



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina ANDREJC

**MOŽNOSTI REMEDIACIJE TAL ONESNAŽENIH Z
DUŠIKOVIMI SPOJINAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina ANDREJC

**MOŽNOSTI REMEDIACIJE TAL ONESNAŽENIH Z DUŠIKOVIMI
SPOJINAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**POSSIBILITIES OF REMEDIATION OF SOILS POLLUTED WITH
NITROGEN COMPOUNDS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Miho Humarja.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Miha HUMAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 630*114:631.453:504.5:502.175(043.2)
KG	Onesnažena tla, remediacija, dušikovi oksidi, denitrifikacija
AV	ANDREJC, Kristina
SA	HUMAR, Miha (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	MOŽNOSTI REMEDIACIJE TAL ONESNAŽENIH Z DUŠIKOVIMI SPOJINAMI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 21 str., 1 pregl., 3 sl., 52 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Tla postanejo onesnažena z dušikovimi spojinami s prekomerno uporabo gnojil in fosilnih goriv. Visoka koncentracija teh spojin (predvsem nitrata) povzroča nižanje pH vrednosti tal. Posledično se iz tal okrepi izluževanje esencialnih elementov. Po drugi strani se poveča tudi mobilnost toksičnih elementov (npr. Al). Zaradi zaostrenih življenjskih pogojev se zmanjša stopnja biodiverzitete v zemlji, kar vpliva na rast rastlin (dreves, poljščin...). Obstaja pester nabor možnosti remediacije tal. Te vključujejo fizikalno-kemične principe ter tehnike bioremediacije. Proces denitrifikacije bakterij in gliv v atmosfero sprošča inerten N ₂ in N ₂ O, ki pripomore k močnejšim podnebnim spremembam. Na zakisana območja se lahko posadijo na nizko vrednost pH naravno tolerantne rastline. Potencial za odstranjevanje dušikovitih spojin predstavljajo tudi gensko spremenjene rastline s prekomerno gensko ekspresijo nekaterih ključnih metabolnih encimov. Simbiotski odnosi med mikroorganizmi in rastlinami omogočajo lažje preživetje in večjo uspešnost v okolju pri obeh straneh. Dodatek bio-ogljja v zemljo izboljša njene lastnosti ter rastlinam in zemeljskim mikroorganizmom omogoči boljše pogoje za obstoj. Za učinkoviti metodi za odstranjevanje nitrata sta se izkazali tudi remediacija s pomočjo električne energije ter upravljanje nivoja podtalnice, pri kateri se ustvarijo primerni pogoji za denitrifikacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 630*114:631.453:504.5:502.175(043.2)

CX Polluted soils, remediation, nitrogen oxides, denitrification

AU ANDREJC, Kristina

AA HUMAR, Miha (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2020

TI POSSIBILITIES OF REMEDIATION OF SOILS POLLUTED WITH NITROGEN COMPOUNDS

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 21 p., 1 tab., 3 fig., 52 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Soils become polluted with nitrogen compounds through excessive use of fertilizers and fossil fuels. High concentrations of these compounds (mostly nitrates) cause a decrease in soil pH. As a result, the elements that are needed by the plants are excluded from the soils. The mobility of toxic elements (e.g. Al) increases. Because of the less favourable living conditions the soil biodiversity decreases. There is a diverse range of soil remediation options. These include the physicochemical principles and bioremediation techniques. The process of denitrification of bacteria and fungi releases inert N₂ and N₂O, which contributes to stronger climate changes, into the atmosphere. Acidic areas can be planted with naturally tolerant plants. The potential for the removal of nitrogen compounds is also represented by genetically modified plants that possess gene overexpression of the key metabolic enzymes. Symbiotic relationships between microorganisms and plants allow easier survival and greater environmental performance on both sides. Adding bio-char to the soil improves its properties and plants along with the terrestrial microorganisms have better chances of survival. Remediation with electrical energy and groundwater level management with which are created conditions for denitrification, have also been proven efficient for the nitrate removal.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 POSLEDICE ONESNAŽENJA TAL Z DUŠIKOVIMI SPOJINAMI	1
2.1 KEMIČNE SPREMEMBE	2
2.2 BIOLOŠKE SPREMEMBE	2
3 MOŽNOSTI REMEDIACIJE	3
4 DENITRIFIKACIJA	4
4.1 POGOJI ZA DELOVANJE PROCESA	5
4.1.1 Prisotnost končnih prejemnikov elektronov	5
4.1.2 Vrednost pH	6
4.1.3 Temperatura	6
4.1.4 Vir ogljika	7
4.1.5 Prisotnost kofaktorjev	7
4.2 BAKTERIJSKA DENITRIFIKACIJA	7
4.2.1 Denitrifikacijski encimi	8
4.3 GLIVNA DENITRIFIKACIJA	9
4.3.1 Ko-denitrifikacija	10
4.4 NEGATIVNI UČINKI DENITRIFIKACIJE	10
5 FITOREMEDIACIJA	10
5.1 GENSKO SPREMENJENE RASTLINE	11
6 SIMBIOTSKI ODNOS	12
6.1 MIKORIZNE GLIVE	12
6.1.1 Endomikoriza	12
6.1.1.1 Arbuskularna mikoriza	12
6.1.1.2 Erikoidna mikoriza	12

6.1.2	Ektomikoriza	13
6.2	ENDOFITI	13
7	BIO-UGLJE	13
8	REMEDIJACIJA Z ELEKTRIČNIM TOKOM	15
8.1	ELEKTRO-BIOREMEDIACIJA	16
9	UPRAVLJANJE NIVOJA PODTALNICE	16
10	ZAKLJUČEK	17
11	VIRI	17

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Razlike med avtotrofno in heterotrofno denitrifikacijo	5

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Glavni vzroki in posledice onesnaženja z dušikovimi spojinami	3
Slika 2: Postopek denitrifikacije	8
Slika 3: Možni vplivi bio-ogljja v zemlji	14

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Al	aluminij
Ca	kalcij
CO ₂	ogljikov dioksid
Da	dalton
K	kalij
Mg	magnezij
Mn	mangan
N	dušik
N ₂	elementarni dušik
N ₂ O	didušikov oksid
NH ₃	amonijak
NH ₄ ⁺	amonij
NO	dušikov monoksid
NO ₂	dušikov dioksid
NO ₂ ⁻	nitrit
NO ₃ ⁻	nitrat

1 UVOD

Dušik (N) je pomemben element, ki sestavlja kar 78 % ozračja in je nepogrešljiv v vseh organizmih. Kot elementaren plin (N_2) je inerten - ne vpliva na okolje, organizmi ga praviloma ne morejo absorbirati in uporabiti v svojem metabolizmu (Follet in Hatfield, 2001). Odkritje Haber-Bosch postopka, ki omogoča industrijsko pretvarjanje N_2 v amonijak (NH_3), je privedlo do razširjene uporabe gnojil. Gnojila vsebujejo dušikove spojine v primerni obliki, da jih lahko organizmi absorbirajo in uporabijo v svojem metabolizmu. Ampak ker ne asimilirajo vsega dodanega dušika, se le-ta lahko izloča v okolje. Prav tako se velike količine dušikovitih spojin sproščajo v zrak s prekomerno uporabo fosilnih goriv. Zanimariti ne gre niti industrijskih izpustov, predvsem kemičnih postopkov, ki za proizvodnjo uporabljajo dušikovo kislino (Nitrogen pollution ..., 2013). Zaradi teh vzrokov se količina reaktivnega dušika (nitrata - NO_3^- in amonija - NH_4^+) v okolju iz dneva v dan povečuje (Driscoll in sod., 2003). Prekomerna dosegljivost dušika v okolju lahko povzroči hude težave, med drugim tudi nastanek kislega dežja ter posledično zakisanje zemeljskih površin.

Tem težavam so izpostavljeni tudi gozdovi, kjer se v zadnjih letih kažejo rezultati dolgoletnih emisij dušikovitih oksidov. Če želimo ohraniti naravo v neokrnjeni obliki, je pomembno, da se najde način vračanja okolja v prvotno stanje. Temu bo posvečena vsebina tega diplomskega seminarja.

2 POSLEDICE ONESNAŽENJA TAL Z DUŠIKOVIMI SPOJINAMI

Dodajanje dušika neposredno poveča njegovo dosegljivost v okolju ter tako vpliva na njegovo kroženje in strukturo ter funkcijo gozdnih ekosistemov (Du in sod., 2019). Pri vnosu dušikovitih spojin v tla je težko določiti kakšen vpliv bo imelo to na vrednost pH, saj lahko različne dušikove spojine tla zakisajo ali pa jih nevtralizirajo. Ko organizmi v svoja tkiva absorbirajo NH_4^+ , okolica korenin postaja kisla, če pa absorbirajo NO_3^- , postaja okolica bazična (Näsholm in Persson, 2000).

Z zakisanjem tal se iz njih okrepi izguba elementov, ki jih organizmi potrebujejo za normalno delovanje (npr. kalcija - Ca in magnezija - Mg), negativen vpliv se kaže tudi na rastlinski rasti ter njihovi sposobnosti koriščenja hranil ter odpornosti na bolezni in škodljivce (Guo in sod., 2010). Pomanjkanje posameznih elementov onemogoči pravilno delovanje fizioloških procesov v rastlini. Ob pomanjkanju rastlinam dosegljivega Mg je onemogočeno nemoteno delovanje klorofila ter pravilno opravljanje fotosinteze. Optimalna količina Ca je pomembna za sintezo rastlinske celične stene, kalij (K) kontrolira privzem ogljikovega dioksida (CO_2) pri fotosintezi z odpiranjem in zapiranjem stomate.

Ob nižanju vrednosti pH se pospeši mobilnost toksičnih elementov (npr. aluminija - Al, mangana - Mn, težkih kovin), spremeni se vrstna sestava zemeljskih mikroorganizmov ter njihovo delovanje (Guo in sod., 2010).

2.1 KEMIČNE SPREMEMBE

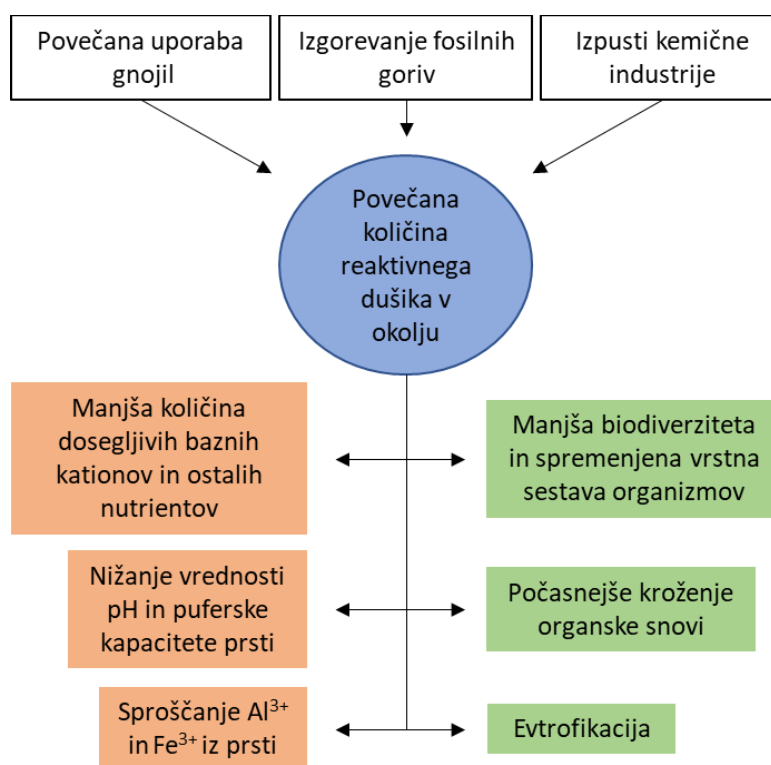
Pri zakisanju tal se zniža vrednost pH ter koncentracija baznih kationov (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}) (Huang in sod., 2014). Njihova količina se močno zmanjšuje z večanjem vnosa N, kar privede do manjše dostopnosti teh elementov za organizme in manjšega prispevka k puferski kapaciteti tal. Ko teh ionov zmanjka, se pričnejo iz zemlje sproščati aluminijevi ioni (Al^{3+}), ki pogosto dosežejo koncentracije, ki so nevarne za živa bitja. Sproščanje Al^{3+} se prične pri $\text{pH} < 4,5$ (Bowman in sod., 2008). Zaradi nižje vrednosti pH se poveča topnost potencialno škodljivih kovin (železa - Fe, Mn), ki jih rastline sicer potrebujejo za normalno rast, ampak v previsokih koncentracijah postanejo toksične (Huang in sod., 2014). Z večanjem vnosa N se v tleh veča koncentracija raztopljenih Fe^{3+} . Pri pH vrednosti tal 3,2 se Fe^{3+} hitreje sprostijo iz granitne podlage kot Al^{3+} (Bowman in sod., 2008).

2.2 BIOLOŠKE SPREMEMBE

Z nižanjem vrednosti pH obstaja vedno manjše število organizmov, ki lahko preživijo v takšnih pogojih, zato se biodiverziteteta v zemlji zmanjšuje (Huang in sod., 2014). Zhang in sod. (2018) so v meta-analizi ugotovili, da je vnos dodatnega N v zemljo povzročil zmanjšanje mikrobne, bakterijske in glivne biomase ter mikrobno respiracijo. Zmanjšala se je količina arbuskularnih mikoriznih gliv in Gram-negativnih bakterij, količina saprofitskih gliv, aktinomicet in G-pozitivnih bakterij pa je ostala nespremenjena. To je privedlo do povečanja razmerja med G-pozitivnimi in G-negativnimi bakterijami, zmanjšalo pa se je razmerje med glivami in bakterijami. Ti učinki so se večali z večanjem stopnje dodajanja in trajanjem poskusov (Zhang in sod., 2018).

V iglastih gozdovih številne glive opravljajo pomembno vlogo razkrojevalcev, saj izločajo številne hidrolitične encime. Z dodatkom anorganskega N se lahko njihova aktivnost omeji, kar bi privedlo do počasnejšega kroženja organske snovi. Raziskave so tudi pokazale, da se z vnosom dodatne količine N spremeni vrstna sestava mikoriznih gliv. Število vrst *Cortinarius* se zmanjša, *Lastarius rufus* pa postane bolj razširjena (Näsholm in Persson, 2000). NO_3^- v velikih koncentracijah je škodljiv, saj lahko celicam povzroča oksidativni stres, ki sproži spremembe v sekundarnem metabolizmu ter avtolizo (Watkinson in sod., 2015). Ob obilici NO_3^- v okolju, se ta prične izločevati iz sistema, kar lahko zaradi njegove velike topnosti vodi do onesnaženja podtalnice ter procesa eutrofikacije (Högberg in sod., 2000).

Z določevanjem nitrogenazne aktivnosti so določili, da se z večanjem količine razpoložljivega N v zemlji znižuje aktivnost biološke fiksacije N (Cusack in sod., 2009) ter da se biomasa nadzemnih rastlinskih delov zmanjšuje (Bowman in sod., 2008). Zaradi spreminjanja deleža posameznih vrst se pojavljajo vprašanja povezana z izgubo biodiverzitetete gliv in višjih rastlin ter posledično spreminjanjem ekosistemov.



Slika 1: Glavni vzroki in posledice onesnaženja z dušikovimi spojinami

3 MOŽNOSTI REMEDIACIJE

Remediacija je pojem, ki združuje raznovrstne postopke vračanja onesnaženega okolja v stanje pred kontaminacijo ali minimaliziranje škodljivih učinkov onesnaženja. Zaradi velikega števila onesnažil ter njihove raznolikosti se uporabljajo številne tehnike ter njihove kombinacije. V primeru onesnaženja s težkimi kovinami se lahko poslužujemo pokrivanja kontaminiranega področja, elektrokinetične ekstrakcije, spiranja zemlje, kemijske imobilizacije, fitoremediacije, solidifikacije ali odlaganja prsti na primerna odlagališča (Liu in sod., 2018).

Boljši pristop kot prenos zemlje na posebno odlagališče je, da se škodljive snovi popolnoma uničijo ali vsaj pretvorijo v manj škodljive. Nekatere tehnike, s katerimi lahko to počnemo so sežig pri visoki temperaturi ter kemijski razkroj. Te metode so učinkovite pri zmanjšanju obsega kontaminacije, ampak imajo nekaj omejitev (tehnološka kompleksnost, cena, neodobravanje javnosti) (Vidali, 2001). Poleg tega v Sloveniji oviro predstavljajo tudi neobstoječe kapacitete.

Bioremediacija je proces, v katerem se organski odpadki pod kontroliranimi pogoji biološko razgradijo v neškodljivo obliko ali padejo pod dovoljene koncentracije, ki jih predpisujejo regulatorne inštitucije (Mueller in sod., 1996). Večinoma se uporabljajo cenovno ugodne in tehnološko nezahtevne tehnike, ki imajo odobravanje javnosti in so lahko pogosto izvedene v *in situ* pogojih. Kontroliranje in optimizacija postopka bioremediacije je odvisna od tega

ali je na voljo organizem, ki je sposoben pretvoriti onesnažilo v manj škodljivo snov, dostopnosti onesnažil mikroorganizmom ter okoljskih dejavnikov (tip prsti, temperatura, vrednost pH, prisotnost kisika in hranil) (Vidali, 2001).

Onesnaženje z NO_3^- je okoljski problem širokega obsega in je razpršeno onesnaženje, saj nima točno določene točke izvora. Zaradi tega so *in situ* metode odstranjevanja NO_3^- najbolj primerne in učinkovite (Della Rocca in sod., 2007). Za remediacijo NO_3^- se komercialno uporabljajo predvsem fizikalno-kemične in kemične metode (med drugim ionska izmenjava, reverzna osmoza ter kemijska denitrifikacija) (Rajmohan in sod., 2018). Metode fizikalno-kemične dekontaminacije so v nasprotju z biološkimi načini lahko izredno drage, neučinkovite in neprijazne ekosistemom (Javaid in sod., 2016). Velik potencial pa obljublja tretiranje NO_3^- s pomočjo bakterij, ki so sposobne procesa denitrifikacije (Rajmohan in sod., 2018).

Čeprav biološka denitrifikacija zahteva natančno načrtovanje (predvsem kar se tiče kontroliranja rasti mikrobnе biomase), je smatrana za najustreznejšo rešitev problema onesnaženja z NO_3^- z ozirom na okoljsko, praktično in ekonomsko plat (Della Rocca in sod., 2007). Mikroorganizmi imajo številne prednosti v postopkih remediacije zaradi široke diverzitete in razširjenosti ter raznolikih metabolnih poti (Javaid in sod., 2016).

4 DENITRIFIKACIJA

Disimilatorna denitrifikacija je proces pretvorbe nitrata (NO_3^-) preko nitrita (NO_2^-), dušikovega monoksida (NO) in didušikovega oksida (N_2O) v elementarni dušik (N_2) (Zumft, 1997). Poznamo tudi asimilatorno denitrifikacijo, pri kateri se NO_3^- pretvori v amonijak, ki se kasneje oksidira v dušik ali se porabi za sintezo proteinov (Rajmohan in sod., 2018). Denitrifikacija je del energetskega aparata denitrifikatorjev, saj lahko NO_3^- in NO_2^- izkoriščajo kot končna sprejemnika elektronov pri elektronski transportni verigi, s pomočjo katere pridobivajo energijo (Zumft, 1997).

Organizmi, ki so sposobni reakcij denitrifikacije so filogenetsko raznovrstni, saj jih najdemo preko treh kraljestev: bakterije, arheje in evkarionti (Saggar in sod., 2012). Herold in sod. (2012) so v vzorce zemlje vnesli glivne (cikloheksimid) in bakterijske (streptomycin in kloramfenikol) inhibitorje. Rezultati so pokazali, da so glive v teh vzorcih prispevale 18% denitrifikacijske aktivnosti, medtem ko so bakterije bile zaslužne za 54% (Herold in sod., 2012).

Večina prokariontskih in vsi evkariontski denitrifikatorji so heterotrofi (Saggar in sod., 2012). Proces heterotrofne denitrifikacije potrebuje za nemoten potek anaerobne pogoje, kot vir energije lahko organizmi izkoriščajo metanol, etanol, očetno kislino, metan, glukozo (Rajmohan in sod., 2018). Izkoriščajo lahko tudi netopne vire ogljika (C) kot so npr. rastlinsko olje, pšenična slama, bombaž in biopolimere (Della Rocca in sod., 2007). Za avtotrofno denitrifikacijo je potrebna prisotnost kisika (O_2), organizmi pa lahko izkoriščajo

vodik, sulfid, žveplo, CO₂. Heterotrofna denitrifikacija ima višjo učinkovitost odstranjevanja NO₃- kot avtotrofna. Ob njenem poteku pa nastajajo hidroksilni ioni (OH⁻), ki zvišujejo pH vrednost okolice (Rajmohan in sod., 2018).

Preglednica 1: Razlike med avtotrofno in heterotrofno denitrifikacijo (Rajmohan in sod., 2018: 393)

	Avtotrofna denitrifikacija	Heterotrofna denitrifikacija
Prisotnost O ₂	Aeroben proces	Anaeroben proces
Pristnost organskega vira	Ni potrebna	Je potrebna
Rodovi mikroorganizmov	<i>Thiobacillus Thiomicrospira,</i> <i>Paracoccus, Thiosphaera</i>	<i>Pseudomonas, Micrococcus,</i> <i>Spirillum, Bacillus</i>
Primeri virov energije in C	S, H, CO ₂ , HCO ₃	Metanol, etanol ali očetna kislina, glukoza,
Učinkovitost odstranjevanja nitrata	Nizka	Visoka
Bazičnost	Zmanjšuje bazičnost	Producira bazičnost
Končni produkt	N ₂	NO, N ₂ O, N ₂

Preučevanje denitrifikacije je omejeno, saj je količina regulatorjev aktivnosti tega procesa (koncentracija O₂, NO₃-, C v tleh), pogojena s številnimi fizikalno-kemičnimi lastnostmi zemlje (Groffman in sod., 1988). Stopnja denitrifikacije in razmerja nastajanja NO, N₂O in N₂ so odvisna od kompleksnih interakcij med zemeljskimi lastnostmi, mikroorganizmi, klimatskimi pogoji in metodami upravljanja. Na denitrifikacijo in njene encime pa vpliva tudi razpoložljivost mineralnega N in labilnega C ter procesi in pogoji, ki vplivajo na reakcijski čas (temperatura, vrednost pH, redoks potencial). Razmerje N₂O:N₂ se poveča ob povečani zalogi N ter znižani vrednosti pH, dosegljivosti C in vsebnosti vode (Saggar in sod., 2012).

4.1 POGOJI ZA DELOVANJE PROCESA

Osnovne zahteve za biološko denitrifikacijo so: prisotnost bakterij, gliv ali drugih organizmov sposobnih denitrifikacije, primernih donorjev elektronov (npr. organske C spojine), anaerobni ali anoksični pogoji in dostopnost dušikovitih oksidov (NO₃-, NO₂-, NO ali N₂O) kot končnih prejemnikov elektronov (Saggar in sod., 2012).

4.1.1 Prisotnost končnih prejemnikov elektronov

Mikroorganizmi želijo pri oksidaciji vira C za prejemnika elektronov izkoristiti spojino, ki jim ponuja največ energije (Rajmohan in sod., 2018). Tako bo ob visokih koncentracijah O₂ potekala aerobna respiracija, četudi bo v okolju NO₃-. Ko se koncentracija dosegljivega O₂ zniža, se inducira sinteza nitrata reduktaze. Ta membransko vezan encim, ki vsebuje molibden, katalizira prvi korak v procesu denitrifikacije. Tudi sinteza drugih encimov potrebnih za proces denitrifikacije je zavrtta ob prisotnosti O₂, poleg tega pa mora za pričetek sinteze v mediju biti prisoten tudi NO₃- (Madigan in sod., 2011). Sintaza teh encimov je manj

tesno povezana s koncentracijo O_2 kot njihova aktivnost, saj se reduktaze dušikovih oksidov sintetizirajo pri višjih koncentracijah kot pa potem dejansko delujejo (Tiedje, 1988).

Biološka denitrifikacija je bolj izražena pri nižjih začetnih koncentracijah NO_3^- . Višja kot je koncentracija, nižja je učinkovitost odstranjevanja. Pri nižjih koncentracijah je selektivnost za nastanek N_2 višja, pri višjih koncentracijah pa nastaja v večjem deležu N_2O , saj je oviran redukcijski korak $N_2O \rightarrow N_2$ (Rajmohan in sod., 2018). Če je NO_2^- edini vir N v mediju ter je tako prva molekula v procesu denitrifikacije, N_2O predstavlja večji delež mešanice končnih plinskih produktov (Cheng in sod., 2020). Koncentracija NO_2^- v primerjavi s koncentracijo NO_3^- v mediju, mora biti nekoliko manjša, saj nekateri denitrifikatorji izražajo inhibirano rast pri koncentracijah NO_2^- 2-3 mM (Tiedje, 1988).

4.1.2 Vrednost pH

Vzdrževanje konstantne vrednosti pH je pomembno za optimalno delovanje bakterijskih encimov. Nizek pH (<5) zmanjšuje hitrost denitrifikacije in vpliva na končen produkt z ustavljanjem denitrifikacijske verige (Rajmohan in sod., 2018). Pri nevtralnih vrednostih pH (pH okrog 7) v procesu denitrifikacije prevladuje nastajanje N_2 , delež nastalega N_2O narašča z nižanjem vrednosti pH (Högberg in sod., 2000). Herold in sod. (2012) so v raziskavi, kjer so preučevali povezavo bakterijske in glivne denitrifikacije ter pH vrednosti zemlje ugotovili, da je najnižja produkcija N_2O bila pri pH 4,2 in najvišja pri pH med 5,5 in 5,9. Spreminjanje vrednosti pH je vplivalo na stopnjo denitrifikacije bakterij, ne pa tudi gliv. Z analiziranjem estrsko vezanih maščobnih kislin so ugotovili, da se je bakterijska biomasa zmanjšala z višanjem vrednosti pH, količina glivne biomase pa je ostajala konstantna. Pri nižjih vrednostih pH se je tako spremenilo razmerje med glivami in bakterijami predvsem zaradi zmanjšanja bakterijske biomase (Herold in sod., 2012).

Sev RADF-77 glive *Fusarium solani*, ki je lahko opravljal proces denitrifikacije v aerobnih pogojih in je bil izoliran iz denitrifikacijskega reaktorja podpiranega s celuloznim materialom, se je izkazal za tolerantnega na nizko vrednost pH. Pri pH vrednosti 3,5 je imel 73,08% učinkovitost, optimum pa se je izkazal pri pH vrednostih med 4,97 in 6,70 (Cheng in sod., 2020).

4.1.3 Temperatura

Denitrifikacija je učinkovitejša pri višjih temperaturah, odvisna je od vrste vira organske snovi (Rajmohan in sod., 2018). Warneke in sod. (2011) so v rezultatih raziskave pokazali, da je v povprečju bilo pri vseh substratih pri višji temperaturi (27,1°C) izpuščenega 7-krat več N_2O kot pri nižji (16,8°C). Stopnja denitrifikacije je tesno povezana tudi s številom kopij gena nitrit reduktaze, katero so je ob zvišanju temperature za 10°C povečalo za 4-krat. Z dvigom temperature se je večinoma povečalo tudi število kopij genov 16S rRNA. Tako je možno večje število kopij denitrifikacijskih genov v substratu pripisati večji bakterijski biomasi (Warneke in sod., 2011).

Inkubacija v okolju z višjo temperaturo pospešuje rast bakterij z *nirS* (genom, ki zapisuje nitrit reduktazo s citokromom *cd1*) in tistih, ki jim manjka *nosZ* (gen, ki zapisuje reduktazo didušikovega oksida). To lahko vpliva na večje izločanje emisij N_2O v okolje v toplejšem okolju (Warneke in sod., 2011).

4.1.4 Vir ogljika

Vir C je v procesu denitrifikacije pomemben kot donor elektronov. Warneke in sod. (2011) so preučili, da se stopnja odstranjevanja NO_3^- z večanjem koncentracije dosegljivega C linearno povečuje. To nakazuje, da je v anaerobnem, z NO_3^- bogatem okolju glavna omejitev dosegljivost C. Hitrost odstranjevanja NO_3^- ni odvisna od vrste substrata, ampak je pomembno kakšna količina C je na voljo mikroorganizmom. Z analizami testiranih substratov (sekanci bora in evkaliptusa, žagovina bora, koruzni storži, pšenična slama in zeleni ostanki grmovja) so ugotovili, da je za postopek denitrifikacije najbolj primerna kombinacija koruznih storžev in sekancev, saj se tako poveča dosegljivost C ter denitrifikacijska aktivnost v sekancih (Warneke in sod., 2011).

Cheng in sod. (2020) so želeli preveriti vpliv različnih virov C na rast in metabolizem novo odkritega seva glive *Fusarium solani*. V poskusih so uporabili glukozo in ostanke proizvodnje čaja, ki nastanejo kot stranski produkt ekstrakcije polifenolov, polisaharidov itd. Izkazalo se je, da je učinkovitost odstranjevanja pri glukozni kot viru C bila 97,68%, pri čajnih ostankih pa 45,38%. Povprečna hitrost denitrifikacije je bila pri glukozni 4,43 mg/(L·h), pri čajnih ostankih pa 4,50 mg/(L·d) (Cheng in sod., 2020).

4.1.5 Prisotnost kofaktorjev

Encimi, ki sodelujejo pri procesu denitrifikacije morajo imeti za svoje delovanje tudi dosegljive kovinske ione, ki delujejo kot kofaktorji. Prsti, ki jim jih zaradi primarne sestave, biološke ali kemijske imobilizacije, primanjkuje ionov imajo lahko zmanjšano stopnjo denitrifikacije (Saggar in sod., 2012).

4.2 BAKTERIJSKA DENITRIFIKACIJA

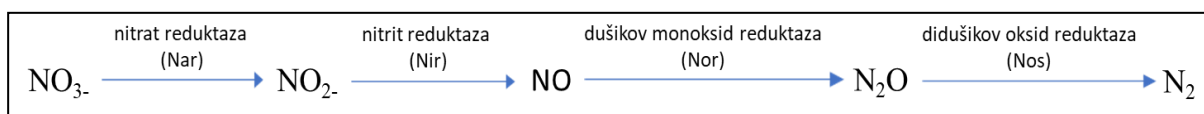
Večina denitrificirajočih prokariontov filogenetsko spada v skupino *Proteobacteria* (Madigan in sod., 2011). Bakterijski rodovi, ki imajo denitrificirajoče vrste so: *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Halobacterium*, *Thiobacillus*, *Moraxella*, *Methanomonas*, *Paracoccus*, *Propionibacterium* in *Xanthomonas* (Rajmohan in sod., 2018). V naravi najpogostejše vrste denitrifikatorjev pa pripadajo rodu *Pseudomonas* (Tiedje, 1988).

Proces denitrifikacije v bakterijah je popolnoma fakultativen, sprožijo ga okoljski parametri (nizka koncentracija O_2 in dosegljivost N oksidov) (Zumft, 1997). Bakterije ne potrebujejo striktnih anaerobnih pogojev, njihova rast pa je hitrejša in bolj zanesljiva, če je kultura

inokulirana v medij v aerobnih pogojih, ki se nato postopno spreminjajo v anaerobne, da omogočijo denitrifikacijo (Tiedje, 1988).

4.2.1 Denitrifikacijski encimi

Denitrifikacija je katalizirana s 4 neodvisnimi intracelularnimi encimi: nitrat reduktaza (Nar), nitrit reduktaza (Nir), dušikov monoksid reduktaza (Nor) in didušikov oksid reduktaza (Nos) (Saggar in sod., 2012).



Slika 2: Postopek denitrifikacije

Pod anaerobnimi pogoji senzorni protein NO_3^- kontrolira ekspresijo membransko vezane respiratorne Nar. To so encimi, ki so navadno sestavljeni iz treh podenot. Velika alfa podenota (112-145 kDa) nosi molibdenski kofaktor, ki predstavlja encimsko aktivno mesto. Manjša, beta encimska podenota veže 4 Fe-S (železo-žveplove) skupke, ki igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju strukture encima in kofaktorja. Katalitično mesto Nar je obrnjeno navznoter, njegovo delovanje pa sprosti NO_2^- v celično citoplazmo (Saggar in sod., 2012).

Nir reduktaza je lokalizirana v periplazmatskem prostoru, zato mora NO_2^- med denitrifikacijo prečkati celično membrano (Zumft, 1997). Denitrificirajoče bakterije imajo enega izmed dveh oblik Nir encima: citokrom *cd₁* ali obliko, ki vsebuje baker (Cu). Citokrom *cd₁* je 120 kDa velik homodimerni encim, vsaka podenota pa ima prostetični skupini hem C in hem D₁. Hem *d₁* je katalitično mesto encima. Substrat (NO_2^-) in produkt (NO) se vežeta preko dušikovih atomov na Fe^{2+} v *d₁* hemu (Nurizzo in sod., 1998). Nitrit reduktaza, ki vsebuje Cu je zgrajena iz treh podenot (40 kDa), ki so tesno povezane v strukturo s centralnih kanalom (Zumft, 1997). Na vsaki monomerni enoti sta dva različna centra z bakrovim atomom: tip I Cu in tip II Cu. Prvi center ima vlogo redoks aktivnega centra, s katerega se elektroni prenašajo na tip II, na katerem je vezan substrat (Cabello in sod., 2009).

NO v prevelikih koncentracijah je toksičen za večino bakterij in gliv. Toksičen je tudi za denitrifikatorje, četudi je inherenten del njihovega celičnega metabolizma. Posledično imajo vsi organizmi, ki opravljajo denitrifikacijo Nor encim, ki pretvarja NO v manj toksičen N_2O . Najbolj opisane reduktaze NO so encimi iz Gram-negativnih bakterij. To so kompleksi zgrajeni iz vsaj dveh podenot (17 in 53 kDa). Večja podenota (NorB) je membransko vezan ter hidrofoben citokrom *b*. Manjša podenota (NorC) pa vsebuje citokrom *c* in je locirana na periplazemski strani (Cabello in sod., 2009). Ta prejme elektrone od njihovega donorja ter jih prenese do katalitičnega mesta NorB, ki omogoča dovolj majhno razdaljo, ki dovoljuje reakcijo med dvema NO molekulama za nastanek N_2O (Zumft, 1997).

Redukcija N_2O do N_2 je zadnji korak denitrifikacije. N_2O reduktaza, ki ga katalizira, je homodimeren encim z dvema podenotama (66 kDa). Vsaka izmed podenot ima do 4 Cu atome, ki naj bi bili katalitično mesto encima (Zumft, 1997).

4.3 GLIVNA DENITRIFIKACIJA

Strokovnjaki so dolgo mislili, da glive niso sposobne procesa denitrifikacije. Shoun in sod. (1992) so v izvedeni raziskavi pokazali, da je veliko glivnih sevov bilo ob inkubaciji pod anaerobnimi pogoji in ob dodatku NO_2^- zmožnih sintetizirati N_2O , NO ali N_2 , v večini primerov pa je bil glavni produkt N_2O (Shoun in sod., 1992). Sinteza N_2O je bila najdena v rodovih *Fusarium*, *Giberella*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus* in *Hansenula* ter v številnih drugih vrstah med nepopolnimi glivami (ang. fungi imperfecti), filamentoznimi glivami in kvasovkami (Zumft, 1997). Shoun in sod. (1992) so pokazali, da imajo tudi sledeče vrste gliv sposobnost denitrifikacije: *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium lini*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon tonkinense*, *Trichoderma hamatum*, *Chaetomium* sp., in *Talaromyces flavus*.

Glivni sistem denitrifikacije se od bakterijskega razlikuje po tem, da ima vključen citokrom P450nor, ki deluje kot reduktaza NO . P-450nor spada v družino evkariontskih P-450 proteinov zaradi strukturnih podobnosti z P-450 oksigenazami, ampak ne katalizira mono-oksigenazne reakcije. Encim je topen monoprotehemijski citokrom s proteinsko maso 44,3 kDa. Za pretvorbo NO v N_2O sta potrebna dva elektrona, za potek reakcije pa P-450nor ne potrebuje posredovanja flavinoproteinov, Fe-S proteinskih kompleksov ali drugih pomožnih prenašalcev. Elektrone lahko prejme naravnost z reduciranih piridinskih nukleotidov (Zumft, 1997). Nastajanje N_2O je močno inhibirano z dodatkom CO , kar je smatrano za posebno lastnost glivne denitrifikacije zaradi vpletenosti P-450 proteina (Shoun in Tanimoto, 1991).

Takaya in Shoun (2000) sta naredila mutante z nefunkcionalnim genom za P-450nor. Ti niso izkazovali niti proteina P-450nor niti reduktaze dušikovega oksida (NO). Mutante niso imele denitrifikacijske aktivnosti ter sposobnosti pretvorbe N_2O v pogojih limitacije z O_2 in prisotnosti NO_3^- . Izkazovali pa so normalno aktivnost nitrit reduktaze in so brez težav producirali NO (Takaya in Shoun, 2000).

Denitrifikacijski sistem glive *Cylindrocarpon tonkinense* naj ne bi imel dNar (disimilatorne nitrat reduktaze). Ampak so Watsuji in sod. (2003) pokazali, da je ta gliva sposobna denitrifikacije NO_3^- ob dodatku NH_4^+ in fermentabilnega vira C (glukoze ali galaktoze) v vlogi donorja elektronov. Ta korak lahko izvede zaradi uporabe asimilatorne nitrat reduktaze, ki reducira nitrat do nitrita. Zanimivo je bilo, da gliva ni proizvajala N_2O , če je bil nitrat edini vir dušika, ampak ga je pričela šele ob dodatku NH_4^+ (Watsuji in sod., 2003).

Pri različnih sevih gliv je bilo opaženo, da N_2O iz nitrata nastaja hitreje, če inkubacijska posoda pred začetkom inkubacije ni preprihana s helijem. Ko pa je bil zrak zamenjan s helijem je bila opažena izrazita lag faza (Shoun in sod., 1992).

4.3.1 Ko-denitrifikacija

Ko-denitrifikacija je proces, pri katerem nastane molekula N_2O ali N_2 , ki jo sestavljata dušikova atoma iz različnih virov. Opažena je bila pri *Fusarium oxysporum*, kjer je za nastanek N_2O en atom dušika prišel od NO_2^- , drug atom dušika pa je lahko priskrbel druga spojina (npr. azid ali salicilhidroksamična kislina). Tako so dokazali, da lahko glive pri procesu denitrifikacije poleg NO_3^- in NO_2^- , porabljajo tudi druge vire N (npr. aminokisliline, anilin, azid), saj lahko tudi te spojine služijo kot darovalci N (Shoun in sod., 1992). Razmerje med denitrifikacijo in ko-denitrifikacijo variira glede na pogoje (vrsta glive in vira dušika). N_2 je navadno tvorjen iz aminov, za N_2O pa se kot vir dušikovih atomov uporabijo imini ali azid. Glivni denitrifikacijski sistem (npr. *F. solani* in *C. tonkinense*) lahko producira N_2 kot produkt ko-denitrifikacije, ne more pa ga pretvoriti z denitrifikacijo (Shoun in sod., 2012).

4.4 NEGATIVNI UČINKI DENITRIFIKACIJE

Številnim denitrifikatorjem manjka eden ali več encimov za popolno denitrifikacijo. Glivam in približno eni tretjini sekvenciranih denitrificirajočih bakterij manjka N_2O reduktaza, posledično je ta plin končni produkt procesa denitrifikacije pri teh organizmih (Saggar in sod., 2012). Ker so produkti denitrifikacije v plinastem agregatnem stanju, je njihovo izhajanje iz sistema dokaj enostavno (Madigan in sod., 2011). Cheng in sod. (2020) so poročali, da se ob aerobni glivni denitrifikaciji v ozračje v obliki plina sprosti 53,66% dodanega N. Tako je proces denitrifikacije lahko ogromen vir emisij N_2O v okolje. Zakisanje okolja zaradi nastanka kislega dežja ter prekomerne uporabe amonijevih gnojil, pospešuje glivno aktivnost ter tako povzroči izločanje še večje količine emisij N_2O (Shoun in sod., 2012). Molekule N_2O shranjujejo termično radiacijo sonca ter tako prispevajo k segrevanju atmosfere, hkrati pa reagirajo z ozonom v stratosferi in troposferi. V troposferi povzročijo nastajanje ozona. V stratosferi se molekule N_2O zaradi vpliva UV svetlobe pretvorijo v NO, molekulo, ki uničuje ozon ter tako vplivajo na manjšo količino ujetih žarkov UV (Nitrogen pollution ..., 2013).

5 FITOREMEDIACIJA

Fitoremediacija je proces čiščenja okolja s pomočjo rastlin. Za rastline je že od nekdaj veljalo, da lahko predstavljajo učinkovita sredstva za odstranjevanje onesnažil iz zemlje, vode in zraka. Z mehanizmi kot so akumulacija, imobilizacija, transformacija poskrbijo za zmanjšanje ali popolno eliminacijo onesnažil. Tehnike fitoremediacije so zelo primerne, kadar je potrebno tretirati velike površine (na katerih je uporaba drugih tehnik remediacije

ekonomsko neugodna ali neizvedljiva), z majhnimi koncentracijami onesnažil (Vidali, 2001).

Bori se že v naravi pojavljajo na območjih z bolj kislimi tlemi, za katere je značilno, da imajo visoke koncentracije raztopljenega Al. Borove korenine so tolerantne na prisotnost visokih koncentracij Al, čemur prispevata vsaj dva mehanizma. Z onemogočenim vstopom Al v korenine se v njihovih vrhovih vzdržuje nizka koncentracija tega elementa. Drugi mehanizem tolerance pa je intracelularno shranjevanje absorbiranega Al v posebnem predelu, večina absorbiranega Al pa je lokalizirana v periferiji celic. Pri tretiranju s koncentracijo Al pod 40 $\mu\text{mol/L}$ ni bilo zaznane inhibicije koreninskega podaljševanja, pri koncentraciji 580 $\mu\text{mol/L}$ pa je bila zaznana 30% inhibicija koreninskega podaljševanja. Rezultati so bili primerjani s sojo, kjer je bila izražena močna inhibicija že pri 5 $\mu\text{mol/L}$, kar je značilno za poljščine. Bor tako zaradi svoje visoke stopnje tolerance predstavlja dober vir genov za prenos v transgene rastline za dvig tolerance na prisotnost Al (Moyer-Henry in sod., 2005).

5.1 GENSKO SPREMENJENE RASTLINE

Gensko spremenjene rastline lahko počistijo specifične onesnaževalce iz atmosfere. Transgene rastline, ki služijo za bioremediacijo okolja, so v javnosti označene z manjšim negativnim prizvokom kot transgene poljščine, njihova regulacija pa je bolj ohlapna. Primarni metabolizem NO_3^- vključuje encime nitrat reduktaza, nitrit reduktaza in glutamin sintetaza, ki igrajo ključno vlogo pri metabolizmu NO_2^- v rastlinah, vsi ti geni pa so zapisani v dednem materialu, ki je lociran v jedru (Gupta in Kulshrestha, 2016).

Naredili so transgenske topole, ki so imeli prekomerno ekspresijo citosolne glutamin sintetaze. V primerjavi s kontrolami divjega tipa so izkazovali povečano biomaso, akumulacijo večje količine proteinov, klorofila in skupnih sladkorjev (glukoza, fruktoza in saharoza). Te rastline so tudi izkazovale večjo učinkovitost izrabe dušika, še posebej v mladih listih, kar je nakazovalo na to, da so sposobne prenesti večino hranil za nastanek biomase v nadzemne dele rastlin. Produkcija celuloze je bila 5-krat višja kot v kontrolnih rastlinah. Rezultati nakazujejo na to, da so transgeni topoli, kljub večji količini dosegljivega dušika, sposobni vzdrževati kontrolirano ravnovesje v asimiliranem C in N. Raziskovalci so odkrili pestro mešanico odzivov transgenih topolov, med drugim akumulacijo obilice dušika v specializiranih shranjevalnih proteinih, povečanem donosu fotosinteze ter uporabo odvečne energije za sintezo celuloze. Tehnologija z izkoriščanjem transgenih dreves bi bila uporabna za odstranjevanje odvečne količine dušika. Nastalo drevesno biomaso bi lahko uporabili za proizvodnjo bioetanola ali v papirni in kašni industriji (ang. pulp industry) (Castro-Rodriguez in sod., 2016).

Dušikov dioksid (NO_2) je pomemben onesnaževalec zraka, ki prispeva k nastanku kislega dežja. Po nanosu NO_2 se v rastlinskih celicah poveča koncentracija nitritnih ionov, v nekaterih primerih je lahko opaziti celo vidne poškodbe na listih. Rastline z bolj aktivno

nitrit reduktazo naj bi bile bolj tolerantne na prisotnost NO₂. Takahashi in sod. (2001) so v rastline *Arabidopsis* s pomočjo cvetačnega mozaičnega virusa in postopka biolistike vstavili gen za nitrit reduktazo iz špinače. Našli so pozitivno korelacijo med čezmerno gensko ekspresijo nitrit reduktaze in asimilacijo NO₂ v transgenih rastlinah *Arabidopsis* (Takahashi in sod., 2001).

6 SIMBIOTSKI ODNOS

6.1 MIKORIZNE GLIVE

Mikoriza je sožitje med glivami in višjimi rastlinami. Glive povečajo površino rastlinskih korenin ter jim pomagajo priskrbeti potrebna hranila ter vodo. Rastline glivo oskrbujejo s sladkorji, ki jih sintetizirajo s pomočjo fotosinteze. Poznamo več tipov mikoriz: endomikoriza (arbuskularna in erikoidna mikoriza) in ektomikoriza.

6.1.1 Endomikoriza

6.1.1.1 Arbuskularna mikoriza

Arbuskularno mikorizo lahko tvori nekaj manj kot 200 vrst gliv iz debla *Glomeromycota*. Spadajo v rodove *Glomus*, *Acaulospora* in *Gigaspora*. Pri vnosu v obremenjene kmetijske površine imajo potencial za izboljšanje produktivnosti različnih poljščin (Watkinson in sod., 2015). Arbuskularne glive lahko izboljšajo strukturo prsti, privzem makro- in mikronutrientov, zmanjšajo škodljivih vplivov slanosti, bazičnosti in težkih kovin, izboljšajo toleranco na sušo ter ohranjajo in izboljšujejo rodovitnost tal (Rouphael in sod., 2015). Pozitivne vplive pa imajo tudi pri izkazovanju odpornosti na patogene in parazitske organizme (Watkinson in sod., 2015).

Rouphael in sod. (2015) so v raziskavi, kjer so preiskovali bučke in njihov odziv na nizko vrednost pH (3,5) ter dodatek Al, ugotovili, da dodatek arbuskularnih gliv vpliva na višji izkoristek ter rastlinsko biomaso, plodovi pa so izkazovali boljšo kakovost. Rastline so imele večjo vsebnost makro- in mikronutrientov (še posebej N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn in B) in večje liste (Rouphael in sod., 2015).

6.1.1.2 Erikoidna mikoriza

Rastline iz družine vresovk (*Ericaceae*) za preživetje potrebujejo zelo zakisana tla, ki so revna s hranili. Da rastline pridobijo vse potrebne minerale, tvorijo erikoidno mikorizo z nekaterimi askomikotnimi glivami. Erikoidna mikoriza se razvije v koreninskih laskih takoj za koreninskim meristemom, kjer so celice napolnjene s hifami. Vsaka celica epidermisa je posebej kolonizirana s hifami, ki prodrejo skozi rastlinsko celično steno ter se v celici širijo. Kolonizacija glive traja dokler ne pride do sekundarne zadebelitve korenine (Watkinson in sod., 2015).

6.1.2 Ektomikoriza

Ektomikorizne glive ne tvorijo intracelularnih struktur ter so asociirane predvsem z olesenelimi trajnicami. Okrog 3% rastlinskih vrst tvori sožitje s tisočimi vrstami ektomikoriznih gliv. Le-te najpogosteje spadajo v rodove *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula* in *Suilla*. Glivne hife tvorijo t.i. Hartigovo mrežo okrog koreninskih celic. Izmenjava hranil in drugih snovi med glivo in rastlino poteka skozi njune celične stene. Številne glive, ki tvorijo ektomikorizo, se lahko zaradi saprofitskih prednikov hranijo na rastlinskih ostankih (Watkinson in sod., 2015).

S kolonizacijo z ektomikorizno glivo *Pisolithus tinctorius* se je pojavila akumulacija Al^{3+} na območju glivnega pokrivala ter Hartigove mreže. Kljub temu da so rezultati pokazali visoko koncentracijo Al znotraj hif, je bila stopnja glivne kolonizacije podobna kot pri kontroli. To nakazuje na visoko toleranco ter učinkovite detoksifikacijske procese znotraj hif. Al, ki je vstopil v območje stranskih korenin je bil večinoma omejen na celično periferijo, kjer je locirana Hartigova mreža (Moyer-Henry in sod., 2005)

6.2 ENDOFITI

Endofiti so organizmi (bakterije in glive), ki imajo celoten življenjski cikel ali njegov del znotraj rastlin ter ne povzročajo simptomov bolezni (Wilson, 1995). Nekatere vrste nudijo zaradi izločenih spojin ekološko prednost gostitelju, saj je le-ta lahko odporen na insekte ali živalsko objedanje (Watkinson in sod., 2015). Fini endofiti (ang. fine endophytes) in temni septirani endofiti (ang. dark septate endophytes) so glive, ki se pojavljajo skupaj z arbuskularnimi mikoriznimi glivami, ampak so bolj pogosti v ostrih podnebnih pogojih kot so npr. visoke nadmorske višine ali pol-sušna področja. Temni septirani endofiti omogočijo rastlinam večjo dosegljivost virov P, boljšo odpornost na sušo in manj infekcij patogenih gliv. Pri višjih vrednostih pH zemlje (pH okrog 7,5) prevladujejo arbuskularne mikorizne glive. Pri nižjih vrednostih pH (pH okrog 4,5) pa so manj pogoste in tako imajo fini endofiti priložnost za večjo razširjenost (Postma in sod., 2007).

7 BIO-UGLJE

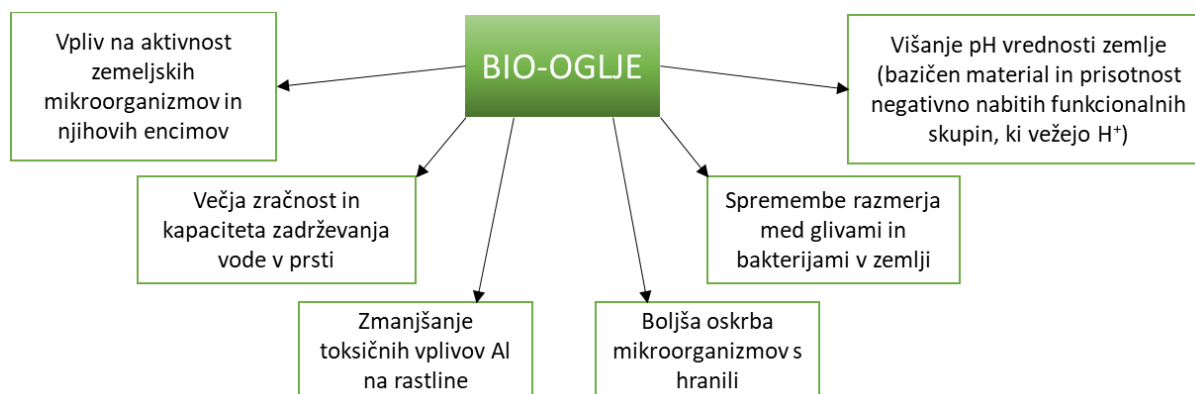
Bio-ogljje (ang. bio-char) je material bogat z ogljikom, ki se ga pridobi s postopkom termične dekompozicije organske snovi pod pogoji omejenega dostopa kisika in relativno nizkimi temperaturami ($<700^{\circ}C$) (Lehmann in Joseph, 2009). Surovine za proizvodnjo bio-oglja so lahko zelo raznolike: od kmetijskih in lesnih ostankov do odpadnih gum, starega gradbenega materiala ter trdnih komunalnih odpadkov. Uporaben je pri recikliranju hranil, izboljševanju lastnosti zemlje ter sekvestraciji ogljika, potencial ima kot sistem upravljanja z odpadki (Brewer in Brown, 2012). Uporabno vrednost ima tudi pri filtraciji zemeljske vode (Lehmann in Joseph, 2009).

Bio-ogljje je zgrajeno iz dveh delov: frakcije ogljika in anorganske frakcije pepela. Prvo frakcijo poleg ogljika sestavljajo vodik, kisik ter na ogljik vezani elementi, na njo pa najbolj vplivajo reakcijski pogoji (čas in temperatura pirolize, hitrost segrevanja). Na anorgansko frakcijo najbolj vplivajo lastnosti surovinskega materiala. Elementarna sestava vključuje številne rastlinske makro- in mikronutriente (Ca, K, P, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), razmerja med njimi so podobna kot v surovinskem materialu (Brewer in Brown, 2012).

Bio-ogljje iz raznovrstnih surovin, obdelano z različnimi temperaturami pirolize ima spreminjajoče se fizikalno-kemične lastnosti kot so npr. pH vrednost, specifična površina, koncentracija različnih elementov (Zhu in sod., 2017). Pri načrtovanju poskusov *in situ* remediacije je potrebno upoštevati, da se površina bio-ogljja ob stiku z okolico, še posebej na začetku izpostavitve, zelo spreminja (Brewer in Brown, 2012). Tako našete značilnosti kot tudi spremembe v zemeljskih lastnostih, ki jih vnos bio-ogljja povzroči, lahko vplivajo na aktivnost mikroorganizmov ter njihovih encimov v zemlji, vpliv pa imajo tudi na spremenjeno razmerje med bakterijami in glivami (Zhu in sod., 2017). Dodatek bio-ogljja v zemljo prispeva k večji zračnosti in višji zemeljski kapaciteti zadrževanja vode, saj se zmanjša njena gostota ter stopnja evapotranspiracije ter poveča poroznost (Gul in sod., 2015). Vnos bio-ogljja v zemljo ponuja tudi številne pozitivne možnosti za mikroorganizme - zagotavlja jim zatočišče v svojih porah, prispeva k boljši oskrbi s hranili, s spremembami fizikalnih lastnosti zemlje pa spreminja njihove habitate (Zhu in sod., 2017).

Dodatek bio-ogljja lahko zaradi njegovega alkalnega pH-ja pozitivno vpliva na višanje pH vrednosti tal. Vrednost pH je povezana s temperaturo produkcije ter vrsto surovine (bio-ogljje, za katerega je surovina les, ima višji pH kot pa če je proizveden iz ostankov poljščin ali gnoja) (Gul in sod., 2015). Drug razlog zaradi katerega je bio-ogljje sposobno dvigovati vrednost pH, pa je prisotnost negativno nabitih karboksilnih, karbonilnih in hidroksilnih skupin na površini, ki lahko, odvisno od pH vrednosti okolja, sprejemajo ali oddajajo protone. Pri alkalnih vrednostih pH-ja bodo protone oddajale, v zakisanem okolju pa jih bodo sprejemale ter tako vplivale na zviševanje vrednosti pH (Brewer in Brown, 2012). Za bio-ogljje je značilna visoka puferska kapaciteta, ki omogoča stabilizacijo pH vrednosti okolice.

Ko je v tleh zaradi nizkega pH-ja visoka koncentracija toksičnih kovin (npr. Al), lahko bio-ogljje dvigne vrednost pH (vpliv na zmanjšanje topnosti) in adsorbira pozitivno nabite kovinske ione ter jih tako odstrani iz medija (Brewer in Brown, 2012). Qian in sod. (2013) so raziskovali vpliv bio-ogljja na zmanjšanje fitotoksičnosti Al na pšenico. Rezultati so pokazali, da je dodatek bio-ogljja pomembno vplival na zmanjšanje inhibicije Al na rast rastlin. Zaradi nevtralizacije nizke vrednosti pH, so se aluminijeve spojine pretvorile v $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ in $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ monomere (ki so se močno adsorbirali na površino bio-ogljja), nevarno toksičen Al^{3+} pa se je pretvoril v manj toksične spojine ($\text{Al}(\text{OH})_3$ in $\text{Al}(\text{OH})_4^-$) (Qian in sod., 2013).



Slika 3: Možni vplivi bio-ogljja v zemlji

Dodatek bio-ogljja pridobljenega iz pšenične slame pri temperaturi 450°C v zemljo je učinkovito zmanjšal N₂O emisije iz gozdnih tal za 25,5%, pri kmetijskih površinah pa za 20,2%. Dodajanje bio-ogljja je imelo vpliv tudi na koncentracije CO₂ in NH₃ (v kmetijskih tleh je njune količine povečal, v gozdnih pa zmanjšal) (Sun in sod., 2014). Razlog za znižanje emisij N₂O je lahko v reaktivnih organskih in anorganskih spojinah z redoks potencialom, ki so sposobne prehajanja iz enega stabilnega stanja v drugo. Te spojine so poznane kot »prevozniki« elektronov (ang. electron shuttle). To vzpodbuja prenos elektronov do denitrificirajočih organizmov v zemlji, ki lahko izboljšajo pretvorbo N₂O v N₂ (Cayuela in sod., 2013).

Yao in sod. (2012) so ugotovili, da so vzorci bio-ogljja, ki so bili proizvedeni pri višji temperaturi pirolize (600°C), lahko odstranjevali NO₃⁻ iz vodne raztopine. Preostali vzorci tega niso izkazovali, povrh tega so NO₃⁻ celo izločali v raztopino. Zvišanje temperature pirolize bi lahko pozitivno vplivalo na sorpcijsko aktivnost bio-ogljja do vodnega NO₃⁻. (Yao in sod., 2012).

8 REMEDIACIJA Z ELEKTRIČNIM TOKOM

Načeloma je biološka denitrifikacija neučinkovita, ko je začetna koncentracija NO₃⁻ višja kot 1000 mg/L. Pri višjih koncentracijah je za učinkovito odstranjevanje NO₃⁻ potrebna kombinacija z drugimi metodami kot je npr. elektrokemična redukcija nitrata (Rajmohan in sod., 2018). Ker onesnaženje z NO₃⁻ ni locirano na točno določljivo točko, se lahko za njegovo odstranjevanje vzpostavi sistem podpovršinske drenaže. Ta sistem skrbi za zbiranje vode z izločenim topnim NO₃⁻, na zbiralni točki, kjer je nato poskrbljeno za učinkovito odstranjevanje NO₃⁻ iz medija. Tak način koncentriranja je dolgotrajen ter zahteva velike količine vode (Cairo in sod., 1996).

Elektro-reklamacija (ang. electroreclamation) je odvisna od zemeljskih lastnosti (poroznost zemlje, električna prevodnost, dielektrična konstanta tekočin) in električnih parametrov (vrsta elektrod ter njihova oddaljenost, napetost, elektrokemični procesi) (Cairo in sod.,

1996). Elektrokinetični sistem deluje po principu, da negativno nabita elektroda (katoda) privlači pozitivno nabite ione (katione), medtem ko pozitivno nabita elektroda (anoda) privlači negativno nabite ione (anione).

Eid in sod. (2000) so v poskusih potrdili učinkovito koncentriranje in vzdrževanje NO_3^- blizu anode pri vseh uporabljenih jakostih toka. Stopnja potovanja NO_3^- je bila višja pri večji količini uporabljene električne energije, nižjih začetnih koncentracijah NO_3^- ter bližje postavljenih elektrodah. Ko se je električni tok višal, se je koncentracija NO_3^- blizu anode zvišala, posledično pa se je koncentracija NO_3^- blizu katode izjemno znižala. Potovanje NO_3^- so povezali tudi z gradientom vrednosti pH, ki se je verjetno razvil kot posledica električnega potenciala. Na začetku je NO_3^- proti anodi potoval hitro, s časom se je pH gradient med elektrodami zvišal in hitrost potovanja NO_3^- se je znižala (Eid in sod., 2000).

8.1 ELEKTRO-BIOREMEDIACIJA

Da pa bi NO_3^- odstranili kar se da učinkovito, lahko načela elektrokinetike združimo z bioremediacijo. To so poskušali izvesti Choi in sod. (2009). Uporabili so seve *Bacillus* spp. ki so bili sposobni reducirati NO_3^- . Testirali so elektrokinetični sistem, biološki sistem ter kombinacijo obojega. Pri prvem so ugotovili, da je koncentracija NO_3^- na anodni strani višja kot na katodni. Pri poskusu s kombinacijo obeh sistemov je bila koncentracija NO_3^- po celotnem sistemu blizu ničle. Določili so, da je slednje najbolj učinkovit način odstranjevanja nitrata (Choi in sod., 2009).

9 UPRAVLJANJE NIVOJA PODTALNICE

Postopek upravljanja nivoja podtalnice je lahko uporaben kot metoda odstranjevanja odvečnega NO_3^- iz zemlje in način za učinkovito zaščito podpovršinskega vodovja pred onesnaževanjem z NO_3^- . Postopek vključuje dvig nivoja podtalnice in ustvarjanje nasičenih pogojev v zgornjem delu profila zemlje. Ker se O_2 iz zemeljskih por hitro porabi pri aerobni respiraciji, nastanejo ugodni pogoji za pričetek procesa denitrifikacije. Plini, ki nastanejo v procesu denitrifikacije, zaradi koncentracijskega gradienta z difuzijo potujejo proti površju. V tem potovanju se premikajo skozi plasti z različno poroznostjo, redoks potencialom, vsebnostjo vode, organske vsebine in N_2O -reduktazne aktivnosti. Nekaj teh faktorjev vpliva na zadrževanje in potovanje plinov iz zemlje, spreminjanje teh parametrov pa vpliva na razmerje izločanja N_2 in N_2O . Če bi velik delež mešanice izločanega plina predstavljal N_2O , bi se povečala njegova atmosferska koncentracija, kar bi lahko privedlo do hitrejših in intenzivnejših podnebnih sprememb. V primeru večinskega deleža N_2 plina, bi to lahko bil potencialno varen način odstranjevanja NO_3^- iz zemlje (Jacinthe in sod., 2000).

V raziskavi so tretirali 3 vzorce različne zemlje z nanosom NO_3^- (300kg /ha) v pasu 10 cm pod površino zemlje. Koncentracije izločanega N_2O so se odzivale na nihanja vodnega stolpca, običajno so bile večje takoj pod vodno mejo kot pa nad. Pri prvem eksperimentu

(statičen) je bil vodni stolpec vedno na enakem mestu (50 cm pod površino zemlje), izločanje N_2O pa je bilo skoraj konstantno. Ti rezultati so bili v nasprotju z drugim eksperimentom (dinamičen), kjer se je nivo vode spreminjal, koncentracije izločanega N_2O pa so posledično zelo variirale. V zaključkih raziskave so strokovnjaki predlagali, da je za najboljše rezultate odstranjevanja NO_3^- s to metodo potrebno vzdrževanje visokega vodnega stolpca čim daljše časovno obdobje (Jacinthe in sod., 2000).

10 ZAKLJUČEK

V diplomskem seminarju sem na kratko predstavila različne možnosti remediacije tal onesnaženih z dušikovimi spojinami. Zaradi predpisanega obsega diplomskega seminarja sem pri vsaki tehniki zbrala osnovne in najpomembnejše podatke ter principe. Vsako poglavje predstavlja potencialno izhodišče za nadaljnje poglobljeno preučevanje ter raziskovanje tudi na eksperimentalnem nivoju. Opisani postopki so raznovrstni in vključujejo tako principe fizikalno-kemične remediacije kot tudi bioremediacije. Posamezne teme, katerih sem se dotaknila, ne predstavljajo samostojnih rešitev problema, temveč se najboljša rešitev verjetno skriva v njihovi kombinaciji.

Gozdovi predstavljajo vir pestre biodiverzitete, dobička in sprostitev ter pripomorejo k zmanjšanju učinka globalnega segrevanja, zato je pomembno, da se poskuša najti način, ki bi jih ohranil v prvotnem in neokrnjenem stanju. Če želimo ohraniti naravo v pravem pomenu besede, bomo morali v prihodnosti več časa in sredstev posvetiti reševanju tega sodobnega problema. Več pozornost pa bi bilo vredno usmeriti v preventivno preprečevanje problema npr. z uporabo bolj učinkovitih gnojilnih sredstev ter kmetijskih praks in zmanjšani rabi fosilnih goriv v vsakdanjem življenju.

11 VIRI

- Bowman W. D., Cleveland C. C., Halada L., Hreško J., Baron J. S. 2008. Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nature Geoscience*, 1, 11: 767-770
- Brewer C. E., Brown R. C. 2012. Biochar. *Comprehensive Renewable Energy*, 5: 357-384
- Cabello P., Roldán M. D., Castillo F., Moreno-Vivián C. 2009. Nitrogen cycle. V: *Encyclopedia of microbiology, environmental microbiology and ecology*. 3rd ed. Schaechter M. (ur.). Cambridge, Academic Press: 299-321
- Cairo G., Larson D., Slack D. 1996. Electromigration of nitrates in soil. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 122, 5: 286-290
- Castro-Rodríguez V., García-Gutiérrez A., Canales J., Cañas R. A., Kirby E. G., Avila C., Cánovas F. M. 2016. Poplar trees for phytoremediation of high levels of nitrate and applications in bioenergy. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 1: 299-312

- Cayuela M. L., Sánchez-Monedero M. A., Roig A., Hanley K., Enders A., Lehmann J. 2013. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N₂O emissions? *Scientific Reports*, 3, 1732, doi: 10.1038/srep01732: 7 str.
- Cheng H.-Y., Xu A.-A., Awasthi M. K., Kong D.-D. Chen J.-S., Wang Y.-F., Xu P. 2020. Aerobic denitrification performance and nitrate removal pathway analysis of a novel fungus *Fusarium solani* RADF-77. *Bioresource Technology*, 295, 122250, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122250: 9 str.
- Choi J.-H., Maruthamuthu S., Lee H.-G., Ha T.-H., Bae J.-H. 2009. Nitrate removal by electro-bioremediation technology in Korean soil. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 1208-1216
- Cusack D. F., Silver W., McDowell W. H. 2009. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems*, 12, 8: 1299-1315
- Della Rocca C., Belgiorno V., Meriç S. 2007. Overview of *in-situ* applicable nitrate removal processes. *Desalination*, 204: 46-62
- Driscoll C., Whitall D., Aber J., Boyer E., Castro M., Cronan C., Goodale C., Groffman P., Hopkinson C., Lambert K., Lawrence G., Ollinger S. 2003. Nitrogen pollution: sources and consequences in the U.S. Northeast. *Environment*, 45, 7: 8-22
- Du E., Fenn M. E., De Vries W., Ok Y. S. 2019. Atmospheric nitrogen deposition to global forests: status, impacts and management options. *Environmental Pollution*, 250: 1044-1048
- Eid N., Elshorbagy W., Larson D., Slack D. 2000. Electro-migration of nitrate in sandy soil. *Journal of Hazardous Materials*, B79: 133-149
- Follet R. F., Hatfield J. L. 2001. Nitrogen in the environment: sources, problems and management. *The Scientific World*, 1, S2: 920-926
- Groffman P. M., Tiedje J. M., Robertson G. P., Christensen S. 1988. Denitrification at different temporal and geographical scales: proximal and distal controls. V: *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. Wilson J. R. (ur.). Wallingford, CAB International: 174-192
- Gul S., Whalen J. K., Thomas B. W., Sachdeva V., Deng H. 2015. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: mechanisms and future directions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 206: 46-59
- Guo J. H., Liu X. J., Zhang Y., Shen J. L., Han W. X., Zhang W. F., Christie P., Goulding K. W. T., Vitousek P. M., Zhang F. S. 2010. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 327, 5968: 1008- 1010
- Gupta G. P., Kulshrestha U. 2016. Biomonitoring and remediation by plants. V: *Plant responses to air pollution*. Kulshrestha U., Saxena P. (ur.). Singapore, Springer: 119-132

- Herold M. B., Baggs M. E., Daniell T. J. 2012. Fungal and bacterial denitrification are differently affected by long-term pH amendment and cultivation of arable soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 54: 25-35
- Huang J., Mo J., Zhang W., Lu X. 2014. Research on acidification in forest soil driven by atmospheric nitrogen deposition. *Acta Ecologica Sinica*, 34, 6: 302-310
- Högberg P., Bengtsson G., Berggren D., Högberg M., Nilsson I., Nohrstedt H.-Ö., Persson T., Sjöberg M. 2000. How are the nitrogen dynamics of forest soils affected? V: Effects of nitrogen deposition on forest ecosystems. Bertills U., Näsholm T. (ur.). Stockholm, Swedish Environmental Protection Agency: 29-52
- Jacinte P.-A., Dick W. A., Brown L. C. 2000. Bioremediation of nitrate-contaminated shallow soils and waters via water table management techniques: evolution and release of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 3: 371-382
- Javid M. K., Ashiq M., Tahir M. 2016. Potential of biological agents in decontamination of agricultural soil. *Scientifica*, 2016, doi: 10.1155/2016/1598325: 9 str.
- Lehmann J., Joseph S. 2009. Biochar for environmental management: an introduction. V: Biochar for environmental management: science and technology. Lehmann J., Joseph S. (ur.). London, Earthscan: 1-12
- Liu L., Li W., Song W., Guo M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633: 206-219
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. 2011. Brock biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 1155 str.
- Moyer-Henry K., Silva I., Macfall J., Johannes E., Allen N., Goldfarb B., Rufty T. 2005. Accumulation and localization of aluminium in root tips of loblolly pine seedlings and the associated ectomycorrhiza *Pisolithus tinctorius*. *Plant, Cell and Environment*, 28, 2: 111-120
- Mueller J. G., Cerniglia C. E., Pritchard P. H. 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. V: Bioremediation: principles and applications. Crawford R. L., Crawford D. L. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 125-194
- Nitrogen pollution and the European environment - implications for air quality policy. 2013. Bristol, Science for Environmental Policy: 28 str.
- Nurizzo D., Cutruzzolà F., Arese M., Bourgeois D., Brunori M., Cambillau C., Tegoni M. 1998. Conformational changes occurring upon reduction and NO binding in nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 37: 13987-13996
- Näsholm T., Persson T. 2000. How are soils and plants affected by nitrogen deposition? – A synthesis. V: Effects of nitrogen deposition on forest ecosystems. Bertills U., Näsholm T. (ur.). Stockholm, Swedish environmental protection agency: 127-136

- Postma J. W. M., Ollson P. A., Falkengren-Grerup U. 2007. Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 400-408
- Qian L., Chen B., Hu D. 2013. Effective alleviation of aluminum phytotoxicity by manure-derived biochar. *Environmental Science & Technology*, 47, 6: 2737-2745
- Rajmohan K. S., Gopinath M., Chetty R. 2018. Bioremediation of nitrate-contaminated wastewater and soil. V: *Bioremediation: applications for environmental protection and management*. Varjani S. J., Agarwal A. K., Gnansounou E., Gurunathan B. (ur.). Singapore, Springer Nature: 387-409
- Rouphael Y., Cardarelli M., Colla G. 2015. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effects of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. *Scientia Horticulturae*, 188: 97-105
- Saggar S., Jha N., Deslippe J., Bolan N. S., Luo J., Giltrap D. L., Kim D.-G., Zaman M., Tillman R. W. 2012. Denitrification and $N_2O:N_2$ production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*, 465: 173-195
- Shoun H., Fushinobu S., Jiang L., Kim S.-W., Wakagi T. 2012. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367: 1186-1194
- Shoun H., Kim D.-H., Uchiyama H., Sugiyama J. 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 94, 3: 277-282
- Shoun H., Tanimoto T. 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement by cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 17: 11078-11082
- Sun L., Li L., Chen Z., Wang J., Xiong Z. 2014. Combined effects of nitrogen deposition and biochar application on emissions of N_2O , CO_2 in NH_3 from agricultural and forest soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60: 254-265
- Takahashi M., Sasaki Y., Ida S., Morikawa H. 2001. Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO_2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 731-741
- Takaya N., Shoun H. 2000. Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Molecular Genetics and Genomics*, 263: 342-348
- Tiedje J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. V: *Environmental microbiology of anaerobes*. Zehnder A. J. B. (ur.). New York, John Wiley and Sons: 179-244
- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 7: 1163-1172

- Warneke S., Schipper L. A., Matiasek M. G., Scow K. M., Cameron S., Bruesewitz D. A., McDonald I. R. 2011. Nitrate removal, communities of denitrifiers and adverse effects in different carbon substrates for use in denitrification beds. *Water Research*, 45, 17: 5463-5475
- Watkinson S. C., Boddy L., Money N. P. 2015. *The Fungi*. 3rd Edition. Cambridge, Academic Press: 466 str.
- Watsuji T., Takaya N., Nakamura A., Shoun H. 2003. Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 5: 1115-1120
- Wilson D. 1995. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73, 2: 274-276
- Yao Y., Gao B., Zhang M., Inyang M., Zimmerman A. R. 2012. Effect of biochar amendment on sorption and leaching of nitrate, ammonium, and phosphate in a sandy soil. *Chemosphere*, 89, 11: 1467-1471
- Zhang T., Chen H. Y. H., Ruan H. 2018. Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes. *The ISME Journal*, 12: 1817-1825
- Zhu X., Chen B., Zhu L., Xing B. 2017. Effects and mechanism of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. *Environmental Pollution*, 227: 98-115
- Zumft W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 4: 533-616