



VPLIV OLJČNIH TROPIN NA MIKROBNO ZDRUŽBO TAL

POROČILO O
CILJNORAZISKOVALNEM PROJEKTU
CRP V4-2216

Ohranjanje in izboljšanje proizvodnega potenciala tal
za trajnostno pridelavo oljk
GO-TO S-OIL



Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta



Vpliv oljčnih tropin na mikrobnou združbo tal

POROČILO O CILJNORAZISKOVALNEM PROJEKTU CRP V4-2216:

Ohranjanje in izboljšanje proizvodnega potenciala tal za trajnostno pridelavo oljk
GO-TO S-OIL

Naročnika:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
Dunajska 22
1000 Ljubljana

Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije
Bleiweisova cesta 30
1000 Ljubljana



Koper, 2026

VPLIV OLJČNIH TROPIN NA MIKROBNO ZDRUŽBO TAL

Poročilo o ciljnoraziskovalnem projektu CRP V4-2216

Avtorji besedila, vsebin in rezultatov: Rok Babič¹, Jakob Fantinič¹, Felipe Bastida², Maja Podgornik¹

1 Inštitut za oljkarstvo, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, Garibaldijska ulica 1, 6000 Koper, Slovenija

2 Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Soil and Water Conservation. Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, Spain

Naziv projekta: CRP V4-2216 Ohranjanje in izboljšanje proizvodnega potenciala tal za trajnostno pridelavo oljk (GO-TO S-OIL)

Delovni sklop 5: Vzorčenje in priprava vzorcev za mikrobiomske analize

Vodja projekta: Maja Podgornik

Glavni urednik založbe: Tilen Glavina

Tehnični urednici: Maja Podgornik, Alenka Obid

Lektura: Nina Novak Kerbler

Oblikovanje naslovnice: Peter Florjančič

Založnik: Znanstveno-raziskovalno središče Koper, Annales ZRS

Za založnika: Rado Pišot

Spletna izdaja, dostopna na: <https://doi.org/10.35469/978-961-7276-11-4>

pod licenco CC-BY-NC-ND



Koper, 2026

Za vsebino dokumenta je odgovorno Znanstveno-raziskovalno središče Koper in v nobenem pogledu ne izraža stališče financerja.

Poročilo vsebuje podatke, ki so nastali v času izvajanja raziskovalnega projekta CRP V4-2216 Ohranjanje in izboljšanje proizvodnega potenciala tal za trajnostno pridelavo oljk (GO-TO S-OIL) in ne gre za zakonsko ali podzakonsko urejanje področja.

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 272414723](#)

ISBN 978-961-7276-11-4 (PDF)

Povzetek

V okviru projekta Go-ToS-Oil smo proučevali vpliv uporabe oljčnih tropin na sestavo mikrobne združbe in aktivnost talnih encimov v oljčniku sorte 'Itrana'. Nanos tropin smo izvedli v različnih časovnih obdobjih, in sicer »1 teden«, »1 mesec«, »6 mesecev« in »1 leto« pred vzorčenjem, nato pa ugotavljali razlike v sestavi mikrobne združbe z uporabo analize metilnih estrov maščobnih kislin (FAMEs) ter sekvenciranjem regij 16S rRNA in ITS2. Analizirali smo tudi encimsko aktivnost ključnih talnih encimov: ureaze, alkalne fosfataze ter β -glukozidaze, povezanih s kroženjem dušika, fosforja in ogljika. Dobljeni rezultati kažejo spremembe v sestavi mikrobne združbe in aktivnosti talnih encimov po nanosu mokrih oljčnih tropin. V zgodnjih fazah po uporabi smo opazili visoke vrednosti bakterijske biomase ob hkratni inhibiciji gliv, medtem ko se v poznejših fazah raznolikost in delež gliv nekoliko povečata. Nanos tropin je povzročil zmanjšanje vrstne bogatosti in prestrukturiranje mikrobne združbe. Ugotovitve glede vsebnosti talnih encimov kažejo, da uporaba tropin pomembno vpliva na mikrobno aktivnost.

Abstract

Within the GO-ToS-Oil project, we investigated the effects of olive pomace application on microbial community composition and soil enzyme activity in an 'Itrana' olive orchard. Olive pomace was applied at different intervals prior to sampling—1 week, 1 month, 6 months, and 1 year – and subsequent changes in the soil microbial community were assessed using fatty acid methyl ester (FAME) profiling and sequencing of the 16S rRNA and ITS2 regions. We also analysed the activity of key soil enzymes linked to nitrogen, phosphorus, and carbon cycling: urease, alkaline phosphatase, and β -glucosidase.

The results show clear shifts in microbial community structure and soil enzyme activity following the application of fresh olive pomace. In the early stages after application, we observed increased bacterial biomass and fungal inhibition, while in later stages both fungal diversity and relative abundance increased. Application of olive pomace reduced species richness and led to a marked restructuring of the microbial community. Enzyme activity patterns further indicated that pomace application has a significant impact on soil microbial functioning.

1. Uvod

Pri mehanski ekstrakciji deviškega oljčnega olja iz plodov oljke nastajajo velike količine stranskega produkta, znanega kot oljčne tropine (olive pomace). Gre za ostanek, sestavljen iz rastlinske vode, povrhnjice, koščic in tkiva oljke, ki je pomemben izziv z vidika trajnosti v sredozemskih državah z intenzivno predelavo oljčnega olja (Markhali in sod., 2020). Sestava oljčnih tropin je zelo variabilna ter je zlasti odvisna od zdravstvenega stanja plodov, sorte, zrelosti in tehnologije ekstrakcije olja (Gómez-Cruz in sod., 2024). V Sloveniji je v zadnjem desetletju prevladala uporaba tehnološkega postopka predelave oljk z dvofaznim dekanterjem (Podgornik in sod., 2022), ki bistveno zmanjša količino nastale odpadne vode in s tem tudi okoljsko obremenitev (López-Piñeiro in sod., 2008, 2011). Namesto ločene rastlinske vode in tropin, ki nastanejo z uporabo trofaznega dekanterja, nastanejo z uporabo dvofaznega dekanterja mokre tropine z visoko vsebnostjo vlage (65–70 %) (Albuquerque in sod., 2004b; Roig in sod., 2006). V skladu z veljavno zakonodajo (Uredba o uporabi oljčnih tropin in rastlinske vode za gnojenje, Uradni list RS, št. 10/22) je mogoče neposredno nanašanje oljčnih tropin na kmetijska zemljišča v enem tednu po njihovem nastanku v maksimalnem odmerku 80 m³/ha. Ta praksa omogoča trajnostni pristop dovajanja hranilnih snovi nazaj v tla, kar podpira načela krožnega gospodarstva in zmanjšuje količino odpadkov iz agroživilske industrije. Kompostirane oljčne tropine kot organski dodatek tlom lahko v zmernih količinah izboljšajo fizikalne in kemične lastnosti tal, vključno z izboljšano poroznostjo tal, zmogljivostjo zadrževanja vode, kationsko izmenjalno kapaciteto, prispeva pa tudi k višji mikrobni raznolikosti. Uporaba oljčnih tropin na kmetijski površini je tako trajnostna strategija, ki omogoča valorizacijo agroindustrijskih odpadkov, hkrati pa prispeva k zmanjševanju uporabe mineralnih gnojil in izboljšanju kakovosti tal, kar je v skladu s smernicami trajnostnega kmetijstva (García-Ruiz in sod., 2021). Vendar pa njihova sestava – zlasti visoka vsebnost fenolnih spojin in nizka pH-vrednost – lahko začasno inhibira mikrobiološko aktivnost tal in fitotoksično deluje na rastline (De Neve in sod., 2004). Poleg tega imajo oljčne tropine relativno visoko biološko potrebo po kisiku in izjemno visoko kemijsko potrebo po kisiku, kar je posledica visoke vsebnosti organske snovi, predvsem biofenolov, lipidov in alkoholov (Dermeche in sod., 2013). Z vidika nanosa na kmetijsko površino so mokre oljčne tropine vir makrohranil, ki jih je mogoče povrniti v tla in tako nadomestiti izgube, nastale z obiranjem pridelka (Nasini in sod., 2012). Tropine so srednje založene s kalijem in fosforjem, medtem ko vsebujejo relativno nizke koncentracije dušika. Poleg osnovnih makrohranil vsebujejo tudi pomembne količine organske snovi (okoli 50 % suhe mase), kar pomeni, da lahko dolgoročno prispevajo k izboljšanju vsebnosti organskega ogljika v tleh. Čeprav imajo oljčne tropine visoko razmerje C/N (okoli 28:1 – 72:1), kar lahko vodi do začasne imobilizacije dušika po aplikaciji, se sčasoma organska snov stabilizira in izboljšuje biološko aktivnost tal (Albuquerque in sod., 2004a). Poleg tega dodatek oljčnih tropin v tla vpliva na sestavo in raznolikost mikrobnih združb, pri čemer pride do povečanje mikrobne biomase in encimske aktivnosti po začetni fazi inhibicije zaradi fenolnih spojin. Sčasoma se fenoli razgradijo in postanejo vir hranil za mikrobe, kar vodi v izboljšano biološko delovanje tal (Di Serio in sod., 2008). Izvedenih je bilo že več terenskih poskusov za oceno vpliva nanosa oljčnih tropin in odpadne vode iz trofaznih dekanterjev ter kompostiranih tropin iz dvofaznih dekanterjev na lastnosti tal in razvoj rastlin pri različnih kulturah. V oljčniku so z večletnim raztrosom ugotovili stabilizacijo ali celo izboljšanje fizikalno-kemijskih lastnosti tal, kot so vsebnost organske snovi in strukture tal brez negativnih učinkov na rast oljke (Nasini in sod., 2012). Podobni učinki so bili opaženi tudi pri poljskih poskusih s koruzo, pri katerih nanos odpadne vode na kmetijsko površino ni povzročil inhibicije rasti ali razvoja rastline, kar kaže na potencialno nefitotoksičnost

materiala v nadzorovanih odmerkih (Di Giovacchino in sod., 2001). Treba je poudariti, da so pozitivni učinki dosegljivi le ob pravilnem načrtovanju odmerkov in časov nanosa, saj lahko previsoke količine fenolnih spojin povzročijo začasno zaviranje mikrobne aktivnosti tal (García-Ortiz in Frías, 1993). Podobne ugotovitve navajajo tudi Lanza in sod. (2020), ki so proučevali vpliv nanosa odpadnih voda iz oljarn v vinogradu. Rezultati kažejo, da lahko ustrezno odmerjen nanos izboljša določene mikrobiološke in kemijske lastnosti tal, medtem ko lahko previsoki odmerki povzročijočasne negativne učinke na encimsko aktivnost in sestavo mikrobne združbe. Kljub temu so bile te spremembe prehodne, saj so se z razgradnjo fenolnih spojin mikrobne združbe sčasoma stabilizirale, kar potrjuje pomen nadzorovanih praks pri uporabi tovrstnih stranskih produktov v kmetijstvu. Zaradi specifičnih lastnosti oljčnih tropin in potrebe po boljšem razumevanju njihovega vpliva na talne mikroorganizme po nanosu na kmetijske površine smo v okviru projekta CRP V4-2216 – Ohranjanje in izboljšanje proizvodnega potenciala tal za trajnostno pridelavo oljk (GO-TO S-OIL), ki ga financirata Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS), želeli v podnebnih in agro-pedoloških razmerah slovenske Istre proučiti vpliv neposredne uporabe oljčnih tropin, pridobljenih s tehnologijo dvofaznega dekanterja, na sestavo in delovanje mikrobne združbe tal. Za ugotavljanje sestave in raznolikosti mikrobni skupnosti v okoljskih vzorcih se pogosto uporabljajo markerji ribosomske DNA, predvsem 16S rRNA nukleotidnega zaporedja za bakterije in arheje ter regije ITS (Internal Transcribed Spacer) nukleotidnega zaporedja za glive. Gen za 16S rRNA je sestavljen iz konzerviranih in variabilnih domen, kar omogoča taksonomsko identifikacijo in filogenetsko razvrščanje prokariotov. Uporaba univerzalnih olegonukleotidnih zaporedij za PCR-amplifikacijo regij 16S omogoča pridobivanje reprezentativnega pregleda bakterijske združbe ter je temelj številnih pristopov, kot sta LH-PCR in T-RFLP. Za ugotavljanje raznolikosti gliv se kot standardni molekularni marker uporablja nukleotidno zaporedje ITS, ki vključuje visokovariabilne odseke med geni za 18S, 5.8S in 28S rRNA. Zaradi svoje spremenljivosti omogoča razlikovanje gliv na taksonomski ravni vrst in se pogosto uporablja pri metagenomskih raziskavah z uporabo visokozmogljivega sekvenciranja (Muyzer in sod., 1993; White in sod., 1990; Ritchie in sod., 2000). Obe regiji, 16S in ITS, sta ključni za natančno oceno sestave mikrobni združbe in se pogosto uporabljata v kombinaciji z drugimi metodami, kot je analiza metilnih estrov maščobnih kislin (FAMES, angl. Fatty Acid Methyl Esters), za bolj celostno karakterizacijo mikrobne populacije tal (Song in sod., 2008). Profiliranje maščobnih kislin je priljubljena metoda za karakterizacijo mikrobni združbe v naravnih sistemih, ki zagotavlja razlikovanje mikroorganizmov na različnih taksonomskih ravneh. Metilne estre maščobnih kislin pripravimo s transesterifikacijo fosfolipidnih maščobnih kislin iz mikrobni membran in kislim katalizatorjem, nato pa izvedemo analizo s plinskim kromatografom. Metoda omogoča hitro in stroškovno učinkovito oceno strukture mikrobne združbe v tleh (Cavigelli in sod., 1995; Zelles in sod., 1992; Willers in sod., 2015). Za ugotavljanje pestrosti mikrobni združbe se pogosto uporabljajo indeksi alfaraznolikosti, kot so Shannon-Wienerjev indeks, Simpsonov indeks, indeks bogatosti in indeks Chao1, ki kvantificirajo vrstno bogatost in enakomernost porazdelitve vrst v posameznem vzorcu. Shannon-Wienerjev indeks (H') upošteva tako število vrst kot njihovo relativno pogostnost, zato je občutljiv na bogastvo in enakomernost – višje vrednosti kažejo večjo raznolikost (Shannon, 1948; Hill in sod., 2003). Simpsonov indeks meri verjetnost, da bosta naključno izbrani enoti iz populacije pripadali isti vrsti – nižje vrednosti pomenijo večjo raznolikost, saj izražajo manjšo prevladanje posameznih vrst (Simpson, 1949). Indeks Chao1 je ocenjevalni indeks vrstne bogatosti, ki temelji na številu redkih vrst (npr. enkratnih in dvakratnih opažanj), zato

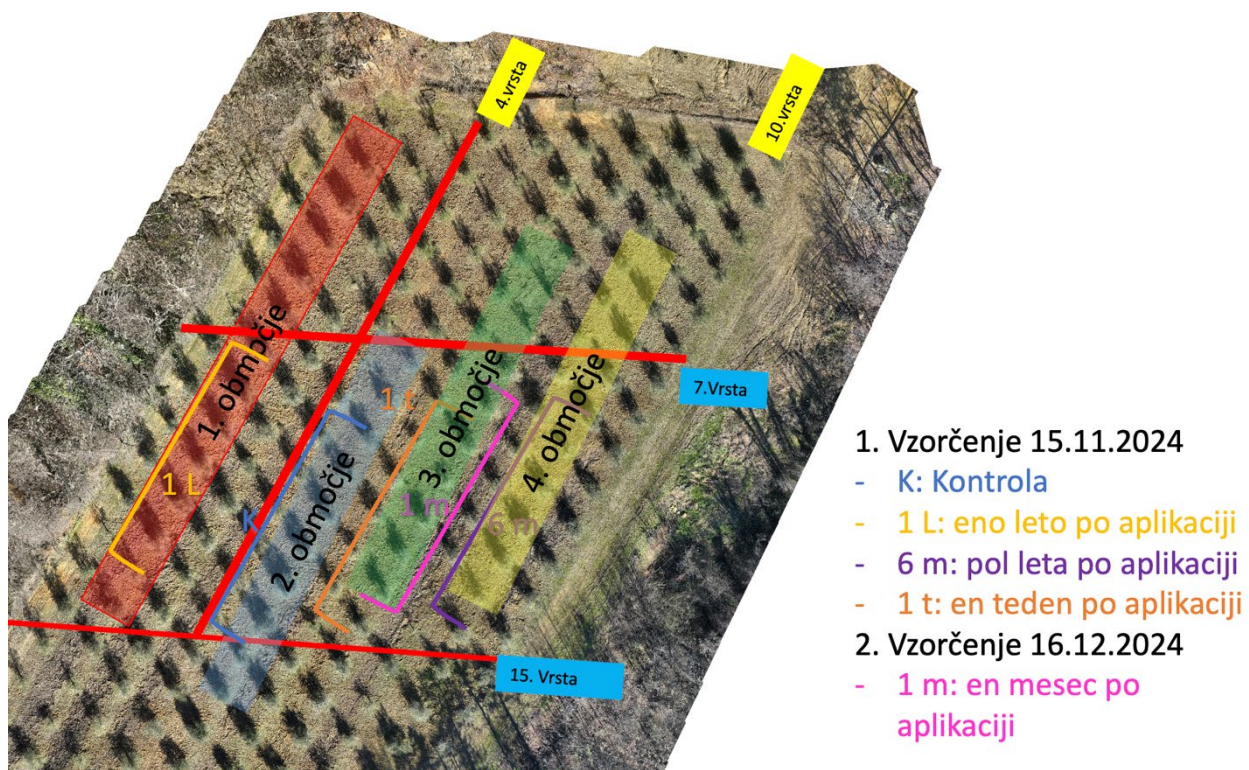
omogoča bolj realno oceno skrite biotske pestrosti, zlasti v okoljih z veliko redkimi vrstami (Chao, 1984). Indeks bogatosti (richness) pa izraža dejansko število opaženih vrst v vzorcu brez upoštevanja njihove porazdelitve. Visoka alfaraznolikost je običajno povezana z večjo stabilnostjo in funkcionalno odpornostjo mikrobnih združb, kar je pomembno za procese, kot so kroženje hranil, razgradnja organskih snovi in odpornost tal na stresne dejavnike (Hill in sod., 2003; Lozupone in Knight, 2008; Torsvik in Øvreås, 2002).

2. Materiali in metode

Poskus je potekal v letih 2023 in 2024 v oljčniku sorte 'Itrana', ki leži med Babiči in Marezigami (45°29'53.8"N 13°47'29.5"E) v submediteranskem podnebnem pasu, za katerega so značilne mile zime in topla do vroča poletja z izrazitim padavinskim maksimumom jeseni. Leta 2024 so vremenski podatki, zabeleženi z avtomatsko meteorološko postajo na lokaciji poskusa, pokazali povprečno letno temperaturo 14,8 °C, z ekstremi od -4,6 °C do 36,2 °C. Skupna količina padavin je znašala 998,8 mm, kar je v skladu z dolgoletnimi povprečji za območje slovenske Istre. Povprečna relativna zračna vlaga je bila 71 %, povprečna hitrost vetra pa 4,4 km/h. Take razmere so značilne za prehodno sredozemsko–kontinentalno podnebje, ki pomembno vpliva na lastnosti tal in fiziologijo rastlin. Tla na poskusni lokaciji so razvita na flišu in jih uvrščamo med agromeliorirana distrična tla, ki so bila rigolana do globine 60–65 cm. Pedološka analiza je pokazala srednje do težko ilovnato teksturo, kislo do zelo kislo reakcijo tal (pH 4,4–5,7) in nizko vsebnost organske snovi (0,3–1,7 %). Prav tako sta bili ugotovljeni nizka založenost s fosforjem in kalijem in zmerna zasičenost z bazičnimi kationi (28–50 %). Take talne razmere niso značilne za flišna območja slovenske Istre, kjer je pH-reakcija tal pogosto rahlo bazična (Ogrin, 2018). Lastnosti tal lahko pomembno vplivajo na dostopnost hranil in zadrževanje vode v tleh. Na poskusno površino so dve leti zapored nanašali tropine, pridobljene s tehnologijo pridelave v sistemu predelave z 2-faznim dekanterjem. Neposreden nanos tropin je bil izveden v spomladanskem in jesenskem obdobju. V spomladanskem obdobju (4. 3. 2023 in 25. 3. 2024) so bile na kmetijsko površino nanesene tropine, ki so bile predhodno shranjene šest mesecev v cisterni z zmogljivostjo 8 m², medtem ko so bile v jesenskem obdobju (18. 11. 2023 in 12. 11. 2024) nanesene sveže tropine, proizvedene sedem dni pred nanosom, v količini, ki je dovoljena z Uredbo o uporabi oljčnih tropin in rastlinske vode za gnojenje (Uradni list RS, št. 10/22), in sicer 80 m³/ha. Poskusna površina je bila pred nanosom oljčnih tropin razdeljena na štiri območja, ki so vključevala pet obravnav.

1. območje: mokre oljčne tropine, nanesene jeseni 2023 – 1. obravnava: »1 leto« (leto dni po nanosu svežih tropin);
2. območje: brez nanosa tropin »kontrola« – 2. obravnava: »kontrola«;
3. območje: mokre oljčne tropine, nanesene jeseni 2023 in 2024 – 3. obravnava: »1 teden« (teden dni po nanosu svežih tropin) – 4. obravnava: »1 mesec« (mesec dni po nanosu tropin);

4. območje: mokre oljčne tropine, nanesene spomladi 2023 in 2024 – 5. obravnava: »6 mesecev« (pol leta po nanosu skladiščenih tropin).



Slika 1: Shema vzorčenja in območji s posameznimi obravnavami

Poskus zajema pet obravnav, in sicer: »kontrolno« na 4. območju, kjer nanos tropin ni bil izveden; »1 teden« na 2. območju, kjer smo sveže tropine nanesli v jesenskem obdobju leta 2023 in 2024; »1 mesec«, ki je prav tako na 2. ploskvi, s tem da smo vzorec odvzeli mesec dni po nanosu; »6 mesecev« na 3. območju, kjer smo tropine nanesli spomladi 2023 in 2024, in »1 leto«, kjer smo tropine nanesli jeseni 2023. Vzorčenje smo izvedli 15. 11. 2024, pri čemer smo vzorčili kontrolno obravnavo in obravnavo, ki zajema nanos po pol leta, letu dni in tednu dni, ter obravnavo brez nanosa. Drugo vzorčenje smo izvedli 16. 12. 2024, pri čemer smo ponovno vzorčili v enaki vrsti kot za obravnavo, ki je zajela nanos po tednu dni in tako dobili vzorec nanosa po mesecu dni. Vzorčenje smo izvedli s sondo Eijkelkamp Purchaurer (Royal Eijkelkamp, Nizozemska), primerno za globine do 1 m, pri čemer smo vzorčili do globine 20 cm. Za vsak vzorec s petimi ponovitvami smo združili pet podvorcev, odvzetih znotraj enakega območja. Del vsakega vzorca smo shranili na 4°C za analizo metilnih estrov maščobnih kislin (FAMES), del pa na –20°C za ugotavljanje mikrobne združbe z RNA-amplifikacijo DNA odseka za 16S rRNA za bakterije in ITS2 regije za glive, da bi ugotavljali sestavo mikrobne združbe.

Lipide smo ekstrahirali iz vzorca zemlje z mešanico kloroforma, metanola in citratnega pufra (1 : 2 : 0,8 v/v/v) po metodi Bligh in Dyer (1959). Nato smo lipide frakcionirali po metodi Frostegård in sod. (1993) ter jih pretvorili v metilne estre maščobnih kislin po Guckert in sod. (1985). Vzorce smo analizirali s plinskim kromatografom Trace Ultra Thermo Scientific, opremljenim s 60 m kapilarno kolono (ThermoTR-

FAME 60 m × 0,25 mm notranji premer × 0,25 µm debelina filma). Podrobnosti o analizi maščobnih kislin in njihovi razvrstitvi v različne mikrobne združbe so opisane pri Moreno in sod. (2019).

Iz vzorcev zemlje smo izolirali in prečistili DNA z uporabo kompleta E.Z.N.A.™ Soil DNA (v skladu s protokolom proizvajalca). Koncentracijo in čistost DNA smo ocenili s spektrofotometrom NanoDrop. Za bakterijske združbe smo amplificirali V4-regijo 16S rRNA, za glive pa ITS2-regijo z ustreznimi oligonukleotidnimi zaporedji (Walters in sod., 2015). PCR (30 ciklov) smo izvedli s HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen) –94 °C 3 min, nato 30 × (94 °C 30 s, 53 °C 40 s, 72 °C 1 min) in 72 °C 5 min. Uspešnost PCR smo ovrednotili na 2-odstotnem agaroznem gelu. Enake količine PCR-produktov smo združili, očistili z magnetnimi kroglicami AMPure XP in pripravili gensko knjižnico s sistemom Illumina TruSeq Nano.

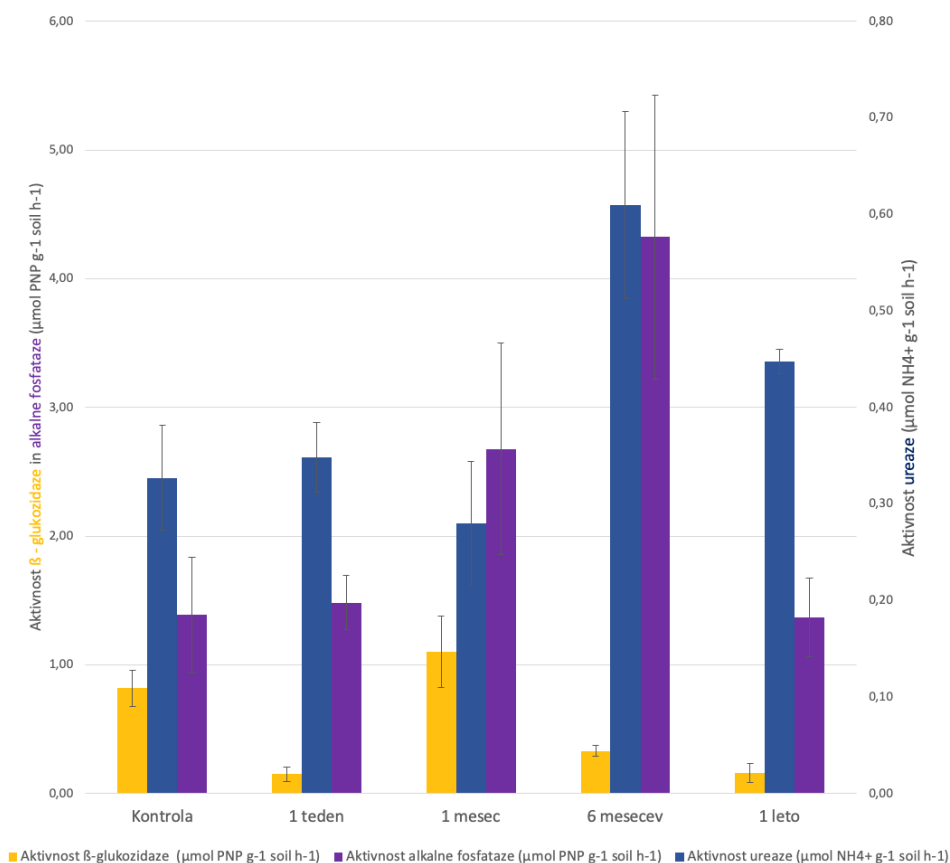
Indekse alfaraznolikosti mikrobnih združbe smo iz dobljenih podatkov na osnovi sekvenciranja za 16S rRNA (bakterije) in ITS2-regijo (glive) izračunali štiri standardne kazalnike: Chao1 (ocenjena vrstna bogatost), Richness (dejansko število opaženih vrst), Shannon-Wienerjev indeks (raznolikost z upoštevanjem enakomernosti porazdelitve) in Simpsonov indeks (dominanca taksonov). Za oceno alfaraznolikosti mikrobnih združb so bili izračunani ti indeksi: indeks bogatosti (številčnost vrst), indeks Chao1, Shannon-Wienerjev indeks (H') in Simpsonov indeks raznolikosti ($1-D$). Ti indeksi skupaj zagotavljajo vpogled v vrstno pestrost in enakomernost porazdelitve organizmov znotraj posameznih vzorcev. Indeks bogatosti (Richness) izraža osnovno število zaznanih vrst oz. operativnih taksonomskih enot v posameznem vzorcu. Indeks Chao1 je neparametrična ocena skupne vrstne pestrosti ob upoštevanju redkih vrst (enojnih in dvojnih pojavitev) in se izračuna po formuli: $Chao1 = S_{obs} + (F1^2) / (2 \times F2)$, pri čemer je: S_{obs} = število opaženih vrst; $F1$ = število vrst, ki se pojavijo samo enkrat; $F2$ število vrst, ki se pojavijo dvakrat. Shannon-Wienerjev indeks (H') je bil izračunan kot: $H' = -\sum (p_i \times \ln(p_i))$, pri čemer je p_i = relativna pogostnost vrste v vzorcu. Simpsonov indeks raznolikosti je bil izračunan kot: $D = \sum (p_i^2)$, pri čemer je p_i = relativna pogostnost vrste, ta indeks je manj občutljiv na redke vrste in bolj poudarja prevladujoče organizme. Za izračune in grafično predstavitev rezultatov smo uporabili program Microsoft Excel, kjer smo za posamezne obravnave prikazali povprečne vrednosti in standardne odklone na osnovi petih ponovitev. Podatki so predstavljeni v obliki stolpčnih grafov za primerjalno vizualizacijo obravnav.

3. Rezultati in diskusija

3.1 Aktivnost talnih encimov po nanosu tropin

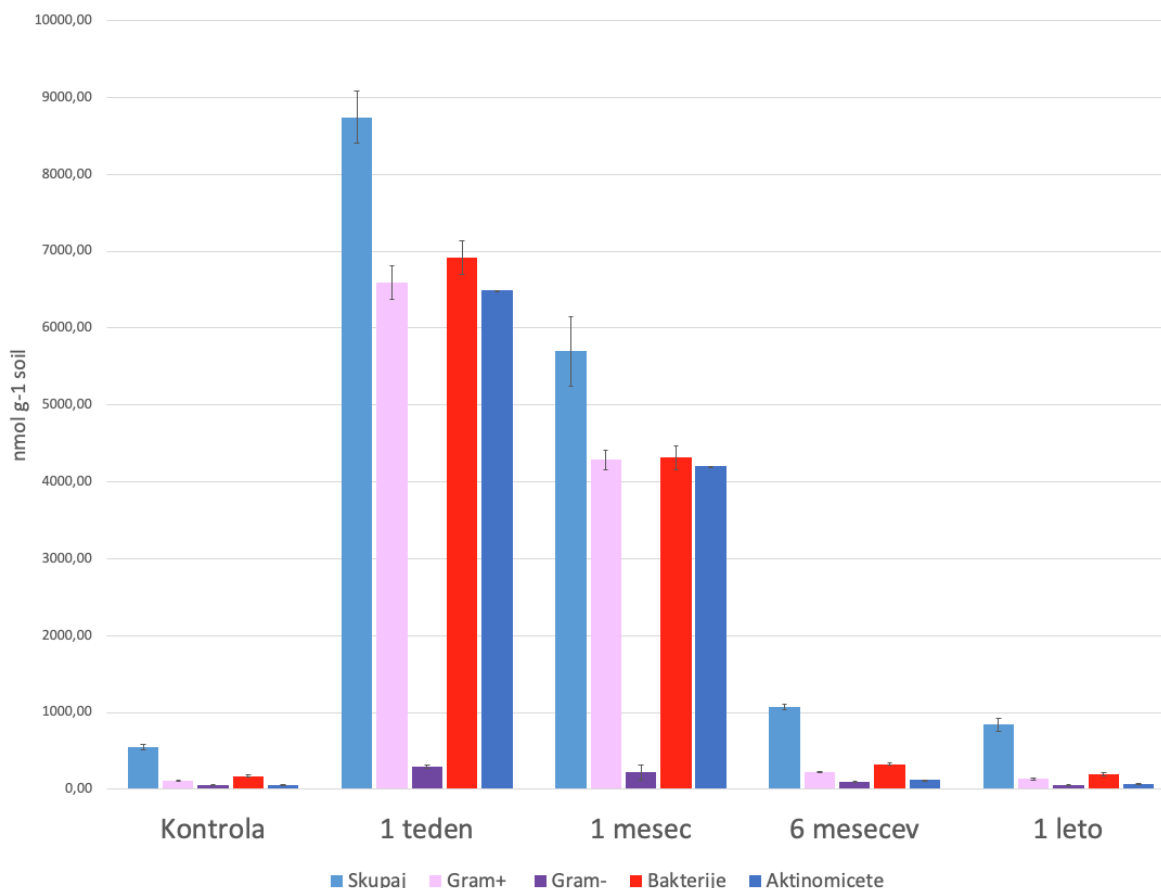
Na podlagi rezultatov analize aktivnosti talnih encimov je razviden dinamičen mikrobni odziv na vnos večje količine organske snovi. Pri obravnavi, vzorčeni teden dni po nanosu, smo zaznali nekoliko nižjo povprečno aktivnost β -glukozidaze ($0,15 \pm 0,05 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) v primerjavi s povprečjem pri kontroli ($0,82 \pm 0,14 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$), kar lahko pripišemo začetni fazi razgradnje mokrih tropin, pri kateri še ni prišlo do pomembnejše mikrobne razgradnje kompleksnih ogljikovih spojin, saj te še niso bile dostopne mikrobom (Bernal in sod., 2009; García-Gil in sod., 2000). Pri obravnavi, vzorčeni mesec dni po nanosu, je bila povprečna aktivnost β -glukozidaze najvišja ($1,10 \pm 0,28 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$), kar je v skladu z ugotovitvami Ntougiasa in sod. (2004), saj gre pri nanosu tropin za vnos večje količine organske snovi, na katero so se mikroorganizmi odzvali s proizvodnjo prisotnega talnega encima. Povečana dostopnost substratov je

verjetno vplivala na odziv mikrobne populacije, kar se kaže tudi v najvišji povprečni aktivnosti alkalne fosfataze ($2,68 \pm 0,82 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). V tem obdobju je nekoliko upadla aktivnost ureaze ($0,28 \pm 0,06 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), kar bi lahko pomenilo imobilizacijo ali predhodno porabo dušika zaradi presežka ogljikovih virov oz. porušenega razmerja C/N, do česar pride z nanosom tropin (De Neve in sod., 2004). Pri obravnavi, vzorčeni 6 mesecev po nanosu, smo zaznali povečano aktivnost ureaze ($0,61 \pm 0,10 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) in alkalne fosfataze ($4,32 \pm 1,10 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), kar verjetno izraža napredovano mineralizacijo dušikovih in fosforjevih spojin. Sočasno je bila aktivnost β -glukozidaze v povprečju nižja ($0,33 \pm 0,05 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), kar lahko kaže zmanjšano razpoložljivost razgradljivih ogljikovih substratov ali preusmeritev mikrobne aktivnosti k presnovi dušika in fosforja. V obravnavi z najdaljšim časovnim zamikom po aplikaciji (približno leto dni) sta bili povprečni aktivnosti ureaze ($0,45 \pm 0,01 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) in alkalne fosfataze ($1,37 \pm 0,31 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) še nekoliko povišani v primerjavi s kontrolo, vendar znižani v primerjavi z obravnavo »6 mesecev«. Taka sprememba je v skladu z ugotovitvami Innangija in sod. (2017), ki navajajo, da dolgotrajna aplikacija oljnih tropin poveča aktivnosti β -glukozidaze, ureaze in fosfataze. Aktivnosti talnih encimov ureaze in fosfataze se pogosto uporabljajo kot kazalnik mineralizacije dušika in fosforja, kar potrjujejo tudi študije Garcíe-Ruiza in sod. (2008), v kateri so omenjeni encimi služili kot zanesljivi pokazatelji izboljšanja biološke kakovosti tal v povezavi z uporabo organskih gnojil.



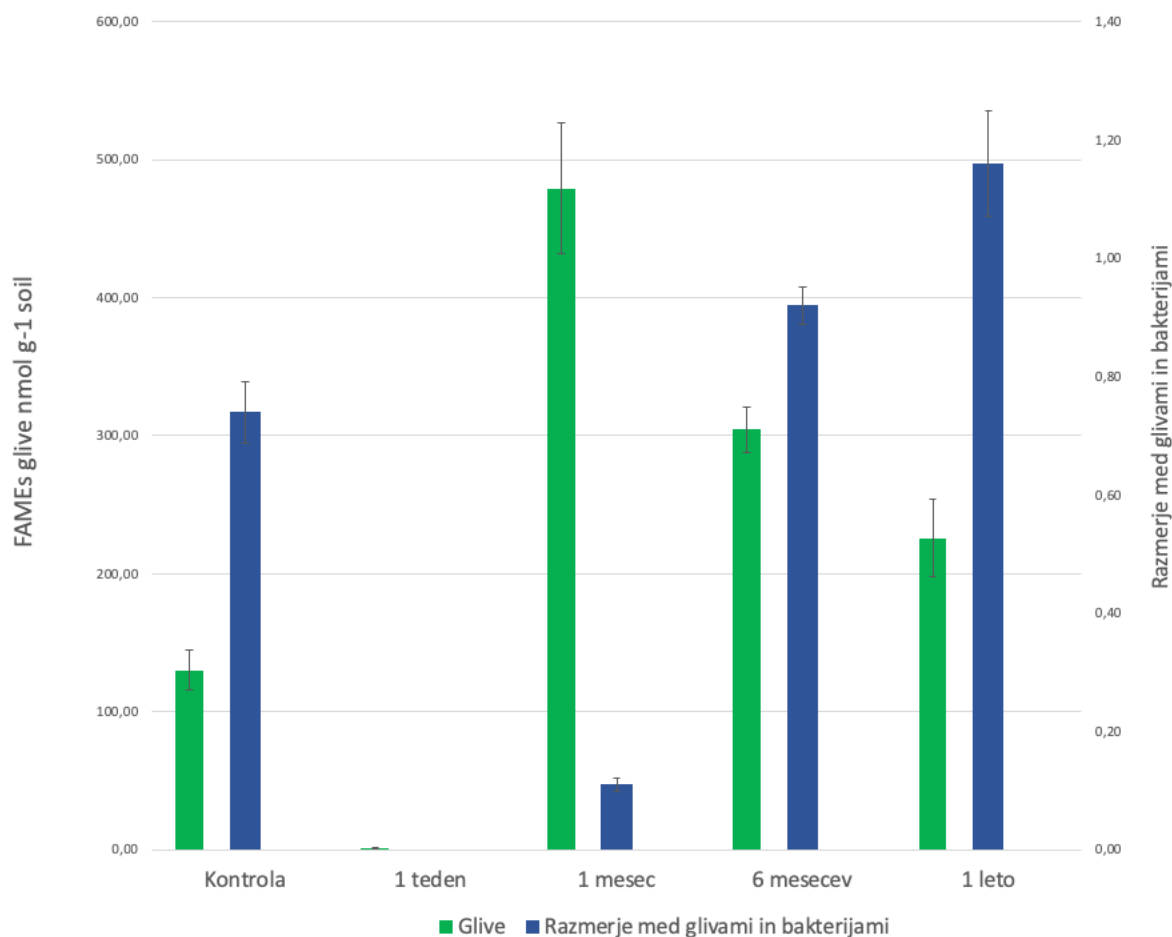
Slika 2: Povprečna aktivnost posameznih talnih encimov glede na obravnavo

3.2 Odziv talne mikrobne združbe na nanos tropin na osnovi analize FAMEs



Slika 3: Sestava mikrobne združbe v tleh po različnih obdobjih predhodnega nanosa oljčnih tropin (kontrola, 1 teden, 1 mesec, 6 mesecev, 1 leto), izražena kot vsebnost metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) v nmol g⁻¹ suhe zemlje

Za oceno sprememb v mikrobni združbi tal po nanosu oljčnih tropin smo uporabili analizo metilnih estrov maščobnih kislin (FAMEs), ki omogoča profiliranje mikrobne biomase in določitev glavnih mikrobnih združb na podlagi značilnih lipidnih markerjev (Zelles, 1999; Frostegård in sod., 1993). Na sliki 3 je prikazana sestava mikrobne združbe v tleh po različnih obdobjih po nanosu oljčnih tropin, ki se izraža kot koncentracija metilnih estrov maščobnih kislin (FAMEs) v nmol g⁻¹ suhe zemlje. Tropine smo nanosili v različnih časovnih razmikih pred vzorčenjem (teden dni, mesec dni, 6 mesecev, leto dni). Najvišje povprečne vrednosti skupne mikrobne biomase (skupaj) so bile izmerjene pri obravnavi z nanosom tropin teden dni pred vzorčenjem ($8742,8 \pm 339,3$ nmol g⁻¹), pri čemer so izrazito prevladovali gram pozitivne bakterije ($6591,0 \pm 222,3$ nmol g⁻¹) in aktinomicete ($6489,8 \pm 247,6$ nmol g⁻¹).



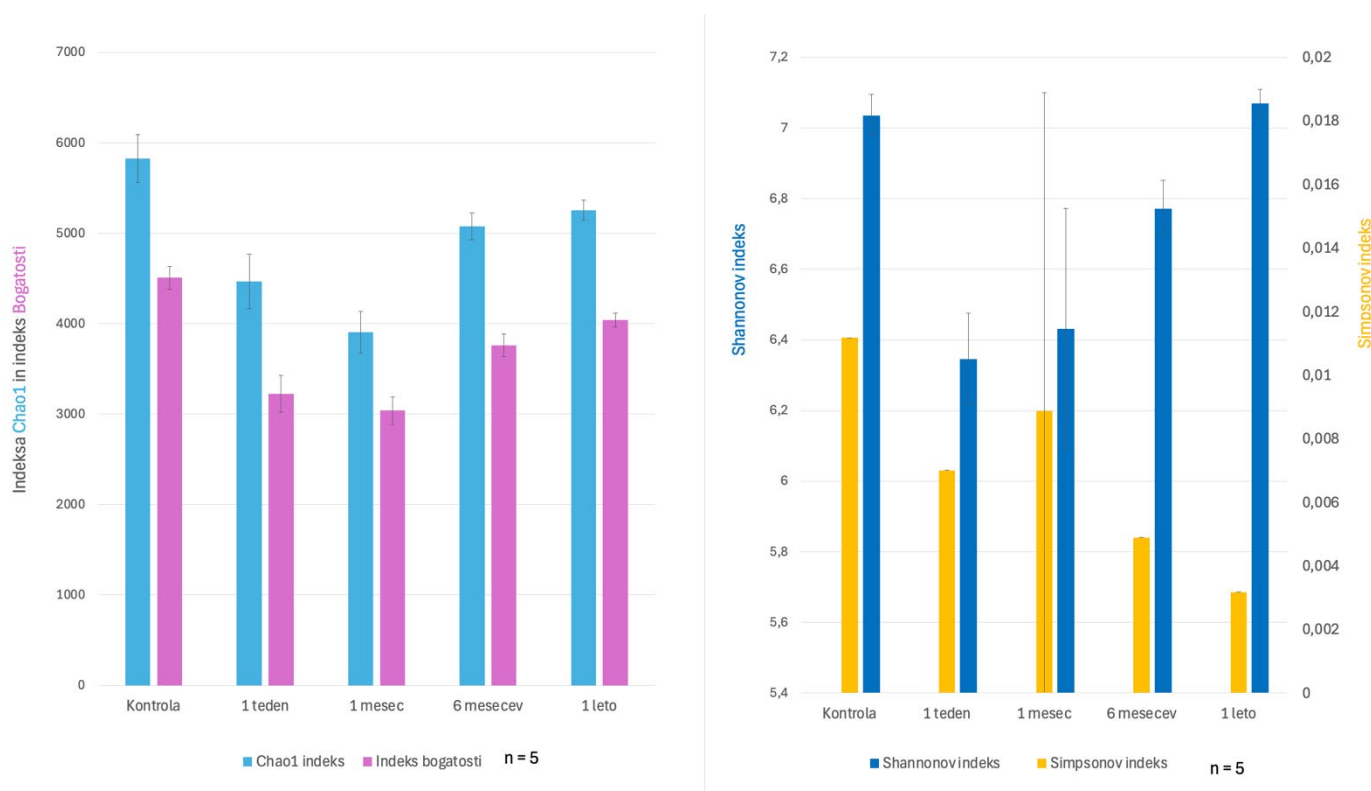
Slika 4: Sestava mikrobne združbe gliv v tleh po različnih obdobjih predhodnega nanosa aplikacije oljčnih tropin (kontrola, 1 teden, 1 mesec, 6 mesecev, 1 leto), ki se izražaena kot vsebnost metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) v nmol g⁻¹ suhe zemlje ter razmerje med bakterijami in glivami

Pri obravnavi, vzorčeni teden dni po nanosu, so bile vrednosti gliv (slika 4) izjemno nizke ($1,06 \pm 0,11$ nmol g⁻¹), kar kaže močno inhibicijo glivne aktivnosti, najverjetneje zaradi prisotnosti fenolnih spojin in drugih fitotoksičnih komponent v svežih tropinah. Posledično je bilo razmerje glive/bakterije (F/B) izjemno nizko ($0,00 \pm 0,00002$), kar kaže na izrazito prevladovanje bakterijske združbe. V obravnavi, pri kateri smo tropine nanесли mesec dni pred vzorčenjem, se je mikrobna biomasa znižala ($5699,9 \pm 45312$ nmol g⁻¹), glive pa so se začele ponovno pojavljati ($479,28 \pm 47,37$ nmol g⁻¹), kar se izraža tudi v rahlem povečanju razmerja F/B ($0,11 \pm 0,0110$). V obravnavah 6 mesecev in leto dni po nanosu je bila skupna biomasa precej nižja (npr. 1 leto: $840,31 \pm 82,21$ nmol g⁻¹), delež gliv pa je bil relativno večji, kar se izraža v višjih razmerjih F/B – pri enoletni obravnavi doseže F/B $1,16 \pm 0,09$. To nakazuje, da se z razgradnjo in stabilizacijo organskih spojin vzpostavijo pogoji, ki omogočajo večji delež gliv v mikrobni združbe. Podobne trende so ugotovili tudi Mechri in sodelavci (2007), ki so pri uporabi odpadnih voda iz trofaznega dekanterja opazili začetno inhibicijo mikrobne aktivnosti zaradi prisotnosti fenolnih spojin, vendar je sledila prilagoditev mikrobne združbe in postopna obnova aktivnosti. Prav tako Nasini in sodelavci (2012) poročajo, da dolgotrajno

nanašanje trdnih tropin vodi v izboljšanje fizikalno-kemičnih lastnosti tal, kar lahko ustvari stabilnejše pogoje za delovanje gliv, zlasti v poznejših fazah po nanosu.

3.3 Indeksi alfaraznolikosti mikrobne združbe

Za oceno vpliva nanosa oljčnih tropin na talno mikrobno raznolikost smo iz rezultatov sekvenciranja nukleotidnih zaporedij fragmentov gena za 16S rRNA (bakterije) in ITS2-regije (glive) izračunali štiri kazalnike alfaraznolikosti: indeks Chao1 (ocenjena vrstna bogatost), indeks bogatosti (dejansko število opaženih vrst), Shannon-Wienerjev indeks (raznolikost ob upoštevanju enakomernosti) in Simpsonov indeks (prevladovanje posameznih vrst, pri čemer nižje vrednosti pomenijo večjo raznolikost). Povprečne vrednosti in standardni odkloni za bakterijske združbe so prikazani na slikah 5 in 6. Pri bakterijah so bile najvišje vrednosti vrstne bogatosti zabeležene v kontrolni obravnavi brez nanosa tropin (Chao1: $5825,4 \pm 265,9$; Richness: $4509,6 \pm 128,6$). Pri vseh obravnavah, v katerih smo nanosili tropine, so bile vrednosti teh indeksov nižje, kar kaže na zmanjšanje vrstne bogatosti bakterijske združbe.

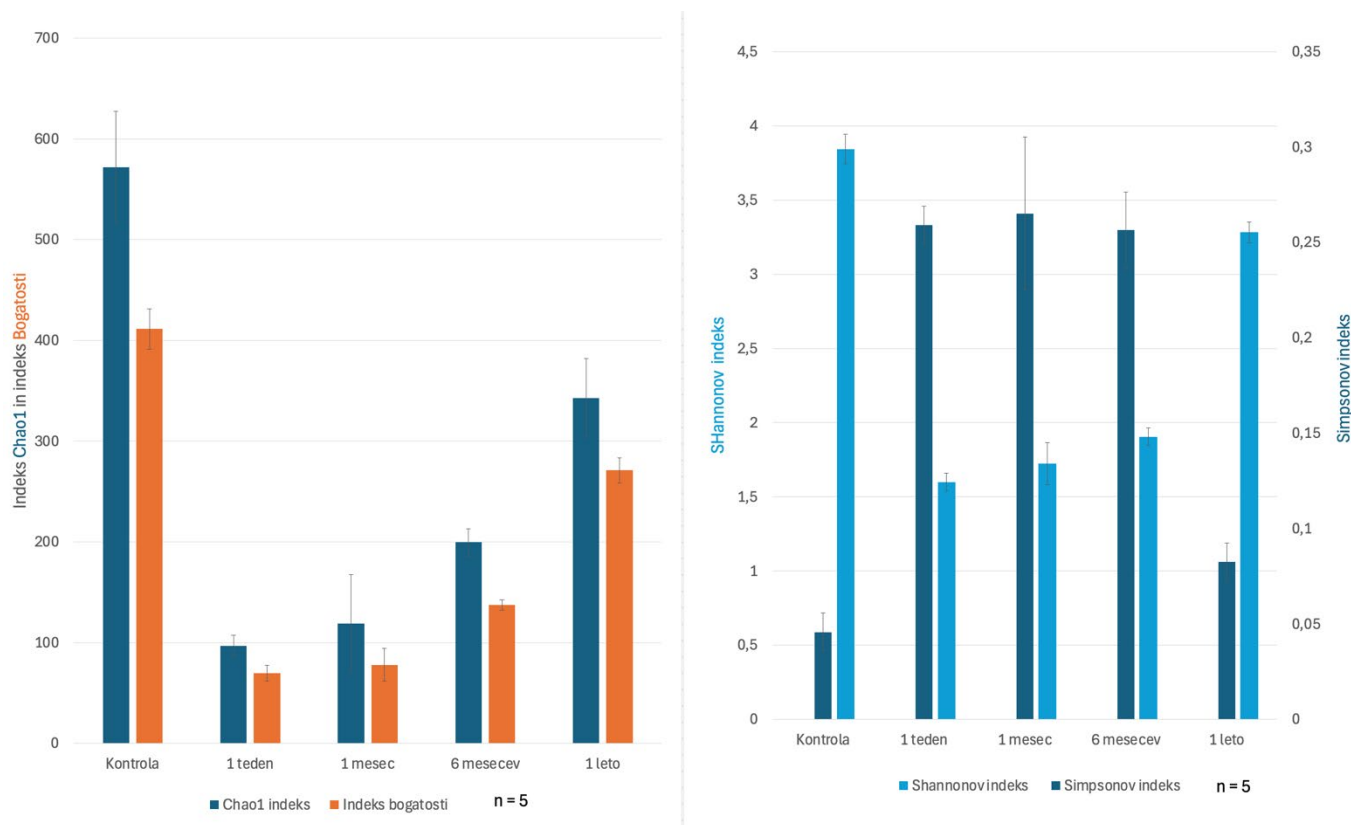


Sliki 5 in 6: Indeksi alfaraznolikosti bakterijskih združb v različnih časovnih obdobjih po nanosu oljčnih tropin.

Najnižji Shannon-Wienerjev indeks ($6,35 \pm 0,13$) je bil izmerjen pri obravnavi, vzorčeni teden dni po nanosu, medtem ko je bila vrednost tega indeksa najvišja pri obravnavi, vzorčeni leto dni po nanosu ($7,07 \pm 0,04$), kar kaže delno okrevanje raznolikosti. Najnižji Simpsonov indeks, ki nakazuje manjšo dominanco posameznih vrst, je bil prav tako zabeležen v obravnavi »1 leto« ($0,0032 \pm 0,00$), kar potrjuje večjo enakomernost združbe pri tej obravnavi ter je v skladu z ugotovitvami Lanza in sod. (2020).

Slika 5 prikazuje vrstno bogatost, izraženo z indeksoma Chao1 in bogatosti desna slika 6 pa Shannon-Wienerjev in Simpsonov indeks. Vrednosti ponazarjajo povprečja petih ponovitev, stolpci pa vključujejo standardni odklon.

Za ugotavljanje alfaraznolikosti pri glivah smo izračunali enake kazalnike kot pri bakterijah. Podatke smo pridobili na osnovi amplifikacije in sekvenciranja ITS2-odseka DNA. Rezultati kažejo, da so pri glivah razlike med obravnavami še izrazitejše. Kot je razvidno s slik 7 in 8, je kontrolna obravnava imela najvišje vrednosti



Sliki 7 in 8: Indeksi alfaraznolikosti bakterijskih združb v različnih časovnih obdobjih po nanosu oljčnih tropin.

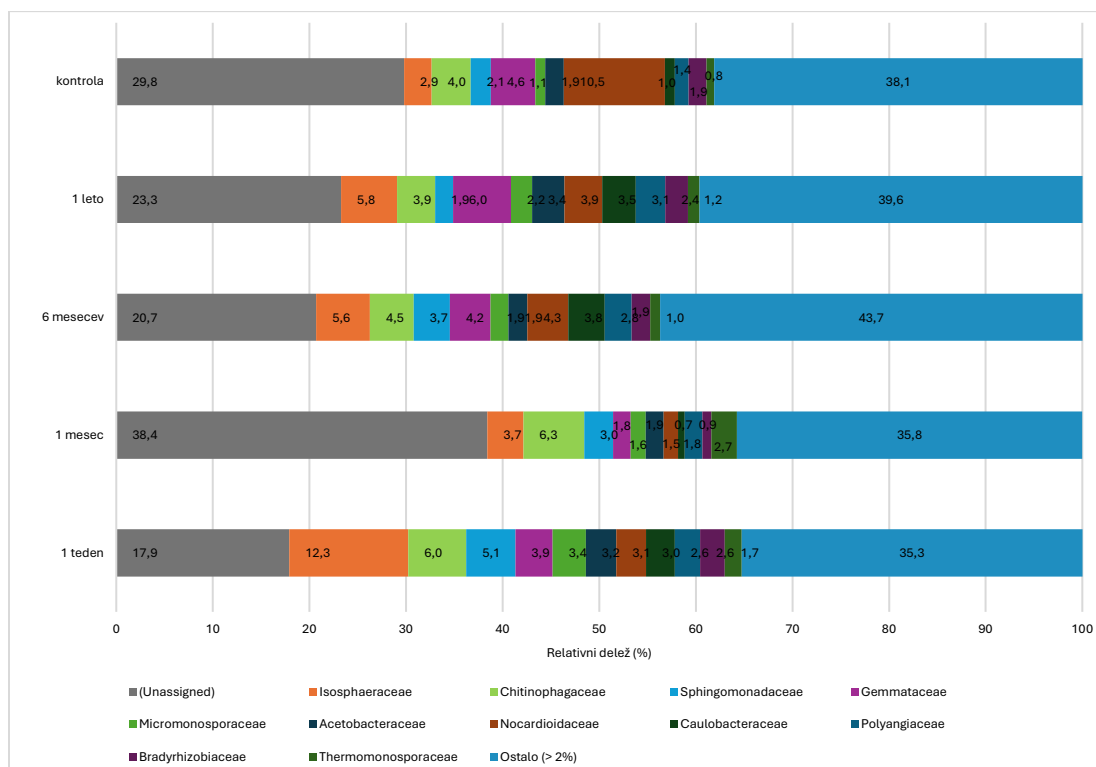
kazalnikov bogatosti (Chao1: $571,7 \pm 55,4$; bogatosti: $411,4 \pm 20,0$), medtem ko so bile pri obravnavah »1 teden«, »1 mesec« in »6 mesecev« vrednosti indeksov Chao1 in bogatosti izrazito nižje. V primerjavi s kontrolo je bil preračunan Shannon-Wienerjev indeks pri teh obravnavah nižji, Simpsonov indeks pa višji v primerjavi z obravnavo, v kateri tropine niso bile nanesene, kar nakazuje, da se z nanosom tropin raznolikost gliv zmanjša, hkrati pa pride do prevladovanja posameznih taksonov. Najnižji Simpsonov indeks ($0,02 \pm 0,01$) je bil izračunan pri kontrolni obravnavi, kar kaže enakomernost porazdelitve taksonov gliv brez pretiranega prevladovanja posameznih vrst. Obravnava »1 leto« izkazuje izboljšanje z večjo raznolikostjo (Shannon: $3,28 \pm 0,07$; Simpson: $0,08 \pm 0,01$), vendar še vedno ni dosežena raven kontrolne obravnave.

Podatki kažejo, da so bile mikrobne združbe v kontrolnih vzorcih bolj raznolike po bogatosti in enakomernem zastopanju posameznih taksonov. Nanos tropin lahko torej povežemo z zmanjšanjem

raznolikosti mikrobnih združbe, posebej izrazito se je to pokazalo pri glivah. Primerjava obravnav ne kaže enopomenskega trenda, temveč prej razlike, ki izhajajo iz kompleksnih odzivov mikrobnih združb na različne stopnje razgradnje in razpoložljivosti organske snovi iz tropin v tleh. Posebno združba gliv glede na dobljene podatke kaže večjo občutljivost za nanos tropin in izrazitejšo spremembo v strukturi združbe v primerjavi z bakterijsko združbo. Taka opažanja so v skladu z ugotovitvami dveh študij, v katerih je navedeno, da odpadna voda iz oljarn povzroča začasno inhibicijo mikrobne aktivnosti, pri čemer so glive občutljivejše (Karpouzas in sod., 2010; Bleve in sod., 2011). Znana je tudi zmanjšana raznolikost gliv v začetni fazi po uporabi kompostiranih tropin ali odpadne vode, ki ji sledi ponovna vzpostavitev raznolikosti ali celo povečanje encimske aktivnosti gliv, ko se fenolne spojine razgradijo (Mechri in sod., 2007; Zervakis in sod., 2013).

3.4 Relativna zastopanost posameznih rodov bakterij na osnovi amplifikacije in sekvenciranja odseka gena 16S rRNA

Amplifikacija in sekvenciranje odseka gena 16S rRNA nam omogoča kvantifikacijo relativnih deležev bakterij na različnih taksonomskih ravneh, prisotnih v vzorcih posameznih obravnav. Na grafu je prikazana taksonomska raven družine z deležem nad 2 %, preostale družine z nižjo pojavnostjo pa smo združili v kategorijo Drugo (< 2 %). Med obravnavami so opazne razlike povprečnih relativnih deležev mikrobov na taksonomski ravni družin in s tem tudi potencialni funkcionalni vlogi prevladujočih mikroorganizmov.



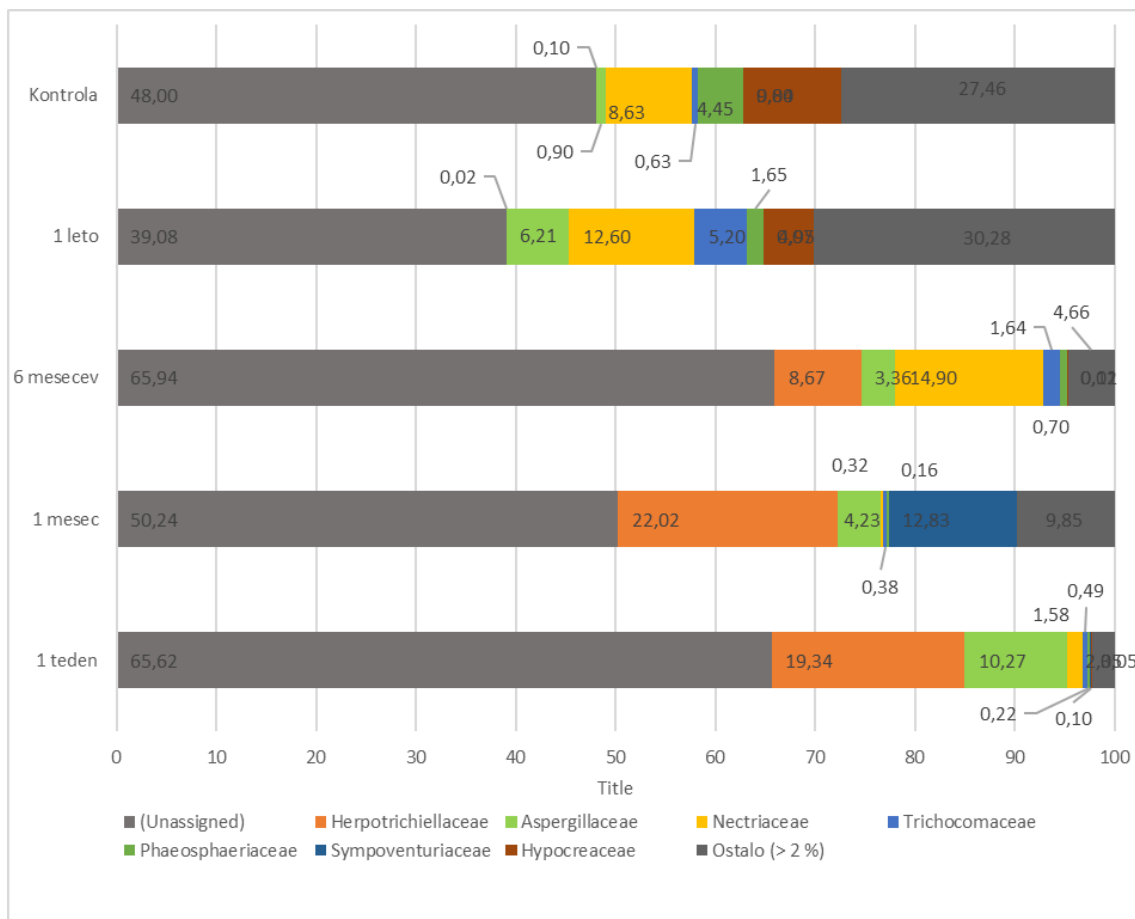
Slika 9: Relativna zastopanost dominantnih bakterijskih družin posameznih obravnav po nanosu aplikaciji mokrih tropin.

V zgodnjih fazah po nanosu tropin (obravnavi »1 teden« in »1 mesec«) je bil zaznan zelo visok delež nerazvrščenih taksonov (ang. unassigned), kar lahko izraža prisotnost mikroorganizmov, ki še niso vključeni v referenčne taksonomske baze. Treba je poudariti, da lahko k razlikam med obravnavami prispevajo sezonske razlike v sestavi tropin. Spomladanski nanos tropin, ki vsebuje višjo koncentracijo fenolnih spojin, lahko na mikrobno združbo vpliva drugače kot jesenski, zlasti glede na fitotoksičnost in specifične selekcijske pritiske (Tsioulpas in sod., 2002; Mechri in sod., 2007). Poleg tega so se v nekaterih študijah nerazvrščeni taksoni pogosto pojavljali v okoljih z visoko vsebnostjo kompleksnih organskih snovi ali fenolov, kar lahko oteži taksonomsko klasifikacijo (Cavicchioli in sod., 2003; Tanca in sod., 2017). Zato je mogoče, da kombinacija spremenjene sestave tropin in odsotnosti referenčnih zaporedij v bazah podatkov vodi v višji delež nerazvrščenih taksonov. Pri obravnavi, vzorčeni teden dni po nanosu tropin, se med družinami z deležem nad 2 % pojavljajo: Isosphaeraceae, Gemmataceae, Sphingomonadaceae, Comamonadaceae in Pseudonocardiaceae. Družina, kot je Isosphaeraceae, je pogosto prisotna v organsko bogatih okoljih in povezana z razgradnjo kompleksnih polisaharidov (Ivanova in sod., 2017). Družine, kot je Sphingomonadaceae, so znane po razgradnji aromatskih spojin, družina Chitinophagaceae pa je pomembna pri razgradnji hitina (Xu in sod., 2022; Singh in sod., 2019). Pri obravnavi, vzorčeni po mesecu dni, se med najpogostejšimi pojavljajo rodovi iz družin Lactobacillaceae, Micromonosporaceae in Microbacteriaceae. Povečana prisotnost Lactobacillaceae kaže morebiten potek fermentacijskih procesov, kar je v skladu z začetnimi anaerobnimi pogoji, ki bi lahko nastali v tleh po nanosu svežega organskega materiala (Bintsis, 2018; Yan in sod., 2022; Kang in sod., 2016). Pri obravnavi, vzorčeni po šestih mesecih, se opazi prestrukturiranje mikrobne združbe z zmanjšanjem deleža nerazvrščenih (ang. unassigned) in povečanjem deležev družin Streptomycetaceae, Micromonosporaceae in Chitinophagaceae. Takšna sestava kaže na prehod iz fermentativne v bolj stabilno in saprotrofsko usmerjeno skupnost. Družina, kot je Streptomycetaceae ima namreč najverjetneje vlogo pri razgradnji lignoceluloznih komponent (Book in sod., 2014). Po enem letu od aplikacije se pokaže trend stabilizacije združbe, pri čemer so deleži funkcionalno pomembnih družin večji kot pri kontroli obravnave. V tej fazi se mikrobiom kaže kot bolj funkcionalno usmerjen, z večjo sposobnostjo razgradnje kompleksne organske snovi. Kontrolna obravnava, ki ni prejela dodatka organskega materiala, ostaja preprostejša in z višjim deležem nerazvrščenih enot. Rezultati kažejo, da ima nanos oljčnih tropin potencial za dolgoročno prestrukturiranje bakterijske mikrobne združbe.

3.5 Relativna zastopanost posameznih rodov gliv na osnovi amplifikacije in sekvenciranja regije ITS2

Rezultati sekvenciranja regije ITS2 so pokazali izrazite razlike v strukturi glivne združbe in s tem večje razlike med obravnavami. V vseh vzorcih so prevladovali neklasificirani taksoni (»unassigned«), kar potrjuje prisotnost gliv, ki še niso vključene v obstoječe referenčne baze podatkov. Najvišjo prisotnost neklasificiranih taksonov smo zabeležili pri obravnavi »6 mesecev« (65,9 %), kar morda kaže pomembno, vendar še nepojasnjeno vlogo tovrstnih gliv pri procesu razgradnje. V zgodnji fazi, torej mesec dni po nanosu, so prevladovale družine, kot sta Phaffomycetaceae (22,0 %) in Saccharomycetaceae (12,83 %). Obe vključujeta številne vrste kvasovk, ki so znane po svoji sposobnosti hitrega izkoriščanja lahko dostopnih ogljikovih virov, kar ustreza razmeram po vnosu svežega organskega materiala (Kurtzman in sod., 2011). Pri obravnavi »1 leto« so večji deleži predstavljale družine, kot sta Herpotrichiellaceae (13,98 %) in

Pleurostomataceae (12,6 %), na podlagi česar je mogoče sklepati o prehodu v bolj specializirano glivno združbo. Ti taksoni so pogosto povezani s počasnejšo rastjo, melanizacijo in sposobnostjo razgradnje kompleksnejših organskih spojin, kot je lignin (Baldrian, 2017). Opazna je tudi dinamika nekaterih oportunističnih družin, kot sta Phaffomycetaceae in Saccharomycetaceae, ki sta bili z visokim deležem zastopani v zgodnji fazi, po letu dni pa sta skoraj popolnoma izginili. Taka dinamika potrjuje rezultate raziskav, ki so proučevale učinke vnosa organskih snovi v tla in pokazale, da oportunistične kvasovke v tleh navadno prevladujejo le kratek čas (López-Mondéjar in sod., 2015). Rezultati torej kažejo večje razlike v sestavi združbe gliv med posameznimi obravnavami.



Slika 10: Relativna zastopanost dominantnih družin gliv pri posameznih obravnavah po nanosu aplikaciji mokrih tropin

4. Sklepi

Rezultati kažejo, da ima uporaba oljčnih tropin v trajnem nasadu izrazit vpliv na mikroorganizme tal. Takoj po nanosu pride do zmanjšane aktivnosti nekaterih encimov in izrazite inhibicije populacije gliv, kar gre najverjetneje pripisati prisotnosti fenolnih spojin v svežih tropinah. Vendar se encimska aktivnost in diverziteta mikrobne združbe začneta stabilizirati že po določenem času po nanosu. Z vidika trajnostnega kmetijstva so se oljčne tropine izkazale kot dragocen organski dodatek, ki lahko ob ustreznem načrtovanju vnosa izboljša biološko delovanje tal in delno nadomesti potrebe po mineralnih gnojilih. Ključno je upoštevanje količine, časa nanosa in stanja tropin, saj lahko nepravilna uporaba povzroči začasno neravnovesje v mikrobni aktivnosti. Za poglobljeno razumevanje dolgoročnega vpliva aplikacije oljčnih tropin na mikrobno združbo tal bi bilo smiselno poskus razširiti v daljše časovno obdobje. Trenutni rezultati namreč kažejo pomembne spremembe v sestavi in aktivnosti mikrobnih združb po nanosu, zato bi lahko večletno spremljanje posameznih obravnav omogočilo boljši vpogled v trajnostne učinke in morebitno stabilizacijo talne mikrobiote.

5. Zahvala

Avtorji se zahvaljujejo financerjem projekta (Javni agenciji za raziskovalno dejavnost, Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano), Sandiju Babiču in sodelavcem Inštituta za oljkarstvo ZRS Koper ter vsem, ki so med letoma 2022 in 2025 kakor koli sodelovali pri izvedbi raziskave.

6. Viri in literatura

Alburquerque, J. A., González, J., Tortosa, G., Baddi, G. A., in Cegarra, J., 2004a: Composting of two-phase olive mill wastes: Organic matter degradation and nitrogen transformation. *Bioresource Technology*, 91(1), 109–114.

Alburquerque, J. A., González, J., Garcia, D., Cegarra, J., 2004b: Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource technology*. 91(2): 195–200.

Baldrian, P., 2017: Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 109–130.

Bernal, M. P., Alburquerque, J. A., in Moral, R., 2009: Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444–5453.

Bintsis, T., 2018: Review on Lactobacillaceae fermentations—role of lactic acid production from carbohydrates. *Journal of Applied Microbiology*.

Bleve, G., Lezzi, C., Mita, G., D’Ostuni, I., Gallo, A., Greco, D., Tristezza, M., in Di Venere, D., 2011: Monitoring of microbial communities in composting olive mill wastes and evaluation of enzyme activities linked to the composting process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7): 1006–1014.

Bligh, E. G., in Dyer, W. J., 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.

Book, A. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Takasuka, T. E., Wendt-Pienkowski, E., in Doering, D. T., 2014: Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. *PLoS Biology*, 12(12): e1001992.

Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S., in Williams, T. J., 2003: Biotechnological uses of archaeal and bacterial extremozymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1): 3–50.

Cavigelli, M. A., Robertson, G. P., in Klug, M. J., 1995: Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 170(1), 99–113. <https://doi.org/10.1007/BF02183056>.

Chao, A., 1984: Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4): 265–270.

De Neve, S., Sáez, S. G., Chaves Daguiar, B., Sleutel, S., in Hofman, G., 2004: Manipulating N mineralization from high N crop residues using on- and off-farm organic materials. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 127–134.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., in Michaud, P., 2013: Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48: 1532–1552.

Di Giovacchino, L., Costantini, N., in Ferrante, M., 2001: Utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione: effetti sulle colture e sul terreno. *Agricoltura Mediterranea*, 131: 33–41.

Di Serio, M. G., Lanza, B., Mucciarella, M. R., Iannucci, E., Savastano, D., Clodoveo, M. L., in Tamborrino, A., 2008: Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. *Bioresource Technology*, 99(8), 2878–2885.

- Frostegård, Å., Tunlid, A., in Bååth, E., 1993: Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3605–3617.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., in Polo, A., 2000: Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1907–1913.
- García-Ruiz, R., Ochoa, M. V., Hinojosa, M. B., in Gómez-Muñoz, B., 2021, Improved soil quality after 16 years of olive mill pomace application in olive oil groves. *Agronomy*, 11(8), 1590.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M. B., in Carreira, J. A., 2008: Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9): 2137–2145.
- García-Ortiz, A., in Frías, L., 1993: El riego con alpechín. *Agricultura, Revista Agropecuaria*, (730), 426–431.
- Guckert, J. B., Hood, M. A., in White, D. C., 1985: Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 491–495.
- Gómez-Cruz, I. del M., Contreras, M., Romero, I., in Castro, E., 2024: Towards the Integral Valorization of Olive Pomace-Derived Biomasses through Biorefinery Strategies. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 38(1), 1–19.
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., in Moffett, B. F., 2003: Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 43(1): 1–11.
- Innangi, M., De Marco, A., De Benedetti, R., Moscatelli, M. C., Mingo, A., Marinari, S., in Giagnoni, L., 2017: Long-term amendment with olive mill waste induces changes in soil biochemical activities and microbial community structure. *Science of the Total Environment*, 577, 576–584.
- Ivanova, A. A., Naumoff, D. G., Kulichevskaya, I. S., Miroshnikov, K. K., Liesack, W., in Dedysh, S. N., 2017: Comparative genomics of four *Isosphaeraceae* Planctomycetes: A common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by *Paludisphaera borealis* PX4^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, and strain SH-PL62. *Frontiers in Microbiology*, 8, 412.
- Kang, J., Zeng, Y., Zhu, Y., Liu, X., Hou, D., Gao, Y., Wang, J., Xu, J., in Wu, F., 2016: Illumina-based analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity of the root-associated bacterial communities of maize (*Zea mays*) under cadmium stress. *Journal of Environmental Sciences*, 40: 228–235.
- Karpouzas, D. G., Paschalidis, C., Vryzas, Z., in Papadopoulou-Mourkidou, E., 2010: Fate and effect of olive mill wastewater on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Biology and Fertility of Soils*, 46: 805–814.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., in Boekhout, T. (ur.), 2011: *The Yeasts: A Taxonomic Study* (5th ed.). Elsevier.
- Lanza, B., Di Serio, M. G., in Di Giovacchino, L., 2020: Microbiological and chemical modifications of soil cultivated with grapevine following agronomic application of olive mill wastewater. *Water, Air, Soil Pollution*, 231: 86.
- Lozupone, C. A., in Knight, R., 2008: Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4): 557–578.

López-Mondéjar, R., Voříšková, J., Větrovský, T., in Baldrian, P., 2015: The bacterial community inhabiting temperate deciduous forest soil is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 87: 43–50.

López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Rato Nunes, J. M., in Barreto, C., 2008: Short and medium-term effects of two- phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioresource Technology*. 99: 7982–7987.

López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Rato Nunes, J. M., Peña, D., in Cabrera, D., 2011: Cumulative and residual effects of two-phase olive mill waste on olive grove production and soil properties. *Soil Science Society of America Journal*. 75: 1061–1069.

Markhali, F. S., Teixeira, J. A., in Rocha, C. M. R., 2020: Olive tree leaves-A source of valuable active compounds. *Processes*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/PR8091177>.

Mechri, B., Issaoui, M., Echbili, A., Baccouri, O., in Hammami, M., 2007: Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6): 777–785.

Moreno, J. L., Torres, I. F., García, C., López-Mondéjar, R., in Bastida, F., 2019: Land use shapes the resistance of the soil microbial community and the C cycling response to drought in a semi-arid area. *Sci. Total Environ.* 648, 1018–1030.

Muyzer, G., de Waal, E. C., in Uitterlinden, A. G., 1993: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.

Nasini, L., Gigliotti, G., Balduccini, M. A., Federici, E., Cenci, G., in Proietti, P., 2012: Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 164, 292–297.

Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., in Papadopoulou, K. K., 2004: Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology*, 157(4): 376–385.

Ogrin, D. (ur.), 2018: Geografija stika slovenske Istre in Tržaškega zaliva. Ljubljana: Znanstvena založba Filozofske fakultete

Podgornik, M., Bučar-Miklavčič, M., Levart, A., Salobir, J., Rezar, V., in Butinar B., 2022: Chemical characteristics of two-phase olive-mill waste and evaluation of their direct soil application in humid Mediterranean regions. *Agronomy [na spletu]*. 2022. Vol. 12, no. 7, 1621.

Ritchie, N. J., Schutter, M. E., Dick, R. P., in Myrold, D. D., 2000: Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1668–1675. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1668-1675.2000>.

Roig, A., Cayuela, M. L., in Sánchez-Monedero, M. A., 2006: An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*. 26: 960–969.

Shannon, C. E., 1948: A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423.

Simpson, E. H., 1949: Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.

- Singh, B. K., Trivedi, P., Egidi, E., Macdonald, C. A., in Delgado-Baquerizo, M., 2019: Crop microbiome and sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 601–602.
- Song, Y., Deng, S. P., Acosta-Martínez, V., in Katsalirou, E., 2008: Characterization of redox-related soil microbial communities along a river floodplain continuum by fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA genes. *Applied Soil Ecology*, 40(3), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.07.005>.
- Tanca, A., Palomba, A., Pisanu, S., Deligios, M., Fraumene, C., Manghina, V., Pagnozzi, D., Addis, M. F., in Uzzau, S., 2014: A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome*, 2(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40168-014-0049-2>.
- Torsvik, V., in Øvreås, L., 2002: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3): 240–245.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., in Aggelis, G., 2002: Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol-oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84(3), 251–257.
- Walters, W. A., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A. E., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. G., Fuhrman, J. A., Apprill, A., in Knight, R., 2015: Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4–5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 1(1), e00009-15.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., in Taylor, J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky in T. J. White (ur.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Willers, C., Jansen van Rensburg, P. J., in Claassens, S., 2015: Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities—a review of interpretations and recent applications. *Journal of Applied*.
- Xu, L., Ahmed, B., in Liu, H., 2022: Microbial degradation of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 20(4): 216.
- Yan, Y., Kuramae, E. E., de Hollander, M., Klinkhamer, P. G. L., in van Veen, J. A., 2022: Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in decomposing litter. *ISME Communications*, 2: 1–10.
- Zelles, L., 1999: Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29(2), 111–129.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., in Beck, T.: 1992 Microbial biomass and community structure in soils as determined by fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Biology and Fertility of Soils*, 14(1), 11–19.
- Zervakis, G. I., Koutrotsios, G., in Katsaris, P., 2013: Composting of olive mill waste-based substrates and bioconversion into high value added products using edible and medicinal mushrooms. *Waste Management*, 33(8): 1700–1710.

