

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nika ZAJEC

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA AKTIVNOST IN PESTROST
MIKROBNE ZDRUŽBE V BARJANSKIH TLEH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON ACTIVITY AND
DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITY IN PEAT SOIL**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2004

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 18.6.2004 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Blaž Stres in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član : dr. Blaž Stres

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 7. september 2004

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
UDK 579.26+631.461:577.2.083(043)=863
KG mikrobiologija tal/Ljubljansko barje/tla/mikrobne združbe/ekologija
mikroorganizmov/aktivnost mikrobne združbe/pestrost mikrobne združbe/molekularne
tehnike/T-RFLP/PCR
AV ZAJEC, Nika
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentor)/ STRES, Blaž (somentor)/ AVGUŠTIN, Gorazd
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2004
IN VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA AKTIVNOST IN PESTROST
MIKROBNE ZDRUŽBE V BARJANSKIH TLEH
TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 47 s., 5 pregl., 12 sl., 1 pril., 50 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Ljubljansko barje je najjužnejše ležeče nizko barje v Evropi. Značilnost barjanskih tal je šota, ki nastane iz odmrlih ostankov šotnih mahov in drugih rastlin. Zaradi hitrejše mineralizacije organskih snovi v obdelovanih tleh, izsuševanja in izkopavanja šote se barjanska tla posedajo, barje pa izginja. Proučevali smo osnovne karakteristike barjanskih tal in ugotavljali, kako okoljski dejavniki vplivajo na aktivnost in pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh. Vzorčili smo avgusta 2003 in marca 2004 na eksperimentalnem polju v Tomišlju in del vzorcev shranili pri 4°C. Območja na tem polju se razlikujejo po deležu organskega ogljika v tleh, nivoju podtalnice in rabi tal (del je travnik, del pa v travnik spremenjeno obdelovano koruzno polje). Ugotovili smo, da je pH barjanskih tal skoraj nevtralen (6,5-6,8). Največjo sposobnost zadrževanja vode v tleh imajo vzorci z večjim deležem organskega ogljika. Na vlažnost tal vpliva predvsem čas vzorčenja in shranjevanje, v manjši meri tudi nivo podtalnice. Mikrobna aktivnost merjena s substratno inducirano respiracijo (SIR) in skupna dehidrogenazna aktivnost sta največji marca, aktivnost pri 4°C shranjenih vzorcev v primerjavi s svežimi pa pade. Ugotovili smo, da delež ogljika v tleh vpliva na aktivnost mikrobne združbe; mikrobne združbe iz vzorcev tal z večjim deležem organskega ogljika so bolj aktivne. Pestrost mikrobnih združb se v različnih vzorcih in po shranjevanju ni bistveno razlikovala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- UDC 579.26+631.461:577.2.083(043)=863
- CX soil microbiology/Ljubljana marsh/soil/microbial community/microbial ecology/activity of microbial community/diversity of microbial community/molecular techniques/T-RFLP/PCR
- AU ZAJEC, Nika
- AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/ STRES, Blaž (co-advisor)/
AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2004
- TI EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON ACTIVITY AND DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITY IN PEAT SOIL
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 47 p, 5 tab., 12 fig., 1 ann., 50 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The Ljubljana Marsh is the most southern low peatland in Europe. It is covered in peat, that was formed from remnants of sphagnum species and other plants. Rapid mineralization of organic matter in drained and managed peatlands and peat extraction lower total peat depth for 3cm per year. We studied basic soil characteristics of peat soil and effect of the environmental factors on activity and diversity of microbial communities in peat soil. We sampled in August 2003 and March 2004; some samples were preserved at 4°C. Experimental field encompassed large plots with different organic carbon content, watertable level and cropping history (permanent grassland and arable converted to grassland more than 10 years ago). We showed that peat soil pH was almost neutral (6,5-6,8). Water holding capacity was higher in soil with high organic carbon content. Soil moisture depended mostly upon time of sampling and preservation and also minorly upon watertable level. Soil microbial activity measured by substrate induced respiration (SIR) and dehydrogenase activity were the highest in March, while activity in stored samples decreased. We showed, that microbial activity in soil was dependent on organic carbon content being most active in soil samples with the highest organic C level. Diversity of microbial community in different samples and after storage showed no significant difference.

KAZALO VSEBINE

	STR.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	X
SEZNAM PRILOG	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LJUBLJANSKO BARJE	3
2.2 EKSPERIMENTALNO POLJE	5
2.3 TLA KOT EKOSISTEM	5
2.4 MIKROBNE ZDRUŽBE V TLEH	7
2.4.1 Aktivnost mikrobne združbe merjena s tehniko s substratom inducirane respiracije (SIR)	7
2.4.2 Dehidrogenazna aktivnost mikrobne združbe	8
2.4.3 Pestrost mikrobne združbe	8
2.4.4 Vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe	10
2.5 NAMEN IN HIPOTEZA	12
2.5.1 Namen	12
2.5.2 Hipoteza	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 EKSPERIMENTALNO POLJE IN VZORČENJE TAL	13
3.2 ZNAČILNOSTI TAL	14
3.2.1 pH tal	14
3.2.2 Vlažnost tal	14
3.2.3 Sposobnost zadrževanja vode v tleh (WHC)	14
3.3 MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE	15

3.3.1 S substratom inducirana respiracija	15
3.3.2 Dehidrogenazna aktivnost	15
3.4 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE	16
3.4.1 Izolacija skupne mikrobne DNA iz tal	16
3.4.2 Kvantifikacija skupne mikrobne DNA izolirane iz tal	16
3.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	16
3.4.4 Restrikcija	17
3.4.5 Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih fragmentov s kapilarno elektroforezo ABI 310	18
3.4.6 Analiza kromatogramov	18
3.5 MATERIALI	20
3.5.1 Reagenti	20
3.5.2 Kompleti	20
3.5.3 Encimi	21
3.5.4 Pufri in raztopine	21
3.5.5 Začetni oligonukleotidi (sintetizirani po naših navodilih v Applied Biosystems, UK)	21
4 REZULTATI	22
4.1 ZNAČILNOSTI TAL	22
4.1.1 pH tal	22
4.1.2 Vlažnost tal	23
4.1.3 Sposobnost zadrževanja vode v tleh (WHC)	24
4.2 MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE	26
4.2.1 S substratom inducirana respiracija (SIR)	26
4.2.2 Dehidrogenazna aktivnost	28
4.3 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE	31
4.3.1 Izolacija in kvantifikacija skupne mikrobne DNA iz tal	31
4.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	31
4.3.3 Analiza T-RFLP fragmentov	32
5.RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1 RAZPRAVA	35
5.2 SKLEPI	39

6 POVZETEK	40
7 VIRI	42
8 ZAHVALA	47
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	STR.	
Preglednica 1	pH vrednosti barjanskih tal: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci. Podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje	22
Preglednica 2	Vlažnost vzorcev barjanskih tal: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci. Podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje	23
Preglednica 3	Sposobnost zadrževanja vode v tleh in trenutna vlažnost podana v enotah WHC (trenutna sposobnost zadrževanja vode) v tleh za barjanska tla: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci, podana je povprečna vrednost dveh meritev in odstopanje	24
Preglednica 4	Aktivnost mikrobne združbe merjena s SIR v avgustovskih vzorcih, avgustovskih vzorcih shranjenih 6 mesecev pri 4°C in marčevskih vzorcih; podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje	27
Preglednica 5	Dehidrogenazna aktivnost merjena na podlagi nastanka TTF iz TTC za barjanska tla: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci, podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje	29

KAZALO SLIK

	STR.
Slika 1 Preskrba nizkega barja (a) in visokega barja (b) z vodo (Dobson in Frid, 1998)	3
Slika 2 Shema eksperimentalnega polja v Tomišlju na Ljubljanskem barju in vzorčevalna mesta s podanimi karakteristikami	13
Slika 3 Vlažnosti vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih	23
Slika 4 Sposobnost zadrževanja vode v barjanskih tleh	25
Slika 5 Trenutna vlažnost v enotah WHC v barjanskih tleh v treh časovnih obdobjih	26
Slika 6 S substratom inducirana respiracija vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih	27
Slika 7 Odvisnost absorbance raztopine TTF v acetonu od njene koncentracije	29
Slika 8 Dehidrogenazna aktivnost vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih	30
Slika 9 Elektroforetski gel izolirane DNA. Nanešeni so (od leve proti desni) marker velikosti SMO#333, DNA izolirana iz avgustovskih vzorcev 1, 3, 6 in 8, marker velikosti SMO#333.	31
Slika 10 Elektroforetski gel PCR produktov. Nanešeni so (od leve proti desni) marker velikosti SMO#333, PCR produkti iz avgustovskih vzorcev 1, 3, 6 in 8, marker velikosti SMO#333	32
Slika 11 Distančna matrika preučevanih vzorcev	33
Slika 12 Dendrogram in elektroferogrami proučevanih vzorcev	33

SEZNAM OKRAJŠAV

Avgust+6M	avgustovski vzorci, shranjeni šest mesecev pri 4°C
dH ₂ O	destilirana voda
EF	elektroforeza
NC	nižji delež organskega ogljika
NP	nižji nivo podtalnice
P	polje
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PT	koruzno polje, spremenjeno v travnik
SIR	s substratum inducirana respiracija
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
TTF	2,3,5-triphenyltetrazolium formazan
VC	višji delež organskega ogljika
VP	višji nivo podtalnice
WHC	sposobnost zadrževanja vode

SEZNAM PRILOG

PRILOGA 1	Elektroferogrami preučevanih vzorcev
-----------	--------------------------------------

1 UVOD

Barja so posebna življenjska okolja, za katera je značilno stalno ali občasno zastajanje vode. Glede na preskrbljenost z vodo in hranili ločimo visoka in nizka barja (Dobson in Frid, 1998). So izključni habitati za številne ogrožene rastlinske in živalske vrste, poleg tega pa opravljajo še druge pomembne ekološke funkcije. So območja odvajanja in zadrževanja odvečne površinske vode, napajajo podtalnico, ki je vir pitne vode in so naravne čistilne naprave za tla in vodo, saj šote, mikrobi in rastline delujejo kot biofiltri. So pa tudi območja emisije toplogrednih plinov (Dobson in Frid, 1998). Ljubljansko barje je najjužnejše ležeče nizko barje v Evropi in opravlja vse zgoraj naštetih funkcije. Tla Ljubljanskega barja so organsko zelo bogata, saj jih večinoma prekriva šota. Izkopavanje šote, izsuševanje in intenzivna kmetijska raba tal so spremenili prvotno podobo barja. Barja v pravem pomenu besede je ostalo še zelo malo (Martinčič, 2003).

Nobena objavljena študija še ni obravnavala vpliva sezonske dinamike okoljskih parametrov v naravnem okolju barjanskih tal na spremembe in zvezo med strukturo in funkcijo mikrobne združbe v različno degradiranih šotnih tleh. Preučevanje tal z različno vsebnostjo organske snovi, različnim nivojem podtalnice in vzorčenje v različnih letnih časih bo prikazalo vlogo in vpliv glavnih dejavnikov okolja (organska snov, nivo podtalnice, temperatura) na aktivnost in pestrost mikrobnih združb v šotnih tleh.

Eksperimentalno polje v Tomišlju, na katerem smo vzorčili, je veliko 1ha in zajema področja, ki se razlikujejo v nivoju podtalnice, deležu ogljika v tleh in rabi tal (travniki in v travnik spremenjeno obdelovano koruzno polje) (Hacin s sod., 2001). V dveh sezonskih obdobjih (avgust in marec) smo odvzeli vzorce, ki se razlikujejo v omenjenih parametrih: deležu organskega ogljika, nivoju podtalnice in rabi tal. Vzorci odvzeti avgusta, so bili poleg tega še približno pol leta shranjeni pri 4°C. Ugotavljali smo aktivnost in pestrost mikrobne združbe posameznega vzorca in skušali ugotoviti, ali imajo omenjeni parametri kakšen vpliv nanju. Klasične mikrobiološke metode, ki temeljijo na gojenju mikroorganizmov, niso bile uporabne, saj bi tako v analizo zajeli le do 1% vseh mikroorganizmov, ki dejansko živijo v tleh (Amman

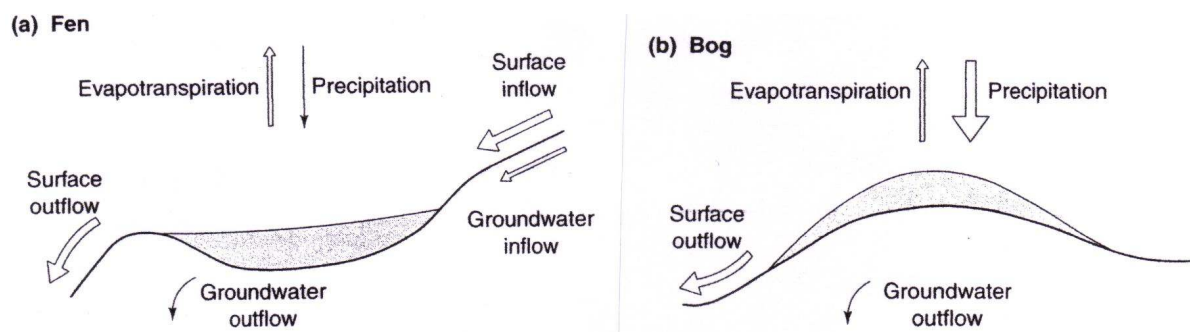
s sod., 1995). Zato smo uporabili fiziološke in molekularno biološke metode, kjer gojenje mikroorganizmov ni bilo potrebno. Aktivnost mikrobne združbe smo merili s tehniko s substratom inducirane respiracije in merjenjem skupne dehidrogenazne aktivnosti. Za določanje pestrosti smo uporabili moderno molekularno biološko tehniko, imenovano T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). Metoda temelji na direktni izolaciji DNA iz tal, pomnoževanju bakterijskih genov za 16S rRNA v reakciji PCR s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, razrezu PCR pomnožkov s tetramerno endonukleazo in analizi nastalih fragmentov s kapilarno elektroforezo (Liu s sod. 1997).

Skušali smo ugotoviti vpliv omenjenih parametrov na osnovne značilnosti tal in na aktivnost in pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh. S tem smo naredili prvi korak k razumevanju vpliva glavnih okoljskih dejavnikov na strukturo in funkcijo mikrobne združbe v šotnih tleh Ljubljanskega barja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LJUBLJANSKO BARJE

Barja so posebni tipi življenjskih okolij, za katere je značilna stalna ali pa občasna, a redna poplavljenost z vodo. Porasla so z vodoljubnimi in vlagoljubnimi rastlinami, iz katerih nastaja šota. Šota nastaja iz odmrlih rastlinskih delov, ki zaradi pomanjkanja kisika ne razpadejo popolnoma v humus, ampak se spremenijo v šoto. Poznamo nizko in visoko barje. Razlikujeta se glede preskrbe z vodo. Nizka minerotrofna barja so mokrišča, ki jih z vodo in hranili oskrbuje podtalnica in pritoki z okoliških hribov. Visoka ombrotrofna barja pa so dvignjena nad zgornji nivo podtalnice. Z vodo jih oskrbuje padavinska voda in so v primerjavi z nizkimi revnejša s hranili (Dobson in Frid, 1998).



Slika 1: Preskrba nizkega barja (a) in visokega barja (b) z vodo (Dobson in Frid, 1998)

Ljubljansko barje je najjužnejše ležeče nizko barje v Evropi in se razteza na površini 16000 ha. Nastalo je kot tektonska udorina v pleistocenu, ki jo je kasneje zalila voda. Zaradi pogrezanja kotline so reke močno naplavljalje prod in druge usedline. V holocenu je nastalo mostiščarsko jezero, pretežni del barjanske kotline pa sta začela prekrivati glina in jezerski melj, ki je po ostankih polžjih hišic dobil ime polžarica. Pred okoli 4000 leti se je mostiščarsko jezero zaradi podnebnih sprememb osušilo in nastala je močvirna ravnina (Enciklopedija Slovenije, 1992). Močvirju je sledilo nizko barje, za katerega je značilno nastajanje šote. Iz nizkega barja, ki je občasno še poplavljeno ali v stiku s tekočo vodo, se lahko razvije visoko barje. V slednjem s hranili revnem okolju rastejo posebno prilagojene rastline, predvsem šotni mahovi. Od skupne površine barja zavzema zemljišče s šotno podlago približno 11000ha. Šota je ponekod debela do 8 m (Peterlin, 1971).

Prvi resen poseg, ki je vplival na vodni režim barja je pomenila gradnja Gruberjevega in Zornovega prekopa konec 18. stoletja. Po letu 1825 pa se je začelo načrtno izsuševanje barja in gradnja melioracijskih kanalov. Z izgradnjo melioracijskih kanalov je bil omogočen nadzor nad poplavami, vendar ob močnem deževju reka Ljubljanica še vedno poplavlja. V 19. stoletju so skušali Ljubljansko barje popolnoma izsušiti in tako pridobiti kmetijske obdelovalne površine (Enciklopedija Slovenije, 1992).

Za predele visokega barja je bil najpomembnejši poseg izkopavanje šote za kurjavo. Šoto so uničevali tudi s požiganjem, da bi pridobili kmetijske površine. Z zniževanjem šote pa se je nižalo barjansko dno in poplave so imele vse večji obseg (Peterlin, 1971). Rezanje šote so prepovedali v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Ob rezanju šote so se na golo, a vlažnejšo površino znova naseljevale nekdanje barjanske vrste. Prepoved rezanja pa je omogočila naseljevanje lesnih vrst, predvsem breze in bora. Barjanske vrste so zaradi nekonkurenčnosti in zasenčenja skoraj v celoti propadle (Martinčič, 2003). Danes primarno barje najdemo le še na površini 1,5 ha na osamelcu Mali plac pri Bevkah (Martinčič, 2003).

Nižinska barja imajo zelo pomembne okoljske funkcije (Dobson in Frid, 1998):

- so habitati za ogrožene živalske in rastlinske vrste,
- delujejo kot območja za odvajanje in zadrževanje odvečnih površinskih voda,
- so zbiralniki talne vode, ki običajno predstavlja zalogo pitne vode,
- delujejo kot naravni mikrobno-rastlinski čistilni sistem za tla in vodo,
- so habitati z največjo vsebnostjo organske snovi v tleh, ki z mikrobno razgradnjo prehaja v toplogredne pline ali okoljsko problematične oblike

Ljubljansko barje je tipično nizko barje s talno vodo, bogato z minerali in hranili in ima vse zgoraj omenjene funkcije. Zaradi izsuševanja, kmetijske rabe in izkopavanja šote je prišlo do degradiranja barja. Osnovni in splošno uveljavljeni princip ohranjanja ali renaturacije degradiranih šotnih barij je vzdrževanje nivoja oz. dvig podtalnice. S tem se zmanjša mineralizacija organske snovi, kar zmanjša posedanje barja (Göttlich, 1990).

2.2 EKSPERIMENTALNO POLJE

Eksperimentalno polje je bilo osnovano na Ljubljanskem barju v Tomišlju leta 1999 in je veliko 1 ha. Namenjeno je preučevanju vpliva višine podtalnice na mineralizacijo organskega materiala, predvsem šote. Hitrost mineralizacije šote je namreč mogoče uravnavati z regulacijo nivoja podtalnice (Göttlich, 1990). Intenzivno obdelovanje tal pospešuje mineralizacijo organskega materiala, predvsem šote in zato se nekatera barja v zmerno toplih klimatih znižujejo tudi do 3 cm na leto (Göttlich, 1990). Na glavnem melioracijskem kanalu je postavljen jez, s katerim je mogoče uravnavati višino podtalnice. Eksperimentalno polje se razlikuje tudi po rabi tal v preteklosti. Del polja je bil vseskozi travnik, del pa je bilo koruzno polje, ki je bilo pred več kot desetimi leti zopet spremenjeno v travnik. Tla na eksperimentalnem polju se razlikujejo tudi v deležu ogljika. Del tal eksperimentalnega polja vsebuje 27-40 % organskega ogljika, del pa 14-20 % (Hacin s sod., 2001). 8 podenot je izbranih tako, da se razlikujejo v rabi tal, v višini podtalnice in deležu organskega ogljika. Tla eksperimentalnega polja pa se ne razlikujejo bistveno v razmerju C:N (13-20) in pH (6,5-7). Na eksperimentalnem polju je bil že opravljen poskus, ali delež organskega ogljika in višina podtalnice vplivata na mineralizacijo dušika. Ugotovljeno je bilo, da je stopnja mineralizacije dušika proporcionalna deležu organskega ogljika v tleh in da je stopnja mineralizacije najvišja pri višini podtalnice 40-60 cm (Hacin s sod, 2001).

2.3 TLA KOT EKOSISTEM

Tla so kompleksen in dinamičen ekosistem. Sestavljena so iz anorganskih mineralnih delcev, razkrajajočega organskega materiala in živih organizmov. Igrajo pomembno vlogo v proizvodnji hrane, kot rezervar vode in pri globalnem kroženju snovi in nutrientov (Atlas in Bartha, 1993). Fizikalne in kemične lastnosti tal vplivajo na prezračevanje, dostopnost nutrientov, zadrževanje vode in tako biološko aktivnost in odnose med organizmi v tleh. Najpomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti so: velikost delcev, poroznost, vlažnost, stopnja prezračevanja, kemijska sestava, delež gline, obseg kationsko izmenjevalne kapacitete in delež organske frakcije tal. Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na nastanek tal so matična podlaga, podnebje, biološka aktivnost, topografija pokrajine in čas. Ločimo organska in

mineralna tla. Organska tla vsebujejo najmanj 20 % organskega ogljika, mineralna pa manj (Sylvia s sod. 1999). Tekstura mineralnih tal je opredeljena z velikostjo anorganskih delcev. Osnovne skupine so pesek (premer 0,05-2,0 mm), melj (premer 0,002-0,5 mm) in glina (premer manj kot 0,002 mm). Tekstura je osnovna lastnost tal in se ne spremeni v kratkem časovnem obdobju (Sylvia s sod.1999).

Organizmi v nekem okolju so lahko indigeni oz. avtohtoni ali vneseni oz. alohtoni (Sylvia s sod. 1999). Zaradi razmeroma visokih koncentracij organskih snovi so tla ugoden habitat predvsem za heterotrofne bakterije in glive. Število mikroorganizmov v tleh je v primerjavi z njihovim številom v morski in sladki vodi bistveno večje (Mishustin, 1975). Različne vrste tal omogočajo uspešnejšo rast populacij z določenim tipom metabolizma. Metabolno sorodne populacije tvorijo delovni ceh (ang. guild), skupki le teh pa mikrobne združbe (Brock, 2000). Najštevilčnejši organizmi v tleh so bakterije (10^6 - 10^9 bakterij na gram tal) in sodelujejo pri kroženju in transformaciji ogljika, dušika, fosforja, žvepla, železa in drugih mineralov v tleh. Lahko so anaerobi, mikroaerofili, fakultativni anaerobi ali aerobi. Najpomembnejši rodovi so: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcalignes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Xanthomonas* (Alexander, 1977). Aktinomicete predstavljajo 10-33 % delež bakterij v tleh in dajejo tlem tipičen vonj. Najpomembnejša rodova sta *Streptomyces* in *Nocardia* (Hattori in Hattori, 1973, Alexander, 1977). Pomembne pa so tudi fotoavtotrofne cianobakterije rodov *Anabaena*, *Calothrix*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* in *Plectonema*. Arheje so ena najmanj raziskanih skupin organizmov v tleh. Njihova fiziološka karakterizacija in ekološki pomen v talnih mikrobnih združbah sta še neznana. Glive lahko predstavljajo večji delež biomase v tleh kot bakterije (Domsch, 1980). Razgrajujejo polisaharide v ostankih rastlin, s hifami povezujejo talne delce, zadržujejo vlago in pomembno prispevajo k aktivnosti v kisljih tleh (Atlas in Bartha, 1993). Najpogostejši so predstavniki rodov *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium* in *Trichoderma* in pa askomicete in bazidiomicete. Kvasovke razgrajujejo rastlinske ostanke in z ekstracelularnimi izločki povezujejo delce tal. Najpomembnejši so rodovi *Candida*, *Rhodotorula* in *Cryptococcus*. Pogoste pa so tudi alohtone kvasovke, ki v tla vstopijo z rastlinskim materialom (Atlas in Bartha 1993). Alge naseljujejo tako zgornje kot notranje sloje tal (Trainor, 1978). Najpomembnejši predstavniki so rodovi *Chlorophycophyta*,

Rodophycophyta in *Euglenophyta*. Praživali so skupaj z nečlenarji pomembni plenilci bakterij, gliv, alg in drug drugega v tleh. Najdemo jih predvsem v zgornjih 15 cm, saj potrebujejo razmeroma visoke koncentracije kisika. Pomembni so za razgradnjo organskih materialov in polimerov, prezračevanje in homogenizacijo tal. Talne živali (žuželke, sesalci, deževniki ipd.) so pomembni za prezračevanje tal, kot plenilci in kot razgrajevalci organskih snovi (Atlas in Bartha 1993).

2.4 MIKROBNE ZDRUŽBE V TLEH

2.4.1 Aktivnost mikrobne združbe merjena s tehniko s substratom inducirane respiracije (SIR)

V aerobnih razmerah so večinski produkti mikrobne respiracijske presnove organskega ogljika CO₂, voda in novonastala biomasa. Tehnika je bila prvič opisana 1977 (Anderson in Domsch). Namenjena je hitremu in objektivnemu ugotavljanju količine biomasnega ogljika v tleh v primerjavi s tehniko fumigacija- ekstrakcija (povzeto po Alef in Nanninpiery, 1995). Metoda temelji na predpostavki, da bodo aktivni mikroorganizmi v tleh takoj po dodatku začeli presnavljati lahko dostopen vir energije, kot je npr. glukoza, do CO₂. Produkcija CO₂ je tako mera za hitrost respiracije, ki se bistveno ne spreminja 6-8 ur, nato pa naraste zaradi rasti mikrobne biomase. Na podlagi sočasnega merjenja SIR in fumigacijskega določanja biomase, je bilo ugotovljeno, da pri temperaturi 22°C 1 ml nastalega CO₂ v 1 uri pomeni 40 mg biomasnega ogljika v tleh (Anderson in Domsch, 1977). Včasih lahko pride do večjih odstopanj od te korelacije, vzroke pa lahko iščemo predvsem v fazi rasti mikrobne populacije- bodisi gre za zelo mlado ali pa zelo staro mikrobno populacijo. Prvotna izvedba metode SIR je bila kasneje modificirana (West in Sparling, 1986). Pomanjkanje vode je prav tako limitni dejavnik za respiracijo v tleh (Orchard in Cook, 1983), zato je glukozo v vzorec tal potrebno dodajati kot vodno raztopino. Za objektivne in primerljive rezultate metode avtorja priporočata tla, ki se ne razlikujejo bistveno v vlažnosti oz. dodajanje raztopine glukoze tako, da te pogoje izenačimo. Metoda ni primerna za tla, kjer prevladuje anaerobna mikrobna združba, saj le-ta presnavlja glukozo tudi do metana in ne le do CO₂ (Yamane in Sato, 1964).

2.4.2 Dehidrogenazna aktivnost mikrobne združbe

Dehidrogenazna aktivnost v tleh je merilo za skupno mikrobno aktivnost (Smith in Pugh, 1979). Encimi dehidrogenaze so udeleženi npr. v oksido-redukcijskih reakcijah Krebsovega cikla. Dehidrogenazno aktivnost ugotavljamo s spektrofotometričnim merjenjem redukcije TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium klorid) v TTF (2,3,5-trifeniltetrazolium formazan). Obe spojini sta občutljivi na svetlobo, zato poskus izvajamo v temi. TTC pri tej metodi uporabljamo kot alternativni elektronski akceptor, vendar se reducira šele, ko so reducirani že vsi ostali prejemniki elektronov. Zato lahko v nekaterih primerih opazimo manjšo mikrobno aktivnost kot bi jo pričakovali glede na stopnjo respiracije (Alef in Nanninpietri, 1995).

2.4.3 Pestrost mikrobne združbe

Morfologija mikroorganizmov je v primerjavi z morfologijo živali preveč enostavna, da bi jih na podlagi tega lahko klasificirali in identificirali. Še do pred kratkim je bila za klasifikacijo in identifikacijo potrebna izolacija čiste kulture in nato določitev fizioloških in biokemijskih lastnosti. Vendar je bilo najprej za vodne, nato pa tudi talne ekosisteme dokazano, da se dejansko število mikroorganizmov in število tistih, ki jih je iz takšnih ekosistemov mogoče vzgojiti, močno razlikuje. Staley in Konopka (1985) sta ta pojav označila kot »great plate count anomaly« oz. anomalija števnosti plošč. Na ploščah tako lahko gojimo v povprečju le 0,3 % mikroorganizmov, ki so dejansko prisotni v tleh (Staley in Konopka, 1985). V zadnjem času pa je bilo opravljenih več raziskav, v katerih so raziskovalci osamili in nato gojili tudi mikroorganizme, ki naj po doslej znanih raziskavah ne bi rastle in vitro. Raziskovalci menijo, da je delež organizmov, ki jih je možno gojiti v laboratoriju večji, kot je veljalo do pred kratkim, le ustrezne razmere je potrebno zagotoviti (Joseph s sod., 2003).

Pred približno dvajsetimi leti so raziskovalci začeli s preučevanjem okoljskih vzorcev na podlagi analize genov za rRNA (Amman s sod. 1995). Molekule 5S rRNA so direktno izolirali iz vzorcev, jih elektroforetsko ločili in ugotovili sestavo njihovih nukleotidnih sekvenc. Tako so proučevali mikrobne združbe v okolici globokomorskih vrečev in združbe v izpiralnih bazenih rudnikov bakra (Stahl s sod. 1984 in 1985). Vendar je 5S rRNA dolga le

120 nukleotidov in kot taka premalo informativna. Poleg tega so se pojavljale težave pri elektroforetskem ločevanju 5S rRNA iz kompleksnejših vzorcev (Amman s sod. 1995). Kasneje so za molekularne analize mikrobnih združb večinoma preučevali gene za 16S rRNA (Ward s sod. 1990). Ta gen je zelo primeren, ker je prisoten pri vseh organizmih, pri vseh ima enako vlogo, struktura molekule je zelo ohranjena, v celici je molekula prisotna v več kopijah, poleg tega pa danes obstaja že zelo velika baza podatkov, ki vsebuje sekvence tega gena pri različnih mikroorganizmih (Amman s sod. 1995).

Pestrost mikrobne združbe je mogoče ugotavljati z različnimi molekularnimi metodami, med drugim z ugotavljanjem T-RFLP (polimorfizem končnih restrikcijskih fragmentov) profilov genov za 16S rRNA (Liu s sod. 1997). Tehnika temelji na direktni izolaciji DNA iz tal, pomnožitvi genov ali delov genov za 16S rRNA s fluorescenčno označenim začetnim oligonukleotidom in razrezu produktov PCR z restrikcijsko endonukleazo. Najpogosteje uporabljene restriktaze so *HhaI*, *MspI*, *RsaI*, *HaeIII*, *Sau3aI* in *AluI* (Kittis, 2003, Osborn s sod., 2000). Nastale fragmente smo analizirali s kapilarno elektroforezo in njihovo število in velikost kaže na pestrost mikrobne združbe. Sama metoda je hitra in objektivna, vendar je potrebno pri izvedbi upoštevati nekatera dejstva:

- različno uspešni lizi po gramu negativnih in pozitivnih bakterijskih celic in pa lizi spor se najlažje izognemo tako, da pri izolaciji DNA uporabimo kombinacijo fizične (stresanje s kroglicami) in kemijske oz. encimske lize celic (Frostegard s sod., 1999).
- matrična DNA, ki ima večjo stopnjo homologije z začetnimi oligonukleotidi, bo preferenčno namnožena (Farely s sod., 1995),
- število kopij rRNA genov v celici variira, kar lahko vpliva na zaznavo določene mikrobne populacije (Liu s sod., 1997),
- pri PCR pomnoževanju lahko pride do tvorbe t.i. himer (Amman s sod. 1995),
- v restrikcijske mešanice moramo dodati približno enake količine DNA, med 50 in 200 ng. Po restrikciji moramo DNA očistiti soli in inaktiviranih encimov, saj lahko motijo kapilarno elektroforezo (Kittis 2001).

Celotni bakterijski gen za 16S rRNA je dolg v povprečju 1500 bp. Ker so pri metodi T-RFLP pomembni le fluorescentno označeni konci, je nesmiselno pomnoževati celoten gen. Par začetnih oligonukleotidov na mestih 341f (štetje po *E. coli*, velja tudi za vse nadaljnje začetne oligonukleotide) in 926r (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3' in 5'CCGTCAATTCCTTTRAGTT 3') naj bi teoretično nalegal na 84,5% 16S rRNA sekvenc deponiranih v RDP bazi podatkov (Liu s sod. 1997), vendar število različnih fragmentov po restrikciji ni bilo zadostno za analizo. V isti raziskavi je bilo ugotovljeno, da omogoča produkt PCR dolg cca. 900bp (začetna oligonukleotida 8f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') in 926r (5' CCGTCAATTCCTTTRAGTT 3')) po restrikciji ločevanje zadostnega števila različnih fragmentov za analizo strukture mikrobne združbe. Pri interpretaciji rezultatov moramo biti previdni. Mikrobnih populacij, ki niso številčno dominantne, ne zaznamo vedno, saj njihova matrična DNA predstavlja premajhen delež DNA celotne mikrobne združbe (Liu s sod. 1997).

2.4.4 Vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe

Kot smo že omenili, so talne mikrobne združbe pomembno udeležene v biogeokemičnem kroženju snovi in so pomembni producenti v kopenskih ekosistemih. Kljub temu pa je malo znanega o tem, kako se mikrobne združbe odzivajo na spremembe okoljskih dejavnikov. To je posledica izredne pestrosti mikrobne združbe in pa dejstva, da mikroorganizmi, ki jih je enostavno gojiti in vitro predstavljajo le majhen delež dejansko prisotnih. Domnevamo in v nekaterih primerih tudi že vemo, da na aktivnost in sestavo mikrobnih združb vplivajo: vrsta oz. tip tal, letni čas, obdelovanje in gnojenje zemlje in vsebnost nutrientov (Bossio s sod. 1998).

V organsko bogatih tleh najdemo v primerjavi s peščenimi več mikroorganizmov, ki jih lahko gojimo in vitro. Tudi pestrost prisotnih mikrobnih združb je v organsko bogatih tleh bistveno večja. Razlika v pestrosti nastane predvsem na račun mikroorganizmov, ki jih ne moremo gojiti, takih pa je bilo v raziskavi Overasa in Torsvika (1998) kar 99,9%. V organsko bogatih tleh je bistveno več substratov, ki jih mikroorganizmi lahko uporabijo kot vir hranil (Sylvia s sod., 1999).

Mikrobne združbe v tleh, ki so bila podvržena različni obdelavi, se razlikujejo (Buckley in Schmidt, 2003, Stres 2003). Tako so mikrobne združbe v obdelovanih tleh drugačne od mikrobnih združb v tleh, ki niso bila nikoli obdelovana. Mikrobne združbe v tleh, katerih obdelovanje je bilo opuščeno pred kratkim, npr. pred devetimi leti, so podobne združbam v obdelovanih tleh. Združbe v tleh, katerih obdelava je bila opuščena pred 45 leti, pa so podobne tistim v neobdelovanih tleh (Buckley in Schmidt, 2003). Predvideva se, da je to posledica različne vsebnosti ogljika in dušika v tleh, saj intenzivna kmetijska raba tal zmanjša njune zaloge v tleh, njihova obnova pa lahko traja tudi več desetletij. Zmanjšanje zaloge ogljika v tleh prav tako zmanjša katabolno pestrost tam živeče mikrobne združbe (Degens s sod. 2000). Pestrost preiskovanih mikrobnih združb je bila večja v neobdelovanih tleh kot v obdelovanih tudi glede na rezultate analize genov za 16S rRNA (Buckley in Schmidt, 2001). Vrsta kulturne rastline, ki raste na obdelovanem polju, ne vpliva na sestavo mikrobne združbe, oz. so razlike tako majhne, da jih z uporabljenimi metodami ni bilo mogoče zaznati (Buckley in Schmidt, 2001). Mikrobne združbe v obdelovanih tleh so v primerjavi z neobdelovanimi bolj pestre, saj so skupine enakomerneje porazdeljene (Stres, 2003).

Mikroorganizmi v tleh niso vedno v aktivnem stanju, večinoma so ravno obratno, v t.i. dormantnem stanju (Sylvia s sod. 1999). Na to vplivajo predvsem temperatura, dostopnost vode in hranil. Največja biomasa in aktivnost na testnem polju Institute of Grassland and Environmental Research v Veliki Britaniji sta bili izmerjeni v spomladanskih vzorcih, najmanjši pa v jesenskih (Bardgett s sod. 1999). Spomladanska aktivnost je posledica dviga temperature, rasti korenin in mobilizacije organskega materiala, ki je ostal nerazgrajen čez zimo. Spremembe v sestavi mikrobnih združb zaradi letnih časov so posledica različnih vremenskih dejavnikov, predvsem padavin (Bossio s sod., 1998).

Prisotnost vode v tleh je odvisna od sestave tal, rastlin, padavin in klimatskega izsuševanja. V tleh je voda vezana na površino delcev ali pa je prosto prisotna v t.i. intersticijskih prostorih. Pomembna je za raztapljanje hranil in plinov (kisika, metana, ogljikovega dioksida in drugih). V dobro prezračeni tleh, ki niso namočena, kisik prosto difundira in tako je njegova koncentracija visoka. V namočenih tleh pa se kisik raztaplja v vodi, od koder ga lahko porabljajo mikroorganizmi. Takšna tla hitro postanejo anoksična (Sylvia s sod. 1999).

Raziskave na inkubiranih vzorcih so pokazale, da enomesečno sušenje vzorcev in ponovno namakanje do prejšnjega stanja bistveno ne spremeni števila mikroorganizmov, se pa po ponovnem namakanju v primerjavi s suhimi vzorci respiracija poveča 1,5x (Bloem s sod., 1992).

2.5. NAMEN IN HIPOTEZA

2.5.1 Namen

Barjanska tla so bila do sedaj zelo malo preučevana. V tej nalogi smo poskušali opraviti nekatere osnovne raziskave barjanskih tal in podati smernice za nadaljnje raziskave. Od velikega močvirja, na katerem se ni dalo pridelovati hrane in so ga zato dolgo izsuševali, ni ostalo več veliko. Nastalo je obsežno polje, ki ga Ljubljana občasno še vedno poplavi, njegova največja vrednost pa so obsežni vlažni travniki, obdani z grmičevjem in obvodnimi lokami. Skušali smo ugotoviti, kako obdelovanje tal, letni čas, vsebnost ogljika in višina podtalnice vplivajo na mikrobno združbo v barjanskih tleh. Namen naloge bil tudi preizkusiti metodo T-RFLP na talnih vzorcih, ki so izredno bogati s huminskimi kislinami, ki so znani inhibitorji verižne reakcije s polimerazo in ugotoviti, ali je le-ta primerna za tovrstne analize

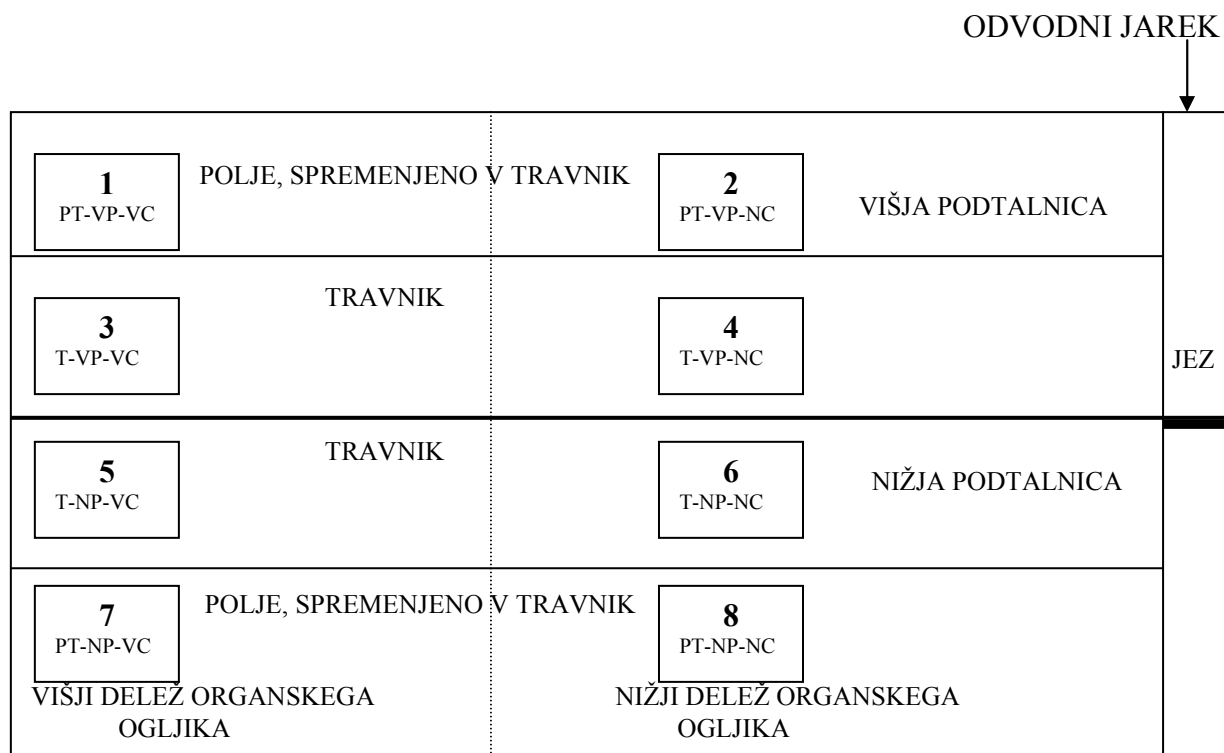
2.5.2 Hipoteza

Glede na dosedanje raziskave, opravljene na tleh, smo predvidevali, da višina podtalnice, letni čas, vsebnost ogljika in obdelovanje tal vplivajo tako na velikost, aktivnost kot tudi na strukturo mikrobne združbe v barjanskih tleh. Predvidevali smo, da hranjenje tal pri 4°C za daljše obdobje povzroči spremembe aktivnosti in strukture mikrobne združbe. Po do sedaj objavljenih raziskavah je tehnika T-RFLP izredno primerna za zaznavanje razlik med mikrobnimi združbami in zato smo pričakovali, da bomo razlike zaznali, v kolikor obstajajo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 EKSPERIMENTALNO POLJE IN VZORČENJE TAL

Vzorci tal smo odvzeli konec avgusta 2003 in marca 2004 na eksperimentalnem polju v Tomišlju. Vzorci smo odvzeli na 8 podenotah eksperimentalnega polja, ki se razlikujejo v višini podtalnice, deležu ogljika in rabi tal. Vsako od podenot smo vzorčili tako, da smo v mreži 3x4 m odvzeli 25-30 sredic na globini 0-30 cm. Vzorci posamezne podenote smo združili v skupen vzorec. Tla smo homogenizirali skozi sito s premerom 4 mm in jih shranili v plastičnih vrečkah pri temperaturi 4°C. Vzorci tal za izolacijo DNA (15x po 1 g svežih tal) smo shranili v sterilnih mikrocentrifugirkah pri -20°C.



Slika 2: Shema eksperimentalnega polja v Tomišlju na Ljubljanskem barju in vzorčevalna mesta s podanimi karakteristikami

LEGENDA:

PT- polje, spremenjeno v travnik, T- travnik, VP- višja podtalnica, NP- nižja podtalnica, NC-nižji delež organskega ogljika, VC- višji delež organskega ogljika

3.2 ZNAČILNOSTI TAL

3.2.1 pH tal

pH ima velik vpliv na biokemijske lastnosti znotraj in zunaj celičnih encimov, na pH gradient med notranjostjo in zunanostjo celic, topnost mineralov v tleh, obliko amonijskega dušika in topnost CO₂. Določali smo aktivno in potencialno kislost talnega vzorca. Aktivna kislost je dejanska kislost talne suspenzije, potencialna kislost pa vključuje še vse H⁺ ione, ki so vezani na talne koloide. Za določanje aktivne kislosti smo v stekleno čašo zatehtali 5 g vzorca in dodali 12 ml dH₂O. Premešali smo s stekleno palčko in izmerili pH s pomočjo pH lističev. Po 1 uri smo suspenzijo prelili v stekleno posodo in izmerili pH s pH-metrom. Potentialno kislost smo izmerili na enak način, le da smo dH₂O nadomestili z 12 ml 1M KCl. Poskus smo izvedli v dveh ponovitvah.

3.2.2 Vlažnost tal

Opisuje trenutno vodno stanje tal, saj se vlažnost spreminja v odvisnosti od vremenskih razmer in letnih časov. Stehtali smo stekleno petrijevko, vanjo zatehtali cca. 25 g svežih homogeniziranih tal in zopet stehtali. Maso posušenih tal smo določili po sušenju v pečici pri 105°C preko noči in ponovnem tehtanju. Delali smo v dveh ponovitvah. Vlažnost smo izračunali: $\text{vlažnost} = \frac{(m_{\text{tal}} - m_{\text{suhih tal}})}{m_{\text{suhih tal}}}$.

3.2.3 Sposobnost zadrževanja vode v tleh (WHC)

WHC (water holding capacity) vpliva na mikrobno aktivnost, ker vpliva na prezračevost tal in dostopnost hranil. Različni deleži WHC se uporabljajo za zagotavljanje enake stopnje vlažnosti v eksperimentih. Na dno Kopetckijevih lončkov smo naložili plast papirnate brisače, cedilo z brisačo popolnoma navlažili in stehtali. Dodali smo vzorec tal do 2 cm pod robom, ponovno stehtali in lončke potopili v čašo z dH₂O. Čašo smo pokrili z aluminijasto folijo in lončke namakali v vodni kopeli preko noči. Delali smo v dveh ponovitvah. Po namakanju smo dali Kopetckijeve lončke na odcejanje, jih pokrili z alu-folijo in vsako uro tehtali. Ko se je

teža ustalila, smo uporabili zadnjo meritev kot podatek pri računanju mase v tleh zadržane vode. WHC smo izračunali po formuli: $WHC = (m_{\text{v tleh zadržana voda}} + m_{\text{nevezana voda}}) / m_{\text{suhih tal}}$. Maso celokupne v tleh zadržane vode smo opredelili kot 100% WHC.

Trenutni WHC je drugačna oblika zapisa za vlažnost in ga izračunamo: $WHC = \text{vlažnost (g H}_2\text{O/ g suhih tal)} / 100\% \text{ WHC (g H}_2\text{O/ g suhih tal)}$.

3.3 MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE

3.3.1 S substratom inducirana respiracija (SIR)

SIR meri odziv mikrobne združbe na lahko dostopen vir energije, kot je npr. glukoza. Metoda temelji na domnevi, da večina aktivnih mikroorganizmov takoj začne presnavljati dodano glukozo do CO_2 . Za vsak vzorec smo v štiri serumske stekleničke zatehtali po 25 g tal in jih navlažili do 70% WHC. V dve steklenički smo dodali glukozo (0,5 g glukoze v vodni raztopini, ki smo jo dodali do 70% WHC), dve pa sta predstavljali kontrolo z vodo brez glukoze. Stekleničke smo tesno zaprli. SIR smo merili preko produkcije CO_2 na plinskem kromatografu (Becker Gas Chromatograph, Model 417) takoj po dodatku substrata in po 3 urah. Stopnjo respiracije smo izrazili kot μl nastalega CO_2 na gram suhih tal v 1 uri.

3.3.2 Dehidrogenazna aktivnost

Dehidrogenazni encimi sodelujejo v reakcijah Krebsovega cikla in drugih reakcijah celičnega metabolizma. Njihovo aktivnost merimo s spektrofotometričnim ugotavljanjem redukcije TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium klorid) do TTF (2,3,5-trifeniltetrazolium formazan). 5 g svežih tal smo zatehtali v 50 ml centrifugirke in dodali 5 ml raztopine TTC (8mg/ml) v 100 mM Tris-HCl pufri, pH=7,7. Centrifugirke smo tesno zaprli, jih zavili v alu-folijo in inkubirali pri 30°C 24 h v temi na rotacijskem stresalniku pri 100 obratih na minuto. Kontrola je vsebovala 5 g tal in 5 ml Tris-HCl pufra brez TTC. Po inkubaciji smo nastali TTF ekstrahirali z dodatkom 40 ml acetona v vsako centrifugirko in jo temeljito pretresli z roko. Inkubirali smo jih še 2 uri na sobni temperaturi v temi in jih vsakih 20 min temeljito pretresli. Po končani

inkubaciji smo jih 5 min centrifugirali pri 3000 g in izmerili absorbanco supernatanta pri 540 nm.

Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo 15 znanih zatehtanih količin TTF raztopili v Tris-HCl pufri, pH=7,7, raztopili v acetonu in pet krat izmerili absorbcijo pri 540 nm. Skupno mikrobno aktivnost smo opredelili kot g nastalega TTF/g suhih tal v 1 uri.

3.4 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE

3.4.1 Izolacija skupne mikrobne DNA iz tal

Skupno mikrobno DNA smo izolirali iz vzorcev velikosti 0,5 g tal s kompletom Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Solana Beach, California) po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo v 1,5% agaroznem gelu.

3.4.2 Kvantifikacija skupne mikrobne DNA izolirane iz tal

Za ugotavljanje koncentracije DNA smo uporabili merjenje absorbcije pri valovnih dolžinah 230, 260 in 280nm. Nukleinske kisline imajo svoj absorpcijski maksimum pri 260nm. Izmerjena $A_{260}=1$ pomeni, da je v vzorcu koncentracija dvoverižne DNA 50 μ g/ml. Absorbcija svetlobe je linearno odvisna od koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu, dokler so vrednosti absorbance pod 1. Razmerje med A_{260} in A_{280} in med A_{260} in A_{230} nam pove, kako čist je vzorec. Pri čistem vzorcu DNA je razmerje $A_{260} : A_{280} = 1,8-2,0$ in razmerje $A_{260} : A_{230}$ manjše od 0,45. Kontaminacija vzorca s proteini oz. ogljikovimi hidrati to razmerje spremeni.

3.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pomnoževali smo cca. 900 bp dolg del gena za 16S rRNA. Uporabili smo začetna nukleotida, ki sta se v raziskavi Liuja s sod. (1997) izkazala za najprimernejša. Začetni oligonukleotid

27f smo označili s fluorokromom 6-FAM, začetni oligonukleotid Pol-927R pa je ostal neoznačen. Za pomnoževanje smo v 25 μ l reakciji uporabili:

- 1 μ l 27f-FAM začetni oligonukleotid (10 μ M, končna koncentracija 0,4 μ M),
- 1 μ l Pol927R začetni oligonukleotid (10 μ M, končna koncentracija 0,4 μ M),
- 2,5 μ l pufer B (10x, končna koncentracija 1x),
- 3,75 μ l MgCl₂ (25mM, končna koncentracija 3,75mM),
- 2,5 μ l dNTP (2mM, končna koncentracija 0,2 μ M),
- 1 μ l BSA (10mg/ml, končna koncentracija 0,4 mg/ml),
- 12,55 μ l sterilna MiliQ voda ,
- 1 μ l Taq polimeraza (5U/ μ l, končna koncentracija 0,2 U/ μ l),
- 1,5 μ l izolirane DNA iz tal (neredčena in 10x redčena)

Pomnoževanje smo izvedli po sledečem protokolu:

- Začetna denaturacija pri 95°C, 5min,
- Denaturacija pri 95°C, 1min ,
- Prileganje pri 52°C, 1min, 35 ciklov
- Podaljševanje pri 72°C, 2min,
- Končno podaljševanje pri 72°C, 10 min,
- Hlajenje pri 4°C

Dve ponovitvi reakcije PCR v kateri smo pomnožili del bakterijskega gena za 16S rRNA iz istega vzorca DNA smo združili, premešali in alikvote analizirali z gelsko elektroforezo (1,5%wt/vol). S tem smo potrdili ustrezno čistost in velikost pomnoženih delov genov za 16S rRNA in njihovo količino ocenili s primerjavo z molekularnim standardom.

3.4.4 Restrikcija

V restriksijsko mešanico smo dodali toliko pomnožka PCR, da je bilo v njej približno 200 ng DNA in jo razrezali s tetramerno endonukleazo *HaeIII* (*Bsu*RI, GG'CC, MBI Fermentas,

Litva) v ločenih reakcijah v pufrih istega proizvajalca, ki omogočajo največjo aktivnost encima. Dodali smo 10U restrikcijske endonukleaze. Rezanje je potekalo preko noči pri 37°C. Po rezanju smo restrikcijsko mešanico inaktivirali 15 minut pri 80°C.

Soli in inaktivirane encime smo odstranili z etanolno precipitacijo z Na-acetatom v hladnem (Ausubel s sod.1991):

- Izmerili smo volumen DNA raztopine, dodali 1/10 volumna 3 M Na acetata in premešali z obračanjem mikrocentrifugirke.
- Dodali smo 2 volumna ledeno hladnega 100 % etanola, premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in pustili 20 minut na ledu.
- Centrifugirali smo 30 minut pri 0°C in 14,000g.
- Odstranili smo supernatant in dodali 500 ml ledeno hladnega 70 % etanola.
- Centrifugirali smo 10 minut pri 4°C in 14,000g.
- Odstranili smo etanol in oborjeno DNA posušili na zraku.

Po čiščenju in odstranitvi etanola smo vzorce shranili v temi pri –20°C.

3.4.5 Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih fragmentov s kapilarno elektroforezo ABI 310

Alikvote (2 µl) inaktivirane restrikcijske mešanice smo zmešali z 2 µl deioniziranega formamida, 0,5 µl pufru za nalaganje in 2,0 µl DNA standarda (TAMRA 1000 fragment length standard, PE Biosystems). Pred nalaganjem smo vzorce denaturirali 5 min pri 94°C in jih takoj ohladili na ledu. Alikvote po 2,5 µl smo pod standardnimi pogoji proizvajalca elektrokinetično injicirali v kapilarno elektroforezo.

3.4.6 Analiza kromatogramov

Profile T-RFLP smo primerjali v mejah velikosti pomnožkov PCR, od 1-1000bp gena za 16S rRNA bakterij. Pri tem smo upoštevali naslednje omejitve:

- Analizirali smo T-RF tistih vzorcev, katerih skupna fluorescenca je presegla mejo 10,000 enot. To so bili vsi vzorci.
- Zaradi interference z začetnimi oligonukleotidi smo izločili fragmente, manjše od 50bp.
- Upoštevali smo le fragmente, katerih fluorescenca je presegla 50 enot. Tako smo jih ločili od ozadja.
- Izločili smo fragmente, katerih relativni delež je bil manjši od 0,5% celokupne fluorescence vzorca.

Dobljene T-RFLP profile smo analizirali s programi GenScan in Genotyper (Applied Biosystems). Mikrobne združbe smo opredelili s številom vrhov signala in z višino posameznega vrha (fluorescenca). Izračunali smo relativne deleže posameznih vrhov glede na skupno fluorescenca vseh vrhov enega vzorca. Podobnost T-RFLP profilov (prisotnost/odsotnost vrhov in njihova fluorescenca) smo primerjali s programom Bio Numerics 3.0 (Applied Maths, Belgija). Program analizira podatke z metodo UPGMA (metoda neponderirane aritmetične sredine). To je distančna metoda za risanje filogenetskega drevesa. Osnova za izračun dendrograma je matrika parnih razdalj med taksoni. Algoritem metode je tak, da poišče najkrajšo razdaljo med taksonoma v matriki in ju združi v nov takson. Algoritem se ponavlja, dokler niso združeni vsi taksoni. Rezultat je koreninjeno drevo.

3.5 MATERIALI

3.5.1 Reagenti

- Aceton (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Agaroza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- Bromfenolmodro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- deionizirani formamid (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- dNTP set (MBI Fermentas, Litva),
- EDTA (Fluka, St. Gallen, Switzerland),
- Etanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Etidijev bromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix, #SMO333 in #SMO248 (MBI Fermentas, Litva),
- Glicerol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- KCl (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- ledocetne kislina (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Na acetat (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Saharoza (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Tris Base (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Tris HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- TAMRA 1000 fragment length standard, PE Biosystems, UK),
- TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- TTF (2,3,5-triphenyltetrazolium formazan, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

3.5.2 Kompleti

Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO, CA, USA)

3.5.3 Encimi

- Taq polimeraza s pripadajočim 10x purom B in $MgCl_2$, (Promega, Madison, WI, ZDA),
- *Hae*III s pripadajočimi pufri (MBI Fermentas, Litva)

3.5.4 Pufri in raztopine

TAE pufer 50x (Sambrook in Russel, 2001):

- 242 g Tris Base,
- 37,1 ml ledocetne kisline,
- 100 ml 0,5M EDTA pH=8,
- dH_2O do 1000 ml, skupni pH=8,5

Tris-HCl pufer 100 mM, pH=7,7:

- 1,66 g Tris Base,
- 5,72 g Tris HCl
- dH_2O do 500 ml

Nalagalni pufer za gelsko elektroforezo (5X):

- 50 % (wt/vol) saharoza,
- 0,1 % (wt/vol) bromfenolmodro

Etidijev bromid (10X), (Ausubel s sod., 1991)

- 5 mg/l (wt/vol) raztopina etidijevega bromida v dH_2O

3.5.5 Začetni oligonukleotidi (sintetizirani po naših navodilih v Applied Biosystems, UK)

- 27f-FAM: 5' 6-FAM-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3', $T_m=51,6^\circ C$,
- Pol 927R: 5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3', $T_m=46,5^\circ C$

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI TAL

4.1.1 pH tal

Preglednica 1: pH vrednosti barjanskih tal: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C (avgust+6M) in marčevski vzorci. Podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje.

vzorec	aktivna kislost			potencialna kislost		
	avgust	avgust+6M	marec	avgust	avgust+6M	marec
1	6,7±0,05	6,7±0	6,6±0,1	6,6±0	6,5±0	6,4±0,1
2	6,6±0,05	6,6±0	6,6±0,1	6,5±0	6,5±0	6,3±0,05
3	6,7±0,1	6,7±0,05	6,6±0,1	6,5±0	6,5±0,05	6,3±0
4	6,7±0	6,6±0,1	6,5±0,05	6,4±0,05	6,4±0,05	6,2±0
5	6,7±0	6,6±0,1	6,6±0,05	6,4±0,1	6,3±0,05	6,3±0
6	6,8±0,05	6,7±0	6,7±0,1	6,5±0,1	6,5±0	6,4±0
7	6,8±0,1	6,8±0	6,7±0	6,5±0,1	6,5±0	6,4±0,05
8	6,8±0,05	6,8±0,05	6,7±0	6,6±0,1	6,4±0	6,3±0

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-VP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC: travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

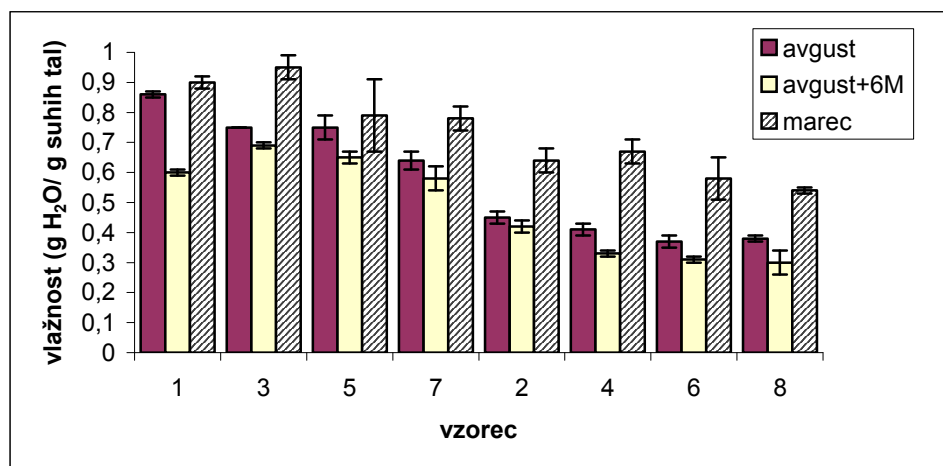
pH vzorcev tal je skoraj nevtralen, med vzorci pa ni opaziti bistvenih razlik. Potencialni pH je nekoliko nižji, kar je pričakovano, saj s KCl sprostimo nekatere ione, ki doprinesejo h kislosti. Spremembe aktivnega pH v tleh, ki so manjše od 0,5 pH enote ne vplivajo bistveno na mikrobne procese. Tla kot celota so namreč zelo kompleksen in heterogen sistem, v katerem je ogromno mikroniš, ki se lahko bistveno razlikujejo med seboj.

4.1.2 Vlažnost tal

Vlažnost tal opisuje trenutno vodno stanje tal in se spreminja v odvisnosti od vremenskih pojavov in letnih časov.

Preglednica 2: Vlažnost vzorcev barjanskih tal: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C (avgust+6M) in marčevski vzorci. Podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje.

vzorec	vlažnost avgust (g H ₂ O/ g suhih tal)	vlažnost avgust+6M (g H ₂ O/ g suhih tal)	vlažnost marec (g H ₂ O/ g suhih tal)
1	0,86±0,01	0,60±0,01	0,90±0,02
2	0,45±0,02	0,42±0,02	0,64±0,04
3	0,75±0	0,69±0,01	0,95±0,04
4	0,41±0,02	0,33±0,01	0,67±0,04
5	0,75±0,04	0,65±0,02	0,79±0,12
6	0,37±0,02	0,31±0,01	0,58±0,07
7	0,64±0,03	0,58±0,04	0,78±0,04
8	0,38±0,01	0,30±0,04	0,54±0,01



Slika 3: Vlažnost vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-VP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC: travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

Ugotovili smo, da imajo marčevski vzorci tal največji delež vlažnosti. To je v skladu s pričakovanji, saj je bilo v obdobju pred marcem veliko padavin, poleg tega se je topil tudi

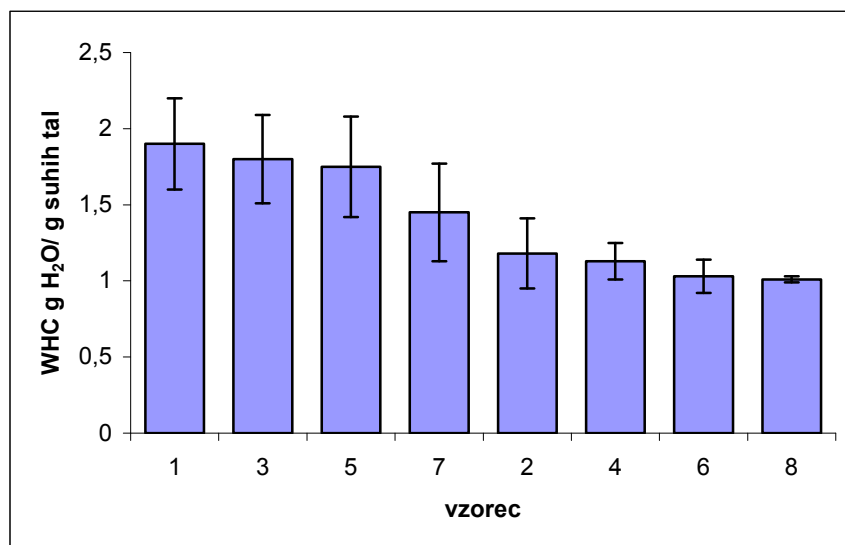
sneg. Avgustovski vzorci tal so bili nabrani po izredno sušnem poletnem obdobju in je tako njihov delež vlažnosti v primerjavi z marčevskimi vzorci tal manjši. Delež vlage se je po šest mesečnem shranjevanju avgustovskih vzorcev tal v plastičnih vrečkah pri 4°C še nekoliko zmanjšal. Glede na nivo podtalnice bi pričakovali večji delež vlažnosti v vzorcih tal 1, 2, 3 in 4, manjšega pa v vzorcih tal 5, 6, 7 in 8. Rezultati pa kažejo, da imajo največji delež vlage vzorci tal 1, 3, 5 in 7. To so vzorci, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika. Največji delež vlažnosti ima vzorec tal 3, ki ima na eksperimentalnem polju takšno lego, da je v območju višje podtalnice, poleg tega pa je tudi 100 % WHC tega vzorca tal drugi največji. Najmanjši delež vlažnosti ima vzorca tal 6 in 8, ki ležita na območju nizke podtalnice in imata najmanjšo 100 % WHC. Če pa primerjamo med seboj vzorce, ki se razlikujejo le v nivoju podtalnice in ne tudi v deležu organskega ogljika (vzorca 1 in 3 v primerjavi z vzorcema 5 in 7; vzorca 2 in 4 v primerjavi z vzorcema 6 in 8), pa ugotovimo, da imajo vzorci v območju višje podtalnice večji delež vlažnosti.

4.1.3 Sposobnost zadrževanja vode v tleh (WHC)

WHC je odvisna predvsem od teksture tal in vsebnosti organskega ogljika v tleh. Glinena tla imajo zaradi koloidne narave delcev veliko kapaciteto zadrževanja vode, peščena pa majhno.

Preglednica 3: Sposobnost zadrževanja vode v tleh in trenutna vlažnost podana v enotah WHC (trenutna sposobnost zadrževanja vode) v tleh za barjanska tla: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 8 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci, podana je povprečna vrednost dveh meritev in odstopanje.

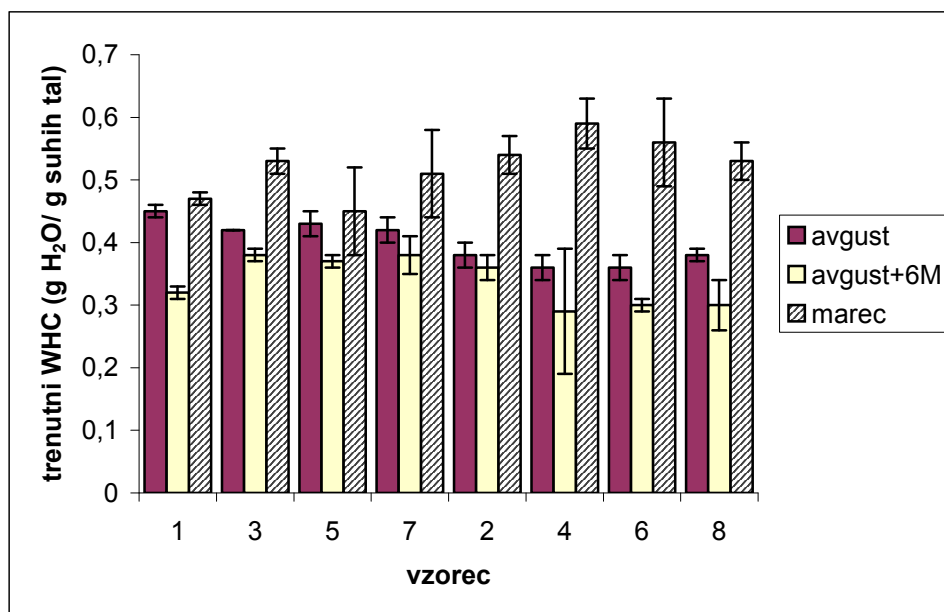
vzorec	100% WHC (g H ₂ O/g suhih tal)	trenutni WHC avgust (g H ₂ O/ g suhih tal)	trenutni WHC avgust+6M (g H ₂ O/ g suhih tal)	trenutni WHC marec (g H ₂ O/ g suhih tal)
1	1,9±0,3	0,45±0,01	0,32±0,01	0,47±0,01
2	1,18±0,23	0,38±0,02	0,36±0,02	0,54±0,03
3	1,8±0,29	0,42±0	0,38±0,01	0,53±0,02
4	1,13±0,12	0,36±0,02	0,29±0,01	0,59±0,04
5	1,75±0,33	0,43±0,02	0,37±0,01	0,45±0,07
6	1,03±0,11	0,36±0,02	0,30±0,01	0,56±0,07
7	1,54±0,32	0,42±0,02	0,38±0,03	0,51±0,07
8	1,01±0,02	0,38±0,01	0,30±0,04	0,53±0,03



Slika 4: Sposobnost zadrževanja vode v barjanskih tleh

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-VP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC: travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

Ugotovili smo, da imajo večjo kapaciteto zadrževanja vode v tleh vzorci 1, 3, 5 in 7, manjšo pa vzorci 2, 4, 6 in 8. Ti skupini vzorcev tal se razlikujeta tudi glede na delež organskega ogljika v tleh. Prva skupina vzorcev tal vsebuje večji delež organskega ogljika. Verjetno gre za večji delež šote, ki dobro zadržuje vodo in tako je posledično kapaciteta zadrževanja vode v teh tleh večja. Vzorci 2, 4, 6 in 8 pa vsebujejo manjši delež organskega ogljika in imajo manjšo sposobnost zadrževanja vode v tleh.



Slika 5: Trenutna vlažnost v enotah WHC barjanskih tal v treh časovnih obdobjih

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-VP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC: travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

Trenutni delež WHC je drugačen zapis za trenutno vlažnost. Uporabljamo ga kot dodatno informacijo.

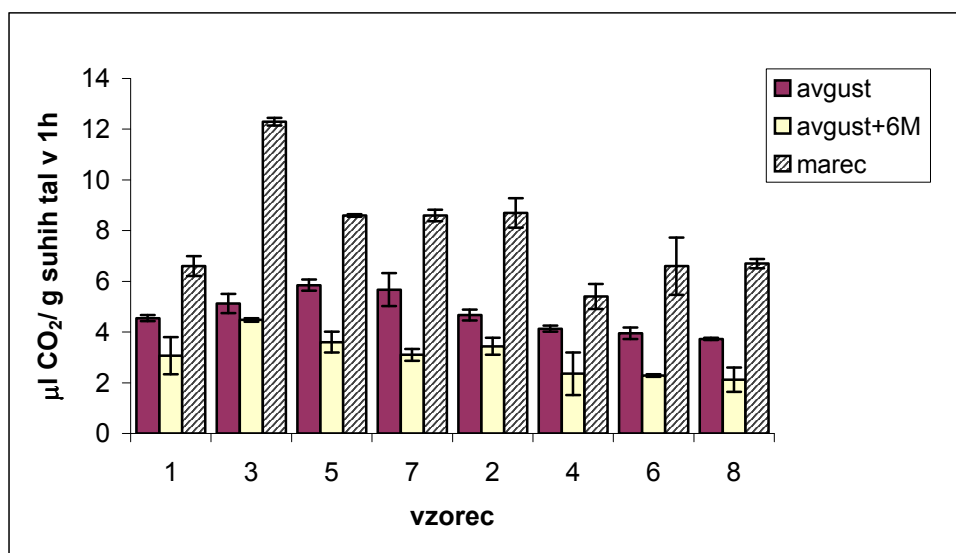
4.2 MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE

4.2.1 S substratom inducirana respiracija (SIR)

S substratom inducirano respiracijo smo ugotavljali kot količino nastalega CO₂ po dodatku glukoze v vzorec. Rezultat smo podali kot μl nastalega CO₂ na gram suhih tal v eni uri.

Preglednica 4: Aktivnost mikrobne združbe merjena s SIR v avgustovskih vzorcih, avgustovskih vzorcih shranjenih 6 mesecev pri 4°C in marčevskih vzorcih; podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje

vzorec	avgust ($\mu\text{l CO}_2/\text{g}$ suhih tal v 1h)	avgust+6M ($\mu\text{l CO}_2/\text{g}$ suhih tal v 1h)	marec ($\mu\text{l CO}_2/\text{g}$ suhih tal v 1h)
1	4,55±0,12	3,07±0,73	6,6±0,39
2	4,67±0,21	3,44±0,33	8,7±0,58
3	5,13±0,038	4,46±0,07	12,3±0,15
4	4,13±0,012	2,36±0,84	5,4±0,49
5	5,85±0,022	3,60±0,41	8,6±0,05
6	3,95±0,23	2,29±0,05	6,6±1,13
7	5,67±0,65	3,10±0,23	8,6±0,23
8	3,73±0,05	2,12±0,48	6,7±0,18



Slika 6: S substratom inducirana respiracija vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-NP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC: travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

S substratom inducirana respiracija je bila največja v vzorcih tal, odvzetih v marcu. Mikrobna aktivnost, merjena s SIR v tleh, odvzetih avgusta, je bil manjša kot v marčevskih vzorcih. Del vzorcev, odvzetih v avgustu, je bil pol leta shranjen pri 4°C. Aktivnost merjena s SIR se je v

primerjavi s svežimi vzorci zmanjšala. Torej shranjevanje vzorcev povzroči zmanjšanje aktivnosti, merjene s SIR:

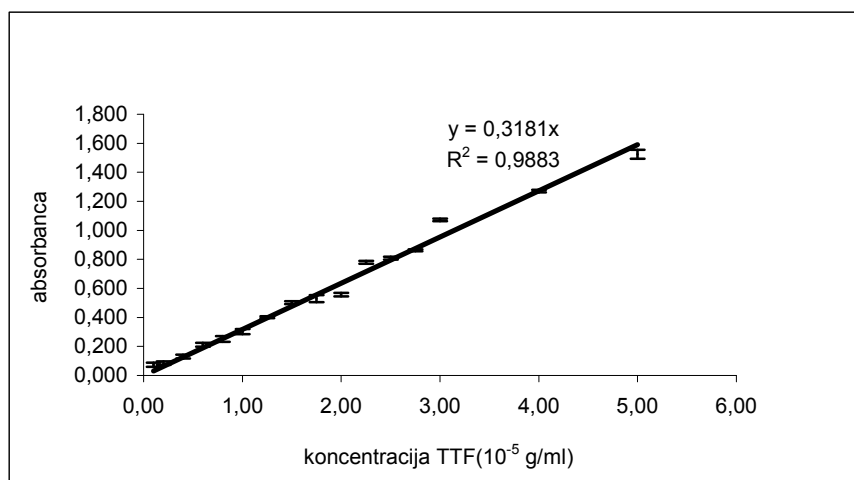
Vzorci tal 1, 3, 5 in 7 so vzorci tal, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika kot vzorci tal 2, 4, 6 in 8. Podatki, pridobljeni v tem poskusu kažejo, da je aktivnost mikrobne združbe, merjena z metodo SIR največja pri vzorcih tal 3, 5 in 7, najnižja pa je pri vzorcih tal 4, 6 in 8. To je v skladu s pričakovanji, saj je v tleh, ki vsebujejo več organskega ogljika več substratov, ki jih mikroorganizmi lahko uporabijo kot vir hranil. Tako je biomasa v takšnih tleh običajno večja (Sylvia s sod., 1998).

Vzorci tal 1, 2, 7 in 8 izhajajo iz tal, ki so bila pred desetimi leti obdelovana. Vzorci tal 3, 4, 5 in 6 pa so vzorci tal, ki so vseskozi travnik. Če primerjamo vzorce, ki se razlikujejo le v rabi tal ugotovimo, da se mikrobna aktivnost merjena s SIR v nekoč obdelovanih tleh v nekaterih vzorcih manjša (1:3, 6:8), pri nekaterih večja (2:4), pri nekaterih pa ni bistvenih razlik (5:7). Na podlagi podatkov, pridobljenih v tem poskusu, ne moremo zagotovo trditi, da obstaja povezava med obdelovanjem tal in aktivnostjo mikrobne združbe, merjene z metodo SIR.

Pri polovici vzorcev na območju višje podtalnice je aktivnost, merjena s SIR večja kot pri nasproti ležečih vzorcih z nižjo podtalnico (3:5, 2:8), pri nekaterih manjša (1:7), pri nekaterih pa ni opaznih razlik (4:6). Rezultati konsistentno ne kažejo v eno smer, zato ne moremo trditi, da višina podtalnice vpliva na aktivnost mikrobne združbe v tleh.

4.2.2 Dehidrogenazna aktivnost

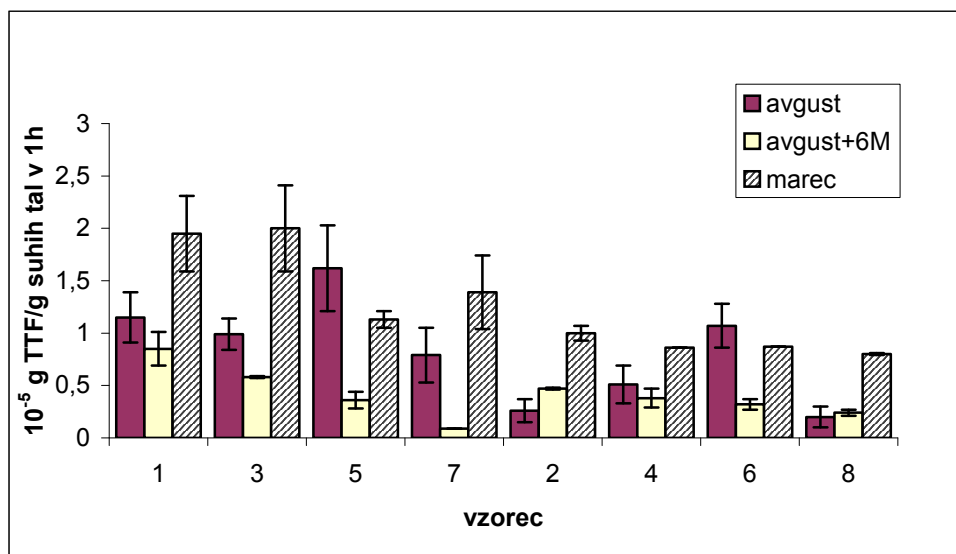
Dehidrogenazno aktivnost smo merili s spektrofotometričnim merjenjem redukcije TTC do TTF. Na podlagi izdelane umeritvene krivulje smo jo podali kot 10^{-5} g nastalega TTF na gram suhih tal v 1 uri.



Slika 7: Odvisnost absorbance raztopine TTF v acetonu od njene koncentracije

Preglednica 5: Dehidrogenazna aktivnost merjena na podlagi nastanka TTF iz TTC za barjanska tla: avgustovski vzorci, avgustovski vzorci shranjeni 6 mesecev pri 4°C in marčevski vzorci, podane so povprečne vrednosti dveh meritev in odstopanje

vzorec	avgust (10 ⁻⁵ g TTF/g suhih tal v 1h)	avgust+6M (10 ⁻⁵ g TTF/g suhih tal v 1h)	marec (10 ⁻⁵ g TTF/g suhih tal v 1h)
1	1,15±0,24	0,85±0,16	1,95±0,36
2	0,26±0,11	0,47±0,01	1±0,07
3	0,99±0,15	0,58±0,01	2±0,41
4	0,51±0,18	0,38±0,09	0,86±0
5	1,62±0,41	0,36±0,08	1,13±0,08
6	1,07±0,21	0,32±0,05	0,87±0
7	0,79±0,26	0,09±0	1,39±0,35
8	0,2±0,1	0,24±0,03	0,8±0,01



Slika 8: Dehidrogenazna aktivnost vzorcev barjanskih tal v treh časovnih obdobjih

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **2** PT-VP-NC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **4** T-VP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **5** T-NP-VC- travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC- travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **7** PT-NP-VC- polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC- polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

Ugotovili smo, da je skupna dehidrogenazna aktivnost v barjanskih tleh največja v marcu. Mikrobna aktivnost v vzorcih tal, odvzetih v avgustu je manjša, po šest mesečnem shranjevanju pa se še zmanjša. Podatki za avgustovska vzorca 2 in 8 odstopajo od ostalih rezultatov, vendar to lahko pripišemo napaki pri izvedbi eksperimenta.

Dehidrogenazna aktivnost mikrobne združbe je večja v tleh, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika (vzorci tal 1, 3, 5 in 7).

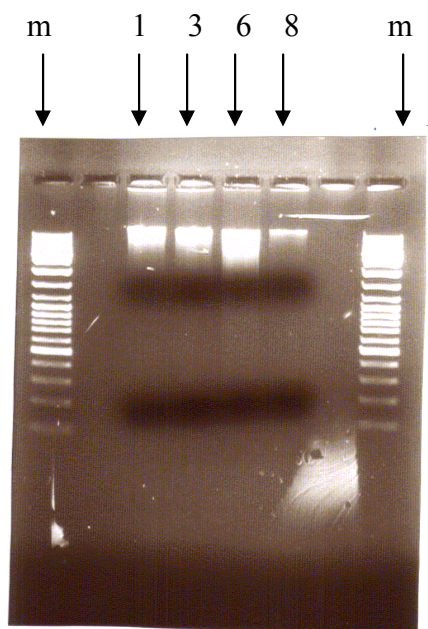
Med obdelovanjem tal in aktivnostjo mikrobne združbe v tleh ne moremo potegniti vzporednice, saj je pri polovici vzorcev tal aktivnost v nekoč obdelovanih tleh nižja (1:3, 8:6), pri polovici pa višja (2:4, 7:5).

Podatki nakazujejo, da je skupna mikrobna aktivnost višja pri vzorcih z višjo podtalnico (1:7, 3:5, 2:8), če so ostali parametri nespremenjeni.

4.3 PESTROST MIKROBNE ZDRUŽBE

4.3.1 Izolacija in kvantifikacija skupne mikrobne DNA iz tal

Skupno mikrobno DNA smo izolirali iz vzorcev, ki so vsebovali 0,5 g tal s kompletom Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit po navodilih proizvajalca. Z gelsko elektroforezo (1,5%wt/vol) smo ugotovili, da je bila izolacija uspešna. Čistost DNA smo ocenili kot ustrezno, saj je bilo razmerje $A_{260}/A_{280}=2, \pm 0,2$ in razmerje $A_{260}/A_{230}=0,5 \pm 0,1$.



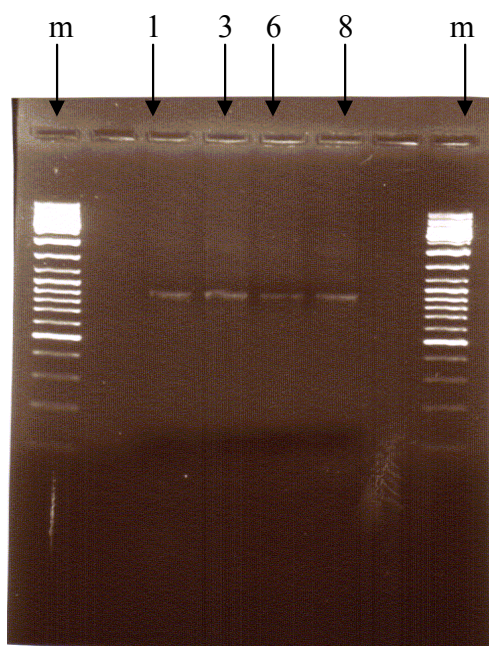
Slika 9: Elektroforetski gel izolirane DNA. Nanešeni so (od leve proti desni) marker velikosti SMO#333, DNA izolirana iz avgustovskih vzorcev 1, 3, 6 in 8, marker velikosti SMO#333.

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

4.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pomnoževanje delov ribosomskih genov iz skupne mikrobne DNA iz vzorcev tal, odvzetih na eksperimentalnem polju avgusta in istih vzorcev, shranjenih pri 4°C, je bilo z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi uspešno. Z agarozno gelsko elektroforezo (1,5%wt/vol) smo

potrdili nastanek pričakovanega pomnožka dolžine 900 bp. Pomnoževanje je bilo uspešno v primeru dodajanje neredčene in 10x redčene matrične DNA. Izvajali smo tudi kontrolno PCR reakcijo, s katero smo potrjevali primernost iskanega fragmenta. Koncentracijo PCR produktov smo ugotavljali s primerjavo z velikostnim molekularnim DNA standardom, katerega fragmenti imajo znano koncentracijo DNA. Koncentracije DNA v PCR produktih so bile različne (16-26ngDNA/ μ l), kar smo kasneje upoštevali pri sestavi restrikcijskih mešanic.



Slika 10: Elektroforetski gel PCR produktov. Nanešeni so (od leve proti desni) marker SMO#333, PCR produkti iz avgustovskih vzorcev 1, 3, 6 in 8, marker SMO#333.

Legenda vzorcev: **1** PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **3** T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; **6** T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; **8** PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika

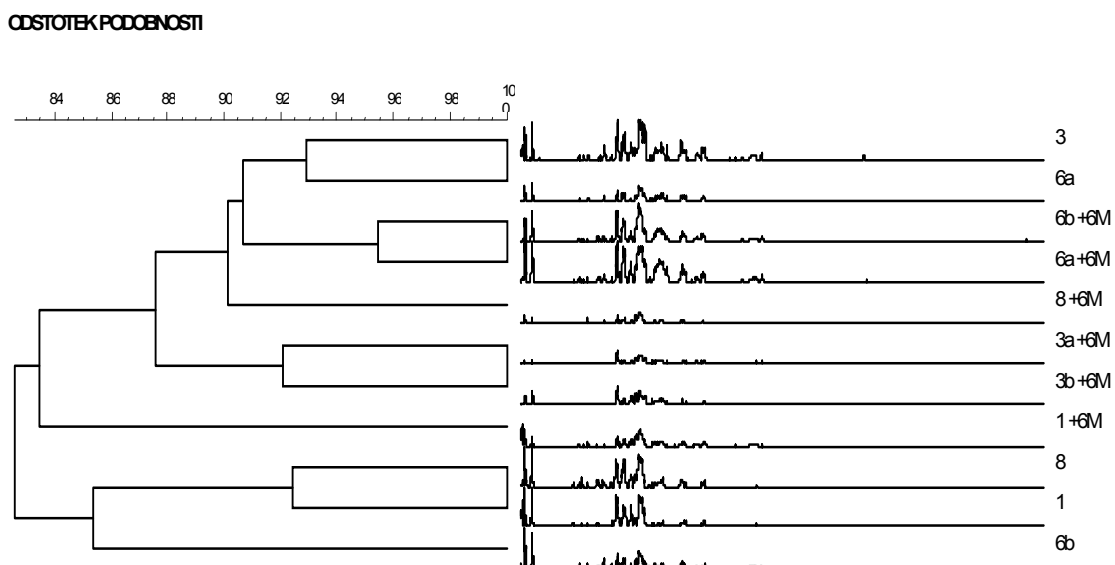
4.3.3 Analiza T-RFLP fragmentov

S tehniko T-RFLP smo pridobili profile terminalnih fragmentov gena za 16S rRNA in na osnovi le-teh proučevali strukturo mikrobne združbe štirih vzorcev tal: 1, 3, 6 in 8 vzorčenih avgusta. Proučevali smo strukturo svežih vzorcev in vzorcev, ki so bili pol leta shranjeni pri 4°C. PCR pomnožke smo rezali z endonukleazo *Hae*III. Rezultat ločevanja s kapilarno elektroforezo so elektroferogrami in podatki o velikosti fragmentov in njihovi fluorescenci.

Podobnost profilov T-RFLP bakterijskih združb smo ugotavljali z računalniškim programom Bionumerics 3.0.

	3	6a	6b+6M	6a+6M	8+6M	3a+6M	3b+6M	1+6M	8	1	6b
3	100,00										
6a	92,89	100,00									
6b+6M	89,06	90,47	100,00								
6a+6M	91,44	91,69	95,43	100,00							
8+6M	89,05	90,51	91,99	89,14	100,00						
3a+6M	86,13	83,66	87,82	86,48	86,13	100,00					
3b+6M	90,09	85,55	89,62	91,13	88,99	92,07	100,00				
1+6M	84,92	79,98	82,51	82,25	87,96	81,57	85,00	100,00			
8	84,24	87,10	89,96	86,69	87,58	71,87	81,27	78,97	100,00		
1	87,31	82,46	84,03	83,51	83,58	74,02	82,97	85,39	92,41	100,00	
6b	84,41	90,36	83,49	85,11	83,28	68,31	78,80	76,29	88,31	82,34	100,00

Slika 11: Distančna matrika preučevanih vzorcev



Slika 12: Dendrogram in elektroferogrami preučevanih vzorcev

Legenda vzorcev: 1, svež avgustovski vzorec, PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 3, svež avgustovski vzorec T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 6a in 6b, paralelki svežega avgustovskega vzorca, T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; 8 PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika, 1+6M, šest mesecev pri 4°C shranjen avgustovski vzorec, PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 3a+6M in 3b+6M, paralelki šest mesecev pri 4°C shranjenega avgustovskega vzorca T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 6a+6M in 6b+6M, paralelki šest mesecev pri 4°C shranjenega avgustovskega vzorca, T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; 8+6M, šest mesecev pri 4°C shranjen avgustovski vzorec, PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika,

Ugotovili smo, da so si mikrobne združbe svežih in pri 4°C shranjenih vzorcev dokaj podobne in sicer 82 %, ter da tvorijo dve skupini.

V eni skupini so sveži vzorci 1 (polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika), 6b (travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika) in 8 (polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika). Strukturi združb v vzorcih 1 in 8 sta si 93 % podobni, struktura združbe v vzorcu 6b jima je 83 % podobna.

V drugi skupini so združbe iz avgustovskih svežih vzorcev 3 (travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika) in 6a (travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika) ter združbe iz pri 4°C shranjenih avgustovskih vzorcev 1 (polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika), 3a in 3b (travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika), 6a in 6b (travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika) in 8 (polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika). Mikrobne združbe v pri 4°C shranjenih vzorcih so si 83 % podobne. Združbe v vzorcih 6a in 6b so si 95 % podobne, v vzorcih 3a in 3b pa 92 %, Združbe v vzorcu 8 polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika so 90 % podobne združbam v vzorcih 6a in 6b in 88 % združbam v vzorcih 3a in 3b. Združbe v vzorcu 1 kažejo 83 % podobnost z ostalimi združbami v shranjenih vzorcih. Združbe v svežih vzorcih 3 in 6a so si 93 % podobne, shranjenim vzorcem pa so 91 % podobne.

Med mikrobnimi združbami v paralelkah istega vzorca smo v dveh primerih ugotovili veliko podobnost (shranjena 3a in 3b (travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika) – 92 % podobnost, shranjena 6a in 6b (travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika) – 95 % podobnost), združbe v paralelkah 6a in 6b (travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika) iz svežih vzorcev pa kažejo le 83 % podobnost.

Enostavno razvidnega vpliva proučevanih dejavnikov na pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh nismo mogli ugotoviti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Barja so posebni tipi življenjskega okolja, za katera je značilno stalno ali občasno zastajanje vode. Porasla so z vodoljubnimi in vlagoljubnimi rastlinami, iz katerih nastaja šota. Šota nastaja iz odmrlih rastlinskih delov, predvsem šotnih mahov, ki zaradi pomanjkanja zraka ne razpadejo popolnoma v humus, ampak se v procesu pooglenitve spremenijo v šoto. Zaradi tega so barjanska tla organsko zelo bogata in dobro zadržujejo vodo. Kot takšna so rodovitna in za kmetijstvo zelo uporabna, problem pa so pogoste poplave. Zaradi izsuševanja in izkopavanja šote se tla Ljubljanskega barja ponekod posedajo tudi do 3 cm na leto (Enciklopedija Slovenije, 1992). Ker je barje izredno pester ekosistem, ki nudi življenjski prostor mnogim zaščitenim živalskim in rastlinskim vrstam, v zadnjih letih potekajo projekti za njegovo ohranitev. V tej diplomski nalogi smo skušali opraviti nekatere bazične raziskave barjanskih tal. Vzorčenje smo opravili v avgustu 2003 in marcu 2004 na eksperimentalnem polju v Tomišlju. Poleg vpliva letnega časa smo skušali določiti še vpliv shranjevanja pri 4°C, deleža organskega ogljika v tleh, obdelovanja in višine podtalnice na aktivnost in strukturo mikrobnih združb.

Ugotovili smo, da je pH tal na eksperimentalnem polju skoraj nevtralen, med vzorci pa ni bilo opaziti bistvenih razlik. Proučevani okoljski dejavniki: čas vzorčenja, shranjevanje pri 4°C, delež organskega ogljika v tleh, obdelovanje in višina podtalnice na pH barjanskih tal v tem poskusu niso imeli vpliva. Večina talnih mikroorganizmov in rastlin najbolje uspeva v tem območju pH (6-7), saj so nutrienti v tem pH območju najlažje dostopni (Sylvia s sod. 1999).

Avgustovski vzorci tal so bili nabrani po izredno sušnem poletnem obdobju in je bil tako njihov delež vlažnosti v primerjavi z marčni vzorci tal manjši. Delež vlage se je po šest mesečnem shranjevanju avgustovskih vzorcev tal v plastičnih vrečkah pri 4°C še zmanjšal. Ugotovili smo, da imajo marčevski vzorci tal največji delež vlažnosti. To je v skladu s pričakovanji, saj je bilo v obdobju pred marcem veliko padavin, poleg tega se je topil tudi sneg. Pričakovali smo večjo razliko v vlažnosti med sočasno vzorčenimi vzorci tal z višjim

nivojem podtalnice v primerjavi z vzorci z nižjim nivojem podtalnice. V tem poskusu smo vzorčili zgornji sloj tal (0-30 cm), ki je glede mikrobne aktivnosti najpomembnejši. Predvidevamo, da je bil avgusta nivo podtalnice zaradi sušnega poletja prenizek, da bi lahko proučevali njen vpliv na zgornji sloj tal. Marca pa so bila tla v zgornjem sloju zaradi padavin in taljenja snega preveč namočena, da bi lahko proučevali le vpliv podtalnice. Največji delež vlage med sočasno vzorčenimi vzorci tal imajo vzorci, ki imajo večji delež organskega ogljika in posledično večjo kapaciteto zadrževanja vode v tleh. Največji delež vlažnosti ima vzorec tal 3, ki ima na eksperimentalnem polju takšno lego, da je v območju višje podtalnice in območju večjega deleža organskega ogljika. Najmanjši delež vlažnosti imata vzorca tal 6 in 8, ki ležita na območju nizke podtalnice in imata manjši delež organskega ogljika. Zaključimo lahko, da ima na vlažnost tal sočasno vzeti vzorcev največji vpliv prisotnost ali odsotnost padavin in ne podtalnica. Večji delež vlažnosti imajo vzorci, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika. Višina podtalnice sicer vpliva na vlažnost vzorcev, vendar je njen vpliv v primerjavi s časom vzorčenja in deležem organskega ogljika zanemarljiv.

Sposobnost zadrževanja vode v tleh je za barjanska tla zaradi vsebnosti šote razmeroma visoka. Ugotovili smo, da imajo največjo sposobnost zadrževanja vode v tleh vzorci, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika.

Aktivnost mikrobne združbe smo merili s substratom inducirano respiracijo in z merjenjem dehidrogenazne aktivnosti. S substratom inducirana respiracija in skupna dehidrogenazna aktivnost sta bili največji v vzorcih tal, odvzetih v marcu. To je v skladu z dosedanjimi raziskavami (Bardgett s sod., 1999), ki pravijo, da so spomladi mikroorganizmi večinoma v aktivnem stanju, saj se dvigne temperatura tal in ozračja, rasti začnejo korenine rastlin in v tleh je veliko organske snovi, ki se je ostala nerazgrajena čez zimo. Aktivnost v vzorcih tal odvzetih avgusta, je bila manjša od aktivnosti v marčevskih vzorcih. To je verjetno posledica visokih poletnih temperatur, pomanjkanja vlage v tleh, poleg tega pa so lahko dostopna hranila v tleh verjetno v dobršni meri že porabljena. Del vzorcev, odvzetih v avgustu, je bil pol leta shranjen na 4°C. Aktivnost se je v primerjavi s svežimi vzorci zmanjšala. Torej shranjevanje vzorcev pri nižji temperaturi povzroči zmanjšanje aktivnosti mikrobne združbe, kar je morda tudi posledica še dodatnega zmanjšanja vlage v tleh.

Aktivnost mikrobne združbe merjena s SIR in dehidrogenazna aktivnost sta bili največji v vzorcih tal, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika. To je v skladu s pričakovanji, saj je v tleh, ki vsebujejo več organskega ogljika več substratov, ki jih mikroorganizmi lahko uporabijo kot vir hranil. Predpostavljamo, da so v takšnih tleh mikrobne združbe v aktivnem stanju.

Mikrobne združbe v tleh, ki so bila podvržena obdelovanju, se razlikujejo od tistih v neobdelovanih tleh (Buckley in Schmidt, 2003, Stres 2003). Obdelovanje tal vpliva na pestrost in aktivnost mikrobne združbe v tleh, saj intenzivna kmetijska raba tal zmanjša zaloge ogljika in dušika v tleh (Degens s sod. 2000). Na eksperimentalnem polju sta dve območji: travnik in nazaj v travnik spremenjeno koruzno polje. Le-to je bilo nazaj v polje spremenjeno pred približno desetimi leti. Glede na raziskave intenzivno obdelovana polja potrebujejo več deset let, da se predvsem zaloge dušika in ogljika in posledično tudi mikrobne združbe povrnejo v prvotno stanje (Buckley in Schmidt, 2003). Torej bi pričakovali, da aktivnost mikrobne združbe v nekoč obdelovanih in neobdelovanih tal razlikuje. Na podlagi rezultatov, pridobljenih v naših poskusih, ne moremo trditi, da med obdelovanjem tal in aktivnostjo mikrobne združbe obstaja kakšna povezava. Proučevana barjanska tla so organsko bogata in predvidevamo, da tudi obdelovanje zaloge ogljika in dušika ni zmanjšalo do te mere, da bi to povzročilo zmanjšanje aktivnosti mikrobne združbe. Mogoče sicer je, da obdelovanje vpliva tudi na velikost in aktivnost mikrobnih združb v barjanskih tleh, vendar smo ugotovili, da je vpliv časa vzorčenja in deleža ogljika bistveno večji in je tako v primerjavi s tem vpliv obdelovanja zanemarljiv.

V tem poskusu smo vzorčili zgornji sloj tal (0-30 cm). Avgusta po sušnem poletju je bil nivo podtalnice prenizek, da bi imela podtalnica vpliv na proučevani zgornji sloj. Pozimi in v marcu pa je velika količina padavin namočila tla, tako da je bil vpliv podtalnice zmanjšan.

Na podlagi T-RFLP analize strukture mikrobnih združb v barjanskih tleh lahko zaključimo, da vpliva proučevanih dejavnikov, t.j. shranjevanje pri 4°C, delež organskega ogljika v tleh, obdelovanje tal, nivo podtalnice na pestrost in razlike v mikrobnih združbah nismo mogli enostavno ugotoviti, saj so ugotovljene razlike v podobnosti T-RFLP profilov majhne

(celokupna podobnost je 82 %, podobnost med paralelkami je 92 %). Iz rezultatov pa je razvidno, da nobeden od proučevanih parametrov ne vpliva bistveno na strukturo bakterijskih združb. Menimo, da bi bilo za določitev vpliva omenjenih dejavnikov potrebno v nadaljevanju raziskave dopolniti:

- Skupno mikrobna DNA iz tal izolirati več kot enkrat. Tako bi dobili bolj reprezentativne vzorce DNA iz tal, saj je v tleh veliko mikroniš, v katerih so združbe, ki so si med seboj lahko precej različne.
- Dele genov za 16S rRNA iz vsake izolirane DNA PCR pomnožiti vsaj 3x in jih nato združiti. Tako bi dobili bolj reprezentativne pomnožke, saj bi minimirali možne razlike pri pomnoževanju s PCR.
- Poskusili bi uporabiti več različnih polimeraz, saj so le-te različno občutljive na inhibitorne snovi (Osborn s sod., 2000).
- Naredili bi več restrikcijskih mešanic in več analiz s kapilarno elektroforezo. Tako bi zmanjšali tudi razlike, ki nastanejo pri ločevanju fragmentov in posledično izboljšali rezultate pri poravnavanju elektroferogramov.

Razlike v strukturi bakterijskih združb so majhne, tako da sklepamo, da nobeden od proučevanih dejavnikov nima bistvenega vpliva na pestrost mikrobnih združb.

5.2 SKLEPI

- pH barjanskih tal je skoraj nevtralen.
- Sposobnost zadrževanja vode v tleh je večja pri vzorcih z večjim deležem ogljika.
- Na vlažnost tal in trenutno sposobnost zadrževanja vode v tleh vplivata predvsem letni čas vzorčenja in delež organskega ogljika v tleh.
- Shranjevanje vzorcev pri nižji temperaturi povzroči zmanjšanje vlage v tleh.
- Na aktivnost mikrobne združbe v barjanskih tleh vplivajo naslednji proučevani parametri: letni čas vzorčenja, shranjevanje pri nižji temperaturi in delež ogljika.
- Mikrobna aktivnost merjena s SIR in dehidrogenazna aktivnost sta bili večji v marčevskih vzorcih tal kot v avgustovskih kljub nižji temperaturi, a večji dostopnosti vode.
- Šest mesečno shranjevanje vzorcev pri 4°C povzroči zmanjšanje mikrobne združbe in njene aktivnosti v tleh.
- Aktivnost združbe merjena s SIR in dehidrogenazna aktivnost sta večji v tleh, ki vsebujejo večji delež organskega ogljika.
- Struktura bakterijskih mikrobnih združb je bila pri vseh proučevanih vzorcih tal zelo podobna, tako da različen delež organskega ogljika, način obdelovanja tal in nivo podtalnice niso povzročili opaznih premikov v obravnavanih združbah.
- Šest mesečno shranjevanje vzorcev pri 4°C ni povzročilo bistvenih sprememb v strukturi dominantnih bakterijskih populacij.

6 POVZETEK

Barja so posebni tipi življenjskega okolja, za katera je značilno stalno ali občasno zastajanje vode. V tleh najdemo veliko šote, ki nastaja iz odmrlih ostankov vodoljubnih in vlagoljubnih rastlin. Le-te zaradi zaradi pomanjkanja zraka ne razpadejo popolnoma v humus, ampak se v procesu pooglenitve spremenijo v šoto.

Mikrobne združbe v tleh so izredno pestre. S klasičnimi gojitvenimi tehnikami jih ni moč proučevati, saj se da po do sedaj znanih raziskavah iz večine ekosistemov vzgojiti le 1% talnih mikroorganizmov. Vplive različnih okoljskih dejavnikov na aktivnost mikrobne združbe v barjanskih tleh smo proučevali z metodo s substratom inducirane respiracije in merjenjem dehidrogenazne aktivnosti. Pestrost pa mikrobne združbe smo proučevali s tipizacijsko molekularno-biološko tehniko imenovano T-RFLP, ki temelji na direktni izolaciji DNA iz tal in pomnoževanju gena za 16S rRNA. Pri nobeni od omenjenih tehnik gojenje mikroorganizmov ni bilo potrebno.

Vzorčenje tal je potekalo avgusta 2003 in marca 2004 na eksperimentalnem polju v Tomišlju na Ljubljanskem barju. Vsakič smo odvzeli 8 vzorcev, ki se razlikujejo v deležu organskega ogljika, višini podtalnice in rabi tal: del polja je bil vseskozi travnik, del pa je bil koruzno polje, ki pa je bilo pred 10 leti spremenjeno nazaj v travnik. Na podlagi poskusov smo ugotovili, da sta aktivnost združbe merjena s SIR in dehidrogenazna aktivnost mikrobne združbe v barjanskih tleh največji marca, v vzorcih, shranjenih pri nižji temperaturi v primerjavi s svežimi pa obe aktivnosti padeta. Ugotovili smo tudi, da delež ogljika v tleh vpliva na aktivnost mikrobne združbe; mikrobne združbe iz vzorcev tal z večjim deležem organskega ogljika so bolj aktivne. Na podlagi podatkov, pridobljenih v tem poskusu pa ne moremo sklepati, da ima podtalnica vpliv na aktivnost mikrobne združbe v barjanskih tleh.

Strukturo mikrobne združbe smo proučevali le na štirih vzorcih z eksperimentalnega polja vzorčenih v avgustu 2003 in na istih vzorcih, ki so bili šest mesecev shranjeni pri 4°C. Združbe v vzorcih so bile dokaj podobne, najmanj 82 % podobne. Različen delež organskega

ogljika, šest mesečno shranjevanje pri 4°C, način obdelovanja tal in nivo podtalnice niso povzročili opaznih premikov v strukturi obravnavanih združb.

7 VIRI

- Alef K., Nannipieri P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, San Diego, Academic Press: 576 str.
- Alexander M. 1977. *Introduction to soil microbiology*, 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Amann, R.I. , Ludwig, W., Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143-169
- Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 215-221
- Atlas R.M., Bartha R. 1993. *Microbial ecology- fundamentals and application*. 4th ed. Redwood City, The Benjamin/ Cummings Publishing co.: 694 str.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1999. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Willey & Sons, Inc, 202 str.
- Bardgett R.D., Lovell R.D., Hobbs P.J., Jarvis S.C. 1999. Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:1021-1030
- Blackwood C.B., Marsh T., Kim S-hH, Paul E.A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. . *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 926-923
- Bloem J., De Ruiter P.C., Koopman G.J., Lebbink G., Brussaard. 1992. Microbial numbers and activity in dried and rewetted arable soil under integrated and conventional management. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 655-665

- Bossio D.A., Scow K.M., Graham K.J. 1998. Determinants of soil microbial communities: effect of agricultural management, season and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36:1-12
- Buckley D.H., Schmidt T.M. 2001. the structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*, 42: 11-21
- Buckley D.H., Schmidt T.M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5 6: 441-452
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Vojvodic-Vukovic M. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:189-196
- Dobson M., Frid E. 1998. *Ecology of aquatic systems*. Essex, Addison Wesley Longmen Limited: 222 str.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*. New York, Academic Press
- Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2000. Assesment of microbial diversity in four southwesteren United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2943-2950
- Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2001. Phylogenetic specifity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 190-197
- Enciklopedija Slovenije: vol 6. 1992. Ljubljana, Mladinska knjiga: 262-266
- Farrelly V., Rainey F.A., Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and rrn copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2798-2801

- Frostegard A., Courtois S., Raimse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5409-5420
- Göttlich K. 1990. *Moor Und Torfkunde..* Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: 334-349
- Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J. 2003. Physiological and community response of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6961-6968
- Gunapala N., Scow K.M. 1998. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 805-816
- Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to soil organic matter content and watertable level. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 503-509
- Hattori T., Hattori R. 1973. *Microbial life in the soil: an introduction.* New York, Marcel Dekker
- Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A., Janssen P.H. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7210-7215
- Kittis C.L. 2001. Terminal restriction patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2: 17-25
- Liu W-T, Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516-4522

- Lukow T., Dunfield P.F., Liesack W. 2000. Use of T-RFLP technique to assess spatial and terminal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 241-247
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed. New Jersey, Prentice Hall, Upper Saddle River: 991 str.
- Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3616-3620
- Martinčič A. 2003. Barje na Ljubljanskem barju- nekdanj, včeraj, danes in jutri. *Proteus* 65, 6: 247-256
- Mishustin E.N. 1975. Microbial associations of soil types. *Microbial Ecology*, 2: 97-118
- Orchard V.A., Cook F.J. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 15: 447-454
- 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*, 2,1: 39-50
- Overas L., Torsvik V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, 36: 303-315
- Peterlin S. 1971. Nekoč je bilo Ljubljansko barje. *Proteus*, 33: 425-429
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning- a laboratory manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. zv : (loč. pag)
- 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

- Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. 1984. Analysis of hydrothermal-vent associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*, 224: 409-411
- Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. 1985. Characterisation of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1379-1384
- Staley J.T., Konopka A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39: 321-346
- Stres B. 2003. Opis sestave in raznovrstnosti denitrifikacijske ter skupne mikrobne združbe v obdelovanih tleh z genetskima markerjema *nosZ* in 16S rRNA. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 79 str.
- Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P., Zuberer D.A. 1999. Principles and applications of soil microbiology. New Jersey, Prentice Hall, Upper Saddle River, USA: 550 str.
- Trainor. R.F. 1978. Introductory phycology. New York, Wiley
- Van Gestel M., Ladd J.N., Amato M. 1992. Microbial biomass responses to seasonal change and imposed drying regimes at increasing depths of undisturbed topsoil profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 103-111
- Ward D.M., Weller R., Bateson M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in natural community. *Nature*, 345: 63-35
- West A.W., Sparling G.P. 1986. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents, *Journal of Microbiological Methods* 5, 3-4: 177-189
- Yamane I., Sato K. 1964. Decomposition of glucose and gas formation in flooded soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 10: 35-41

8 ZAHVALA

- Hvala mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec, da mi je omogočila izvedbo diplomske naloge.
- Posebna zahvala gre dr. Blažu Stresu za vso pomoč, nasvete in odgovore na moja včasih čudna vprašanja, saj brez tega ta diplomska naloga ne bi nastala.
- Hvala prof. dr. Gorazdu Avguštinu za kritičen pregled naloge in vse konstruktivne pripombe.
- Hvala vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo, da sem se znašla v svetu imenovanem laboratorij.
- Hvala mag. Andreju Razpetu za pomoč pri izvedbi kapilarne elektroforeze.
- Barbari, Barbari, Tjaši, Vesni in Doroteji se zahvaljujem za družbo in pomoč, ko nisem več vedela, kako dalje.
- Živa, hvala da obstajaš in da si tak optimist. Brez tebe bi že stokrat obupala.
- Vlado, hvala da si strumno in veselo prenašal moje napade brezvolje in mi pomagal vrniti se na pravo pot.
- Brita, Rašica naju je še vedno počakala.
- Najboljše pride na koncu: hvala zlatima mami in očiju, da sta mi omogočila študij in me vseskozi podpirala.

PRILOGA 1: Elektroferogrami preučevanih vzorcev

Vzorci si po vrsti od zgoraj navzdol sledijo:

- 1 3a+6M
- 2 vzorec, ki ni del tega poskusa
- 3 6a+6M
- 4 6b+6M
- 5 vzorec, ki ni del tega poskusa
- 6 1+6M
- 7 6a
- 8 8+6M
- 9 3b+6M
- 10 3
- 11 6b
- 12 8
- 13 1

Legenda vzorcev: 1, svež avgustovski vzorec, PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 3, svež avgustovski vzorec T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 6a in 6b, paralelki svežega avgustovskega vzorca, T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; 8 PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika, 1+6M, šest mesecev pri 4°C shranjen avgustovski vzorec, PT-VP-VC- polje, spremenjeno v travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 3a+6M in 3b+6M, paralelki šest mesecev pri 4°C shranjenega avgustovskega vzorca T-VP-VC- travnik, višja podtalnica, višji delež organskega ogljika; 6a+6M in 6b+6M, paralelki šest mesecev pri 4°C shranjenega avgustovskega vzorca, T-NP-NC: travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika; 8+6M, šest mesecev pri 4°C shranjen avgustovski vzorec, PT-NP-NC: polje, spremenjeno v travnik, nižja podtalnica, nižji delež organskega ogljika,