

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Levin PAL

**ČISTILNA SPOSOBNOST TAL LJUBLJANSKEGA BARJA ZA  
ODSTRANJEVANJE MINERALNIH OBLIK DUŠIKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE POTENTIAL OF LJUBLJANA MARSH SOIL FOR MINERAL  
NITROGEN REMOVAL**

DISSERTATION THESIS

Ljubljana, 2011

Doktorska disertacija:

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 9. seje Komisije za doktorski študij z dne 9.9.2010 po pooblastilu Senata Univerze v Ljubljani z dne 20.1.2009 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja agronomije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rok Mihelič

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Članica: doc. dr. Nives Ogrinc

Datum zagovora: 14. junij 2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Levin PAL

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
DK UDK 579.26: 579.6: 631.461 (043.3)  
KG Mikrobiologija tal/ekologija/Ljubljansko barje/šota/talna organska snov/  
mineralizacija/nitrifikacija/denitrifikacija/oksični in anoksični cikli/temperatura/  
hranjenje tal/emisija toplogrednega plina/gnojenje/pronicanje nitrata/  
ogljikov dioksid/dušikov oksidul  
KK AGRIS P01/P34  
AV PAL, Levin, univ. dipl. mikrobiolog  
SA MANDIČ-MULEC, Ines (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenija  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in  
biotehniških znanosti, področje agronomije  
LI 2011  
IN ČISTILNA SPOSOBNOST TAL LJUBLJANSKEGA BARJA ZA  
ODSTRANJEVANJE MINERALNIH OBLIK DUŠIKA  
TD Doktorska disertacija  
OP IX, 84 str., 3 pregl., 16 sl., 154 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Zgornji sloji šote Ljubljanskega barja so zaradi izsuševanja delno mineralizirani,  
sezonsko nihanje podtalnice pa redno izmenjuje oksične in anoksične razmere v teh  
slojih. Amonijski dušik iz gnojil ali gospodinjskih odpadkov se v oksičnih razmerah  
nitrificira do nitratov, ki onesnažujejo podtalnico. Denitrifikacija nitratni dušik  
odstrani z redukcijo v dušikove pline. V okviru te doktorske disertacije smo  
preučevali vpliv bremenitve z mineralnim dušikom, temperature in kisika na  
dinamiko pretvorb dušika v tleh Ljubljanskega barja. Denitrifikacijska encimska  
aktivnost (DEA) je bila prisotna po celotnem 1 m globokem vertikalnem profilu  
šotnih tal. Zgornji, 0 – 30 cm, sloj je med cikličnim bremenjenjem z amonijem in  
izmenjavanjem oksičnih in anoksičnih razmer (oksični/anoksični cikli) pri 28 °C v  
treh ciklih (~3 mesecih) odstranil 1300 µg N g<sup>-1</sup> suhih tal oz. hipotetično vsaj 2600  
kg N ha<sup>-1</sup>. Pri povprečnih letnih temperaturah (10 - 12 °C) bi tla isto količino dušika  
pretvorila v enem letu. Zaradi visoke pufrske in sorpcijske kapacitete tal je bila  
volatilizacija amoniaka nizka. Medtem ko je bila avtotrofna nitrifikacija stabilna, sta  
heterotrofna denitrifikacija in produkcija CO<sub>2</sub> (mineralizacija) linearno padali med  
oksičnimi/anoksičnimi cikli. Podobno je v tleh, ki so bila 12 mesecev shranjena pri  
4 °C, nitrifikacijska hitrost ostala visoka, denitrifikacija pa je tekla le v prisotnosti  
rastlinskih eksudatov. Torej kljub visoki vsebnosti organskega ogljika v šotnih tleh,  
ta ni bil mikrobom dostopen. Temperatura je prav tako bolj vplivala na  
denitrifikacijo (Q<sub>10</sub> = 2,9 – 3,9) kot na nitrifikacijo (Q<sub>10</sub> = 2,3 – 2,9). Kar 30 – 40 %  
nitrata pa se je pretvorilo v toplogredni plin N<sub>2</sub>O, kar uvršča ta tla kot neprimerna za  
čiščenje odpadnih voda v naravi (*in situ*).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDK 579.26: 579.6: 631.461 (043.3)  
CX soil microbiology / ecology / Ljubljana marsh / peat / soil organic matter / mineralization / nitrification / denitrification / oxic and anoxic cycling / temperature / soil storage / greenhouse gas emission / fertilization / nitrate leaching / carbon dioxide / nitrous oxide  
CC AGRIS P01/P34  
AU PAL, Levin  
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenia  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgradual Study of Biology and Biotechnology, field Agronomy  
PY 2011  
TI THE POTENTIAL OF LJUBLJANA MARSH SOIL FOR MINERAL NITROGEN REMOVAL  
DT Doctoral Dissertation  
NO IX, 84 p., 3 tab., 16 fig., 154 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The upper layers of Ljubljana marsh drained fen soil are partially mineralized and subjected to regular groundwater fluctuations causing shifts of oxic and anoxic conditions. Ammonium derived from fertilizers or domestic wastewaters is converted to nitrate by nitrification, which takes place in oxic conditions. Nitrate leaching to groundwater is prevented by denitrification, which is anoxic reduction of nitrate to nitrogen gasses. Denitrification enzyme activity (DEA) was detected across the whole 1-m soil vertical profile, with the highest activity in the upper 0-30 cm soil layer. This layer removed  $1300 \mu\text{g N g}^{-1}$  dry soil (hypothetically  $2600 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) after three cycles (~3 months) of sequential ammonium amendments followed by alternating oxic and anoxic conditions at 28 °C. The same amount of mineral nitrogen would be removed by the 30-cm soil layer at average annual temperatures (10 – 12 °C) in one year. Ammonia volatilization was low due to high sorption and buffer capacities of this soil. While autotrophic nitrification was stable, the heterotrophic denitrification and CO<sub>2</sub> production (mineralization) decreased linearly during oxic/anoxic cycles. Similarly, in soil that was stored for 12 months at 4 °C, nitrification rates remained high, but denitrification proceeded only in the presence of plant exudates. Despite high organic carbon content in peat soil there was a lack of available carbon source for microorganisms. Denitrification also showed higher sensitivity to temperature ( $Q_{10} = 2.9$  to 3.9) than nitrification ( $Q_{10} = 2.3$  to 2.9). N<sub>2</sub>O emission presented 30 - 40% of nitrate losses placing this soil as unsuitable for *in situ* wastewater treatment.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Slovarček	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	3
1.1.1 Namen	3
1.1.2 Hipoteze	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 OGLJIKOV CIKEL	4
2.1.1 Biološko kroženje ogljika v kopenskih ekosistemih	4
2.1.2 Nastanek organske snovi na mokriščih	5
2.1.3 Vpliv človeka na ravnovesje rezervoarjev ogljika na Zemlji	6
2.1.4 Povezava med ogljikovim in dušikovim ciklom	7
2.2 DUŠIKOV CIKEL	8
2.2.1 Biološko kroženje dušika v tleh	8
2.2.2 Vpliv človeka na globalno kroženje dušika	13
2.3 ŠOTNA TLA LJUBLJANSKEGA BARJA	14
2.3.1 Renaturacija Ljubljanskega barja	14
2.3.2 Šota in čiščenje odpadnih voda	15
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>16</b>
3.1 VZORČENJE TAL NA EKSPERIMENTALNEM POLJU NA LJUBLJANSKEM BARJU	16
3.1.1 Vzorčenje vertikalnih profilov tal za analize denitrifikacijske encimske aktivnosti (DEA) in najbolj verjetnega števila denitrifikatorjev (MPN)	16
3.1.2 Vzorčenje zgornjega sloja tal globine 0 - 30 cm za eksperimente v mikrokozmi	17
3.1.3 Ugotavljanje vsebnosti vode in kapacitete za zadrževanje vode v tleh takoj po vzorčenju	18
3.2 ANALIZE POTENCIALNIH ENCIMSKIH AKTIVNOSTI IN ŠTEVILA DENITRIFIKATORJEV V VERTIKALNEM PROFILU TAL	20
3.2.1 Ugotavljanje denitrifikacijske encimske aktivnosti (DEA) v vertikalnem profilu tal	20
3.2.2 Ugotavljanje najbolj verjetnega števila denitrifikatorjev v vertikalnem profilu tal	22
3.3 EKSPERIMENTI V MIKROKOZMIH	24
3.3.1 Opis mikrokozmov in obremenitev tal z mineralnim dušikom v mikrokozmi	24
3.3.2 Trije inkubacijski eksperimenti z mikrokozmi	25
3.3.3 Analitske tehnike med eksperimenti v mikrokozmi	28
3.3.4 Izračun hitrosti mikrobnih procesov in temperaturnih koeficientov $Q_{10}$	33

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>34</b>
4.1	FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI V ZVEZI Z ODSTRANJEVANJEM DUŠIKA	34
4.2	MIKROBIOLOŠKE ANALIZE VERTIKALNEGA PROFILA TAL	36
<b>4.2.1</b>	<b>Denitrifikacijska encimska aktivnost</b>	<b>36</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Najbolj verjetno število denitrifikacijskih mikroorganizmov</b>	<b>36</b>
4.3	LABORATORIJSKI EKSPERIMENTI S TLEMI V MIKROKOZMIH	38
<b>4.3.1</b>	<b>Nitrifikacija, denitrifikacija in produkcija toplogrednih plinov v odvisnosti od temperature tal med oksičnim/anoksičnim ciklom v svežih tleh</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med tremi oksičnimi/anoksičnimi cikli v tleh, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C</b>	<b>46</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med hranjenjem tal pri 4 °C</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>56</b>
5.1	DENITRIFIKACIJSKA AKTIVNOST IN ZASTOPANOST DENITRIFIKATORJEV V VERTIKALNIH PROFILIH TAL LJUBLJANSKEGA BARJA	56
5.2	OPREDELITEV POTENCIALA TAL LJUBLJANSKEGA BARJA ZA PRETVORBE IN ODSTRANJEVANJE MINERALNIH OBLIK DUŠIKA	57
<b>5.2.1</b>	<b>Primernost tal za uporabo v čistilnih procesih iz vidika nekaterih fizikalno-kemijskih lastnosti</b>	<b>57</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Potencialne mikrobne pretvorbe in odstranjevanje mineralnega dušika med izmeničnimi oksičnimi/anoksičnimi cikli</b>	<b>58</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Potencialne in realne hitrosti nitrifikacije in denitrifikacije</b>	<b>61</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Relacije med razgradnjo organske snovi, temperaturo, aplikacijo mineralnega dušika in temperaturnimi prehodi iz 4 °C na 28 °C med hranjenjem tal</b>	<b>63</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Emisije toplogrednih plinov med oksičnimi in anoksičnimi razmerami</b>	<b>65</b>
5.3	SKLEPI	67
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>68</b>
6.1	POVZETEK	68
6.2	SUMMARY	70
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>72</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Hitrosti oksidacije amonija in redukcije nitrata ter hitrosti oksične in anoksične produkcije dušikovega oksidula in ogljikovega dioksida svežih tal v odvisnosti od temperature	44
Preglednica 2: Koncentracije amonija, nitrata in nitrita ter skupnega mineralnega dušika na začetku treh oksičnih/anoksičnih ciklov v tleh, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C	47
Preglednica 3: Hitrosti nitrifikacije, denitrifikacije, neto mineralizacije in koncentracija raztopljenega organskega ogljika v talnih mikrokozmih med tremi oksičnimi/anoksičnimi cikli pri 28 °C	50

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema vzorčenja vertikalnih profilov tal na neonesnaženi in točkasto onesnaženi lokaciji	17
Slika 2: Shema vzorčenja, homogenizacije in shranjevanja tal za eksperimente v mikrokozmih	18
Slika 3: Shema mikrokozma s tlemi	24
Slika 4: Mikrokozmi kot sistemi za kontrolirano preučevanje vpliva različnih dejavnikov na mikrobne procese v tleh	26
Slika 5: Povezave med pH, nitratom in volatilizacijo amonija	35
Slika 6: Prostorska variabilnost in vpliv točkovnega vira onesnaženja z odpadno gospodinjstvo vodo na (a) denitrifikacijsko encimsko aktivnost (DEA) in (b) število denitrifikacijskih mikroorganizmov (MPN) v tleh	37
Slika 7: Potek nitrifikacije v oksičnih in denitrifikacije v anoksičnih razmerah v svežih tleh pri 28 °C (a) in 4 °C (b)	39
Slika 8: Vpliv dodatka amonija ter koncentracije nitrita na emisijo N <sub>2</sub> O pri 28 °C (a) in 4 °C (b) v oksičnih razmerah	41
Slika 9: Vpliv temperature in dodatka mineralnega dušika na mineralizacijo organskega ogljika v oksičnih in anoksičnih razmerah pri 28 °C in 4 °C	43
Slika 10: Vpliv temperature na nitrifikacijo (a) in denitrifikacijo (b) v tleh	45
Slika 11: Potencialne pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med tremi zaporednim cikli oksičnih in anoksičnih razmer v tleh	48
Slika 12: Vpliv števila oksičnih/anoksičnih ciklov na nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial tal (a) in mikrobno respiracijo pri 28 °C (b)	51
Slika 13: Potencialne pretvorbe mineralnega dušika med oksičnim/anoksičnim ciklom v tleh po 12. mesecih hranjenja pri 4 °C	52
Slika 14: Vpliv hranjenja tal pri 4 °C na nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial tal	53
Slika 15: Dodatek sintetičnih rastlinskih eksudatov in hitrost denitrifikacije v tleh	54
Slika 16: Vpliv hranjenja tal na oksično in anoksično respiracijo	55

## SLOVARČEK

- AOA – amoniak oksidirajoče arheje (ammonia oxidizing archaea)  
AOB – amoniak oksidirajoče bakterije (ammonia oxidising bacteria)  
BPP – bruto primarna produkcija (bruto primary production)  
C – ogljik  
KIK – kationska izmenjevalna kapaciteta (cation exchange capacity)  
CH<sub>4</sub> – metan  
CO<sub>2</sub> – ogljikov dioksid  
DEA – denitrifikacijska encimska aktivnost (denitrification enzyme activity)  
DOC – raztopljeni organski ogljik (dissolved organic carbon)  
MPN – najbolj verjetno število (most probable number)  
N – dušik  
N<sub>2</sub> – molekularni (atmosferski) dušik  
N<sub>2</sub>O – dušikov oksidul  
NH<sub>3</sub> – amoniak  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – amonij  
NO – dušikov monoksid  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – nitrit  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – nitrat  
NOB – nitrit oksidirajoče bakterije (nitrite oxidizing bacteria)  
NEA – nitrifikacijska encimska aktivnost (nitrification enzyme activity)  
NEP – neto produkcija ekosistema (net ecosystem production)  
Nr – reaktivna (živi biomasi dostopna) oblika dušika  
NPP – neto primarna produkcija (net primary production)  
NSP – neto sekundarna produkcija (net secondary production)  
POC – delci organskega ogljika (particulate organic carbon)  
POM – delci organske snovi (particulate organic matter)  
SIR – substratna inducirana respiracija (substrate induced respiration)  
SOM – talna organska snov (soil organic matter)  
WFPS – z vodo napolnjena prostornina por (water filled pore space)  
WHC – kapaciteta za zadrževanje vode (water holding capacity)

## 1 UVOD

Ljubljansko barje je največje mokrišče v Sloveniji (Melik, 1927) in je priznано kot področje z največjo vrednostjo naravne dediščine, ki se razprostira na 150 km<sup>2</sup> veliki ravnici med Ljubljano in Krimom ter Pijavo Gorico in Vrhniko (Tome in sod., 2000; Premelč, 2006).

Ljubljansko barje je skoraj v celoti nizko barje, kjer težko najdemo ostanke prave šote, saj se je ta v preteklosti izrezovala in uporabljala za kurjavo (Melik, 1927). Dobrih 200 let nazaj se je začelo izgrajevanje mreže osuševalnih jarkov in poglobljanje struge reke Ljubljanice, ki se je končalo leta 1953 s Plečnikovimi zapornicami na Ljubljanici (Čeak, 2005). Ta poseg v naravo je znižal frekvenco poplavljanja na Ljubljanskem barju ter omogočil učinkovito izrabo tal v kmetijske namene, zato je močvirnata narava Ljubljanskega barja danes dokaj nerazpoznavna (Simoneti in sod., 2007), zgornji sloji šote pa so delno razgrajeni (Hacin in sod., 2001).

Površje Ljubljanskega barja leži nad nahajališči pitne vode (Ježovnik, 2009) in je v večinskem delu namenjeno kmetovanju, ki vključuje tudi uporabo gnojil. Zaradi preprečevanja pronicanja nitratov v podtalnico je maksimalna zakonsko dovoljena letna aplikacija dušika omejena na 170 kg N ha<sup>-1</sup> letno (Uredba o varstvu voda ... , 2009; EC ... , 2009). V povprečju rastline privzamejo le 50 % dušika iz umetnih gnojil, ostali dušik pa se v obliki nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in nitrita (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sprošča v podtalnico ali pa zapušča tla v obliki emisij amoniaka (NH<sub>3</sub>), dušikovega monoksida (NO), dušikovega oksidula (N<sub>2</sub>O) in molekularnega dušika (N<sub>2</sub>) (Galloway in Cowling, 2002; Galloway in sod., 2003).

Tla so lahko zelo učinkovit medij za filtriranje odpadnih voda (Lance in sod., 1980), še posebej šotna tla (Damman, 1988), ki lahko dosežejo nitrifikacijske hitrosti, primerljive z aeracijskimi bazeni čistilnih naprav (Heavey, 2003). Princip čiščenja odpadnih voda poteka s sklopljenima procesoma nitrifikacije in denitrifikacije (Rittman in McCarty, 2001), v zadnjih časih pa v čistilnih napravah v ospredje prihaja tudi prva stopnja nitrifikacije, sklopljena z oksidacijo amonija z nitritom do molekularnega dušika (anamox), ki je bila odkrita pred kratkim (Mulder in sod., 1995) in v tleh ni signifikantna (Robertson in Groffman, 2007; Prosser, 2007).

Nitrifikacija je dvostopenjski proces, ki poteka v oksičnih razmerah, kjer se v prvi stopnji amonij oksidira najprej v nitrit, v drugi stopnji pa se nastali nitrit oksidira do nitrata (Prosser, 1989). Denitrifikacija in anamox potekata v anoksičnih razmerah (Tiedje, 1994; Robertson in Groffman, 2007) in povzročita redukcijo raztopljenih dušikovih oksidov v plinaste oblike dušika, katerih emisije omogočajo transport dušika v atmosfero (odstranjevanje iz čistilnih naprav oz. tal) (Madigan in sod., 2003).

V čistilnih napravah se odpadna voda navadno preliva iz reaktorjev z oksičnimi razmerami v reaktorje z anoksičnimi razmerami (Rittman in McCarty, 2001), v tleh pa lahko procesi nitrifikacije in denitrifikacije ob primerni vsebnosti vode tečejo hkrati, zaradi prisotnosti oksičnih in anoksičnih con v tleh (Wrage in sod., 2001). Poleg tega se v naravi vzdolž vertikalnega profila tal navadno vzpostavijo pretežno oksične razmere nad nivojem podtalnice ter anoksične razmere pod nivojem podtalnice (Brune in sod., 2000; Kristensen, 2000). Zaradi prisotnosti žive rastlinske biomase, ki mikroorganizme oskrbuje z rastlinskimi eksudati (Krafczyk in sod., 1984), so v zgornjih slojih tal mikrobne aktivnosti in število mikroorganizmov navadno najvišji (Linne von Berg in Bothe, 1992; Mergel in sod., 2001). Gradient oksičnih in anoksičnih razmer omogoča nitrifikacijo v zgornjih slojih tal, nitrat pa lahko pronica v globlje sloje tal, zato je denitrifikacija v globljih slojih ključni mehanizem, ki odloča o usodi nitrata v tleh (Tiedje, 1994).

Shranjevanje tal pri 4 °C po vzorčenju (ISO 10381-6, 2009 cit. po Wallenius, 2010) ne bi smelo vplivati na čistilno sposobnost šotnih tal. Delno razgrajeni zgornji sloji šotnih tal Ljubljanskega barja imajo še vedno visoko vsebnost organske snovi in so bila klaficirana kot histosol (Hacin in sod., 2001). Hranjenje teh tal pri 4 °C ni vplivalo na pestrost bakterijske združbe (Zajec, 2004) in tla so med inkubacijo pri 4 °C proizvajala zelo nizke emisije ogljikovega dioksida (CO<sub>2</sub>) (Pal, 2007), kar kaže, da je bila mineralizacija organskega ogljika pri nizkih temperaturah nizka (Kirschbaum, 1995). Prav tako se število nitrifikacijskih in denitrifikacijskih mikroorganizmov ter njihove potencialne encimske aktivnosti (NEA in DEA) pri nizki temperaturi niso bistveno spreminjale (Pal, 2007; Resman, 2007; Stres in sod., 2008).

## 1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

### 1.1.1 Namen

Namen raziskave je bil ovrednotiti naravno čistilno sposobnost šotnih tal za čiščenje viškov dušika in sicer potencial za aerobne pretvorbe (nitrifikacijo) in anaerobno odstranjevanje (denitrifikacijo) mineralnih oblik dušika v tleh Ljubljanskega barja, ki naj bi ščitila podtalnico pred pronicanjem nitratov, v odvisnosti od bremenitve tal, kisika, temperature in starosti tal.

### 1.1.2 Hipoteze

- Tla Ljubljanskega barja (histosol) so ohranila visok potencial za pretvorbe mineralnih oblik dušika, ki ostane visok tudi po večkratnih bremenitvah in večkratnih izmenjavah oksičnih in anoksičnih razmer.
- Pri odstranjevanju amonijskega dušika, dodanega v tla z visoko vsebnostjo organske snovi (Histosol), bodo emisije amoniaka med nitrifikacijo nizke, nastali nitrat pa se bo v anoksičnih razmerah iz tal odstranil v obliki  $N_2O$  in  $N_2$ .
- Potencialna denitrifikacijska encimska aktivnost (DEA) je najvišja v zgornjih slojih tal Ljubljanskega barja in z globino upada.
- Hranjenje tal z visoko vsebnostjo organske snovi (histosol) pri nizkih temperaturah ne vpliva na pretvorbe dodanega mineralnega dušika.
- Temperatura vpliva na nitrifikacijske in denitrifikacijske hitrosti v tleh.

## 2 PREGLED OBJAV

Dušik (N) in ogljik (C) sta gradnika organske snovi v tleh in se sproščata ob njeni razgradnji (mineralizaciji), zato sta tudi ogljikov in dušikov cikel tesno prepletena. Amonijski dušik, ki se sprosti, vstopi v proces nitrifikacije ter se pretvori do nitrata. Nitrat pa se z denitrifikacijo uplani in odstrani iz tal, pri čemer se porabi določen delež dostopne organske snovi (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Madigan in sod., 2003; Horwath, 2007; Robertson in Groffman, 2007; Reddy in DeLaune, 2008).

### 2.1 OGLJIKOV CIKEL

Že pred nastankom življenja na Zemlji naj bi bil ogljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) v atmosferi aktivna molekula, vključena v prvotno globalno kroženje ogljika, ki je potekalo na osnovi fizikalno-kemičnih in ne bioloških procesov.  $\text{CO}_2$  se je raztapljal v vodi, ki je spirala preperela magnezijeve, silikatne in kalcijeve kamnine. Ioni iz kamnin so reagirali s karbonatnimi ioni med transportom površinskih voda do oceanov. Nastajal je predvsem kalcijev karbonat, ki se je sedimentiral na dno oceanov. Zaradi visokih temperatur v plašču Zemlje so posedeni karbonati preperovali in se ob izbruhih vulkanov vračali v atmosfero v obliki  $\text{CO}_2$  (Berner in sod., 1983; Raymo, 1991).

V obdobju devona v paleozoiku so se pojavile prve fotosintetske rastline, ki so anorganski ogljik ( $\text{CO}_2$ ) vgrajevale v biomaso in proizvajale kisik. Takratni mikroorganizmi še niso razvili sposobnosti razgradnje lignina iz odmrlega rastlinskega materiala. Slednji se je odlagal v sedimente in nastal je enormni rezervoar biološko neaktivnega organskega ogljika, ki je danes poznan kot zemeljska zaloga fosilnih goriv (Robinson, 1990).

Podobno nastanku fosilnih goriv je, od zadnje ledene dobe dalje, iz odmrle rastlinske biomase v mokriščih nastajala šota. Mokrišča so namreč okolja z visoko vsebnostjo vode in posledično znižano dostopnostjo kisika, kar inhibira mineralizacijo organske snovi. Za razliko od fosilnih goriv se šota nahaja izključno v površinskih slojih in v globino meri le 2 – 4 m (Morita, 1980).

#### 2.1.1 Biološko kroženje ogljika v kopenskih ekosistemih

Prvi korak biološkega kroženja ogljika je pretvorba anorganskega ogljika ( $\text{CO}_2$ ) v organskega oz. bruto primarna produkcija (BPP), ki je posledica fotosinteze (alg, zelenih rastlin in cianobakterij) ali kemolitotrofne fiksacije  $\text{CO}_2$ . V terestričnih ekosistemih so pomembne predvsem fotosintetske rastline, v tleh pa so prisotne tudi kemolitotrofne bakterije (npr. nitrifikatorji), ki prispevajo le manjšinski delež BPP. Del fiksiranega ogljika rastline z respiracijo vrnejo v atmosfero, drugi del pa se vgradi v rastlinsko biomaso in predstavlja neto primarno produkcijo (NPP). Neto sekundarni producenti (NSP) so

mikroorganizmi in živali, ki se prehranjujejo z odmrlo biomaso NPP organizmov (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Madigan in sod., 2003; Horwath, 2007).

Odmrta biomasa vsebuje kompleksne polimere (celuloza, polisaharidi, proteini), ki jih specializirani celulolitični in hidrolitični izvencelični encimi mikroorganizmov hidrolizirajo v monomere (enostavni sladkorji, aminokisljine). Nadaljni metabolizem je lahko fermentativen ali respiratoren. Pri fermentacijah se del substrata oksidira hkrati ko se drugi del substrata reducira, razgradnja organske snovi pa poteka v odsotnosti zunanjega elektronskega sprejemnika. Za respiracije je potreben zunanji sprejemnik elektronov, ki se reducira, medtem ko organska snov oksidira. Pri živalih in rastlinah je sprejemnik elektronov kisik, mikroorganizmi pa za respiracijo lahko uporabljajo železo, nitrat, fumarat, sulfat, karbonat in žveplo. Zato so le mikroorganizmi sposobni rasti v anoksičnih razmerah. Tako respiracija kot fermentacija mikroorganizmom omogočata shranjevanje energije, ki nastane med eksotermno razgradnjo substrata (Madigan in sod., 2003).

Zaloga labilnega (stalno krožečega) ogljika predstavlja neto produkcijo ekosistema (NEP) in je definirana kot BPP, ki ji odštejemo respiratorne izgube CO<sub>2</sub> avtotrofnih (fotosintetskih) organizmov in heterotrofnih organizmov. Če je NEP = 0, potem sta fiksacija CO<sub>2</sub> iz atmosfere in vračanje CO<sub>2</sub> v atmosfero (razgradnja) v ravnotežju (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Madigan in sod., 2003; Horwath, 2007).

### **2.1.2 Nastanek organske snovi na mokriščih**

Hitrost razgradnje je odvisna od kvalitete rastlinskega materiala, ki vstopa v tla. Če je NEP pozitivna, pomeni, da se v ekosistemu kopiči organska snov. Gozdovi imajo najvišjo NEP, ker se v njih akumulira les, ki je težko razgradljiv. V ekosistemih s konstantno nizkimi temperaturami (permafrost, subarktika) ali pa v ekosistemih z omejeno dostopnostjo kisika (mokrišča) je visoka NEP odraz nizke mikrobne aktivnosti (Prentice in sod., 2001).

Organsko snov v delcih (POM) predstavljajo s prostim očesom prepoznavni ostanki živalske in rastlinske biomase, ki se nalagajo na površini mokrišč (detrit - listje, odmrle živali in rastline). Ogljik v POM (POC) je podvržen nadaljnji razgradnji v enostavnejše monomere (DOC – dissolved organic carbon). Približno 50 % POC oz. DOC se vgradi v mikrobno biomaso (MBC – microbial biomass carbon) in 50 % mineralizira v anorganski ogljik (CO<sub>2</sub>). Ogljik v mikrobni biomas (MBC – microbial biomass carbon) ima najkrajši zadrževalni čas (nekaj dni) in predstavlja le 3 – 5 % celotnega organskega ogljika (TOC – total organic carbon) v tleh. Preostali del TOC je inkorporiran v talni organski snovi (SOM – soil organic matter), ki se razgrajuje več let, desetletij, stoletij, tisočletij (Horwath, 2007; Reddy in DeLaune, 2008).

SOM predstavljajo s prostim očesom nerazpoznavni ostanki rastlin, živali, mikroorganizmov in stranskih produktov razgradnje. SOM vsebuje nehuminske substance

(ogljikovi hidrati, proteini, maščobe), fenolne substance (lignin in tanin) ter težko razgradljive huminske snovi. Ogljikovi hidrati, proteini in maščobe so lahko razgradljive organske komponente rastlinskih in živalskih celic. Lignin je polimer sekundarne celične stene rastlin in je zaradi hidrofobnosti, visoke gostote in neenakomerne razvejanosti težko dostopen encimom. Glive so pri razgradnji lignina v tleh bolj uspešne od bakterij (Horwath, 2007). Tanini so polifenoli, ki denaturirajo proteine ali pa interagirajo s proteini in pomagajo pri razgradnji organske snovi (Reddy in DeLaune, 2008).

Akumulacija SOM v šoti je posledica nalaganja vedno novejših plasti odmrle biomase na še ne dokončno razgrajene stare plasti. Zaradi visoke vsebnosti vode v spodnjih plasteh se v globljih slojih tal vzpostavijo anoksične razmere, ki močno znižajo hitrost mikrobne razgradnje. Biorazgradljivost plasti šote pada z globino, saj se SOM globljih slojev šote sčasoma humificira. Huminske snovi imajo višjo vsebnost C (50 – 55 %) in H (5 %) ter nižjo vsebnost O (33 %) kot biomasa, iz katere nastanejo. Nastanejo po združitvi s prostimi radikali mineralnega N. Poleg 5 % N vsebujejo še po 1 % P in 1 % S ter < 1 % mikroelementov in kovin (Al, Ca, Zn, Cu) (Horwath, 2007). Sestava huminske snovi v različnih tleh je različna, fizikalno-kemijske lastnosti pa so skupne. Delijo se na humin (netopen v alkalnem), huminske kisline (topne v kislem) in fulvo kisline (topne v alkalnem in kislem) (Reddy in DeLaune, 2008).

Dodatno zaščito pred mikrobno razgradnjo šoti omogoča visoka kationska izmenjevalna kapaciteta (KIK), ki korelira z vsebnostjo organske snovi v tleh (Duan in Xiao, 2000). Zaradi visoke KIK šotna tla vežejo tako elemente (Ca, Mg, Na, K) kot elemente v sledovih (Zn, Fe, Mn), ki so nujno potrebni za mikrobno rast (Gogo in Pearce, 2009).

### **2.1.3 Vpliv človeka na ravnovesje rezervoarjev ogljika na Zemlji**

Od industrijske revolucije dalje je bilo razumevanje ogljikovega cikla predvsem usmerjeno v optimizacijo izrabe naravnih virov energije, ki so jih predstavljala fosilna goriva. Zaradi visoke energijske vrednosti in vsebnosti organskega ogljika so šotna tla poleg rodovitnosti v kmetijstvu predstavljala izziv za razvoj tehnologij pridobivanja goriva in plinov, intermediatov v industriji plastike ter medicinskih in gospodinjskih kemikalij (Morita, 1980). Zadnja desetletja pa se različne znanstvene stroke po svetu ukvarjajo predvsem s posledicami industrijske izrabe velikih rezervoarjev ogljika, ki višajo atmosferske koncentracije CO<sub>2</sub> (Watson in sod., 1990; Forster in sod., 2007).

Toplogredni plin CO<sub>2</sub> v atmosferi absorbira infrardeče sevanje, ki se odbija od Zemljine površine (Shine in sod., 1990). Kurjenje fosilnih goriv torej spreminja neaktivni ogljik v aktivnega (CO<sub>2</sub>), s tem pa povečuje učinek tople grede na Zemlji. Krčenje gozdov dodatno pripomore k toplogrednemu učinku, saj imajo gozdovi enormne kapacitete za fiksacijo CO<sub>2</sub> iz atmosfere, v lesni biomasi pa je shranjenega kar 75 % celotnega kopenskega ogljika. Intenzivna raba v kmetijski namene pa povzroča pospešeno razgradnjo talne

organske snovi in dodatne emisije CO<sub>2</sub>. Antropogena aktivnost torej s spreminjanjem naravnih hitrosti pretvorb ogljikovih zvrsti ruši naravno razmerje med aktivnimi in neaktivnimi rezervoarji ogljika na Zemlji (Watson in sod., 1990).

Pri tem šotna tla niso izjema, saj bi v naravi delovala kot ponor ogljika, vendar so zaradi izrezovanja in kurjenja, izsuševanja in kmetovanja prispevala k zvišanju koncentracije CO<sub>2</sub> v atmosferi (Raich in Schlesinger, 1992; Kirschbaum, 1995; Kirschbaum, 2000; Prentice in sod., 2001).

### 2.1.3.1 Obnova šotišč

V preteklih desetletjih se je pričelo pretirano mineralizacijo šote (Prentice in sod., 2001) preprečevati z dvigom podtalne vode na prvotni nivo (Brake in sod., 1999). S spodbujanjem rasti oz. inokulacijo prvotnega rastlinja na šotiščih (Schipper in sod., 2002; Wösten in sod., 2008) se ohranja prvotna kemična sestava organske snovi v tleh (Wind-Mulder in sod., 1996; Djurdjevic in sod. 2003), pri čemer se je za koristno izkazalo celo gnojenje s fosforjem (Sottocornola in sod., 2007).

Določen del šote se med obnovo šotišč v anoksičnih razmerah mineralizira, kar se kaže v povišanih koncentracijah DOC, vendar se na račun naraščanja koncentracij huminskih kislin v raztopljeni organski snovi (Glatzel in sod., 2003) produkcija CO<sub>2</sub> (mineralizacija DOC) sčasoma preneha (Goldhammer in Blodau, 2008). V potopljenih šotnih tleh se je akumuliral acetat, prihajalo je do anoksične respiracije s sulfatom in z zamikom še do metanogeneze, vendar sta ta dva procesa pokrila le 5 – 22 % produkcije CO<sub>2</sub>, kar kaže na prisotnost mnogih alternativnih in nepoznanih anaerobnih poti v šotnih tleh (Goldhammer in Blodau, 2008).

Nivo podtalnice in pH šotišč sta vplivala na spremembe populacij tako eukariontskih kot prokariontskih organizmov, pri čemer se je glivna populacija znižala, populacija črvov, skakačev, praživali in bakterij pa povišala ob dvignjenem nivoju podtalnice v obnovljenem šotišču (van Dijk in sod., 2009). Na dvignjenih barjih se je pestrost rastlinja v času od začetka obnavljanja povišala, struktura združbe hroščev (Watts in sod., 2008) in metuljev (Butovsky in sod., 2004) pa je postajala vedno bolj podobna nativnim združbam teh ekosistemov.

### 2.1.4 Povezava med ogljikovim in dušikovim ciklom

Produktivnost ekosistemov ni odvisna le od ogljika, ampak je v tesni povezavi z dostopnostjo ostalih esencialnih nutrientov – dušika (N), fosforja (P), kisika (O) in žvepla (S). Ti elementi so ključni gradniki bioloških molekul in vzdržujejo tako avtotrofno primarno produkcijo, kot heterotrofno sekundarno produkcijo. Z izjemo dušika, ki je

pretežno zastopan v obliki težko dostopnega molekularnega dušika ( $N_2$ ) v atmosferi, so ostali elementi živim organizmom razpoložljivi v globalnih rezervoarjih (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Madigan in sod., 2003; Bottomley in Myrold, 2007; Horwath, 2007; Robertson in Groffman, 2007).

V rastlinsko biomaso so poleg ogljika vgrajeni tudi drugi elementi, ki se med heterotrofno razgradnjo (sekundarno produkcijo) mineralizirajo. Večina rastlinskega materiala vsebuje polimere ogljika, največ virov dušika pa se nahaja v proteinih citoplazme. Izvencelične peptidaze in proteaze razgradijo proteine do aminokislin. Slednje so labilen vir dušika v ekosistemu, ki ga mikroorganizmi potrebujejo za vgradnjo v lastne proteine, nukleinske kisline in ostale celične sestavine (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Madigan in sod., 2003; Bottomley in Myrold, 2007; Horwath, 2007; Robertson in Groffman, 2007).

Ker je dušik v talnih ekosistemih navadno limitni nutrient, je razgradnja organske snovi predvsem odvisna od razmerja med ogljikom in dušikom (C : N) v substratih. V substratih z nizkim C : N je dušika več, kot ga mikroorganizmi potrebujejo za lastni obstoj, zato ga v obliki amonija sproščajo v okolico (mineralizacija dušika). V substratih z visokim C : N pa je dušika premalo za popolno razgradnjo, zato bodo mikrobi poskušali pridobiti mineralni dušik iz okolice (imobilizacija dušika) (Robertson in Groffman, 2007). Gnojenje organskih tal z mineralnim dušikom zniža razmerje C : N, rastline pa v povprečju privzamejo le 50 % dodanega dušika (Galloway in Cowling, 2002), zato lahko pride do dodatne razgradnje talne organske snovi (Robertson in Groffman, 2007), kar je poleg izsuševanja dodaten škodljiv aspekt uporabe šotnih tal v kmetijske namene.

## 2.2 DUŠIKOV CIKEL

Dušik v tleh je lahko organski ali anorganski. Anorganske oblike dušika so molekularni dušik ( $N_2$ ), amoniak/amonij ( $NH_3/NH_4^+$ ), nitrit ( $NO_2^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ), dušikov oksid (NO) in dušikov oksidul ( $N_2O$ ). Organski dušik je vgrajen v proteine, nukleinske kisline in amino sladkorje biomase. Urea je oblika dušika, ki jo izločajo živali in ljudje (Robertson in Groffman, 2007). V nativnih mokriščih je največ dušika v organski snovi. Dušik je navadno limiten, zato se po mineralizaciji organske snovi hitro vgradi v živo rastlinsko in mikrobnno biomaso in so koncentracije mineralnega dušika v tleh nizke (Reddy in DeLaune, 2008).

### 2.2.1 Biološko kroženje dušika v tleh

Globalno kroženje dušika (N) na Zemlji v grobem poteka z biološko fiksacijo, mineralizacijo, nitrifikacijo in denitrifikacijo. Fiksacija dušika prenese atmosferski  $N_2$  v biosfero, z amonifikacijo se organski N pretvori v mineralni amonij ( $NH_4^+$ ), z nitrifikacijo

se mineralne oblike dušika iz  $\text{NH}_4^+$  pretvarjajo do nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) in nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ). Denitrifikacija reducira  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2^-$  v plinaste oblike ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  in  $\text{N}_2$ ), ki vstopajo nazaj v atmosfero. Če ne bi bilo denitrifikacije, bi se iz atmosfere sčasoma fiksiral ves  $\text{N}_2$  (Bottomley in Myrold, 2007). Znotraj biosfere poteka interni dušikov cikel, ki je sestavljen iz hkratne mineralizacije organskega dušika in asimilacije mineralnega dušika (Robertson in Groffman, 2007).

#### 2.2.1.1 Fiksacija dušika

*Fiksacija dušika* je redukcija atmosferskega  $\text{N}_2$  v  $\text{NH}_4^+$ . Fiksacijo N vršijo bakterije in arheje z aktivnim encimskim kompleksom, ki se imenuje nitrogenaza. Nitrogenaza je občutljiva za kisik, zato fiksacija  $\text{N}_2$  poteka v striktno anoksičnih pogojih, kot so cone v okolici korenin, na meji oksično/anoksično poplavljenih tal in v anoksičnih tleh mokrišč. Za prekinitev trojne vezi v molekuli  $\text{N}_2$  je potrebno veliko energije, zato je večina prostoživečih fiksatorjev  $\text{N}_2$  fototrofnih ali pa živijo v simbiozi s fototrofnimi rastlinami (Bottomley in Myrold, 2007).

#### 2.2.1.2 Amonifikacija in imobilizacija dušika

*Amonifikacija* je biološka pretvorba organskega dušika v  $\text{NH}_4^+$  med razgradnjo organske snovi in je prvi korak pri mineralizaciji organskega N. Amonifikacija v anoksičnih razmerah je zaradi upočasnjene razgradnje organske snovi počasnejša kot v oksičnih razmerah. *Imobilizacija* dušika je vgradnja mineraliziranega amonija v mikrobno in rastlinsko biomaso. O poteku imobilizacije mineralnega N v tleh odloča razmerje C : N v organski snovi, ki se razgrajuje (Atlas in Bartha, 1993; Paul in Clark, 1996; Bottomley in Myrold, 2007; Robertson in Groffman, 2007).

#### 2.2.1.3 Nitrifikacija

*Nitrifikacija* je biološka oksidacija amoniaka ( $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$ ) v nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), ki poteka v oksičnih razmerah. Nitrifikacija poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji se  $\text{NH}_3$  oksidira v  $\text{NO}_2^-$ , v drugi stopnji pa  $\text{NO}_2^-$  v  $\text{NO}_3^-$ . Prvo stopnjo nitrifikacije vršijo kemoavtotrofne bakterije, ki amonij uporabijo kot vir elektronov za respiracijo s kisikom, organsko snov pa v obliki  $\text{CO}_2$  fiksirajo iz atmosfere (Prosser, 1989).

Pionir mikrobiologije, dr. Sergei Nikolaievich Winogradsky, je do leta 1893 izoliral in poimenoval prve rodove bakterij, ki avtotrofno oksidirajo amonij (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* in *Nitrosovibrio*) (Atlas in Bartha, 1993) in so bili z izjemo rodu *Nitrosococcus* (Gamaproteobakterije) vsi uvrščeni med Betaproteobakterije (Purkhold in sod., 2000). Kasneje so bili iz tal izolirani tudi

heterotrofni nitrifikatorji (Nishio in sod., 1998; Brierley in Wood, 2001), vendar je avtotrofna nitrifikacija v tleh prevladujoča (Islam in sod., 2007). Poleg amonij oksidirajočih bakterij (AOB) so pred kratkim v morskih sedimentih odkrili arheje, ki oksidirajo amonij (AOA) (Francis in sod., 2005). V širokem spektru različnih tal je bilo število AOA višje od AOB (Leininger in sod., 2006), kar je bilo ugotovljeno tudi v tleh Ljubljanskega barja (Höfferle in sod., 2010) in kaže, da AOA z edinstvenimi mehanizmi nitrifikacije in avtotrofije signifikantno sodelujejo pri kroženju ogljika in dušika v morskih in kopenskih ekosistemih (Walker in sod., 2010).

Bakterije, ki oksidirajo nitrit (NOB), so na splošno bolj raznolike od AOB in spadajo v razrede Proteobakterij (Alfa/Gama/Deltaproteobakterije) in Nitrospir, vendar so z modernimi molekularnimi tehnikami v tleh uspeli odkriti le dva pomembna rodova, *Nitrobacter* in *Nitrospira* (Freitag in sod., 2005).

#### 2.2.1.3.1 Vpliv okoljskih dejavnikov na nitrifikacijo

O tem, ali bo v tleh nitrifikacija tekla, odloča predvsem dostopnost amonija. Če so tla limitirana z dušikom, potem se bo mineraliziran  $\text{NH}_4^+$  imobiliziral v biomaso in nitrifikacija ne bo tekla. Prav tako imajo rastline navadno višjo afiniteto do mineralnega  $\text{NH}_4^+$  kot bakterije. Torej do nitrifikacije pride le ob presežnih koncentracijah mineralnega  $\text{NH}_4^+$  v tleh, ki so posledica intenzivne mineralizacije organske snovi, ali pa gnojenja z dušikovimi gnojili (Robertson, 1982).

Nitrifikacija poteka v striktno oksičnih pogojih (Prosser, 1989), zato je v potopljenih tleh močno inhibirana (Linn in Doran, 1984). V mokriščih nitrifikacija teče v oksičnih predelih okoli rastlinskih korenin ali pa na meji tla/podtalna voda, kjer se v približno 2 mm debelem sloju tal vzpostavi optimalna vsebnost vode in kisika za nitrifikacijo (Brune in sod., 2000; Kristensen, 2000).

Nitrifikacija optimalno poteka pri nevtralnem pH 7 – 8 (Prosser, 1989), kasneje pa so bili odkriti mehanizmi, ki omogočajo nitrifikacijo v kisljih tleh (De Boer in Kowalchuk, 2001). Hitrost nitrifikacije je sicer odvisna od temperature (Dalias in sod., 2002), vendar nitrifikacija lahko teče celo v zmrznjenih tleh (Clark in sod., 2009).

#### 2.2.1.4 Denitrifikacija

*Denitrifikacija* je uplinjevanje raztopljenega nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) in nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) preko dušikovega monoksida (NO) v plinasta dušikov oksidul ( $\text{N}_2\text{O}$ ) in molekularni dušik ( $\text{N}_2$ ) (Knowles, 1982). Mikrobiologi pod pojmom denitrifikacija razumemo predvsem disimilativno redukcijo nitrata v dušikove pline, ki jo vršijo respiratorni denitrifikatorji (Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995). Ta proces je mikrobna respiracija, pri kateri se

elektroni med razgradnjo organske snovi prenašajo na sprejemnike elektronov v naslednjem vrstnem redu:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  (Madigan in sod., 2003). Ker je nitrat energetsko manj ugoden sprejemnik elektronov od kisika, denitrifikacija poteka v anoksičnih razmerah (Linn in Doran, 1984).

Denitrifikatorji so tako fiziološko kot taksonomsko zelo raznoliki. Obstajajo heterotrofni, kemoavtotrofni in fotoavtotrofni denitrifikatorji, ki so lahko tudi fiksatorji dušika, termofili, halofili in patogeni. Identificiranih je bilo več kot 50 rodov in več kot 125 vrst denitrifikatorjev (Zumft, 1997). Za tla so značilni heterotrofni fakultativno anaerobni denitrifikatorji iz rodov *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Agribacterium* in *Flavibacterium* (Tiedje, 1994; Robertson in Groffman, 2007).

#### 2.2.1.4.1 Vpliv okoljskih dejavnikov na denitrifikacijo

Denitrifikacija poteka v anoksičnih okoljih. Ta okolja se v večji meri vzpostavijo v potopljenih tleh (mokrišča), v manjši meri pa se anoksične cone vzpostavijo v talnih agregatih, celo v dobro aeriranih tleh (Wrage in sod., 2001). Talni agregati v premeru merijo manj kot 2 mm in so skupek mineralov in ostankov organske snovi, ki jih povezujejo polisaharidi biološkega izvora (Paul in Clark, 1996). Ti agregati so obkroženi s tankim slojem vode, ki ovira izmenjavo plinov. Zaradi visoke mikrobne aktivnosti je poraba kisika v okolici talnih agregatov hitrejša od same difuzije v notranjost agregatov, kjer so posledično vzpostavljene stalne anoksične razmere (Sexstone in sod., 1985). Denitrifikacija postane signifikantna pri 60 % WFPS (z vodo napolnjena prostornina por – water filled pore space) (Linn in Doran, 1984).

Poleg anoksičnih razmer morata za denitrifikacijo biti zagotovljena še nitrat in nitrit, ki sta alternativna sprejemnika elektronov za anoksično respiracijo denitrifikatorjev (Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995). Kljub temu, da obstajajo kemolitotrofni in fotolitotrofni denitrifikatorji, je denitrifikacija v tleh predvsem heterotrofna, zato mora biti razpoložljiv tudi vir organskega ogljika (Paul in Clark, 1996).

Nitrat se v tleh kopiči z nitrifikacijo, ki poteka v oksičnih razmerah (Prosser, 1989). V stalno potopljenih tleh mokrišč in riževih polj je dostopnost kisika nizka, zato je navadno nitrat limitni dejavnik denitrifikacije. Če v določenem sloju tal obstaja z nivojem podtalnice določena meja oksično/anoksično, nitrati pronicajo iz površinskih oksičnih slojev tal v anoksične sloje tal, kjer poteče denitrifikacija. V takih razmerah pogosto postane limiten ogljik (Knowles, 1982; Atlas in Bartha, 1993; Tiedje, 1994; Paul in Clark, 1996; Galloway in Cowling, 2002; Madigan in sod., 2003; Robertson in Groffman, 2007; Reddy in DeLaune, 2008).

Kadar se oksične in anoksične razmere periodično izmenjujejo zaradi nihanja nivoja podtalne vode po močnih deževjih in občasnih poplavah, je denitrifikacija stimulirana

(Tiedje, 1994; Paul in Clark, 1996). Oksična nitrifikacija in mineralizacija zagotavljata tako vir organske snovi, kot vir nitrata za anoksično heterotrofno denitrifikacijo (Wrage in sod., 2001). Kvaliteta vira ogljika igra pomembno vlogo še posebej pri nizkih temperaturah, ki inhibirajo denitrifikacijo (Lewandoswki, 1982; Nedwell, 1999; Martin in sod., 2009).

#### 2.2.1.5 Ostali procesi, vključeni v kroženje dušika

*Disimilativna redukcija nitrata do amonija* (DNRA) poteka v anoksičnih razmerah in jo vršijo obligatni anaerobi kot sta *Clostridium* in *Streptococcus* za pridobivanje energije (Tiedje, 1994; Reddy in DeLaune, 2008).

*Asimilativna redukcija nitrata do amonija* (ANRA) je oksičen in anoksičen proces in vključuje redukcijo nitrata v amino skupine, ki postanejo del celičnih sestavin. ANRA je značilna za mikroorganizme in večino rastlin (Tiedje, 1994; Reddy in DeLaune, 2008).

*Nerespiratorna denitrifikacija* poteka z različnimi bakterijami in glivami, ki asimilirajo nitrat in v glavnem proizvajajo  $N_2O$  v aerobnih in anaerobnih razmerah, pri tem pa, za razliko od respiratorne denitrifikacije, ne pridobivajo energije za celično rast (Tiedje, 1994; Robertson in Groffman, 2007).

*Anaerobna oksidacija amonija* (*anammox*) je bila prvič odkrita v bioreaktorjih čistilnih naprav (Mulder in sod., 1995) in je reakcija amonija ( $NH_4^+$ ) in nitrita ( $NO_2^-$ ) v molekularni dušik ( $N_2$ ). Proces poteka s specializirano skupino anaerobnih mikroorganizmov, ki so prisotni tudi v tleh (Humbert in sod., 2009), vendar sam proces v tleh ni signifikanten (Prosser, 2007).

*Kemodenitrifikacija* poteka v kisljih tleh ( $pH \leq 5$ ), ko  $NO_2^-$  kemično reagira v NO. Pri kemodenitrifikaciji v manjši meri nastajata še  $N_2O$  in  $N_2$ .  $NO_3^-$  lahko oksidira organski dušik, pri čemer nastaja  $N_2$ . Reakcija bi lahko bila pomemben vir atmosferskega NO med taljenjem zamrznjenih tal in vlaženjem suhih tal (Tiedje, 1994; Paul in Clark, 1996; Russow in sod., 2000; Robertson in Groffman, 2007; Russow in sod., 2009).

*Volatilizacija amoniaka* je fizikalno-kemijski proces, ki poteka predvsem v alkalnih tleh ( $pH > 7.5$ ), ko je ravnotežje med raztopljenim  $NH_4^+$  in plinastim  $NH_3$  močno pomaknjeno v smer  $NH_3$ , ki lahko prosto volatilizira iz tal (Reddy in DeLaune, 2008). Opredelitev volatilizacije  $NH_3$  v tleh je pomembna za kmetijstvo, saj lahko predstavlja velik del izgub mineralnega dušika iz tal po aplikaciji dušikovih gnojil (Berge in sod., 2005).

## 2.2.2 Vpliv človeka na globalno kroženje dušika

Z vpeljavo kemijskega procesa Haber-Bosch, ki omogoča umetno fiksacijo dušika, se je v preteklem stoletju začela proizvodnja umetnih dušikovih gnojil, ki so izboljšala kmetijsko izrabo tal in povečala proizvodnjo hrane na svetu. Od vpeljave Haber-Bosch procesa do danes je svetovna populacija eksponentno narasla, prav tako pa tudi količine reaktivnega dušika (Nr) na Zemlji (Galloway in sod., 2003).

Naše okolje je poleg omenjenega Nr iz proizvodnje hrane dodatno obremenjeno še z dušikom, ki se sprošča v atmosfero ob kurjenju fosilnih goriv. V 1990-ih so antropogeni viri Nr predstavljali več kot 160 teragramov (Tg) N letno, kar pomeni, da je na globalni ravni vnos antropogenega Nr 11-krat višji od naravnega vnosa z biološko fiksacijo (15 Tg N letno). Kar 85 % antropogenega dušika se porabi za proizvodnjo umetnih gnojil, posledično so se hitrosti kroženja dušika znotraj biosfere podvojile. 50 % dodanega mineralnega dušika sprejme rastlinska biomasa, preostalih 50 % reaktivnega dušika pa je podvrženo volatilizaciji amoniaka, kemodenitrifikaciji in mikrobnim procesom v tleh (Galloway in Cowling, 2002; Galloway in sod., 2003). Antropogeni vnos je povišal obseg in podvojil hitrosti kroženja dušika. Zaradi znižanega razmerja C : N prihaja do stimulacije mineralizacije organskega ogljika v tleh, zato je globalni dušikov cikel po antropogenih posegih pričel poganjati ogljikovega (Gruber in Galloway, 2008).

Presežne količine dušika v tleh povzročajo vrsto ekoloških problemov, saj se odvečni mineralni dušik spira v podtalne vode, te pa se iztekajo v reke, jezera in oceane. Z nitrifikacijo nastanejo nitrati, ki skupaj s toksičnimi nitriti (Gelfand in Yakir, 2008) povzročajo evtrofikacijo, omejeno dostopnost kisika, znižanje diverzitete in posledično uničenje sladkovodnih in priobalnih ekosistemov (Vitousek in sod., 1997; Rabalais, 2002). Zato je denitrifikacija v tleh, ki presežke dušika vrača v atmosfero, ključni mehanizem za preprečevanje onesnaženja podtalnih voda (Tiedje, 1994).

Denitrifikacija, ki ima sicer omenjene pozitivne učinke, prispeva k povišanju koncentracij  $N_2O$  v atmosferi (Mosier in sod., 1998).  $N_2O$  je toplogredni plin z razpolovno dobo 114 let in 298-krat močnejšim toplogrednim učinkom od ogljikovega dioksida ( $CO_2$ ) ter 12-krat močnejšim od metana ( $CH_4$ ) (Forster s sod., 2007). V tleh le določen delež mineralnega dušika ( $NO_3^-$  in  $NO_2^-$ ) reducira do  $N_2$ , preostanek pa iz zemlje izhaja kot emisija toplogrednega  $N_2O$  (Abbasi in Adams, 2000; Mathieu in sod., 2006; Ruser in sod., 2006; Carter, 2007). Tudi nitrifikacija delno prispeva k emisijam  $N_2O$  (Russow in sod., 2000; Wrage in sod., 2001; Wrage in sod., 2004; Russow in sod., 2009).

## 2.3 ŠOTNA TLA LJUBLJANSKEGA BARJA

Ljubljansko barje leži v Ljubljanski kotlini, ki je na eni strani omejena s predalpskim svetom, na drugi pa s kraškimi svetom. Količina padavin na Ljubljanskem barju niha med 75 in 150 mm mesečno, temperatura zraka pa se giblje med - 3 °C in 5 °C pozimi ter med 18 °C in 24 °C poleti (Izbrani met ... , 2004). Za tla Ljubljanskega barja so značilne visoke vsebnosti vode (90 % WHC) pozimi in nizke (45 % WHC) poleti (Stres in sod., 2008), temperatura zgornjega sloja tal je med - 1 °C in 6 °C pozimi ter 17 °C in 24 °C poleti (Danevčič in sod., 2010). Z globino se vpliv zunanjih sezonskih temperaturnih fluktuacij niža in temperatura na globini 90 cm niha med 6 °C in 18 °C, nivo podtalnice pa v rednih intervalih, tudi po večkrat mesečno, niha na globinah med 14 cm in 46 cm (Repič, 2009).

### 2.3.1 Renaturacija Ljubljanskega barja

Krajinski park Ljubljansko barje je področje visoke naravne in kulturne dediščine (Tome in sod., 2000) in spada med zaščitena območja Natura 2000 (Simoneti in sod., 2007). V preteklosti je bilo Ljubljansko barje izsuševano v namene kmetijstva. Zaradi spusta nivoja podtalnice so vrhnji sloji tal postali prezračeni in so se sčasoma začeli mineralizirati. Zato v gornjem sloju tal Ljubljanskega barja ne najdemo več prave šote (Melik, 1927; Premelč, 2006), vendar imajo tla kljub temu še vedno visoko vsebnost organskega ogljika (Hacin in sod., 2001).

V naši prejšnji študiji smo ugotavljali, kako bi renaturacija Ljubljanskega barja (dvig podtalnice na naravni nivo) vplivala na aktivnost in število nitrifikacijskih (Resman, 2007) in denitrifikacijskih (Pal, 2007) mikroorganizmov ter strukturo mikrobnih združb (Stres in sod., 2008). Ugotovili smo, da je spreminjanje okoljskih dejavnikov (temperature in vsebnosti vode) vplivalo predvsem na nitrifikacijske potenciale v tleh (Resman, 2007), medtem ko so denitrifikacijski potenciali ostajali nespremenjeni (Pal, 2007). Število nitrifikacijskih in denitrifikacijskih mikroorganizmov pa se ni spremenilo kljub daljši izpostavljenosti nizkim (oksično) ali visokim (anoksično) vsebnostim vode v tleh in mikrobne združbe so po 12. tednih inkubacij v različnih pogojih ostale nespremenjene (Stres in sod., 2008).

V stalno potopljenih tleh se je ves nitrat porabil, posledično se je prenehala produkcija toplogrednega N<sub>2</sub>O, tla pa so po 7. tednih pričela proizvajati metan (CH<sub>4</sub>) (Jerman in sod., 2009), kar je značilno za mokrišča (Prentice in sod., 2001). Pri visokih temperaturah so se emisije CO<sub>2</sub> prenehale po 12. tednih inkubacije ne glede na vsebnost vode (Stres in sod., 2008), kar je nakazalo določeno omejenost rezervoarja dostopnega organskega ogljika v tleh, inkubiranih pri konstantnih pogojih.

Naselja na Ljubljanskem barju so kljub mreži izsuševalnih jarkov in regulaciji nivoja reke Ljubljanice še vedno poplavno ogrožena, o čemer pričajo tudi nedavne poplave v širši

okolici Ljubljane (Hladnik-Milharčič, 2010). Pred izsuševanjem Ljubljanskega barja so bile take poplave pogostejše in obsežnejše (Melik, 1927), zato ideja o renaturaciji Ljubljanskega barja z dvigom podtalnice ne pride v upoštevanje.

### 2.3.2 Šota in čiščenje odpadnih voda

Šota je primerna za čiščenje odpadnih voda (Damman, 1988). Obstajajo šotni filtri z vertikalnim (VF – vertical flow) ali horizontalnim (HF – horizontal flow) pretokom (Corley in sod., 2006; Kõiv in sod., 2009), lahko pa se šota nahaja v bioreaktorjih s šotno posteljico (Heavey, 2003). Možno je tudi čiščenje v naravi, ko se odpadno vodo nanaša direktno na površino mokrišč (Klřve, 2001; Healy in sod., 2007). Šota je zaradi visoke kationske izmenjevalne kapacitete uporabna tudi pri odstranjevanju kovin iz odpadnih voda (Brown in sod., 2000; Ringqvist in sod., 2002; Kalmykova in sod., 2009).

Čiščenje odpadnih voda z uporabo šote je lahko tudi nestabilno (Hu in Gagnon, 2006; Healy in sod., 2007). Vertikalni pretoki omogočajo oksidacijo amonija, problematična pa je denitrifikacija. Pri sistemih s horizontalnim pretokom so pogoji za denitrifikacijo ugodni, oksidacija amonija pa je omejena (Vymazal, 2007). Omenjeni sistemi ne morejo vzdrževati oksičnih in anoksičnih razmer hkrati, zato je za popolno odstranjevanje dušika primernejše kombinirati oksične in anoksične sisteme (Vymazal, 2007). Dobro aerirani reaktorji s šotnimi posteljcami so učinkovito oksidirali amonij, nastali nitrat pa se v anoksični koloni ni denitrificiral (Heavey, 2003). Anoksični sistemi za denitrifikacijo sčasoma postanejo nefunkcionalni zaradi pomanjkanja dostopnega vira ogljika (Heavey, 2003; Ambus in sod., 2007; Dodla in sod., 2008; Gibert in sod., 2008; Martin in sod., 2009).

Nihanje nivoja podtalnice v odvisnosti od padavin na Ljubljanskem barju se, zaradi mreže izsuševalnih jarkov, večino leta odvija pod površjem tal (Repič, 2009). Posledično se v teh slojih tal izmenjujejo oksične in anoksične razmere (Linn in Doran, 1984; Brune in sod., 2000; Kristensen, 2000). V oksičnih razmerah se del organske snovi razgradi v mikrobom dostopne oblike, ki lahko v anoksičnih razmerah predstavljajo vir organskega ogljika za denitrifikacijo (Knowles, 1982; Tiedje, 1994; Paul in Clark, 1996; Horwath, 2007; Robertson in Groffman, 2007).

Glede na prebrano literaturo smo v tezah tega doktorskega dela predpostavili, da bi periodično izmenjevanje oksičnih in anoksičnih razmer v tleh Ljubljanskega barja omogočalo uspešno odstranjevanje dodanega mineralnega dušika v odsotnosti zunanega vira ogljika. Optimalne hitrosti odstranjevanja mineralnega dušika (Saad in Conrad, 1993) smo ugotavljali pri 28 °C, minimalne hitrosti pa pri 4 °C (Stres in sod., 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE

V nadaljevanju je opisana izvedba eksperimentov, ki so se začeli najprej z opredelitvijo potencialnih mikrobnih aktivnosti v naravi – na eksperimentalnem polju – ter se nato nadaljevali s tremi laboratorijskimi inkubacijskimi eksperimenti v mikrokozmih, ki so vključevali opredelitev vplivov fizikalno-kemijskih in bioloških dejavnikov na mikrobnе procese kroženja dušika. Dobljeni rezultati so tako omogočili opredelitev primernosti uporabe preučevanih tal za čiščenje z mineralnim dušikom bogatih odpadnih voda.

#### 3.1 VZORČENJE TAL NA EKSPERIMENTALNEM POLJU NA LJUBLJANSKEM BARJU

Eksperimentalno polje v Podkraju pri Tomišlju na Ljubljanskem barju (45°58'S in 14°28'Z) je travnik s šotnimi tlemi, ki so zaradi izsuševanja Ljubljanskega barja delno razgrajena (Hacin in sod., 2001). Tako kot nivo podtalnice tudi vsebnost organskega ogljika narašča z oddaljenostjo od drenažnega jarka in tla eksperimentalnega polja se v grobem delijo na tla LC (low carbon) in tla HC (high carbon). Predel HC vsebuje mesto, ki je že 38 let točkasto onesnaženo z gospodinjskimi odplakami (Höfferle in sod., 2010) in vsebuje povišane koncentracije amonija (HA – high ammonium).

Tla LC (Humic gleysoil) na globinah 0 - 90 cm vsebujejo 90 -120 mg  $C_{org} g^{-1}_{st}$  (9 - 12 %) organskega ogljika in 4 - 7 mg  $N_{org} g^{-1}_{st}$  (0,4 - 0,7 %) organskega dušika in imajo nižji nivo podtalne vode (70 - 120 cm), ker so bližje drenažnemu jarku. Tla HC (Histosol) imajo višji nivo podtalne vode (10 - 60 cm) in imajo na globinah 0 - 90 cm višjo vsebnost organskega ogljika (160 - 240 mg  $C_{org} g^{-1}_{st}$  = 16 - 24 %) in organskega dušika (8 - 15 mg  $N_{org} g^{-1}_{st}$  = 0,8 - 1,5 %) (Hacin in sod., 2001).

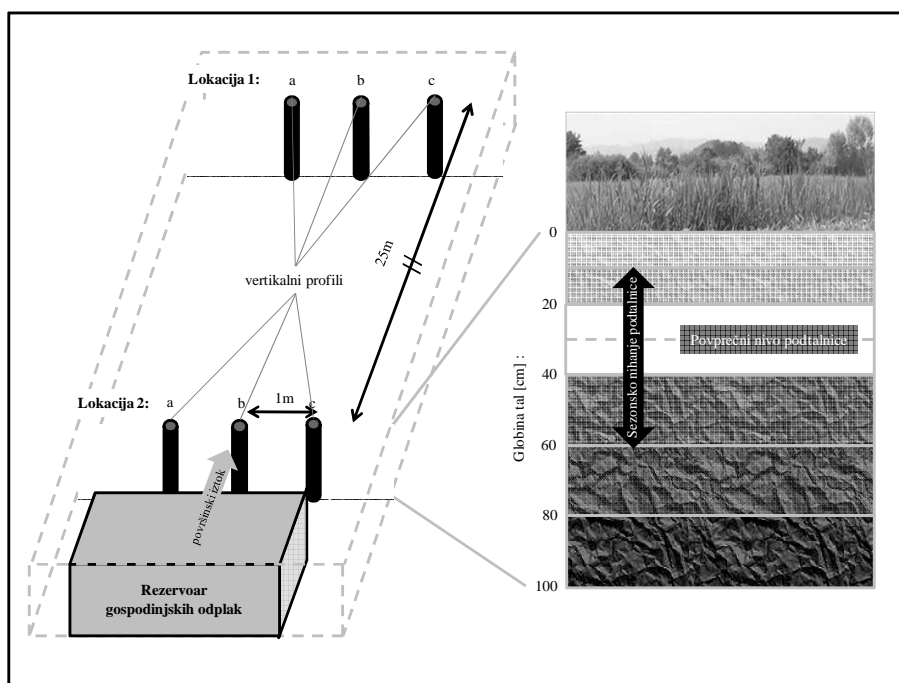
Podzemni rezervoar gospodinjstva (n = 2 osebi), ki stoji na predelu HC eksperimentalnega polja, je tik nad površino tal preluknjan in predstavlja vir točkastega onesnaženja (HA – high ammonium) z gospodinjskimi odpadnimi vodami. Na globinah 40 - 100 cm mesta HA so koncentracije amonija narastle iz 12 na 220  $\mu g NH_4^+ - N g^{-1}_{st}$ , medtem ko so koncentracije nitrata znašale 0 - 60  $\mu g NO_3^- - N g^{-1}_{st}$ . Neonesnaženo mesto LA (low ammonium) je bilo 25 m oddaljeno od HA in je vsebovalo 0 - 14  $\mu g NH_4^+ - N g^{-1}_{st}$  in 0 - 4  $\mu g NO_3^- - N g^{-1}_{st}$  (Höfferle in sod., 2010).

##### 3.1.1 Vzorčenje vertikalnih profilov tal za analize denitrifikacijske encimske aktivnosti (DEA) in najbolj verjetnega števila denitrifikatorjev (MPN)

Za ugotavljanje prostorske variabilnosti in vpliva onesnaženosti z gospodinjskimi odplakami na potencialne denitrifikacijske aktivnosti in število denitrifikatorjev v naravi sta bili na medsebojni razdalji 25 m izbrani dve lokaciji vzorčenja (lokacija 1 in

lokacija 2). Lokacija 1 je bila na neonesnaženem delu eksperimentalnega polja (LA), lokacija 2 pa na mestu točkastega onesnaženja tal z gospodinjskimi odpadki (HA). Lokacija 2 je bila 1 m oddaljena od rezervoarja, iz katerega so na površino tal pronicale gospodinjske odplake (Slika 1).

Znotraj lokacije 1 in lokacije 2 so bili ločeno odvzeti po trije vertikalni profili, medsebojno oddaljeni po 1 m (mikrolokacije 1a, 1b, 1c in 2a, 2b, 2c). Vertikalni profili so bili odvzeti na globinah 0 - 10 cm, 10 - 20 cm, 20 - 40 cm, 40 - 60 cm, 60 - 80 cm in 80 - 100 cm na vsaki izmed šestih mikrolokacij. Vzorčene sredice posameznih globin s premerom 5 cm so bile homogenizirane v laboratoriju. Odstranjena je bila s prostim očesom vidna biomasa in tla so bila presejana skozi sito s porami premera 8 mm. Analiza DEA vseh vzorcev tal je trajala 4 dni, v tem obdobju pa so bila tla shranjena v plastičnih vrečkah pri 4 °C.

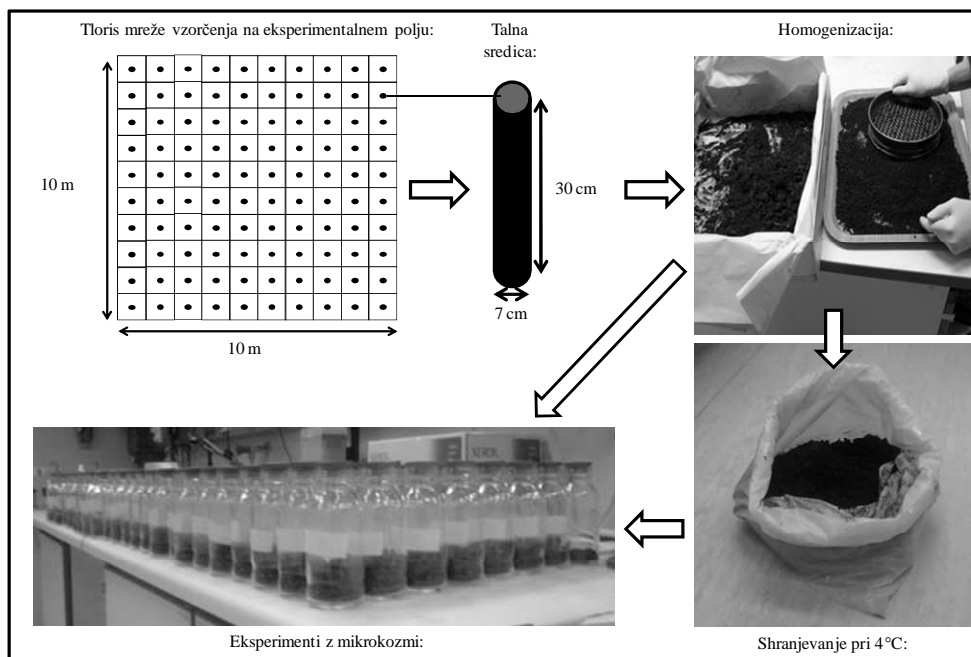


Slika 1. Shema vzorčenja vertikalnih profilov tal na neonesnaženi in točkasto onesnaženi lokaciji  
Figure 1. Soil vertical profile (vertikalni profili) sampling scheme of unpolluted (Lokacija 1) and point polluted (Lokacija 2) sites (rezervoar gospodinjskih odpadkov = domestic sewage tank, povprečni nivo podtalnice = average groundwater level, globina tal = soil depth, sezonsko nihanje podtalnice = area of annual groundwater fluctuations).

### 3.1.2 Vzorčenje zgornjega sloja tal globine 0 - 30 cm za eksperimente v mikrokozmih

Na neonesnaženem delu eksperimentalnega polja smo vzorčili z organsko snovjo bogatejša tla HC. Površina vzorčenja (100 m<sup>2</sup>) je bila kvadratna, s stranico 10 m. V mreži 10 m x 10 m, smo odvzeli 100 sredic, dolžine 30 cm, s premerom 7 cm (Slika 2) in z ohranjeno vertikalno strukturo tal ter vso vegetacijo.

Homogenizacija tal je potekala v laboratoriju. Korenine in ostanke žive, s prostim očesom vidne, rastlinske in živalske biomase, smo iz tal odstranjevali pred in med sejanjem s sitom z 8 mm porami. Vsa presejana tla smo dobro premešali med seboj, da smo dobili homogeno maso tal, ki smo jo shranili pri 4 °C v nezatesnjenih plastičnih vrečkah (Slika 2).



Slika 2. Shema vzorčenja, homogenizacije in shranjevanja tal za eksperimente v mikrokozmi  
Figure 2. The sheme of sampling, homogenization and storage of soil for microcosm experiments

### 3.1.3 Ugotavljanje vsebnosti vode in kapacitete za zadrževanje vode v tleh takoj po vzorčenju

Del analiz tal takoj po vzorčenju se je nanašal predvsem na abiotske dejavnike, kot sta vsebnost vode v tleh in kapaciteta tal za zadrževanje vode v tleh, ki sta zelo pomembni karakteristiki. Vsebnost vode v tleh je nujno potrebno določiti svežim vzorcem tal, saj lahko rezultate eksperimentov, pridobljene iz tal različnih vsebnosti vode med seboj primerjamo le, če so izraženi na gravimetrično enoto suhih tal, ali pa morajo biti izraženi na volumetrično enoto tal. Podatka o začetni gravimetrični vsebnosti vode (VL - vlažnost) ter kapaciteti tal za zadrževanje vode (WHC – water holding capacity) v tleh sta bila potrebna za nastavitev in kontrolo želene vsebnosti vode v mikrokozmi s tlemi (glej 3.3.1).

#### 3.1.3.1 Gravimetrična vsebnost vode v tleh

Gravimetrična vsebnost vode v tleh (VL) je mera, ki pove, koliko gramov vode ( $m_{H_2O}$ ) je v 1g suhih tal ( $m_{st}$ ). Ugotavljanje vsebnosti vode v tleh smo vedno izvedli vsaj v treh

ponovitvah. V suhe plastične tehtiče, ki smo jih prej stehtali ( $m_{teht}$ ), smo zatehtali točno 30 g tal. Nato smo tla s tehtiči sušili do konstantne teže pri 60 °C (tla so bogata z organsko snovjo, zato se sušenje pri višjih temperaturah odsvetuje). Posušena tla, skupaj s tehtiči, smo ponovno stehtali ( $m_{st+teht}$ ) in izračunali vsebnost vode v tleh.

Enačba oz. formula ... (1)

$$VL = \frac{m_{H_2O}}{m_{st}} = \frac{30 \text{ g} \cdot (m_{st+teht} - m_{teht})}{m_{st+teht} - m_{teht}}$$

(**VL** - gravimetrična vsebnost vode v tleh,  **$m_{H_2O}$**  – masa vode v tleh,  **$m_{st}$**  – masa suhih tal,  **$m_{teht}$**  – masa tehtiča,  **$m_{st+teht}$**  – masa suhih tal s tehtičem)  
- enačba velja, če pred sušenjem tal v tehtič dodamo točno 30 g tal

### 3.1.3.2 Kapaciteta tal za zadrževanje vode v tleh

Kapaciteta za zadrževanje vode v tleh (WHC) je največja masa vode, ki jo en gram tal lahko zadrži. WHC smo ovrednotili v šestih ponovitvah. V kovinske cilindre, s cedilom na dnu, smo pogrnili nekaj slojev papirnate brisače. Potem smo cilindre stehtali ( $m_c$ ). Nato smo dodali tla tako, da so segala 2 cm pod rob cilindra. Cilindre s cedilom, brisačo in tlemi smo čez noč namakali v posodi z destilirano vodo. Naslednji dan smo cilindre s tlemi, prepojenimi z vodo, odcejali. Odtekanje vode smo spremljali s tehtanjem vsakih 60 minut. Ko se je masa z vodo nasičenih tal v cilindru ustalila ( $m_{c+t+H_2O}$ ), smo tla v cilindrih posušili pri 60 °C in ugotovili maso cilindra s suhimi tlemi ( $m_{c+st}$ ).

WHC tal smo ovrednotili samo na začetku eksperimenta, vsebnost vode v tleh smo izmerili ob vsakokratni analizi vzorcev in jo izrazili v odstotnem deležu kapacitete za zadrževanje vode v tleh (% WHC).

Enačba oz. formula ... (2)

$$WHC = \frac{m_{maxH_2O}}{m_{st}} = \frac{m_{c+t+H_2O} - m_{c+st}}{m_{c+st} - m_c}, \% WHC = \frac{VL}{WHC} \cdot 100\%$$

( **$m_{maxH_2O}$**  – maksimalna masa vode, ki jo tla zadržijo,  **$m_{st}$**  – masa suhih tal,  **$m_c$**  – masa suhega cilindra z brisačo,  **$m_{c+t+H_2O}$**  – masa z vodo nasičenih tal skupaj s cilindrom,  **$m_{c+st}$**  – masa cilindra s suhimi tlemi, **VL** – vsebnost vode v tleh (enačba oz. formula 1), **% WHC** – delež vode glede na kapaciteto tal za zadrževanje vode)

## 3.2 ANALIZE POTENCIALNIH ENCIMSKIH AKTIVNOSTI IN ŠTEVILA DENITRIFIKATORJEV V VERTIKALNEM PROFILU TAL

V nadaljevanju so opisane metode analiz potencialnih denitrifikacijskih aktivnosti (DEA) ter najbolj verjetnega števila (MPN) denitrifikacijskih mikroorganizmov v vertikalnem, 1 m globokem profilu tal na eksperimentalnem polju na Ljubljanskem barju.

### 3.2.1 Ugotavljanje denitrifikacijske encimske aktivnosti (DEA) v vertikalnem profilu tal

DEA smo merili v talnem profilu na različnih globinah (glej 3.1.1 na str. 16). Meritve so bile vedno izvedene v treh bioloških ponovitvah (3 mikrolokacije) in vsaka od teh še v dveh tehničnih ponovitvah.

V posamezno, 150 ml sterilno stekleničko, smo prenesli 10 g tal z znano vsebnostjo vode in jih zalili s 40 ml sterilnega gojišča (5 mM glukoza, 5 mM nitrat, pH 6,5-6,8). Nato smo v stekleničkah vzpostavili anoksično atmosfero z 90 % v/v N<sub>2</sub> in 10 % v/v acetilena (glej 3.2.1.2 na str. 21).

Vse stekleničke s suspenzijo tal in anoksično atmosfero z acetilenom so se 90 min stresale pri 28 °C na 200 obr / min (stresalnik Tehtnica, tip: Vibromix 403 EVT). Med stresanjem smo v 30-minutnih intervalih z 1-ml injekcijsko brizgo in iglo vzorčili po 50 µl plinske faze in vsebino ročno nanašali na kolono plinskega kromatografa, s katerim smo ugotovili koncentracijo N<sub>2</sub>O v plinski fazi stekleničk. Način detekcije in izračun koncentracij N<sub>2</sub>O s plinsko kromatografijo je opisan v 3.3.3.5.2 na str.31).

Za ugotavljanje volumna plinske faze stekleničk smo ob koncu merjenja vsako stekleničko s tlemi skupaj s čepom in zamaškom stehtali ( $m_{\text{steklenička+tla}}$ ), dolili destilirano vodo do roba stekleničke, jo zaprli in spet stehtali ( $m_{\text{zalita steklenička}}$ ).

#### 3.2.1.1 Izračun DEA

DEA smo izračunali za vsako stekleničko posebej. Za vsako stekleničko smo potrebovali podatke o koncentraciji N<sub>2</sub>O [ppm] v plinski fazi ob časih 0, 30, 60 in 90 min, ki smo jih pridobili s plinsko kromatografijo. Iz teh podatkov smo z linearno regresijo ugotovili koeficient naklona premice (k) odvisnosti koncentracije N<sub>2</sub>O po času. Za opredelitev absolutne količine N<sub>2</sub>O, ki jo je posamezni vzorec proizvedel, smo potrebovali podatek o volumnu plinske faze ( $V_g$ ) stekleničke. Plin N<sub>2</sub>O se raztaplja v vodni fazi, zato smo potrebovali še podatek o volumnu vodne faze tal in gojišča ( $V_1$ ) ter Bunsenov koeficient raztapljanja N<sub>2</sub>O pri 28°C ( $\alpha_{28^\circ\text{C}}$ ). Podatek o masi suhih tal ( $m_{\text{st}}$ ) in volumnu vode v tleh ( $m_{\text{H}_2\text{O}}$ ) smo izračunali iz *enačbe oz. formule 1* za vsebnost vode v tleh (VL). DEA smo

izrazili kot maso dušika, ki se je pretvorila v  $N_2O$  v enem gramu suhih tal v eni uri ( $\mu g N_2O - N g^{-1}_{st} h^{-1}$ ).

Enačba oz. formula ... (3)

$$DEA = \frac{2 \cdot k \left[ \frac{ppm N_2O-N}{h} \right] \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha_{28^\circ C} \cdot V_l) [ml]}{m_{st} [g_{st}]} \cdot \left( \frac{P \cdot M}{R \cdot T} = \frac{101,3 \cdot 10^3 \left[ \frac{N}{m^2} \right] \cdot 14 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu g N_2O-N}{mol} \right]}{8,314 \left[ \frac{Nm}{mol K} \right] \cdot (273+28) [K]} \right) =$$

$$\frac{2 \cdot k \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + 0,508 \cdot V_l) [ml N_2O-N]}{m_{st} [g_{st}] [h]} \cdot \frac{14 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu g N_2O-N}{mol} \right]}{24704 \left[ \frac{ml}{mol} \right]} = DEA [\mu g N_2O - N g_{st}^{-1} h^{-1}]$$

- $k = \frac{\partial N_2O}{\partial t}$ ,  $1 mol N_2O = 2 mol N_2O - N \rightarrow 2k = \frac{\partial N_2O-N}{\partial t}$ ,
- $m_{st} = \frac{m_{tal}}{V_{L+1}} = \frac{10 g}{V_{L+1}} [g]$
- $V_g = m_{zalita steklenička} - m_{steklenička+tla} [ml]$
- $V_l = V_{gojišča} + m_{H_2O} = 40 ml + V_L \cdot m_{st} [ml]$
- $m_{H_2O}$  – masa vode v tleh
- $\alpha_{28^\circ C} = 0,508$
- 1 mol plina pri 28 °C zaseda 24704 ml (izračunano po plinski enačbi).

### 3.2.1.2 Postopek zamenjave oksične atmosfere z anoksično

Princip izmenjave atmosfere je analogen, tako v stekleničkah za meritve DEA, kot v mikrokozmih.

Stekleničke smo z gumijastimi čepi in aluminijastimi pokrovčki zaprli ter preko gumijastih čepov izmenjali atmosfero z  $N_2$ . Sistem za izmenjavo atmosfere ima mešalni ventil, ki povezuje vakumsko črpalko (Vacumbrand MZ2), jeklenko dušika (Dušik 5,0- Messer Slovenija) in 10 tankih cevi ( $\Phi = cca. 1 mm$ ). Na koncih cevi so nataknjene injekcijske igle, preko katerih je mogoča izmenjava atmosfere skozi gumijaste čepke stekleničk (mikrokozmov) z vzorci hkrati v desetih stekleničkah.

Anoksično atmosfero smo vzpostavili s tremi vakuumiranjmi (3x po 3 min) za vsako stekleničko (mikrokozem). Med in po treh zaporednih vakuumiranjih je sledil dodatek  $N_2$  v atmosfero stekleničk do nadtlaka 1 bar. Nato smo notranji nadtlak posamezne stekleničke izenačili z zunanjim tlakom. Tlak smo izenačili z ohišjem 10-ml injekcijske brizge brez potisnega bata, ki je vsebovalo 5 ml vode.

V vse stekleničke za DEA smo s 50ml injekcijsko brizgo in iglo preko gumijastega čepa dodali po 12 ml acetilena (~ 10 % v/v). V tiste anoksične mikrokozme, ki smo jim dodajali acetilen pa 30 ml acetilena (~ 10 % v/v). Nato smo ponovno izenačili tlake. V diplomskem delu Pal (2007) so metode izmenjevanja atmosfere opremljene tudi s slikovnim materialom.

### 3.2.2 Ugotavljanje najbolj verjetnega števila denitrifikatorjev v vertikalnem profilu tal

Število denitrifikatorjev v tleh smo ugotavljali z metodo MPN (most probable number), ki smo jo izvajali na mikrotitrskih ploščah. Metoda MPN na mikrotitrskih ploščah je enostavnejša od originalne metode MPN v epruvetah Hungate (Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995), rezultati pa so primerljivi (Pal, 2007). Metoda MPN deluje po principu redčenja suspenzije istih tal v več ponovitvah in zaznavanja prisotnosti denitrifikatorjev v posameznih redčitvah po inkubaciji.

#### 3.2.2.1 Priprava gojišča, suspenzije tal in nacepljanje na mikrotitrsko ploščo

Pripravili smo gojišče za denitrifikatorje D30 (Tiedje in sod., 1982; Tiedje, 1994; Cheneby in sod., 1998; Stres in sod., 2008). V plastično merilno posodo smo nalili cca. 800 ml deionizirane vode in ob mešanju z magnetnim mešalom pri 800 obr/min raztopili 1 g hranilnega bujona (Nutrient Broth, Difco), 0,22 g  $\text{KNO}_3$ , 0,5 g Na-sukcinata, 0,5 g Na-acetata ter deionizirano vodo dolili do oznake 1000 ml. Gojišče smo prelili v 0,5 l stekleničke ter sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121 °C). V mikrotitrsko ploščo, ki so imele 8 vrstic (A – H) z 12. luknjicami (skupaj 8 x 12 = 96 luknjic), smo najprej z osem-kanalno pipeto sterilno dodali po 180  $\mu\text{l}$  gojišča D30 v vsako luknjico.

V sterilno 150-ml stekleničko smo zatehtali 10 g tal z znano vsebnostjo vode v tleh in dolili 90 ml gojišča D30. Suspenzijo tal smo 30 min horizontalno stresali pri 150 obr/min. Takoj po stresanju smo suspenzijo tal nalili v sterilno petrijevko in začeli s sterilnim redčenjem vzorcev na mikrotitrskih ploščah. Z osem-kanalno pipeto smo prenesli 30  $\mu\text{l}$  suspenzije v vseh 8 luknjic prvega stolpca. Z novimi sterilnimi nastavki pipete smo premešali vsebino luknjic in 30  $\mu\text{l}$  prenesli v vsako luknjico naslednjega stolpca in na enak način postopek prenašanja po 30  $\mu\text{l}$  ponavljali do 12. stolpca. Tako je v vsaki od osmih vrstic nastala po ena ponovitev redčitvene vrste.

#### 3.2.2.2 Inkubacija mikrotitrskih plošč in odčitavanje MPN

Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali pri 28°C v temi in v anoksični atmosferi, ki smo jo vzpostavili tako, da smo mikrotitrsko ploščo zaprli v plinotesne vrečke skupaj s katalizatorjem, ki reducira ves prisoten kisik v atmosferi.

Po inkubaciji smo odčitali rezultate v posameznih luknjicah. Prisotnost nitrata v luknjici je negativen rezultat. Prisotnost nitrita oz. odsotnost nitrata in nitrita sta pozitivna rezultata. Reagent SA+NEDA obarva nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) v luknjici vijolično (pozitiven rezultat). Če se gojišče ob dodatku SA+NEDA ne obarva, dodamo cink. Cink reducira še prisoten nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) do nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), zato vijolično barvo gojišča sedaj predstavlja nitrat (negativen

rezultat). Če se ob SA+NEDA in cinku luknjica sploh ne obarva, pomeni, da se je ves nitrat preko nitrita reducirjal do plinastih produktov (pozitiven rezultat).

### 3.2.2.3 Izračun MPN

Obseg združbe denitrifikatorjev smo podali kot najbolj verjetno število celic v enem gramu suhih tal (MPN  $g^{-1}_{st}$ ). Število smo ugotovili s pomočjo računalna Bam-MPN (Blodgett, 2003). Za izračun MPN so potrebni naslednji podatki:

- Masa suhih tal ( $m_n$ ) v posameznem stolpcu redčitvenih vrst na mikrotitrski plošči, ki jo izračunano iz enačbe za vsebnost vode v tleh (enačba oz. formula 1), koncentracije začetne suspenzije tal ( $c_{suspenzije}$ ), količine suspenzije, ki smo jo prenašali med luknjicami mikrotitrskе plošče (30  $\mu$ l) in količine gojišča v posamezni luknjici (180  $\mu$ l).
- Nato v računalno vnesemo podatek o številu ponovitev posamezne redčitve (8) ter število pozitivnih luknjic za posamezno redčitev (0 - 8),

Ko vnesemo potrebne podatke, računalno bam-MPN izračuna najbolj verjetno število celic denitrifikatorjev v enem gramu suhih tal. Poleg tega poda rezultat tudi v logaritemski vrednosti s 95 % intervalom zaupanja.

Enačba oz. formula

... (4)

$$c_{suspenzije} = \frac{m_{st}[g_{st}]}{V_{suspenzije} [ml]} = \frac{m_{st} [g_{st}]}{m_{H_2O} + V_{gojišča} [ml]} = \frac{m_{st} [g_{st}]}{(m_{tal} - m_{st}) + V_{gojišča} [ml]}$$

$$c_1 = c_{suspenzije} \cdot \frac{30 \mu l}{30 \mu l + 180 \mu l} \left[ \frac{g_{st}}{ml} \right], m_1 = c_1 \cdot 0,210 ml [g_{st}]$$

$$c_n = c_{n-1} \cdot \frac{30 \mu l}{30 \mu l + 180 \mu l} \left[ \frac{g_{st}}{ml} \right], m_n = c_n \cdot 0,210 ml [g_{st}], (2 < n < 12)$$

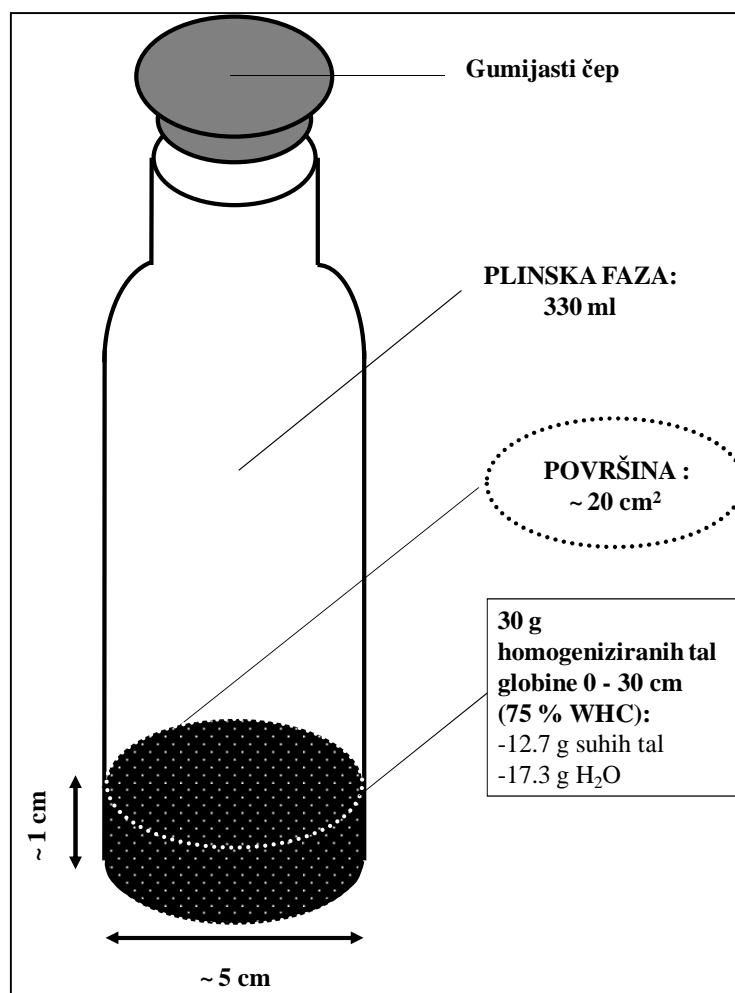
- $c_{suspenzije}$  - koncentracija suhih tal v suspenziji
- $m_{st} = \frac{m_{tal}}{VL+1} = \frac{10 g}{VL+1} [g_{st}]$  - masa suhih tal
- $V_{suspenzije} = m_{H_2O} + V_{gojišča} = (10 g - m_{st}) + 90 ml$
- $m_{H_2O} = m_{tal} - m_{st} [ml]$  - masa/volumen vode v tleh
- $c_1$  - koncentracija suspenzije tal v prvi luknjici mikrotitrskе plošče
- $m_1$  - masa tal v prvi luknjici mikrotitrskе plošče
- $c_n$  - koncentracija suspenzije v n-tem stolpcu mikrotitrskе plošče
- $m_n$  - masa tal v n-tem stolpcu mikrotitrskе plošče

### 3.3 EKSPERIMENTI V MIKROKOZMIH

Eksperimenti v mikrokozmih so omogočali spremljanje odvisnosti mikrobnih procesov od prisotnosti/odsotnosti mineralnega dušika, oksičnih/anoksičnih razmer, temperature itd. V nadaljevanju so opisani trije laboratorijski eksperimenti, ki so vključevali inkubacijo tal v mikrokozmih.

#### 3.3.1 Opis mikrokozmov in obremenitev tal z mineralnim dušikom v mikrokozmih

Mikrokozme tal smo pripravili v 330-ml stekleničkah, s premerom 5 cm, ki so se lahko plinotesno zaprle z gumijastimi čepi in aluminijastimi pokrovčki (Slika 3).



Slika 3. Shema mikrokozma s tlemi

Figure 3 Soil microcosm sheme (gumijasti čep = rubber stopper, plinska faza = gas phase, homogeniziranih tal globine = homogenized soil at the depth of, suhih tal = dry soil)

V mikrokozme (Slika 3) smo dodali po 23,7 g tal s 47 % WHC. Nato smo po površini sloja tal v mikrokozmih z 10-ml pipeto poškropili primerno količino deionizirane vode ( $V = 6,3$  ml), da so tla dosegla 75 % WHC (kontrolni mikrokozmi). V eksperimentalne oz. z mineralnim dušikom obremenjene mikrokozme smo dodali volumsko enako količino raztopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in  $\text{KNO}_3$ , katere koncentracija je bila natančno izračunana, da smo skupaj z želeno vsebnostjo vode dosegli tudi obremenitev z amonijem in nitratom, ki smo jo želeli (Preglednica 2, str. 47).

Mikrokozmi so tako vsebovali 30 g obremenjenih ali neobremenjenih tal s 75 % WHC. Tla v mikrokozmih so oblikovala 1 cm debel sloj s površino  $20 \text{ cm}^2$  (Slika 3). Podatek o površini tal v mikrokozmih smo uporabili za aproksimacijo gravimetričnih obremenitev tal na površinske obremenitve.

### 3.3.2 Trije inkubacijski eksperimenti z mikrokozmi

V nadaljevanju je predstavljena zasnova treh inkubacijskih eksperimentov v mikrokozmih (Slika 4). Prvi eksperiment vključuje vpliv temperature na nitrifikacijske in denitrifikacijske procese in emisije  $\text{N}_2\text{O}$  in  $\text{CO}_2$  v svežih tleh. Drugi eksperiment vključuje vpliv zaporednih ciklov oksičnih in anoksičnih razmer na te procese v tleh in tretji eksperiment vpliv hranjenja tal pri  $4^\circ\text{C}$  na nitrifikacijo, denitrifikacijo in mineralizacijo organskega ogljika.

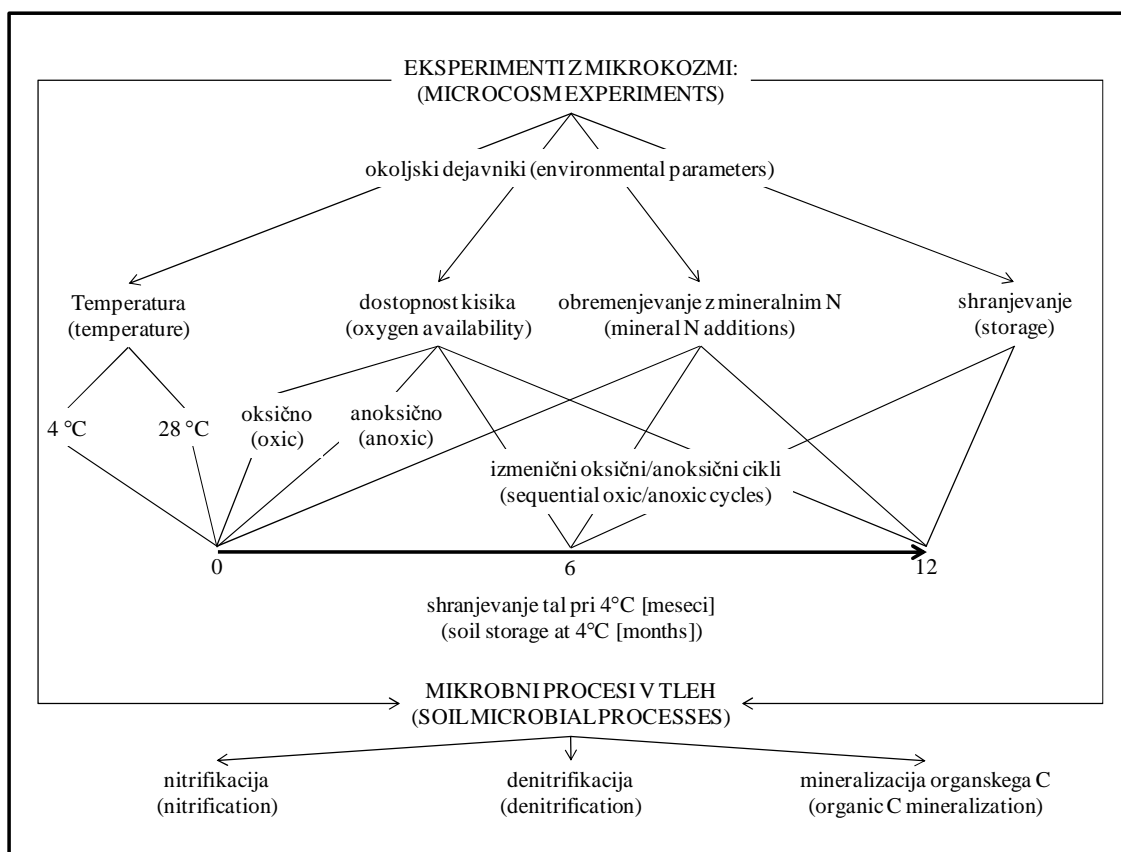
#### 3.3.2.1 Eksperiment z mikrokozmi s sveže vzorčenimi tlemi: vpliv temperature na hitrosti nitrifikacije in denitrifikacije

Pripravljenih je bilo 160 mikrokozmov, ki so vsebovali po 30 g sveže vzorčenih tal s 75 % WHC (Slika 3), od katerih je bilo 80 mikrokozmov obremenjenih s  $500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  (eksperimentalni mikrokozmi) in 80 neobremenjenih (kontrolnih) mikrokozmov (glej 3.3.1, str. 24). Polovica eksperimentalnih in kontrolnih mikrokozmov je bila 10 dni inkubirana pri  $28^\circ\text{C}$ , druga polovica pa 51 dni pri  $4^\circ\text{C}$ . Sledila je zamenjava oksične atmosfere v anoksično atmosfero (glej 3.2.1.2, str. 21) in mikrokozmi so se inkubirali nadaljnih 26 in 147 dni pri  $28^\circ\text{C}$  in  $4^\circ\text{C}$ .

Analiza koncentracij mineralnega dušika je potekala z destruktivnimi vzorčenji (žrtvovanjem) po dveh eksperimentalnih in kontrolnih mikrokozmov naenkrat (v dveh ponovitvah). Koncentracije mineralnega dušika (glej 3.3.3.4, str. 30) so bile izmerjene vsak drugi dan pri  $28^\circ\text{C}$ , medtem ko so pri  $4^\circ\text{C}$ , zaradi počasnejše kinetike procesov, bile analizirane v daljših razmakih (4 – 7 dni v oksični fazi ter do 14 dni v anoksični fazi). Dodatno sta bila ob času 0, 10 min in 2h po dodatku amonija za spremljanje koncentracij

mineralnega dušika (sorpcija amonija) destruktivno vzorčena po dva eksperimentalna mikrokozma.

Vzorčenja plinske faze mikrokozmov (glej 3.3.3.5.1 str. 30) oz. meritve emisij CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>O so potekale v rednih dnevni intervalih in le redko je bil interval med posameznima meritvama daljši kot 3 dni.



Slika 4. Mikrokozmi kot sistemi za kontrolirano preučevanje vpliva različnih dejavnikov na mikrobnne procese v tleh

Figure 4. Microcosms as systems for the controlled study of factors affecting microbial processes in soil

### 3.3.2.2 Eksperiment z mikrokozmi s tlemi, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C: vpliv števila oksičnih/anoksičnih ciklov na hitrosti mikrobnnih procesov v tleh

Pripravljenih je bilo 60 kontrolnih in 60 eksperimentalnih mikrokozmov s po 30 g tal s 75 % WHC, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C. Na začetku eksperimenta je bil v kontrolna tla dodan nitrat ( $400 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), v eksperimentalna pa poleg nitrata še amonij ( $100 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Tla so imela po dodatku 10-krat višje koncentracije amonija in nitrata od naravnih v neonesnaženih sveže vzorčenih tleh.

Nato so bili izvedeni trije cikli izmeničnih oksičnih in anoksičnih razmer, kjer je v vsakem ciklu oksični fazi sledila anoksična faza (glej 3.2.1.2, str. 21) in anoksični fazi oksična faza naslednjega cikla (oksični/anoksični cikli). Na začetku drugega in tretjega oksičnega/anoksičnega cikla je bil v eksperimentalne mikrokozme ponovno dodan amonij ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  in  $300 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Mikrokozmi so bili inkubirani v temi pri  $28^\circ\text{C}$  in oksične faze prvega, drugega in tretjega cikla so trajale 11, 7 in 8 dni z vmesnimi anoksičnimi fazami, ki so trajale 24, 23 in 28 dni.

Meritve emisij  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  in  $\text{N}_2\text{O}$  so potekale v treh naključno izbranih kontrolnih in eksperimentalnih mikrokozmih, ki so bili nato destruktivno vzorčeni za analize vsebnosti mineralnega dušika in talnega pH (glej 3.3.3, str. 28). Raztopljeni organski ogljik (DOC) je bil na začetku in koncu vsake oksične in anoksične faze ekstrahiran iz dveh vzorčenih mikrokozmov.

### 3.3.2.3 Eksperiment z mikrokozmi s tlemi, ki so bila 12 mesecev shranjena pri $4^\circ\text{C}$ : vpliv hranjenja tal in dodatka rastlinskih eksudatov na mikrobne procese v tleh

Tretji eksperiment je bil zastavljen na enak način kot drugi, le da so bila uporabljena tla predhodno 12 mesecev shranjena pri  $4^\circ\text{C}$ . V eksperimentalne mikrokozme je bil dodan amonij ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), nitrat pa se je v tleh med shranjevanjem že sam po sebi akumuliral ( $374 \pm 13 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ).

40 kontrolnih in 40 eksperimentalnih mikrokozmov se je 11 dni oksično inkubiralo v temi pri  $28^\circ\text{C}$  in nato 28 dni v anoksičnih razmerah. Na 38. dan inkubacije oz. 28. dan anoksične inkubacije so bili v tla dodani sintetični rastlinski eksudati.

Sintetične rastlinske eksudate smo pripravili tako, da smo v terilnico zatehtali kemikalije v trdnem agregatnem stanju; 65 % sladkorjev (glukoza, galaktoza, fruktoza in arabinoza – vsakega po 16,25 % m/m), 33 % organskih kislin (malat, sukcinat, acetatn in citrat – vsakega po 8,25 % m/m) in 2 % aminokislin (L-aspartat, L-glutamin in L-alanin – vsakega po 0,67 % m/m). Trdno mešanico smo s terilnico zdrobili v fini prah. Po površini tal v vsakem mikrokozmu smo enakomerno potresli natančno 1 g rastlinskih eksudatov. Sintetični rastlinski eksudati simulirajo eksudate korenin koroze (Krafczyk in sod., 1984), ki je na Ljubljanskem barju eden izmed glavnih kmetijskih pridelkov.

Za ugotavljanje koncentracij mineralnega dušika in pH tal sta bila v rednih dnevih intervalih med oksično in 4 do 7-dnevnih intervalih med anoksično inkubacijo destruktivno vzorčena po dva mikrokozma, emisije  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  in  $\text{N}_2\text{O}$  pa so bile izmerjene iz treh, naključno izbranih mikrokozmov (glej 3.3.3, str. 28).

### 3.3.3 Analitske tehnike med eksperimenti v mikrokozmih

Del analiz abiotskih dejavnikov se je nanašal na opredelitev parametrov, ki karakterizirajo tla kot primerna za odstranjevanje mineralnih oblik dušika: vpliv povišanih koncentracij mineralnega dušika na talni pH in delež volatiliziranega amoniaka.

V nadaljevanju so predstavljeni postopki ugotavljanja koncentracij raztopljenega organskega ogljika (DOC), mineralnega dušika ter emisij toplogrednih plinov CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>O. Ti dejavniki se v tleh tesno prepletajo tako z biotskimi kot z abiotskimi dejavniki, spremembe v koncentracijah naštetih zvrsti N in C pa so v odsotnosti rastlinske in živalske biomase posledica mikrobnih aktivnosti.

#### 3.3.3.1 Volatilizacija amoniaka

Volatilizacijo amoniaka iz tal smo merili z rahlo prirejeno mikro-difuzijsko metodo (Mulvaney, 1996). Sistem za loveljenje amoniaka smo namreč izdelali sami. Uporabili smo valjaste steklene posode (V = 550 ml), ki jih je bilo možno s pokrovom in tesnilom plinotesno zapreti (analogno mikrokozmu). V posode smo dodali vzorce, katerih emisijo amoniaka smo želeli ugotoviti. V posode smo nato postavili manjše, zgoraj odprte posodice (premer: 3 cm, višina: 1,5 cm), ki so vsebovale 5 ml dvojnega boratnega indikatorja (pasti za amoniak). Posode s pastmi smo čez noč inkubirali pri 28°C.

Po inkubaciji se je v pasti ujel amoniak in barva indikatorja se je spremenila iz vijolične v zeleno. Dvojni boratni indikator smo prelili v 50-ml erlenmajerico in dolili deionizirano vodo do oznake 30 ml. Vsebinsko vzorca smo nato titrirali z 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do barvnega preskoka iz zelene v vijolično barvo. Vzoredno smo titrirali tudi interno kontrolo, ki je vsebovala 5 ml svežega boratnega indikatorja in 25 ml deionizirane vode. Količino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, porabljene pri titraciji kontrole (V<sub>IK</sub>) smo odšteli od količine, porabljene za titracijo vzorca (V<sub>V</sub>). 1 ml porabljene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je potreben za titracijo 70 μg NH<sub>3</sub> - N.

Enačba oz. formula

... (5)

$$m_{NH_3-N} = (V_V - V_K) \cdot \frac{70 \mu g NH_3-N}{ml}$$

( $m_{NH_3-N}$  – absolutna masa amoniakovega dušika v pasti,  $V_V$  – volumen 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za titracijo vzorca [ml],  $V_K$  – volumen 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za titracijo interne kontrole [ml])

##### 3.3.3.1.1 Volatilizacija amoniaka med oksično inkubacijo tal

Eksperiment je vključeval 11- dnevno inkubacijo pri 28 °C, ki je bila analogna oksični fazi ciklov prej opisanih eksperimentov z mikrokozmi (3.3.2, str. 25), le da so bili mikrokozmi

malce večji ( $V = 550$  ml) in so vsebovali past za lovljenje amoniaka. Po trije obremenjeni ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) in trije neobremenjeni mikrokozmi s tlemi so bili skupaj s pastjo plinotesno zaprti. Vsebnost ujetega raztopljenega amonija v pasteh je bila analizirana vsakih 24 ur. Nato smo mikrokozme prezračili in v njih za nadaljnjih 24 ur postavili sveže pasti za amoniak.

#### 3.3.3.1.2 Odvisnost volatilizacije amoniaka od pH tal

Drugi eksperiment je bil namenjen ugotavljanju vpliva pH tal na volatilizacijo amoniaka. V 15 mikrokozmov s pastmi za lovljenje amoniaka, smo dodali po 20 g tal in dolili 10 ml 0,04 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (tla + raztopina  $\text{NH}_4^+$ ). Pripravljeni so bili še kontrolni mikrokozmi, ki so vsebovali le 10 ml 0,04 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (raztopina  $\text{NH}_4^+$ ). Po trem mikrokozmom s tlemi in trem kontrolnim mikrokozmom so bile dodane različne količine 1 M NaOH (0 ml, 0,1 ml, 1 ml, 5 ml in 50 ml 1 M NaOH), ki so omogočile dvig pH na vrednosti med pH 7 in pH 14. Vzorci so bili 24 ur inkubirani pri 28 °C, nato pa sta bila izmerjena količina amoniaka, ki se je ujela v pasti, in pH tal.

#### 3.3.3.2 Ugotavljanje pH tal

pH smo merili v plastičnih 100-ml kozarčkih, v katerih je bila suspenzija tal v razmerju tla : deionizirana voda = 1 : 2 (Thomas, 1996). 10 g tal smo zalili z 20 ml deionizirane vode. S stekleno palčko smo suspenzijo dobro premešali, tako da smo zdrobili talne makro-agregate ( $r > 4$  mm). Nato smo pustili, da se tla posedejo na dno plastičnih kozarčkov ter po 1 uri v raztopini izmerili pH. pH meter (WTW InLabSeries) s stekleno elektrodo (WTW SenTix 81 pH 0...14/0°C...100°C) smo pred uporabo po navodilih proizvajalca umerili s standardnima raztopinama pH 7 in pH 12.

#### 3.3.3.3 Ugotavljanje koncentracije raztopljenega organskega ogljika (DOC)

DOC je bil ekstrahiran iz suspenzije tal v razmerju tla : deionizirana voda = 1 : 4 (Burford in Bremner, 1975). V stekleničke ( $V = 250$  ml) smo zatehtali 10 g tal in dodali 40 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Stekleničke smo pokrili z gumijastimi čepi in aluminijastimi pokrovčki ter suspenzijo tal 20 min horizontalno stresali pri 150 obr/min. Vzorce smo 20 min sedimentirali ter jih nato prefiltrirali (filter s porami 0,45  $\mu\text{m}$ ) v 250-ml erlenmajerice. Volumen filtrata je znašal 30 ml. Koncentracija DOC v filtratu je bila ugotovljena po standardu ISO 8245 s Shimadzu 5000A CNS analizatorjem na Oddelku za analizo kemijo Inštituta za varstvo okolja Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

Enačba oz. formula ... (6)

$$DOC \left[ \frac{\mu g C}{g_{st}} \right] = \frac{c_{DOC} \left[ \frac{\mu g C}{ml} \right] \cdot V_l [ml]}{m_{st} [g_{st}]} = \frac{c_{DOC} \left[ \frac{\mu g C}{ml} \right] \cdot (V_{dH_2O} + m_{H_2O}) [ml]}{m_{st} [g_{st}]} = \frac{c_{DOC} \left[ \frac{\mu g C}{ml} \right] \cdot (40 + (10 - m_{st})) [ml]}{m_{st} [g_{st}]}$$

( $c_{DOC}$  – koncentracija DOC v filtratu [ $mg/ml = \mu g/\mu l$ ],  $V_l$  – volumen tekoče faze [ $ml$ ],  $m_{st} = \frac{m_{tal}}{V_{L+1}} = \frac{10 g}{V_{L+1}} [g]$  – masa suhih tal [ $g$ ],  $V_{dH_2O} = 40 ml$  - volumen dodane deionizirane vode [ $ml$ ],  $m_{H_2O} = m_{tal} - m_{st} = 10 g - m_{st}$  – masa vode v tleh [ $g=ml$ ])

### 3.3.3.4 Ugotavljanje koncentracij mineralnega dušika v tleh

Ekstrakcija mineralnega dušika iz tal je potekala iz 10 g tal, ki smo jih zalili s 100 ml 2 M KCl. Zatesnjene stekleničke s tlemi in KCl smo 1 uro horizontalno stresali pri 180 obr/min. Nato smo jih sedimentirali pri 4 °C čez noč. Koncentracija mineralnega dušika v supernatantu je bila analizirana z avtomatskim analizatorjem (FlowSys, Aliance Instruments, Salzburg, Avstria).

Enačba oz. formula ... (7)

$$N_{min} \left[ \frac{\mu g N}{g_{st}} \right] = \frac{c_{N_{min}} \left[ \frac{\mu g N}{ml} \right] \cdot V_l [ml]}{m_{st} [g_{st}]} = \frac{N_{min} \left[ \frac{\mu g N}{ml} \right] \cdot (V_{2M KCl} + m_{H_2O}) [ml]}{m_{st} [g_{st}]} = \frac{N_{min} \left[ \frac{\mu g N}{ml} \right] \cdot (100 + (10 - m_{st})) [ml]}{m_{st} [g_{st}]}$$

( $N_{min}$  – koncentracija mineralnega dušika v supernatantu [ $mg/ml = \mu g/\mu l$ ],  $V_l$  – volumen tekoče faze [ $ml$ ],  $m_{st} = \frac{m_{tal}}{V_{L+1}} = \frac{10 g}{V_{L+1}} [g]$  – masa suhih tal [ $g$ ],  $V_{dH_2O} = 100 ml$  - volumen dodane 2 M KCl [ $ml$ ],  $m_{H_2O} = m_{tal} - m_{st} = 10 g - m_{st}$  – masa vode v tleh [ $g=ml$ ])

### 3.3.3.5 Vzorčenje plinske faze in ugotavljanje emisij toplogrednih plinov s plinsko kromatografijo

Splošno aktivnost mikrobnih združb smo spremljali preko neto emisij CO<sub>2</sub>, ki odražajo neto mineralizacijo organskega ogljika. Emisije CH<sub>4</sub> so značilne za metanogenezo, N<sub>2</sub>O pa za nitrifikacijo in denitrifikacijo.

#### 3.3.3.5.1 Vzorčenje plinske faze mikrokozmov

Vzorčenje plinske faze v mikrokozmih je za vse tri pline potekalo naenkrat, saj so se ločili na koloni plinskega kromatografa.

Skozi gumijast čep posameznega mikrokozma smo prebodli injekcijsko iglo, na katero je bil nataknen zaporni ventil, nanj pa 10-ml injekcijska brizga. Ventil smo odprli ter posrkali 10 ml plinske faze ter zaprli ventil, preden smo brizgo skupaj z iglo izvlekli iz mikrokozma. Plinsko fazo smo iz 10-ml brizge prenesli v plinotesno 2-ml stekleničko z gumijastim čepom. To smo naredili tako, da smo skozi gumijasti čep stekleničke prebodli še eno iglo z odprtim zapornim ventilom, ki je omogočala uhajanje plina iz stekleničke.

Nato smo stekleničko prepihali z 8 ml vzorca plinske faze iz brizge, zaporni ventil na steklenički zaprli in vbrižgali preostala 2 ml. Tako je bil v vsaki 2-ml plinotesni steklenički vzpostavljen nadtlak, ki smo ga izenačili z zunanjim tlakom, tik preden smo 2-ml stekleničke naložili na avtoanalizator plinskega kromatografa.

Kadar smo vzorčili plinske faze oksično inkubiranih mikrokozmov, smo po tri mikrokozme inkubirali zatesnjene z gumijastim čepom za čas med dvema vzorčenjema (24 – max. 72 ur), medtem ko so se ostali mikrokozmi inkubirali v stiku z zunanjo atmosfero. Po vzorčenju smo mikrokozme prezračili in naključno izbrali nove tri mikrokozme.

Anoksični mikrokozmi so bili plinotesno zaprti in ob vzorčenju smo odvzeli 10 ml plinske faze, ki smo jo nato nadomestili s svežo plinsko fazo ( $N_2$  ali  $N_2 + 10\%$  v/v acetilen – glej 3.2.1.2, str. 21) ter inkubirali dalje. Ob vsakem naslednjem vzorčenju plinske faze smo izbrali druge tri mikrokozme. Proti koncu eksperimentov se je število mikrokozmov zmanjševalo zaradi destruktivnih vzorčenj. Zato so nekateri mikrokozmi med merjenjem emisij prišli večkrat na vrsto. Takrat smo pri računanju emisij s korekcijo volumna plinske faze upoštevali nadomeščeno plinsko fazo.

#### 3.3.3.5.2 Plinska kromatografija

Spremembam v produkciji toplogrednih plinov smo sledili s plinsko kromatografijo (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies). Vzorce plinske faze meritev DEA (glej 3.2.1, str. 20) smo skozi injektor naprave nanašali ročno. Omenjeni aparat pa ima vgrajen avtoanalizator, s katerim je mogoče avtomatično analizirati do 100 originalnih plinotesnih 2-ml stekleničk, ki smo jih pripravili za analize plinskih faz mikrokozmov.

V plinski kromatograf je bila nameščena kolona J and V Scientific (GS-Carbon Plot, 30m x 0,530mm) in metanizator. Detektor FID (flame ionization detector) zaznava količino  $CH_4$ , detektor ECD (electron capture detector) pa količino  $N_2O$  v vzorcu.  $CO_2$  gre po ločbi na koloni na metanizator, ki ga spremeni v  $CH_4$ . Detektor FID tako zazna tudi v  $CH_4$  spremenjen  $CO_2$ . Signal iz detektorjev se procesira glede na jakost in trajanje in odraža določeno površino pika posameznega plina.

Umeritvene krivulje za plinski kromatograf so bile narejene za vsak plin posebej z uporabo standardnih vzorcev plinov s koncentracijami v območju med 10 in 100 000 ppm (parts per milion – delcev na milijon delcev). Iz umeritvene krivulje odvisnosti površin pikov od koncentracij standardnih vzorcev smo s programsko opremo plinskega kromatografa preračunali eksperimentalne koncentracije plinov. Koncentracije  $CH_4$  in  $N_2O$  so podane v ppm, koncentracije  $CO_2$  pa v odstotkih (% - delcev na sto delcev).

### 3.3.3.5.3 Izračun emisij toplogrednih plinov iz tal v mikrokozmih

V vseh mikrokozmih je bilo 30 g tal s 75 % WHC oz. je vsebnost vode v tleh znašala ( $V_L = 1,37 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Zato je bila v vseh mikrokozmih količina suhih tal ( $m_{\text{st}}$ ) enaka (12,74 g) in ravno tako volumen vodne faze v tleh ( $V_l = 17,36 \text{ g}$ ). Emisije so bile v prvem eksperimentu izmerjene pri dveh temperaturah (28 °C in 4 °C), zato so bile upoštevane temperaturne korekcije, ki upoštevajo različne Bunsenove koeficiente (topnost plinov) pri različnih temperaturah in različne molske volumne, ki po plinski enačbi ( $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$ ) padajo s temperaturo.

Enačba oz. formula ... (8)

$$eCH_4 - C \left[ \frac{\mu\text{g } CH_4 - C}{g_{\text{st}}} \right] = \frac{c [\text{ppm } CH_4 - C] \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha_{CH_4} \cdot V_l) [\text{ml}]}{m_{\text{st}} [g_{\text{st}}]} eCH_4 - C = \frac{c [\text{ppm } CH_4 - C] \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha_{CH_4} \cdot V_l) [\text{ml}]}{m_{\text{st}} [g_{\text{st}}]}$$

$$\left( \frac{P \cdot M}{R \cdot T} = \frac{101,3 \cdot 10^3 \left[ \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \right] \cdot 12 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu\text{g } CH_4 - C}{\text{mol}} \right]}{8,314 \left[ \frac{\text{Nm}}{\text{mol K}} \right] \cdot T [\text{K}]} \right) = \frac{c \cdot 10^{-6} \cdot (306 + \alpha_{CH_4} \cdot 17,36) \cdot 101,3 \cdot 10^3 \cdot 12 \cdot 10^6 \mu\text{g } CH_4 - C}{12,74 g_{\text{st}} \cdot 8,314 \left[ \frac{1}{\text{K}} \right] \cdot T [\text{K}]}$$

( $eCH_4 - C$  – emisija  $CH_4$ ,  $c$  = koncentracija  $CH_4$  [ppm],  $\alpha_{CH_4}(28 \cdot c) = 0,03$ ,  $\alpha_{CH_4}(4 \cdot c) = 0,05$ ,

$m_{\text{st}} = \frac{m_{\text{tal}}}{V_L + 1} = \frac{30 \text{ g}}{1,37 + 1} = 12,74 \text{ g}$ ,  $V_g = m_{\text{zalita steklenička}} - m_{\text{steklenička} + \text{tla}} = 306 \text{ ml}$ ,

$V_l = m_{H_2O} = V_L \cdot m_{\text{st}} = 17,36 \text{ ml}$ ,  $T_{28 \cdot c} = 301 \text{ K}$ ,  $T_{4 \cdot c} = 277 \text{ K}$ )

Enačba oz. formula ... (9)

$$eCO_2 - C \left[ \frac{\mu\text{g } CO_2 - C}{g_{\text{st}}} \right] = \frac{c [\% CO_2 - C] \cdot 10^{-2} \cdot (V_g + \alpha_{CO_2} \cdot V_l) [\text{ml}]}{m_{\text{st}} [g_{\text{st}}]} eCO_2 - C = \frac{c [\% CO_2 - C] \cdot 10^{-2} \cdot (V_g + \alpha_{CO_2} \cdot V_l) [\text{ml}]}{m_{\text{st}} [g_{\text{st}}]}$$

$$\left( \frac{P \cdot M}{R \cdot T} = \frac{101,3 \cdot 10^3 \left[ \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \right] \cdot 12 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu\text{g } CO_2 - C}{\text{mol}} \right]}{8,314 \left[ \frac{\text{Nm}}{\text{mol K}} \right] \cdot T [\text{K}]} \right) = \frac{c \cdot 10^{-2} \cdot (306 + \alpha_{CO_2} \cdot 17,36) \cdot 101,3 \cdot 10^3 \cdot 12 \cdot 10^6 \mu\text{g } CO_2 - C}{12,74 g_{\text{st}} \cdot 8,314 \left[ \frac{1}{\text{K}} \right] \cdot T [\text{K}]}$$

( $eCO_2 - C$  – emisija  $CO_2$ ,  $c$  = koncentracija  $CO_2$  [%],  $\alpha_{CO_2}(28 \cdot c) = 0,71$ ,  $\alpha_{CO_2}(4 \cdot c) = 1,42$ )

- za ostale podatke glej Enačbo oz. formulo 8

Enačba oz. formula ... (10)

$$eN_2O - N \left[ \frac{\mu\text{g } N_2O - N}{g_{\text{st}}} \right] = \frac{2 \cdot c [\text{ppm } N_2O - N] \cdot 10^{-6} \cdot (V_g + \alpha_{N_2O} \cdot V_l) [\text{ml}]}{m_{\text{st}} [g_{\text{st}}]} \cdot \left( \frac{P \cdot M}{R \cdot T} = \frac{101,3 \cdot 10^3 \left[ \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \right] \cdot 14 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu\text{g } N_2O - N}{\text{mol}} \right]}{8,314 \left[ \frac{\text{Nm}}{\text{mol K}} \right] \cdot T [\text{K}]} \right) =$$

$$\frac{2 \cdot c \cdot 10^{-6} \cdot (306 + \alpha_{N_2O} \cdot 17,36) \cdot 101,3 \cdot 10^3 \cdot 14 \cdot 10^6 \mu\text{g } N_2O - N}{12,74 g_{\text{st}} \cdot 8,314 \left[ \frac{1}{\text{K}} \right] \cdot T [\text{K}]}$$

( $eN_2O - N$  – emisija  $N_2O$ ,  $c$  =  $N_2O$  [ppm],  $1 \text{ mol } N_2O = 2 \text{ mol } N_2O - N \rightarrow 2c = N_2O - N$  [ppm]

$\alpha_{N_2O}(28 \cdot c) = 0,51$ ,  $\alpha_{N_2O}(4 \cdot c) = 1,06$ )

- za ostale podatke glej Enačbo oz. formulo 8

### 3.3.4 Izračun hitrosti mikrobnih procesov in temperaturnih koeficientov $Q_{10}$

Hitrosti mikrobnih procesov so bile predstavljene kot izračunani koeficienti linearne regresije podatkov o spremembah koncentracij izmerjenih mineralnih N in C zvrsti v času. Iz dveh hitrosti mikrobnega procesa ( $R_1$  in  $R_2$ ), izmerjenega pri dveh temperaturah, so bili izračunani temperaturni koeficienti  $Q_{10}$  (Eskandari, 2005).

Enačba oz. formula ... (11)

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

Iz Enačbe oz. formule 11 in podatkov za  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $T_1$  (4 °C) in  $T_2$  (28 °C) smo nato izpeljali funkcijo, ki je opisala spremembe hitrosti mikrobnih procesov v odvisnosti od temperature po kinetiki  $Q_{10}$ . Tako je bilo možno oceniti hitrosti procesov pri izbranih temperaturah.

Enačba oz. formula ... (12)

$$f(x) = R_1 \cdot Q_{10}^{\frac{x - T_1}{10}} = \frac{R_2}{Q_{10}^{\frac{T_2 - x}{10}}}, 4 \text{ °C} < x < 28 \text{ °C}$$

## 4 REZULTATI

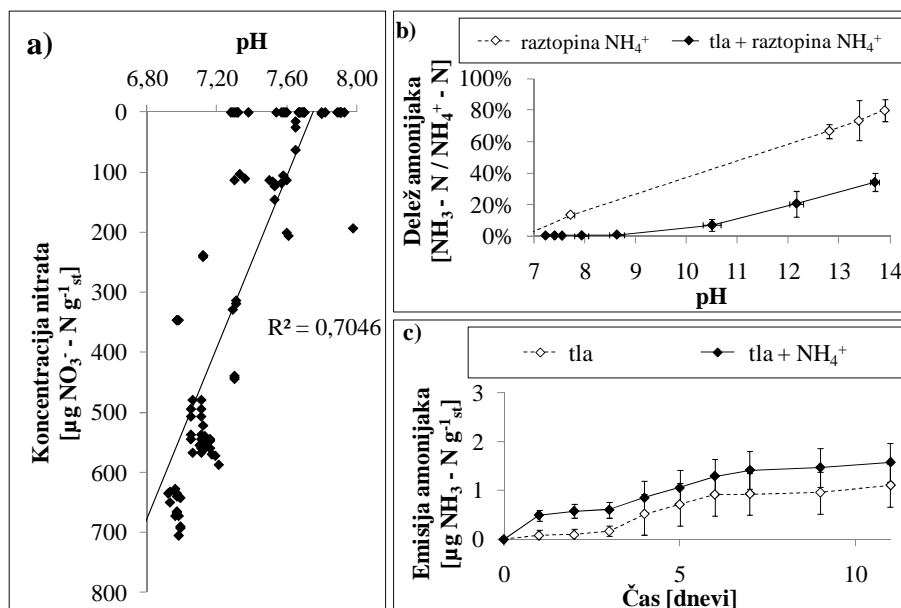
### 4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI V ZVEZI Z ODSTRANJEVANJEM DUŠIKA

Laboratorijski eksperimenti, ki so vključevali dodajanje in spremljanje različnih koncentracij mineralnega dušika in hkratno spremljanje pH v tleh HC (Slika 11 in Slika 13), vzorčenih na eksperimentalnem polju na Ljubljanskem barju, so razkrili splošno negativno linearno korelacijo med koncentracijami nitrata in pH tal (Slika 5a). V vzorcih tal, kjer se je poleg nitrata nahajal tudi amonij, je bila ta korelacija šibkejša ( $R^2 = 0,70$ ) kot v vzorcih brez amonija ( $R^2 = 0,87$ ). Medtem ko so koncentracije nitrata nihale v razmeroma širokem območju med 0 in  $700 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ , se je pH tal gibal v relativno ozkem območju med pH 6 in pH 7.

Volatilizacija amoniaka, ki pozitivno korelira s pH, je bila pospešena z dodajanjem NaOH v mikrokozme. (Slika 5b). Povišanje pH je sprožilo volatilizacijo amoniaka z zvišanim deležem volatiliziranega amoniaka glede na začetno količino amonija. Ta delež pa je celo pri pH 11 znašal le 3 - 11 %. Ravno tako je pH tal ob dodajanju NaOH le počasi naraščal in je šele po dodatku 50 ml 1 M NaOH k 20 g tal dosegel pH 14, medtem ko se je v raztopini pH dvignil na vrednost pH 14 po dodatku 10-krat manj koncentrirane NaOH. Zato ne preseneča, da se pH sveže vzorčenih tal navadno giblje le v območju med pH 6 in pH 7, v katerem je nizka tudi volatilizacija amoniaka, ki smo jo spremljali v vzorcih tal v mikrokozmih, obremenjenih z amonijem ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) (Slika 5c).

Volatilizacija amoniaka je linearno naraščala ( $R_2 = 0,84$ ) prvih 6 dni inkubacije in se je nato ustalila pri  $0,5 - 2,0 \mu\text{g NH}_3 - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ , kar predstavlja le 0,3 - 1,0 % dodanega mineralnega amonija. Hitrost produkcije amoniaka prvih 7 dni inkubacije je v obremenjenih vzorcih tal znašala  $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g NH}_3 - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  in se ni signifikantno razlikovala ( $p > 0,05$ ) od hitrosti v kontrolnih vzorcih tal ( $0,16 \pm 0,06 \mu\text{g NH}_3 - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ).

Na volatilizacijo amoniaka poleg pH vpliva še sorpcija amonijevega iona na negativno nabite talne delce, ki je bila v našem primeru razvidna takoj po dodatku  $500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  v tla, ko se je količina amonija, ki jo je bilo možno ekstrahirati z 2M KCl, drastično znižala na  $450 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  po 10 min in na  $380 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  po 2 h od dodatka amonija (Slika 7).



Slika 5. Povezave med pH, nitratom in volatilizacijo amonija. (a) Odvisnost pH od koncentracije nitrata v tleh predstavljajo podatki, ki so bili pridobljeni v kateremkoli od eksperimentov v tej disertaciji, kjer je poleg koncentracije nitrata bil izmerjen tudi pH tal. (b) Volatilizacija  $\text{NH}_3$  v odvisnosti od pH raztopine  $\text{NH}_4^+$  oz. pH tal, bremenjenih z raztopino  $\text{NH}_4^+$ . pH je bil uravnavan z 1 M NaOH. (c) Volatilizacija  $\text{NH}_3$  med 11-dnevno inkubacijo bremenjenih ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) in neobremenjenih tal, pri  $28^\circ\text{C}$ . Podatki v b in c so predstavljeni v obliki povprečnih vrednosti s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja meritev ( $n = 3$ ).

Figure 5 Relationships between pH, nitrate concentrations and  $\text{NH}_3$  volatilization. (a) Correlation between nitrate and pH is based on any data obtained in this dissertation where soil nitrate concentration and pH measurements took place at the same time. (b) Influence of pH on  $\text{NH}_3$  volatilization. (c)  $\text{NH}_3$  volatilization during 11-day incubation of control soil (tla) and the soil amended with  $200 \mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  (tla +  $\text{NH}_4^+$ ) incubated at  $28^\circ\text{C}$ . Volatilization was measured daily. The data point in figures b represent average values of triplicate measurements with 95 % confidence intervals.

## 4.2 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE VERTIKALNEGA PROFILA TAL

V vertikalnem profilu tal Ljubljanskega barja smo analizirali Nitrifikacijsko Encimsko Aktivnost (NEA) in Denitrifikacijsko Encimsko Aktivnost (DEA) ter najbolj verjetno število nitrifikatorjev in denitrifikatorjev z metodo MPN. Podatki o NEA in MPN nitrifikatorjev so analizirani in objavljeni v Höfferle s sod. (2010), podatki o DEA in MPN denitrifikatorjev pa so predstavljeni v nadaljevanju.

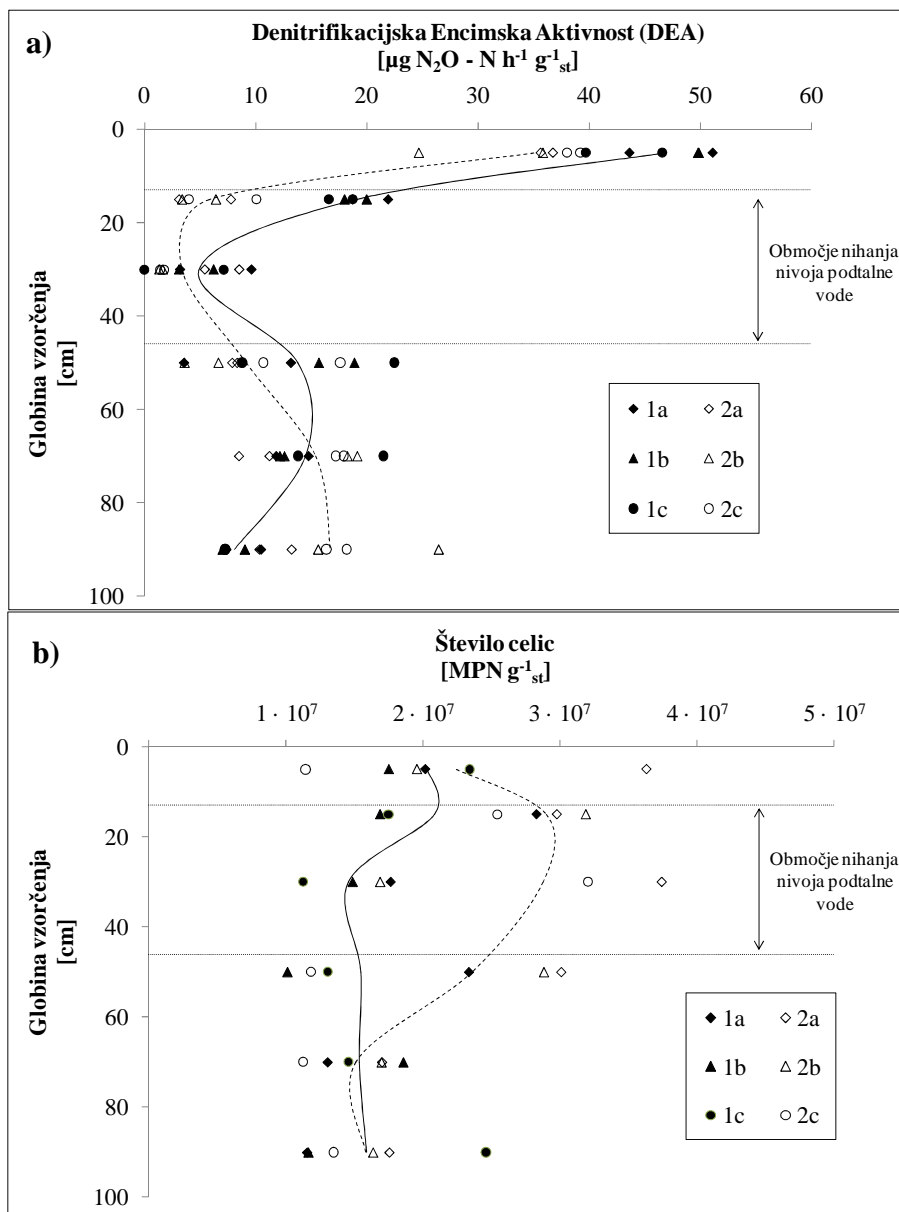
### 4.2.1 Denitrifikacijska encimska aktivnost

DEA je bila, tako na lokaciji točkastega vira onesnaženja kot na 25 m oddaljeni neonesnaženi lokaciji, najvišja v zgornjem, 0–5 cm globokem sloju tal ( $47 \pm 4$  in  $35 \pm 4 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ ) in je z globino upadala. Najnižja DEA je bila izmerjena v slojih tal na globini 20–40 cm ( $5 \pm 3$  in  $3 \pm 2 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ ), ki je hkrati tudi globina nihanja povprečnega letnega nivoja podtalnice ( $30 \pm 17$  cm) (Slika 6a).

Kljub prostorski variabilnosti DEA na treh, 1 m oddaljenih mikrolokacijah znotraj posamezne lokacije, je bila DEA na globinah 0–20 cm signifikantno višja in na globini 80–100 cm signifikantno nižja ( $p < 0,05$ ) na mestu vira točkastega onesnaženja v primerjavi z neonesnaženim vzorčnim mestom. DEA obeh lokacij v slojih tal na globinah 5–10 in 20–40–60–80 cm je ravno tako kazala določeno prostorsko variabilnost in se je gibala med 5 in  $22 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ , toda signifikantnih razlik ni bilo ( $p > 0,05$ ).

### 4.2.2 Najbolj verjetno število denitrifikacijskih mikroorganizmov

Najbolj verjetno število denitrifikacijskih mikroorganizmov (MPN denitrifikatorjev) se je na onesnaženi in na 25 m oddaljeni neonesnaženi lokaciji gibalo med  $1 - 4 \cdot 10^7$  celic  $\text{g}^{-1}_{\text{st}}$  po celotnem vertikalnem profilu (Slika 6b). Variabilnost MPN denitrifikatorjev je bila na onesnaženi lokaciji rahlo višja kot na neonesnaženi lokaciji, kjer je to število znašalo  $1 - 3 \cdot 10^7$  celic  $\text{g}^{-1}_{\text{st}}$ , vendar signifikantnih razlik med obema lokacijama ni bilo ( $p > 0,05$ ). Prav tako se podatki o velikosti denitrifikacijske populacije na različnih globinah vertikalnega profila, niso signifikantno razlikovali ( $p > 0,05$ ).



Slika 6. Prostorska variabilnost in vpliv točkovega vira onesaženja z odpadno gospodinjno vodo na (a) denitrifikacijsko encimsko aktivnost (DEA) in (b) število denitrifikacijskih mikroorganizmov (MPN) v tleh. DEA in MPN v 1 m globokem vertikalnem profilu tal sta bila znotraj neonesažene lokacije 1 in točkasto onesažene lokacije 2 v dveh tehničnih ponovitvah izmerjena na treh mikrolokacijah (a, b in c). Polna črta (—) povezuje povprečne vrednosti DEA (a) in MPN (b) lokacije 1, prekinjena črta (- - -) pa lokacije 2. Figure 6 Spatial variability and the influence of the point source (household wastewater) pollution on soil Denitrification Enzyme Activity (DEA) (a) and the Most Probable Number (MPN) of denitrifying microorganisms (b). DEA and MPN measurements were performed in technical duplicates of three microlocations (a, b, c) of unpolluted (1a, 1b, 1c) and point polluted (2a, 2b, 2c) locations. The line (—) presents the average DEA and MPN values of the unpolluted site (location 1) and the line (- - -) connects the average values of point polluted site (location 2).

### 4.3 LABORATORIJSKI EKSPERIMENTI S TLEMI V MIKROKOZMIH

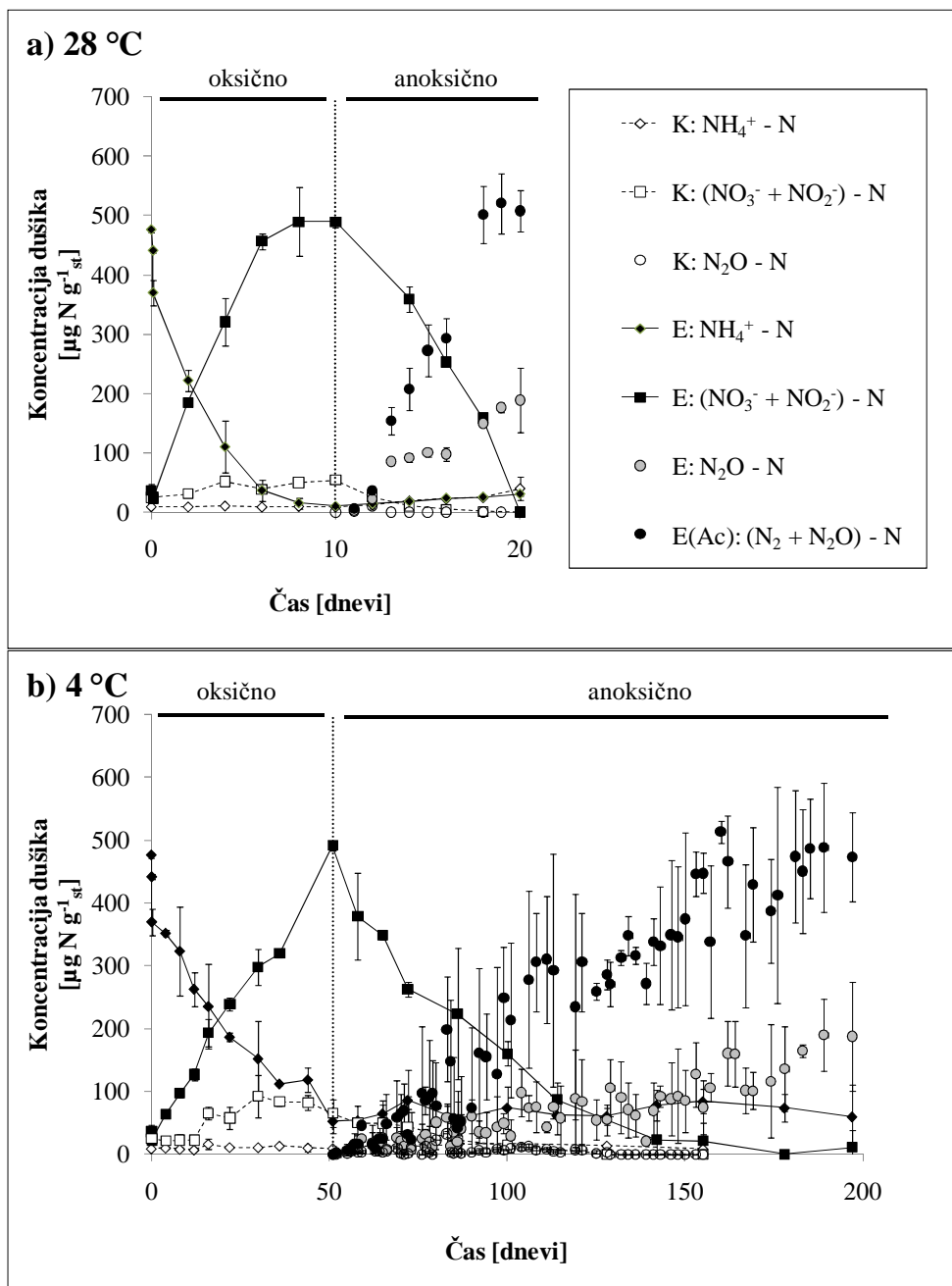
#### 4.3.1 Nitrifikacija, denitrifikacija in produkcija toplogrednih plinov v odvisnosti od temperature tal med oksičnim/anoksičnim ciklom v svežih tleh

Oksični/anoksični cikel s sveže vzorčenimi tlemi v mikrokozmih je bil izveden pri 28 °C in 4 °C, kjer so si sledili oksična (nitrifikacijska) in anoksična (denitrifikacijska) faza (Slika 7a in b)

V prvem, oksičnem delu cikla pri 28 °C so tla pretvorila dodatek  $500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  v  $490 \pm 58 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  v 6. – 8. dneh inkubacije. Pri 4 °C pa je bilo potrebnih 51 dni, da so tla pretvorila enako obremenitev v  $491 \pm 7 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . Koncentracije amonija so padale s hitrostmi, ekvivalentnimi hitrostim nastanka nitrata in nitrita, ki so znašale 59 - 71 in  $6 - 8 \mu\text{g (NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  pri 28 °C in 4 °C (Preglednica 1). Nitrifikacijske hitrosti pri 4 °C so bile nižje, in sicer  $11 \pm 2 \%$  nitrifikacijskega potenciala pri 28 °C.

V drugem, anoksičnem delu cikla, so tla potrebovala 8 dni pri 28 °C in 100 do 120 dni pri 4 °C (Slika 7) za kompletno redukcijo nitrata in nitrita ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ), nastalega v predhodni oksični fazi, do dušikovega oksidula in molekularnega dušika ( $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ ). Kumulativna količina  $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$  na koncu anoksičnih faz je bila ekvivalentna začetnim koncentracijam  $\text{NO}_3^-$  ( $p > 0,05$ ) in je znašala  $494 \pm 17 \mu\text{g (N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  pri 28 °C in  $473 \pm 71 \mu\text{g (N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  pri 4 °C. Na koncu anoksičnih faz je nastalo  $189 \pm 54 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  pri 28 °C in  $188 \pm 87 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  pri 4 °C, kar pomeni, da je bilo razmerje  $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O})$  pri obeh temperaturah podobno (30 - 40 %).

Hitrosti porabe  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  in nastanka  $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$  so pri 28 °C znašale 54 - 64 in pri 4 °C  $2 - 4 \mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  (Preglednica 1). Denitrifikacijske hitrosti pri 4 °C so bile torej skoraj 20-krat nižje kot pri 28 °C in so predstavljale  $6 \pm 1 \%$  denitrifikacijskega potenciala pri 28 °C.



Slika 7. Potek nitrifikacije v oksičnih in denitrifikacije v anoksičnih razmerah v svežih tleh pri 28 °C (a) in 4 °C (b). Eksperimentalni vzorci (E) so bili ob začetku inkubacije obremenjeni s  $\sim 500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ , medtem ko kontrolni vzorci (K) niso vsebovali amonija. Anoksični mikrokozmi E(Ac) so vsebovali acetylen ( $10_{\text{vol.}} \%$ ), ki inhibira pretvorbo  $\text{N}_2\text{O}$  v  $\text{N}_2$ . Vsebnost mineralnega dušika je bila ugotovljena z destruktivnimi vzorčenji po dveh mikrokozmov, medtem ko so bile emisije  $\text{N}_2\text{O}$  in  $\text{N}_2$  ugotovljene v treh ponovitvah. Podatki so prikazani kot povprečne vrednosti s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja.

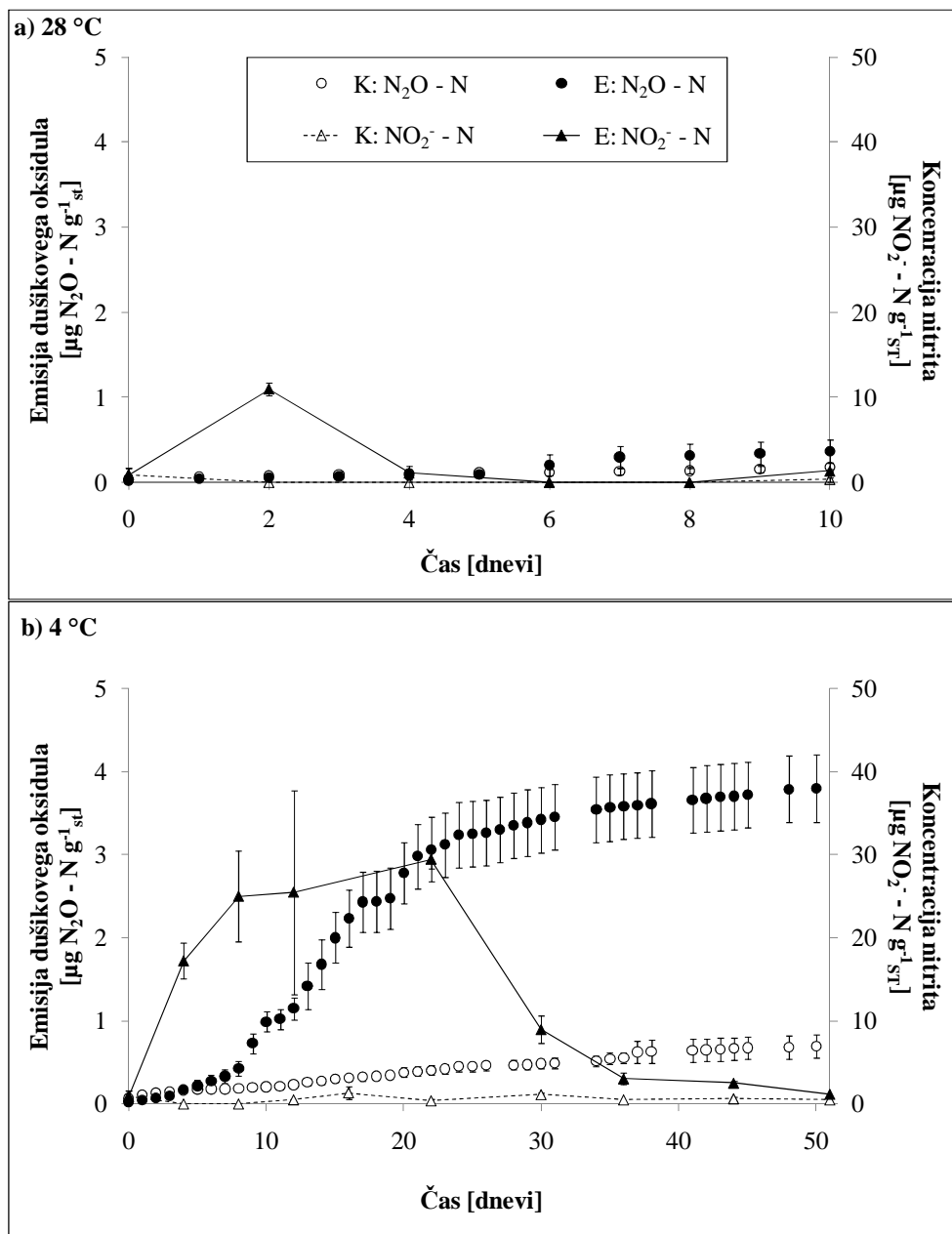
Figure 7 Nitrification and denitrification patterns in freshly sampled peat soil microcosms at 28 °C (a) and 4 °C (b). At the beginning ammonium ( $\sim 500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) was added to experimental microcosms (E) while the control microcosms (K) were not amended. Anoxic microcosms E(Ac) contained acetylene ( $10_{\text{vol.}} \%$ ), which inhibited the conversion of  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$ . Mineral nitrogen content was determined from duplicate microcosms by destructive samplings, while gas phase  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$  were determined in triplicates. The data are presented as average values with 95 % confidence intervals. st = dry soil

#### 4.3.1.1 Koncentracije nitrita in emisije N<sub>2</sub>O med oksično fazo oksičnega/anoksičnega cikla

Koncentracije nitrita (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) in emisije N<sub>2</sub>O so bile med oksično fazo pri 28 °C in 4 °C nizke (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/[NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] < 6 %; N<sub>2</sub>O/[NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] < 1 %) in zaradi večje preglednosti niso bile prikazane na prejšnji sliki (Slika 7), ampak so prikazane posebej (Slika 8).

Kumulativna količina N<sub>2</sub>O kontrolnih in z amonijem obremenjenih (500 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>) mikrokozmov se pri 28 °C ni signifikantno razlikovala (0,34 ± 0,14 µg N<sub>2</sub>O - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>). Bila pa je 2-krat nižja kot v kontrolnih vzorcih, inkubiranih pri 4 °C, kjer je znašala 0,69 ± 0,14 µg N<sub>2</sub>O - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>. Dodatek amonija je pri 4 °C povečal produkcijo N<sub>2</sub>O tako, da je kumulativna emisija N<sub>2</sub>O na koncu inkubacije znašala 3,8 ± 0,4 µg N<sub>2</sub>O - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>, kar pa je kljub vsemu predstavljalo le 0,86 ± 0,10 % izgub vsega dodanega mineralnega dušika.

Emisije N<sub>2</sub>O v mikrokozmih z obremenjenimi tlemi pri 4 °C so v obdobju med 8. in 22. dnevom inkubacije naraščale signifikantno hitreje kot v kontrolnih mikrokozmih (Preglednica 1). V istem obdobju so bile koncentracije nitrita obremenjenih vzorcev povišane in so znašale od 8. do 22. dneva inkubacije 25 ± 5 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>, nato pa so do 36. dneva inkubacije padle in se ustalile pri 1,2 - 3,8 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>. Koncentracije nitrita, z izjemo enega samega pika (11 ± 1 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>) na 2. dan oksične inkubacije v obremenjenih tleh, so se pri 28 °C gibale med 0,0 in 1,6 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub>.



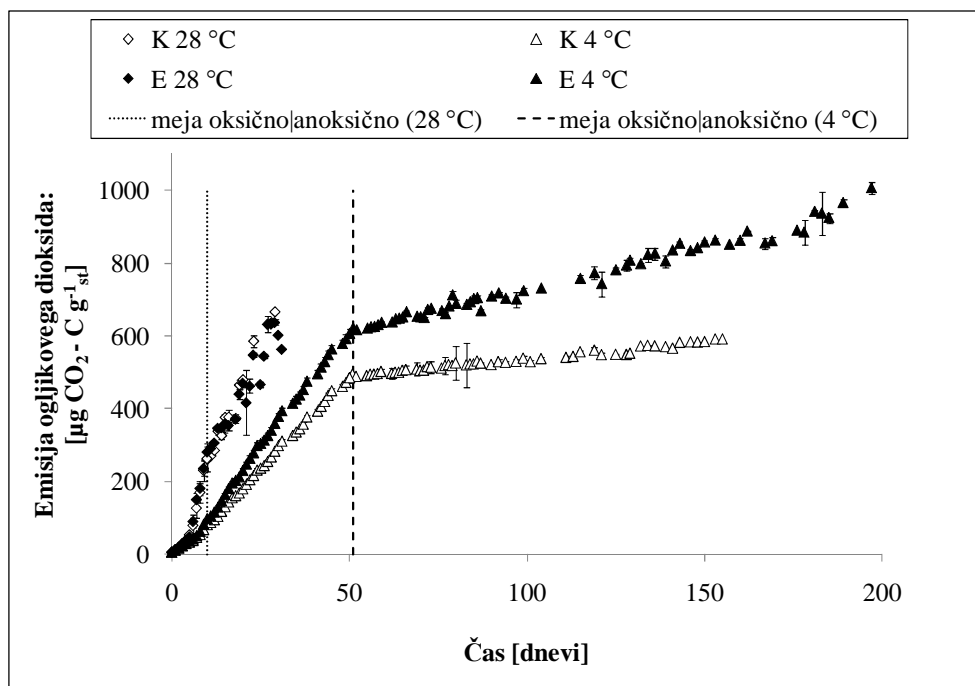
Slika 8. Vpliv dodatka amonija ter koncentracije nitrita na emisijo  $\text{N}_2\text{O}$  pri 28 °C (a) in 4 °C (b) v oksičnih razmerah. Mikrokozmi K so vsebovali sveža tla, mikrokozmi E pa ista tla, obremenjena z amonijem ( $\sim 500 \mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Emisije  $\text{N}_2\text{O}$  so bile ob vsakem vzorčenju izmerjene iz treh, naključno izbranih mikrokozmov, koncentracije  $\text{NO}_2^-$  (sekundarna os) pa so bile izmerjene po destruktivnem vzorčenju po dveh mikrokozmov. Točke na grafikonu predstavljajo povprečja s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja.  
 Figure 8. Influence of ammonium addition on soil nitrite concentrations and nitrous oxide emissions at 28 °C (a) and 4 °C (b). Microcosms contained intact (K) and ammonium amended ( $\sim 500 \mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) freshly sampled soil.  $\text{N}_2\text{O}$  emission was measured in triplicates while duplicate microcosms were destructively sampled for mineral nitrogen concentration determinations. The data are presented as average values with 95 % confidence intervals. st = dry soil

#### 4.3.1.2 Mineralizacija ogljika v odvisnosti od temperature, oksičnih in anoksičnih razmer ter obremenitve tal z mineralnim dušikom

Pri 28 °C so bile emisije CO<sub>2</sub> med obremenjenimi in kontrolnimi vzorci tal podobne ( $p > 0,05$ ). Naraščanje emisij CO<sub>2</sub> v 10-dnevni oksični fazi pri 28 °C je spominjalo na eksponentno rast ( $R^2 = 0,98$ ) z začetno lag-fazo v prvih 6. dneh, ko je produkcija CO<sub>2</sub> znašala  $9 \pm 1 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ , nato pa narastla na  $47 \pm 9 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v naslednjih štirih dneh inkubacije. Povprečna hitrost produkcije CO<sub>2</sub> 10-dnevnega obdobja oksične faze ( $29 \pm 4 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ) je predstavljena v Tabeli 1 in je bila pridobljena z linearno regresijo ( $R^2 = 0,81$ ). Prehod iz oksične v anoksično fazo je pri 28 °C povzročil padec v produkciji CO<sub>2</sub> iz  $\sim 30 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  na  $\sim 20 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  (Preglednica 1).

Pri 4 °C so bile tako oksične kot anoksične emisije CO<sub>2</sub> obremenjenih mikrokozmov signifikantno višje ( $p < 0,05$ ) od kontrolnih (Slika 9). Razlika v hitrosti produkcije CO<sub>2</sub> med kontrolnimi in bremenjenimi vzorci je bila bolj opazna v anoksični kot v oksični fazi in je bila v obremenjenih mikrokozmih 3-krat višja od kontrolnih (Preglednica 1). Prehod iz oksičnega v anoksično je pri 4 °C bolj drastično znižal hitrosti produkcije CO<sub>2</sub>, ki so padle iz 12,8 na 2,4  $\mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v obremenjenih in iz 9,7 na 0,9  $\mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v kontrolnih mikrokozmih.

Produkcija CO<sub>2</sub> v oksičnih razmerah z vrednostmi  $Q_{10} < 2$  je kazala nizko odvisnost od temperature (Preglednica 1). V anoksičnih razmerah so bile  $Q_{10}$  vrednosti višje, prišlo pa je še do razlike v  $Q_{10}$  vrednostih kontrolnih ( $Q_{10} = 3,5$ ) in obremenjenih ( $Q_{10} = 2,5$ ) vzorcev tal, saj je prisotnost nitrata pri 4 °C zvišala hitrost produkcije CO<sub>2</sub> in posledično znižala temperaturno odvisnost samega procesa (Preglednica 1).



Slika 9. Vpliv temperature in dodatka mineralnega dušika na mineralizacijo organskega ogljika v oksičnih in anoksičnih razmerah pri 28 °C in 4 °C. Prikazane so kumulativne emisije CO<sub>2</sub> med 10 in 51-dnevno oksično inkubacijo, ki ji je sledila 20 in 150-dnevna anoksična inkubacija pri 28 °C in 4 °C v neobremenjenih mikrokozmi (K) in eksperimentalnih mikrokozmi (E), v katere je na začetku bil dodan amonij (~500  $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}\text{st}$ ). Podatki so predstavljeni kot povprečne vrednosti, izmerjene v treh naključno izbranih mikrokozmi, s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja.

Figure 9 Influence of temperature and mineral nitrogen application on carbon mineralization in oxic and anoxic conditions at 28 °C and 4 °C. Cumulative CO<sub>2</sub> emission during 10-days and 51-days of oxic incubation followed by 20 and 147 days of anoxic incubation were determined in intact (K) and experimental microcosms (E) that were amended with ~500  $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}\text{st}$ . The data are presented as average values and 95 % confidence intervals.

#### 4.3.1.3 Hitrosti pretvorb mineralnega dušika in produkcije CO<sub>2</sub> v odvisnosti od temperature, oksičnih/anoksičnih razmer in obremenitve z mineralnim dušikom

Hitrost nitrifikacije pri 4 °C je bila signifikantno višja od hitrosti denitrifikacije, medtem ko sta bili pri 28 °C nitrifikacijska in denitrifikacijska hitrost višji kot pri 4 °C in se nista signifikantno razlikovali (Preglednica 1). Nižji temperaturni koeficient  $Q_{10}$  kaže na manjšo odvisnost nitrifikacije od temperature v primerjavi z denitrifikacijo, čeprav pa se  $Q_{10}$  nitrifikacije in denitrifikacije nista signifikantno razlikovala.

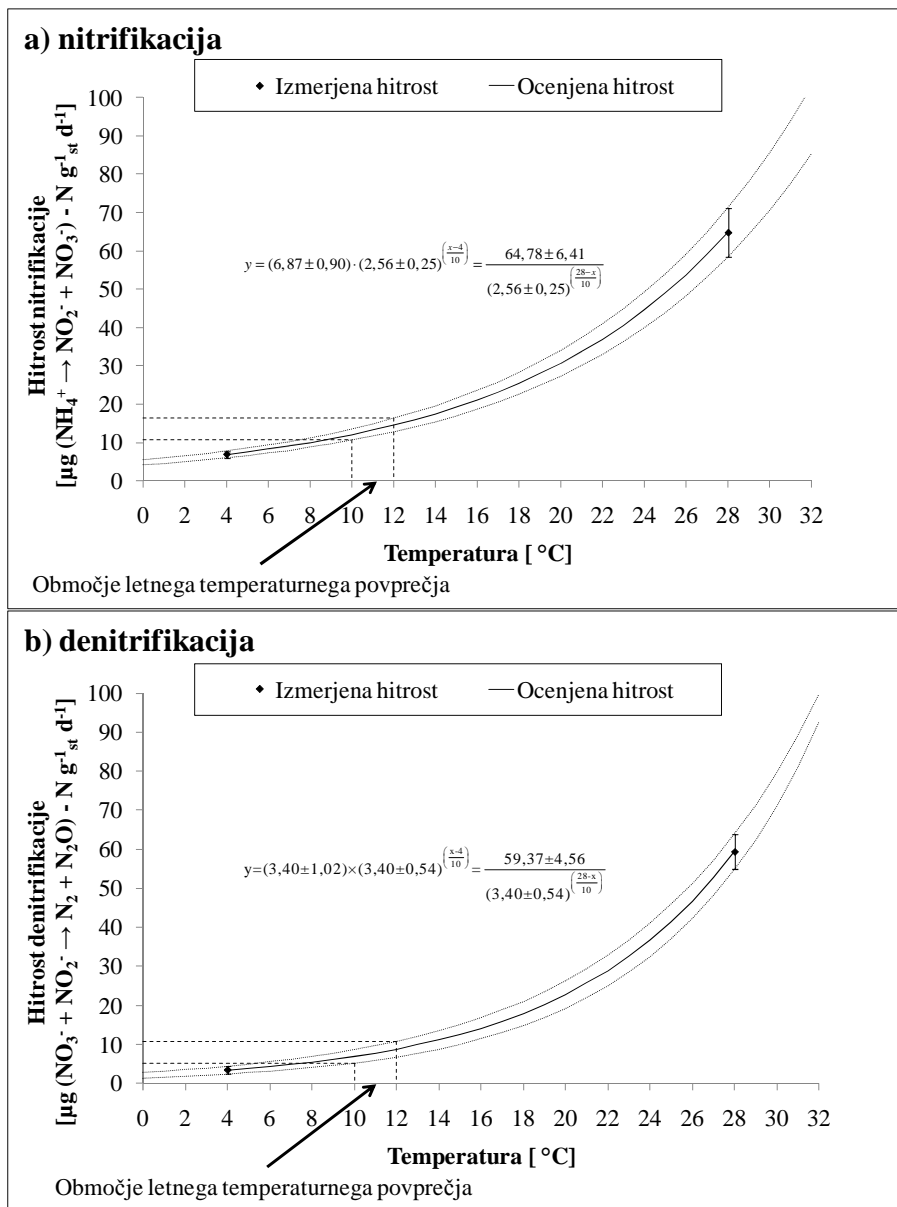
Produkcija N<sub>2</sub>O v oksičnih razmerah je bila v kontrolnih tleh neodvisna od temperature ( $Q_{10} = 1$ ). V bremenjenih vzorcih pa so bile emisije višje pri nižji temperaturi ( $Q_{10} < 1$ ). V anoksičnih razmerah je bila hitrost redukcije nitrata signifikantno višja pri 28 °C. Podoben vpliv temperature smo izmerili tudi za emisije N<sub>2</sub>O (podobne  $Q_{10}$  vrednosti), vendar so bile hitrosti redukcije nitrata pri obeh temperaturah približno 3-krat višje od emisij N<sub>2</sub>O (Preglednica 1).

Preglednica 1. Hitrosti oksidacije amonija in redukcije nitrata ter hitrosti oksidne in anoksične produkcije dušikovega oksidula in ogljikovega dioksida svežih tal v odvisnosti od temperature. Hitrosti v kontrolnih (K) in z mineralnim dušikom obremenjenih (E) mikrokozmih so bile pridobljene z linearno regresijo koncentracij zvrsti mineralnega N in C v času. Zaradi nizkih koncentracij pretvorbe mineralnega N niso bile določene (nd) v vzorcih K. V tabeli so prikazane povprečne hitrosti in  $Q_{10}$  vrednosti s 95 % intervali zaupanja. Izračunane hitrosti pretvorb N in C zvrsti so signifikantno različne ( $p < 0,05$ ), če se poleg njih nahajajo različne črke (a - r).

Table 1 Temperature dependence of ammonium oxidation to nitrate (oksidacija amonija), nitrate reduction to nitrogen gases (redukcija nitrata) and  $N_2O$  and  $CO_2$  production (produkcija) in oxic (oksidno) and anoxic (anoksično) conditions with corresponding temperature coefficients  $Q_{10}$ . The rates in ammonium amended (E) and control (K) samples were obtained by linear regression of temporal N and C concentration changes and are presented as average values with 95 % confidence intervals. If letters (a - r) next to the values are different, the values are significantly different ( $p < 0.05$ ) according Student t test. nd – not determined, st = dry soil

Proces	Vzorec	Hitrosti [ $\mu\text{g N oz.C g}^{-1}\text{st}^{-1}\text{d}^{-1}$ ]		Temperaturni koeficient $Q_{10}$
		4 °C	28 °C	
Oksidacija amonija ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ )	K	nd	nd	nd
	E	$7 \pm 1$ a	$65 \pm 6$ j	$2.6 \pm 0.3$ n
oksidno produkcija $N_2O$	K	$0.013 \pm 0.001$ b	$0.013 \pm 0.003$ b=k	$1.0 \pm 0.1$ o
	E	$0.190 \pm 0.013$ c	$0.074 \pm 0.041$ g	$0.7 \pm 0.2$ o
produkcija $CO_2$	K	$9.7 \pm 0.1$ d	$26 \pm 4$ l	$1.5 \pm 0.1$ p
	E	$12.8 \pm 0.1$ e	$29 \pm 4$ l	$1.4 \pm 0.1$ p
Redukcija nitrata ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ )	K	nd	nd	nd
	E	$3.40 \pm 1.02$ f	$59 \pm 5$ j	$3.4 \pm 0.5$ n=r
anoksično produkcija $N_2O$	K	$0.05 \pm 0.03$ g	$0.01 \pm 0.05$ k	$0.8 \pm 0.8$ o=p
	E	$1,09 \pm 0,12$ h	$19 \pm 2$ m	$3,3 \pm 0.3$ r
produkcija $CO_2$	K	$0.92 \pm 0.03$ i	$19 \pm 1$ m	$3.5 \pm 0.2$ r
	E	$2.37 \pm 0.09$ f	$20 \pm 1$ m	$2.4 \pm 0.1$ n

#### 4.3.1.4 Aproksimacije hitrosti nitrifikacije in denitrifikacije pri povprečnih letnih temperaturah



Slika 10. Vpliv temperature na nitrifikacijo (a) in denitrifikacijo (b) v tleh. Spremembe nitrifikacijskih in denitrifikacijskih hitrosti v temperaturnem območju 0 – 32 °C izhajajo iz aproksimacije izmerjenih nitrifikacijskih in denitrifikacijskih hitrosti pri 4 °C in 28 °C s funkcijo, ki je bila izpeljana iz enačbe za temperaturni koeficient  $Q_{10}$ . Hitrosti sta predstavljeni kot točki s pripadajočima 95 % intervaloma zaupanja, povezani s funkcijo temperaturnega koeficienta  $Q_{10}$  (—), omejeno s 95 % intervalom zaupanja (.....). Ocena hitrosti nitrifikacije in denitrifikacije v območju povprečne letne temperature (10 - 12 °C) je označena s prekinjeno črto (- - -).

Figure 10 Influence of temperature on nitrification (a) and denitrification (b) rates. Nitrification and denitrification rates were measured at 4 °C and 28 °C (izmerjena hitrost) and estimated (ocenjena hitrost) in the range of temperatures from 0 °C to 32 °C were approximated using the function derived from the equation for  $Q_{10}$  value calculations. The rates are presented as data points with 95 % confidence intervals and connected with the  $Q_{10}$  function (—) limited by 95 % confidence interval (- - -).

Hitrosti ( $R_1$  in  $R_2$ ) nitrifikacije in denitrifikacije pri  $T_1 = 4$  °C in  $T_2 = 28$  [°C], s pripadajočimi  $Q_{10}$  vrednostmi za nitrifikacijo in denitrifikacijo so prikazane v Tabeli 1. Spremembe nitrifikacijskih (Slika 9a) in denitrifikacijskih hitrosti (Slika 9b) v odvisnosti od temperature so bile opisane s funkcijo, izpeljano iz enačbe za temperaturni koeficient  $Q_{10}$ . Nitrifikacijske hitrosti bi po teh ocenah pri povprečnih letnih temperaturah (10 - 12 °C) znašale  $11 - 16 \mu\text{g} (\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ , denitrifikacijske pa  $5 - 11 \mu\text{g} (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med tremi oksičnimi/anoksičnimi cikli v tleh, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C

Tla, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C, so bila uporabljena v eksperimentu s tremi oksičnimi/anoksičnimi cikli. Prvi oksični/anoksični cikel je bil zastavljen analogno prej opisanemu ciklu s sveže vzorčenimi tlemi (Slika 7), le da je bila na račun znižane denitrifikacijske hitrosti v 6 mesecev shranjenih tleh anoksična faza podaljšana (Slika 11) in da so inkubacije mikrokozmov potekale le pri 28°C.

Po šestih mesecih hranjenja tal pri 4 °C se je v tleh akumuliralo  $11 \pm 2 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  in  $123 \pm 11 \mu\text{g} (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . Na začetku eksperimenta je bil v kontrolna tla dodan nitrat ( $400 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), v eksperimentalna pa poleg nitrata še amonij (prvi cikel:  $100 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ , ob začetku drugega oziroma tretjega cikla pa  $200$  oziroma  $300 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). V tabeli (Preglednica 2) so prikazane izmerjene gravimetrične koncentracije po dodatku mineralnega dušika v kontrolna in eksperimentalna tla, ki so preračunane tudi na površinske in hipotetične koncentracije dušika. Tako je npr. dodatek amonija ( $100 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) bil ekvivalenten površinski obremenitvi 1-cm debelega sloja tal s  $6,35 \text{ kg N Ha}^{-1}$ , hipotetično pa to predstavlja aplikacijo  $190 \text{ kg N Ha}^{-1}$  na originalno vzorčen sloj tal globine 0 - 30 cm (Preglednica 2).

V oksični fazi prvega cikla se je celokupen amonij ( $111 \pm 17 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) že po dveh dneh pretvoril do nitrata ( $118 \pm 29 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), ki je skupaj z nitratom, prisotnim na začetku eksperimenta znašala  $639 \pm 11 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . Do 7. dne inkubacije je količina nitrata, kljub nizki vsebnosti amonija v tleh, še naprej naraščala in dosegla vrh po sedmih dneh inkubacije ( $696 \pm 7 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Podoben trend naraščanja nitrata med inkubacijo smo izmerili tudi v kontrolnih vzorcih, ki so od začetka vsebovali nizke koncentracije amonija. Do konca oksične faze je koncentracija nitrata v bremenjenih mikrokozmih nekoliko padla in se ustalila pri  $652 \pm 21 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . Predvidevamo, da je v prvi fazi oksičnega cikla, najverjetneje hkrati z nitrifikacijo, v zaznavni meri potekala tudi mineralizacija organske snovi, s katero se je do 7. dne sproščal dodaten amonij. Verjetno je tudi v oksičnih razmerah prišlo do pojava anoksičnih mikro-niš, kjer je potekala denitrifikacija in zaradi katere je koncentracija nitrata padla med sedmim in desetim dnevom inkubacije. Med oksičnimi fazami sledečih dveh ciklov je bila začetna koncentracija amonija (Slika 11a) ekvivalentna ( $p > 0,05$ ) končni koncentraciji nitrata

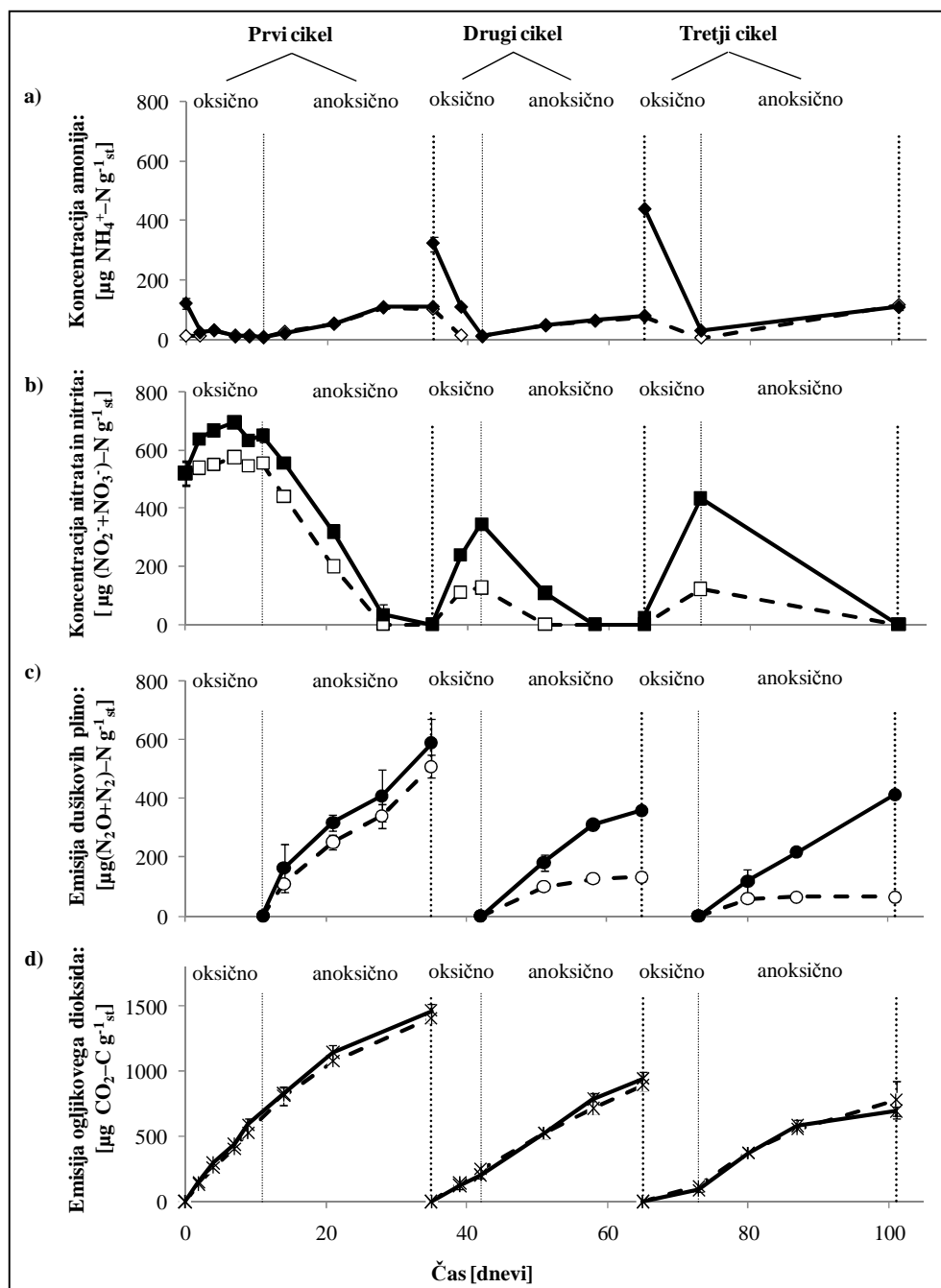
(Slika 11b), slednji pa se je med anoksičnimi fazami iz tal odstranjeval v obliki ekvivalentnih količin ( $p > 0,05$ ) dušikovih plinov (Slika 11c).

Podobno kot v oksičnem/anoksičnem ciklu s sveže vzorčenimi tlemi (Slika 9a), tudi v vseh treh ciklih, izvedenih s 6 mesecev shranjenimi tlemi, ni bilo signifikantnih razlik v kumulativni emisiji  $\text{CO}_2$  ( $p > 0,05$ ) med kontrolnimi in obremenjenimi vzorci tal (Slika 11d). Produkcija  $\text{CO}_2$  pa je padala s številom ciklov (Preglednica 3).

Preglednica 2. Koncentracije amonija, nitrata in nitrita ter skupnega mineralnega dušika na začetku treh oksičnih/anoksičnih ciklov v tleh, ki so bila 6 mesecev shranjena pri 4 °C. Prikazana je gravimetrična vsebnost posameznih zvrsti mineralnega dušika ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) in njihova vsota (Skupni  $\text{N}_{\text{min}}$ ) v neobremenjenih (K) in z amonijem obremenjenih (E) mikrokozmih s tlemi. Gravimetrične koncentracije v obremenjenih vzorcih so bile preračunane v površinske količine 1 cm debelega sloja tal v mikrokozmih oz. hipotetične količine originalnega 0 - 30 cm globokega sloja tal. Koncentracije so podane kot povprečne vrednosti ( $n = 3$ ) s 95 % intervali zaupanja. Prikazane vrednosti so signifikantno različne ( $p < 0,05$ ), če se poleg njih nahajajo različne črke (a - j).

Table 2 Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate and nitrite ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) and total mineral nitrogen (Skupni  $\text{N}_{\text{min}}$ ) at the beginning of three oxic/anoxic cycles performed in soil that was previously stored at 4 °C for 6 months. Gravimetric concentrations (gravimetrična) in ammonium amended soil were recalculated to areal values (površinska) which refer to mineral nitrogen amounts of 1 cm thick soil layer. Areal concentrations were extrapolated to hypothetical soil concentrations (hipotetična) in original 0 - 30 cm soil layer. Small letters (a - j) lying next to the gravimetric values denote the results of Student t-test. If letters (a - r) next to the values are different, the values are significantly different ( $p < 0.05$ ) according Student t test. nd - not determined, st = dry soil

		Prvi cikel	Drugi cikel	Tretji cikel	Skupni $\text{N}_{\text{min}}$
Vsebnost	mineralnega	Gravimetrične koncentracije [ $\mu\text{g N g}^{-1}_{\text{st}}$ ]			
dušika:					
K	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	11 ± 2 a	101 ± 5 b	65 ± 2 c	177 ± 6 d
	$(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N}$	521 ± 38 e	0	0	521 ± 38 e
	Skupni $\text{N}_{\text{min}}$	532 ± 38 e	101 ± 5 b	65 ± 2 c	698 ± 38 f
E	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	122 ± 16 b	323 ± 24 g	438 ± 1 h	883 ± 29 i
	$(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N}$	521 ± 38 e	0	0	521 ± 38 e
	Skupni $\text{N}_{\text{min}}$	643 ± 41 f	323 ± 24 g	438 ± 1 h	1404 ± 48 j
Vsebnost	mineralnega	Površinske koncentracije (1 cm debel sloj tal) [ $\text{kg Ha}^{-1}$ ]			
dušika:					
E	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	8 ± 1	21 ± 2	28 ± 0	56 ± 2
	$(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N}$	33 ± 2	0	0	33 ± 2
	Skupni $\text{N}_{\text{min}}$	41 ± 3	21 ± 2	28 ± 0	89 ± 3
Vsebnost	mineralnega	Hipotetične koncentracije (0 - 30 cm globok sloj tal) [ $\text{kg Ha}^{-1}$ ]			
dušika:					
E	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	232 ± 30	615 ± 46	834 ± 2	1682 ± 55
	$(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N}$	993 ± 72	0	0	993 ± 72
	Skupni $\text{N}_{\text{min}}$	1225 ± 78	615 ± 46	834 ± 2	2675 ± 90



Slika 11. Potencialne pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med tremi zaporednim cikli oksičnih in anoksičnih razmer v tleh. Tla so bila pred ciklično inkubacijo hranjena šest mesecev pri 4 °C. Koncentracije amonija (a), nitrata in nitrita (b) ter kumulativne emisije dušikovih plinov (c) in ogljikovega dioksida (d) pri 28 °C so bile izmerjene v rednih intervalih med inkubacijo talnih mikrokozmov. Tla so bila na začetku vsakega cikla obremenjena z amonijem (—), kot kontrola pa so služila neobremenjena tla (- - -). Podatki so predstavljeni kot povprečne vrednosti (n = 3) s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja.

Figure 11 Potential nitrogen transformations during three sequential oxic/anoxic cycles in soil after 6 months of storage at 4 °C. Ammonium (a), nitrate and nitrite (b), cumulative nitrogen gases (c) and carbon dioxide (d) emission were measured in regular intervals during incubation of intact (- - -) and ammonium amended soil microcosms (—) at 28 °C. Ammonium was added at the beginning of each oxic/anoxic cycle. The data are presented as average values (n = 3) and 95 % confidence intervals. st = dry soil

Vrednost pH in koncentracija nitrata sta med eksperimentom negativno korelirala (Slika ). Najvišje pH vrednosti tal (pH 7,4 - 7,8) so bile izmerjene na začetku drugega in tretjega cikla, ko v tleh ni bilo nitrata, najnižje pa na koncih ciklov (pH 6,9 - 7,5), ko je bila koncentracija nitrata najvišja.

#### 4.3.2.1 Hitrosti mikrobnih procesov v 6 mesecev shranjenih tleh v odvisnosti od števila oksično/anoksičnih ciklov

Nitrifikacijske hitrosti so bile merjene na dva načina: preko hitrosti porabe (oksidacije) amonija in preko hitrosti nastajanja nitrata in nitrita (Preglednica 3). Hitrost oksidacije amonija je bila ekvivalentna hitrosti nastanka nitrata in nitrita ( $p > 0,05$ ) v vseh treh oksičnih fazah ciklov. Ravno tako se nitrifikacijske hitrosti v posameznih ciklih niso signifikantno razlikovale (Slika 12a) in so znašale  $40 - 52 \mu\text{g} (\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ .

V treh anoksičnih fazah ciklov so bile hitrosti porabe nitrata in nitrita ekvivalentne hitrostim nastanka dušikovih plinov ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ), kar definira denitrifikacijo (Preglednica 3). Hitrosti denitrifikacije so znašale  $14 - 38 \mu\text{g} (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  in so bile signifikantno nižje ( $p < 0,05$ ) od nitrifikacijskih hitrosti. Poleg tega so denitrifikacijske hitrosti signifikantno padle z vsakim ciklom ( $p < 0,05$ ). Tako se je pokazala močna negativna linearna ( $R^2 = 0,95$ ) korelacija denitrifikacije in števila ciklov, ki v hipotetičnem petem oksičnem/anoksičnem ciklu projecira terminacijo procesa denitrifikacije (Slika 12a).

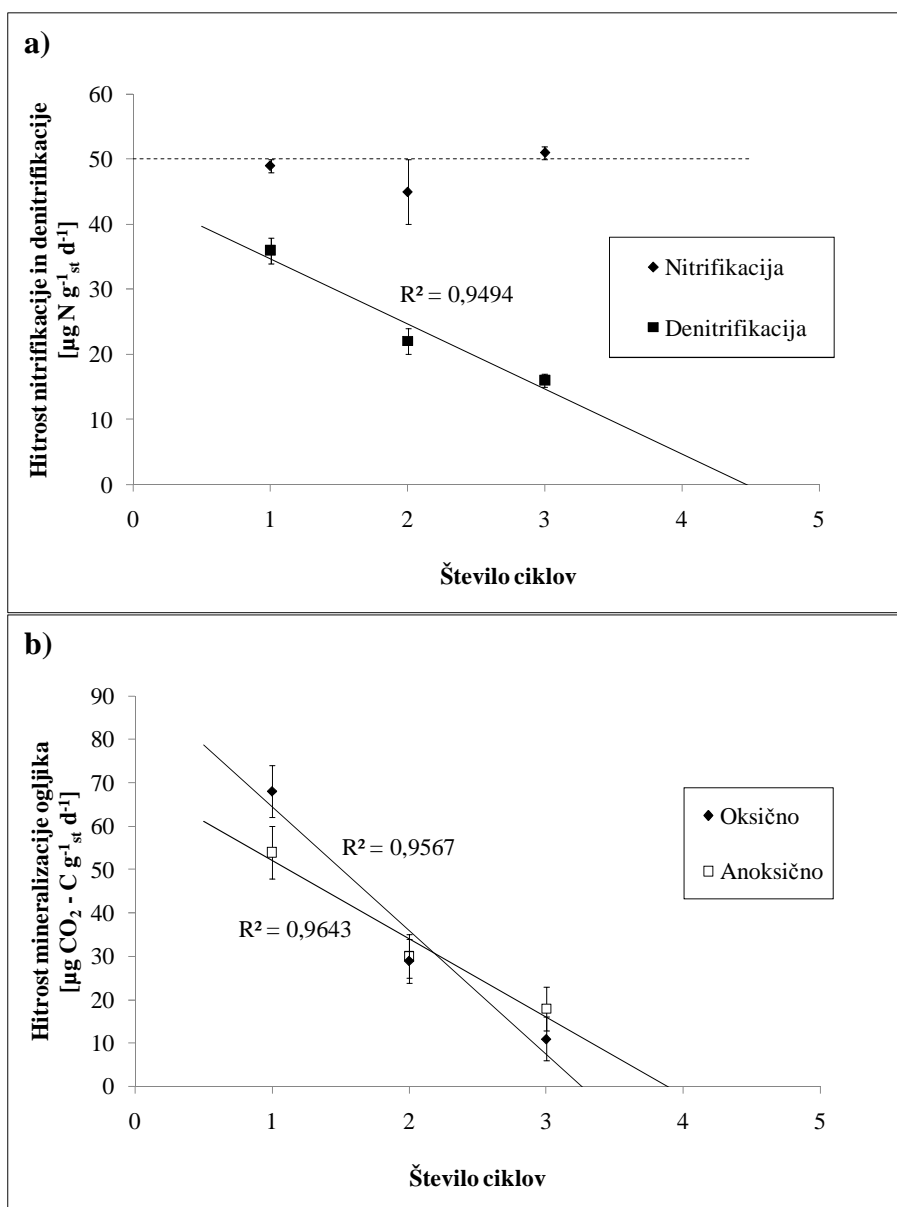
Hitrosti produkcije  $\text{CO}_2$  so bile, tako kot denitrifikacijski potenciali, v obremenjenih in neobremenjenih vzorcih tal podobne ( $p > 0,05$ ) in so upadale iz cikla v cikel ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 3). Linearna regresija oksične produkcije  $\text{CO}_2$  v odvisnosti od števila ciklov ( $R^2 = 0,96$ ) napoveduje znižanje talne respiracije pod zaznavno mejo že na začetku četrtega cikla, medtem ko naj bi se anoksična respiracija ( $R^2 = 0,96$ ) prenehala na koncu četrtega oksičnega/anoksičnega cikla (Slika 12b).

Preglednica 3. Hitrosti nitrifikacije, denitrifikacije, neto mineralizacije in koncentracija raztopljenega organskega ogljika v talnih mikrokozmih med tremi oksičnimi/anoksičnimi cikli pri 28 °C. Hitrosti v kontrolnih (K) in z mineralnim dušikom obremenjenih (E) mikrokozmih so bile pridobljene z linearno regresijo koncentracij zvrsti mineralnega N in C v času. Zaradi nizkih koncentracij pretvorbe mineralnega N niso bile določene (nd) v vzorcih K. V tabeli so prikazane povprečne hitrosti in  $Q_{10}$  vrednosti s 95 % intervali zaupanja. Izračunane hitrosti pretvorb N in C zvrsti in koncentracij DOC so signifikantno različne ( $p < 0,05$ ), če se poleg njih nahajajo različne črke (a - e).

Table 3 Nitrification (oksidacija amonija - nitrifikacija) and denitrification (redukcija nitrata - denitrifikacija) rates, oxic and anoxic  $CO_2$  production rates (neto mineralizacija org. ogljika – oksično/anoksično) and Dissolved Organic Carbon (DOC) concentrations in soil microcosms at 28 °C during 1st (Prvi), 2nd (Drugi) and the 3rd (Tretji) sequential oxic/anoxic cycle at 28 °C. The rates were obtained by linear regressions of mineral N and C transformations in time. The data are presented as average values with 95 % confidence intervals. If letters (a - e) next to the values are different, the values are significantly different ( $p < 0.05$ ) according Student t test. st = dry soil

Vzorec:	Prvi cikel	Drugi cikel	Tretji cikel	
	Oksidacija amonija – nitrifikacija			
E	- 49 ± 1 a	- 45 ± 5 a	- 51 ± 1 a	[ $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
E	+ 39 ± 11 a=b	+ 50 ± 5 a	+ 51 ± 4 a	[ $\mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
	Redukcija nitrata – denitrifikacija			
E	- 36 ± 2 b	- 22 ± 2 b=c	- 16 ± 1 d	[ $\mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
E	+ 30 ± 8 b	+ 19 ± 1 c	+ 15 ± 1 d	[ $\mu\text{g (N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
	Neto mineralizacija org. ogljika – oksično			
E	68 ± 15 a	29 ± 4 b	11 ± 2 c	
K	60 ± 8 a	35 ± 2 b=d	15 ± 2 c	[ $\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
	Neto mineralizacija org. ogljika – anoksično			
E	54 ± 6 a	30 ± 5 b	18 ± 5 c=e	
K	52 ± 11a	24 ± 2 b	20 ± 4 e	[ $\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ ]
	Vsebnost DOC - oksično			
E	75 ± 34 a=b	116 ± 61 a=b	82 ± 49 a=b	
K	41 ± 19 a	190 ± 152 a=b	165 ± 80 a=b	[ $\mu\text{g C g}^{-1}_{\text{st}}$ ]
	Vsebnost DOC - anoksično			
E	106 ± 75 a=b	62 ± 23 a=b	96 ± 36 a=b	
K	181 ± 162 a=b	117 ± 87 a=b	147 ± 76 b	[ $\mu\text{g C g}^{-1}_{\text{st}}$ ]

Vsebnost DOC na začetkih in koncih oksičnih in anoksičnih faz ciklov je bila zelo variabilna in se je gibala med 19 - 245  $\mu\text{g C g}^{-1}_{\text{st}}$ . Med DOC in oksičnimi, anoksičnimi pogoji, časom, številom ciklov, emisijami  $CO_2$ , pH in ostalimi parametri, merjenimi med eksperimentom, ni bilo očitnih korelacij (Preglednica 3).

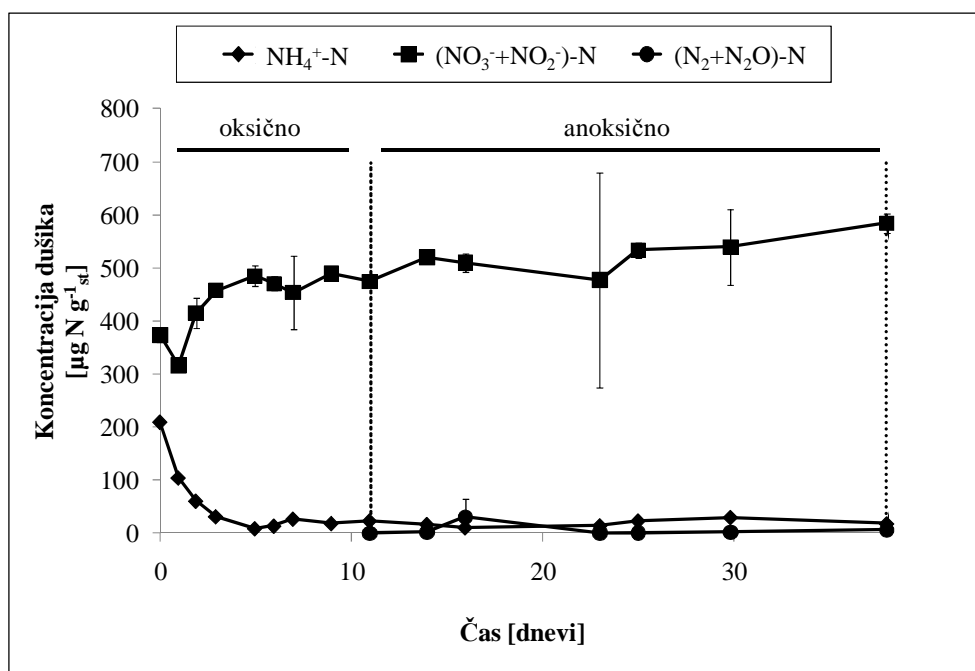


Slika 12. Vpliv števila oksičnih/anoksičnih ciklov na nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial tal (a) in mikrobovo respiracijo pri 28 °C (b). Nitrifikacijska, denitrifikacijska in hitrost oksične in anoksične mineralizacije organskega ogljika so predstavljene kot povprečne izračunane vrednosti, skupaj s 95 % intervali zaupanja. Prikazana je prekinjena črta (-----), ki označuje povprečno nitrifikacijsko aktivnost na začetku in na koncu oksičnih/anoksičnih ciklov ter trendne črte (—) s koeficienti determinacije ( $R^2$ ), ki opisujejo linearne regresije podatkov o hitrostih.

Figure 12 Soil nitrification (nitrifikacija), denitrification (denitrifikacija) (a) and oxic (oksično) and anoxic (anoksično) carbon mineralization rates (hitrost mineralizacije ogljika) (b) and dependence of the number of oxic/anoxic cycles performed at 28 °C. The rates are presented as average values with 95 % confidence intervals. Dotted line (-----) represents average nitrification rate from the first and the third oxic/anoxic cycle and the trendlines (—) of linear regressions with coefficients of determination ( $R^2$ ) represent denitrification rates and oxic/anoxic  $\text{CO}_2$  production rates in relation to the cycle number.

### 4.3.3 Pretvorbe mineralnega dušika in mineralizacija organskega ogljika med hranjenjem tal pri 4 °C

Tla so bila 1 leto shranjena pri 4 °C, nato pa so bila uporabljena v oksično/anoksičnem ciklu, ki je bil zastavljen na enak način kot za sveža (Slika 7) in 6 mesecev (Slika 11) shranjena tla. Po shranjevanju so bila tla inkubirana pri 28 °C in dodan je bil amonij ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Med 12-mesečnim shranjevanjem pri 4 °C se je v tleh akumuliralo  $374 \pm 13 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . Oksična faza cikla je trajala 11 dni, anoksična pa nadaljnjih 27 dni. V oksični fazi se je amonij oksidiral do končne koncentracije  $471 \pm 5 \mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ . V anoksični fazi pa ni prišlo do denitrifikacije (Slika 13).

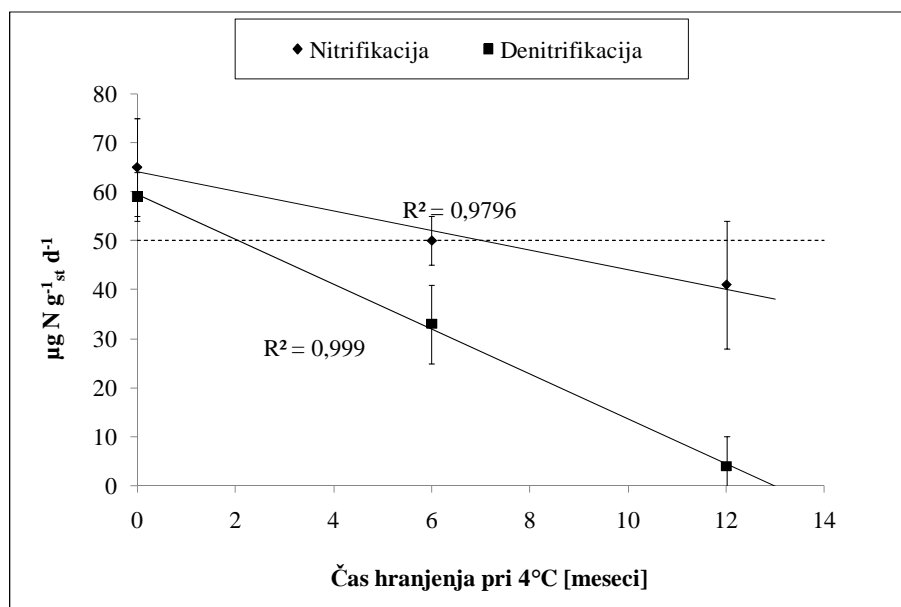


Slika 13. Potencialne pretvorbe mineralnega dušika med oksičnim/anoksičnim ciklom v tleh po 12. mesecih hranjenja pri 4 °C. Koncentracije amonija ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrata in nitrita ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) ter kumulativne emisije dušikovih plinov ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ) so bile izmerjene v rednih intervalih med 10-dnevno oksično, ki ji je sledila 30-dnevna anoksična inkubacija talnih mikrokozmov pri 28 °C. Tla v mikrokozmih so bila na začetku inkubacije obremenjena z amonijem ( $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ). Podatki o mineralnem dušiku so bili pridobljeni z destruktivnim vzorčenjem dveh mikrokozmov ( $n=2$ ), podatki o emisijah  $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$  pa iz treh naključno izbranih mikrokozmov ( $n=3$ ) in so predstavljeni kot povprečne vrednosti s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja.

Figure 13 Potential mineral nitrogen transformations during oxic/anoxic cycle in soil that was stored at 4 °C for 12 months. Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrite and nitrate ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) and cumulative nitrous oxide and nitrogen gas ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ) emission was measured in regular intervals during 10-day oxic and 30-day anoxic incubation of ammonium amended microcosms at 28 °C. The mineral nitrogen data were collected by destructive sampling of two replicate microcosms, while the gas phase of three replicate microcosms was analyzed for  $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$  at each sampling. The data are presented as average values with 95 % confidence intervals.

#### 4.3.3.1 Nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial v tleh, hranjenih eno leto pri 4 °C

Oksidacija  $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  je popolnoma potekla v petih dneh, medtem ko se je v svežih tleh v osmih dneh nitrificiralo kar  $500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  (Slika 7). Hitrost nitrifikacije je v prvih dveh dneh bila podobna kot v svežih tleh. Količina amonija je do petega dne eksponentno padala ( $R^2 = 0,99$ ). Hitrost nitrifikacije je znašala  $41 \pm 13 \mu\text{g (NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  in je bila signifikantno nižja ( $p < 0,05$ ) kot v svežih ( $65 \pm 6$ ), ne pa tudi 6 mesecev shranjenih tleh ( $p > 0,05$ ), kjer je znašala  $44 \pm 11 \mu\text{g (NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  (Slika 14). Do terminacije nitrifikacije v tleh bi po projekciji linearne regresije (Slika 14) prišlo šele po 32 mesecih oz. dveh letih in osmih mesecih hranjenja pri 4 °C.

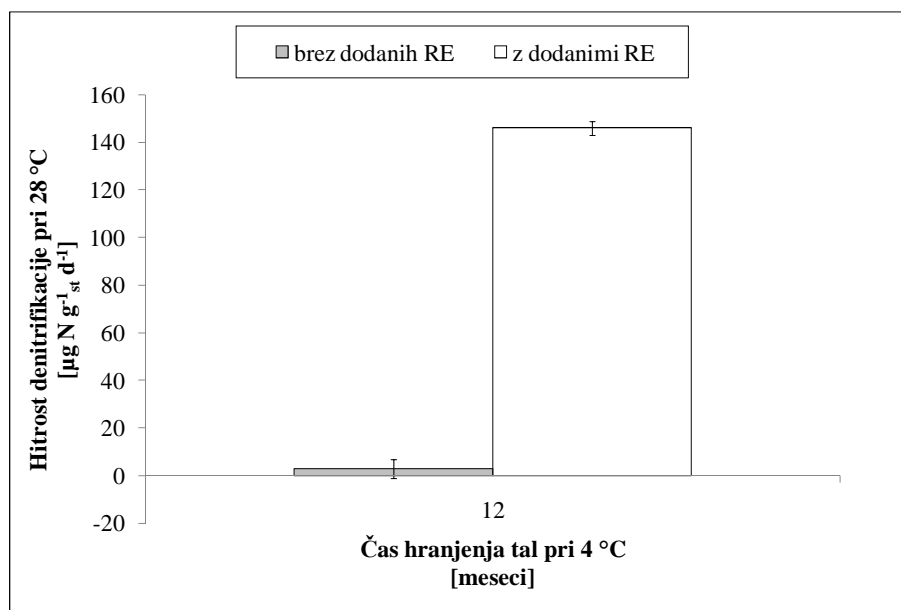


Slika 14. Vpliv hranjenja tal pri 4 °C na nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial tal. Nitrifikacijska, denitrifikacijska in hitrost sta predstavljeni kot povprečne izračunane vrednosti, skupaj s 95 % intervali zaupanja. Prikazana je prekinjena črta (-----), ki označuje povprečno nitrifikacijsko aktivnost v 6 mesecev shranjenih tal, medtem ko trendna črta (—) s koeficientom determinacije ( $R^2$ ) opisuje linearno regresijo denitrifikacijske hitrosti v času.

Figure 14 Influence of storage at 4 °C on soil nitrification (nitrifikacija) and denitrification (denitrifikacija) potential at 28 °C. Nitrification and denitrification rates are presented as average values with 95 % confidence intervals. Dotted line (-----) present average nitrification rate in 6 months stored soil, while the trend line (—) of linear regression of temporal changes of denitrification rate is presented with its coefficient of determination ( $R^2$ ).

Za razliko od nitrifikacijskih hitrosti pa so bile denitrifikacijske hitrosti v tleh, ki so bila hranjena pri 4 °C, signifikantno nižje ( $p < 0,05$ ). Slednje so upadle iz  $59 \pm 5$  v sveže vzorčenih tleh (Preglednica 1) na  $33 \pm 8$  v 6 mesecev hranjenih tleh in na  $4 \pm 6 \mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v 12 mesecev hranjenih tleh (Preglednica 3). Linearna regresija potencialnih denitrifikacijskih hitrosti v odvisnosti od hranjenja pri 4 °C (Slika 14) kaže, da bi denitrifikacija prenehala po 13. mesecih hranjenja tal.

Za upočasnjeno denitrifikacijo v tleh, hranjenjenih pri 4 °C, bi lahko bilo odgovorno pomanjkanje dostopnih substratov, npr. rastlinskih eksudatov v tleh. Zato je bil izveden dodaten podeksperiment, v katerem so bili v tla dodani sintetični rastlinski eksudati (Slika 15). Denitrifikacijska hitrost se je takoj po dodatku zvišala na  $146 \pm 3 \mu\text{g} (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}) - \text{N} \text{ g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$ , kar je več kot 2-kratno zvišanje denitrifikacijske hitrosti.



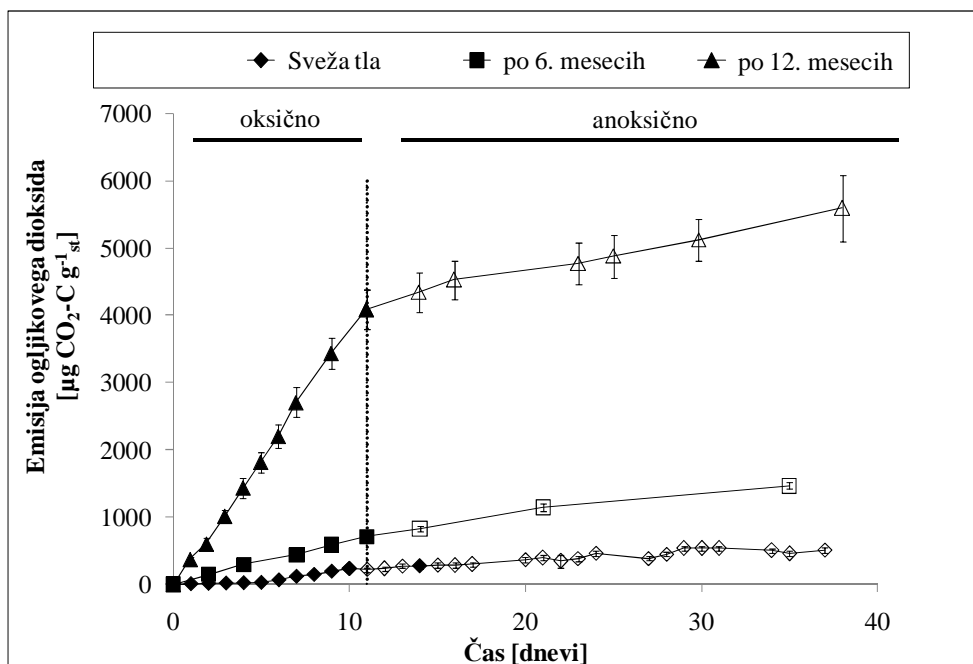
Slika 15. Dodatek sintetičnih rastlinskih eksudatov in hitrost denitrifikacije v tleh. Rastlinski eksudati (RE) so bili dodani v tla, ki so bila 12 mesecev shranjena pri 4 °C. Denitrifikacijska hitrost pri 28 °C je bila ugotovljena pred in po dodatku rastlinskih eksudatov ter je predstavljena kot povprečna vrednost s pripadajočim 95 % intervalom zaupanja.

Figure 15 Synthetic plant exudates (RE) addition and soil denitrification rates in soil that was stored at 4 °C for 12 months. Denitrification rates were determined at 28 °C before and after the RE addition and are presented as average values with 95 % confidence intervals.

#### 4.3.3.2 Oksična in anoksična mineralizacija organskega ogljika v odvisnosti od časa shranjevanja tal pri 4 °C

Kumulativna emisija CO<sub>2</sub> po enajstih dneh oksične inkubacije tal pri 28 °C, ki so bila predhodno 12 mesecev shranjena pri 4 °C, je bila 6-krat višja od te emisije pri 6 mesecev shranjenih tleh ter 12-krat višja od emisije CO<sub>2</sub> sveže vzorčenih tal (Slika 16). Hitrosti oksične produkcije CO<sub>2</sub> so bile  $26 \pm 6$  v svežih tleh (Preglednica 1),  $64 \pm 17$  v 6 mesecev shranjenih tleh (Preglednica 3) ter  $388 \pm 42 \mu\text{g} \text{CO}_2 - \text{C} \text{ g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v 12 mesecev shranjenih tleh.

V anoksičnih pogojih so hitrosti produkcije CO<sub>2</sub> znašale  $20 \pm 1$  v svežih tleh,  $58 \pm 13$  v 6 mesecev shranjenih tleh ter  $54 \pm 13 \mu\text{g} \text{CO}_2 - \text{C} \text{ g}^{-1}_{\text{st}} \text{d}^{-1}$  v 12 mesecev shranjenih tleh. Med hitrostjo anoksične produkcije CO<sub>2</sub> 6 in 12 mesecev shranjenih tal ni bilo significantne razlike ( $p > 0,05$ ).



Slika 16. Vpliv hranjenja tal na oksično in anoksično respiracijo. Kumulativne emisije ogljikovega dioksida pri 28 °C med oksičnim/anoksičnim ciklom svežih tal in tal, ki so bila hranjena pri 4 °C 6 mesecev oziroma 12 mesecev so predstavljene kot povprečne vrednosti s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja  
Figure 16 The influence of soil storage at 4 °C on oxic (oksično) and anoxic (anoksično) respiration. Cumulative CO<sub>2</sub> emission at 28 °C during 10-day oxic phase and 25 – 28-day anoxic phase of oxic/anoxic cycle in freshly sampled soil (sveža tla), 6 months stored soil (po 6. mesecih) and 12 months stored soil (po 12. mesecih). The data are presented as average values with 95 % confidence intervals.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 DENITRIFIKACIJSKA AKTIVNOST IN ZASTOPANOST DENITRIFIKATORJEV V VERTIKALNIH PROFILIH TAL LJUBLJANSKEGA BARJA

Denitrifikacijska encimska aktivnost (DEA) se sicer ugotavlja v anoksičnih razmerah, vendar korelira z dehidrogenazno aktivnostjo (Simek, 2000) in mikrobnno biomaso, podobno kot substratno inducirana respiracija (SIR) (Anderson in Domsch, 2010). Zato DEA odraža okoljske razmere na mestu vzorčenja (Tiedje, 1994) in je posredna mera za splošno mikrobnno aktivnost v tleh (Paul in Clark, 1996), ki je bila tleh Ljubljanskega barja najvišja v zgornjem, 0 - 10 cm sloju tal. Visoke mikrobne aktivnosti so značilne za vrhnje sloje tal, v katerih je delež rastlinske in mikrobne biomase največji (Mergel in sod., 2001).

DEA (Slika 6) je bila znotraj posamezne makro-lokacije prostorsko variabilna in je lahko bila na nekem mestu in na določeni globini komaj zaznavna, medtem ko je na drugem, 1 m oddaljenem mestu na isti globini potekala z bistveno višjimi hitrostmi, kar kaže na obstoj ti. vročih točk (hot spots) denitrifikacije (McClain in sod., 2003; Bruland in sod., 2006). Med makro-lokacijama, od katerih je bila ena onesnažena s točkastim virom gospodinjiskih odplak in druga neonesnažena, je bilo zaznati manjše razlike v DEA. Tako je neonesnažena lokacija na globinah 0 - 20 cm imela signifikantno višjo DEA, na globini 80 - 100 cm pa signifikantno nižjo DEA kot na točkasto onesnaženi lokaciji. Te razlike je moč pripisati prisotnosti povišanih koncentracij mineralnega dušika v onesnaženih tleh, ki v zmernih količinah pozitivno vplivajo na DEA, v previsokih odmerkih pa jo znižajo (Simek, 2000). Po drugi strani pa so te razlike lahko enostavno posledica medsebojne prostorske variabilnosti makro-lokacij (Bruland in sod., 2006).

Število denitrifikacijskih mikroorganizmov je znašalo med  $1 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}_{\text{st}}$  in  $4 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}_{\text{st}}$ , kar je v skladu z rezultati o številu kopij denitrifikacijskih genov *narG*, *nirK* in *nosZ*, ki se je tako v tleh Ljubljanskega barja kot v nekaterih drugih tleh gibalo med  $10^6$  in  $10^8 \text{ g}^{-1}_{\text{st}}$  (Henry in sod., 2006). Število kopij gena 16SrRNA, ki je proporcionalno številu celotne bakterijske populacije, je znašalo med  $10^8$  in  $10^9 \text{ g}^{-1}_{\text{st}}$  (Henry in sod., 2006). V zastopanosti denitrifikacijske populacije (MPN) na posameznih globinah, kot tudi po celotnem vertikalnem profilu tal ni bilo signifikantnih razlik (Slika 6). DEA torej ni bila odvisna od števila denitrifikacijskih organizmov v tleh, ampak od določenih regulatornih okoljskih dejavnikov, ki so vplivali na število sintetiziranih in aktivnih denitrifikacijskih encimov, katerim je DEA proporcionalna (Tiedje, 1994). Vse to kaže, da je strategija preživetja denitrifikacijskih mikroorganizmov v tem okolju K-strategija, ki jo definirata konstantna velikost populacije in kompeticija za razpoložljive substrate (Pianka, 1972). Denitrifikacijski mikroorganizmi tako preživijo daljša obdobja (vsaj 3 mesece) v odsotnosti kisika in nitrata in ob daljši izpostavljenosti stresnim razmeram lahko za preživetje uporabljajo druge metabolne poti (npr. fermentirajo) (Jorgensen in Tiedje, 1993).

Nižja DEA oz. manjše število sintetiziranih denitrifikacijskih encimov (Tiedje, 1994) na globinah 20 - 40 cm bi lahko bilo posledica stresnih razmer za denitrifikacijske mikroorganizme, zaradi nihanja nivoja podtalnice, ki omogoča redne izmenjave oksičnih in anoksičnih razmer (Brune in sod., 2000). Vendar je ta razlaga manj verjetna, saj so denitrifikacijski encimi prisotni celo v anoksičnih mikro-nišah dobro aeriranih tal (Wrage in sod., 2001), kar je v skladu s tem, da je bila DEA v vrhnjih slojih, nad nivojem podtalnice, celo višja kot v nivojih pod podtalno vodo. Zato je za znižano DEA v slojih, izpostavljenih nihanju nivoja podtalnice, bolj verjetna razlaga, da so bili denitrifikacijski mikroorganizmi na teh globinah limitirani z dostopnostjo substratov (Knowles, 1982). Koncentracija nitrata v tleh je bila na mestu točkastega vira onesnaženja rahlo povišana ( $9 \pm 7 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), kar pa ni vplivalo na DEA, saj je bila ta enaka kot DEA neonesnažene lokacije na globini 20 - 40 cm. Zato je bil padec DEA na obeh lokacijah v območju nihanja nivoja podtalnice najverjetneje posledica znižane dostopnosti organskega ogljika (Burford in Bremner, 1975), za katero bi lahko bila odgovorna povišana razgradnja organske snovi na meji oksično/anoksično (Kristensen, 2000) ali pa izpiranje raztopljenega organskega ogljika v globlje sloje tal kot posledica nihanja nivoja podtalnice (Groenendijk in sod., 2005).

Pri primerjavi denitrifikacijskih aktivnosti vseh slojev nad nivojem podtalnice in pod nivojem podtalnice, se je izkazalo, da se je DEA skozi 0 - 1 m globok vertikalni profil tal ohranjala in je na globinah 0 - 40 cm v povprečju znašala  $19 \pm 6 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ , na globinah 40 - 100 cm pa  $13 \pm 2 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ .

## 5.2 OPREDELITEV POTENCIALA TAL LJUBLJANSKEGA BARJA ZA PRETVORBE IN ODSTRANJEVANJE MINERALNIH OBLIK DUŠIKA

Za eksperimente v mikrokozmi, ki so opisani v nadaljevanju, smo vzorčili zgornji 0 - 30 cm sloj tal, ki se nahaja tik nad povprečnim letnim nivojem podtalnice ( $30 \pm 16$  cm). Zgornjih 14 cm tega sloja je v naravi konstantno izpostavljenih oksičnim razmeram, medtem ko se v spodnjih 15. cm skozi leto v rednih intervalih izmenjujejo oksične in anoksične razmere, ki so posledica nihanja nivoja podtalnice (Hacin in sod., 2001) in talnih redox potencialov (Höfferle in sod., 2010).

### 5.2.1 Primernost tal za uporabo v čistilnih procesih iz vidika nekaterih fizikalno-kemijskih lastnosti

Zgornji, 0 - 30 cm globok sloj tal Ljubljanskega barja predstavlja delno razgrajena šota, ki ima vseeno relativno visok delež organskega ogljika (16 %), in je pH nevtralna do alkalna (pH 7 - 8, Slika 5) (Hacin in sod., 2001; Danevčič in sod., 2010). Kljub temu, da izgube dušika z volatilizacijo v nekaterih tleh postanejo signifikantne pri  $\text{pH} > 7$  (Ventura in Yoshida, 1977), je v tleh Ljubljanskega barja volatilizacija amoniaka predstavljala manj

kot 2 % izgub mineralnega dušika (Slika 5), kar pa je najverjetneje posledica negativne korelacije med volatilizacijo amoniaka in količino organske snovi v tleh ter kationsko izmenjevalno kapaciteto tal (Duan in Xiao, 2000). Slednja je pripomogla k sorpciji amonija na negativno nabite talne delce (Wu in McGechan, 1998) in je bila razvidna v prvih dveh urah po dodatku amonija v tla, ko je koncentracija amonija, ki ga je bilo mogoče ekstrahirati z 2 M KCl, naglo padla (Slika 7). Kljub adsorpciji pa je amonij bil dostopen nitrifikacijskim mikroorganizmom (Nielsen, 1996), ki so v oksičnih razmerah proizvedli količino nitrata, ekvivalentno začetni količini dodanega amonija (Slika 7).

Relativno visoke koncentracije nitrata, ki se je med nitrifikacijo akumuliral v tleh, so povzročile le majhne spremembe pH v območju med pH 7 in pH 8 (Slika 5). Močna pufrska kapaciteta ter močna kationsko-izmenjevalna kapaciteta tal v omenjenem območju pH je bila razvidna tudi iz rezultatov eksperimenta z dodajanjem NaOH v tla (Slika 5b). O pufrski kapaciteti tal priča dejstvo, da je bilo potrebno za enako spremembo pH v suspenzijo tal dodati 10-krat več ekvivalentov NaOH, kot v vodno raztopino. O visoki kationsko-izmenjevalni kapaciteti tal pa priča dejstvo, da je bila volatilizacija amoniaka pri povišanem pH suspenzije tal vsaj 2-krat nižja kot volatilizacija iz raztopine amonija (Slika 5b).

Zanemarljiva volatilizacija zaradi sorpcije in pospešene nitrifikacije po dodatku amonija (Poach in sod., 2003) ter močna pufrska kapaciteta tal sta pokazali, da so ta tla iz fizikalno-kemijskega vidika zelo stabilen sistem, ki bi lahko bil celo bolj primeren za uporabo pri odstranjevanju mineralnih oblik dušika, kot aktivno blato čistilnih naprav (Heavey, 2003; Corley in sod., 2006), kjer povišane koncentracije nitrita in nitrata znižajo pH odpadne vode in po negativni povratni zanki blokirajo nitrifikacijo (Ruiz in sod., 2003).

## **5.2.2 Potencialne mikrobne pretvorbe in odstranjevanje mineralnega dušika med izmeničnimi oksičnimi/anoksičnimi cikli**

V mikrokozmi (Slika 3) so bila tla s 75 % WHC = 57 WFPS (Robertson in Groffman, 2007), ki predstavlja optimalno vsebnost vode za nitrifikacijo, respiracijo in mineralizacijo (Linn in Doran, 1984) v tleh. Za denitrifikacijo so bile v mikrokozmi vzpostavljene anoksične razmere (Knowles, 1982; Tiedje, 1994). Ugotavljanje nitrifikacijskega in denitrifikacijskega potenciala med oksičnimi/anoksičnimi cikli je potekalo pri temperaturi 28 °C, ki je optimalna za nitrifikacijo in denitrifikacijo (Saad in Conrad, 1993).

### **5.2.2.1 Nitrifikacijski in denitrifikacijski potencial sveže vzorčenih tal**

Sveža tla so zmogla nitrificirati  $500 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  dodanega amonija v 8. dneh in denitrificirati  $500 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  nastalega nitrata do dušikovih plinov ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ) v 10. dneh pri 28 °C (Slika 7a). Koncentracija nitrita je bila med oksično fazo nizka (Slika

8a) in je predstavljal manj kot 10 % celotne aplikacije mineralnega dušika, kar pomeni da sta bili obe stopnji nitrifikacije ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$  in  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) usklajeni in se nitrit med nitrifikacijo ni akumuliral do toksičnih koncentracij (Gelfand in Yakir, 2008). Kljub temu, da sta se v anoksičnih razmerah v določenih trenutkih v tleh skupaj pojavljala amonij ( $31 \pm 3 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) in nitrit ( $56 \pm 16 \mu\text{g NO}_2^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ), proces anaerobne oksidacije amonija z nitritom do plinastega dušika (anamosis) (Mulder in sod., 1995) ni bil signifikanten.

Eksperiment s sveže vzorčenimi tlemi je torej pokazal, da je v oksičnih razmerah potekla popolna oksidacija amonija do nitrata, medtem ko se je nitrat v anoksičnih razmerah popolnoma reduciral do dušikovih plinov (Slika 7a). Na podlagi teh rezultatov je bila podprta idejna zasnova oksičnih/anoksičnih ciklov, ki so bili sestavljeni iz oksičnih in anoksičnih faz, v katerih je v oksičnih fazah potekala nitrifikacija, v anoksičnih fazah pa denitrifikacija. Z drugimi besedami - v enem oksičnem/anoksičnem ciklu je potekel kompleten dušikov cikel; od aplikacije do pretvorbe in odstranjevanja mineralnega dušika v atmosfero (Paul in Clark, 1996).

#### 5.2.2.2 Pretvorbe in odstranjevanje mineralnega dušika v tleh med tremi zaporednimi oksičnimi/anoksičnimi cikli pri 28 °C

Neonesnažena tla na Ljubljanskem barju so vsebovala maksimalno  $10 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  in maksimalno  $50 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  (Höfferle in sod., 2010). V začetku eksperimenta z zaporednimi oksičnimi/anoksičnimi cikli (Slika 11) so bila tla, ki so bila predhodno 6 mesecev shranjena pri 4 °C, obremenjena tako, da so vsebovala 10-kratne naravne koncentracije mineralnega dušika ( $100 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  in  $500 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ ) (Preglednica 2). Nato so bili izvedeni trije oksični/anoksični cikli (Slika 11). V oksičnih fazah ciklov se je amonij oksidiral do nitrata, v anoksičnih fazah pa se je nitrat reduciral in odstranil iz tal v obliki dušikovih plinov ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ). Na začetku drugega oksičnega/anoksičnega cikla je bilo dodanih  $200 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  amonija in na začetku tretjega  $300 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  (Slika 11, Preglednica 2).

Tla so pri 28 °C v treh zaporednih oksičnih/anoksičnih cikli nitrificirala okoli  $800 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  amonijskega dušika in denitrificirala okoli  $1400 \mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  nitratskega dušika (Preglednica 2). V tretjem ciklu, ko je bila na začetku cikla koncentracija amonija najvišja  $440 \mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$ , hitrost denitrifikacije pa najnižja (Slika 12), so tla med oksično fazo v 8. dneh oksidirala ves dodan amonij, nastali nitrat pa reducirala v dušikove pline ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ) v 28. dneh anoksičnih razmer.

Daljša obdobja za nitrifikacijo neugodnih anoksičnih razmer, ki so sledila oksičnim fazam posameznih ciklov, niso signifikantno vplivala na hitrost nitrifikacije v naslednjih oksičnih fazah (Preglednica 3). Projekcije linearnih regresij hitrosti procesov v odvisnosti od števila oksičnih/anoksičnih ciklov (Slika 12) so pokazale, da zaporedni cikli niso prizadeli

nitrifikacije, vendar pa bi se glede na projekcije po treh do štirih ciklih, kljub visoki vsebnosti organskega ogljika v tleh, prenehala procesa mineralizacije organske snovi in denitrifikacije, kar bi onemogočilo uspešno odstranjevanje mineralnega dušika iz tal po daljšem obdobju uporabe šote, kot substrata.

Denitrifikacijski mikroorganizmi naj bi bili na izmenjave oksičnih in anoksičnih pogojev zelo dobro prilagojeni, saj so to večinoma heterotrofni fakultativno anaerobi, ki v oksičnih razmerah uporabljajo kisik, v anoksičnih pa nitrat kot terminalni elektronski akceptor za respiracijo (Knowles, 1982; Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995; Paul in Clark, 1996). Za preživetje v odsotnosti nitrata lahko denitrifikatorji celo fermentirajo (Jorgensen in Tiedje, 1993). Padec denitrifikacije je bil koreliran s padcem mineralizacije organske snovi (Slika 12) in zato najverjetneje povezan z znižanjem koncentracij dostopnega mineralnega ogljika (Burford in Bremner, 1975; Tiedje, 1994; Mahne in Tiedje, 1995; Simek, 2000), česar pa ni bilo mogoče potrditi s spremljanjem koncentracij raztopljenega organskega ogljika (DOC) v tleh. Te so bile zelo variabilne ter 3 do 30-krat nižje od kumulativnih emisij CO<sub>2</sub> (Preglednica 3). Sproščanje DOC med razgradnjo polimerne organske snovi je najverjetneje potekalo sinhrono z mineralizacijo razgradnih produktov do CO<sub>2</sub> (Alvarez in sod., 1995), zato se DOC v tleh ni akumuliral, niti ni koreliral z emisijami CO<sub>2</sub>, kar potrjuje, da kvantiteta DOC ne igra tako pomembne vloge pri regulaciji mikrobnih procesov in je pri teh procesih pomembnejša kvaliteta (delež aktivnega organskega ogljika) DOC (Fissore in sod., 2009).

#### 5.2.2.3 Prenehanje denitrifikacije v tleh, ki so bila predhodno 1 leto shranjena pri 4 °C

Tla so po 12. mesecih hranjenja pri 4 °C ob prehodu na 28 °C pretvorila ves dodan amonij v nitrat (Slika 13) s podobno hitrostjo kot 6 mesecev shranjena tla med tremi oksičnimi fazami oksično/anoksičnih ciklov. Denitrifikacija v anoksičnih razmerah pa po 1. letu hranjenja ni potekla.

Podobno kot število oksičnih/anoksičnih ciklov, ki ni vplivalo na hitrosti nitrifikacije, znižalo pa je hitrosti denitrifikacije (Slika 12), je čas hranjenja tal pri 4 °C drastično znižal le denitrifikacijske hitrosti (Slika 14). Projekcija linearne regresije je pokazala, da bi se nitrifikacija v teh tleh ustavila šele po 2. letih in 8. mesecih hranjenja pri 4 °C. Nitrifikacijske hitrosti so med hranjenjem tal bile višje od denitrifikacijskih ter počasneje padale. Proces nitrifikacije, za razliko od denitrifikacije, zaradi svoje avtotrofne narave (Prosser, 1989), ni bil občutljiv na pomanjkanje rastlinskih eksudatov v tleh. To obrazloži akumulacijo nitrata med tro-mesečno inkubacijo istih tal pri 4 °C (Stres in sod., 2008), ki je bila ugotovljena tudi po 6. in 12. mesecih hranjenja v eksperimentih iz te študije.

Vzrok za prenehanje denitrifikacije v tleh po enem letu shranjevanja pri 4 °C bi sicer lahko bilo drastično znižanje števila denitrifikacijske populacije, vendar se v podobnih eksperimentih z mikrokozmi, kjer so bila tla 3 mesece inkubirana pri 4 °C, najbolj verjetno

število (MPN) denitrifikatorjev ni signifikantno spremenilo (Stres in sod., 2008). Bolj verjetna razlaga bi bila pomanjkanje kvalitetnega raztopljenega organskega ogljika za heterotrofno denitrifikacijo (Burford in Bremner, 1975), saj so bila tla shranjena pri 4 °C v odsotnosti rastlinske biomase, ki bi tvorila lahko razgradljive rastlinske eksudate (Krafczyk in sod., 1984). In res, denitrifikacija je po 12. mesecih shranjevanja pri 4 °C stekla takoj po dodatku sintetičnih rastlinskih eksudatov, hitrost denitrifikacije pa je bila celo 2-krat višja, kot v svežih tleh (Slika 15). Na splošno namreč velja, da je v procesih odstranjevanja dušika pogosto potrebno dodajati zunanji vir lahko razgradljivega ogljika (Heavey, 2003; Ambus in sod., 2007; Dodla in sod., 2008; Gibert in sod., 2008; Martin in sod., 2009), ki pospeši denitrifikacijo.

### 5.2.3 Potencialne in realne hitrosti nitrifikacije in denitrifikacije

Rezultati eksperimentov v mikrokozmih so pokazali, da so tla sicer po določenem številu ciklov (Slika 12) oz. po določenem času hranjenja pri 4 °C (Slika 14) izgubila denitrifikacijsko sposobnost v odsotnosti zunanjega vira organskega ogljika. Vseeno pa so v treh zaporednih oksičnih/anoksičnih ciklih bila potencialno sposobna pretvoriti (nitrificirati) več kot 800  $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  amonija in odstraniti denitrificirati, več kot 1400  $\mu\text{g (NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  nitrata (Preglednica 2).

Potencialne hitrosti so bile ugotovljene pri 28 °C, ki je optimalna temperatura za nitrifikacijo in denitrifikacijo v tleh (Saad in Conrad, 1993). Vendar pa so na Ljubljanskem barju sezonske temperature 0 - 30 cm sloja tal nižje in nihajo med - 1 °C in 6 °C pozimi ter 17 °C in 24 °C poleti (Repič, 2009) (Danevčič in sod., 2010). Zato bi rezultati o čistilnem potencialu, ki so bili opisani do sedaj, veljali le v primeru, če bi bila tla odstranjena iz naravnega okolja in bi se uporabljala v sistemih za odstranjevanje mineralnih oblik dušika, pri kontrolirani temperaturi (28 °C). Ti sistemi (npr. bioreaktoji s šotno posteljico in šotni filtri) pa so navadno izpostavljeni naravnim temperaturnim fluktuacijam in padavinam (Heavey, 2003; Corley in sod., 2006).

Za opredelitev naravnega (realnega) potenciala tal za čiščenje mineralnih oblik dušika so bili na voljo le podatki laboratorijskih eksperimentov, izvedenih pri dveh ekstremnih temperaturah inkubacije (4 °C in 28 °C) (Slika 7), zato je bilo potrebno nitrifikacijske in denitrifikacijske hitrosti aproksimirati na povprečno temperaturo tal in na površinsko enoto tal ob naslednjih predpostavkah:

- Kadar sta na voljo le podatka o reakcijskih hitrostih pri dveh temperaturah, je spremembe hitrosti v odvisnosti od sprememb temperature primerneje, kot z enostavno linearno regresijo, opisati s temperaturnim koeficientom  $Q_{10}$  (Escandari, 2010), saj hitrosti bioloških reakcij v kompleksnih naravnih okoljih s temperaturo pogosto eksponentno naraščajo (Kirschbaum, 1995). Temperatura namreč vpliva tudi na difuzijo (Ambus, 1993) in afiniteto substratov (Nedwell, 1999), fluidnost membran

- (Los in Murata, 2004), konformacijske spremembe encimov (Curatola in sod., 1983) itd.
- Povprečne letne temperature na Ljubljanskem barju znašajo med 10 °C in 12 °C (Repič, 2009; Danevčič in sod., 2010)
  - Padavine na Ljubljanskem barju večkrat mesečno povzročijo fluktuacije nivoja podtalnice (Hacin in sod., 2001; Repič, 2009), gradient prehoda iz oksičnih v anoksične razmere pa se vzpostavi tudi vzdolž vertikalnega profila tal v smeri iz slojev nad nivojem podtalnice proti slojem pod nivojem podtalnice (Kristensen, 2000), kjer so bili encimsko aktivni in prisotni tako nitrifikacijski (Höfferle in sod., 2010) kot denitrifikacijski mikroorganizmi (Slika 6, str. 37).
  - Nitrifikacija in denitrifikacija zaradi nastanka oksičnih in anoksičnih mikro-niš v naravi pogosto potekata simultano (Linn in Doran, 1984; Abbasi in Adams, 2000; Russow in sod., 2000; Wrage in sod., 2001).
  - 1 cm debel sloj tal v posameznem mikrokozmu (Slika 3) je imel površino 20 cm<sup>2</sup>. Iz teh podatkov je bilo mogoče pretvoriti gravimetrično aplikacijo dušika na površinsko (npr. 100 μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub> je ekvivalentno 6,35 kg N ha<sup>-1</sup> v 1 cm debelem sloju tal oz. 190 kg N ha<sup>-1</sup> v hipotetičnem 30-cm originalno vzorčenem sloju tal - Preglednica 2).

Z upoštevanjem kinetike temperaturnega koeficienta Q<sub>10</sub> so bile v območju povprečne letne temperature (10 - 12 °C) ocenjene realne nitrifikacijske in denitrifikacijske aktivnosti. Nitrifikacijske aktivnosti so bile 5 krat nižje, denitrifikacijske pa 7 krat nižje pri 10 - 12 °C (Slika 10) kot potencialne hitrosti obeh procesov pri 28 °C. V treh oksičnih/anoksičnih ciklih (Slika 11), ki so trajali vsak približno po 30 dni, so potencialne nitrifikacijske hitrosti v mikrokozmih s slojem tal, debelim 1 cm, znašale 40 - 52 μg (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> → NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub> d<sup>-1</sup> (ekvivalentno 2,9 - 3,2 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), denitrifikacijske pa 14 - 38 μg (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub> + N<sub>2</sub>O) - N g<sup>-1</sup><sub>st</sub> d<sup>-1</sup> (ekvivalentno 1,0 - 2,3 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Preglednica 3). 5-krat nižje realne nitrifikacijske in 7-krat nižje realne denitrifikacijske hitrosti v 1 cm debelem sloju tal pa bi znašale dnevno: 0,6 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in 0,2 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> oz. letno: 223 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> in 86 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>.

S takimi hitrostmi bi zgolj 1 cm debel sloj tal pri povprečnih letnih temperaturah pretvoril in odstranil 86 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> oz. 51 % dovoljene letne aplikacije dušika, ki znaša 170 kg ha<sup>-1</sup> (EC, 2009). Ob predpostavki, da bi v naravnih razmerah 50 % apliciranega dušika privzele rastline (Galloway in Cowling, 2002), bi preostalih 50 % mikroorganizmi v samo 1 cm debelem sloju tal pretvorili med oksičnimi/anoksičnimi cikli v enem letu. Zato lahko zaključimo, da so tla Ljubljanskega barja zagotovo zaščitena pred onesnaževanjem podtalnice, če so izpostavljena z zakonom predpisanim aplikacijam gnojil.

Hipotetično so realne nitrifikacijske in denitrifikacijske hitrosti bile še višje, saj je bil originalen sloj tal, ki je bil homogeniziran in uporabljen v mikrokozmih, vzorčen iz globin 0 - 30 cm. Površinske aplikacije dušika v originalnem sloju tal bi zato lahko bile 30-krat višje od zgoraj omenjenih (Preglednica 2) in hitrosti nitrifikacije bi pri 10 - 12 °C znašale 18 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, denitrifikacije pa 7 kg N ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Te hitrosti so bile podobne hitrostim

odstranjevanja dušika v rastlinskih čistilnih napravah ( $7 - 17 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (Vymazal, 2007), medtem ko je nitrifikacija v hipotetičnem 30-cm sloju tal potekala z nižjo hitrostjo kot v reaktorjih s šotno posteljico (peat bed reactors), kjer je znašala  $110 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$  in je bila primerljiva s hitrostmi nitrifikacije cenovno veliko manj ugodnih sistemov aerobnih bioloških čistilnih naprav (Heavey, 2003).

Vendar pa Vymazal (2007) poroča, da se v rastlinskih čistilnih napravah, zaradi nepopolne anoksičnosti, dejansko odstrani le 40 - 50 % mineralnega dušika in Heavey (2003), da je bilo v šotne filtre potrebno dodajati metanol, da je denitrifikacija potekla. V zgoraj opisanih oksičnih/anoksičnih ciklih je v anoksičnih fazah bilo omogočeno 100 % odstranjevanje dodanega mineralnega dušika iz tal, vendar pa bi bilo potrebno po določenem številu oksičnih/anoksičnih ciklov tudi v ta tla dodajati zunanji vir lahko razgradljivega organskega ogljika.

Kakorkoli že – zgornji, 0 - 30 cm globok sloj tal Ljubljanskega barja bi pri povprečnih letnih temperaturah v odsotnosti zunanjega vira organskega ogljika v enem letu hipotetično lahko nitrificiral  $6690 \text{ kg N ha}^{-1}$  in denitrificiral  $2580 \text{ kg N ha}^{-1}$ , kar je več, kot 10-kratna dovoljena letna aplikacija mineralnega dušika (EC, 2009).

#### **5.2.4 Relacije med razgradnjo organske snovi, temperaturo, aplikacijo mineralnega dušika in temperaturnimi prehodi iz 4 °C na 28 °C med hranjenjem tal**

Produkcija  $\text{CO}_2$  v svežih tleh (Slika 9) je pri 28 °C potekala z višjimi hitrostmi kot pri 4 °C, saj hitrost razgradnje organske snovi v tleh pozitivno korelira s temperaturo (Kirschbaum, 1995) tudi v tleh Ljubljanskega barja (Stres in sod., 2008). Pri 28 °C so tla med oksično fazo proizvajala  $\text{CO}_2$  le z rahlo višjo hitrostjo kot v anoksični fazi, medtem ko je bil padec po prehodu iz oksičnih v anoksične razmere bolj drastičen pri 4 °C in je evidenten tudi v nižjih  $Q_{10}$  vrednostih oksične ( $Q_{10} = 1,3 - 1,6$ ) v primerjavi z anoksično ( $Q_{10} = 2,5 - 3,5$ ) produkcijo  $\text{CO}_2$  (Preglednica 2).

Temperaturni koeficienti, ki opisujejo odvisnost encimskih reakcij od temperature (Eskandari, 2005), so v tleh kultiviranega nizkega barja »Majnegarden« iz južne Švedske, ki ima podobno vsebnost organske snovi in pH nihale v enakem območju ( $Q_{10} = 2 - 4$ ), kot na Ljubljanskem barju (Berglund in sod., 2010). Nerazgrajena šota britanskih nizkih barij je proizvajala  $\text{CO}_2$  z 10-krat višjimi hitrostmi (Kechavarzi in sod., 2010). V določenih primerih, posebno pri visokih vsebnostih vode v tleh, je bila respiracija obratno sorazmerna s temperaturo ( $Q_{10} < 1$ ) (Kechavarzi in sod., 2010). Podatki te študije in naše prejšnje študije (Stres in sod., 2008) kažejo, da je na Ljubljanskem barju respiracija tudi pri visokih vsebnostih vode vedno pozitivno korelirala s temperaturo.

Hitrosti razgradnje šote pozitivno korelirajo še z vsebnostjo ogljika in dušika v tleh (Haraguchi in sod., 2003; Domisch in sod., 2005). V šotnih tleh Ljubljanskega barja pri

28 °C v produkciji CO<sub>2</sub> kontrolnih in obremenjenih vzrocev ni bilo razlik, kar pomeni, da mineralni dušik, kljub nizkim koncentracijam v kontrolnih vzorcih, ni bil limitni faktor. Pri 4 °C, za razliko od 28 °C, je aplikacija mineralnega dušika signifikantno vplivala na oksično in anoksično produkcijo CO<sub>2</sub> (Slika 9). To kaže, da so bila tla v oksičnih razmerah pri nizkih temperaturah limitirana z mineralnim dušikom, ki se je med razgradnjo kompleksne organske snovi pri nizkih temperaturah najverjetneje počasneje sproščal od mineralnega ogljika (Paul in Clark, 1996; Robertson in Groffman, 2007; Miller in sod., 2008).

V anoksičnih razmerah povišane koncentracije nitrata pri 28 °C ravno tako niso vplivale na emisijo CO<sub>2</sub>, iz česar sledi, da je mineralizacija organske snovi v anoksičnih razmerah pri 28 °C lahko potekala s heterotrofnimi mikroorganizmi, ki niso nujno denitrifikatorji (Horwath, 2007). To je v skladu s hipotezo, da naj bi zaradi nizkih koncentracij nitrata bila na Ljubljanskem barju glavno gonilo anoksične mineralizacije organske snovi redukcija železa, kot alternativnega sprejemnika elektronov (Jerman in sod., 2009).

Vendar je zanimivo, da so bila enaka tla pri 4 °C v oksičnih razmerah limitirana z mineralnim dušikom, v anoksičnih razmerah pa so heterotrofni procesi z alternativnimi sprejemniki elektronov tekli počasneje, kot ob prisotnosti nitrata (Slika 9). Vse to kaže, da razgradnja organske snovi pri nizkih temperaturah, zaradi hkratnih interakcij različnih bioloških in fizikalno-kemijskih dejavnikov (Curatola in sod., 1983; Ambus, 1993; Nedwell, 1999; Los in Murata, 2004), postane desinhronizirana, zato je odziv mikrobnih združb na spremenjene temperature lahko zelo kompleksen (Kirschbaum, 2000; Liu in sod., 2006).

Kompleksen odziv je bil opažen tudi ob prehodih tal iz 4 °C na 28 °C po 6. mesecih in 12. mesecih hranjenja pri 4 °C (Slika 16). Ker je produkcija CO<sub>2</sub> v direktni relaciji z mineralizacijo lahko dostopnega vira organskega ogljika (Alvarez in sod., 1995), so bili podatki o 12-krat višji produkciji CO<sub>2</sub> v 12 mesecev shranjenih tleh (Slika 16) na prvi pogled kontradiktorni ugotovitvi iz prejšnjega poglavja diskusije (glej 5.2.2.3, str. 60), da je bila denitrifikacija v teh tleh inhibirana s pomanjkanjem lahko razgradljivega organskega ogljika (Slika 15). V nadaljevanju sledi obrazložitev.

Kumulativne emisije CO<sub>2</sub> so na koncu 11-dnevne oksične faze v 12 mesecev shranjenih tleh znašale  $4088 \pm 290 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}}$  (Slika 16), tla pa v anoksični fazi cikla niso denitrificirala. Vsota kumulativnih emisij vseh treh oksičnih/anoksičnih ciklov, izvedenih s 6 mesecev shranjenimi tlemi je znašala  $3102 \pm 77 \mu\text{g CO}_2 - \text{C g}^{-1}_{\text{st}}$  (Slika 11), linearna regresija denitrifikacije in mineralizacije pa je projecirala prenehanje mikrobnih aktivnosti najkasneje v naslednjem, četrtem oksičnem/anoksičnem ciklu (Slika 12). Vse to kaže na nekakšen rezervoar organske snovi v tleh, od katere je bil en del dostopen za mikrobnno razgradnjo (labilen), drugi del pa je bil odporen (rezistenten) proti mikrobnni razgradnji (Alvarez in sod., 1995). Ko se je labilni organski ogljik porabil, v tleh denitrifikacija ni bila

več mogoča in zaradi narave eksperimenta se je labilni organski ogljik porabil v oksični fazi, kateri je sledila anoksična (denitrifikacijska) faza.

Med 12-mesečnim shranjevanjem tal se je torej najverjetneje akumuliral pretežni del labilnega ogljika. Ta je nastajal med počasno razgradnjo polimerne organske snovi pri 4 °C na delno razgrajene produkte. Ti produkti so v nadaljnjo razgradnjo vstopali z nižjimi hitrostmi kot nastajali (Kirschbaum, 1995), saj imajo mikroorganizmi pri nizkih temperaturah nižjo afiniteto do substratov (Nedwell, 1999). Tako so se labilni substrati med shranjevanjem tal pri 4 °C akumulirali v tleh in so postali mikrobom dostopni v trenutku, ko so bila tla izpostavljena višji temperaturi (28 °C), kar se je odrazilo v povišani produkciji CO<sub>2</sub> (Slika 16). Ker se je celotni rezervoar labilnega organskega ogljika med oksično fazo izpraznil, je bila denitrifikacija v sledeči anoksični fazi oksičnega/anoksičnega cikla inhibirana (Slika 14).

### 5.2.5 Emisije toplogrednih plinov med oksičnimi in anoksičnimi razmerami

Določen delež apliciranega mineralnega dušika se pretvori v N<sub>2</sub>O, ki je poleg CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> glavni povzročitelj toplogrednega učinka iz kmetijskih površin (Forster in sod., 2007).

Pri visokih temperaturah so bile emisije CO<sub>2</sub> višje kot pri nižjih temperaturah (Stres in sod., 2008), aplikacija dušika pa ni vplivala na produkcijo CO<sub>2</sub> pri 28 °C (Slika 9). Pri nižjih temperaturah je mineralni dušik povzročil povišano produkcijo CO<sub>2</sub> (glej 4.3.1.2, str. 42). Gnojenje tal z mineralnim dušikom pospeši tako dušikov kot tudi ogljikov cikel v tleh (Galloway in sod., 2003) in že dolgo je znano, da emisije CO<sub>2</sub>, ki s temperaturo naraščajo, na globalno segrevanje delujejo po principu pozitivne povratne zanke (Raich in Schlesinger, 1992).

Emisije metana (CH<sub>4</sub>) niso bile ugotovljene, čeprav so bili mikrokozmi daljša obdobja inkubirani celo v popolnoma anoksičnih razmerah, ki so najbolj ugodne za metanogenezo in zavirajo metanotrofijo (Madigan in sod., 2003). Ljubljansko barje ne producira metana, ampak ima v naravi pogosto celo negativne emisije metana – deluje kot neto ponor (neto sink) za metan (Danevčič in sod., 2010). Tudi v laboratorijskih eksperimentih je do metanogeneze prišlo šele po 7. tednih (Stres in sod., 2008) ali še daljši inkubaciji (Jerman in sod., 2009) talnih mikrokozmov pri visokih temperaturah in vsebnostih vode.

Količina N<sub>2</sub>O, ki je nastala v oksičnih ali anoksičnih razmerah, je bila višja v prisotnosti mineralnega dušika (Slika 7 in Slika 8), delež N<sub>2</sub>O / NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Morkved in sod., 2007) med nitrifikacijo pa je bil višji (0,9 %) pri 4 °C kot pri 28 °C (0,1 %). Med denitrifikacijo je bil delež N<sub>2</sub>O še višji ( $N_2O / (NO_3^- + NO_2^-) = 30 - 40 \%$ ) in ni bil odvisen od temperature (Slika 7). Denitrifikacija je bila torej glavni vir emisij N<sub>2</sub>O, kar je v skladu z ugotovitvami, da je produkcija N<sub>2</sub>O višja v prisotnosti nitrata, kot v prisotnosti amonija in pozitivno korelira z vsebnostjo vode v tleh (Abbasi in Adams, 2000; Carter, 2007), s katero je

denitrifikacija preko dostopnosti kisika kontrolirana (Linn in Doran, 1984). Te ugotovitve postavljajo nitrat v vlogo limitnega faktorja emisij  $N_2O$  (Öquist in sod., 2007). V gramu suhih tal Ljubljanskega barja je okoli  $10^8$  kopij gena *narG* (gen za reduktazo nitrata – NAR) med  $10^6$  in  $10^7$  kopij *nirK* (gen za reduktazo nitrita – NIR) in okoli  $10^6$  kopij *nosZ* (gen za reduktazo  $N_2O$  – N2OR) (Henry in sod., 2006), zato so bile povišane emisije  $N_2O$  najverjetneje odraz nižjega deleža aktivnega encima N2OR, ki tudi ni nujno prisoten in aktiven v vseh denitrifikacijskih mikroorganizmih (Zumft, 1997).

Med nitrifikacijo je na količino emisij  $N_2O$  vplivala koncentracija nitrita v tleh, saj je kumulativna emisija  $N_2O$  linearno naraščala le v obdobju, ko so se v tleh akumulirale manjše količine nitrita (5 - 7 %). Nitrit je torej verjetno bil substrat za kemične in biološke reakcije (Russow in sod., 2000), kot so kemodenitrifikacija (Tiedje, 1994), denitrifikacija z nitrifikatorji (Wrage in sod., 2001; Wrage in sod., 2004) ter denitrifikacija (Smith in sod., 1978; Knowles, 1982), ki so v tleh odgovorne za izgubljanje mineralnega dušika v obliki  $N_2O$  (Russow in sod., 2009).

Avtotrofna nitrifikacija z bakterijami poteka v dveh stopnjah (Prosser, 1989) in vse kaže, da pri 4 °C prva stopnja (oksidacija amonija do nitrita) ni bila popolnoma sinhronizirana z drugo stopnjo (oksidacijo nitrita do nitrata), zato so se v tleh akumulirale manjše količine nitrita. Te so pozročile povišan delež sproščenega  $N_2O$  pri nizkih temperaturah, o katerem poročajo mnogi avtorji (Maag in Vinther, 1996; Holtan-Hartwig in sod., 2002; Wolf in Brumme, 2002; Koponen in sod., 2004; Koponen in sod., 2006; Morkved in sod., 2006; Singurindy in sod., 2009). Ob natančnem pregledu literature je bilo ugotovljeno, da je mišljenje o emisijah  $N_2O$  kot posledici nitrifikacije zmotno, saj je nitrit edini prekurzor za nastanek  $N_2O$  (Russow in sod., 2000; Wrage in sod., 2001; Wrage in sod., 2004; Russow in sod., 2009), kar pomeni, da je  $N_2O$  v oksičnih razmerah nastajal v anoksičnih mikro-nišah z denitrifikacijo (Wrage in sod., 2001), ki je po definiciji redukcija mineralnih dušikovih oksidov, nitrata ( $NO_3^-$ ) ali nitrita ( $NO_2^-$ ), v plinaste okside, dušikov monoksid (NO) in dušikov oksidul ( $N_2O$ ), ki so lahko reducirani naprej do molekularnega dušika ( $N_2$ ) (Knowles, 1982).

Kljub visokemu potencialu za odstranjevanje mineralnega dušika tal Ljubljanskega barja, se je torej za problematičnega izkazal toplogredni učinek (Danevčič in sod., 2010), ki je na splošno značilen za kmetijske površine (Vitousek in sod., 1997; Mosier in sod., 1998). Torej bi bila ta tla za namene čiščenja odpadnih voda primerna le v strogo kontroliranih procesnih pogojih. Redukcija dušikovega oksidula ( $N_2O$ ) do molekularnega dušika ( $N_2$ ), ki je zadnji korak denitrifikacije, navadno v tleh poteče šele, ko zmanjka nitrata in nitrita, ki sta energetsko ugodnejša elektronska sprejemnika elektronov (Zumft, 1997), zato bi bilo potrebno plinsko fazo, ki je vsebovala visoke koncentracije  $N_2O$  napeljati skozi dodatne anoksične šotne filtre, ki bi v odsotnosti nitrata reducirali  $N_2O$  do  $N_2$  (Lance in sod., 1980; Zhou in sod., 2009).

### 5.3 SKLEPI

- Tla Ljubljanskega barja (histosol) so ohranila visok potencial za pretvorbe mineralnih oblik dušika, ki pa se je v odsotnosti zunanje vira lahko razgradljive organske snovi zmanjšal po večkratnih bremenitvah in izmenjavah oksičnih in anoksičnih pogojev.
- Pri pretvorbah amonijskega dušika z nitrifikacijo so volatilizacija amoniaka in emisije N<sub>2</sub>O predstavljale manj kot 2 % izgub mineralnega dušika, medtem ko so pri odstranjevanju nitratnega dušika z denitrifikacijo izgube dušika v obliki N<sub>2</sub>O znašale med 30 in 40 %.
- Potencialna denitrifikacijska encimska aktivnost (DEA) je bila najvišja v zgornjem, 0 - 10 cm globokem sloju tal, vendar generalno z globino ni upadala, saj je bila v povprečju na globinah 0 - 40 cm podobna kot na globinah 40 - 100 cm.
- Hranjenje tal z visoko vsebnostjo organske snovi (histosol) pri 4 °C je negativno vplivalo na denitrifikacijo, medtem ko je bil vpliv na nitrifikacijo zanemarljiv.
- Temperatura v območju med 4 °C in 28 °C je pozitivno vplivala na pretvorbe mineralnega dušika v tleh.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Vrhnje sloje šote na Ljubljanskem barju so v preteklih stoletjih izrezovali, površino Ljubljanskega barja pa izsuševali v kmetijske namene. Sezonsko nihanje podtalnice se danes zaradi izsuševanja večinoma odvija pod površino tal. Posledično se v vrhnjih slojih izmenjujejo oksične in anoksične razmere, kar povzroča dodatno razgradnjo preostale šote. Poleg tega kmetovanje z gnojenjem ogroža vire pitne vode, ki se nahajajo pod Ljubljanskim barjem. Kljub delni razgradnji šote današnjih vrhnjih slojev, so tla klasificirana kot tla, bogata z organsko snovjo (histosol). Poleg oksičnih in anoksičnih prihaja tudi do fluktuacij med poletnimi in zimskimi temperaturami. Nizke temperature inhibirajo mikrobne aktivnosti, zato se npr. za mikrobiološke analize priporoča sveže vzorčena tla shranjevati pri temperaturah tik nad lediščem.

V tej doktorski disertaciji smo ugotavljali: vpliv onesnaževanja z gospodinjskimi odplakami na *in situ* prostorsko variabilnost aktivnosti in zastopanosti mikrobne populacije v tleh Ljubljanskega barja; ali zgornji 30-cm sloji tal zmorejo pretvoriti in odstraniti najvišjo dovoljeno letno aplikacijo mineralnega dušika ( $170 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) med izmeničnim spreminjanjem oksičnih in anoksičnih razmer (oksični/anoksični cikli), ki favorizirajo nitrifikacijo in denitrifikacijo; ali princip oksičnih/anoksičnih ciklov omogoča pretvorbe višjih količin dušika, primerljive z aktivnim blatom konvencionalnih čistilnih naprav; in kako hranjenje tal pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  vpliva na mikrobne aktivnosti v tleh.

Na eksperimentalnem polju v Podkraju pri Tomišlju na Ljubljanskem barju smo na 25 m oddaljenih lokacijah 1 (intaktna) in 2 (točkasto onesnažena z gospodinjskimi odplakami) na razdalji 1 m vzorčili po 3 vertikalne profile (1a, 1b, 1c, 2a, 2b in 2c) iz šestih globin (0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80 in 80-100 cm). Z analizami aktivnosti (DEA) in števila (MPN) denitrifikatorjev, ki v grobem korelirajo s splošno aktivnostjo in količino biomase v tleh, smo po vertikalnih profilih opredelili prostorsko variabilnost ter vpliv onesnaževanja z gospodinjskimi odplakami na mikrobne procese v tleh. Nato smo v mreži  $10 \times 10 \text{ m}$  na globinah 0 – 30 cm vzorčili 100 talnih sredic ( $2r = 7 \text{ cm}$ ), ki smo jih homogenizirali in shranili pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vpliv temperature na hitrosti pretvorb in odstranjevanja dušika smo ugotavljali v mikrokozmijskih pripravljanih iz sveže vzorčenih tal pri dveh temperaturah ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ). S temperaturnimi koeficienti  $Q_{10}$  smo ocenili hitrosti mikrobnih procesov pri povprečni letni temperaturi tal ( $10 - 12 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Nato smo s tlemi, ki so bila 6 mesecev shranjena pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , izvedli tri oksične/anoksične cikle. Na začetku vsakega cikla smo dodali amonij, ki se je v 8 – 11 dni trajajočih oksičnih razmerah nitrificiral v nitrat ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ), slednji pa se je v 21 – 28 dni trajajočih anoksičnih razmerah odstranil iz tal z denitrifikacijo do plinastih oblik dušika ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ). Enak eksperiment smo izvedli še s tlemi, ki so bila 12 mesecev po vzorčenju shranjena pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ter tako opredelili vpliv shranjevanja tal na mikrobne aktivnosti.

V vertikalnem profilu (0 - 1 m) tal na Ljubljanskem barju je bila DEA v zgornjem sloju (0 - 10 cm) najvišja in najnižja na globinah območja letnega nihanja podtalnice (20 - 40 cm), v povprečju pa je bila DEA nad in pod nivojem podtalnice podobna in se je gibala med 11 in 25  $\mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{h}^{-1}$ . V zastopanosti (MPN) denitrifikatorjev po vertikalnem profilu tal ni bilo signifikantnih razlik. Točkasto onesnaženje ni vplivalo na DEA in MPN.

Med prednostmi uporabe tal Ljubljanskega barja za čiščenje dušika, v primerjavi s konvencionalnimi čistilnimi napravami, sta se izkazali visoka kationsko izmenjevalna in puferska kapaciteta tal. Ne glede na koncentracije amonija v tleh je sorpcijska kapaciteta preprečevala volatilizacijo amoniaka ( $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+ < 2 \%$ ), ki je vstopal v nitrifikacijo. Nakopičen nitrat ni inhibiral mikrobnih aktivnosti z zakisanjem, saj je bila vrednost pH vedno v območju pH 6 - 8 in je zagotavljal optimalne mikrobne aktivnosti.

Zgornji, 0 - 30 cm globok sloj tal je v treh ciklih izmeničnih oksičnih (8 - 11 dni) in anoksičnih (21 - 28 dni) razmer pri 28 °C odstranil več kot 800  $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  dodanega amonija in 500  $\mu\text{g NO}_3^- - \text{N g}^{-1}_{\text{st}}$  nitrata, kar hipotetično predstavlja 2600 kg N ha<sup>-1</sup>, torej vsaj 10-kratno dovoljeno letno aplikacijo (170 kg N ha<sup>-1</sup>) mineralnega dušika v tla. Pri povprečnih letnih temperaturah (10 - 12 °C) na Ljubljanskem barju bi 30 cm globok sloj tal to enako količino pretvoril in odstranil v enem letu. Ponavljanje oksičnih/anoksičnih ciklov ni vplivalo na nitrifikacijske hitrosti, medtem ko je potencial za heterotrofno denitrifikacijo linearno padal, podobno kot mineralizacija organskega ogljika do CO<sub>2</sub>. Iz tega sledi, da je med zaporednimi oksičnimi in anoksičnimi cikli pričelo primanjkovati kvalitetnega/dostopnega lahko razgradljivega vira organskega ogljika.

Po 12-mesečnem shranjevanju tal pri 4 °C je nitrifikacijski potencial prav tako ostal visok, denitrifikacija pa je bila inhibirana že v prvem oksičnem/anoksičnem ciklu. Emisije CO<sub>2</sub> 12 mesecev shranjenih tal so bile po prehodu iz 4 °C na 28 °C v oksičnih razmerah kar 12-krat višje od teh emisij v sveže vzorčenih tleh. Opazili smo, da so bila tla med inkubacijo pri 4 °C limitirana z virom mineralnega dušika, medtem ko pri 28 °C hitrost mineralizacije ni bila odvisna od dodatkov mineralnega dušika. Zato sklepamo, da med shranjevanjem tal pri nizkih temperaturah razgradnja polimerne organske snovi v labilne oblike ogljika ni bila sinhronizirana z mineralizacijo nastalih monomerov do CO<sub>2</sub>. Ob prehodu iz 4 °C na 28 °C se je akumulirani labilni ogljik zato že v 10. dneh oksičnih razmer prvega cikla mineraliziral in v sledečih anoksičnih razmerah ni bil več dostopen za denitrifikacijo. Dodatek rastlinskih eksudatov v tla po 12. mesecih shranjevanja pri 4 °C je povzročil pospešeno denitrifikacijo.

Kljub visokemu potencialu za odstranjevanje mineralnega dušika in preprečevanju pronicanja nitratov v podtalne vode se je med denitrifikacijo kar 30 - 40 % nitrata pretvorilo v N<sub>2</sub>O, kar iz vidika globalnega segrevanja uvršča ta tla kot neprimerna za uporabo pri čiščenju odpadnih voda v naravnem okolju (*in situ*).

## 6.2 SUMMARY

Through the past centuries the area of Ljubljana marsh was drained for agricultural purposes and upper peat layers were cut and used for fossil fuels. Due to drainage regular groundwater fluctuations occur below the soil surface causing the shifts of oxic and anoxic conditions in upper soil layers, leading to further degradation of the remaining peat. Farming and fertilization threaten the sources of drinking water located below the Ljubljana marsh. Despite the partial degradation of today's top layers of peat, the soil is classified as rich organic matter soil (Histosol). Besides oxic/anoxic fluctuations the soil is also exposed to summer/winter temperature fluctuations.

In this doctoral dissertation we aimed to determine: the influence of household wastewater point pollution on *in situ* spatial variability of microbial activity and the abundance across the vertical profile of this soil; the capability of upper 30-cm soil layer to convert and remove the maximum annual application of mineral nitrogen ( $170 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) during sequential alternations of oxic and anoxic conditions (oxic/anoxic cycling) favouring nitrification and denitrification processes; the comparability of soil oxic/anoxic cycling to conventional activated sludge wastewater treatment plants; and the effect of cold storage at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  on soil microbial activities.

At the Ljubljana marsh experimental field in Podkraj (Tomišelj) denitrification enzyme activity (DEA) and the most probable number (MPN) of denitrifiers were analysed in vertical profiles of Location 1 (intact) and 25 m distant Location 2 (point polluted site). Three separate vertical profiles were collected at each location (1a, 1b, 1c, 2a, 2b and 2c) at six depths (0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80 and 80-100 cm) in order to get the insight into the spatial variability of general microbial activity and biomass that is roughly correlated to DEA and MPN of denitrifiers, respectively. Separate sampling was performed for microcosm studies. Soil cores ( $2r = 7 \text{ cm}$ ) of 0 – 30 cm depths were collected, homogenized and stored at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The effect of temperature on the nitrogen transformation rates was determined in freshly sampled soil microcosms at two temperatures ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The temperature coefficients  $Q_{10}$  allowed the approximation of the microbial processes rates to the average annual temperature of  $10 - 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . After 6 months of storage at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  the soil was subjected to three sequential oxic/anoxic cycles each consisting of oxic phase of 8 – 11 days and an anoxic phase of 21 – 28 days. Ammonium that was added to soil at the beginning of each cycle was nitrified ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) to nitrate in oxic phases and the nitrate was removed from soil in form of nitrogen gasses through denitrification ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) in anoxic phases of cycles. The same experiment was repeated with samples stored for 12 months at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  to examine the effect of soil storage at low temperatures on microbial activities.

The highest DEA was observed in the top (0 - 10 cm) soil layer and the lowest DEA at the depths of regular water table fluctuations (20 - 40 cm). However, the average DEA above and below the groundwater table was ranging between 11 in  $25 \mu\text{g N}_2\text{O} - \text{N g}^{-1}_{\text{st}} \text{ h}^{-1}$ . There

were no significant differences in the abundance of denitrifiers (MPN) across the soil layers of 0 – 1 m vertical profile.

Comparing to conventional activated sludge systems, the use of Ljubljana marsh soil in wastewater treatment was advantageous due to high cation exchange and buffer capacities of this soil. Ammonia was adsorbed and nitrified, rather than volatilized ( $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+ < 2\%$ ). Soil pH was ranging between pH 6 – 8 enabling optimal microbial activities even after accumulation of high amounts of nitrate preventing the soil acidification.

Upper soil layer of 0 – 30 cm depth was exposed to three sequential oxic/anoxic cycles composed of 8 – 10 days oxic followed by 21 – 28 days of anoxic conditions at 28 °C. The 0 – 30 cm soil layer removed at least  $1300 \mu\text{g N g}^{-1}_{\text{st}}$ , which is equal to hypothetical application of  $2600 \text{ kg N ha}^{-1}$  and more than 10 times higher than maximum allowed mineral nitrogen application of  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$ . The same amount of mineral nitrogen would be removed by the 30-cm soil layer at average annual temperatures (10 – 12 °C) in one year. Sequential oxic/anoxic cycles did not affect the rates of nitrification, while denitrification as well as carbon mineralization rates decreased linearly with the number of cycles suggesting the lack of easy degradable/available/labile organic carbon after multiple oxic/anoxic cycles.

In the first oxic/anoxic cycle after the storage of soil at 4 °C for 12 months denitrification terminated, while nitrification rate was similar to that of fresh soil. After the shift from 4 °C to 28 °C the oxic  $\text{CO}_2$  production of 12 months stored soil was 12-times higher comparing to that of fresh soil. It was also noticed in fresh soil samples that the pattern of carbon mineralization was different at 4 °C as compared to 28 °C. Carbon mineralization was limited by mineral nitrogen at 4 °C, but not at 28 °C. The data suggest desynchronized degradation of polymeric organic substances and further mineralization to  $\text{CO}_2$  during the soil storage at 4 °C. At the shift to 28 °C the accumulated labile organic carbon was readily mineralized in the first 10 days of oxic incubation. Due to oxic mineralization organic carbon was no more available for denitrification in the following anoxic phase of oxic/anoxic cycle. Nevertheless, denitrification proceeded efficiently in 12 months stored soil, after the addition of synthetic plant exudates.

Despite high potential for mineral nitrogen removal preventing nitrate leaching to groundwater, 30 – 40 % of nitrate was converted to greenhouse gas  $\text{N}_2\text{O}$  during denitrification, indicating this soil as not appropriate for wastewater treatment use in its natural habitat (*in situ*).

## 7 VIRI

- Abbasi M.K., Adams W.A. 2000. Gaseous N emission during simultaneous nitrification-denitrification associated with mineral N fertilization to a grassland soil under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 8-9: 1251-1259
- Alvarez R., Díaz R.A., Barbero N., Santanatoglia O.J., Blotta L. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and CO<sub>2</sub>-C production from three tillage systems. *Soil and Tillage Research*, 33, 1: 17-28
- Ambus P. 1993. Control of denitrification enzyme activity in a streamside soil. *FEMS Microbiology Letters*, 102, 3-4: 225-234
- Ambus P., Petersen S.O., Soussana J.F. 2007. Short-term carbon and nitrogen cycling in urine patches assessed by combined carbon-13 and nitrogen-15 labelling. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121, 1-2: 84-92
- Anderson T.-H., Domsch K.H. 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 12: 2039-2043
- Atlas R.M., Bartha R. 1993. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 3rd edition. Reswood City, The Benjamin/Cummings Publishing Company: 563 str.
- Berge N.D., Reinhart D.R., Townsend T.G. 2005. The fate of nitrogen in bioreactor landfills. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35, 4: 365-399
- Berglund Ö., Berglund K., Klemedtsson L. 2010. A lysimeter study on the effect of temperature on CO<sub>2</sub> emission from cultivated peat soils. *Geoderma*, 154, 3-4: 211-218
- Berner R.A., Lasaga A.C., Garrels R.M. 1983. The carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *American Journal of Science*, 283, 7: 641-683
- Blodgett R. 2003. Bacteriological analytical manual online: Most probable number from serial dilutions. United States Food and Drug Administration. (18. junij 2009). <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> (27. februar 2011)
- Bottomley P.J., Myrold D.D. 2007. Biological N inputs. V: *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd edition. Paul E. A. (ur.). Amsterdam, Academic press: 303-339
- Brake M., Höper H., Joergensen R.G. 1999. Land use-induced changes in activity and biomass of microorganisms in raised bog peats at different depths. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 11: 1489-1497

- Brierley E.D.R., Wood M. 2001. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 10: 1403-1409
- Brown P.A., Gill S.A., Allen S.J. 2000. Metal removal from wastewater using peat. *Water Research*, 34, 16: 3907-3916
- Bruland G., Richardson C., Whalen S. 2006. Spatial variability of denitrification potential and related soil properties in created, restored, and paired natural wetlands. *Wetlands*, 26, 4: 1042-1056
- Brune A., Frenzel P., Cypionka H. 2000. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 5: 691-710
- Burford J.R., Bremner J.M. 1975. Relationships between the denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 7, 6: 389-394
- Butovsky R.O., Reijnen R., Aleshenko G.M., Melik-Bagdasarov E.M., Otchagov D.M. 2004. Assessing the conservation potential of damaged peat bog networks in central and northern Meshera (central Russia). *Journal for Nature Conservation*, 12, 1: 1-13
- Carter M.S. 2007. Contribution of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O emissions from urine patches. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 8: 2091-2102
- Chèneby D., Hartmann A., Hénault C., Topp E., Germon J.C. 1998. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N<sub>2</sub>O in two soils. *Biology and Fertility of Soils*, 28, 1: 19-26
- Clark K., Chantigny M.H., Angers D.A., Rochette P., Parent L.-É. 2009. Nitrogen transformations in cold and frozen agricultural soils following organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2: 348-356
- Corley M., Rodgers M., Mulqueen J., Clifford E. 2006. The performance of fibrous peat biofilters in treating domestic strength wastewater. *Journal of Environmental Science and Health*, 41, 5: 811-824
- Curatola G., Fiorini R.M., Solaini G., Baracca A., Castelli G.P., Lenaz G. 1983. Temperature-dependent conformational changes in isolated oligomycin-sensitive ATPase. *FEBS Letters*, 155, 1: 131-134
- Čeak, 2005. Ljubljansko barje – Ekorina vrnitev. *Gea*, 3: 14-21
- Dalias P., Anderson J.M., Bottner P., Couéteux M.-M. 2002. Temperature responses of net nitrogen mineralization and nitrification in conifer forest soils incubated under standard laboratory conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 5: 691-701

- Damman A.W.H. 1988. Regulation of Nitrogen Removal and Retention in Sphagnum bogs and Other Peatlands. *Oikos*, 51, 3: 291-305
- Danevčič T., Mandic-Mulec I., Stres B., Stopar D., Hacin J. 2010. Emissions of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O from Southern European peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 9: 1437-1446
- De Boer W., Kowalchuk G.A. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 7-8: 853-866
- Djurđjević L., Dinic A., Mitrović M., Pavlović P., Tesević V. 2003. Phenolic acids distribution in a peat of the relict community with Serbian spruce in the Tara Mt. forest reserve (Serbia). *European Journal of Soil Biology*, 39, 2: 97-103
- Dodla S.K., Wang J.J., DeLaune R.D., Cook R.L. 2008. Denitrification potential and its relation to organic carbon quality in three coastal wetland soils. *Science of The Total Environment*, 407, 1: 471-480
- Domisch T., Finér L., Laine J., Laiho R. 2005. Decomposition and nitrogen dynamics of litter in peat soils from two climatic regions under different temperature regimes. *European Journal of Soil Biology*, 42, 2: 74-81
- Duan Z., Xiao H. 2000. Effects of soil properties on ammonia volatilization. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49: 845-852
- EC - European Commission, 2009. 5th commission summary on the implementation of the urban waste water treatment directive. Commission Staff Working Document SEC(2009)1114final. Directorate General Environment, Brussels (on line) [http://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/implementation/implementationreports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/implementation/implementationreports_en.htm) (26. februar 2011).
- Eskandari S. 2005. Temperature coefficient (Q<sub>10</sub>). California State Polytechnic University Pomona. [http://www.csupomona.edu/~seskandari/physiology/physiological\\_calculators/Q10.html](http://www.csupomona.edu/~seskandari/physiology/physiological_calculators/Q10.html) (5. marec 2011)
- Fissore C., Giardina C.P., Kolka R.K., Trettin C.C. 2009. Soil organic carbon quality in forested mineral wetlands at different mean annual temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 3: 458-466
- Forster P., Ramaswamy V., Artaxo P., Berntsen T., Betts R., Fahey D.W., Haywood J., Lean J., Lowe D.C., Myhre G., Nganga J., Prinn R., Raga G., Schulz M., Van Dorland R. 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. V: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt

- K.B., Tignor M., Miller H.L. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 131-234
- Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., Oakley B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS*, 102, 41: 14683-14688
- Freitag T.E., Chang L., Clegg C.D., Prosser J.I. 2005. Influence of Inorganic Nitrogen Management Regime on the Diversity of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Agricultural Grassland Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8323-8334
- Galloway J.N., Aber J.D., Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B., Cosby B.J. 2003. The nitrogen cascade. *Bioscience*, 53, 4: 341-356
- Galloway J.N., Cowling E.B. 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31, 2: 64-71
- Gelfand I., Yakir D. 2008. Influence of nitrite accumulation in association with seasonal patterns and mineralization of soil nitrogen in a semi-arid pine forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2: 415-424
- Gibert O., Pomierny S., Rowe I., Kalin R.M. 2008. Selection of organic substrates as potential reactive materials for use in a denitrification permeable reactive barrier (PRB). *Bioresource Technology*, 99, 16: 7587-7596
- Glatzel S., Kalbitz K., Dalva M., Moore T. 2003. Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. *Geoderma*, 113, 3-4: 397-411
- Gogo S., Pearce D.M.E. 2009. Carbon, cations and CEC: Interactions and effects on microbial activity in peat. *Geoderma*, 153, 1-2: 76-86
- Goldammer T., Blodau C. 2008. Desiccation and product accumulation constrain heterotrophic anaerobic respiration in peats of an ombrotrophic temperate bog. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 8: 2007-2015
- Groenendijk P., Renaud L.V., Roelsma J. 2005. Prediction of Nitrogen and Phosphorus leaching to groundwater and surface waters: Process descriptions of the animo4.0 model. Wageningen, Alterra: 114 str.
- Gruber N., Galloway J.N. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451, 7176: 293-296
- Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to soil organic matter content and watertable level. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 5: 503-509

- Haraguchi A., Hasegawa C., Hirayama A., Kojima H. 2003. Decomposition activity of peat soils in geogenous mires in Sasakami, central Japan. *European Journal of Soil Biology*, 39, 4: 191-196
- Healy M.G., Rodgers M., Mulqueen J. 2007. Treatment of dairy wastewater using constructed wetlands and intermittent sand filters. *Bioresource Technology*, 98, 12: 2268-2281
- Heavey M. 2003. Low-cost treatment of landfill leachate using peat. *Waste Management*, 23, 5: 447-454
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK* and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5181-5189
- Hladnik-Milharčič E. 2010. Zares težko postane, ko vode odtečejo. *Dnevnik* (24.12.2010). <http://www.dnevnik.si/objektiv/reportaza/1042412512> (27. februar 2011)
- Höfferle Š., Nicol G.W., Pal L., Hacin J., Prosser J.I., Mandic-Mulec I. 2010. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 2: 302-315
- Holtan-Hartwig L., Dörsch P., Bakken L.R. 2002. Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N<sub>2</sub>O production and reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 11: 1797-1806
- Horwath W. 2007. Carbon cycling and formation of soil organic matter. V: *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd edition. Paul E. A. (ur.). Amsterdam, Academic press: 303-340
- Hu Z., Gagnon G.A. 2006. Impact of filter media on the performance of full-scale recirculating biofilters for treating multi-residential wastewater. *Water Research*, 40, 7: 1474-1480
- Humbert S., Tarnawski S., Fromin N., Mallet M.-P., Aragno M., Zopfi J. 2009. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME Journal*, 4, 3: 450-454
- Islam A., Chen D., White R.E. 2007. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 4: 972-975
- Izbrani meteorološki podatki. (10.9.2004) Agencija Republike Slovenije za okolje [http://www.arso.gov.si/cd/izbrani\\_meteo\\_podatki/](http://www.arso.gov.si/cd/izbrani_meteo_podatki/) (2. marec 2011)

- Jerman V., Metje M., Mandic-Mulec I., Frenzel P. 2009. Wetland restoration and methanogenesis: the activity of microbial populations and competition for substrates at different temperatures. *Biogeosciences Discussions*, 6, 1: 2357-2386
- Ježovnik V. 2009. Razskava posedanj Ljubljanskega barja zaradi črpanja vode v Vodarni Brest. *Geodetski vestnik* 53, 1: 23-35
- Jorgensen K.S., Tiedje J.M. 1993. Survival of denitrifiers in nitrate-free, anaerobic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 10: 3297-3305
- Kalmykova Y., Strömvall A.-M., Rauch S., Morrison G. 2009. Peat filter performance under changing environmental conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1: 389-393
- Kechavarzi C., Dawson Q., Bartlett M., Leeds-Harrison P.B. 2010. The role of soil moisture, temperature and nutrient amendment on CO<sub>2</sub> efflux from agricultural peat soil microcosms. *Geoderma*, 154, 3-4: 203-210
- Kirschbaum M.U.F. 1995. The temperature dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 6: 753-760
- Kirschbaum M.U.F. 2000. Will changes in soil organic carbon act as a positive or negative feedback on global warming? *Biogeochemistry*, 48, 1: 21-51
- Klřve B. 2001. Characteristics of nitrogen and phosphorus loads in peat mining wastewater. *Water Research*, 35, 10: 2353-2362
- Knowles R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 1: 43-70
- Kõiv M., Vohla C., Mõtlep R., Liira M., Kirsimäe K., Mander Ü. 2009. The performance of peat-filled subsurface flow filters treating landfill leachate and municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 35, 2: 204-212
- Koponen H.T., Escudé Duran C., Maljanen M., Hytönen J., Martikainen P.J. 2006. Temperature responses of NO and N<sub>2</sub>O emissions from boreal organic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 7: 1779-1787
- Koponen H.T., Flöjt L., Martikainen P.J. 2004. Nitrous oxide emissions from agricultural soils at low temperatures: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 5: 757-766
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H. 1984. Soluble Root Exudates of Maize - Influence of Potassium Supply and Rhizosphere Microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 16, 4: 315-322

- Kristensen E. 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia*, 426, 1: 1-24
- Lance J.C., Rice R.C., Gilbert R.G. 1980. Renovation of wastewater by soil columns flooded with primary effluent. *Water Pollution Control Federation*, 52, 2: 381-388
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442, 7104: 806-809
- Lewandoski Z. 1982. Temperature dependency of biological denitrification with organic materials addition. *Water Research*, 16, 1: 19-22
- Linn D.M., Doran J.W. 1984. Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 48, 6: 1267-1272
- Linne von Berg K.H., Bothe H. 1992. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing. *FEMS Microbiology Letters*, 86, 4: 331-336
- Liu H.S., Li L.H., Han X.G., Huang J.H., Sun J.X., Wang H.Y. 2006. Respiratory substrate availability plays a crucial role in the response of soil respiration to environmental factors. *Applied Soil Ecology*, 32, 3: 284-292
- Los D.A., Murata N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666, 1-2: 142-157
- Maag M., Vinther F.P. 1996. Nitrous oxide emission by nitrification and denitrification in different soil types and at different soil moisture contents and temperatures. *Applied Soil Ecology*, 4, 1: 5-14
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th edition. New York, Pearson Education: 1019 str.
- Mahne I., Tiedje J.M. 1995. Criteria and Methodology for Identifying Respiratory Denitrifiers. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3: 1110-1115
- Martin D., Salminen J.M., Niemi R.M., Heiskanen I.M., Valve M.J., Hellstén P.P., Nystén T.H. 2009. Acetate and ethanol as potential enhancers of low temperature denitrification in soil contaminated by fur farms: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 2-3: 1230-1238
- Mathieu O., Lévêque J., Hénault C., Milloux M.J., Bizouard F., Andreux F. 2006. Emissions and spatial variability of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> and nitrous oxide mole fraction at the

- field scale, revealed with  $^{15}\text{N}$  isotopic techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 5: 941-951
- McClain M.E., Boyer E.W., Dent C.L., Gergel S.E., Grimm N.B., Groffman P.M., Hart S.C., Harvey J.W., Johnston C.A., Mayorga E., McDowell W.H., Pinay G. 2003. Biogeochemical Hot Spots and Hot Moments at the Interface of Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*, 6, 4: 301-312
- Melik A. 1927. Kolonizacija Ljubljanskega barja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza Srbov, Hrvatov in Slovencev, Filozofska fakulteta. Tiskovna zadruga: 73 str.
- Mergel A., Schmitz O., Mallmann T., Bothe H. 2001. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 1: 33-42
- Miller M.N., Zebarth B.J., Dandie C.E., Burton D.L., Goyer C., Trevors J.T. 2008. Crop residue influence on denitrification,  $\text{N}_2\text{O}$  emissions and denitrifier community abundance in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 10: 2553-2562
- Morita H. 1980. Peat and its organic chemistry. *Journal of Chemical Education*, 57, 10: 695-696
- Morkved P.T., Dörsch P., Bakken L.R. 2007. The  $\text{N}_2\text{O}$  product ratio of nitrification and its dependence on long-term changes in soil pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 8: 2048-2057
- Morkved P.T., Dörsch P., Henriksen T.M., Bakken L.R. 2006.  $\text{N}_2\text{O}$  emissions and product ratios of nitrification and denitrification as affected by freezing and thawing. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 12: 3411-3420
- Mosier A., Kroeze C., Nevison C., Oenema O., Seitzinger S., van Cleemput O. 1998. Closing the global  $\text{N}_2\text{O}$  budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52, 2: 225-248
- Mulder A., Vandegraaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. 1995. Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor. *Fems Microbiology Ecology*, 16, 3: 177-183
- Mulvaney R.L. 1996. Nitrogen - inorganic forms. V: Methods of soil analysis. Bigham J. M. (Ed.). Madison, Winconsin, Soil Science Society of America: 1139 - 1143
- Nedwell D.B. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 2: 101-111

- Nielsen P.H. 1996. Adsorption of ammonium to activated sludge. *Water Research*, 30, 3: 762-764
- Nishio T., Yoshikura T., Mishima H., Inouye Z., Itoh H. 1998. Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK17. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 4: 351-356
- Öquist M.G., Petrone K., Nilsson M., Klemedtsson L. 2007. Nitrification controls N<sub>2</sub>O production rates in a frozen boreal forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 7: 1809-1811
- Pal L. 2007. Mikrobna aktivnost in struktura denitrifikatorjev v tleh Ljubljanskega barja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Medoddelčni študij mikrobiologije: 62 str.
- Paul E.A., Clark F.E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. 2nd edition. San Diego, Academic Press: 340 str.
- Pianka E.R. 1972. r and K Selection or b and d Selection? *The American Naturalist*, 106, 951: 581-588
- Poach M.E., Hunt P.G., Vanotti M.B., Stone K.C., Matheny T.A., Johnson M.H., Sadler E.J. 2003. Improved nitrogen treatment by constructed wetlands receiving partially nitrified liquid swine manure. *Ecological Engineering*, 20, 2: 183-197
- Premelč M. 2006. Strokovna podlaga predlaganega krajinskega parka Ljubljansko barje. Diplomsko delo. Ljubljana, Filozofska fakulteta. Oddelek za geografijo: 71 str.
- Prentice I.C., Farquhar G.D., Fasham M.J.R., Goulden M.L., Heimann M., Jaramillo V.J., Kheshgi H.S., Le Quéré C., Scholes R.J., Wallace D.W.R. 2001. The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. V: *Climate change 2001: Working group I: The scientific bases*. Houghton J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguer M., van der Linden P.J., Dai X., Maskell K., Johnson C.A. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 185-237
- Prosser J.I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. V: *Advances in microbial physiology*. Volume 30. Rose A.H., Tempest D.W. (ur.). London, Academic Press: 125-181
- Prosser J.I. 2007. Microorganisms cycling soil nutrients and their diversity. V: *Modern soil microbiology*. van Elsas J. D., Jansson J. K. (ur.). Boca Raton., Taylor and Francis Group: 237-261
- Purkhold U., Pommerening-Roser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P., Wagner M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on

- comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 12: 5368-5382
- Rabalais N.N. 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *Ambio*, 31, 2: 102-112
- Raich J.W., Schlesinger W.H. 1992. The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus B*, 44, 2: 81-99
- Raymo M.E. 1991. Geochemical evidence supporting T. C. Chamberlin's theory of glaciation. *Geology*, 19, 4: 344-347
- Reddy K.R., DeLaune R.D. 2008. *Biogeochemistry of wetlands: Science and applications*. Boca Raton, Taylor and Francis Group: 774 str.
- Repič D. 2009. Aktivnost in številčnost mikrobne združbe v različnih globinah barjanskih tal. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 59 str.
- Resman L. 2007. Vpliv dejavnikov okolja na dinamiko nitrifikatorjev in na emisije toplogrednih plinov v mikrokozmih tal Ljubljanskega barja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 62 str.
- Ringqvist L., Holmgren A., Öborn I. 2002. Poorly humified peat as an adsorbent for metals in wastewater. *Water Research*, 36, 9: 2394-2404
- Rittmann B.E., McCarty P.L. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Boston, McGraw-Hill: 754 str.
- Robertson G.P. 1982. Factors Regulated Nitrification in Primary and Secondary Succession. *Ecology*, 63, 5: 1561-1573
- Robertson G.P., Groffman P. 2007. Nitrogen transformations. V: *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd edition. Paul E. A. (ur.). Amsterdam, Academic press: 341-364
- Robinson J.M. 1990. Lignin, land plants, and fungi: Biological evolution affecting Phanerozoic oxygen balance. *Geology*, 18, 7: 607-610
- Ruiz G., Jeison D., Chamy R. 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, 37, 6: 1371-1377
- Ruser R., Flessa H., Russow R., Schmidt G., Buegger F., Munch J.C. 2006. Emission of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> from soil fertilized with nitrate: Effect of compaction, soil moisture and rewetting. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2: 263-274

- Russow R., Sich I., Neue H.U. 2000. The formation of the trace gases NO and N<sub>2</sub>O in soils by the coupled processes of nitrification and denitrification: results of kinetic <sup>15</sup>N tracer investigations. *Chemosphere - Global Change Science*, 2, 3-4: 359-366
- Russow R., Stange C.F., Neue H.U. 2009. Role of nitrite and nitric oxide in the processes of nitrification and denitrification in soil: Results from <sup>15</sup>N tracer experiments. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 4: 785-795
- Saad O.A.L.O., Conrad R. 1993. Temperature dependence of nitrification, denitrification, and turnover of nitric oxide in different soils. *Biology and Fertility of Soils*, 15, 1: 21-27
- Schipper L.A., Clarkson B.R., Vojvodic-Vukovic M., Webster R. 2002. Restoring cut-over restiad peat bogs: A factorial experiment of nutrients, seed and cultivation. *Ecological Engineering*, 19, 1: 29-40
- Sexstone A.J., Revsbech N.P., Parkin T.B., Tiedje J.M. 1985. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Science Society of America Journal*, 49: 645-651
- Shine K.P., Derwent R.G., Wuebbles D.J., Morcrette J.J. 1990. Radiative Forcing of Climate. V: Climate change: The IPCC Scientific Report. Houghton J. T., Jenkins G. J., Ephraums J. J. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 41-68
- Simek M. 2000. Changes in potential denitrification and respiration during the cold storage of soils. *Folia Microbiologica (Praha)*, 45, 2: 187-190
- Simoneti M., Šorn M., Javornik L., Dagan R., Vodlan M., Babič B. 2007. Sodelovanje in pomoč pri oblikovanju strokovnih izhodišč za pripravo Uredbe o krajinskem parku Ljubljansko barje. Ministrstvo za Okolje in Prostor Republike Slovenije.
- Singurindy O., Molodovskaya M., Richards B.K., Steenhuis T.S. 2009. Nitrous oxide emission at low temperatures from manure-amended soils under corn (*Zea mays* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 132, 1-2: 74-81
- Smith M.S., Firestone M.K., Tiedje J.M. 1978. The Acetylene Inhibition Method for Short-term Measurement of Soil Denitrification and its Evaluation Using Nitrogen-13. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 4: 611-615
- Sottocornola M., Boudreau S., Rochefort L. 2007. Peat bog restoration: Effect of phosphorus on plant re-establishment. *Ecological Engineering*, 31, 1: 29-40
- Stres B., Danevčič T., Pal L., Fuka M.M., Resman L., Leskovec S., Hacin J., Stopar D., Mahne I., Mandic-Mulec I. 2008. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 1: 110-122

- Thomas G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. V: *Methods of soil analyses*. Bigham J. M. (Ed.). Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America: 575 - 490
- Tiedje J.M. 1994. Denitrifiers. V: *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*. Weaver R. W., Angle J. S., Bottomley P. J., Bezdicek D. F., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. (ur.). New York, Soil Science Society of America: 245-267
- Tiedje J.M., Sextone A.J., Myrold D.D., Robinson J.A. 1982. Denitrification: Ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 569-583
- Tome D., Verbič Jože, Verbič Janko, Volk T., Rednak M., Babnik D., Pintar M. 2000. Pogoji naravovarstveno in/ali ekonomsko sprejemljive košnje travnikov na Ljubljanskem barju. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 51 str.
- Uredba o varstvu voda pred onesnaževanjem z nitrati iz kmetijskih virov. Ur. l. RS št. 113-5/09
- van Dijk J., Didden W.A.M., Kuenen F., van Bodegom P.M., Verhoef H.A., Aerts R. 2009. Can differences in soil community composition after peat meadow restoration lead to different decomposition and mineralization rates? *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 8: 1717-1725
- Ventura W.B., Yoshida T. 1977. Ammonia volatilization from flooded tropical soil. *Plant and Soil*, 46: 521-531
- Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P.A., Schindler D.W., Schlesinger W.H., Tilman D.G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications*, 7, 3: 737-750
- Vymazal J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 380, 1-3: 48-65
- Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N., Arp D.J., Brochier-Armanet C., Chain P.S., Chan P.P., Gollabgir A., Hemp J., Hugler M., Karr E.A., Konneke M., Shin M., Lawton T.J., Lowe T., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L.A., Lang D., Sievert S.M., Rosenzweig A.C., Manning G., Stahl D.A. 2010. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *PNAS*, 107, 19: 8818-8823
- Wallenius K., Rita H., Simpanen S., Mikkonen A., Niemi R.M. 2010. Sample storage for soil enzyme activity and bacterial community profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 1: 48-55
- Watson R.T., Rodhe H., Oeschger H., Siegenthaler U. 1990. Greenhouse Gases and Aerosols. V: *Climate change: The IPCC scientific assessment*. Houghton J. T., Jenkins G. J., Ephraums J. J. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 1-40

- Watts C.H., Clarkson B.R., Didham R.K. 2008. Rapid beetle community convergence following experimental habitat restoration in a mined peat bog. *Biological Conservation*, 141, 2: 568-579
- Wind-Mulder H.L., Rochefort L., Vitt D.H. 1996. Water and peat chemistry comparisons of natural and post-harvested peatlands across Canada and their relevance to peatland restoration. *Ecological Engineering*, 7, 3: 161-181
- Wolf I., Brumme R. 2002. Contribution of nitrification and denitrification sources for seasonal N<sub>2</sub>O emissions in an acid German forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 5: 741-744
- Wösten J.H.M., Clymans E., Page S.E., Rieley J.O., Limin S.H. 2008. Peat-water interrelationships in a tropical peatland ecosystem in Southeast Asia. *CATENA*, 73, 2: 212-224
- Wrage N., Velthof G.L., Laanbroek H.J., Oenema O. 2004. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 2: 229-236
- Wrage N., Velthof G.L., van Beusichem M.L., Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 12-13: 1723-1732
- Wu L., McGechan M.B. 1998. A Review of Carbon and Nitrogen Processes in Four Soil Nitrogen Dynamics Models. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 69, 4: 279-305
- Zajec N. 2004. Vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh. Diplomsko delo. Univerza Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Medoddelčni študij mikrobiologije: 47 str.
- Zhou S., Nakashimada Y., Hosomi M. 2009. Nitrogen transformations in vertical flow systems with and without rice (*Oryza sativa*) studied with a high-resolution soil-water profiler. *Ecological Engineering*, 35, 2: 213-220
- Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 4: 533-616

---

*Pred pionirsko zastavo obljudbam, da se bom marljivo in vztrajno učil. S svojim znanjem in pridnostjo želim zdaj in ko odrastem koristiti svoji domovini in vsem njenim delavnim ljudem. Obljudbam, da bom zvest tovariš in dober človek. Vse moje delo in ravnanje naj pokažeta, da sem vreden otrok svojega ljudstva in vreden član velike družine narodov, ki hočejo po poti napredka, pravice in miru (Častna pionirska, 1987).*

---

## **ZAHVALJUJEM SE:**

- **Ines Mandić-Mulec** za ustvarjalno sodelovanje in kritično soočanje pri reševanju problemov, da me je sprejela na Katedro za mikrobiologijo in mi omogočala redno zaposlitev ter nabiranje izkušenj v sodelovanju s Centrom odličnosti Okoljske tehnologije, Čistilno napravo Domžale-Kamnik, Inštitutom Jožef-Štefan, projektom Metaexplore in programsko skupino Mikrobiologija in biotehnologija živil in okolja pod vodstvom **Petra Rasporja**, ki je krila materialne stroške eksperimentov in obiske treh konferenc z mednarodno udeležbo; COST Action 856 (Ljubljana, Slovenija), 4. kongres Slovenskega Mikrobiološkega Društva (Portorož, Slovenija), Activated Sludge Population Dynamics 5 (Aalborg, Danska) ter Ecology of Soil Microorganisms 2011 (Praga, Češka).
- **Blažu Stresu** za vpeljevanje v mikrokozmos z glednega znanstvenega dela, zasnovanja kontroliranih eksperimentov in primernih metodologij (SIR, NEA, DEA, MPN, T-RFLP), statističnih analiz in interpretacij rezultatov ter za požrtvovalnost pri posredovanju literature, znanja, idej – tudi ob poznih nočnih razpravah.
- **Simoni Leskovec\*** za deljenje bogatih izkušenj pri premišljenem eksperimentiranju in optimizaciji analitskih metod, pripravi gojišč in raztopin, zagotavljanju vseh potrebnih materialov, meritvah z AutoAnalyzer-jem in posredovanju elektronskih knjig.
- **Tjaši Danevčič** za zanesljivo in odgovorno pomoč pri plinski kromatografiji, NanoDrop-u in PlateReader-ju ter železne živce pri reševanju neštetihih splošnih, tehnoloških, računalniških in birokratskih zagat.
- **Janezu Hacinu**, s katerim sva prebrodila, povzročila in prediskutirala Ljubljansko barje po dolgem in počez, vmes pa ob dobri glasbi, kapljici, čevapčičih in tobaku potovala na Mars in nazaj.
- **Polonci Štefanič\*** za koristne razprave in konstruktivno pomoč pri gojitvenih tehnikah, izolacijah DNA, PCR reakcijah, gelski elektroforezi in varnosti pri delu ter za nesebično posredovanje informacij, posojanje sevov, računalnika, epic, tipsov...
- **Barbari Kraigher** za 16SrRNA in *amoA* sodelovanje v laboratoriju III, ki traja vse od daljnega leta 2007, ko sva se za(je)bavala s T-RFLP-ji in klonskimi knjižnicami.
- **Vesni Jerman** za uvod v sekvenciranje DNA, prijetne pogovore in zelo uporabno literaturo.
- **Špeli Höfferle** za zanimive poljudne in znanstvene debate o zakonitostih tal in znanosti kot taki ter konkretno obvladovanje molekularnih metod za preučevanje nitrifikatorjev v tleh in vpeljevanje v DGGE in RT-PCR.
- **Tini Ivančič** in **Mihu Črnigoju** za barvito pisarniško življenje in **Nejcu Stariču** za družbo v laboratoriju in na jadranih.
- *\*Simoni in Polonci za prijateljstvo in motivacijo ob dopoldanskih kavah, s katerimi smo si polepšali dneve.*
- **Lučki Kajfež-Bogataj, Ines Mandić-Mulec, Marini Pintar, Gregorju Anderluhu, Franciju Avscu, Andreju Blejcu, Janezu Hacinu in Davidu Stoparju** za posredovanje znanja na podiplomskem študiju; **Ines Mandić-Mulec, Nives Ogrinc, Roku Miheliču, Karmen Stopar** in **Petru Palu** za popravke doktorske disertacije; **Vesni Ješe-Janežič** za vso organizacijo skozi podiplomski študij.

---

*Dajem častno pionirsko vsem*

- *Poštenim,*
  - *Iskrenim,*
  - *Olikanim,*
  - *Neustrašnim,*
  - *Iznajdljivim in*
  - *Radodarnim*
- 

- **svojim najbližjim:**

- **Aniti Legan**, ki mi vedno stoji ob strani in skrbi, da nama je lepo;
- **Tončki, Petru in Evi Pal** za vsa sobotna kosila in družinske izlete ter moralno in finančno podporo v času študija in brezposelnosti;
- **Ani in Francu Bolha, Zvonki in Ivanu Palu;**
- **Jelki Legan, Ivu Ivačiču in Asji Legan** za prijaznost in gostoljublje ob nedeljskih kosilih.

- **prijateljem,**

- **tetam, stricem, bratrancem in sestričnam.**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Levin PAL

**Čistilna sposobnost tal Ljubljanskega barja za  
odstranjevanje mineralnih oblik dušika**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2011