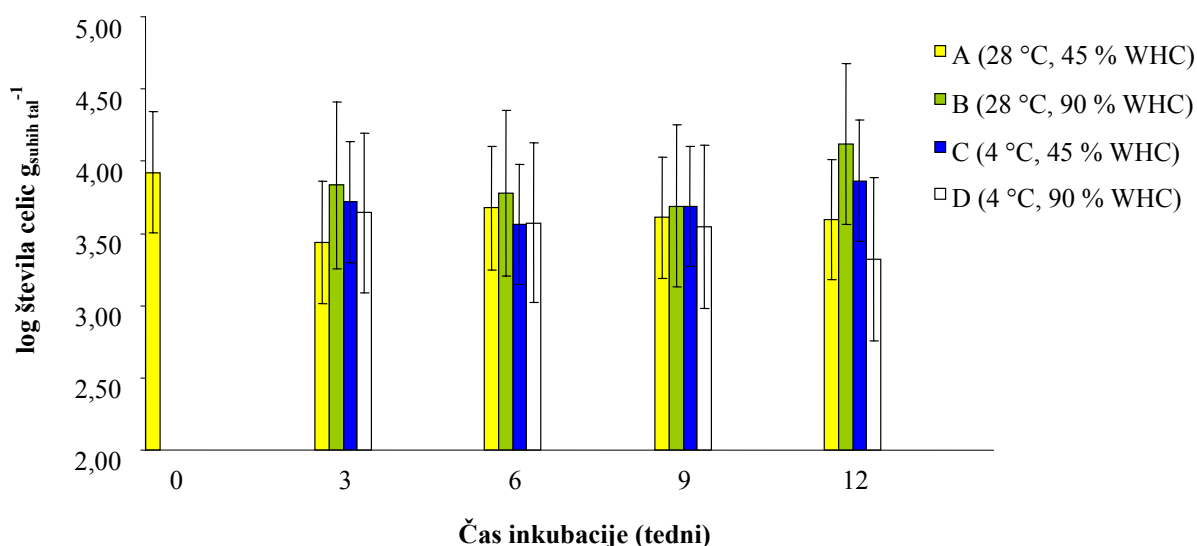
5.1 UGOTAVLJANJE WHC

Po homogenizaciji tal po vzorčenju na barju smo vsa tla premešali v en vzorec. Temu smo določili vsebnost vode v tleh in sposobnost za zadrževanje vode (WHC). Vsebnost vode v tleh je znašala 42 % WHC. Največjo maso vode, ki so jo tla sposobna zadržati, opredelimo kot 100 % WHC in je v našem primeru znašala $1,82 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{vode}} / \text{g}_{\text{suhih tal}}$.

5.2 UGOTAVLJANJE MPN

Vzorec tal smo nacepili v mikrotitrne plošče, ki so vsebovale selektivno gojišče za nitrifikatorje. Po štirih tednih inkubacije smo ugotavljali njihovo število v vzorcih, ki so se razlikovali v vsebnosti vode v tleh (45 % ali 90 % WHC) in temperaturi inkubacije (4 °C ali 28 °C).

Število nitrifikatorjev se med dvanajsttedensko inkubacijo v različnih razmerah ni bistveno spremenilo (slika 9).



Slika 9: MPN nitrifikatorjev - logaritem števila celic na gram suhih tal med dvanajsttedensko inkubacijo mikrokozmov v različnih razmerah. 4 skupine inkubacije: A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC). Mikrokozme posamezne skupine smo razdirali vsake 3 tedne, 12 tednov.

5.3 UGOTAVLJANJE NEA

Z metodo NEA smo ugotavljali vpliv temperature (4 °C ali 28 °C), vsebnosti vode v tleh (45 % ali 90 % WHC) in časa inkubacije (0, 3, 6, 9 in 12 tednov) na potencialno sposobnost tal, da presnovijo amonij v nitrat in nitrit. V sistem smo dodali presežek amonija.

Mikrokozme smo izpostavili desetdnevni predinkubaciji pri 28 °C in 45 % WHC, s čimer smo dosegli uravnoteženje razmer v tleh. Ugotovili smo, da je po desetdnevni predinkubaciji hitrost presnove amonija v nitrat in nitrit $0,014 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$ (slika 10).

Nato smo mikrokozme razdelili v štiri skupine, ki smo jih inkubirali v štirih različnih razmerah:

5.3.1 Razmere inkubacije A (28 °C, 45 % WHC)

V tej skupini smo vzdrževali enake razmere kot na začetku. Aktivnost se je postopno poviševala ob vseh meritvah in je po dvanajstih tednih dosegla $0,040 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$, kar je več kot dvakrat toliko na začetku (slika 10).

5.3.2 Razmere inkubacije B (28 °C, 90 % WHC)

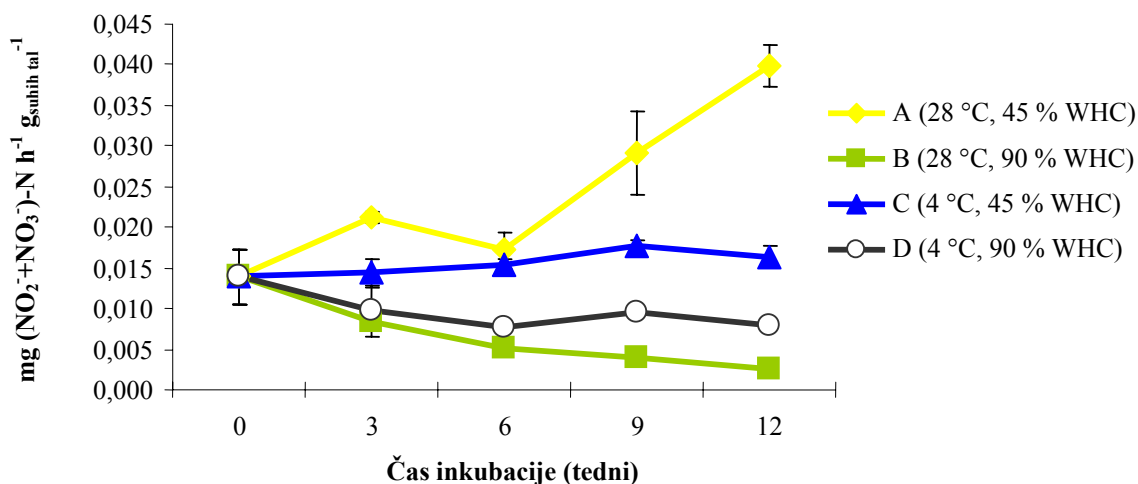
Če smo po predinkubaciji razmere spremenili tako, da smo tla v mikrokozmu ob času t_0 tednov navlažili iz 45 % na 90 % WHC, se je po treh tednih sposobnost tal za oksidacijo amonija zmanjšala na $0,008 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$, kar je skoraj za polovico. Po šestih tednih se je trend nadaljeval na $0,005 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$, po devetih je sposobnost tal padla na $0,004 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$, po dvanajstih pa na $0,002 \text{ mg } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N h}^{-1} \text{ g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$ (slika 10), kar je sedemkrat manj glede na začetno aktivnost ob času t_0 .

5.3.3 Razmere inkubacije C (4 °C, 45 % WHC)

Inkubacija tal pri 4 °C in 45 % WHC ni pripeljala do sprememb potencialne aktivnosti tal za oksidacijo amonija. Le-ta se je v času 12 tedenske inkubacije gibala med 0,014 in 0,018 mg (NO₂⁻+NO₃⁻)-N h⁻¹ g_{suhih tal}⁻¹ (slika 10).

5.3.4 Razmere inkubacije D (4 °C, 90 % WHC)

Tla smo navlažili na 90 % WHC in jih dali inkubirati na 4 °C. Po treh tednih se njihova sposobnost ni znatno spremenila. Po šestih je padla na 0,007 mg (NO₂⁻+NO₃⁻)-N h⁻¹ g_{suhih tal}⁻¹, kar je za polovico začetne vrednosti. Po devetih in po dvanajstih tednih inkubacije se vrednosti niso več signifikantno spremenile (slika 10).

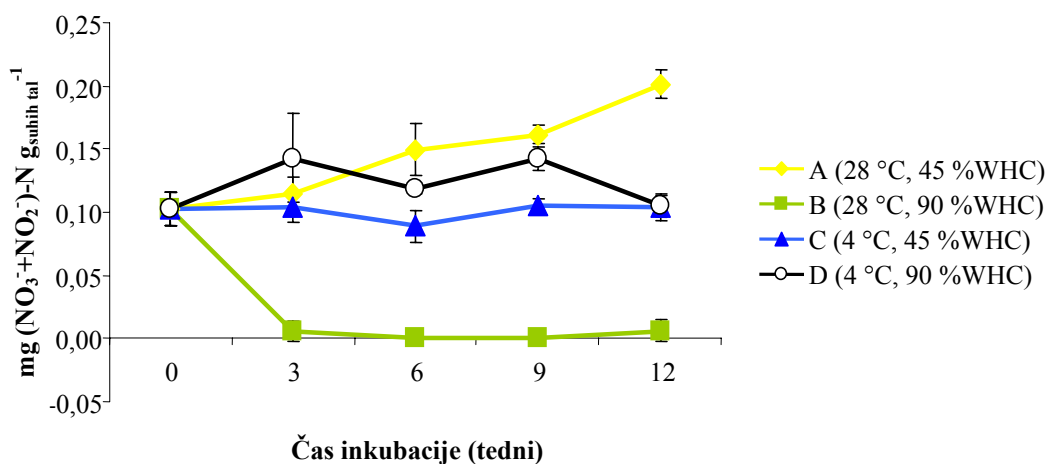


Slika 10: Nitrifikacijska encimska aktivnost (NEA) – hitrost proizvodnje (NO₂⁻+NO₃⁻)-N (mg) na uro na gram suhih tal med dvanajsttedensko inkubacijo mikrokozmov v različnih razmerah - 4 skupine inkubacije: A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC). Mikrokozme posamezne skupine smo razdirali vsake 3 tedne, 12 tednov.

5.4 SPREMLJANJE KONCENTRACIJ NITRATA IN NITRITA V MIKROKOZMIH

V mikrokozmih smo spremljali tudi vsebnost nitrata in nitrita med dvanajsttedensko inkubacijo. Takoj po predinkubaciji ob času t_0 je bilo v tleh mikrokozmov $0,10 \text{ mg } (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)\text{-N g}_{\text{suhih tal}}^{-1}$. Skupni nitrarno-nitritni dušik je pri skupini A (28°C , 45 % WHC) v mikrokozmih ves čas naraščal in po dvanajstih tednih dosegel dvakratno koncentracijo začetnega stanja. Pri skupini B (28°C , 90 % WHC) je količina nitrarno-nitritnega dušika po treh tednih upadla na minimum in tam ostala do konca eksperimenta. Pri skupinah C (4°C , 45 % WHC) in D (4°C , 90 % WHC), je količina ostala na približno enakem nivoju kot na začetku, opazno je bilo rahlo povečanje pri skupini D (4°C , 90 % WHC) (slika 11).

Skupni nitrarno-nitritni dušik je bil skoraj ves v obliki nitrata (98-100 %). Nitrita je bilo v mikrokozmih zelo malo, na meji ali celo pod mejo detekcije, ki za naš avtomatski analizator (The continuous-flow analyser, Floxsys, Alliance instruments) znaša $1 \text{ } \mu\text{g/g}_{\text{suhih tal}}$.



Slika 11: Vsebnost nitrarno-nitritnega dušika v mikrokozmih med dvanajsttedensko inkubacijo. Podatke smo vzeli iz meritev ob času t_0 ur pri merjenju nitrifikacijske encimske aktivnosti z avtomatskim analizatorjem.

4.6 VPLIV NAVLAŽEVANJA/IZSUŠEVANJA TAL V MIKROKOZMIH NA EMISIJE TOPLOGREDNIH PLINOV

Vpliv postopnega navlaževanja/izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije CO₂, N₂O in CH₄ smo merili v dveh časovno ločenih podeksperimentih: takoj po predinkubaciji ob času t_0 in po dvanajsttedenski inkubaciji, ko so bili mikrokozmi izpostavljeni štirim različnim razmeram (poglavji 4.3. in 4.4.).

4.6.1 Emisije CO₂

Emisije CO₂ v podeksperimentu takoj po predinkubaciji ob času t_0 - navlaževanje po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), so naraščale vzporedno z naraščanjem % WHC v mikrokozmih do 80 % WHC. Maksimum je bil 2,95 µg CO₂-C g_{suhih tal}⁻¹ h⁻¹. Pri višjem WHC so emisije CO₂ upadle (slika 12a).

V drugem delu eksperimenta po 12 tednih inkubacije smo spremljali vpliv navlaževanja ali izsuševanja v štirih različnih razmerah. V mikrokozmih iz skupine A (28 °C, 45 % WHC), ki smo jih navlaževali po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), so emisije CO₂ naraščale podobno kot v mikrokozmih iz prvega dela eksperimenta ob času t_0 , to je vzporedno z naraščanjem % WHC. Tudi tu so emisije CO₂ dosegle maksimum pri 80 % WHC, pri višjih vrednostih WHC je njihova količina upadla. Tudi količinsko so bile emisije CO₂ podobne tistim ob času t_0 , maksimum je bil 2,76 µg CO₂-C g_{suhih tal}⁻¹ h⁻¹ (slika 12b). V mikrokozmih iz skupine B (28 °C, 90 % WHC), ki smo jih sušili po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 45 % WHC, 28 °C), je imel % WHC podoben vpliv kot pri prejšnjih dveh, le da so bila tla tu izpostavljena sušenju. Najprej so bile ob visokem % WHC emisije šibke, nato so pri 80 % WHC dosegle svoj maksimum in nato je vzporedno s padanjem % WHC tudi količina emisij upadla. Zanimivo pa je, da so bile maksimalne emisije CO₂ v tem podeksperimentu dvakrat višje (7,05 µg CO₂-C g_{suhih tal}⁻¹ h⁻¹) v primerjavi z maksimalnimi količinami emisij podeksperimentov navlaževanja po shemi suho poletje – mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C) ob časih t_0 in t_{12} (slike 12a, b in c). Tla mikrokozmov skupine C (4 °C, 45 % WHC) smo navlaževali po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C). Emisije CO₂ so se pojavljale v

zelo majhnih količinah – maksimum je bil tu le $0,77 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 12d), kar je trikrat manj kot če je navlaževanje potekalo pri 28°C (slika 12b). Tla mikrokozmov skupine D (4°C , 90 % WHC) smo sušili po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4°C). Emisije CO_2 so bile tudi tu količinsko zelo majhne, maksimum je bil $0,85 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 12e), kar je sedemkrat manj kot pri podeksperimentu poletnega izsuševanja (slika 12c).

4.6.2 Emisije N_2O

V prvem podeksperimentu ob času t_0 - navlaževanje po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28°C), emisij N_2O nismo zaznali, dokler vsebnost vode v tleh v mikrokozmu ni dosegla vsaj 65 % WHC. Nato je količina emisij naraščala do konca eksperimenta vzporedno z naraščanjem % WHC. Maksimalna količina emisij je bila pri 90 % WHC in je znašala $908 \text{ ng g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 13a).

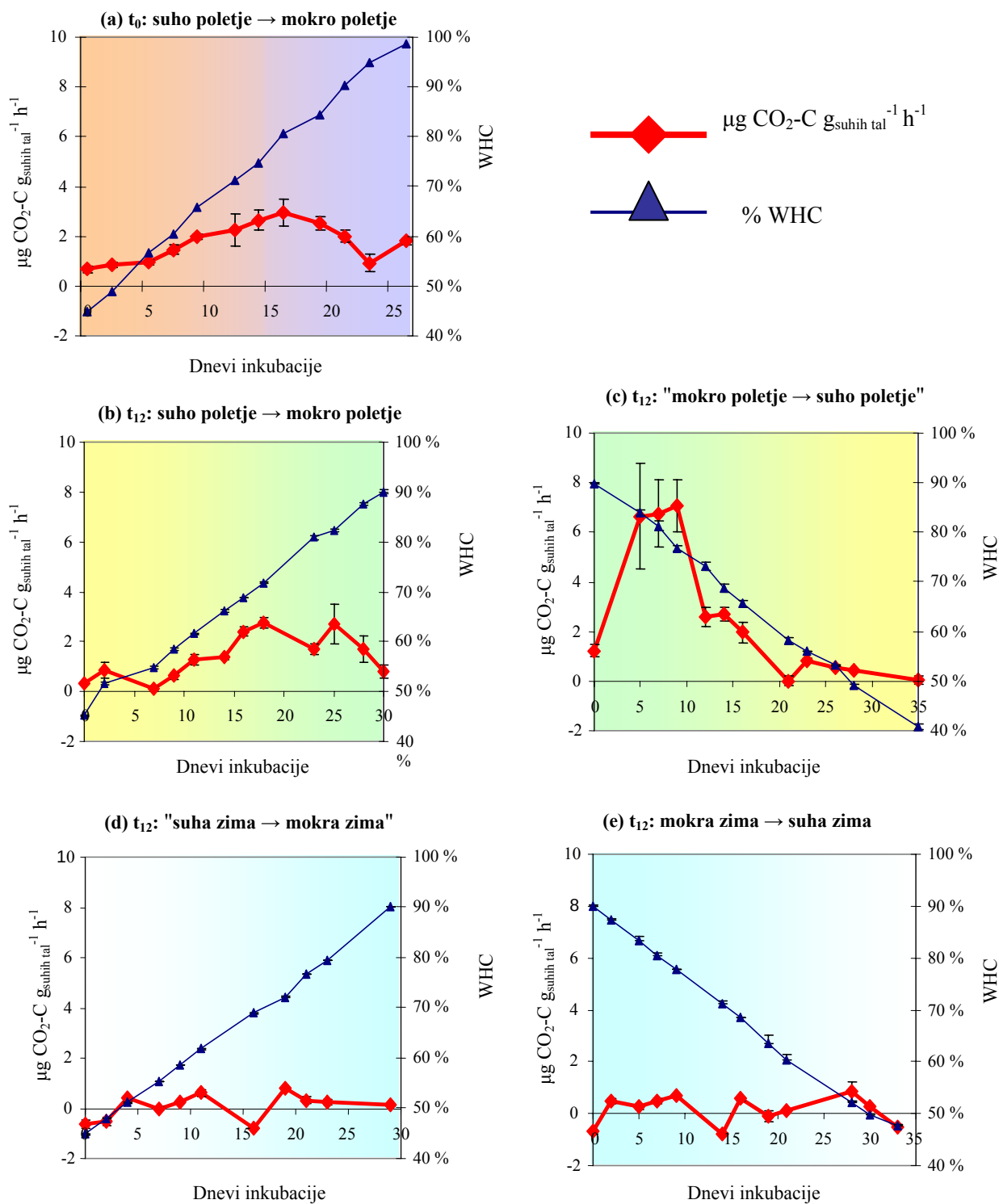
Podoben vzorec emisij N_2O smo dobili tudi v drugem delu eksperimenta, ko smo po 12 tednih inkubacije spremljali vpliv navlaževanja po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28°C). Maksimalno vrednost emisij smo zaznali pri 90 % WHC in je bila $2230 \text{ ng g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 13b), kar je dvakrat več kot pri podeksperimentu ob času t_0 . V mikrokozmih iz skupine B (28°C , 90 % WHC), ki smo jih izsuševali po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 45 % WHC, 28°C), emisij pri 90 % WHC sprva nismo zaznali. Takoj ko pa so se tla v mikrokozmi posušila na manj kot 90 % WHC, smo jih zaznali in maksimum izmerili pri 80 % WHC – $880 \text{ ng g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 13c), kar je podobno kot pri podeksperimentu ob času t_0 in dvakrat manj kot pri podeksperimentu poletnega navlaževanja ob času t_{12} . Ko pa je vsebnost vode v tleh padla pod 65 % WHC so emisije N_2O prenehale (slika 13c). Ta vzorec sproščanja emisij je bil značilen že pri prejšnjih dveh podeksperimentih. Tla mikrokozmov skupine C (4°C , 45 % WHC) smo navlaževali po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4°C). Emisije N_2O so se pojavile le v šumu v zelo majhnih količinah (slika 13d). Tla mikrokozmov skupine D (4°C , 90 % WHC) smo sušili po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4°C). Emisij je bilo sprva pri 90 % WHC zelo malo oziroma skoraj nič, podobno kot pri podeksperimentu izsuševanja mikrokozmov skupine B (28°C , 90 % WHC). Nato

so podobno kot v omenjenem podeksperimentu narasle takoj, ko so se tla posušila pod 90 % WHC in dosegle maksimum $330 \text{ ng g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 13e) pri 75 % WHC, kar je skoraj trikrat manj kot v podeksperimentu poletnega izsuševanja mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC) ob času t_{12} . Ko so se tla posušila pod 65 % WHC so tudi tu emisije izginile (slika 13e).

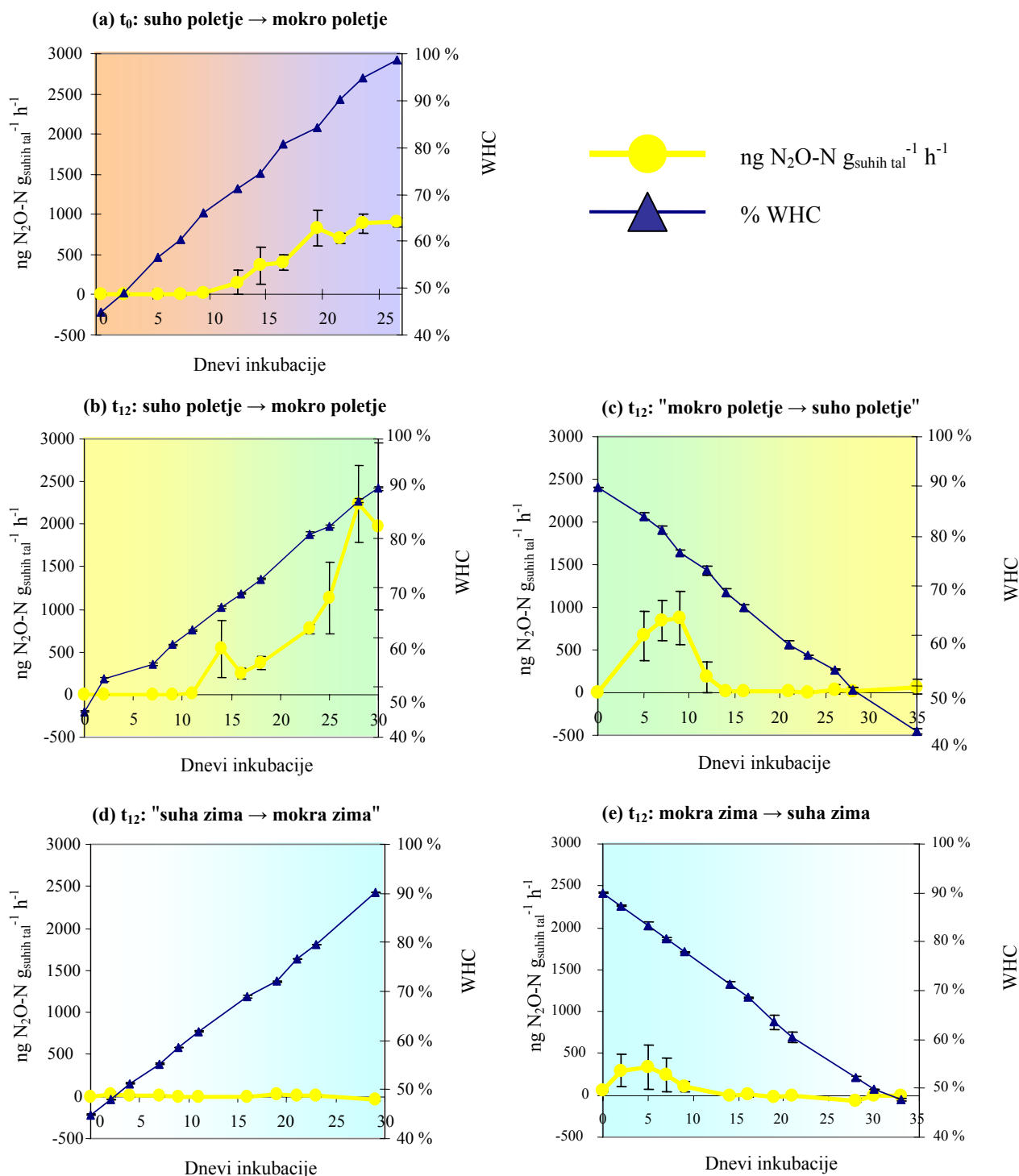
4.5.3 Emisije CH_4

V prvem podeksperimentu ob času t_0 - navlaževanje po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), so se emisije CH_4 pojavile v tako majhnih količinah, da lahko rečemo, da so bile na meji detekcije (slika 14a).

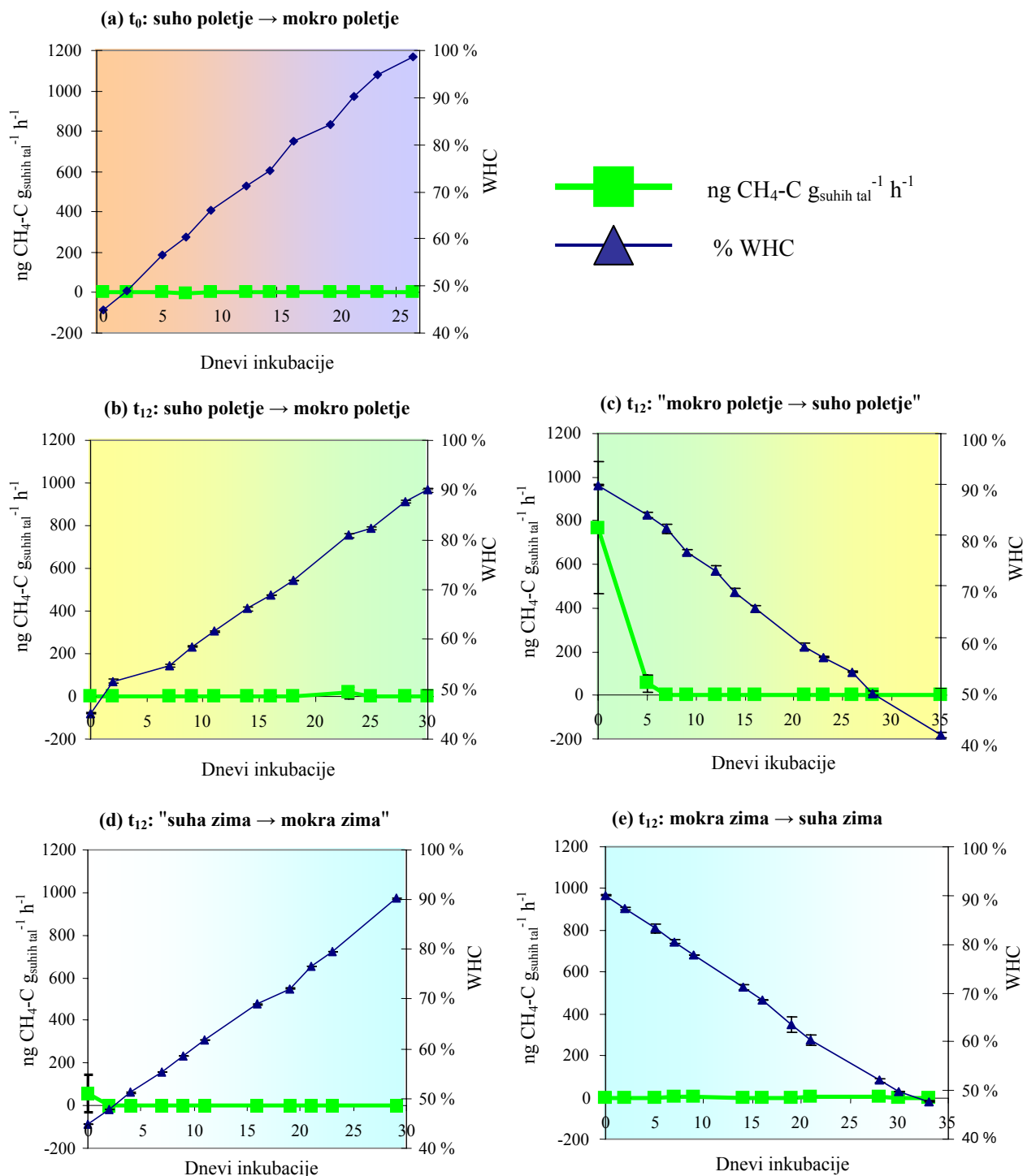
Podobno emisij CH_4 nismo zaznali v podeksperimentih navlaževanja mikrokozmov skupine A (28 °C, 45 % WHC) po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), navlaževanja tal mikrokozmov skupine C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C) ter izsuševanja mikrokozmov skupine D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C) (slike 14 b, d in e). Edino v podeksperimentu izsuševanja tal mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC) po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 45 % WHC, 28 °C) smo zaznali emisije CH_4 , pa še tu le takoj na začetku, dokler je bil % WHC 90 %. Znašale so $770 \text{ ng g}_{\text{suhih tal}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Že ob naslednji meritvi, ko so se tla izsušila pod 85 % WHC, emisij metana nismo več zaznali (slika 14c).



Slika 12: Emisije CO_2 . (a) – vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja tal v mikrokozmih po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) na emisije CO_2 ob času t_0 eksperimenta takoj po predinkubaciji. (b) do (e) - vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja ali izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije CO_2 po 12 tednih inkubacije (čas t_{12}); (b) navlaževanje tal v mikrokozmih iz skupine A (28 °C, 45 % WHC) po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), (c) izsuševanje tal v mikrokozmih iz skupine B (28 °C, 90 % WHC) po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 40 % WHC, 28 °C), (d) navlaževanje tal v mikrokozmih iz skupine C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C), (e) izsuševanje tal v mikrokozmih iz skupine D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C). Emisije smo merili trikrat tedensko. Rezultat je podan kot $\mu\text{g CO}_2\text{-C}$ na gram suhih tal na uro.



Slika 13: Emisije N_2O . (a) – vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja tal v mikrokozmih po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) na emisije N_2O ob času t_0 eksperimenta takoj po predinkubaciji. (b) do (e) - vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja ali izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije CO_2 po 12 tednih inkubacije (čas t_{12}); (b) navlaževanje tal v mikrokozmih iz veje A (28 °C, 45 % WHC) po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), (c) izsuševanje tal v mikrokozmih iz veje B (28 °C, 90 % WHC) po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 40 % WHC, 28 °C), (d) navlaževanje tal v mikrokozmih iz veje C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C), (e) izsuševanje tal v mikrokozmih iz veje D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C). Emisije smo merili trikrat tedensko. Rezultat je podan kot ng N_2O-N na gram suhih tal na uro.



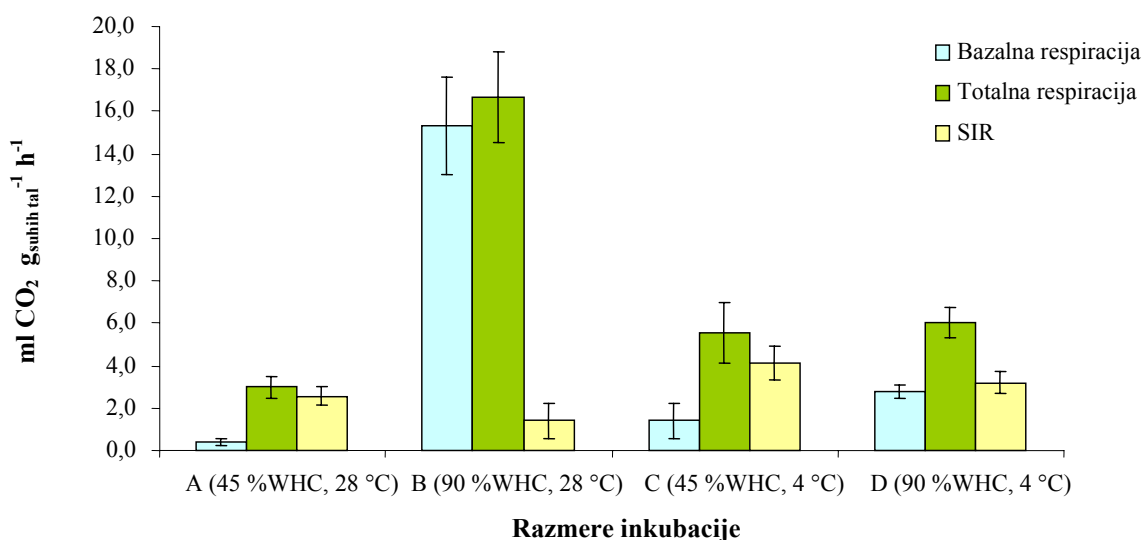
Slika 14: Emisije CH_4 . (a) – vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja tal v mikrokozmih po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) na emisije CH_4 ob času t_0 eksperimenta takoj po predinkubaciji. (b) do (e) - vpliv postopnega 30 dnevnega navlaževanja ali izsuševanja tal v mikrokozmih na emisije CO_2 po 12 tednih inkubacije (čas t_{12}); (b) navlaževanje tal v mikrokozmih iz skupine A (28 °C, 45 % WHC) po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 90 % WHC, 28 °C), (c) izsuševanje tal v mikrokozmih iz skupine B (28 °C, 90 % WHC) po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 40 % WHC, 28 °C), (d) navlaževanje tal v mikrokozmih iz skupine C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C), (e) izsuševanje tal v mikrokozmih iz skupine D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C). Emisije smo merili trikrat tedensko. Rezultat je podan kot ng $\text{CH}_4\text{-C}$ na gram suhih tal na uro.

4.7 MERJENJE AKTIVNOSTI SPLOŠNE HETEROTROFNE MIKROBNE ZDRUŽBE S SUBSTRATOM INDUCIRANO RESPIRACIJO

Aktivnost mikrobne združbe v tleh smo izmerili na koncu dvanajsttedenskega eksperimenta v vseh skupinah inkubacije – A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC). Ugotavljali smo jo kot količino nastalega CO₂ po dodatku glukoze v vzorec. Rezultat smo podali kot ml CO₂ na gram suhih tal na uro.

Razlike med skupinami A (28 °C, 45 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) so v okviru napak, zato ne moremo reči, da se s substratom inducirana respiracija med temi skupinami signifikantno razlikuje (slika 15). Najmanjšo s substratom inducirano respiracijo pa smo po dvanajsttedenski inkubaciji zaznali v tleh skupine B (28 °C, 90 % WHC) (slika15).

Bazalna respiracija pa je daleč največja v tleh mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC), najnižja je v tleh skupine A (28 °C, 45 % WHC), sledita C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) (slika15).



Slika 15: S substratom inducirana respiracija po dvanajstih tednih inkubacije mikrokozmov v štirih različnih razmerah inkubacije. Bazalna respiracija – količina sproščenega CO₂ v kontrolnih stekleničkah brez dodatka glukoze. Totalna respiracija – količina sproščenega CO₂ v stekleničkah z dodatkom glukoze. SIR – razlika med totalno in bazalno respiracijo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Barja so posebni tipi življenjskega okolja, za katera je značilno stalno ali občasno zastajanje vode. Šota nastaja iz odmrlih rastlinskih delov, predvsem šotnih mahov, ki zaradi pomanjkanja zraka ne razpadejo v humus. Zato so barjanska tla organsko zelo bogata in dobro zadržujejo vodo. Na mikrobne procese ima poleg vsebnosti vode v tleh zelo velik vpliv temperatura. V tej diplomski nalogi smo barjanska tla v laboratoriju izpostavili štirim kombinacijam vsebnosti vode in temperature v tleh; dve sta simulirali podnebne razmere kot vladajo v naravi – mokro zimo in suho poletje, redkeje pa zasledimo suho zimo in mokro poletje. Zanimalo nas je, kako dolgotrajna (dvanajst tednov dolga) inkubacija, ki ustreza dolžini sezone v naravi, vpliva na število in aktivnost nitrifikacijskih bakterij ter na aktivnost celotne mikrobne združbe v tleh. Vzporedno smo izvedli še podesperimente, kjer smo preverili vpliv navlaževanja (simulacija padavin v naravi) in izsuševanja (simulacija suše) barjanskih tal na emisije treh toplogrednih plinov – CO₂, N₂O in CH₄.

V laboratoriju smo tla inkubirali v steklenih kozarcih in to obliko inkubacije poimenovali mikrokozmi. Pred tem smo iz tal odstranili ostanke s prostim očesom vidne rastlinske in živalske biomase. Sposobnost zadrževanja vode v tleh je za barjanska tla zaradi visoke vsebnosti organske snovi precej visoka. Ugotovili smo, da je bila maksimalna (100 % WHC) sposobnost zadrževanja vode (WHC) preučevanih barjanskih tal $1,8 \pm 0,2$ grama vode na gram suhih tal, kar je podobno kot so za tla Ljubljanskega barja z visoko vsebnostjo organskega ogljika ugotovili že pred nami (Kraigher in sod., 2006; Zajec, 2006).

Potencialna nitrifikacijska encimska aktivnost se je med inkubacijo tal v različnih razmerah spreminjala (slika 10). Največja je bila na koncu dvanajsttedenske inkubacije tal pri 28 °C in 45 % WHC (razmere inkubacije A - poletje), na približno enakem nivoju skozi inkubacijo je ostala v razmerah inkubacije C ("suha zima") z enako vsebnostjo vode v tleh, vendar temperaturo inkubacije 4 °C (slika 10). Pri skupinah B (28 °C, 90 % WHC; "vlažno

poletje") in D (4 °C, 90 WHC; zima), ki imata visoko vsebnost vode v tleh, je viden v času inkubacije upad aktivnosti in je večji pri skupini B (slika 10). Zaman in Chang (2004) sta ugotovila, da ima temperatura dominanten vpliv na nitrifikacijo v gozdnih in obdelovanih tleh, pri čemer je bila optimalna temperatura za aktivnost nitrifikacijskih bakterij 25 °C, podobno stopnjo nitrifikacijske aktivnosti so zaznali pri 40 °C, zelo nizko pa pri 5 °C. Tudi vsebnost vode v tleh je imela velik vpliv na nitrifikacijo, vendar avtorji niso ugotovili posebnega trenda. Cookson in sodelavci (2006) so višjo stopnjo nitrifikacije zaznali pri vzorcih inkubiranih pri 25 °C v primerjavi s tistimi pri 5 °C. Williams in sodelavci (2003) so podobno dokazali največjo potencialno nitrifikacijsko aktivnost pri višji temperaturi, aktivnost pa je bila višja ob nižji vsebnosti vode v tleh, ki je bila posledica prisotnosti rastlin oziroma nižje podtalnice – poplavljenost z vodo je namreč omejevala bakterijam dostop do kisika. Tudi mi smo, v skladu s pričakovanji, ugotovili porast nitrifikacijske aktivnosti pri višji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh – skupina A (28 °C, 45 % WHC). Pri višji temperaturi so v splošnem encimske reakcije hitrejše. Aktivnost nitrifikacijskih bakterij je odvisna od dostopnosti kisika. Višji kot je WHC (mera za vsebnost vode v tleh), več talnih por je zasičenih z vodo, bolj je omejena difuzija plinov med tlemi in zrakom, manj je mikrobom dostopnega kisika; zato ni presenetljivo, da je pri 90 % WHC (skupini B in D) nitrifikacijska aktivnost upadla. Večji upad pa je opaziti pri skupini B (28 °C, 90 % WHC), kjer so bila tla inkubirana pri višjih temperaturah, kar kaže, da je aktivnost nitrifikacijskih bakterij omejena z respiracijo heterotrofov, še posebej, ko je prisotnega dosti organskega ogljika (Sundberg in sod., 2007).

Število nitrifikatorjev se po dvanajsttedenski inkubaciji v različnih razmerah ni znatno spremenilo (slika 9). Pričakovali smo, da bo število nitrifikatorjev sovpadalo z njihovo aktivnostjo, torej da bo naraslo pri višji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh ter upadlo pri nižji temperaturi oziroma višji vsebnosti vode v tleh, kar pa se ni zgodilo. Podobno so ugotovili tudi Hermansson in sodelavci (2004), ki so proučevali vpliv dodajanja apna na število in aktivnost nitrifikacijskih bakterij. Za večino vzorcev so ugotovili, da število nitrifikatorjev in njihova aktivnost nista premosorazmerni – več nitrifikatorjev ne pomeni nujno večje aktivnosti – obstaja namreč velik, neaktiven del populacije nitrifikacijskih bakterij, nitrifikacijski potencial pa je mera za aktivni del združbe. Schmidt (1982, cit. po Hermansson, 2004) je celo ugotovil, da je aktivni del združbe le 0-2 % celic, nitrifikacijska

aktivnost pa se poviša, če tla inkubiramo v ugodnih razmerah (Rudebeck in Persson, 1998, cit. po Hermansson, 2004). Pal (2007), ki je proučeval aktivnost in število denitrifikatorjev v tleh istih mikrokozmov kot mi, je ugotovil, da tudi število in aktivnost denitrifikatorjev nista premosorazmerni – število je tekom inkubacije ostajalo dokaj konstantno, aktivnost se je spreminjala v odvisnosti od temperature, vsebnosti vode v tleh in časa inkubacije. Število nitrifikacijskih bakterij ugotovljeno z metodo MPN v našem eksperimentu se giblje med 10^3 in 10^4 celic na gram suhih tal in je v skladu s številom nitrifikatorjev ugotovljenim z metodo MPN v številnih raziskavah – v tleh živi med 10^3 in 10^5 celic na gram (Klemedtsson, 1998; Carnol, 1999; Phillips, 2000). Carnol in sodelavci (1999) so zaznali več nitrifikatorjev v humusnih kot v mineralnih tleh, število po štirimesečni inkubaciji je bilo višje pri 4 °C in 12 °C kot pri 20 °C, inkubacija pri različni stopnji vsebnosti vode v tleh pa ni imela opaznega vpliva na število. V sodobnih časih število nitrifikacijskih bakterij raje ugotavljajo z molekularnimi metodami, kot je na primer verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) (Hermansson in sod., 2004) in cPCR (Phillips in sod., 2000) in s fluorescenčnimi specifičnimi protitelesi (Gerards in sod., 1998), ki v nasprotju z MPN metodo ugotovijo tudi neaktivni del populacije ter tiste, ki jih v laboratorijskih razmerah ni mogoče gojiti. Gerards in sodelavci (1998) so dokazali, da je število nitrifikacijskih bakterij ugotovljeno z metodo MPN bilo vedno manjše (10^4 - krat) kot število ugotovljeno z mikroskopijo s specifičnimi protitelesi. Da je število ugotovljeno z MPN manjše kot z drugimi metodami, pa so v primerjavi z drugimi analizami ugotovili tudi Hermansson in sodelavci (10 - 10^6 krat) ter Phillips in sodelavci (10 - 100 krat). Mi smo kljub temu uporabili standardno metodo MPN, ki je še vedno najbolj uporabljana metoda za ugotavljanje števila nitrifikatorjev (Woomer, 1994). Tako smo z gojitveno tehniko ugotovili obseg aktivne združbe nitrifikatorjev, njeno aktivnost pa smo izmerili z identičnim principom in sestavo gojišča. Tako smo lahko korelirali spremljano aktivnost in MPN brez ozadja, vidnega z molekularnimi metodami.

Če predpostavimo, da je nitrifikacijska aktivnost na celico konstantna ter da vse aktivne celice doprinesejo enako k nitrifikacijskemu potencialu, lahko izračunamo frakcijo aktivnih celic v združbi nitrifikatorjev (Hermansson, 2004). Temelječ na podatkih Schmidta (1982, cit. po Hermansson, 2004), ki je ugotovil, da ima ena celica rodu *Nitrosospira*, ki so dominantni oksidatorji amonija v gozdnih tleh, oksidacijski potencial

0,056 pg NH₄-N na uro, je aktivna frakcija združbe med 0 in 2 %. Naši podatki kažejo, da izpostavljenost tal različni temperaturi in vsebnosti vode v tleh verjetno nima vpliva na število nitrifikatorjev, vpliva pa na njihovo aktivnost. V neugodnih razmerah (nižja temperatura, visoka vsebnost vode v tleh) celice nitrifikatorjev preidejo v mirujoče stanje, v ugodnih razmerah (visoka temperatura, nizka vsebnost vode v tleh) pa sintetizirajo velike količine nitrifikacijskih encimov. Nitrifikacijska aktivnost se poveša, če tla inkubiramo v ugodnih razmerah (Rudebeck in Persson, 1998, cit. po Hermansson, 2004).

Količina nitrata in nitrita je v mikrokozmi skozi eksperiment pri skupinah A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC) in C (4 °C, 45 % WHC) sovpadala z nitrifikacijsko aktivnostjo (sliki 10 in 11), kar smo tudi pričakovali. Nasprotno pa pri skupini D (4 °C, 90 % WHC) to ni opazno (sliki 10 in 11). Pri višji temperaturi je narasla nitrifikacijska aktivnost in posledično se je povečala tudi količina nitrata v skupini A (28 °C, 45 % WHC) (slika 11). Pri skupini B (28 °C, 90 % WHC) je upadla nitrifikacijska aktivnost, še bolj drastičen je bil upad količine nitrata. Tu vidimo prevladujoč vpliv vode v tleh na nitrifikacijsko aktivnost v primerjavi s temperaturo. Čeprav je voda nujno potrebna za rast in preživetje talne mikrobiote, pa voda vpliva tudi na topnost in difuzijo kisika v tleh, ki lahko pri visoki vsebnosti vode postane limiten faktor. Obenem pa pri visoki temperaturi naraste tudi talna respiracija, kar še dodatno zniža parcialni tlak kisika in s tem nitrifikacijsko aktivnost. Zaradi anaerobioze se verjetno zviša denitrifikacijska aktivnost, kar dodatno zniža vsebnost nitrata (Carnol in Ineson, 1999). Avtorja sta proučevala vpliv štirimesečne inkubacije tal pri treh različnih temperaturah (4 °C, 12 °C in 20 °C) in treh različnih vsebnostih vode v tleh na koncentracije nitrata, število nitrifikatorjev in emisije N₂O. Glede na začetno vrednost se je po štirih mesecih inkubacije koncentracija nitrata najbolj povečala pri 12 °C in hkrati nizki vsebnosti vode v tleh, pri 4 °C je ostala na razmeroma enakem nivoju. Najnižje vrednosti nitrata sta avtorja zaznala pri 20 °C in hkrati visoki vsebnosti vode v tleh. Nizek temperaturni optimum za nitrifikacijo (12 °C) pojasnjujeta z uporabo intaktnih talnih vzorcev – v številnih raziskavah so namreč dokazali da je temperaturni optimum za nitrifikacijo v naravi lahko tudi nižji v primerjavi z raziskavami, kjer so proučevali homogenizirane in posušene talne vzorce (Carnol in Ineson, 1999). Tudi mi smo pri nižji temperaturi (4 °C) ugotovili dokaj stabilni nivo koncentracije nitrata skozi dvanajsttedensko inkubacijo. Pri skupini C (4 °C, 45 % WHC)

sta ostala nivo nitrata in nitrifikacijska encimska aktivnost na enaki ravni kot na začetku eksperimenta (sliki 10 in 11). Pri skupini D (4 °C, 90 % WHC) pa se je aktivnost zmanjšala, nivo nitrata pa se je celo rahlo povečal (sliki 10 in 11). Zakaj je bila koncentracija nitrata večja v teh vzorcih kot v tistih iz 4 °C in 45 % WHC še ne vemo povsem razložiti. Denitrifikacijska aktivnost je bila namreč višja v tleh skupine D (4 °C, 90 % WHC) kot v tleh skupine C (4 °C, 45 % WHC) (Pal, 2007), zato bi (gledano skupaj z nitrifikacijsko aktivnostjo) pričakovali nižji nivo nitrata pri skupini D (4 °C, 90 % WHC).

V aerobnih razmerah so večinski produkti mikrobne respiracijske presnove organskega ogljika CO₂, voda in novonastala biomasa. Metoda s substratom inducirane respiracije (SIR) je namenjena hitremu in objektivnemu ugotavljanju količine biomasnega ogljika v tleh (Alef in Nannipieri, 1995) in temelji na predpostavki, da bodo aktivni mikroorganizmi v tleh takoj po dodatku začeli presnavljati lahko dostopen vir energije, kot je na primer glukoza, do CO₂. Prvič sta jo opisala Anderson in Domsch (1978), ki sta ugotovila, da pri temperaturi 22 °C 1 ml nastalega CO₂ v 1 uri pomeni 40 mg biomasnega ogljika v tleh.

Aktivnost splošne heterotrofne mikrobne združbe v tleh, inkubiranih v mikrokozmi v štirih različnih razmerah – A (28 °C, 45 % WHC), B (28 °C, 90 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC), smo po dvanajstih tednih inkubacije izmerili z metodo s substratom inducirane respiracije. Zaradi velikih standardnih odklonov ne moremo trditi, da se inducirana aktivnost v skupinah A (28 °C, 45 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) razlikuje, čeprav presenetljivo podatki kažejo največje vrednosti v skupini C. Najnižje vrednosti so bile v tleh skupine B (28 °C, 90 % WHC), kar je zaradi visoke vsebnosti vode v tleh razumljivo (anaerobe razmere, ki omejujejo aerobno respiracijo), vendar bi zaradi višje temperature inkubacije vseeno pričakovali višje vrednosti kot pri skupini D (4 °C, 90 % WHC). Naredili smo tudi t-test, ki je pokazal, da se vrednosti skupine B (28 °C, 90 % WHC) signifikantno razlikujejo le od vrednosti skupin C (4 °C, 45 % WHC) ($p < 0,01$) in D (4 °C, 90 % WHC) ($p < 0,04$), ne pa tudi od skupine A (28 °C, 45 % WHC) ($p < 0,11$). Bazalna respiracija pa je nasprotno daleč najvišja v tleh skupine B (28 °C, 90 % WHC). Zaključimo lahko, da dvanajsttedenska inkubacija tal v različnih razmerah ne spremeni odzivnosti mikrobne združbe na glukozo, razen v primeru B (28 °C, 90 % WHC).

Ogljikov dioksid v tleh nastaja kot posledica mikrobne razgradnje organskega materiala, ta pa je močno odvisna od klimatskih dejavnikov – temperature in padavin (Shestra in sod., 2004; Curiel-Yuste in sod. 2005). Curiel-Yuste in sodelavci (2004) so ugotovili, da dež močno poveča emisije CO₂ v sušnem obdobju, pojav pa v glavnem pripisujejo ciklom mikrobne umrljivosti zaradi suše in ponovne rasti preživelih celic po ponovni dostopnosti vode na nutrientih umrlih. Tudi Burger in sodelavci (2005), ki so proučevali kratkotrajni vpliv navlaževanja tal v mikrokozmi, so ugotovili hiter odziv respiracije na spremembe vsebnosti vode v tleh – maksimalno respiracijo so zaznali pri 60 % WFPS (angl. Water Filled Pore Spaces – z vodo zapolnjene pore). Emisije CO₂ naraščajo tudi z naraščanjem temperature, kar ni presenetljivo (Shestra in sod., 2004; Kiese in Butterbach-Bahl, 2002). Mi smo proučevali vpliv navlaževanja oziroma sušenja tal v mikrokozmi pri dveh različnih temperaturah – 4 °C in 28 °C. Ugotovili smo, da so tudi v našem eksperimentu emisije CO₂ naraščale vzporedno z naraščanjem vsebnosti vode v tleh v mikrokozmu ter da so bile emisije pri 28 °C tudi 10-80 - krat višje v primerjavi s tistimi pri 4 °C (slike 12 a, b, c, d in e). Ugotovili smo tudi, da so emisije CO₂ upadle, ko je vsebnost vode v tleh v mikrokozmi, ki smo jih nalaževali, presegla 80 % WHC oziroma so narasle šele, ko so se mikrokozmi posušili na 80 % WHC, ki je očitno tudi optimalen za razvoj emisij CO₂ v proučevanih tleh (slike 12 a, b in c). Predvidevamo, da je pri 80 % WHC tista meja, ko tla preidejo iz aerobnega v anaerobno območje, zato upade količina emisij, ki so večinoma posledica aerobne razgradnje. Podatek o količini z vodo zasičenih por (WFPS) bi nam dal še boljšo razlago, vendar povezave med WHC in WFPS za barjanska tla zaenkrat še nismo določili, te raziskave so trenutno v teku (Repič, 2007). V številnih raziskavah so ugotovili, da je meja aerobioze in anaerobioze nekje med 65-75 % WFPS, ta preskok pa vpliva ne samo na emisije CO₂, ampak tudi na emisije N₂O ter CH₄ (del Prado in sod., 2006, Khalil in sod., 2002). Na podoben pojav upada emisij CO₂ potem, ko je vsebnost vode v tleh presegla določeno mejo (v njunem primeru 50-60 % WFPS), sta naletela pri merjenju emisij iz tal tropskega deževnega gozda v Avstraliji med sušno in med vlažno sezono tudi Kiese in Butterbach-Bahl (2002). Podobno sta dokazala tudi pozitivno povezanost med naraščanjem vsebnosti vode v tleh in naraščajočimi emisijami CO₂. Oboje je potrdilo njuno hipotezo, da WFPS višji od 60 % ovira difuzijo kisika v matriks, zato ta postane limiten, kar omejuje heterotrofno respiracijo. Emisije CO₂ v mikrokozmi, ki smo jih ob času t₀ navlaževali po shemi suho poletje – mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) so

količinsko primerljive z emisijami CO₂ v navlaževalnem podeksperimentu po shemi suho poletje – mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) ob času t₁₂ (sliki 12 a in b). Dvanajsttedenska inkubacija tal pri 45 % WHC in 28 °C očitno ni vplivala na mikrobnno združbo. Če pa primerjamo maksimalne količine emisij v mikrokozmi, ki smo jih sušili po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 40 % WHC, 28 °C) ob času t₁₂ z prej omenjenima podeksperimentoma poletnega navlaževanja ob časih t₀ in t₁₂, ugotovimo tudi do dvakrat višje emisije (slika 12c). Predvidevamo, da je razlika posledica večje difuzije CO₂ iz tal mikrokozmov veje B (28 °C, 90 % WHC) v primerjavi s tlemi mikrokozmov veje A (28 °C, 45 % WHC) zaradi dvanajsttedenske inkubacije v razmerah visoke vsebnosti vode v tleh, ki je omogočila kopičenje tega plina v porah tal veje B (28 °C, 90 % WHC). Takoj ko je WHC ob sušenju padel na 80 %, je nakopičeni CO₂ začel izhajati iz tal in s tem povzročil velike količine emisij CO₂. Za omenjeno trditev pa nimamo dokazov, morali bi narediti nov eksperiment, s katerim bi spremljali tudi v vodni fazi raztopljeni CO₂. Emisije CO₂ pri 4 °C so pri obeh podeksperimentih – navlaževanje tal mikrokozmov veje C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C) in izsuševanje tal mikrokozmov veje D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C) – količinsko zelo majhne in ne kažejo nobenega izrazitega trenda v odvisnosti od časa inkubacije in % WHC (sliki 12 d in e). Vsi rezultati, razen tistih pri 90 % WHC, so potrdili našo hipotezo, da bodo emisije CO₂ pri višji temperaturi in višji vsebnosti vode v tleh višje. To je z enkrattedenskim spremljanjem emisij CO₂, N₂O in CH₄ med dvanajsttedensko inkubacijo istih mikrokozmov, vendar v konstantnih razmerah temperature in vsebnosti vode v tleh, dokazal tudi Pal (2007). Emisije CO₂ so bile med dvanajsttedensko inkubacijo signifikantne v skupinah A (28 °C, 45 % WHC) in B (28 °C, 90 % WHC), inkubiranih pri višji temperaturi, minimalne pa so bile pri skupinah C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC), inkubiranih pri nizki temperaturi. Razlike zaradi vsebnosti vode v tleh v njegovem eksperimentu niso bile tako očitne.

Mikrobni procesi v tleh (nitrifikacija, denitrifikacija in disimilativna redukcija nitrata) so glaven vir N₂O v atmosferi, med najpomembnejše dejavnike, ki vplivajo na procese nastanka N₂O pa spadajo poleg temperature in vsebnosti vode v tleh še način obdelovanja in gnojenja, vsebnost organske snovi ter pH in tekstura tal (del Prado in sod. 2006). V istih

mikrokozmih, kjer smo tla izpostavljali navlaževanju in izsuševanju ter merili emisije CO₂, smo merili tudi emisije drugih dveh toplogrednih plinov – N₂O in CH₄. Emisije N₂O so v našem eksperimentu pokazale pozitivno korelacijo tako z naraščajočo vsebnostjo vode v tleh kot z višjo temperaturo, kar so dokazali že tudi v številnih raziskavah (Kiese in Butterbach-Bahl, 2002; Khalil in sod., 2002; del Prado in sod., 2006, Chatskikh in sod., 2005), ugotovljeno pa se sklada tudi z našo hipotezo. Emisije N₂O v mikrokozmih, ki smo jih navlaževali po shemi suho poletje → mokro poletje (45 % do 100 % WHC, 28 °C) naraščajo podobno pri podeksperimentu ob času t₀ kakor pri tistem ob času t₁₂ – N₂O se pojavi ko se WHC dvigne nad 60 % in narašča z naraščanjem vsebnosti vode v tleh do konca eksperimenta, razlika je v količini – pri podeksperimentu po 12 tednih je količina emisij dvakrat večja (sliki 12 a in b). Razliko lahko razloži dejstvo, da je količina nitrata zaradi visoke nitrifikacijske aktivnosti v skupini A (28 °C, 45 % WHC) med dvanajsttedensko inkubacijo narasla in dosegla dvakratno količino začetne (slika 11), zato so imeli denitrifikatorji na razpolago dvakrat več substata kot ob času t₀. Pomanjkanje nitrata v tleh mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC) po dvanajstih tednih (slika 11) razloži tudi začetno odsotnost emisij v podeksperimentu simulacije izsuševanja po shemi *mokro poletje* → *suho poletje* (90 % do 45 % WHC, 28 °C), upad vsebnosti vode v tleh pod 70 % WHC pa povzroči izginitev emisij (slika 13c). 80 % WHC kot vrednost vsebnosti vode v tleh, pri kateri emisije N₂O dosežejo maksimum, je verjetno optimalen za sklopitev nitrifikacije kot vira nitrata in denitrifikacije, ki ta nitrat porablja za proizvodnjo N₂O. Pri podeksperimentu izsuševanja tal mikrokozmov skupine D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C) so se emisije obnašale podobno kot pri podeksperimentu izsuševanja tal mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC) po shemi "mokro poletje → suho poletje" (90 % do 45 % WHC, 28 °C) (sliki 13 c in e), razliko v količini pa lahko pripišemo nižji temperaturi, zaradi katere so bakterije manj aktivne. Zanimivo pa pri podeksperimentu navlaževanja tal mikrokozmov skupine C (4 °C, 45 % WHC) po shemi "suha zima → mokra zima" (45 % do 90 % WHC, 4 °C) emisij N₂O skorajda nismo zaznali (slika 13d) – nizka temperatura verjetno inhibira NO₂⁻ reduktazo denitrifikatorjev (del Prado in sod., 2006). Zanimivo bi bilo preveriti še, kateri je glavni mikrobní proces nastanka N₂O v naših tleh, saj so Khalil in sodelavci (2002) ugotovili, da je v aerobnih razmerah glavni vir N₂O nitrifikacija, denitrifikacija pa postane pomemben vir šele ko WFPS naraste nad 65-75 %. Podobno so ugotovili tudi del Prado in

sodelavci (2006), ki pa so pri WFPS višjih od 75 % celo zaznali upad emisij N_2O in predvidevajo popolno denitrifikacijo do N_2 . Pal (2007) je tedensko spremljal emisije N_2O v teh istih mikrokozmih med dvanajsttedensko inkubacijo v konstantnih razmerah vsebnosti vode v tleh in temperature. Emisij tekom eksperimenta ni zaznal v mikrokozmih skupin A (28 °C, 45 % WHC) in C (4 °C, 45 % WHC), kar se je pokazalo tudi na začetku naših treh podeksperimentov navlaževanja, ki so sledili dvanajsttedenski inkubaciji (slike 13 a, b in d). V mikrokozmih skupine B (28 °C, 90 % WHC) je prvi teden po zalitju mikrokozmov ob času t_1 izmeril maksimalno količino emisij N_2O , nato so v naslednjih dveh tednih emisije upadle na minimum in tam ostale do konca dvanajsttedenske inkubacije. Ti rezultati se skladajo z našimi meritvami dostopnega nitrata v tleh mikrokozmov med dvanajsttedensko inkubacijo (slika 11). Tla mikrokozmov skupine D (4 °C, 90 % WHC) so v njegovem eksperimentu ves čas emitirala signifikantne količine N_2O , zato je nenavadno, da nismo zaznali večjih količin na začetku našega podeksperimenta izsuševanja tal mikrokozmov skupine D (4 °C, 90 % WHC) po shemi mokra zima → suha zima (90 % do 45 % WHC, 4 °C) (slika 13e), tudi glede na to, da je bilo v mikrokozmi prisotnega relativno veliko nitrata (slika 11).

Mokrišča, ki so večinoma na šotnih tleh, imajo zaradi poplavljanja v glavnem anoksičen značaj in posledično visok potencial za emisije metana. Globalno gledano prispevajo 10-28 % vseh svetovnih emisij metana (Van den Pol in sod., 1999a). Tudi tla uporabljena v našem eksperimentu so bila večinoma šotna tla. Kljub temu pa emisij metana v že omenjenih podeksperimentih navlaževanja in izsuševanja večinoma nismo zaznali oziroma so bile minimalne (slike 14 a, b, d in e). Pojavile so se le na začetku podeksperimenta izsuševanja tal mikrokozmov skupine B (28 °C, 90 % WHC) po shemi mokro poletje → suho poletje (90 % do 45 % WHC, 28 °C) po dvanajstih tednih inkubacije mikrokozmov pri 28 °C in 90 % WHC, izginile pa so takoj, ko je WHC padel pod 85 % (slika 14c). Pal (2007) je spremljal emisije metana v teh istih mikrokozmih tekom dvanajsttedenske inkubacije enkrat tedensko. Emisije metana se v skupinah A (28 °C, 45 % WHC), C (4 °C, 45 % WHC) in D (4 °C, 90 % WHC) niso pojavile, v skupini B (28 °C, 90 % WHC) pa so se pojavile po 8 tednih in ostale do konca dvanajsttedenske inkubacije – v nadaljevanju smo jih tu zasledili tudi mi. Metanogenezo v tleh Ljubljanskega barja je proučevala tudi Jerman (2007), ki je ugotovila, da se metan pojavi šele, ko bakterije reducirajo ves Fe^{3+} v tleh v

Fe^{2+} . Metanogene bakterije namreč v boju za vodik ali acetat niso dovolj konkurenčne z reducenti nitrata, sulfata oziroma Fe^{3+} , ki vsi uporabljajo termodinamsko ugodnejše elektronske akceptorje kot je CO_2 (Achtnich in sod., 1995). Ugotovili pa so tudi, da metanogenci sami raje uporabljajo za oksidacijo organske snovi Fe^{3+} kot CO_2 (van Bodegom in sod., 2004). Visoka vsebnost vode v tleh in visoka temperatura pa v splošnem pozitivno vplivata na emisije metana (Augustin in sod., 1998; Van den Pol – Van Dasselaar in sod., 1999a), kar se je odražalo tudi v naših rezultatih, saj smo emisije metana zaznali le pri 90 % WHC in 28 °C.

5.2 SKLEPI

- na število nitrifikatorjev dolgotrajna inkubacija v različnih modelnih sezonah Ljubljanskega barja nima signifikantnega vpliva
- na nitrifikacijsko encimsko aktivnost močno vplivajo različne razmere inkubacije – poveča se pri višji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh, zniža se pri nizki temperaturi in visoki vsebnosti vode v tleh
- visoke temperature omogočijo višjo aktivnost mikroorganizmov, zato so količine emisij CO₂, N₂O in CH₄ višje pri višji temperaturi, višja vsebnost vode v tleh pa povzroči anaerobne razmere, kar po eni strani zviša emisije N₂O in CH₄, po drugi pa zniža emisije CO₂
- emisije CO₂ na prehodu sezon so največje pri visoki temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh
- emisije N₂O na prehodu sezon so največje pri visoki temperaturi in visoki vsebnosti vode v tleh
- emisije CH₄ na prehodu sezon se zmanjšajo pod mejo detekcije, ko vsebnost vode v tleh pade pod 85 % WHC, pojavijo pa se le pri visoki temperaturi
- dvanajsttedenska inkubacija tal v različnih razmerah ne povzroči signifikantnih razlik v s substratom inducirani respiraciji, le inkubacija tal pri nizki temperaturi in nizki vsebnosti vode v tleh jo zmanjša

6 POVZETEK

Barja so poseben tip življenjskega okolja, za katera je značilno stalno ali občasno zastajanje vode. Barjanska tla so organsko zelo bogata, saj večinoma vsebujejo šoto (Martinčič, 2003). Ker šotišča shranjujejo ogromne količine organskega ogljika, so zelo pomembni ekosistemi in sprememba njihove funkcije ima lahko globalne posledice kot so na primer povišane emisije toplogrednih plinov.

V dvanajst tednov trajajočem laboratorijskem eksperimentu z mikrokozmi tal Ljubljanskega barja smo proučevali vpliv štirih različnih kombinacij vsebnosti vode v tleh (45 in 90 % WHC) in temperature (28 in 4 °C) na število nitrifikatorjev (z metodo MPN), njihovo aktivnost (z metodo NEA) ter na aktivnost splošne heterotrofne mikrobne združbe (merjena z metodo SIR). Ugotavljali smo tudi vpliv kratkotrajnega navlaževanja oziroma izsuševanja tal v mikrokozmi na emisije toplogrednih plinov CO₂, N₂O in CH₄.

Ugotovili smo, da dvanajsttedenska inkubacija tal pri različni temperaturi in vsebnosti vode v tleh nima signifikantnega vpliva na število nitrifikatorjev, ima pa velik vpliv na njihovo aktivnost – ta se s časom zviša pri višji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh, pri višji temperaturi in visoki vsebnosti vode v tleh drastično upade, inkubacija tal pri nizki temperaturi pa nima tako velikega vpliva na aktivnost, vseeno pa je nižja pri visoki vsebnosti vode v tleh. S substratom inducirana respiracija se na koncu eksperimenta ni signifikantno razlikovala med posameznimi vejami inkubacije, le pri nižji temperaturi in nižji vsebnosti vode v tleh je bila v primerjavi z ostalimi vejami nižja. Pri višji temperaturi so bile emisije vseh treh plinov – CO₂, N₂O in CH₄ višje kot pri nizki temperaturi. CH₄ se je pojavil v tleh šele po dolgotrajni inkubaciji pri visoki temperaturi in visoki vsebnosti vode v tleh in je izginil takoj ko so se tla posušila na 85 % WHC. Navlaževanje suhih tal je v vseh primerih povečalo emisije CO₂ in N₂O, vendar je vsebnost vode v tleh večja od 80 % WHC zmanjšala sproščanje CO₂ ne pa tudi sproščanja N₂O. Nasprotno so se pri izsuševanju mokrih tal emisije N₂O pojavile pri višji vsebnosti vode v tleh kot CO₂. Emisije CO₂ so se pri nižji vsebnosti vode v tleh v tleh pojavljale tudi ko N₂O ni bilo več zaslediti. Na emisije N₂O je bistveno vplivala tudi vsebnost nitrata v tleh, ki je nastajal/se porabljal tekom inkubacije.

7 VIRI

Achtnich C., Bak F., Conrad R. 1995. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric ion reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 65-72

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 the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 215-221

Arnone J.A., Bohlen P.J. 1998. Stimulated Stimulated N₂O flux from intact grassland monoliths after two growing seasons under elevated atmospheric CO₂. *Oecologia*, 116: 331-335

ARSO – Agencija Republike Slovenije za okolje. 2007a. Padavine Črna vas. Ljubljana, ARSO – Agencija Republike Slovenije za okolje.

http://www.arso.gov.si/cd/izbrani_meteo_podatki/padavine/P195.htm (maj 2007): 1 str.

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

Atlas R.M., Bartha R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and application*. 4th ed. Redwood City, The Benjamin/Cummings Publishing co.: 694str.

Augustin J., Merbach W., Rogasik J. 1998. Factors influencing nitrous oxide and methane emissions from minerotrophic fens in northeast Germany. *Biology and Fertility of Soils*, 28 :1–4

Bouwman A.F. 1990. Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. *Soils and the Greenhouse Effect*. Chichester, Wiley: 61-127.

Blodgett R. 2006. Bacteriological analytical manual online: most probable number from serial dilutions. Rockville, Food and Drug Administration's Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. (maj 2007):13 str

Carnol M., Ineson P. 1999. Environmental factors controlling NO_3^- leaching, N_2O emissions and numbers of NH_4^+ oxidisers in a coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 979-990

Cookson W.R., Osman M., Marschner P., Abaye D.A., Clark I., Murphy D.V., Stockdale E.A., Watson C.A. 2007. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 744–756

Curiel Yuste J., Janssens I.A., Ceulemans R. 2005. Calibration and validation of an empirical approach to model soil CO_2 efflux in a deciduous forest. *Biogeochemistry*, 73: 209–230

Chatskikh D., Olesen J.E., Berntsen J., Regina K., Yamulki S. 2005. Simulation of effects of soils, climate and management on N_2O emission from grasslands. *Biogeochemistry*, 76: 395–419

De Boer W., Kowalchuk G.A. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 853-866

del Prado A., Merino P., Estavillo J.M., Pinto M., Gonzalez-Murua C. 2006. N_2O and NO emissions from different N sources and under a range of soil water contents. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 74: 229 –243

Ehhalt D., Prather M., Dentener F., Derwent R., Dlugokencky E., Holland E., Isaksen I., Katima J., Kirchhoff V., Matson P., Midgley P., Wang M.. 2001. Atmospheric chemistry and greenhouse gases. V: Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on the Climate Change. Houghton, J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguer M., van der Linden P.J., Dai X., Maskell K., Johnson C.A. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press. http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/127.htm (februar 2007): 50 str.

Gerards S., Duyts H., Laanbroek H.J. 1998. Ammonium-induced inhibition of ammonium-starved *Nitrosomonas europaea* cells in soil and sand slurries. FEMS Microbiology Ecology, 26: 269-280

Gottlich K. 1990. Moor und Torfkunde. Stuttgart, E. Schwiezbartsche Verlagsbuchhandlung: 334-349

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

Hacin J., Čop J., Sinkovič T., Vidrih M. 2004a. Vpliv košnje in gnojenja na sestavo dveh različnih travnikov na Ljubljanskem barju. Acta Agriculturae Slovenica, 83: 157-169

Hacin J., Čop J., Železnik B., Jamnik B. 2004b. Opredelitev vodnega režima v bodočem krajinskem parku Ljubljansko barje. Končno poročilo o raziskovalnem projektu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 45 str.

Hermansson A., Bäckman J.S.K., Svensson B.H., Lindgren P.E. 2004. Quantification of ammonia-oxidising bacteria in limed and non-limed acidic coniferous forest soil using real-time PCR. Soil Biology and Biochemistry, 36: 1935–1941

Jerman V. 2007. Metanogeneza v tleh Ljubljanskega barja – osebna komunikacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Jetten M.S.M., Wagner M., Fuerst J., van Loosdrecht M., Kuenen G., Strous M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 283-288

Kiese R., Butterbach-Bahl K. 2002. N₂O and CO₂ emissions from three different tropical forest sites in the wet tropics of Queensland, Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 975-987

Klemendtsson L., Jiang Q., Klemendtsson K.A.E., Bakken L. 1999. Autotrophic ammonium-oxidising bacteria in Swedish mor humus. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 839-847

Koops H.P., Pommerening-Röser A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37: 1-9

Koops H.P., Müller U.C. 1992. The lithotrophic ammonia – oxidizing bacteria. V: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd ed. Vol.2. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (eds.). Berlin, Springer: 2625-2637

Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., van Elsasb J.D., Mandič-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2762–2771

Ludwig J., Meixner F.X., Vogel B., Förstner J. 2001. Soil-air exchange of nitric oxide: An overview of processes, environmental factors, and modeling studies. *Biogeochemistry*, 52: 225–257

Lundberg J.O., Weitzberg E., Cole J.A., Benjamin N. 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology*, 2:593-602

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

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

Microbiology and bacteriology – the world of microbes: nitrification. 2007. Madison, University of Wisconsin.

<http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/textbook/metabolism/NitrificationET.jpg>

Pal L., 2007. Mikrobna aktivnost in struktura denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 64 str.

Phillips C.J., Eldor A.P., Prosser J.I. 2000. Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 167-175

Pihlatie M., Syväsalö E., Simojoki A., Esala M., Regina K. 2004. Contribution of nitrification and denitrification to N₂O production in peat, clay and loamy sand soils under different soil moisture conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 70: 135–141

Powell S.J., Prosser J. 1986. Inhibition of ammonium oxidation by nitrapyrin in soil and liquid culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 782-787

Prosser J.I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. [Advances in Microbial Physiology](#), 30: 125-181. V: Prinčič A. 2000. Obnašanje združb nitrifikatorjev pri selektivnih okoljskih pogojih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-18

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

Rudebeck A., Persson T. 1998. Nitrification in organic and mineral soil layers in coniferous forests in response to acidity. *Environmental Pollution*, 102: 377–383. Cit. po: Hermansson A., Bäckman J.S.K., Svensson B.H. in Lindgren P.E. 2004. Quantification of ammonia-oxidising bacteria in limed and non-limed acidic coniferous forest soil using real-time PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1935–1941

Schmidt, E.L. 1982. Nitrification in soil. *Nitrogen in Agricultural Soils. Agronomy Monograph*, 22: 253–285. Cit po: Hermansson A., Bäckman J.S.K., Svensson B.H. in Lindgren P.E. 2004. Quantification of ammonia-oxidising bacteria in limed and non-limed acidic coniferous forest soil using real-time PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1935–1941

Schmidt I., Sliekers O., Schmid M., Cirpus I., Strous M., Bock E., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 2002. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria - competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 175-181

Shrestha B.M., Situala B.K., Singh B.R., Bajracharya R.M. 2004. Fluxes of CO₂ and CH₄ in soil profiles of a mountainous watershed of Nepal as influenced by land use, temperature, moisture and substrate addition. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 68: 155–164

Stevens R.J., Laughlin R.J. 1998. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52: 131–139

Stopar D., Stres B., Mahne I. 2006. Praktikum iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

www.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/kompndijekologi2004.pdf (februar 2007): 75 str.

Sundberg C., Stendhal J.S.K., Tonderski K., Lindgren P.E. 2007. Overland flow systems for treatment of landfill leachates - Potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 127–138

van Bodegom P.M., Scholten J.C.M., Stams A.J.M. 2004 Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 261–268

Van den Pol - Van Dasselaar A., Van Beusichem M.L., Oenema O. 1999a. Methane emissions from wet grasslands on peat soil in a nature preserve. *Biogeochemistry*, 44: 205-220

Van den Pol - Van Dasselaar A., Van Beusichem M.L., Oenema O.. 1999b. Determinants of spatial variability of methane emissions from wet grasslands on peat soil. *Biogeochemistry*, 44: 221-237.

Williams B.L., Pyatt D.G., Anderson A.R. 2003. Potencial nitrification in the profile of a peaty gley soil beneath *Molinia* planted with pine, spruce and birch. *Forest Ecology and Management*, 176: 473-484

Weaver R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicek D., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. 1994. Methods of soil analysis: Part 2 – Microbiological and biochemical properties. Wisconsin, Soil Science Society of America: 835 str.

Woomer P.L. 1994. Most probable number counts. V: Methods of soil analysis: Part 2 – Microbiological and biochemical properties. Weaver R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicek D., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. (eds.). Wisconsin, Soil Science Society of America: 59-79

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

Zaman M., Chang S.X. 2004. Substrat type, temperature and moisture content affect gross and net nitrification rates in agroforestry systems. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 269-279

ZAHVALA

Da je nastala moja diploma se zahvljujem:

- prof. dr. Ines Mandić-Mulec, da mi je omogočila izvedbo diplomske naloge, za kritike, pohvale, nasvete, za prijaznost in potrpežljivost.
- dr. Blažu Stresu, da me je popeljal skozi eksperiment, za vse strokovne razlage, napotke glede izdelave diplome in kritične preglede mojega dela.
- Simoni Leskovec in Tjaši Danevčič, da sta mi pomagali pri delu z aparaturami ter predvsem za vse drobne, vsakdanje nasvete, ko sem se obračala nanju.
- Levinu Palu, za sodelovanje v laboratoriju, za vso pomoč pri obdelavi rezultatov, za skakanje okrog z mojim indeksom, predvsem pa za tisto družbo zunaj sivih zidov.

Da pa sem sploh prišla tako daleč in za vse ostalo pa se zahvaljujem še:

- Mami, atu, stari mami in bratu, da so me sprejeli vedno odprtih rok, ko sem prišla domov, za vso ljubezen in podporo.
- Dejanu, da me je tiščal naprej, ko sem obstala, držal na tleh, ko sem letela, ter da je.
- Cimram Petri, Barbi, Valeriji, Jani brez katerih bi bilo življenje v Ljubljani živ dolgčas.
- Heleni, Jasni, Nini, Nataši za prijateljstvo.
- Družini Ilc za vse kar so mi tako nesebično nudili.
- Rožicam, da me na vsakem koraku po tem planetu razveseljujejo.