



UPPSALA
UNIVERSITET



UPTEC W 18 034

Examensarbete 30 hp
Augusti 2018

Nitrifierande mikrobiella samhällen som indikatorer för förorenad jord

Jämförelse av den genetiska och funktionella
potentialen

Linn Berkelund

REFERAT

Nitrifierande mikrobiella samhällen som indikatorer för förorenad jord - Jämförelse av den genetiska och funktionella potentialen

Linn Berkelund

I Sverige finns det ungefär 25 000 riskklassade förorenade områden samt ännu fler områden som potentiellt är förorenade. Naturvårdsverket har tagit fram generella riktvärden för olika förorenade ämnen. Halter över riktvärdena antyder att risken för negativa effekter på människan eller miljön bedöms vara stor och att efterbehandling av området är aktuellt. Ett vanligt, men kostsamt efterbehandlingsalternativ är urschaktning och bortforsling av jord innehållandes halter av ämnen över riktvärdena. Ett intresse finns för att utveckla lätt tillämpbara metoder för platsspecifik riskbedömning av mark i syfte att skydda markmiljön och dess funktioner. Mikroorganismer som ingår i kvävetets kretslopp utför nyckelfunktioner i jorden. Flera studier indikerar att dessa mikroorganismers abundans och aktivitet påverkas av flera olika markföroreningar.

Inom forskningsprojektet APPLICERA har ett lysimeterexperiment genomförts där två jordar, med olika egenskaper med avseende på bland annat kornstorleksfördelning och pH (svagt basisk sandy loam respektive sur sand), förorenats med koppar respektive PAH:er i varierande halter. Halterna motsvarar riktvärden för känslig markanvändning (KM), mindre känslig markanvändning (MKM) och 3xMKM. Provtagning av jorden har skett vid tre tillfällen under en period av 16 månader. I detta examensarbete har nitrifierande mikroorganismers potential för att användas som indikatorer för förändrad markfunktion i förorenad jord undersökts. Detta har gjorts genom att kvantifiera ammoniakoxiderande arkéer (AOA), ammoniakoxiderande bakterier (AOB) samt de nitritoxiderande bakteriesläktena *Nitrospira* och *Nitrobacter* i jord som provtagits vid de olika tidpunkterna i lysimeterexperimentet. Mätning av potentiell ammoniakoxidation (PAO) har skett för jord från det sista provtagningstillfället.

Resultaten visade att abundansen av mikroorganismerna generellt var större i den svagt basiska jorden klassificerad som sandy loam än i den sura jorden klassificerad som sand. Med tiden minskade AOA:s abundans för den högsta koncentrationen av koppar och PAH, särskilt utpräglad var minskningen i den sura jorden. Även *Nitrospira* minskade i abundans i PAH-förorenad jord för båda jordtyperna, dock kunde en minskning i abundans i kopparförorenad jord statistisk endast säkerställas för den sura jorden. AOB:s och *Nitrobacters* abundans visade inte på någon tydlig uppåt- eller nedåtgående trend varken över tid eller för ökande föroreningshalt. Skillnaden i kvantitet av mikroorganismer mellan jordtyperna antyder att jordens kemiska och fysiska egenskaper påverkade mikroorganismernas abundans såväl som föroreningarnas biotillgänglighet. PAO minskade med ökande kopparhalt för båda jordtyper, däremot sågs en minskning i PAO med ökande PAH-halt endast i den sura jorden. Resultaten antyder att abundansen av AOA och *Nitrospiras* verkar ha störst potential att utgöra generella indikatorer över ändrad markfunktion, dock lämpligen med komplettering av förbättrade mätningar av PAO för att få mer information om kvävetets kretslopp i förorenad jord.

Nyckelord: Förorenad mark, koppar, PAH, nitrifikation, mikroorganismer, AOA, AOB, *Nitrospira*, *Nitrobacter*

*Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges lantbruksuniversitet.
Box 7026, SE-750 07 Uppsala. ISSN 1401-5765.*

ABSTRACT

Nitrifying microbial communities as indicators of soil contamination - Comparison of genetic and functional potential

Linn Berkelund

In Sweden there are around 25,000 contaminated areas classified as a risk for human health or the environment, and even more potentially contaminated areas. The Swedish Environmental Protection Agency has developed generic guideline values for hazardous substances. Contamination levels exceeding the guideline values indicate a large risk for human health or the environment and that there is a need to remediate the site. A frequently used and expensive aftertreatment is excavation and removal of contaminated soil. Therefore, there is an interest to develop easy applicable methods for site-specific risk assessment with the purpose to protect the soil environment and its functions. Microorganisms involved in the nitrogen cycle perform key functions in soil. Several studies indicate that the abundance and activity of N-cycling microorganisms are sensitive to various soil pollutions.

Within the research project APPLICERA, a lysimeter experiment was conducted with two different soil types (acidic sandy soil and slightly alkaline sandy loam) and different contamination levels of copper and PAH. The contamination levels corresponded to generic guideline values for sensitive land-use (KM), less sensitive land-use (MKM) and 3xMKM. Soil samples were taken at three times during a period of 16 months. The aim of this master thesis was to investigate nitrifying microorganism potential as indicators for altered soil functioning in contaminated soil. Ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and the nitrite-oxidizing bacteria genera *Nitrospira* and *Nitrobacter* has been quantified in soil samples with the different treatments. Measurements of the potential ammonia oxidation (PAO) have been performed in soil from the last sample taking.

The abundance of the nitrifying microorganisms was in general higher in the slightly alkaline sandy loam soil. Over time there was a decrease in AOA abundance for the highest concentration of copper and PAH, most pronounced in the acidic sandy soil. Also, a decrease in the abundance of *Nitrospira* in soil contaminated with PAHs could be seen for both soil types. In copper contaminated soil a distinct decrease in the abundance of *Nitrospira* could only be seen in the acidic sandy soil. The abundance of AOB and *Nitrobacter* did not show any obvious pattern for different contamination levels or over time. The difference in abundance of nitrifying microorganisms between the soil types suggests that the soil's chemical and physical characteristics as well as the bioavailability of the contaminant affected their abundance. A significant decrease in PAO could be seen for the highest contamination level of copper for both soil types, but for the PAH contaminated soil PAO decreased only in the acidic sandy soil. These results suggest that the abundance of AOA and *Nitrospira* seems to have greatest potential as general indicators for altered soil functioning. However, improved activity measurements are needed to gain greater insight into the soil N-cycle functioning in contaminated soils.

Key words: Contaminated soil, copper, PAH, nitrification, microorganisms, AOA, AOB, *Nitrospira*, *Nitrobacter*

Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of
Agricultural Sciences. Box 7026, SE-750 07 Uppsala. ISSN 1401-5765.

FÖRORD

Detta examensarbete om 30 högskolepoäng är den avslutande delen av mina studier på civilingenjörsprogrammet i miljö- och vattenteknik vid Uppsala universitet och Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). Arbetet har utförts på institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi på SLU. Examensarbetet är en del av forskningsprojektet APPLICERA som syftar till att utveckla lättanvänd metodik för riskbedömning av förorenade områden med fokus på att skydda markmiljön. Forskningsprojektet är finansierat av Formas, Trafikverket och Statens geotekniska institut (SGI).Handledare för examensarbetet var Christopher Jones och ämnesgranskare var Sara Hallin på institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi.

Ett stort tack till min handledare och ämnesgranskare som varit engagerade och givit stöd i arbetet. Jag vill också rikta ett tack till alla hjälpsamma personer i labbet, ett särskilt stort tack till Maria Hellman och Jaanis Juhanson för hjälp vid kvantifiering av mikroorganismer. Det har varit en rolig, spännande och lärorik tid hos er där jag verkligen fått fördjupa mina kunskaper om markmikroorganismer. Jag vill också tacka Daniela Mellado för gott samarbete och utförd DNA-extraktion. Även ett tack riktas till personer involverade i forskningsprojektet för tillåtelse att publicera en bild från lysimeterexperimentet.

Sist men inte minst vill jag tacka min tålmodiga sambo Daniel som varit ett stort stöd under arbetets gång.

Linn Berkelund
Uppsala, 2018

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Nitrifierande mikrobiella samhällen som indikatorer för förorenad jord - Jämförelse av den genetiska och funktionella potentialen

Linn Berkelund

Jord är en naturresurs som tillhandahåller olika ekosystemtjänster såsom matproduktion, nedbrytning av visst avfall och energigrödor. Historiskt har industriverksamhet såsom glasbruk, impregneringsanläggningar, kemtvätterier samt massa- och pappersbruk resulterat i att giftiga ämnen spridits i naturen. I Sverige finns ett stort antal förorenade områden som är i behov av åtgärder. Åtgärdandet av förorenad mark faller inom miljökvalitetsmålet Giftfri miljö som syftar till att förekomsten av ämnen i miljön till följd av antropogena aktiviteter inte ska utgöra ett hot varken för människan eller den biologiska mångfalden. Naturvårdsverket är den myndighet som har det övergripande ansvaret i arbetet kring förorenade områden och de har tagit fram metoder för riskbedömning av förorenad mark samt generella riktvärden för olika ämnen. Föroreningshalter över riktvärdena antyder att risken för negativa effekter på människan eller miljön bedöms vara stor och att efterbehandling av området är aktuellt. Det är ofta skyddet av markmiljön på platsen som leder till lägst riktvärdeshalter. Till stor del är det mikroorganismer som utför viktiga processer i marken, såsom ämnens kretslopp i marken. Det saknas standardiserade metoder för att avgöra förorenings påverkan på dessa mikroorganismer. Ett vanligt efterbehandlingsalternativ av förorenad mark är urschaktning och bortforsling av jord innehållandes halter av ämnen över riktvärdena. Dock är detta behandlingsalternativ kostsamt och därför finns ett behov av att utreda nyttan av denna åtgärd för markmiljön.

Till följd av detta har forskningsprojektet APPLICERA initierats som syftar till att utveckla lätt applicerbara metoder som kan användas vid platsspecifik riskbedömning av förorenad mark där fokus ligger på att skydda markmiljön och dess funktioner. Viktiga nyckelfunktioner utförs bland annat av olika typer av mikroorganismer i marken som är inblandade i exempelvis kvävet kretslopp. Kväve är ett grundämne som är nödvändigt för livet på jorden då det bland annat ingår i proteiner. Kvävet kretslopp är globalt och i marken finns mikroorganismer, både bakterier och arkéer, som utför biologisk kvävefixering där kvävgas från luften omvandlas till ammoniak. Ammonium är den protonerade formen av ammoniak som bildas när föreningen tar upp en proton. Med minskande pH-värde i jordens markvatten protoneras en allt större del av all ammoniak och blir ammonium då det finns fler vätejoner att tillgå. I marken kan ammoniak oxideras till nitrit av mikroorganismer som nyttjar kväveföreningen för att erhålla energi. Nitrit i stora koncentrationer i marken är giftigt, men kväveföreningen ansamlas sällan i marken. Vissa mikroorganismer i marken kan även utnyttja nitrit för att tillgodose sitt energibehov och då oxideras nitrit till nitrat. Omvandlingen av ammoniak till nitrit och vidare till nitrat benämns nitrifikation.

Forskning inom området tyder på att mikroorganismerna som utför de olika delstegen i nitrifikationsprocessen påverkas negativt i jord förorenad med en eller flera föroreningar. Exempelvis har olika tungmetaller visat sig påverka kvantiteten och aktiviteten hos mikroorganismer som deltar i nitrifikationsprocessen. Även organiska ämnen som polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er) som bildas vid ofullständig förbränning av organiskt material har visat sig ha en inverkan på mikroorganismerna. Vissa mikroorganismer har förmågan att bryta ner PAH:er även om processen går långsamt.

I detta projekt har det undersökts hur kvantiteten av mikroorganismer inblandade i nitrifikationsprocessen i jorden ändras med ökande föroreningshalt av koppar respektive PAH:er över tid. Utöver detta har aktivitetsmätningar gjorts för att uppskatta vid vilken hastighet ammoniakoxiderande mikroorganismer oxiderar ammoniak till nitrit under tänkta optimala förhållanden. Detta har gjorts genom att förorena jord av två olika jordtyper med koppar respektive PAH:er i varierande halter och sedan har jordarna provtagits under tre tillfällen. Den ena jorden var en sandig lerjord med ett svagt basiskt pH-värde. Den andra jorden som undersöktes hade ett surt pH-värde och var sandig.

Molekylära tekniker är kraftfulla verktyg för att studera mikroorganismer i jorden. DNA från mikroorganismer kan extraheras från jordprov, och rikligheten av olika grupper av mikroorganismer kan bestämmas genom att använda en teknik som benämns kvantitativ PCR (qPCR). Det finns ammoniakoxiderande arkéer (AOA) samt ammoniakoxiderande bakterier (AOB) som utför det första steget i nitrifikationsprocessen och båda dessa grupper kvantifierades i det här arbetet. Även de mindre välstuderade bakteriesläktena *Nitrospira* och *Nitrobacter* som tros oxidera merparten av nitrit till nitrat i många jordar kvantifierades.

Kvantiteten av alla undersökta mikroorganismer var generellt större i den svagt basiska leriga sandjorden än i den sura sandjorden vid alla tidpunkter i både förorenad och i ej förorenad referensjord. Antalet mikroorganismer tillhörande gruppen AOA minskade med tiden för den högsta föroreningshalten av koppar respektive PAH i båda jordtyperna. Ett liknande mönster syntes för *Nitrospira*, dock observerades ingen tydlig nedgång i antalet *Nitrospira* för den högsta föroreningshalten i den svagt basiska leriga sandjorden. Kvantiteten av AOB och *Nitrobacter* hade ingen tydlig nedåtgående trend för ökade föroreningsgrad. Den faktorn som hade störst inverkan på antalet mikroorganismer var generellt jordtyp, vilket indikerar att jordens egenskaper har större inverkan än föroreningarna vid de undersökta föroreningsgraderna. Aktivitetsmätningarna visade att mikroorganismerna vid antagna optimala förhållande var som mest aktiva i den svagt basiska leriga sandjorden. Aktiviteten hos mikroorganismerna minskade i den svagt basiska leriga sandjorden endast för ökande föroreningsgrad av koppar. I den sura sandjorden minskade aktiviteten med ökande föroreningsgrad för både koppar och PAH. Sammantaget verkar AOA och *Nitrospiras* kvantitet i kombination med aktivitetsmätningar ha störst potential att utgöra indikatorer för när nitrifikationsprocessen i marken hämmas av föroreningar.

ORDLISTA

Amplifiering	En specifik DNA-sekvens kopieras och många kopior skapas genom PCR-teknik.
AOA	Ammoniakoxiderande arkéer
AOB	Ammoniakoxiderande bakterier
Cq-värde	Cycle of quantification-värde, den värmecykel under qPCR där antal kopior av en DNA-sekvens når över ett visst tröskelvärde.
Gelelektrofores	Elektriskt laddande molekyler, såsom negativt laddade DNA-molekyler, vandrar i en gel när ett elektriskt fält appliceras. Beroende på molekylernas storlek färdas de med olika hastighet i gelen och separeras.
Kemolitoautotrof organism	Organism som erhåller energi genom att oxidera oorganiska ämnen.
Lysimeter	Behållare som ofta är cylinderformad som fylls med jord med dränering av vatten i botten. Kan exempelvis användas för att isolera jord som genomgått viss behandling för att senare utföra någon form av provtagning på jorden.
Mikrobiom	Samtliga mikroorganismer i en viss miljö.
NB	<i>Nitrobacter</i> , släkte av nitritoxiderande bakterier
NOB	Nitritoxiderande bakterier
NS	<i>Nitrospira</i> , släkte av nitritoxiderande bakterier
Nyckelart	En art i ett ekosystem som är viktig för andra arter då den har en stor inverkan på processer och ekosystemets uppbyggnad.
Oligotrof	Näringsfattig miljö eller organism som kan leva i en näringsfattig miljö.
PAO	Potentiell ammoniakoxidation
Plasmid	Ringformade DNA-segment (ej kromosomalt) som bland annat kan förekomma hos bakterier
qPCR	Kvantitativ polymeraskedjereaktion, en metod för att kvantifiera antalet kopior av en viss gensekvens.
SQ	Starting Quantity, antal genkopior av en specifik gen i ett prov från start när qPCR genomförs.

Ts

Torrsubstans, kvarvarande mängd material efter fullständig torkning.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1	INLEDNING	1
2	SYFTE OCH FRÅGESTÄLLNINGAR	2
2.1	Avgränsningar	2
3	TEORI	3
3.1	Mikroorganismer som indikatorer	3
3.2	Nitrifikation	4
3.2.1	Ammoniakoxiderande bakterier	6
3.2.2	Ammoniakoxiderande arkéer	6
3.2.3	Nitritoxiderande bakterier	6
3.2.4	Miljöfaktorer som påverkar nitrifierande mikroorganismer	7
3.3	Föroreningars påverkan på nitrifierande mikroorganismer	8
3.3.1	Koppars bindning i mark och biotillgänglighet	8
3.3.2	Koppars påverkan på nitrifierande mikroorganismer	9
3.3.3	PAH:ers bindning i mark och biotillgänglighet	10
3.3.4	PAH:ers påverkan på nitrifierande mikroorganismer	10
4	MATERIAL OCH METODER	11
4.1	Lysimeterförsök	11
4.2	Kvantifiering av nitrifierande mikroorganismer	13
4.2.1	DNA-extraktion och undersökning av extraherat DNA:s kvalitet	13
4.2.2	Kvantifiering av mikroorganismer	14
4.3	Aktivitetsmätningar av nitrifierande samhällen	17
4.4	Statistiska analyser	18
5	RESULTAT	21
5.1	Kvantifiering av mikroorganismer	21
5.1.1	Kvantifiering av ammoniakoxiderande arkéer (AOA)	21
5.1.2	Kvantifiering av ammoniakoxiderande bakterier (AOB)	23
5.1.3	Kvantifiering av nitritoxiderande bakterier	24
5.1.4	Korrelationsanalys mellan olika nitrifierande mikroorganismer	28
5.2	Potentiell ammoniakoxidation (PAO)	30
5.3	Korrelationsanalys mellan antalet gener och PAO	31
6	DISKUSSION	33
6.1	Nitrifierande mikroorganismers genetiska potential	33
6.1.1	Mikroorganismernas kvantitet	33
6.1.2	Nitrifierande mikroorganismers samvariation	34

6.1.3	Mätosäkerheter vid qPCR	35
6.2	Nitrifierande samhällens funktionella potential.....	35
6.2.1	Mätosäkerheter och antaganden vid aktivitetsmätningar.....	35
6.3	Tillämpbarhet vid riskbedömning av förorenad mark.....	36
6.4	Förslag till vidare arbete	36
7	SLUTSATSER.....	38
8	REFERENSER	39
	BILAGA A – Reagensmixer vid qPCR.....	46
	BILAGA B – Transformerings av data	49
	BILAGA C – Resultat av variansanalyser för genkopior/ng DNA.....	51
	BILAGA D – Korrelationstester	59

1 INLEDNING

I Sverige finns det cirka 25 000 riskklassade förorenade områden och av dessa är 1000 allvarligt förorenade (Naturvårdsverket, 2018). Att åtgärda förorenade områden faller inom miljö kvalitetsmålet Giftfri miljö och de ska enligt miljömålet åtgärdas till den grad att dessa inte utgör något hot för varken människors hälsa eller miljön (Miljödepartementet, 2012). Riktvärden för olika ämnen är ett viktigt verktyg i riskbedömningen av förorenade områden. Dessa kan vara generella riktvärden som Naturvårdsverket tagit fram, men det är inte alltid dessa kan användas då förhållanden på platsen kan avvika från förutsättningarna som ligger till grund för det generella riktvärdet. Det kan exempelvis vara skyddsvärdet för miljön och omgivningen som skiljer sig. I dessa fall tas ibland platsspecifika riktvärden fram efter Naturvårdsverkets metodik. Ibland lämpar sig inte riktvärden som bedömningsgrund och istället finns ett behov av en mer fördjupad riskbedömning (Naturvårdsverket, 2009).

Riktvärden som är framtagna för skydd av markmiljön kan indelas i två skyddsnivåer: känslig markanvändning (KM) och mindre känslig markanvändning (MKM). Dessa har i de flesta fall tagits fram genom ekotoxikologiska studier av ett visst antal organismer. Vid otillräckliga data för marklevande organismer används data från tester utförda på akvatiska organismer. Ekosystemet på platsen bedöms att kunna utföra de funktioner som behövs för markanvändningen när föroreningshalten inte är högre än riktvärdet (Naturvårdsverket, 2009). Markmiljön är ofta det styrande skyddsobjektet vid riskbedömningar, men trots det är det ovanligt att fördjupade ekotoxikologiska eller ekologiska riskbedömningar genomförs. En konsekvens av detta är att påkostade urschaktningar av all jord med föroreningshalter över riktvärdena är ett vanligt efterbehandlingsalternativ trots att nyttan för markmiljön är okänd (Back et al., 2016).

I nuläget finns många icke standardiserade ekotoxikologiska tester, men få tester för ekologisk riskbedömning att använda vid platsspecifik riskbedömning av förorenad jord. Detta gör att lämpliga metoder ofta måste utvecklas för varje enskilt fall vilket leder till stora kostnader samt kan ge upphov till godtycklighet i bedömningen. Det finns även en osäkerhet kring hur användbara de ekotoxikologiska testernas resultat är i riskbedömningar (Naturvårdsverket, 2006a). Arbetet med att ta fram standardiserade metoder för ekologisk riskbedömning är i sin linda. En förklaring till detta är att det inte ställs några krav på att tillämpa ekologisk riskbedömning av mark (Back et al., 2016).

Nitrifikation som är en biokemisk process som utförs av mikroorganismer i marken är en viktig markfunktion som bedömts vara intressant att studera närmare med avseende på dess potential att användas vid markeologiska riskbedömningar av förorenad jord. Därmed finns ett behov av att undersöka om kvantiteten och funktionen hos de nitrifierande mikroorganismerna kan vara lämpliga indikatorer för markmiljöns status beträffande dess funktion och påverkan av föroreningar.

2 SYFTE OCH FRÅGESTÄLLNINGAR

Syftet med det här examensarbetet var att undersöka om nitrifierande mikroorganismers kvantitet och funktion kan vara lämpliga indikatorer för att avgöra när nitrifikationsprocessen i mark förändras till följd av koppar och polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er). Arbetet syftade även till att undersöka om jordtyp kunde påverka hur lämpliga de nitrifierande samhällena var att användas som indikator samt om effekten av föroreningarna varierade över tid. Utöver detta fanns ett intresse för att undersöka vilka grupper av nitrifierande mikroorganismer som var involverade i nitrifikationsprocessen i förorenad jord av olika jordtyp. För att uppnå syftet med arbetet formulerades följande frågeställningar:

- Hur påverkas kvantitet och funktion hos mikrobiella nitrifierande samhällen av koppar respektive PAH:er i mark?
- Har jordtyp någon effekt på de nitrifierande samhällenas förmåga att utgöra en indikator för markens funktion och föroreningsstatus?
- Varierar effekten av föroreningarna över tid?
- Hur reagerar olika grupper av nitrifierande mikroorganismer på koppar respektive PAH:er?

2.1 AVGRÄNSNINGAR

I projektet har det ej undersökts vilka effekter mixer av flera föroreningar, exempelvis av både koppar och PAH, har på de nitrifierande mikroorganismerna. Vidare studerades inte effekten av koppar och PAH på nitrifierande bakterier som kan utföra alla steg i nitrifikationsprocessen (comammox).

3 TEORI

3.1 MIKROORGANISMER SOM INDIKATORER

Bioindikatorer är organismer som kan används för att avgöra status hos en miljö eller för att upptäcka när förändringar sker i en miljö. Lämpliga bioindikatorer hittas bland djur, växter, plankton såväl som hos mikroorganismer beroende på syftet (Parmar, Rawtani & Agrawal, 2016). Mikroorganismer används bland annat som biologiska indikatorer inom dricksvattenproduktion för att upptäcka otillräcklig rening av vattnet och andra problem med dricksvattenkvaliteten (Svenskt vatten, 2017). För jord har en hel del forskning bedrivits med syftet att hitta biologiska indikatorer för markkvalitet. Nyttan med indikatorerna är bland annat att tidigt kunna se om en jord mister någon viktig funktion (Schloter et al., 2018). Mark är en naturresurs som förser oss med många ekosystemtjänster, exempelvis möjliggör den matproduktion. Förståelsen kring markens funktioner och ekosystemtjänster som den erbjuder är ännu bristfällig. Dock är det känt att jordens möjlighet att erbjuda olika ekosystemtjänster beror av jordens förmåga att bibehålla olika egenskaper exempelvis en viss markbiologi (Hatfield, Sauer & Cruse, 2017). Till stor del har fokus inom forskning legat på att hitta indikatorer för jord bland makrofaunan i marken, exempelvis diversiteten av nematoder och daggmaskar (Schloter et al., 2018). Daggmaskar har få yttre barriärer mot markvätskan och konsumerar stora mängder jord vilket har gjort att de fått mycket fokus i ekotoxikologiska studier. Flera studier har visat att de är lämpliga indikatorer för metallföroreningar i de marktyper där de existerar då de ackumulerar metaller (Sivakumar, 2015).

Markmikroorganismers potential att utgöra lämpliga biologiska indikatorer har inte undersökts i lika stor utsträckning som makrofaunan i marken. De organismer som är lämpliga kandidater för att utgöra indikatorer i jord bör idealt utföra någon nyckelfunktion i jorden eller vara en nyckelart (Schloter et al., 2018). En indikator bör även svara snabbt på naturliga såväl som antropogena förändringar (Cardoso et al., 2013).

Vilka mikroorganismer som finns i jord varierar mycket i tid och rum (Schloter et al., 2018). Mikroorganismernas aktivitet i jorden är generellt låg och de hittas enbart på en liten andel av den totala partikelytan i jorden. De finns i anslutning till lerpartiklar, organiskt material, i små hålrum mellan partiklar och i rotzonen hos växter (Kavamura & Esposito, 2010). Jordens partikelstorlek har en inverkan på mikrobiella samhällens struktur. I en studie av Sessitsch et al. (2001) konstaterades en större diversitet av mikroorganismer i finkorning mark jämfört med grovkorning mark. I storleksfraktionerna silt och lera påträffades en högre andel biomassa än i andra fraktioner.

Det finns många tillgängliga metoder för att studera mikrobiom i jorden. Traditionellt har odling av mikroorganismer varit vanligt förekommande. Odling av mikroorganismer har nackdelen att metoden inte ger fullständig information om vilka mikroorganismer som de facto finns *in situ*. Det uppskattas att endast 1 % av mikroorganismerna i ett mikrobiellt samhälle är odlingsbara. Polymeraskedjereaktion (PCR) och kvantitativ PCR (qPCR) är exempel på molekylära metoder där många kopior skapas av en specifik DNA- eller RNA-sekvens för att kunna detektera och/eller kvantifiera den. Nackdelar med PCR/qPCR är bland annat att det kan uppkomma ospecifika PCR-produkter såsom artefakter, vilket ger ett felaktigt resultat (van Elsas & Boersma, 2011). Andra nackdelar är att det kan förekomma inhibition i proverna och att den specifika primer som används inte detekterar/kvantifierar alla organismer som utför en viss funktion i jorden. Många studier av mikroorganismer som indikatorer i jord har fokuserat på det mikrobiella samhällets sammansättning genom att kvantifiera gener genom qPCR. Samhällen av

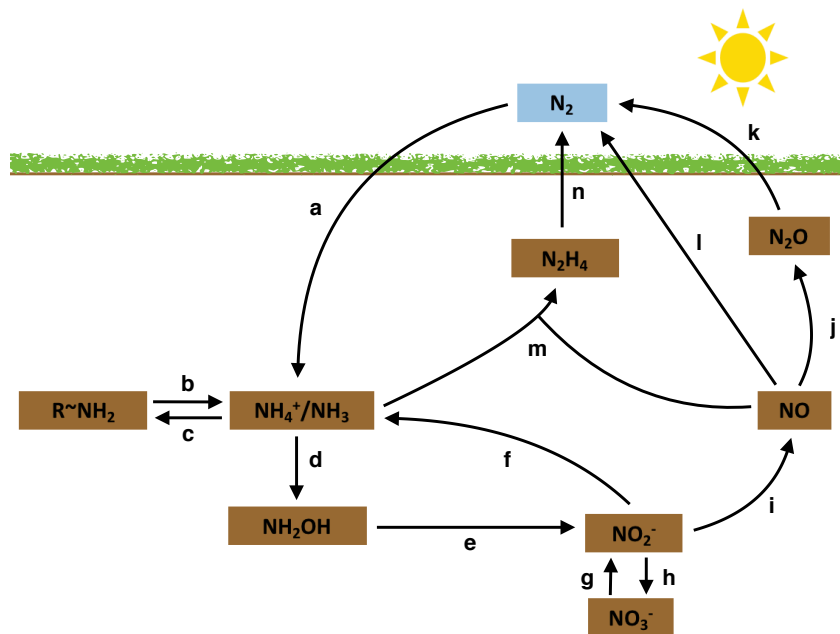
bakterier, arkéer och svampar kan kvantifieras genom att detektera gener som kodar olika subenheter av ribosomer, som hittas i alla levande organismer. Bakterier och arkéers abundans i en miljö kan bestämmas genom att kvantifiera den ribosomala genen 16S rRNA. Svampar kan istället kvantifieras genom ITS-regionen som är en bit icke-kodande DNA som hittas mellan de ribosomala generna (Beebee & Rowe, 2004; Schloter et al., 2018). Bland mikroorganismer som utför nyckelfunktioner i marken och därmed har potential att utgöra indikatorer finns flera molekylära markörer för mikroorganismer som är involverade i kretsloppen av kol och kväve. En del mikroorganismer uttrycker endast en viss funktion under specifika miljöförhållanden vilket gör att kvantifiering av dessa inte alltid säger något om deras aktuella funktion i jorden (Schloter et al., 2018).

Förutom molekylära metoder som fokuserar på att fastställa mikroorganismers riklighet finns andra metoder som syftar till att kartlägga mikroorganismers funktioner i jorden. Mätning av mikrobiell aktivitet ute i fält, exempelvis markrespiration, försvåras av att inverkan av miljöfaktorer är föränderliga och att mikroorganismernas aktivitet kan vara svår att särskilja från växters. Korttidsmätningar av aktivitet i labb där enzymatisk aktivitet mäts har fördelen att miljöförhållanden kan hållas konstanta (Schloter, Dilly & Munch, 2003). Vid mätningar av enzymatiska aktiviteter är ett problem att nuvarande tillgängliga metoder ger information om potentiell enzymaktivitet snarare än den verkliga i jorden. Detta gör det svårt att dra slutsatser kring jordens verkliga funktion (Nannipieri et al., 2012).

Ett stort antal studier som genomförts visar att de flesta mikroorganismers funktioner har liten motståndskraft och återhämtningsförmåga i jordar som förorenats med tungmetaller. Även andra föroreningar, exempelvis PAH:er har visat sig ha en negativ inverkan på mikroorganismer. Kväve är ofta det näringsämne som är begränsande i marken och därav har ett intresse funnits för att undersöka hur mikroorganismerna som deltar i dess kretslopp exempelvis påverkas av tungmetaller och om de är lämpliga bioindikatorer. Mikroorganismerna som deltar i kvävet kretslopp har visat sig vara mindre toleranta mot tungmetaller än de som deltar i kolets kretslopp i marken (Griffiths & Philippot, 2013).

3.2 NITRIFIKATION

Kväve har ett globalt kretslopp och hittas i atmosfären, hydrosfären och biosfären i sin rena form samt i olika kväveföreningar. Kväve är essentiellt för livet på jorden då det är en beståndsdel i proteiner och andra biomolekyler (Nationalencyklopedin, u.å.-a). De huvudsakliga processerna i kvävet kretslopp illustreras i figur 1. Processerna sker även i vatten och mellan vatten och luft. Kvävet övergång från kvävgas i atmosfären till kväveföreningar som kan användas i cellulär metabolism och för tillväxt är fullständigt beroende av mikrobiell aktivitet. Biologisk kvävefixering är en process som utförs av bakterier och arkéer i mark eller vatten där kvävgas, N_2 i atmosfären reduceras till ammoniak, NH_3 . De kvävefixerande organismerna kodar för enzymet *nitrogenas* som katalyserar reaktionen. Ammoniaken som bildas vid kvävefixeringen kan assimileras av växter i form av ammonium, NH_4^+ , men även oxideras aerobt eller anaerobt av ammoniakoxiderande mikrober (Stein & Klotz, 2016).

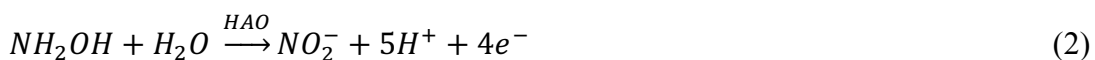
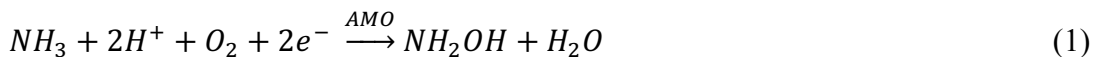


Figur 1. Kvävetts kretslopp med de huvudsakliga processerna: (a) kvävefixering, (b) mineralisering, (c) assimilation, (d-e) ammoniumoxidation till nitrit, (f) nitrit reduceras till ammonium, (g) nitrat reduceras till nitrit, (h) nitritoxidation till nitrat, (i-l) denitrifikation, (m-n) anammox. (delprocesser hämtade från Stein & Klotz, 2016). Egen illustration.

I denna litteraturstudie ligger fokus på mikroorganismer som deltar i de aeroba nitrifikationsprocessen (delprocesserna d-e och h i figur 1 samt ekvationerna 1-3).

Mikroorganismerna som är inblandade i ammoniaks omvandling till nitrat kan delas in i tre grupper: ammoniakoxiderande, nitritoxiderande samt fullständiga ammoniakoxiderande mikroorganismer, kallade comammox (Stein & Klotz, 2016). Oxidationen av ammoniak till nitrit (ekvation 1 och 2) är vanligen det hastighetsbegränsande steget i nitrifikationsprocessen (Prosser & Nicol, 2012). Processerna i ekvationerna 2-3 är energigivande för kemoautotrofa mikroorganismer. Vissa heterotrofa bakterier och svampar har förmågan att delta i nitrifikationsprocessen, men processen är inte energigivande för dem. Dessa tros kunna spela en stor roll i miljöer där autotrofa nitrifierare är hämmade av en eller flera faktorer (Ward, 2013).

Ammoniaks oxidation till nitrit sker i två delsteg, där det första delsteget (ekvation 1) katalyseras av enzymet *ammoniakmonooxygenas* (*AMO*) och det andra delsteget (ekvation 2) av enzymet *hydroxylaminoxidoreduktas* (*HAO*) (Kowalchuk, & Stephen, 2001).



Nitritoxidoreduktas (*NXR*) är det enzym som har en nyckelroll i nitrits oxidation till nitrat (ekvation 3) (Daims, Lückner & Wagner, 2016). Nyligen har en enskild organism som utför alla stegen i nitrifikationsprocessen (ekvation 1-3) upptäckts (van Kessel et al., 2015).



3.2.1 Ammoniakoxiderande bakterier

Ammoniakoxiderande bakterier (AOB) är kemolitoautotrofa och utför den energigivande oxidationen av ammoniak till nitrit. Den energi som AOB utvinnet vid oxidation av kväveföreningarna används för att fixera koldioxid och tillgodose behovet av kolkälla med hjälp av Calvencykeln (Ward, 2013). Calvencykeln sker i kloroplasternas stroma hos växter, bakterier och alger och möjliggör koldioxidassimilation genom att koldioxid omvandlas till kolhydrater (Nationalencyklopedin, u.å.-b). Nitrit är den huvudsakliga produkten som bildas när AOB oxiderar ammoniak, men även lustgas bildas i mindre skala. Lustgasproduktionen gynnas av låga syrehalter (Ward, 2013). Aktiviteten och tillväxten av AOB tros inte begränsas av tillgången till koldioxid. AOB påträffas i de flesta oxiska miljöer där det finns tillgång till ammoniak och är allmänt förekommande i jord, färskvatten och marina miljöer. AOB har även hittats i mindre syrerika miljöer. AOB tillväxer långsamt vilket gör dem till svårodlade mikroorganismer. I jord tros AOB till stor del finnas associerade till jordpartiklar vilket gör att de får en låg omsättnings hastighet. De flesta AOB förmodas kunna överleva långa perioder av inaktivitet.

Olika RNA- och DNA-sekvenser kan användas som markörer för att identifiera AOB. Specifika sekvenser av 16S rRNA-genen har länge använts som markörer, men senare har även AOB:s variant av genen *amoA* börjat användas. En fördel med *amoA*-genen är att den har större variation hos olika arter än sekvenser av 16S rRNA vilket möjliggör att nära besläktade arter kan särskiljas vid sekvensering (Kowalchuk, & Stephen, 2001).

3.2.2 Ammoniakoxiderande arkéer

Den första ammoniakoxiderade arkéen (AOA) beskrevs av Könneke et al. (2005) år 2005 och hittades i havsvatten. Upptäckten av dessa mikroorganismer kom att grundligt förändra kunskapen om vilka mikroorganismer som utför det första delsteget i nitrifikationsprocessen. AOA har visat sig vara dominerande över AOB i många naturmiljöer. AOA tros vara övervägande kemolitoautotrofa, men de assimilerar huvudsakligen koldioxid på ett annat sätt än AOB (Ward, 2013). AOA har även hittats i miljöer med extrema förhållanden, exempelvis hittades år 2008 termofila AOA som kan tillväxa i miljöer där temperaturen är högre än 70 °C. AOA har precis som AOB sekvenser av 16S rRNA och *amoA* som kan användas som markörer (de la Torre et al., 2008).

3.2.3 Nitritoxiderande bakterier

Det andra steget i nitrifikationsprocessen (ekvation 3) utförs av nitritoxiderande bakterier (NOB) (Ward, 2013). Kunskapen om dessa mikroorganismer är inte lika stor som för de ammoniakoxiderande mikroorganismerna. Mycket av forskningen har inriktat sig på ammoniakoxiderarna och en av anledningarna till detta är att den första delprocessen i nitrifikationen ansetts vara det hastighetsbegränsande delsteget. Nitrit, den första produkten i nitrifikationsprocessen, hittas däremot sällan ackumulerad i ekosystem. NOB har en viktig funktion i kvävet kretslopp då de genom att katalysera omvandlingen av nitrit till nitrat motverkar kväveförluster. Det finns kemolitoautotrofa NOB samt fototrofa NOB som endast använder nitrit som en elektrongivare för sin biosyntes. Kemolitoautotrofa NOB kan förutom genom nitritoxidation erhålla energi genom att oxidera vätgas, H₂ och formiat, HCO₂⁻. I jord har huvudsakligen nitritoxiderande bakterier tillhörande släktena *Nitrospira*, *Nitrobacter* och *Nitrococcus* identifierats (Daims, Lüscher & Wagner, 2016). *Nitrobacter* är kemolitoautotrofa och deras metabolism har likheter med AOB då båda grupperna av mikroorganismer använder Calvencykeln för att assimilera koldioxid (Ward, 2013).

År 2015 upptäcktes av flera olika forskargrupper att vissa bakterier från släktet *Nitrospira* som hittats i vatten kodar för alla enzymer som krävs för att katalysera samtliga delsteg i nitrifikationsprocessen. Processen benämns comammox (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015). Mikroorganismer som är kapabla till att utföra comammox har därefter genom qPCR-teknik identifierats i flera andra miljöer, exempelvis olika jordar (Hu & He, 2017). Olika varianter av generna *nxrA* och *nxrB* kan användas som markörer för NOB (Daims, Lücker & Wagner, 2016).

3.2.4 Miljöfaktorer som påverkar nitrifierande mikroorganismer

pH-värde

Det har länge antagits att nitrifikation inte sker i någon stor utsträckning i sura jordar (pH <5,5). Detta har bland annat antagits bero på att tillgången på substratet ammoniak för den första delreaktionen i nitrifikationen minskar med sjunkande pH-värde. Ammoniaks protonerade form ammonium är dominerande vid sura förhållanden. Relativt nyligen observerades nitrifikation ske i mycket sura jordar med pH-värden runt 3 (Li et al., 2018).

Flera studier har gjorts där kvantiteten av AOA och AOB undersökts vid olika pH-värden. Sambandet mellan jordens pH-värde och mikroorganismernas kvantitet har varierat för olika platser och ingen tydlig generell korrelation har hittats. Detta kan indikera att mikroorganismer tillhörande samma grupp kan ha olika nischer gällande i vilket pH-intervall de förekommer i jord. AOA är dock allmänt förekommande i jordar med varierande pH-värden. AOB har däremot inte hittats i exempelvis sura skogsjordar (Prosser & Nicol, 2012). Detta skulle kunna förklaras av att AOB inte kan använda ammonium, den protonerade formen av ammoniak, som dominerar vid låga pH-värden (Stahl & de la Torre, 2012).

Vilken inverkan pH har på NOB:s abundans är ännu inte helt känt (Li et al., 2018). Meng (2016) har i ett långtidsförsök i jordbruksjord undersökt vilken inverkan pH har på släktena *Nitrospira* och *Nitrobacter*. Resultatet av studien indikerar att *Nitrospiras* abundans blir lägre vid låga pH-värden. *Nitrobacters* abundans var däremot samma eller högre för minskande pH. Stempfhuber et al. (2016) har upptäckt att pH-värde tillsammans med diversiteten på växterna i ett skogsekosystem tycks inverka på samforekomsten av autotrofa ammoniak- och nitritoxiderande mikroorganismer. AOA och *Nitrospira*-liknande mikroorganismer dominerade över AOB och *Nitrobacter*-liknande mikroorganismer i alla skogsekosystem som undersöktes. I de flesta skogsekosystemen samvarierade AOA och *Nitrospira*-liknande mikroorganismer med varandra. AOB samvarierade med *Nitrobacter*-liknande mikroorganismer. I skogsjord med surt pH upptäcktes inga tydliga samvariationer mellan de autotrofa ammoniakoxiderande och nitritoxiderande mikroorganismerna. En möjlig orsak som lyfts fram är att heterotrofa nitrifierare kanske samspelar med de autotrofa mikroorganismerna under dessa förhållanden.

Temperatur

I en studie som undersökte hur ammoniakoxiderande bakterier och arkéer påverkades av tillgängligheten på substratet ammoniak och temperatur i en jordbruksjord sågs olika temperaturoptimum för bakterierna respektive arkéerna. Arkéernas nitrifikationsaktivitet var som högst vid 41 °C och som lägst vid 5 °C. Bakterierna hade en lägre optimal temperatur och var som mest aktiva vid 31 °C (Ouyang, Norton & Stark 2017). Även Taylor et al. (2017) har observerat en högre optimal temperatur för AOA än för AOB samt resultat som kan tyda på att AOB har en lägre minimumtemperatur för när de är

aktiva än AOA. Gubry-Rangin et al. (2017) har hittat en koppling mellan jordens pH-värde och i vilket temperaturintervall som AOA är aktiva. För sura jordar var AOA:s aktivitet generellt högre vid 20 °C än vid 30 °C. I jord med neutralt pH-värde var förhållandet däremot det omvända. Termofila *Nitrospira* har hittats i geotermiska källor och klarar av temperaturer upp till cirka 60-65 °C. I reningsverk har *Nitrospira* påvisats tillväxa i temperaturintervallet 10-28 °C (Daims, Lücker & Wagner, 2016). För *Nitrospira* och andra NOB i jord finns det knapphändigt med information om temperaturintervall för tillväxt och aktivitet.

Substrattillgänglighet

Olika ekologiska nischer bland ammoniakoxiderande mikroorganismer kan utvecklas genom olika affinitet för ammoniak och varierande tolerans för höga ammoniakkoncentrationer (Prosser & Nicol, 2012). Di et al. (2010) undersökte tillväxt och nitrifikationshastighet hos AOA och AOB i jordar som tillsatts urinkväve från djur. AOB visade sig tillväxa avsevärt av substratet, samtidigt som tillväxten hos AOA hämmades. Resultaten indikerar att AOB föredrar jordar med högre koncentration av ammoniak och AOA jordar med lägre ammoniakkoncentrationer. Även en studie av Verhamme, Prosser & Nicol (2011) undersökte ammoniakkoncentrationens effekt på AOA och AOB. Detta gjordes genom mikrokosmstudier där jord inkuberades med ammoniak i olika koncentrationer (från naturlig koncentration i jorden till hög koncentration). AOB tillväxte endast betydande vid den högsta koncentrationen (200 µg NH₄⁺-N/g jord) till skillnad från AOA som tillväxte vid alla ammoniakkoncentrationer. Flera studier indikerar att AOB har större tillväxt och aktivitet än AOA i jordar med tillskott av stora mängder oorganisk ammonium (Stahl & de la Torre, 2012). En studie visade bland annat att AOB var funktionellt dominant över AOA i en jordbruksjord trots att AOA:s *amoA*-gen fanns i större kvantitet (Jia & Conrad, 2009).

Arter av *Nitrospira* som är kapabla till comammox har visat sig oxidera ammoniak med en jämförelsevis låg hastighet. Deras affinitet för ammoniak är hög och nuvarande kunskapsläge indikerar att de har en nisch för oligotrofa miljöer (Hu & He, 2017). *Nitrobacter* verkar istället ha en nisch för miljöer där nitrit finns i större överskott (Nowka, Daims & Spieck, 2015).

3.3 FÖRORENINGARS PÅVERKAN PÅ NITRIFIERANDE MIKROORGANISMER

Negativ påverkan av olika tungmetaller har observerats hos mikroorganismer som är involverade i viktiga kretslopp i marken, däribland kvävet kretslopp. Metallerna har bland annat setts ha en ogynnsam verkan på enzymaktiviteten hos mikroorganismer (Griffiths & Philippot, 2013). Även vissa bekämpningsmedel och kolväten påverkar nitrifikationsprocessen negativt (Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Sverdrup et al., 2002). I detta examensarbete avgränsas detta avsnitt av litteraturstudien främst till att kartlägga koppar och PAH-föroreningars påverkan på nitrifierande mikroorganismer.

3.3.1 Koppars bindning i mark och biotillgänglighet

Metallen koppar förekommer naturligt i marken och halterna varierar beroende på moderbergartens kopparinnehåll. Koppar är en beståndsdel i vissa enzymer, däribland de enzym som möjliggör biologisk kvävefixering i marken (Eriksson et al., 2011). Koppars biotillgänglighet i marken ändras med tiden till följd av kemiska processer. pH är en faktor som har stor inverkan på hur snabbt vattenlöslig koppar som tillförs en jord genomgår dessa kemiska processer och övergår till mindre mobila former. Dessa

processer har setts ske väldigt långsamt i jordar med ett pH-värde <5. Koppars i markvattnet utgör den mest biotillgängliga formen och traditionellt har den fria kopparjonen, Cu^{2+} ansetts vara den biotillgängliga formen (Maderova et al., 2011). Dock tyder en studie av Brandt, Holm & Nybroe (2008) på att även lösta organiska komplex med koppar i markvattnet kan vara biotillgängliga. De mekanismer som har störst inverkan på metallers fastläggning i marken är utfällning och adsorption (Naturvårdsverket, 2006b).

Utfällning av metaller i marken styrs huvudsakligen av de två faktorerna pH och DOC-halt i markvattnet. En hög DOC-halt har en motverkande effekt på utfällningar då humusämnen, som ofta utgör majoriteten av DOC, kan komplexbinda starkt med metaller. Koppars bindning till humusämnen är även stark vid låga pH-värden. De huvudsakliga typerna av utfällningar som sker med metaller är utfällningar med karbonater, oxider, hydroxider, sulfater och fosfater. I reducerade miljöer sker särskilt sulfidutfällningar och i markvattnet med högt pH är det utfällningar med oxider, hydroxider och karbonater som dominerar. För koppar sker särskilt bildning av oxidkomplex, dessa är dock svagare än de komplex som koppar bildar med humusämnen (Naturvårdsverket, 2006b).

Vid adsorption av metaller till ytor i marken står den enskilda metallen i jämvikt med sin lösta form. pH är den faktor som huvudsakligen styr adsorptionen av metaller. Detta beror på att många partiklars laddning är pH-beroende och därmed varierar storleken på den elektrostatiska attraktionen mellan metall och yta. Koppar kan genom ytcomplexbildning exempelvis adsorberas till aggregerade humusämnen, järn- och aluminiumhydroxider och manganoxid. Katjoner såsom koppar kan även adsorberas till negativt laddade lermineraltor elektrostatiskt, dock är denna adsorptionsmekanism inte dominerande för koppar (Naturvårdsverket, 2006b).

3.3.2 Koppars påverkan på nitrifierande mikroorganismer

I jordar förorenade med tungmetaller, såsom koppar har påverkan på mikroorganismers kvantitet och aktiviteten hos deras enzym observerats i flera studier (Kuperman & Carreiro, 1997; Wang et al., 2006; Wyszowska et al., 2013). Tungmetallerna utgör en abiotisk påfrestning då de kan påverka mikroorganismernas metabolism på olika sätt. Mikroorganismer har olika tålighet för tungmetaller och detta kan härledas till varierande metaboliska funktioner (Wyszowska et al., 2013). Flera studier har gjorts som tyder på att nitrifierande mikrobiella samhällen som tidigare exponerats för koppar kan bli mer motståndskraftiga mot en senare exponering (Fait et al., 2006; Li et al., 2014). Fait et al. (2006) observerade exempelvis ökad tolerans hos nitrifierande mikro-organismer som långtidsexponerats för koppar under 80 år i fält.

Subrahmanyam et al. (2014) har studerat hur ammoniakoxiderande mikroorganismer i sura jordar svarar på att bli exponerade för arsenik respektive koppar samt av att bli exponerade för båda metallerna samtidigt. I studien inkuberades jord med olika behandlingar under 10 veckor. De kopparkoncentrationer som undersöktes var i intervallet 125-500 mg koppar/kg ts jord. Flera tester gjordes, däribland mätning av potentiell nitrifikation och kvantifiering av AOA:s respektive AOB:s *amoA*-gener. Den potentiella nitrifikationshastigheten minskade med ökad metallhalt för de båda sura jordarna. Både AOA:s och AOB:s abundans minskade med ökande metallhalt, men AOA:s abundans var dock högre för alla undersökta halter. I jord som behandlats med

både koppar och arsenik påverkades mikroorganismernas abundans mer än för de enskilda behandlingarna.

Det finns få studier där nitrifierande mikroorganismers påverkan av koppar i neutrala och basiska jordar studerats. En trolig orsak är att biotillgängligheten ökar med minskande pH-värde. Det finns även knapphändigt med studier där NOBs tolerans mot koppar i jord studerats. I aktivt slam har NOB setts vara mindre känsliga för kopparexponering än AOB (Ouyang et al., 2016).

3.3.3 PAH:ers bindning i mark och biotillgänglighet

Polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er) består av minst två bensenringar. Dessa bildas bland annat vid ofullständig förbränning av oljeprodukter och när proteiner, fetter och kolhydrater upphettas tillräckligt. PAH:er är svårösliga i vatten samt svårflyktiga vilket möjliggör att de kan ansamlas i organiskt material i jord (Sterner, 2010). I jord kan PAH:er frigöras från olika typer av källmaterial. Dessa källmaterial är ofta vätskor som har låg löslighet i vatten, så kallade non-aqueous phase liquids (NAPLs) eller fasta ämnen, exempelvis sot. Källmaterialen innehåller flera olika organiska och oorganiska föroreningar. Källmaterialen anses både frigöra och fastlägga ämnen, och PAH:er sorberas starkt till fasta källmaterial. Adsorptionsställena på dessa material kan dock bli mättade av organiskt material och andra föroreningar vilket leder till att PAH:er kan frigöras i större utsträckning till markmiljön och blir mer biotillgängliga. Jordens sammansättning och egenskaper har en effekt på hur biotillgängliga PAH:er är för organismer i marken. Särskilt har andelen organiskt material som jorden innehåller visats sig ha en stor inverkan (Yu et al., 2018). Flera studier tyder på att PAH:ers biotillgänglighet minskar med ökande halt totalt organiskt kol (TOC) i jorden (Yang et al., 2010; Tao et al., 2006). I jordar som är förorenade med både PAH samt tungmetaller har en minskad biotillgänglighet av PAH observerats med ökande metallhalt. Den minskade biotillgängligheten beror av ökad sorption av PAH, i vissa fall ökar sorptionen med mer än 100 % (Gao et al, 2006; Liang, Zhu & Zhuang, 2016).

3.3.4 PAH:ers påverkan på nitrifierande mikroorganismer

I en studie av Cheng et al. (2014) studerades olika mikrobiella indikatorers potential att avgöra PAH-föreningen benzo(a)pyrens ekotoxicitet. Indikatorerna som undersöktes var mikrobiell biomassa i jorden, respiration, nitrifikation samt Shannon-index vilket är ett diversitetsindex. I studien undersöktes indikatorernas förmåga i två jordar med olika egenskaper med avseende på bland annat pH och andel organiskt material. Nitrifikation var den indikator som visades sig vara den mest känsliga i båda testjordarna och föreslogs i studien att vara en lämplig indikator för benzo(a)pyren. I flera studier har nitrifikationshastigheten hos nitrifierande mikroorganismer mätt i form av potentiell ammoniakoxidation (ISO 15685) observerats minska i PAH-förorenade jordar (Hund-Rinke & Simon, 2008; Klimkowicz-Pawlas & Maliszewska-Kordybach, 2010). Generellt var inverkan på nitrifikationshastigheten som högst i sandiga jordar med låg TOC-halt och låg biologisk aktivitet.

Nitrifierande mikroorganismer verkar med tiden kunna utveckla en tolerans mot PAH:er och andra kolväten. Deni och Penninckx (1999) undersökte kolvätenes effekt på nitrifierande bakterier och deras resultat antydde att de nitrifierande bakterierna utvecklade en tolerans i jord som tidigare exponerats för kolväten. Även Lindgren et al. (2015) som undersökte nitrifierande bakterier i sediment såg en ökad tolerans mot PAH:er

hos mikroorganismer som förut varit exponerade. Toleransen mättes i form av potentiell nitrifikation.

4 MATERIAL OCH METODER

4.1 LYSIMETERFÖRSÖK

Jord från Nántuna som är beläget sydost om centrala Uppsala, samt från Krusenberg som ligger några enstaka mil söder om Uppsala, valdes ut till forskningsprojektet APPLICERA. Båda områdena som jord togs från är klassificerade som betesmark. I november 2015 togs jordprover från de utvalda platserna och i tabell 1 visas pH-värde i markvattnet, totalt kol (Total-C) respektive kväve (Total-N), C/N-kvot, TOC, andel ler samt vattenhållande förmåga i respektive jordprov. Utifrån jordarnas kornstorleksfördelning klassificerades de enligt USA:s jordbruksdepartements (USDA) klassificeringssystem. Jorden från Nántuna klassificerades till sandy loam och Krusenbergsjorden till sand.

Tabell 1. Egenskaper i jordprov tagna från valda delområden av Nántuna och Krusenberg

Egenskaper	Jordprov	
	Nántuna	Krusenberg
pH (H ₂ O)	7,99	5,24
Total-C (%)	1,35	1,27
Total-N (%)	0,125	0,104
C/N	10,8	12,2
TOC (%)	1,39	1,32
Ler (%)	12	5
Vattenhållande förmåga (ml/kg färskvikt jord)	112	125

I november 2015 skedde tillverkning av spikjord innehållandes koppar av totalt 114,5 kg jord (färskvikt) från Nántuna och av 224,7 kg jord (färskvikt) från Krusenberg. Spiklösningar som tillsattes till respektive jord bestod av 1 M CuCl₂·2H₂O samt 1 M CaO. Till 1 kg jord tillsattes 40 ml av respektive lösning i syfte att uppnå en kopparkoncentration på 3000 mg/kg jord. Spikjordarna placerades i början av december 2015 i totalt sex lysimeterör vid en lysimeteranläggning och lakades i cirka 6 månader.

Som spikjord för PAH provtogs jord från en impregneringsanläggning i Nässjö i maj 2016. PAH-extraktion utfördes med USA:s miljöskyddsmyndighet EPA:s metod 3540C (EPA, 1996). Ytterligare rening skedde som beskrivit av Arp et al. (2014). Därefter uppmättes halter av olika PAH:er med gaskromatografi-masspektrometri (GC/MS). De analytiska inställningarna under mätningar var enligt rekommendationerna av Lundstedt et al. (2014). Jorden hade en totalhalt av PAH:er på 14 000 mg/kg jord. Halten av PAH-föreningar med låg molekylvikt (PAH-L) var 7800 mg/kg jord och med anledning av att denna halt överskred gällande riktvärden mest valdes lysimeterförsöket att skalas efter koncentrationen av PAH-L.

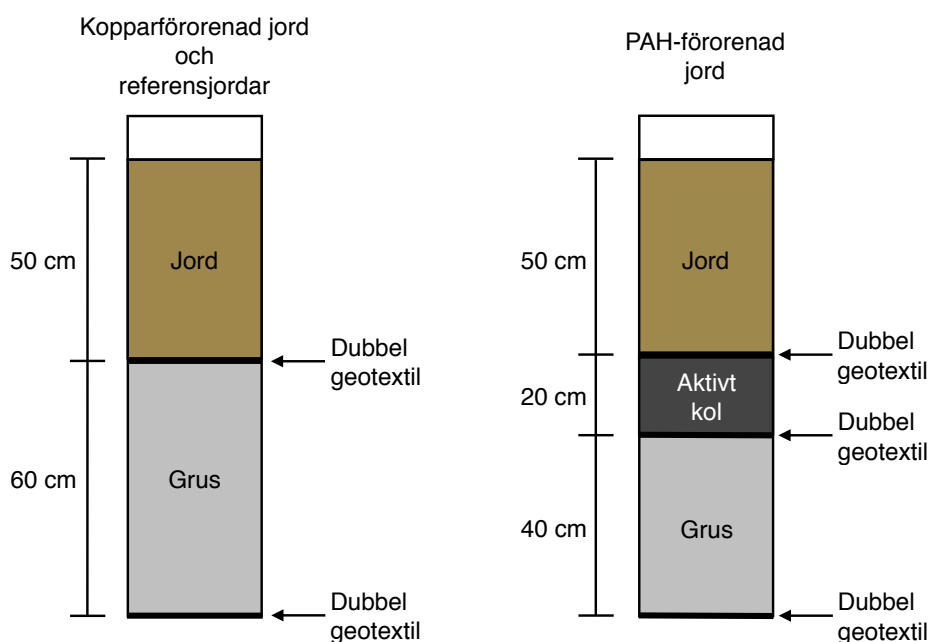
I maj 2016 blandades spikkjordarna innehållandes koppar respektive PAH med obehandlad jord från Nántuna respektive Krusenberg för att uppnå målkoncentrationer av koppar respektive PAH enligt tabell 2. Maximalt användes cirka 2 % PAH-förorenad spikjord från Nässjö för att uppnå den högsta målkoncentrationen. Innan tillsatts av spikjord innehöll Nántunajorden 7,0 mg Cu/kg och Krusenbergsjorden 9,1 mg Cu/kg. De olika koncentrationerna av koppar och PAH-L efter att spikjord blandats in motsvarade

riktvärden för KM (känslig markanvändning), MKM (mindre känslig markanvändning) och 3xMKM. Varje behandling upprepades tre gånger (A-C) för varje jordtyp (Nåntuna och Krusenberget) och även den gemensamma referensjorden för koppar och PAH bereddes i tre exemplar, vilket totalt blev 42 kolonner med jord. Fortsättningsvis i rapporten kommer behandling PAH 1 och Cu 1 användas för KM, behandling PAH 2 och Cu 2 för MKM och behandling PAH 3 och Cu 3 för 3xMKM.

Tabell 2. Målkoncentrationer av koppar respektive PAH för de olika behandlingarna i lysimeterförsöket

Jord	Behandling	Koncentration (mg/kg)
Nåntuna/Krusenberg	Referens 1-3	-
	PAH 1 A-C	15 (PAH-L)
	PAH 2 A-C	60 (PAH-L)
	PAH 3 A-C	170 (PAH-L)
	Cu 1 A-C	200
	Cu 2 A-C	430
	Cu 3 A-C	1100

De 42 olika kolonnerna placerades slumpmässigt ut i lysimeteranläggningen i slutet av maj 2016. I lysimeterrören innehållandes kopparbehandlade jordar placerades en dubbel geotextil i botten efterföljt av 60 cm grus (figur 2). Ovanpå gruset placerades en dubbel geotextilduk och därefter 50 cm av kopparförorenad jord. De oförorenade referensjordarna placerades på samma sätt i lysimeterrören. För lysimeterrören med de PAH-behandlade jordarna placerade en dubbel geotextil i botten efterföljt av 40 cm grus och ett 20 cm tjockt lager av aktivt kol för att förhindra att PAH:er läckte ut med vattnet som avleddes från lysimetrarnas botten. Ovanpå detta placerade en dubbel geotextil efterföljt av 50 cm PAH-behandlad jord.



Figur 2. Lysimeterrören i genomskärning för referensjordarna och koppar-respektive PAH-förorenad jord. Bilden är ej skalenlig.

Den första provtagningen av jord i de 42 lysimetrarna skedde i juni 2016 nästan direkt efter att jorden placerats ut i lysimetrarna. I september 2016 skedde den andra

provtagningen av samtliga 42 lysimetterör. Den tredje och sista provtagningen av jord skedde i oktober 2017. Jordprover som togs vid de tre tillfällena förvarades nedfrysta i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tills analys gjordes. I figur 3 ses några av lysimetterörerna vid anläggningen.



Figur 3. Lysimetterör vid lysimeteranläggningen. Foto taget av Dan Berggren Kleja.

4.2 Kvantifiering av nitrifierande mikroorganismer

4.2.1 DNA-extraktion och undersökning av extraherat DNA:s kvalitet

I januari 2018 extraherades DNA från alla jordprover tagna vid de tre tillfällena: juni 2016, september 2016 samt oktober 2017. Extraktionspaketet som användes var NucleoSpin® Soil från Macherey-Nagel. DNA-extrakten förvarades vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA-extraktens kvalitet kontrollerades med NanoDrop ND-1000 spektrofotometer. Rapporterad precisionen vid mätning av våglängd är 1 nm och absorbansprecision är 3 %. Instrumentet kan mäta koncentration av dubbelsträngat DNA i koncentrationsintervall 2-3700 ng/ μl (Thermo Fisher Scientific, 2010). Med spektrofotometern erhöles en grov uppskattning av den totala koncentrationen av dubbelsträngat DNA i proven. Förutom detta erhöles kvoten mellan absorbansen vid våglängderna 260 nm och 230 nm samt kvoten mellan absorbansen vid våglängderna 260 nm och 280 nm. Dessa kvoter är ett mått på renhet hos DNA-extrakt. Den förstnämnda kvoten A_{260}/A_{230} anger förhållandet mellan DNA:s och organiska molekyler absorptions. Förväntat värde på denna kvot är mellan 2,0-2,2. Kvoten A_{260}/A_{280} anger förhållandet mellan DNA:s och proteiners absorptions och idealt värde är 2,0 (Matlock, 2015).

Kvantifiering av dubbelsträngat DNA i DNA-extrakten undersöktes förutom med spektrofotometri med fluorometri för att få en noggrannare skattning av total DNA-koncentration. En Qubit 2.0 Fluorometer användes för mätningarna. Kitet som användes var Qubit dsDNA BR Assay Kit vilket är för bredspektrummatning. Mätinstrumentets rapporterade variationskoefficient (CV) är $<5\text{ }%$ (Thermo Fisher Scientific, 2016). Kvantifieringen utfördes med 2 μl DNA-extrakt. Gelelektrofores utfördes för vidare undersökning av det extraherade DNA:ts kvalitet. Tjockleken på de band som uppstod gav en uppskattning om mängden DNA i de olika DNA-extrakten samt hur långa DNA-fragmenten var.

4.2.2 Kvantifiering av mikroorganismer

4.2.2.1 Utspädning av DNA-extrakt och inhibitionstest

Varje DNA-extrakt späddes ut med Tris-EDTA-buffert (TE-buffert) till en målkonzentration av dubbelsträngat DNA på 2,5 ng/μl och till en total volym av 150 μl. TE-bufferten som användes bestod av 10 mM Tris och 0,1mM EDTA. Var och en av DNA-extrakten delades upp i fem rör med 30 μl i vardera rör och därefter frystes rören ned. Test av inhibering i de utspädda DNA-extrakten utfördes för att se om det fanns några föroreningar i proven. Detta gjordes för att dessa kan störa qPCR-mätningarna. Ifall inhibering uppträder i proverna när qPCR genomförs för en gen kommer resultatet av kvantifieringen att underskatta antal kopior av genen. Om inhibering förekommer kan ytterligare utspädning av DNA-extrakten vara nödvändigt. Testet utfördes genom att tillsätta en plasmid och undersöka hur denna amplifierades med de plasmidspecifika primrarna T7 och SP6. I bilaga A finns mer information kring använd reaktionsmix vid PCR-körningen.

PCR-maskinen som användes var Bio-Rad CFX Connect Real-Time System och den har hög känslighet då den kan detektera så lite som en kopia av DNA-sekvensen som kvantifieras. Precisionen i temperatur är vid 90 °C $\pm 0,2$ °C och skillnaden i temperatur mellan olika brunnar i en PCR-platta är $\pm 0,4$ °C de första 10 s efter att temperaturen nått 90 °C (Bio-Rad, u.å.) Proverna kördes i ett värmecykelprogram (se bilaga A) där antal kopior av DNA-sekvensen som amplifierades mättes genom fluorescens. Fluorescensen ökar i proverna för varje värmecykel. Hur mycket fluorescensen ökar i respektive prov beror av hur många kopior av DNA-sekvensen som amplifierades som fanns i provet från start. Det detekteras i vilken värmecykel respektive provs fluorescens når över ett visst tröskelvärde.

Det bedömdes att den första utspädning var tillräcklig då de olika DNA-extraktens detekterades i ungefär samma värmecykel. Reaktionerna med extraherat DNA och plasmid skiljde sig inte från reaktionerna med rent Lambda-DNA och plasmid.

4.2.2.2 Kvantifiering av mikroorganismer

Kvantifiering av AOA, AOB samt de nitritoxiderande bakteriesläktena *Nitrobacter* och *Nitrospira* i DNA-extrakten gjordes med qPCR. Vid samtliga kvantifieringar användes PCR-maskinen Bio-Rad CFX Connect Real-Time System. För att kunna kvantifiera generna för de olika organismerna användes olika primrar. Primrarna innehåller nukleotider som orienterar sig på varsin sida av DNA-segmentet som ska amplifieras. Under ett värmecykelprogram bryts det dubbelsträngade DNA:ts vätebindningar och en amplifiering sker av DNA-segmentet vilket leder till att många kopior av segmentet skapas. Antal genkopior i proven mättes med fluorescens och det detekterades i vilken värmecykel respektive prov nådde över ett visst tröskelvärde. Proverna gavs på så vis olika C_q-värden. Kvantifieringen av respektive gen gjordes två gånger för varje DNA-extrakt i två oberoende PCR-körningar under samma dag. Prover där de två tekniska replikatens C_q-värden skiljde sig mer än 0,8 cykler gjordes om då detta antogs bero på pipetteringsfel. Efter omgjord qPCR skiljde sig enstaka DNA-extrakts två tekniska replikats C_q-värden fortfarande mer än 0,8 cykler, dock ej mer än 1,1 cykler.

Vid kvantifiering av varje gen gjordes en spädningsserie med standardlösningar med känt antal kopior av DNA-segmentet som skulle kvantifieras. TE-buffert användes för utspädningen. Spädningsserien gjordes i intervallet 10¹-10⁸ genkopior genom att utgå från en stamlösning innehållandes 10⁸ genkopior. Varje stamlösning gjordes i replikat om två

inför varje qPCR-körning. Vid qPCR mäts standardernas fluorescens, vilket gör att antalet kopior av generna i proverna kan fås fram. För varje gen gjordes flera PCR-körningar då alla prover inte fick plats i en PCR-platta med 96 brunnar. Förutom prover och standarder hade varje PCR-platta en negativ kontroll med sterilt vatten samt en NTC-kontroll (eng. *no template control*) med Lambda-DNA. De gener som kvantifierades för de olika mikroorganismerna var funktionella gener. För AOA respektive AOB kvantifierades olika varianter av den funktionella gen som kodar för enzymet *ammoniakmonooxygenas (amoA)*. För *Nitrobacter* och *Nitrospira* kvantifierades olika varianter av den funktionella gen som kodar för enzymet *nitritoxidoreduktas beta (nrxB)*.

Cq-värdena för de olika standardlösningarna varierade en del för de olika PCR-körningarna, vilket gjorde att beslut togs om att göra en standardkurva av standardlösningarnas Cq-värden från flera olika PCR-körningar för respektive gen. För att få en rät linje logaritmerades SQ-värdena som anger antalet genkopior i standardlösningarna från start. Enstaka standardlösningarnas Cq-värden från körningar exkluderades om de var utanför provernas område eller avvek mycket från de andra körningarnas Cq-värden för standardlösningar av samma koncentration.

En optimal lutning på standardkurvan är -3,32, vilket betyder att antalet genkopior fördubblas i varje värmecykel. Detta ger en effektivitet, E på 100 % för en PCR-körning. Parametrar som påverkar effektiviteten för en PCR-körning är bland annat hur optimal designen är hos primrarna, eventuella inhiberande ämnen i proverna och hur väl pipettering utförs (Thermo Fisher Scientific, u.å.). E beräknas med formeln nedan (ekvation 4).

$$E = 10^{-1/\text{linjens lutning}} - 1 \quad (4)$$

För varje gen som kvantifierades eftersträvades en effektivitet på minst 75 % vid varje PCR-körning. Standardlösningarna kontrollerades innan proverna analyserades genom en PCR-körning med enbart standarderna samt en blank med sterilt vatten, en NTC-kontroll och en med DNA-extrakt från ett okänt jordprov. Provet med det okända DNA:t lades till för att se om målgenen kvantifierades under PCR-körningen. Förutom detta analyserades erhållna amplifieringskurvor och smältkurvor för respektive körning. Vid kvantifiering av alla gener användes iQ SYBR Green Supermix som innehåller färgämnet SYBR green som är fluorescerande och binder till dubbelsträngat DNA vilket får dess fluorescens att öka (Primrose & Twyman, 2006).

För att undvika att ospecifik produkt amplifieras aktiveras mixen först när värmecykelprogrammet startar under en PCR-körning. För varje gen som kvantifierades användes i varje provbrunn på PCR-plattan 2 µl DNA-extrakt utspätt till en målkoncentration av dubbelsträngat DNA på 2,5 ng/µl. Således tillsattes 5 ng dubbelsträngat DNA till varje provbrunn. Totalvolymen i varje provbrunn innehållandes DNA-extrakt och reaktionsmix var 15 µl.

Vid kvantifiering av AOA användes primrarna CamoA19f och CamoA616r. Se bilaga A för detaljer kring reaktionsmixen som användes och värmecykelprogram. PCR-körningen med enbart standardlösningarna gav en effektivitet på mindre än 75 %, vilket medförde att PCR-programmet modifierades en aning för att öka effektiviteten. Därefter jämfördes fyra olika framtagna standarder med varandra. Testkörningen med dessa standarder gav speciellt tillfredsställande resultat för två av dessa då effektiviteten blev högst för dem

och det beslutades att en av dessa skulle användas för PCR-körningarna med proverna. Effektiviteten blev 76,4 % för den standardkurva som erhöles genom att kombinera standardlösningarnas Cq-värden från de olika PCR-körningarna. R²-värdet för regressionen blev 0,996.

Vid PCR-körningarna för kvantifiering av AOB användes primrarna AmoA1F och AmoA2R. Detaljer kring använd reaktionsmix och värmecykelprogram finns i bilaga A. Standardlösningarnas Cq-värden skiljde sig en del för prover som gjordes om (skillnad i Cq-värde > 0,8 för de två tekniska replikaten) och för prover som inte gjordes om. Beslut togs om att exkludera de enstaka standardkurvor från en dag som avvek från de andra standardkurvorna. Använd standardkurva för samtliga prover hade en effektivitet på 79,2 % och R²-värdet var 0,996.

Vid kvantifiering av bakteriesläktet *Nitrospira* användes primrarna nxrB169F och nxrB638R. Information kring använd reaktionsmix och värmecykelprogram finns i bilaga A. Använd standardstamlösning visade sig vara felaktig och Cq-värden för en standardserie gjord från en korrekt stamlösning användes istället för att beräkna antal genkopior i proverna. Effektiviteten på denna standardkurva var 89,4 % och dess R²-värde 0,996.

Det nitritoxiderande bakteriesläktet *Nitrobacter* kvantifierades med primrarna nxrB1F och nxrB1R. Se bilaga A för information kring använd reaktionsmix och värmecykelprogram. Standardkurvan som erhöles genom PCR-körningarna visade sig senare överskatta antal kopior av *Nitrobacters nxrB*-gen. Anledningen till detta är att det var något fel på standardlösningen med 10⁸ genkopior som standardserien gjorts utifrån. Eftersom det inte var något fel på reaktionsmixen som använts för proverna togs beslut om att använda Cq-värden för en standardserie som utgått från en korrekt standardlösning som erhöles från separata PCR-körningar. Den beräknade effektiviteten för denna standardkurva var 83,3 % och R²-värdet 0,995.

Erhållna PCR-produkter i brunnarna på PCR-plattorna analyserades med gelelektrofores. Gelen med brunnar för proverna göts med SB-buffert och elektroforesen skedde i SB-buffert. Efter avslutad gelelektrofores undersöktes PCR-produkten genom att kolla hur många baspar den hade samt om någon ospecifik produkt förekom.

Efter slutförd qPCR beräknades medelvärden av de två tekniska replikatens Cq-värden för varje DNA-extrakt. Därefter beräknades genkopior i reaktionsvolymen, vilket är detsamma som genkopior/5 ng DNA, med standardkurvornas ekvationer som relaterar Cq-värdet till antal genkopior. Antalet genkopior/ng DNA erhöles genom att dividera detta värde med 5. Genkopior/ng DNA för de olika undersökta generna redovisas i bilaga C. Därefter beräknades genkopior/g ts jord med ekvation 5 och 6.

$$\frac{m_{DNA,totalt}}{m_{jord,ts}} = \frac{m_{DNA,utspätt\ extrakt}/\mu l \cdot V_{extrakt,totalt}}{m_{jord,ts}} \quad (5)$$

$m_{DNA,utspätt\ extrakt}$ är den mängd DNA (ng/ μ l) som uppmätts i de utspädda DNA-extrakten med fluorometri, $V_{extrakt,totalt}$ är totalvolym extrakt som användes vid extraktion av DNA från respektive jordprov (100 μ l) och $m_{jord,ts}$ är den mängd ts jord (g) som användes för DNA-extraktionen. Antalet genkopior av en kvantifierad gen per g ts jord beräknades sedan med ekvation (6).

$$\frac{genkopior}{m_{jord,ts}} = \frac{genkopior/ng\ DNA \cdot m_{DNA,totalt}}{m_{jord,ts}} \quad (6)$$

4.3 AKTIVITETSMÄTNINGAR AV NITRIFIERANDE SAMHÄLLEN

Aktivitetmätningar av nitrifierande mikroorganismer genomfördes för jordprover från Nantuna och Krusenberg från tidpunkten oktober 2017 då den sista insamlingen av jord skedde. Metoden som tillämpades för aktivitetmätningarna var mätning av potentiell ammoniakoxidation (PAO). Standardmetoden ISO 15685 användes med några modifikationer. Nitrifikationsprocessens andra steg inhiberas med natriumklorat vilket gör att nitrit ansamlas i jordproverna. Nitritbildningens hastighet är konstant och ansamlad mängd nitrit mäts upprepade gånger med jämna tidsintervall under mätningen.

Jordprov togs ut från frysen cirka 17 timmar innan mätningarna utfördes. 20 g av varje jordprov vägdes in i 250 ml duranflaskor. För att syresätta mikroorganismerna skruvades locken på löst för att ett visst luftflöde in i flaskorna skulle kunna ske. Duranflaskorna inkuberades därefter vid 25 °C i ett konstantrum för att ge mikroorganismerna optimala förhållanden. Även substrat för ammoniakoxidationerna och 4 M kaliumklorid förvarades i konstantrummet. Substratet innehöll 1,5 mM ammoniumsulfat, (NH₄)₂SO₄ och dess pH-värde var 7,2. Försöket inleddes genom att tillsätta 80 ml substrat i vardera duranflaska och därefter sattes hållock på flaskorna. Flaskorna ställdes på ett skakbord inställt på 175 rpm. Mätningar utfördes 2, 3, 4, 5 samt 6 timmar efter att substrat tillsatts. Detta är en modifikation från standardmetoden där endast mätningar utförs för timme 2 och timme 6. Modifikationen gjordes för att få fler mätpunkter och därmed mer pålitliga resultat. Vid mätningarna pipetterades 1,6 ml av innehållet i respektive flaska ner i ett rör innehållandes 1,6 ml 4 M kaliumklorid. I standardprotokollet har kaliumkloriden en koncentration på 2 M. Kaliumkloriden stoppar den pågående ammoniakoxidationen. Rören innehållandes substrat och kaliumklorid centrifugerades med hastigheten 4300 rpm under tre minuter. Därefter filtrerades vätskan i respektive rör genom ett filter med tätheten 0,8 µm.

Nitrithalten i den filtrerade vätskan mättes genom spektrofotometri med en Foss FIAstar 5000 Analyser som hanterar vätkemiska analyser. Analysinstrumentet har för använt koncentrationsintervall för mätningar en detektionsgräns på 0,005 µg/ml NO₂⁻N (Foss, 2008). Mätningarna gjordes enligt ISO 13395-1996 med några modifikationer. Istället för destillerat vatten användes 2 M kaliumklorid som bärlösning och reagenslösning. En spädningsserie med nio standardlösningar innehållandes nitrit i koncentrationsintervallet 0-1,0 mg/l gjordes varje dag mätningar utfördes då nitritlösningarna är instabila. Standardlösningarna gav en kurva som relaterade nitritkoncentration till absorbans och utifrån denna beräknades nitritinnehåll i de olika proverna. Nitrithalten i jordproverna vid de olika tidpunkterna beräknades därefter med ekvation 7.

$$Nitrit_{jordprov} = \frac{nitrit_{FIA} \cdot spädningfaktor \cdot volym_{substrat}}{m_{jord, fw}} \quad (7)$$

Nitrit_{FIA} är beräknad nitrithalt (mg/l) utifrån standardevkvationen erhållen vid mätning med spektrofotometern, *volym_{substrat}* är tillsatt mängd substratvätska (l) och *m_{jord, fw}* är färskvikt jord (g). Spädningfaktorn har värdet 2 då varje prov späddes med lika mängd 4 M kaliumklorid innan mätning.

Nitrithalten (i enheten ng NO₂⁻-N/g färskvikt jord) i varje enskilt jordprov vid de olika tidpunkterna sattes som en funktion av tiden (min). PAO (ng NO₂⁻-N g⁻¹ fw⁻¹ min⁻¹) erhålls som lutningen på linjen. Därefter dividerades värdet på PAO med ts-halten för jordprovet för att uttrycka PAO i enheten ng NO₂⁻-N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹.

4.4 STATISTISKA ANALYSER

Variansanalys av qPCR-data samt aktivitetsdata gjordes med 2-vägs variansanalys, även benämnt 2-vägs-ANOVA, för faktorerna jordtyp samt koppar-respektive PAH-koncentration. Detta gjordes för att undersöka om faktorerna hade en signifikant påverkan på kvantiteten av de nitrifierande mikroorganismerna. Variansanalyser genomfördes huvudsakligen i MATLAB, men även programvaran Minitab express användes. Konfidensnivån valdes till 95 % ($\alpha=0,05$) för samtliga ANOVA-tester. För qPCR-data ansattes nollhypoteserna, H_0 att föroreningsgrad och jordtyp inte har någon signifikant inverkan på antalet genkopior. H_0 för aktivitetsmätningarna var att aktiviteten är densamma oavsett föroreningsgrad och jordtyp.

Innan ett ANOVA-test kan genomföras måste vissa villkor vara uppfyllda för datamängderna som ska undersökas (Gotelli & Ellison, 2004). Dessa antaganden är:

1. Data måste vara oberoende samt identiskt fördelat.
2. Variansen ska vara likartad mellan grupper.
3. Residualerna antas följa en normalfördelning och ha ett medelvärde på noll.
4. Data ska ha klassificerats korrekt, vilket exempelvis betyder att prov som ingår i samma behandlingsgrupp ska ha behandlats likadant.
5. Huvudeffekterna som undersöks ska vara additiva.

De olika datamängdernas statistiska fördelning undersöktes genom att analysera residualernas spridning kring värdet noll med histogram och normal-QQ-plot. De flesta datamängderna var inte normalfördelade, vilket krävde transformation av värdena för att uppfylla kriterierna för variansanalysen. Vilken transformation som var mest lämplig för de olika datamängderna varierade. De transformationer som genomfördes var log₁₀-transformering, kvadratrotstransformering, inverstransformering samt Box-Cox-transformering. Vid Box-Cox-transformering upphöjs alla värden med talet λ . Exponenten λ ges ett värde som ger den mest optimala anpassningen av residualerna till en normalfördelning. Vissa av datamängderna uppfyllde antagande 3 ovan sämre än de andra. Mer information finns i appendix B där även transformationer för samtliga datamängderna redovisas.

ANOVA-tabellerna erhållna i MATLAB kompletterades med att beräkna hur stor andel varje medelkvadratsumma över variation bidrar till den totala variationen. 2-vägs-ANOVAN hade två fixerade faktorer (jordtyp och koncentrationsnivå [av förorening]) för samtliga datamängder. Faktorn jordtyp benämns faktor A och faktorn koncentrationsnivå benämns faktor B i ekvationerna 8-10.

Variansen för faktorn jordtyp beräknades med ekvation 8, där MS_A är medelkvadratsumman av faktorns variation, $MS_{residual}$ är medelkvadratsumman av variationen inom grupper, a är antalet jordtyper, b är antalet nivåer av koppar respektive PAH och n är antalet biologiska replikat inom samma behandling.

$$\sigma_A^2 = \frac{MS_A - MS_{residual}(a-1)}{abn} \quad (8)$$

Variansen för faktorn koncentration beräknades med ekvation 9.

$$\sigma_B^2 = \frac{MS_B - MS_{residual}(b-1)}{abn} \quad (9)$$

Interaktionstermens varians beräknades med ekvation 10.

$$\sigma_{AxB}^2 = \frac{MS_{AxB} - MS_{residual}(a-1)(b-1)}{abn} \quad (10)$$

MS_A , MS_B , MS_{AxB} och $MS_{residual}$ beräknades av använd programvara enligt ekvationerna 11, 12, 13 och 14.

$$MS_A = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2}{a-1} \quad (11)$$

\bar{Y}_i är medelvärdet för varje jordtyp i , \bar{Y} är medelvärdet för alla datavärden och $a-1$ är frihetsgrader för faktorn A (jordtyp).

$$MS_B = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2}{b-1} \quad (12)$$

\bar{Y}_j är medelvärdet för varje koncentration j , \bar{Y} är medelvärdet för alla datavärden och $b-1$ är frihetsgrader för faktorn B (koncentration).

$$MS_{AxB} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\bar{Y}_{ij} - \bar{Y}_i - \bar{Y}_j + \bar{Y})^2}{(a-1)(b-1)} \quad (13)$$

\bar{Y}_{ij} är medelvärdet av den unika kombinationen av jordtyp i och koncentration j , \bar{Y}_i är medelvärdet för varje jordtyp i , \bar{Y}_j är medelvärdet för varje koncentration j , \bar{Y} är medelvärdet för alla datavärden och $(a-1)(b-1)$ är antal frihetsgrader.

$$MS_{residual} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (Y_{ijk} - \bar{Y}_{ij})^2}{ab(n-1)} \quad (14)$$

Y_{ijk} är datavärde för den unika kombinationen av jordtyp i och koncentration j för biologiskt replikat k , \bar{Y}_{ij} är medelvärdet av de biologiska replikaten för kombinationen av faktor i och koncentration j och $ab(n-1)$ är antal frihetsgrader.

Andel av den totala variationen som kunde förklaras av faktorerna jordtyp och koncentration respektive interaktionen mellan dem gavs av ekvation 15.

$$PEV_{A,B,AxB} = \frac{\sigma_{A,B,AxB}^2}{\sigma_A^2 + \sigma_B^2 + \sigma_{AxB}^2 + \sigma_e^2} \quad (15)$$

Andel av den totala variationen som kunde förklaras av variansen inom grupper beräknades med ekvation 16.

$$PEV_e = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_A^2 + \sigma_B^2 + \sigma_{AxB}^2 + \sigma_e^2} \quad (16)$$

Om nollhypotesen förkastades för någon av de undersökta variablerna genomfördes Tukey-Kramers post hoc-test för att undersöka vilken eller vilka behandlingars väntevärde som skiljde sig signifikant åt från de andra behandlingarnas väntevärde. Tukey-Kramers post hoc-test har samma antaganden som ANOVA-tester och testen genomfördes med samma transformering av datavärdena som vid variansanalyserna.

Korrelationsanalys gjordes för de olika mikroorganismernas kvantitet vid de olika tidpunkterna för att undersöka hur de samvarierade. Vid korrelationsanalyserna har biologiska replikat för olika geners abundans som härstammar från jord från samma lysimeterrör vid samma provtagningsdatum jämförts. Dels gjordes korrelationstester där samvariationen mellan två gener i en jordtyp testades över tid, men även samvariationen vid enskilda tidpunkter i en jordtyp undersöktes. Eftersom datamängderna inte var approximativt normalfördelade och punktdiagram inte alltid visade på ett linjärt förhållande mellan variablerna uteslöts parametriska korrelationstest såsom Pearsons. Istället utfördes Kendalls icke-parametriska rangkorrelationstest vid konfidensnivån 95 % ($\alpha=0,05$). Innan testet genomfördes undersöktes förhållandet mellan variablerna i ett punktdiagram. Punktdiagram för signifikanta korrelationer redovisas i bilaga D. Förhållandet mellan variablerna var inte tydligt monotont för alla variabler vilket gav icke signifikanta resultat. Korrelationsanalys med Kendalls korrelationstest gjordes även för att undersöka samvariation mellan de olika genernas kvantitet och den potentiella ammoniakoxidationen vid tidpunkten oktober 2017. Även dessa korrelationsanalyser gjordes parvis för varje biologiskt replikat av en gens abundans och uppmätt PAO vid respektive provtagningsstillfälle för alla koncentrationer (referens, KM, MKM och 3xMKM). Biologiska replikat som jämförts för olika gener härstammar från jord från samma lysimeterrör. Punktdiagram för signifikanta korrelationer mellan PAO och mikroorganismers abundans redovisas i bilaga D.

5 RESULTAT

5.1 KVANTIFIERING AV MIKROORGANISMER

5.1.1 Kvantifiering av ammoniakoxiderande arkéer (AOA)

Abundansen av AOA:s *amoA*-gen för de olika behandlingarna och tidpunkterna var i intervallet $1,6 \cdot 10^6$ - $3,1 \cdot 10^8$ genkopior/g ts jord. Variansanalys av AOA-*amoA* genkopior/g ts jord för olika kopparkoncentrationer visade att det var en signifikant skillnad ($P < 0,05$) mellan de olika jordtyperna (Nåntuna och Krusenberg) för alla undersökta tidpunkter (tabell 3). Andel av förklarad varians (PEV) indikerar hur mycket av den totala variansen som kan förklaras av en variabel. PEV var högst för faktorn jordtyp för alla tidpunkter, men variationen i antal AOA-*amoA* genkopior uppkommen på grund av olika kopparkoncentrationer ökade med tiden. De signifikanta P-värdena för faktorn Cu (kopparkoncentration) i september 2016 och i oktober 2017 i tabell 3 indikerar att det fanns en signifikant skillnad i kvantiteten av AOA-*amoA* mellan en eller flera av kopparbehandlingarna vid dessa tidpunkter. Detta resultat överensstämmer med resultatet från post hoc-testet som redovisas i figur 4.

Variansanalys av AOA-*amoA* genkopior/g ts jord för olika PAH-koncentrationer visade att det var en signifikant skillnad ($P < 0,05$) mellan de olika jordtyperna för alla undersökta tidpunkter (tabell 3). Det höga PEV-värdet för jordtyp vid alla tidpunkter indikerade att en stor del av uppvisad variation i antal genkopior kunde förklaras av denna faktor. Variationen i antal AOA-*amoA* genkopior uppkommen på grund olika PAH-koncentrationer ökade dock med tiden. Interaktionstermen för koncentration och jordtyp hade ett P-värde $< 0,05$ för september 2016 och oktober 2017 vilket betyder att en statistiskt signifikant interaktionseffekt fanns. Dock var denna interaktion liten, vilket kan ses på de låga PEV-värdena för faktorn PAH x jord.

Tabell 3. Resultat av variansanalys av antal AOA-*amoA* genkopior/g ts för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

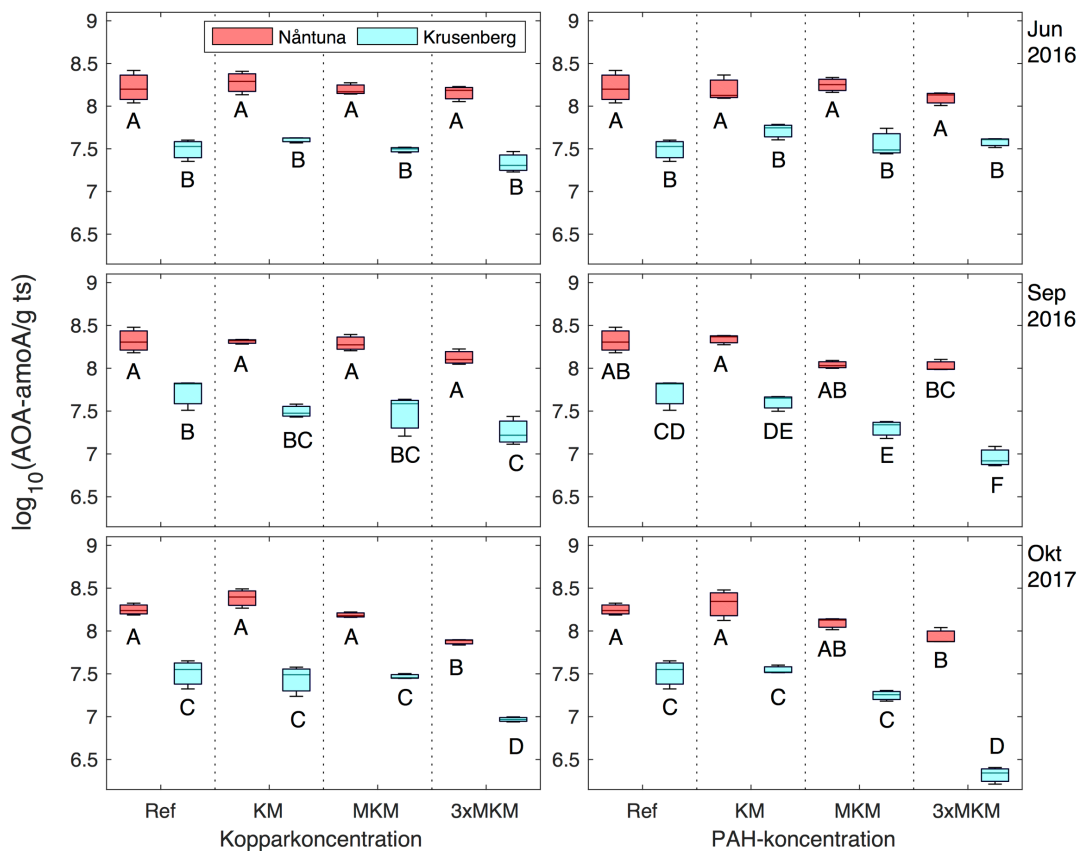
Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	PEV (%)	<i>P</i>	<i>F</i>	PEV (%)	<i>P</i>	<i>F</i>	PEV (%)	<i>P</i>
Cu ^a	3,07	2,2	-	5,53	6,3	**	30,80	17,1	***
Jord ^b	250,42	89,7	***	178,37	82,5	***	407,69	77,8	***
Cu x jord ^a	0,50	0,5	-	1,02	0,0	-	2,01	0,6	***
Inom		8,6			11,2			4,6	
PAH ^a	1,00	0,0	-	30,87	21,0	***	68,46	25,8	***
Jord ^b	138,08	84,5	***	301,91	70,6	***	497,20	63,2	***
PAH x jord ^a	1,42	0,8	-	4,81	2,7	*	21,69	7,9	***
Inom		14,8			5,6			3,1	

a= $F_{3,23}$, b= $F_{1,23}$, $0,01 \leq P < 0,05$ *, $0,001 \leq P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, ej signifikant P-värde -

Antalet AOA-*amoA* genkopior/g ts jord i juni 2016 skiljde sig inte signifikant inom samma jordtyp för olika kopparkoncentrationer (figur 4). Detta kan även ses i tabell 3 där P-värdet för kopparkoncentration är större än 0,05 för juni 2016. Dock var skillnaden i antalet AOA-*amoA* genkopior signifikant mellan de olika jordtyperna. I september 2016 var abundansen av AOA:s *amoA*-gen vid den högsta koncentrationen i Krusenbergsjorden

signifikant mindre än i den oförorenade referensjorden. I oktober 2017 skiljde sig jordtyperna signifikant åt. Kvantiteten av AOA:s *amoA*-gen i jord med kopparkoncentration motsvarande 3xMKM var signifikant lägre än för de andra koncentrationerna för både Nántuna och Krusenberg.

För den PAH-förorenade jorden var det i juni 2016 endast en statistiskt signifikant skillnad i antalet AOA-*amoA* genkopior/g ts jord mellan jordtyperna. Tre månader senare i september 2016 hade dock skillnader i *amoA*-genens abundans ökat mellan de undersökta koncentrationerna i Krusenbergsjorden. Vid den sista tidpunkten var minskningen i *amoA*-genens abundans vid den högsta PAH-koncentrationen än mer utpräglad. Antal genkopior av AOA:s *amoA*-gen/g ts jord i Nántunajorden var vid den högsta koncentrationen signifikant lägre än för referens och KM, dock ej MKM (figur 4).



Figur 4. Låddiagram över logaritmerat antal AOA-*amoA* genkopior/g ts jord för olika kopparkoncentrationer samt PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

5.1.2 Kvantifiering av ammoniakoxiderande bakterier (AOB)

AOB:s *amoA*-gens abundans/ g ts jord var i intervallet $5,5 \cdot 10^5$ - $4,9 \cdot 10^7$ och således cirka en storleksordning mindre än den uppmätta för AOA. Variansanalys visade inga signifikanta skillnader i antalet AOB-*amoA* genkopior i juni 2016 i relation till kopparkoncentration (tabell 4). I juni 2016 och september 2016 förklarades mer än hälften av variationen av faktorn jordtyp. I oktober 2017 var variationen uppkommen till följd av kopparkoncentration nästa lika stor som den som härrörde från jordtyp. Andel av den totala variansen som förklarades av variationen inom grupperna varierade mellan 34,7-49,3 %.

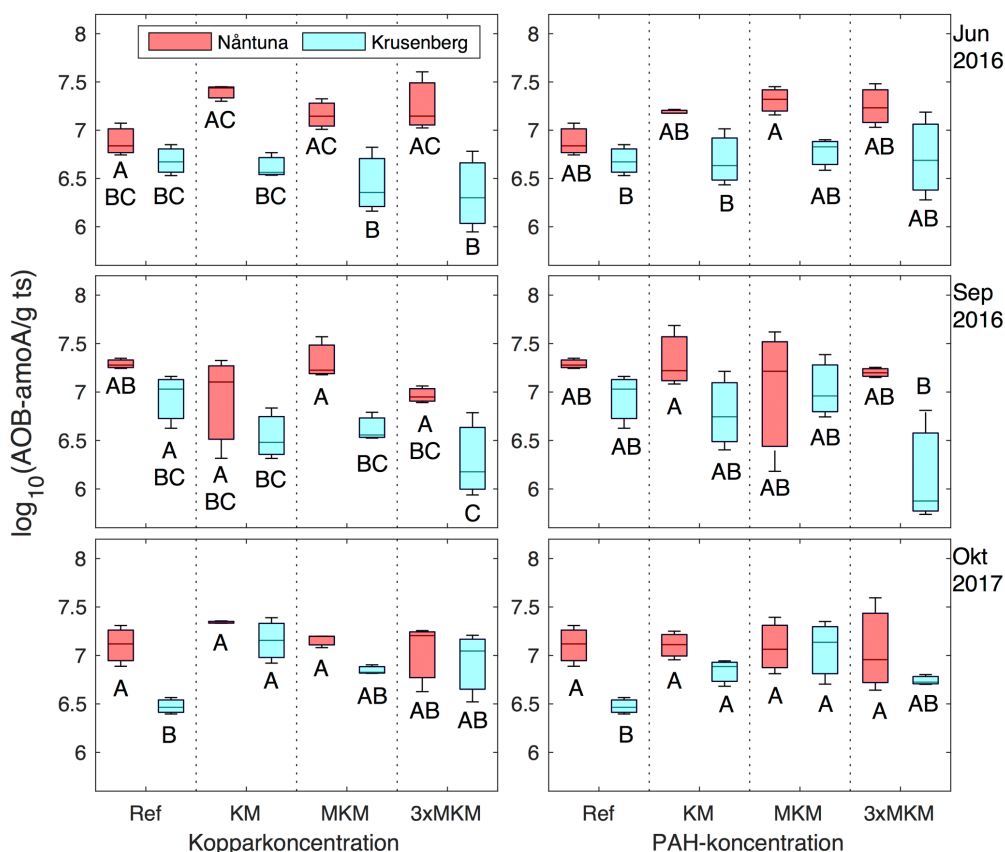
Genomförda variansanalyser för den PAH-förorenade jorden visade att en stor andel av den totala variansen vid alla tidpunkter kunde förklaras av faktorn jordtyp (tabell 4). Variation inom grupperna stod för minst 41 % av den totala variansen för de olika tidpunkterna och var större eller lika stor som andelen varians som kunde förklaras av faktorn koncentration vid alla undersökta tidpunkter. En signifikant interaktionseffekt fanns mellan PAH-koncentration och jordtyp i oktober 2017.

Tabell 4. Variansanalys av antal AOB-*amoA* genkopior/g ts för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	F	PEV (%)	P	F	PEV (%)	P	F	PEV (%)	P
Cu ^a	1,12	0,5	-	3,49	14,4	*	4,65	22,5	*
Jord ^b	41,67	58,8	***	22,11	40,7	***	12,45	23,5	**
Cu x jord ^a	2,39	6,0	-	0,75	-1,4	-	1,76	4,7	-
Inom		34,7			46,3			49,3	
PAH ^a	1,95	5,8	-	1,43	3,7	-	3,97	15,3	*
Jord ^b	22,90	44,7	***	8,30	20,8	*	15,65	25,2	**
PAH x jord ^a	1,07	0,4	-	1,82	7,0	-	4,56	18,3	*
Inom		49,0			68,5			41,2	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01≤P<0,05 *, 0,001≤P<0,01**, P<0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Resultatet av genomfört post hoc-test visade inte på några signifikanta skillnader i antalet AOB-*amoA* genkopior i juni 2016 för någon av de undersökta jordtyperna (figur 5). Kvantiteten av AOB-*amoA* var inte statistiskt signifikant olika för de två undersökta jordtyperna. I oktober 2017 var skillnaderna i AOB:s *amoA*-gen abundans mellan de olika jordtyperna mindre utpräglad än vid de andra tidpunkterna. Detta bidrog antagligen till att PEV ökade för faktorn föroreningsgrad (Cu och PAH). I oktober 2017 skiljde sig antalet genkopior i referensjorden från Krusenberg sig signifikant från antalet i KM, men ej med de andra koncentrationerna av koppar. Föroreningsgraden av PAH hade ingen signifikant effekt på kvantiteten av AOB-*amoA* i juni och september 2016 (figur 5). I oktober 2017 skiljde sig antalet genkopior i referensproven för Krusenberg signifikant från antalet vid koncentrationerna KM och MKM av PAH.



Figur 5. Låddiagram över logaritmerat antal AOB-*amoA* genkopior/g ts jord för olika kopparkoncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

5.1.3 Kvantifiering av nitritoxiderande bakterier

Nitrospira nxrB-gens abundans/g ts jord var generellt högre än *Nitrobacters* och var i de undersökta jordproverna i intervallet $2,9 \cdot 10^5$ - $7,4 \cdot 10^7$. *Nitrobacters* abundans var mellan $2,0 \cdot 10^4$ - $1,7 \cdot 10^6$ genkopior/g ts jord. *Nitrospira* uppvisade liknande trender i abundans med de olika behandlingarna som AOA. Variansanalyser av *Nitrospira-nxrB* genkopior/g ts för de olika tidpunkterna indikerar att jordtyp var den största källan till skillnader i antalet genkopior i den kopparförorenade jorden (tabell 5). Andel av den totala variationen som kunde förklaras av kopparkoncentration var relativt låg för alla tidpunkter. Värt att notera är dock att den ökade i september 2016 för att sedan minska till den sista tidpunkten. För september 2016 fanns en signifikant interaktionseffekt mellan faktorerna koncentration och jordtyp.

Variationen i antalet *Nitrospira-nxrB* genkopior/g ts i PAH-förorenad jord förklarades i juni 2016 till stor del av faktorn jordtyp (tabell 5). Tre månader senare hade andelen variation som kan förklaras av faktorn jordtyp minskat, dock ökade andelen variation som kunde förklaras av jordtyp en aning vid den sista undersökta tidpunkten. Värt att notera är att det för datavärdena från september 2016 fanns en signifikant interaktionseffekt mellan koncentration och jordtyp.

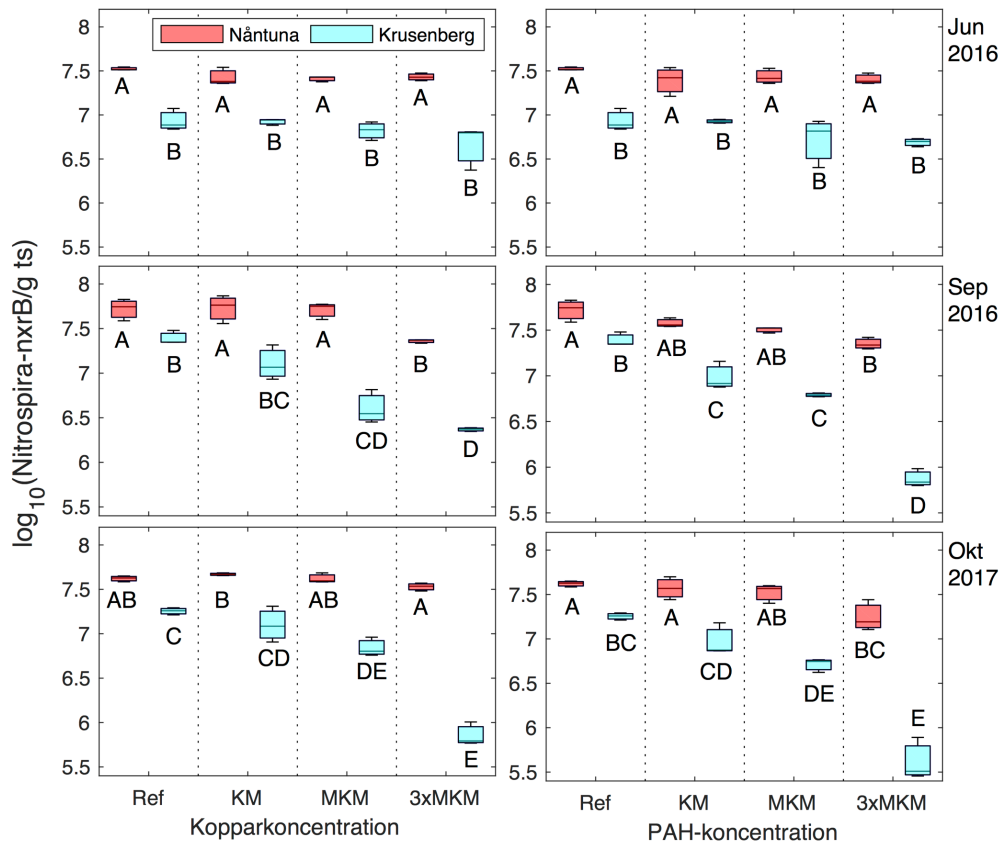
Tabell 5. Resultat av variansanalys av antal *Nitrospira-nxrB* genkopior/g ts för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentrationen samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>
Cu ^a	3,65	2,4	*	18,34	22,9	***	17,19	9,0	***
Jord ^b	304,96	90,4	***	143,89	62,9	***	464,30	85,5	***
Cu x jord ^a	1,13	0,1	-	3,80	3,7	*	2,98	1,1	-
Inom		7,1			10,6			4,4	
PAH ^a	2,50	2,3	-	122,55	36,5	***	26,86	28,5	***
Jord ^b	167,16	85,3	***	472,67	47,2	***	169,70	61,9	***
PAH x jord ^a	1,06	0,1	-	47,47	13,9	***	1,76	0,8	-
Inom		12,3			2,4			8,8	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01 ≤ P < 0,05 *, 0,001 ≤ P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Kvantiteten av *Nitrospiras nxrB*-gen/g ts jord i Nåntunajorden uppvisade inte någon tydlig nedåtgående trend för ökad kopparkoncentration vid de undersökta tidpunkterna (figur 6). I juni 2016 fanns det endast signifikanta skillnader i antal *Nitrospira-nxrB* genkopior/g ts för faktorn jordtyp. I september 2016 och oktober 2017 kunde däremot en tydlig minskande trend i *nxrB*-genens abundans ses med ökande kopparkoncentration.

Mönstret i *Nitrospiras nxrB*-gens kvantitet var liknande för den PAH-förorenade jorden, där en nedåtgående trend i abundans sågs i Krusenbergsjorden för ökande PAH-koncentration. Effekten av PAH-behandlingarna på *Nitrospiras* abundans i Nåntunajorden var mer uttalad än i kopparbehandlad jord av samma jordtyp (figur 6).



Figur 6. Låddiagram över logaritmerat antal *Nitrospira-nxrB* genkopior/g ts jord för olika kopparkoncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

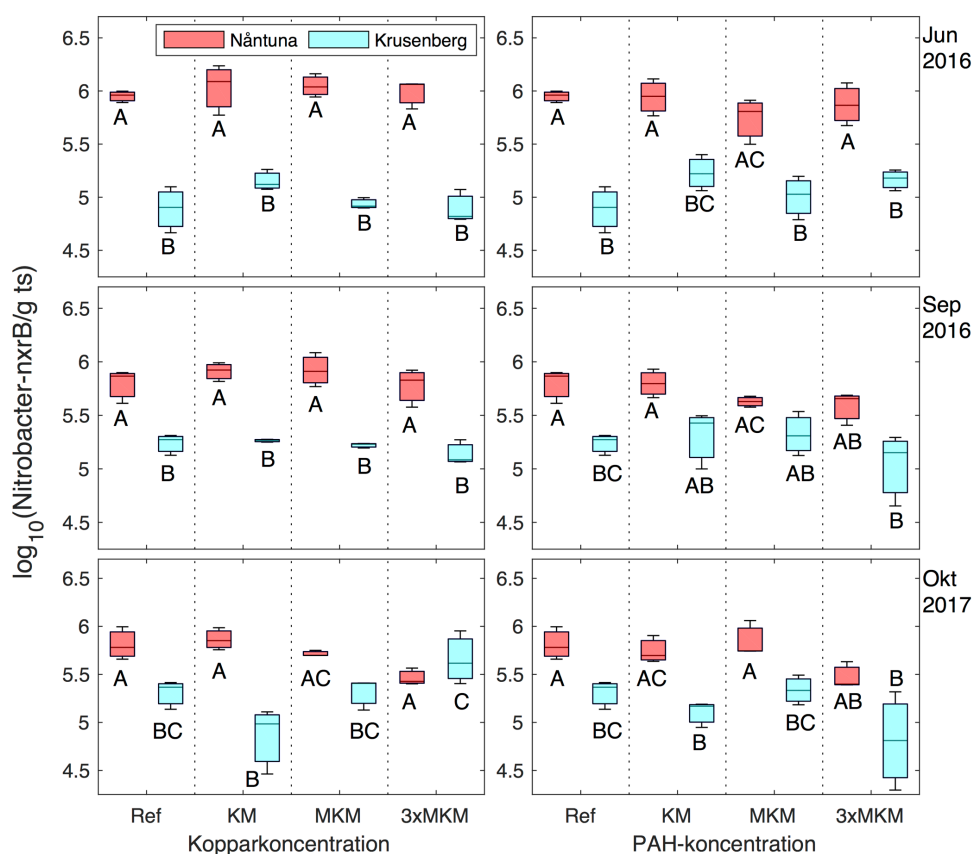
Jordtyp var den enda faktorn som hade signifikant effekt på kvantiteten av *Nitrobacters nxrB*-gen, förutom i oktober 2017 då det även fanns en interaktionseffekt mellan kopparkoncentration och jordtyp (tabell 6). Det höga värdet på PEV indikerade att denna interaktionseffekt var mycket uttalad. PAH-koncentration hade endast en signifikant effekt på kvantiteten av genen för oktober 2017.

Tabell 6. Variansanalys av antal *Nitrobacter-nxrB* genkopior/g ts för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>
Cu ^a	1,59	0,6	-	1,47	0,7	-	0,50	1,9	-
Jord ^b	298,27	92,3	***	171,54	87,9	***	30,10	36,7	***
Cu x jord ^a	0,70	-0,3	-	0,38	-1,0	-	10,26	35,0	***
Inom		7,5			12,4			30,2	
PAH ^a	1,30	0,7	-	1,82	4,1	-	4,56	13,7	*
Jord ^b	104,00	80,8	***	35,49	57,9	***	46,53	58,2	***
PAH x jord ^a	0,87	-0,3	-	0,54	-2,3	-	0,32	-2,6	-
Inom		18,8			40,3			30,7	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01 ≤ P < 0,05 *, 0,001 ≤ P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Varken kopparkoncentration eller PAH-koncentration hade någon tydlig effekt på antalet *Nitrobacter-nxrB* genkopior/g ts (figur 7). De två olika jordtyperna var generellt statistiskt signifikant olika varandra i antalet genkopior. Dock blev jordtyperna allt mer lika varandra med tiden, vilket kan ses genom att låddiagrammen märkts med samma bokstav.



Figur 7. Låddiagram över logaritmerat antal *Nitrobacter-nxrB* genkopior/g ts jord för olika kopparkoncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

5.1.4 Korrelationsanalys mellan olika nitrifierande mikroorganismer

Korrelationsanalys med Kendalls rangkorrelation för att undersöka samvariationen mellan olika geners abundans över tid för alla koncentrationer visade att svaga korrelationer fanns mellan vissa gener i kopparförorenad jord från Nántuna (tabell 7). I kopparförorenad jord från Krusenberg korrelerade endast AOA och *Nitrospira* med varandra, dock var denna korrelation starkare än de i den andra jordtypen. Endast statistiskt signifikanta korrelationer ($P < 0,05$) vid den valda konfidensnivån 95 % ($\alpha = 0,05$) redovisas i tabell 7.

Tabell 7. Signifikanta korrelationer ($P < 0,05$) mellan total abundans (genkopior/g ts) av olika mikroorganismers gener i kopparförorenad jord för alla koncentrationer över tid för respektive jordtyp, antal datapunkter $n=36$ för respektive korrelation

Variabel 1	Variabel 2	Korrelationskoefficient (Kendall's τ)	P-värde
<u>Nántuna</u>			
AOA- <i>amoA</i>	AOB- <i>amoA</i>	0,254	*
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,295	*
AOA- <i>amoA</i>	NB- <i>nxB</i>	0,244	*
<u>Krusenberg</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,511	***

* $0,01 \leq P < 0,05$

** $0,001 \leq P < 0,01$

*** $P < 0,001$

När samvariationer mellan mikroorganismernas kvantitet istället undersöktes för enskilda tidpunkter i kopparförorenad jord för alla koncentrationer var de korrelationerna som var statistiskt signifikanta generellt starkare (tabell 8). I Nántunajorden fanns endast signifikanta korrelationer mellan variabler för den sista tidpunkten. AOA har relativt starka positiva korrelationer med både *Nitrospira* och *Nitrobacter*. I Krusenbergsjorden fanns signifikanta korrelationer för alla tidpunkter.

Tabell 8. Signifikanta resultat av korrelationstest i kopparförorenad jord för alla koncentrationer mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) för de två jordtyperna vid de olika undersökta tidpunkterna, antal datapunkter $n=12$ för respektive korrelation

Variabel 1	Variabel 2	Korrelationskoefficient (Kendall's τ)	P-värde
<u>Nántuna oktober 2017</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,636	**
AOA- <i>amoA</i>	NB- <i>nxB</i>	0,758	**
NS- <i>nxB</i>	NB- <i>nxB</i>	0,515	*
<u>Krusenberg juni 2016</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,697	***
AOA- <i>amoA</i>	NB- <i>nxB</i>	0,457	*
AOB- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,545	*
<u>Krusenberg september 2016</u>			
AOA- <i>amoA</i>	AOB- <i>amoA</i>	0,606	**
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,515	*

AOB- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,485	*
<u>Krusenberg oktober 2017</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,545	*

* $0,01 \leq P < 0,05$

** $0,001 \leq P < 0,01$

*** $P < 0,001$

Samvariationer mellan de olika generna inom en och samma jordtyp över tid för PAH-förorenad jord för alla koncentrationer gav precis som för den kopparförorenade jorden relativt svaga korrelationer (tabell 9).

Tabell 9. Signifikanta korrelationer ($P < 0,05$) mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) i PAH-förorenad jord för alla koncentrationer över tid för respektive jordtyp, antal datapunkter $n=36$ för respektive korrelation

Variabel 1	Variabel 2	Korrelationskoefficient (Kendall's τ)	P-värde
<u>Nåntuna</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,416	***
AOA- <i>amoA</i>	NB- <i>nxB</i>	0,333	**
NS- <i>nxB</i>	NB- <i>nxB</i>	0,283	*
<u>Krusenberg</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,486	***

* $0,01 \leq P < 0,05$

** $0,001 \leq P < 0,01$

*** $P < 0,001$

Samvariationen mellan de olika generna i PAH-förorenad jord för respektive jordtyp för enskilda tidpunkter för alla koncentrationer redovisas i tabell 10. De flesta signifikanta korrelationer var relativt starka.

Tabell 10. Signifikanta resultat av korrelationstest i PAH-förorenad jord för alla koncentrationer mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) för de två jordtyperna vid de olika undersökta tidpunkterna, antal datapunkter n=12 för respektive korrelation

Variabel 1	Variabel 2	Korrelationskoefficient (Kendall's τ)	P-värde
<u>Nåntuna juni 2016</u>			
NS- <i>nxB</i>	NB- <i>nxB</i>	0,455	*
<u>Nåntuna september 2016</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,546	*
NS- <i>nxB</i>	NB- <i>nxB</i>	0,485	*
<u>Nåntuna oktober 2017</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,606	**
AOA- <i>amoA</i>	NB- <i>nxB</i>	0,485	*
NS- <i>nxB</i>	NB- <i>nxB</i>	0,576	**
<u>Krusenberg september 2016</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,788	***
<u>Krusenberg oktober 2017</u>			
AOA- <i>amoA</i>	NS- <i>nxB</i>	0,667	**

* $0,01 \leq P < 0,05$

** $0,001 \leq P < 0,01$

*** $P < 0,001$

5.2 POTENTIELL AMMONIAKOXIDATION (PAO)

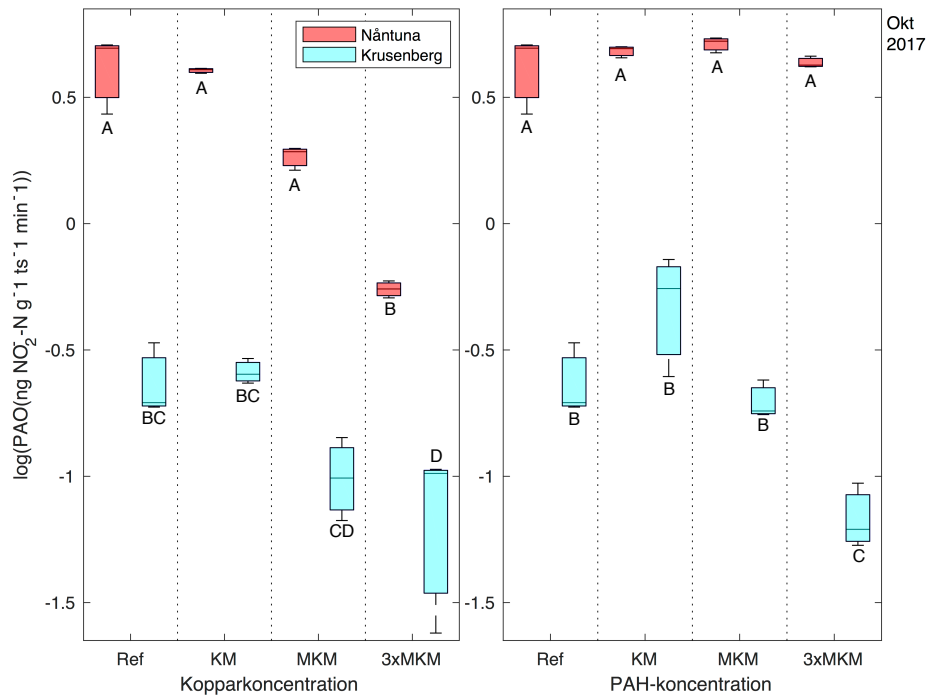
Uppmätt PAO i jord från Nåntuna var i intervallet 0,51-5,43 ng NO₂⁻-N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹ och för jord från Krusenberg 0,02-0,72 ng NO₂⁻-N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹. Jordtyp förklarade den största delen av variationen i PAO för både koppar- och PAH-kontaminerad jord. Ingen signifikant interaktionseffekt förekom mellan faktorerna kopparkoncentration och jordtyp, däremot mellan faktorerna PAH-koncentration och jordtyp. Av de två undersökta föroreningarna hade koppar starkast effekt och förklarade 20 % av den totala variationen av PAO (tabell 11). Andelen variation som förklarades av PAH-koncentration var endast några enstaka procent.

Tabell 11. Variansanalys av potentiell ammoniakoxidation (ng NO₂⁻-N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹) i oktober 2017 för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration respektive jordtyp och PAH-koncentration

Variationsursprung	PEV (%)	F	P-värde
Cu-koncentration ^a	19,4	27,13	***
Jordtyp ^b	74,4	302,08	***
Koncentration x jord ^a	0,3	1,34	-
Inom	5,9		
PAH-koncentration ^a	2,8	9,29	***
Jordtyp ^b	92,6	830,85	***
Koncentration x jord ^a	2,0	6,97	**
Inom	2,7		

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, $0,01 \leq P < 0,05$ *, $0,001 \leq P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, ej signifikant P-värde -

Den potentiella ammoniakoxidationen var signifikant lägre vid den högsta kopparkoncentrationen 3xMKM i Nántunajorden (figur 8). Post hoc-testets resultat visade däremot att PAO inte skiljde sig signifikant åt för de lägre koncentrationerna inom samma jordtyp. För kopparförorenad jord från Krusenberg var PAO signifikant lägre vid den högsta koncentrationen än i referens och i vid koncentrationen KM. I den PAH-förorenade jorden skiljde sig inte PAO i Nántunajorden signifikant för de olika koncentrationerna. För Krusbergsjorden var PAO i vid den högsta PAH-koncentrationen signifikant lägre än vid de andra undersökta koncentrationerna.



Figur 8. Potentiell ammoniakoxidation, PAO ($\text{ng NO}_2^- \text{-N g}^{-1} \text{ ts}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i kopparförorenad respektive PAH-förorenad jord från Nántuna och Krusenberg i oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

5.3 KORRELATIONSANALYS MELLAN ANTALET GENER OCH PAO

Genomförda korrelationstester antyder att minskningen i PAO i båda jordtyper för den kopparförorenade jorden samt för den PAH-förorenade Krusbergsjorden var kopplad till en minskad abundans av en specifik grupp av mikroorganismer. I den kopparförorenade jorden fanns en relativt stark positiv korrelation mellan AOA:s *amoA*-gen och PAO i båda jordtyperna. I Nántunajorden fanns även en stark korrelation mellan *Nitrobacters nxrB*-gen och PAO, men i jord från Krusenberg korrelerade istället *Nitrospira nxrB*-gen med PAO (tabell 12).

Det fanns inga statistiskt signifikanta korrelationer mellan mikroorganismernas gener och PAO för PAH-förorenad jord från Nántuna (tabell 12). I jord från Krusenberg fanns relativt starka positiva korrelationer mellan AOA:s *amoA*-gen och PAO samt mellan *Nitrospiras nxrB*-gen och PAO.

Tabell 12. Korrelationer mellan antalet gener (genkopior/g ts) och potentiell ammoniakoxidation, PAO (ng NO₂⁻-N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹) i kopparförorenad respektive PAH-förorenad jord över alla koncentrationer i oktober 2017 från Nântuna respektive Krusenberg, antal datapunkter n=12 för respektive korrelation

Variabel 1	Variabel 2	Korrelationskoefficient (Kendall's τ)	P-värde
<u>Kopparförorenad jord Nântuna</u>			
AOA- <i>amoA</i>	PAO	0,667	**
NB- <i>nxB</i>	PAO	0,788	***
<u>Kopparförorenad jord Krusenberg</u>			
AOA- <i>amoA</i>	PAO	0,485	*
NS- <i>nxB</i>	PAO	0,576	**
<u>PAH-förorenad jord Krusenberg</u>			
AOA- <i>amoA</i>	PAO	0,697	***
NS- <i>nxB</i>	PAO	0,545	*

*0,01 ≤ P < 0,05

**0,001 ≤ P < 0,01

***P < 0,001

6 DISKUSSION

6.1 NITRIFIERANDE MIKROORGANISMERS GENETISKA POTENTIAL

6.1.1 Mikroorganismernas kvantitet

AOA:s högre abundans än AOB i de oförorenade referensjordarna stämmer väl överens med många studiers resultat där AOA visats vara dominerande över AOB i många miljöer (Ward, 2013). Leininger et al. (2006) undersökte ammoniakoxiderande mikroorganismers abundans i ett antal jordar med varierande egenskaper i Europa. Ett antal av jordarna var precis som Nântunajorden klassificerade som sandy loam (def. USDA), men pH-värdet i dessa var lägre. I de undersökta jordar var AOA:s abundans mycket högre än AOB:s. I referensjorden från Nântuna var dock denna skillnad mellan AOA och AOB inte lika uttalad. Orsaken till detta kan tänkas vara det högre pH-värdet i Nântunajorden som gör att det finns god tillgång till ammoniak, den oprotomerade formen av substratet ammonium som AOB förmodas använda. För den sura sandjorden från Krusenberg var AOB:s abundans oväntat hög med avseende på det låga pH-värdet. Dock var AOB:s abundans i Leininger et al. (2006) studie i stort sett lika hög som AOA:s för odlingsbar gräsmark med pH 5,5 (H₂O). Den högre abundansen av *Nitrospira* jämfört med *Nitrobacter* i referensjordarna kan eventuellt bero på att tillgången på substrat var låg. Simonin et al. (2015) observerade att *Nitrospiras* abundans var högre än *Nitrobacters* i jord med låg halt tillgängligt substrat.

Jordtyp var den faktor som hade störst inverkan på abundansen av de olika undersökta funktionella grupperna för både koppar- och PAH-behandlad jord. Detta sågs särskilt tydligt hos AOA och *Nitrospira*. Jordtyp hade således en väldigt stark inverkan på abundans i både oförorenad och förorenad jord. Den generellt starkare effekten av koppar på AOA:s och *Nitrospiras* abundans i jord från Krusenberg än från Nântuna kan tänkas bero på att biotillgängligheten för föroreningarna var större i Krusenbergsjorden, då biotillgängligheten ökar med minskande pH-värde (Naturvårdsverket, 2006b). AOA:s och *Nitrospiras* varierande abundans i de två jordtyperna för PAH-förorenad jord kan inte förklaras av TOC-halt, utan andra egenskaper hos jordarna har medfört skillnader i abundans. Ifall TOC-halten i Krusenbergsjorden hade varit avsevärt lägre än i Nântunajorden skulle det ha kunnat resultera i en större biotillgänglighet av PAH:er. Vid provtagning ute i fält är jordtypens inverkan på mikroorganismernas abundans således viktigt att ha i beaktande. Effekten av föroreningar skulle kunna döljas av de skillnader i jordtyp som finns på olika provtagningsplatser samt att jordtypen i sig kan påverka biotillgängligheten. Detta kan göra det svårt att avgöra föroreningars påverkan på nitrifierande samhällens abundans när lämpliga referensprov med samma jordegenskaper saknas.

Statistiskt signifikanta skillnader i abundans kunde generellt bara ses vid de högsta undersökta föroreningshalterna i jord från de två sista provtagningarna. Detta indikerar att lägre halter av koppar och PAH inte hade några stora effekter på de undersökta nitrifierande mikroorganismernas kvantitet. Dock tycks effekten av de undersökta föroreningarna på AOA:s och *Nitrospiras* abundans generellt öka med tiden baserat på PEV-värden för koppar och PAH (tabell 3 och 5). Det skulle ha varit intressant att undersöka mikroorganismernas abundans i jorden efter längre tid än de 16 månader som experimentet pågick för att se om effekten blir större med tiden samt om abundansen även minskar signifikant för de lägre föroreningsgraderna. Det var en aning förvånande att ingen minskade eller ökande abundans av AOB kunde ses med tiden för någon av jordtyperna då AOB visat sig vara känsligare än AOA för koppar i många olika naturmiljöer (He et al., 2018; Subrahmanyam et al., 2014). De applicerade doserna av

koppar är möjligen inte tillräckligt stora för att ge en statistiskt signifikant påverkan på dessa mikroorganismers abundans vid de miljöförhållanden som existerat under experimenttiden. Detta kan dessutom tyda på att AOB:s abundans i jord är en olämplig indikator för att bedöma förlust av markfunktionen nitrifikation, vilket gör att den kanske inte lämpar sig att använda vid ekologisk riskbedömning.

Det var även oväntat att AOB inte heller uppvisade någon ökande eller minskande abundans med tiden i PAH-förorenad jord. AOB har tidigare visat sig förekomma i stabila populationer i jord som under lång tid använts för nedbrytning av olja med hjälp av mikroorganismer, s.k. landfarming (Kurola et al., 2005). Den PAH-förorenade jorden från impregneringsanläggningen i Nässjö som blandats med ren jord för att uppnå olika föroreningsgrader i experimentet har även den varit förorenad under lång tid. Dock uppgår andelen spikjord från Nässjö maximalt till 2 % och ökad tolerans enbart hos AOB-populationer i denna skulle antagligen inte ge erhållet resultat av kvantifieringen. AOB-populationer i jorden från provplatserna är därmed förmodligen toleranta mot PAH samt koppar under rådande miljöförhållanden. Det kan eventuellt även tänkas bero på inaktivitet, då AOB som tidigare nämnt tros kunna överleva perioder av inaktivitet (Kowalchuk & Stephen, 2001).

Precis som för AOB syntes ingen tydlig ökande eller minskande trend i *Nitrobacters* abundans med ökande föroreningsgrad. I kopparförorenad jord kunde ingen skillnad i abundans mellan olika behandlingar förklaras av föroreningsgrad. Detta kan tyda på att *Nitrobacter* var toleranta vid de kopparhalter som de exponerades för. Som nämnt i teoriavsnittet har *Nitrobacter* och AOB liknande metabolism och *Nitrobacter* har dessutom i slam visat sig vara mer toleranta än AOB mot kopparexponering (Ward, 2013; Ouyang et al., 2016). *Nitrobacters* abundans verkar följaktligen vara en mindre lämplig indikator vid ekologisk riskbedömning.

6.1.2 Nitrifierande mikroorganismers samvariation

Resultatet av genomförda korrelationstester för de två jordtyperna över tid gav generellt svagare och färre statistiskt signifikanta korrelationer än när korrelationsanalys gjordes separat för varje tidpunkt. Detta indikerar att samvariationen mellan de olika nitrifierande mikroorganismerna varierar över tid. En tänkbar orsak till detta är att vissa mikroorganismers abundans minskar avsevärt med tiden i förorenad jord samtidigt som andras abundans är relativt oförändrad. Även säsongsmässiga effekter kan tänkas inverka så att korrelationstest som görs för alla tidpunkter samtidigt blir svagare. Påverkan på nitrifierande mikroorganismers abundans har tidigare setts variera med säsong. Berg & Rosswall (1987) konstaterade att ammoniumoxiderande mikroorganismers abundans och aktivitet i jordbruksmark var som högst under vår och höst. I en annan studie som undersökte abundans och sammansättning hos AOA och AOB i torvjord samt lustgasemissioner förekom säsongsmässiga variationer i abundans endast för AOB vars abundans var som störst under varma perioder (Andert et al., 2011). Dock ter sig kvantiteten av de olika undersökta generna i experimentet vara relativt oförändrad över tid i referensjordarna, vilket indikerar att säsongsmässiga variationer hade en liten inverkan på de olika genernas abundans.

Generellt fanns för båda jordtyper och föroreningar en måttligt stark positiv korrelation mellan AOA:s *amoA*-gen och *Nitrospiras nxB*-gen vid alla undersökta tidpunkter. Denna korrelation är starkare än den mellan AOA och *Nitrobacter* för de olika jordarna och föroreningarna, undantaget kopparförorenad jord från Nantuna i oktober 2017 där

korrelationen mellan AOA och *Nitrobacter* är en aning starkare. Flera studier som undersökt nitrifierande mikroorganismers abundans och korrelation visar på att AOA:s och *Nitrospiras* abundans samt AOB:s och *Nitrobacters* abundans korrelerar positivt i olika miljöer (Meng, 2016; Simonin et al., 2015; Stempfhuber et al., 2016). I de undersökta jordarna fanns dock ingen korrelation mellan AOB och *Nitrobacter* vid någon tidpunkt.

6.1.3 Mätosäkerheter vid qPCR

Spridningen i antal genkopior mellan biologiska replikat inom samma behandling varierade. Vid kvantifiering av AOB:s *amoA*-gen samt *Nitrobacters nxB*-gen var spridningen mellan biologiska replikat jämförelsevis stor. Tänkbara orsaker till detta kan exempelvis vara naturlig variation, variation uppkommen på grund av att den lokala miljön i de olika lysimeterrören skiljer sig och mätfel. Under kvantifieringen gjordes två tekniska replikat för varje jordprov. Dessa replikat analyserades oberoende av varandra i olika PCR-körningar och ny reaktionsmixen framställdes inför varje körning. Skillnaden när de tekniska replikatens detekterades under PCR-körningarna var mindre än 0,8 värmecykler. Detta indikerar att de stora skillnaderna mellan vissa biologiska replikat ej uppkommit till följd av mätfel vid genomförd qPCR. Det ska emellertid påpekas att alla DNA-extrakt som användes till qPCR var utspädda till en viss målkoncentration av dubbelsträngat DNA. För att kunna göra dessa utspädningar har koncentrationen av DNA mätts. Dessa två moment kan ha introducerat vissa felaktigheter. Dock är det mindre troligt att detta har haft en stor inverkan på kvantifieringens resultat då variationen mellan de biologiska replikaten var mindre för AOA:s *amoA*-gen och *Nitrospiras nxB*-gen trots att samma utspädda DNA-extrakt använts vid analyserna. Även genomfört inhibitionstest där de olika DNA-extrakten detekterades vid ungefär samma värmecykel i PCR-programmet indikerade att proverna hade relativt lika koncentration av dubbelsträngat DNA samt att eventuella inhiberande ämnen i extrakten var i tillräckligt låga koncentrationer.

6.2 NITRIFIERANDE SAMHÄLLENS FUNKTIONELLA POTENTIAL

I likhet med abundansdata hade jordtyp en stor effekt på den potentiella aktiviteten hos de nitrifierande mikroorganismerna. Stenberg et al. (1998) erhöll varierande PAO för olika jordar, med generellt lägre PAO för jordar innehållandes låg andel ler och högre PAO för jordar innehållandes hög andel ler och neutralt pH. Studiens resultat för olika jordtyper visar därmed på liknande mönster som erhöles i detta arbete för referensjordarna. En statistisk signifikant minskning av PAO sågs generellt endast för den högsta eller näst högsta föroreningsgraden, vilket tyder på att de nitrifierande mikroorganismernas funktion inte påverkades nämnvärt vid de lägre föroreningsgraderna. Det är anmärkningsvärt att PAO inte sjönk för den PAH-förorenade Nantunajorden trots att AOA minskade i kvantitet. Ingen korrelation med AOB hittades, men detta kan eventuellt tänkas bero på en stor naturlig variation i AOB:s abundans. En annan tänkbar teori är att heterotrofa nitrifierare kan ha bidragit till nitrifikationsprocessen, precis som Ward (2013) beskriver tros kunna ske när autotrofa nitrifierare är hämmade. Minskningen av AOA:s abundans kan eventuellt även vara för liten för att ge någon statistisk signifikant minskning av PAO.

6.2.1 Mätosäkerheter och antaganden vid aktivitetsmätningar

Aktivitetsmätningarna gjordes på jord som varit nedfryst till -20 °C i cirka 6 månader, men frysförvaringen har troligen inte haft någon effekt på aktiviteten. Stenberg et al. (1998) undersökte hur aktiviteten hos mikroorganismer påverkas i jord som varit nedfryst

till -20 °C respektive lagring vid -2 °C i jämförelse med färsk jord. Enligt studien påverkades den potentiella ammoniakoxidationen lite eller inget alls i de undersökta jordarna som varit nedfrysta i mer än ett år. Vid mätning av aktivitet i de olika jordproven blev standardavvikelsen för de tre biologiska replikaten generellt större i jord från Krusenberg än i Nåntunajorden. Uppmätta koncentrationer var över detektionsgränsen, men det kan inte uteslutas att den större standardavvikelsen beror på minskad precision i mätningar vid låga koncentrationer. Det kan även vara pipetteringen av provtagningsvätskan som vid låga nitrithalter inte är tillräckligt noggrann.

Metoden för aktivitetsmätning syftar till att mäta högsta möjliga aktivitet hos de ammoniakoxiderande mikroorganismerna vid optimala förhållanden vid pH 7,2. Vid tillämpning av metoden skakas jord med substratvätska som har ett pH-värde runt 7,2 samt buffrande egenskaper. Ett grundläggande antagande som görs är att alla ammoniakoxiderande mikroorganismer har sitt optimum vid ett neutralt pH. Flera studier antyder att aktiviteten hos nitrifierare i sur jord kan underskattas med metoden. Andra saker som kan vara problematiskt med metoden är att AOB ofta gynnas vid tillsats av oorganiskt ammonium samt att mängden tillsatt ammonium misstänks kunna hämma AOA som generellt föredrar låga halter (Li et al., 2018). Dock var tillsatt mängd ammonium i den här studien (ISO 15685) förhållandevis låg. Det som därmed främst misstänks kunna ha gett missvisande resultat är användningen av substratvätska med neutralt pH-värde till den sura Krusenbergsjorden.

6.3 TILLÄMPBARHET VID RISKBEDÖMNING AV FÖRORENAD MARK

De nitrifierande mikroorganismerna som visade störst genetisk potential som indikatorer för att avgöra föroreningars påverkan på markens funktion var AOA och *Nitrospira*. Dock bör kvantifieringen av dessa kombineras med aktivitetsmätningar då mikroorganismernas abundans endast indikerar den genetiska potentialen, vilket inte ger en fullständig bild av deras funktionella förmåga. Visserligen korrelerade vissa mikroorganismer abundans med PAO, men utan aktivitetsmätningar kan det endast anas vilka nitrifierares ändrade abundans som är kopplade till minskad ammoniakoxidation.

Båda undersökta angreppssätt är relativt enkla att tillämpa. Dock är aktivitetsmätningarna tidskrävande och nitrithalten i proven måste analyseras inom ett dygn eftersom nitrit är instabilt. Utöver detta misstänks resultatet kunna bli missvisande för sura jordar, vilket gör att nuvarande standardiserade metod är olämplig om information om den faktiska funktionen i marken ska tas fram till en ekologisk riskbedömning. Användning av en metod där det tas hänsyn till pH-värde i marken är inte standardiserad och mindre lätt att tillämpa. Fördelen med att undersöka den genetiska potentialen är att metoden är densamma oavsett jordtyp. En stor utmaning med båda metoderna inför en eventuell tillämpning i ekologisk riskbedömning är den stora inverkan som jordtyp har på både abundans och aktivitet hos mikroorganismerna, vilket kan försvåra möjligheten att dra slutsatser om föroreningarnas påverkan.

6.4 FÖRSLAG TILL VIDARE ARBETE

Inom projektets tidsram fanns inte tid att kvantifiera de *Nitrospira* som är kapabla till att utföra alla oxidationssteg i nitrifikationsprocessen, comammox. Kvantifiering av dessa mikroorganismer i referensjord och förorenad jord skulle ge en mer fullständig bild över effekter på den genetiska potentialen för nitrifikationen. Det skulle även vara relevant att utföra aktivitetsmätningar på jord från olika säsonger samt provtagning av jord under längre tid för att se om mikroorganismernas abundans ändras efter ytterligare tid.

Eftersom mikroorganismernas aktivitet i sura jordar misstänks kunna bli missvisande vid använd standardiserad metod för aktivitetsmätning kan det vara relevant att undersöka om en alternativ metod är lämpligare. En jämförande studie skulle kunna göras där aktivitetsmätningar utförs med substratvätska som har samma pH-värde som marken samt med den använda standardiserade metoden. Därtill finns ett behov av att studera påverkan på mikroorganismers kvantitet och aktivitet i jord med en mer komplex föroreningsproblematik.

7 SLUTSATSER

- Det mikrobiella nitrifierande samhällets storlek minskade med ökande föroreningsgrad av koppar respektive PAH. Denna minskning av storlek var kopplad till minskad abundans av AOA och det nitritoxiderande bakteriesläktet *Nitrospira*.
- Inget tydligt mönster kunde uttydas i AOB:s och *Nitrobacters* abundans med ökad föroreningsgrad av koppar respektive PAH. Abundansen av dessa mikroorganismerna förefaller vara opåverkad i jordtyperna vid de miljöförhållanden som funnits under experimenttiden.
- Effekten av både koppar och PAH på mikroorganismernas abundans blev generellt mer påtaglig över tid, särskilt tydligt var detta för AOA och *Nitrospira*.
- Effekten av föroreningarna var generellt mer uttalad i den sura Krusenbergsjorden (sand) än i den svagt basiska Nântunajorden (sandy loam) med högre kol- och kvävehalt. AOA:s abundans minskade med ökad föroreningsgrad för båda undersökta jordtyper. *Nitrospiras* abundans minskade enbart för en av jordtyperna (sand).
- Funktionen hos det nitrifierande samhället mätt i form av potentiell ammoniakoxidation visade på en funktionsförlust i kopparförorenad jord med ökande föroreningsgrad för båda jordtyper. I den svagt basiska Nântunajorden korrelerade funktionsförlusten positivt med AOA:s och *Nitrobacters* abundans och i den sura Krusenbergsjorden korrelerade funktionsförlusten positivt med AOA:s och *Nitrospiras* abundans.
- För PAH-förorenad jord sågs enbart en funktionsförlust för Krusenbergsjorden vid den högsta föroreningsgraden, vilken korrelerade positivt med AOA:s och *Nitrospiras* abundans.

8 REFERENSER

Andert, J., Wessén, E., Börjesson, G. & Hallin, S. (2011). Temporal changes in abundance and composition of ammonia-oxidizing bacterial and archaeal communities in a drained peat soil in relation to N₂O emissions. *Journal of Soils and Sediment*, 11, ss. 1399-1407.

Arp, H.P.H, Lundstedt, S., Josefsson, S., Cornelissen, G., Enell, A., Allard A.S. & Berggren Kleja, D. (2014). Native Oxy-PAHs, N-PACs, and PAHs in Historically Contaminated Soils from Sweden, Belgium, and France: Their Soil-Porewater Partitioning Behavior, Bioaccumulation in *Enchytraeus crypticus*, and Bioavailability. *Environmental Science & Technology*, 48, ss. 11187–11195.

Back, P.E., Enell, A., Fransson, M., Hermansson, S., Rosén, L., Volchko, Y., Wiberg, K. & Åberg, A. (2016), *Markmiljöns skyddsvärde. En härledning med utgångspunkt i miljöetik och lagstiftning*, SGI Publikation 27, Statens geotekniska institut, Linköping.

Beebee, T.JC. & Rowe, G. (2004). *An introduction to molecular ecology*, 1 uppl. Oxford: Oxford University Press.

Berg, P. & Rosswall, T. (1987). Seasonal variations in abundance and activity of nitrifiers in four arable cropping systems. *Microbial Ecology*, 13(1), ss. 75-87.

Bio-Rad (u.å.). *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System*. Tillgänglig: <https://www.bio-rad.com/en-se/product/cfx-connect-real-time-pcr-detection-system?ID=LN5TFG15> [2018-06-20]

Brandt, K.K., Holm, P.E. & Nybroe, O. (2008). Evidence for Bioavailable Copper-Dissolved Organic Matter Complexes and Transiently Increased Copper Bioavailability in Manure-Amended Soils as Determined by Bioluminescent Bacterial Biosensors. *Environmental Science & Technology*, 42, ss. 3102–3108.

Cardoso, E.J.B.N., Vasconcellos, R.L.F., Bini, D., Miyauchi, M.Y.H., dos Santos, C.A., Alves, P.R.L.A., de Paula, A.M., Nakatani, A.S., de Moraes Pereira, J. & Nogueira, M.A. (2013). Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola*, 70(4), ss. 274-289.

Cheng, J., Song, J., Ding, C., Li, X. & Wang, X. (2014). Ecotoxicity of Benzo(a)pyrene assessed by soil microbial indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9), ss. 1930-1936.

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H. & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528, ss. 504-509.

Daims, H., Lücker, S. & Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), ss. 699-711. Elsevier.

- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke M. & Stahl, D.A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol, *Environmental Microbiology*, 10(1), ss. 810-818.
- Deni, J. & Penninckx, M.J. (1999). Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), ss. 4008-4013.
- Di, H.J., Cameron, K.C., Shen, J.P., Winefield, C.S., O'Callaghan, M., Bowatte, S. & He, J.Z. (2010). Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 72, ss. 386-394.
- EPA (1996). *Method 3540C – Soxhlet extraction*. Tillgänglig: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3540c.pdf> [2018-06-28]
- Eriksson, J., Dahlin, S., Nilsson, I. & Simonsson, M. (2011). *Marklära*. 1 uppl. Lund: Studentlitteratur.
- Fait, G., Broos, Zrna, S., Lombi, E. & Hamon, R. (2006). Tolerance of nitrifying bacteria to copper and nickel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8), ss. 2000-2005.
- Foss (2008). *Determination of nitrite in water by FIAstar 5000*, Application Note 5200, Rev 2, Hillerød: Foss.
- Gao, Y., Xiong, W., Ling, W. & Xu, J. (2006). Sorption of phenanthrene by soils contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 65, ss. 1355-1361.
- Gotelli, N.J. & Ellison, A.M. (2004). *A Primer of Ecological Statistics*. 1 uppl. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Griffiths, B.S. & Philippot, L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbial reviews*, 37, ss. 112-129.
- Gubry-Rangin, C., Novotnik, B., Mandič-Mulec, I., Nicol, G.W. & Prosser, J.I. (2017). Temperature responses of soil ammonia-oxidising archaea depend on pH. *Soil Biology & Biochemistry*, 106, ss. 61-68.
- Hatfield, J.L., Sauer, T.J. & Cruse, R.M. (2017). Soil: The Forgotten Piece of the Water Food, Energy Nexus, *Advances in Agronomy*, 143, ss.1-46.
- He, H., Liu, H., Shen, T., Wei, S., Dai, J. & Wang, R. (2018). Influence of Cu application on ammonia oxidizers in fluvo-aquic soil. *Geoderma*, 321(2018), ss. 141-150.
- Hu, H.W. & He, J.Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17, ss. 2709-2717.
- Hund-Rinke, K. & Simon, M. (2008). Bioavailability assessment of contaminants in soils via respiration and nitrification tests. *Environmental Pollution*, 153, ss. 468-475.

- Jacobsen, C.S. & Hjelmsø, M.H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, ss. 15-20.
- Jia, Z & Conrad, R. (2009). *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11(7), ss. 1658-1671.
- Kavamura, V.N. & Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28, ss. 61-69.
- Klimkowicz-Pawlas, A. & Maliszewska-Kordybach, B. (2010). Nitrification potential as indicator of PAHs ecotoxicity in freshly contaminated soils. Example of phenanthrene and pyrene. *Ecological Chemistry and Engineering*, 17(8), ss. 943-957.
- Kowalchuk, G.A. & Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55, ss. 485-529.
- Kuperman, R.G. & Carreiro, M.M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem, *Soil Biology and Biochemistry*, 29, ss. 179-190.
- Kurola, J., Salkinoja-Salonen, M., Aarnio, T., Hultman, J. & Romantschuk, M. (2005). Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *FEMS Microbiology Letters*, 250, ss. 33-38.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B & Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, ss. 543-546.
- Leininger, S., Urich, U., 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, ss.806-809.
- Li, J., Zheng, Y.M., Liu, Y.R., Ma, Y.B., Hu, H.W. & He, J.Z. (2014). Initial Copper Stress Strengthens the Resistance of Soil Microorganisms to a Subsequent Copper Stress. *Microbial Ecology*, 67, ss. 931-941.
- Li, Y., Chapman, S.J., Nicol, G.W. & Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, ss. 290-301.
- Liang, X., Zhu, L. & Zhuang, S. (2016). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soils enhanced by heavy metals: perspective of molecular interactions. *Journal of Soils and Sediment*, 16, ss. 1509-1518.
- Lindgren, J.F., Hassellöv, I-M., Landquist, H. & Dahllöf, I. (2015). Low concentrations of PAHs induce tolerance in nitrifying bacteria. *Marine Science*, 2, artikel 35.

Lundstedt, S., Bandowe, B.A.M., Wilcke, W., Boll, E., Christensen, J.H., Vila, J., Grifoll, M., Faure, P., Biache, C., Lorgeoux, C., Larsson, M., Frech Irgum, K., Ivarsson, P. & Ricci, M. (2014). First intercomparison study on the analysis of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (oxy-PAHs) and nitrogen heterocyclic polycyclic aromatic compounds (N-PACs) in contaminated soil. *Trends in Analytical Chemistry*, 57, ss. 83–92.

Maderova, L., Watsen, M. & Paton, G.I. (2011). Bioavailability and toxicity of copper in soils: Integrating chemical approaches with responses of microbial biosensors. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, ss. 1162- 1168.

Matlock, B. (2015). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. [Produktblad]. Wilmington: Thermo Scientific. Tillgänglig:
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> [2018-05-17]

Meng, Y. (2016). *Nitrite oxidising bacteria in soil: examination of the interactions with ammonia oxidisers and the influence of pH on their diversity and distribution*. Diss., Aberdeen: University of Aberdeen.

Miljödepartementet (2012). *Svenska miljömål – preciseringar av miljö kvalitetsmålen och en första uppsättning etappmål*. [Broschyr], Departementsserien 2012:23. Stockholm: Miljödepartementet. Tillgänglig:
<http://www.regeringen.se/contentassets/1941c045c62d446c9ed4392bfaf80130/svenska-miljomal---preciseringar-av-miljokvalitetsmalen-och-en-forsta-uppsattning-etappmal-ds-201223>

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Fornasier, F., Moscatelli, M.C. & Marinari, S. (2012). Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils*, 48, ss. 743-762.

Naturvårdsverket (2006a). *Förbättrade miljöriskbedömningar*. Rapport 5538. ISBN 91-620-5538-0.

Naturvårdsverket (2006b). *Metallers mobilitet i marken*. Rapport 5536. ISBN 91-620-5536-4.

Naturvårdsverket (2009). *Riktvärden för förorenad mark – Modellbeskrivning och vägledning*. Rapport 5976. ISBN 978-91-620-5976-7.

Naturvårdsverket (2018). *De flesta förorenade områdena är kända*. Tillgänglig:
<http://www.naturvardsverket.se/Sa-mar-miljon/Mark/Fororenade-omraden/> [2018-03-02]

Nationalencyklopedin (u.å-a), *Kväve*. Tillgänglig:
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/kvave> [2018-02-22]

Nationalencyklopedin (u.å-b), *Calvincykeln*. Tillgänglig:
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/calvincykeln> [2018-02-23]

Nowka, B., Daims, H. & Spieck, E. (2015). Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), ss. 745-753.

Ouyang, F., Zhai, H., Ji, M., Zhang, H. & Dong, Z. (2016). Physiological and transcriptional responses of nitrifying bacteria exposed to copper in activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 301, ss. 172–178.

Ouyang, Y., Norton, J.M. & Stark, J.M. (2017). Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 113, ss. 161-172.

Parmar, T.K., Rawtani, D. & Agrawal, Y.K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9, ss. 110-118.

Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngröft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A. & Wagner, M. (2012). amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 14(2), ss. 525-539.

Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E. & Loy, A. (2014). *NxrB* encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. *Environmental Microbiology*, 16, ss. 3055-3071.

Primrose, S.B. & Twyman, R.M. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 7. uppl. Malden: Blackwell Publishing.

Prosser, J.I. & Nicol, G.W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in microbiology*, 20(11), ss. 523-531.

Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. & Liesack, W. (1997). The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), ss. 4704-4712.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning; a laboratory manual*. 3 uppl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schloter, M., Dilly, O. & Munch, J.C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, ss. 255-262

Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S.J. & van Elsas, J.D. (2018) Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54, ss.1-10.

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. (2001). Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), ss. 4215-4224.

- Simonin, M., Le Roux, X., Poly, F., Lerondelle, C., Hungate, B.A., Nunan, N. & Niboyet, A. (2015). Coupling Between and Among Ammonia Oxidizers and Nitrite Oxidizers in Grassland Mesocosms Submitted to Elevated CO₂ and Nitrogen Supply. *Microbial Ecology*, 70, ss. 809-818.
- Sivakumar, S. (2015). Effects of metals on earthworm life cycles: a review, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(8), artikel 530.
- Stahl, D.A. & de la Torre, J.R. (2012). Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66, ss. 83-101.
- Stein, L.Y. & Klotz, M.G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 2016(26), ss. 94-98.
- Stempfhuber, B., Richter-Heitmann, T., Regan, K.M., Kölbl, A., Wüst, P.K., Marhan, S., Sikorski, J., Overmann, J., Friedrich, M.W., Kandeler, E. & Schloter, M. (2016). Spatial Interaction of Archaeal Ammonia-Oxidizers and Nitrite-Oxidizing Bacteria in an Unfertilized Grassland Soil, *Frontiers in Microbiology*, 6, artikel 1567.
- Stenberg, B., Johansson, M., Pell, M., Sjö Dahl-Svensson, K., Stenström, J. & Torstensson, L. (1998). Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(3), ss. 393–402.
- Sterner, O. (2010). *Förgiftningar och miljöhot*. 2. uppl. Lund: Studentlitteratur.
- Subrahmanyam, G., Hu, H.W., Zheng, Y.M., Archana, G., He, J.Z. & Liu, Y-R. (2014). Response of ammonia oxidizing microbes to the stresses of arsenic and copper in two acidic alfisols. *Applied Soil Ecology*, 77, ss. 59–67.
- Svenskt vatten (2017). *Bakterier och alger*. Tillgänglig: <http://www.svensktvatten.se/vattentjanster/dricksvatten/riskanalys-och-provtagning/mikroorganismer-i-vatten/bakterier-och-alger/> [2018-03-18]
- Sverdrup, L.E., Ekelund, F., Krogh, P.H., Nielsen, T. & Johnsen, K. (2002). Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(8), ss. 1644–1650.
- Tao, S., Xu, F., Liu, W., Cui, Y. & Coveney, R.M. (2006). A Chemical Extraction Method for Mimicking Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Wheat Grown in Soils Containing Various Amounts of Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 40, ss. 2219-2224.
- Taylor, A.E., Giguere, A.G., Zobelein, C.M., Myrold, D.D. & Bottomley, P.J. (2017). Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria. *The ISME Journal*, 11, ss. 896-908.

Thermo Fisher Scientific (u.å.). *Poor Efficiency of PCR*. Tillgänglig: <https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html> [2018-05-18]

Thermo Fisher Scientific (2010). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*. [Produktblad]. Wilmington: Thermo Scientific. Tillgänglig: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf> [2018-06-20]

Thermo Fisher Scientific (2016). *Comparison of Quant-iT and Qubit DNA quantitation assays for accuracy and precision*. [Produktblad]. Wilmington: Thermo Scientific. Tillgänglig: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/comparison-quantit-qubit-dna-quantitation-app-note.pdf> [2018-06-20]

van Elsas, J.D. & Boersma, F.G.H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47, ss. 77-87.

van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M. & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 28, ss. 555-559.

Vanparys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. & De Vos, P. (2007). The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, ss. 297-308.

Verhamme, D.T, Prosser, J.I. & Nicol, G.W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME Journal*, 5, ss. 1067-1071.

Wang, Y.P., Shi, J.Y., Wang, H., Lin, Q., Chen, X.C. & Chen Y.X. (2007). The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, ss. 75–81.

Ward, B.B. (2013). Nitrification. In *Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7

Wyszkowska, J., Borowik, A., Kucharski, M. & Kucharski, J. (2013). Effect of cadmium, copper and zinc on plants, soil microorganisms and soil enzymes. *Elementology*, 18, ss. 769-796.

Yang, Y., Zhang, N., Xue, M. & Tao, S. (2010). Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environmental Pollution*, 158, ss. 2170-2174.

Yu, L., Duan, L., Naidu, R. & Semple, K.T. (2018). Abiotic factors controlling bioavailability and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: Putting together a bigger picture. *Science of the Total Environment*, 2018, ss. 1140-1153.

BILAGA A – Reagensmixer vid qPCR

I tabell 13 visas reaktionsmixen som användes för kontroll av inhibering i de utspädda DNA-extrakten. De negativa kontrollerna bestod av en kontroll med sterilt vatten samt av sju NTC-kontroller (No Template DNA). I NTC-kontrollerna tillsattes Lambda-DNA. I varje brunn tillsattes 2 µl DNA, Lambda-DNA eller sterilt vatten samt 18 µl reaktionsmix. BSA (bovint serumalbumin) användes för att förstärka amplifieringen av DNA. Primern T7 har DNA-sekvensen TAATACGACTCACTATAGGG och primern SP6 har DNA-sekvensen ATTTAGGTGACACTATAG (Sambrook & Russell, 2001).

Tabell 13. Reagenser som använts till reaktionsmixen för inhibitionstestet, volym av reagenserna per reaktion (rx) och slutgiltig reagenskoncentration när reaktionsmixen blandats med DNA-extrakt, Lambda-DNA eller sterilt vatten

Reagens	Volym/rx (µl)	Reagenskoncentration
Sterilt vatten	4	-
iQ5 (2X mix)	10	1X
BSA (20 µg/ µl)	1	1 µg/ µl
Primer T7 (10 µM)	0,5	0,25 µM
Primer SP6 (10 µM)	0,5	0,25 µM
Plasmid (5·10 ⁶ AOA-kopior/µl)	2	1,0·10 ⁷ kopior/ µl
Volym mastermix per brunn	18	-

PCR-programmet som användes för inhibitionstestet var: 95 °C 5 min; (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 80 °C 5 s) x 35; 65–95 °C smältning. Antalet värmecykler var således 35 stycken. Genkopior i de olika proverna mättes med fluorescens vid temperaturen 80 °C i varje värmecykel.

För kvantifiering av AOA användes reaktionsmixen i tabell 14. I varje brunn tillsattes även 2 µl DNA, Lambda-DNA eller sterilt vatten. Primern CamoA19f har DNA-sekvensen ATGGTCTGGYTWAGACG och primern CamoA616r har DNA-sekvensen GCCATCCABCKRTANGTCCA (Pester et al., 2012).

Tabell 14. Reagenser som använts till reaktionsmixen för AOA, volym av reagenserna per reaktion (rx) och slutgiltig reagenskoncentration när reaktionsmixen blandats med 2 µl DNA-extrakt, Lambda-DNA eller sterilt vatten

Reagens	Volym/rx (µl)	Reagenskoncentration
Sterilt vatten	3,25	-
iQ5 (2X mix)	7,5	1X
BSA (20 µg/ µl)	0,75	1 µg/ µl
Primer CamoA19f (10 µM)	0,75	0,5 µM
Primer CamoA616r (10 µM)	0,75	0,5 µM
Volym mastermix per brunn	13	-

PCR-programmet som användes vid körning av det första tekniska replikatet för AOA var: 95°C 5 min; (95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 78 °C 10 s) x 35; 95 °C 15 sec; 65–95 °C smältning. För det andra tekniska replikatet modifierades programmet genom att ta bort smältningen på slutet vilket ej påverkar kvantifieringen av antalet genkopior. Detta gjordes för att undvika att två band erhöles för PCR-produkten vid gelelektrofores som senare utfördes. Detta underlättade analysen av banden.

Reaktionsmixen som användes vid kvantifiering av AOB redovisas i tabell 15. Primern AmoA1F har DNA-sekvensen GGGGTTTCTACTGGTGGT och primern AmoA2R har DNA-sekvensen CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC (Rotthauwe et al., 1997).

Tabell 15. Reagenser som använts till reaktionsmixen för AOB, volym av reagenserna per reaktion (rx) och slutgiltig reagenskoncentration när reaktionsmixen blandats med 2 µl DNA-extrakt, Lambda-DNA eller sterilt vatten

Reagens	Volym/rx (µl)	Reagenskoncentration
Sterilt vatten	3,25	-
iQ5 (2X mix)	7,5	1X
BSA (20 µg/ µl)	0,75	1 µg/ µl
Primer AmoA1F (10 µM)	0,75	0,5 µM
Primer AmoA2R (10 µM)	0,75	0,5 µM
Volym mastermix ber brunn	13	-

PCR-programmet som användes för att kvantifiera AOB var: 95°C 5 min; (95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 78°C 10 s) x 35; 95 15 s; 65-95 °C smältning. Även för AOB genomfördes en körning med smältkurva och en utan för varje DNA-extrakt.

Reaktionsmixen som användes för kvantifiering av *Nitrobacter* redovisas i tabell 16. Primern nxrB1F har DNA-sekvensen ACGTGGAGACCAAGCCGGG och primern nxrB1R har DNA-sekvensen CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA (Y=C eller T) (Vanparys et al., 2007).

Tabell 16. Reagenser som använts till reaktionsmixen för Nitrobacter, volym av reagenserna per reaktion (rx) och slutgiltig reagenskoncentration när reaktionsmixen blandats med 2 µl DNA-extrakt, Lambda-DNA eller sterilt vatten

Reagens	Volym/rx (µl)	Reagenskoncentration
Sterilt vatten	3,25	-
iQ5 (2X mix)	7,5	1X
BSA (20 µg/ µl)	0,75	1 µg/ µl
Primer nxrB1F (10 µM)	0,75	0,5 µM
Primer nxrB1R (10 µM)	0,75	0,5 µM
Volym mastermix ber brunn	13	-

PCR-programmet som användes för att kvantifiera *Nitrobacter* var: 95°C 7 min; (95°C 15 s, 72-67°C 30 s, 72°C 30 s, 78°C 8 s) x8, (95°C 15 s, 67°C 30 s, 72°C 30 s, 78°C 8 s) x 27; 95 15 s; 65-95 °C smältning. Inför körning av det andra tekniska replikatet togs smältningen bort för att underlätta analysen efter utförd gelelektrofores.

Kvantifiering av *Nitrospira* gjordes med reaktionsmixen i tabell 17. Primern nxrB169F har DNA-sekvensen ACGTGGAGACCAAGCCGGG och primern nxrB638R har DNA-sekvensen CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA (Pester et al., 2014).

Tabell 17. Reagenser som använts till reaktionsmixen för *Nitrospira*, volym av reagenserna per reaktion (rx) och slutgiltig reagenskoncentration när reaktionsmixen blandats med 2 µl DNA-extrakt, Lambda-DNA eller sterilt vatten

Reagens	Volym/rx (µl)	Reagenskoncentration
Sterilt vatten	3,25	-
iQ5 (2X mix)	7,5	1X
BSA (20 µg/ µl)	0,75	1 µg/ µl
Primer nxrB169F (10 µM)	0,75	0,5 µM
Primer nxrB638R (10 µM)	0,75	0,5 µM
Volym mastermix ber brunn	13	-

Använt PCR-program för att kvantifiera *Nitrospira* var: 95°C 5 min; (95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 45 s, 78°C 8 s) x 35; 95 °C 15 s; 65-95 °C smältning.

BILAGA B – Transformationer av data

Transformationer som gjordes för AOA:s *amoA*-gen innan variansanalys och post hoc-test visas i tabell 18.

Tabell 18. Transformationer av värden för AOA:s *amoA*-gen innan variansanalys och post hoc-test

Förorening	Tidpunkt	AOA- <i>amoA</i> [genkopior/ng DNA]	AOA- <i>amoA</i> [genkopior/g ts]
Cu	Jun 2016	Invers	log ₁₀
PAH	Jun 2016	log ₁₀	log ₁₀
Cu	Sep 2016	log ₁₀	log ₁₀
PAH	Sep 2016	log ₁₀	log ₁₀
Cu	Okt 2017	log ₁₀	log ₁₀
PAH	Okt 2017	log ₁₀	log ₁₀

De transformationer som genomfördes för AOB:s *amoA*-gen innan variansanalys och post hoc-test presenteras nedan (tabell 19).

Tabell 19. Transformationer av värden för AOB:s *amoA*-gen innan variansanalys och post hoc-test, för färgmarkerade transformationer blev residualerna mindre normalfördelade än för de andra datamängderna

Förorening	Tidpunkt	AOB- <i>amoA</i> [genkopior/ng DNA]	AOB- <i>amoA</i> [genkopior/g ts]
Cu	Jun 2016	log ₁₀	log ₁₀
PAH	Jun 2016	Box-Cox	Kvadratrot
Cu	Sep 2016	log ₁₀	Kvadratrot
PAH	Sep 2016	log ₁₀	log ₁₀
Cu	Okt 2017	Invers	log ₁₀
PAH	Okt 2017	Invers	Invers

Transformationer av abundans av Nitrospiras *nrxB*-gen redovisas i tabell 20.

Tabell 20. Transformationer av värden för Nitrospiras *nrxB*-gen innan variansanalys och post hoc-test, för färgmarkerade transformationer blev residualerna mindre normalfördelade än för de andra datamängderna

Förorening	Tidpunkt	Nitrospira- <i>nrxB</i> [genkopior/ng DNA]	Nitrospira- <i>nrxB</i> [genkopior/g ts]
Cu	Jun 2016	log ₁₀	Kvadratrot
PAH	Jun 2016	Kvadratrot	Box-Cox
Cu	Sep 2016	Kvadratrot	Kvadratrot
PAH	Sep 2016	Kvadratrot	log ₁₀
Cu	Okt 2017	Kvadratrot	-
PAH	Okt 2017	-	Kvadratrot

Transformationer av värden för Nitrobacters *nrxB*-gen redovisas i tabell 21.

Tabell 21. Transformerings av värden för *Nitrobacter nxrB*-gen innan variansanalys och post hoc-test, för färgmarkerade transformationer blev residualerna mindre normalfördelade än för de andra datamängderna

Förorening	Tidpunkt	<i>Nitrobacter-nxrB</i> [genkopior/ng DNA]	<i>Nitrobacter-nxrB</i> [genkopior/g ts]
Cu	Jun 2016	Kvadratrot	Box-Cox
PAH	Jun 2016	-	Kvadratrot
Cu	Sep 2016	Invers	log ₁₀
PAH	Sep 2016	log ₁₀	log ₁₀
Cu	Okt 2017	Box-Cox	Box-Cox
PAH	Okt 2017	-	Kvadratrot

Data för mätning av potentiell ammoniakoxidation har Box-Cox-transformerats.

BILAGA C – Resultat av variansanalyser för genkopior/ng DNA

AOA

Abundansen av AOA:s *amoA*-gen var för de olika behandlingarna och tidpunkterna i intervallet $3,0 \cdot 10^2$ - $1,9 \cdot 10^4$ genkopior/ng DNA. Variansanalys visade att nollhypotesen, dvs. att ingen skillnad fanns i antalet AOA-*amoA*/ng DNA mellan jordtyperna kunde förkastas för alla undersökta tidpunkter (tabell 22). För faktorn kopparkoncentration fanns endast en statistiskt signifikant skillnad i antalet AOA-*amoA*/ng DNA vid tidpunkten oktober 2017. Inga interaktionseffekter mellan de undersökta faktorerna koncentration och jord kunde bekräftas. Resultatet för oktober visade att skillnader i antalet genkopior förekom mellan de olika kopparkoncentrationerna.

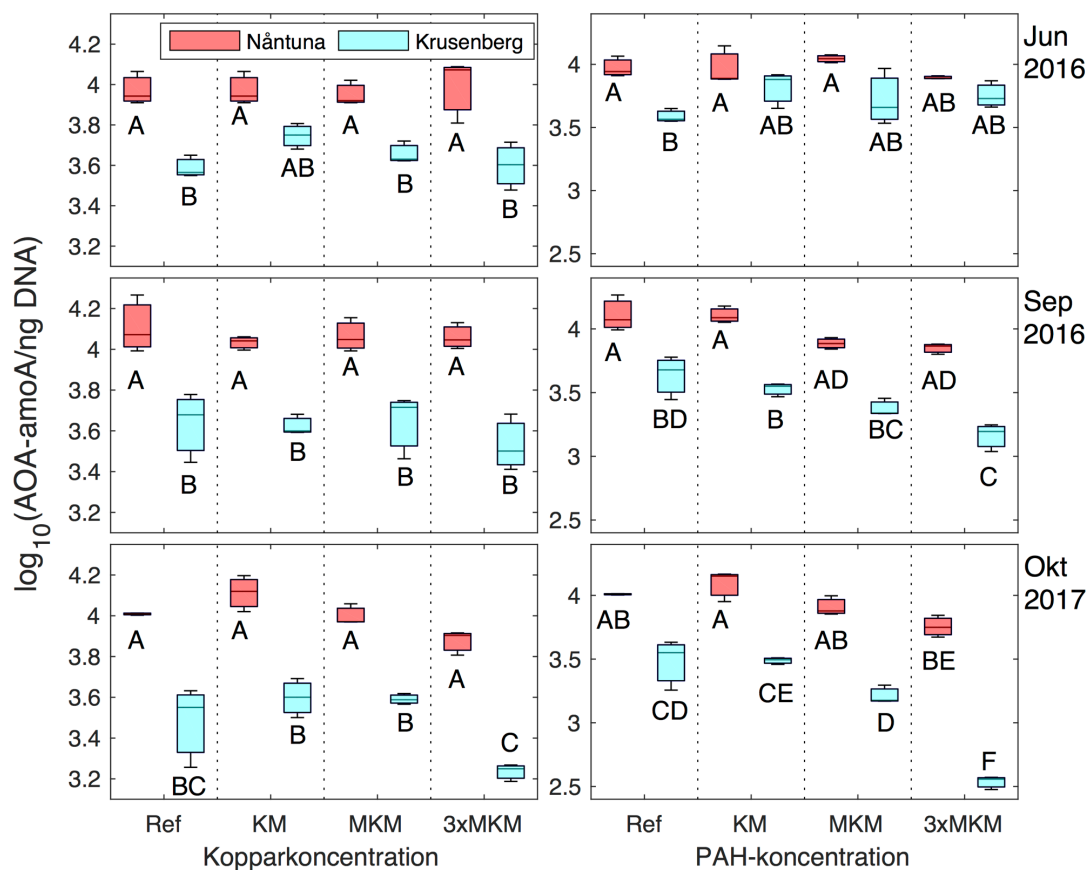
För den PAH-förorenade jorden visade variansanalys att signifikanta skillnader i kvantiteten av AOA:s *amoA*-gen/ng DNA fanns för de två undersökta jordarna vid alla tidpunkter (tabell 22). För september 2016 och oktober 2017 fanns även signifikanta skillnader i antalet gener mellan olika PAH-koncentrationer. För tidpunkten oktober 2017 fanns en interaktionseffekt mellan de undersökta faktorerna.

Tabell 22. Variansanalys av antal AOA-*amoA* genkopior/ng DNA för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>
Cu ^a	1,34	1,2	-	0,49	-1,3	-	13,1	14,4	***
Jord ^b	60,30	69,0	***	94,55	82,0	***	77,0	84,4	***
Cu x jord ^a	1,56	2,0	-	0,34	-1,7	-	0,8	0,8	-
Inom		27,9			21,1			0,4	
PAH ^a	1,169	1,0	-	18,05	18,6	***	27,0	27,7	***
Jord ^b	26,382	49,3	***	199,21	72,2	***	61,7	63,2	***
PAH x jord ^a	1,532	3,1	-	1,40	0,4	-	7,3	7,5	***
Inom		46,6			8,7		4,0	1,5	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01 ≤ P < 0,05 *, 0,001 ≤ P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Resultatet av kvantifieringen av AOA:s *amoA*-gen/ng DNA för koppar respektive PAH i de olika jordtyperna visas i figur 9. Post hoc-testen som gjordes för respektive tidpunkt visade att *amoA*-genens abundans skiljde sig mellan kopparförorenad jord från Nántuna och Krusenberg. För PAH-förorenad jord var *amoA*-genens abundans i juni 2016 relativt lika för de två jordtyperna, men med tiden skiljde sig abundansen allt mer mellan jordarna. Inom samma jord var skillnaderna små mellan de olika behandlingarna för båda föroreningarna. I jord från oktober 2017 skiljde sig antalet genkopior i Krusenbergsjorden vid koncentrationen 3xMKM från de andra koncentrationerna för båda undersökta föroreningar.



Figur 9. Låddiagram över logaritmerat antal AOA-*amoA* genkopior/ng DNA för olika koppar-koncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

AOB

Abundansen av AOB:s *amoA*-gen var mellan $8,2 \cdot 10^1$ - $3,2 \cdot 10^3$ genkopior/ng DNA. Variansanalys av AOB:s *amoA*-gen /ng DNA för kopparförorenad jord visade att en stor del av den totala variansen för juni och september 2016 kunde förklaras av varians inom grupper (tabell 23). För juni 2016 fanns en signifikant skillnad i antal genkopior mellan jordtyperna, men för september 2016 och oktober 2017 var denna skillnad ej signifikant.

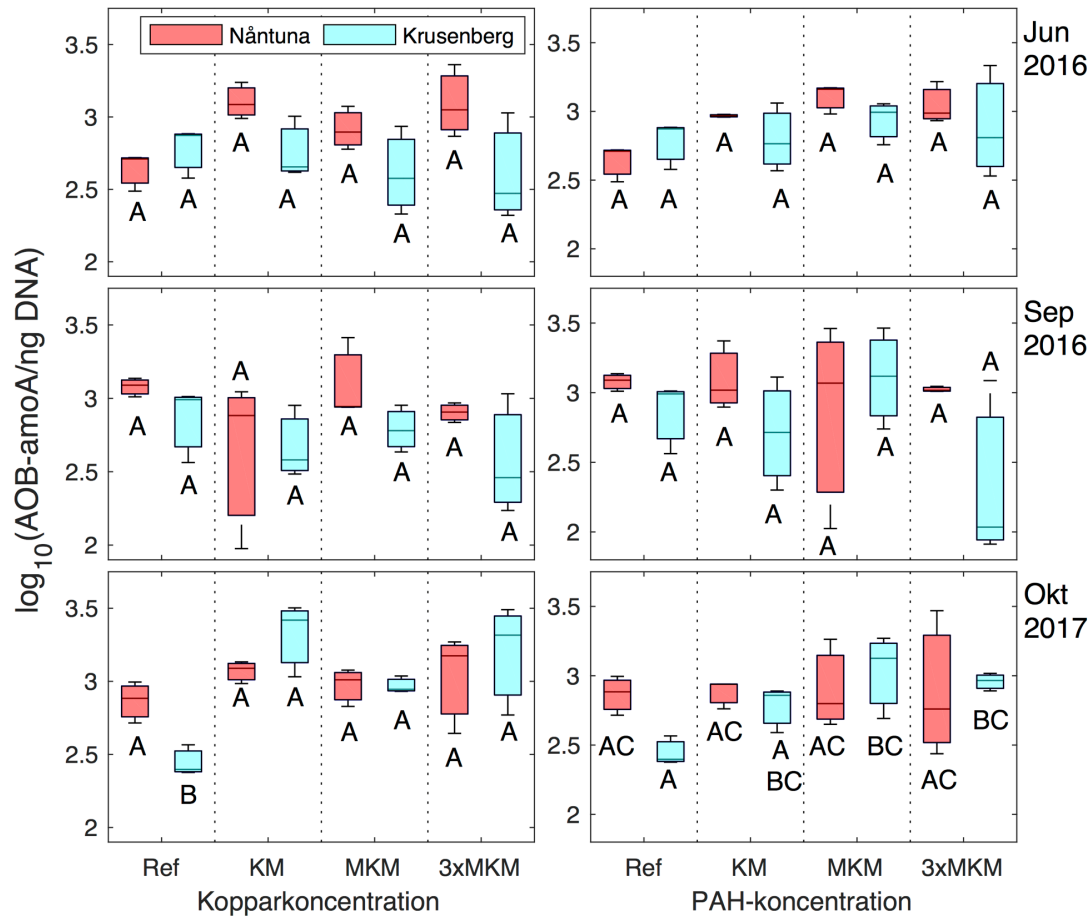
För den PAH-förorenade jorden syntes inga signifikanta skillnader i kvantiteten av AOB:s *amoA*-gen/ng DNA som kunde förklaras av faktorerna jordtyp och koncentration vid någon av de undersökta tidpunkterna (tabell 23).

Tabell 23. Variansanalys av antal AOB-*amoA* genkopior/ng DNA för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>		<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>		<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	
Cu ^a	1,08	0,8	-	1,55	6,4	-	12,14	43,4	***
Jord ^b	6,98	17,9	*	2,78	6,9	-	2,76	2,3	-
Cu x jord ^a	2,06	9,5	-	0,47	-6,2	-	6,92	23,1	**
Inom		71,9			92,9			31,2	
PAH ^a	2,66	17,5	-	0,65	-4,2	-	2,60	12,9	-
Jord ^b	1,10	0,3	-	2,30	5,2	-	1,16	0,4	-
PAH x jord ^a	0,78	-2,3	-	1,32	3,8	-	3,77	22,3	*
Inom		84,5			95,3			64,4	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01 ≤ P < 0,05 *, 0,001 ≤ P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Resultatet av post hoc-tester stöder variansanalysernas resultat. Dock avviker antal genkopior i referensen för Krusenbergsjorden från de kopparförorenade jordarna för tidpunkten oktober 2017 (figur 10).



Figur 10. Låddiagram över logaritmerat antal AOB-*amoA* genkopior/ng DNA för olika kopparkoncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

Nitrospira

Nitrospiras *nxB*-gens abundans/ng DNA i jordproverna var i intervallet $5,3 \cdot 10^1$ - $3,9 \cdot 10^3$. Variansanalys av *Nitrospira-nxB*/ng DNA för kopparförorenad visade på signifikanta skillnader i antalet genkopior för faktorn jord för alla tidpunkter (tabell 24). För faktorn kopparkoncentration fanns signifikanta skillnader i kvantiteten av genen för september 2016 och oktober 2017. För dessa tidpunkter fanns även en interaktionseffekt mellan de två faktorerna och den var mest utpräglad för den sista tidpunkten.

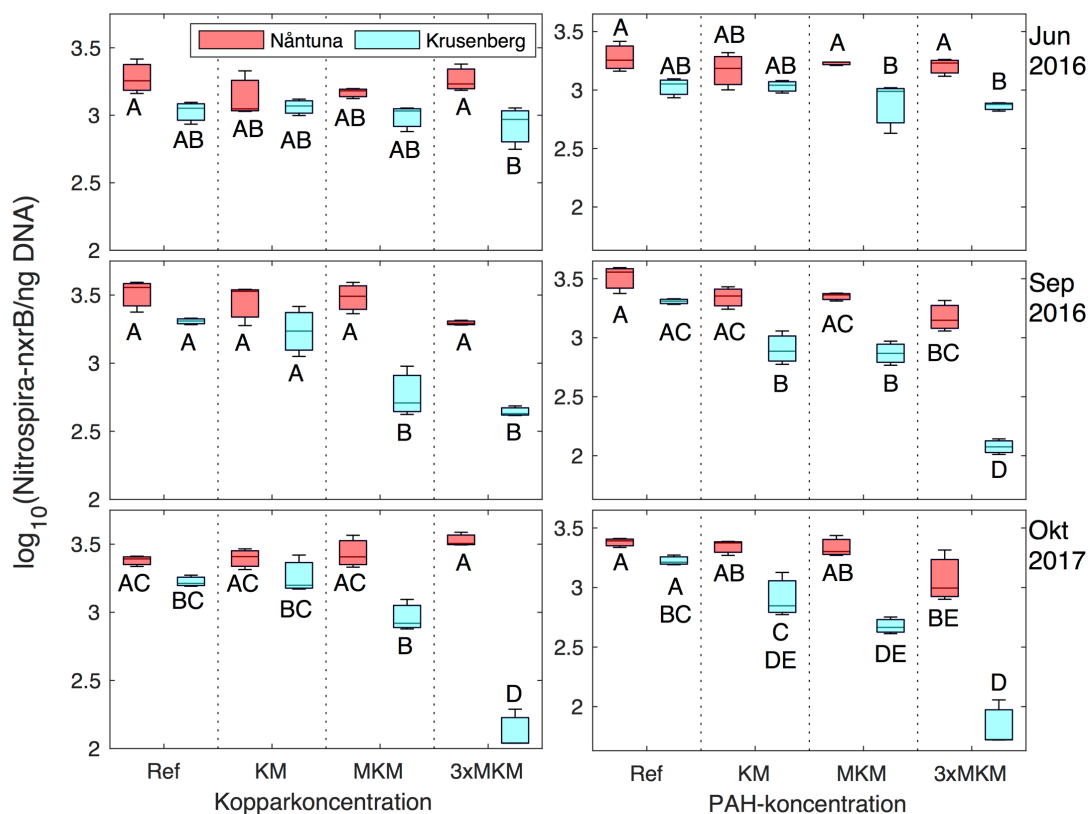
För den PAH-förorenade jorden fanns för de två sista tidpunkterna signifikanta skillnader i antalet *Nitrospira-nxB*/ng DNA för faktorn PAH-koncentration (tabell 24). För september 2016 fanns en interaktionseffekt mellan de undersökta faktorerna, dock förklaras mycket litet av den totala variansen av detta.

Tabell 24. Variansanalys av antal *Nitrospira-nxrB* genkopior/ng DNA för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>
Cu ^a	0,50	-3,4	-	10,99	24,5	***	7,81	8,5	**
Jord ^b	21,09	45,5	***	61,65	49,6	***	126,26	52,0	***
Cu x jord ^a	1,52	3,6	-	3,57	6,3	*	24,79	29,6	***
Inom		54,4			19,6			10,0	
PAH ^a	1,24	1,2	-	35,28	40,8	***	15,00	29,8	***
Jord ^b	34,73	58,2	***	119,06	46,9	***	72,89	51,0	***
PAH x jord ^a	0,83	-0,9	-	3,31	2,8	*	2,00	2,1	-
Inom		41,4			9,5			17,0	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01 ≤ P < 0,05 *, 0,001 ≤ P < 0,01 **, P < 0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Resultatet av genkvantifieringen av antalet genkopior av *Nitrospiras nxrB*-gen/ng DNA samt av genomförda post hoc-tester visas i figur 11. Antalet genkopior/ng DNA i Nåntunajorden var i stort sett konstant vid alla tidpunkter för båda föroreningarna. För Krusenbergsjorden var skillnaderna i antalet gener som störst i september 2016 och oktober 2017. Den högsta koncentrationen 3xMKM skiljde sig signifikant från alla de andra koncentrationerna för PAH-förorenad jord i september 2016 samt i oktober 2017. För den kopparförorenade jorden skiljde sig antalet genkopior vid koncentrationen 3xMKM i oktober 2017 signifikant från alla de andra koncentrationerna. Även i september 2016 var det skillnader i antalet genkopior vid olika föroreningsgrader i den kopparförorenade jorden.



Figur 11. Låddiagram över logaritmerat antal *Nitrospira-nxrB* genkopior/ng DNA för olika koppar-koncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

Nitrobacter

Abundansen för *Nitrobacters nxrB*-gen/ng DNA var mellan $3,2-1,6 \cdot 10^2$. Enligt genomförda variansanalyser för kopparförorenad jord förklarades vid den första tidpunkten en stor andel av variationen av antalet *Nitrobacter-nxrB*/ng DNA av jordtyp (tabell 25). Andel av variansen som kunde förklaras av jordtyp minskade dock med tiden och en större andel av variansen kunde förklaras av faktorn kopparkoncentration. En stor andel av variansen, cirka 50 % förklarades i oktober 2017 av att det förekommer en interaktionseffekt mellan de två undersökta faktorerna.

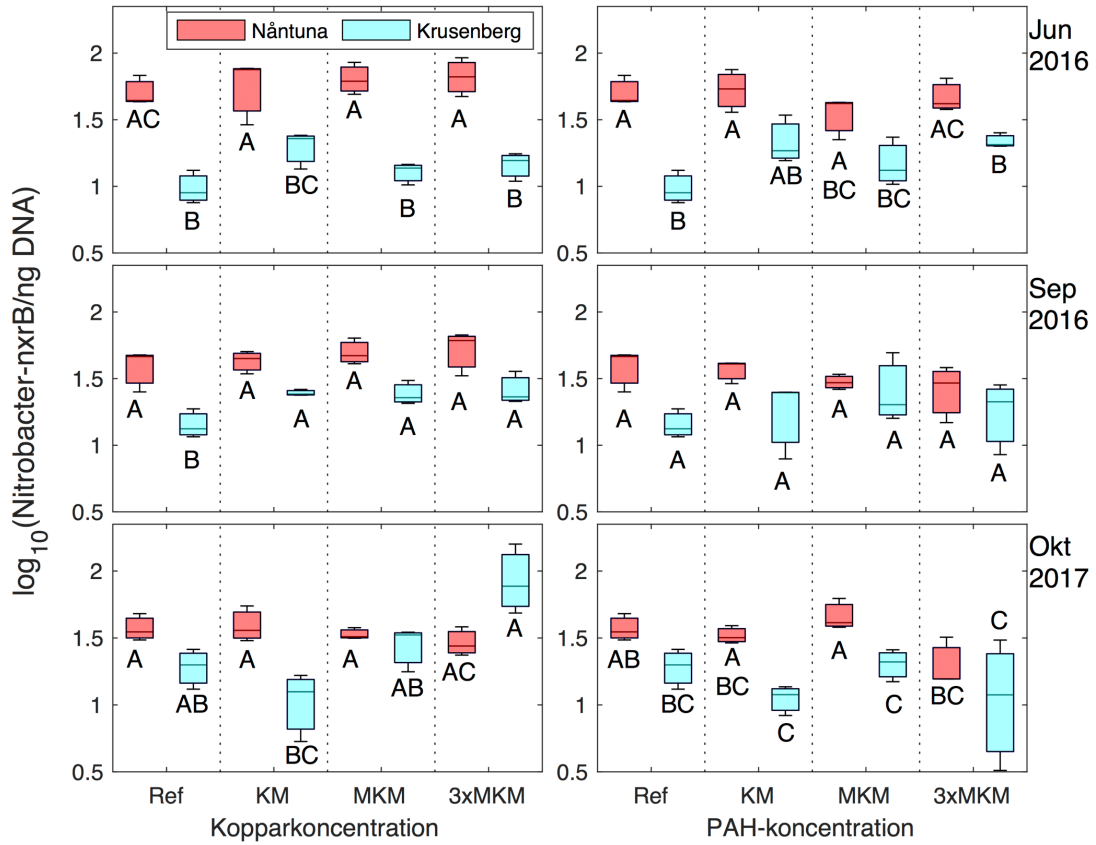
Variansanalys av *Nitrobacters nxrB*-gen/ng DNA visade att faktorn jordtyp förklarade majoriteten av variansen, andelen minskade dock en aning med tiden (tabell 25). Endast för oktober 2017 kunde signifikanta skillnader i antalet genkopior förklaras av föroreningsgrad.

Tabell 25. Variansanalys av antal *Nitrobacter-nxrB* genkopior/ng DNA för de olika tidpunkterna för faktorerna jordtyp och kopparkoncentration samt för faktorerna jordtyp och PAH-koncentration

Variations- ursprung	Juni 2016			September 2016			Oktober 2017		
	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>PEV (%)</i>	<i>P</i>
Cu ^a	0,50	-0,1	-	6,08	17,2	*	5,76	25,4	*
Jord ^b	21,09	79,6	***	44,84	49,5	***	3,04	3,6	-
Cu x jord ^a	1,52	-1,34	-	2,85	6,3	-	10,33	49,7	***
Inom		21,9			27,1			21,3	
PAH ^a	1,42	2,0	-	0,36	-6,3	-	3,57	13,6	*
Jord ^b	39,66	60,6	***	9,55	28,0	**	24,51	41,5	***
PAH x jord ^a	0,96	0,2	-	0,96	-0,4	-	1,46	2,5	-
Inom		37,6			78,7			42,4	

a=F_{3,23}, b=F_{1,23}, 0,01≤P <0,05 *, 0,001≤P <0,01 **, P <0,001 ***, ej signifikant P-värde -

Resultatet av post hoc-testerna visade att antalet genkopior i den kopparförorenade jorden skiljde mellan de två jordtyperna vid den första tidpunkten, men med tiden blev jordarna alltmer lika (figur 12). Kvantiteten av genen skiljde sig i juni 2016 inte lika distinkt mellan jordtyperna för den PAH-förorenade jorden. Skillnaderna i antalet genkopior mellan jordtyperna var som minst i september 2016 för båda föroreningarna.



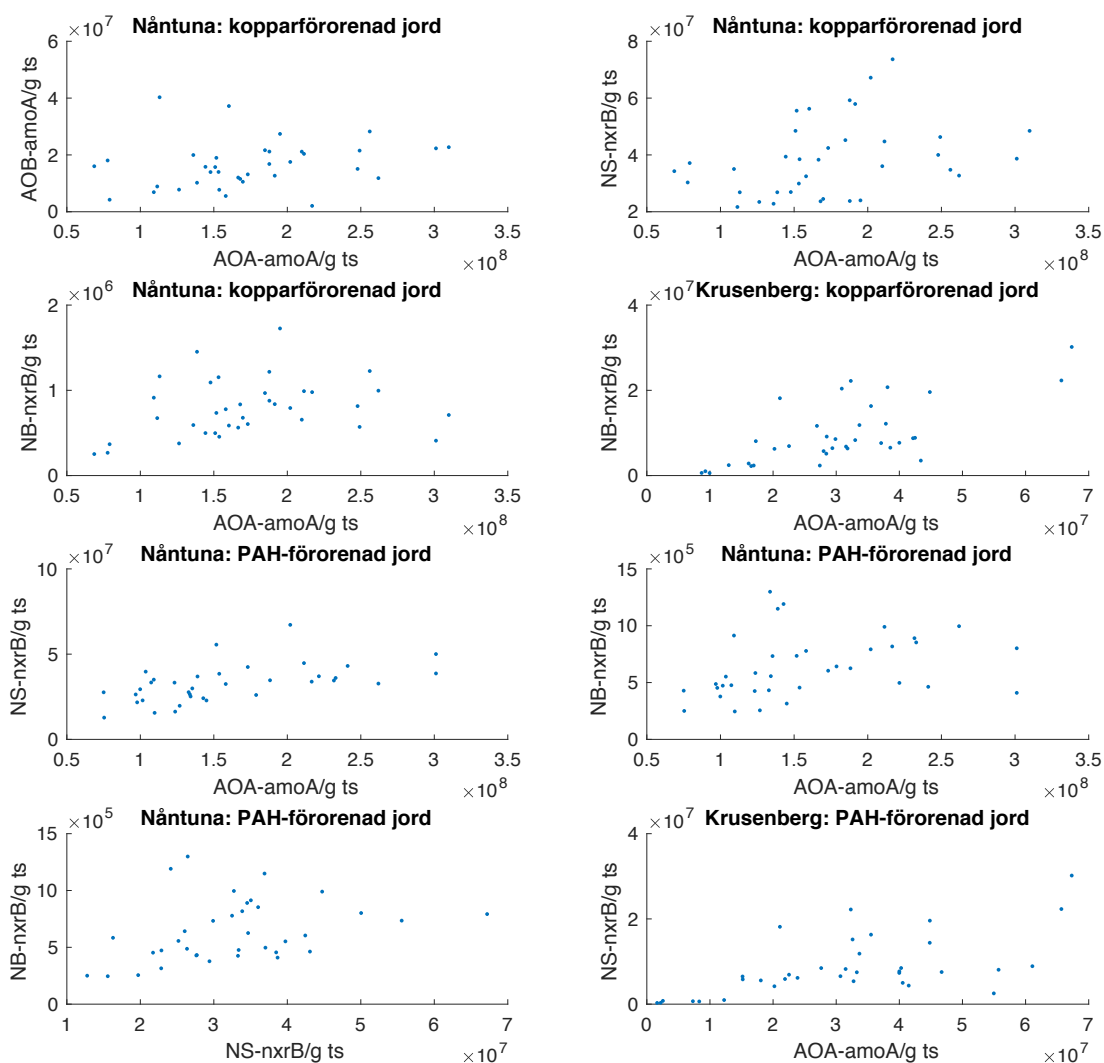
Figur 12. Låddiagram över logaritmerat antal *Nitrobacter-nxrB* genkopior/ng DNA för olika koppar-koncentrationer och PAH-koncentrationer vid tidpunkterna juni 2016, september 2016 och oktober 2017. Dataunderlag för varje låddiagram är logaritmerade värden av tre biologiska replikat. I varje delfigur indikerar låddiagram märkta med samma bokstav att de inte har medelvärden som skiljer sig signifikant från varandra.

BILAGA D – Korrelationstester

I denna bilaga visas i punktdiagram hur signifikanta korrelationer mellan olika mikroorganismers abundans samt korrelationer mellan mikroorganismernas abundans och PAO såg ut.

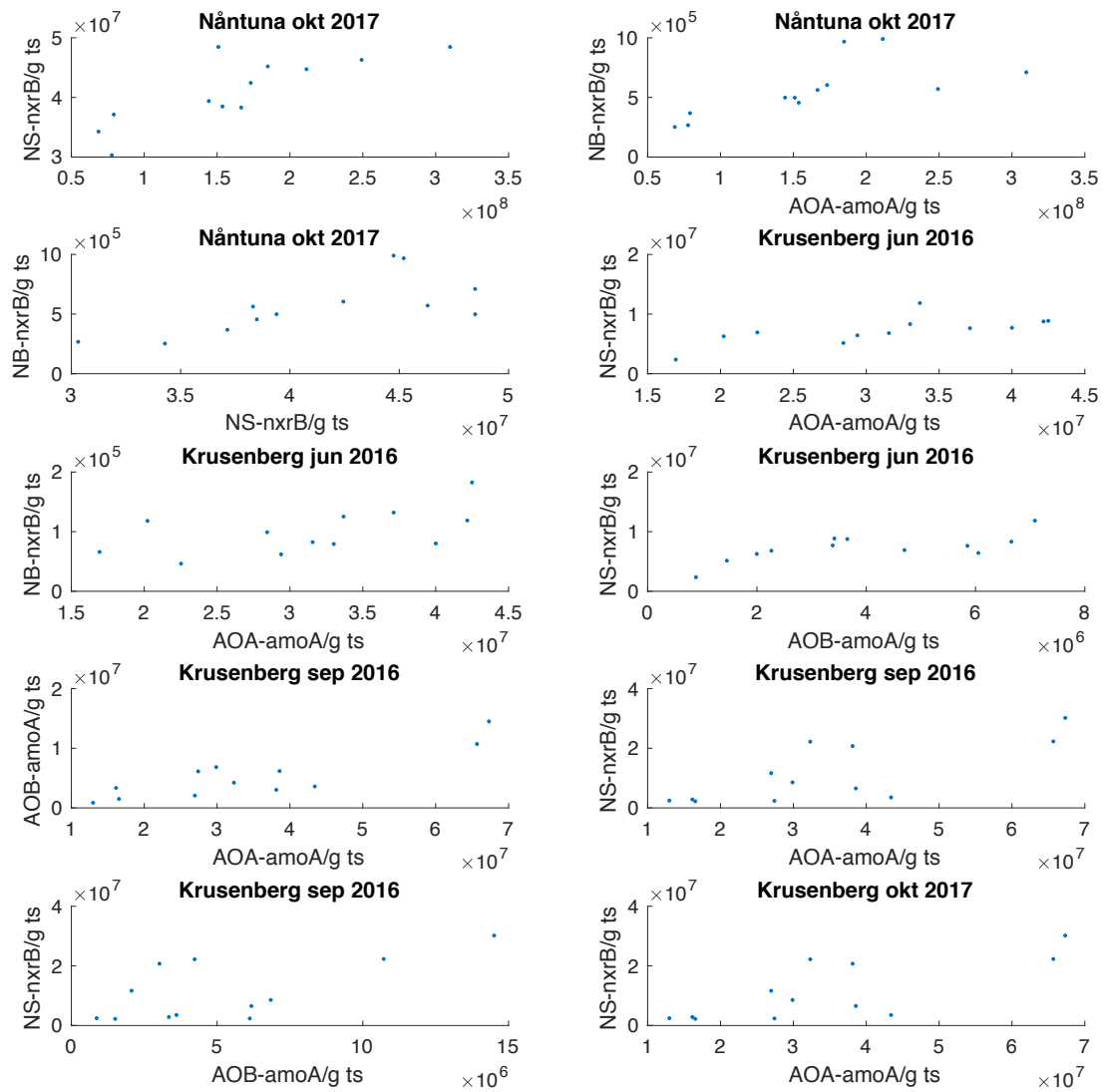
Korrelationstester mellan olika mikroorganismers abundans

Punktdiagram över förhållandet mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) över tid redovisas i figur 13.



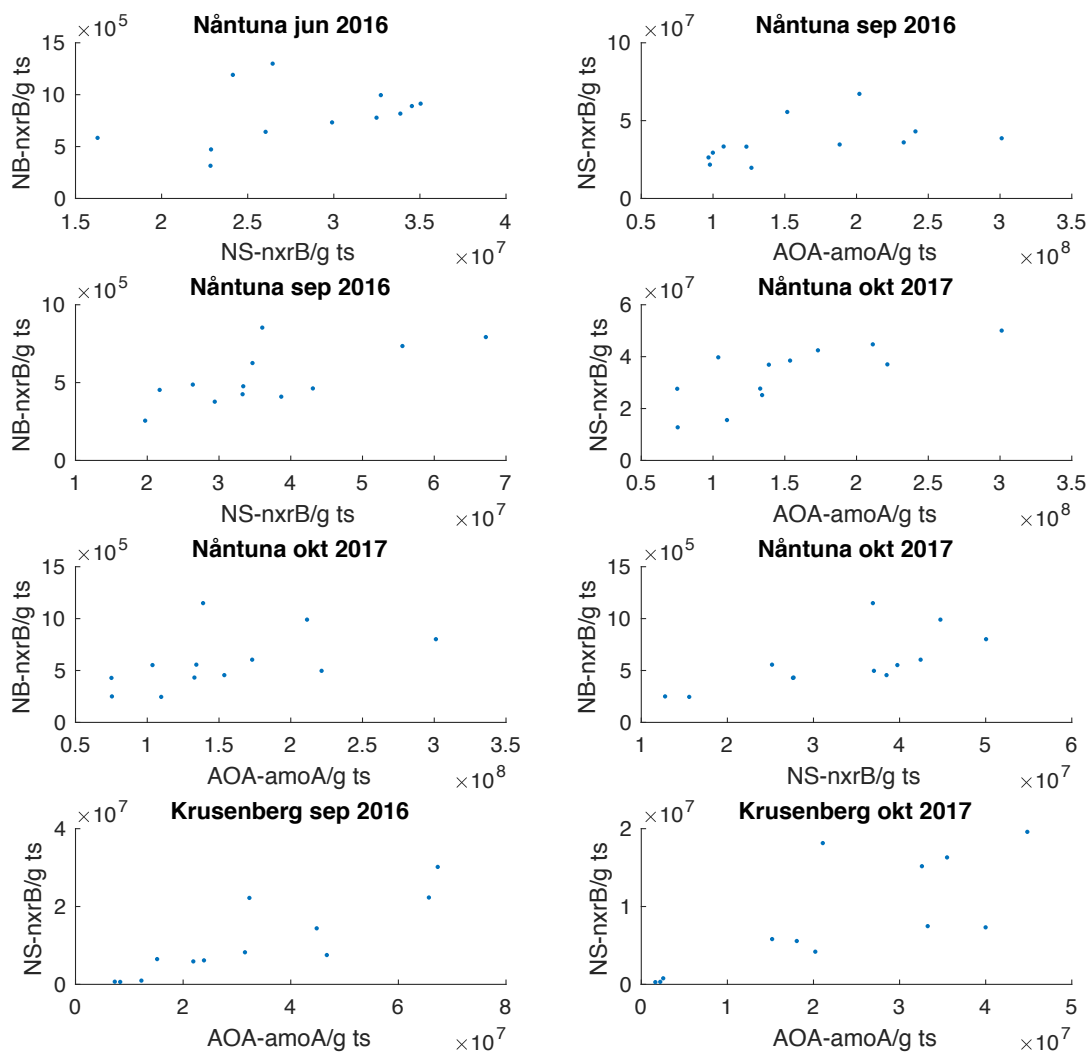
Figur 13. Punktdiagram över förhållandena mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts jord) i koppar-respektive PAH-förorenad jord i de olika jordtyperna över tid.

Förhållanden mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) i koppar-förorenad jord vid olika tidpunkter ses i figur 14.



Figur 14. Punktdiagram över förhållandena mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts jord) i kopparförorenad jord i de olika jordtyperna vid olika tidpunkter.

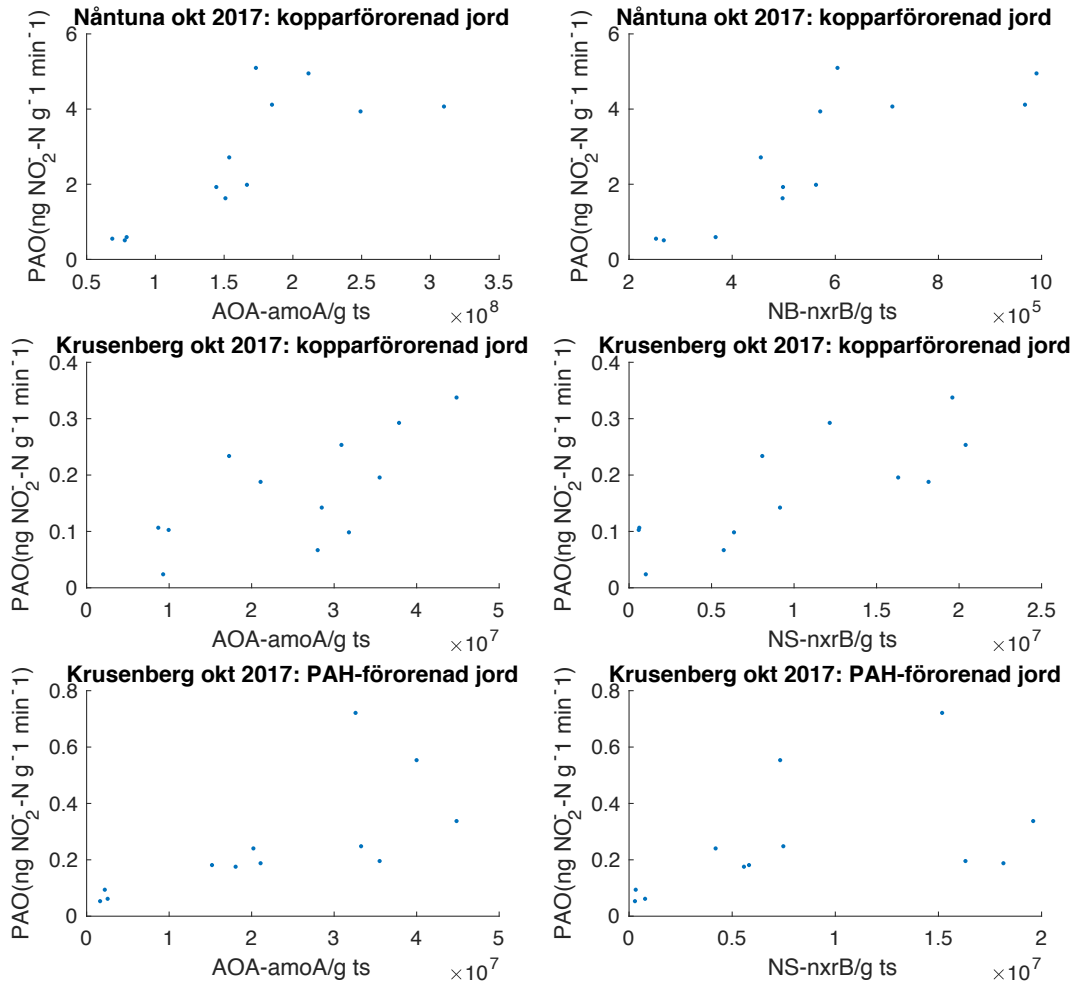
I figur 15 redovisas förhållanden mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts) i PAH-förorenad jord vid olika tidpunkter.



Figur 15. Punktdiagram över förhållandena mellan olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts jord) i PAH-förorenad jord i de olika jordtyperna vid olika tidpunkter.

Korrelationstester mellan mikroorganismers abundans och PAO

Förhållanden mellan PAO ($\text{ng NO}_2^- - \text{N g}^{-1} \text{ ts}^{-1} \text{ min}^{-1}$) och olika mikroorganismers abundans (genkopior/ g ts) i koppar-respektive PAH-förorenad jord i oktotober 2017 redovisas i figur 16.



Figur 16. Punktdiagram över förhållandena mellan PAO (ng NO₂⁻ - N g⁻¹ ts⁻¹ min⁻¹) och olika mikroorganismers abundans (genkopior/g ts jord) i oktober 2017 i de olika jordtyperna för koppar- respektive PAH-förorenad jord.