

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok LENARČIČ

BIOREMEDIACIJSKI POTENCIAL ŠOTNIH TAL

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

BIOREMEDIATIONAL POTENTIAL OF PEAT SOIL

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

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 27.5.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Blaž Stres in za recenzenta prof. dr. David Stopar.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Lenarčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
UDK 628.35+631.416:597.6(043)=863
KG biološko čiščenje odpadnih vod/šota/Ljubljansko barje/bioremediacija/odpadne vode/nitrifikacija/denitrifikacija/kroženje dušika
AV LENARČIČ, Rok
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/STRES, Blaž (somentor)/STOPAR, David (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2006
IN BIOREMEDIACIJSKI POTENCIAL ŠOTNIH TAL
TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 53 s., 2 pregl., 13 sl., 40 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Tla Ljubljanskega barja vsebujejo velike količine šote, ki je sestavljena iz delno razgrajenega organskega materiala. Zaradi svojih lastnosti je šota primerna za čiščenje z dušikom bremenjenih odpadnih vod. Preučevali smo bioremediacijski potencial barjanskih tal in njihovo sposobnost odstranjevanja dušika primerjali z mineralnimi tlemi. Vzorce barjanskih in mineralnih tal smo bremenili z dušikom in jih štiri tedne inkubirali v stekleničkah z aerobno oziroma anaerobno atmosfero. Tedensko smo v vzorcih tal ugotavljali število heterotrofov, nitrifikatorjev ter denitrifikatorjev in izvajali ekstrakcijo dušikovih ionov ter s tem spremljali učinkovitost poteka nitrifikacije in denitrifikacije. Trikrat tedensko smo v plinasti fazi stekleničk izmerili emisije nastalega CO₂ in N₂O. Vzporedno smo izvedli še dodaten poskus in sestavili manjšo čistilno napravo in spremljali potek odstranjevanja dušika iz vode. Ugotovili smo, da so tla Ljubljanskega barja za odstranjevanje dušika iz vode primerna vsaj toliko kot mineralna tla, saj potekajo procesi nitrifikacije in denitrifikacije v barjanskih tleh vsaj tako dobro kot v mineralnih tleh. Mikrobna aktivnost, določena preko meritev emisij, je višja v barjanskih tleh, poleg tega pa barjanska tla vsebujejo višje število heterotrofov in denitrifikatorjev na gram suhih tal. Število nitrifikatorjev pa je v obeh tipih tal enako.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
UDC 628.35+631.461:579.6(043)=863
CX biological treatment of wastewater/peat/Ljubljana marsh/bioremediation/waste waters/nitrification/denitrification/nitrogen cycle
AU LENARČIČ, Rok
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/STRES, Blaž (co-advisor)/STOPAR, David (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI BIOREMEDIATIONAL POTENTIAL OF PEAT SOIL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 53 p, 2 tab., 13 fig., 40 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Ljubljana marsh soil contains loads of peat, which consists of partly degraded organic material. Because of its properties peat is a very useful media for treatment of wastewaters that are rich in nitrogen. We have studied the bioremediational potential of Ljubljana marsh soil and we have compared the ability of removing nitrogen between the two soil types. We have loaded soil samples of both types of soil with nitrogen and incubated them in flasks with aerobic or anaerobic atmosphere. In soil samples we have determined the number of heterotrophic, nitrifying and denitrifying bacteria weekly and performed the KCl extraction of nitrogen ions, so that we have had an insight into the nitrification and denitrification effectivenesses. We have measured the quantity of CO₂ and N₂O emissions in gas phase of flasks three times per week. Besides, we have performed an additional experiment consisting of a PVC tube filled with soil that have simulated a small wastewater treatment system where we have studied the nitrogen removal efficiency from wastewater. The results of our study show that Ljubljana marsh soil is in comparison to mineral soil at least as useful in nitrogen removal from wastewater as mineral soil is, having at least as high nitrification and denitrification rates as mineral soil. Microbial activity determined by emissions measurements is higher in Ljubljana marsh soil and so are the microbial populations of heterotrophes and denitrifiers per gram of dried soil. The number of nitrifiers is similar in both soil types.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZA	2
1.1.1 Namen	2
1.1.2 Hipoteza	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DUŠIKOV CIKEL	3
2.1.1 Nitrifikacija	4
2.1.2 Denitrifikacija in redukcija nitrata	7
2.1.3 Abiotske reakcije dušika v tleh	8
2.2 MOŽNI PROBLEMI UPORABE DUŠIKA V KMETIJSTVU	8
2.2.1 Emisije N₂O	9
2.3 MOKRIŠČA	10
2.3.1 Primernost mokrišč za čiščenje odpadnih vod	11
2.3.2 Ljubljansko barje	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 EKSPERIMENTALNO POLJE, VZORČENJE IN PRIPRAVA TAL	14

3.2	KAPACITETA ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)	14
3.3	OPIS POSKUSA V MIKROKOZMIH:	15
3.3.1	Določanje vlažnosti tal v stekleničkah	18
3.3.2	Spremljanje koncentracij in pretvorb nitrita, nitrata in amonijevega iona	18
3.3.3	Ugotavljanje obsega mikrobne združbe v vzorcu tal (najbolj verjetno število)	18
3.3.4	Ugotavljanje mikrobne aktivnosti preko meritev emisij CO₂ in N₂O	21
3.4	SPREMLJANJE HITROSTI PRETVORB DUŠIKOVIH ONESNAŽIL V KOLONAH S TLEMI	22
3.5	DOLOČANJE HITROSTI VEZAVE IN KOLIČINE VEZANEGA NH ₄ ⁺ -N NA BARJANSKA/MINERALNA TLA	23
3.6	SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE NITRITA	23
3.7	SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE AMONIJA	24
3.8	RAZTOPINE IN PUFRI	24
4	REZULTATI	26
4.1	KAPACITETA ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)	26
4.2	SPREMLJANJE KONCENTRACIJ IN PRETVORB NITRITA, NITRATA IN AMONIJEVEGA IONA V MIKROKOZMIH	26
4.2.1	Aerobna inkubacija (spremljanje nitrifikacije)	26
4.2.2	Anaerobna inkubacija (spremljanje denitrifikacije)	29
4.3	UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCU TAL	31
4.3.1	Stekleničke z aerobno atmosfero	31
4.3.2	Stekleničke z anaerobno atmosfero	32
4.4	UGOTAVLJANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI PREKO MERITEV EMISIJ CO ₂ IN N ₂ O	34

4.4.1	Stekleničke z aerobno atmosfero; hitrost proizvodnje emisij	34
4.4.2	Stekleničke z anaerobno atmosfero; skupna količina proizvedenih plinov	36
4.5	SPREMLJANJE HITROSTI PRETVORB DUŠIKOVIH ONESNAŽIL V STOLPCU S TLEMI	39
4.6	HITROST IN DELEŽ VEZAVE AMONIJA NA TLA	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.2	SKLEPI	46
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48
8	ZAHVALA	53

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1 Primerjava lastnosti barjanskih in mineralnih tal (Kraigher in sod., 2006; Hacin in sod., 2001; Mihelič in Pačnik, 2005)	13
Preglednica 2 Variante raztopin, ki smo jih dodali barjanskim oziroma mineralnim tlem	15

KAZALO SLIK

		str.
Slika 1	Dušikov krog (Madigan in sod., 2003)	4
Slika 2	Shematski prikaz nizkega barja (Dobson in Frid, 1998)	11
Slika 3	Mineralna tla (levo) in barjanska tla (desno)	14
Slika 4	Shema aerobnega oziroma anaerobnega dela poskusa za barjanska tla	16
Slika 5	Kolone z barjanskimi in mineralnimi tlemi ter kroženje z dušikom bremenjene vode	23
Slika 6	Spremljanje koncentracij $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in $\text{NO}_3^-\text{-N}$ na gram suhih tal med štiritedensko aerobno inkubacijo	28
Slika 7	Spremljanje koncentracij $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in $\text{NO}_3^-\text{-N}$ na gram suhih tal med štiritedensko anaerobno inkubacijo	30
Slika 8	Logaritem števila heterotrofov in nitrifikatorjev v tleh med štiritedensko aerobno inkubacijo stekleničk	32
Slika 9	Logaritem števila heterotrofov in denitrifikatorjev v tleh med štiritedensko anaerobno inkubacijo stekleničk	34
Slika 10	Količina proizvedenega N_2O in CO_2 (ml) v eni uri na gram suhih tal med štiritedensko aerobno inkubacijo	36
Slika 11	Količina skupno proizvedenih mg N_2O in ml CO_2 na gram suhih tal med štiritedensko anaerobno inkubacijo v barjanskih in mineralnih tleh	38
Slika 12	Koncentracije $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/l) v izcedni vodi v času	40
Slika 13	Hitrost in relativna količina vezanega $\text{NH}_4^+\text{-N}$ na barjanska in mineralna tla	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

NH ₄ Cl	amonijev klorid
NPK	umetno gnojilo (vsebuje 15% dušika (od tega 55% NH ₄ ⁺ -N iz amoniaka in 45% NO ₃ ⁻ -N iz nitratne kisline), 15% fosforja in 15 % kalija)
WHC	kapaciteta zadrževanja vode (angl. water holding capacity)

UVOD

Dandanes se na kmetijske površine po svetu aplicira velike količine gnojil, ki vsebujejo dušik. Dušik se v tleh v mikrobni procesih pretvarja do nitrita in nitrata, ki pa se zaradi prevelikih količin pogosto izpirata iz tal (Hansen in Henriksen, 1989).

Izpiranje je problematično predvsem na vodovarstvenih področjih in tam, kjer so pod tlemi večje količine podtalnice. V Sloveniji so najvišje dovoljene vrednosti 50 mg NO₃⁻/l in 0,1 mg NO₂⁻/l v pitni vodi (Pravilnik..., 1997), saj lahko obe obliki dušika povzročata resne zdravstvene težave (Ingersoll in Baker, 1998).

Industrijske in komunalne odplake ter odplake večjih farm živali vsebujejo pogosto velike količine dušika, ki se jih želimo znebiti preden te vode dosežejo naravni ekosistem. Pri iskanju biotehnoških rešitev za čiščenje z dušikom bremenjenih vod so se mokrišča izkazala kot uporaben medij (Poach in sod., 2004; Stone in sod., 2004; De Laune in sod., 2005).

Južni del Ljubljanske kotline zavzema Ljubljansko barje, ki je najjužnejše ležeče nizko barje v Evropi. Tla Ljubljanskega barja so organsko zelo bogata, saj večinoma vsebujejo šoto (Martinčič, 2003). Zaradi velike vsebnosti šote so ta tla lahko primeren substrat za odstranjevanje dušika iz odpadnih vod, zato smo želeli ugotoviti njihov bioremediacijski potencial v primerjavi s povprečnimi mineralnimi tlemi.

Barjanska tla smo primerjali z mineralnimi v poteku nitrifikacije, denitrifikacije, številu bakterij, ki sodelujejo v procesih odstranjevanja dušika, in v obnašanju tal v sistemu manjše čistilne naprave, ki smo jo pripravili iz PVC cevi premera 16cm.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZA

1.1.1 Namen

Tla šotnih mokrišč so se v mnogih študijah (Poach in sod., 2004; Stone in sod., 2004) izkazala za učinkovit substrat, v katerem z mikrobnimi procesi poteka odstranjevanje dušika iz onesnaženih vod. Ker tla ljubljanskega barja prav tako vsebujejo velik delež šote, je bil namen diplomskega dela ovrednotiti bioremediacijski potencial odstranjevanja viškov dušika barjanskih tal v primerjavi s potencialom mineralnih tal.

1.1.2 Hipoteza

Predpostavili smo, da imajo šotna tla Ljubljanskega barja višji bioremediacijski potencial kot mineralna tla.

2 PREGLED OBJAV

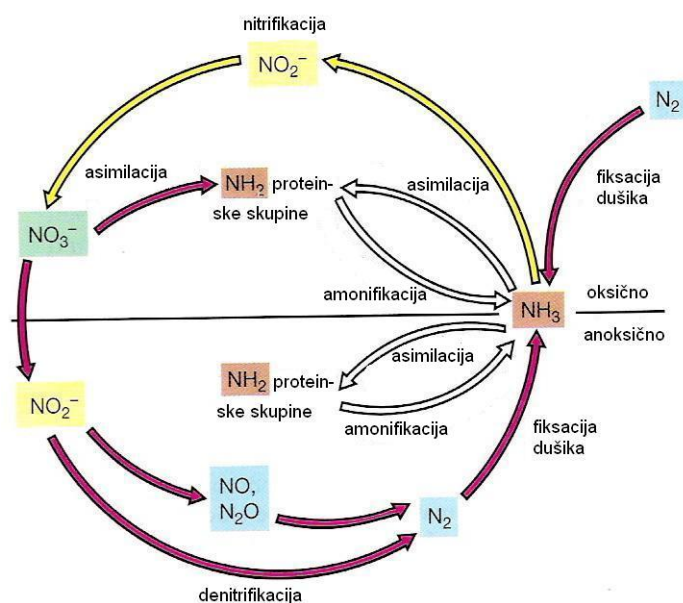
V sodobnem kmetijstvu se v želji po večjih donosih pridelka dodaja na polja gnojila. Gnojila vsebujejo predvsem dušik in fosfor, ki sta pogosto limitna dejavnika, a nujno potrebna za rast rastlin. Ponekod se v tla vnaša količine dušika, ki so večje od 200-300 kg N/ha (Hansen in Henriksen, 1989). V Sloveniji je najvišja dovoljena meja vnosa 170 kg N/ha tal (Uredba..., 2005). Rastline iz tal črpajo dostopne oblike dušika, kar zmanjša količino le tega v tleh. V naravnih ekosistemih se dušik vnaša v tla s procesom fiksacije dušika, ki ga opravljajo bakterije. Tudi dušik, ki je tlem dodan v obliki gnojil, je podvržen bakterijskim transformacijam (Hansen in Henriksen, 1989).

2.1 DUŠIKOV CIKEL

Dušik je takoj za ogljikom najpogostejši element v celicah. Povprečna bakterijska celica vsebuje 12% dušika v suhi teži. Je pomemben element v proteinih, nukleinskih kislinah in ostalih celičnih komponentah (Madigan in sod., 2003)

V naravi je dušik prisoten v organski in anorganski obliki. Pojavlja se v različnih oksidacijskih stanjih in ima stabilna valenčna stanja od -3 (NH_3) do +5 (NO_3^-).

Velik in počasi krožeč rezervoar dušika je atmosfera. Prav tako velik in praktično nedostopen rezervoar je dušik v kamninah in sedimentih, kajti geološki depoziti lažje dostopnega dušika so zelo redki. Anorganski dušikovi ioni (amonij, nitrat in nitrit) se pojavljajo v dobro topnih soleh in so posledično razporejeni v vodnih raztopinah po ekosferi. Tvorijo majhne vendar aktivne rezervoarje dušika. Tudi živ in odmrli organski material predstavlja sicer majhen vendar aktiven rezervoar dušika. V zmernih klimatih predstavlja stabiliziran talni organski material in humus relativno stabilen rezervoar, ki je primeren za privzem ob mineralizaciji. V naravi sta fiksacija dušika in denitrifikacija v ravnovesju, vendar se z vse večjim vnosom antropogenega dušika to ravnovesje postopoma ruši in vodi k zmanjševanju zalog organskega ogljika v tleh (Madigan in sod., 2003).



Slika 1 Dušikov krog (Madigan in sod., 2003)

Pri kroženju dušika, ki prihaja v tla ob gnojenju kmetijskih površin, pa tudi v procesih čiščenja odpadnih vod, sta najpomembnejša mikrobnoma procesa nitrifikacija in denitrifikacija.

2.1.1 Nitrifikacija

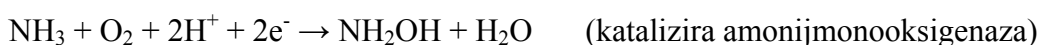
Nitrifikacija je proces oksidacije amonijevih ionov preko nitrita do nitrata, ki pretežno poteka ob sodelovanju avtotrofnih bakterij, imenovanih nitrifikatorji. Nitrifikatorji so torej kemolitotrofne bakterije, ki izrabljajo energijo za asimilacijo CO_2 iz nitrifikacije (Atlas in Bartha, 1998).

Avtotrofna oksidacija amonija je dvostopenjski proces. V prvi stopnji se amonij oksidira do nitrita, v drugi stopnji pa se nitrit oksidira do nitrata. Koraka nitrifikacije opravljajo različne bakterije, vendar sta običajno procesa tesno sklopljena in tako ne prihaja do akumulacije nitrita. Prvo stopnjo izvajajo oksidatorji amonija, drugo stopnjo pa oksidatorji nitrita. Oba procesa sta sicer energetsko ugodna, zato obe skupini mikroorganizmov dobita z oksidacijo anorganskih oblik dušika dovolj energije za fiksacijo CO_2 , vendar proces vseeno ni energetsko visoko učinkovit (De Boer in Kowalchuk, 2001; Buscot in Varna,

2005). Za fiksacijo enega mola CO₂ se mora namreč oksidirati približno 35 molov amonija oziroma celo 100 molov nitrita (Atlas in Bartha, 1998).

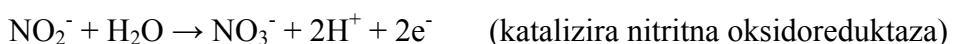
Prva stopnja, oksidacija amonija, je večstopenjski proces in energijsko donosnejši. Poglavitni encim te stopnje je membransko vezana amonijmonooksigenaza, sodeluje pa tudi hidroksilamin oksidoreduktaza. Za amonijmonooksigenazo je substrat preferenčno NH₃, pred NH₄⁺. Poleg amonija pa lahko encim oksidira še vrsto drugih organskih, nepolarnih substanc, ki lahko delujejo kot kompetitivni inhibitorji oksidacije amonija (De Boer in Kowalchuk, 2000). Bakterije, ki opravljajo to stopnjo, pripadajo rodovom: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobulus* in drugim. V tleh se kot dominanten pojavlja rod *Nitrosomonas* (De Boer in Kowalchuk, 2001; Atlas in Bartha, 1998).

Kemijski reakciji prve stopnje nitrifikacije: oksidacija amonijskega dušika do nitrita (Alexander, 1977, cit. po: Prinčič, 1996):



Druga stopnja, oksidacija nitrita do nitrata, je enostopenjski proces in daje manj energije kot prva stopnja (Atlas in Bartha, 1998). Bakterije, ki sodelujejo v drugi stopnji nitrifikacije, pripadajo rodovom: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* in *Nitrococcus*. Med njimi se kot dominanten v tleh pojavlja rod *Nitrobacter* (De Boer in Kowalchuk, 2001; Atlas in Bartha, 1998).

Kemijska reakcija druge stopnje nitrifikacije: oksidacija nitrita do nitrata (Alexander, 1977, cit. po: Prinčič, 1996)



Oksidacije dušikovih komponent v tleh so poleg avtotrofnih mikroorganizmov sposobne tudi nekatere heterotrofne bakterije in glive. Transformacije vključujejo oksidacijo organskih in anorganskih dušikovih substanc. Vendar pa heterotrofna oksidacija amonija ni

vezana na celično rast, kot je to značilno za avtotrofno nitrifikacijo. Bakterije, ki lahko izrabljajo amonij za heterotrofno oksidacijo, pripadajo več različnim rodovom (De Boer in Kowalchuk, 2001; Atlas in Bartha, 1998).

Proces nitrifikacije in mikroorganizmi, ki v njem sodelujejo, so zelo občutljivi na okoljski stres. Predvsem je občutljiv drugi del, oksidacija nitrita v nitrat, zato se ob stresnih pogojih v tleh lahko kopiči nitrit. Nitrifikacija intenzivneje poteka v suhih in pH nevtralnih tleh, slabše pa v vlažnih in kislih tleh (Atlas in Bartha, 1998). V nekaterih kislih tleh nitrifikacija sploh ne poteka. Občutljivost na nizek pH je verjetno posledica odvisnosti amonij monooksigenaze od NH_3 , saj se razpoložljivost NH_3 eksponentno zmanjšuje z nižanjem pH. Izolati iz rodu *Nitrospira*, izolirani iz kislih tal, so praviloma nezmožni oksidacije amonija pri pH nižjem od 5,5, čeprav so opisani tudi sevi, ki so prilagojeni na nizek pH. Rast in nitrifikacijo pri nižjih pH vrednostih jim omogoča agregacija celic in tvorba biofilma (De Boer in Kowalchuk, 2001).

Nitrit se mora zaradi potencialne toksičnosti v naravi čim hitreje odstraniti. Najučinkovitejše odstranjevanje je takojšnja poraba nitrita z nitrit oksidirajočimi bakterijami. Mikroskopski posnetek kislih gozdnih tal je pokazal agregate bakterijskih celic iz rodu *Nitrosospira*, obkrožene s celicami iz rodu *Nitrobacter*. Takšni agregati oksidatorjev amonija in oksidatorjev nitrita omogočajo, da se nastali nitrit takoj porabi in ne nastajajo toksični produkti. Podobne agregate so opazili tudi v tleh z nevtralnim pH. (De Boer in Kowalchuk, 2001).

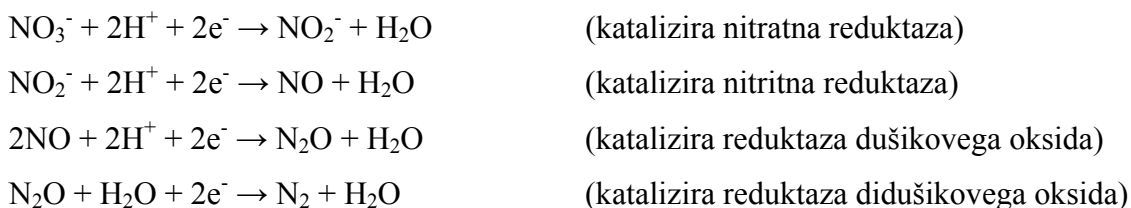
Proces nitrifikacije v tleh je zelo pomemben, saj pretvorba amonija v nitrat pomeni spremembo naboja iz pozitivnega v negativnega. Pozitivno nabiti ioni se vežejo na negativno nabite delce glin v tleh, negativno nabiti ioni pa lahko prosto migrirajo v talni vodi. Nitrifikacija je torej proces imobilizacije dušika v tleh. Običajno nitrifikacijske bakterije amonij v tleh hitro oksidirajo, nitrat pa privzemajo rastline (Atlas in Bartha, 1998).

2.1.2 Denitrifikacija in redukcija nitrata

Številne bakterije, glive in alge so sposobne izrabe nitrata neposredno iz okolja in njegovo vgradnjo v celični material preko asimilatorne redukcije nitrata. Normalna atmosferska koncentracija kisika ne inhibira encimskega kompleksa asimilatorne redukcije nitrata. Poleg nitrifikacije tudi asimilatorna redukcija nitrata vpliva na to, da se amonij v okolju ne kopiči, saj se takoj vgradi v celični material, poleg tega amonij deluje tudi povratno kot inhibitor tega procesa (Atlas in Bartha, 1998)

V anaerobnih okoljih bakterije izrabijo nitratne ione kot terminalne elektronske akceptorje v dihalni verigi. Proces imenujemo nitratna respiracija ali disimilativna redukcija nitrata. Nitrat se reducira preko več vmesnih stopenj, organski material, ki vstopa v reakcijo, pa se ob tem oksidira. Obstajata dva tipa disimilativne redukcije nitrata: 1. fakultativni anaerobi, kot npr. vrste iz rodu *Alcaligenes*, reducirajo nitrat v anaerobnih razmerah do nitrita ali pa do amonija (proces nitratne amonifikacije). Ti organizmi ne proizvajajo plinastih produktov, torej ne denitrificirajo. Ob nitratni amonifikaciji se amonij lahko kopiči v okolju. V primerjavi z denitrifikacijo naj bi bil ta proces manj pomemben za odstranjevanje nitrata in nitrita iz okolja. 2. denitrifikatorji, kot npr. *Paracoccus denitrificans* in številne pseudomonade, pa imajo kompleksnejšo pot redukcije nitrata preko nitrita, dušikovega oksida (NO), didušikovega oksida (N₂O) do molekularnega dušika (N₂). V tleh so najpomembnejši denitrifikacijski rodovi *Pseudomonas* (npr. *Pseudomonas denitrificans*) in *Alcaligenes*. Produkt denitrifikacije z omenjenimi rodovi je običajno mešanica N₂O in N₂, ki sta plina in izhajata iz tal. Razmerje produktov je odvisno od mikroorganizmov, ki proces izvajajo in od okoljskih pogojev, tako pri nižjem pH nastaja več N₂O (Ellis in sod., 1996; Atlas in Bartha, 1998; Stres, 2003).

Kemijske reakcije denitrifikacije (Strous, 2000, cit. po: Prinčič, 2001; Stres, 2003):



Sočasno z denitrifikacijo poteka tudi oksidacija organskega materiala, ki v reakciji predstavlja vir elektronov (Atlas in Bartha, 1998). Različni denitrifikatorji uporabljajo različne vire ogljika (Lee in Welander, 1996), nizka dostopnost vira ogljika v tleh pa lahko omejuje denitrifikacijo (Ingersoll in Baker, 1998).

V tleh potekata nitrifikacija in denitrifikacija običajno dovolj blizu skupaj, da lahko z nitrifikacijo nastali NO_3^- difundira v anaerobno denitrifikacijsko cono, kjer se v ustrezni mikrobnih združbi reducira do N_2 .

2.1.3 Abiotske reakcije dušika v tleh

Poleg bioloških procesov lahko v tleh zadržujejo dušik tudi abiotski procesi. Abiotsko se v talni organski material vgrajuje predvsem NO_2^- , manj pa NH_4^+ in NO_3^- (Barrett in sod., 2002; Fitzhugh in sod., 2003; Dail in sod., 2001).

Abiotske reakcije NO_2^- s talnim organskim materialom potečejo zelo hitro in tvorijo organsko vezan dušik (Thorn in Mikita, 2000; Fitzhugh in sod., 2003). Te reakcije tekmujejo z biološko vodenimi procesi, zato je v tleh, kjer je prisotnih veliko oksidatorjev amonija in nitrita, le ta porabljen hitreje s strani bakterij, kot pa je na voljo za abiotsko vgradnjo v organski material (Fitzhugh in sod., 2003). Bolj pomembna je abiotska imobilizacija NO_2^- v tleh, ki imajo višek prisotnega dušika.

2.2 MOŽNI PROBLEMI UPORABE DUŠIKA V KMETIJSTVU

V mikrobnih procesih nastali nitrit in nitrat se pogosto izpirata iz tal (Hansen in Henriksen, 1989). To izničuje učinek dodajanja gnojila in hkrati onesnažuje podtalnico. Prisotnost nitrita v podtalnici je resna težava, saj nitrit kemično reagira z amino snovmi v okolju in organizmih ter tako tvori nitrozamine, ki so visoko kancerogeni. Nitrat sam po sebi sicer ni toksičen, vendar zaradi potencialnih pretvorb predstavlja veliko zdravstveno tveganje. V gastrointestinalnem traktu se mikrobnost lahko reducira do nitrita. Normalna želodčna kislost odraslega človeka proces sicer preprečuje, k pretvorbi pa so bolj nagnjeni otroci, saj imajo nižjo kislost v želodcu. V plazmi raztopljen nitrit se veže na hemoglobin in nastane methemoglobin, kar povzroča sindrome pomanjkanja kisika v telesu in znake zadušitve, ki

se kažejo kot tako imenovani blue baby sindrom pri otrocih. Podobne težave lahko nastanejo tudi pri zastrupljeni živini, saj pride do sprememb v vampu, kar povzroča bolezn ali celo smrt živine (Ingersoll in sod., 1998; Atlas in Bartha, 1998). Problem z nitritom nastaja tudi v kislih tleh, saj pri nizkem pH nitrit prevladuje v obliki nitritne kisline, ki je toksična (De Boer in Kowalchuk, 2001; Shen in sod., 2003).

Na splošno sicer velja, da je metabolizem NO_2^- v tleh zelo hiter, zato se NO_2^- akumulira le, ko sprememba katerega od okoljskih faktorjev povzroči znižano porabo NO_2^- , v primerjavi s produkcijo. Pri nekaterih bakterijah nitritno reduktazo inhibira tudi prisotnosti NO_3^- v okolju. To lahko v aktivno nitrificirajočih tleh, kjer je veliko NO_3^- , pomeni kopičenje NO_2^- , saj se NO_3^- reducira v NO_2^- , redukcija NO_2^- naprej v NO pa je ustavljena (Burns in sod., 1996). Nitrit se v tleh akumulira tudi takrat, ko je na razpolago malo virov ogljika. NO_3^- in NO sta močnejša kompetitorja za elektrone, redukcija NO_2^- pa pri tem zaostaja (Burns in sod., 1996).

2.2.1 Emisije N_2O

Problem viškov dušika v okolju pa je poleg onesnaževanja pitne vode tudi nastanek N_2O , ki poleg CO_2 in CH_4 sodi med pomembne toplogredne pline in povzroča globalno segrevanje ozračja. Prispevek molekule N_2O k efektu tople grede je 200-300 krat večji kot prispevek molekule CO_2 (Kimochi in sod., 1998; Bouwman, 1990). Emisije N_2O smatramo kot izgubo dušika iz tal, saj kot plin izhaja v atmosfero. N_2O je produkt denitrifikacije v anaerobnih razmerah, delno pa tudi nitrifikacije v aerobnih razmerah (Khalil in sod., 2004; Koops in sod., 1997; Silvan in sod., 2002). V šotnih tleh, prepojenih z vodo in bogatih s hranili, je bistveni vir N_2O proces denitrifikacije (Silvan in sod., 2002; Davidsson in sod., 2002). Dostopnost kisika je ključni faktor, ki vpliva na nitrifikacijo in denitrifikacijo in s tem na emisije N_2O (Khalil in sod., 2004).

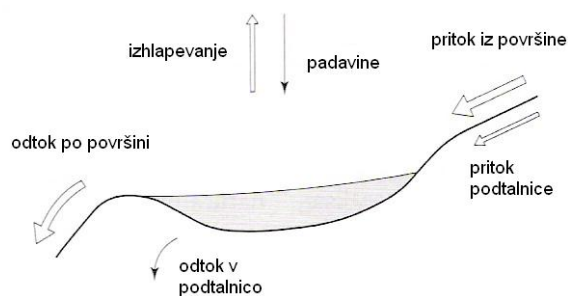
Nastanek N_2O v procesu nitrifikacije ni dokončno pojasnjen, v literaturi pa se najpogosteje omenjajo trije mehanizmi:

- Nastanek N_2O je posledica formacije intermedijata HNO med oksidacijo NH_2OH v NO_2^- .
- Uporaba NO_2^- kot alternativnega akceptorja elektronov med oksidacijo NH_4^+ za rast nitrifikatorjev, kadar v okolju ni dovolj kisika.
- Delna oksidacija NH_4^+ do NO_2^- v aerobnih razmerah, kateri sledi difuzija v anaerobne žepe in redukcija v N_2O v procesu denitrifikacije (Khalil in sod., 2004).

Zaradi možnih težav, ki jih lahko povzročijo prevelike količine dušika v vodah, se iščejo metode odstranjevanja dušika iz onesnaženih voda. Ena izmed možnih biotehnoloških rešitev za bioremediacijo vode, ki je prekomerno onesnažena z dušikom, je uporaba mokrišč.

2.3 MOKRIŠČA

Mokrišča so področja periodične ali stalne potopljenosti tal z vodo. Zaradi visokega vodnega stolpca je značilnost mokrišč anoksičnost tal. Mokrišča delimo v grobem v dve večji skupini. Prva skupina so robna mokrišča, ki nastajajo ob večjih vodnih telesih (reke, jezera, morje), ki predstavljajo glavni vir vode za to vrsto mokrišč. Druga skupina mokrišč pa nastaja neodvisno od večjih vodnih teles. Glavni viri vode za ta mokrišča so padavinska voda, podtalnica in spiranje okoliških površin (Dobson in Frid, 1998). V drugo skupino mokrišč spadajo barja. Ločimo visoka in nizka barja, ki se med seboj razlikujejo v preskrbi z vodo. Visoko barje je dvignjeno nad nivo podtalnice in se preskrbuje predvsem s padavinsko vodo. Nizko barje se oskrbuje z vodo predvsem iz podtalnice, s pritoki iz okoliških hribov in s padavinami. Nasičena so z vodo, kar zavira razgradnjo organskega materiala. Posledica je akumulacija delno razgrajenega rastlinskega materiala, ki tvori šoto. Zato pravimo nizkim barjem bogatim s šoto tudi šotišča. Običajno so nizka barja bogata s hranili (Dobson in Frid, 1998).



Slika 2 Shematski prikaz nizkega barja (Dobson in Frid, 1998)

2.3.1 Primernost mokrišč za čiščenje odpadnih vod

Mokrišča so se izkazala kot učinkovit odstranjevalec raztopljenega in na delce vezanega dušika ter fosforja iz odpadnih vod (Davidsson in sod., 2002). Prekomerne koncentracije nutrientov v onesnaženih vodah odstranjujejo z vključevanjem v rastlinski material, s sedimentacijo in z razgradnjo akumuliranega dušika v procesih nitrifikacije in denitrifikacije (Atlas in Bartha, 1998; Davidsson in sod., 2002; Ayaz in Akca, 2001). Privzem dušika s strani rastlin in akumulacija v tleh predstavlja manj kot 10% celotno odstranjenega dušika, mnogo pomembnejša sta procesa uplinjevanja amonija ter sklopljene nitrifikacije in denitrifikacije (Poach in sod., 2004).

V procesu sklopljenih reakcij najprej potečeta amonifikacija in nitrifikacija. V tej stopnji se organski dušik spremeni v oksidirani anorganski dušik, to je nitrat. Zadnji korak v odstranjevanju dušika iz odplak je respiratorna denitrifikacija, kjer se nitrat preko intermediatov (NO , N_2O) pretvori do molekularnega dušika in izhaja kot plin v atmosfero (Lee in Welander, 1995; Poach in sod., 2004). Stopnja denitrifikacije sloni na viru ogljika kot donorju elektronov, tega pa v samih odpadnih vodah pogosto ni dovolj, zato moramo za uspešno pot pretvorbe zagotoviti primeren zunanji vir elektronov (Lee in Welander, 1996). Študije različnih tipov mokrišč nakazujejo, da je rezervoar organskega ogljika v šoti mokrišč zadosten za zagotavljanje donorjev elektronov za denitrifikacijo. Na daljši rok bi lahko razgradljivega organskega materiala sicer lahko zmanjkalo, ker bi se zaradi prevelikih potreb lahko v celoti porabil, vendar naravne razmere vsaj v evtrofnih barjih omogočajo stalen donos organskega materiala v obliki akumulacije rastlinskega materiala

vsako jesen (Davidsson in sod., 2002). Kritična meja C:N razmerja, nad katero se nitrat uspešno odstranjuje iz onesnažene vode, je 5:1 (Ingersoll in Baker, 1998).

Poleg plinastega dušika so produkti čiščenja odpadnih vod tudi trije glavni toplogredni plini: poleg že omenjenega N₂O tudi CO₂ in CH₄, ki povzročajo globalno segrevanje ozračja (Kimochi in sod., 1998).

Sistem čiščenja odpadnih vod, obremenjenih z N in P pa ne poteka le v naravnih mokriščih. Že več let so v uporabi tako imenovana konstruirana mokrišča za čiščenje komunalnih odplak in živalskih odpadnih vod, v katerih na umetno zgrajenem mokrišču potekajo procesi, ekvivalentni procesom v naravnih mokriščih (Stone in sod., 2004). Sistemi konstruiranih mokrišč so cenovno ugodni in primerni za območja, kjer je zemlja relativno poceni, zmernotopla klima in kjer je malo podtalnice (Ingersoll in Baker, 1998). Poleg uporabe mokrišč pa se v čistilnih napravah lahko uporablja šota, preko katere črpamo vodo, ki jo želimo očistiti. Takšnim sistemom pravimo šotni filtri (Geerts in McCarthy, 1999)

V tem diplomskem delu smo želeli opredeliti bioremediacijski potencial tal Ljubljanskega barja. Tla smo primerjali z mineralnimi tlemi, ki smo jih odvzeli na obrobju Ljubljanskega barja in s tem zagotovili, da imajo raziskovana tla enake podnebne pogoje.

2.3.2 Ljubljansko barje

Ljubljansko barje se nahaja južno od Ljubljane (45°58'N, 14°28'E) in pokriva približno 16000 ha površine. Povprečna letna temperatura je 10 °C, povprečna letna količina padavin pa znaša 1400 mm. Večino pokrivajo travniške površine (65 %) in polja koruze (25 %), manjši del pa predstavlja zaščiten močvirnat gozd in predeli visokega barja. V 19. stoletju je bilo Ljubljansko barje sistematično izsuševano z izgradnjo odvodnih jarkov, da bi bilo uporabno v kmetijske namene. Vrhnji sloj barjanskih tal vsebuje 20-60 % organskega materiala, kar uvršča ta tla med najbolj rodovitna. (Hacin in sod., 2001; Kraigher in sod., 2006). Aktivnost mikroorganizmov v barjanskih tleh je odvisna od vsebnosti vode in vodnega stolpca in je višja pri večji vsebnosti vode. V poletnem času mikrobna aktivnost

kljub višjim temperaturam pade zaradi večje sušnosti. Velja pa, da je mikrobna združba v omenjenih barjanskih tleh dokaj stabilna in se ne spreminja veliko glede na vsebnost organskega materiala kljub spremembam vsebnosti vode in temperaturnim spremembam. (Kraigher in sod., 2006).

V preglednici 1 je prikazana primerjava barjanskih tal z mineralnimi. Podatki veljajo za sloj tal na globini 0-30 cm (Kraigher in sod., 2003; Hacin in sod., 2001; Mihelič in Pačnik, 2005)

	BARJANSKA TLA	MINERALNA TLA
vsebnost organskega ogljika (mg/g)	150 ± 15	
odstotek ogljika v tleh	15	2,6
vsebnost organskega dušika (mg/g)	13 ± 1	
odstotek skupnega dušika v tleh	1,3	0,26
C/N razmerje	11,8 ± 0,3	10
WHC (g H ₂ O/g suhih tal)	1,7 ± 0,2	
pH	6,6	6,3
% peska	0,1	23
% glinastih delcev	60,3	24,6
% melja	39,6	52,4
odstotek organskega materiala v tleh	27-40	4,5

Preglednica 1 Primerjava lastnosti barjanskih in mineralnih tal (Kraigher in sod., 2006; Hacin in sod., 2001; Mihelič in Pačnik, 2005)

Znano je, da je v tleh z več organskega materiala več mikrobne biomase in višja mikrobna respiracija (Hofman in sod., 2004). Pomembnen vpliv na mikrobno aktivnost v tleh pa ima poleg organskega materiala tudi sposobnost tal za zadrževanje vode (WHC – water holding capacity), saj vpliva na prezračevnost tal in dostopnost hranil. Optimalne razmere za aktivnost aerobnih organizmov v tleh so med 50 % in 70 % WHC, ob večjih vrednostih WHC pa prihaja do slabše dostopnosti kisika (Kraigher in sod., 2006). Nihanje vlažnosti tal omejuje mikrobno rast bolj v organsko revnejših tleh kot v tleh bogatih z organskim materialom (Atlas in Bartha, 1998).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 EKSPERIMENTALNO POLJE, VZORČENJE IN PRIPRAVA TAL

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili barjanska tla in mineralna tla. Vzorce barjanskih tal smo odvzeli februarja 2006 na eksperimentalnem polju v Tomišlju, na travniku, po površini 10x10 metrov in na globini 0-30 cm. Vzorci mineralnih tal so bili odvzeti v začetku maja 2006 na eksperimentalnem polju oddelka za agronomijo ob Biotehniški fakulteti, na opuščeni njivi, po površini 10x10 metrov in na globini 0-30 cm. Vzorci tal so bili nato v laboratoriju posušeni do 30-40 % WHC, homogenizirani in presejani skozi 5mm sito ter do uporabe shranjeni pri temperaturi 4 °C.



Slika 3 Mineralna tla (levo) in barjanska tla (desno)

3.2 KAPACITETA ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)

WHC je sposobnost zadrževanja vode v tleh. 100 % WHC je največja masa vode, ki jo je sposoben zadržati 1 g tal. Na dno kovinskih cilindrov smo naložili plast popolnoma navlažene papirnate brisače in jih stehali. Nato smo dodali vzorec tal do višine 2 cm pod robom cilindra in jih ponovno stehali, ter nato potopili v destilirano vodo. Delali smo v treh ponovitvah. Cilindre z vzorci zemlje smo preko noči namakali v čaši z destilirano vodo in čašo pokrili z aluminijasto folijo. Naslednji dan smo dali cilindre na odcejanje in jih vsako uro tehtali do konstantne teže. Pokrili smo jih z aluminijasto folijo, da bi preprečili izhlapevanje vode. Zadnje meritev smo uporabili kot podatek pri računanju mase v tleh zadržane vode. WHC smo računali po formuli: $WHC = (m_v \text{ tleh zadržane vode} + m_{\text{odsušene vode}}) / m_{\text{suhih tal}}$. Maso celokupne v tleh zadržane vode smo opredelili kot 100 % WHC.

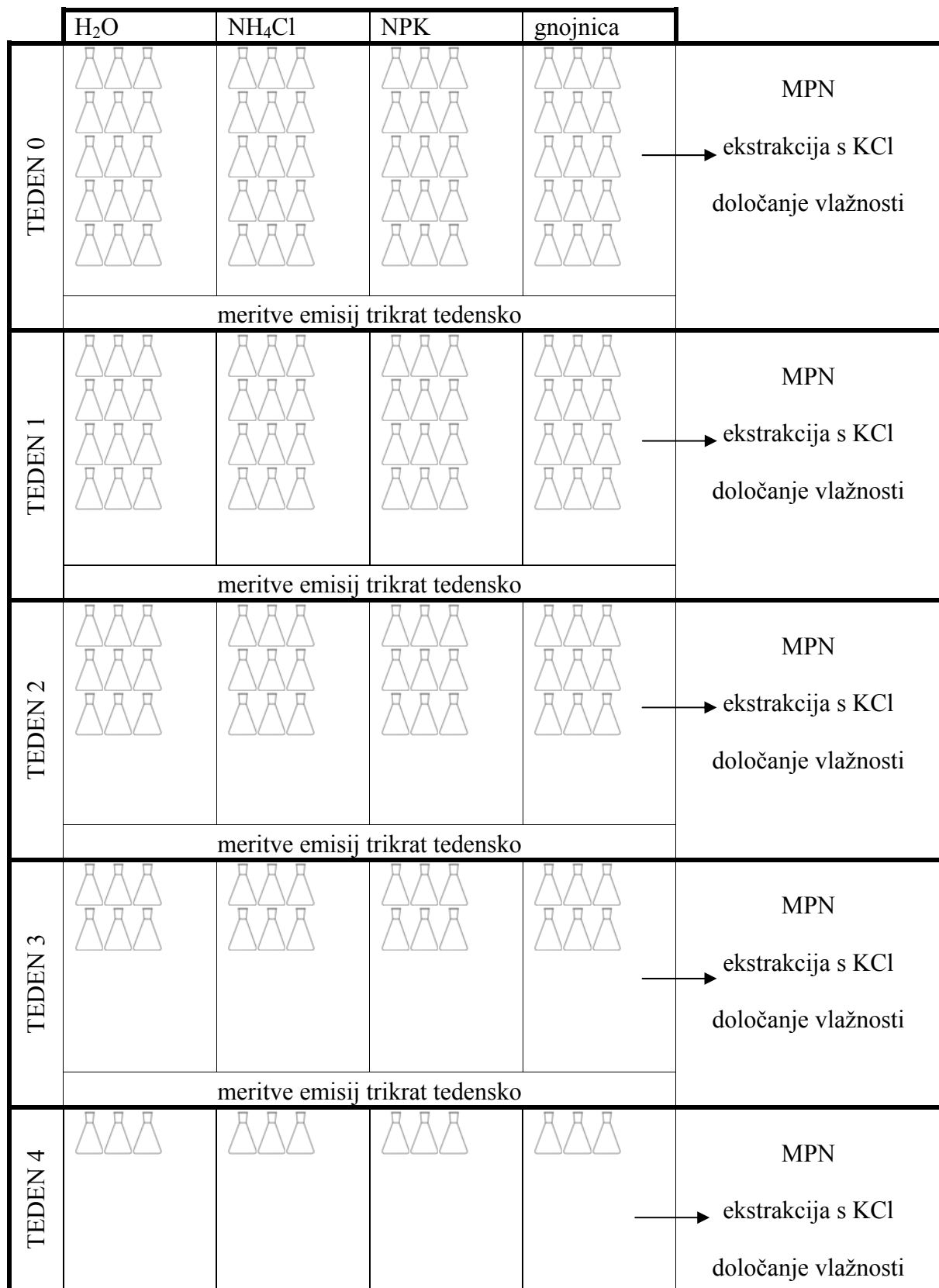
3.3 OPIS POSKUSA V MIKROKOZMIH:

Primerjali smo sposobnost barjanskih in mineralnih tal za čiščenje viškov dušika. V 250 ml stekleničke smo zatehtali 30 g tal in tla bremenili z raztopinami, kot je prikazano v tabeli 2. V stekleničkah smo zagotovili 60 % WHC in 0,13 mg N/g tal. Zaradi mnogo nižje sposobnosti zadrževanja vode mineralnih tal in prenizke vsebnosti dušika v gnojnici, smo poskusu z mineralnimi tlemi dodali še varianto stekleničk, v katerih smo zagotovili 0,13 mg N/g tal, vendar zato 94 % WHC.

VARIANTE RAZTOPIN		MINERALNA TLA	BARJANSKA TLA
H ₂ O (60 % WHC)	dodana raztopina	destilirana voda	destilirana voda
	dodano (ml)	5,43	10
	mg N/g tal	0	0
NH ₄ Cl (60 % WHC)	dodana raztopina	2,816 g/l → 0,737 g N/l	1,53 g/l → 0,4 gN/l
	dodano (ml)	5,43	10
	mg N/g tal	0,13	0,13
NPK (60 % WHC)	dodana raztopina	4,913 g/l → 0,737 g N/l	2,67 g/l → 0,4 gN/l
	dodano (ml)	5,43	10
	mg N/g tal	0,13	0,13
gnojnica (60 % WHC)	dodana raztopina	gnojnica (0,4 g NH ₄ ⁺ -N/l)	gnojnica (0,4 g NH ₄ ⁺ -N/l)
	dodano (ml)	5,43	10
	mg N/g tal	0,07	0,13
gnojnica (94 % WHC)	dodana raztopina	gnojnica (0,4 g NH ₄ ⁺ -N/l)	
	dodano (ml)	10	
	mg N/g tal	0,13	

Preglednica 2 Variante raztopin, ki smo jih dodali barjanskim oziroma mineralnim tlem

* NPK vsebuje 15 % dušika (od tega 55 % NH₄⁺-N iz amoniaka in 45 % NO₃⁻-N iz nitratne kisline), 15 % fosforja in 15 % kalija.



Slika 4 Shema aerobnega oziroma anaerobnega dela poskusa za barjanska tla

Shema poskusa prikazuje polovico poskusa, saj je bil poskus sestavljen iz serije stekleničk z aerobno atmosfero in serije stekleničk z anaerobno atmosfero.

Eksperiment smo za vsako varianto pri določenem tipu tal opravili v treh ponovitvah. Kot kontrola je služila varianta s tlemi brez dodanega dušika. Za vsako vrsto tal pa je bil poskus razdeljen na dve seriji, aerobno inkubacijo in anaerobno inkubacijo. Vzorce tal smo v stekleničkah inkubirali 4 tedne na 28 °C, v temi, aerobno ali anaerobno. Med aerobno inkubacijo smo imeli stekleničke zaprte le z aluminijasto folijo, da bi preprečili prekomerno izhlapevanje vode. Te stekleničke smo dvakrat tedensko redno vlažili z destilirano vodo, da smo tekom poskusa zagotavljali konstanten 60 % WHC. V primerih anaerobne inkubacije smo stekleničke plinotesno zaprli, trikrat vakumirali po štiri minute in vmes vedno dodali N₂, da smo zamenjali atmosfero. Ko je bila atmosfera zamenjana, smo dodali še 30 ml acetilena (kar ustreza 10 % plinske faze stekleničke) in izenačili pritisk.

Za izvedbo poskusa smo pripravili 120 stekleničk z barjanskimi tlemi, 60 za aerobno in 60 za anaerobno inkubacijo, ter 150 stekleničk z mineralnimi tlemi, 75 za aerobno in 75 za anaerobno inkubacijo (mineralnim tlem smo zaradi različne kapacitete zadrževanja vode dodali še varianto z 94 % WHC, da smo tako v tla dodali 0,13 mg N/g tal). V tedenskih intervalih smo razdrli 12+12 stekleničk z barjanskimi tlemi oziroma 15+15 stekleničk z mineralnimi tlemi in v talnih vzorcih:

- določali vlažnost tal (glej 3.3.1),
- izvedli ekstrakcijo s KCl za določanje dušikovih ionov (glej 3.3.2),
- ugotavljali obseg bakterijske združbe (heterotrofi v aerobno in anaerobno inkubiranih vzorcih tal, nitrifikatorji v aerobno inkubiranih vzorcih tal in denitrifikatorji v anaerobno inkubiranih vzorcih tal) z metodo MPN (glej 3.3.3).

Emisije smo merili v stekleničkah trikrat tedensko štiri tedne. Za merjenje emisij smo si izbrali stekleničke, ki so bile razdrte zadnji teden.

3.3.1 Določanje vlažnosti tal v stekleničkah

Ob vsakem razdiranju stekleničk smo določili vlažnost tal. V stehtane tehtiče smo zatehtali 10 g tal in tla popolnoma posušili v sušilniku pri 60 °C. Posušena tla smo ponovno stehtali in odšteli maso tehtiča, da smo dobili maso suhih tal. Razlika v masi tal in masi suhih tal je masa vode, ki je bila prisotna v tleh med inkubacijo.

3.3.2 Spremljanje koncentracij in pretvorb nitrita, nitrata in amonijevega iona

Ob dodatku 2 M KCl v vzorec tal se zaradi izmenjave ionov iz tal sprostijo nitrat, nitrit in amonij, ki jih nato določimo v raztopini. V 150 ml steklenički smo 10 g tal zalili s 100 ml 2 M KCl in stekleničke vodoravno stresali 1 uro. Po eni uri smo stekleničke postavili pokončno in počakali 2 uri, da se tla posedejo, iz raztopine pa vzeli 10 ml vzorca za analizo ionov na avtomatskem analizatorju za določanje dušikovih ionov (The continuous-flow analyser, Flowsys, Alliance instruments). Na analizatorju smo izmerili koncentraciji NO_x^- in NH_4^+ ionov, nitrit pa je bil določen spektrofotometrično (glej 3.6). Količino nitrata smo določili tako, da smo od količine NO_x^- odšteli koncentracijo NO_2^- .

3.3.3 Ugotavljanje obsega mikrobne združbe v vzorcu tal (najbolj verjetno število)

Število bakterij smo določali z metodo MPN (most probable number), ki temelji na principu redčenja vzorca tal v selektivnem gojišču za določeno skupino mikroorganizmov. V vzorcih tal z aerobno atmosfero smo ugotavljali število heterotrofov in nitrifikatorjev, v vzorcih tal z anaerobno atmosfero pa število heterotrofov in denitrifikatorjev. V 500 ml stekleničko smo zatehtali 10 g vzorca tal, zalili z 90 ml pufra MgSO_4 in stresali vodoravno 20 minut. Suspenzijo smo nacepili na mikrotitrne plošče (glej 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3). Po končani inkubaciji smo na mikrotitrskih ploščah odčitali število pozitivnih luknjic, to je luknjic, kjer je opažena rast bakterij. Za izračun števila bakterij v gramu suhih tal smo v MPN računalu (Food and..., 2006) vnesli podatke o količini stresanih tal, volumnu dodanega pufra, volumnu gojišča v luknjicah mikrotitrne plošče in volumnu nacepljene suspenzije ter odčitali rezultat.

3.3.3.1 Ugotavljanje obsega heterotrofne združbe

40 μ l suspenzije stresanih tal smo nacepili v serijo prvih osem luknjic na mikrotitrski plošči z 8x12 luknjicami, v katere smo predhodno dodali 180 μ l selektivnega gojišča za heterotrofe. S sterilnimi nastavki pipete smo vsebino prvih osem luknjic premešali in 40 μ l prenesli v serijo naslednjih osem luknjic. Postopek smo ponovili še desetkrat. Mikrotitrške plošče so bile nato inkubirane aerobno štiri tedne na 28 °C v temi. Po štirih tednih smo odčitali motnost v luknjicah mikrotitrskih plošč, motna luknjica pomeni rast heterotrofnih bakterij.

Gojišče za heterotrofe:

- NB (Nutrient broth, Difco) 1 g
- Na-acetat 0,5 g
- Na-sukcinat 0,5 g
- MgSO₄·7H₂O 1 g
- CaCl₂ 0,05 g
- K₂HPO₄ 0,14 g
- KH₂PO₄ 0,02 g
- Deionizirana voda 1000 ml

Gojišču je bil pH uravnan na 6,5 (HCl/ NaOH), nato smo gojišče avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.3.3.2 Določanje obsega združbe nitrifikatorjev

70 μ l suspenzije stresanih tal smo nacepili v serijo prvih osem luknjic na mikrotitrski plošči z 8x12 luknjicami, v katere smo predhodno dodali 140 μ l selektivnega gojišča za nitrifikatorje. S sterilnimi nastavki pipete smo vsebino prvih osem luknjic premešali in 70 μ l prenesli v serijo naslednjih osem luknjic. Postopek smo ponovili še desetkrat. Mikrotitrške plošče so bile nato inkubirane aerobno šest tednov na 28 °C v temi. Po šestih tednih smo ugotavljali prisotnost nitrita oziroma nitrata. V vsako luknjico mikrotitrške plošče smo dodali kapljico reagenta SA+NEDA. Reagent za določevanje nitrita vsebuje sulfanilamid in naftiletildiamin (SA+NEDA), ki daje v reakciji z nitritom rožnato

obarvano azo spojino. Če je prisoten nitrat, le tega s cinkom reduciramo do nitrita, ki z reagentom SA+NEDA tvori rožnato obarvano spojino.

Gojišče za nitrifikatorje:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,0 g/100 ml) 10 ml
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,34 g/100 ml) 1,0 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,0 g/100 ml) 1,0 ml
- Bromothymol blue (0,04 g/100 ml) 5,0 ml
- KH_2PO_4 (0,2 M) 7,5 ml
- Kelirano Fe 1,0 ml
- Mikroelementi 1,0 ml
- Deionizirana voda 1000 ml

Gojišču je bil pH uravnan z 2% K_2CO_2 na 7,0-7,2, nato smo gojišče avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.3.3.3 Določevanje obsega združbe denitrifikatorjev

40 μl suspenzije stresanih tal smo nacepili v serijo prvih osem luknjic na mikrotitrski plošči z 8x12 luknjicami, v katere smo predhodno dodali 180 μl selektivnega gojišča za denitrifikatorje. S sterilnimi nastavki pipete smo vsebino prvih osem luknjic premešali in 40 μl prenesli v serijo naslednjih osem luknjic. Postopek smo ponovili še desetkrat. Mikrotitrške plošče so bile nato inkubirane anaerobno štiri tedne na 28 °C v temi. Po štirih tednih smo ugotavljali prisotnost nitrita z reagentom SA+NEDA oziroma odsotnost nitrata. V vsako luknjico smo dodali kapljico reagenta.

Gojišče za denitrifikatorje (D30)

- Nutrient broth 1 g
- KNO_3 (30 mgN/l) 0,22 g
- Na-sukcinat 0,5 g
- Na-acetat 0,5 g
- Deionizirana voda 1000 ml

Gojišču je bil pH uravnan na 6,5-6,8 (HCl/NaOH), nato smo gojišče avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.3.4 Ugotavljanje mikrobne aktivnosti preko meritev emisij CO₂ in N₂O

3.3.4.1 Meritev N₂O

N₂O smo merili na plinskem kromatogramu (Network GC system, 6890 N, Agilent Technologies). V kolono smo vbrizgali 0,1 ml plinske faze iz stekleničk (celoten volumen plinske faze je bil 300 ml), kjer smo inkubirali barjanska oziroma mineralna tla. Stekleničke, v katerih smo spremljali denitrifikacijo, so bile stalno zaprte, saj je atmosfera vsebovala N₂. V stekleničkah, kjer smo spremljali nitrifikacijo, pa smo prav tako izmerili N₂O, vendar smo stekleničke zaprli 8 ur pred meritvijo. Izmerjeno koncentracijo plina smo s pomočjo umeritvene krivulje podali v odstotkih in nato celotno količino plina v steklenički izračunali po formuli: $M=C_g \cdot (V_g+V_l \cdot \alpha)$ (M-celotna količina N₂O v posodi (ml), C_g-izmerjena koncentracija N₂O v plinski fazi (%), V_g-volumen plinske faze (ml), V_l-volumen tekoče faze (ml), α-Bunsenov koeficient topnosti plinov, ki znaša 0,4042 za N₂O pri temperaturi 28 °C). Za anaerobno inkubirane vzorce tal smo rezultat izrazili v mg N₂O na gram suhih tal. Za aerobno inkubirane vzorce tal pa smo rezultat izrazili v ml N₂O na gram suhih tal na uro.

3.3.4.2 Meritev CO₂

CO₂ smo merili na plinskem kromatogramu (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies). V kolono smo vbrizgali 0,1 ml plinske faze iz stekleničk (celoten volumen plinske faze je 300 ml), kjer smo inkubirali barjanska oziroma mineralna tla. Stekleničke, v katerih smo spremljali denitrifikacijo, so bile stalno zaprte, saj je bila atmosfera anaerobna. Nitrifikacijske stekleničke pa smo 8 ur pred meritvijo zaprli in nato vzeli 0,1 ml vzorca. Izmerjeno koncentracijo CO₂ smo s pomočjo umeritvene krivulje podali v odstotkih in nato celotno količino plina v steklenički izračunali po formuli: $M=C_g \cdot (V_g+V_l \cdot \alpha)$ (M-celotna količina CO₂ v posodi (ml), C_g-izmerjena koncentracija CO₂ v plinski fazi (%), V_g-volumen plinske faze (ml), V_l-volumen tekoče faze (ml), α-Bunsenov koeficient topnosti plinov, ki znaša 0,7013 za CO₂ pri 28 °C). Rezultat smo za anaerobno inkubirane vzorce

tal izrazili v ml CO₂ na gram suhih tal. Za aerobno inkubirane vzorce tal pa smo rezultat izrazili v ml CO₂ na gram suhih tal na uro.

3.4 SPREMLJANJE HITROSTI PRETVORB DUŠIKOVIH ONESNAŽIL V KOLONAH S TLEMI

PVC cevi premera 16 cm smo do 5 cm pod robom napolnili z barjanskimi oziroma mineralnimi tlemi. Delali smo v treh ponovitvah. Na spodnji strani cevi je bil narejen odtok za odtekanje pronicajoče vode, nad njim pa 2 cm plast peska, da ne bi prihajalo do zamašitve odtoka z delci tal. Cevi iz odtoka so bile preko električne črpalke speljane na vrh kolone, da je voda krožila. Pretok je bil uravnan na 128,75 ml/h. Stalno smo zagotavljali nivo vode na polovici višine kolone. Spodnji del je bil tako potopljen v vodi. V koloni smo torej zagotavljali konstanten nivo vode, ne pa konstantne količine vode. Po pakiranju smo kolone pustili 10 dni, da se ob kroženju vode razmere stabilizirajo, nato pa smo vso vodo spustili skozi iztok in tej izcedni vodi dodali 1,53 g NH₄Cl (kar ustreza 200 kg N/ha površine) in raztopino zopet zlili na vrh kolone. Takoj po dodatku raztopine amonijeve soli smo odvzeli vzorec za analizo NH₄⁺, NO₃⁻ in NO₂⁻ ionov. Naslednji vzorec smo odvzeli po 24 urah, nato po 48 urah in nato vzorčili vsak drugi ali tretji dan, kasneje vsak peti dan (odvisno od opaženih sprememb v koncentracijah ionov). NH₄⁺ in NO₂⁻ smo izmerili spektrofotometrično (glej 3.6, 3.7). Hkrati smo na avtomatskem analizatorju za določanje dušikovih ionov (The continuous-flow analyser, Flowsys, Alliance instruments) izmerili koncentracijo NO_x⁻ ionov, od katere smo odšteli koncentracijo NO₂⁻ ionov in dobili koncentracijo NO₃⁻ ionov.



Slika 5 Kolone z barjanskimi in mineralnimi tlemi ter kroženje z dušikom bremenjene vode

3.5 DOLOČANJE HITROSTI VEZAVE IN KOLIČINE VEZANEGA NH_4^+ -N NA BARJANSKA/MINERALNA TLA

V stekleničke smo zatehtali 40 g tal, zalili z 200 ml raztopine NH_4Cl (0,4 g $\text{NH}_4\text{-N/l}$) in izvajali meritve nevezanega NH_4^+ -N v raztopini ob časih 15, 30, 45, 60 in 120 minut. Ob navedenih časih smo iz stekleničke vzeli 5 ml vzorca in merili NH_4^+ -N spektrofotometrično (glej 3.6, 3.7) na spektrofotometru (Philips PU8620 series, UV/visible spectrophotometer). Poskus smo izvedli v treh ponovitvah.

3.6 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE NITRITA

Ob vsaki seriji meritev smo pripravili poleg vzorcev še standard in vzorec za ničlenje.

Standard:	1 ml standardne raztopine NO_2^- -N (1 mg NO_2^- -N/l)
	3 ml destilirane vode
	1 ml SA+NEDA reagenta
Slepa proba:	4 ml destilirane vode
	1 ml SA+NEDA reagenta
Vzorci:	1 ml vzorca
	3 ml destilirane vode
	1 ml SA+NEDA reagenta

Reagente smo v epruveti premešali z vrtinčnim mešalom in inkubirali na sobni temperaturi. Po 20 minutah smo opravili meritve pri valovni dolžini 540 nm. S slepo probo

smo ničlili spektrofotometer, nato smo izmerili standard in vtikali koncentracijo nitrita v standardu. Izpis na spektrofotometru nam je podal rezultat v mg NO_2^- -N/l. Vse meritve smo opravili na spektrofotometru Philips PU8620 series, UV/visible spectrophotometer.

3.7 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE AMONIJA

Ob vsaki meritvi smo poleg vzorca pripravili še standard in vzorec za ničljenje.

Standard:	1 ml standardne raztopine NH_4^+ -N (20 mg NH_4^+ -N/l)
	5 ml barvnega reagenta
	5 ml alkalne raztopine hipoklorida
Slepa proba:	1 ml destilirane vode
	5 ml barvnega reagenta
	5 ml alkalne raztopine hipoklorida
Vzorec:	1 ml vzorca
	5 ml barvnega reagenta
	5 ml alkalne raztopine hipoklorida

Ob dodatku reagentov smo vzorce dobro premešali na vrtničnem mešalu in nato epruvete 15 minut inkubirali na 38 °C. Po inkubaciji smo vzorce izmerili pri valovni dolžini 660 nm. S slepo probo smo ničlili spektrofotometer, nato smo izmerili standard in v spektrofotometer vtikali koncentracijo NH_4^+ -N v standardu. Izpis na spektrofotometru nam je podal rezultat v mg NH_4^+ -N/l. Vse meritve smo opravili na spektrofotometru Philips PU8620 series, UV/visible spectrophotometer.

3.8 RAZTOPINE IN PUFRI

Barvni reagent za spektrofotometrično določanje amonija:

- Na-salicilat 34 g
- Na-citrat 25 g
- Na-tartrat 25 g
- Na-nitroprusid 0,12 g
- deionizirana voda 1000 ml

Alkalna raztopina hipoklorida za spektrofotometrično določanje nitrita:

- NaOH 30 g
- Na-hipoklorit (>5 % aktivnega klora) 10 ml
- deionizirana voda 1000 ml

SA+NEDA reagent za določanje nitrita:

- Sulfanilamid 10 g
- koncentrirana fosforna kislina 100 ml
- N-10 naftiletildiamin dihidroklorid 0,5 g
- deionizirana voda 1000 ml

4 REZULTATI

4.1 KAPACITETA ZADRŽEVANJA VODE V TLEH (WHC)

Barjanskim in mineralnim tlem smo izmerili kapaciteto zadrževanja vode. Tla smo za 24 ur potopili v destilirano vodo in nato pustili, da je nevezana voda odtekla. 100 % WHC je največja masa vode, ki so jo tla sposobna zadržati.

Barjanska tla: 100 % WHC je $1,82 \pm 0,02$ g vode/g suhih tal

Mineralna tla: 100 % WHC je $0,44 \pm 0,01$ g vode/g suhih tal

1 g suhih barjanskih tal torej lahko zadrži približno štirikrat več vode kot 1 g suhih mineralnih tal.

4.2 SPREMLJANJE KONCENTRACIJ IN PRETVORB NITRITA, NITRATA IN AMONIJEVEGA IONA V MIKROKOZMIH

4.2.1 Aerobna inkubacija (spremljanje nitrifikacije)

Začetna koncentracija amonija je bila v kontrolnih stekleničkah (voda brez dodanega dušika) pri mineralnih tleh 0, barjanska tla pa so vsebovala približno $0,005$ mg NH_4^+ -N na gram suhih tal. Mnogo višje (okoli $0,1$ mg na gram suhih tal) so bile začetne koncentracije NH_4^+ -N v ostalih stekleničkah, saj smo jim dodali amonij. To velja tako za mineralna kot za barjanska tla (slika 6a, 6b). Stekleničke mineralnih tal, ki smo jim dodali gnojnico do 94 % WHC so vsebovale $0,18$ mg NH_4^+ -N, ker je količina dodane gnojnice skoraj enkrat večja kot v stekleničkah z gnojnico in 60 % WHC. V stekleničkah, kjer je bil dušik dodan v obliki NPK, je bilo amonija približno pol manj kot v stekleničkah z dodanim NH_4Cl oziroma gnojnico, saj je bil v dodani količini dušika prisoten poleg amonija še nitrat.

Že po enem tednu inkubacije amonija v tleh nismo več zaznali niti v mineralnih tleh niti v barjanskih tleh (slika 6a, slika 6b).

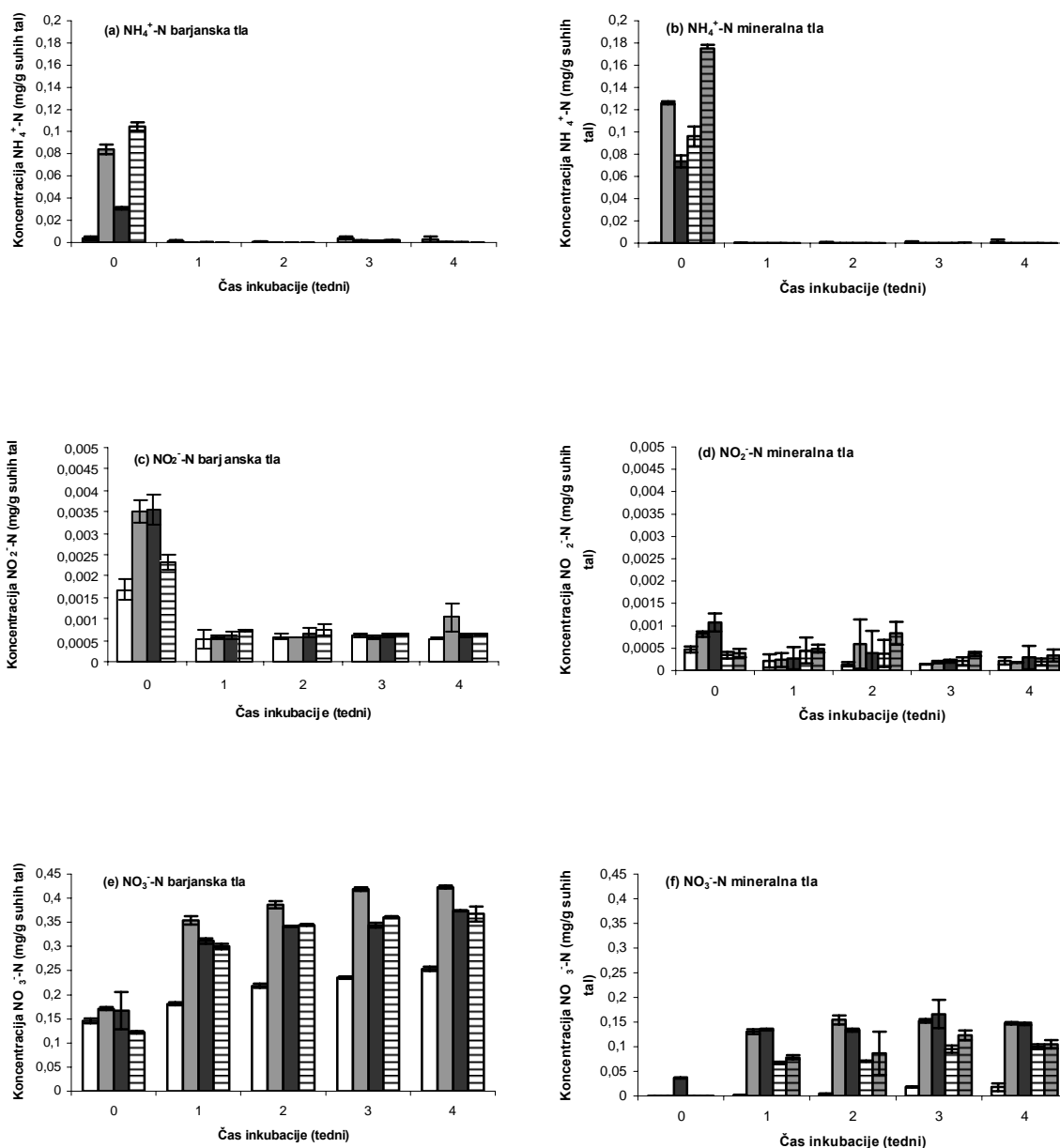
Ob začetku inkubacije so barjanska tla vsebovala $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal, mineralna tla pa $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N. Največ NO_2^- -N je bilo v barjanskih tleh ob začetku inkubacije v variantama z dodanim NH_4Cl in NPK, to je $3,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal. Barjanska tla z dodano gnojnico pa so v izmerjenem začetnem stanju vsebovala

$2,4 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal (slika 6c). Varianta mineralnih tal z dodano gnojnico je vsebovala v začetnem stanju prav toliko NO_2^- -N na gram suhih tal kot kontrolni vzorci, mineralna tla z dodanim NPK pa $1 \cdot 10^{-3}$ mg (slika 6d).

Po enem tednu inkubacije se je v barjanskih tleh količina NO_2^- -N v vseh variantah znižala na nekaj več kot $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal in takšna ostala do konca inkubacije (slika 6c). V mineralnih tleh je znižanje koncentracije NO_2^- -N manj opazno, saj so bile začetne koncentracije nižje (slika 6d).

V začetnem stanju je bilo v barjanskih tleh prisotnega približno 0,15 mg NO_3^- -N na gram suhih tal, podobna količina NO_3^- -N je bila tudi v ponovitvah z dodanim dušikom. Po enem tednu je količina nitrata v stekleničkah z dodanim dušikom narasla na približno 0,3 mg NO_3^- -N na gram suhih tal in se nato do konca inkubacije še nekoliko povišala. V kontrolnih stekleničkah z barjanskimi tlemi je količina NO_3^- -N naraščala dokaj enakomerno vse štiri tedne inkubacije. Do konca inkubacije se je tako povišala za približno 0,1 mg na gram suhih tal. (slika 6e).

V mineralnih tleh v začetnem stanju NO_3^- -N ni bilo, razen v stekleničkah z dodanim NPK. Po enem tednu je količina narasla v vseh variantah (razen v kontrolnih) in sicer na 0,15 mg NO_3^- -N na gram suhih tal v ponovitvah z dodanim amonijem in NPK oziroma na 0,075 mg na gram suhih tal v ponovitvah z dodano gnojnico. Količina NO_3^- -N je do konca inkubacije nato ostala dokaj konstantna, rahlo naraščanje je opazno le v kontrolnih stekleničkah z mineralnimi tlemi in destilirano vodo ter v variantama z dodano gnojnico, kjer se je do konca inkubacije akumuliralo približno 0,02 mg NO_3^- -N na gram suhih tal (slika 6f).



Slika 6 a, b, c, d, e, f Spremljanje koncentracij NH₄⁺-N, NO₂⁻-N in NO₃⁻-N na gram suhih tal med štiritredensko aerobno inkubacijo. V stekleničke smo zatehtali 30 g tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60 % WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali štiri tedne aerobno na 28 °C v temi in tedensko merili koncentracijo dušikovih ionov.

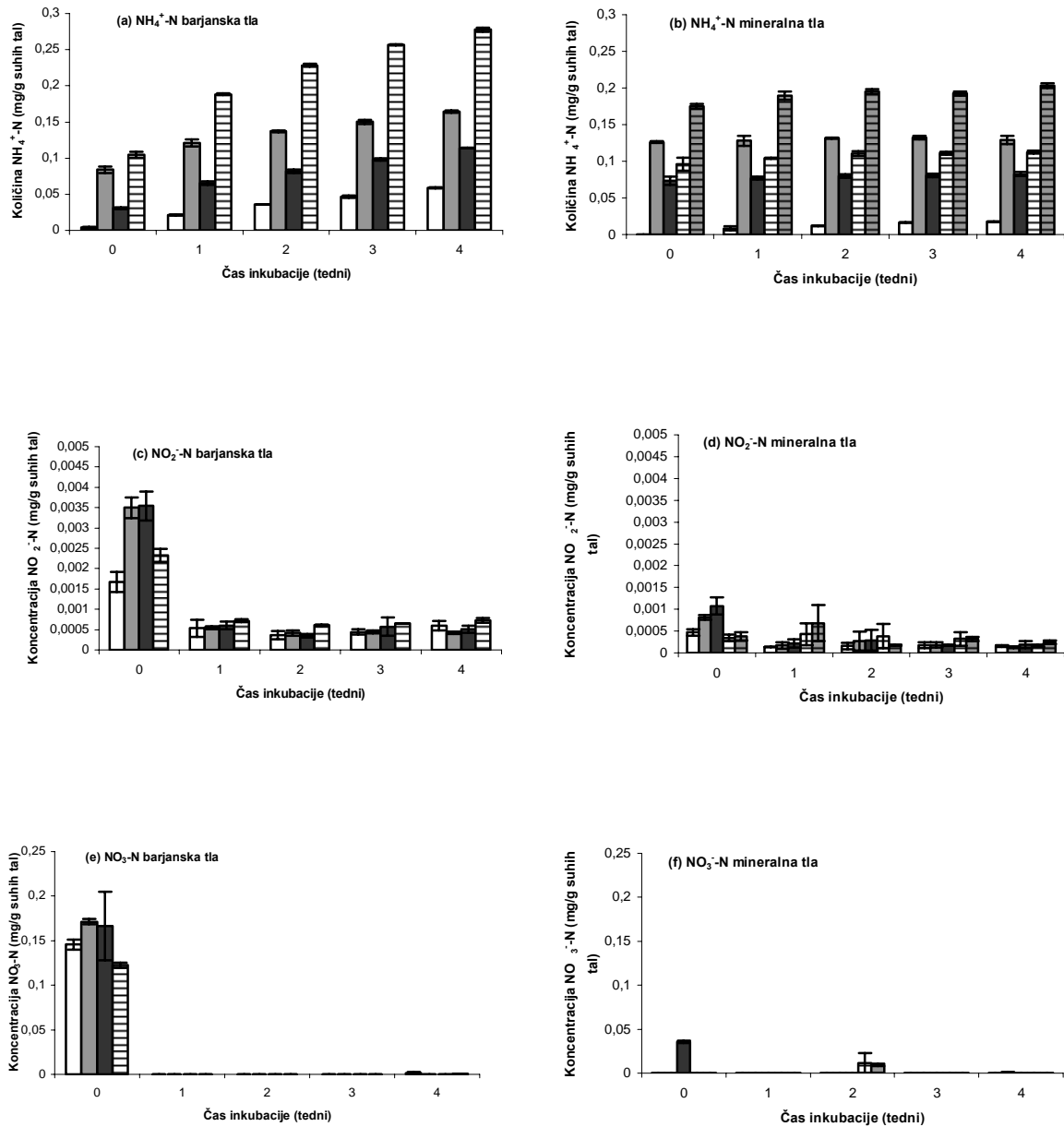
- H₂O
- NH₄Cl
- NPK
- ▨ gnojnica
- ▩ gnojnica 94 % WHC

4.2.2 Anaerobna inkubacija (spremljanje denitrifikacije)

V anaerobno inkubiranih stekleničkah so v začetnem stanju barjanska tla vsebovala približno $5 \cdot 10^{-3}$ mg NH_4^+ -N na gram suhih tal, barjanska tla z dodanim NPK 0,025 mg NH_4^+ -N na gram suhih tal, tla, katerim smo dodali NH_4Cl in gnojnico pa so v začetnem stanju vsebovala približno 0,1 mg NH_4^+ -N na gram suhih tal. Količina NH_4^+ -N je tedensko naraščala v vseh stekleničkah do konca inkubacije. Najvišja je bila količina NH_4^+ -N ob koncu inkubacije v stekleničkah z dodano gnojnico, to je približno 0,27 mg NH_4^+ -N na gram suhih tal, najnižja pa v kontrolnih stekleničkah brez dodanega dušika, to je 0,05 mg NH_4^+ -N na gram suhih tal (slika 7a).

V mineralnih tleh je bilo začetno stanje podobno začetnemu stanju barjanskih tal. NH_4^+ -N ni bilo v kontrolnih stekleničkah brez dodanega dušika, največ NH_4^+ -N pa je bilo v steklenički z dodano gnojnico do 94% WHC, saj so te ponovitve dobile največjo količino gnojnice. Koncentracije NH_4^+ -N se tekom inkubacije niso vidno spreminjale, temveč so ostale dokaj konstantne (slika 7b).

Začetne koncentracije NO_2^- -N v barjanskih tleh so bile najvišje v stekleničkah z dodanim NH_4Cl in NPK, to je $3,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal, najnižje pa v kontrolnih stekleničkah, kjer ni bilo dodanega dušika in sicer $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal. Koncentracije NO_2^- -N so že po enem tednu padle na približno $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal in ostale do konca inkubacije nizke in dokaj izenačene pri vseh stekleničkah (slika 7c). Mnogo nižje so bile začetne koncentracije v mineralnih tleh, to je od $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal v kontrolnih stekleničkah do $1 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal v stekleničkah z dodanim NPK. Koncentracije so po enem tednu padle in se ustalile na približno $0,25 \cdot 10^{-3}$ mg NO_2^- -N na gram suhih tal (slika 7d).



Slika 7 a, b, c, d, e, f Spremljanje koncentracij NH₄⁺-N, NO₂⁻-N in NO₃⁻-N na gram suhih tal med štiritedensko anaerobno inkubacijo. V stekleničke smo zatehtali 30 g tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60 % WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali štiri tedne anaerobno v atmosferi N₂ na 28 °C v temi in tedensko merili koncentracijo dušikovih ionov.

- H₂O
- NH₄Cl
- NPK
- ▨ gnojnica
- ▨ gnojnica 94 % WHC

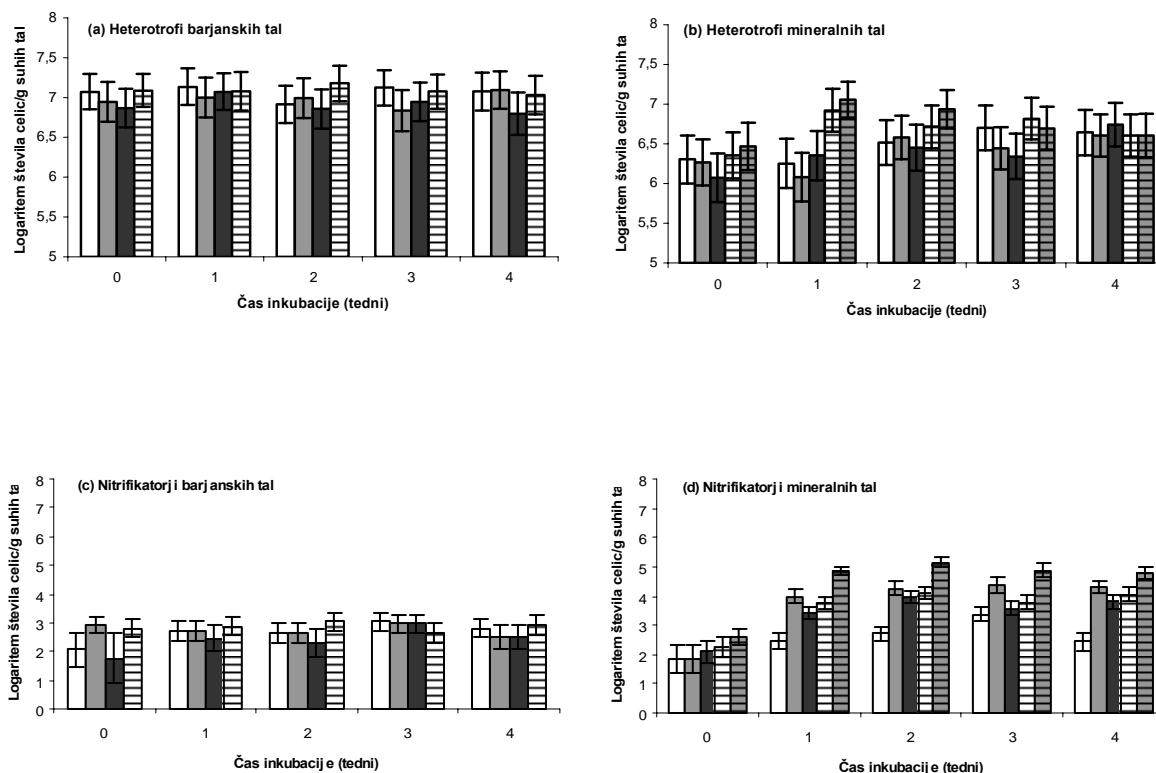
V barjanskih tleh je bilo v začetnem stanju v vseh stekleničkah okoli 0,15 mg NO_3^- -N na gram suhih tal, že po enem tednu inkubacije pa NO_3^- -N v tleh ni bilo več. Zaznali ga nismo več do konca inkubacije (slika 7e). V mineralnih tleh NO_3^- -N tudi na začetku ni bilo, razen v stekleničkah z dodanim NPK, kjer ga je bilo nekaj manj kot 0,05 mg na gram suhih tal. Nekaj malega NO_3^- -N smo izmerili po 2 tednih inkubacije v stekleničkah z gnojnico (slika 7f).

4.3 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCU TAL

4.3.1 Stekleničke z aerobno atmosfero

Število heterotrofnih bakterij je bilo v barjanskih tleh v vseh stekleničkah tekom inkubacije konstantno, to je 10^7 bakterij (slika 8a). V mineralnih tleh je bilo heterotrofov nekoliko manj kot v barjanskih tleh, približno $4 \cdot 10^6$ bakterij. Število se je v variantah z dodano gnojvko po enem tednu povečalo do približno 10^7 bakterij in se do konca inkubacije nekoliko pomanjšalo. (slika 8b).

Število nitrifikatorjev v barjanskih tleh (slika 8c) je nekoliko višje od 10^2 bakterij v gramu suhih tal in se med štiritedensko inkubacijo praktično ne spreminja. V kontrolnih stekleničkah mineralnih tal je bilo v začetnem stanju 10^2 nitrifikatorjev, po enem tednu se je število povečalo na $5 \cdot 10^2$ nitrifikatorjev v gramu suhih tal in nato do tretjega tedna inkubacije naraslo do $5 \cdot 10^3$. V variantah z dodanim dušikom se je število povečalo na 10^4 , oziroma v varianti s 94 % gnojvko celo do 10^5 (slika 8d). V variantah mineralnih tal z dodanim dušikom se število nitrifikatorjev do konca inkubacije ni več bistveno spreminjalo.



Slika 8 a, b, c, d Logaritem števila heterotrofov in nitrifikatorjev v tleh med štiritedensko aerobno inkubacijo stekleničk. V stekleničke smo zatehtali 30 g tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60 % WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali štiri tedne aerobno na 28 °C v temi in tedensko ugotavljali število bakterij v vzorcih tal.

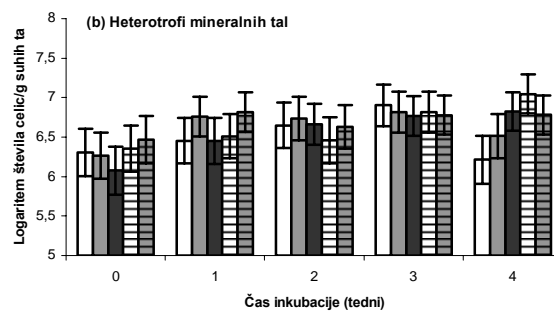
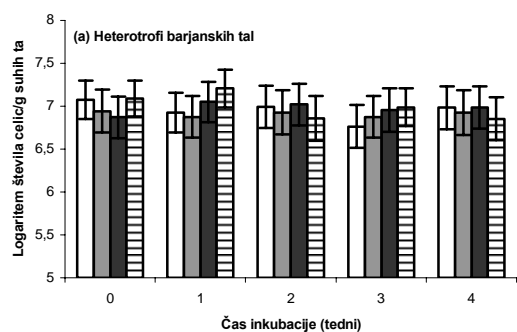
- H₂O
- NH₄Cl
- NPK
- ▨ gnojnica
- ▩ gnojnica 94 % WHC

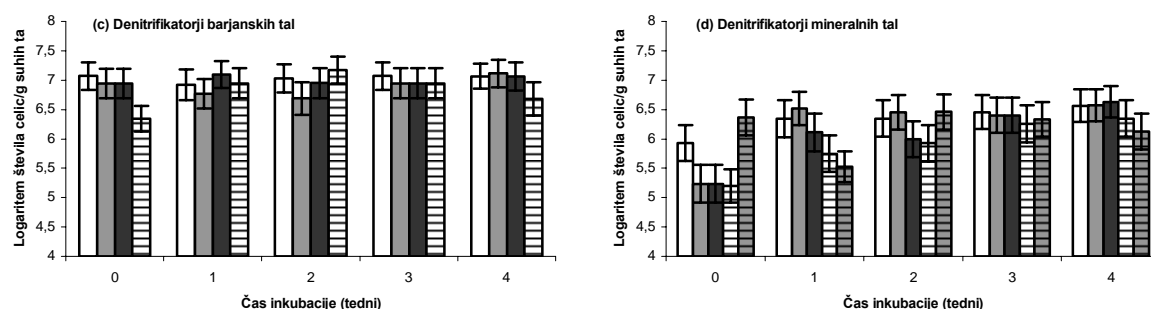
4.3.2 Stekleničke z anaerobno atmosfero

Število heterotrofov v barjanskih tleh je bilo v stekleničkah z anaerobno atmosfero (slika 9a) enako kot v stekleničkah s kisikom, to je 10^7 bakterij v gramu suhih tal (slika 8a). Tudi med stekleničkami ni opaznih bistvenih sprememb, število ostaja vse štiri tedne inkubacije

nespremenjeno (slika 9a). Mineralna tla vsebujejo nekoliko manj heterotrofov (slika 9b) od barjanskih tal, približno $4 \cdot 10^6$ bakterij, število pa se tekom inkubacije rahlo povečuje do nekako $6 \cdot 10^6$ bakterij.

V barjanskih tleh smo ugotovili približno 10^7 denitrifikatorjev (slika 9c), število pa se tekom inkubacije ni spreminjalo, tudi če primerjamo variante med sabo. V mineralnih tleh (slika 9d) je denitrifikatorjev manj kot v barjanskih tleh (slika 9c), približno 10^6 bakterij. Število se je po enem tednu inkubacije v kontrolnih stekleničkah povišalo na približno $3 \cdot 10^6$, po dveh tednih inkubacije pa se je pri vseh variantah ustalilo na približno $2,5 \cdot 10^6$ bakterij na gram suhih tal.





Slika 9 a, b, c, d Logaritmem števila heterotrofov in denitrifikatorjev v tleh med štiritedensko anaerobno inkubacijo stekleničk. V stekleničke smo zatehtali 30 g tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60 % WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali štiri tedne anaerobno v atmosferi N_2 na 28 °C v temi in tedensko ugotavljali število bakterij v vzorcih tal.

- H_2O
- NH_4Cl
- NPK
- ▨ gnojnica
- ▩ gnojnica 94 % WHC

4.4 UGOTAVLJANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI PREKO MERITEV EMISIJ CO_2 IN N_2O

4.4.1 Stekleničke z aerobno atmosfero; hitrost proizvodnje emisij

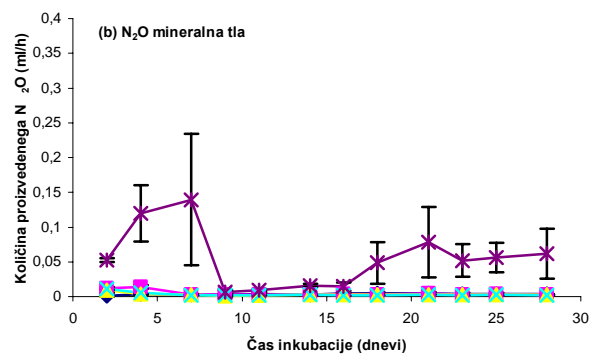
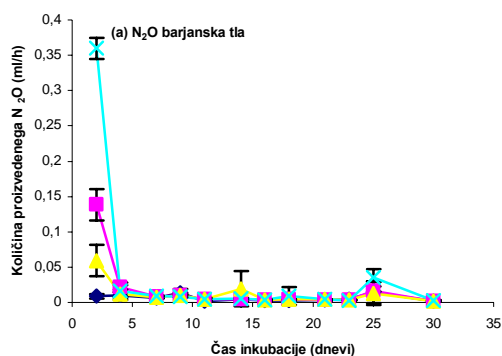
Večji del N_2O se je sprostil iz barjanskih tal že po 2 dneh inkubacije, največ iz stekleničk z dodano gnojnico, to je 0,35 ml N_2O na gram suhih tal v eni uri. V kontrolnih stekleničkah se je iz tal sprostila le komaj zaznavna količina N_2O . V kontrolnih stekleničkah se je sprostilo le okoli 0,01 ml N_2O na gram tal na uro. V naslednjih dneh in do konca inkubacije se je sproščalo le malo N_2O , manj kot 0,025 ml na gram suhih tal v eni uri (slika 10a).

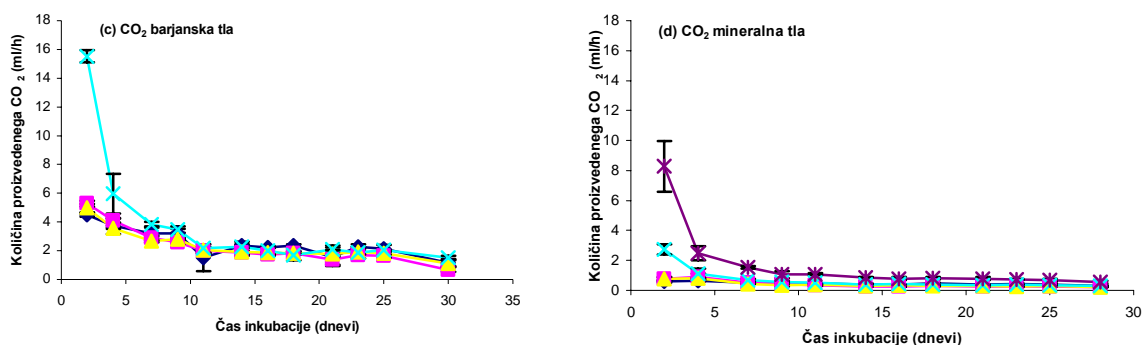
Emisije N_2O v mineralnih tleh so bile manjše, sprostilo se je le okoli 0,02 ml N_2O na gram suhih tal v eni uri. Več nastalega N_2O (približno 0,15 ml na gram tal v eni uri) je bilo le v

stekleničkah z dodano gnojnico pri 94 % WHC, hitrost nastanka emisij N_2O je bila maksimalna po enem tednu (slika 10b).

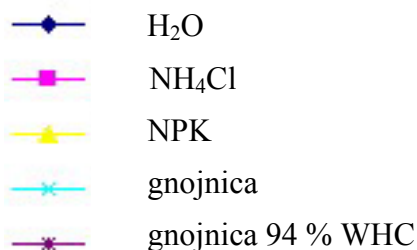
Hitrost proizvodnje CO_2 v barjanskih tleh je bila najvišja dva dni po začetku inkubacije in je nato dnevno počasi padala. Najvišja je bila v stekleničkah z dodano gnojnico, to je 16 ml CO_2 na gram suhih tal v eni uri, v ostalih stekleničkah pa okoli 5 ml CO_2 na gram suhih tal v eni uri. Po 30 dneh inkubacije je v eni uri na gram tal nastalo le še okoli 2 ml CO_2 . (slika 10c).

V mineralnih tleh je bila hitrost proizvodnje CO_2 nižja, v stekleničkah z dodano gnojnico je nastalo le 3 ml CO_2 na gram suhih tal na uro. Več CO_2 , to je 8 ml na gram suhih tal na uro je nastalo v stekleničkah z mineralnimi tlemi in gnojnico pri 94 % WHC. Hitrost nastajanja CO_2 je po desetih dneh padla in se ustalila na približno 1 ml proizvedenega CO_2 na gram suhih tal na uro (slika 10d).





Slika 10 a, b, c, d Hitrost proizvodnje N_2O in CO_2 (ml) v eni uri na gram suhih tal med štiritredensko aerobno inkubacijo. V stekleničke smo zatehtali 30 g tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60% WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali štiri tedne aerobno na 28 °C v temi in trikrat tedensko merili emisije plinov N_2O in CO_2 .

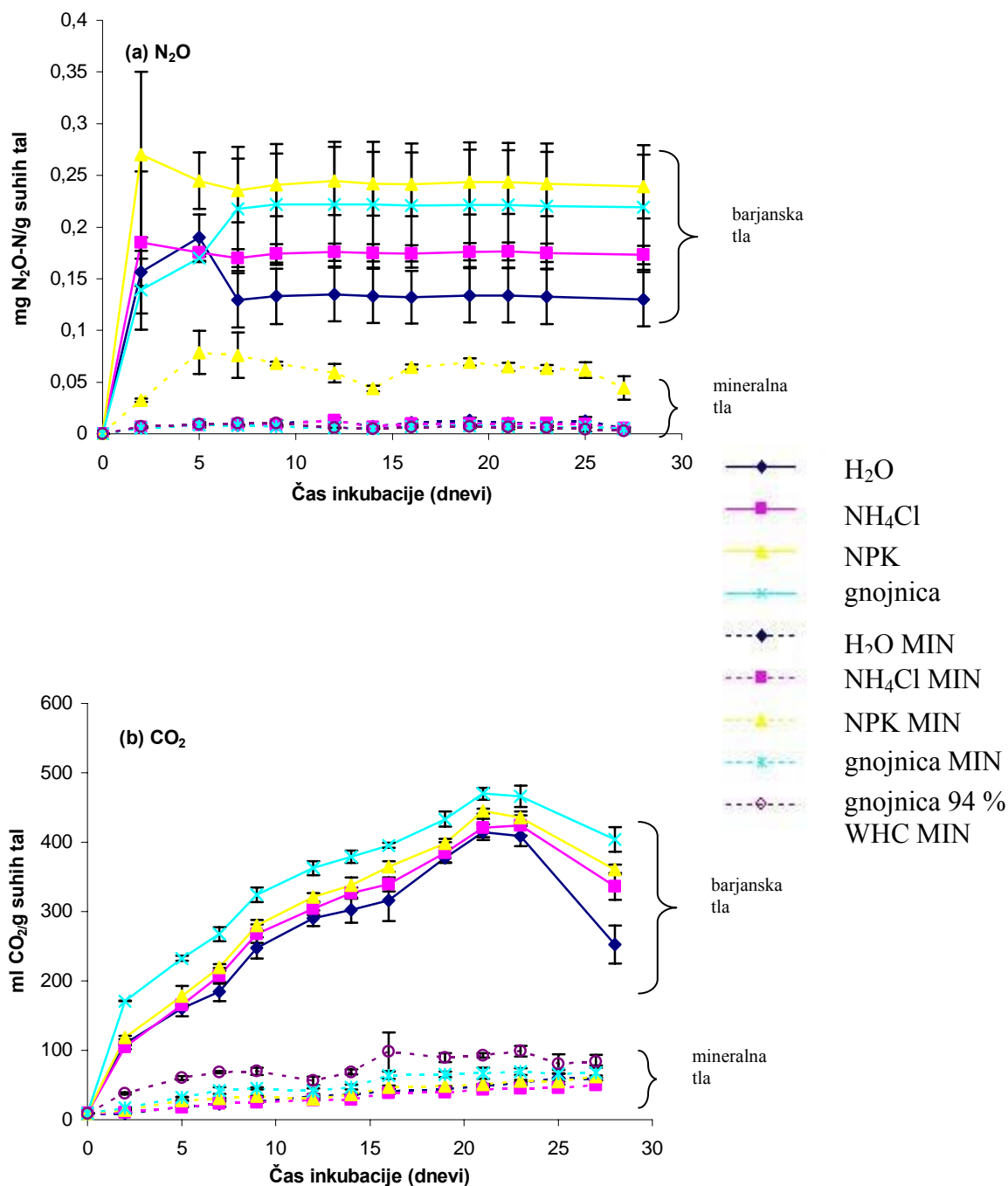


4.4.2 Stekleničke z anaerobno atmosfero; skupna količina proizvedenih plinov

Količina N_2O se je v barjanskih tleh po enem tednu stabilizirala in ostala do konca inkubacije dokaj konstantna. Najmanj je bilo proizvedenega N_2O v kontrolnih stekleničkah, to je približno 0,13 mg N_2O na gram suhih tal, največ pa v stekleničkah z dodanim NPK, to je 0,25 mg N_2O na gram suhih tal (slika 11a). V mineralnih tleh je nastalo zelo malo N_2O v primerjavi z barjanskimi tlemi. Nastalo je le okoli 0,01 mg N_2O na gram suhih tal, nekoliko več N_2O je nastalo le v varianti z dodano gnojnico, kjer je nastalo približno 0,075 mg N_2O na gram suhih tal (slika 11a).

Količina nastalega CO_2 je bila v barjanskih tleh najnižja v kontrolnih stekleničkah, najvišja pa v stekleničkah z dodano gnojnico. V stekleničkah je v prvih dveh dneh inkubacije nastalo 100 ml CO_2 na gram suhih tal, količina pa je nato tri tedne naraščala do približno

400 ml CO₂ na gram suhih tal, in nato začela upadati (slika 11b). V mineralnih tleh je nastalo manj CO₂ kot v barjanskih tleh. Največ CO₂ je nastalo v varianti z dodano gnojnico, po štirih tednih inkubacije smo izmerili 5 ml CO₂ na gram suhih tal. CO₂ je nastajal do konca inkubacije (slika 11b).



Slika 11 a, b Količina skupno proizvedenih mg N₂O in ml CO₂ na gram suhih tal med štiritredensko anaerobno inkubacijo v barjanskih in mineralnih tleh. V stekleničke smo zatehtali 30 g barjanskih tal, dodali 0,4 g dušika in zagotovili 60 % WHC (v stekleničke z mineralnimi tlemi in gnojnico smo pri varianti s 60 % WHC dodali 0,217 g dušika in pri varianti s 94 % WHC 0,4 g dušika). Stekleničke smo inkubirali 4 tedne anaerobno na 28 °C v temi in trikrat tedensko merili emisije N₂O in CO₂ plinov.

4.5 SPREMLJANJE HITROSTI PRETVORB DUŠIKOVIH ONESNAŽIL V STOLPCU S TLEMI

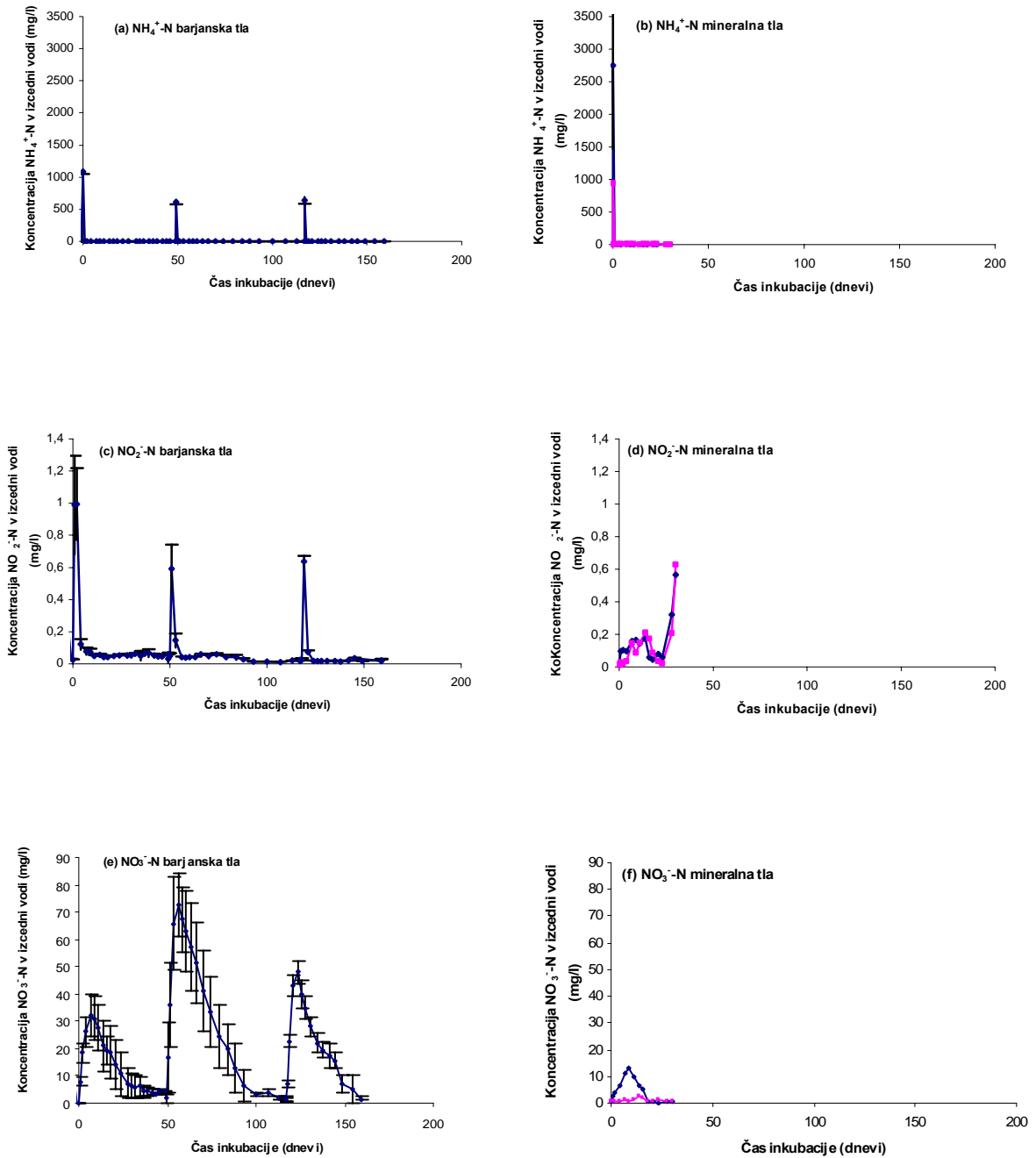
PVC cevi premera 16 cm smo napolnili z barjanskimi oziroma mineralnimi tlemi in skozi tla spustili z dušikom bremenjeno vodo. Izcedno vodo smo z električno črpalko ponovno črpali na vrh kolone in med kroženjem vode opazovali pretvorbe med dušikovimi ioni v izcedni vodi. Izcedno vodo barjanskih tal smo z amonijem bremenili trikrat, izcedno vodo mineralnih tal pa enkrat.

24 ur po dodatku amonija je koncentracija le tega v izcedni vodi močno upadla. V barjanskih tleh na raven 0-1 mg/l in 1-5 mg/l v mineralnih tleh. Koncentracije se nato tekom inkubacije niso spreminjale (slika 12a, 12b).

Koncentracija NO_2^- -N se je v izcedni vodi kolone z barjanskimi tlemi povišala že takoj naslednji dan po dodatku amonija in dosegla vrh drugi dan po dodatku. Koncentracija je nato padla in ostala nizka in dokaj konstantna (slika 12c). V izcedni vodi mineralnih tal se je NO_2^- -N prav tako pojavil že naslednji dan po dodatku amonija, vendar je vrh dosegel šele po štirih tednih (slika 12d).

NO_3^- -N se je pojavil v izcedni vodi barjanskih tal kmalu po dodatku amonija, svoj vrh pa je dosegel približno en teden po dodatku (oziroma približno pet dni po vrhu NO_2^- -N). Nato je koncentracija NO_3^- -N počasi padla (slika 12e). Izcedna voda kolon z mineralnimi tlemi je vsebovala v vsaki koloni različne količine NO_3^- -N. V izcedni vodi prve kolone smo največ NO_3^- -N zaznali osem dni po dodatku amonija, v izcedni vodi druge kolone pa 14 dni po dodatku amonija, vendar je bila izmerjena količina mnogo nižja od one v prvi koloni (slika 12f).

Opazili smo, da je pronicanje vode lažje skozi barjanska tla kot pa skozi mineralna tla.



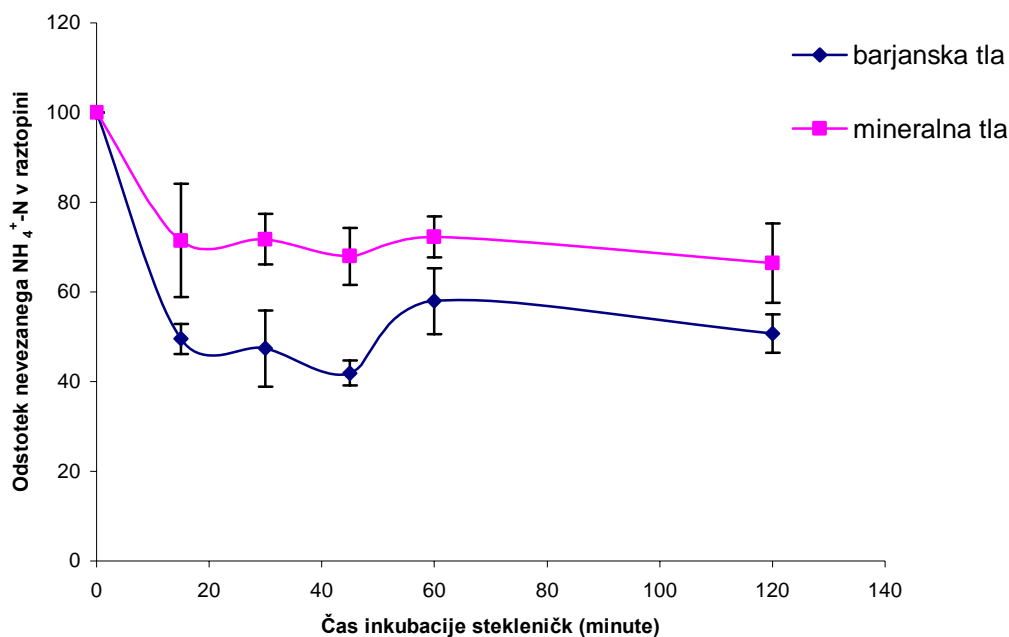
Slika 12 a, b, c, d, e, f Koncentracije $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/l) v izcedni vodi v času. PVC cevi smo napolnili s tlemi, uravnali nivo gladine vode na polovici kolone in s črpalko vračali izcedno vodo na vrh kolone. Ob dnevih 0, 49 in 117 smo v izcedno vodo dodali 1,53 g NH_4Cl (0,4 g N) in raztopino zopet zlili na vrh kolone, ter spremljali pretvorbe in koncentracije dušikovih ionov v izcedni vodi.

4.6 HITROST IN DELEŽ VEZAVE AMONIJA NA TLA

V poskusu z barjanskimi tlemi se je že po 15 minutah na tla vezalo približno 50 % amonija iz raztopine, kar pomeni približno 45,7 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Preračunano na gram suhih barjanskih tal je to 1,54 mg vezanega $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

V poskusu z mineralnimi tlemi pa se je po 15 minutah na tla vezalo približno 30 % dodanega amonija iz raztopine, to je približno 23,5 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Preračunano na gram suhih mineralnih tal je to 0,62 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

Na gram suhih barjanskih tal se pri sobni temperaturi torej veže 2,5x več $\text{NH}_4^+\text{-N}$ kot na gram suhih mineralnih tal. Časovni potek vezave pa je med tlemi zelo podoben. Večina amonija se veže že po 15 minutah (slika 13).



Slika 13 Hitrost in relativna količina nevezanega $\text{NH}_4^+\text{-N}$ na barjanska in mineralna tla. V stekleničke smo zatehtali 40 g tal (in sočasno določili vlažnost teh tal), zalili z 200 ml raztopine NH_4Cl in vsakih 15 minut izmerili koncentracijo nevezanega $\text{NH}_4^+\text{-N}$ v raztopini.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Barjanska tla imajo zaradi stalne ali začasne poplavljenosti počasnejšo razgradnjo rastlinskega materiala, zaradi česar nastaja šota. Šota je delno fosiliziran ostanek rastlinskega materiala, sestavljen pretežno iz lignina in celuloze. Zaradi velike ionsko-izmenjevalne kapacitete in visoke vsebnosti organskega materiala je šota primeren substrat za čiščenje odpadnih vod (Couillard, 1993; Austin, 2006). V tej diplomski nalogi smo primerjali sposobnosti barjanskih tal (vsebujejo šoto) in mineralnih tal (imajo zelo malo organskega materiala in veliko mineralnih delcev) za čiščenje viškov dušika.

Poteku nitrifikacije smo sledili v stekleničkah z aerobno atmosfero. Ekstrakcija dušikovih ionov je pokazala, da se je ves dodani NH_4^+ hitro porabil, saj ga po enem tednu nismo več zaznali niti v barjanskih niti v mineralnih tleh (slika 6a, 6b). Preko nitrita se je pretvoril v nitrat, ki se je kopičil v tleh (slika 6e, 6f). Količina nitrata pa je naraščala tudi v kontrolnih stekleničkah z barjanskimi tlemi, kar je verjetno posledica mineralizacije organskega materiala. Ob mineralizaciji se sprošča dodaten amonij, ki se nato oksidira do nitrata. Na ta način je v barjanskih tleh nastalo 0,1 mg NO_3^- -N na gram suhih tal, v mineralnih tleh pa petkrat manj, to je le okoli 0,02 mg na gram suhih tal (slika 6e, 6f). Razlika je verjetno posledica različne količine organskega materiala v obeh vrstah tal, ki se mineralizira.

Oba tipa tal imata enako število nitrifikatorjev (10^2 - $3 \cdot 10^2$), dodatek dušika v tla pa povzroči povečanje števila nitrifikatorjev le v mineralnih tleh. Verjetno so nitrifikatorji v mineralnih tleh omejeni z dostopnostjo nitrata, zato se združba poveča šele po dodatku amonija oziroma vira energije.

V stekleničkah z anaerobno atmosfero smo sledili poteku denitrifikacije. V začetnem stanju imajo barjanska tla več denitrifikatorjev (10^7 v gramu suhih tal) kot pa mineralna tla (10^6 denitrifikatorjev v gramu suhih tal). Barjanska tla so zaradi pogoste potopljenosti in s tem povezanih anaerobnih razmer ugodnejši medij za rast denitrifikatorjev. Poleg tega imajo tudi višji delež organskega materiala, ki je za uspešno rast denitrifikatorjev nujno potreben. Število denitrifikatorjev pa se v mineralnih tleh po enem tednu nekoliko poveča.

V kontrolnih stekleničkah barjanskih tal z anaerobno atmosfero se je v času štiritedenske inkubacije količina $\text{NH}_4^+\text{-N}$ v gramu suhih tal povišala za približno 0,05 mg. Količina se je poviševala vse štiri tedne inkubacije enakomerno (slika 7a). Vzrok je verjetno sproščanje amonija z mineralizacijo organskega materiala barjanskih tal, saj je v procesu denitrifikacije organski material uporabljen kot donor elektronov in se oksidira, organsko vezan dušik pa se pri tem sprosti v obliki amonija. Vir nastalega amonija pa je lahko tudi disimilativna redukcija nitrata do amonija. Največ $\text{NH}_4^+\text{-N}$, skoraj 0,2 mg na gram suhih tal, je nastalo v barjanskih tleh z dodano gnojnico. Gnojnica vsebuje še dodaten lahko dostopen organski material in ureo, ki ima veliko organsko vezanega dušika, zato je bogat vir amonija.

Trend pojavljanja $\text{NO}_2^-\text{-N}$ v stekleničkah z anaerobno atmosfero je zelo podoben onemu v stekleničkah z aerobno atmosfero. Nitrit, ki ga barjanska tla vsebujejo v začetku inkubacije se hitro porabi, koncentracija pa je nato do konca inkubacije nizka in dokaj konstantna (slika 7c, 7d). Barjanska tla so v začetnem stanju vsebovala približno 0,15 mg $\text{NO}_3^-\text{-N}$, v mineralnih tleh pa nitrata nismo zaznali. V mineralnih tleh verjetno nitrat nastaja v naravnem okolju v zelo majhnih količinah, saj so ta tla sestavljena pretežno iz mineralnih delcev, organskega materiala, ki je lahko vir dušika, pa je v teh tleh desetkrat manj kot v barjanskih.

Nitrat se v procesu denitrifikacije pretvori do plinastega dušika. V plinski fazi stekleničk smo merili koncentracijo N_2O . Ugotovili samo, da se je ves nitrat iz obeh tipov tal pretvoril v N_2O , v barjanskih tleh z dodanimi oblikami dušika pa je nastalo še nekoliko več N_2O (slika 11a). Emisije N_2O so v mineralnih tleh na komaj zaznavnem nivoju, saj tla niso vsebovala nitrata, ki je substrat za proces denitrifikacije. Dodatno pa nitrat ni mogel nastajati zaradi anaerobnih razmer, ki zavirajo potek nitrifikacije. Za obe vrsti tal velja, da so imele variante z dodanim NPK najvišjo izmerjeno količino plina N_2O , saj NPK vsebuje 45 % dušika v obliki nitrata (slika 11a).

Talna respiracija je vsota vseh metabolnih aktivnosti, ki producirajo in porabljajo CO_2 , je torej neto rezultat sproščanja in porabljanja CO_2 s strani metabolno aktivnih talnih organizmov (Weaver, 1994). Količina nastalega CO_2 kaže na višjo aktivnost barjanskih tal.

Že po dveh dneh inkubacije je v barjanskih tleh nastalo več kot 100 ml CO₂ na gram suhih tal, v mineralnih tleh pa le okoli 20 ml (slika 11b). V mineralnih tleh je količina CO₂ naraščala zelo počasi, medtem ko je v barjanskih tleh hitro naraščala tri tedne, nato pa začela upadati. Največ CO₂ je nastalo v stekleničkah z dodano gnojnico, saj gnojnica vsebuje veliko lahko razgradljivega organskega materiala, ki se pretvarja v CO₂. Upad koncentracije CO₂ po tritedenski inkubaciji verjetno kaže na neto porabo tega plina in morebitno aktivnost litotrofov. V anaerobnih pogojih bi to lahko bil tudi proces metanogeneze.

Tudi hitrost produkcije CO₂ je višja v barjanskih tleh v primerjavi z mineralnimi tlemi (približno petkrat višja), saj je v slednjih nastala le komaj zaznavna količina CO₂ v gramu suhih tal na uro. Nekoliko večjo količino akumuliranega CO₂ smo izmerili le v stekleničkah z mineralnimi tlemi v poskusnih variantah z dodano gnojnico. Gnojnica vsebuje lahko razgradljivi organski material, ki se pretvori v CO₂. Barjanska tla vsebujejo več lahko razgradljivega organskega materiala in je zato hitrost nastanka CO₂ višja, vendar tekom inkubacije upada (slika 10c). Dodaten razlog za višjo hitrost produkcije CO₂ v barjanskih tleh je verjetno tudi večje število heterotrofnih bakterij v barjanskih tleh, saj ti iz organskega materiala proizvajajo CO₂.

V PVC ceveh smo skušali ustvariti pogoje za hkraten potek nitrifikacije in denitrifikacije in s tem spremljati celosten potencial tal za čiščenje z dušikom obremenjene vode. Ugotovili smo, da so barjanska tla ustrežnejši medij za pronicanje vode kot mineralna tla. Voda je skozi barjanska tla pronicala neovirano, kar je omogočalo boljši stik onesnažene vode z mikrobno združbo v tleh in zato boljše rezultate čiščenja. Skozi mineralna tla pa je voda pronicala zelo slabo, verjetno zaradi nastanka neprepustnih plasti, ki so posledica drugačne sestave mineralnih tal.

Dodanega amonija barjanskim in mineralnim tlem že takoj naslednji dan skoraj nismo več zaznali v izcedni vodi. Predvidevamo, da se je dodani amonij vezal na delce tal ali na organski material in se tekom inkubacije ob mikrobni procesih pretvarjal v ionske oziroma plinaste produkte. V procesu nitrifikacije je nastajal nitrit in nato nitrat. Ker v

poskusu nismo izvajali meritev emisij plinov N_2O , ne vemo kolikšne količine dodanega amonija so se v obliki plinov sprostile v atmosfero.

Izcedna voda mineralnih tal je ob meritvah vsebovala 2-6 mg/l amonija, izcedna voda barjanskih tal pa manj kot 1 mg/l, kar kaže na slabšo sposobnost mineralnih tal za zadrževanje amonija. Tudi dodaten podposkus vezave amonija na oba tipa tal je pokazal višjo kapaciteto vezave amonija na barjanska tla. Razlog je verjetno v večji količini organskega materiala v barjanskih tleh, ki ima visoko ionsko-izmenjevalno kapaciteto (Austin, 2006), kakor tudi v različni teksturi tal.

V mineralnih tleh je zaradi zelo slabega pronicanja vode in težav z zamašitvijo kolon ponovljivost poskusa nizka. Tla v kolonah so se odzivala zelo različno, odvisno od tega, kako je voda krožila. Maksimalno koncentracijo nitrita smo v izcedni vodi mineralnih tal izmerili šele po treh tednih inkubacije (slika 12d), kar je mnogo kasneje kot v izcedni vodi barjanskih tal.

Za boljšo opredelitev razlik med barjanskimi in mineralnimi tlemi bi morali opraviti pogostejše meritve procesov v prvem tednu inkubacije tal, saj se večina sprememb zgodi tedaj. Rezultati kažejo, da so barjanska tla sposobna zadržati večje količine dušikovih ionov, procesi nitrifikacije in denitrifikacije pa potekajo v barjanskih tleh vsaj enako učinkovito kot v mineralnih. Barjanska tla bi zato lahko bila primeren substrat za odstranjevanje viškov dušika v biotehnoloških procesih čiščenja odpadnih vod.

5.2 SKLEPI

- Glede na emisije CO₂ plina imajo barjanska tla višjo skupno mikrobno aktivnost od mineralnih tal, enkrat višje pa je tudi število heterotrofnih bakterij na gram suhih barjanskih tal.
- Glede na emisije N₂O plina v anaerobnih pogojih ugotavljamo večjo denitrifikacijsko aktivnost barjanskih tal. Število denitrifikatorjev na gram suhih barjanskih tal (10⁷ bakterij) je večje od števila le teh na gram suhih mineralnih tal (10⁶ bakterij).
- Število nitrifikatorjev na gram suhih tal je v obeh tipih tal podobno (1·10² -3·10² bakterij). Dodatek dušika povzroči povečanje števila nitrifikatorjev v mineralnih tleh, ne pa tudi v barjanskih.
- Mineralizacija organskega dušika je nekoliko večja v barjanskih tleh.
- Oba tipa tal imata potencial za odstranjevanje NH₄⁺ iz raztopine in sposobnost poteka procesov nitrifikacije in denitrifikacije.
- Sistem za čiščenje dušika z barjanskimi tlemi še vedno deluje podobno učinkovito po večkratnih bremenitvah z dušikom.

6 POVZETEK

V današnjem času postajajo z dušikom obremenjene vode vse večji problem, zato se išče primerne metode za čiščenje odpadnih vod. Barjanska tla so zaradi velike vsebnosti šote lahko primeren medij za čiščenje z dušikom obremenjenih vod, saj ima šota veliko ionsko-izmenjevalno kapaciteto, poleg tega pa vsebuje velike količine organskega materiala, ki v procesu denitrifikacije služi kot donor elektronov.

Da bi ugotovili bioremediacijski potencial tal Ljubljanskega barja, smo primerjali prečiščevalne sposobnosti barjanskih tal z mineralnimi tlemi. Zaradi boljše primerljivosti, smo obe vrsti tal odvzeli na območjih z enakimi podnebnimi razmerami.

Vzorci tal smo bremenili z različnimi oblikami dušika in jih štiri tedne inkubirali v stekleničkah. Tedensko smo izvajali ekstrakcijo dušikovih ionov iz vzorcev tal s KCl, da smo spremljali potek nitrifikacije in denitrifikacije, v vzorcih tal smo spremljali spremembe v številu heterotrofov, nitrifikatorjev ter denitrifikatorjev in trikrat tedensko merili emisije N_2O in CO_2 plinov. Za spremljanje skupnega poteka čiščenja dušikovih bremenil v vodi pa smo sestavili manjšo čistilno napravo. PVC cevi smo napolnili s tlemi in spremljali proces pretvorb dušikovih ionov v izcedni vodi, ki smo jo z električno črpalko stalno črpali nazaj na vrh cevi s tlemi.

Ugotovili smo, da barjanska tla vsebujejo več heterotrofov in denitrifikatorjev od mineralnih tal, število heterotrofov pa se med inkubacijo ni bistveno spreminjalo. Po enem tednu inkubacije se je število denitrifikatorjev v mineralnih tleh nekoliko povečalo. Število nitrifikatorjev je v barjanskih tleh konstantno, v mineralnih tleh pa se po enem tednu poveča in je tako višje od števila nitrifikatorjev v barjanskih tleh. Meritve emisij so pokazale, da je splošna mikrobna aktivnost barjanskih tal višja od splošne mikrobne aktivnosti mineralnih tal. Proces nitrifikacije in denitrifikacije potekajo v barjanskih tleh vsaj tako dobro kot v mineralnih, imajo pa barjanska tla zmožnost vezave večje količine amonija od mineralnih tal.

7 VIRI

- Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2nd ed, New York, London, John Wiley and Sons: 225-330. Citirano po: Prinčič A. 1996. Nitrifikacija in polimorfizem restriksijskih fragmentov nitrifikacijskih populacij odpadne vode. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta in Medicinska fakulteta: 1-6.
- Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park, California. Addison Wesley Longman Limited: 421-427.
- Austin D. 2006. Influence of cation exchange capacity (CEC) in a tidal flow, flood and drain wastewater treatment wetland. Ecological Engineering, online junij 2006.
- Ayaz S.C., Akca L. 2001. Treatment of wastewater by natural systems. Environment International, 26: 189-195.
- Barrett J.E., Johnson D.W., Burke I.C. 2002. Abiotic nitrogen uptake in semiarid grassland soils of the U.S. Great Plains. Soil Science Society of America Journal, 66: 979-987.
- Bouwman A.F., 1990. Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Soils and the Greenhouse Effect. Chichester, Wiley: 61-127.
- Burns L.C., Stevens R.J., Laughlin R.J. 1996. Production of nitrite in soil by simultaneous nitrification and denitrification. Soil Biology & Biochemistry, 28: 609-616.
- Buscot F., Varna A. 2005. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin:159-172.

- Couillard D. 1993. The use of peat in wastewater treatment. *Water Research*, 28: 1261-1274.
- Dail D.B., Davidson E.A., Chorover J. 2001. Rapid abiotic transformation of nitrate in an acid forest soil. *Biogeochemistry*, 54: 131-146.
- Davidsson T. E., Trepel M., Schrautzer J. 2002. Denitrification in drained and rewetted minerotrophic peat soils in Northern Germany (Pohnsdorfer Stauung). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165: 199-204.
- De Boer W., Kowalchuk G.A. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 853-866.
- DeLaune R.D., Jugsujinda A., West J.L., Johnson C.B., Kongchum M. 2005. A screening of the capacity of Louisiana freshwater wetlands to process nitrate in diverted Mississippi River water. *Ecological Engineering*, 25: 315-321.
- Dobson M., Frid C. 1998. *Ecology of aquatic systems*. Edinburgh Gate, Harlow, England, Addison Wesley Longman Limited: 158-169.
- Ellis S., Dendooven L., Gouling W.T., 1996. Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and N₂O evolution during denitrification; Nitrate disappearance during denitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 589-595.
- Food and Drug Administration's Center for Food Safety & Applied Nutrition. Most probable number from serial dilutions: software. 2006. Rockville, FDA/Centre for Food Safety & Applied Nutrition
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html#tables>

- Fitzhugh R.D., Lovett G.M., Venterea R.T. 2003. Biotic and abiotic immobilization of ammonium, nitrite, and nitrate in soils developed under different species in the Catskill Mountains. *Global Change Biology*, 9: 1591-1601.
- Geerts S.M., McCarthy B. Wastewater treatment by peat filters. *Focus 10,000 Minnesota's Lakeside Magazine*, maj 1999: 351-356
University of Minnesota, Water Research Centre.
<http://septic.coafes.umn.edu/>
- Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to organic matter content and watertable level. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 503-509.
- Hansen J.A., Henriksen K. 1989. Nitrogen in organic wastes applied to soils. London, Academic Press: 185-260.
- Hofrman J., Dušek L., Klanova J., Bezchlebova J., Holoubek I. 2004. Monitoring microbial biomass and respiration in different soils from the Czech Republic – a summary of results. *Environment International*, 30: 19-30.
- Ingersoll T.L., Baker L.A. 1998. Nitrate removal in wetland microcosms. *Water Research*, 32: 677-684.
- Khalil K., Mary B., Renault P. 2004. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O₂ concentration. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 687-699.
- Kimochi Y., Inamori Y., Mizuochi M., Xu K.Q., Matsumura M. 1998. Nitrogen removal and N₂O emission in a full-scale domestic wastewater treatment plant with intermittent aeration. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 2: 202-206.

- Koops J.G., van Beusichen M.L., Oenema O. 1997. Nitrogen loss from grassland on peat soils through oxide production. *Plant and Soil*, 188:119-130.
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., Van Elsas J.D., Mandic-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2762-2771.
- Lee N.M., Welander T. 1996. The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 3: 277-285.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. New York, Pearson Education: 104, 662-664.
- Martinčič A. 2003. Barje na Ljubljanskem barju-nekdaj, včeraj, danes in jutri. *Proteus*, 65, 6: 247-256.
- Mihelič R., Pačnik T. 2005. Sonaravni sistemi obdelave tal za tehnološko učinkovito in okolju prijazno kmetijstvo (poljedelstvo). Zaključno poročilo CRP projekta V4-450-01 (Konkurenčnost Slovenije 2001 - 2006). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str.
- Poach M.E., Hunt P.G., Reddy G.B., Stone K.C., Johnson M.H., Grubbs A. 2004. Swine wastewater treatment by marsh-pond-marsh constructed wetlands under varying nitrogen loads. *Ecological Engineering*, 23: 165-175.
- Pravilnik o zdravstveni ustreznosti pitne vode. 1997. Uradni list Republike Slovenije, 7, 46: 4125-4145.
- Shen Q.R., Ran W., Cao Z.H. 2003. Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere*, 50: 747-753.

- Silvan N., Regina K., Kitunen V., Vasander H., Laine J. 2002. Gaseous nitrogen loss from a restored peatland buffer zone. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 721-728.
- Stone K.C., Poach M.E., Hunt P.G., Reddy G.B. 2004. Marsh-pond-marsh constructed wetland design analysis for swine lagoon wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 23: 127-133.
- Stres B. 2003. Opis sestave in raznovrstnosti denitrifikacijske ter skupne mikrobne združbe v obdelovanih tleh z genetskima markerjema *nosZ* in 16S rDNA. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 1-4.
- Strous M. 2000. Anaerobic ammonium oxidation. Dissertation thesis. Delft, Technische Universiteit Delft: 18-19. Citirano po: Prinčič A. 2001. Obnašanje nitrifikacijskih združb pri selektivnih dejavnikih okolja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 3-6.
- Thorn K.A., Mikita M.A. 2000. Nitrite Fixation by humic substances: nitrogen-15 nuclear magnetic resonance evidence for potential intermediates in chemodenitrification. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 568-582.
- Uredba o mejnih vrednostih vnosa nevarnih snovi in gnojil v tla. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 84: 8709-8717.
- Weaver R.W (ed.). 1994. *Methods of soil analysis: Part 2- Microbiological and biochemical properties*. Wisconsin, Soil Science Society of America: 835 str.

8 ZAHVALA

- Hvala mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec, da mi je omogočila izvedbo diplomske naloge in za vso pomoč ob zaključevanju.
- Hvala dr. Blažu Stresu za pomoč med praktičnim delom, za ideje, ko nismo vedeli kako naprej in za vse odgovore na moja vprašanja.
- Hvala prof. dr. Davidu Stoparju za kritičen pregled diplomskega dela.
- Hvala Tjaši in Simoni za izjemno pomoč pri delu v laboratoriju. Brez vaju ne bi bilo rezultatov.
- Hvala Nastji, Juretu in Tinetu za pomoč med pisanjem in vse vzpodbudne besede. Brez vas bi obupal že na začetku.
- Hvala bratu za vzpodbude in prenašanje moje občasne slabe volje.
- Na koncu hvala mojima zlatima staršema, da sta mi omogočila študij in me vseskozi podpirala.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok LENARČIČ

BIOREMEDIACIJSKI POTENCIAL ŠOTNIH TAL

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006