

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**Možnosti využití přístroje OxiTop
pro měření půdní respirace**

Bakalářská práce



Autor práce: Matyáš Malý

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Voříšek, CSc.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Možnosti využití přístroje OxiTop pro měření půdní respirace vypracoval samostatně výhradně za použití pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

Matyáš Malý

Děkuji prof. Ing. Karlovi Voříškovi, CSc. a RNDr. Svatoslavě Strnadové za vstřícnost, odborné vedení a cenné rady, které mi byly značně nápomocné při zpracování této práce.

Souhrn

Práce se věnuje uvedení nového přístroje pro měření půdní respirace OxiTop OC 110 do provozu a vytvoření metodiky pro práci s ním. Zejména se zabývá parametry vhodnými pro nastavení a založení měření.

Dále se práce věnuje ověření a vyhodnocení využitelnosti metody měření půdní respirace pomocí OxiTopu v porovnání s konvenčními metodami. K ověření této nové metody bylo použito souběžného měření dvacetihodinovým respirometrickým testem. Pro zjištění parciálních informací, vedoucích k úspěšnému založení a průběhu měření, byla použita titrační metoda. Vzorky půdy k měření byly odebrány z dlouhodobého pokusu Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze na školním demonstračním a pokusném pozemku a to z variant – Hnůj, NPK a Kontrola.

Hlavním výstupem této práce je navržený postup měření přístrojem OxiTop OC 110.

Klíčová slova

OxiTop, půdní respirace, půdní mikroorganismy, půdní kvalita

Summary

The thesis deals with start-up of new soil respirometric apparatus OxiTop OC 110, it's proper set-up for practical experiments and also creating methodology for whole process of measuring.

Another step was to compare this new method with conventional one by verifying and evaluating results. As a conventional method has been used parallel measuring by twenty-hour respirometrical test. The titration has been used for determination of partial information that led to appropriate setting of the apparatus. Soil samples were taken of the long-term experiment managed by KAVR FAPPZ ČZU that has place on school experimental field. Examined variants were Manure, NPK and Control.

Main output of this thesis is the proposed method of measuring with OxiTop OC 110.

Keywords

OxiTop, soil respiration, soil microorganisms, soil quality

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce a hypotézy	9
2.1. Cíle práce	9
2.2. Hypotézy	9
3. Literární rešerše.....	10
3.1. Mikrobiální populace a její prostředí.....	10
3.1.1. Půda	10
3.1.2. Půdní mikroorganismy	11
3.1.3. Půdní mikrobiální biomasa.....	11
3.1.4. Vliv mikrobiální složky na kvalitu půdy	12
3.2. Měření v půdní mikrobiologii.....	14
3.2.1. Vzorkování.....	14
3.2.2. Rozvržení vzorkování	15
3.2.3. Odběr vzorků.....	17
3.2.4. Transport vzorků.....	18
3.2.5. Úprava vzorků	18
3.2.6. Skladování vzorků	18
3.3. Mikrobiální aktivita půdy	20
3.3.1. Půdní respirace.....	21
3.3.2. Respirační kvocient.....	23
3.3.3. Bazální půdní respirace.....	23
3.3.4. Substrátem indukovaná půdní respirace	23
4. Zařízení, materiál a metodika	25
4.1. Zařízení OxiTop OC 110	25
4.2. Půdní vzorky.....	25
4.2.1. Schéma a systém odběru	25
4.2.2. Úprava vzorků před skladováním	26
4.2.3. Skladování vzorků	26
4.3. Zkušební měření.....	26
4.3.1. Stanovení vhodných parametrů pro nastavení a práci s přístrojem OxiTop OC 110.....	26

4.3.2.	Schéma řídicí jednotky (kontroloru).....	27
4.3.3.	Schéma měřící soustavy	28
4.4.	Měření na přístroji OxiTop OC 110.....	29
4.4.1.	Pracovní postup přípravy	29
4.4.2.	Popis funkcí kláves na kontroloru	29
4.4.3.	Nastavení řídicí jednotky (kontroloru)	30
4.4.4.	Spuštění měření	31
4.4.5.	Vyvolání průběžných hodnot	31
4.4.6.	Vyvolání dat po skončení doby měření.....	32
4.5.	Dvacetihodinový respirometrický test.....	32
4.6.	Titrační metoda měření půdní respirace.....	33
5.	Výsledky.....	34
5.1.	Nastavení přístroje OxiTop OC 110	34
5.2.	Stanovení parametrů pro měření	34
5.2.1.	1. zkušební měření.....	34
5.2.2.	2. zkušební měření.....	37
5.3.	Modelové srovnávací měření respirace na dlouhodobém pokusu KAVR	39
5.3.1.	Odběr 17. 8. 2011.....	39
5.3.2.	Odběr 21. 10. 2011	39
6.	Diskuze	41
7.	Závěr	43
8.	Použitá literatura.....	44
9.	Přílohy	Chyba! Záložka není definována.
9.1.	Grafy modelového srovnávacího měření.....	48
9.1.1.	Odběr 17. 8. 2011.....	48
9.1.2.	Odběr 21. 10. 2011	50

1. Úvod

Zemědělství je stěžejním oborem pro existenci lidské společnosti a to nejen z důvodu zabezpečení dostatečného množství potravy. Jeho úkolem je i utváření a revitalizace prostředí, hospodaření s energií či vytváření podmínek pro koloběh látek. Nemalou roli hraje i jako médium pro působení vědy. Vedle válek i jiných katastrof je odedávna zemědělství a prostředí s ním spojené hlavní hnací silou pokroku. Nejinak tomu je i v dnešních dnech, kdy jsou na něj kladeny vysoké nároky z důvodu rychlého růstu světové populace, zmenšování plochy orné půdy ve vyspělém světě, neutěšené situaci v zemích třetího světa či uměle vyvolané panice ohledně změn klimatu. Svoji roli hraje také zmenšování vstupů do této sféry a to jak těch finančního rázu, tak vstupů týkajících se lidského kapitálu zabývajících se tímto oborem. Výzkum v oblasti zemědělství se proto jeví jako důležitá, zajímavá ale i perspektivní disciplína.

V současnosti se kromě zdokonalování mechanizace klade důraz na pěstování a šlechtění nových výrazně výnosnějších odrůd polních plodin. K dosažení očekávaných výsledků při jejich praktickém využití je však třeba úměrně zvyšovat i úroveň poznání o podmínkách prostředí, ve kterém by měly být pěstovány. Neméně důležitou oblastí je i zefektivnění výživy a hnojení. Úspěchu na tomto poli by nemohlo být dosaženo bez zlepšování znalostí o vlastnostech půdy a životních projevech půdních mikroorganismů.

Půdní respirace jako elementární projev aktivity a života půdních mikroorganismů, poskytuje informaci nejen o jejich stavu a vitalitě, ale zároveň informuje o degradaci biologicky dostupných organických látek, či o průběhu jejich mineralizace. Její měření je proto základním analytickým nástrojem stanovení kvality půd pro zemědělskou praxi.

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle práce

Stěžejním cílem práce je zprovoznění nového přístroje OxiTop OC 110. Dále je cílem práce jeho uvedení do praxe měření půdní respirace, srovnání měření s klasickými metodami, určení vhodnosti jeho použití pro praktické měření a vytvoření metodiky pro práci s tímto přístrojem.

2.2. Hypotézy

OxiTop OC 110 je vhodný pro praktické měření půdní respirace.

Měření s OxiTop OC 110 skýtá oproti klasickým metodám výhody.

3. Literární rešerše

3.1. Mikrobiální populace a její prostředí

3.1.1. Půda

Půda jako médium či substrát pro rozličná společenství mikroorganismů je místem, ve kterém probíhá řada procesů, jež jsou díky množství a aktivitě mikroorganismů, kteří v ní asimilují minerální látky a rozkládají látky organické, součástí přírodních cyklů látek (Fleisbach a Widmer, 2006).

Půda je samostatným přírodním útvarem vzniklým působením půdotvorných faktorů z povrchových zvětralin zemské kůry a z organických zbytků (Wu a Zhang, 2011). Je životním prostorem pro půdní organizmy, stanovištěm volně rostoucí vegetace i prostředkem sloužícím pro pěstování kulturních rostlin. Má schopnost regulovat koloběh látek, ukládat je a být tak i jejich zdrojem a to jak látek užitečných, tak potenciálně rizikových. Půdní systém je živý dynamický a stále se vyvíjející. Pro přežití a prosperitu všech suchozemských společenstev hraje tato slabá půdní vrstva Země jednou z nejdůležitějších a nezastupitelných rolí (Schloter a kol., 2003). Půda je tvořena třemi základními skupenstvími - pevným, kapalným a plynným. Tyto mohou být dle Waksmana (1961) rozděleny do pěti různých složek:

- MINERÁLNÍ SLOŽKA. Její částice mají značně rozdílnou velikost i stupeň mechanického i chemického rozkladu. Tato skupina zahrnuje vše od oblázků přes pískovou a hlinitou až po jílovitou frakci.
- ORGANICKÉ ZBYTKY ROSTLINNÉHO A ŽIVOČIŠNÉHO CHARAKTERU. Tato skupina zahrnuje čerstvě opadané listí, strniště a další odumřelé části rostlin, zbytky těl hmyzu, ostatních bezobratlých i obratlovců. Tyto složky, případně jejich části, se v půdě nacházejí ve stádiích rozkladu od zcela nerozložených až po rozložené do stádia, ve kterém se již nedá rozeznat původní struktura, jejichž poslední formou je stádium, které označujeme jako humus, případně humifikované látky.
- ŽIVÁ SLOŽKA. Všechny formy života nacházející se v půdě – živé kořeny všech vyšších rostlin, živočichové od prvoků, hmyzu, žížal až po hlodavce a také početné skupiny hub, řas, kvasinek, aktinomycet a bakterií.

- VODA. Hlavní představitel kapalné frakce půdy zahrnující vodu volnou i hygrokopicky vázanou, roztoky solí i organických látek.
- PLYNY. Hlavními složkami půdní atmosféry jsou oxid uhličitý, kyslík a dusík a dále pak ostatní plyny, jejichž obsah je charakteristickým prvkem různých typů a druhů půd.

3.1.2. Půdní mikroorganismy

Díky mikrobiální populaci utvářející společně s kořeny vyšších rostlin a živočichy živý ekosystém, není půda jen mrtvou masou minerálních látek a organických zbytků. Mikrobiální životní prostor je v zásadě porézní médium proměnné v prostoru i čase, jež je společným produktem biologických, mechanických a fyzikálně-chemických procesů v půdě a jejím okolí (Standing a Killham, 2007). Důraz na výzkum půdních mikroorganismů a zájem o jejich diverzitu mezi vědci rapidně roste s vzrůstajícím zájmem o půdní úrodnost. Hlavní charakteristickou vlastností není jen chemické složení půdy ale i kvalitativní a kvantitativní ukazatele mikrobiálního života (Giri a kol., 2005). Péče a zájem o diversitu, životaschopnost a fungování mikrobiálních populací je základním předpokladem trvale udržitelného rozvoje zemědělství (Benizri a kol., 2002).

3.1.3. Půdní mikrobiální biomasa

Půdní mikrobiální biomasa může být definována jako skupina všech organismů žijících v půdě, jež jsou obvykle menší než zhruba 10 μm (Schloter a kol., 2003). Největší pozornost bývá věnována pěti hlavním skupinám, do nichž jsou mikroorganismy rozděleny: houbám, bakteriím, aktinomycetám, řasám a prvokům. Tyto jsou úzce spojeny s půdními částicemi, převážně pak jílovo-organickými složkami. Nejčastěji můžeme mikroby pozorovat jako samostatné buňky či jako mikrokolonie (Buscot, 2005). Každý druh má svou nezastupitelnou specifickou roli tak, aby se vzájemně doplňovaly a fungovaly jako jeden celek (Brooks a kol., 1984). Na základě molekulárních studií lze usuzovat, že například 1g jakékoli půdy průměrně obsahuje více než miliardu bakterií patřících do zhruba 10000 různých druhů (Ovreas a Torsvik, 1998), přičemž celkem bylo celosvětově zatím v půdách

determinováno více než 30000 druhů bakterií, 1500000 hub, 60000 řas (převážně řas modro-zelených – cyanobakterií) a 100000 prvoků. V průměrně úrodné půdě mírného pásma pak může být celkový objem mikrobiální biomasy až 20 t/ha ornice (Pankhurst a Lynch, 1995).

3.1.4. Vliv mikrobiální složky na kvalitu půdy

Kvalita zemědělských půd je definována jako schopnost poskytovat zdravé a nutričně bohaté kulturní plodiny, schopnost rezistence proti erozi a schopnost minimalizovat dopad nežádoucích vlivů prostředí na rostliny. Celosvětová snaha o zlepšení či zachování půdních parametrů pramení zejména ze závažného zvyšování míry eroze, zvýšeného výskytu tvorby půdních škraloupů, utužování, snížení infiltrace vody, nepříznivých změn pH, kontaminace polutanty, zasolení a zvyšování intenzity zemědělské produkce (Babich a Stotzky, 1985). Intenzivní hospodaření bez dostatečného dodávání hnojiv zároveň vede k vyčerpání půdy, což je patrné na příkladu Středního Východu, kde bylo sice po staletí využíváno orby, avšak bez přihnojování a v dobách sucha, kdy nebylo pokrytí polí dostatečné, docházelo k masivním erozím (Elliot a kol., 1996).

Kvalita půdy však nezáleží jen na fyzikálních či chemických vlastnostech, ale je velice úzce spjata i s těmi biologickými, a to zejména těmi, jež jsou ovlivňovány mikrobiální aktivitou. Půdní vlastnosti, jež jsou ovlivněny obsahem a složením mikrobiální biomasy, jsou zejména: vodní kapacita, stupeň infiltrace, erodovatelnost, tvorba škraloupů, stabilita půdního agregátu, náchylnost ke zhutnění, koloběh živin a schopnost jejich zadržování, přístupnost dusíku a složení půdní organické hmoty (Elliot a kol., 1996). Tuto skutečnost lze doložit na několika studiích, které prokázaly vliv a důležitost mikroorganismů a produktů jejich metabolismu na půdní strukturu a stabilitu půdního agregátu (Waksman, 1961). Zabránit degradaci vlastností půdy ovlivnitelných mikrobiálními pochody lze zejména využitím statkových hnojiv, zeleným hnojením či dalším hnojením organickými materiály, zařazením meziplodin do osevního postupu, efektivním zacházením s posklizňovými zbytky či samotným vhodně sestaveným osevním postupem. V návaznosti na stupeň poškození půdy v tomto ohledu bude však náprava značně zdoluhavá (Elliot a kol., 1996). Renagold a kol. (1987) ve své dlouhodobé studii trvajícím od roku 1948 do roku 1985 na jisté

farmě ve východní části státu Washington, USA pozorovali, že vzorky z pozemků hnojených organickými hnojivy mají výrazně vyšší obsah polysacharidů, nižší náchylnost k praskání a přesychání a mocnost ornice je v průměru o téměř 16 cm větší než mocnost ornice u pozemků, jež byly obhospodařovány za použití výhradně minerálních hnojiv. Právě hloubka ornice je v přímé souvislosti s obsahem organické hmoty a stupněm jejího rozkladu, během doby trvání studie totiž docházelo k mnohem masivnější erozi a tím i úbytku ornice. Bylo prokázáno, že při stejném způsobu a intenzitě hospodaření by do padesáti let na těchto pozemcích došlo ke snížení výnosů až na polovinu a to i za předpokladu aplikace vyšších dávek minerálních hnojiv. Existence úzké pozitivní korelace mezi obsahem organické hmoty a mikrobiální aktivitou je neoddiskutovatelným faktem (Martyniuk a Wagner, 1978).

Pokud bychom chtěli půdní kvalitu vyjádřit pomocí kvantitativních ukazatelů, zjistíme, že většinu znaků nelze čísly relevantně vyjádřit. Ukazatelem, který je nejobektivněji hodnotitelný tak zůstává právě obsah organické hmoty, jež poukazuje i na potenciál obsahu mikrobiální biomasy. Jedinečnost tohoto parametru je i v propojení fyzikálních, chemických a biologických vlastností půdy (Elliot a kol., 1996).

3.2. Měření v půdní mikrobiologii

3.2.1. Vzorkování

Většina analytických metod používaných v půdní mikrobiologii počítá se zpracováním vzorků v laboratorním prostředí, proto je základem každého měření v tomto oboru vzorkování. Cílem odběru vzorků půdy z určitého pozemku nebo lokality pro mikrobiologické analýzy je většinou získání průměrného vzorku reprezentujícího danou plochu. Z tohoto důvodu odebíráme větší množství dílčích vzorků, jejichž smícháním se získá vzorek směsný. Dle Krištůfka a Šimka (1998) může být počet dílčích vzorků různý a bývá stanoven zejména na základě velikosti plochy, jež je cílem analýzy, jeho heterogenity a samozřejmě potřeby samotného měření. Nevýhodou při odběru malého počtu dílčích vzorků může být nebezpečí, že výsledný směsný vzorek bude ovlivněn prostorovou variabilitou, což znamená, že nebude relevantně reprezentovat půdu dané lokality. Nevýhodou odběru většího počtu vzorků pak může být větší pracnost, zvýšené finanční a časové nároky, pracnější a potenciálně obtížnější homogenizace atp. Pokud je našim cílem získat informace o heterogenitě, či zjistit krajní hodnoty konkrétních parametrů pozemku, dílčí vzorky nemícháme, ale ukládáme je a analyzujeme individuálně (Forster, 1995).

Každé mechanické narušení půdy nutně vede k změnám charakteru daného místa a k ovlivnění mikrobiálního života a jeho aktivity. Tím, že během odběru vyjmeme z půdního profilu jeho část, narušíme v něm probíhající procesy. K mnohem znatelnějším změnám však bude docházet ve vzorku samotném. Rozsah změn mikrobiální aktivity ve vzorku záleží především na odebraném množství půdy (Öhlinger, 1996).

Pokud není našim cílem zkoumání vlivu změn počasí či například aktivity indukované hnojením je, dle Krištůfka a Šimka (1998), vhodné odebírat půdu za podmínek standardních pro danou lokalitu. Není proto vhodné provádět vzorkování během či bezprostředně po dlouhých, případně enormních, obdobích sucha, vydatných srážek, zaplavení nebo po hnojení. Zcela nevhodné je pak provádět odběry po aplikaci pesticidů nebo jiném chemickém zasažení půdy. Jako vhodná doba pro odběr půdních vzorků po hnojení se doporučuje 4 – 6 týdnů po minerálním hnojení a 3

měsíce po hnojení organickým. Pokud by cíle pozorování mohly být ovlivnitelné zastíněním rostlinným pokryvem nebo vlivem kořenů, je třeba tuto skutečnost brát v úvahu, protože v jarním a zimním období je zastínění i vliv kořenů nižší než v období letním a podzimním. Vliv sezóny na půdní mikroorganismy je patrný i skrze vlhkostní a zejména teplotní poměry, dle Forstera (1995) je proto pro komplexnost, objektivitu a možnost porovnání výsledků z různých lokalit žádoucí provádět vzorkování během celého roku či sezóny.

3.2.2. Rozvržení vzorkování

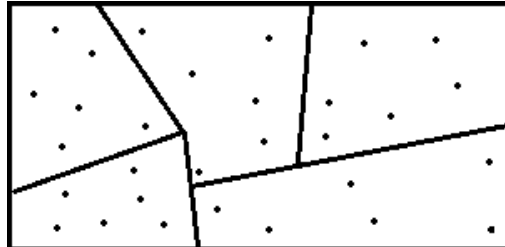
Vzorkovací schéma může mít na kvalitu a reprezentativnost výsledků zcela zásadní vliv. Pokud se rozhodneme odebrat vzorky zcela náhodně na velmi různorodém pozemku, nebudeme pravděpodobně mít ve směsném vzorku zastoupeny všechny významné složky půdy. I proto je důležité znát základní charakteristiky pozemku z hlediska jeho topografie (svažitost, orientaci na světové strany, nadmořskou výšku nejnižšího a nejvyššího bodu, atd.), dále hloubku ornice, utuženost půdy, skeletovitost a vláhové poměry. Pokud se ve výše zmíněných charakteristikách minimální a maximální parametry daného pozemku liší o více než 30%, je žádoucí takový vhodně rozdělit a provést oddělené vzorkování, případně vyloučit vzorky s krajními hodnotami (Öhlinger, 1996).

Minimální počet vzorků je obtížné obecně stanovit, je ho proto většinou nutné stanovit empiricky. Schéma pro vzorkování by mělo respektovat pedologickou a geochemickou variabilitu pozemku, stanovené cíle měření a být vhodné pro podmínky dané lokality. Opět nelze doporučit univerzální schéma, a jak uvádí Sářka (1998) aplikované schéma je nakonec kombinací těchto základních schémat:

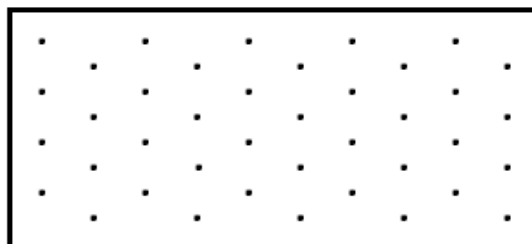
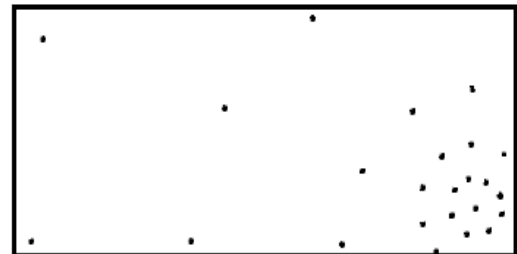
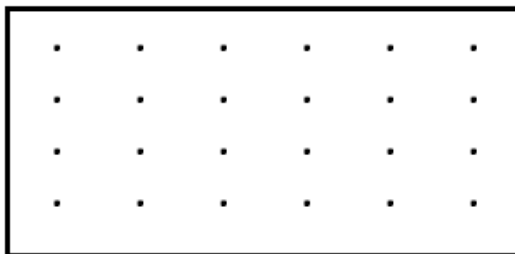
- NÁHODNÉ SCHÉMA (RANDOM). Lokality odběru jsou určeny náhodně, většinou respektující zásadu rovnoměrného rozmístění na ploše.



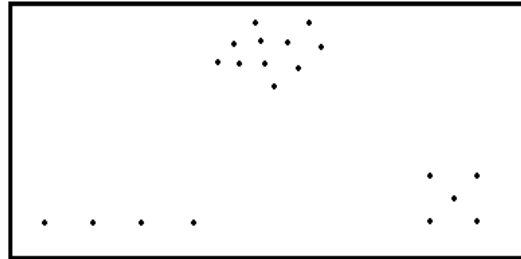
- UTRÍDĚNÉ NÁHODNÉ SCHÉMA (STRATIFIED RANDOM). Zájmová lokalita je rozdělena na několik okrsků (strat) podle odlišných podmínek a v každém okrsku je uplatněna náhodná lokalizace vzorku při odlišné hustotě na jednotku plochy. Utřídění (stratifikace) umožňuje zachytit předem identifikovatelné odlišnosti menších ploch, které by mohly v náhodném nebo systematickém vzorkování vypadnout.



- SYSTEMATICKÉ SCHÉMA (SYSTEMATIC). Je založeno na vytyčení pravidelné vzorkovací sítě. Ta může být liniová, hvězdicová, trojúhelníková, čtvercová, hexagonální atp. Výhodou je rovnoměrné rozmístění vzorků na ploše, lepší možnost uplatnění statistických a mapových metod, zachycení prostorové kontinuity půdních vlastností. Nevýhodou je možnost vynechání „hot spots“, pokud systematická síť není dostatečně hustá. Proto je možné zvolit v rámci jedné vzorkované plochy i rozdílnou hustotu vzorkování. Například hvězdicové schéma se používá pro charakteristiku bodových zdrojů kontaminace – střed hvězdice je umístěn do zdroje. V blízkosti středu může být na paprscích zvolena vyšší hustota odběrů. Optimální výsledky pro zachycení „hot spots“ byly dosaženy aplikací systematického schématu tzv. herringbone.



- CÍLENÉ SCHÉMA (JUDGMENTAL). Lokality odběru vzorků, případně hustota vzorkování jsou určovány podle požadovaného cíle a známých půdních poměrů (například zachycení všech půdních typů na ploše atp.)



3.2.3. Odběr vzorků

Odběrová soustava nemusí být nikterak komplikované zařízení. V zásadě se sestává z nějakého druhu vzorkovače, většinou se jedná o ocelový válec či vrták o průměru 2 – 5 cm (Krištůfek a Šimek, 1998), v některých případech postačí i obyčejný rýč, lopatka či nůž, dále vhodné nádoby či plastového sáčku, případně zkumavky pro ukládání vzorků a popisovače pro označení a rozlišení vzorků. Hloubka i průměr odebíraného vzorku záleží jednak na používaném vybavení, ale zejména na účelu vzorkování. Pro mikrobiologické účely bývá hloubka odběru v rámci mocnosti ornice tedy většinou do 25 cm (Forster, 1995). U orných půd v našich zeměpisných šířkách se nejčastěji odebírá svrchní část ornice, což je svrchní zhruba 15 cm vrstva. Vzorky z půdních vzorkovačů ve tvaru válcovitých monolitů je možné analyzovat jako celek či je dle potřeby rozdělit na jednotlivé vrstvy, protože aktivita a rozmístění půdních mikroorganismů se v půdním profilu s vzrůstající hloubkou výrazně mění. V případě půd s dobře rozlišitelnými jednotlivými horizonty se tyto zpravidla analyzují zvlášť. I když v individuálních případech může být zvolená strategie jiná, pro studium sinic a řas se zpravidla odebírá svrchní 1 - 3 cm vrstva půdy, pro studium bakterií a mikromycet svrchní 5, 10 nebo 15 cm vrstva, pro studium půdních živočichů svrchní 10 nebo 15 cm vrstva. Průměr odebíraného vzorku takováto specifika nemá, je přesto žádoucí znát plochu vzorkovače, protože pak lze výsledky analýz lehce přepočítat na jednotku plochy (Krištůfek a Šimek, 1998). Pro zvýšení preciznosti a lepší vypovídací hodnotu výsledků je však vhodné stanovit si a dodržovat jednotnou hloubku odběru.

3.2.4. Transport vzorků

Transport vzorků do laboratorního prostředí by měl proběhnout co možná nejrychleji. V ideálním případě by mělo ještě na poli proběhnout zchlazení, nebo alespoň uložení do tepelně izolovaných nádob a to z důvodu omezení změn vzniklých teplotními rozdíly po odebrání a během přepravy do laboratoře. Po odebrání neporušených půdních vzorků je třeba se vyvarovat vibracím a neřízenému pohybu vzorků (Forster, 1995).

3.2.5. Úprava vzorků

Z odebraných vzorků se nejprve odstraní větší kameny, viditelné části rostlin, případní živočichové a následně se opět důkladně promísí. Pro řadu analýz se směsný vzorek proseje přes síto s 2 mm oky (nejčastěji používaná síta mají oka o velikosti 2 – 5 mm). Může se stát, že vzorek není z důvodu vlhkosti či utužení možné úspěšně prosít a proto je nutné ho nastrohat na adekvátně hrubém struhadle. Po prosetí je vhodné opět vybrat rostlinné zbytky. V některých případech se z důvodu možné kontaminace na sítu dává přednost jen ručnímu odstranění větších částic. Další nevýhodou prosívání je to, že s hrubší částí připravíme vzorek i o některé mikroorganismy (Öhlinger, 1996). Krištůfek a Šimek (1998) zjistili, že např. dehydrogenázová aktivita stanovená ve frakci půdních částic menších než 0,25 mm byla o 22 % vyšší v porovnání s aktivitou půdní frakce pod 2 mm. Měření provedli ihned po prosetí půdy.

3.2.6. Skladování vzorků

Dle Forstera (1995), Öhlingera, (1996) ani Krištůfka a Šimka (1998) nejsou pro skladování vzorků zatím v odborné literatuře daná žádná obecně závazná pravidla. Je to podle nich způsobeno hlavně tím, že efekty vlivu skladování byly autorem zpracovány pouze pro jimi vybraný konkrétní zkoumaný případ. Obecně se dá říci, že vzhledem k nepřírozeným podmínkám a k řadě faktorů, které mohou ovlivnit vzorek během skladování, je vhodné provádět analýzy co možná nejdříve po odběru. To však není vždy možné, pro některé typy analýz, zejména pro stanovování některých aktivit mikroorganismů, vhodné a jistě ne celá vědecká veřejnost by se na tomto postupu shodla, protože skladování v určitých podmínkách může eliminovat změny

vzniklé odběrem, který mohl v mikrobiální biomase způsobit velmi prudké změny. Má se za to, že během skladování se poměry ve vzorku opět stabilizují, není však zcela jasné nakolik se mikrobiální společenstvo ve vzorku podobá původnímu společenstvu v půdě v době před odběrem (Křišťůfek a Šimek, 1998). Naopak se dá shodnout na tom, že je vhodné minimalizovat manipulaci se vzorky, zajistit jim stabilní a standardní aerační podmínky, čistotu a sterilitu a dodržovat základní hygienická pravidla a normy.

Pokud je analýza prosetých vzorků provedena do zhruba jednoho měsíce od jejich odebrání, je možné je skladovat ve tmě při teplotách od 2 do 4 °C v klimatizovaných místnostech nebo lednicích. Takto uložené vzorky by neměly být stlačené. Pokud by doba skladování měla překročit jeden měsíc, dají se vzorky skladovat zmražené na teplotu -20 °C, v tomto případě by však mělo dojít pouze k jejich homogenizaci a k prosetí by mělo dojít až po jejich rozmražení. Rozmrazovat vzorky se doporučuje minimálně 5 dní před jejich analyzováním a to opět při teplotách od 2 do 4 °C v klimatizovaných místnostech nebo lednicích (Öhlinger, 1996).

Například Elhottová a kol. (1998) provedla dva souběžné pokusy na sledování změn mikrobiální biomasy v průběhu skladování vzorků při 4 °C. V obou případech byly zjištěny signifikantní změny v celkovém množství mikrobiální biomasy a to zejména v prvních dnech, zatímco po zhruba po dvou měsících skladování se mikrobiální biomasa ustálila na konstantní hladině. Pokles celkové mikrobiální biomasy byl provázen nárůstem biomasy bakteriální a byl tedy způsoben především poklesem biomasy mikromycet, což bylo podle Elhottové a kol. (1998) způsobeno tím, že během mechanického zpracování půdy v rámci přípravy vzorku pro analýzu došlo k potrhání a následnému odumření houbových vláken. Nárůst bakteriální biomasy byl doprovázen akumulací zásobních látek v bakteriálních buňkách, jež předchází tvorbě klidových stádií, což je ukazatelem, že bakterie se v prvních měsících přizpůsobovaly novým, nepříznivým podmínkám. Navrhuje proto, aby vzorky pro stanovení mikrobiální biomasy byly po odběru přesety a dále uchovávány ve vlhkém stavu v polyetylenových sáčcích po dobu nejméně dvou měsíců.

V každém případě je pro porovnání výsledků nejdůležitější se všemi vzorky v rámci jednoho způsobu měření zacházet naprosto stejně (Forster, 1995).

3.3. Mikrobiální aktivita půdy

Termín mikrobiální aktivita v rámci půdy zahrnuje všechny biochemické reakce vyvolané půdními mikroorganismy. Na rozdíl od půdní biologické aktivity tedy nezahrnuje příspěvek metabolických aktivit půdní fauny a flory (Nannipieri a kol., 1990). Některé reakce, jako například půdní respirace či produkce tepla vyvolaná mikrobiální aktivitou, jsou vesměs spojeny se všemi, nebo alespoň většinou půdních mikroorganismů. Zatímco procesy jako nitrifikace či fixace dusíku jsou spojeny pouze s konkrétními typy mikroorganismů (Alef a Nannipieri, 1995). Společenství půdních mikroorganismů je značně různorodé, jakož i funkce jednotlivých druhů. Jejich aktivity vedou k uvolňování živin a jejich zpřístupnění rostlinám, mají i zásadní vliv na biogeochemické cykly v půdě, rozkládají látky půdu znečišťující, nepřírozené, stabilizují půdní strukturu či hospodaří s půdní organickou hmotou. Mikrobiální aktivity jsou ovlivňovány a regulovány panujícími živinovými poměry, teplotou, vlhkostí půdy či stupněm provzdušenosti čili dostatkem kyslíku (Dilly, 2005).

Měření půdní mikrobiální aktivity je založeno na přítomnosti a pozorování neporušených a aktivních buněk mikrobů a je vlastně odrazem jejich fyziologického stavu (Alef a Nannipieri, 1995).

Často se můžeme setkat se souběžným měřením mikrobiální aktivity v aktuálních podmínkách, tedy podmínkách téměř odpovídajícím podmínkám panujícím na poli a měřením na vzorcích obohacených o živný substrát jako je například glukóza. V prvním případě mluvíme o bazálně-aktuální aktivitě a ve druhém o aktivitě potenciální (Nannipieri a kol., 1990). Toto rozdělení však i podle něj není přesné, protože analýzy prováděné v laboratořích na prosetých vzorcích s optimálním nasycením vodou a při optimální teplotě, by mohly být považovány za měření potencionální aktivity i přes absenci živného substrátu (Alef a Nannipieri, 1995). Podle Dillyho (2006) má na mikrobiální aktivitu vliv i doba trvání pokusu, leč větší váhu přisuzuje prostředí, ve kterém pokus probíhá. V polních pokusech, a to zvláště těch trvajících několik týdnů až měsíců, můžou, podle něj, měnit se podmínky počasí v kombinaci s vlivem průběhu měření značně ovlivňovat mikrobiální aktivitu a tím i výsledky. Na druhou stranu je takovéto pozorování pro řadu pokusů přesnější a vhodnější, protože v sobě zahrnuje i vliv faktorů prostředí jako je teplota, dostatek

vlhkosti a provzdušnění ale také interakci mikroorganismů s rostlinami a živočichy. Naopak laboratorní prostředí má výhodu ve stejnorodosti prostředí, v němž pokusy probíhají a faktory, které mohou způsobit nežádoucí ovlivnění výsledků, jsou zde značně eliminovány. Další výhodou laboratorního prostředí je možnost porovnávání dat z různých měření různých laboratoří.

3.3.1. Půdní respirace

Půdní respirace je jedním z nejstarších, ale přesto stále pravděpodobně nepoužívanějším způsobem stanovení půdní mikrobiální aktivity (Kieft a Rosacker, 1991).

Půdní respirace je spojena s celou širokou škálou půdních mikroorganismů, avšak dominantní roli zřejmě zaujímá biomasa půdních hub následovaná biomasou půdních bakterií. Jejich poměr a jejich podíl na celkovém množství uvolněného oxidu uhličitého může být i určujícím faktorem pro hodnocení kvality půd a pro způsob hospodaření na nich (Pell a kol., 2006).

Aktivní život buněk vyžaduje neustálý přísun energie, což pro heterotrofní mikroorganismy znamená její transformaci z organických látek jako je například celulóza, bílkoviny, nukleotidy či humifikované složky. Energii dodávající reakce v buňkách mají redoxní charakter a jsou založeny na přenosu elektronu od donora k akceptoru. Respirací, jež je oxidací organických látek aerobními mikroorganismy, dochází k přijetí elektronu a uvolnění oxidu uhličitého a vody. Metabolické aktivity půdních mikroorganismů tak mohou být kvantitativně charakterizovány pomocí měření produkce CO₂, případně spotřeby O₂ (Nannipieri a kol., 1990).

Dle novější definice Pella a kol. (2006) je respirace procesem pravděpodobně nejúžeji spjatým s životem, kterým je aerobním i anaerobním získávání energie, v němž organické i anorganické sloučeniny slouží mikrobiální buňce jako primární donor elektronu a vstřebané zoxidované látky slouží jako cílový elektronový akceptor. Během respirace prochází energií obsahující látka procesem glykolýzy, citrátovým cyklem až do elektronového respiračního řetězce.

O něco méně sofistikovaná definice půdní respirace uvádí, že během procesu je přijímán kyslík ve stejném čase, jako je uvolňován oxid uhličitý (Dilly a kol., 2000)

V půdním ekosystému se však vyskytují i jiné zdroje oxidu uhličitého než mikroorganismy, které pak mohou ovlivnit výsledky zejména při měření in situ. K takovým může patřit například fermentace nebo abiotické procesy jako uvolňování oxidu uhličitého z uhličitánů (Pell a kol., 2006). Dalším velmi důležitým zdrojem oxidu uhličitého v půdě patří kořeny rostlin, které z celkového množství stojí za produkcí zhruba 12 - 30 %. Za respiraci však musí být brána i řada anaerobních procesů kdy jsou například NO_3^- , Fe^{3+} nebo SO_4^- anaerobními mikroorganismy využity jako elektronové akceptory a tak není molekula kyslíku spotřebovávána jako při aerobní respiraci. Proto pokud se produkce oxidu uhličitého a souběžná spotřeba kyslíku bere jako indikátor půdní respirace, jedná se pouze o půdní aerobní respiraci a ne fermentaci (Pell a kol., 2006).

Půdní respirace je také ovlivněna panující teplotou, půdní vlhkostí, přístupností živin, strukturou půdy či větrnými podmínkami. Optimální obsah vody pro půdní respiraci se pohybuje zhruba v rozmezí 50 – 80 % maximální vodní kapacity v závislosti na půdním druhu (Pell a kol., 2006). Aktivita větru a s ní spojené vysušování půdy má na respiraci půdních mikroorganismů zásadní vliv. Ve znovu ovlhčených větrem vysušených půdách dochází z počátku díky fyzikálním a chemickým procesům k velmi razantnímu nárůstu aktivity, což je pravděpodobně důsledek uvolnění jednoduše degradovatelných organických sloučenin, jako jsou například aminokyseliny nebo organické kyseliny. Znovuovlhčením větrem vysušených půd obsahujících uhličitany dochází také k uvolnění abiotického oxidu uhličitého a proto se při zkoumání respirace u takových půd užívá měření založeného na spotřebě kyslíku (Alef, 1995).

Uhlík tvoří v průměru asi 50 % z celkového zastoupení prvků v rostlinných i živočišných pletivech. Rozkladem jejich zbytků tudíž kromě asimilace během buněčné syntézy dochází k jeho uvolňování do atmosféry a to v podobě oxidu uhličitého. V případě dekompozice celulózy, hemicelulózy, cukrů a škrobů houbovitými mikroorganismy a aerobními bakteriemi v půdě, je 50 – 80 % z celkově uvolněného uhlíku právě v této formě (Waksman, 1961). Waksman (1961) při pokusech s rozkladem rýžové slámy mimo půdu, v laboratorních podmínkách pouze s čistými kulturami mikroorganismů, pozoroval, že z celkového množství oxidu uhličitého je do okolí uvolněno průměrně 72 – 83 %.

3.3.2. Respirační kvocient

Respirační kvocient (RQ) se vyjadřuje jako podíl uvolněného oxidu uhličitého ku spotřebovanému kyslíku a vypovídá o fyziologickém stavu půdní mikrobiální biomasy (Alef, 1995). Jeho hodnota by teoreticky měla být 1, ale v praxi je ve většině případů nižší, takže příjem kyslíku bývá všeobecně vyšší než produkce oxidu uhličitého, což může být dle Dillyho (2005) způsobeno současně probíhajícím rozkladem lipidů, bílkovin či ligninu, huminových kyselin, případně nitrifikací a oxidací metanu. Při anaerobních podmínkách anabolické procesy a mineralizace organických kyselin mohou hodnoty respiračního kvocientu zvýšit na víc než 1.

3.3.3. Bazální půdní respirace

Bazální půdní respirace je definována jako respirace bez přidání živného substrátu a její měření bývá samostatně používáno převážně pro dlouhotrvající pokusy, u nichž se sleduje například stupeň mineralizace některých látek, případně pro krátkodobější pokusy, jejichž cílem je například stanovení vlivu herbicidů na půdní mikroflóru (Schinner a kol., 1996). Je založena na vyrovnané respiraci, při které dochází k dekompozici organických látek převážně z půdní zásoby. Hodnoty bazální respirace odráží jak kvalitu zdroje uhlíku, tak jeho množství. Bazální respirace může také udávat schopnost půdy vyrovnat se s nežádoucími podmínkami či parametry a to jak pro danou lokalitu přirozenými, tak způsobenými antropogenní činností (Pell a kol., 2006).

3.3.4. Substrátem indukovaná půdní respirace

Substrátem indukovaná půdní respirace je respirace měřená po přidání některého druhu živného substrátu (Alef, 1995). Dilly (2005) pozoroval, že přidání glukózy obecně vede k mobilizaci metabolických procesů a ke stimulaci růstu mikrobiální biomasy a k enzymatické aktivitě. Hodnoty respiračního kvocientu se během prvních čtyř hodin od přidání blíží 1 a v době od čtyř do 24 hodin se často dostávají až k hodnotě 1,3. Tyto zvýšené hodnoty vysvětluje právě nárůstem mikrobiální biomasy, její vyšší glykolytickou aktivitou a oxidováním glukózy na vyšší stupeň. Podmínky pro substrátem indukovanou respiraci se samozřejmě přirozeně nevyskytují a standardní

roční přísun energie do půdy dovoluje mikrobiálním společenstvům se rozmnožovat jen několikrát do roka (Dilly, 2005).

4. Zařízení, materiál a metodika

Pokusy proběhly roku 2011 v laboratoři Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze.

4.1. Zařízení OxiTop OC 110

Základem měření byl přístroj OxiTop OC 110 německé firmy WTW. Jedná se o manometrický přístroj pracující na principu měření změny tlaku v uzavřené soustavě. Podtlak vzniká na základě spotřeby kyslíku aerobními mikroorganismy, při čemž dochází k produkci CO₂, který je zachycován absorpčním činidlem. Míra změny tlaku v nádobě je tedy přímo závislá na spotřebě kyslíku. Změna tlaku je zaznamenávána automaticky tlakovým čidlem umístěným v měřicí hlavici a to ve stejných intervalech 360x za dobu měření, případně je možné odečíst a zaznamenat průběžnou hodnotu manuálně a to maximálně 10x pro každý vzorek. Z měřicí hlavičky se následně pomocí sběrné jednotky (kontroloru) odebírají naměřená data. Z kontroloru lze naměřené výsledky přenést pomocí programu Achat OC do počítače k následnému zpracování.

4.2. Půdní vzorky

Vzorky půdy byly odebrány z dlouhodobého pokusu KAVR Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze a to v termínech 17. 8. 2011 a 21. 10. 2011. Pro odběr byly vybrány varianty Hnůj, NPK a Kontrola a to zejména kvůli různorodosti jejich charakteru a tak i předpokládaným možným odlišnostem v hodnotách, kterých by u nich mohla mikrobiální aktivita dosahovat.

4.2.1. Schéma a systém odběru

Odběry vzorků probíhaly podle „Systematického schématu“ (viz str. 16). Z každé varianty bylo pomocí půdního vrtáku odebráno dvanáct dílčích vzorků z profilu do 15-20 cm. Z těchto jednotlivých vpichů byl vytvořen směsný vzorek, který byl ještě na

poli v igelitovém pytli mechanicky rozmělněn. Počet vpichů z každé varianty byl stanoven na základě celkové potřeby zeminy pro všechna prováděná měření, celkově tak bylo odebráno okolo 2,5 kg zeminy z každé zkoumané varianty.

4.2.2. Úprava vzorků před skladováním

Čerstvý vzorek byl po přenesení do laboratoře znovu důkladně mechanicky rozmělněn a promísen. V případě prvního odběru byl z důvodu vyšší vlhkosti směsný vzorek nastrouhán na 2 mm struhadle a v případě druhého odběru byl vzorek prosetý na 2 mm síť. V obou případech byly ještě před úpravou ze vzorků odstraněny zbytky rostlin, semena, půdní živočichové a větší části hornin.

4.2.3. Skladování vzorků

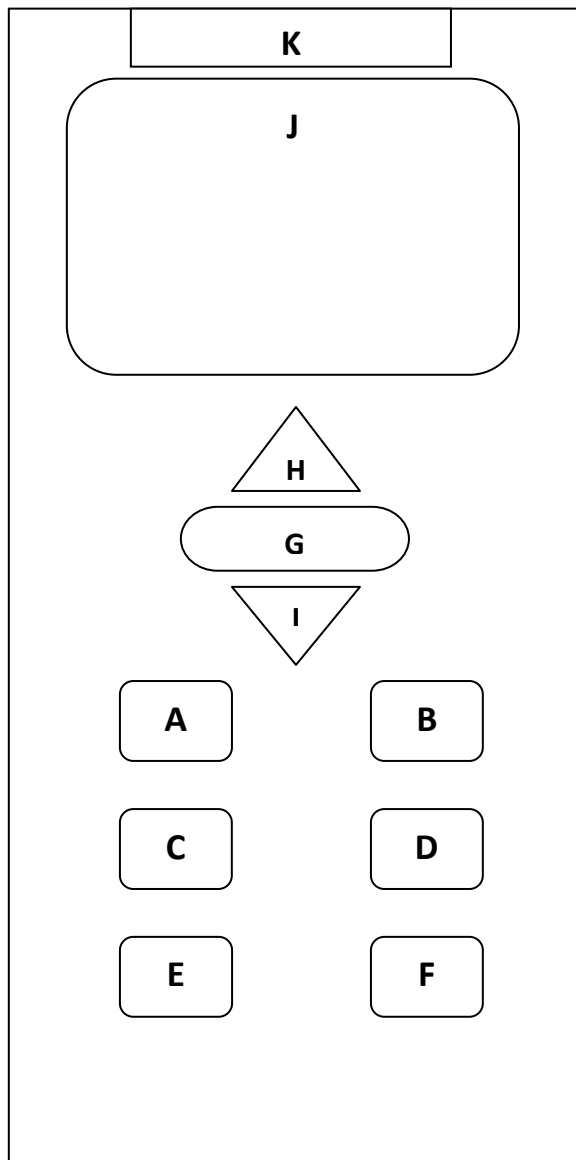
Upravené vzorky byly skladovány nestlačené v plastových nádobách bez přístupu vzduchu při teplotě 4°C. V případě prvního odběru skladování trvalo dva týdny a v případě druhého tři týdny.

4.3. Zkušební měření

4.3.1. Stanovení vhodných parametrů pro nastavení a práci s přístrojem OxiTop OC 110

Před započítím práce bylo nejprve nutné se podrobně seznámit s možnostmi, omezeními a způsobem měření na přístroji OxiTop OC 110. Byly proto odebrány zkušební vzorky, se kterými bylo odstartováno pokusné měření. Sledována byla velikost navážky, tak aby byl vzorek dostatečně reprezentativní a přitom hodnoty vzniklého podtlaku, zejména u měření substrátem indukované respirace, nepřesahovaly nastavené limity pojistných ventilů hlavic. Dále bylo sledováno dostatečné množství a koncentrace absorpčního činidla, tak aby během měření nedošlo k vyčerpání jeho kapacity a vhodná doba trvání měření, tak aby ve výsledném grafu byly patrné všechny podstatné změny v mikrobiální aktivitě.

4.3.2. Schéma řídicí jednotky (kontroloru)

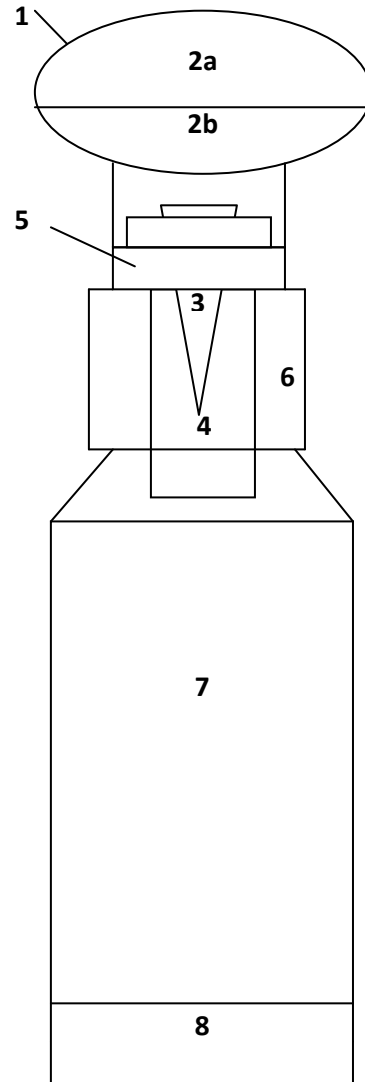


Seznam kláves a funkčních prvků

- A-** „komunikace s měřicí hlavicí“
- B-** „správa vzorků“
- C-** „zobrazení naměřených hodnot“
- D-** „tisk“
- E-** „nástroje/nastavení/možnosti“
- F-** „zapnutí/vypnutí přístroje“
- G-** „potvrzení zadání“
- H-** „pohyb kurzoru nahoru/vpravo, zvýšení hodnoty čísel“
- I-** „pohyb kurzoru dolů/vlevo, snížení hodnoty čísel“
- J-** „display“
- K-** „IR port“

4.3.3. Schéma měřicí soustavy

- 1- „měřicí hlava“
- 2- a, „tlakové čidlo“ b, „IR port“
- 3- „PU vložka“
- 4- „nádobka na absorbér CO₂“
- 5- „těsnění“
- 6- „dotahovací uzávěr“
- 7- „inkubační lahev“
- 8- „měřený vzorek“



4.4. Měření na přístroji OxiTop OC 110

4.4.1. Pracovní postup přípravy

Všechny součásti měřicí soustavy je třeba dokonale umýt a opláchnout destilovanou vodou. Dále je třeba je nechat rozložené vyschnout tak, aby se před použitím na žádné z částí nenacházela vlhkost.

Na dno inkubační láhve (7) se rovnoměrně rozprostře vzorek (8) a nechá se společně s ostatními částmi soustavy alespoň 30 minut vytemperovat. Temperovat je třeba i ostatní materiál či pomůcky, které se budou používat (pipety, injekční stříkačky, baňky s absorpčním činidlem, živným roztokem, vodou, atd.)

Do lahví, ve kterých se měří substrátem indukovaná respirace, se stejnoměrně přidá živný substrát, v případě tohoto měření se jednalo o 25 % roztok glukózy v množství 0,4 ml na každých 10 g vzorku. Půda v lahvích, ve kterých se měří basální respirace, se ovlhčí adekvátním množstvím H₂O. Do nádobky (4) na absorpční roztok se napipetuje 5 ml adekvátně koncentrovaného roztoku NaOH.

Pevně a opatrně se sešroubuje naplněná nádobka (4) a těsnění (5), vloží se do hrdla inkubační láhve (8) a dotáhne uzávěrem (6). Skrz těsnění (5) se nasadí vložka (3) a našroubuje měřicí hlava (1) tak, aby byl cítit dostatečný odpor, avšak je třeba dát pozor na stržení závitu.

4.4.2. Popis funkcí kláves na kontroloru

A- Veškerá komunikace s měřicí hlavicí - start měření, vyvolání konečných i průběžných dat, zobrazení nebo změna nastavených parametrů (doba měření, změna čísla vzorku, předčasné ukončení...).

B- Zobrazení seznamu vzorků s ikonou ukazatele stavu průběhu měření (prázdná či nedokončená ikona = aktuálně měřený vzorek, plná ikona + √ = dokončené měření). Po zmáčknutí se jako první zobrazí naposledy odstartované vzorky, stiskem či držením kurzorové klávesy H se lze dostat k dříve odstartovaným a starším vzorkům.

Pokud je spuštěno měření, zobrazí se seznam ihned po zapnutí kontroloru.

- C- Po zvolení konkrétního vzorku ze seznamu zobrazí jeho hodnoty graficky i číselně. Číselná hodnota udává buď naposledy odečtenou hodnotu vzorků, u nichž právě probíhá měření, či hodnotu v době ukončení měření. Pro získání číselných údajů z průběhu měření je třeba zmáčknout klávesu G a pomocí kurzorových kláves H a I se pohybovat grafem.
- D- Kontrolor je možné pomocí IR portu připojit ke speciální tiskárně TD100 a stiskem této klávesy iniciovat tisk.
- E- Veškeré nastavení, kontrola i údržba měřící soustavy - nastavení provozních režimů, doby měření, změna jazyka, mazání paměti, atd.
- F- Řídící jednotku zapíná a vypíná.
- G- Potvrzení volby zadání, v některých případech návrat o krok zpět.
- H- Slouží pro pohyb nahoru v menu displeje, zvyšuje hodnoty při nastavení měření, pohyb kurzoru směrem vlevo v rámci grafu.
- I- Slouží pro pohyb dolů v menu displeje, snižuje hodnoty při nastavení měření, pohyb kurzoru směrem vpravo v rámci grafu.

4.4.3. Nastavení řídicí jednotky (kontroloru)

Kontrolor se zapne stiskem klávesy F a následně se provede základní požadované nastavení.

Stiskne se klávesa E a v menu se vybere volba nastavení (*settings*), potvrdí se klávesou G, jejím dalším stiskem na příslušné volbě nastavení se zvolí pracovní režim (*operation mode*) v tomto případě tlak p (*pressure p*), pomocí kláves H a I se nastaví doba měření (*measuring time*), nastaví se aktuální datum a čas (*date/time*), je vhodné vypnout režim GLP (*good laboratory practice*), pro práci v provozním režimu tlak p není podstatný a jeho vypnutím se ušetří opětovné nastavování před každým měřením. Dále je žádoucí nastavit pod volbou paměť (*memory*) manuální mazání naměřených hodnot, v opačném případě dojde při odstartování nového měření k automatickému vymazání celé paměti. Dále je možné nastavit automatické úsporné vypnutí (*swich-off interval*) v rozmezí 5-15 minut, hodnotu limitního tlaku (*limit pressure*) v rozmezí 50-500 hPa a jazyk komunikace displeje (*language*) výběr je z angličtiny a němčiny.

Všechny výše zmíněné volby potvrzujeme klávesou G.

4.4.4. Spuštění měření

Po provedení základního nastavení se stiskne klávesu A a zvolí se start měření (*start sample*), kontrolor nabídne ke kontrole informace o nastavení a době ukončení měření. Po zkontrolování se volba potvrdí. Na displeji se objeví výzva k přiblížení kontroloru k měřicí hlavici (*please hold controller to ρ*). Kontrolor se ze vzdálenosti cca 5 cm namíří na měřicí hlavici. Po úspěšném spuštění se ozve zvukový tón a na displeji se objeví *!started!*, za cca 5 vteřin se znovu objeví nabídka na start měření, takto se pokračuje až do odstartování všech vzorků, poté je možné přístroj vypnout.

4.4.5. Vyvolání průběžných hodnot

a, všech vzorků najednou

Zapne se řídicí jednotka, na displeji se objeví seznam právě měřených vzorků. Stiskne se klávesa A a zvolí možnost „*call up all data*“. Kontrolor se přidrží ve vzdálenosti do 1 m od všech měřících hlavic, IR porty na hlavicích postupně červeně zablikají a ozve se zvukový signál. Nyní je možné po stisknutí klávesy B, volbě konkrétního vzorku a stisknutí klávesy C vidět momentální hodnotu tlaku v láhvi a dosavadní průběh měření.

b, jednotlivých vzorků

Zapne se řídicí jednotka, na displeji se objeví seznam právě měřených vzorků. Zvolí se požadovaný vzorek a stiskne klávesa G. V zobrazeném menu se zvolí „*momentary value*“ a kontrolor přidrží ve vzdálenosti do 1 m od odpovídající měřicí hlavice. Po světelném i zvukovém signálu se na displeji objeví zjištěná aktuální hodnota s možností jejího uložení (*save*). Po této volbě se kontrolér vrátí na základní menu „*momentary value*“.

Průběžných hodnot lze pro každý vzorek uložit maximálně 10.

4.4.6. Vyvolání dat po skončení doby měření

Postup je stejný jako u vyvolání veškerých dat pro všechny vzorky najednou. Zapne se řídicí jednotka, na displeji se objeví seznam právě měřených vzorků. Stiskne se klávesa A a zvolí možnost „*call up all data*“. Kontrolor se přidrží ve vzdálenosti do 1 m od všech měřících hlavic, IR porty na hlavicích postupně červeně zablikají a ozve se zvukový signál. Po stisku klávesy B, volbě konkrétního vzorku a stisknutí klávesy C je možné vidět konečné hodnoty a výsledný graf.

Bezprostředně po vyvolání dat po skončení doby měření jsou hlavice připraveny k dalšímu měření a v seznamu vzorků jsou naměřené vzorky označeny jako ukončené (plná ikona + ✓).

4.5. Dvacetihodinový respirometrický test

Do Erlenmayerových baněk s přesně stanoveným objemem se naváží 50 g vzorku půdy. Od každé varianty se založí dvě opakování pro bazální respiraci a dvě opakování pro respiraci substrátem indukovanou. Půda se ovlhčí H₂O respektive přidáme 25 % roztok glukózy v množství 0,4 ml na každých 10 g navážky. Uzavře se pryžovou zátkou, kterou procházejí dvě skleněné rourky ukončené gumovou hadičkou, která se uzavře skleněnou tyčinkou. Takto připravené vzorky se na 20 hodin uloží do komorového termostatu 30 °C. Zároveň je třeba připravit cca 10 l koncentrovaného roztoku NaCl.

Po dvaceti hodinách se provede měření množství vyprodukovaného CO₂. Roztokem NaCl se jednou z hadiček procházejících zátkou zvolna naplňuje Erlenmayerova baňka se vzorkem, čímž se z ní vytěsňuje směs vzduchu a CO₂. Tato směs je druhou z hadiček vháněna do interferometru, kde se prosvěcuje a pomocí hledání shody barevných škál kontrolní (bez CO₂) a měřící trubice se odečte hodnota, která následně slouží k výpočtu množství vyprodukovaného CO₂.

4.6. Titrační metoda měření půdní respirace

Princip tohoto měření spočívá v titrování absorpčního činidla z měřicí soustavy 0,5M H₂SO₄.

Nádobku i ostatních části, jež přišly s absorpčním činidlem do styku je třeba demineralizovanou H₂O vypláchnout do kádinky. Následně se přidá 1 ml BaCl₂ a 0,5 ml fenolftaleinu. Tento roztok titrujeme 0,5M H₂SO₄ až do úplného odbarvení. Množství spotřebované H₂SO₄ pak slouží ke stanovení množství absorbovaného CO₂.

Tato metoda sloužila především pro stanovení potřebné koncentrace a množství NaOH, který byl použit jako absorpční činidlo pro měření na OxiTopu. Původní záměr použít tuto metodu jako srovnávací nedošel naplnění a to zejména z důvodu obtížně proveditelného bezeztrátového vyjmutí nádobky na absorpční činidlo. Po ukončení měření je totiž vlivem podtlaku třeba všechny závity na měřicí soustavě povolit poměrně velkou silou, přičemž může dojít k částečnému rozlití činidla, a tím se měření pro srovnání stává neprůkazným.

5. Výsledky

5.1. Nastavení přístroje OxiTop OC 110

K základnímu nastavení přístroje bylo použito návodu k obsluze pro OxiTop OC 110 a Standardní operační procedury SOILETOX-SOP-14 (Černošlávková, 2006).

Pro účely této práce byl zvolen provozní režim tlak p. Hodnota limitního tlaku byla nastavena na – 250 hPa. Jako jazyk komunikace byla zvolena angličtina. Z důvodu snazší obslužnosti byla vypnuta funkce GLP (good laboratory practice), tudíž nebylo nutné přístroj před každým měřením opětovně nastavovat.

5.2. Stanovení parametrů pro měření

5.2.1. 1. zkušební měření

Pro 1. zkušební měření bylo rozhodnuto o navážkách půdy 10 g a 30 g. Obě navážky byly založeny ve dvou opakováních pro měření bazální respirace (BSK) a dvou opakováních pro měření substrátem indukované respirace (s přídatkem 25 % roztoku glukózy v množství 0,4 ml/10 g). Délka měření byla stanovena na 14 dní. Jako absorpční činidlo bylo použito 5 ml 1M roztoku NaOH. Vzorky nebyly stratifikovány. Výsledky viz Tab. 1 a Graf 1 a 2.

Typ vzorku	Navážka 10 g Hodnota minimálního tlaku (hPa)	Navážka 30 g Hodnota minimálního tlaku (hPa)	Spotřeba H ₂ SO ₄ při titraci (ml) Navážka 10 g	Spotřeba H ₂ SO ₄ při titraci (ml) Navážka 30 g
BSK #1	-12	-17	4,1	2,5
BSK #2	-9	-20	4,0	2,4
Glukóza #1	-68	-170	2,3	0,0
Glukóza #2	-91	-173	2,2	0,0

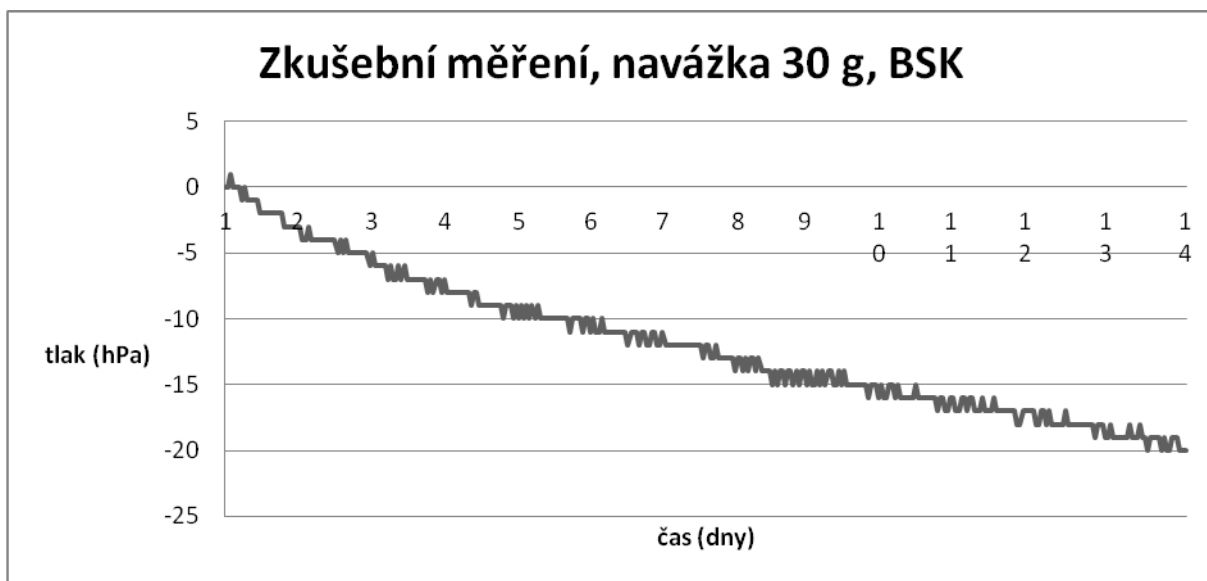
Tab. 1: výsledky 1. zkušebního měření.

Z naměřených hodnot poklesu tlaku v soustavě jsou patrné výrazné rozdíly mezi jednotlivými opakováními zejména u 10 g navážky, varianty s přidavkem glukózy. Což je pravděpodobně důsledek nerovnoměrného rozložení vzorku na dně inkubační láhve, při čemž mohlo dojít k nestejnomyému obohacení glukózou, případně aplikaci mimo samotný vzorek. Navážka 10 g se proto jeví jako nedostatečná.

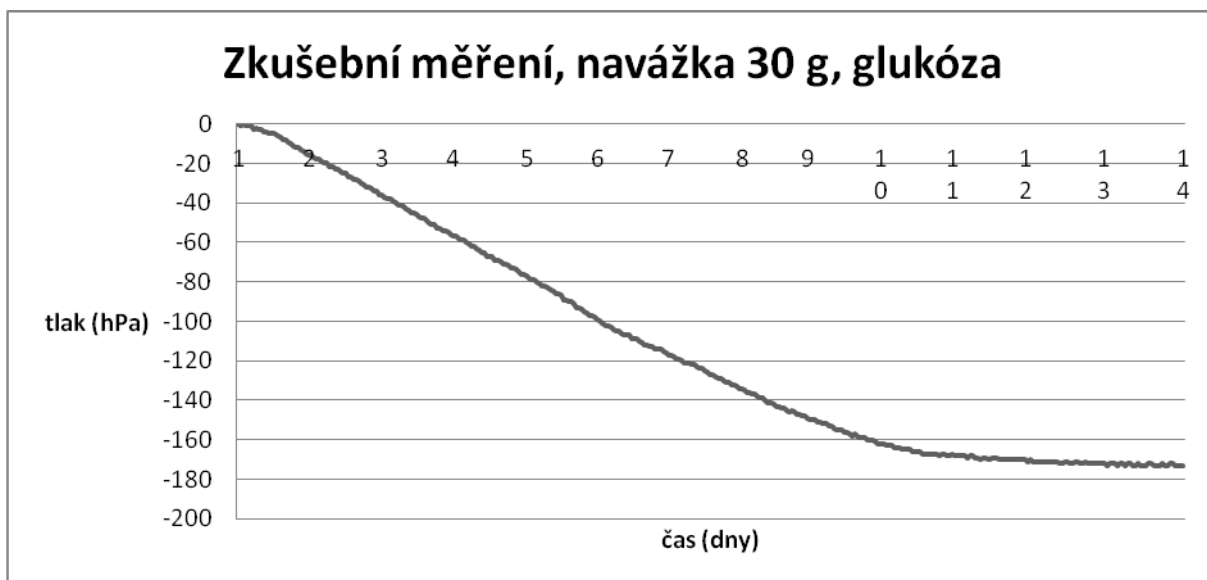
Hodnoty poklesu tlaku při 30 g navážce jsou mezi jednotlivými opakováními poměrně vyrovnané. Z čehož vyplývá, že 30 g navážka je dostatečná.

Z výsledků titrace však vyplývá, že při měření substrátem indukované respirace 30 g navážky byla kapacita 5 ml 1M roztoku NaOH zcela vyčerpána. Řešením by mohlo být větší množství absorpčního činidla či jeho silnější koncentrace. Zvýšení množství absorpčního činidla není vzhledem k omezenému objemu příslušné nádoby možné a tak bylo přistoupeno na zvýšení koncentrace NaOH z 1M na 2M. Spotřeba H_2SO_4 při kontrolní titraci nepoužitého 1M roztoku NaOH byla 4,8 ml.

Předpoklad průběhu změny tlaku v soustavě počítal po určité době s ustálením snímaných hodnot, k čemuž, jak je patrné z Grafu 1, po čtrnácti dnech měření BSK na 30 g navážce nedošlo. Při obohacení substrátu glukózou dochází k rychlejšímu nárůstu aktivity a množení mikroorganismů, ale také k jejich rychlejšímu vyčerpání (viz Graf 2), kdy už po cca deseti dnech dochází k ustálení hodnot tlaku. (Průběhy měření ostatních variant mají velmi podobný charakter a z důvodu zachování rozsahu práce zde nejsou uvedeny). Pro měření respiračního potenciálu půdy je tak doba 14 dní dostatečná, avšak pro dosažení úplných výsledků při měření basální respirace je třeba dobu prodloužit.



Graf 1: příklad průběhu 1. zkušebního měření - BSK



Graf 2: příklad průběhu 1. zkušebního měření - s přidavkem glukózy

5.2.2. 2. zkušební měření

Druhé kontrolní měření bylo zaměřeno především na zjištění vhodnosti použití 2M roztoku NaOH jako absorpčního činidla a dále na upravení navážky a doby měření. Pro zjištění dostatku kapacity byly založeny pouze varianty s přidavkem živného substrátu. Navážky činily 10 g a 20 g a ke každé bylo použito 1M i 2M roztoku NaOH a to vždy ve dvou opakováních. Výsledky viz Tab. 2. Pro zjištění vhodné doby měření byla založena varianta BSK s 20 g navážkou ve dvou opakováních. Doba měření všech variant byla stanovena na 20 dní. Výsledky viz Graf 3 a 4. Všechny vzorky byly 2 týdny stratifikovány.

Typ absorpčního činidla	Navážka 10 g Hodnota minimálního tlaku (hPa)	Navážka 20 g Hodnota minimálního tlaku (hPa)	Spotřeba H ₂ SO ₄ při titraci (ml) Navážka 10 g	Spotřeba H ₂ SO ₄ při titraci (ml) Navážka 20 g
1M NaOH #1	-93	-163	2,6	0,3
1M NaOH #2	-101	-164	2,4	0,2
2M NaOH #1	-107	-164	7,1	5,3
2M NaOH #2	-106	-163	7,1	5,4

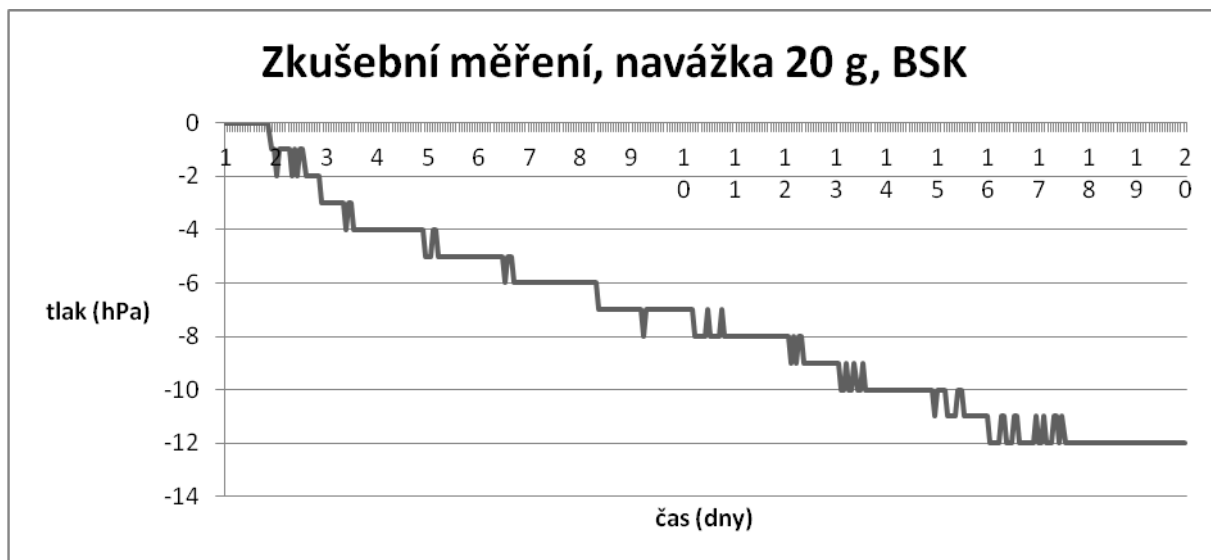
Tab. 2: výsledky 2. zkušební měření

Z výsledků vyplývá, že v naměřených hodnotách minimálního tlaku u 10 g navážky jsou opět patrné rozdíly. Hodnoty u 20 g navážky jsou naopak velmi vyrovnané, a proto se jeví, podobně jako 30 g navážka, jako vhodná pro měření na OxiTopu. Zároveň lze říci, že výsledky obou sledovaných variant jsou u 2. zkušební měření vyrovnanější v porovnání s 1. zkušebním měřením. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena procesem stratifikace, během kterého dochází k minimalizaci vlivu odběru na půdní mikroorganismy.

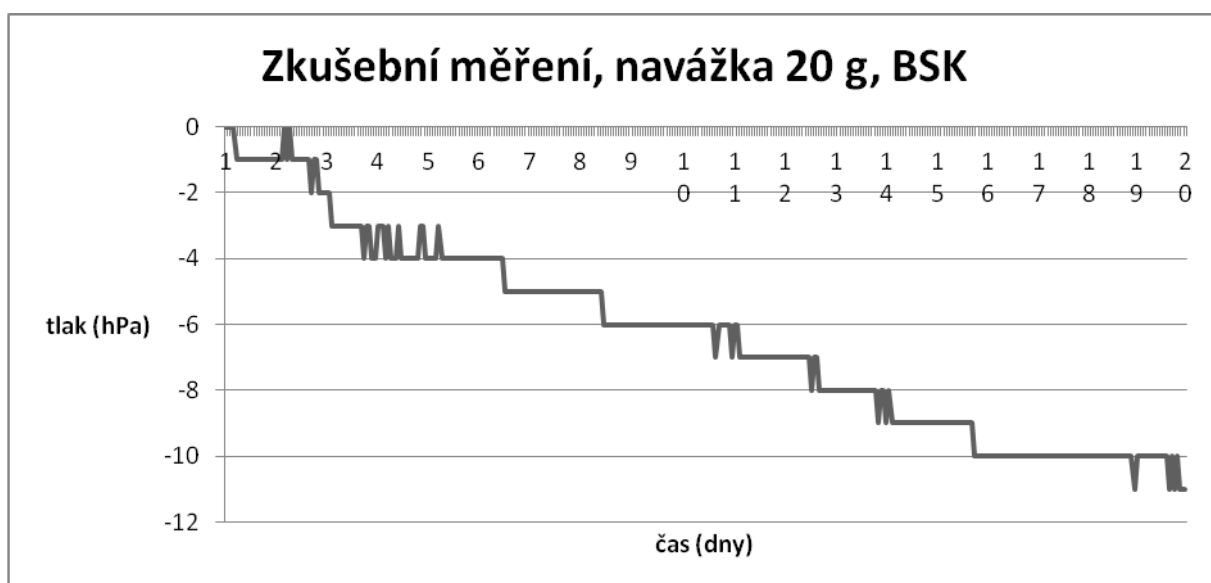
Pro obě navážky v tomto případě byla dostatečná i nižší z koncentrací absorpčního činidla, avšak u 20 g navážky varianty s 1M roztokem byla kapacita NaOH téměř vyčerpána. (Spotřeba H₂SO₄ při kontrolní titraci nepoužitého 1M roztoku NaOH byla 4,7 ml). Při případných větších projevech mikrobiální aktivity by tedy kapacita nemusela být dostatečná. Naopak u varianty s 2M roztokem a 20 g navážky nebyla kapacita vyčerpána ani z poloviny, protože spotřeba H₂SO₄ při kontrolní titraci

nepoužitého 2M roztoku NaOH byla 9,4 ml. Vzhledem k výsledkům tohoto měření je tedy vhodné používat 2M roztok NaOH.

Z Grafů 3 a 4 je patrné, že k ustálení poklesu tlaku u obou opakování došlo zhruba po šestnácti dnech od odstartování měření. 20 dní se proto zdá být jako dostatečná doba pro měření průběhu basální respirace.



Graf 3: průběh 2. zkušebního měření – BSK, 1. opakování



Graf 4: průběh 2. zkušebního měření – BSK, 2. opakování

5.3. Modelové srovnávací měření respirace na dlouhodobém pokusu KAVR

5.3.1. Odběr 17. 8. 2011

Pro první modelové měření na OxiTop OC 110 byly zvoleny 30 g navážky. Dvacetihodinový respirometrický test probíhal na 50g navážkách. Zkoumané varianty byly Hnůj, NPK a Kontrola, ve verzích pro měření BSK a substrátem indukovaná respirace, vždy ve dvou opakováních.

Principy obou měření jsou zcela odlišné. OxiTop měří na základě detekce tlaku respektive vývoji hodnot podtlaku v uzavřené soustavě během dané doby. Dvacetihodinový respirometrický test interferometricky stanovuje zastoupení CO₂ obsaženého ve směsi plynů, jež vznikla během doby měření, následným výpočtem se stanovuje jeho vyprodukované množství za 20 hodin. Výsledky viz Tab. 3

	20h Respirometrie – Produkce CO ₂ (mg)	OxiTop – hodnoty tlaku po 20h (hPa)	OxiTop – Hodnoty minimálního tlaku (hPa)
Hnůj BSK	15,720	0	-14
	15,458	0	-12
NPK BSK	14,148	0	-9
	13,886	0	-10
Kontrola BSK	12,838	0	-4
	12,576	0	-6
Hnůj glukóza	45,588	-9	-204
	41,396	-8	-204
NPK glukóza	43,492	-9	-203
	42,182	-10	-203
Kontrola glukóza	40,610	-7	-200
	41,685	-8	-199

Tab. 3: Výsledky modelového měření z odběru 17. 8. 2011

5.3.2. Odběr 21. 10. 2011

Pro druhé modelové měření na OxiTop OC110 byly zvoleny 20 g navážky. Dvacetihodinový respirometrický test probíhal dle standardní metodiky opět na 50g navážkách. Zkoumané varianty zůstaly stejné - Hnůj, NPK a Kontrola, ve verzích pro

měření BSK a substrátem indukovaná respirace, vždy ve dvou opakováních. Výsledky viz Tab. 1

	20h Respirometrie - Produkce CO ₂ (mg)	OxiTop - hodnoty tlaku po 20h (hPa)	OxiTop - Hodnoty minimálního tlaku (hPa)
Hnůj BSK	6,550	0	-12
	6,812	0	-11
NPK BSK	6,288	0	-8
	6,026	0	-8
Kontrola BSK	5,240	0	-4
	5,502	0	-5
Hnůj glukóza	37,204	-8	-126
	38,252	-8	-129
NPK glukóza	37,990	-8	-123
	36,942	-8	-121
Kontrola glukóza	34,060	-6	-117
	33,536	-6	-110

Tab. 4: Výsledky modelového měření z odběru 21. 10. 2011

Změny tlaku variant BSK nejsou při měření na OxiTopu po dvaceti hodinách patrné, což je způsobeno tím, že minimální jednotkou, jejíž změnu je OxiTop schopen zaznamenat je 1 hPa, což je hodnota, které pravděpodobně nebylo dosaženo. U variant s přidavkem glukózy je již změna zřejmá, avšak vzhledem k již zmiňované citlivosti měření nejsou hodnoty příliš průkazné.

Hodnoty minimálního naměřeného tlaku již porovnatelné s respirometrickým testem jsou. Na základě porovnání diferencí mezi jednotlivými variantami v zásadě korespondují s výsledky dvacetihodinového testu. U pokusu hnojeného hnojem byly naměřeny nejvyšší hodnoty poklesu tlaku i produkce CO₂. Hodnoty u pokusu hnojeného NPK dosahovaly střední úrovně a nejmenší mikrobiální aktivita byla pozorována u nehnojené varianty Kontrola.

Grafy respiračních křivek těchto dvou modelových měření jsou uvedeny v kapitole 9. Přílohy.

6. Diskuze

Pro odběr, skladování a zpracování vzorků pro měření půdní respirace neexistuje všeobecně přijímaná universální metodika. Jistým vodítkem může být norma ISO 10381-6 (2009), avšak ne vždy je vhodné a žádoucí se této normy držet a tak je standardnějším postupem stanovení vlastní metodiky reflektující lokální podmínky a individuální cíle.

Odběr vzorků pro měření na přístroji OxiTop OC 110 není ničím limitován, důležité je pouze odebrat dostatečné množství půdy. Vzhledem k výsledkům všech měření se jako nejvhodnější následný postup před zakládáním měření jeví důkladná homogenizace a prosetí vzorku na 2 mm síť. V některých případech nemusí být prosetí možné, zejména z důvodu vyšší vlhkosti, případně vyššího podílu jílovitých částic, a je tak třeba homogenizovaný vzorek nastrohat na struhadle odpovídající hrubosti. Proces strouhání však není ideální. Do vzorku určenému k měření se takto mohou dostat i některé složky, které by jinak zůstaly na síti, jako například měkčí části půdního skeletu či organických zbytků. Strouhání by tak mělo předcházet důkladné manuální probrání vzorku. Z výsledků zkušebních měření vyplývá, že stratifikace před měřením má vliv na vyrovnanost mezi jednotlivými opakováními. Pro tuto práci použitá doba skladování nestlačených vzorků v rozmezí 2 – 3 týdnů při teplotě 4 °C, bez přístupu vzduchu a světla, se jeví jako vhodná. Černohlávková (2006) uvádí jako minimální dobu 4 dny a jako maximální 3 měsíce. Doporučuje také půdu ideálně druhý, nejdéle však třetí den provětrávat, tento prvek nebyl v této práci aplikován, nelze proto posoudit jeho vhodnost.

Jako ideální se osvědčila navážka 20 g a to jak pro měření basální respirace, tak pro měření respirace substrátem indukované. Černohlávková (2006) ve své metodice používá navážku 30 g pro basální respiraci a 10 g pro substrátem indukovanou, což skýtá nevýhody v nejednoznačnosti výsledků při primárním porovnání a zejména v obtížnějším založení a rovnoměrném obohacení vzorku o malé navážce.

Jako absorpční činidlo byl použit 2M roztok NaOH (8 g NaOH/100 ml) v množství 5 ml. Tato kombinace zaručuje pro 20 g navážku dostatečnou absorpční kapacitu a to i pro značně mikrobiálně aktivní půdy.

Pro všechna měření na OxiTopu provedená pro tuto práci byla vhodná doba měření 20 dnů. Při nastavení přístroje na dobu kratší by nemuselo dojít k ustálení ani dosažení maximálních hodnot podtlaku, delší doba měření se pak jeví jako neopodstatněná, protože po dosažení zhruba šestnáctého dne v měření nedochází k výrazným změnám.

Po základním nastavení a zprovoznění se OxiTop OC 110 jeví jako uživatelsky poměrně přívětivý přístroj. Jeho velkou výhodou je možnost sledování respirace v průběhu času, možnost měření předčasně ukončit, bez znehodnocení výsledků pokusu a možnost kdykoli vyvolat aktuální hodnoty. Pro srovnání použita respirometrická metoda je v zásadě destruktivní a její pomocí nelze reflektovat maximální potenciál měřeného vzorku. Další výhodou je eliminace chyb, případně zmaření měření lidským faktorem. Od založení a odstartování až do ukončení probíhá měření automaticky a výsledky jsou exaktně zaznamenávány. Naopak při dvacetihodinovém respirometrickém testu je třeba učinit několik kroků, které mohou být při neopatrném počínání zdrojem chyb. Například při zavádění hadičky pro přívod roztoku NaCl či hadičky pro odvod směsi plynů s CO₂ může dojít k nežádoucímu ovlivnění měření. Hlavním problémem však může být samotné odečítání hodnot, na které má značný vliv ostrost a citlivost lidského zraku na různé odstíny růžové. Mezi nevýhody OxiTopu pak patří jeho již zmiňovaná horší citlivost, kdy jeho pomocí není téměř možné pozorovat změny mikrobiální aktivity v době kratší než 1 den. V tomto ohledu je dvacetihodinový respirometrický test bezesporu výhodnější. Související nevýhodou pak může být právě delší doba měření.

Titrační metoda se osvědčila jako nástroj sloužící k stanovení vhodné koncentrace absorpčního činidla. Pro srovnávací měření vhodná příliš nebyla. Některé výsledky byly sice průkazné, leč v každém měření došlo, při pokusu o co nejšetrnější přenos a otevření soustavy, k rozlití NaOH minimálně u jedné varianty. To je však způsobeno tím, že systém OxiTopu není, na rozdíl od například systému používaného pro Isermeyerovu metodu, primárně určen pro následnou titraci absorpčního činidla.

7. Závěr

Přístroj pro měření půdní respirace OxiTop OC 110 je bezesporu zajímavou alternativou ke konvenčně používaným metodám. Jeho praktické využití by si mohlo na poli půdní mikrobiologie najít své místo. Systém, na jehož principu je OxiTop založen, tedy měření podtlaku vzniklého respirací půdních mikroorganismů v uzavřené soustavě, je od ostatních metod podstatně odlišný. A protože výsledek měření je vždy ovlivněn zvolenou metodou, je vhodné ho také brát v potaz.

Zvolený provozní režim (tlak p) je pouze jedním ze tří, jež OxiTop nabízí a tak existují ještě další, v této práci neprozkoumané, možnosti jeho využití. Jako jediná z použitých metod právě tato také umožňuje zkoumání respirace v průběhu času, čehož by mohlo být využito i pro jiné než laboratorní metody, například použití OxiTopu v polních podmínkách by po některých úpravách technického charakteru bylo jistě zajímavou výzvou.

Primárně stanovený cíl, totiž zprovoznění tohoto nového přístroje, došel naplnění. Naplnění cíle v podobě jeho uvedení do praxe bude ještě záležet na faktorech, které nebylo možné v průběhu vytváření této práce ovlivnit. Důležitým zjištěním, které by uvedení do praxe mohlo pozitivně ovlivnit, zůstává skutečnost, že výsledky z měření na OxiTopu OC 110, korespondují s výsledky standardně používaného dvacetihodinového respirometrického testu.

8. Použitá literatura

- Alef, K., Nannipieri, P. (eds.). 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London, p. 576. ISBN 0-12-513840-7
- Babich, H., Stotzky, G. 1985. Heavy Metal Toxicity to Microbe-Mediated Ecologic Processes: A Review and Potential Application to Regulatory Policies. *Environmental Research* 39 (1). 111-137
- Benizri, E., Dedourge, O., Dibattista-Leboeuf, C., Piutti, S., Nguyen, C., Guckert, A. (2002) Effect of Maize Rhizodeposits on Soil Microbial Community Diversity. *Applied Soil Ecology* 21(3). 261–265.
- Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S. 1985. Phosphorus in the Soil Microbial Biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 16 (2). 169-175.
- Buscot, F. 2005. What Are Soils?, p. 3-18. In Buscot, F., Varma, A. (eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0
- Černošková, J. 2006. Stanovení dlouhodobé půdní respirace systémem OxiTop. Recetox. Brno, 5 s.
- Dilly, O., Bach, H. J., Buscot, F., Eschenbach, C., Kutsch, W. L., Middelhoff, U., Pritsch, K., Munch, J. C. 2000. Characteristics and Energetic Strategies of the Rhizosphere in Ecosystems of the Bornhöved Lake District. *Applied Soil Ecology* 15 (2). 201-210.
- Dilly, O. 2005. Microbial Energetics in Soils, p. 123-138. In Buscot, F., Varma, A. (eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0
- Dilly, O. 2006. Estimating Soil Microbial Activity, p. 114-116. In Bloem, J., Hopkins D. W., Benedetti, A. (eds.), *Microbial Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing. Wallingford, p. 307. ISBN 0-85199-098-3

Elhottová, D., Šantrůčková, H., Petersen, S. 1998. Změny mikrobiální biomasy během skladování vzorků při 4°C. s. 65-68. In Křišťůfek, V., Šantrůčková, H., Šimek, M. (eds.), Odběr, skladování a úprava půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy. Ústav půdní biologie AV ČR. České Budějovice, 109 s. ISBN 80-902020-3-9

Elliot, F. L., Lynch, J.M., Papendick, R.I. 1996. The Microbial Component of Soil Quality p. 1-21. In Stotzky, G., Bollag, J. M. (eds.) Soil Biochemistry, Volume 9. Marcel Dekker, Inc. New York

Fleisbach, A., Widmer F. 2006. Estimating Soil Microbial Biomass p. 73-76. In Bloem, J., Hopkins D. W., Benedetti, A. (eds.), Microbial Methods for Assessing Soil Quality. CABI Publishing. Wallingford, p. 307. ISBN 0-85199-098-3

Forster, J.C. 1995. Soil Sampling and Storage, p. 49-51. In Alef, K., Nannipieri, P. (eds.), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. London, p. 576. ISBN 0-12-513840-7

Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A. 2005. Microbial Diversity in Soils, p. 19-49. In Buscot, F., Varma, A. (eds.), Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0

Kieft, T.L., Rosacker, L. L. 1991. Application of Respiration and Adenylate-based Soil Microbiological Assay to Deep Subsurface Terrestrial Sediments. Soil Biology & Biochemistry 23 (6). 563-568

Křišťůfek, V., Šimek, M. 1998. Odběr, skladování a úprava půdních vzorků pro mikrobiologické analýzy. s. 11-13. In Křišťůfek, V., Šantrůčková, H., Šimek, M. (eds.), Odběr, skladování a úprava půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy. Ústav půdní biologie AV ČR. České Budějovice, 109 s. ISBN 80-902020-3-9

Martiniuk, S., Wagner, G. H. 1978. Quantitative and Qualitative Examination of Soil Microflora Associated with Different Management Systems. Soil Science 125 (6). 343-350

Nannipieri, P., Grego, S., Cecanti, B. 1990. Ecological Significance of the Biological Activity in Soil. p. 293-355. In. Bollag, J. M., Stotzky, G. (eds.) Soil Biochemistry, Volume 6. Marcel Dekker, Inc. New York

- Öhlinger, R. 1996. Soil Sampling and Sample Preparation, p. 7-11. In Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds.), *Methods in Soil Microbiology*. Springer. Berlin, p. 425. ISBN 3-540-59055-2
- Ovreas, L., Torsvik, V. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial Ecology* 36 (3). 303-315
- Pankhurst, C. E., Lynch, J. M. 1995. The Role of Soil Microbiology in Sustainable Intensive Agriculture. p. 229-248. In Andrews, J. H., Tommerrup, I. (eds.), *Advances in Plant Pathology, Volume 11*. Academic Press. London, p. 322. ISBN 0-12-033711-8
- Pell, M., Stenström, J., Granhall, U. (2006). Soil Respiration. p. 117-126. In Bloem, J., Hopkins D. W., Benedetti, A. (eds.), *Microbial Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing. Wallingford, p. 307. ISBN 0-85199-098-3
- Renagold, J. P., Elliot, F. L., Unger, P. W. 1987. Long-term Effects of Organic and Conventional Farming on Soil Erosion. *Nature* 330 (6146). 370-372
- Sáňka, M. 1998. Vzorkování půd pro jednorázová šetření a dlouhodobá pozorování. s. 7-9. In Křišťůfek, V., Šantrůčková, H., Šimek, M. (eds.), *Odběr, skladování a úprava půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy*. Ústav půdní biologie AV ČR. České Budějovice, 109 s. ISBN 80-902020-3-9
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds.). 1996. *Methods in Soil Microbiology*. Springer. Berlin, p. 425. ISBN 3-540-59055-2
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C. 2003. Indicators for Evaluating Soil Quality. *Agriculture Ecosystems and Environment* 98 (1-3). 255-262.
- Standing, D., Killham, K. 2007. The Soil Environment, p. 1-22. In Elsas, J. D., Jansson, J. K., Trevors, J. T. (eds), *Modern Soil Microbiology*. CRC Press. Boca Raton, p. 646. ISBN 0-8247-2749-5
- Waksman, S.A. 1961. *Soil Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 356. Library of Congress Catalogue Card Number 52-9965

Wu, K., Zhang, X. 2011. Modelling Soil Structure and Process, p. 13-36. In Ritz, K., Young, I. (eds.), *The Architecture and Biology of Soils-Life in Inner Space*. CABI Publishing. Wallingford, p. 244. ISBN 978-1-84593-532-0

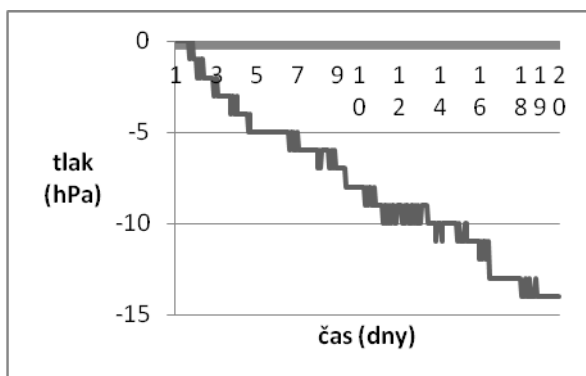
ISO 16072. Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. 2001. International organization for standardization, p. 19.

ISO 10381-6. Soil quality -- Sampling -- Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory. 2009. International organization for standardization, p. 6.

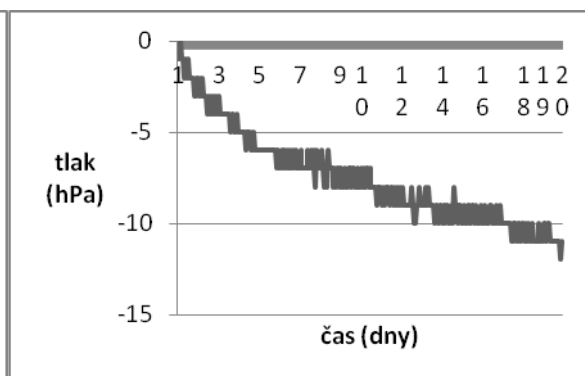
9. Přílohy

9.1. Grafy modelového srovnávacího měření

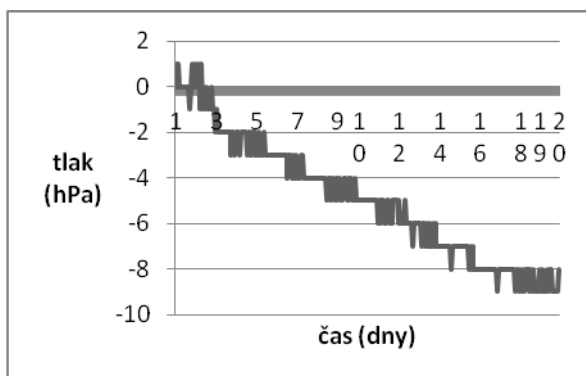
9.1.1. Odběr 17. 8. 2011



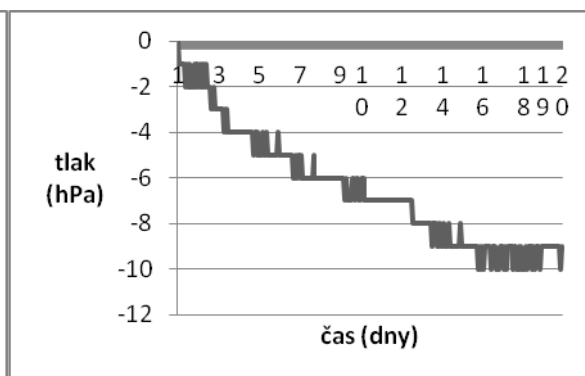
Graf 5: Hnůj, BSK, varianta 1



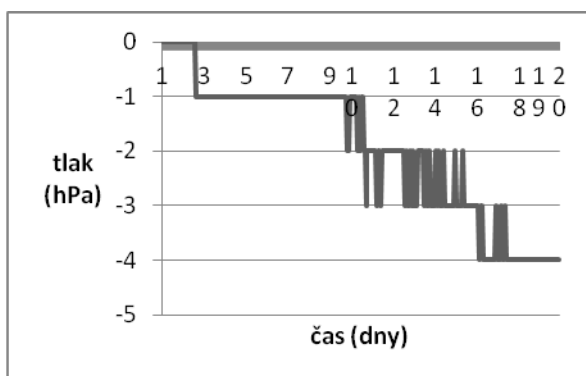
Graf 6: Hnůj, BSK, varianta 2



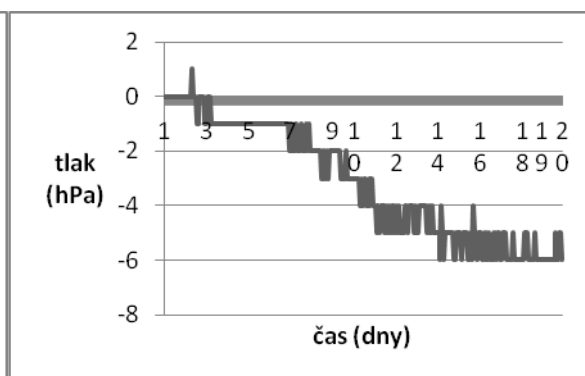
Graf 7: NPK, BSK, varianta 1



Graf 8: Kontrola, BSK, varianta 2

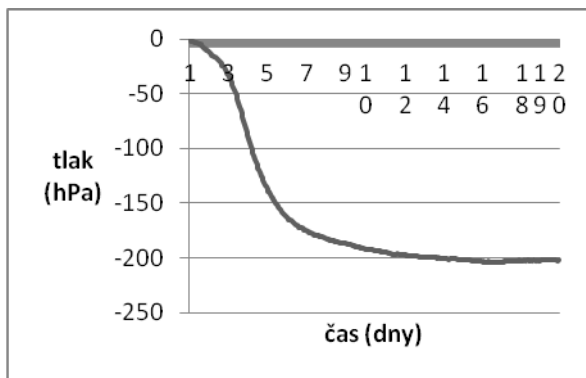


Graf 9: Kontrola, BSK, varianta 1

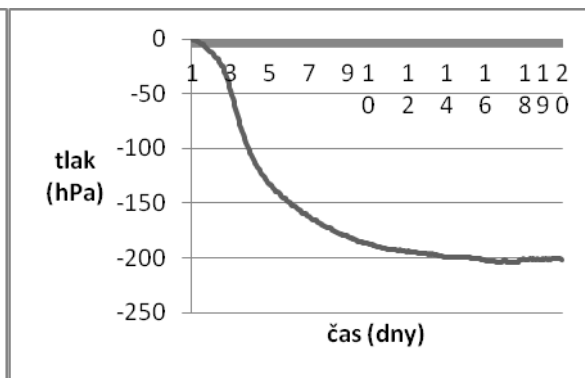


Graf 10: Kontrola, BSK, varianta 2

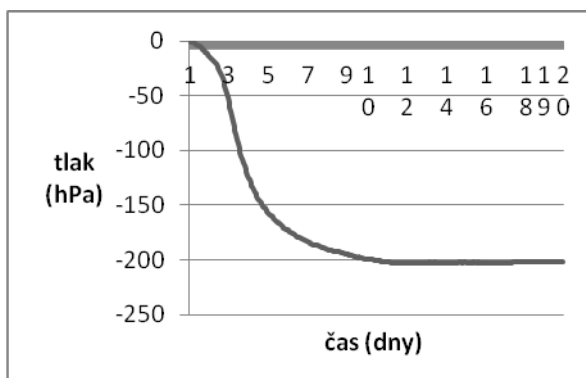
Možnosti využití přístroje OxiTop pro měření půdní respirace



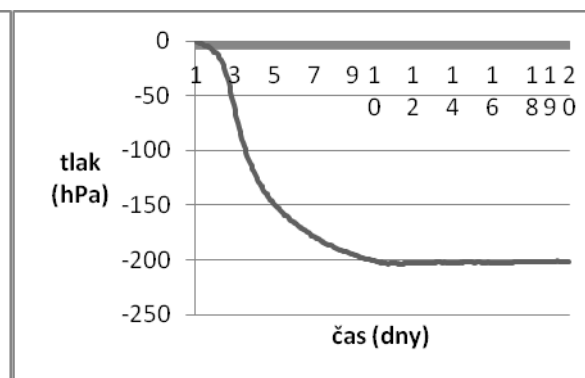
Graf 11: Hněj, glukóza, varianta 1



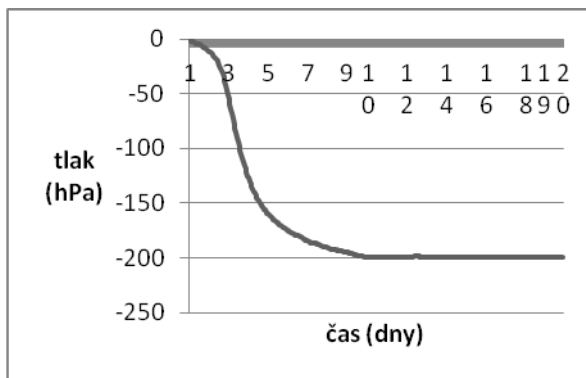
Graf 12: Hněj, glukóza, varianta 2



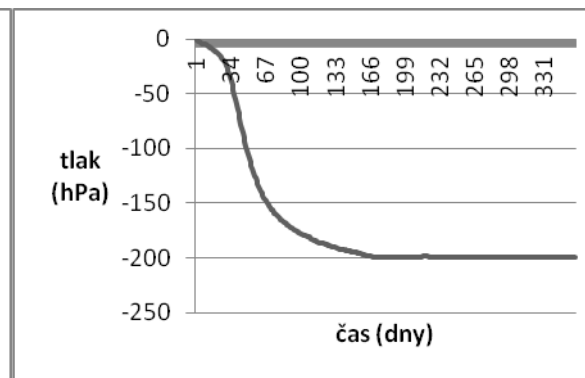
Graf 13: NPK, glukóza, varianta 1



Graf 14: NPK, glukóza, varianta 2

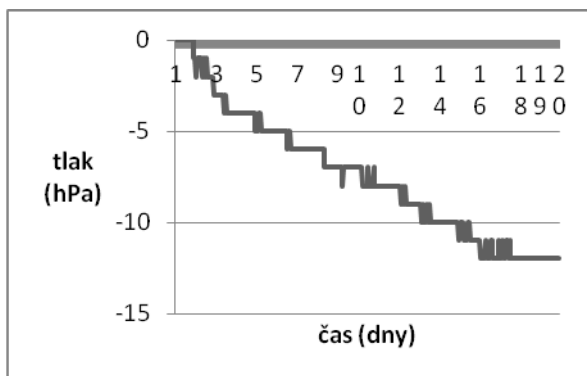


Graf 15: Kontrola, glukóza, varianta 1

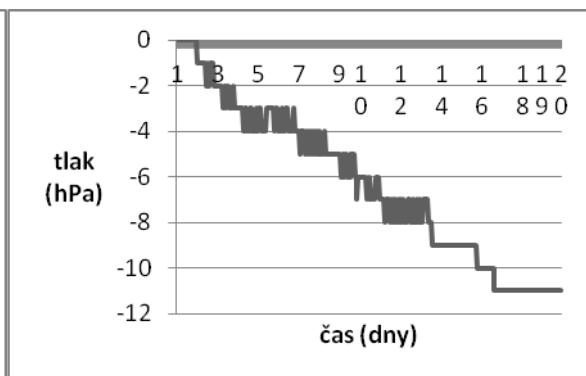


Graf 16: Kontrola, glukóza, varianta 2

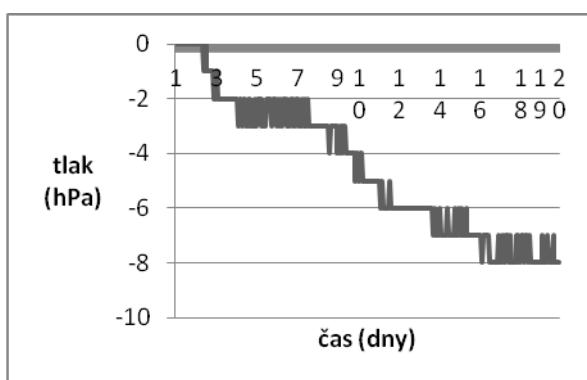
9.1.2. Odběr 21. 10. 2011



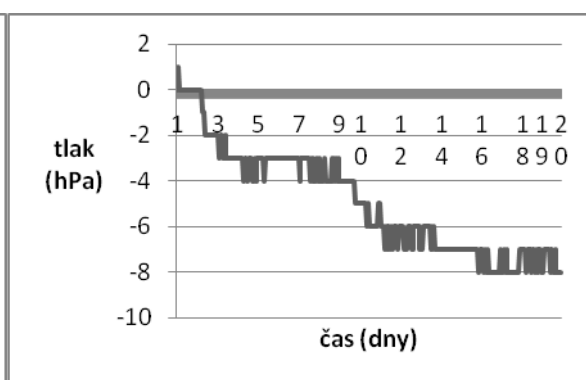
Graf 17: Hnůj, BSK, varianta 1



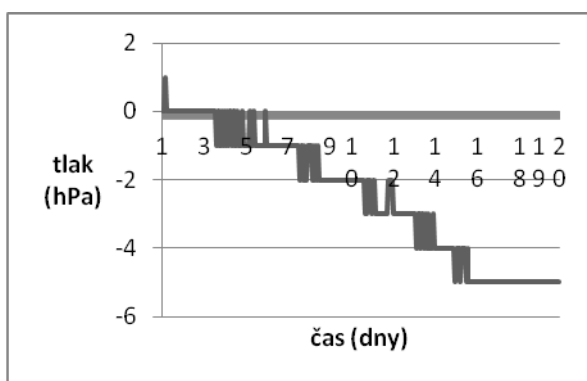
Graf 18: Hnůj, BSK, varianta 2



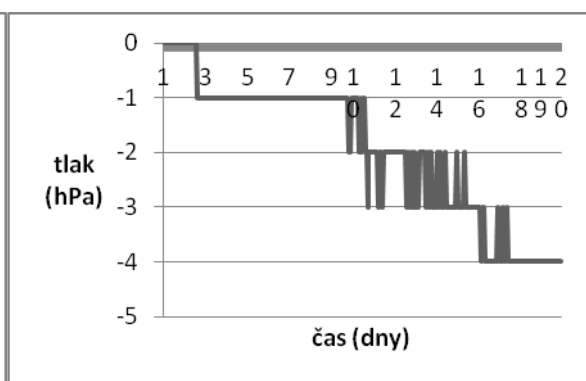
Graf 19: NPK, BSK, varianta 1



Graf 20: NPK, BSK, varianta 2

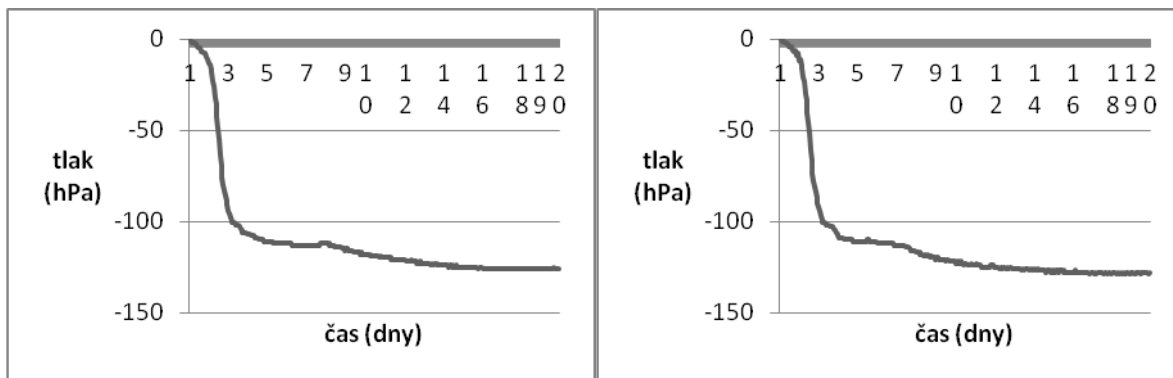


Graf 21: Kontrola, BSK, varianta 1



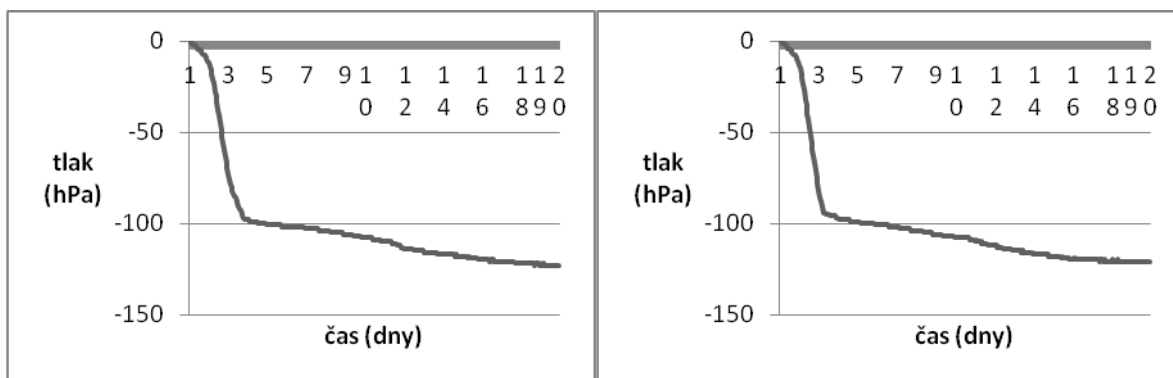
Graf 22: Kontrola, BSK, varianta 2

Možnosti využití přístroje OxiTop pro měření půdní respirace



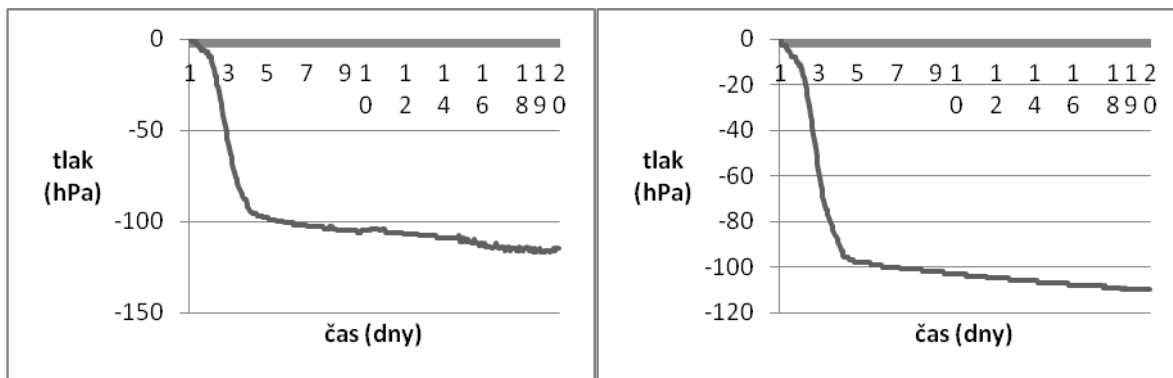
Graf 23: Hnůj, glukóza, varianta 1

Graf 24: Hnůj, glukóza, varianta 2



Graf 25: NPK, glukóza, varianta 1

Graf 26: NPK, glukóza, varianta 2



Graf 27: Kontrola, glukóza, varianta 1

Graf 28: Kontrola, glukóza, varianta 2