

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marija SELAK (DEMŠAR)

VPLIV TEŽKIH KOVIN NA LAKAZNO AKTIVNOST V TLEH

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

IMPACT OF HEAVY METALS ON LACCASE ACTIVITY IN SOIL

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vzorčenje in pedološke meritve tal z Jesenic ter pedološke meritve tal iz Podkloštra so opravili na Katedri za pedologijo in varstvo okolja na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete. Na Oddelku za zootehniko, Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Rodici so pripravili profile T-RFLP.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 9.6.2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić - Mulec in za recenzentko prof. dr. Damjano Drobne.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić - Mulec

Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

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

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marija Selak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.64+631.46:577.15(043)=163.6
KG	mikrobiologija tal/pedologija/onesnaženost tal/težke kovine/biodosegljivost kovin/encimi/lakaze/lakazna aktivnost/mikrobna aktivnost/mikrobne združbe
AV	SELAK (DEMŠAR), Marija
SA	MANDIĆ - MULEC, Ines (mentorica)/DROBNE, Damjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	VPLIV TEŽKIH KOVIN NA LAKAZNO AKTIVNOST V TLEH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 68 str., 14 pregl., 29 sl., 3 pril., 66 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Težke kovine (TK), kot so Zn, Pb in Cd, so pogosta onesnažila v tleh, ki so pri prekomernem nakopičenju strupene za živ sistem. TK imajo na encimsko aktivnost inhibitorjen vpliv. Lakaze so encimi, ki spadajo med fenol oksidaze in dokazano je, da so občutljivi na prisotnost TK. Predpostavili smo, da lakaze lahko služijo kot biosenzorji za oceno biodosegljivosti TK v tleh. V diplomski nalogi smo preverili vpliv TK na lakazno aktivnost v šestih različnih tleh ter v onesnaženih in remediiranih tleh iz Podkloštra. Ugotovili smo, da je vrednost lakazne aktivnosti odvisna od tipa tal in izbire substrata, s katerim določamo encimsko aktivnost. Med tlemi iz Podkloštra ni bilo razlik v mikrobni aktivnosti in biomasi, prav tako nismo zaznali razlik v strukturi združbe bakterij in gliv, pokazali pa smo statistično značilen vpliv na lakazno aktivnost v onesnaženih in remediiranih tleh. Sklepamo, da so razlike v lakazni aktivnosti posledica različne biodostopnosti TK v tleh, kar je v skladu s hipotezo, da TK negativno vplivajo na lakazno aktivnost v tleh.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.64+631.46:577.15(043)=163.6

CX soil microbiology/pedology/soil pollution/heavy metals/bioavailability of metals/enzymes/laccases/laccase activity/microbial activity/microbial community

AU SELAK (DEMŠAR), Marija

AA MANDIĆ - MULEC, Ines (supervisor)/DROBNE, Damjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2011

TI IMPACT OF HEAVY METALS ON LACCASE ACTIVITY IN SOIL

DT Graduation Thesis (University Studies)

NO XI, 68 p., 14 tab., 29 fig., 3 ann., 66 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Heavy metals, such as Zn, Pb and Cd, are common contaminants of the soil, and may be toxic to biosystem and inhibit enzyme activity in case of excessive accumulation. Laccases are enzymes that show phenol oxidase activity. It has been proven that laccases are sensitive to the presence of heavy metal. Therefore we hypothesized that laccases can be inhibited by heavy metals in soil and thereby serve as biosensors for an assessment of the bioavailability of heavy metals in this environment. In the present thesis the influence of heavy metals on laccase activity was examined in six different soils. In addition, laccase activity, microbial biomass/activity as well as bacterial and fungal community structure were assessed in the polluted and remediated soil from Arnoldstein. The results indicated that the laccase activity was dependent on the type of soil and on the substrate used in the enzyme activity assay. The three soils from Arnoldstein did not show any significant difference in microbial activity, microbial biomass and in the structure of bacterial and fungal communities. In contrast, the statistically significant difference in laccase activity between the polluted and remediated soils was detected, which suggested that bioavailability of metals is different in the soils examined and is consistent with the hypothesis that heavy metals have a negative impact on laccase activity in soil.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VIRI IN OBLIKE TEŽKIH KOVIN V TLEH	3
2.2 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA MIKROORGANIZME IN POMEN ZAZNAVANJA TEŽKIH KOVIN V TLEH	5
2.3 METODE ZAZNAVANJA TEŽKIH KOVIN	6
2.3.1 Vpliv težkih kovin na encimsko aktivnost.....	6
2.3.2 Merjenje fenol oksidazne aktivnosti.....	7
2.3.3 Mikrobna biomasa in mikrobna aktivnost	8
2.3.4 Lakaze	9
2.3.4.1 Mehanizem delovanja	9
2.3.4.2 Substrati in inhibitorji lakaz	10
2.3.4.3 Merjenje encimske aktivnosti.....	12
2.4 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA MIKROBNO ZDRUŽBO V TLEH	17
2.4.1 T-RFLP analiza bakterijske in glivne združbe.....	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.2 VZORČNA MESTA IN VZORČENJE	24
3.2.1 Onesnažena in neonesnažena tla z Jesenic	24
3.2.2 Kontrolna in remediirana tla iz Podkloštra.....	24
3.3 PEDOLOŠKE MERITVE.....	27
3.3.1 Lastnosti tal z Jesenic.....	27
3.3.2 Lastnosti tal iz Podkloštra	27
3.4 LAKAZNA AKTIVNOST V TLEH.....	28

3.4.1	Test lakazne aktivnosti.....	28
3.4.2	Metoda bazalne respiracije in s substratom inducirana respiracija	31
3.5	T-RFLP ANALIZA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE.....	32
4	REZULTATI	36
4.1	PEDOLOŠKE MERITVE.....	36
4.1.1	Lastnosti tal z Jesenic.....	36
4.1.2	Lastnosti tal iz Podkloštra	37
4.2	ENCIMSKA AKTIVNOST V TLEH	41
4.2.1	Optimizacija metode merjenja lakazne aktivnosti v tleh	41
4.2.2	Bazalna respiracija in s substratom inducirana respiracija	46
4.3	STRUKTURA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE.....	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	LAKAZNA AKTIVNOST V TLEH IZ PODKLOŠTRA	52
5.2	MIKROBNA AKTIVNOST IN BIOMASA V TLEH IZ PODKLOŠTRA	53
5.3	BAKTERIJSKA IN GLIVNA ZDRUŽBA V TLEH IZ PODKLOŠTRA	54
5.4	UPORABA TESTA LAKAZNE AKTIVNOSTI ZA OKOLJSKE VZORCE.....	56
5.5	SKLEPI	58
6	POVZETEK.....	59
7	VIRI.....	61

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Substrati za merjenje encimske aktivnosti.	13
Preglednica 2: Splošni in molekularni reagenti in proizvajalci.....	19
Preglednica 3: Založne raztopine in pufri.	20
Preglednica 4: Uporabljeni restrikcijski encimi.	21
Preglednica 5: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.	22
Preglednica 6: Končne koncentracije substratov v testu lakazne aktivnosti v tleh z Jesenic...	29
Preglednica 7: Priprava reakcijskih mešanic za PCR 16S rDNA oz. za 18S rDNA.	34
Preglednica 8: Potek pomnoževanja 16S rDNA.	34
Preglednica 9: Potek pomnoževanja 18S rDNA.	34
Preglednica 10: Lastnosti onesnaženih in neonesnaženih tal z Jesenic.	36
Preglednica 11: Potencialno mobilni delež kovin v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic, določen s TCLP metodo (n=6).	36
Preglednica 12: Celokupne koncentracije kovin določene z zlatotopko v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic.	37
Preglednica 13: Lastnosti tal iz Podkloštra in celokupne koncentracije kovin.	38
Preglednica 14: Lakazna aktivnost (A/g suhih tal) v onesnaženih tleh z Jesenic, določena z različnimi substrati in pri različnih pH (n=1 in n=2 za test z ABTS).	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Model katalitičnega jedra lakaz iz štirih bakrovih atomov (Arora in Sharma, 2010).	10
Slika 2: Kristalna struktura Lac1 iz <i>Trametes versicolor</i> z vezavnim mestom za substrat (Rodgers in sod., 2010).	10
Slika 3: Shema redoks cikla oksidacije substrata (Arora in Sharma, 2010).	11
Slika 4: Redoks pretvorba ABTS v pozitivno nabit kationski radikal ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) in dikation (ABTS^{2+}) (Solis-Oba in sod., 2005).	14
Slika 5: Oksidacija katehola v prisotnosti prolina (Perruci in sod., 2000).	16
Slika 6: Obnova ekosistema po onesnaženju (Hinojosa in sod., 2010).	17
Slika 7: Shematski prikaz dela in analiz.	23
Slika 8: Lega Podkloštra v Avstriji (Friesl-Hanl in sod., 2009).	24
Slika 9: Poskusno polje.	26
Slika 10: Tla poskusnega polja.	26
Slika 11: Shema vzorčenja na poskusnem polju v Podkloštru.	26
Slika 12: Shematski prikaz testa lakazne aktivnosti.	28
Slika 13: Priprava svežih tal za stresanje.	30
Slika 14: Mikrotitrna plošča pred spektrofotometričnim merjenjem produktov različnih substratov.	30
Slika 15: Shematski prikaz T-RFLP analize bakterijske in glivne združbe.	32
Slika 16: Biodosegljivosti Cu, Cd, Pb in Zn v tleh iz Podkloštra določene po spiranju z deionizirano vodo in $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (n=3).	38
Slika 17: Koncentracije Cu, Cd, Pb in Zn v tleh iz Podkloštra pri pH 5,0 določene po spiranju z deionizirano vodo, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ in amonoacetatom (n=3).	39
Slika 18: Primerjava lakazne aktivnosti v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic pri različnih pH za substrat ABTS v končni koncentraciji 0,010 M.	41
Slika 19: Lakazna aktivnost v šestih različnih vzorcih tal za različne substrate pri različnih pH.	43
Slika 20: Primerjava lakazne aktivnosti pri pH 4,0 in pH 5,8 v tleh iz Podkloštra (n=18).	44
Slika 21: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti pri pH 4,0 v tleh iz Podkloštra (n=6).	45

Slika 22: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti pri pH 5,8 v tleh iz Podkloštra (n=6).....	45
Slika 23: Primerjava bazalne respiracije in s substratom inducirane respiracije v tleh iz Podkloštra pri 70 % WHC.....	46
Slika 24: Elektroforeza v agaroznem gelu produktov PCR 16S rDNA.	47
Slika 25: Podobnost profilov T-RFLP PCR produktov gena za 16S rDNA, rezanih s HaeIII	48
Slika 26: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 16S rDNA, rezanih z AluI. .	49
Slika 27: Velikost čistih PCR produktov 18S rDNA.	50
Slika 28: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 18S rDNA, rezanih s HaeIII.	50
Slika 29: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 18S rDNA, rezanih z MspI.	51

KAZALO PRILOG

Priloga A

Priloga A1: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti poljskih paralelk pri pH 4,0

Priloga A2: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti poljskih paralelk pri pH 5,8

Priloga B: Koncentracije celokupne izolirane DNA

Priloga C

Priloga C1: Restriksijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 18S rDNA

Priloga C2: Restriksijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 16S rDNA

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

4M-CAT	4-metil katehol (4-metil 1,2-dihidroksibenzen)
6-FAM	6-karboski fluorescein
A	absorbanca
ABTS	2,2'-azinobis-(-3-etilbenzotiazolin-6-sulfononska kislina)
BR	bazalna respiracija
CAT	katehol (1,2-dihidroksibenzen)
Cd	kadmij
Cu	baker
DMP	2,6-dimetoksifenol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GC	gas chromatography (plinska kromatografija)
GUA	guaiacol
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
Pb	svinec
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
PRO	prolin
SIR	substrate induced respiration (s substratom inducirana respiracija)
SYR	siringaldazin, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid azin
TCLP	estracijska metoda za merjenje potenciala tal za sproščanje onesnažil v okolje (toxicity characteristic leaching procedure)
TK	težka kovina, težke kovine
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism (polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov)
WHC	water holding capacity (sposobnost zadrževanja vode)
Zn	cink

1 UVOD

Težke kovine (TK) so eden izmed glavnih virov onesnaženja tal. Povečano koncentracijo TK je opaziti na območjih, kjer je bila v preteklosti ali je še danes rudniško-topilniška dejavnost. TK okolju niso nevarne v majhnih količinah, v povečanih koncentracijah pa so strupene.

Kemijsko vrednotenje vsebnosti biodostopnih TK v tleh je pomembno, vendar so rezultati bolj zgovorni, če so dopolnjeni z biološkimi testi. Predvideva se, da so biološke lastnosti tal zgodnejši pokazatelji degradacije tal kot kemijski ali fizikalni parametri (Floch in sod., 2009), pri čemer pogosto uporabimo encimsko aktivnost kot mero za oceno kvalitete tal. TK imajo na mnoge encime inhibitoren vpliv (Karaca in sod., 2010), tudi na fenol oksidaze, in zato bi z merjenjem aktivnosti talnih encimov lahko ocenili vplive onesnaženja tal s TK (Floch in sod., 2009). Fenol oksidaze (lakaze) so encimi, ki poleg fenolov oksidirajo polifenole, aromatske amine in različne nefenolne substrate (Claus, 2003). Študije vpliva TK na lakazno aktivnost so bile narejene na čistih encimih (Lorenzo in sod., 2005) in na okoljskih vzorcih po dodatku TK. Študije encimske aktivnosti, ki temeljijo na laboratorijskih poskusih s solmi kovin kot viri TK, ne predstavljajo pogojev kot so v naravi, kjer se kovine navadno akumulirajo v manj dostopnih kemijskih oblikah (Kamal in sod., 2010).

Floch in sod. (2009) predlagajo, da lakazna aktivnost lahko služi kot mera za mikrobnno biomaso v onesnaženih tleh, zato menimo, da je potrebno rezultate lakazne aktivnosti podpreti z dodatnimi meritvami, ki omogočajo neodvisno oceno mikrobne biomase, mikrobne aktivnosti ali strukture mikrobne združbe. Giller in sod. (2009) poudarjajo, da razlike v biodostopnosti TK ter raznolikosti in občutljivosti mikroorganizmov vodijo v neskladne rezultate študij vpliva strupenosti TK na talne mikroorganizme in mikrobne procese.

Friesl-Hanl in sod. (2009) so onesnažena tla tretirali z različnimi imobilizatorji kovin in s tem spremenili biodostopnost Cd, Pb, Zn in Cu v primerjavi z netretiranimi (kontrolnimi) tlemi. Ta tla smo uporabili kot eksperimentalni modelni sistem za testiranje hipoteze, da je lakazna aktivnost primeren biosenzor onesnaženosti tal s TK. Menimo, da je merjenje encimske aktivnosti v takih tleh primernejše kot v kratkotrajno onesnaženih tleh, na katerih je bilo narejenih mnogo študij vpliva TK na encimsko aktivnost.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Namen diplomske naloge je bil optimizirati metodo določanja lakazne aktivnosti v okoljskih vzorcih tal in ugotoviti morebitne razlike v lakazni aktivnosti v tleh, ki so onesnažena s TK, v primerjavi z neonesnaženimi tlemi.

Predhodne objave, navedene v pregledu objav, so pokazale, da TK vplivajo inhibitorno na encimske aktivnosti v tleh, zato smo postavili hipotezo (1), da bo lakazna aktivnost v onesnaženih tleh manjša kot v neonesnaženih.

Predpostavili smo tudi (hipoteza 2), da bo mikrobna biomasa, mikrobna aktivnost in struktura mikrobne združbe bakterij ter gliv podobna v onesnaženih in v neonesnaženih tleh.

Ob predpostavki, da obe hipotezi držita, menimo, da bi aktivnost lakaz lahko služila kot biosenzor biodosegljivosti TK v tleh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRI IN OBLIKE TEŽKIH KOVIN V TLEH

Prisotnost TK v tleh je posledica industrijskih dejavnosti rudarjenja in taljenja rude, vnašanja gnojil in blata čistilnih naprav, industrijskih koproduktov, namakanja tal z odpadno vodo, ki vsebuje TK, atmosferskega depozita (Appenroth, 2010; Maritnez in sod., 2000; Leštan, 2002) ter nastanka tal na kamnini, bogati s kovino. V splošnem je vsebnost TK večja v kamninah vulkanskega kot sedimentnega izvora (Leštan, 2002). Antropogeni vir TK je tudi kmetijstvo, ki je zaradi uporabe mnogih kemikalij, kot so pesticidi, vključno s fungicidi in herbicidi, eden od glavnih virov onesnaženja tal s TK (He in sod., 2005).

Izraz TK pogosto vključuje elemente svinca (Pb), kadmija (Cd) in cinka (Zn). Ponavadi so TK opredeljene z gostoto elementarne oblike od $3,5 \text{ g/cm}^3$ do 7 g/cm^3 (Duffus, 2002) oziroma z gostoto, ki presega 5 g/cm^3 (Adriano, 1986). Vendar Appenroth (2010) ugotavlja, da ni nobene povezave med gostoto kovine in njenimi fiziološkimi ali toksikološkimi učinki.

Pb je eden izmed najpogostejših onesnažil v tleh (Karaca in sod., 2010). Talilnice Pb povzročajo obsežna onesnaženja, ki so pogosto sanirana z dragimi in invazivnimi remediacijskimi tehnikami. Sedanje remediacijske aktivnosti vključujejo (1) izkopavanje in odstranitev onesnaženih tal, (2) imobilizacijo in zadrževanje TK v tleh z mešanjem ali vnašanjem snovi kot so cement, apno in različni fosfati, (3) odstranitev TK iz tal s precipitacijo na elektrode, (4) fitoekstrakcijo kovin z rastlinami, ki akumulirajo kovine ter (5) spiranje tal (Finžgar in Leštan, 2006). Učinkovita in poceni remediacija, ki nima negativnega vpliva na strukturo in biologijo tal, poteka z imobilizatorji TK in temelji na mehanizmi kompleksiranja, precipitacije in difuzije (Friesl-Hanl in sod., 2009).

Pb se pojavlja v oksidacijskem stanju Pb^{2+} (najbolj stabilna valenca), manj pogosto v valenci Pb^{4+} . Večinoma je Pb vezan na organsko snov ali adsorbiran na gline, železove in magnezijeve okside, le majhen delež je topen v vodi in se lahko spira skozi talni profil oziroma je dostopen v kemijsko izmenljivi obliki. Izmenljiva frakcija Pb pada z naraščanjem pH in narašča v zelo onesnaženih tleh, v katerih so vezavna mesta že nasičena (Scheuhammer in Beyer, 2010). Pb^{2+} ima sposobnost izmenjave s K, Sr, Ba in celo Na in Ca

(Adriano, 1986). Srednja koncentracija Pb v obdelanih, relativno onesnaženih področjih, je v območju 10-60 µg/g suhih tal. Naravni vir Pb je galenit (PbS), manj pogosta minerala sta svinčev karbonat in svinčev sulfat-anglesit (Scheuhammer in Beyer, 2010).

Naravna vsebnost Zn v tleh je v koncentracijah med 10 in 300 mg/kg suhih tal (Zupan in sod., 2008). Pojavlja se v oksidacijskem stanju 2+, tako kot Cd, in v vodni raztopini tvori mnogo kompleksnih ionov ($\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ in $\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$). Povečane koncentracije v tleh so posledica atmosferskih depozitov zaradi delovanja talilnic rud, posebej Pb in Zn (Adriano, 1986).

Na območjih rudniške, topilniške dejavnosti, kovinske industrije, industrije plastike in mikroelektronike ter odlaganja odpadkov so tla pogosto onesnažena s Cd. V neonesnaženih tleh je koncentracija Cd povprečno 0,35 mg/kg suhih tal (Zupan in sod., 2008). Topnost Cd v tleh pada z naraščanjem pH. Pri visokih koncentracijah je topnost Cd odvisna od precipitacije $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ in CdCO_3 (Adriano, 1986).

Cu se v tleh nahaja v različnih oblikah: (1) v talni raztopini je lahko v ionski obliki in kompleksiran, (2) na izmenljivih mestih, (3) na specifičnih sorpcijskih mestih, (4) v talnih oksidnih materialih, (5) na organskih ostankih in živih organizmih in (6) v mrežni strukturi primarnih in sekundarnih mineralov. Cu v naravi tvori sulfide, sulfate, sulfonate, karbonate in druge spojine. Pojavlja se tudi kot samorodna kovina. Najpogostejši Cu mineral je halkopirit (CuFeS_2 , 34 % Cu) (Adriano, 1986). Povprečne koncentracije Cu v neonesnaženih tleh so med 5 in 30mg/kg (Zupan in sod., 2008).

Ključne lastnosti, ki določajo topnost oziroma zadrževanje in dostopnost TK v tleh, so pH talne suspenzije, raztopljen organski snov, talna faza kovinskih oksidov, vsebnost organske snovi v tleh ter kationska izmenjevalna kapaciteta tal (Nieminen in sod., 2007; Martinez in sod., 2000). Martinez in sod. (2000) so določili vrednost pH, pod katero se v tleh povečajo mobilnost kovine, biološka dostopnost in strupenost kovin. Za Pb so določili $\text{pH } 5,2 \pm 0,2$, za Cu pa $\text{pH } 5,5 \pm 0,2$.

2.2 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA MIKROORGANIZME IN POMEN ZAZNAVANJA TEŽKIH KOVIN V TLEH

Mikroorganizmi se hitro odzivajo na motnje v okolici, saj so z njo tesno povezani zaradi relativno visokega razmerja med površino in volumnom (Hinojosa in sod., 2010).

Strupenost TK za živ sistem je odvisna od kovine same, organizmov, na katere deluje, in je vedno povezana s celicam dostopno koncentracijo kovin. Tako so mikronutrienti ključni za metabolizem celic v nizkih koncentracijah in strupeni v visokih koncentracijah (Appenroth, 2010). Biodostopne oblike Cu so za mikroorganizme nujno potrebne, saj je Cu vključen v mnogo procesov. Nizke koncentracije Zn in Cu imajo hranilno vrednost, ne pa tudi Cd (Karaca in sod., 2010).

Mnoge kovine so za mikroorganizme potencialno strupene. Z bistvenimi celičnimi snovmi se vežejo s kovalentnimi in nekovalentnimi vezmi. Pri visokih koncentracijah tako neesencialne kot esencialne kovine poškodujejo celično membrano, spremenijo specifičnost encima, prekinajo celične funkcije in poškodujejo strukturo DNA (Bruins in sod., 2000).

TK vstopajo v človeško telo z vdihovanjem, geofagijo in vnašanjem oporečne hrane, pridelane na onesnaženih območjih, pri tem so posebej ogroženi otroci (Leštan, 2002). Zaradi negativnega vpliva TK na zdravje človeka, kvaliteto tal in pitno vodo je pomembno zagotavljati nizke koncentracije TK. Poleg ukrepov zmanjšanja onesnaževanja zaradi antropogene dejavnosti je pomembno določiti, spremljati in sanirati onesnažena območja.

V Sloveniji so z Uredbo določene mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za posamezne nevarne snovi v tleh, tudi za kovine (Uredba o..., 1996).

Kovine v tleh se lahko zaznava na različne načine, glede na to ali se določa celokupne, mobilne ali biodostopne koncentracije kovin. Spremljanje onesnaženosti tal pa je bolj kot s fizikalno- kemijskimi lastnostmi ustrezno z biološkimi testi, ki so lahko zgodnejši pokazatelji kvalitete tal.

2.3 METODE ZAZNAVANJA TEŽKIH KOVIN

Spremembe indikatorjev, ki temeljijo na mikrobni strukturi in funkciji, so lahko celo prej zaznane kot spremembe v fizikalnih in kemijskih lastnostih tal in so zgodnji pokazatelji izboljšanja ali degradacije tal (Hinojosa in sod., 2010). V tleh se običajno določi celokupna ali biodostopna koncentracija TK. Biodostopnost je definirana kot frakcija vseh onesnažil v talnih delcih, ki so dostopni receptorskemu organizmu (Karaca in sod., 2010). Biodostopna frakcija TK se lahko oceni z enim ekstraktantom, kot so raztopljene kisline (HCl , NH_4^+ , HNO_3), ali z raztopinami s kelirajočimi agensi, kot je npr. etilendiamin tetraacetat. S sekvenčno ekstrakcijsko tehniko se raztopi različne trdne frakcije in po korakih iz tal izloči kovine povezane z vsako frakcijo. Najprej se izloči najbolj dostopna oziroma dosegljiva frakcija, z uporabo bolj agresivnih reagentov pa se izločijo bolj nedostopne oblike (Nieminen in sod., 2007).

Aktivnosti talnih encimov so primerni pokazatelji kvalitete tal zaradi tesne povezanosti s talno biologijo, enostavnosti merjenja aktivnosti, hitrega odziva na motnje ali stres. Indikatorji onesnaženja naj bi imeli naslednje lastnosti: občutljivost na prisotnost onesnažila, sposobnost odražanja različnih stopenj onesnaženja, zanesljivost odgovora na kakršnokoli onesnažilo, občutljivost na različna onesnažila, razlikovanje med vplivom onesnažila in predhodne degradacije tal (Hinojosa in sod., 2010).

2.3.1 Vpliv težkih kovin na encimsko aktivnost

TK lahko vplivajo na talne encime preko inhibicije aktivnosti ali biosinteze encima. Vplivajo pa lahko tudi na sestavo mikrobne združbe, s čemer se spremeni tudi sestava encimov v tleh. Posredni vplivi vključujejo spremembe v talnem pH, ki vplivajo na encimsko kinetiko in na dostopnost substrata (Hinojosa in sod., 2010).

Encimske reakcije so inhibirane s TK na tri različne načine: (1) s kompleksacijo substrata, (2) z vezavo TK na protein oziroma na aktivno mesto encima (npr. Cd^{2+} naj bi se vezal na sulfhidrilno skupino) ali pa (3) TK deluje na kompleks encim - substrat. TK naj bi tekmoval

s kovinskim ionom, ki je potreben za vezavo substrata na encim. Intenziteta encimske inhibicije je odvisna od koncentracije kovinskega iona in encima, interakcije med TK, reakcij TK s funkcionalnimi skupinami encima ter kemijskih in fizikalnih lastnosti tal (Karaca in sod., 2010).

Na onesnaženje s TK so občutljivi številni hidrolitični encimi, kot na primer fosfataza, amidaza, glukozidaza in galaktozidaza, celulaza, glukozaminidaza in lipaza (Floch in sod., 2009). Aktivnosti ureaze, katalaze, invertaze in kisle fosfataze so signifikatno zmanjšane zaradi vpliva Pb, proteaza, alkalna fosfataza in arilsulfataza pa zaradi Cd. Zaradi večje mobilnosti in manjše afinitete za vezavo na talne koloide je Cd bolj toksičen za encime kot Pb. Ionske lastnosti Cd so podobne Zn, zato po hkratni aplikaciji Cd, Pb in Zn pride do sinergističnega inhibitornega vpliva Cd in Zn na encimsko aktivnost (Karaca in sod., 2010).

Kot inhibitorji encimske aktivnosti lahko delujejo tudi halogeni elementi, vključno s kloridnim ionom. Floch in sod. (2009) poročajo, da je v prisotnosti kloridne soli kovine fenol oksidazna aktivnost bolj inhibirana kot v prisotnosti sulfatne soli kovine. Pri inkubacijskih študijah lahko dodatek nitratnih ali sulfatnih soli kovin zabriše dejanski inhibitorni vpliv TK, saj imata dušik in sulfat stimulatorni vpliv na mikrofloro (Karaca in sod., 2010).

2.3.2 Merjenje fenol oksidazne aktivnosti

Fenol oksidaze so encimi, ki oksidirajo fenolne spojine v prisotnosti kisika. Testi, s katerimi merimo fenol oksidazno aktivnost v vzorcih iz okolja, zajemajo aktivnost različnih encimov iz razreda monofenol monooksigenaz, ki vključuje tirozinaze (monofenol oksidaze) in lakaze. Lakaze so verjetno največja skupina fenol oksidaz v tleh (Sinsabaugh, 2009).

Floch in sod. (2007) so predlagali uporabo fenol oksidazne aktivnosti kot biosenzorje za aromatska onesnažila in TK, pri čemer je potrebno ustvariti povezavo med encimsko aktivnostjo in mikrobno biomaso v tleh, onesnaženih s TK.

2.3.3 Mikrobna biomasa in mikrobna aktivnost

Mikrobna biomasa je ključni parameter in izhodišče za mnoge programe monitoringa tal. S substratom inducirana respiracija (SIR) je fiziološki respiracijski odgovor talnih organizmov na dodatek substrata za zagotovitev ocene biomasnega ogljika talnih mikrobov (Sparling, 1995). Z merjenjem bazalne respiracije tal (BR) se lahko oceni mikrobno aktivnost, z merjenjem aktivnosti dehidrogenaz pa celokupno oksidativno aktivnost celic (Smith in Pugh, 1979).

SIR temelji na naslednjih predpostavkah:

- (i) SIR različnih organizmov je konstantna,
- (ii) večina talne mikrobiote se odzove na dodatek substrata tekom merjenja,
- (iii) glukoza je primeren substrat za sprožitev maksimalnega odziva in
- (iv) prispevek mikrobnega ogljika organizmov, ki ne metabolizirajo glukoze, je neznaten.

V večini tal so periode aktivne rasti kratke in hranila slabo dostopna, zato je večina organizmov v počivajoči ali stacionarni fazi rasti. V takih tleh je metoda SIR zanesljiva. Pri določanju SIR uporabljamo plinsko kromatografijo in merimo produkcijo CO₂ po dodatku vodne raztopine glukoze, ki zagotavlja mikrobom substrat in vlažnost tal (Sparling, 1995). Merjenje koncentracije CO₂ je občutljivo zaradi nizke koncentracije CO₂ v zraku v primerjavi z O₂ (Hinojosa in sod., 2010).

Stopnja mikrobne respiracije na enoto mikrobne biomase je metabolni kvocient (Anderson in Domisch, 1985) ali specifična stopnja respiracije ($q\text{CO}_2$). Giller in sod. (1998) so predlagali $q\text{CO}_2$ kot alternativno mero sprememb v mikrobni biomasi, ki jo lahko uporabimo tudi za zaznavanje stresnih razmer zaradi TK v tleh. Visok $q\text{CO}_2$ je lastnost mikrobne biomase v dolgotrajno onesnaženih tleh.

2.3.4 Lakaze

Lakaze (benzendiol: kisikove oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) so skupina fenol oksidaz, ki vsebujejo več atomov bakra (ang. multicopper oxidases) (EC 1.10.3.3) (Hullo in sod., 2001). Od katehol oksidaz in tirozinaz se lakaze razlikujejo po oksidaciji *p*-difenola (Diamantidis in sod., 2000).

Znane glivne lakaze so pretežno monomerni proteini (55-85 kDa) z izoelektrično točko okrog pH 4 (Rodgers in sod., 2010). Glivne lakaze, ki so izločene iz celice, so običajno glikozilirane, vendar niso vse lakaze ekstracelularne (Rodgers in sod., 2010). Lakazam podobni proteini so lahko intracelularni, periplazmatski ali prisotni v ovojnici spore, kot pri *Bacillus subtilis* (Hullo in sod., 2001).

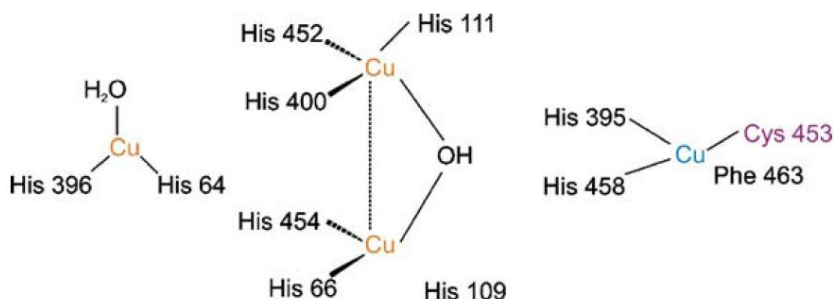
Lakaze imajo nizko specifičnost za redukcijo substrata, zato imajo velik komercialni in biotehnološki pomen. Zaradi možnosti uporabe v industriji in za zaščito okolja pridobivajo pozornost, še posebej lakaze gliv bele trohnobe (Li in sod., 2007; Rodgers in sod., 2010). Prepostavlja se, da imajo lakaze pomembno vlogo pri detoksifikaciji fenolov z reakcijo spajanja (Betts in King, 1991).

2.3.4.1 Mehanizem delovanja

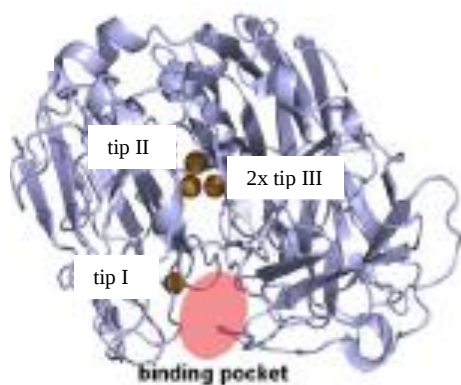
Predlagani model katalitičnega jedra lakaz iz štirih bakrovih atomov je na Sliki 1. Substrat se veže v bližino Cu tipa I (Slika 1 in Slika 2) in se oksidira z oddajo enega elektrona. Cu tipa I je hitro reoksidiran. Znotrajcelični elektronski prenos poteka na veliki razdalji – od ohranjenega motiva histidin-cistein-histidin do trijedrne skupine bakrov. Kisik se veže med dva Cu tipa III in se reducira v vodo. Med katalitičnim ciklom mora biti Cu tipa I oksidiran in reduciran štirikrat (Rodgers in sod., 2010).

Zaradi nedostopnosti kisika je lakazna aktivnost v tleh, nasičenih z vodo, nizka in se povečuje z naraščanjem koncentracije kisika (Claus, 2010).

Kompleksna struktura lakaze CotA *Bacillus subtilis* z ABTS je pokazala, da je žep za substrat v bližini mesta Cu tipa I, tako da je elektronski donor v neposrednem stiku s Cu tipa I (Li in sod., 2007).



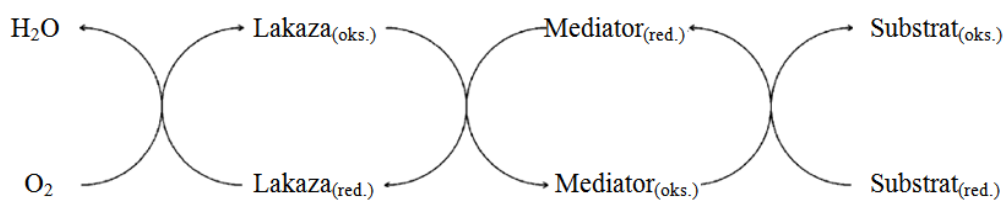
Slika 1: Model katalitičnega jedra lakaz iz štirih bakrovih atomov (Arora in Sharma, 2010). Levo Cu tipa I, Cu tipa II; desno Cu tipa III.



Slika 2: Kristalna struktura Lac1 iz *Trametes versicolor* z vezavnim mestom za substrat. Cu atomi so prikazani z oranžnimi krogi (Rodgers in sod., 2010).

2.3.4.2 Substrati in inhibitorji lakaz

Obseg substratov je določen z redoks potencialom Cu tipa I. Če je redoks potencial substrata nižji od redoks potenciala Cu tipa I, lahko lakaza katalizira oksidacijo substrata (Gianfreda in sod., 1999). Standardni redoks potencial za lakazno aktivnost je ponavadi med 0,5 V in 0,8 V, to je premalo za oksidacijo ksenobiotskih spojin, zato je potreben mediator, molekula, ki razširi encimatsko reaktivnost lakaz za različne substrate. ABTS je najpogosteje uporabljeni mediator, ki deluje kot redoks intermediat med aktivnim mestom encima in nefenolnim substratom pri prenosu elektrona (Majeau in sod., 2009).



Slika 3: Shema redoks cikla oksidacije substrata (Arora in Sharma, 2010).

Oksidirani radikal mediatorja deluje na substrat, ki ima visok redoks potencial (Slika 3) (Arora in Sharma, 2010). Na ta način lahko lakaze, ki so poleg lignin peroksidaz in manganovih peroksidaz glavni encimi za razgradnjo lignina, oksidirajo tudi nefenolne ligninske modelne spojine.

Bakterijske in glivne lakaze so širokospecifični encimi z raznolikimi biološkimi vlogami. Več kot sto različnih snovi so identificirali kot substrate za glivne lakaze (Baldrian, 2006). Oksidirajo lahko fenole, polifenole, aromatske amine in različne nefenolne substrate (Claus, 2003), substrati so tako tudi barvila, pesticidi, endokrini motilci, policiklični aromatski ogljikovodiki. Dekarboksilirajo lahko fenolne in metoksifenolne kisline in demetilirajo metoksilne skupine, dehalogenirajo na *orto* in *para* poziciji substituirane snovi. Z oksidacijo fenolnih substratov pride do nastanka ariloksiradikala, ki se pretvori v kinon v drugi stopnji oksidacije. Kinonski intermediati spontano reagirajo med sabo in tvorijo topne ali netopne obarvane oligomere, odvisno od substrata in okoljskih parametrov. Koprodukti lakaz so lahko substrati drugim ekstracelularnim encimom, odvisno od mikrobne vrste, reakcijskih pogojev, tipa in koncentracije substrata, kar kaže na kompleksnost lakazne aktivnosti v kombinaciji z drugimi ekstracelularnimi encimi (Majeau in sod., 2009).

Tirozinaze, katehol oksidaze in lakaze imajo podoben obseg substratov, razlikujejo pa se v strukturi. Tirozinaze imajo združen dvojedrni Cu kompleks v aktivnem mestu (vsebuje samo dva Cu atoma tipa III). Lakaze lahko depolimerizirajo ali polimerizirajo substrat, smer reakcije je odvisna od lakazne molekularne strukture, tipa in količine substrata kot tudi od nastalega produkta. V reakciji nastane semi-kinon, prosti radikal, ki je močno reaktiven in sposoben interakcije s številnimi snovmi (DeSouza - Ticlo, 2008).

Zaenkrat je edini znani specifični inhibitor lakaz natrijev azid, ki interagira s Cu v aktivnem centru encima (Claus, 2010). Lakaze lahko inhibirajo tudi manjši in elektronegativni halidi –

najmočnejše fluorid, manj klorid, najmanj bromid. Koncentracija klorida za prepolovitev lakazne aktivnosti je od 100 μM do 100 mM za različne vrste lakaz (Rodgers in sod., 2010).

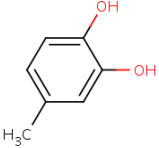
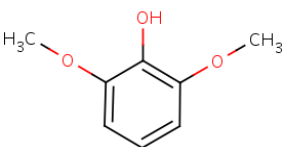
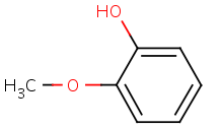
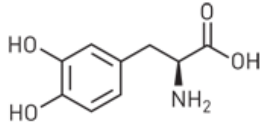
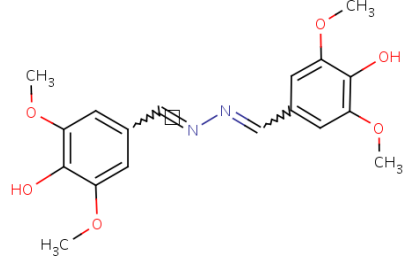
2.3.4.3 Merjenje encimske aktivnosti

Čeprav je merjenje encimske oksidacije fenolnih snovi pomembna mera talne mikrobne kapacitete, je predlaganih metod malo in so vprašljive (Perucci in sod., 2000).

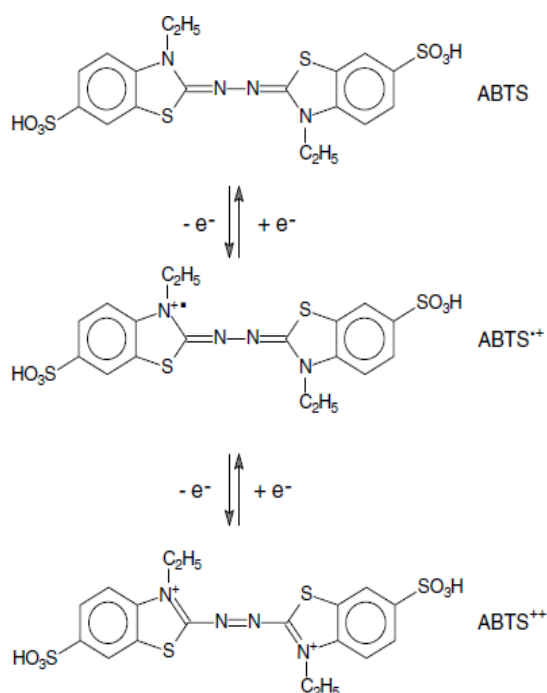
Metode za merjenje encimske aktivnosti v tleh ponavadi vključujejo dodajanje sintetičnega substrata, ki je povezan s fluorescentno molekulo (fluoroforom) ali s substratom, ki oblikuje obarvano snov (kromofor) v razredčeno homogenizirano talno suspenzijo. Po določenem inkubacijskem času sledi merjenje povečanja fluorescence ali absorbance. V zadnjih letih se je tudi po zaslugi mikrotitrskih plošč in spektrofotometričnih čitalcev za mikrotitrne plošče povečalo razumevanje *in situ* aktivnosti ekstracelularnih encimov (Wallenstein in Weintraub, 2008).

Aktivnosti čistih encimov je mogoče določiti s substrati, navedenimi v Preglednici 1.

Preglednica 1: Substrati za merjenje encimske aktivnosti.

Kratica substrata; substrat; produkt oksidacije	Strukturna formula (Slike povzete po Schomburg, 2011)	Valovna dolžina; pH stabilnega produkta	Vir
ABTS; 2,2'-azinobis- (-3-etilbenzotiazolin-6- sulfononska kislina); ABTS ⁺	Slika 4	420 nm; pH 5,7, pH 2-3	Floch in sod., 2007; Criquet in sod., 1999
4M-CAT; 4-metil 1,2-dihidroksibenzen		420 nm	
2,6-DMP; 2,6-dimetoksifenol; 3,5,3',5'-tetrametoksidifeno- kinon		468 nm; nevtralni pH	Betts in King, 1991; Johannes in Majcherczyk, 2000; Solano in sod., 2001
GUA; 2-metoksifenol		468 nm (Johannes in Majcherczyk, 2000)	Solano in sod., 2001
L-DOPA; L-3,4-dihidroksifenilalanin; 2-karboksil-2,3-dihidroindol- 5,6-kinon		450 nm; pH 5	Sinsabaugh, 2009
SYR; siringaldazin oz. 4-hidroksi- 3,5-dimetoksibenz- aldehid azin		525 nm	Majeau in sod., 2009
CAT+PRO; katehol oz. 1,2-dihidroksibenzen; 4-(N-prolin)-o-benzokinon	Slika 5	525 nm; pH 6-7	Perruci in sod., 2000

Daleč najpogostejši uporabljen substrat za merjenje katalitske aktivnosti lakaz je ABTS, ki ne oblikuje kinonov (Majeau in sod., 2009), variacije v absorbanci ABTS⁺ pri različnih pH pa so zanemarljive ali pa jih ni (Floch in sod., 2007). Slika 4 prikazuje redoks pretvorbo substrata ABTS, ki jo lahko opravijo lakaze (Solis-Oba in sod., 2005). Oksidacijo ABTS z lakazo iz glive *Trametes versicolor* so spremljali z absorbanco pri 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 / \text{Mcm}$) (Bourbonnais in sod., 1998).



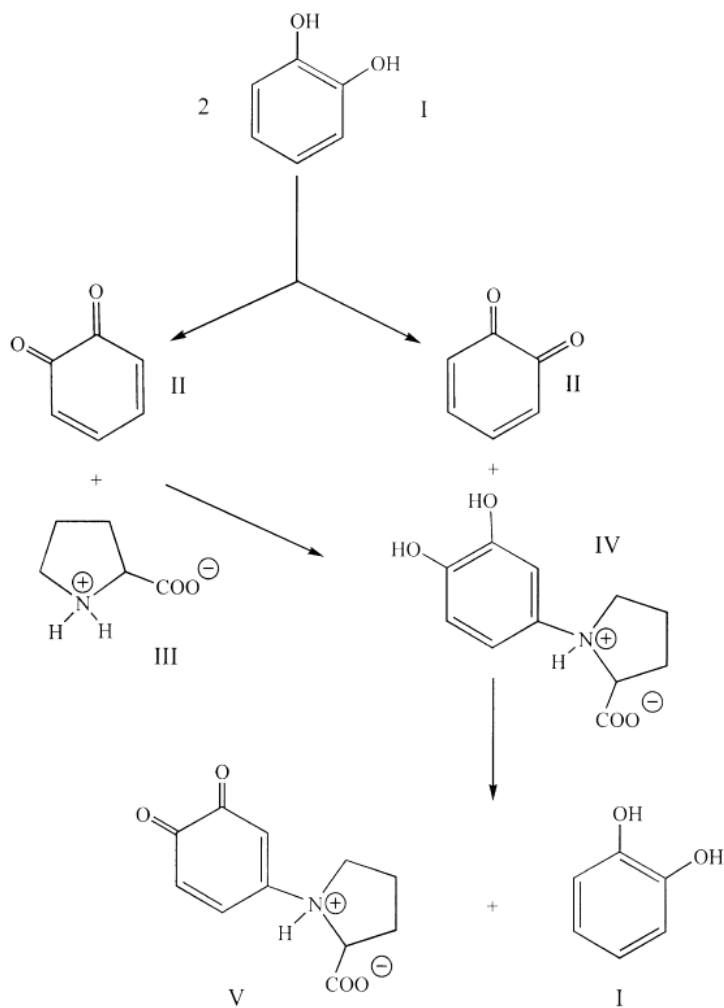
Slika 4: Redoks pretvorba ABTS v pozitivno nabit kationski radikal (ABTS^{•+}) in dikation (ABTS²⁺) (Solis-Oba in sod., 2005).

Kinetiko oksidacije ABTS v tleh so opazovali Floch in sod. (2007). V času inkubacije niso opazili kemijske ali abiotske oksidacije ABTS s steriliziranimi tlemi, kar potrjuje encimatski izvor aktivnosti. Hitrost fenol oksidazne aktivnosti je bila optimalna znotraj prvih 15 minut, po približno eni uri pa je dosegla fazo, ko se aktivnost ne spreminja več. Prednost testa je kratek čas inkubacije, v katerem ni mikrobne rasti in metabolizma, ki se sicer zgodi tekom daljših inkubacij. Ker so v študiji testirali le tri vzorce tal, predvidevajo, da lahko abiotske interference nastanejo v drugih tleh, z različnimi kemijskimi in fizikalnimi lastnostmi. Količina tal za test encimske aktivnosti je odvisna od tipa tal in od tarčnega encima, ki ga želimo zasledovati (Floch in sod., 2007).

Nad pH 7 so fenol oksidaze običajno popolnoma inaktivirane s hidroksidnimi ioni. Floch in sod. (2007) navajajo, da je detekcija fenol oksidazne aktivnosti v bazičnih tleh s substratom ABTS nemogoča. Kljub temu predvidevajo, da se fenol oksidaze izločajo v zunajcelični prostor tudi v alkalnih tleh in so aktivne zaradi prisotnih mikromest v talnem matriksu, kjer je pH bolj kisel (Floch in sod., 2007).

Za študij vpliva TK na encimsko aktivnost v tleh z dodanimi solmi kovin je potrebno izbrati tiste kovine, ki imajo redoks potencial nižji od $\text{ABTS}^+/\text{ABTS}$, ki je okrog 0,47 V. Zaradi višjega redoks potenciala pride do neencimatske oksidacije ABTS (npr. s Fe (III)) (Floch in sod., 2009).

Produkt, ki nastane po encimatski oksidaciji katehola v prisotnosti prolina (CAT+PRO) je kinon (Slika 5). Kinoni so visoko reaktivni in lahko tvorijo različne kondenzacijske produkte, posebej v prisotnosti spojin s prosto amino skupino. Polimerizacija fenolov in kinonov lahko vodi v kovalentno vgradnjo v huminske makromolekule. Zaradi možnosti abiotske kemijske oksidacije CAT Perruci in sod. (2000) predlagajo avtoklavirana tla kot kontrolo (30 minut pri 120 °C). Floch in sod. (2007) za oceno abiotske oksidacije prav tako predlagajo pripravo avtoklavirane kontrole (avtoklaviranje so podaljšali na eno uro). Sterilizacija tal lahko poteka tudi s fumigacijo s kloroformom (Perruci in sod., 2000).



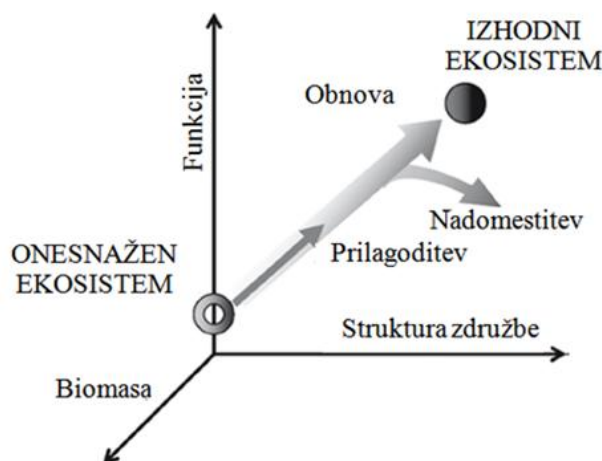
Slika 5: Oksidacija katehola v prisotnosti prolina. (I) katehol; (II) o-benzokinin; (III) prolin; (IV) 4-(N-prolin)-2-hidroksifenol; (V) 4-(N-prolin)-o-benzokinin, slednji je rdeče obarvana snov (Perruci in sod., 2000).

Nekateri substrati niso primerni za merjenje encimske aktivnosti v tleh. L-DOPA ni primeren zaradi kemijskih oksidacij s talnimi delci, kot poročajo Floch in sod. (2007), GUA in DMP imata omejeno topnosti oziroma nastajajo netopni produkti (Perruci in sod., 2000), s substratom SYR pa Floch in sod. (2009) niso dobili pozitivnega rezultata. Majeau in sod. (2009) navajajo, da je za merjenje lakazne aktivnosti ta substrat primeren, če aktivnost merimo v odsotnosti vodikovega peroksida in ob hkratnem negativnem testu za oksidacijo tirozina.

2.4 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA MIKROBNO ZDRUŽBO V TLEH

Mikroorganizmi so daleč najbolj aktiven in funkcionalno raznolik del talne biote. Mikrobiota prokaritov in gliv posreduje 90 % procesov v tleh (Kamal in sod., 2010). Za spremljanje aktivnosti fenol oksidaz v tleh ob prisotnosti TK je potrebno določiti vpliv mikrobne biomase in strukture mikrobne združbe, saj ima konzorcij mikrobov sposobnost, da se prilagodi okoljskim omejitvam z aktivnostjo, z biomaso in s strukturo mikrobne združbe. Te parametre se upošteva tudi pri obravnavi ocenjevanja kvalitete tal (Schloter in sod, 2003).

V zadnjih letih zasledimo mnogo objav o negativnih vplivih onesnaženja s TK na mikrobne združbe in funkcije v tleh, manj pozornosti pa je bilo namenjeno poteku revitalizacije onesnaženega ekosistema s spremljanjem mikrobne strukture in funkcije. Revitalizacije onesnaženega ekosistema poteka v smeri povečanja strukturne kompleksnosti in funkcije tako, da bi bil čim bolj podoben izhodnemu ekosistemu (Slika 6) (Hinojosa in sod., 2010).



Slika 6: Obnova ekosistema po onesnaženju (Hinojosa in sod., 2010).

Vzdržljivost/odpornost tal (ang. resilience) je sposobnost tal, da si povrne funkcionalno in strukturno integriteto po izpostavljenem onesnaženju (Nannipieri in sod. 2003). Lazzaro in sod. (2006) so naredili raziskavo funkcionalne stabilnosti združbe in njene odpornosti na stres po 90 dneh. Prvi so pokazali vpliv časa na biodostopnost Pb in na spremembo mikrobne združbe v tleh.

Bakterije so razvile mnogo učinkovitih sistemov za razstrupljanje škodljivih oblik TK:

- (i) izključevanje kovin s spremembo celične stene, membrane ali drugih ovojnic,
- (ii) aktivni transport kovin iz celice,
- (iii) znotrajcelična ali zunajcelična vezava kovin na proteine,
- (iv) encimska detoksifikacija kovin v manj strupeno obliko in
- (v) zmanjšanje občutljivosti kovinskih celičnih tarč.

Geni na kromosomih, plazmidih ali transpozonih imajo zapise za specifično odpornost na različne ione kovin (Bruins in sod., 2000). Kothe in sod. (2010) omenjajo pri streptomycetah, ki so pomemben del talne bakterijske populacije, kelatorje TK kot je oksalat in sideroforje. Podobno rizobakterije spreminjajo biodostopnost TK z izločanjem kelirajočih snovi, nižajem pH okolja in spreminjanjem redoks potenciala (Kamal in sod., 2010). Mikroorganizmi so nedvomno vključeni v biogeokemijo kovin. Potencialne procese za bioremediacijo onesnaženja s kovinami je opisal Gadd (2004).

2.4.1 T-RFLP analiza bakterijske in glivne združbe

Uvedba molekularnih metod v mikrobni ekologiji omogoča spremljanje dinamike mikrobne združbe na podlagi spreminjanja fizikalno-kemijskih in/ali bioloških pogojev skozi čas, kar je ključno za spremljanje delovanja združbe (Osborn in sod., 2000). Za primerjavo strukture mikrobne združbe se med drugim uporablja polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP), ki je učinkovita metoda za določanje razlik in sprememb v bakterijski združbi (Turpeinen in sod., 2004) in v združbi arbuskularnih mikoriznih gliv. Uporablja se za analize pestrosti, raznolikosti in primerjanje strukture mikrobne združbe v različnih okoljih (Liu in sod., 1997). Tehnika temelji na direktni izolaciji DNA iz tal, pomnožitvi genov ali delov genov za 16S rDNA oziroma 18S rDNA s fluorescenčno označenim začetnim oligonukleotidom in razrezu produktov PCR z restrikcijsko endonukleazo. Analiza fragmentov poteka s kapilarno elektroforezo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Preglednica 2: Splošni in molekularni reagenti in proizvajalci.

Reagenti	Proizvajalec
splošni laboratorijski material	Eppendorf, Haburg, Nemčija Platibrand, Nemčija
ABTS	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
4M-CAT	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
L-DOPA	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
SYR	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
GUA	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
CAT	Sigma-Aldrich, St.Louis, ZDA
PRO	Merck, Nemčija
Mikoritirske plošče	
UltraClean Soil DNA Isolation Kit	MO BIO, Solano Beach, Kalifornija, ZDA
Sintetični oligonukleotidi (Preglednica 5)	
Agaroz	
Go Taq polimeraza	Promega, Madison, ZDA
Deoksiribonukleotidi (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	
25mM MgCl ₂	Promega, Madison, ZDA
5X Go Taq Flexi pufer	Promega, Madison, ZDA
BSA	BioLabs, New England
Standardna DNA lestvica	Fermentas
PureLink™ Gel Extraction Kit, Invitrogen	Carlsbad, Kalifornija, ZDA
QuickClean 5M PCR Purification Kit	GenScript, Piscataway, ZDA
Restriksijski encimi (Preglednica 4)	Fermentas
Tango pufer	

Preglednica 3: Založne raztopine in pufri.

Pufer	Sestava in hranjenje pufra
pufer 2,2	2 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; 98 ml 0,1 M citronske kisline (hranjenje pri 4 °C)
pufer pH 4,0	38,55 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; 61,45 ml 0,1 M citronske kisline (hranjenje pri 4 °C)
pufer pH 5,8	60,45 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; 39,55 ml 0,1 M citronske kisline (hranjenje pri 4 °C)
pufer 7,6	93,65 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; 6,35 ml 0,1 M citronske kisline (hranjenje pri 4 °C)
pufer 10,0	boratni pufer in NaOH (hranjenje pri 4 °C)
Fiziološka raztopina	9 g NaCl; dH ₂ O do 1000 ml
Tris-acetatni pufer (TAE) 50x	242 g Tris; 57,1 ml očetna kislina; 100 ml 0,5 M EDTA; dH ₂ O do 1 l
6X nanašalni pufer	Bromofenol modro 0,25 %; ksilen cianol 0,25 %; glicerol 30 % (hranjenje pri 4 °C)
Raztopina etidijevega bromida	20 µl 10 mg/l etidijevega bromida; dH ₂ O do 500 ml

Laboratorijski pribor:

- Laboratorijska steklovina (erlenmajerice, čaše, merilni valji, epruveta, serumske stekleničke)
- Laboratorijske rokavice
- Pipetni nastavki
- Mikrocentrifugirke (200 µl, 1500 µl)
- Plastične falkonke
- Secirni pribor
- Polavtomatske pipete (2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) Eppendorf, Haburg, Nemčija
- Multikanalna pipeta 20-200 µl Transferpette

Aparature:

- Avtoklav Kambič Laboratorijska oprema, Slovenija
- Bunsenov gorilnik
- Centrifuga Centric 150, Tehnica, Slovenije
- Centrifuga s hlajenjem Sigma 3K30, Nemčija
- Električni transformator za elektroforezo
- Elektroforezni sistem Biometra, Standard Power Pack P25
- Elektronska tehtnica Mettler PM, 4600 Delta Range, Mettler instrumente AG, Švedska
- Hladilnik NewLine, Gorenje, Slovenija
- Horizontalni stresalnik Vibromix 40, Tehnica, Slovenija
- Mikrovalovna pečica
- Magnetno mešalo Vibromix, Tehnica, Slovenija
- Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific
- PCR naprava – ciklični termostat Biometra ThermoCycler, Nemčija
- Plinski kromatograf s priborom Hewlett, Packard 5890
- Pečica Binder, Nemčija
- Spektrofotometer Multiscanspectrum, Thermo Electron Corporation, Ulm, Nemčija
- Tehnica Scaltec, Nemčija
- Tehnica Rotamix
- Termostat
- Transluminator
- Vorteks mešalo
- Zamrzovalna omara Forma -86 °C, Thermo Electron Corporation, Ulm, Nemčija
- Zamrzovalna omara Gorenje, Slovenija
- Zaščitna komora ESCO, PCR kabinet

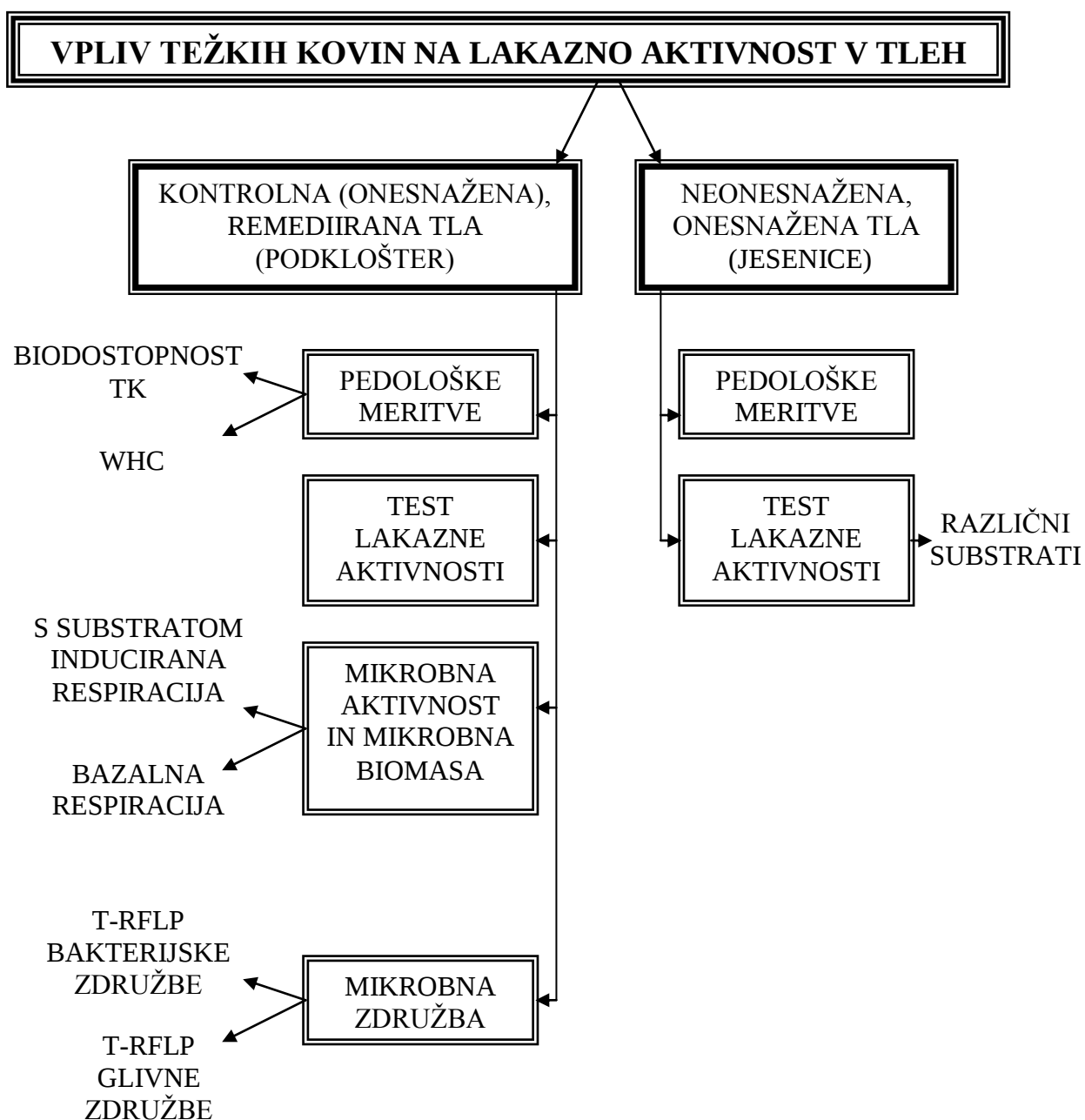
Preglednica 4: Uporabljeni restrikcijski encimi.

Restrikcijski encim (izoshizomer)	Prepoznavno mesto	Restrikcija	Vir
HaeIII (BshI, BsuRI, PstI)	GG'CC	16S rRNA, 18S rDNA	Liu in sod., 1997
MspI (HapII, HpaII)	C'CGG	18S rDNA	
AluI	AG'CT	16S rRNA	

Preglednica 5: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Oznaka	Zaporedje	Vir
6-FAM-27F	5'[6FAM]-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Lane, 1991
927R	5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3'	
EF3	5'-TCCTCTAAATGACCAAGTTTG-3'	Smit in sod., 1999
6-FAM-EF4	5'[6FAM]-GGAAGGGRTGTATTTATTAG-3'	

Laboratorijsko delo je zajemalo dva dela. V prvem delu smo izvedli test lakazne aktivnosti v mikrotitrskih ploščah na vzorcu neonesnaženih in onesnaženih tal z Jesenic, pri katerem smo uporabili različne substrate za lakazo in s katerim smo skušali ovrednotiti onesnaženost tal. Poleg tega smo opredelili tudi fizikalno kemične lastnosti vzorčenih tal (pedološke meritve). V drugem delu diplomske naloge smo primerjali lakazno aktivnost v neremediiranih (kontrolnih oz. onesnaženih) in remediiranih tleh iz Podkloštra. Določena je bila biodostopnost kovin v kontrolnih in v različno remediiranih tleh. Med kontrolnimi in remediiranimi tlemi smo določili razlike v mikrobni biomasi, mikrobni aktivnosti ter v bakterijski in glivni združbi (Slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz dela in analiz.

3.2 VZORČNA MESTA IN VZORČENJE

3.2.1 Onesnažena in neonesnažena tla z Jesenic

Vzorčno mesto onesnaženih tal na Jesenicah je bilo na brežini, poraščeni z obcestnim grmičevjem, veliko in mrtvo koprivo ter regratom na 538 m n.v. (42°33'14" severno in 13°40'56" vzhodno). Vzorčno mesto neonesnaženih tal je bilo na travniku otroškega igrišča na Jesenicah na 593 m n.v. (42°65'01" severno, 14°45'29" vzhodno).

3.2.2 Kontrolna in remediirana tla iz Podkloštra

Poskusno polje v Podkloštru v Avstriji (Slika 8) je od stare talilnice svinca in cinka oddaljeno en kilometer proti zahodu. Leta 1992 so talilnico zaprli, emisije so tako približno 500 let onesnaževale okolico večinoma s Pb, Zn in Cd, v manjšem obsegu tudi s Cu in As. Preiskave kmetijskih tal leta 2001 so pokazale onesnaženje s Pb (<5870 mg/kg), Zn (<3480 mg/kg), Cd (<24,4 mg/kg) in Cu (<188 mg/kg). Elementi v sledovih so prisotni v tleh tudi zaradi geoloških razlogov.



Slika 8: Lega Podkloštra v Avstriji (Friesl-Hanl in sod., 2009).

Friesl-Hanl in sod. (2009) so v obdobju petih let z remediacijo dosegli zmanjšanje biodostopnih koncentracij Cd, Pb in Zn. Tlem so dodali različne dodatke, ki z imobilizacijo TK in/ali spremembo talnega pH zmanjšajo biodostopno frakcijo in sicer:

- droben do zrnat odpadni produkt gramozne industrije, ki vsebuje 40–65 % SiO_2 , 10–14 % Al_2O_3 , 3–7 % Fe_2O_3 , 5–12 % CaO in 4–6 % MgO , gramozno blato (ang. gravel sludge) (pH 8,2);
- stranski produkt predelave boksita v industriji aluminija, vsebuje 15–17 % Al_2O_3 , 12–14 % SiO_2 , 39–43 % Fe_2O_3 in 8–10 % Na_2O , rdeče blato (ang. red mud) (pH 10,4);
- 97 % CaCO_3 , apno.

Po letu 2005 so dodatke namestili globlje v tla za bolj homogeno disperzijo. Najboljši imobilizacijski učinek je potekel v tleh, tretiranih z gramoznim blatom in ostanki boksita. Dodatek imobilizatorja zviša talni pH, topnost TK se ob tem zmanjša. TK precipitirajo in se vežejo na koloide, kot so organski delci, železovi in aluminijevi koloidi. V globljih plasteh tal ni bilo vpliva tretiranja in spiranja Cd in Zn glede na podatke talne vode v porah na globinah 30 cm in 60 cm. Koncentracija Zn je po tretiranju padla pod avstrijske standarde (Friesl-Hanl in sod., 2009).

Tla v Podkloštru so distrični kambisol, razvit na glacialnih sedimentih. Distrična tla imajo majhni delež bazičnih kationov (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) in tudi nizko pH vrednost (kisla in zelo kisla tla) (Zupan in sod., 2008). Na mikroklimo Ziljske doline vplivajo smer doline od vzhoda proti zahodu in stabilne inverzije jeseni in pozimi. Letne padavine so okrog 1300-1400 mm z maksimumom poleti in jeseni.

Vzorčenje je potekalo 6. 12. 2009 na globini od 0-20 cm na poskusnem polju, zasajenem s koruzo (*Zea mays L.*) v bližini stare talilnice Pb in Zn v Podkloštru. Na polju je bilo približno 5 cm snega, temperatura ozračja okrog 0 °C. Vzorčenje za določanje mikrobne biomase in mikrobne aktivnosti je potekalo 20. 11. 2009 na globini 0-20 cm pri temperaturi ozračja okrog 3 °C (Slika 9 in Slika 10).

Vzorci neremediiranih (kontrolnih oz. onesnaženih), z apnom remediiranih ter z gramoznim blatom in ostanki boksita remediiranih tal, smo odvzeli v treh pravih ponovitvah. Natančne lokacije so prikazane na Sliki 11, kjer so označena polja odvzema vzorca. Dolžina stranice posameznega polja je dva metra. Tla smo vzorčili s pripomočkom za vzorčenje na različnih globinah. Za posamezno poljsko paralelko smo združili tla treh pravih ponovitev (vrtin), ki smo jih presegali skozi sito s premerom luknjic 4 mm in temeljito premešali. V sterilne mikrocentrifugirke smo razdelili po 0,5 g vsake poljske paralelke ter shranili na -80 °C do nadaljnjih analiz.

Lastnosti tal poljskega eksperimenta na mestu Stossau na globini od 0-20 cm: pH 4,9; tekstura tal: pesek 486 g/kg, melj 359 g/kg, glina 155 g/kg; kationska izmenjevalna kapaciteta 50 mmol_c/kg, ekstrahirane frakcije kovin z 1 M NH_4NO_3 v mg/kg: 32,0 ± 1,8 As, 5,6 ± 0,8 Cd, 58,2 ± 3,3 Cu, 913 ± 140 Pb, 545 ± 74 Zn. Za imobilizacijski mehanizem na

različne površine iz glinenih mineralov in železovih oksidov je vsaj za prvo hitro soprcijsko stopnjo potrebna pH sprememba. Leta 2007 je bila razlika med pH kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tal 1,5 enote (leta 2005 dve enoti). Friesl-Hanl in sod. (2009) so v letu 2007 določili naslednje pH vrednosti: za K: $\text{pH } 5,3 \pm 0,2$, A: $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$ in B: $\text{pH } 6,5 \pm 0,2$.



Slika 9: Poskusno polje.



Slika 10: Tla poskusnega polja.

		A1		B3		A2		K2		
				A3	K3			B2	B1	K1

Slika 11: Shema vzorčenja na poskusnem polju v Podkloštru. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3).

3.3 PEDOLOŠKE MERITVE

3.3.1 Lastnosti tal z Jesenic

Na Katedri za pedologijo in varstvo okolja na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete so onesnaženim in neonesnaženim tlem z Jesenic določili teksturni razred, pH, delež organske snovi, razmerje med ogljikom in dušikom, celokupne koncentracije kovin in potencialno mobilni delež kovin Cr, Ni, Zn, Pb, Cu in Cd, ki so ga določili s TCLP metodo. Rezultati so bili ovrednoteni glede na zakonsko določene mejne, opozorilne in kritične vrednosti nevarnih snovi.

3.3.2 Lastnosti tal iz Podkloštra

V tleh iz Podkloštra so na Katedri za pedologijo in varstvo okolja na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete z metodo šest stopenjske sekvenčne analize določili biodosegljivost Cu, Cd, Pb in Zn in koncentracije ionov teh kovin, vezanih na karbonate po spiranju z deionizirano vodo, raztopino $Mg(NO_3)_2$ in amonoacetatom (pH 5,0).

Vsebnost vode v tleh smo določili kot sposobnost zadrževanja vode v tleh (WHC). 100 % WHC pomeni največjo maso vode, ki jo lahko zadrži 1 g tal in ker ima vpliv na prezračenost in dostopnost hranil ter tako na mikrobno aktivnost v tleh, je potrebno pri metodah SIR in BR zagotoviti, da se eksperimenti izvajajo pri enaki stopnji vsebnosti vode v tleh. Najprej smo stehali suhe in mokre Kopecky posodice, jih napolnili z vlažnimi tlemi in ponovno stehali. Cilindre z vzorci smo postavili v vodo in jih pokrili s stekleno petrijevko, da voda ni izhlapevala. Vzorce smo odcedili in stehali. Do konstantne teže smo tla sušili v pečici pri 105 °C.

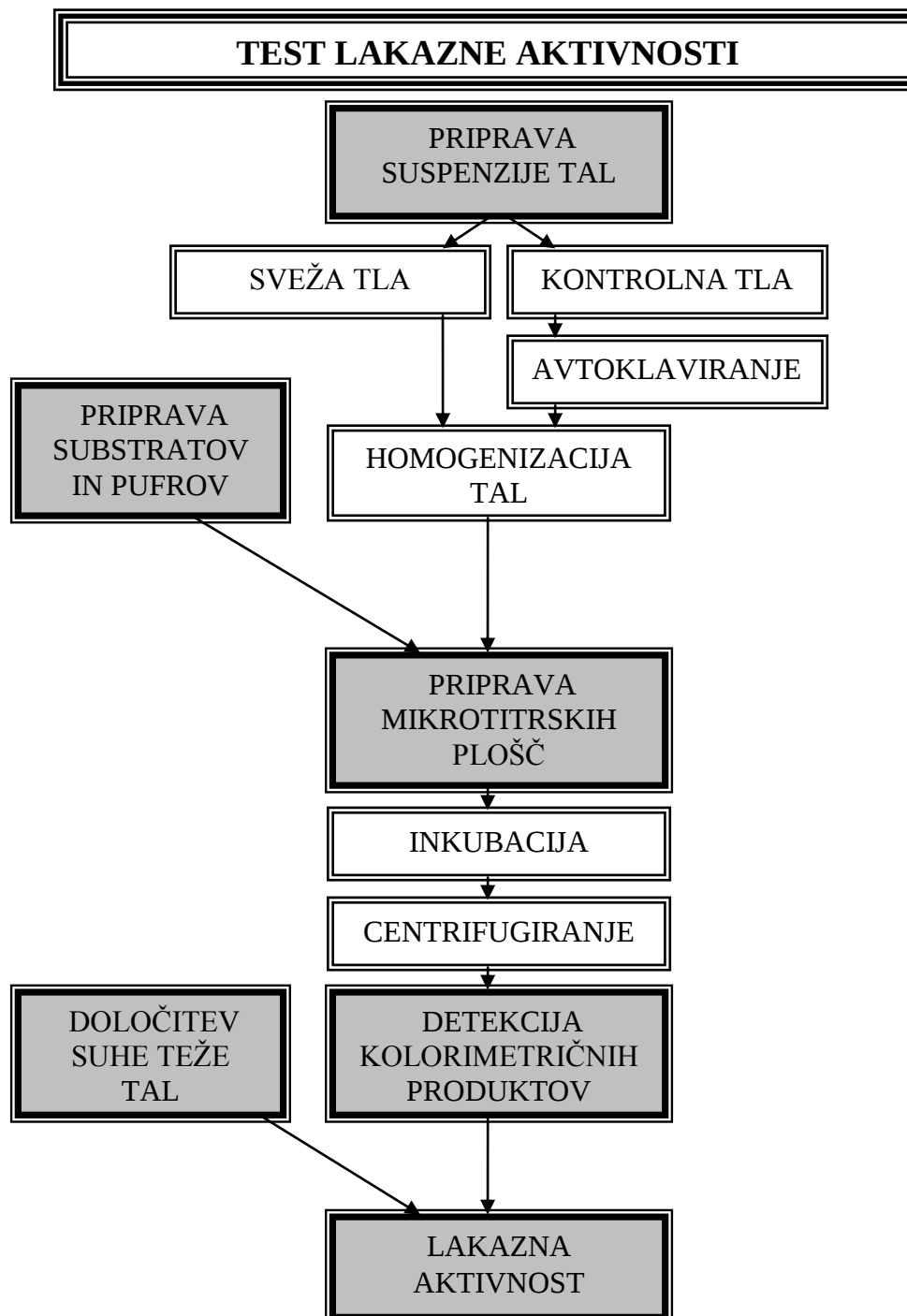
Določili smo maso odcejenih in suhih tal ter izračunali WHC:

$$WHC = (m_{\text{voda in tla}} - m_{\text{suha tla}}) / m_{\text{suha tla}} \quad \dots (1)$$

Vsebnost vode smo izrazili kot odstotni delež glede na celotno kapaciteto tal za zadrževanje vode: $\% WHC = (vsebnost\ vode\ v\ tleh / WHC) * 100 \%$ (2)

3.4 LAKAZNA AKTIVNOST V TLEH

3.4.1 Test lakazne aktivnosti



Slika 12: Shematski prikaz testa lakazne aktivnosti.

Lakazno aktivnost smo merili v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic z različnimi substrati ter v kontrolnih in remediiranih tleh iz Podkloštra le z ABTS (Slika 12).

- Priprava substratov in pufrov

Po navodilih McIlvaine (1921) smo pripravili citrat fosfatne pufre pH 2,2; pH 4,0; pH 5,8 in pH 7,6 (oba Merck, Nemčija) in boratni pufer pH 10,0.

Za test lakazne aktivnosti smo vedno pripravili sveže substrate. Končne koncentracije substratov so navedene v Preglednici 6.

Preglednica 6: Končne koncentracije substratov v testu lakazne aktivnosti v tleh z Jesenic.

Substrat	Končna koncentracija (M)	Topilo
ABTS	0,011	dvakrat deionizirana voda
4M-CAT	0,130	destilirana voda
DMP	0,110	etanol, destilirana voda
L-DOPA	0,002	destilirana voda
4M-CAT+PRO	0,107	destilirana voda
CAT+PRO	0,036	destilirana voda
GUA	0,217	etanol, destilirana voda
SYR	0,002	formamid

- Priprava suspenzije tal

10 g svežih tal smo zatehtali v 100 ml fiziološke raztopine (Slika 13). Avtoklaviranje kontrolnih tal za sveže vzorce je potekalo eno uro pri 121 °C (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija). Sveže in avtoklavirane vzorce smo stresali pol ure na 250 rpm na horizontalnem vorteksu (Tehtnica, Slovenija). 10 ml talne suspenzije smo prenesli v falkonko z dodanimi majhnimi steklenimi kroglicami in homogenizirali na horizontalnem vorteksu (Tehtnica, Slovenija) in sicer 5 minut za tla z Jesenic in 15 minut za tla iz Podkloštra.



Slika 13: Priprava svežih tal za stresanje.

- Test lakazne aktivnosti v mikrotitrskih ploščah

V vsako luknjico na mikrotitrski plošči smo dali po eno stekleno kroglico, z multikanalno pipeto smo odpipetirali 50 μ l sveže pripravljene substrata in pufer ustreznega pH (180 μ l k tlem z Jesenic, oziroma 130 μ l k tlem iz Podkloštra). Odpipetirali smo 30 μ l suspenzije tal z Jesenic oziroma 50 μ l suspenzije tal iz Podkloštra v šestih ponovitvah in inkubirali eno uro s stresanjem na horizontalnem vorteksu (Tehtnica, Slovenija) pri 150 rpm. Mikrotitrške plošče smo postavili v centrifugo (Sigma 3K30, Nemčija) in centrifugirali 4 minute pri 2500 rpm in sobni temperaturi. 150 μ l supernatanta smo prenesli v novo mikrotitrsko ploščo za spektrofotometrične meritve kolorimetričnih produktov reakcije (Slika 14).



Slika 14: Mikrotitrška plošča pred spektrofotometričnim merjenjem produktov različnih substratov.

- Detekcija kolorimetričnih produktov

S spektrofotometrom (Thermo Electron Corporation, Finska) smo pomerili absorbance pri valovni dolžini 420 nm za detekcijo nastalih produktov substrata ABTS in 4M-CAT, pri

468 nm za DMP in GUA, 485 nm za L-DOPA in 525 nm za SYR, 4M-CAT+PRO ter CAT+PRO.

- Določitev suhe teže tal

Točno 10 g tal smo sušili v pečici (Binder, Nemčija) pri 105 °C do konstantne teže. Iz razlike med svežimi in suhimi tlemi smo izračunali delež suhih tal v eni luknjici na mikrotitski plošči.

- Izračun lakazne aktivnosti

Razliko v absorbanci med svežimi in avtoklaviranimi tlemi smo preračunali na gram suhih tal. Rezultate lakazne aktivnosti v tleh iz Podkloštra smo prikazali v R programu (v. 2.10.1, r-project.org).

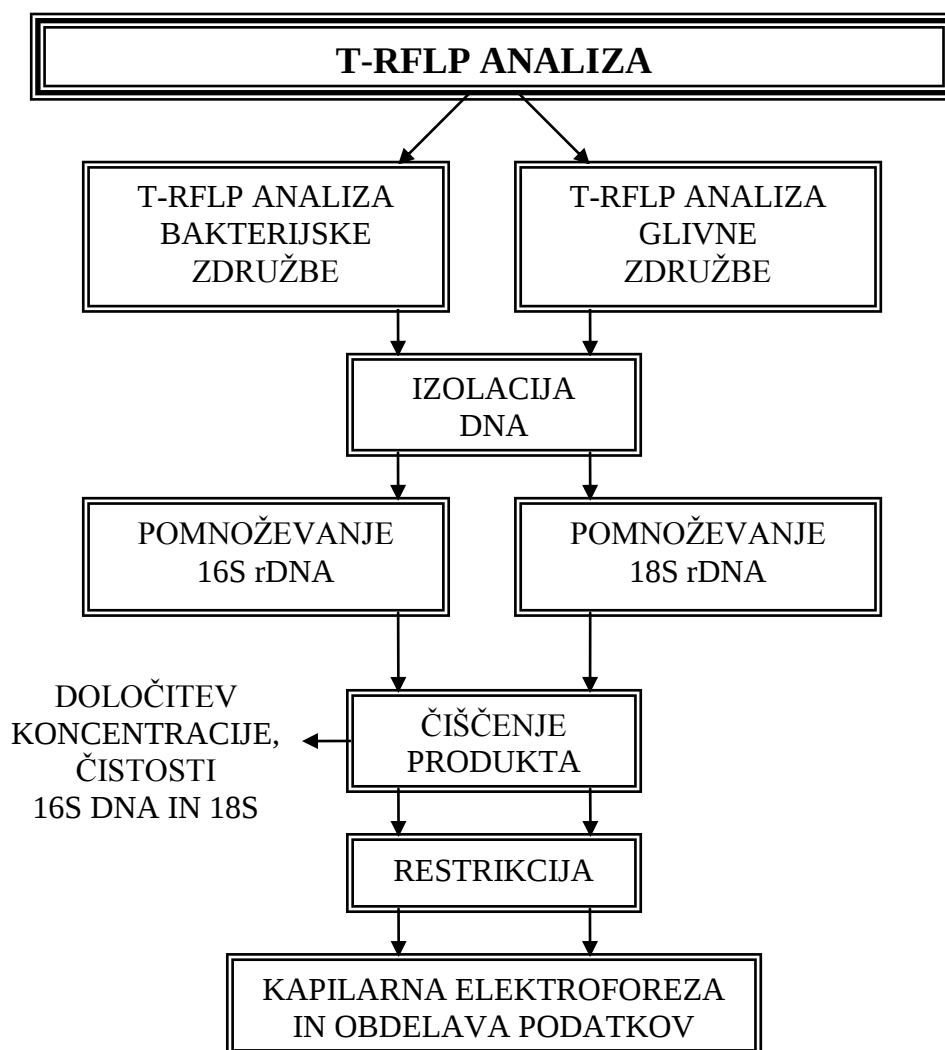
3.4.2 Metoda bazalne respiracije in s substratom inducirana respiracija

Za merjenje s substratom inducirane respiracije (SIR) smo 25 g svežim tlem dodali 0,6 ml sterilne fiziološke raztopine in 1,5 ml 40 % raztopine glukoze za zagotovitev 70 % WHC. Ta količina dodane glukoze naj bi zadostovala za zagotovitev največjega SIR odziva (Sparling, 1995). Serumske steklenice smo zatesnili ter inkubirali tri ure pri sobni temperaturi v temi. Delež v plinski fazi prisotnega CO₂ smo izmerili s plinskim kromatografom (Hewlett Packard 5890) na začetku in koncu inkubacije. Bazalno respiracijo (BR) smo merili na enak način, vendar brez dodane glukoze. Tlem smo dodali 2,1 ml sterilne fiziološke raztopine.

SIR in BR smo merili v vseh poljskih paralelkah kontrolnih in remediiranih tal. SIR smo merili v tehničnih ponovitvah, razen za A3. Prav tako smo v ponovitvah merili BR, razen za K2, A3 in B3.

3.5 T-RFLP ANALIZA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE

Potek T-RFLP analize bakterijske in glivne združbe je prikazan na Sliki 15.



Slika 15: Shematski prikaz T-RFLP analize bakterijske in glivne združbe.

- Izolacija DNA

DNA smo izolirali iz 0,25 g tal iz vseh poljskih paralelk v ponovitvi s kompletom UltraClean Soil DNA Isolation Kit po navodilih proizvajalca MO BIO (Solano Beach, Kalifornija, ZDA).

– Preverjanje čistosti DNA na agaroznem gelu in merjenje koncentracije DNA

Za pripravo 0,8 % (wt/vol) agaroznega gela smo v 100 ml Erlenmeyerjevi bučki segrevali 30 ml 1x TAE pufra s 0,24 g agaroze, dokler se ni raztopila. V pripravljen model z glavnički smo razlili približno na 40 °C ohlajeno agarozo in počakali, da se strdi. Gel smo prenesli v raztopino etidijevega bromida za 15 minut in ga nato razbravali v vodi. 5 µl DNA vzorcev smo nanegli na gel skupaj s po 1 µl pufra za nanašanje DNA (6x DNA loading dye, Fermentas). Na gel smo nanegli 3 µl Fermentas DNA standardne lestvice v koncentraciji 0,1 µg/µl.

Koncentracijo in čistost DNA smo izmerili z napravo NanoDrop 100 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Delaware, ZDA), za kar smo uporabili 1,5 µl vzorca.

– PCR 16S rRNA in 18S rDNA

Za pomnoževanje 900 bp dolgega gena za 16S rRNA smo uporabili začetna oligonukleotida, specifična za bakterije (Liu in sod., 1997). Začetni oligonukleotid 927R je bil neoznačen, 27F pa je bil označen s 6FAM.

Za pomnoževanje 1,4 kbp dolgega gena za 18S rDNA smo uporabili začetna oligonukleotida EF3 in EF4, slednji je bil označen s 6FAM (Preglednica 5).

Kot matriko smo uporabili celokupno izolirano DNA iz kontrolnih in remediiranih tal.

Za obe pomnoževanji smo pripravili negativno kontrolo, to je vzorec brez dodane matrike. Reakcijske mešanice smo pripravili tako, kot je navedeno v Preglednici 7. Potek pomnoževanja je za 16S rDNA naveden v Preglednici 8, za 18S rDNA pa v Preglednici 9.

Preglednica 7: Priprava reakcijskih mešanic za PCR 16S rDNA oz. za 18S rDNA.

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	za 26 μl reakcijo (μl)
DNA matrica			2
miliQ			14,63
PCR pufer	5x	1x	5
MgCl₂	25 mM	2 mM	2
BSA	10 mg/ml	0,2 mg/ml	0,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
6FAM-27F oz. 6FAM- EF4	10 mM	0,2 mM	0,5
927R oz. EF3	10 mM	0,2 mM	0,5
Go Taq polimeraza (Promega, Madison, ZDA)	5 U/ μ l	0,0243 U/ μ l	0,125

Preglednica 8: Potek pomnoževanja 16S rDNA.

Začetna denaturacija	94 °C	2 min
Cikli (25x)		
denaturacija	94 °C	1 min
prileganje oligonukleotidnih začetnikov	50 °C	1 min
pomnoževanje	72 °C	1 min
Končno podaljševanje	72 °C	5 min
Ohlajanje	16 °C	

Preglednica 9: Potek pomnoževanja 18S rDNA.

Začetna denaturacija	94 °C	2 min
Cikli (25x)		
denaturacija	94 °C	1 min
prileganje oligonukleotidnih začetnikov	48 °C	1 min
pomnoževanje	72 °C	1,5 min
Končno podaljševanje	72 °C	5 min
Ohlajanje	16 °C	

– Čiščenje produkta verižne reakcije s polimerazo

Ponovitve iz pomnoževanja enake DNA smo združili in skupaj s 7 μ l nanašalnega pufru nanesli v jamico na 0,8 % gel. Na gel smo nanesli tudi 7 μ l DNA standardne lestvice. S PureLink™ Gel Extraction Kit smo po navodilih proizvajalca (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) očistili produkte PCR iz gela.

Očiščen produkt (5 μ l) smo preverili na 0,8 % (wt/vol) agaroznem gelu in ga primerjali s standardno lestvico Lambda DNA, pripravljeno z restrikcijskim encimom PstI (3 μ l).

– Restrikcija in T-RFLP analiza

Očiščene PCR produkte smo rezali z restrikcijskim encimom po protokolu kot priporoča proizvajalec Fermentas. Uporabili smo restrikcijske encime HaeIII, MspI in AluI (Preglednica 4).

V reakcijo smo dodali po 80 ng očiščenih PCR produktov, 2 μ l pufru, dvakrat deionizirano vodo in 1,5 μ l restrikcijskega encima. Volumni dodanih reagentov za pripravo restrikcijskih mešanic so zbrani v Prilogi C1 in Prilogi C2.

Restrikcijske mešanice smo premešali, centrifugirali 1 minuto pri 10000 rpm in inkubirali 16 ur v temi pri 37 °C. Restriktaze smo nato inaktivirali z 20 minutnim segrevanjem v termobloku pri 80 °C. Z etanolno precipitacijo smo oborili DNA (Powell in Gannon, 2002).

Vzorci smo posredovali na analizo s kapilarno elektroforezo, ki so jo izvedli na Oddelku za zootehniko, Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Rodici. Elektroferograme vzorcev smo pregledali s programom Bionumerics v. 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Belgija), v katerem smo s Pearsonovo korelacijo in metodo UPGMA (neobtežena metoda parnih skupin z aritmetično sredino) izrisali dendrograme.

4 REZULTATI

4.1 PEDOLOŠKE MERITVE

4.1.1 Lastnosti tal z Jesenic

Glede na delež peska (60 %), melja (30 %) in glin (10 %) smo onesnažena in neonesnažena tla z Jesenic uvrstili v isti teksturni razred in sicer peščena ilovica. V Preglednici 10 so navedeni parametri, v katerih se tla razlikujejo. Nekoliko manjši delež organske snovi je bil v onesnaženih tleh, razmerje med ogljikom in dušikom je bilo tu večje. pH, določen s CaCl_2 , je bil v teh tleh le nekoliko višji kot v neonesnaženih.

Preglednica 10: Lastnosti onesnaženih in neonesnaženih tal z Jesenic.

Parameter	Onesnažena tla	Neonesnažena tla
pH (CaCl_2)	7	6,7
delež ogljika (%)	4,9	7,5
razmerje ogljika z dušikom	37,7	28,8

V onesnaženih tleh je bil potencialno mobilni delež kovin povsod večji kot v neonesnaženih tleh (Preglednica 11).

Preglednica 11: Potencialno mobilni delež kovin v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic, določen s TCLP metodo (n=6).

Kovina	Koncentracija v onesnaženih tleh (mg/kg)	Koncentracija v neonesnaženih tleh (mg/kg)
Zn	$24,59 \pm 1,37$	$0,63 \pm 0,77$
Pb	$13,08 \pm 2,58$	$0,66 \pm 0,71$
Cr	$7,37 \pm 1,34$	$0,04 \pm 0,11$
Ni	$1,87 \pm 0,73$	$0,13 \pm 0,10$
Cu	$0,66 \pm 0,35$	$0,07 \pm 0,08$
Cd	$0,25 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$

Vrednotenje rezultatov meritev onesnaženosti tal glede na zakonsko določeno mejne, opozorilne in kritične vrednosti nevarnih snovi v tleh je pokazalo, da kritične imisijske vrednosti v onesnaženih tleh presegajo Cr, Ni in Zn (Preglednica 12). Koncentracije Pb, Cu in Cd v onesnaženih tleh so presegale opozorilno imisijsko vrednost. V neonesnaženih tleh so bile koncentracije kovin manjše kot v onesnaženih, kljub temu pa koncentraciji Pb in Cd presegata opozorilno imisijsko vrednost, koncentracija Zn presega mejno imisijsko vrednost. Koncentracije ostalih kovin so pod mejno vrednostjo.

Preglednica 12: Celokupne koncentracije kovin določene z zlatotopko v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic.

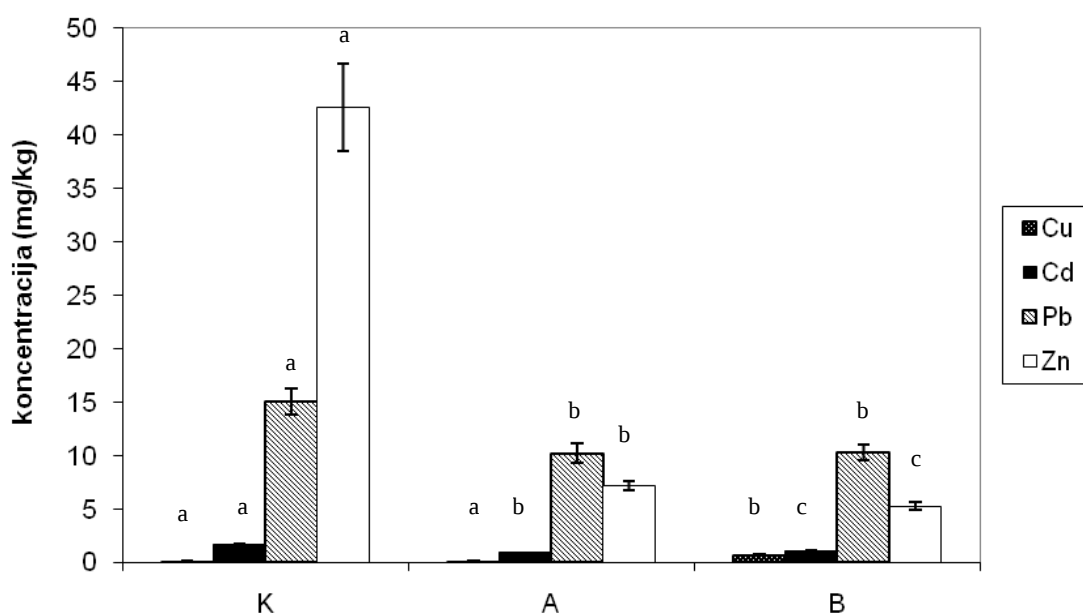
Kovina	Koncentracija v onesnaženih tleh (mg/kg)	Koncentracija v neonesnaženih tleh (mg/kg)
Cr	1458,6 ± 55,2	20,4 ± 1,2
Zn	1092,2 ± 125,3	157,9 ± 14,5
Pb	484,9 ± 31,8	106,9 ± 14,2
Ni	231,9 ± 29,4	25,9 ± 1,4
Cd	8,1 ± 0,1	2,5 ± 1,7
Cu	140,6 ± 4,6	25,1 ± 0,7

4.1.2 Lastnosti tal iz Podkloštra

V Preglednici 13 so navedene lastnosti tal in celokupne koncentracija kovin v tleh iz Podkloštra, določene z zlatotopko. Celokupne koncentracije Pb so v vseh tleh presegle kritično vrednost, celokupne koncentracije Cd in Zn pa opozorilno vrednost (Uredba o..., 1996).

Preglednica 13: Lastnosti tal iz Podkloštra in celokupne koncentracije kovin. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B). 100 % WHC- največja vsebnost vode, ki jo lahko zadrži 1g tal. Navedene so povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

Parametri		K	A	B
Celokupna koncentracija kovin (mg/kg)	Cu	43,1 ± 1,3	42,5 ± 1,9	45,0 ± 3,1
	Cd	6,3 ± 0,2	6,3 ± 0	6,8 ± 0,2
	Pb	1051,1 ± 13,3	1063,5 ± 1,2	1118,4 ± 74,3
	Zn	399,3 ± 7,8	412,8 ± 11,6	420,8 ± 23,5
pH (n=3)		5,38 ± 0,12	6,02 ± 0,03	6,32 ± 0,03
100 % WHC (n=2)		0,60 ± 0,03	0,60 ± 0	0,64 ± 0,01
vlažnost (g vode/g tal)		0,28	0,28	0,28



Slika 16: Biodosegljivosti Cu, Cd, Pb in Zn v tleh iz Podkloštra določene po spiranju z deionizirano vodo in $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (n=3). Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B). Oznake za statistično značilne razlike (t-test, $P < 0,05$) (a,b,c). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

Biodosegljivosti Cu, Cd, Pb in Zn so bile določene z metodo šest stopenjske sekvenčne analize (s spiranjem z deionizirano vodo in $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) v kontrolnih tleh (K), tleh

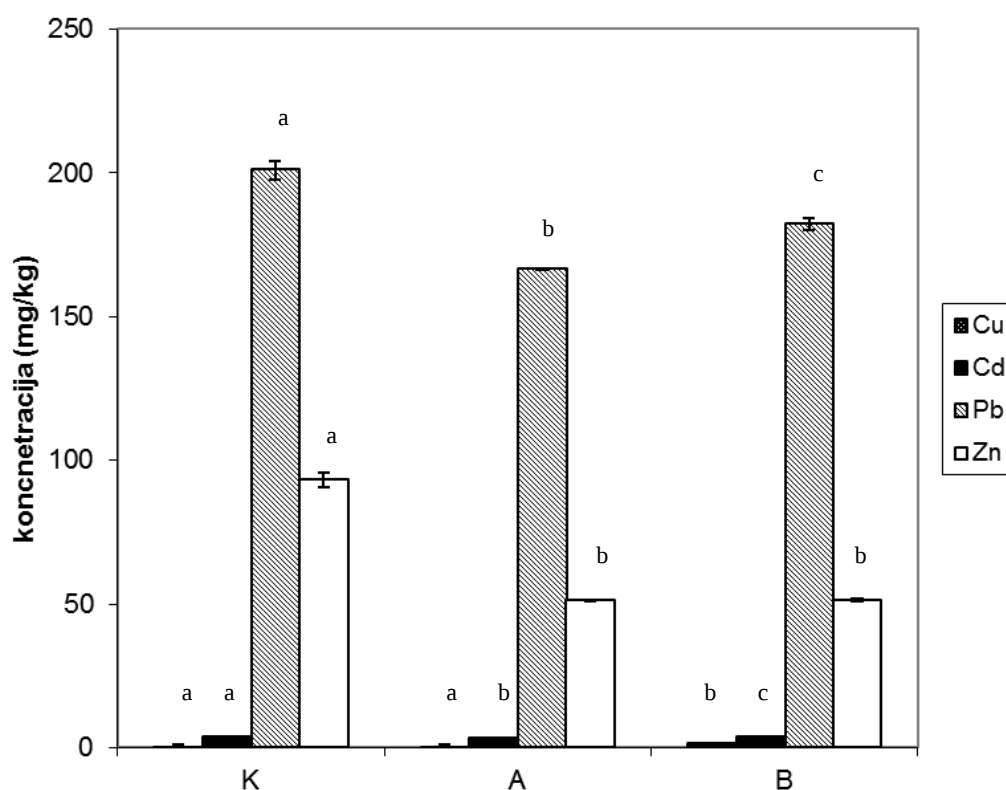
remediiranih z apnom (A) ter v tleh, remediiranih z gramoznim blatom in ostanki boksita (B) (Slika 16).

Biodosegljivosti Cd, Zn in Pb so bile največje v tleh K in so se statistično razlikovale od biodosegljivosti v A in B. Biodosegljivost Zn je bila v tleh K šestkrat večja kot v tleh A. V tleh A je bilo 36 % več Zn kot v tleh B, kar je posledica uporabe različnih imobilizatorjev pri remediiranju.

V tleh K je bilo biodosegljivega Cd 82 % več kot v tleh A in 52% več kot v tleh B.

V tleh K je bilo biodosegljivega Pb približno 50 % več kot v tleh A in B, medtem ko razlika med A in B ni bila statistično značilna.

V primerjavi s tlemi B je bila biodosegljivost Cu manjša v tleh K in A. Razlika v biodosegljivosti Cu med tlemi K in A ni bila statistično značilna.



Slika 17: Koncentracije Cu, Cd, Pb in Zn v tleh iz Podkloštra pri pH 5,0 določene po spiranju z deionizirano vodo, $Mg(NO_3)_2$ in amonoacetatom ($n=3$). Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B). Oznake za statistično značilne razlike (t-test, $P<0,05$) (a,b,c). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno deviacijo.

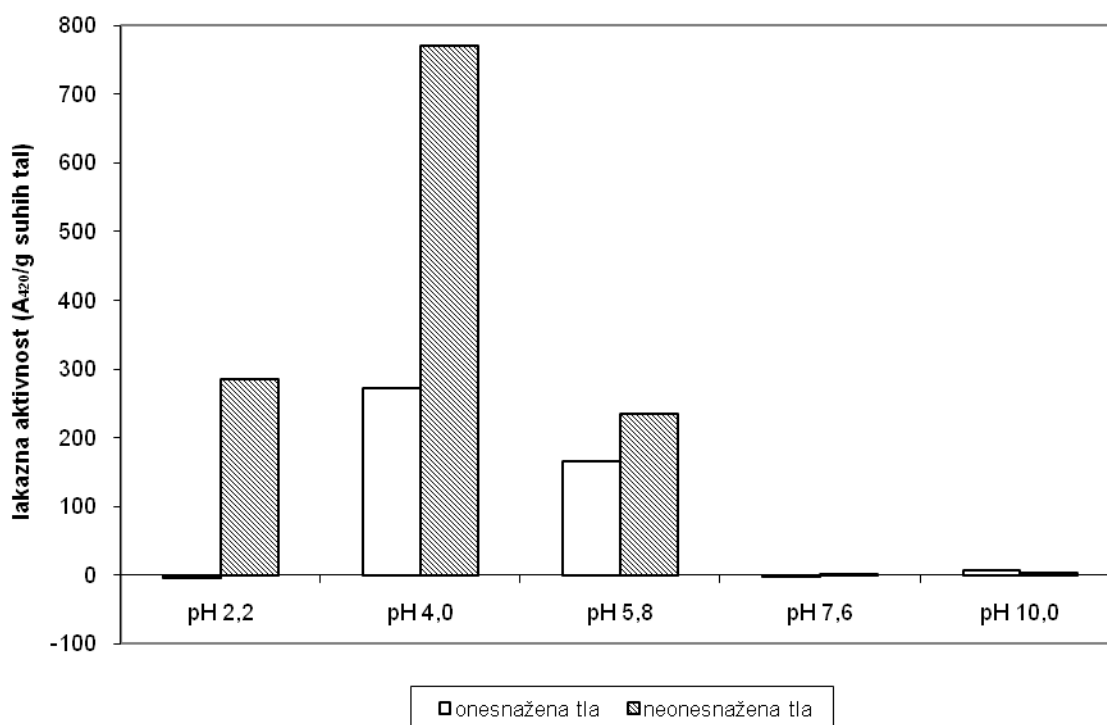
Koncentracije kovin v kislem so bile večje od biodosegljivosti kovin (Slika 17). Poleg tega so bile v kislem koncentracije vseh merjenih kovin v tleh K večje kot v tleh A oziroma B, razen za Cu. V kislem so se razlike v koncentraciji Zn med remediiranimi in kontrolnimi tlemi sicer nekoliko zmanjšale v primerjavi z biodostopno koncentracijo pri višjem pH, vendar so razlike za Zn ostale še vedno najvišje. Razlika v koncentraciji Zn med remediiranimi tlemi v primerjavi z razliko v biodostopnosti Zn ni statistično značilna, nasprotno pa je statistično značilna razlika v koncentraciji Pb. Z nižanjem pH so se razlike v koncentraciji kovin med tlemi zmanjšale. Tako so bile razlike v koncentraciji Cd, Zn in Pb med tlemi pri pH 5,0 manjše v primerjavi z razlikami biodosegljivega Cd, Zn in Pb. Pri pH nižjem od 2 (po spiranju s hidroksilamin hidrokloridom, ki povzroči zmanjšanje železovih in manganovih oksidov v topno obliko) so se koncentracije približno izenačile. Primerjava celokupnih koncentracij po spiranju z zlatotopko je pokazala, da med tlemi ni statistično značilne razlike (Preglednica 13). Sklepamo torej, da so razlike v vsebnosti kovin med tlemi pri pH 5,0 večje kot pri pH 4,0.

V tleh K je bila vsebnost Pb za 10 % večja kot v tleh B, vsebnost Cd pa za 8 %. Koncentracija Pb in Cd je bila v tleh A za približno 10 % manjša kot v tleh B.

4.2 ENCIMSKA AKTIVNOST V TLEH

4.2.1 Optimizacija metode merjenja lakazne aktivnosti v tleh

- Vpliv eksperimentalnega pH in substrata na lakazno aktivnost



Slika 18: Primerjava lakazne aktivnosti v onesnaženih in neonesnaženih tleh z Jesenic pri različnih pH za substrat ABTS v končni koncentraciji 0,010 M.

Vrednotenje lakazne (fenol oksidazne) aktivnosti v tleh pri različnih eksperimentalnih pH vrednostih je pokazalo, da je lakazna aktivnost večja v neonesnaženih kot v onesnaženih tleh. In sicer smo zaznali največje razlike pri pH 4,0, kjer je bila lakazna aktivnost v neonesnaženih tleh za 2,8-krat večja kot v onesnaženih tleh (Slika 18). Razlike smo zaznali pri vseh testiranih pH, razen pri pH 10, kjer verjetno substrat ABTS, ki deluje optimalno med pH 4,0 in pH 5,8, ni bil več primeren. Lakazna aktivnost avtoklaviranih tal je bila pri pH 2,2 in pH 7,6 negativna, verjetno zato, ker je bil vzorec avtoklaviranih tal intenzivneje obarvan (z večjo absorbanco) kot sveža tla.

Zaradi omejenega pH območja, v katerem je mogoče uporabiti substrat ABTS za določanje lakazne aktivnosti, smo za merjenje lakazne aktivnosti pri različnih pH uporabili tudi druge substrate v izbranih koncentracijah. Rezultati so podani v Preglednici 14.

Preglednica 14: Lakazna aktivnost (A/g suhih tal) v onesnaženih tleh z Jesenic, določena z različnimi substrati in pri različnih pH (n=1 in n=2 za test z ABTS).

Substrat	Koncentracija	pH 2,2	pH 4,0	pH 5,8	pH 7,6	pH 10,0
ABTS	0,011 M	-15 ± 5	199 ± 24	67 ± 26	3 ± 1	13
4M-CAT	0,130 M	1	4	9	9	22
DMP	0,110 M	0	0	3	41	99
L-DOPA	0,002 M	2	6	6	10	42
4M-CAT+PRO	0,107 M	-1	0	20	14	54
CAT+PRO	0,036 M	0	5	26	63	131

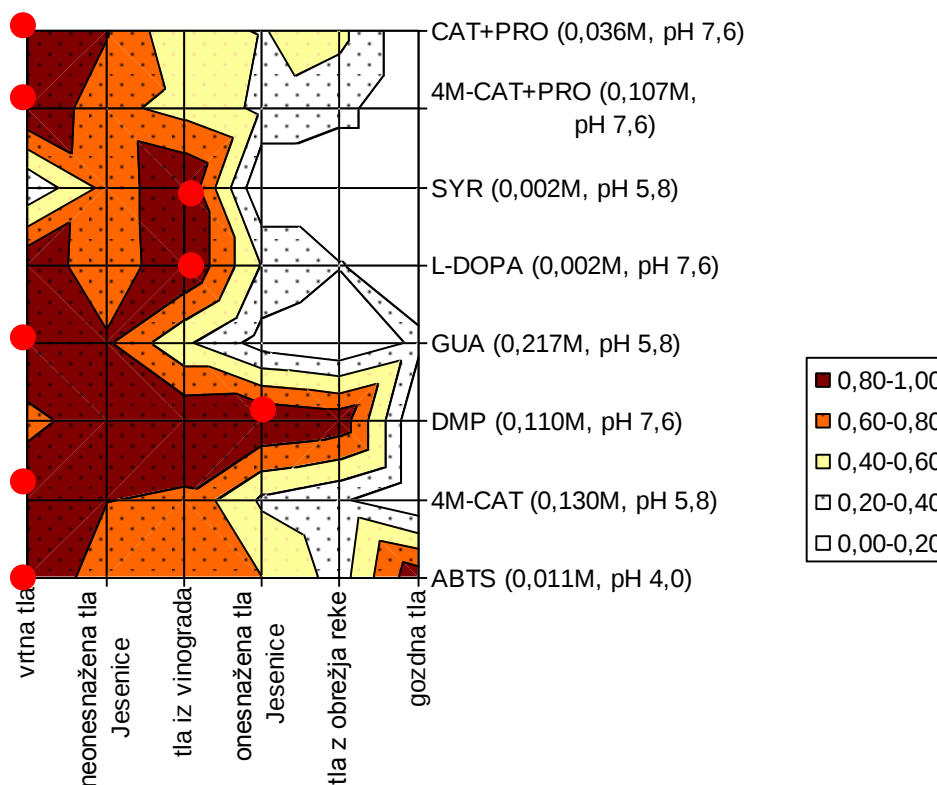
Največje vrednosti A/g suhih tal smo zaznali s substratom ABTS v končni koncentraciji 0,010 M pri pH 4,0 (n=2) (Preglednica 14). Ostali substrati so se najintenzivneje odzvali pri pH 10, kjer je bila lakazna aktivnost največja. Med slednjimi pa so bile največje lakazne aktivnosti izmerjene, če je bil vzorec izpostavljen substratu CAT+PRO.

– Vpliv tipa tal in substrata na lakazno aktivnost v tleh

Poleg vpliva izbranega substrata in pH na lakazno aktivnost v tleh smo preverili tudi vpliv tipa tal na aktivnost tega encima. Rezultati analiz so prikazani na Sliki 19. Ugotovili smo, da se lakazna aktivnost spreminja s tipom tal in da so imela vrtna tla največjo lakazno aktivnost izmed vseh tal in sicer 358 A₄₂₀/g suhih tal za substrat ABTS. Vrtna tla so imela največje lakazne aktivnosti tudi za substrate 4M-CAT, GUA in 4M-CAT+PRO in CAT+PRO, kar je na sliki prikazano z rdečo točko.

Največje lakazne aktivnosti v vseh tleh so bile določene s substratom ABTS, najmanjše pa s SYR in GUA (več kot 25-krat manjša lakazna aktivnost kot za substrat ABTS). Ker raztopine teh substratov zaradi slabe topnosti v vodi ni mogoče pripraviti v večji založni

koncentraciji, menimo, da SYR in GUA nista primerna substrata za testiranje lakazne aktivnosti v tleh.

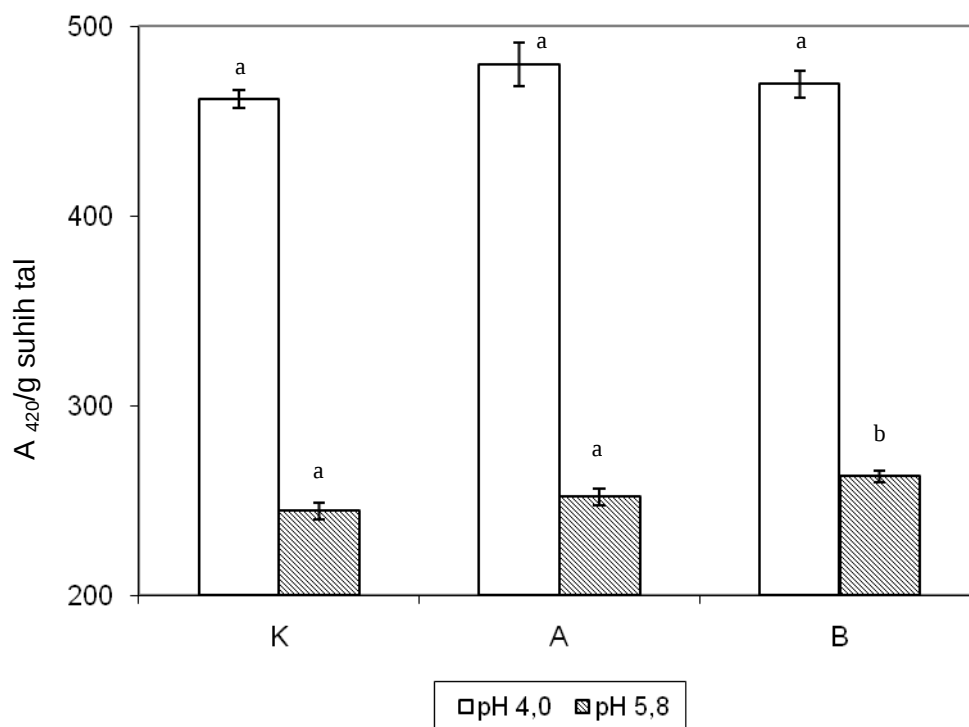


Slika 19: Lakazna aktivnost v šestih različnih vzorcih tal za različne substrate pri različnih pH. V oklepaju je navedena končna koncentracija substrata. Rdeča točka prikazuje največjo izmerjeno lakazno aktivnost za posamezen substrat. Prikazane so normirane vrednosti.

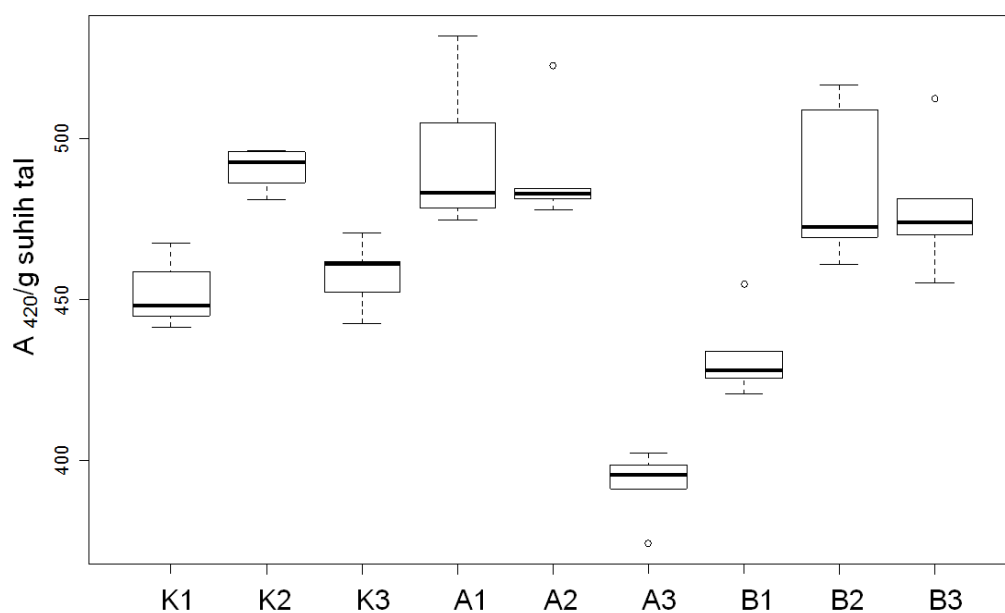
- Vpliv TK na lakazno aktivnost v tleh (primer tal iz Podkloštra)

V nadaljevanju smo preverjali lakazno aktivnost v kontrolnih in remediiranih tleh iz Podkloštra. Lakazna aktivnost (srednja vrednost) je bila večja v remediiranih kot v kontrolnih tleh. Lakazna aktivnost v tleh K in B je bila pri pH 5,8 statistično različna s p-vrednostjo 0,00009, pri čemer je bila srednja vrednost lakazne aktivnosti za K 242 A_{420} /g suhih tal, za B pa 259 A_{420} /g suhih tal (Slika 20). Razlike so bile najbolj opazne pri pH 5,8, kjer bila razpršenost izmerjenih aktivnosti med poljskimi paralelkami tal K, A in B manjša (Slika 22) kot pri pH 4,0 (Slika 21). Rezultati meritev lakazne aktivnosti so navedeni v Prilogi A. Velike variabilnosti meritev zabišejo morda prisotne razlike med kontrolnimi in remediiranimi tlemi.

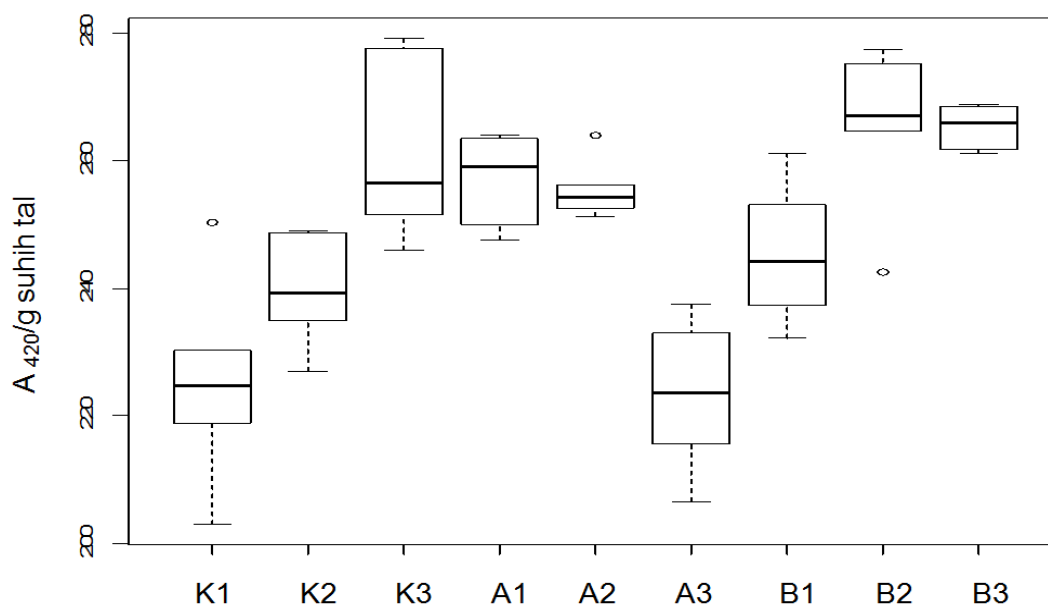
Srednje vrednosti so bile pri pH 5,8 manjše kot pri pH 4,0, vendar je trend ostajal podoben. Nasprotno pa se lakazna aktivnost v K in B pri pH 4,0 ni statistično razlikovala (p-vrednost je 0,69). Prav tako se lakazna aktivnost v K in A pri obeh pH statistično ni razlikovala (pri pH 4,0 je p-vrednost 0,46, pri pH 5,8 pa 0,67).



Slika 20: Primerjava lakazne aktivnosti pri pH 4,0 in pH 5,8 v tleh iz Podkloštra (n=18). Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B). Oznaki za statistično značilne razlike (t-test, $P < 0,05$) (a,b). Prikazane so srednje vrednosti s standardnimi napakami.

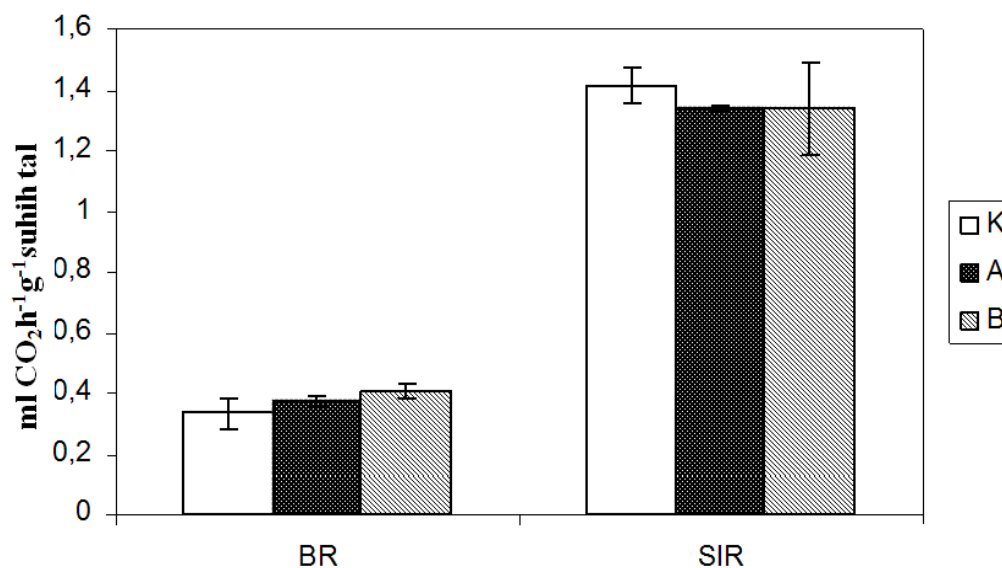


Slika 21: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti pri pH 4,0 v tleh iz Podkloštra (n=6). Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3). Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce vrednosti lakazne aktivnosti.



Slika 22: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti pri pH 5,8 v tleh iz Podkloštra (n=6). Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3). Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce vrednosti lakazne aktivnosti.

4.2.2 Bazalna respiracija in s substratom inducirana respiracija



Slika 23: Primerjava bazalne respiracije in s substratom inducirane respiracije v tleh iz Podkloštra pri 70 % WHC. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno deviacijo ($n=5$ pri bazalni respiraciji (BR); $n=6$ za K in B (vsaka poljska paralelka v tehnični ponovitvi) in $n=5$ za A pri s substratno inducirani respiraciji (SIR)).

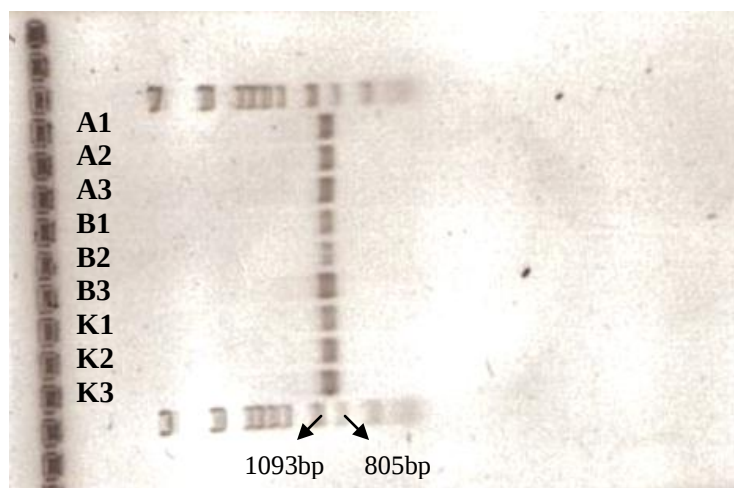
Med kontrolnimi (onesnaženimi) in remediiranimi tlemi ni statistično značilnih razlik v bazalni respiraciji, ki je mera za mikrobovno aktivnost, kar prikazuje Slika 23 s srednjimi vrednostmi in standardnimi napakami. Med kontrolnimi in remediiranimi tlemi A je p -vrednost 0,35, med kontrolnimi in remediiranimi tlemi B pa 0,22.

Prav tako med tlemi ni razlik v mikrobnih biomasi, ki smo jo merili s substratno inducirano respiracijo (Slika 23). Med kontrolnimi in remediiranimi tlemi B je p -vrednost 0,23.

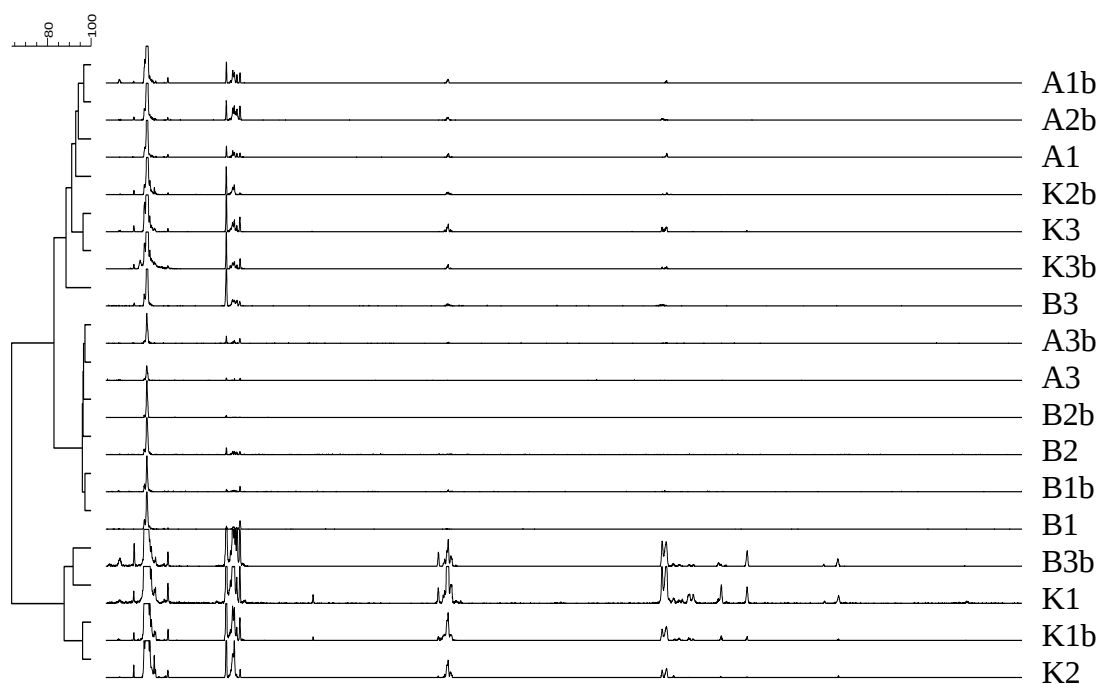
4.3 STRUKTURA BAKTERIJSKE IN GLIVNE ZDRUŽBE

Čistost izolirane celokupne DNA smo preverili z merjenjem optične gostote oz. absorbance. Čista DNA ima vrednost razmerja med absorbcijo pri 260 nm in 280 nm (A_{260}/A_{280}) med 1,7 in 2,0. Rezultati v Prilogi B kažejo, da vzorci vsebujejo primesi, ki absorbirajo pri 280 nm (RNA in aromatske aminokisline v beljakovinah). Koncentracije celokupne izolirane DNA iz tal so bile od 10,69 ng/ μ l do 24,58 ng/ μ l.

Slika 24 prikazuje velikost čistega PCR produkta 16S rDNA.

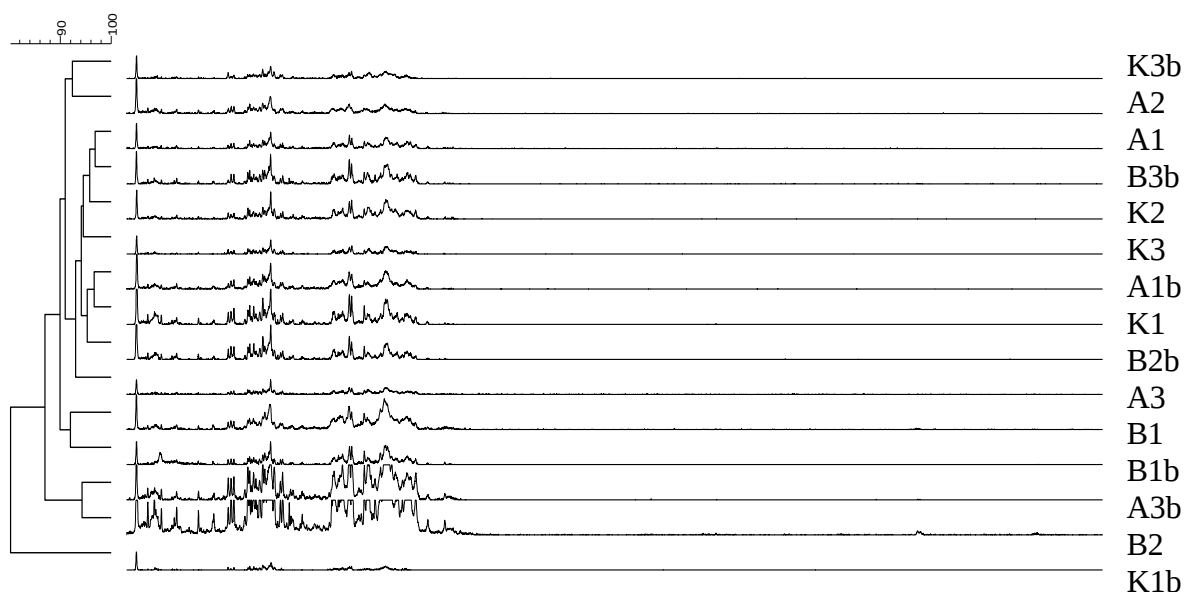


Slika 24: Elektroforeza v agaroznem gelu produktov PCR 16S rDNA. Velikost čistega PCR produkta za 16S rDNA je pričakovanih 900 bp.



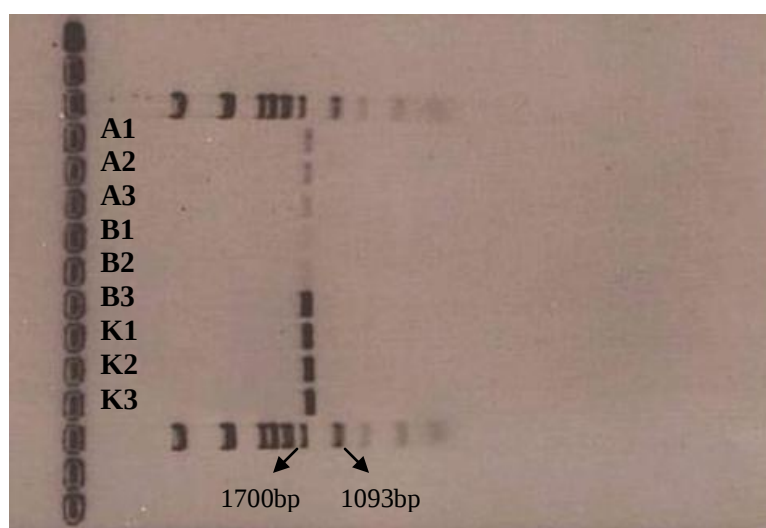
Slika 25: Podobnost profilov T-RFLP PCR produktov gena za 16S rDNA, rezanih s HaeIII. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev vzorca (b).

Razporeditev vzorcev na dendrogramu (Slika 25) kaže, da variabilnost v strukturi bakterijske združbe med tlemi z različno biodosegljivostjo kovin ni bila večja od variabilnosti med poljskimi paralelkami in od variabilnosti tehničnih ponovitev (B3 in B3b). Na dendrogramu je za K2 in K2b prikazan najnižji delež podobnosti med tehničnima ponovitvama. Čeprav imata podoben vzorec vrhov, sta zaradi različne intenzitete fluorescence terminalnih restikcijskih fragmentov (T-RF) razporejena v različni skupini. Restrikcija s HaeIII ni uspela za vzorec A2.



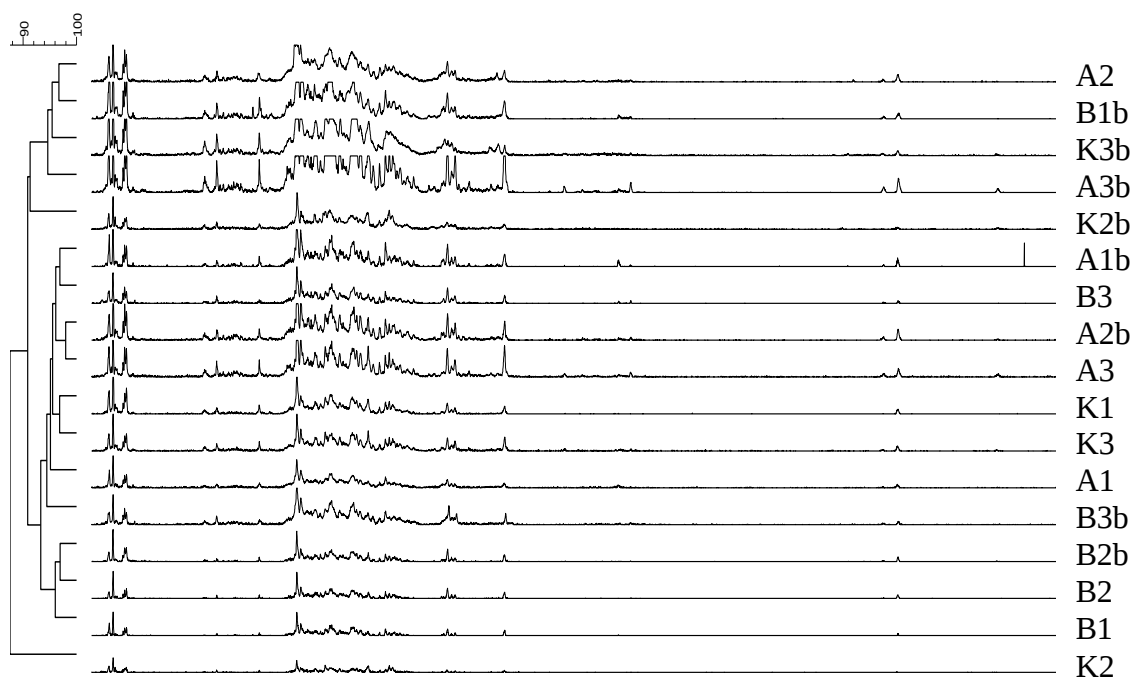
Slika 26: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 16S rDNA, rezanih z AluI. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev vzorca (b).

Dendrogram vzorcev 16S rDNA, rezanih z AluI zopet pokaže, da variabilnost v strukturi mikrobne združbe med vzorci različnih tal ni bila večja od variabilnosti med poljskimi paralelkami in med tehničnimi ponovitvami (K1 in K1b) (Slika 26). Restrikcija z AluI ni uspela za vzorce A2b, B3, K2b in K2, vendar je trend stabilne združbe viden. Menimo, da je dendrogram vzorcev, rezanih z AluI, bolj informativen kot dendrogram vzorcev, rezanih s HaeIII, saj je z restrikcijo nastalo več T-RF pikov.



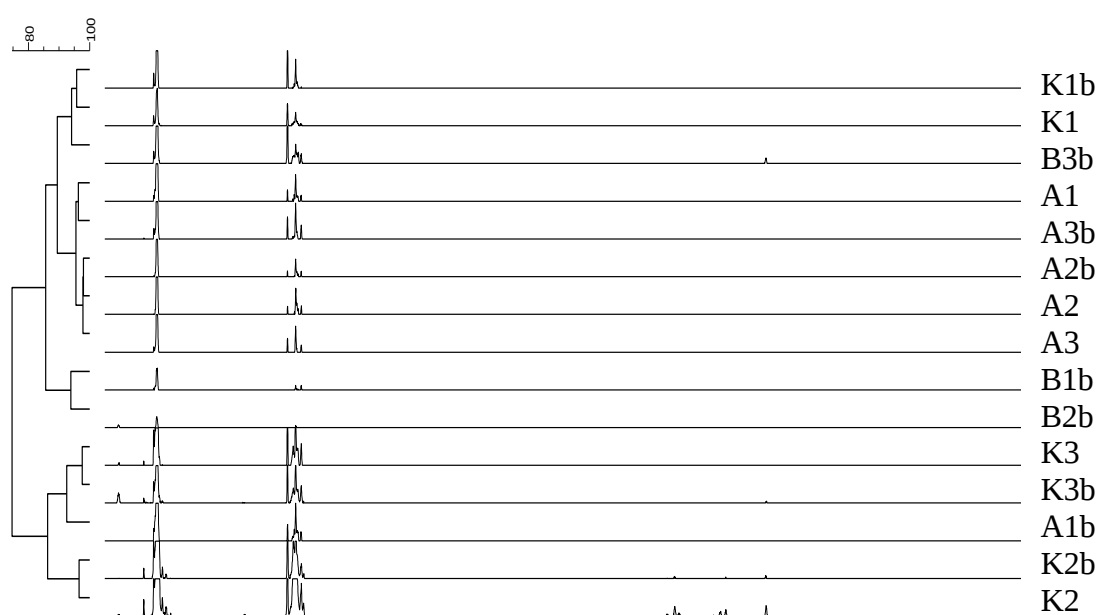
Slika 27: Velikost čistih PCR produktov 18S rDNA. Velikost pričakovanega produkta je 1,4 kb.

S PCR smo pridobili tudi produkte gena 18S rDNA velikosti 1,4 kbp in specifičnega za glive (Slika 27). Učinkovitost pomnoževanja ni bila za vse vzorce enaka, kar se kaže v razliki intenzitete lis.



Slika 28: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 18S rDNA, rezanih s HaeIII. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev vzorca (b). Iz analize smo izključili neuspeli vzorec K1b.

Dendrogram na Sliki 28 kaže na veliko podobnost T-RFLP profilov gena za 18S rRNA gliv med vzorci tal. Profili TRLP so si bili vsaj 88 % podobni in med njimi ni bilo značilnega združevanja v gruče v odvisnosti od tipa vzorca. Čeprav so bili profili med sabo zelo podobni, opazimo razliko v višini pikov, kar je verjetno posledica neenakomernega nanosa DNA na sekvenator. Iz analize smo izločili neuspeli vzorec K1b.



Slika 29: Podobnost T-RFLP profilov PCR produktov gena za 18S rDNA, rezanih z MspI. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev vzorca (b).

Z restrikcijo z MspI je nastalo manj T-RFjev kot pri rezanju s HaeIII (Slika 29). Vzorci B1, B2 in B3 niso uspeli zaradi prenizke koncentracije nanosenega produkta PCR. Čeprav se oblikujeta dve skupini podobnosti pri 78 % mejni vrednosti, ni značilnega povezovanja vzorcev glede na tip tal, zato ni mogoče zaključiti, da je remediacija tal povzročila značilne spremembe v strukturi združbe ne glede na uporabljen restrikcijski encim.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 LAKAZNA AKTIVNOST V TLEH IZ PODKLOŠTRA

Lakazna aktivnost v tleh iz Podkloštra je manjša v kontrolnih (onesnaženih) kot v remediiranih tleh. Razlika v aktivnosti je odvisna od pH in od biodosegljivosti kovin v tleh oziroma od učinkovitosti imobilizacije kovin.

Statistično značilno razliko v lakazni aktivnosti smo ugotovili pri pH 5,8 (p-vrednost je 0,00009). V kontrolnih (onesnaženih) tleh K je lakazna aktivnost manjša kot v remediiranih tleh B. Biodosegljive kovine verjetno zmanjšajo lakazno aktivnost. V tleh K je bila biodosegljivost kovin večja kot v B. Biodosegljivosti Zn, Pb in Cd so se statistično razlikovale med tlemi K in B. Najbolj opazna je bila razlika v biodosegljivosti Zn, ki je bila v tleh K osemkrat večja kot v B. Floch in sod. (2009) so po dodatku Cd (II) opazili večjo inhibicijo fenol oksidaz kot po dodatku Pb (II), medtem ko z Zn (II) inhibicije niso opazili.

Med tlemi A in K ni bilo tako očitnih razlik v lakazni aktivnosti kot med B in K zaradi manjše razlike v biodostopnosti kovin, kar kaže, da je imobilizacija kovin z gramoznim blatom in ostanki boksita bolj učinkovita kot z apnom, kot ugotavljajo tudi Friesl-Hanl in sod. (2009).

Razlike v lakazni aktivnosti so bile pri pH 4,0 manjše kot pri pH 5,8. Neenaka učinkovitost imobilizacije v poljskih paralelkah in majhne razlike v koncentraciji kovin med tlemi zabrišejo razlike v lakazni aktivnosti. Variabilnost lakazne aktivnosti med poljskimi paralelkami je velika, čeprav smo vsako poljsko paralelko pripravili s homogenizacijo tal treh pravih ponovitev (vrtin) na tej paralelki. Sklepamo, da so rezultati posledica heterogene remediacije poljskih paralelek. Lakazno aktivnost, ki smo jih izmerili v poljski paralelki bi bilo zato smiselno primerjati z biodosegljivostjo kovin v teh tleh in ne v homogeniziranih tleh dveh poljskih paralelek.

Pri pH 5,0 so v raztopini poleg biodosegljive frakcije kovin tudi iz karbonatov sproščeni ioni kovin, pri pH 2,0 pa še kovine iz železovih in manganovih oksidov (Leštan in sod., 2003). Rezultati kažejo, da so bile razlike v koncentraciji kovin pri pH 5,0 med tlemi manjše kot razlike v biodosegljivosti. Lakazne aktivnosti pri pH 4,0 smo primerjali s koncentracijo kovin pri pH 5,0 in ugotovili, da so aktivnosti večje v tleh z manjšo koncentracijo kovin. V tleh A je bila tako zaradi manjše koncentracije Pb in Cd lakazna aktivnost večja kot v tleh B, kar je obratno kot pri pH 5,8, vendar razlika s tlemi K ni bila statistično značilna (p-vrednost je 0,46).

Koncentracije kovin pri pH 4,0 so bile večje kot pri pH 5,8. Kljub temu izmerjene lakazne aktivnosti pri pH 4,0 niso bile manjše kot pri pH 5,8. Fabbrini in sod. (2002) navajajo, da je koncentracija ABTS²⁺ večja pri nižjih pH, kar pomeni, da bi bile lahko večje aktivnosti pri nizkem pH posledica boljše aktivacije substrata in niso povezane s koncentracijo kovin v tleh. To tudi pomeni, da meritev pri različnih pH ni mogoče med sabo neposredno primerjati. Primerjava trenda lakazne aktivnosti pa pokaže, da je tudi pri pH 4,0 srednja vrednost remediiranih tal večja kot v kontrolnih.

5.2 MIKROBNA AKTIVNOST IN BIOMASA V TLEH IZ PODKLOŠTRA

Med kontrolnimi (onesnaženimi) in remediiranimi tlemi ni bilo razlik v mikrobnih aktivnostih in tudi ne v mikrobnih biomasah.

Rezultati bazalne respiracije so bili v vseh vzorcih tal podobni. Verjetno bi bile razlike prisotne v primeru večjih razlik v biodosegljivosti kovin med tlemi. Frey in sod. (2006), ki so primerjali bazalno respiracijo v kontrolnih tleh in v tleh s prašnim filtrom iz talilnice kovin, so štiri leta zapored pokazali, da je razlika v bazalni respiraciji v onesnaženih in neonesnaženih tleh statistično značilna.

Mikrobna biomasa se med tlemi ni razlikovala. Količina producirane CO₂ na gram suhih tal je bila v vseh vzorcih podobna. Nasprotno so Frey in sod. (2006) opazili, da je biomasnega ogljika 40 % več v neonesnaženih kot v onesnaženih tleh. Razlike v

biodosegljivosti Pb in Zn so bile v omenjeni študiji mnogo večje kot v naši raziskavi (tudi do 177- kratne).

Dehidrogenazna aktivnost v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh iz Podkloštra ni bila signifikantno različna. Zmanjšano dehidrogenazno aktivnost oziroma skupno mikrobno aktivnost je pričakovati v tleh s kratkotrajno izpostavitvijo visokim koncentracijam TK (po zalivanju s solmi TK) in ne v dolgotrajno onesnaženih tleh iz Podkloštra, kjer je možno, da so se mikroorganizmi prilagodili. Sardar in sod. (2007) poročajo, da se je s povečanjem koncentracij TK encimska aktivnost zmanjšala, in sicer je bila dehidrogenazna aktivnost signifikantno različna v času 12 tednov inkubacije tal z dodanima Cd in Pb. Ker je bila celokupna koncentracija slednjega 500 mg/kg, biodosegljivost pa ni bila določena, raziskave ne moremo primerjati z našimi rezultati.

5.3 BAKTERIJSKA IN GLIVNA ZDRUŽBA V TLEH IZ PODKLOŠTRA

Na podlagi rezultatov T-RFLP analize sklepamo, da med vzorci kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tal ni razlik v strukturi bakterijske in glivne združbe.

Variabilnost v strukturi bakterijske združbe med kontrolnimi (onesnaženimi) in remediiranimi tlemi ni večja od variabilnosti med poljskimi paralelkami in od variabilnosti tehničnih ponovitev.

Študije sprememb v mikrobni združbi zaradi TK so z različnimi molekularnimi tehnikami določili mnogi avtorji (Frey in sod., 2006; Lazzaro in sod., 2006; Perez-de- Mora in sod., 2006; Renella in sod., 2005; Turpeinen in sod., 2004), med njimi Sardar in sod. (2007), ki so v času 12 tednov po dodatku Cd z metodo DGGE dokazali spremembo v strukturi mikrobne združbe v onesnaženih tleh v primerjavi z neonesnaženimi. Giller in sod. (2009) navajajo, da je odgovor mikrobov po kratkotrajni izpostavitvi kovinam nenapovedljiv in je malo podoben odgovoru po dolgotrajni izpostavitvi. Rezultati študij o strupenosti kovin za talne mikroorganizme se med seboj razlikujejo zaradi različne biodostopnosti TK.

Kovine v tleh so pogosto prisotne v ionski obliki in tako reagirajo z negativno nabitimi tlemi. Dodatek apna in rdečega blata povzroči zvišanje pH in sorpcijo kovin na različno nabite koloide, kot so organska snov, železovi ali aluminijevi oksidi. Razlikovanje med vplivom kovin in zvišanjem pH pa ni enostavno, ker imata oba vpliva podobne učinke na strukturo talne mikrobne združbe. Dodatek apna po šestih mesecih negativno vpliva na število prostoživečih fiksatorjev dušika (zmanjšanje nastanka amonija, biodostopne oblika dušika). Remediacija z rdečim blatom pa vpliva na upad števila heterotrofnih gliv in premik mikrobne združbe iz Gram pozitivne v Gram negativno (pH razlika med tlemi je približno 3 enote) (Garau in sod., 2007).

Z analizo T-RFLP v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh nismo določili razlik v bakterijski in glivni združbi. Talni mikrobi imajo obsežno fiziološko prilagodljivost in izkažejo svojo aktivnost tako, da naredijo nujne kovine dostopne in v primerni koncentraciji ter odstranijo ali razstrupijo škodljive oblike kovin. Geni za rezistenco na TK so pogosto prisotni na plazmidih in se lahko širijo v populaciji in združbi kot odgovor na selekcijski pritisk, povezan z izpostavljenostjo TK (Kamal, 2010).

Rezistenca tal je zmogljivost talne združbe, da prenese stres (Nannipieri in sod. 2003) oziroma sposobnost tal, da kljub spremembam zaradi stresa ohrani funkcijo. Četudi bi se mikrobna združba spremenila, ni nujno, da premik v strukturi spremeni funkcijo ekosistema. Za to obstajata dva razloga: nova združba lahko vsebuje taksone, ki so funkcionalno drugačni od izhodnih in delujejo različno, vendar v mešani združbi omogočajo enako delovanje ekosistema kot pred onesnaženjem (Hinojosa, 2010).

Toumela in sod. (2005) poročajo, da se na onesnaženih območjih mikrobna združba prevesi v prid glivam, česar na tleh iz Podkloštra nismo preverili.

Mikrobna združba lahko z regulacijami zaobide motnje v okolju. Spremembe zaradi motnje se hitreje kot v spremembi mikrobne združbe pokažejo kot razlike v aktivnosti talnih encimov. Prvi odgovor na motnjo se pričakuje na nivoju z najmanj stopnjami regulacije, to je na nivoju encimske aktivnosti. Poleg tega je prednost aktivnosti talnih encimov kot biosenzorjev v primerjavi s spremljanjem sprememb v strukturi mikrobne združbe tudi hitrejša, bolj enostavna in cenejša merjenje.

5.4 UPORABA TESTA LAKAZNE AKTIVNOSTI ZA OKOLJSKE VZORCE

Test za merjenje lakazne aktivnosti v tleh v mikrotitrskih ploščah je potrebno optimizirati glede na tip tal, izbrani substrat in pH. Pri študiju vpliva TK na lakazno aktivnost je bilo ugotovljeno, da je pomembna tudi izbira primernih kontrolnih tal.

Za določanje vpliva kovin na lakazno aktivnost v onesnaženih tleh je potrebno imeti primerljiva neonesnažena tla. Kontrolna (onesnažena) in remediirana tla iz Podkloštra imajo podobne pedološke lastnosti, razlikujejo se le v vsebnosti kovin in lakazni aktivnosti. Rezultati aktivnosti na tleh z Jesenic kažejo v isto smer, vendar v teh tleh sprememb v aktivnosti ne moremo pripisati zgolj vplivu kovin. Podobno so za preučevanje vpliva TK pripravili remediirana tla Perez-de-Mora in sod. (2006) (z organskimi dodatki po 18 mesecih) in Garau in sod. (2007) (z rdečim blatom, zeolitom in apnom po šestih mesecih).

Rezultati lakazne aktivnosti na šestih različnih tipih tal kažejo, da je vrednost aktivnosti odvisna od tipa tal in od izbranega substrata. Substrati, s katerimi smo merili lakazno aktivnost v različnih tipih tal se sicer uporabljajo za merjenje aktivnosti čistih lakaz (Solano in sod., 2001; Johannes in Majcherczyk, 2000).

V tej raziskavi smo za merjenje aktivnosti izbrali substrat ABTS, ki so ga v kompleksnem vzorcu tal uporabili tudi Floch in sod. (2007). Z ABTS lahko hitro in enostavno določimo encimsko aktivnost v tleh (Floch in sod., 2009). Rezultati encimskih testov, v katerih se uporabljajo topni substrati, morda ne predstavljajo ustrezne aktivnosti encimov, ki razgrajujejo večje kompleksne netopne polimere v topne oligomere in monomere (Wallenstein in Weintraub, 2008). To pa očitno ne predstavlja omejitve za merjenje fenol oksidazne aktivnosti v tleh, saj so Floch in sod. (2009) naredili test v kratkotrajno onesnaženih tleh s topnim substratom.

Substrati DMP in L-DOPA ter SYR in GUA niso primerni substrati za merjenje lakazne aktivnosti v okoljskih vzorcih. Substrati morajo biti v naravnih vzorcih v prebitku in dostopni za stabilizirane encime, ki so v kompleksu z organsko snovjo, tanini in glino

(Wallenstein in Weintraub, 2008). Navedeni substrati so v vodi slabo topni, topnost DMP in L-DOPA pa smo povečali tako, da smo ju raztopili v etanolu in nato redčili z vodo. Odziv lakazne aktivnosti na povečanje koncentracije substrata ni bil linearen (rezultati niso prikazani), verjetno zaradi nastanka netopnih produktov (Betts in King, 1991), ki smo jih po centrifugiranju odstranili skupaj s talnimi delci in aktivnost tako podcenili.

Na vrednost lakazne aktivnosti poleg izbire substrata vpliva tudi pH. Za merjenje lakazne aktivnosti s substratom ABTS sta najbolj primerna pH 4,0 in pH 5,8, pri katerem smo izmerili največje aktivnosti. Podobno priporočajo merjenje aktivnosti pri pH 5,7 tudi Criquet in sod. (1999). Pri pH 4,0 je bila aktivnost večja zaradi večje koncentracije ABTS^{2+} pri nižjih pH (Fabbrini in sod., 2002). Menimo, da je aktivnost najbolj smiselno meriti pri pH 5,8, ki je v pH območju vzorčenih tal.

Razlike v lakazni aktivnosti med tlemi iz Podkloštra bi bile verjetno še bolj izrazite ob upoštevanju sezone vzorčenja in biodosegljivosti kovin v posamezni poljski paralelki. Vpliv kovin na encimsko aktivnost je odvisen od sezonskih nihanj, večji kot jeseni je v pomladnih in poletnih mesecih (Karaca in sod., 2010). Poleg tega bi lahko s kvantifikacijo lakaznih genov v tleh dodatno raziskali vpliv kovin na lakazno aktivnost.

5.5 SKLEPI

Na podlagi raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Tip tal in tudi substrat, ki ga uporabimo pri testu, vplivata na izmerjeno lakazno aktivnost.
- Za merjenje lakazne aktivnosti v kompleksnem vzorcu tal v mikrotitrski plošči je najbolj primeren substrat ABTS.
- Razliko v lakazni aktivnosti smo določili tudi med tlemi z Jesenic. Lakazna aktivnost v onesnaženih tleh je bila manjša kot v neonesnaženih.
- Lakazna aktivnost v kontrolnih (onesnaženih) tleh K iz Podkloštra, izmerjena pri pH 5,8, je signifikantno nižja kot v tleh B, remediiranih z gramoznim blatom (p-vrednost je 0,00009). Pri pH 4,0 razlike v lakazni aktivnosti med remediiranimi in kontrolnimi tlemi iz Podkloštra niso statistično značilne (p-vrednosti sta 0,46 za tla A, remediirana z apnom in 0,69 za tla B, remediirana z gramoznim blatom).
- Razlika v koncentraciji kovin med tlemi je pri pH 4,0 manjša kot pri pH 5,8.
- Mikrobne aktivnosti, mikrobne biomase in strukture združb bakterij in gliv niso bile različne v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh.
- Na podlagi zgornjih treh ugotovitev lahko zaključimo, da razlike v lakazni aktivnosti v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh niso posledica razlik v mikrobni aktivnosti, mikrobni biomasi, bakterijski ali glivni združbi.
- Test lakazne aktivnosti se zaradi odziva na biodosegljivost kovin v tleh lahko razvije v smer biomonitoringa tal.

6 POVZETEK

TK so eden izmed glavnih onesnažil tal. Velik doprinos k onesnaženju je posledica antropogene dejavnosti. Pogoste kovine v tleh so Zn, Pb in Cd. Strupenost teh kovin za živ sistem je vedno povezana s koncentracijo kovin, dostopno celicam. Mikroorganizmi se zaradi tesne povezanosti z okolico hitro odzivajo na motnje, tudi na povečano prisotnost kovin. Spremembe indikatorjev, ki temeljijo na mikrobni strukturi in funkciji, so lahko celo prej zaznane kot spremembe v fizikalnih in kemijskih lastnostih tal, ki so zgodnji pokazatelji izboljšanja ali degradacije tal.

Aktivnosti talnih encimov so primerni indikatorji kvalitete tal zaradi povezanosti s talno biologijo, enostavnosti merjenja aktivnosti in hitrega odziva encimov na motnje ali stres. Kovine lahko vplivajo na talne encime preko inhibicije aktivnosti ali biosinteze encima.

Študije vpliva TK na encimsko aktivnost so bile narejene na čistih encimih in na okoljskih vzorcih po dodatku TK. Tla so navadno onesnažili (zalivali) s solmi kovin kot viri kovin, kar pa ne predstavlja pogojev kot so v naravi. Rezultatov v takih tleh ni mogoče primerjati z neonesnaženimi tlemi, saj se kovine v naravi akumulirajo v manj dostopnih kemijskih oblikah. Zato smo v diplomski nalogi vpliv kovin določali na neremediiranih (kontrolnih) in remediiranih tleh. To pomeni, da je bila tekom remediacije na poskusnem polju v remediiranih tleh spremenjena le biodostopnost kovin v primerjavi s kontrolnimi. Menimo, da je tak pristop ugotavljanja vpliva kovin na lakazno aktivnost primernejši kot v kratkotrajno onesnaženih tleh z veliko biodosegljivostjo kovin.

Kot biosenzor za kovine je bila predlagana uporaba fenol oksidazne aktivnosti. Verjetno največja skupina fenol oksidaz v tleh so lakaze. Zaradi možnosti uporabe v industriji in za zaščito okolja pridobivajo na pomenu. Imajo širok obseg substratov. Za merjenje lakazne aktivnosti se uporabljajo substrati ABTS, 4-M CAT, DMP, L-DOPA, 4-M CAT+PRO, CAT+PRO, SYR in GUA. Nekateri substrati so manj primerni za merjenje aktivnosti v tleh zaradi kemijske oksidacije s talnimi delci, omejene topnosti ali nastanka netopnih produktov. Za študij vpliva kovin na fenol oksidazno aktivnost v tleh se uporablja substrat

ABTS, ki se oksidira v obstojen radikal, katerega koncentracijo lahko spremljamo kolorimetrično.

V diplomski nalogi nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo TK na lakazno aktivnost. S substratom ABTS smo določili statistično značilno razliko v lakazni aktivnosti v tleh iz Podkloštra z različno biodosegljivostjo kovin. Podoben trend so pokazali tudi rezultati na onesnaženih in neonesnaženih tleh iz Jesenic. Ugotovili smo, da je vrednost lakazne aktivnosti odvisna od tipa tal in izbire substrata. Največje aktivnosti smo izmerili s substratom ABTS pri pH 4,0 in pH 5,8. Primerjava lakazne aktivnosti med kontrolnimi (onesnaženimi) tlemi K in remediiranimi tlemi B pri pH 5,8 je pokazala, da je lakazna aktivnost večja v remediiranih kot v kontrolnih tleh. Biodosegljivost kovin, posebej Zn, je v remediiranih tleh manjša kot v kontrolnih (onesnaženih) tleh.

Razlika v lakazni aktivnosti ni nujno posledica vpliva TK. Zato smo preverili, ali se tla razlikujejo v mikrobni biomasi, mikrobni aktivnosti in v strukturi bakterijske in glivne združbe. Spremljanje dinamike mikrobne združbe je ključno za spremljanje delovanja združbe. Konzorcij mikrobov ima sposobnost, da se prilagodi okoljskim omejitvam. Bakterije so namreč razvile učinkovite sisteme za razstrupljanje škodljivih oblik TK, gene za specifično odpornost na različne ione kovine imajo tudi na plazmidih.

Mikrobno aktivnost v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh iz Podkloštra smo določili z bazalno respiracijo. Rezultati kažejo, da med tlemi ni razlik v mikrobni aktivnosti, kot tudi ne v mikrobni biomasi, določeni s substratno inducirano respiracijo. Razlike v strukturi mikrobne združbe v kontrolnih (onesnaženih) in remediiranih tleh smo določili s T-RFLP analizo bakterijske in glivne združbe. Variabilnost bakterijske oziroma glivne združbe v tleh ni večja od variabilnosti med poljskimi paralelkami.

Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da so razlike v lakazni aktivnosti med kontrolnimi (onesnaženimi) in remediiranimi tlemi posledica različne biodostopnosti kovin v tleh, saj med tlemi ni razlik v mikrobni aktivnosti, določeni z bazalno respiracijo, mikrobni biomasi, določeni s substratno inducirano respiracijo ali v strukturi mikrobne združbe, določeni s T-RFLP analizo. Rezultati ne nasprotujejo hipotezi, da povečana biodosegljivost TK zmanjša lakazno aktivnost v tleh. Zato menimo, da se lahko test lakazne aktivnosti razvije v smeri ugotavljanja biodosegljivosti kovin v tleh.

7 VIRI

- Adriano D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. New York, Springer: 535 str.
- Anderson T.H., Domisch K.H. 1985. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils*, 1: 81-89.
- Appenroth K.J. 2010. Definition of "heavy metals" and their role in biological systems. V: *Soil heavy metals*. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 19-29.
- Arora D.S., Sharma R.K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 1760-1788.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215-242.
- Betts W. B., King J.E. 1991. Oxidative coupling of 2,6-dimethoxyphenol by fungi and bacteria. *Mycological Research*, 95, 5: 526-530.
- Bourbonnais R., Leech D., Paice M. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1379: 381-390.
- Bruins M.R, Kapil S., Oehme F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 198-207.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179: 145-150.

- Claus H. 2010. Copper-containing oxidases: Occurrence in soil microorganisms, properties, and applications. V: Soil heavy metals. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 281-313.
- Criquet S., Tagger S., Vogt G., Iacazio G., Le Petit J. 1999. Laccase activity of forest litter. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1239-1244.
- DeSouza-Ticlo D. 2008. The lignin-degrading enzyme, laccase from marine fungi: Biochemical and molecular approaches. PhD Thesis. Goa, Goa University: 33 str.
- Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 919-927.
- Duffus J.H. 2002. Heavy metals—a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*. 74: 793–807.
- Fabbrini M., Galli C., Gentili P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16: 231–240.
- Finžgar N., Leštan D. 2006. Heap leaching of Pb and Zn contaminated soil using ozone/UV treatment of EDTA extractants. *Chemosphere*, 63: 1736-1743.
- Floch C., Alarcon-Gutierrez E., Criquet S. 2007. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 319-324.
- Floch C., Alarcon-Gutierrez E., Criquet S. 2009. Metal effect on phenol oxidase activities of soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 108-114.
- Frey B., Stemmer M., Widmer F., Luster J., Sperisen C. 2006. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1745-1756.

- Friesl-Hanl W., Platzer K., Horak O. 2009. Immobilising of Cd, Pb, and Zn contaminated arable soils close to a former Pb/Zn smelter: a field study in Austria over 5 years. *Environmental Geochemistry and Health*, 31: 581-594.
- Gadd G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122: 109-119.
- Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P., Melis P. 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 142: 47-57.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1: 1-26.
- Giller K.E., Witter E., McGrath S.P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 2031-2037.
- Giller K.E., Witter E., McGrath S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1389-1414.
- He Z. L., Yang X. E., Stoffella P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impact on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 125-140.
- Hinojosa M.B., Garcia-Ruiz R., Carreira J.A. 2010. Utilizing microbial community structure and function to evaluate the health of heavy metal polluted soils.V: Soil heavy metals. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 185-224.
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-depended laccase. *Journal of Bacteriology*, 183, 18: 5426-5430.

- Johannes C., Majcherczyk A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78: 193-199.
- Kamal S., Prasad R., Varma A. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals. V: *Soil heavy metals*. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer : 31-63.
- Karaca A. Cetin S.C., Turgay O.C., Kizilkaya R. 2010. Effect of heavy metals on soil enzyme activities. V: *Soil heavy metals*. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 237-262.
- Kothe E., Dimkpa C., Haferburg G., Schmidt A., Schmid A., Schütze E. 2010. V: *Soil heavy metals*. Sherameti I., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 225-235.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrand E., Goodfellow M. (eds.). New York, Wiley: 115–175.
- Lazzaro A., Schulin R., Widmer F., Frey B. 2006. Changes in lead availability affect bacterial community structure but not basal respiration in a microcosm study with forest soils. *Science of the Total Environment*, 371: 110-124.
- Leštan D. 2002. *Ekopedologija, študijsko gradivo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za pedologijo in varstvo okolja: 277 str.
- Leštan D., Grčman H., Zupan M., Bačac N. 2003. Relationship of soil properties to fractionation of Pb and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination*, 12, 4: 507-522.
- Li X., Wei Z., Zhang M., Peng X., Yu G., Teng M., Gong W. 2007. Crystal structure of *E.coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 21-26.

- Liu W., Marsh T. L., Cheng H., Forney L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRN. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 63: 4516–4522.
- Lorenzo M., Moldes D., Couto S.R., Sanroman M.A. 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compound. *Chemosphere*, 60: 1124-1128.
- Majeau J.A., Brar S. K., Tyagi R. D. 2009. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101: 2331-2350.
- Martinez C.E., Motto H.E. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, 107: 153-158.
- McIlvaine T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49: 183-186.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670.
- Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2: 39-50.
- Perez-de-Mora A., Burgos P., Madejon E., Cabrera F., Jaeckel P., Schlöter M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: Effect of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 327-341.
- Perruci P., Casucci C., Dumontet S. 2000. An improved method to evaluate the *o*-diphenol oxidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1927-1933.

- Powell R., Gannon F. 2002. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. Oxford University, Oxford University Press: 2 str.
<http://fds.oup.com/www.oup.co.uk/pdf/pas/9v1-7-3.pdf> (3.1.2011)
- Renella G., Mench M., Gelsomino A., Landi L., Nannipieri P. 2005. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1498-1506.
- Rodgers C.J., Blandford C.F., Giddens S.R., Skamnioti P., Armstrong F.A., Gurr S.J. 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology*, 28, 2: 63-72.
- Sardar K., Qing C., Abd El-Latif H., Yue X., Ji-Zheng H. 2007. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 834-840.
- Scheuhammer A.M., Beyer W.N., Schmitt C.J. 2010. Lead. V: *Ecotoxicology: A derivative of encyclopedia of ecology*. Jørgensen S.E. (ed.). New York, Elsevier: 260-267.
- Schlöter M., Dilly O., Munch J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 255-262.
- Schomburg D. 2011. Brenda: The comprehensive enzyme information system. Braunschweig, Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universitaet Braunschweig: 1 str.
<http://www.brenda-enzymes.info> (3.1.2011).
- Nieminen T. M., Ukonmaanaho L., Rausch N., Shotyk W. 2007. Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. V: *Nickel and its surprising impact in nature*. Vol. 2. Metal ions in life sciences. Sigel A., Sigel H., Sigel R. K. O. (eds.) New York, Wiley: 1-22.

- Sinsabaugh R.L. 2009. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 391-404.
- Smit E., Leeftang P., Glandorf B., Van Elsas J.D., Wernars K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 6: 2614–2621.
- Smith S.N., Pugh G.J.F. 1979. Evaluation of dehydrogenase as a suitable indicator of soil microflora activity. *Enzyme Microbiology and Technology*, 1: 279-281.
- Solano F., Lucas-Elio P., Lopez-Serrano D., Fernandez E., Sanchez-Amat-A. 2001. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 204: 175-181.
- Solis-Oba M., Ugalde-Saldivar V. M., Gonzalez I., Viniegra-Gonzalez G. 2005. An electrochemical- spectrophotometrical study of oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 579: 59-66.
- Sparling G.P. 1995. The substrate-induced respiration method. V: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Alef K., Nannipieri P. (eds.). London, Academic Press: 397- 404.
- Turpeinen R., Kairesalo T., Häggblom M.M. 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbial Ecology*, 47: 39-50.
- Toumela M., Steffen K.T., Kerko E., Hartikainen H., Hofrichter M., Hatakka A. 2005. Influence of Pb contamination in boreal soil on growth and lignolytic activity of litter-decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 179-186.

Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996.

Uradni list Republike Slovenije, 16, 68: 1-3.

Wallenstein M.D., Weintraub M.N. 2008. Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2098-2106.

Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 63 str.

ZAHVALA

- za strokovne nasvete in prijazno pomoč pri izdelavi diplomske naloge mentorici prof. dr. Ines Mandić - Mulec, delovnemu mentorju Luku Ausecu in recenzentki prof. dr. Damjani Drobne,
- zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu,
- za podatke o vzorčenih tleh Katedri za pedologijo in varstvo okolja,
- za možnost izobraževanja in vso podporo staršem in možu.

PRILOGE

Priloga A

Priloga A1: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti poljskih paralelk pri pH 4,0. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3).

tla	Lakazna aktivnost (A/g suhih tal)					
K1	447	445	459	467	441	450
K2	496	496	493	481	493	486
K3	462	452	442	471	461	460
A1	532	475	483	478	505	483
A2	522	483	485	481	483	478
A3	402	398	399	374	391	393
B1	455	426	430	426	434	421
B2	517	461	475	469	470	509
B3	512	481	473	470	475	455

Priloga A2: Razpršenost meritev lakazne aktivnosti poljskih paralelk pri pH 5,8. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3).

tla	Lakazna aktivnost (A/g suhih tal)					
K1	230	219	203	227	250	222
K2	236	235	227	243	249	249
K3	246	253	252	260	278	279
A1	263	248	250	261	264	257
A2	253	256	251	254	264	255
A3	229	219	207	216	238	233
B1	237	244	232	261	253	245
B2	269	265	243	275	265	277
B3	264	262	261	268	269	268

Priloga B: Koncentracije celokupne izolirane DNA. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitve (b).

Vzorec	Koncentracija celokupne DNA (ng/μl)	A260/A280
A1	20,57	1,49
A1b	15,14	1,5
A2	18,71	1,48
A2b	21,06	1,56
A3	17,89	1,52
A3b	14,76	1,77
B1	23,31	1,46
B1b	24,58	1,47
B2	14,43	1,71
B2b	20,66	1,58
B3	21,4	1,54
B3b	17,25	1,61
K1	15,01	1,56
K1b	14,46	1,68
K2	13,13	1,48
K2b	10,69	1,66
K3	18,17	1,61
K3b	15,39	1,53

Priloga C

Priloga C1: Restriktcijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 18S rDNA. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitve (b).

Restriktaza	Vzorec 18S rDNA	Koncentracija DNA (ng/μl)	dodana DNA (μl)	mQ (μl)	10x pufer Tango (μl)	restriktaza (10U/μl) (μl)	ngDNA/rkc	skupaj (μl)
HaeIII	A1	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
HaeIII	A1b	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
MspI	A1	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
MspI	A1b	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
HaeIII	A2	1,625	20,00	32,00	4	3	32,5	59,00
HaeIII	A2b	1,625	20,00	32,00	4	3	32,5	59,00
MspI	A2	1,625	10,00	16,00	2	1,5	16,25	29,50
MspI	A2b	1,625	10,00	16,00	2	1,5	16,25	29,50
HaeIII	A3	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
HaeIII	A3b	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
MspI	A3	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
MspI	A3b	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
HaeIII	B1	2,48	20,00	32,00	4	3	49,6	59,00
HaeIII	B1b	2,48	20,00	32,00	4	3	49,6	59,00
MspI	B1	2,48	10,00	16,00	2	1,5	24,8	29,50
MspI	B1b	2,48	10,00	16,00	2	1,5	24,8	29,50
HaeIII	B2	2,89	20,00	32,00	4	3	57,8	59,00
HaeIII	B2b	2,89	20,00	32,00	4	3	57,8	59,00
MspI	B2	2,89	10,00	16,00	2	1,5	28,9	29,50
MspI	B2b	2,89	10,00	16,00	2	1,5	28,9	29,50
HaeIII	B3	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
HaeIII	B3b	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
MspI	B3	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
MspI	B3b	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K1	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K1b	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50

se nadaljuje

nadaljevanje: Priloga C1: Restriktcijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 18S rDNA. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev (b).

Restriktaza	Vzorec 18S rDNA	Koncentracija DNA (ng/μl)	dodana DNA (μl)	mQ (μl)	10x pufer Tango (μl)	restriktaza (10U/μl) (μl)	ngDNA/rkc	skupaj (μl)
MspI	K1	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
MspI	K1b	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K2	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K2b	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
MspI	K2	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
MspI	K2b	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K3	3,87	20,00	32,00	4	4	77,4	60,00
HaeIII	K3b	3,87	20,00	32,00	4	4	77,4	60,00
MspI	K3	3,87	13,00	32,00	4	4	50,31	53,00
MspI	K3b	3,87	7,00	32,00	4	4	27,09	47,00

Priloga C2: Restriktcijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 16S rDNA. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev (b).

Restriktaza	Vzorec 16S rDNA	Koncentracija DNA (ng/μl)	dodana DNA (μl)	mQ (μl)	10x pufer Tango (μl)	restriktaza (10U/μl) (μl)	ngDNA/rkc	skupaj (μl)
HaeIII	A1	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
HaeIII	A1b	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
MspI	A1	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
MspI	A1b	5,07	15,78	10,22	2	1,5	80	29,50
HaeIII	A2	1,625	20,00	32,00	4	3	32,5	59,00
HaeIII	A2b	1,625	20,00	32,00	4	3	32,5	59,00
MspI	A2	1,625	10,00	16,00	2	1,5	16,25	29,50
MspI	A2b	1,625	10,00	16,00	2	1,5	16,25	29,50
HaeIII	A3	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50

se nadaljuje

nadaljevanje: Priloga C2: Restriksijske mešanice za vzorce čistih PCR produktov 16S rDNA. Kontrolna tla (K), tla remediirana z apnom (A), tla remediirana z gramoznim blatom (B), poljske paralelke (1,2,3), tehnična ponovitev (b).

Restriktaza	Vzorec 16S rDNA	Koncentracija DNA (ng/μl)	dodana DNA (μl)	mQ (μl)	10x puffer Tango (μl)	restriktaza (10U/μl) (μl)	ngDNA/rkc	skupaj (μl)
HaeIII	A3b	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
MspI	A3	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
MspI	A3b	6,76	11,83	14,17	2	1,5	80	29,50
HaeIII	B1	2,48	20,00	32,00	4	3	49,6	59,00
HaeIII	B1b	2,48	20,00	32,00	4	3	49,6	59,00
MspI	B1	2,48	10,00	16,00	2	1,5	24,8	29,50
MspI	B1b	2,48	10,00	16,00	2	1,5	24,8	29,50
HaeIII	B2	2,89	20,00	32,00	4	3	57,8	59,00
HaeIII	B2b	2,89	20,00	32,00	4	3	57,8	59,00
MspI	B2	2,89	10,00	16,00	2	1,5	28,9	29,50
MspI	B2b	2,89	10,00	16,00	2	1,5	28,9	29,50
HaeIII	B3	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
HaeIII	B3b	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
MspI	B3	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
MspI	B3b	4,9	16,33	9,67	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K1	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K1b	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
MspI	K1	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
MspI	K1b	5,9	13,56	12,44	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K2	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K2b	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
MspI	K2	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
MspI	K2b	5,61	14,26	11,74	2	1,5	80	29,50
HaeIII	K3	3,87	20,00	32,00	4	4	77,4	60,00
HaeIII	K3b	3,87	20,00	32,00	4	4	77,4	60,00
MspI	K3	3,87	13,00	32,00	4	4	50,31	53,00
MspI	K3b	3,87	7,00	32,00	4	4	27,09	47,00

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marija SELAK

**VPLIV TEŽKIH KOVIN NA LAKAZNO AKTIVNOST
V TLEH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011