

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra pedologie a ochrany půd**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv *Aspergillus niger* na dostupnost fosforu v půdě  
v závislosti na půdním typu**

**Diplomová práce**

**Autor práce Bc. Rostislav Čermák**

**Program Zahradnictví**

**Vedoucí práce Mgr. Filip Polák, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*Vliv *Aspergillus niger* na dostupnost fosforu v půdě v závislosti na půdním typu*" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce Mgr. Filipovi Polákovi, Ph.D. za pomoc, pečlivost a trpělivost. Poděkování patří i dalším lidem na katedře pedologie, kteří se jakkoliv podíleli na této práci, včetně Bc. Šárky Heřmánkové. Chtěl bych poděkovat i mé rodině, která mě podporovala během studia. V neposlední řadě i přítelkyni a mé sestře, která mi pomáhala nejen se stylistikou, ale i psychikou.

# Vliv *Aspergillus niger* na dostupnost fosforu v půdě v závislosti na půdním typu

## Souhrn

Cílem práce bylo stanovit vliv mikroskopické vláknité houby *Aspergillus niger* na dostupnost fosforu v půdě a určit závislost tohoto procesu od půdního typu. Celkem bylo vybráno 6 půd z různých lokalit České republiky: 3 hnědozemě, 2 černozemě, a 1 kambizem.

Tato houba byla naočkována do vybraných půd a vzorky se udržovaly v kultivačním boxu po dobu 12 týdnů. Po 6 a 12 týdnech bylo provedeno stanovení půdní reakce, obsah vodou mobilizovatelného fosforu, potenciálně dostupného fosforu metodou Mehlich III a kationtů  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ .

U vzorků, kde byl kultivován *A. niger*, bylo naměřeno vyšší  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  oproti kontrole v 10 z 12 případů. Celkově byly tyto rozdíly relativně malé, u hnědozemí spíše  $<0,1$ , u černozemí  $<0,05$  a u kambizemě  $<0,02$ .

Množství vodou mobilizovatelného fosforu bylo v 8 z 12 případů zjištěno vyšší u použitého druhu houby než u kontroly. Ve většině případů šlo o zvýšení nebo výjimečně snížení do  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Výjimkou byla hnědozem C, kde byl rozdíl v nárůstu o  $1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Obsah potenciálně dostupného fosforu stanoveného metodou Mehlich III byl vyšší u námi kultivované houby oproti kontrole u většiny půd (9 z 12 případů). U černozemí byly naměřeny vyšší rozdíly v množství oproti hnědozemím a kambizemím. Pokud jsme ale porovnali procenta tohoto rozdílu, zaznamenáváme již menší rozdíly mezi typem půdy. Například největší nárůst měla černozem S o  $10,7 \text{ mg.kg}^{-1}$  v 6 týdnech kultivace a o  $24,7 \text{ mg.kg}^{-1}$  ve 12 týdnech. V porovnání s kambizem BR měla ve 12 týdnech o  $3,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  a hnědozemími v průměru v 6 týdnech o  $4,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U černozemě S ve 12 týdnech tomu bylo téměř stejně procent (13,8 %), jako u kambizemě BR ve 12 týdnech (13,6 %), méně pak u hnědozemí v 6 týdnech v průměru (9,4 %). Byl ale zaznamenán i pokles, a to u dvou hnědozemí ve 12 týdnech v průměru přibližně o  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  u vzorků s *A. niger* v porovnání s kontrolou u hnědozemě V o  $57 \text{ mg.kg}^{-1}$  a černozemě BR o  $85 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Kambizem BR měla vyšší množství  $\text{Al}^{3+}$  u námi použitého druhu mikroskopické houby oproti kontrole o  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U hnědozemí a černozemí jsme naměřili naopak nižší množství tohoto kationtu u vzorků s použitou houbou.

Mikroskopická houba *A. niger* vykazovala schopnost ovlivňovat živiny, zejména mobilizovat fosfor ve všech vybraných typech půd, čímž ho potenciálně zpřístupnila ze sloučenin pro rostlinu dřív nedostupných.

**Klíčová slova:** *Aspergillus niger*, půda, fosfor, organické kyseliny, pH

# Influence of *Aspergillus niger* on phosphorus availability in soil depending on soil type

## Summary

The aim of this work was to determine the influence of the microscopic filamentous fungus *Aspergillus niger* on the availability of phosphorus in the soil and to determine the dependence of this process on the type of the soil. In total, 6 soils were chosen from different locations in the Czech Republic: 3 brown soil, 2 black soil, and 1 cambium.

The fungus was inoculated into the selected soils and samples were maintained in the cultivation box for 12 weeks. After 6 and 12 weeks, a determination of the soil reaction was made, as well as the content of water-mobilized phosphorus, the potentially available phosphorus by the Mehlich III method and lastly  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ .

In the samples where *A. niger* was cultivated, a higher  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  was measured compared to the control in 10 out of 12 cases. Overall, these differences were relatively small,  $<0.1$  for brown soils,  $<0.05$  for black soils and  $<0.02$  for cambium. In 8 out of 12 cases, the amount of water-mobilizable phosphorus was found to be higher in the used fungus species than in the control. In most cases, it was an increase, exceptionally a decrease to  $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  was noted. The exception was brown soil C, where the difference in the increase was  $1.7 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

The content of potentially available phosphorus determined by the Mehlich III method was higher in our cultivated fungus than in the control in most soils (9 out of 12 cases). Higher differences in quantity compared to brown soils and cambium were measured. But if we compared the percentages of this difference, we already note smaller differences between the types of soil. For example, black soil S had the greatest increase by  $10.7 \text{ mg.kg}^{-1}$  in 6 weeks of cultivation and by  $24.7 \text{ mg.kg}^{-1}$  in 12 weeks. Compared to cambium BR, it had  $3.4 \text{ mg.kg}^{-1}$  in 12 weeks and brown soils in 6 weeks by  $4.8 \text{ mg.kg}^{-1}$ . In black soil S at 12 weeks, it was almost the same percentage (13.8%) as in cambium BR at 12 weeks (13.6%), while it was less in brown soil at 6 weeks on average (9.4%). However, a decrease was also recorded, namely by approximately  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  in 12 weeks in two brown soils.

We observed a statistically significant increase in  $\text{Ca}^{2+}$  in the samples with *A. niger* compared to the control in brown soil V by  $57 \text{ mg.kg}^{-1}$  and black soil BR by  $85 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Cambium BR had a higher amount of  $\text{Al}^{3+}$  in the species of microscopic fungus we used compared to the control by  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$ . On the other hand, we measured a lower amount of this cation in the brown soil and black soil in the samples with the sponge used.

The microscopic fungus *A. niger* showed the ability to influence nutrients, especially to mobilize phosphorus in all selected soil types, thereby potentially making it available from compounds previously unavailable to the plant.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, soil, phosphorus, organic acids, pH

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
2.1	Hypotéza .....	10
2.2	Cíl.....	10
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>11</b>
3.1	Fosfor .....	11
3.2	Fosfor v půdě .....	12
3.3	Fosfor v půdě .....	12
3.3.1	Strategie pro blízkou budoucnost .....	13
3.3.2	Fosfor mobilizující mikroorganismy .....	14
3.3.3	Fosfor mobilizující bakterie.....	14
3.3.4	Fosfor mobilizující mikroskopické houby .....	14
3.3.5	<i>Aspergillus niger</i> .....	15
3.3.6	Mechanismy mikrobiální mobilizace fosforu .....	16
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>18</b>
4.1	Charakteristika vybraných půd, úprava půdních vzorků .....	18
4.2	Stanovení maximální kapilární kapacity a retenční vodní kapacity .....	18
4.3	Příprava vzorků na kultivaci, inokulace půdy spórami <i>A. niger</i> a jeho použitý kmenový druh .....	20
4.4	Úprava vzorků po kultivaci.....	21
4.5	Extrakce fosforu pomocí vody, stanovení aktivní půdní reakce a vodou mobilizovatelných prvků .....	22
4.6	Extrakce dostupných prvků podle Mehlich III .....	22
4.7	Extrakce vzorků pomocí BaCl <sub>2</sub> , stanovení výměnného pH a výměnných kationtů .....	23
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>24</b>
5.1	Změny pH půdy .....	24
5.2	Obsah vodou extrahovatelného fosforu .....	27
5.3	Stanovení množství fosforu metodou Mehlich III.....	29
5.4	Stanovení množství kationtů Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> a Ca <sup>2+</sup> extrakcí BaCl <sub>2</sub> .....	31
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>35</b>
6.1	Změna půdní reakce.....	35
6.2	Mobilizace fosforu působením <i>Aspergillus niger</i> .....	37
6.3	Kationty Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> a Ca <sup>2+</sup> extrahované BaCl <sub>2</sub> .....	40
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>I</b>
<b>10</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b></b>
<b>11</b>	<b>Seznam grafů.....</b>	<b></b>

**12 Seznam tabulek .....**



# 1 Úvod

Obsah dostupného fosforu ve významné míře ovlivňuje úrodnost zemědělských půd a jeho nedostatek je běžným jevem i přesto, že celkový obsah fosforu v půdě lze považovat za poměrně vysoký. Navzdory dlouhodobé aplikaci hnojiv dostupnost této živiny zůstává relativně nízká díky vzniku nedostupných forem, čímž rostlinám zůstává skutečně přístupný jen malý podíl a zbytek zůstává uložen v půdě (Zhu et al. 2018).

V přírodě běžně existují mikroorganismy, které dokážou mobilizovat fosfor z těchto forem a obstarat ho jak pro sebe, nebo pokud žijí v symbióze, poskytnut tuto živinu i rostlině. A to díky vylučování velkého množství látek do extracelulárního prostoru, které dokážou fosfor mobilizovat z nedostupné formy, kde k němu mají přístup i kořeny rostlin (Alori et al. 2017; Vassileva et al. 2022).

Přítomnost přirozených fosfor-mobilizujících druhů mikroorganismů se proto pro úrodnost půdy ukazuje jako významný faktor a současně představuje perspektivní nástroj moderního ekologického zemědělství. Jejich cílené využití by umožnilo nejen zvýšit dostupnost fosforu již v zemědělské půdě obsaženého, ale zároveň by umožnilo snížit nároky na dávku hnojení (Gurbanov et al. 2021).

Diplomová práce si proto dává za cíl zkoumat vliv vláknité mikroskopické houby *Aspergillus niger* na změny obsahu dostupného fosforu, snažit se identifikovat mechanismy, které tento proces umožňují a současně stanovit případný vliv půdního typu na tyto procesy.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

### 2.1 Hypotéza

Množství uvolňovaného fosforu bude záležet na jeho přístupnosti. V půdách s vyšším obsahem snadno dostupného fosforu bude rozsah mobilizace nižší než v půdách, kde fosfor dominuje v nepřístupných formách.

Mobilizace fosforu bude souviset především s organickými kyselinami a hodnotou pH v důsledku aktivity *Aspergillus niger*.

### 2.2 Cíl

Stanovení vlivu mikroskopické vláknité houby *Aspergillus niger* na množství dostupného fosforu v různých půdních typech a určení vlivu půdního typu na interakci mezi mikroorganismem a půdou.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Fosfor

Fosfor je nekovový prvek, jenž se vyskytuje v přírodě pouze ve formě sloučenin a v zemské kůře je obsažen přibližně v obsahu 0,09 % hmotnosti (Filippelli 2008). Ve fungování organismů hraje zásadní roli. U prokaryot i eukaryot je fosfor esenciální živinou, která se účastní například biochemických procesů, jako je metabolismus lipidů a syntéza nukleových kyselin a buněčných membrán. Podílí se také na buněčné signalizaci a je životně důležitý pro tvorbu nukleotidů, jež obsahují molekuly DNA a RNA, či ATP (adenosintrifosfát), který slouží jako zdroj energie pro širokou škálu biologických funkcí (Ha & Tran 2014). Ve skutečnosti žádný známý životní proces nemůže fungovat bez přítomnosti tohoto prvku (Richardson et al. 2011). Nedostatek fosforu vede k obecnému omezení řady metabolických procesů, včetně buněčného dělení a růstu, nebo respirace a fotosyntézy (Terry & Ulrich 1973).

Z chemického hlediska existuje více alotropních forem fosforu, především:

- a) **bílý fosfor** – je vysoce reaktivní a na vzduchu samo vznětlivý,
- b) **červený fosfor** – vzniká zahříváním bílého bez přístupu vzduchu a je méně reaktivní,
- c) **černý fosfor** – vzniká zahříváním bílého fosforu za velmi vysokých tlaků nebo za přítomnosti katalyzátoru. (Corbridge 2013)

Díky značné reaktivitě tohoto prvku se v přírodě nalézá převážně v podobě sloučenin, nejčastěji v podobě orthofosforečnanů  $-\text{PO}_4^{3-}$  (pro zjednodušení dál v textu jen fosfor), a nejzastoupenějším minerálem je apatit, neboli fosforečnan vápenatý, který je nejčastěji zastoupen v podobě fluoro-, chloro- nebo hydroxyl-apatitu  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2]$ . Apatity jsou magmatické, sedimentární nebo metamorfické minerály a slouží jako surovina pro výrobu umělých hnojiv, kyseliny fosforečné a dalších sloučenin. Dalším důležitým zdrojem je fosforit. Jedná se o sedimentární horniny oceánského původu vzniklé z mrtvých organismů, které obsahovaly vysoké množství apatitu (Fecenko & Ložek 2000; Tiessen 2008; Tan 2009).

Ročně je vytěženo přibližně 20 Mt fosforu (Scholz et al. 2014), což je z dlouhodobého hlediska problematické, neboť kvalitní zdroje ubývají a jsou situovány na malé ploše. Tři čtvrtiny se nachází v Maroku a Západní Sahaře, další významná ložiska jsou v Číně, USA a Rusku. Toto rozdělení v kombinaci s jeho ekonomickou volatilitou (cena fosforu v roce 2008 krátkodobě vzrostla osmkrát) by mohlo v oblasti potravinové bezpečnosti vést v budoucnosti k politickému napětí (Cordell & White 2011; Daneshgar et al. 2018). Přestože celkový rozsah použitelných rezerv zdrojů fosforu je těžko předvídatelný, celosvětové zásoby fosfátů se odhadují na více než 300 000 Mt, velká část není v ekonomických a technologických podmínkách pro těžbu atraktivní (Notholt et al. 2005).

Vzhledem k nestabilitě plyných forem, výskyt fosforu v atmosféře je zanedbatelný, proto jeho koloběh probíhá především mezi horninami, vodou, půdou a organismy (Daneshgar et al. 2018). Přirozený cyklus začíná zvětráváním minerálů, odkud putuje do půdy nebo vod. Následně vstupuje do trofického systému a poté se vrací do půdy skrze výkaly, odumřelé rostliny a živočichy. Tato část procesu se může mnohokrát opakovat. Postupem času se tento fosfor vyplavuje do vodních toků, a nakonec je unášen do moří a oceánů. Zde se opět ukládá a během milionů let se mění na sedimentární horniny. Cyklus znovu začíná vynesáním na pevninskou souš a zvětráváním (Filippelli 2002; Ruttenger 2003; Filippelli 2008).

### 3.2 Fosfor v půdě

Fosfor se v půdě vyskytuje v řadě forem. Tvoří běžně složky hornin a minerálů, různé formy organické hmoty (například humusové látky) (Khan et al. 2014) a rozpuštěný fosfor v půdním roztoku (Dollard & Billard 2003). Podíly těchto složek se v jednotlivých půdách liší v závislosti od mateční horniny, vegetačního krytu, vodního režimu anebo historickém využití půdy (Sanyal & De Datta 1991). Podíl organického fosforu v půdě kolísá od 2 do 75 % a podíl anorganického fosforu se pohybuje od 25 do 98 %. V lehkých (písčítých) půdách je obsah organického fosforu nižší než v půdách středních (hlinitých) (Fecenko & Ložek 2000). Celkové množství v hloubce 0–15 cm se může pohybovat od 50 do 3000 mg.kg<sup>-1</sup> (Sanyal & De Datta 1991), běžně je spíše mezi 200 až 800 mg.kg<sup>-1</sup> (Tiessen 2008).

**Anorganický** fosfor je v půdě zastoupen v podobě minerálů a hornin. Rozpustnost těchto sloučenin je ovlivněna především půdním pH, přičemž pro použití rostlinami je nejdostupnější při hodnotách pH 6 až 7. Zvýšením pH nad 7,3 je fixován vápníkem, zatímco při pH nižším než 6 je fosfor fixován hliníkem a při pH pod 5 fixován železem (Penn & Camberato 2019). To je způsobeno díky zápornému náboji na molekule PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, která snadno reaguje s kationty železa (Fe<sup>3+</sup>), hliníku (Al<sup>3+</sup>) a vápníku (Ca<sup>2+</sup>). V důsledku toho a vzhledem ke vzniku nerozpustných komplexů, mobilita fosforu v půdě a půdním roztoku klesá a fosfor se stává nedostupným.

**Organické** podoby půdního fosforu představující asi polovinu celkového organického fosforu, jsou zastoupeny jako inositol trifosfát. Jiné varianty jsou hlavně vázány v humusu a dalších organických složkách půdy. Tyto formy tvoří důležitou zásobu fosforu v půdě, kterou uvolňují během mineralizace a jsou citlivé na půdní vlhkost a teplotu. Organický fosfor má tendenci se hromadit v půdním profilu a je jen málo pohyblivý. Mezi organické formy fosforu se rovněž řadí sloučeniny vázané v živém biomase, díky čemuž je jen v mikroorganismech potenciálně 60–120 kg fosforu na hektar (Turner et al. 2005; Withers et al. 2015).

I když celkový obsah fosforu v půdě překračuje požadavky organismů, dostupnost fosforu je omezena právě jeho imobilitou. Rozpustné frakce, převážně H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> a HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Paul et al. 1996), jsou proto jediné formy, které mohou organismy přijímat. V půdách obvykle dosahuje obsah mobilního fosforu méně než 0,01 mg/l (Sharpley 2000), což vede k jeho rychlé spotřebě.

Dynamika fosforu v rhizosféře je ovlivňována především:

- **vlhkostí**, která ovlivňuje míru degradace organické hmoty;
- **minerálním složením**, které určuje rozsah sorpčních procesů (Neumann & Römheld 2002);
- a **aktivitě organismů**, jež mají schopnost mobilizovat fosfor.

Celosvětově má mnoho půd nedostatečné zásoby přístupného fosforu, důsledkem čehož je vyžadováno intenzivní hnojení, a tedy dostupnost fosforu v půdě je spatřována jako hlavní faktor omezující produktivitu rostlin (Richardson et al. 2011).

### 3.3 Fosfor v půdě

Obecně jsou k hnojení využívány organické a minerální formy fosforu. Mezi organické, které lze považovat za obnovitelné, jsou řazeny:

- a) **organická a statková hnojiva** (chlévský hnůj, kejda, močůvka, sláma a kompost),
- b) **kostní moučka**,

- c) **kaly z čištění odpadních vod** a
- d) **rybníční bahno** (Vaněk 2007).

Potenciálním problémem u těchto hnojiv je kontaminace těžkými kovy, případně jinými rizikovými látkami (Duras & Potužák 2021), které vyžadují „vyčištění“ hnojiva před použitím (Kotzurová et al. 2016).

K minerálním formám, které jsou nejvíce využívány, patří superfosfáty, například  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$  (Tan 2009) nebo komerčně nazývaný Amofos. Obojí jsou granulovaná, kombinovaná hnojiva s vodorozpustným fosforem o určitém obsahu, například superfosfáty 7,5-21 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Zároveň se tato kombinovaná hnojiva používají i ke hnojení dalším prvkem, superfosfáty obsahují síru a Amofos amonný dusík (Vaněk 2007).

Celosvětově jsou potřeby fosforu uspokojovány těžbou sedimentů, z nichž se až 82 % spotřebuje na hnojiva (Van Kauwenbergh 2010). Spotřeba fosforu pro účely hnojení se ale v důsledku rostoucí populace a poptávky po zemědělských výnosech zvyšuje (Sarvajayakesavalu et al. 2018). Vzhledem k tomu, že z celkové aplikace je efektivních pouze 16 % (Loehr 2012), současná zemědělská praxe má tendenci dávku hnojiv navyšovat (Adhya et al. 2015), v důsledku čeho se reálně hnojivem jen víc plýtvá. Po aplikaci hnojiva do půdy začne vlhkost rozpouštět jeho částice, což zvyšuje množství fosforu v půdním roztoku a umožňuje mu difuzi na krátkou vzdálenost od hnojiva (Busman et al. 2002). Kvůli rychlé adsorpci nebo vázání mikroorganismy se více než 80 % fosforu z hnojiva může stát pro rostliny nedostupným krátce po aplikaci (Zhu et al. 2018). Většina půd má vysokou schopnost vázat fosfor, což znamená, že nadbytek fosforu z hnojiv má tendenci hromadit se v půdě (Withers et al. 2015), zatímco snadno rozpustné formy se mohou lehce vymývat (Ha & Tran 2014). Tento jev způsobuje nárůst fosforečnanů ve vodních tocích a v minulosti vedl k eutrofizaci a nadměrnému růstu sinic, což narušovalo ekosystémy v důsledku nedostatku rozpuštěného kyslíku nebo tvorby cyanotoxinů (Anderson et al. 2002). I když se tento problém od druhé poloviny 20. století výrazně zlepšil, únik fosforu zůstává významný. Odhaduje se, že jen v rámci EU-27 bylo v roce 2005 kvůli zemědělské činnosti spláchnuto do vodních toků kolem 0,146 Mt fosforu (van Dijk et al. 2016).

### 3.3.1 Strategie pro blízkou budoucnost

Udržitelnost globálního využívání fosforu se objevuje jako hlavní společenský cíl pro zajištění budoucí potravinové, energetické a vodní bezpečnosti. Hlavní výzvy rozdělil Withers et al. (2015) do čtyř bodů :

- 1) spotřebovat méně fosfátové horniny s vyšší účinností,
- 2) minimalizovat ztráty fosforu a vznik odpadu, který nelze recyklovat,
- 3) stanovit ekonomické, sociálně a environmentálně přijatelné cíle udržitelnosti, aby došlo ke snížení poptávky po fosforu a
- 4) navrhnout výrobní systémy řízené výstupem s minimálními požadavky a maximální účinností.

Dalšími alternativami, jak zlepšit využití fosforu v zemědělství je zvýšení přesnosti používání hnojiv (Withers et al. 2015), šlechtění rostlin (Rose et al. 2010) a využití nanočásticových hnojiv (Liu & Lal 2014). Velmi slibným se však jeví využití již v půdě nahromaděného fosforu z dlouhodobé aplikace fosforečných hnojiv. Tento naakumulovaný fosfor představuje z globálního hlediska velký sekundární zdroj, který je dostatečný k udržení výnosů plodin po celém světě

přibližně na 100 let (Khan et al. 2007). Zpřístupnit by ho dokázali některé fosfor mobilizující mikroorganismy a produkty jejich metabolismu (Adhya et al. 2015; Kour et al. 2021).

### 3.3.2 Fosfor mobilizující mikroorganismy

Mikroorganismy hrají zásadní roli v rhizosféře, kde plní mnoho významných funkcí. Existuje obrovská rozmanitost půdních mikrobiomů (epifytických, endofytických a rhizosférických), které mají schopnost mobilizovat nerozpustný fosfor a zvýšit jeho přístupnost (Kour et al. 2021). Tato široká škála bakterií, hub a endofytů má schopnost solubilizovat (rozpouštět) anorganické i organické formy fosforu prostřednictvím produkce široké palety metabolických produktů (Adhya et al. 2015; Kour et al. 2021).

### 3.3.3 Fosfor mobilizující bakterie

Množství bakterií mobilizující fosfor může být v půdě podle odhadů 1-50 % z celkové příslušné populace. Pro porovnání u hub se jedná pouze o 0,1-0,5 % (Zaidi et al. 2009). Tyto bakterie v porovnání s rostlinami disponují větším počtem mechanismů, které umožňují fosfor zpřístupnit. Jedná se o produkci anorganických a organických kyselin (Rodríguez & Fraga 1999) a snižování pH produkcí protonů ( $H^+$ ). Primárně mineralizují organické formy pomocí extracelulárních enzymů, které v závislosti od pH půdy budou buď kyselé nebo alkalické povahy (Ragot et al. 2017). Známé bakterie, které ovlivňují příjem fosforu rostlinami zahrnují rody *Bacillus* (Ramesh et al. 2014), *Rhizobium* (Chabot et al. 1996) a další (Billah et al. 2019).

Nassal et al. (2018) provedli experiment s bakterií *Pseudomonas sp.* ve skleníku na rostlince rajčete (*Solanum lycopersicum*), při kterém bakterii naočkovali do půdy s nízkou zásobou fosforu potřebného k dosažení úspěšného klíčení rostlin. Působením bakterie byl pozorován: a) vyšší příjem fosforu rostlinami, b) vyšší mikrobiální aktivita v půdě a c) zlepšení růstu rostlin.

### 3.3.4 Fosfor mobilizující mikroskopické houby

Rostliny jsou schopny bez pomoci mikroorganismů získávat fosfor z půdy pouze v blízkosti kořenů nebo kořenového vlásení. Vznikem symbiózy s mikroskopickými houbami se tento prostor rozšiřuje dále od kořenů a vzniká prostor společný označovaný jako mykorhizosféra. Ta v závislosti od propojení může tvořit ektomykorhizní symbiózu nebo arbuskulární mykorhizní symbiózu (Priyadharsini et al. 2016).

Ektomykorhiza zahrnuje kolem 2 % všech rostlinných druhů, převážné však dřevin, u nichž houby umožňují hostiteli přijímat vodu a živiny. Tyto látky pronikají přes hyfy do mezibuněčného prostoru kořene anebo se koncentrují na povrchu kořenů (Kafle et al. 2019). Ektomykorhizy jsou schopny mobilizovat fosfor z anorganických zdrojů pomocí vylučování organických kyselin, například kyseliny šťavelové (Tunlid et al. 2016) anebo organických zdrojů pomocí enzymů fosfatáz (Antibus et al. 1992).

Arbuskulární mykorhizní symbióza zahrnuje houby, které tvoří symbiotickou asociaci s více než 70 % druhů suchozemských rostlin včetně agronomicky důležitých plodin jako jsou obiloviny a luštěniny (Wang & Qiu 2006; Smith & Smith 2011). U této formy symbiózy hyfy

hub pronikají přímo do buněk kořenů rostlin, kde vytvářejí takzvané arbuskuly, případně vezikuly tvořené shluky nebo svazky hyf. I v tomto případě jsou hyfy schopné extrahovat fosfor z jeho nedostupných forem (Kafle et al. 2019).

Jak u ektomykorhizní tak u arbuskulární mykorhyzy hostitelská rostlina poskytuje houbám na oplátku zdroj živin ve formě cukrů a lipidů (Kiers et al. 2011).

I když by bylo logické předpokládat, že významné fosfor mobilizující mikroskopické houby budou řazeny do těchto skupin, mnoho autorů označuje jako efektivnější kmeny z rodů *Penicillium*, *Aspergillus* anebo *Trichoderma* (Sharma et al. 2013; Kishore et al. 2015; Vassileva et al. 2022). Tyto nejsou řazeny mezi mykorhizy a je pro ně charakteristická schopnost produkce rozmanité škály metabolitů, schopných mobilizovat fosfor. Tyto druhy jsou schopné kolonizovat různorodá stanoviště (mnohdy extrémní) a nevyžadují přítomnost symbiotické rostliny jelikož jsou řazeny mezi heterotrofní saprotrofy (Houbraken & Samson 2011), čili energii získávají rozkladem odumřelé organické hmoty.

### 3.3.5 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* je mikroskopická houba z oddělení askomycety (Baker 2006), které jsou druhově nejpočetnějším kmenem hub (známo 66 tisíc druhů) a rozmnožují se nepohlavně konidiiemi se spóry uvnitř útvaru zvaného askus (vřecko) (Bennett Richard & Turgeon 2016; Jablonský et al. 2019). V životním prostředí je všudypřítomná (vyskytuje se v půdě i ve vodě) a díky své potenciální patogenitě a produkcí ochratoxinu A může být pro lidi nebezpečná (Baker 2006; Nielsen et al. 2009; Phoebe 2018). Lze se s ní setkat i v domácnostech na potravinách i na stěnách či předmětech, typicky v podobě „černé plísně“. Je rovněž ekonomicky důležitá zejména jako fermentační organismus používaný k průmyslové produkci kyseliny citrónové. Ta představuje jeden z nejúčinnějších a bilančně nejvýtečnějších bioprocusů, které se v současnosti používají. Jako běžná součást mikrobiálních společenstev hraje *A. niger* v půdách také významnou roli v globálním uhlíkovém cyklu. Je půdní saprobou se širokou řadou hydrolytických a oxidačních enzymů, které se podílejí na rozkladu rostlinné lignocelulózy a také produkuje různé enzymy, které jsou důležité i pro průmysl (Baker 2006).

Především díky schopnosti vytvářet množství metabolických produktů (například kyseliny šťavelové a citrónové) může přispívat k výživě rostlin. Yin et al. (2015) izolovali *A. niger* a *Penicillium oxalicum*, díky kterým došlo ke zvýšení dostupnosti fosforu, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou produkcí organických kyselin houbami do vápenité půdy a její následnou acidifikací (Yin et al. 2015). Produkce těchto kyselin je pro *A. niger* životní strategií jak získat fosfor pro svůj růst (Nascimento et al. 2021). Studie od Nascimento et al. (2021) ukazuje, že v *in vitro* pokusech po dlouhodobé adsorpci fosforu v půdě může být fosfor uvolněn pomocí organických kyselin této houby. Ta uvolňovala fosfor v množství převyšujícím její vlastní potřebu, což naznačuje, že může pozitivně přispět k výživě rostlin. Procento získaného fosforu po 40 dnech kontaktu s půdou se pohybovalo mezi 18 a 32 %, což ukazuje, že houba a vybrané metabolity mohou zvýšit dostupnost fosforu částečným zvrácením adsorpce. Mendes et al. (2022) zkoušeli nechat reagovat přímo abiotickou kyselinu šťavelovou s fosfátovou horninou, konkrétně apatitem a extrahovali přibližně 73 % fosforu, kdy se většina fosforu uvolnila za méně než hodinu. Pro porovnání nechali fosfátovou horninu reagovat i s biotickou (mykogenní) kyselinou šťavelovou z *A. niger*, kde byla extrakce 57 % . Naproti

tomu při vynechání pufru v živém médiu při kultivaci *A. niger* bylo rozpuštěno téměř 100 % fosforu obsaženého v hornině (Mendes et al. 2022). Tian et al. (2021) zkoumali rozdíl mezi uvolňováním fosforu z fosforečnanu vápenatého a železitého pomocí této houby. Množství uvolněného fosforu bylo jednak o dost vyšší z fosforečnanu vápenatého, a druhak autoři dále zjistili, že forma fosfátů samotného ovlivňuje rozsah produkce kyselin. U obou forem fosfátů se však ukázal na mobilizaci fosforu dominantnější vliv kyseliny šťavelové. (Tian et al. 2021).

Schopnost mobilizovat fosfor pomocí *A. niger* nalezneme dále například v experimentu od Xiao et al. (2013). Kultivace trvala 5 dní na agarovém médiu a 2 měsíce v květináčích. Největšího růstu dosahovala houba při pH 6-7. Významně vyšší aktivita mobilizovat fosfor byla při nižším pH. Teplota 30 °C nejvíce podporovala růst houby. Zasolení nad 0,5 % NaCl snižovalo schopnost mobilizovat fosfor kvůli nepříznivým osmotickým podmínkám. Houba úspěšně po 5 dnech mobilizovala fosfor z nerozpustného fosforečnanu vápenatého na agarovém médiu. V květináčích s polní půdou byl výrazně vyšší růst rostlin o 36,8 % v porovnání s kontrolou a zvýšil se i příjem fosfátů pšenice, kde bylo pozorováno o 40,9 % zvýšení akumulace fosfátů v rostlinách oproti kontrole. Tato houba v pokusu se pšenicí způsobila zjevné snížení pH půdy v porovnání s půdou neočkovanou (Xiao et al. 2013).

Nejsou to ale pouze organické kyseliny, pomocí nichž je zmiňovaná houba schopna rozpouštět fosfátové minerály. Významnou roli hrají extracelulární enzymy, jako je fytáza a fosfatáza (Din et al. 2019). Účinnost této enzymatické aktivity měřili Din et al. (2019) v polním pokusu, zvláště s *A. niger* a *Azotobacter* (bakterie), na podporu fixace dusíku a také v kombinaci těchto dvou mikroorganismů. Zvýšení kvality růstu pozorovali oproti kontrole u *A. niger* i *Azotobacter*. Avšak nejvýznamnější zlepšení nastalo až při ošetření jejich kombinací (Din et al. 2019).

### 3.3.6 Mechanismy mikrobiální mobilizace fosforu

Dynamika fosforu v půdě závisí na rozpouštění a srážení, sorpci a desorpci a vzájemné přeměně mezi organickými a anorganickými formami fosforu (Sims & Pierzynski 2005). Tyto procesy ovlivňují v půdě fosfor mobilizující mikroorganismy prostřednictvím mineralizace, mobilizace a imobilizace, které jsou řízeny dostupnými anorganickými minerály v půdě. Hlavní strategie pro rozpouštění fosfátů u těchto mikroorganismů zahrnuje exsudaci organických kyselin, protonů a sideroforů, extracelulárních enzymů; a v důsledku mineralizace organického substrátu (Rawat et al. 2021). Anorganické fosfáty, které snadno reagují s kationty železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ), hliníku ( $\text{Al}^{3+}$ ) a vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) za vzniku nerozpustného komplexu, jsou mobilizovány především organickými kyselinami (Ameen et al. 2019). Mezi tyto kyseliny patří, například, kyselina citrónová, glukonová, šťavelová a vinná. Ty chelatují kationty, které jsou vázané na fosfát a zpřístupní  $\text{PO}_4^{3-}$  anebo zprostředkují jeho vytlačení ze sorpční pozice působením aniontu organické kyseliny (Duebel et al. 2000).

Dále snižují rhizosférické pH prostřednictvím výměny plynů ( $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$ ) a rovnováhou protonů a hydrogenuhličitanu, čímž uvolňují vázaný fosfor (Kim et al. 1997) anebo zapříčiní okyselení a uvolnění fosfátů z komplexů substitucí protonů za kationty např.  $\text{Fe}^{3+}$  (Goldstein 1994). Do extracelulárního prostoru jsou organické kyseliny transportovány buď pasivním transportem, které závisí na permeabilitě membrány a pH cytosolu (Casal et al. 2008) nebo aktivním transportem ve směru elektrochemického gradientu zprostředkovaným vylučováním



H<sup>+</sup> cytoplazmatickými H<sup>+</sup>-ATP-ázami (Badri & Vivanco 2009). Většina organismů udržuje pH cytosolu blízko neutrální oblasti nezávisle na okolním prostředí, například pH 7,55 najdeme v hyfách mikroskopické vláknité houby *A. niger* (Dollard & Billard 2003). Proto organické kyseliny opouštějí buňku jako disociované anionty (rozštěpené, záporně nabitě částice). Za acidifikaci bezprostředního okolí organismu v půdě proto odpovídá kotransport H<sup>+</sup>, který zajišťuje zmiňovaný pozitivní gradient při uvolňování aniontů organických kyselin z cytosolu buněk. Skutečnost, že organické kyseliny opouštějí buňku jako disociované anionty, znamená, že budou mít spíše tendenci chovat se jako zásada a vychytávat volně H<sup>+</sup> z půdy, v důsledku čehož bude docházet ke zvyšování pH (Hinsinger et al. 2003). Jiným způsobem, jakým organické kyseliny mohou ovlivňovat změnu půdního pH, je mikrobiální indukovaná dekarboxylace organických kyselin, která rovněž vede ke spotřebě H<sup>+</sup>. V této souvislosti byl pozorovaný nárůst půdního pH o 0,85 oproti kontrole ( $P < 0,001$ ) během rozkladu citranu nebo jablečnanu (Yan et al. 1996).

Sorpce organických kyselin na tuhou fázi půd se uskutečňuje díky reaktivní karboxylové skupině velmi rychle, v řádu minut (Jones & Brassington 1998). Na sorpci organických kyselin má významný vliv především mineralogické složení půd a jejich chemické vlastnosti (Fujii et al. 2010). Fujii et al. (2010) zjistili rostoucí adsorpční kapacitu citranu, šťavelanu a octanu s množstvím amorfních (nepravidelně uspořádaných) Al- nebo Fe- oxohydroxidů na různé typy půd. Účinnost vázání organických kyselin na půdní složky ovlivňuje jejich difúzi do půdních roztoků a migraci v půdním profilu. Slabě vážící kyseliny mohou migrovat více jak 5 mm od kořenů rostlin (Darrah 1991), většina však bude imobilizována již ve vzdálenosti 1 mm (Jones et al. 1996). Anionty organických kyselin jsou schopny vytlačovat některé živiny ze sorpčních míst na půdních koloidech (Bao et al. 2011). Tyto anionty budují konkurenční vztah o sorpční místa s jinými záporně nabitými živinami v půdě. Z toho důvodu vyvolává vylučování organických kyselin v půdě desorpce těchto živin nebo omezuje jejich mobilizaci v důsledku navázání na půdní složky (Jones & Brassington 1998; Jones & Edwards 1998). Sorpce organických kyselin také ovlivňuje míru fixace organického uhlíku a tvorby CO<sub>2</sub> (Oburger et al. 2009), protože značný podíl těchto kyselin podléhá v půdách mineralizaci (Fujii et al. 2010).

## 4 Metodika

V diplomové práci bylo použito celkem 6 vzorků půdy z různých lokalit na území České republiky. Z toho 5 vzorků bylo odebráno ze zemědělsky využívaných půd a 1 vzorek z lesní půdy. Do vybraných půd byla následně v laboratoři inokulována mikroskopická vláknitá houba *A. niger* a kultivována při stabilní teplotě a vlhkosti po dobu 6 a 12 týdnů. Po ukončení kultivace bylo ve vzorcích stanoveno pH, změny obsahu dostupného fosforu extrahovatelných vodou a dle Mehlicha III.

### 4.1 Charakteristika vybraných půd, úprava půdních vzorků

V tabulce 1 vidíme detailnější charakteristiky vybraných půd, které byly pro diplomovou práci vybrány.

Vzorky byly usušeny v sušárně při 40 °C do dosažení konstantní hmotnosti a sítováním byla získána frakce <2 mm, která byla následně použita při experimentech.

Lokalita	Půdní typ	Zrnitost	Ps (%)	Jl (%)	Pch (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	Využití
<b>Brdy</b>	kambizem	hlinitý písek	77	5	19	x	smrkový les
<b>Brumovice</b>	černozem typická	prachovitá hlína	28	14	58	x	zemědělství
<b>Cítov</b>	hnědozem typická	písčítá hlína	75	13	12	0,8	
<b>Kosova hora</b>	hnědozem typická	hlinitá půda	34	9	57	x	
<b>Suchdol</b>	černozem karbonátová	hlinitá půda	44	8	48	20,5	
<b>Vidim</b>	hnědozem typická	prachovitá hlína	18	24	58	x	

Ps – písek, Jl = jíl, Pch = prach; x = zanedbatelný obsah (<0,25 %)

Brdy (Čermák 2021), Brumovice (Zádorová et al. 2015), Cítov (zdroj vlastní), Kosova hora (Zádorová et al. 2023), Suchdol (Kodešová et al. 2016), Vidim (Zádorová et al. 2015).

### 4.2 Stanovení maximální kapilární kapacity a retenční vodní kapacity

Aby bylo možné simulovat podmínky podobné skutečné půdě, bylo nutné zajistit přísun vody, který by neměl za následek vznik anaerobních podmínek a umožnil transport plynů. Pro tyto účely musela být v přesítovaných vzorcích určena maximální kapilární vodní kapacita (dále pouze  $\theta_{MKK}$ ) a retenční vodní kapacita (dále pouze  $\theta_{RVK}$ ).

$\theta_{MKK}$  charakterizuje schopnost půdy zadržet vodu využitelnou pro vegetaci, pro kterou je charakteristická neustálenost. V důsledku gravitační tíhy může voda profilem putovat, neboť převyšuje peristaltický tlak v kapilárách mezi částicemi půdy.

$\theta_{RVK}$  už není ovlivněna gravitační silou, nýbrž pouze kapilárními silami a její hodnota udává množství ustálené vody v pórech, která v reálné půdě odpovídá procentuálnímu zastoupení kapilárních pórů, jež vedou vodu proti gravitaci (Valla et al. 2000).

Při stanovování  $\theta_{MKK}$  a  $\theta_{RVK}$  u přesítovaných vzorků půdy bylo postupováno obdobně jako při stanovování u neporušeného vzorku pomocí Kopeckého válečků (Valla et al. 2000). Pouze s tím rozdílem, že válečky byly naplněny půdou až v laboratoři. Na analytických váhách byly zváženy prázdné Kopeckého válečky s hodinovým sklem a malým filtračním papírem. Dále byl na sytící podložku v tácu položen arch filtračního papíru, na který se položily válečky. Ty se pak naplnily přesítovanou půdou až po okraj a zakryly hodinovým sklíčkem. Tác se nakonec podlil vodou, aby nezasahovala po válečky, ale pouze vzlínala přes filtrační papíry do půdy. Běžně se toto stanovení s přesítovanou půdou neurčuje, pro potřeby experimentu však bylo potřebné použít homogenizovanou frakci  $< 2$  mm, pro níž by se reálné hodnoty  $\theta_{MKK}$  a  $\theta_{RVK}$  nevztahovaly, protože úpravou půdy původní póry zanikly.

Válečky se nechaly sytit vodou do úplného nasycení, které indikovalo orosení hodinového sklíčka, kdy byly následně zváženy. Tím byla určena maximální nasáklivost konkrétního vzorku. Válečky se umístily následně na 4 vrstvy filtračního papíru, čímž byl simulován přirozený přestup, podobně jako v přirozených podmínkách půdy. Na Obrázku 1 můžeme vidět příklad odsávání vody z Kopeckého válečků.



Obrázek 1: Příklad odsávání vody z Kopeckého válečků (zdroj vlastní).

Válečky se podle platného postupu každých 5, 30, 120 minut a 24 hodin zvážily a následně se umístily na 4 nové vrstvy filtračního papíru. Po posledním vážení byly válečky sušeny při 105 °C až do dosažení konstantní hmotnosti. Hmotnost suché půdy byla zjištěna po vychladnutí (Valla et al. 2000).

Výpočet  $\theta_{\text{MKK}}$  a  $\theta_{\text{RVK}}$  byl proveden podle vzorců uvedených níže:

$$\theta_{\text{MKK}} [\% v/v] = \frac{G_D - G_F}{\text{objem Kopeckého válečku}} * 100$$

$$\theta_{\text{RVK}} [\% v/v] = \frac{G_E - G_F}{\text{objem Kopeckého válečku}} * 100$$

$G_D$  – hmotnost válečku po 2 hodinách odsávání

$G_E$  – hmotnost válečku po 24 hodinách odsávání

$G_F$  – hmotnost válečku po vysušení

objem Kopeckého válečku = 100 cm<sup>3</sup>

#### 4.3 Příprava vzorků na kultivaci, inokulace půdy spórami *A. niger* a jeho použitý kmenový druh

Zkumavky byly předem provrtány ve spodní části 2 mm vrtákem. Aby půda nepropadávala, bylo dno ucpáno skelnou vatou. Díky tomu mohla voda i vzduch volně migrovat v celém objemu půdy. Do takto připravených zkumavek bylo naváženo přesně 6,0 g půdy a poté byly bez víčka zváženy. To bylo nezbytné, aby bylo během experimentu možné půdu zalévat správným množstvím vody. Pro každou půdu byla v průběhu experimentu zvolena 4 opakování s *A. niger* a 4 opakování byla rovněž pro kontrolu bez mikroskopické houby.

Očkování proběhlo v laminárním boxu podle zásad sterilní práce, aby se předešlo nežádoucí kontaminaci jinými druhy mikroorganismů. Pomocí inokulační kličky namočené do sterilní vody byly setřeny spóry *A. niger*, kultivované na Sabouroad dextroze agar (Himedia) po dobu 7 dnů. Klička se spórami se poté zanořila do půdy a ta byla intenzivně promíchána, aby byly spóry v půdě distribuovány v co největším objemu.

Následně byla pipetou přidána sterilní deionizovaná voda v objemu specifickém pro každý vzorek půdy, aby se dosáhla  $\theta_{\text{MKK}}$ . Zkumavky byly opět zváženy bez víčka, aby bylo během kultivace možné udržovat vlhkost vzorků v rozsahu vyšším než  $\theta_{\text{RVK}}$  a nižším než  $\theta_{\text{MKK}}$ . Tento vlhkostní režim zajišťoval pro buňky *A. niger* optimální podmínky růstu a současně díky gravitačnímu transportu podporoval difuzi plynů v půdě.

Zalité vzorky, byly přeneseny do kultivačního boxu, kde byly při stabilní teplotě 22,5 °C kultivovány 6 nebo 12 týdnů. Vzorky v kultivačním boxu ilustruje Obrázek 2. Táč s vodou na dně boxu umožnil udržovat stabilní vlhkost vzduchu a regulovat výpar ze vzorků. Víčka byla na zkumavkách pouze položena, aby byla dosažena rovnovážnost mezi tlaky, díky čemuž mohla voda prosakovat do půdy nebo se z ní odpařovat.

Aby bylo možné udržovat požadovanou vlhkost půdy, vzorky se v týdenních intervalech vážily, a v závislosti od hmotnosti se zalévaly požadovaným množstvím sterilní deionizované vody.



Obrázek 2: Vzorky v kultivačním boxu (zdroj vlastní).

Kmen *Aspergillus niger*, který byl použit v diplomové práci nese katalogové označení CBS 140837 a pochází ze sbírky Botanického ústavu Slovenské Akademie Věd v Bratislavě. Původně byl izolovaný z kontaminované půdy z oblasti bývalé těžby rtuti v Rudňanech na středním Slovensku (Urík et al. 2014).

#### 4.4 Úprava vzorků po kultivaci

Po skončení kultivace (po 6 a 12 týdnech) byly vzorky naposledy zvaženy. Půda se přenesla do Petriho misek a dala sušit do sušárny (Memmert) při teplotě 40 °C. Při tomto úkonu bylo vyzorováno, že půda obsahující *A. niger* měla tendenci držet více pohromadě, a bylo náročné přenést ji ze zkumavky, to je možné vidět na Obrázku 3 níže. Stejný efekt byl pozorován po 6 i 12 týdnech kultivace. Po vysušení se vzorky rozemlely v achátové třecí misce a vložily do popsaných sáčků.



Obrázek 3: Vzorky po 6 týdnech kultivace. Dole kontrolní půda a nahoře půda inokulována spórami *A. niger* (zdroj vlastní).

#### 4.5 Extrakce fosforu pomocí vody, stanovení aktivní půdní reakce a vodou mobilizovatelných prvků

Po vysušení byly 3,0 g vzorku naváženy do 50 ml centrifugačních zkumavek a zality 30 ml deionizované vody, aby byl dosažený extrakční poměr půdy k vodě 1:10 (Jackson 1958). Zkumavky se umístily na horizontální třepačku a byly třepány při 160 kmitech za minutu po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce byly vzorky ze třepačky vyjmuty a ponechány volně sedimentovat. Po uplynutí 1 hodiny se se získanými extrakty dále pracovalo.

Následně proběhlo zkalibrování pH metru pomocí pH pufrů (pH 4, 7 a 10). Značka pH metru (Multi 3620 IDS), elektroda (pH Electrode SenTix 940).  $pH_{H_2O}$  bylo změřeno s přesností na dvě desetinná místa.

Vzorky po změření pH byly následně přefiltrovaly přes membránový filtr s velikostí 0,45  $\mu\text{m}$  (VWR, Nylon) a následně analyzovány pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) iCap 7000 (Thermo). Prvková analýza proběhla stejný den extrakce, aby nedošlo k vysrážení jeho složek. Část těchto vzorků byla rovněž využita na stanovení obsahu organických kyselin pomocí iontové chromatografie.

#### 4.6 Extrakce dostupných prvků podle Mehlich III

Metoda Mehlich III je postup extrakce, která je použitelná pro řadu prvků. Extrakt se skládá z 0,2 mol/L<sup>-1</sup> ledové kyseliny octové, 0,25 mol/L<sup>-1</sup> dusičnanu amonného, 0,015 mol/L<sup>-1</sup> fluoridu amonného, 0,13 mol/L<sup>-1</sup> kyseliny dusičné a 0,001 mol/L<sup>-1</sup> EDTA (kyseliny ethylendiamintetraoctové). Tato extrakce se nejčastěji používá pro stanovení makroživin (fosfor, vápník, hořčík a draslík) a mikroživin (měď, zinek, mangan a železo). Mehlich III vysoce koreluje s rostlinným příjmem fosforu, a proto se považuje za standardní metodu pro

stanovení jeho rostlinám dostupného typu. Pro extrakci podle Mehlich III byla využita vysušená půda, po určení vodou extrahovatelných prvků, která byla rozdrvena skleněnou tyčinkou. Extrakce probíhala za využití extrakčního poměru 1:10 podobně jako při extrakci vodou. Vzorky byly extrahovány na rotační třepačce Multi Bio RS – 24 (Biosan) při 20 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a následně centrifugovány 10 minut při 4000 otáčkách za minutu.

Po centrifugaci byly vzorky přefiltrovaly přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (VWR, Nylon). Z filtrovaného roztoku byl pipetováním odebrán 1 mL a přenesen do zkumavek s 9 mL deionizované vody. Pomocí ICP-OES byl v těchto 10násobně zředěných roztocích stanoven obsah prvků. Analýza proběhla dle standardního postupu maximálně do tří hodin od extrakce.

#### **4.7 Extrakce vzorků pomocí $\text{BaCl}_2$ , stanovení výměnného pH a výměnných kationtů**

Během extrakce v  $\text{BaCl}_2$  bylo podle standardního metodického postupu (Cools & De Vos 2010) do 15 ml centrifugačních zkumavek naváženo 1,0 g vzorku a zalito 12 ml 0,1 mol/L roztoku  $\text{BaCl}_2$  (Cools & De Vos 2010). Princip této metody spočívá v nasycení sorpčního komplexu přebytkem kationtu Barya ( $\text{Ba}^{2+}$ ) a vytěsnění sorbovaných kationtů z půdy do roztoku. Vzorky byly následně na rotační třepačce Biosan – Multi Bio RS - 24 extrahovány při 20 otáčkách za minutu po 2 hodiny. Po ukončení extrakce byly následně vloženy do centrifugy při 4000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. S takto připravenými vzorky bylo dále nakládáno.

V návaznosti na proběhlé úkony bylo učiněno zkalibrování pH metru pomocí pH pufrů (pH 4, 7 a 10). Značka pH metru (Multi 3620 IDS), elektroda (pH Electrode SenTix 940). Změřilo se  $\text{pH}_{\text{BaCl}_2}$  s přesností na dvě desetinná místa.

Dále se vzorky přefiltrovaly přes stříkačkový membránový filtr s póry menšími než 0,45  $\mu\text{m}$  (VWR, Nylon). Do zkumavek byl pipetováním přenesen 1 mL filtrovaného roztoku ke kterému bylo přidáno 9 mL deionizované vody. V těchto 10násobně zředěných roztocích byl stanoven obsah prvků. K tomuto účelu bylo opět využito ICP-OES.

## 5 Výsledky

### 5.1 Změny pH půdy

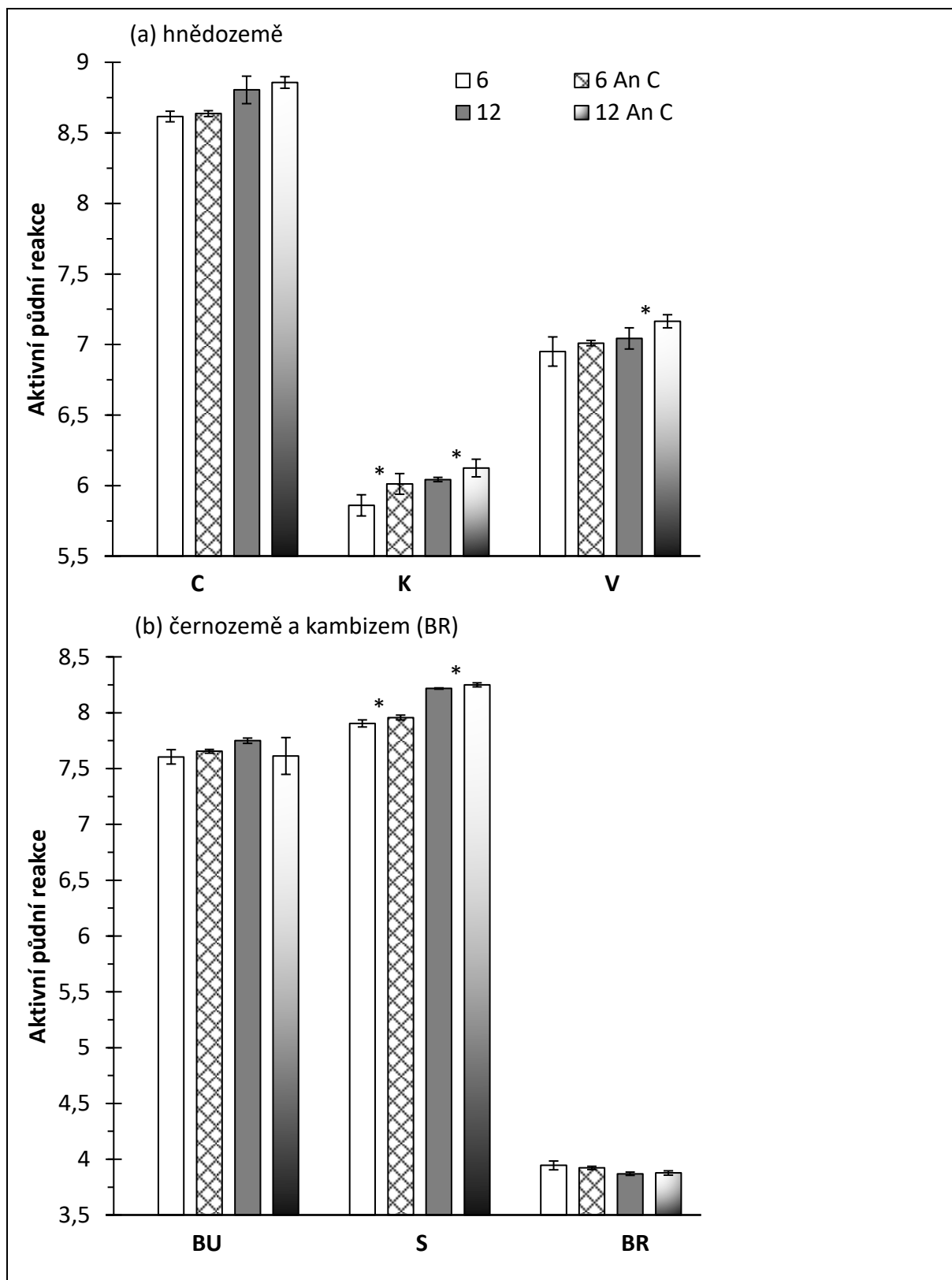
Na grafu 1(a) hnědozemě pozorujeme vyšší hodnotu aktivní půdní reakce  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u vzorků s *A. niger* oproti kontrole u všech vybraných půd. Z téhož grafu jsou dále celkově vidět vyšší hodnoty  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  ve 12 týdnech kultivace oproti 6 týdnům. Statisticky významně vyšší  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u vzorků s kultivovanou houbou bylo naměřeno u půdy Kosova hora jak v 6 týdnech kultivace (kontrola 5,86 a *A. niger* 6,01), tak ve 12 týdnech (kontrola 6,04 a *A. niger* 6,13). V případě půdy Vidim bylo statisticky významné měření ve 12 týdnech ( $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u kontroly 7,04 a *A. niger* 7,17).

Z grafu 1(b) černoze země a kambizem (BR) vidíme statisticky významné zvýšení  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u vzorků s houbou pouze v případě půdy Suchdol v 6 i 12 týdnech. Toto zvýšení bylo <0,05 setin jednotek. V 6 týdnech bylo  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  (u kontroly 7,91 a *A. niger* 7,96) a ve 12 týdnech (u kontroly 8,22 a *A. niger* 8,25). Půda Brumovice měla u kontroly v 6 týdnech a u *A. niger* ve 12 týdnech velký rozptyl a nelze ji jednoznačně hodnotit. Bylo zde však v 6 týdnech naměřeno vyšší  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u *A. niger* oproti kontrole, později ve 12 týdnech byly měřeny nižší hodnoty u vzorků inokulovaných houbou.

U kambizemě Brdy, která měla  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} < 4$  jednotky jsme naměřili (u kultivované houby v 6 týdnech 3,92 a u kontroly 3,95). Ve 12 týdnech byl rozdíl mezi houbou a kontrolou nevýznamný (<0,01 jednotky).

U půd typu hnědozemě a černoze země bylo měřeno ve 12 týdnech vyšší  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  v porovnání s 6 týdny (výjimkou je zde pouze vzorek u půdy Brumovice s *A. niger* ve 12 týdnech. Například u hnědozemí měla již zmíněná půda Kosova hora (u kontroly v 6 týdnech 5,86 a ve 12 týdnech 6,04). U černoze země bylo pozorováno u půdy Suchdol (v 6 týdnech u kontroly 7,91 a ve 12 týdnech 8,22). Pouze u těchto zmíněných půd bylo měření v 6 i 12 týdnech statisticky významné. Naopak nižší naměřené  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  ve 12 týdnech oproti 6 týdnům nalezneme pouze u typu kambizem, půda Brdy (kontrola v 6 týdnech 3,92 a ve 12 týdnech 3,87).





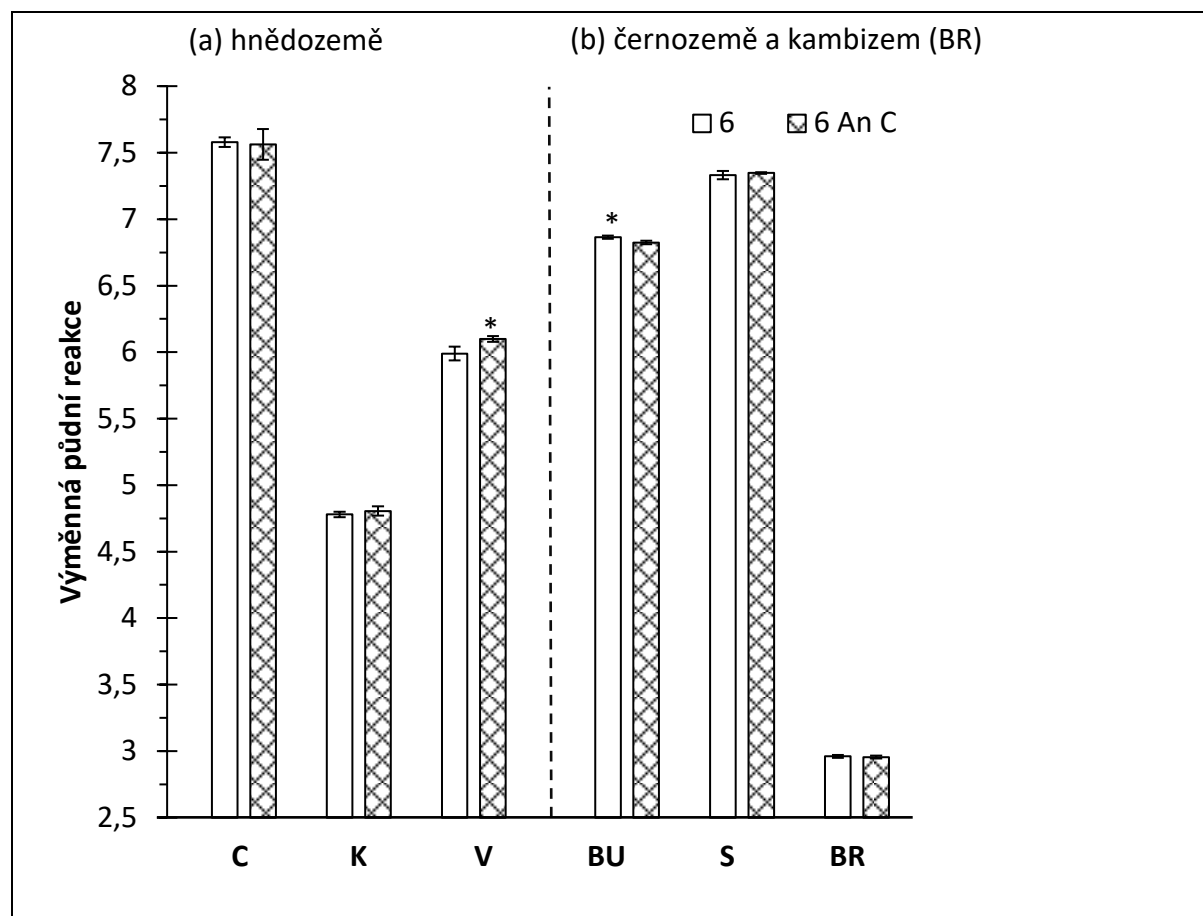
Graf 1(a),(b): Změny aktivní půdní reakce ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$

Změny výměnné půdní reakce  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  můžeme vidět na grafu 2(a) hnědozemě a (b) černozemě a kambizem (BR). Z důvodu poruchy přístroje máme však k dispozici výsledky pouze z 6 týdnů kultivace. Statisticky významné měření nalezneme u dvou půd, vyšší hodnotu  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  u *A. niger* v porovnání s kontrolou je u půdy Vidim (5,99 u kontroly a 6,10 u *A. niger*). Naopak nižší naměřené  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  u použité houby máme v případě půdy Brumovice (kontrola 6,87 a *A. niger* 6,83). U půdy Brdy bylo naměřeno stejné  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  u kontroly i vzorku s houbou. Půdy Cítov, Kosova hora a Suchdol měly hodnoty  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  velmi podobné mezi *A. niger* a kontrolou (rozdíl max. 0,03 jednotky pH).



Graf 2(a),(b): Změny výměnné půdní reakce ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

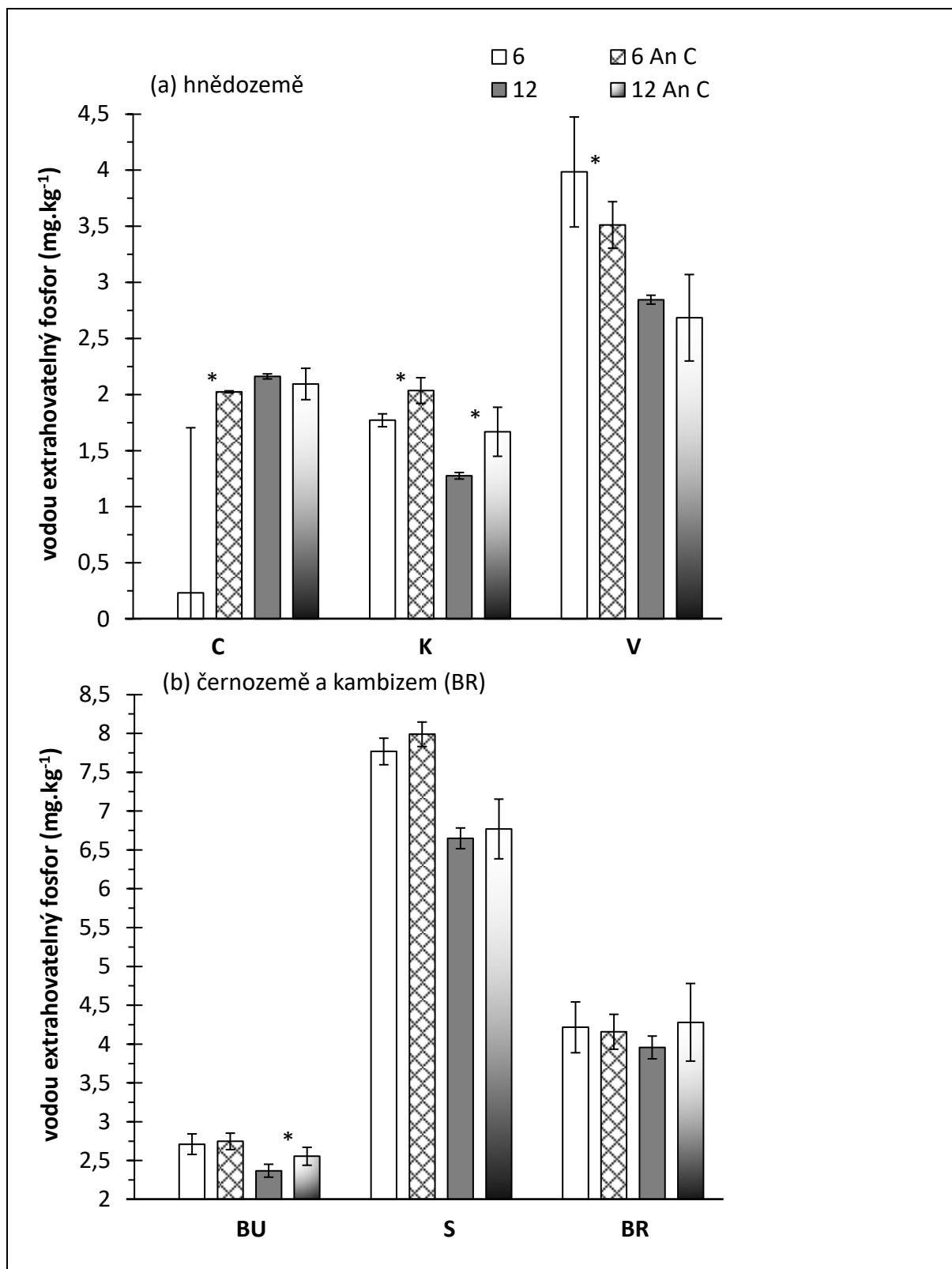
An C – přidání *A. niger*, \* – statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$

## 5.2 Obsah vodou extrahovatelného fosforu

Množství vodou extrahovatelného fosforu pro hnědozemě nalezneme v grafu 3(a). Nejmenší množství vyšlo u půdy Cítov v 6 týdnech u kontroly ( $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) a u mikroskopické houby ( $2,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Ve 12 týdnech bylo však naměřeno mírně nižší množství u *A. niger* oproti vzorku kontrolnímu. Půda Kosova hora měla jak 6 týdnech, tak 12 týdnech statisticky významně vyšší množství fosforu u houbou inokulovaných vzorků. Kontrola v 6 týdnech ( $1,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) a *A. niger* ( $2,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), kontrola ve 12 týdnech ( $1,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) a *A. niger* ( $1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Nejvyšší množství vodou extrahovatelného fosforu bylo naměřeno u kontrolního vzorku půdy Vidim v 6 týdnech kultivace ( $4,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), významně ( $p < 0,05$ ) méně měl vzorek s *A. niger* ( $3,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Stejně tak bylo naměřeno u této půdy vyšší množství fosforu u kontroly ve 12 týdnech. Nutno ale dodat, že zde nalezneme větší směrodatnou odchylku u vzorku s *A. niger*.

Na grafu 3(b) černozemě a kambizem (BR) pozorujeme u půdy Brumovice v 6 týdnech kultivace mírně vyšší množství fosforu u přidané houby v porovnání se vzorkem kontrolním. Statisticky významně naměřené množství máme až ve 12 týdnech u kontroly ( $2,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) a u vzorku s přidanou mikroskopickou houbou ( $2,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Půda Suchdol vykazuje také vyšší naměřené množství u *A. niger* v porovnání s kontrolou, a to jak v 6, tak 12 týdnech. U půdy Brdy bylo naměřeno u vzorku s houbou v 6 týdnech mírně nižší množství fosforu oproti kontrole a naopak ve 12 týdnech mírně vyšší množství. Nalezneme zde ale větší směrodatné odchylky.

Klesající trend naměřeného fosforu v čase, kdy máme extrahováno nižší množství fosforu ve 12 týdnech oproti 6 týdnům nalezneme jednoznačně u dvou hnědozemí (Kosova hora a Vidim) a u obou černozemí (Brumovice a Suchdol).



Graf 3(a),(b): Obsah vodou extrahovatelného fosforu ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

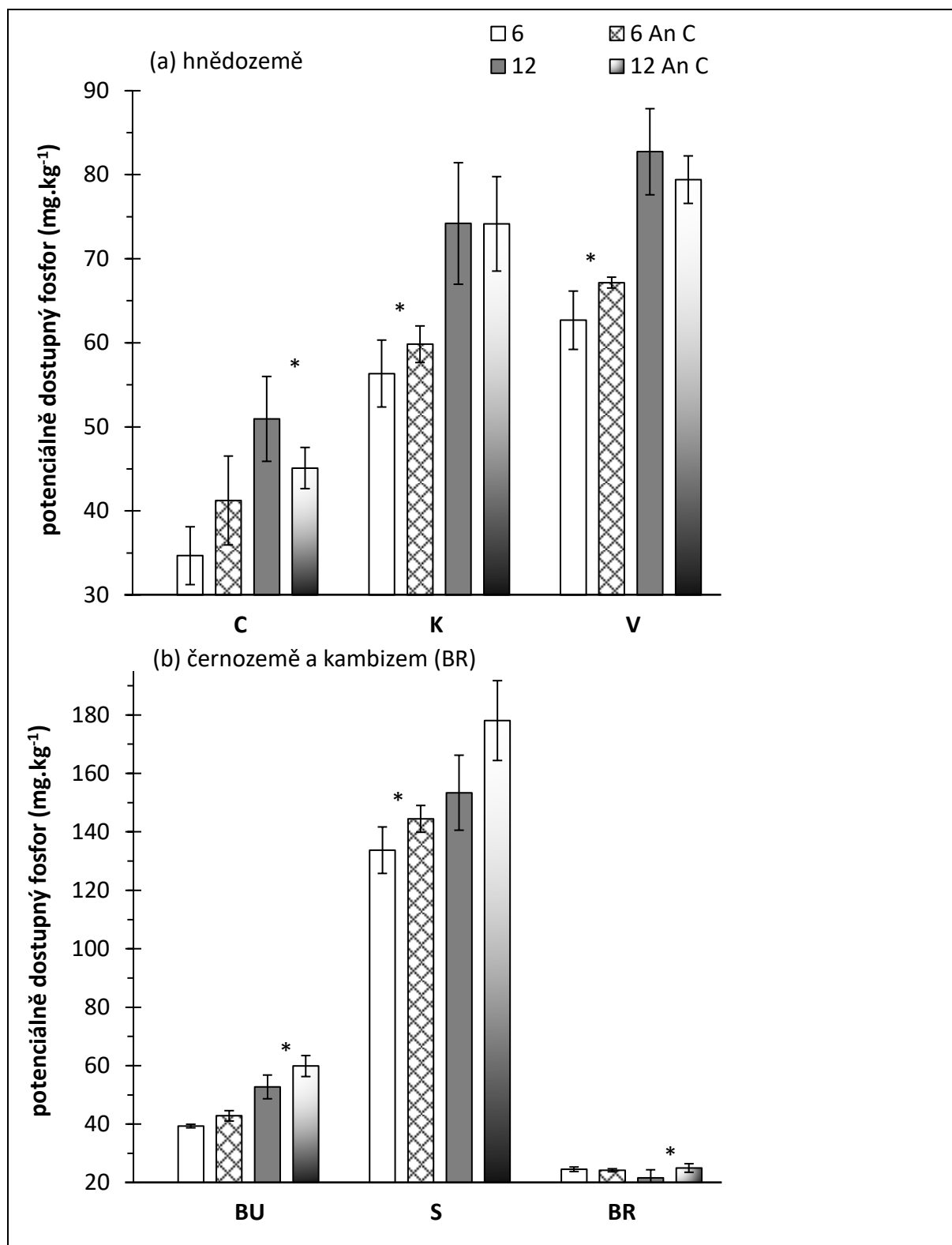
An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$

### 5.3 Stanovení množství fosforu metodou Mehlich III

Množství fosforu stanoveného metodou Mehlich III lze spatřit na grafu 4(a),(b). V případě grafu 4(a) hnědozemě můžeme vidět v 6 týdnech kultivace u všech vybraných hnědozemí naměřené vyšší množství fosforu u houby v porovnání s kontrolou. U půd Kosova hora a Vidim bylo toto měření statisticky významné. Kosova hora měla v 6 týdnech u mikroskopické houby 59,8 mg.kg<sup>-1</sup> fosforu a u kontroly 56,3 mg.kg<sup>-1</sup>, Vidim v 6 týdnech u *A. niger* obsahoval 67,2 mg.kg<sup>-1</sup> a u kontroly 62,7 mg.kg<sup>-1</sup>. Naopak ve 12 týdnech kultivace pozorujeme u všech hnědozemí opačný efekt, kdy u vzorků ošetřených houbou pozorujeme nižší obsahy fosforu v porovnání kontrolou. Statisticky významné měření máme pouze u půdy Cítov, a to u kontroly ve 12 týdnech 51,0 mg.kg<sup>-1</sup> fosforu, zatímco u vzorku s houbou to bylo 45,1 mg.kg<sup>-1</sup>.

Na grafu 4(b) vidíme u černozemí vyšší hodnoty naměřeného fosforu u inokulované půdy v porovnání s kontrolou jak v případě 6 tak i 12 týdnů. Zároveň pozorujeme zvýšení obsahu fosforu s délkou kultivace. Statisticky významné rozdíly nalezneme u půdy Brumovice ve 12 týdnech, kdy *A. niger* (59,9 mg.kg<sup>-1</sup>) zvýšil potenciální dostupnost proti kontrole (52,8 mg.kg<sup>-1</sup>). U půdy Suchdol měl v 6 týdnech významně méně ( $p < 0,05$ ) kontrolní vzorek (134 mg.kg<sup>-1</sup>) a *A. niger* (144 mg.kg<sup>-1</sup>). Ve 12 týdnech bylo u kontroly 154 mg.kg<sup>-1</sup> a kultivované houby 178 mg.kg<sup>-1</sup>.

Kambizem Brdy na grafu 4(b) vykazovala v 6 týdnech téměř stejné množství bez ohledu na ošetření půdy, zatímco ve 12 týdnech měření měl vzorek ošetřený houbou statisticky významně vyšší množství fosforu (25,0 mg.kg<sup>-1</sup>) oproti kontrole (21,6 mg.kg<sup>-1</sup>).



Graf 4(a),(b): Obsah fosforu měřený metodou Mehlich III ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$

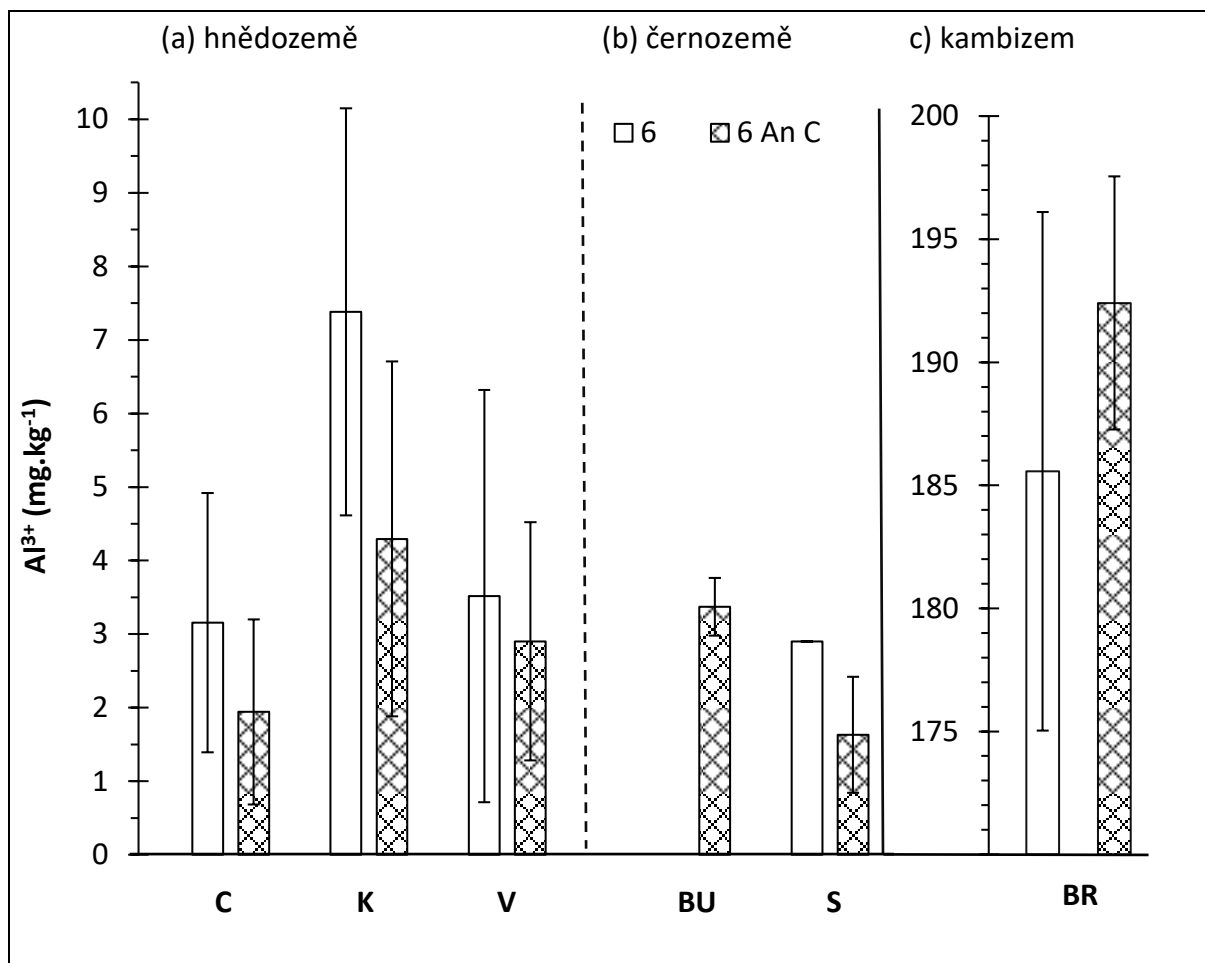
#### 5.4 Stanovení množství kationtů $\text{Al}^{3+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ca}^{2+}$ extrakcí $\text{BaCl}_2$

Množství vytěsněných kationtů ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ ) pomocí extrakce  $\text{BaCl}_2$  znázorňují následující grafy 5, 6 a 7. Kvůli poruše stroje na měření jsou k dispozici pouze výsledky z 6 týdne.

Všechny hnědozemě na grafu 5(a) vykazovaly nižší množství  $\text{Al}^{3+}$  u námi kultivované houby v porovnání s kontrolou. Kosova hora měla tento rozdíl největší, u kontroly ( $7,38 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a u kultivované houby ( $4,29 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

Stejně tak u černozemě Suchdol na grafu 5(b) bylo u *A. niger* naměřeno nižší množství  $\text{Al}^{3+}$  ( $1,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) oproti vzorku kontrolnímu ( $2,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Půda Suchdol měla u kontrolního vzorku platné pouze jedno měření, a proto zde není směrodatná odchylka. Údaj u kontrolního vzorku půdy Brumovice nebyl přístrojem naměřen, protože byl pod mezí kvantifikovatelnosti.

Největší množství  $\text{Al}^{3+}$  měla kambizem Brdy na samostatné stupnici grafu 5(c), kdy obsah u houby ( $192,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) převyšoval kontrolu ( $185,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Důsledkem směrodatné odchylky a relativně malého počtu vzorků není možné však určit významnost rozdílu.



Graf 5(a),(b): Množství kationtu hliníku  $Al^{3+}$  stanoveného extrakcí  $BaCl_2$  ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě a kambizem: BU – Brumovice, S – Suchdol

(c) kambizem: BR – Brdy

An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významné  $p < 0,05$

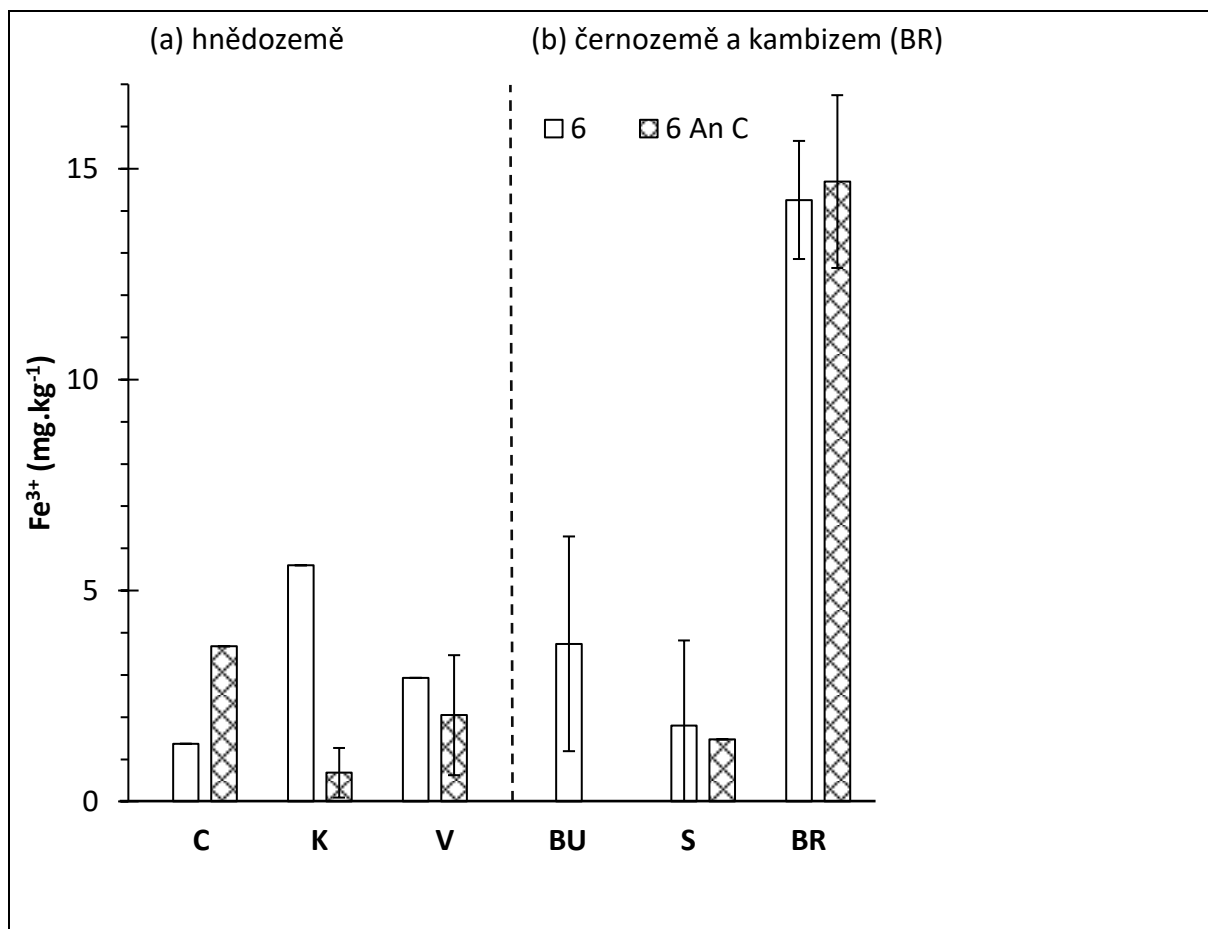
Na grafu 6(a),(b) je zobrazeno množství trojmocného kationtu železa ( $Fe^{3+}$ ) extrahovaného v  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $BaCl_2$ . Bylo zde hodně vzorků, kde máme platné pouze jedno měření a proto u nich není směrodatná odchylka. U vzorku půdy Brumovice s *A. niger* se nedal prvek změřit díky příliš nízkému obsahu.

Zatímco u hnědozemí Kosova hora a Vidim pozorujeme nižší množství  $Fe^{3+}$  v případě vzorku s *A. niger* u Cítova měla naopak vyšší množství  $Fe^{3+}$ . Kosova hora měla u kontroly u ( $5,60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a *A. niger* ( $0,70 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), Vidim u kontroly ( $2,93 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a použité houby ( $2,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), Cítov naopak u kontroly méně ( $1,37 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a *A. niger* ( $3,68 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

U Černozemě Suchdol na grafu 6(b) bylo naměřeno méně  $Fe^{3+}$  u houby ( $1,48 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a více u kontroly ( $1,80 \text{ mg.kg}^{-1}$ )

Kambizem Brdy měla celkově nejvyšší množství tohoto prvku z vybraných půd, významný rozdíl u použitého druhu houby ( $14,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a u kontroly ( $14,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) však nepozorujeme.





Graf 6(a),(b): Množství kationtu hliníku Fe<sup>3+</sup> stanoveného extrakcí BaCl<sub>2</sub> ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

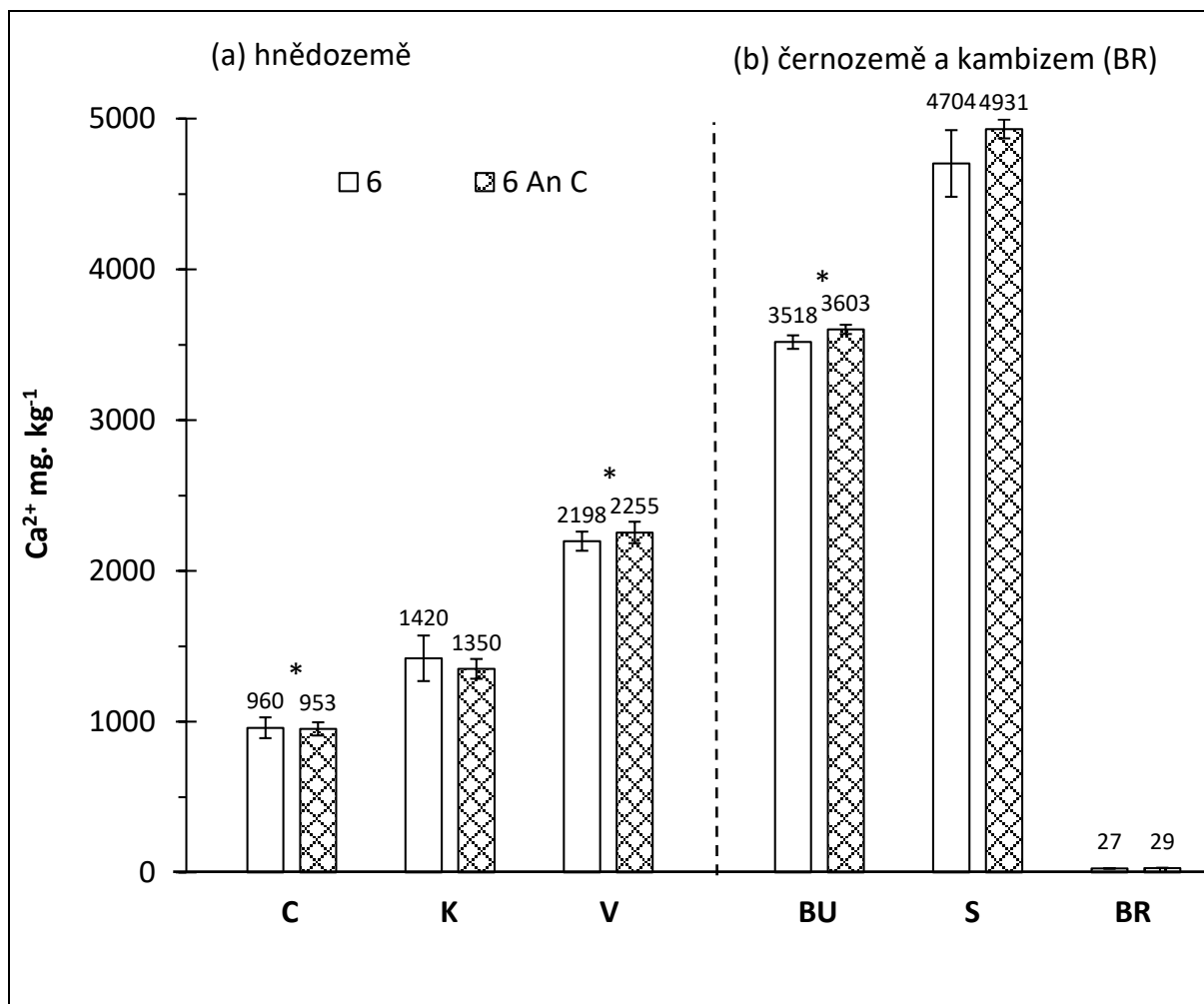
(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významné p < 0,05

Množství vytěsněného kationtu vápníku (Ca<sup>2+</sup>) je zobrazeno na grafu 7(a),(b). U hnědozemí Cítov a Kosova hora bylo naměřeno nižší množství vápníku u *A. niger*. U půdy Cítov byl rozdíl statisticky významný, ale činí pouze 7 mg.kg<sup>-1</sup>. Kosova hora měla tento rozdíl větší, u použité houby (1350 mg.kg<sup>-1</sup>) a u kontroly (1420 mg.kg<sup>-1</sup>). Hnědozem Vidim měla naopak u houby významně vyšší množství vápníku (2255 mg.kg<sup>-1</sup>) než u kontrolního vzorku (2198 mg.kg<sup>-1</sup>).

Pohledem na graf 7(b) vidíme u černozemí a kambizemě Brdy vyšší množství Ca<sup>2+</sup> opět u vzorků s houbou. U černozemě Brumovice bylo naměřeno statisticky významné zvýšení u *A. niger* (3603 mg.kg<sup>-1</sup>) oproti kontrole (3518 mg.kg<sup>-1</sup>). Suchdol měla také více u použité houby (4931 mg.kg<sup>-1</sup>) v porovnání s kontrolou (4704 mg.kg<sup>-1</sup>). Zároveň je to nejvyšší naměřené množství vápníku z vybraných půd. Nejmenší množství takto stanoveného vápníku bylo naměřeno u kambizemě Brdy, u *A. niger* (29 mg.kg<sup>-1</sup>) a u kontroly (27 mg.kg<sup>-1</sup>).



Graf 7(a),(b): Množství kationtu vápníku Ca<sup>2+</sup> stanoveného extrakcí BaCl<sub>2</sub> ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

An C – přidáný *A. niger*, \* – statisticky významné p < 0,05

## 6 Diskuse

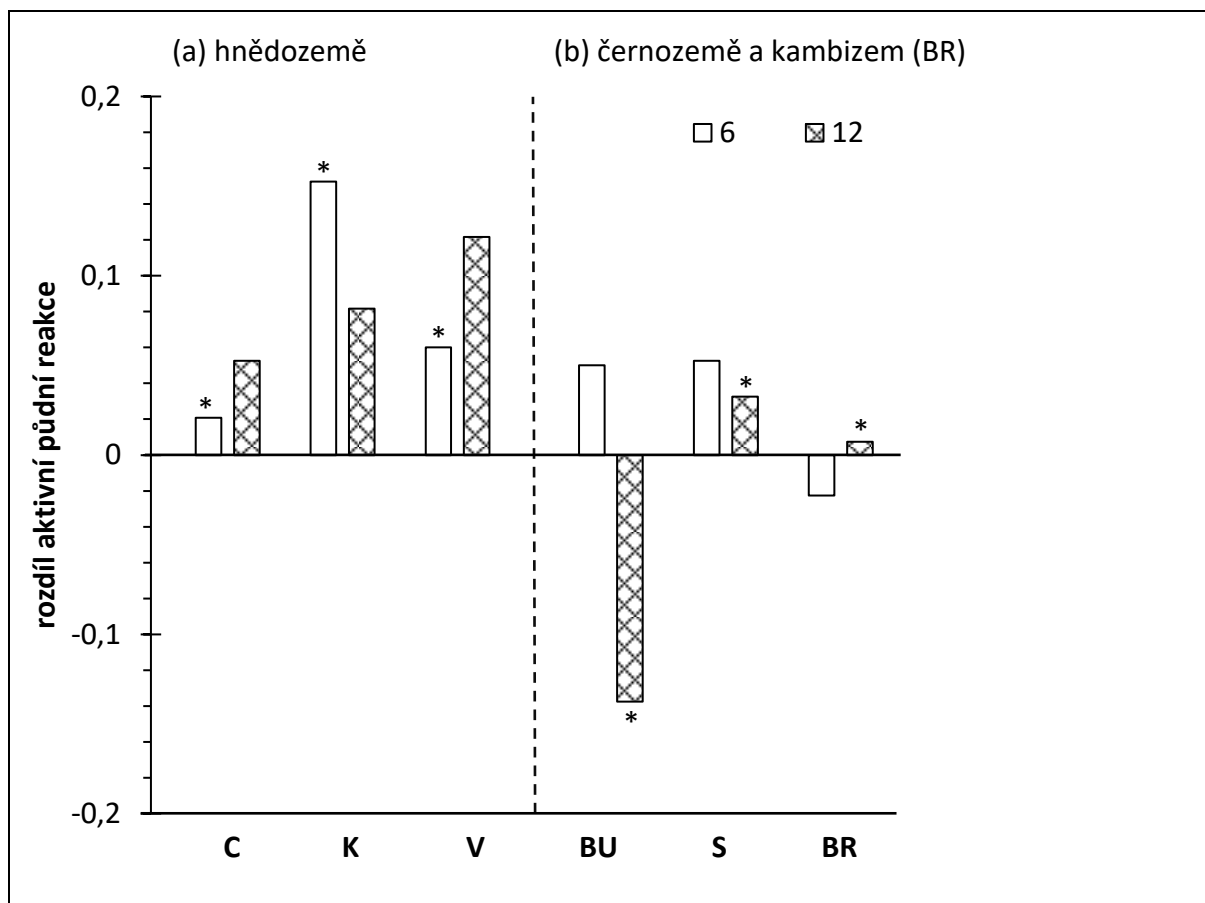
### 6.1 Změna půdní reakce

V námi vybraných půdních typech pozorujeme v 6 i 12 týdnech kultivace naměřenou vyšší aktivní půdní reakci u s *A. niger* v porovnání s kontrolou. Rozdíl těchto hodnot v  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  převážně ve prospěch kultivované houby v porovnání s kontrolními nalezneme na grafu 8(a),(b). Tento jev zaznamenáváme celkem u 10 z 12 případů. Výjimku nalezneme pouze u černozemě BU ve 12 týdnech a kambizemě BR v 6 týdnech, kdy naopak pozorujeme sklon k acidifikaci půd.

Ačkoliv by se mohlo zdát, že organické kyseliny, které produkuje *A. niger*, by měly přispívat ke snižování pH jak se domníval Yin et al. (2015), v našem případě došlo ke snížení jen ve 2 případech. Do extracelulárního prostoru jsou organické kyseliny transportovány buď pasivním transportem, který závisí na permeabilitě membrány a pH cytosolu (Casal et al. 2008) nebo aktivním transportem ve směru elektrochemického gradientu zprostředkovaným vylučováním cytoplazmatickými  $\text{H}^+$ -ATP-ázami (Badri & Vivanco 2009). Většina organismů udržuje pH cytosolu blízko neutrální oblasti nezávisle na okolním prostředí, například pH 7,55 u *A. niger* (Dollard & Billard 2003). Proto organické kyseliny opouštějí buňku jako disociované anionty a za acidifikaci bezprostředního okolí organismu v půdě bude spíše odpovídat kotransport  $\text{H}^+$ , který zajišťuje potřebný pozitivní gradient při uvolňování aniontů organických kyselin z cytosolu buněk. Skutečnost, že organické kyseliny opouštějí buňku jako disociované anionty, znamená, že budou mít spíše tendenci chovat se jako zásada a vychytávat  $\text{H}^+$  z půdy, v důsledku čehož bude docházet ke zvyšování pH (Hinsinger et al. 2003). Dalším způsobem, jakým organické kyseliny mohou ovlivňovat změnu půdního pH, je mikrobiální indukovaná dekarboxylace organických kyselin, která rovněž vede ke spotřebě  $\text{H}^+$ , co by daleko vhodněji vysvětlovalo naše pozorování. V této souvislosti byl pozorovaný nárůst půdního pH o 0,85 oproti kontrole ( $P < 0,001$ ) během rozkladu citranu nebo jablečnanu (Yan et al. 1996).

Námi vyobrazené změny jsou ale celkem malé, max. 0,15 jednotek u hnědozemě K v 6 týdnech kultivace, u většiny případů pod 0,1 jednotky. Pokud se budeme domnívat, že jsou organické kyseliny v inokulované půdě dekarboxylované (Yan et al. 1996) a navázané na půdní komponenty, bude tento mechanismus relativně pomalý (Oburger et al. 2009).

Další autoři Xu et al. (2006); Jayalath et al. (2016) pozorovali při rozkladu půdní organické hmoty, které jsou organické kyseliny součástí také zvyšování pH půdy. V závislosti na pufrací kapacitě bylo zvýšení pH obecně větší u půd s nižším pH než u půd s vyšším pH (Xu et al. 2006). To by vysvětlilo z našeho pozorování vyšší rozdíly nárůstu  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  u *A. niger* u hnědozemí K a V ( $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} < 7,5$ ) oproti hnědozemí C ( $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} > 8,5$ ) a černozemím BU a S ( $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} > 7,5$ ). Tyto rozdíly spatříme na grafu 8(a), (b). Půdy s  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} > 7,5$  (C, BU, S) měly nárůst u *A. niger* max. o 0,05 jednotky v porovnání s půdami, které měly  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} < 7,5$  (K, V), kde byl nárůst až o 0,15 jednotky.



Graf 8(a),(b): Rozdíl aktivní půdní reakce mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidím

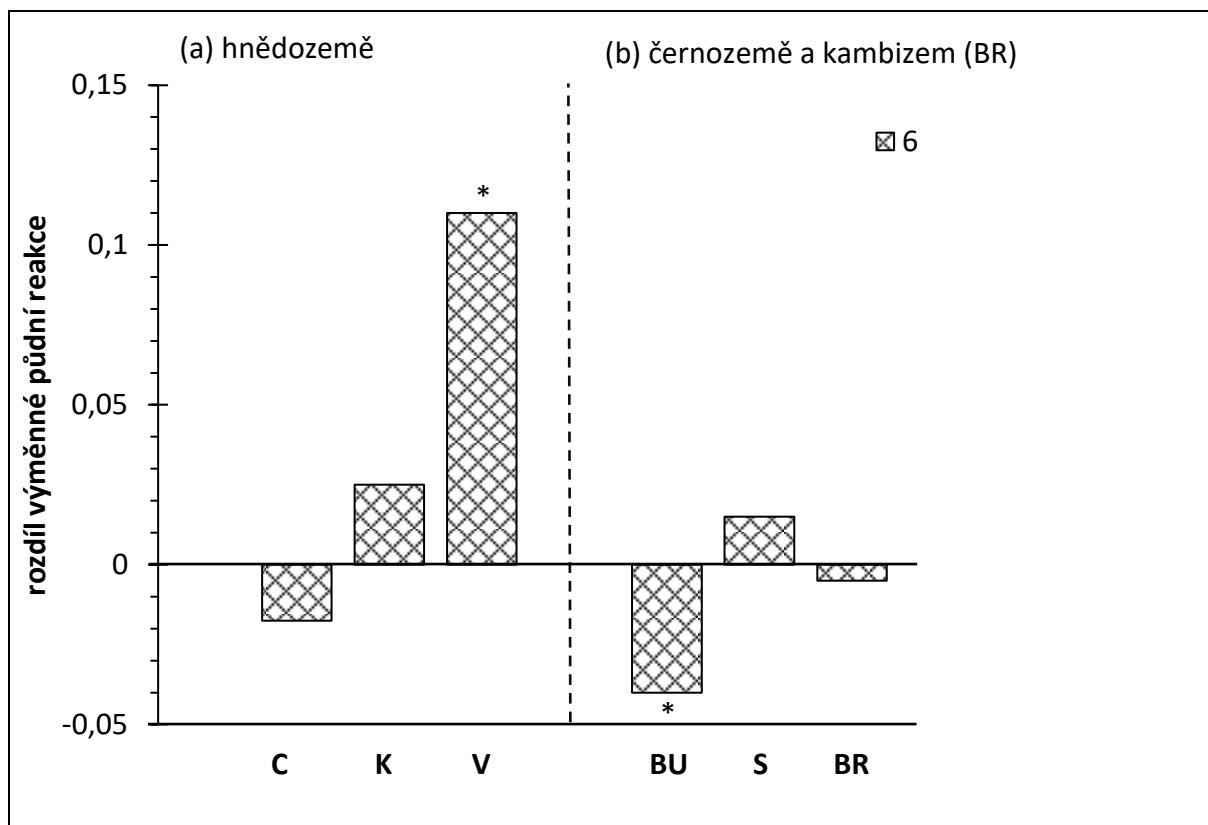
(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

\* – statisticky významné  $p < 0,05$

Rozdíl ve výměnné půdní reakci  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  mezi *A. niger* a kontrolou zobrazuje graf 9(a),(b). V našem pozorování jsou tyto rozdíly až na jednu výjimku velmi malé (pod 0,04 jednotky), ať šlo o zvýšení nebo snížení.

Výjimku zde tvoří hnědozem V, která vykazovala statisticky významnější zvýšení  $\text{pH}_{(\text{BaCl}_2)}$  u námi použitého druhu houby v porovnání s kontrolou o 0,11 jednotek.

Vyšší výměnné pH u houby oproti kontrole může rovněž znamenat dekarboxylaci organických kyselin, při které se spotřebovává  $\text{H}^+$  (Yan et al. 1996). Větší rozdíl v případě hnědozemě V by mohl být způsoben intenzivnějším rozkladem a tím efektivnější ztrátě  $\text{H}^+$ .



Graf 9(a),(b): Rozdíl výměnné půdní reakce mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

\* – statisticky významné  $p < 0,05$

## 6.2 Mobilizace fosforu působením *Aspergillus niger*

Celkem jsme zaznamenali nárůst vodou extrahovatelného fosforu u vzorků obsahující houbu v 8 z 12 případů. Tento výsledek a rozdíly mezi *A. niger* a kontrolou můžeme pozorovat z grafu 10(a),(b). U hnědozemě C byl rozdíl v 6 týdnech statisticky významný (1,8 mg.kg<sup>-1</sup>), což odpovídá nárůstu až o 88,5 %. Statisticky významný rozdíl jsme zaznamenali také u hnědozemě K v 6 týdnech (0,26 mg.kg<sup>-1</sup>) a ve 12 týdnech (0,39 mg.kg<sup>-1</sup>). Nárůst u K v 6 týdnech odpovídá 13 % a ve 12 týdnech 23,6 %.

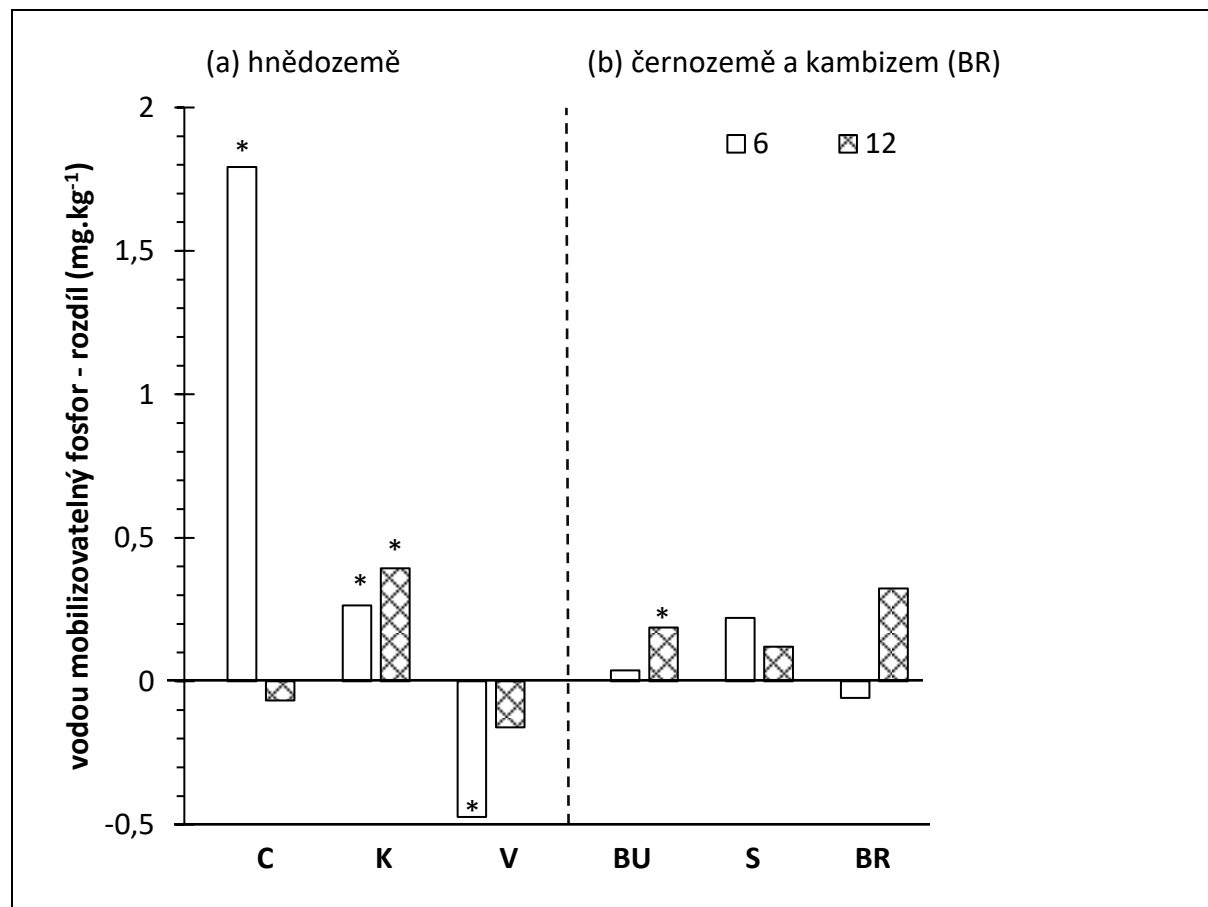
Obě černozemě vykazovali také zvýšení fosforu u *A. niger* max. o 0,22 mg.kg<sup>-1</sup>.

Kambizem BR měla pouze ve 12 týdnech nárůst fosforu u použité houby v porovnání s kontrolou o 0,32 mg.kg<sup>-1</sup>.

Výjimku z našich výsledků tvoří hnědozem V, kde byl v 6 i 12 týdnech zaznamenán pokles fosforu u vzorků s houbou. Hnědozem V obsahovala velké množství prachových částic (58 %). Prach má sice vyšší vododržnost, ale příliš nepřispívá k tvorbě půdní struktury. Nevytváří strukturální agregáty a nevyznačuje se výraznou plasticitou vlivem přijímání vody nebo stabilitou agregátů. Pro tyto půdy s velkou příměsí prachu je typická slévacost, tvorba škraloupů a kůr (Vavříček & Kučera 2014), což mohlo mít za následek nižší množství kyslíku v půdě a houba zde příliš nemusela prospívat. Tento efekt ale nepozorujeme u černozemě BU se stejným obsahem prachu, tudíž se můžeme domnívat, že spíše došlo k imobilizaci v půdních

organismech (Zhu et al. 2018) nebo sorpci na půdní komponenty (Zhu et al. 2018; Ameen et al. 2019). Nejlepším vysvětlením by mohla být zmíněná sorpce na půdní komponenty, konkrétně na jílové částice (Zhang et al. 2019), což by mohlo znamenat naměřené nižší množství u hnědozemě V a do určité míry i relativně malé zvýšení u černozemě BU. Současně to ale není úplně v rozporu s „prachovou teorií“.

Celkově byly námi měřené rozdíly až na výjimku hnědozemě C v 6 týdnech velmi malé  $<0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Můžeme se domnívat, že organické kyseliny byly rychle a pevně vázané na půdu a jen málo bylo vodou extrahovatelných (Jones & Brassington 1998).



Graf 10(a),(b): Rozdíl ve vodě mobilizovatelném fosforu mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

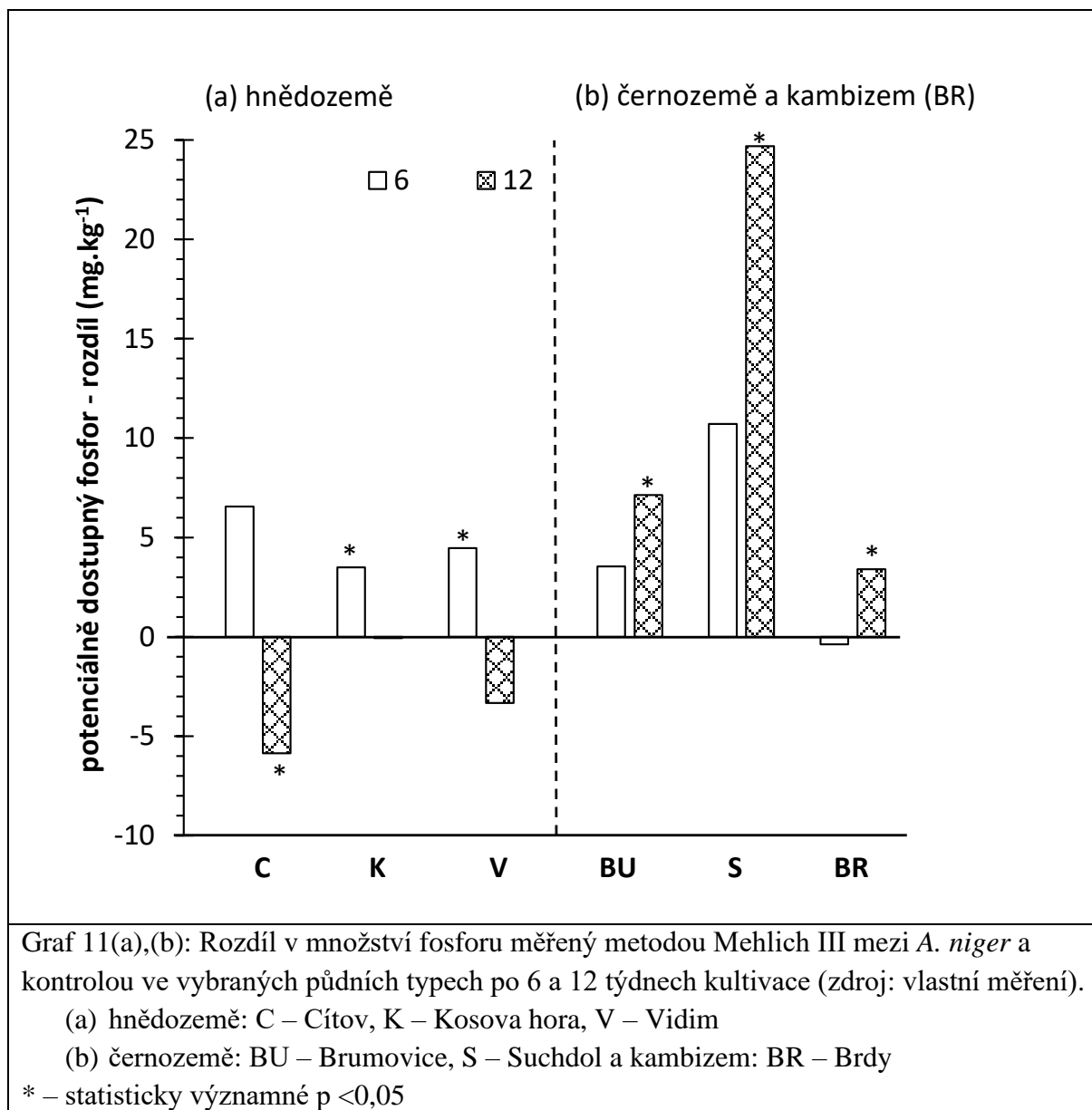
\* – statisticky významné  $p < 0,05$

Výraznějších rozdílů v množství fosforu se můžeme všimnout na následujícím grafu 11(a),(b) v případě potencionálně dostupného fosforu extrahovaného BaCl<sub>2</sub>. Stejně jako u vodou mobilizovatelného fosforu jsme naměřili v 8 z 12 případů vyšší množství u *A. niger* ve srovnání s kontrolními vzorky.

Všechny hnědozemě měly v 6 týdnech pozorování vyšší obsah tohoto fosforu u kultivované houby oproti kontrole. Největší statisticky významný rozdíl jsme zaznamenali u hnědozemě V (4,5 mg. kg<sup>-1</sup>). Ve 12 týdnech byla u hnědozemí situace úplně opačná a u *A. niger* jsme naměřili méně fosforu v porovnání s kontrolou. U hnědozemě C statisticky významně nižší množství o 6,6 mg. kg<sup>-1</sup>. V případě vodou extrahovatelného fosforu jsme u těchto půd ve 12 týdnech pozorovali také snížení. Sorpce na jílové částice (Zhang et al. 2019) by i zde mohla být vhodným vysvětlením, zejména u hnědozemě V (obsah jílu 24 %) Bohužel černozem BU (obsah jílu 14 %) měla naopak u kultivované houby nárůst, a tak nelze jednoznačně u hnědozemě C (obsah jílu 13 %) tuto teorii potvrdit. Vhodnějším vysvětlením by bylo vysoké množství prachu (75 %), kde se houba nemusela dobře rozvíjet. V průběhu času mohlo dojít ke slehnutí a tvorbě půdního škrálopou, čímž jsou tyto prachovité půdy typické (Vavříček & Kučera 2014).

Obě černozemě vykazovaly jak v 6, tak 12 týdnech vyšší množství fosforu u *A. niger* oproti kontrole, přičemž byl tento rozdíl ve 12 týdnech dvojnásobně větší než u 6 týdnů. Rozdíl činil u černozemě S v 6 týdnech (10,7 mg.kg<sup>-1</sup>) a ve 12 týdnech (24,7 mg.kg<sup>-1</sup>). U černozemě BU byl rozdíl v 6 týdnech (3,5 mg.kg<sup>-1</sup>) a ve 12 týdnech (7,1 mg.kg<sup>-1</sup>). Zde by se dalo usuzovat, že na černozemích má tato mikroskopická houba schopnost mobilizovat více fosforu. Nicméně zejména u černozemě S bylo u *A. niger* naměřeno celkově nejvyšší množství fosforu v 6 týdnech (133 mg.kg<sup>-1</sup>) a ještě více ve 12 týdnech (180 mg.kg<sup>-1</sup>), v porovnání s ostatními půdami, které měly max. kolem 80 mg.kg<sup>-1</sup>. Spíše proto jsou tyto rozdíly znatelnější v porovnání s hnědozeměmi a kambizemí. Pokud se ale podíváme na procenta, které jsou vypočítána z rozdílu množství fosforu mezi vzorky *A. niger* a kontrolou. U kambizemě BR to bylo přibližně stejně procent (13,6 %) jako u černozemě S (13,8 %), kde zaznamenáváme tento rozdíl daleko vyšší (24,7 mg. kg<sup>-1</sup>) oproti BR (3,4 mg. kg<sup>-1</sup>).

Naše výsledky a více studií Chuang et al. (2007); Bakri (2019); Nascimento et al. (2021) dokazují u této houby ve většině případů zvýšení množství dostupného fosforu. Tito autoři uvádějí zvýšení fosforu především díky organickým kyselinám, které houba produkuje. Většina z nich nevyvrací anebo tvrdí, že to není jediný mechanismus, který má toto zvýšení za následek.



### 6.3 Kationty $Al^{3+}$ , $Fe^{3+}$ a $Ca^{2+}$ extrahované $BaCl_2$

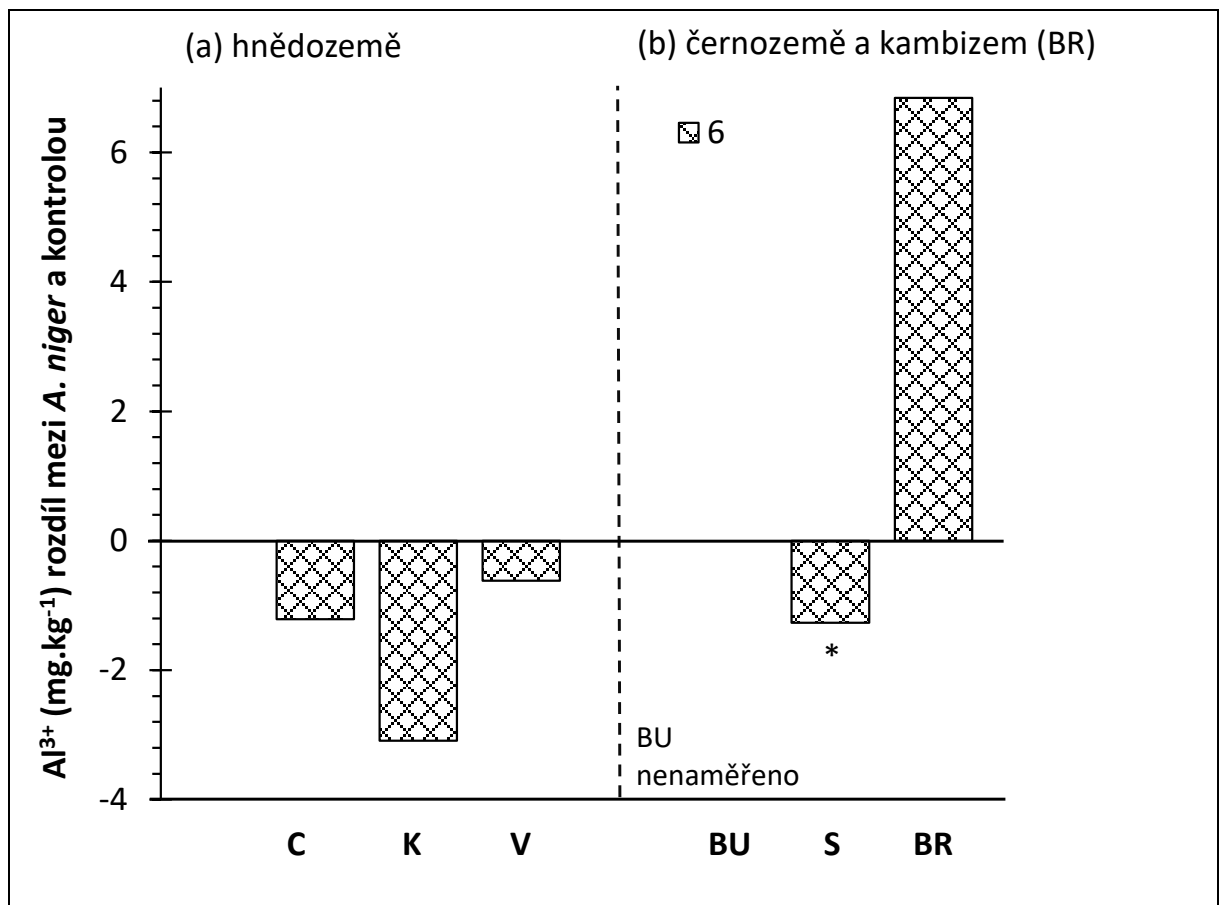
Na grafu 12(a),(b) nalezneme rozdíl v množství hliníku ( $Al^{3+}$ ) mezi kultivovanou houbou a kontrolou. Více hliníku u *A. niger* v porovnání s kontrolou jsme naměřili pouze u kambizemě BR a to o ( $6,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Tato lesní půda má nízké  $pH_{(H_2O)} \sim 4$  jednotky a předpokládá se zde i vyšší obsah tohoto kationtu (Vaněk 2007), který jsme naměřili u kontroly  $185 \text{ mg.kg}^{-1}$  a u vzorku s *A. niger*  $192 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ostatní půdy měly hliník pod  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Kvůli nízkému  $pH_{(H_2O)} \sim 4$  jednotky u kambizemě BR předpokládáme i vyšší rozpustnost hliníku, čímž se zvyšuje jeho dostupnost pro biochemické přeměny. Adaptace *A. niger* na kyselé podmínky hodnotili například Park et al. (1996), kde hyfy této houby přestaly růst až pod  $pH$  1,4. Postupný nárůst koncentrace vyluhovaného hliníku během kultivace *A. niger* na kyselém médiu ( $pH \sim 2$  jednotky a dokonce i s  $pH < 2$ ) pozorovali Urík et al. (2018), zároveň autoři upozornili na zvýšení biologické dostupnosti hliníku a tím i pravděpodobnost jeho negativního dopadu na životní prostředí, protože se stává více mobilní ve vodním médiu. Díky těmto studiím



a našemu pozorování můžeme potvrdit, že je *A. niger* schopný snášet takto nízké pH a zvýšený obsah hliníku byl skutečně způsobený vlivem houby, a nikoliv pouze následkem nízkého pH půdy.

Naopak u všech hnědozemí a černozemě S bylo u vzorků s houbou méně hliníku oproti kontrole. U hnědozemí byl největší rozdíl u půdy K (3,1 mg.kg<sup>-1</sup>).

V půdě jsou anionty organických kyselin v konkurenčním vztahu s jinými záporně nabitými živinami. Tyto kyseliny, které produkuje *A. niger* vyvolávají v půdě desorpci živin nebo naopak omezují jejich mobilitu navázáním na půdní složky (Bolan et al. 1994; Jones & Brassington 1998). V kyselých půdách anionty organických kyselin konkurují o vazebná místa na půdních koloidech a jejich mobilita se může zvyšovat (Hocking 2001), což by vysvětlilo u kambizemě BR zvýšení hliníku. Naopak u ostatních půd, kde došlo ke snížení, mohly organické kyseliny reagovat s kationty kovů a tvořit organokovové komplexy s různou stabilitou (Wang et al. 2007). Tyto komplexy mohou být zabudovány v buňkách nebo okolním prostředí (Lundström 1993).



Graf 12(a),(b): Rozdíl v množství Al<sup>3+</sup> extrahovaný BaCl<sub>2</sub> mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

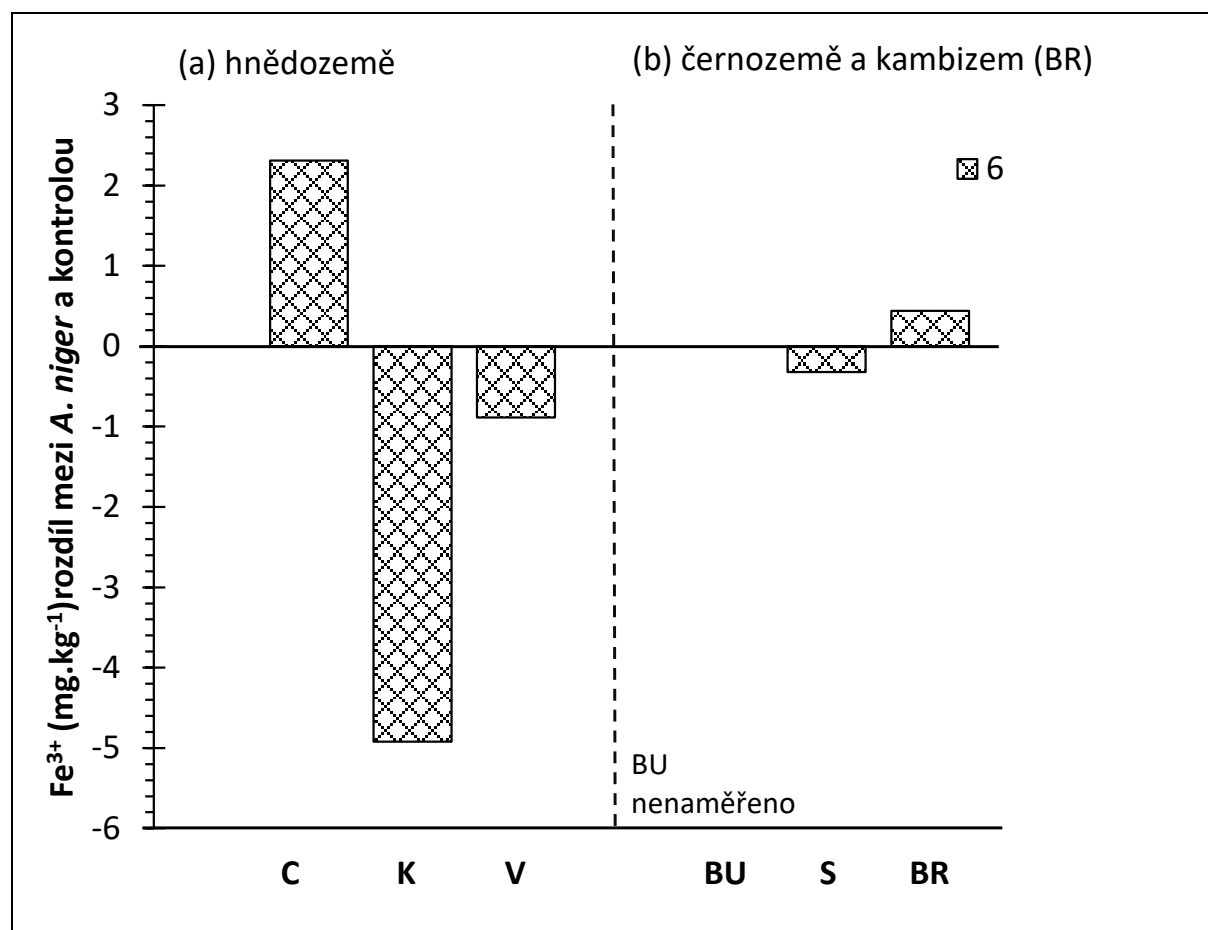
(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

\* – statisticky významné p < 0,05

Rozdíl mezi *A. niger* a kontrolou v množství železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) extrahovaného pomocí  $\text{BaCl}_2$  zobrazuje graf 13(a),(b). Vyjma kambizemě BR bylo u ostatních půd minimálně v jednom případě, buďto u kultivované houby nebo u kontroly, platné pouze jedno měření. Navíc se zde potýkáme s velkými směrodatnými odchylkami. U černozemě BU se prvek ve vzorku s *A. niger* nedal změřit díky příliš nízkému obsahu.

Kambizem BR měla platných více měření, bohužel s velkou směrodatnou odchylkou. Dalo by se alespoň usuzovat, že mírné zvýšení železa u vzorku s *A. niger* by mohlo být důsledkem zvýšené mobility organických kyselin a tím desorpce živin z půdních koloidů (Hocking 2001). Díky vysokým směrodatným odchylkám však nelze potvrdit významnost rozdílu.

Jak již bylo zmíněno, ostatní půdy měly platné pouze jedno měření, buď v kontrole nebo *A. niger* a navíc i velké směrodatné odchylky. Bohužel nelze tyto výsledky statisticky vhodně okomentovat.



Graf 13(a),(b): Rozdíl v množství  $\text{Fe}^{3+}$  extrahovaný  $\text{BaCl}_2$  mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

\* – statisticky významné  $p < 0,05$

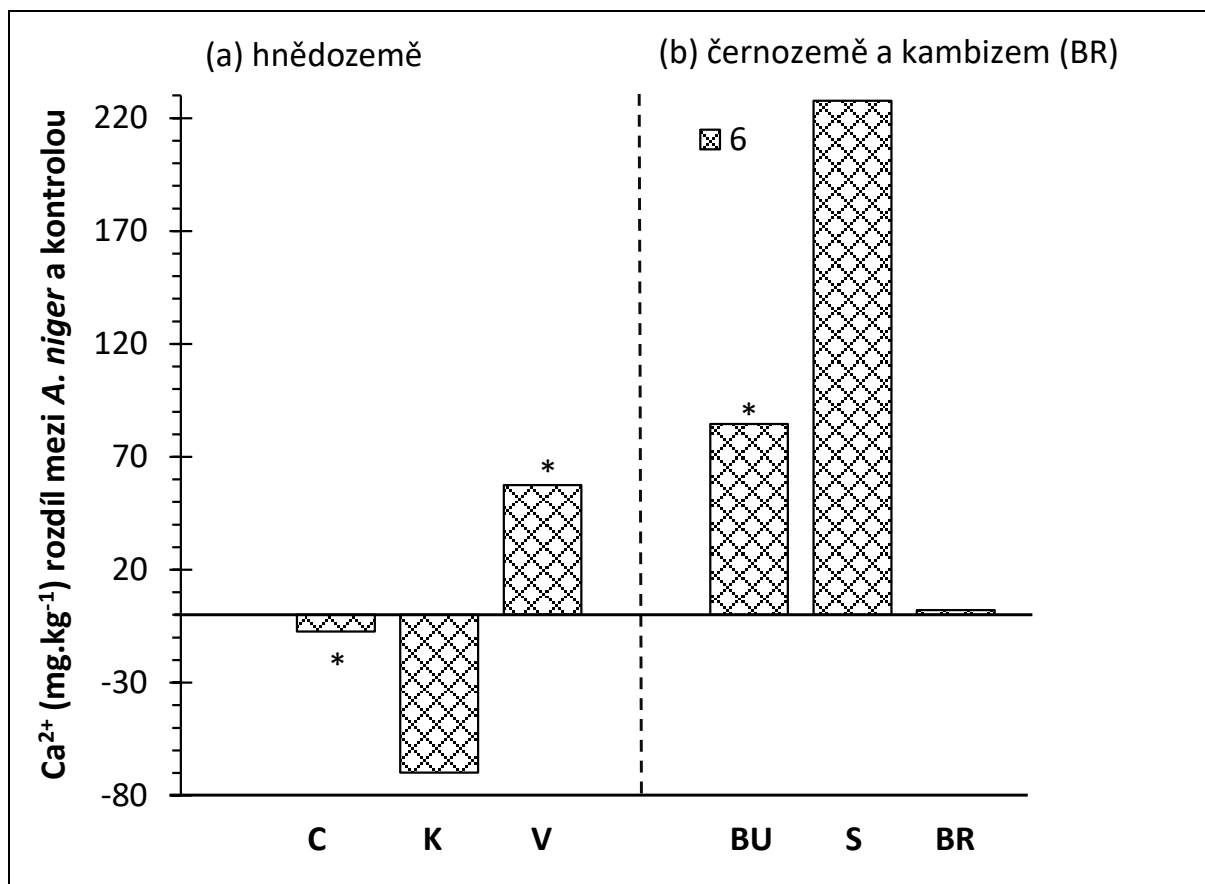
Rozdíl v množství vytěsněného vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mezi námi použitou houbu a kontrolou nalezneme v grafu 14(a), (b). Nárůst vápníku u kultivované houby pozorujeme u 4 z 6 půd. Ze

tří hnědozemí pozorujeme zvýšení vápníku pouze v případě půdy V o 57 mg.kg<sup>-1</sup> (P <0,05). Hnědozem C vykazovala naopak snížení. Tento rozdíl vzhledem k celkovému množství (~ 950 mg.kg<sup>-1</sup>) byl relativně malý (7 mg.kg<sup>-1</sup>), byť statisticky významný. U hnědozemě K také došlo ke snížení množství Ca<sup>2+</sup> u kultivované houby o 70 mg.kg<sup>-1</sup>, avšak směrodatná odchylka činila 151 mg.kg<sup>-1</sup>.

Obě černoze měly zvýšené množství vápníku u *A. niger* oproti kontrole. Černoze BU statisticky významně vyšší o 85 mg.kg<sup>-1</sup>. U černoze S byl tento rozdíl nejvyšší (227 mg.kg<sup>-1</sup>), nicméně kontrola měla odchylku 221 mg.kg<sup>-1</sup>. U jediné této půdy, která obsahovala dostatečné množství CaCO<sub>3</sub> (20,5 %) mohlo potenciálně dojít k rozpouštění karbonátů pomocí organických kyselin, které obecně *A. niger* produkuje. Protože jsou karbonáty snadno rozpustné v kyselinách a ve vodě nerozpustné (Dolníček & Sulovský 2013), mohlo dojít ke zvýšení množství kationtu vápníku díky houbě.

Kambizem BR měla rozdíl pouze 2,2 mg.kg<sup>-1</sup> ve prospěch houby. Tento rozdíl není statisticky významný i vzhledem k směrodatné odchylce 2,7 mg.kg<sup>-1</sup> u kontroly.

U hnědozemě V a černoze BU, kde jsme naměřili statisticky vyšší hodnoty Ca<sup>2+</sup> u *A. niger* musíme hledat jiný mechanismus, který měl tento efekt za následek. Nízkomolekulární organické kyseliny, které jsou obecně produkovány touto houbou, se vyznačují schopností vyluhovat, vytvářet komplexy a srážet kovy z nerozpustných minerálů (Burgstaller & Schinner 1993; Sayer et al. 1995). Během kultivace *A. niger* pozorovali Gharieb et al. (1998) produkci šťavelanu vápenatého na agarovém médiu, kde byl přidán přírodní sádrovec (síran vápenatý). Odhalili tvorbu krystalů obsahující vápník s podobnou morfologií šťavelanu vápenatého a považují zde kyselinu šťavelovou jako další mechanismus vedoucí ke komplexaci vápenatých iontů a zpřístupnění síranu. Zároveň se shodují s Moghimi et al. (1978); Bolan et al. (1994), kteří uvádějí, že organické kyseliny zvyšují zpřístupnění nerozpustného fosfátu obsahujícího vápník tím, že dodávají protony a komplexují vápník.



Graf 14(a),(b): Rozdíl v množství  $\text{Ca}^{2+}$  extrahovaný  $\text{BaCl}_2$  mezi *A. niger* a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření).

(a) hnědozemě: C – Cítov, K – Kosova hora, V – Vidim

(b) černozemě: BU – Brumovice, S – Suchdol a kambizem: BR – Brdy

\* – statisticky významné  $p < 0,05$

## 7 Závěr

Cílem práce bylo stanovení vlivu mikroskopické vláknité houby *Aspergillus niger* na množství dostupného fosforu v různých půdních typech a určení vlivu půdního typu na interakci mezi mikroorganismem a půdou.

U většiny vybraných půdních typů bylo v 6 i 12 týdnech kultivace naměřeno u *A. niger* vyšší  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  oproti kontrole, celkově v 10 z 12 případů. Rozdíly v pH byly ale relativně malé. U hnědozemí jsme zaznamenali spíše  $<0,1$ , u černozemí  $<0,05$  a u kambizemě  $<0,02$ .

Množství vodou extrahovatelného fosforu jsme naměřili v 8 z 12 případů vyšší u vzorků, kde byl kultivován použitý kmen této houby v porovnání s kontrolou. Celkově byly námi zaznamenané rozdíly až na výjimku hnědozemě C v 6 týdnech spíše malé ( $<0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

Potencionálně dostupný fosfor byl vyšší u vzorků s *A. niger* v 9 z 12 případů. U černozemí byly naměřeny vyšší rozdíly v množství oproti hnědozemím a kambizemi. Pokud jsme ale porovnali procenta tohoto zvýšení, rozdíly mezi typem půdy se v některých případech vyrovnaly anebo alespoň přiblížili. Naši hypotézu, kdy bude množství uvolňovaného fosforu záležet na jeho přístupnosti nebylo možné z výsledků autorem potvrdit. Z více studií Chuang et al. (2007); Bakri (2019); Nascimento et al. (2021) lze ale potvrdit naši další hypotézu, že bude mobilizace fosforu souviset především s organickými kyselinami a hodnotou pH v důsledku aktivity *A. niger*. Zároveň tito autoři nevyvrací anebo tvrdí, že to není jediný mechanismus, který má mobilizaci za následek a bude potřeba dalšího pozorování této houby.

Kambizem Brdy vykazovala vyšší množství  $\text{Al}^{3+}$  u námi použitého druhu mikroskopické houby oproti kontrole o  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U hnědozemí a černozemí jsme naměřili naopak nižší množství tohoto kationtu u vzorků s použitou houbou.

Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  u vzorků s kultivovanou houbou v porovnání s kontrolou u hnědozemě V o  $57 \text{ mg.kg}^{-1}$  a černozemě BU o  $85 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Kmen mikroskopické houby *A. niger*, který byl použit v závěrečné práci, má schopnost ovlivňovat živiny v půdě, zejména obsah dostupného fosforu, ale také množství kationtů  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . V závislosti na půdním typu, konkrétní půdě a délce pozorování působila kultivovaná houba odlišně. Doufám, že naše výsledky poskytnou další podklady o mobilizaci fosforu tímto kmenem houby a přispěly ke stávajícímu i budoucímu zkoumání.

## 8 Literatura

Adhya TK, Kumar N, Reddy G, Podile AR, Bee H, Samantaray B. 2015. Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils. *Current Science* **108**(7): 1280-1287.

Alori ET, Glick BR, Babalola OO. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology* **8**: 971.

Ameen F, AlYahya SA, AlNadhari S, Alasmari H, Alhoshani F, Wainwright M. 2019. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in desert soils: species, limitations and mechanisms. *Archives of Agronomy and Soil Science* **65**(10): 1446-1459.

Antibus RK, Sinsabaugh RL, Linkins AE. 1992. Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **70**(4): 794-801.

Badri DV, Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment* **32**(6): 666-681.

Baker SE. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical mycology* **44**(Supplement\_1): S17-S21.

Bakri MM. 2019. Tri-Calcium and Zinc Phosphates Solubilization by *Aspergillus niger* and Its Relation to Organic Acids Production. *BioNanoScience* **9**(2): 238-244.

Bao T, Sun T, Sun L. 2011. Low molecular weight organic acids in root exudates and cadmium accumulation in cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and nonhyperaccumulator *Solanum lycopersicum* L. *African Journal of Biotechnology* **10**(75): 17180-17185.

Bennett Richard J, Turgeon BG. 2016. Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiology Spectrum* **4**(5): 4.5.20.

Billah M, Khan M, Bano A, Hassan TU, Munir A, Gurmani AR. 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal* **36**(10): 904-916.

Bolan NS, Naidu R, Mahimairaja S, Baskaran S. 1994. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils* **18**(4): 311-319.

Burgstaller W, Schinner F. 1993. Leaching of metals with fungi. *Journal of Biotechnology* **27**(2): 91-116.

Casal M, Paiva S, Queirós O, Soares-Silva I. 2008. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS microbiology reviews* **32**(6): 974-994.

Cools N, De Vos B. 2010. Sampling and analysis of soil. Manual part X. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. UNECE, ICP Forests, Hamburg **208**: 536-542.

Corbridge DE. 2013. Phosphorus: chemistry, biochemistry and technology, CRC press.

Cordell D, White S. 2011 Peak Phosphorus: Clarifying the Key Issues of a Vigorous Debate about Long-Term Phosphorus Security. *Sustainability* **3**, 2027-2049 DOI: 10.3390/su3102027

Čermák R. 2021. Půdy historických milířišť jako prostředek pro současné biocharové aplikace. Katedra pedologie a ochrany půd, Česká zemědělská univerzita.

Daneshgar S, Callegari A, Capodaglio AG, Vaccari D. 2018 The Potential Phosphorus Crisis: Resource Conservation and Possible Escape Technologies: A Review. *Resources* **7**, DOI: 10.3390/resources7020037

Darrah P. 1991. Measuring the diffusion coefficient of rhizosphere exudates in soil. I. The diffusion of non-sorbing compounds. *Journal of soil science* **42**(3): 413-420.

Din M et al. 2019. Production of nitrogen fixing *Azotobacter* (SR-4) and phosphorus solubilizing *Aspergillus niger* and their evaluation on *Lagenaria siceraria* and *Abelmoschus esculentus*. *Biotechnology Reports* **22**: e00323.

Dollard M-A, Billard P. 2003. Whole-cell bacterial sensors for the monitoring of phosphate bioavailability. *Journal of Microbiological Methods* **55**(1): 221-229.

Dolníček Z, Sulovský P. 2013. Laboratorní metody výzkumu, Univerzita Palackého v Olomouci.

Duebel A, Gransee A, Merbach W. 2000. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *J Plant Nutr Soil Sci* **163**: 387-392.

Duras J, Potužák J. 2021. 7 Rybníky-účinný nástroj pro recyklaci živin v krajině. SBORNÍK REFERÁTŮ: 53.

Fecenko J, Ložek O. 2000. Výživa a hnojení poľných plodín. SPU Nitra, ISBN 80-7137-777-5.

Filippelli GM. 2002. The global phosphorus cycle. *Reviews in mineralogy and geochemistry* **48**(1): 391-425.

Filippelli GM. 2008. The Global Phosphorus Cycle: Past, Present, and Future. *Elements* **4**(2): 89-95.

Fujii K, Hayakawa C, Van Hees PA, Funakawa S, Kosaki T. 2010. Biodegradation of low molecular weight organic compounds and their contribution to heterotrophic soil respiration in three Japanese forest soils. *Plant and soil* **334**: 475-489.

Gharieb MM, Sayer JA, Gadd GM. 1998. Solubilization of natural gypsum (CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) and the formation of calcium oxalate by *Aspergillus niger* and *Serpula himantoides*. *Mycological Research* **102**(7): 825-830.

Goldstein A. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC: 197-203.

Gurbanov R, Kalkanci B, Karadag H, Samgane G. 2021. Phosphorus solubilizing microorganisms. *Biofertilizers: Study and Impact*: 151-182.

Ha S, Tran L-S. 2014. Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Critical Reviews in Biotechnology* **34**(1): 16-30.

Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and soil* **248**: 43-59.

Hocking P. 2001. Organic acids exuded from roots in phosphorus uptake and aluminum tolerance of plants in acid soils. *Advances in agronomy* **74**: 63-97.

Houbraken J, Samson RA. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* **70**(1): 1-51.

Chabot R, Antoun H, Cescas MP. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant and soil* **184**(2): 311-321.

Chuang C-C, Kuo Y-L, Chao C-C, Chao W-L. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* **43**(5): 575-584.



Jablonský I, Koudela M, Šašek V. 2019. Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat, Profi Press s.r.o.

Jackson ML. 1958. Soil chemical analysis / c M.L. Jackson. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, Inc.

Jayalath N, Mosley LM, Fitzpatrick RW, Marschner P. 2016. Addition of organic matter influences pH changes in reduced and oxidised acid sulfate soils. *Geoderma* **262**: 125-132.

Jones D, Brassington D. 1998. Sorption of organic acids in acid soils and its implications in the rhizosphere. *European Journal of Soil Science* **49**(3): 447-455.

Jones D, Edwards A. 1998. Influence of sorption on the biological utilization of two simple carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* **30**(14): 1895-1902.

Jones DL, Darah PR, Kochian LV. 1996. Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant and soil* **180**: 57-66.

Kafle A, Cope KR, Rath R, Krishna Yakha J, Subramanian S, Bücking H, Garcia K. 2019 Harnessing Soil Microbes to Improve Plant Phosphate Efficiency in Cropping Systems. *Agronomy* **9**, DOI: 10.3390/agronomy9030127

Khan M, Zaidi A, Ahmad E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *Phosphate solubilizing microorganisms*, Springer: 31-62.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agronomy for Sustainable Development* **27**(1): 29-43.

Kiers ET et al. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *science* **333**(6044): 880-882.

Kim K, McDonald G, Jordan D. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils* **24**(4): 347-352.

Kishore N, Pindi PK, Ram Reddy S. 2015. Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*: 307-333.

Kodešová R et al. 2016. An analysis of the dissipation of pharmaceuticals under thirteen different soil conditions. *Science of The Total Environment* **544**: 369-381.

Kotzurová I, Holba M, Pospíšková K, Kolařík J, Filip J. 2016. Porovnání technologií odstraňování a recyklace fosforu na komunálních čistírnách v České republice.

Kour D, Rana KL, Kaur T, Yadav N, Yadav AN, Kumar M, Kumar V, Dhaliwal HS, Saxena AK. 2021. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review. *Pedosphere* **31**(1): 43-75.

Liu R, Lal R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* **4**(1): 5686.

Loehr R. 2012. *Pollution control for agriculture*, Elsevier.

Lundström US. 1993. The role of organic acids in the soil solution chemistry of a podzolized soil. *Journal of soil science* **44**(1): 121-133.

Mendes GdO, Dyer T, Csetenyi L, Gadd GM. 2022. Rock phosphate solubilization by abiotic and fungal-produced oxalic acid: reaction parameters and bioleaching potential. *Microbial Biotechnology* **15**(4): 1189-1202.

Moghimi A, Lewis D, Oades J. 1978. Release of phosphate from calcium phosphates by rhizosphere products. *Soil Biology and Biochemistry* **10**(4): 277-281.

Nascimento JMd, Vieira Netto JAF, Valadares RV, Mendes GdO, Silva IRd, Vergütz L, Costa MD. 2021. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. *Soil Biology and Biochemistry* **156**: 108190.

Nassal D, Spohn M, Eltlbany N, Jacquiod S, Smalla K, Marhan S, Kandeler E. 2018. Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. *Plant and soil* **427**(1): 17-37.

Neumann G, Römheld V. 2002. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. *Plant roots: The hidden half*(Ed. 3): 617-649.

Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**(5): 1225-1242.

Notholt A, Sheldon R, Davidson D. 2005. *Phosphate deposits of the world: volume 2, phosphate rock resources*, Cambridge University Press.

Oburger E, Kirk GJ, Wenzel WW, Puschenreiter M, Jones DL. 2009. Interactive effects of organic acids in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **41**(3): 449-457.

Park J-C, Matsuoka H, Takatori K, Kurata H. 1996. Adaptation of *Aspergillus niger* to acidic conditions and its relationship to salt stress and miconazole. *Mycological Research* **100**(7): 869-874.

Paul EA, Paustian KH, Elliott E, Cole CV. 1996. *Soil Organic Matter in Temperate Agroecosystems Long Term Experiments in North America*, CRC Press.

Penn CJ, Camberato JJ. 2019 A Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH Affects Phosphorus Availability to Plants. *Agriculture* **9**, DOI: 10.3390/agriculture9060120

Phoebe H-S, B.Sc. 2018. What is *Aspergillus niger*? News-Medical.

Priyadharsini P, Rojamala K, Ravi RK, Muthuraja R, Nagaraj K, Muthukumar T. 2016. Mycorrhizosphere: The extended rhizosphere and its significance. *Plant-microbe interaction: An approach to sustainable agriculture*: 97-124.

Ragot SA, Kertesz MA, Mészáros É, Frossard E, Bünemann EK. 2017. Soil phoD and phoX alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple environmental factors. *FEMS microbiology ecology* **93**(1): fiw212.

Ramesh A, Sharma SK, Yadav N, Joshi OP. 2014. Phosphorus Mobilization from Native Soil P-Pool upon Inoculation with Phytate-Mineralizing and Phosphate-Solubilizing *Bacillus aryabhattai* Isolates for Improved P-Acquisition and Growth of Soybean and Wheat Crops in Microcosm Conditions. *Agricultural Research* **3**(2): 118-127.

Rawat P, Das S, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. 2021. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **21**(1): 49-68.

Richardson AE et al. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and soil* **349**(1): 121-156.

Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Department of Microbiology, Cuban Research Institute on Sugarcane By-Products (ICIDCA), Havana, Cuba. Havana. Cuba.

Rose TJ, Pariasca-Tanaka J, Rose MT, Fukuta Y, Wissuwa M. 2010. Genotypic variation in grain phosphorus concentration, and opportunities to improve P-use efficiency in rice. *Field Crops Research* **119**(1): 154-160.

Ruttenberg KC. 2003. *The Global Phosphorus Cycle*. Treatise on Geochemistry. Holland HD and Turekian KK. Oxford, Pergamon: 585-643.

Sanyal S, De Datta S. 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Advances in soil science*, Springer: 1-120.

Sarvajayakesavalu S, Lu Y, Withers PJA, Pavinato PS, Pan G, Chareonsudjai P. 2018. Phosphorus recovery: a need for an integrated approach. *Ecosystem Health and Sustainability* **4**(2): 48-57.

Sayer JA, Raggett SL, Gadd GM. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Research* **99**(8): 987-993.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* **2**: 1-14.

Sharpley A. 2000. Phosphorus availability, CRC Press. Boca Raton Florida. pp. D18-D37: D18-D30.

Scholz RW, Roy AH, Brand FS, Hellums DT, Ulrich AE. 2014. Sustainable phosphorus management.

Sims J, Pierzynski G. 2005. Chemistry of phosphorus in soil. *Chemical processes in soil*. Soil Sci Soc Am book series(8).

Smith SE, Smith FA. 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**(1): 227-250.

Tan KH. 2009. *Environmental soil science*, CRC Press.

Terry N, Ulrich A. 1973. Effects of phosphorus deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant physiology* **51**(1): 43-47.

Tian D et al. 2021. A study of P release from Fe-P and Ca-P via the organic acids secreted by *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiology* **59**(9): 819-826.

Tiessen H. 2008. Phosphorus in the global environment. *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. White PJ and Hammond JP. Dordrecht, Springer Netherlands: 1-7.

Tunlid A, Floudas D, Koide R, Rineau F. 2016. Soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi. *Molecular mycorrhizal symbiosis*: 257-275.

Turner BL, Frossard E, Baldwin DS. 2005. *Organic phosphorus in the environment*, CABI Pub.

Urík M, Hlodák M, Mikušová P, Matuš P. 2014. Potential of microscopic fungi isolated from mercury contaminated soils to accumulate and volatilize mercury (II). *Water, Air, & Soil Pollution* **225**: 1-11.

Urík M, Polák F, Bujdoš M, Pifková I, Kořenková L, Littera P, Matuš P. 2018. Aluminium Leaching by Heterotrophic Microorganism *Aspergillus niger*: An Acidic Leaching? *Arabian Journal for Science and Engineering* **43**(5): 2369-2374.

Valla M, Kozák J, Němeček J, Matula S, Borůvka L, Drábek O. 2000. *Pedologické praktikum. Česká zemědělská univerzita v Praze Agronomická Fakulta*: 33-38.

Van Kauwenbergh SJ. 2010. World phosphate rock reserves and resources, *IFDC Muscle Shoals*.

Vaněk V. 2007. *Výživa polních a zahradních plodin*, Profi Press.

Vassileva M, Mendes GO, Deriu MA, Benedetto GD, Flor-Peregrin E, Mocali S, Martos V, Vassilev N. 2022. Fungi, P-Solubilization, and Plant Nutrition. *Microorganisms* **10**(9).

Vavříček D, Kučera A. 2014. *Lesnická pedologie pro posluchače LDF Mendelu v Brně. Ústav geologie a pedologie*: 176.

Wang B, Qiu Y-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299-363.

Wang X, Li Q, Ding J, Luo M, Zhang T, Zhou Y. 2007. An Improved Method for the Extraction of Low Molecular Weight Organic Acids in Variable Charge Soils. *Analytical Sciences* **23**(5): 539-543.

Withers PJA, Elser JJ, Hilton J, Ohtake H, Schipper WJ, van Dijk KC. 2015. Greening the global phosphorus cycle: how green chemistry can help achieve planetary P sustainability. *Green Chemistry* **17**(4): 2087-2099.

Xiao C, Zhang H, Fang Y, Chi R. 2013. Evaluation for Rock Phosphate Solubilization in Fermentation and Soil-Plant System Using A Stress-Tolerant Phosphate-Solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **169**(1): 123-133.

Xu JM, Tang C, Chen ZL. 2006. The role of plant residues in pH change of acid soils differing in initial pH. *Soil Biology and Biochemistry* **38**(4): 709-719.

Yan F, Schubert S, Mengel K. 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. *Soil Biology and Biochemistry* **28**(4): 617-624.

Yin Z, Shi F, Jiang H, Roberts DP, Chen S, Fan B. 2015. Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology* **61**(12): 913-923.

Zádorová T et al. 2023. Formation of Colluvisols in different soil regions and slope positions (Czechia): Stratification and upbuilding of colluvial profiles. *CATENA* **221**: 106755.

Zádorová T, Penížek V, Vašát R, Žížala D, Chuman T, Vaněk A. 2015. Colluvial soils as a soil organic carbon pool in different soil regions. *Geoderma* **253**: 122-134.

Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani P. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial strategies for crop improvement*: 23-50.

Zhang L, Hu Y, Han F, Wu Y, Tian D, Su M, Wang S, Li Z, Hu S. 2019. Influences of multiple clay minerals on the phosphorus transport driven by *Aspergillus niger*. *Applied Clay Science* **177**: 12-18.

Zhu J, Li M, Whelan M. 2018. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of The Total Environment* **612**: 522-537.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

pH <sub>(H<sub>2</sub>O)</sub>	aktivní pH
pH <sub>(BaCl<sub>2</sub>)</sub>	výměnné pH
Cox	množství organického uhlíku
k	kontrola
Ani	<i>Aspergillus niger</i>
BR	Brdy
BU	Brumovice
C	Cítov
K	Kosova hora
S	Suchdol
V	Vidim
6	6 týdnů kultivace
12	12 týdnů kultivace
*	t-test >0,05
P >0,05	Studentův t-test >0,05

## 10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Příklad odsávání vody z Kopeckého válečků (zdroj vlastní).....	19
Obrázek 2: Vzorky v kultivačním boxu (zdroj vlastní).....	21
Obrázek 3: Vzorky po 6 týdnech kultivace. Dole kontrolní půda a nahoře půda inokulována spórami <i>A. niger</i> (zdroj vlastní).....	22





## 11 Seznam grafů

Graf 1(a),(b): Změny aktivní půdní reakce ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	25
Graf 2(a),(b): Změny výměnné půdní reakce ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	26
Graf 3(a),(b): Obsah vodou extrahovatelného fosforu ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	28
Graf 4(a),(b): Obsah fosforu měřený metodou Mehlich III ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	30
Graf 5(a),(b): Množství kationtu hliníku $Al^{3+}$ stanoveného extrakcí $BaCl_2$ ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	32
Graf 6(a),(b): Množství kationtu hliníku $Fe^{3+}$ stanoveného extrakcí $BaCl_2$ ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	33
Graf 7(a),(b): Množství kationtu vápníku $Ca^{2+}$ stanoveného extrakcí $BaCl_2$ ve vybraných půdních typech s odlišným ošetřením po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	34
Graf 8(a),(b): Rozdíl aktivní půdní reakce mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	36
Graf 9(a),(b): Rozdíl výměnné půdní reakce mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	37
Graf 10(a),(b): Rozdíl ve vodě mobilizovatelném fosforu mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	38
Graf 11(a),(b): Rozdíl v množství fosforu měřený metodou Mehlich III mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 a 12 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	40
Graf 12(a),(b): Rozdíl v množství $Al^{3+}$ extrahovaný $BaCl_2$ mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	41
Graf 13(a),(b): Rozdíl v množství $Fe^{3+}$ extrahovaný $BaCl_2$ mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	42
Graf 14(a),(b): Rozdíl v množství $Ca^{2+}$ extrahovaný $BaCl_2$ mezi A. niger a kontrolou ve vybraných půdních typech po 6 týdnech kultivace (zdroj: vlastní měření). .....	44



## **12 Seznam tabulek**

Tabulka 1: Charakteristika vybraných půd z lokality .....	18
---	----