



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská
a technologická

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ FAKULTA

Katedra agroekosystémů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VLIV VYBRANÝCH LEGUMINÓZ NA MIKROBIÁLNÍ AKTIVITU
V PŮDĚ**

Autor diplomové práce: Bc. Lukáš Hodan

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ing. Kristýna Perná, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 31.3.2023

Podpis:

Abstrakt

Hlavním tématem předkládané diplomové práce je vliv pěstování leguminóz na mikrobiální aktivitu v půdě. Vybranými druhy leguminóz byly hrách setý (*Pisum sativum*) a lupina bílá (*Lupinus albus*). Diplomová práce je rozdělena na literární rešerši a výzkum. Literární přehled seznamuje s obecnými znaky pěstování leguminóz, jejich výhodou zařazování v osevních postupech, jednotlivé druhy mikrobiálních společenstev, mikrobiální aktivitu a její atributy a možnosti měření mikrobiální aktivity. Výzkumná část odkazuje na maloparcelkový pokus, který probíhal na pozemku ve Zvíkově u Českých Budějovic, který je veden v režimu ekologického zemědělství. Cílem výzkumu této práce bylo určit vliv pěstování hrachu setého a lupiny bílé v rámci ekologického zemědělství na aktivitu půdní bioty, a to zejména s ohledem na půdní bazální respiraci, jakožto jeden z hlavních aspektů mikrobiologické aktivity. Kromě toho byla provedena mikrobiologická kultivace na zjištění celkového počtu půdních mikroorganismů (bakterií a mikroskopických hub) v jednotlivých půdních vzorcích dle sledované plodiny. Během pokusu se dále sledovaly údaje meteorologických dat, vlhkost, teplota, výskyt škůdců, chorob a plevelných rostlin. Laboratorní část této práce probíhala ve vegetační sezóně v roce 2022. Proběhly celkem čtyři měření během různých fází vegetačního růstu (setí, růst vegetace, sklizeň). V rámci kultivace celkového počtu mikroorganismů (CPM) nebyl zjištěn (dle statistického zhodnocení) vliv pěstování obou sledovaných plodin na růst půdních mikroorganismů. Laboratorními měřeními bazální respirace u půdních vzorků byl zjištěn nárůst mikrobiální aktivity v průběhu vegetace, a to u obou sledovaných plodin. Na základě studií, které hodnotí bazální respiraci jako klíčovým znakem půdní mikrobiální aktivity, můžeme říct, že pěstování hrachu setého a lupiny bílé podporuje mikrobiální činnost. Přesnějších výsledků by se dosáhlo výzkumem alespoň 3 vegetačních období po sobě.

Klíčová slova: leguminózy, mikrobiální aktivita, bazální respirace, mikrobiologie

Abstract

The main topic of the presented diploma thesis is the influence of leguminous cultivation on microbial activity in the soil. The selected leguminous species were common pea (*Pisum sativum*) and white lupine (*Lupinus albus*). The diploma thesis is divided into literary research and research. The literature review introduces the general features of leguminous cultivation, their advantage of inclusion in sowing procedures, individual types of microbial communities, microbial activity and its attributes, and the possibilities of measuring microbial activity. The research part refers to a small-plot experiment that took place on a plot of land in Zvíkov near České Budějovice, which is conducted under the organic farming regime. The aim of the research of this work was to determine the influence of the cultivation of field peas and white lupine within organic farming on the activity of soil biota, especially with regard to soil basal respiration, as one of the main aspects of microbiological activity. In addition, microbiological cultivation was performed to determine the total number of soil microorganisms (bacteria and microscopic fungi) in individual soil samples according to the monitored crop. Meteorological data, humidity, temperature, occurrence of pests, diseases and weed plants were also monitored during the experiment. The laboratory part of this work took place in the growing season of 2022. A total of four measurements were made during different phases of vegetation growth (sowing, vegetation growth, harvest). As part of the cultivation of the total number of microorganisms (CPM), the influence of the cultivation of both monitored crops on the growth of soil microorganisms was not detected (according to statistical evaluation). Laboratory measurements of basal respiration in soil samples revealed an increase in microbial activity during the vegetation period, in both monitored crops. Based on studies that evaluate basal respiration as a key feature of soil microbial activity, we can say that the cultivation of field peas and white lupine supports microbial activity. More accurate results would be achieved by researching at least 3 growing seasons in a row.

Keywords: legumes, microbial activity, basal respiration, microbiology

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé práce, Mgr. Ing. Kristýně Perné, Ph.D., za cenné rady a obětavost při vypracování mé diplomové práce

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Pěstování leguminóz v ekologickém způsobu hospodaření.....	9
2.2 Význam leguminóz v osevních postupech.....	11
2.3 Mikrobiální aktivita půd.....	12
2.4 Struktura mikrobiálních společenstev.....	13
2.5 Význam mikrobiálních společenstev.....	14
2.5.1 Charakteristika mikroskopických hub.....	15
2.5.2 Význam mikroskopických hub.....	16
2.6 Půdní respirace.....	17
2.7 Enzymatická aktivita.....	19
2.8 Faktory ovlivňující mikrobiální aktivitu.....	20
2.8.1 Vliv teploty, vlhkosti, záření a pH půdy.....	20
2.8.2 Složení půdy a poměr C/N.....	21
2.8.3 Působení ostatních půdních organismů.....	21
2.9 Měření a hodnocení mikrobiální aktivity.....	22
2.9.1 Bazální respirace.....	23
2.9.2 Substrátem indukovaná respirace.....	23
2.9.3 Měření půdní biomasy fumigačně extrakční metodou (CFE).....	24
2.9.4 Mineralizace dusíku.....	24
2.9.4.1 Amonifikace.....	25
2.9.4.2 Potenciální nitrifikace (PAO).....	25
2.9.5 Dehydrogenázová aktivita.....	25
2.9.6 Metoda BIOLOG.....	26
2.9.7 Analýza lipidových profilů (PLFA).....	26
2.9.8 Analýza pomocí nukleových kyselin.....	27
2.9.8.1 Izolace DNA.....	27
2.9.8.2 Izolace RNA.....	28
2.9.8.3 PCR.....	28
3. CÍL PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY	39
4. METODIKA	30
4.1 Charakteristika odběrového místa.....	30

4.2	Záznam meteorologických dat.....	30
4.3	Sběr dat.....	30
4.4	Odběr, zpracování a stanovení půdních vzorků.....	32
4.4.1	Stanovení maximální kapilární vodní kapacity.....	33
4.4.2	Stanovení bazální respirace.....	33
4.4.3	Mikrobiologická část – kvantifikace mikroorganismů.....	34
4.5	Statistické vyhodnocení.....	35
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Vyhodnocení výsledků.....	36
5.2	Diskuze.....	49
6.	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
	SEZNAM ZKRATEK	57

1 Úvod

Jedinečná ekologická role leguminóz je fixace dusíku. Dusík je součástí všech bílkovin a je nezbytnou součástí metabolismu rostlin i zvířat. Přestože elementární dusík tvoří asi 80 % atmosféry, není přímo dostupný pro živé organismy. Dusík, který mohou živé organismy metabolizovat, musí být ve formě dusičnanů nebo amoniaku. Prostřednictvím vzájemné symbiózy mezi luskovinami a bakteriemi se stává dusík biotický a přístupný pro rostliny. Leguminózy poskytují domov a obživu bakteriím v kořenových uzlinách. Při složité biosyntetické interakci mezi hostitelskou rostlinou a bakterií vznikají sloučeniny dusíku, které hostitelská rostlina využívá. Tyto sloučeniny jsou dostupné i dalším rostlinám poté, co rozpadlé kořeny (a jiné části rostlin) uvolnily tyto živiny zpět do půdy. Fixace dusíku z leguminóz má v zemědělství prvořadý význam. Před začátkem používání průmyslových hnojiv bylo zemědělství a skládání osevních postupů závislé na luskovinách a na používání organických hnojiv. Běžným osevním postupem bylo střídání plodiny na zrna, jako je kukuřice či ozimá pšenice, s leguminózami či vojtěškou. Kromě příspěvku dusíku do půdy přináší i pícninářskou kvalitu. I přes dnešní markantní spotřebu průmyslových hnojiv převládá příjem dusíku z pěstování leguminóz a používání organických hnojiv. Hospodaření ekologickým způsobem a zařazování leguminóz do osevních postupů podporuje diverzitu půdního edafonu. Dalším plusem je snižování eroze půdy a možnost pěstování leguminóz jako meziplodiny či na "zelené hnojení". Leguminózy mají oproti jiným kulturním plodinám výborné nutriční vlastnosti, především co se týče obsahu bílkovin a tuků. Proto se leguminózy řadí mezi energetické plodiny stěžejní ve výživě lidí i zvířat.

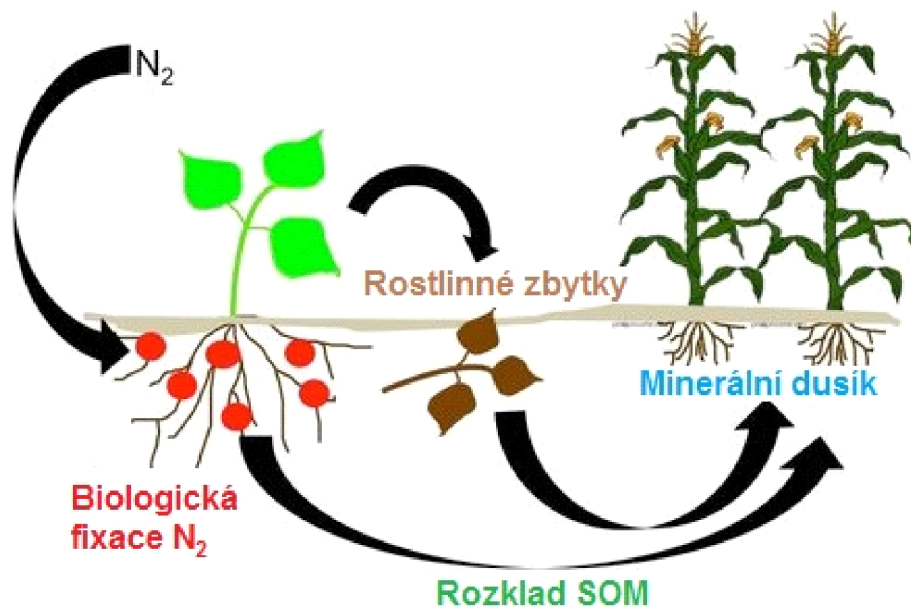
2 Literární přehled

2.1 Pěstování leguminóz v ekologickém způsobu hospodaření

Ekologické zemědělství je založeno na udržitelnosti a podpoře přirozených biologických procesů bez zasahování do životního prostředí (Galazka, 2016). Ve zjednodušených systémech jsou kultivační postupy minimalizovány. Spočívají především v kypření svrchní vrstvy půdy, ponechání rostlinných zbytků a využití meziplodin. Ponechání posklizňových zbytků v půdě má dopad na hospodaření s půdními živinami, což může být přínosné pro vlastnosti půdy. Organické hnojení prokazatelně zvyšuje počty mikroorganismů v půdě a navíc mohou bránit v tvorbě nepříznivých patogenů. Ekologické zemědělství přispívá k zachování biologické rozmanitosti půdy (Dumontet et al., 2017). Naproti tomu konvenční zásahy do půdy mají negativní důsledky ve všech směrech, ve fyzikálních, chemických i biologických. Monokultura a intenzivní orba vede ke kompaktnější půdě, což může mít za následek nižší výnosy (Tran et al., 2016). V konvenčním zemědělství se používá mnoho minerálních hnojiv, antibiotik a hormonů, což vede k degradaci půdního prostředí. Zároveň s sebou nese riziko ztráty biologické rozmanitosti (Marquard et al., 2009). Význam leguminóz spočívá v důležitosti při produkci jak potravin pro člověka, tak krmiv pro hospodářská zvířata. Neméně důležitá je potom průmyslová výroba barviv (Prahbu & Bhute, 2012).

Leguminózy tvoří přibližně 27 % světové produkce rostlinné výroby a spotřebu bílkovin lidí a hospodářských zvířat pokrývají asi z 33 %. V našich podmínkách jsou leguminózy rozšířenou čeledí. Jen v ČR se pěstuje na 43 druhů leguminóz (Smýkal et al., 2015). Leguminózy jsou široce definované svou neobvyklou stavbou a strukturou květů a plodů (Graham & Vance, 2003). Díky této neobvyklé stavbě květů jsou leguminózy obvykle entomogamní, typicky jsou opylovány čmeláky (Stone et al., 2003). Leguminózy jsou zastoupeny z 88 % druhy, které jsou schopny zakládat kořenové hlízky s bakteriemi rodu *Rhizobium* (Obr. 1) a vázat vzdušný dusík (Graham & Vance, 2003). Tvorba symbioticky účinné kořenové soustavy leguminóz zajišťuje signalizaci mezi hostitelem a mikroorganismy. Fixace vzdušného dusíku je prováděna pouze prokaryoty s příslušnými enzymy. Diazotrofové, kteří fixují molekulární dusík, jsou specifickou skupinou mikroorganismů, protože dokáží žít jak samostatně, tak v symbiotickém vztahu. Symbiotické druhy poutají ročně až 400 kg N/ha. Tyto symbionty rozdělujeme na dva typy dle druhu symbiózy:

- Asociativní - druhy mikroorganismů, kteří nežijí přímo na rostlině, ale v těsné blízkosti jejího kořenového systému. Jedná se o rody *Azotobacter*, *Arthrobacter* a *Pseudomonas*. Tyto druhy jsou typické především pro tropická a subtropická pásma
- Nodulující - vztah, kdy mikroorganismy vytvářejí hlízky přímo na rostlinných orgánech. Rostliny jsou obohacovány o dusíkaté látky a mikroorganismy kořenovými exudáty, které obsahují snadno rozložitelný uhlíkatý skelet.



Obr. 1: Biologická fixace N_2 (zdroj: web2.mendelu.cz)

Flavonoidy nebo isoflavonoidy uvolňované z kořenů leguminóz indukují transkripci nodulačních genů v bakteriích, což vede k tvorbě lipo-chitinových oligosacharidů, které naopak signalizují hostitelské rostlině, aby začala tvořit více hlízek (Graham & Vance, 2003). Maximální přínos fixace dusíku však závisí na dostupnosti půdního fosforu. Přibližně na třetině světových půd je limitujícím prvkem v půdě právě fosfor, bez kterého nemůže započít mikrobiální aktivita. K nedostatku fosforu jsou obzvláště náchylné půdy kyselé. I když je hnojení fosforem dostatečné, je tento fosfor v půdě mobilní a podléhá eutrofizaci. Rostliny ho tedy mohou v prvním roce přijmout nanejvýš 15 % (Graham & Vance, 2003).

2.2 Význam leguminóz v osevních postupech

Přidávání leguminóz do osevních plánů je odůvodněno jejich přirozenou schopností využívat atmosférický dusík. Ukázalo se, že zařazení leguminóz jako předplodiny ke kukuřici seté zvyšuje její výnosy až o 30 % a navyšuje se obsah N-látek v rostlinném pletivu kukuřice (Duchene et al., 2017). Kromě toho, že leguminózy slouží jako kvalitní světový zdroj potravin a krmiv, přispívají ke snížení emisí skleníkových plynů, protože v průměru uvolňují těchto plynů o 500 % až 700 % méně na jednotku plochy než běžné polní plodiny (Stagnari et al., 2017). Dále umožňují sekvestraci uhlíku v půdách a redukují energetické vstupy díky snížení potřeby dusíkatého hnojení. Tato sekvestrace uhlíku se pohybuje kolem 277 kg CO₂/ha/rok, což představuje úsporu dusíkatých hnojiv přibližně 88 kg N/ha/rok (1 kg N = 3,15 kg CO₂) (Stagnari et al., 2017). Například nejčastějším skleníkovým plynem v rostlinné výrobě je oxid dusný. Kvůli nadměrnému dusíkatému hnojení se procesem zvaným denitrifikace uvolní z každých 100 kg dusíkatých hnojiv přibližně 1 kg dusíku v podobě N₂O. Měřením toků N₂O u pěstovaných rostlin se ukázalo, že u hrachu vysublimuje 69 kg N₂O/ha/rok, kdežto u ozimé pšenice to je 368 kg N₂O/ha/rok a u řepky dokonce 534 kg N₂O/ha/rok. Z tohoto důvodu je zařazení leguminóz do osevních postupů jedním z klíčových pro podporu ekologického zemědělství (Stagnari et al., 2017).

Leguminózy, jakožto klíčový atribut koloběhu dusíku v půdě, je prospěšné zařazovat do osevních postupů. Neméně důležité jsou však i pro koloběh jiných prvků. Po dusíku je fosfor nejvíce limitujícím faktorem pro růst rostlin. Ve skutečnosti je fosfor v půdě hojný, avšak v nerozpustných formách, které jsou nedostupné pro příjem kořenovou soustavou. V této souvislosti zvyšují leguminózy akvizici fosforu a to především vychytáváním anorganických forem fosforu z hlubších půd díky rozsáhlé kořenové soustavě (Duchene et al., 2017). Střídání leguminóz v osevních postupech má také významný vliv na strukturu mikrobiální společenstev a jejich diverzitu.

Ukázalo se, že produkce lektinů leguminózami může ovlivnit mobilitu rhizobakterií podporujících růst rostlin, zlepšit kolonizaci kořenů a fytoaktivitu. Stejně tak sekrece určitých flavonoidů, například naringeninů, který se podílí na známém symbiotickém spojení mezi luštěninami a bakteriemi *Rhizobium*, je zodpovědný za kolonizaci kořenů bakteriálním rodem *Azospirillum*, jehož funkcí je podpora růstu rostlin a fixace vzdušného dusíku. Stejně tak vylučování izoflavonů kořeny sóji podporuje osídlování prospěšnou bakterií *Bradyrhizobium japonicum*, která zlepšuje výnosy plodin (Duchene et al., 2017).



Obr. 2: Hlízky na kořenech hrachu polního (zdroj: agromanual.cz)

2.3 Mikrobiální aktivita půd

Půda je systémem, který je schopný přizpůsobovat se změnám podmínek, skládající se ze živých i neživých komponent. Hodnotným komplexem živých složek půdy jsou mikroorganismy. Mezi nejdůležitější mikroorganismy se řadí zástupci z domény *Bacteria* (prokaryotní organismy) a říše *Fungi* (Mukerji et al., 2006). Dalšími významnými mikroorganismy jsou zástupci z domény *Archea* a říše *Protozoa*. Význam zástupců těchto domén je bezprecedentní (Yan et al., 2015). Činnost mikroorganismů hraje důležitou roli při rozkladu organických látek, tvorbě půdního sorpčního komplexu, hromadění živin v půdě a jejich zpřístupňování rostlinám. Mikroorganismy také řídí odstraňování škodlivých látek vzniklé lidskou činností (Šimek et al., 2011; Sutton, 2011).

Mikroorganismy a jejich společenstva hrají v půdě důležitou roli, i přes jejich nízké hmotnostní zastoupení (přibližně 0,5 hm. %). Účastní se všech biochemických reakcí. Na dekompozici se mikroorganismy podílejí přímo, stejně tak na oxidaci, redukci a imobilizaci půdní organické hmoty (SOM). Další nepostradatelnou úlohou je koloběh uhlíku (respirace) a biologická fixace dusíku. Centrem všech mikrobiálních aktivit v půdě je sféra ovlivněná participací kořenů rostlin, tzv. rhizosféra (Záhora, 2012; Yan et al., 2015). Půdní mikroorganismy jsou součástí většího celku označovaný jako půdní edafon, který zahrnuje velké množství organismů nehlédě na to, jestli půdu obývají trvale či provizorně. Půda obsahuje

přibližně 5 % SOM, přičemž podíl mikroorganismů na živé frakci SOM je 75 % (Šimek et al., 2015). Jako ukazatele vitálních znaků půdních mikroorganismů a vyobrazení jejich křivky intenzity se používá termín mikrobiální aktivita. Zhodnocení této půdní aktivity mikroorganismů je úzce korelováno respirací. (Bloem et al., 2006; Rivastava, 2010).

Veškeré biochemické procesy v půdě jsou spojeny právě s mikrobiální aktivitou, protože pouze vitální a aktivní organismy se mohou účastnit těchto procesů (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013). Půdní mikrobiální aktivita a její intenzita je tedy zásadním parametrem, který udává schopnost půdy rozkládat primární organickou hmotu a účastnit se koloběhu živin v půdě.

Tab. 1: Hlavní funkce půdních mikroorganismů a jejich význam (Nilsen & Winding, 2002)

Funkce	Význam
Rozklad primární organické hmoty	Přístup živin půdnímu edafonu
Detoxikační vlastnosti	Odstranění půdních škodlivin
Transport vody a regulace	Omezení ztráty živin
Regulace hydrologických procesů	Zadržení vody v půdě
Udržování struktury půdy	Zamezení eroze půdy
Transport plynů	Přímý vliv na koncentraci CO ₂ v ovzduší
Ovlivnění natality škůdců	Udržování biodiverzity

2.4 Struktura mikrobiálních společenstev

Půda je nerozsáhlejším komplexem biologické diverzity na Zemi. Je to dáno taxonomií jednotlivých mikrobiálních společenstev. V kvalitních půdních podmínkách mohou tyto společenstva tvořit miliardy mikroorganismů. Průměrné počty mikroorganismů se přepočítávají na jeden gram půdy a tvoří přibližně 10^7 - 10^{10} bakterií (*Bacteria*), aktinobakterií (*Actinobacteria*) a archaebakterií (*Archaea*), 10^5 - 10^6 hub (*Fungi*), 10^4 - 10^5 prvoků (*Protozoa*), řas (*Algae*), sinic (*Cyanobacteria*) a virů (Van Elsas et al., 2006; Voroney, 2007).

Nejčastějšími druhy půdních bakterií jsou *Pseudomonas*, *Actinomycetes* a *Eubacteria*. Důležité pro zemědělství a ekologickou stabilitu v půdě jsou dusík fixující bakterie, tzv. nitrifikační bakterie. Jsou to především rody *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, a *Nitrobacter*. Dalšími významnými bakteriemi jsou hlízkové bakterie, např. *Rhizobium*, *Mesorhizobium* nebo *Sinorhizobium*, žijící v symbiotickém vztahu s bobovitými rostlinami, které přeměňují NH₄⁺ na, rostlině lépe dostupné, dusitany a dusičnany. Fixace dusíku jsou

schopny také Gram-pozitivní aktinobakterie rodu *Frankia*. Stěžejní jsou také fotosyntetizující sinice (např. *Oscillatoria*) (Bolmann, 2006).

Mezi nerozsáhlejší skupinu půdních mikroorganismů patří gram-pozitivní aktinobakterie, které tvoří přibližně 30 % celkového počtu všech bakterií. Nejvíce bývají zastoupeny rody *Streptomyces* nebo *Mycobacterium*. Charakteristika těchto aktinobakterií spočívá v jejich chemoheterotrofní výživě. Dělí se do několika skupin, které jsou definovány schopností růstu v různých hodnotách pH. Alkafilní bakterie rostou při pH nad 9,0, neutrofilní mezi 5,0 a 9,0 a acidofilní vyžadují kyselé půdy s pH pod 5,0 (Baldrian et al., 2011).

Houby (*Fungi*) jsou neméně důležitou součástí půdních organismů tvořící symbiotické vztahy s obšírnou řadou rostlin, přičemž nejvíc stěžejní je arbuskulární mykorhiza, která brání rostliny vůči půdním patogenům a negativnímu vlivu nízkého pH. Jeden z kvalitativních znaků půd je právě obsah těchto hub v půdě a jejich vliv na fyziologii rostlin (Dumas-Gaudot, 2000). Mykorhizní houby jsou všudypřítomné a tvoří symbiotické vztahy s kořeny 80 % všech druhů suchozemských rostlin. Výměnou za uhlík dodávají rostlinám živiny tvořené prvky dusíku, fosforu, mědi, zinku a železa a vytváří jim ochranu před suchem a jinými stresovými podněty (Van der Heijden et al., 2008).

2.5 Význam mikrobiálních společenstev

I mezi půdními mikroorganismy se prostřednictvím evoluce vytvořily interakce na biochemické úrovni. Půdní biota tvoří společenské komplexy, které se odlišně participují na biochemické úrovni, mají odlišnou houževnatost na různé stresové situace a na změnu ekologické niky. Jedním z parametrů hodnocení půdní mikrobiální diverzity je schopnost mikroorganismů reagovat na stresové situace a na změnu vnějších podmínek (Bressan et al., 2008).

Významným pochodem iniciovaným právě společenstvy mikroorganismů, distribuující organický uhlík v půdě, je dekompozice lignocelulózy na celulózu a hemicelulózu. Tato dekompozice je nejvíce iniciována právě aktinobakteriemi, které používají rozkladné extracelulární enzymy produkované na povrchu bakteriálních buněk. Mezi rozkladné enzymy patří např. endocelulázy, glykosylované hydrolázy, peroxidázy a glykosidázy. Rozkladným procesem se díky těmto enzymům štěpí makromolekula celulózy na oligomery či monomery glukózy, která slouží v půdě jako kultivační médium. Bakterie metabolizují glukózu s daleko vyšší účinností než mikroskopické houby.

Dalším významným biochemickým procesem v půdě je rozklad ligninu. Rozkladu ligninu se v půdě účastní všechny typy bakterií, především však mikroskopické houby. Působením enzymu ligninperoxidázy způsobují bílou hnilobu (Baldrian et al., 2011).

Veškerý koloběh uhlíku v půdě je řízen mikroorganismy. Takovýto uhlík je během fotosyntézy zabudováván autotrofními organismy ve formě oxidu uhličitého jako organický vázaný uhlík. Během dekompozičních procesů v půdě se organický vázaný uhlík dostává do půdy pomocí kořenů rostlin a zaručuje výživu bakteriím a jiným mykorrhizním organismům v rhizosféře (Bonkowski et al., 2000). Při rozkladných procesech se dělí mikroorganismy na tzv. r-stratégy rozkládající organickou hmotu s nízkým poměrem C/N a jsou vyživováni energeticky bohatými látkami. Dále máme tzv. K-stratégy, kteří se zaměřují na rozklad látek s vyšším poměrem C/N a jejich růst limitují r-stratégové. Cyklus fosforu a dostupnost živin (např. Fe, Zn, či Cu) a stopových prvků ovlivňují také půdní mikroorganismy (Fontaine et al., 2003).

2.5.1 Charakteristika mikroskopických hub

Mikroskopické houby jsou skupinou eukaryotních organismů s heterotrofním způsobem výživy. Mají širokou fyziologickou a morfologickou diverzitu a osidlují mnohé biotopy. Jejich nejvýznamější rolí je dekompozice organické hmoty. Významnou část těl tvoří tzv. hyfy, které se rozrůstají do podhoubí (tzv. mycelia). Mikroskopické houby se vyskytují jak v půdě, tak v ovzduší nebo vodě, ale také v krmivech pro hospodářská zvířata a konkrétních potravinách. Jsou velmi flexibilní co se týče požadavků na podmínky růstu (Tab. 2), proto se jedná o velmi rozšířené kontaminanty (Laciaková et al., 2011).

Tab. 2: Faktory růstu mikrobiálních hub (Laciaková et al., 2011)

Faktor	Růst	Produkce mykotoxinů
Teplota	-12°C - 55°C	4 - 40 °C
pH	1,7-10	5-8
Aktivita vody (aw)	Min. 0,62	Min. 0,8 – 0,85
Redukční potenciál (Eh)	Aerobní podmínky	Aerobní podmínky
Vliv solí	Do 20 % NaCl	Do 14 % NaCl
Vliv cukrů	Do 50 % sacharózy	Do 50 % sacharózy

2.5.2 Význam mikroskopických hub

Kromě toho, že mikroskopické houby vyvolávají mykózy a mykoalergie u lidí i hospodářských zvířat a způsobují oslabení imunitního systému a úbytek svalové hmoty, mají velký význam v půdě v rámci koloběhu živin a dekompozice. Hrají významnou roli v koloběhu uhlíku, především při rozkladu ligninu. Využívají se také v potravinářském (výroba sýrů) a farmaceutickém (výroba léčiv) průmyslu. Mezi nejvýznamnější rody mikroskopických hub produkující mykotoxiny patří rod *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* a *Fusarium* (Malíř et al., 2003). Tyto rody jsou známí saprofyti, s výjimkou rodu *Fusarium*, který se přizpůsobil parazitismu. Mají antimikrobiální účinky a jsou to známí dekompozitěři v půdě, kde rozkládají půdní organickou hmotu (Laciaková et al., 2011).



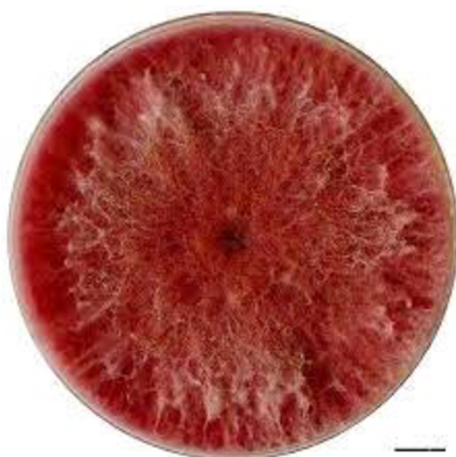
Obr. 3: rod *Penicillium* (Chumchalová et al., 2006)



Obr. 4: rod *Aspergillus* (Chumchalová et al., 2006)



Obr. 5: rod *Alternaria* (Chumchalová et al., 2006)



Obr. 6: rod *Fusarium* (Chumchalová et al., 2006)

2.6 Půdní respirace

Půdní mikrobiální společenstva jsou tvořena z nezměrné škály organismů, které mohou být v odlišných fyziologických stádiích. V obecné rovině může být mikrobiální aktivita rozčleněna do třech základních živých stavů (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013):

1) Aktivní stav = mikroorganismy jsou součástí biochemických reakcí v půdě, zajišťují cyklus živin a mineralizují primární organickou hmotu.

2) Potencionálně aktivní stav (fyziologická bdělost) = mikroorganismy jsou vitální, avšak v nečinnosti. Po uvedení média v půdě nebo redukci stresových faktorů jsou mikroorganismy schopny okamžitě začít s mineralizací SOM.

3) Vegetativní stav = mikroorganismy jsou ve stádiu, kdy čekají na změnu vnějších podmínek (např. půdní vlhkosti).

Dekompozicí organických látek v půdě dochází k podnícení mikroorganismů. Tato aktivace je vyjádřitelná produkcí oxidu uhličitého půdní biotou v určitém časovém intervalu neboli půdní respirací (Mikanová et al., 2010). Půdní respirace slouží jako jeden z hlavních parametrů pro hodnocení aktivity půdních mikroorganismů. Půdní respirace je propojena s mineralizací půdní organické hmoty a je označována za heterotrofní, dále potom spolu s dýcháním půdních mikroorganismů a kořenovou autotrofní respirací představuje celkovou půdní respiraci (Deng et al., 2010).

Půdní respirace (SR) má nezpochybnitelnou roli pro řízení koncentrace atmosférického CO₂ a posléze i dynamiky klimatu v celosvětovém měřítku. Hodnota SR je velmi flexibilní a podmíněna změnou faktorů environmentálního prostředí, jakými jsou například srážkové úhrny, teplota, nebo zásoba uhlíku v půdě, neboť právě tyto atributy řídí dostupnost uhlíku v půdě. SR tak indikuje vliv změny meteorologických podmínek na půdní prostředí (Matiás et al., 2011). V případě, že SR dosahuje stálých hodnot a její původ je dán rozkladem SOM, je označována za *bazální respiraci* (BAS). Intenzita BAS je podmíněna množstvím a kvalitou půdního uhlíku, respektive množstvím uhlíku v SOM. BAS a její hodnoty tvoří potenciál půdních mikroorganismů rozkládat látky organického původu, jelikož zvyšující se mikrobiální aktivita v půdě je podmíněna rostoucí hodnotou BAS. S rostoucí hodnotou BAS tedy vzrůstá zapojení mikroorganismů do biochemických pochodů v půdě (Bloem et al., 2006). Aktuální půdní respirace lze vyjádřit právě BAS a většinou je měřena v delších časových periodách.

Kromě bazální respirace se hodnotí u další druhy respirací, např. substrátem indukovaná respirace, která monitoruje respiraci mikroorganismů schopných využít momentálně dostupné médium, nejčastěji se jedná o jednoduchý cukr – glukózu. Jedním z nedostatků substrátem indukované respirace je fakt, že měří pouze kvantitu mikrobiální společnosti, neboť je měřena po aplikaci glukózy (Šimek et al., 2011) a během následujících několika hodin po přidavku není zaznamenán významnější růst mikrobiálních populací, a proto je respirační reakce dána přímou úměrou k množství mikrobiální biomasy v půdě. Půdní respirace (nebo též produkce

CO₂) je ukazatelem mikrobiální aktivity v půdě, která také koreluje s obsahem půdní organické hmoty. Parametr půdní respirace a její aktivity je tedy potenciálem rozkladu primární organické hmoty a sledování koloběhu živin v půdě (Bloem et al., 2006).

2.7 Enzymatická aktivita

Enzymatické látky v půdě jsou ojedinělé sloučeniny na bázi bílkovin, které fungují jako katalyzátory všemožných biochemických půdních procesů, které souvisejí s:

- 1) vitalitou půdních mikroorganismů
- 2) rozkladem SOM
- 3) tvorbou složitějších org. látek v rámci SOM
- 4) tvorbou půdní struktury (Das & Varma, 2011).

Přítomnost enzymů u mikroorganismů hodnotí momentální stav půdního prostředí. Mezi nejvýznamnější enzymatický proces v rámci monitoringu mikrobiální aktivity se řadí dehydrogenázová aktivita (DHA) (Zheng et al., 2015). Dehydrogenáza je označována jako enzym dýchacího řetězce. Hlavním přínos dehydrogenázy je v biologické oxidaci organických látek nebo SOM. Tato oxidace je realizována za využití transferu protonů a elektronů z donoru na akceptor a nastává tak přenos energie v dýchacím řetězci (Mikanová et al., 2010). DHA proto zobrazuje celkovou oxidační aktivitu půdních mikroorganismů (Brezinska et al., 2001) v kontextu metabolické aktivity půdní mikroflóry (Risastava, 2010). DHA je stežejní pro zhodnocení a kvantifikaci mikrobiální aktivity, neboť její citlivost na zatížení půdy je značná (Risastava, 2010).

Enzymatická aktivita je všeobecně hodnocena podle aktivity různých enzymů, které jsou produkovány mikroorganismy hlavně při rozkladu polysacharidů. Hlavní extracelulární enzymy jsou oxidázy, hydrolázy, peroxidázy a fosfatázy. Tyto rozkládají především celulózu a lignin a ovlivňují tak koloběh biogenních prvků v půdě (Baldrian, 2009). Enzymatická aktivita je v korelaci s množstvím mikroorganismů v půdě. Činnost oxidativních a hydrolytických enzymů navyšuje dekompozici půdní organické hmoty. Jedním takových příkladem je aktivita ureázy. Ta je měřítkem intenzity přeměny dusíku v půdě a podmiňuje dostupnost a příjem N-látek u rostlin. Dalším příkladem je aktivita lignocelulolytických enzymů inhibované prvky kovů, kdy se při činnosti těchto enzymů snižuje objem mikrobiální biomasy, naopak houby vykazují značný nárůst (Baldrian et al., 2011).

2.8 Faktory ovlivňující mikrobiální aktivitu

Hlavním biochemickým procesem rozkladu půdní organické hmoty je dekompozice, která zajišťuje vstup živin do půdy. Tento proces je korelován některými fyzikální a chemickými parametry, jako třeba pH půdy, teplota nebo aktuální půdní vlhkost. Dále je dekompozice ovlivněna chemickým složením SOM a dále na diverzitě půdní bioty a dané mikrobiální aktivitě. Dekompoziční procesy ovlivněné mikrobiální aktivitou se dělí do dvou fází, přičemž první fáze je rychlejší a klíčovými atributy ovlivňující děj jsou klimatické podmínky a přístupnost živin. Druhá fáze je pomalejší a je podmíněna složením SOM. Na základě složení SOM dochází k postupnému uvolňování příslušných prvků do půdy (především dusíku, uhlíku a fosforu). Půdní biota využívá a zpracovává půdní organickou hmotu, přičemž zabudovává uhlík především do formy humusu. Dalšími látkami, které jsou uvolňují do půdy, jsou především rozpustné organické látky, jako třeba cukry (monosacharidy a oligosacharidy), fenoly (taniny) a glyceridy (Aerst, 1997).

2.8.1 Vliv teploty, vlhkosti, záření a pH půdy

Zvyšující se teplota v půdě má značný vliv na transport živin, a tím pádem je teplota důležitým faktorem účinnosti mikrobiální aktivity. Dekompozici organické hmoty ovlivňuje dále fotodegradace UV-B zářením. Také půdní vlhkost je odpovědná za změnu mikrobiální aktivity, protože nižší obsah vody znemožní schopnost látek difundovat, půdní biota je méně vyživována a mikrobiální aktivita potlačena. Kolísáním obsahu vody v půdě může tak mikrobiální aktivita stagnovat nebo může být stimulována. Změny v půdní vlhkosti tak mění diverzitu mikrobiálního společenstva, neboť mikroskopické houby mají vyšší toleranci vůči suchu než třeba bakterie a aktinobakterie. Naopak nadměrný obsah vody v půdě snižuje dostupnost kyslíku potřebného pro mikrobiální aktivitu.

V průběhu biochemických procesů půdních mikroorganismů se značně projevuje vliv pH v půdě. Při nižším půdním pH dochází k nárůstu acidofilních mikroorganismů oproti ostatních druhů. Kyselinotvorné prostředí také podporuje produkci kořenových exudátů, hromadění oxidu uhličitého nebo uvolňování hliníku do půdy. Mikrobiální aktivita je tak ovlivněna snížením rozpustnosti některých org. látek a tím pádem dostupnosti základních živin. Nižší pH také podporuje uvolňování toxických prvků v půdě. Při vyšším pH se zase zvyšuje účinnost fixace dusíku bakteriálními rody (Berg, 2000; Cornejo et al., 1994).

2.8.2 Složení půdy a poměr C/N

Diverzita mikrobiálního společenstva a schopnost mikrobiální aktivity se aktivně podílet na zpracovávání organických látek je nejvíce závislá na chemickém složení půdy. Mikrobiální aktivita koreluje se stechiometrickým koeficientem uhlíku a dusíku v půdě, přičemž se zvyšujícím se poměrem C/N úroveň aktivity klesá. Půdy, které mají poměr C/N v rozmezí 15 až 20 jsou považovány za dostatečně zásobené dusíkem, nejkvalitnější půdy bývají černozemě s poměrem C/N přibližně 10 a s vysokou mikrobiální aktivitou. Ekosystémy kyselých anaerobních půd, jako jsou třeba rašeliniště, se vyznačují poměrem C/N kolem 60, kdy při těchto hodnotách dochází během dekompozice k imobilizaci dusíku. Půdy bohaté na živiny vynikají rychlým průběhem rozkladu, kdežto půdy chudší na živiny produkují těžko rozložitelnou organickou hmotu (Aerst, 1997).

K nejvyšší intenzitě mikrobiální aktivity dochází, na základě teorie stechiometrického rozkladu, v případě vstupujícího C a N podmíněným nárokům biomasy (Hessen et al., 2004). Některé druhy mikroorganismů zachycují vzdušný dusík a redukuje jej na amoniakální formu, která je půdním edafonem využita a začleněna do biomasy. Z této biomasy posléze rostliny vstřebávají dusík ve formě amonických iontů nebo dusičnanů. V rámci koloběhu dusíku v půdě je odumřením biomasy N_2 znovu využit, volatilizován, nitrifikován na nitráty, anebo naopak denitrifikován na N_2O (oxid dusný) (Šimek a Cooper, 2006).

Složení půdní organické hmoty je podmíněno množstvím uhlíku dostupného v půdě. Nejčastěji se uhlík do půdy dostává ve formě celulózy a také z 20 % kořenovými exudáty, které jsou pro půdní biotu daleko dostupnější formou uhlíku díky jednoduššímu chemickému složení těchto exudátů (Berg, 2000; Bonkowski et al., 2000).

2.8.3 Působení ostatních půdních organismů

Jak rychlý je rozklad organických látek je dáno především půdní biotou, jejíž efektivitu, účinnost a populační dynamiku ovlivňuje predace půdní mikrofaunou. Bakteriofágní hlístice (*Nematoda*) a prvoci (*Protozoa*), které taktéž rozkládají organickou hmotu, konzumují při nedostatku potravy kromě bakterií i jiné prvoky, houby, celulózu nebo huminové sloučeniny (Scheu, 1990; Bonkowski et al., 2000).

Kromě mikrofauny je významným participantem na rozkladu organické hmoty také půdní mezofauna a makrofauna. Jejich funkce spočívá ve změnách chemického složení půdy a pH, provzdušňování půdy a predaci. Z hlediska biodiverzity půdní makrofauny jsou

nejvýznamnějším zástupcem členovci (Arthropoda), stejnonožci (Isopoda), stonožkovci (Myriapoda) a brouci (Coleoptera).

Snad nejvýznamnějším přínosem pro kvalitu půdy, provzdušňování a tím pádem zvýšení intenzity mikrobiální aktivity je kmen kroužkovců (*Annelida*). Typickým zástupcem jsou žížaly. Podle jednotlivých druhů vytvářejí horizontální či vertikální cestičky a zajišťují provětrávání půdy, vodní režim půdy a transport živin. Jejich činnost napomáhá chemicky rozkládat půdní organickou hmotu, čímž zvyšují příjem živin pro mikrobiální společenstva a podporují růst těchto společenstev. Existuje dokonce přímá úměra mezi hustotou žížal a obsahu uhlíku v SOM. Žížaly navíc produkují svými žlázami zásadité látky, které neutralizují huminové kyseliny, a tím pádem zvyšují pH půd (Scheu, 1990; Bonkowski et al., 2000).

2.9 Měření a hodnocení mikrobiální aktivity

Sledování a porozumění vlastnostem mikrobiální aktivity a diverzity, které mají značný vliv na ekosystém půdy, je z vědeckého, a hlavně zemědělského hlediska, velmi důležité, neboť analýza těchto vlastností může být využita pro praktická opatření ke zlepšování kvality půdy. V kontextu celého půdního ekosystému jsou dobře definovatelné vztahy mikrobiální diverzity, rostlin a půdy a můžou se vytyčit vysoce citlivé indikátory, které establují vitalitu celého půdního systému (Hill et al., 2000).

Dnes se hojně využívají molekulární metody (např. amplifikace podjednotek rRNA genů) měřené z nukleových kyselin. Tyto metody přinesly do výzkumu půdní bioty nové možnosti analýzy genetické diverzity i těch rodů v současnosti laboratorně nekultivovatelné, což přispělo ke komplexní kvalifikaci mikrobiálních společenstev. Kromě přístrojových měření existuje řada dalších analytických metod využívající enzymatickou aktivitu, mikrobiální respiraci či obsah ATP, avšak umožňují pouze obecné charakteristiky mikrobiálních společenstev (Hill et al., 2000; Chowdhury & Dick, 2012).

2.9.1 Bazální respirace

Bazální respirace se hodnotí jako rychlost, za kterou mikroorganismy spotřebují kyslík, nebo také vyprodukují oxid uhličitý za časový úsek. Půda je před samotným měřením několik dní inkubována a poté je měřeno množství CO₂ buď analyticky (titrací uvolněného CO₂ v roztoku NaOH) nebo instrumentálně. Výsledek se vyjádří jako obsah CO₂ ve vzorku na gram sušiny a jednotku času ($\mu\text{g CO}_2\text{-C. g}_{\text{suš.}}\text{ hod}^{-1}$).

Bazální respirace půdní bioty je ukazatelem respirační aktivity a hodnotí fyziologický stav dané mikrobiálního společenstva. Je tudíž kvalitativní metodou. Mikrobiální společenstvo a jeho respirační aktivita je podmíněna množstvím dostupných živin v půdě a je odrazem momentální vitality, biochemických procesů, popř. působení stresových činitelů (ISO/DIS 16072, 2002).

2.9.2 Substrátem indukovaná respirace

Substrátem indukovaná respirace je obvykle měřena po přidání lehce využitelného média, např. glukózy, narozdíl od bazální respirace, která je atributem uvolňovaného CO₂ bez přidání média. U této metody se sleduje křivka vyprodukovaného oxidu uhličitého stejně jako u bazální respirace, tj. buď analytickou metodou, nebo instrumentálně. Výsledky zapisujeme buď jako kumulativní obsah CO₂-C ($\mu\text{g CO}_2\text{-C. g}_{\text{suš.}}$), nebo jako potenciální respirační rychlost po statistickém zpracování dat ($\mu\text{g CO}_2\text{-C. g}_{\text{suš.}}\text{ hod}^{-1}$) (ISO 14240-1, 1997).

U substrátem indukované indukce můžeme horizont sledování upravit na několikadenní za podmínky přidavku dalších typů substrátů coby zdroje živin, a to např. amonných a fosfátových iontů. V praxi se v rámci mikrobiální aktivity měří napřed bazální respirace, jejíž grafické vyjádření bude reprezentovat přímka. Po přidavku základního substrátu glukózy nabývá graf exponenciálního tvaru. U K-stratégů je možné sledovat konstantní odezvu a po přidání média, jako třeba glukózy, se exponenciálně množí r-stratégové. Parametrem u exponenciální křivky je tzv. *lag time*, což je doba od přidání média glukózy do začátku fáze exponenciální, dále rychlost růstu a aktivační respirační koeficient. Pro všechny atributy jsou stanoveny hodnoty limitu, které popisují stav půdy (ISO 14240-1, 1997).

2.9.3 Měření biomasy fumigačně extrační metodou (CFE)

Fumigačně extrační metodou (CFE), se stanovuje celkový C v půdní hmotě. Uhlík, který se extrahuje z této biomasy a který je obsažený v buňkách (C_{bio}), se fumigací pomocí chloroformu rozloží zpět do půdní hmoty. Obsah C_{bio} se poté stanoví rozdílem mezi vzorkem fumigovaným a nefumigovaným. Celkový obsah uhlíku se v těchto vzorcích stanoví oxidací pomocí dichromanu za přítomnosti silné kyseliny a posléze titrací Mohrovou solí, nebo spektrofotometrickou metodou. Výsledek je vyjádřený v mikrogramech hmotnosti C_{bio} vztažené na hmotnost půdy ($\mu\text{g } C_{\text{bio}} \cdot \text{g suš.}^{-1}$).

Výhodou fumigačně extrační metody je, že vzorek nemusíme separovat ani jinak upravovat a získáme tak souběžné stanovení obsahu půdní bioty C_{bio} a stanovení obsahu mimobuněčného uhlíku C_{org} . Na druhou stranu nám tato metoda neposkytne podrobný rozbor stavu mikrobiálních společenstev, jelikož nám tato metoda zobrazí pouze objem mikrobiální biomasy. Pro zjištění stavu vitality mikrobiálního společenstva je zapotřebí doplnit CFE metodu a jinou, kvalitativní (ISO 4240-2, 1997).

2.9.4 Mineralizace dusíku

Mineralizace N je dána dvěma pochody, a to nitrifikací a amonifikací. Při prvním kroku, amonifikaci, je mikrobiální činností přeměňován dusík, který je organický vázaný, na amoniakální ionty. Uvolňované ionty jsou stěžejní živinou a zdrojem dusíku pro producenty. V procesu amonifikace je participováno velké množství mikroorganismů. Naproti tomu je do nitrifikace zapojeno užší množství půdní bioty. Oba procesy, jak amonifikace, tak nitrifikace, jsou závislé na mnoha faktorech, jako třeba obsah O_2 , pH, vlhkost půdy apod. Především nitrifikace je proces náročný na energetické vstupy a citlivý na vnější podmínky. V případě, že je půda jakýmkoliv způsobem stresována, nitrifikace neprobíhá (Maier et al., 2000).

Měření mineralizace dusíku probíhá na začátku inkubace a posléze po 30 dnech jako vyprodukovaná suma NH_4^+ , NO_3^- a NO_2^- . Měření probíhá spektrofotometricky nebo iontově selektivní metodou (Maier et al., 2000).

2.9.4.1 Amonifikace

Deaminace je vázána na vitální buňky s výjimkou enzymu ureázy, kdy se dusík vázaný v organických sloučeninách přeměňuje na NH_4^+ . Za nepřístupu vzduchu nedochází k oxidačním procesům, tím pádem nedochází k přeměně dusitanů na dusičnany, a v půdě se kumulují amonné ionty. Rozdíl uvolněných amonných iontů na začátku a na konci inkubační doby (7 dní) se uvádí jako amonifikační aktivita mikrobiálních společenstev. Když ale přidáme substrát ve formě arginitu nebo peptonu, mikroorganismy budou více vyživovány organickým dusíkem a přírůstek $\text{NH}_4^+\text{-N}$ v ošetřených vzorcích oproti původním měříme jako potenciální amonifikaci. Stanovení této aktivity se provádí spektrofotometricky (Maier et al., 2000).

2.9.4.2 Potenciální nitrifikace (PAO)

Uvolněný NH_4^+ je postupně oxidován na NO_2^- a NO_3^- . V první fázi nitrifikace se aktivita nitrifikačních enzymů stanovuje metodou zvanou krátkodobá potenciální nitrifikace (SNA). Půdní vzorky jsou po přidání amonného substrátu inkubovány v půdní suspenzi. V odebíraných vzorcích se stanovuje množství NO_2^- spektrofotometricky. Předpokládá se lineární růst NO_2^- v čase (ISO/DIS 15685, 2001).

2.9.5 Dehydrogenázová aktivita

Aktivita enzymů je zajištěna jak prvořadě enzymy, které jsou obsaženy v buňkách. Důležitá je opatrnost při odběru vzorků, neboť enzymy snadno podléhají změnám. U mikroorganismů jsou nejvíce sledovány enzymy dehydrogenázy, B-galaktosidázy a fosfatázy (Maier et al., 2000). Dehydrogenázy jsou enzymy, na které se nevztahuje extracelulární aktivita a které se vyskytují pouze v živých buňkách. Rozlišujeme dva typy dehydrogenáz, které se mezi sebou liší koenzymem. V prvním typu je koenzymem nikotinamid, druhý typ obsahuje složku flavin.

Pro zhodnocení bakteriální enzymové aktivity je hojně využívaná methylová modř nebo tetrazoliové soli. Nevýhodou methylenové modři je kromě toho, že podléhá procesu oxidace na vzdušném kyslíku, i míra toxicity pro bakterie. Proto je při stanovení dehydrogenázové aktivity nejvýhodnějším akceptorem vodíku právě sloučenina tetrazolia. Ta se během dehydrogenázové aktivity redukuje na červený formazan. Zbarvené akceptory se stanovují spektrofotometricky (Maier et al., 2000).

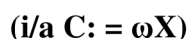
2.9.6 Metoda BIOLOG

Základem metody BIOLOG pro určování rozličnosti půdní bioty je schopnost půdních mikroorganismů metabolizovat odlišné uhlíkaté skelety. Pro monitoring se používá EcoPlate destička, která obsahuje 31 různých uhlíkatých substrátů. Půdní vzorky se nadávkuje do jamek mikrodestičky, které musí být ve správném množství. Ty druhy půdních mikroorganismů, které jsou schopny metabolizovat daný uhlíkatý substrát, začnou respirovat a přidané barvivo TTC se zbarví na trifenylformazan. Po dokončení nadávkování všech jamek se provede fyziologický profil společenstev metodou CLPP (tj. soubor proteolytických enzymů). Respirační vývoj se pak měří jako nárůst absorbance. Měření probíhá ve zvolených časových intervalech (nejčastěji po 24 hodinách, 4 - 5 dnů). Výsledkem bývá sigmoidní křivka (nárůst absorbance v čase) a zhodnocením všech uhlíkatých substrátů získáme metabolickou mikrobiální aktivitu (Maier et al., 2000).

2.9.7 Analýza lipidových profilů (PLFA)

Biodiverzita je častým znakem kvality života v půdě. Není však jednoduché kvantifikovat a určit jednotlivé půdní druhy. Proto se používá specifických lipidů, jež jsou součástí živých organismů a díky tomu mohou být rozlišovány jednotlivé půdní druhy. Druhové a poměrové složení PLFA může být tak specifické, že dokážeme zhodnotit až jednotlivé taxonomické druhy a fyziologický stav půdní bioty (Maier et al., 2000).

Základní složkou jednoduchých i složených lipidů jsou mastné kyseliny, které se v bakteriální buňce vyskytují ve formě triacylglycerolů a fosfolipidů. Pro analýzu mikrobiálních společenstev pomocí lipidových profilů jsou důležitější fosfolipidy, jelikož se nacházejí jen ve vitálních buňkách a po smrti buňky jsou degradovány ve velmi krátkém intervalu. Mastné kyseliny jsou významné svojí amfipatií (hydrofobní a hydrofilní částí), přičemž se každá z těchto částí orientuje opačným směrem při výstavbě membrán (polární část směrem k vnějšímu prostředí a nepolární část směrem k vnitřnímu prostředí) (Maier et al., 2000). Při PLFA analýze se používá identifikace mastných kyselin pomocí kódu:



kde i/a značí buď iso nebo anteiso methylové větvení, C je počet uhlíků, = značí počet dvojných vazeb, ωX značí pozici poslední dvojně vazby. Analýza PLFA slouží jako celkový fingerprint mikrobiálního společenstva. Rozdíly v PLFA profilech jsou způsobeny odlišnými půdními typy nebo environmentálními fyzikálními parametry. Další změny mohou nastat při fyziologickém

stresu půdní bioty, a to především při hladovění, při změně pH nebo obsahu polutantů (Pelz et al., 2001).

2.9.8 Analýza pomocí nukleových kyselin

Analýza půdní biodiverzity a vlastností půdních mikroorganismů byla dříve nesnadná kvůli zastaralým a nedokonalým metodám (kultivační, biochemické, imunologické). Dnes se díky rozvoji molekulárně biologických technik upouští od kultivačních technik, které vypovídají o skutečné mikrobiální aktivitě velmi málo, a využívá se nukleových kyselin (Uhlík et al., 2007). Navíc je jen velmi málo kultivovatelných mikroorganismů (Marzorati et al., 2008). Pro monitoring mikrobiální diverzity se dnes používá především gen 16S rDNA (je rozšířen, homologní a obsahuje konzervativní úseky k taxonomickému zařazení a variabilní úseky k fylogenetickému srovnávání). Pro monitoring mikrobiální aktivity je třeba sledovat funkční geny zasazené v různých místech DNA (Malik et al., 2007).

2.9.8.1 Izolace DNA

Základem úspěšné analýzy je získání značného množství čisté DNA. S každým dalším krokem čištění DNA výtěžek klesá. Avšak dnes již citlivé metody, jako je PCR nebo hybridizační metody, nepotřebují velké množství DNA. Specifika izolace genomické DNA spočívají především ve značné molekulové hmotnosti, délce vláken a křehkosti izolované molekuly. Pokud vzniknou na vláknech zlomy, jsou lokalizovány náhodně. Při izolaci DNA se používá dezintegrace materiálu: mražení a tání (tzv. bead-beating), nebo se také využívá enzymatického štěpení. Následný krok rozpustí buněčné membrány a denaturuje bílkoviny pomocí detergentu (např. sarcosyl). Poté se rozpustí bílkoviny proteinázou K.

Pro ochranu DNA se používá lyzační pufr EDTA (tj. pufr používaný pro skladování DNáz a znemožňuje vedlejší reakce), který funguje jako kofaktor významných deoxyribonukleáz (DNáz). Nakonec se DNA extrahuje buď fenolovou metodou, nebo pomocí NaCl. Koncentrace extrahované DNA se kvantifikuje ethanolem nebo isopropanolem (Hang et al., 2004). Celková extrahovaná DNA daného vzorku nepředstavuje v rámci reprezentace genomů mikrobiálních společenstev vyvážený výsledek, neboť málo rozšířené druhy mohou kvantitativně přestínit několik hojných a rozšířených druhů mikroorganismů. Tato skutečnost způsobuje zdroj chyb v dalším vyhodnocování, především v PCR (Cowen et al., 2005).

2.9.8.2 Izolace RNA

Izolace RNA je oproti DNA specifická, protože je daleko méně stabilní než DNA, avšak je pravděpodobné ji izolovat metodami příbuznými jako pro izolaci DNA. Stěžejní rozdílem je opatrnost v postupu, aby nedocházelo k narušení RNA pomocí všudypřítomných ribonukleáz (RNáz), které jsou teplotně odolné a jsou soběstačné, jelikož nepotřebují pro svoji aktivitu žádné kofaktory. V půdním vzorku jsou dalšími negativními činiteli při izolaci RNA také jílové a huminové částice. Izolace RNA je rozdělena do čtyř fází:

- lýze buněk
- inaktivace nukleáz
- extrakce RNA
- purifikace vzorku

Nejvíce náchylnou částí k degradaci RNA je komplexní lýze. Tuto degradaci je možné minimalizovat, pokud se izolace RNA provede za nízkých teplot a umístěním vzorků do lyzačního pufru. Je nezbytně nutné, aby se během manipulace s izolovanou RNA zabránilo kontaminaci např. kontaktem skleněného laboratorního materiálu s plamenem, nebo ošetřením laboratorního materiálu chloroformem. Také je možné ošetřit pomůcky destilovanou vodou s přídavkem diethylpyrokarbonátu, který se nechá působit 24 hodin a poté se degraduje autoklávou (Cowen et al., 2005).

2.9.8.3 PCR (polymerase chain reaction)

Tato metoda je založena na amplifikaci (= rozmnožení) DNA in vitro. Namnožení DNA probíhá pomocí enzymu DNA - polymeráza. Díky tomuto enzymu se komplementuje vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že k druhému vláknu přidává nové nukleotidy ve směru 5' - 3'. Kromě volného nukleotidu je potřeba krátký úsek - primer, jenž je uměle syntetizován. DNA-polymeráza určuje místo navázání primeru na templát. Původně dvouvláknová DNA je rozstřížena na samostatná vlákna tzv. denaturací bílkovin. Pokud se cykly denaturací opakují, pokračuje i nasedání primerů a prodlužování DNA-polymerázou a získáme tak templáty sloužící pro další reakční cyklus. Množství templátů vzniká rychlostí 2^x , kde x je počet cyklů. Z původních dvou vláken můžeme získat dvacet cyklů až 2^{20} kopií (Markoulatos et al., 2002).

3 Cíl práce a pracovní hypotézy

Předkládaná diplomová práce je rozdělena do dvou základních částí: teoretické (literární přehled) a praktické (výzkum). Každá z těchto částí je definovaná určitým cílem. Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na pěstování leguminóz v ekologickém způsobu hospodaření, význam těchto plodin v osevních postupech, mikrobiální aktivitu zemědělských půd, metody měření mikrobiální aktivity v půdě, význam mikroskopických hub a bakterií v půdě a faktory ovlivňující mikrobiální aktivitu půd. Výzkumná část předkládané diplomové práce ověřila níže vyslovené experimentální hypotézy. Ověření hypotéz předcházely terénní odběry vzorků půdy a laboratorní experiment, ve kterém byla měřena vlhkost půdních vzorků, maximální kapilární kapacita, bazální respirace a zhodnocení kultivace půdních vzorků.

Na základě realizace obou částí předkládané diplomové práce bylo hlavním cílem celkového zhodnocení vlivu pěstování leguminóz, a to varianty hrachu polního, varianty lupiny a varianty úhuru na mikrobiální aktivitu půd v různých vegetačních obdobích (období setí, období vegetačního růstu, období před sklizní).

Cílem experimentální části práce bylo zjištění, zda-li má pěstování hrachu a lupiny v ekologickém režimu zemědělství vliv na mikrobiální aktivitu v půdě ve srovnání s mikrobiální aktivitou v půdě na pozemku pokrytém úhorem.

Pracovní hypotézy:

- H_0 = nulová hypotéza: pěstování hrachu a lupiny v ekologickém režimu zemědělství nemá významnější vliv na mikrobiální aktivitu v půdě ve srovnání s běžným pozemkem pokrytým úhorem.
- H_1 = alternativní hypotéza: pěstování hrachu v ekologickém režimu zemědělství má významný vliv na mikrobiální aktivitu v půdě ve srovnání s běžným pozemkem pokrytým úhorem, kdežto u lupiny se významnější vliv neprojevuje.
- H_2 = alternativní hypotéza: pěstování lupiny v ekologickém režimu zemědělství má významný vliv na mikrobiální aktivitu v půdě ve srovnání s běžným pozemkem pokrytým úhorem, kdežto u hrachu se významnější vliv neprojevuje.
- H_3 = alternativní hypotéza: u obou pěstovaných plodin v ekologickém režimu zemědělství se projevuje značný vliv na mikrobiální aktivitu v půdě

4 Metodika

4.1 Charakteristika odběrového místa

Experiment byl prováděn v rámci maloparcelkového pokusu založeného na zemědělském pozemku v lokalitě Zvíkov u Českých Budějovic. Pozemek je registrován v režimu ekologického zemědělství. Předplodinou na pokusné zemědělské půdě byl jetel luční (odrůda Bonus), který byl pěstován dva užitkové roky a zaorán byl na podzim 2021. K založení pokusů byla vysazena lupina bílá (odrůda Dieta s výsevkem 180 kg.ha⁻¹) a hrách setý (odrůda Avatar s výsevkem 300 kg.ha⁻¹).

Tab. 3: Charakteristika pokusné lokality

Zemědělská výrobní oblast	obilnářská
Nadmořská výška	490 m.n.m.
Půdní druh	hlinitá (střední)
Půdní typ	hnědozem luvizemní

4.2 Záznam meteorologických dat

Tab. 4: Záznamy měsíčních meteorologických dat lokality Zvíkov u Českých Budějovic

Měsíc	Teplota vzduchu (°C)			Srážky (mm)		
	Průměr	Dlouhodobý průměr	Rozdíl	Suma	Dlouhodobý průměr	Rozdíl
leden	1,4	-2,7	+4,4	20,8	26,5	-5,7
únor	3,4	-1,1	+4,5	34,3	27,1	+7,2
březen	3,2	2,4	+0,8	15,5	34,4	-18,9
duben	6,5	6,9	-0,4	47,5	48,6	-1,1
květen	14,4	11,9	+2,5	39,3	76,7	-37,4
červen	18,6	15,2	+3,4	187,8	99,2	+88,6
červenec	18,7	16,8	+1,9	76,7	84,6	-7,9
srpen	18,7	16,1	+2,6	82,1	83,3	-1,2
01-12/2022	10,6	8,2	+2,4	504,0	480,4	+23,6

4.3 Sběr dat

Od počátku zasetí hrachu a lupiny byl zahájen sběr dat. Ten zahrnoval především meteorologická data, výskyt chorob, škůdců a plevelů. Z chorob byla zpozorována v počátečních růstových fázích u obou plodin přítomnost kořenových chorob. Tyto choroby však ve svém důsledku neovlivnily celkový počet rostlin na jednotku plochy. Významnější

problém však představoval výskyt antraknózy u lupiny bílé od měsíce června u všech variant (vzorek č. 28, 41 a 57). Antraknóza byla zpozorována taktéž u variant hrachu setého od poloviny června. Zde však byla omezena pouze na několik jedinců. V období před sklizní byly rostliny lupiny a hrachu napadeny ve všech variantách černěmi. Při kontrole škůdců byl na začátku května zpozorován listopas čárkovaný, který způsobuje požerky listů. S vegetačním růstem však populace listopase klesala, takže nebylo nutné přistoupit k cílené regulaci. Co se týče zhodnocení plevelů, tak byly populace hrachu a lupiny od začátku vegetace zapleveleny pýrem plazivým, dále se zde vyskytoval oves a ježatka kuří noha. V období před sklizní bylo již pole silně zapleveleno.



Obr. 10: Monitoring plevelů během vegetace (foto: K.Perná)



Obr. 11: Monitoring plevelů během vegetace – pýr plazivý (foto: K.Perná)

4.4 Odběr, zpracování a stanovení vzorků

K odběru vzorku byly využity celkem 3 varianty – varianta, kde byl zaset hrách setý (se 3 opakováními), varianta, kde byla zasetá lupina bílá (také se 3 opakováními) a kontrolní varianta (úhor). Celkem bylo při každém odběru odebíráno 7 půdních vzorků. Půdní vzorky byly odebírány v průběhu sezóny vždy ze stejné části (o velikosti 1 m²) příslušného políčka. Prostřednictvím Kopeckého válečku byly odebrány půdní vzorky pro stanovení MKK a prostřednictvím odběrové tyče bylo odebráno z každé plošky celkem 5 vzorků (z hloubky 5 až 20 cm), z nichž byl vytvořen směsný vzorek pro stanovení půdní vlhkosti a přípravu půdních výluh.

4.4.1 Stanovení maximální kapilární vodní kapacity

Odebraný Kopeckého váleček se vzorkem se nechal nasakovat vodou z podložky přes 2x přeložený filtrační papír. Zemina se ve válečku přikryla hodinovým sklem, aby se zamezilo výparu, a nechala se sytit vodou z podložky tak dlouho, dokud se na povrchu zeminy pod hodinovým sklem neobjevil vodní film. Doba nasakování se nastavila na 24 hodin. Po této době se váleček položil na síťku vystlanou několikrát přeloženým filtračním papírem. Po 2 hodinách pustila zemina slabě kapilárně poutanou vodu a váleček se ze zeminou, sítkou a hodinovým sklem se zvažil. Po zvažení se váleček se zeminou nechal vysušit při 105 C po dobu 6 hodin. Po vysušení se váleček opět zvažil. Výpočet MKK se stanovil takto:

$$\text{MKK} = ((a - c) / 100) * 100 \text{ (obj. \%)}$$

kde a = váha vlhkého vzorku; b = váha po vysušení

4.4.2 Stanovení bazální respirace

Ze směšného vzorku se odvážilo 20 g vzorku zeminy a nechalo inkubovat v sáčku z monofilu a uzavřené nádobě. V první fázi se vzorek zeminy nechal inkubovat 48 hodin v uzavřené nádobě nad 20 ml vyvařené destilované vody (bez CO₂). V druhé fázi se sáček zavěsil do uzavřené nádoby nad 20 ml NaOH a nechal inkubovat dalších 24 hodin. Obě inkubace probíhaly za pokojových teplot. Dalším krokem byla titrace.

Titrace odměrným roztokem HCl je metoda založena na jímání CO₂ uvolněného z půdního vzorku do roztoku NaOH. Při reakci vzniká Na₂CO₃. Poté, co se odstraní vzorek a do NaOH se přidaly 4 kapky indikátoru fenolftaleinu a 2 ml roztoku BaCl₂, se titrovalo roztokem HCl do vymizení růžového zbarvení. Od každého vzorku se provedly 3 titrace.

Ještě před samotnou titrací uvolněného NaOH roztoku se musela provést standardizace HCl. Postup byl takový, že se do titrační baňky odměřilo 10 ml roztoku Na₂CO₃. Přidaly se 4 kapky methylované a titrovalo pomocí roztoku HCl. Po přechodu ze žlutého do oranžového zbarvení se titrační nádobka překryla hodinovým sklem a směs nad plamenem povařila. Po ochlazení se znovu dotitrovalo do oranžového zbarvení.

Výpočet bazální respirace RES (množství uvolněného CO₂ v ug CO₂.g⁻¹) se stanovil takto:

$$RES = \frac{2200 \cdot (100+W) \cdot f \cdot (S-V)}{N \cdot 100 \cdot 24}$$

kde N = navážka čerstvé půdy, S = spotřeba ml HCl na slepý pokus, V = spotřeba ml HCl na vzorek, W = obsah H₂O v % vztažený na hmotnost suché půdy, f = 20/V₀, kde V₀ je spotřeba ml HCl při standardizaci HCl

4.4.3 Mikrobiologická část - kvantifikace mikroorganismů

Analýza kvantifikace mikroorganismů vzorků zeminy metodou kultivace půdy na Petriho miskách probíhala ve dvou variantách, a to na neselektivním mikrobiologickém kultivačním médiu s extraktem (YEA = yeast extract agar), a na médiu s přídavkem ATB (odlišení počtu bakterií a hub). Do 1 litrových titračních baněk se odměřilo 11,5 g média YEAST EXTRACT AGAR a přidalo 500 ml destilované vody. Jedna titrační baňka obsahovala pouze destilovanou vodu s agarem, do druhé bylo přidáno ATB (v tomto případě chloramphenicol). Před aplikací do Erlenmayerovy baňky se ATB nechalo rozpustit ve 3 ml ethanolu. Hrdla titračních baněk se zakryla hliníkovou fólií a nechaly vařit v autoklávě při 100 °C po dobu 10 min. Po vychladnutí (přibližně na 45 °C) se roztok agarů rozlýval na Petriho misky. Celkem bylo připraveno 42 Petriho misek YEA a 42 Petriho misek YEA+ (s přídavkem ATB). Vzorky půdy byly připraveny tzv. ředící metodou. Sterilně se odvážílo 25 g zeminy z každého směšného vzorku do Erlenmayerovy baňky a přidalo se 225 ml destilované vody. Baňky se dali na 30 minut zhomogenizovat na třepačku při 110 otáčkách.

Po homogenizaci se připravila ředící sada 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ a 10⁻⁵ tím způsobem, že do první zkumavky se mikropipetou odměřil 1 ml zhomogenizovaného vzorku, ta se protřepala na vortexu a z ní se odměřil další 1 ml do další zkumavky atd. Po nařazení jednotlivých zkumavek se automatickou pipetou odměřil 0,1 ml ze zkumavky zředěné na 10⁻² a aplikoval na Petriho misku s YEA+ (agar s ATB) a poté další 0,1 ml ze zkumavky zředěné na 10⁻⁵ a aplikoval na Petriho misku s YEA (samotný agar). Celkem bylo pro zhodnocení stavu mikrobiálních společenstev použito 42 misek YEA a 42 misek YEA+ATB (12 misek od každého vzorku). Vzorky se v lednici nechaly inkubovat 7 dní při teplotě 25°C. Poté přišla na řadu analýza počtu kolonií na každé Petriho misce.



Obr. 12: Příprava vzorků tzv. ředící metodou (Foto: K.Perná)

4.5 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení laboratorní práce bylo provedeno pomocí programu Statistica. Stanovení vlhkosti, maximální kapilární kapacity, bazální respirace a celkový počet mikroorganismů byly vyhodnoceny pomocí základních statistických ukazatelů a na základě jednofaktorového ANOVA testu a korelačních vztahů. Analýza byla použita pro vyhodnocení závislosti mezi jednotlivými sledovanými plodinami a jednotlivými skupinami mikroorganismů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení výsledků

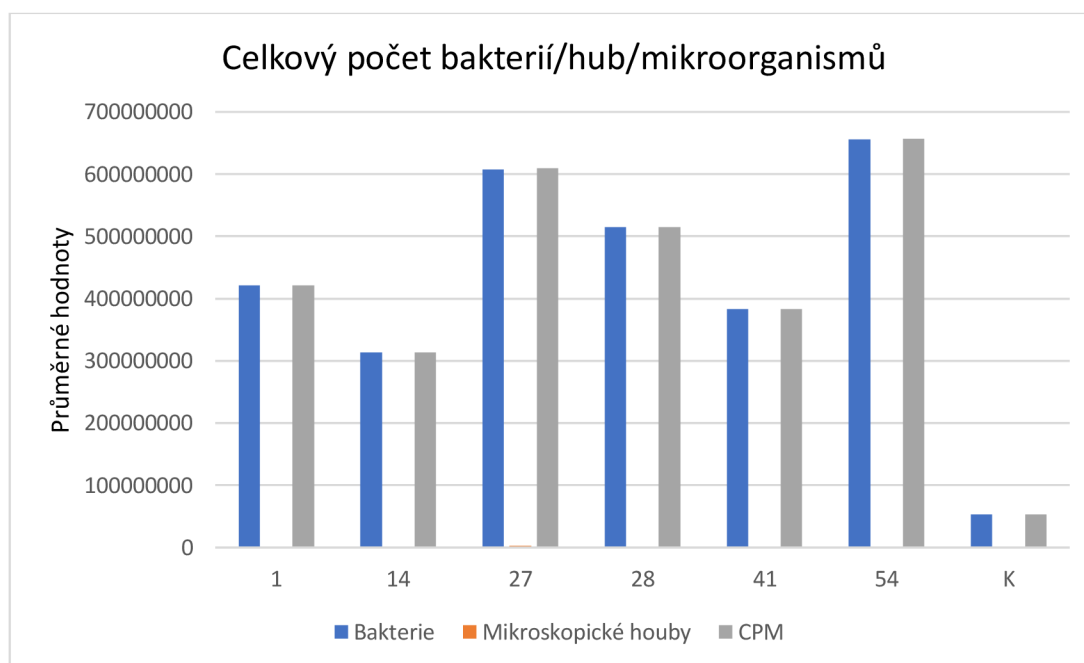
Sledované vegetační období bylo z hlediska klimatických a meteorologických podmínek nepříznivé pro pěstování leguminóz. Počátek vegetačního období procházel značně suchým obdobím. V době předset'ové přípravy a setí byl srážkový úhrn z hlediska dlouhodobých statistik značně podprůměrný. V měsíci březnu spadlo v dané lokalitě jen 15,5 mm srážek (viz. Tab. 4), což byl rozdíl 18,9 mm oproti dlouhodobému průměru. Podobný trend pokračoval i v měsíci dubnu a květnu. Naopak v měsíci červnu byly srážky vysoce nadprůměrné, kdy měsíční úhrn srážek činil 187,8 mm, což bylo o 88,6 mm více oproti dlouhodobému průměru. Měsíce červenec a srpen nebyly ve srážkových úhrnech oproti jiným rokům značně odlišné. Teplota byla během doby vegetace lehce nadprůměrná.

Nepříznivé klimatické podmínky se odrazily na výskytu chorob u obou sledovaných plodin. Díky silnému srážkovému úhrnu v měsíci červnu se v porostu lupiny i hrachu objevila antraknóza, která byla laboratorně potvrzena. U lupiny bílé způsobila značné ztráty při výnosech, kdy rostlina nebyla schopna dostatečné tvorby lusků a semen. U hrachu setého se antraknóza objevila taktéž, avšak pouze lokálně na několika jedincích a pouze u jedné varianty. Antraknóza u hrachu neměla větší vliv na kvalitu vegetace a následnou sklizeň. V době před sklizní byly listy plodin napadeny černěmi. Napadení se týkalo hrachu i lupiny ve všech variantách. Laboratorně pod mikroskopem byli označeni původci rodu *Alternaria* a *Cladosporium*. Na začátku května bylo zpozorováno napadení škůdcem listopasem čárkovaným, avšak s postupujícím růstem vegetace intenzita požerků listů klesala, takže škůdce nepředstavoval značné nebezpečí a nebylo potřeba cílené regulace. Co se týče plevelů, tak v období růstu bylo na pozemku monitorováno několik druhů plevelu: pýr plazivý, penízek rolní, oves hluchý a ježatka kuří noha (viz. Obr. 7 a 8). V době před sklizní bylo pole již silně zapleveleno.

V odebraných vzorcích byl stanoven celkový počet mikroorganismů a celkový počet mikroskopických hub kultivační metodou a bazální respirace mikroorganismů. Měřením celkového počtu mikroorganismů v půdě v období setí (viz. Tab. 5 a Obr. 13, str. 41) byl zjištěn větší poměr počtu bakterií ku počtu mikroskopických hub u všech variant hrachu (vzorek č. 1, 14 a 27) a u všech variant lupiny (vzorek č. 28, 41 a 54). Celkově vyšších hodnot mikroorganismů v půdě dosahovaly vzorky lupiny bílé.

Tab. 5: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé vzorky 1. měření.

Vzorek	Hodnota	CPM	Houby
Vzorek č.1	průměr	421666667	146667
	SD	116690474	54283
Vzorek č. 14	průměr	313333333	183333
	SD	102111051	68896
Vzorek č. 27	průměr	610000000	2766667
	SD	134759044	1318585
Vzorek č. 28	průměr	515000000	196667
	SD	173522333	47188
Vzorek č. 41	průměr	383333333	173333
	SD	109483637	52026
Vzorek č. 54	průměr	656666667	451667
	SD	67724934	141621
Vzorek K	průměr	533333333	220000
	SD	23380904	66030

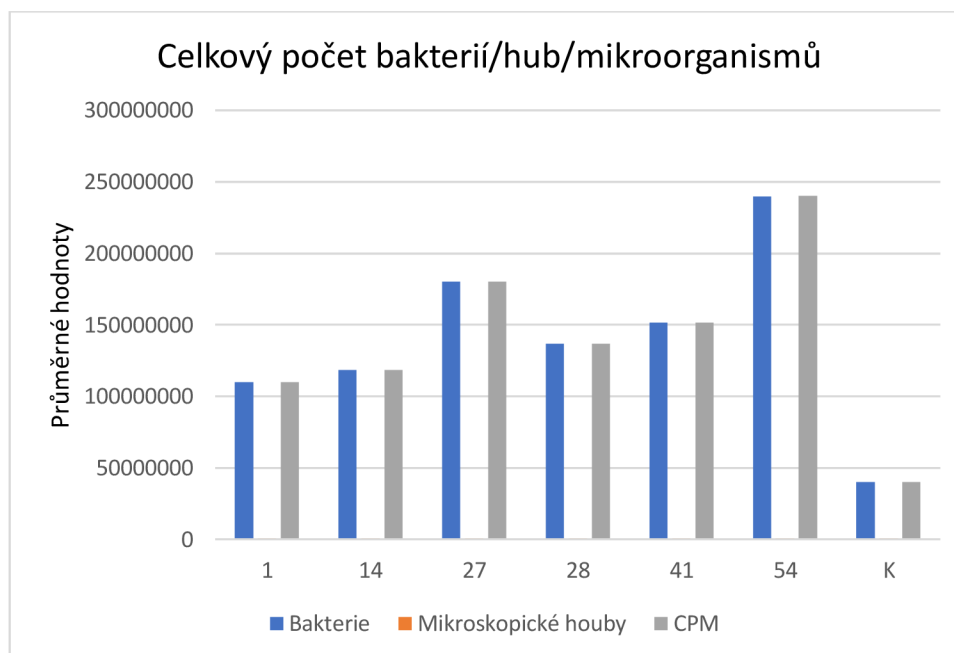


Obr. 13: Počet mikroorganismů kultivační metodou 1. měření

Výsledky, které byly naměřeny v průběhu vegetace a které zobrazuje Tab. 6 a Obr. 14, napovídají o klesajícím CPM v půdě, přičemž největší propad je zřejmý u bakterií ve všech kontrolních variantách.

Tab. 6: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé vzorky 2. měření

Vzorek	Hodnota	CPM	Houby
Vzorek č.1	průměr	110000000	55000
	SD	49396356	28810
Vzorek č. 14	průměr	118333333	28333
	SD	58452260	11690
Vzorek č. 27	průměr	180000000	38333
	SD	58309519	28577
Vzorek č. 28	průměr	136666667	176667
	SD	45460606	60222
Vzorek č. 41	průměr	151666667	135000
	SD	54191020	67750
Vzorek č. 54	průměr	240000000	323333
	SD	115412304	128789
Vzorek K	průměr	400000000	178333
	SD	28284271	101473

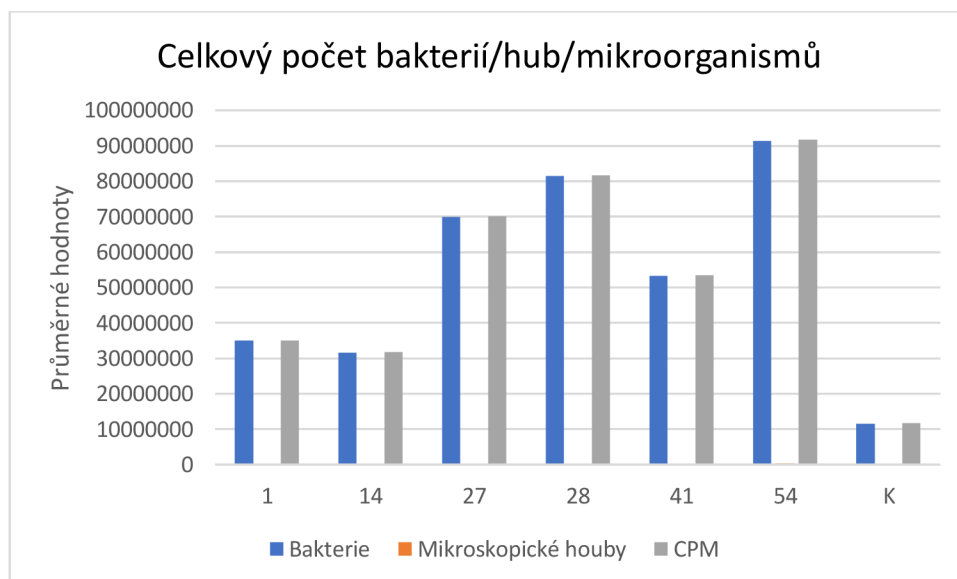


Obr. 14: Počet mikroorganismů kultivační metodou 2.měření

Tab. 7 a Obr. 15 ukazují data 3. měření, kde je jasný pokles CPM u všech variant hrachu setého a lupiny bílé. Kontrolní vzorek úhoru ukazuje na neměnný trend jak v CPM, tak na podíl bakterií a mikroskopických hub.

Tab. 7: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé vzorky 3. měření

Vzorek	Hodnota	CPM	Houby
Vzorek č.1	průměr	35000000	66667
	SD	25099800	41312
Vzorek č. 14	průměr	31666666	43333
	SD	21369761	32041
Vzorek č. 27	průměr	70000000	98333
	SD	24494897	31885
Vzorek č. 28	průměr	81666666	193333
	SD	42622372	84774
Vzorek č. 41	průměr	53333333	116666
	SD	38815804	66232
Vzorek č. 54	průměr	91666666	293333
	SD	56361925	108382
Vzorek K	průměr	11666666	176667
	SD	4082483	84774

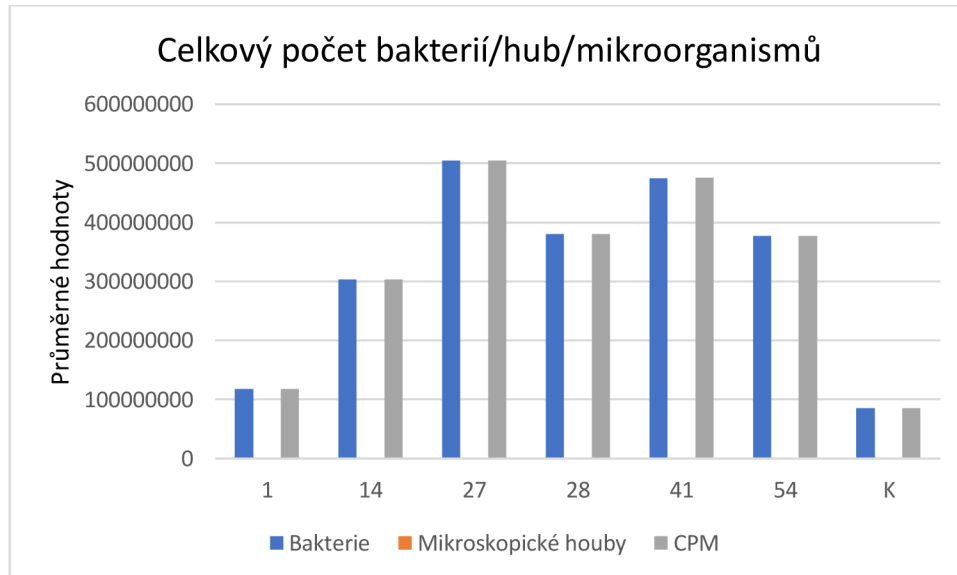


Obr. 15: Počet mikroorganismů kultivační metodou 3.měření

Tab. 8 a Obr. 16 ukazují na vzestupný trend CPM v období před setím. Oproti obsahu dat 3. měření několikanásobně stoupl počet bakterií u všech variant hrachu i lupiny, přičemž klesl podíl mikroskopických hub.

Tab. 8: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé vzorky 4. měření

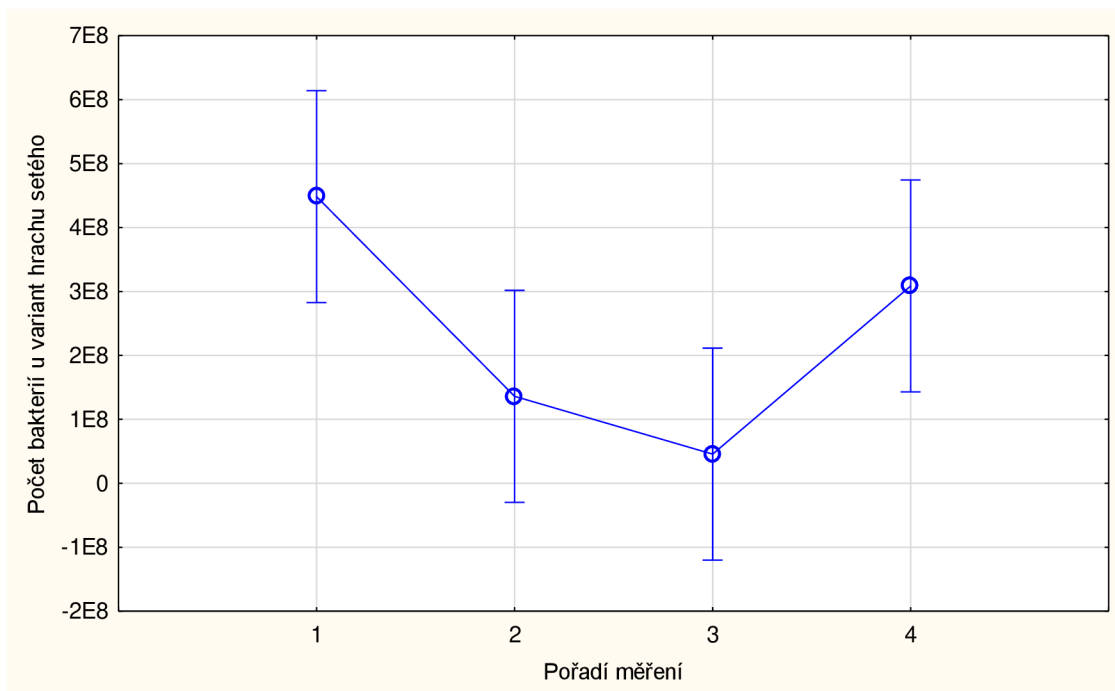
Vzorek	Hodnota	CPM	Houby
Vzorek č.1	průměr	117500000	96666
	SD	134792804	46332
Vzorek č. 14	průměr	303333333	33333
	SD	128322510	19663
Vzorek č. 27	průměr	505000000	90000
	SD	162326831	35777
Vzorek č. 28	průměr	380000000	115000
	SD	142968528	39370
Vzorek č. 41	průměr	475000000	125000
	SD	185553226	76092
Vzorek č. 54	průměr	376666666	231666
	SD	187794213	67946
Vzorek K	průměr	85000000	196666
	SD	60909769	85244



Obr. 16: Počet mikroorganismů kultivační metodou 4.měření

Na statistické zhodnocení počtu celkové mikrobiální biomasy jednotlivých měření bylo použito analýzy rozptylu (ANOVA), pro jednoduchost výsledků jednofaktorového testu.

Vyhodnocením vývoje počtu bakterií u variant hrachu setého (Obr. 17) je získána velice nízká hodnota p, přičemž alespoň jedno z měření nemá stejnou střední hodnotu na hladině významnosti $p < 0,05$. Na základě Scheffeho testu (Tab. 9) je zřejmý rozptyl středních hodnot mezi 1. a 3. měřením. Ostatní měření zůstali statisticky homogenní, včetně 1. a 4. měření (měření v období před setím a ve fázi sklizně).

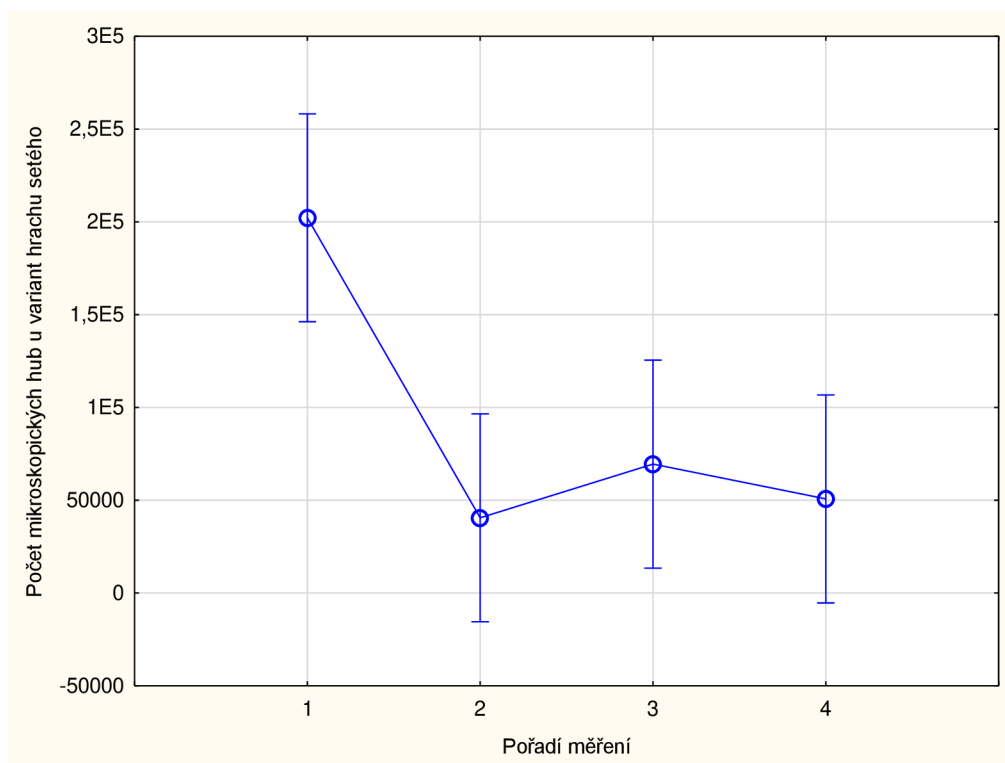


Obr. 17: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ s hodnotami F a p vývoje počtu bakterií u variant hrachu setého.

Tab. 9: Statistické zhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti $p < 0,05$). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje vyhodnocení počtu bakterií u variant hrachu setého.

Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		44,833	13,610	4,5333	33,177
1	1		0,057396	0,016305	0,672444
2	2	0,057396		0,808792	0,286513
3	3	0,016305	0,808792		0,082731
4	4	0,672444	0,286513	0,082731	

Výsledky vývoje počtu mikroskopických hub u hrachu setého (Obr. 18, Tab. 10) ukazují na celkový pokles středních hodnot u všech měření.

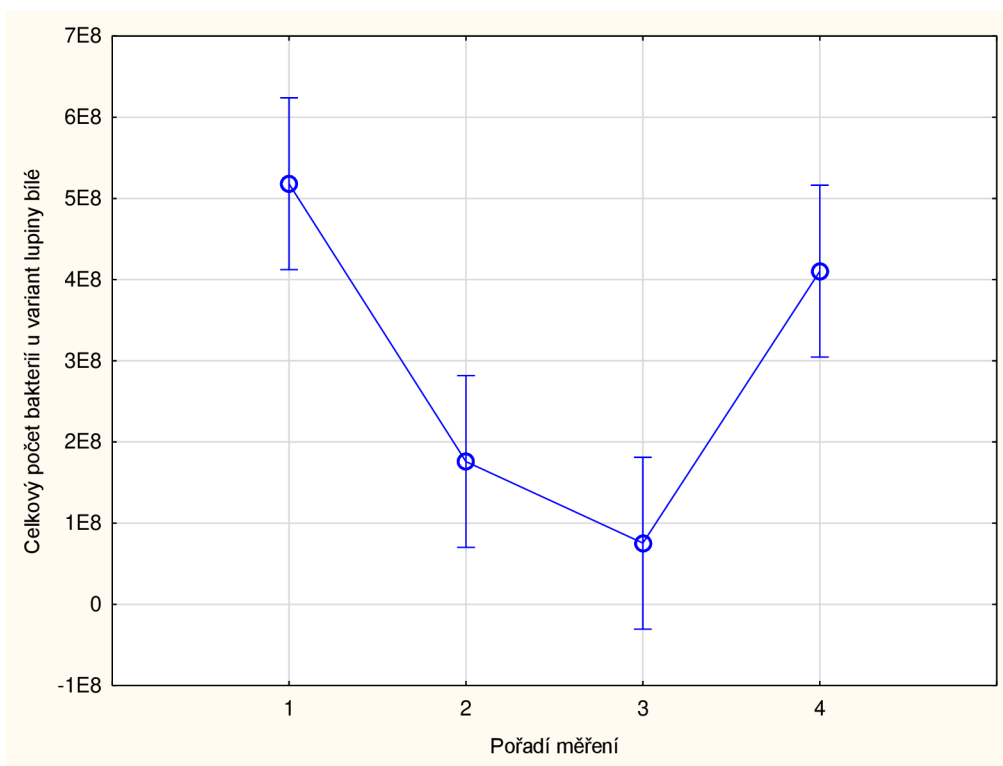


Obr. 18: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ s hodnotami F a p vývoje počtu mikroskopických hub u variant hrachu setého.

Tab. 10: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti $p < 0,05$). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje statistický výsledek počtu mikroskopických hub ve variantách hrachu setého.

Cell No.	Var1	{1} 2022E2	{2} 40555,	{3} 69444,	{4} 50702,
	1	1		0,010848	0,030940
2	2	0,010848		0,869156	0,992796
3	3	0,030940	0,869156		0,958258
4	4	0,015559	0,992796	0,958258	

Statistické vyhodnocení vývoje počtu bakterií u variant lupiny bílé (Obr. 19, Tab. 11) ukazuje na rozptyl středních hodnot mezi skupinami 1. a 4. měření a 2. a 3. měření s nízkou hodnotou $p=0,0046$. Střední hodnoty 1. a 4. měření jsou homogenní.

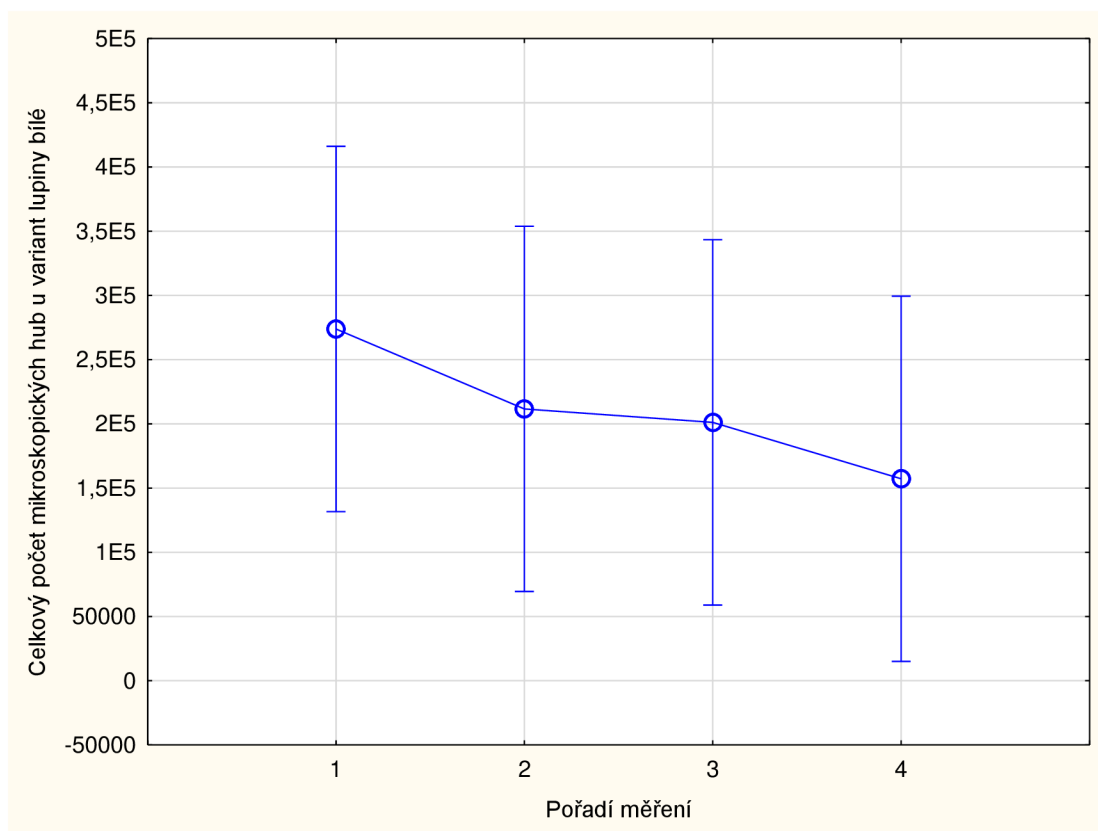


Obr. 19: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ s hodnotami F a p vývoje počtu bakterií u variant lupiny bílé.

Tab. 11: Statistické zhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti $p<0,05$). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje výsledek počtu bakterií ve variantách lupiny bílé.

Cell No.	Var5	{1}	{2}	{3}	{4}
		5181E5	1759E5	7535E4	4104E5
1	1		0,005560	0,001070	0,474851
2	2	0,005560		0,527776	0,042730
3	3	0,001070	0,527776		0,006309
4	4	0,474851	0,042730	0,006309	

Vyhodnocení vývoje počtu mikroskopických hub u variant lupiny bílé (Obr. 20, Tab. 12) udává vysokou hodnotu $p=0,6$. To udává homogenitu rozptylu středních hodnot u všech měření variant lupiny bílé.



Obr. 20: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ s hodnotami F a p vývoje počtu mikroskopických hub u variant lupiny bílé.

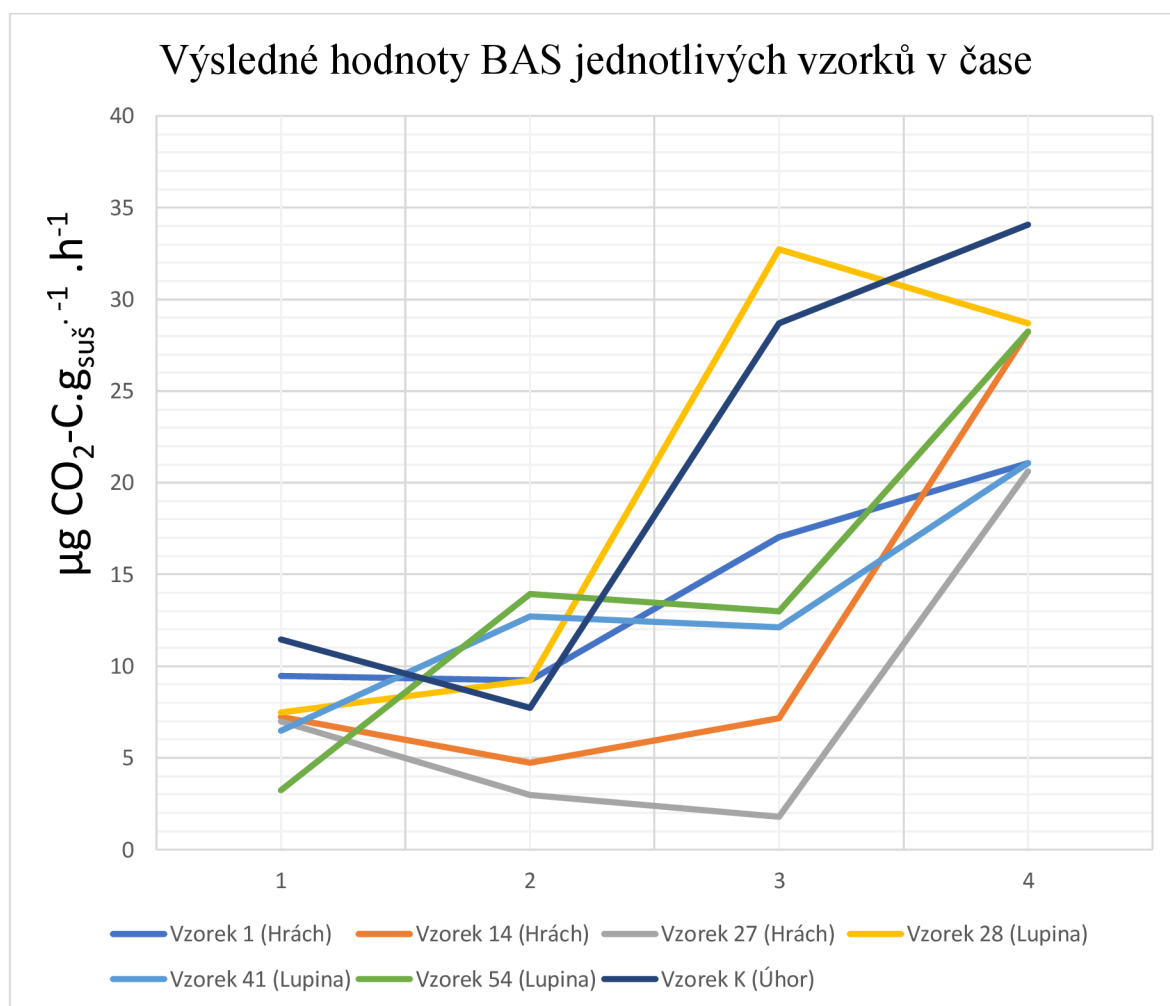
Tab. 12: Statistické zhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti $p < 0,05$). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje výsledek počtu mikroskopických hub ve variantách lupiny bílé.

Cell No.	Var5	{1}	{2}	{3}	{4}
		2739E2	2117E2	2011E2	1572E2
1	1		0,913934	0,871595	0,635018
2	2	0,913934		0,999489	0,939646
3	3	0,871595	0,999489		0,966652
4	4	0,635018	0,939646	0,966652	

V Tab. 13 jsou naměřené hodnoty uvolněného množství CO₂-C bazální respirace jednotlivých měření a vzorků. Hodnoty udávají průměry ze tří opakovaných titrací. Obr. 21 zobrazuje výsledné hodnoty jednotlivých vzorků v čase. U všech variant došlo k výraznému navýšení hodnot bazální respirace mezi obdobím setí a sklizně. Největších navýšení vyprodukované CO₂-C dosáhly mikroorganismy u variant 14 (hrách), 28 (lupina), 54 (lupina) a kontrolní varianta úhoru.

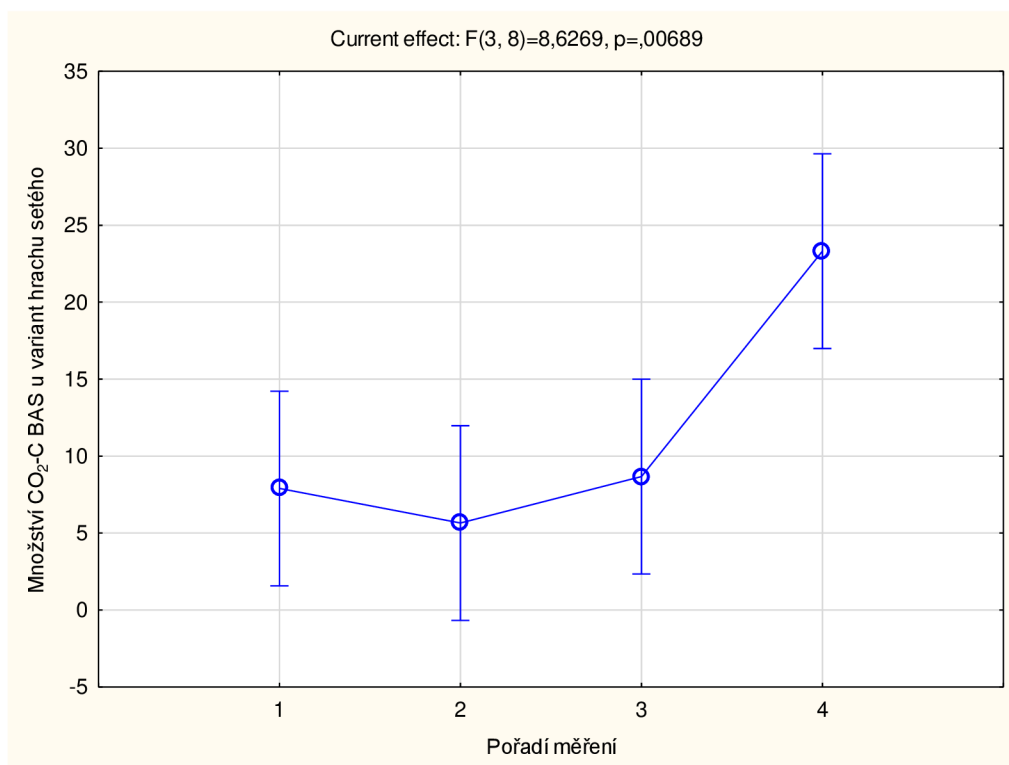
Tab. 13: Výsledné průměrné hodnoty BAS jednotlivých vzorků ($\mu\text{g CO}_2\text{-C}\cdot\text{g}_{\text{suš}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

Vzorek	1	14	27	28	41	54	K
1.měření	9,472	7,231	6,981	7,48	6,482	3,239	11,469
2.měření	9,225	4,737	2,992	9,225	12,716	13,952	7,729
3.měření	17,035	7,172	1,792	32,726	12,104	13,001	28,691
4.měření	21,071	28,243	20,621	28,691	21,07	28,243	34,071



Obr. 21: Výsledné průměrné hodnoty BAS jednotlivých vzorků v čase

Po statistickém vyhodnocení jednofaktorového testu „ANOVA“ (Obr. 22) uvolněného množství CO₂-C bazální respirace u variant hrachu setého je ukazatelem heterogenity rozptylu nízká hodnota p=0,006. Na základě Scheffeho testu (Tab. 14) je zřejmý rozptyl středních hodnot 4. měření od všech ostatních předešlých.

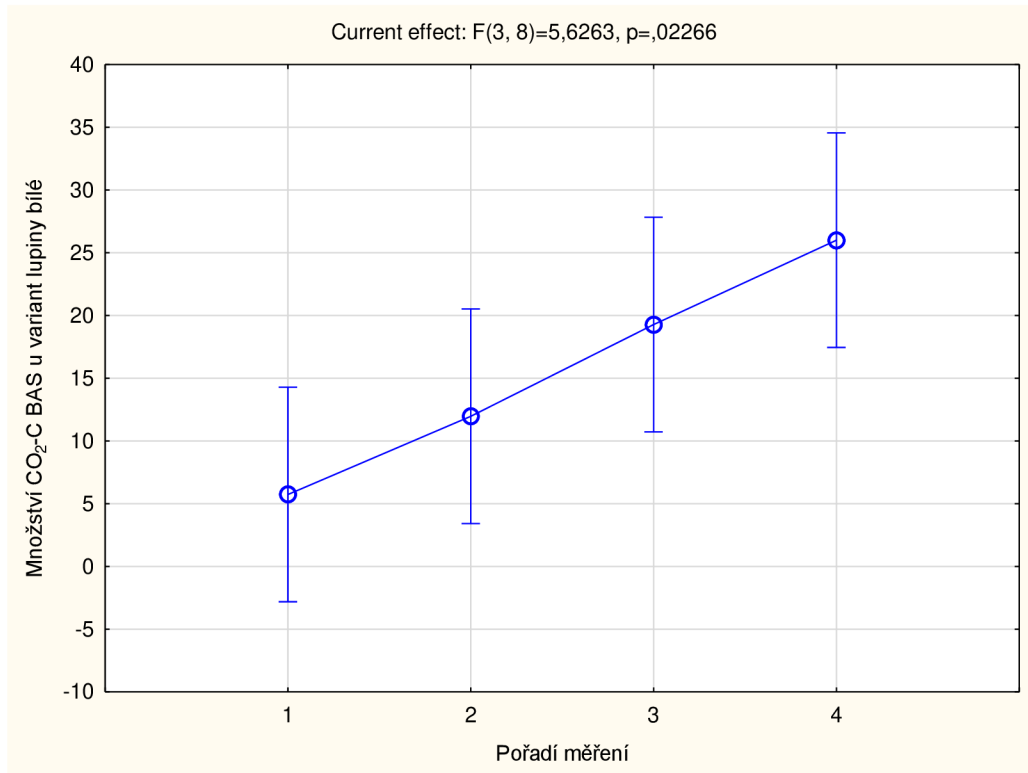


Obr. 22: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ množství CO₂-C BAS u variant hrachu setého s hodnotami F a p.

Tab. 14: Statistické zhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti p<0,05). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje výsledek vyprodukovaného množství CO₂-C BAS u variant hrachu setého.

Cell No.	Var5	{1}	{2}	{3}	{4}
		7,8947	5,6513	8,6663	23,312
1	1		0,950941	0,997753	0,026853
2	2	0,950941		0,892562	0,013039
3	3	0,997753	0,892562		0,034649
4	4	0,026853	0,013039	0,034649	

Statistické vyhodnocení bazální respirace u variant lupiny bílé (Obr. 23) ukazuje na nízkou hodnotu $p=0,02$. Na základě Scheffeho testu (Tab. 15) je zřejmý statistický nárůst středních hodnot mezi 1. a 4. měřením.

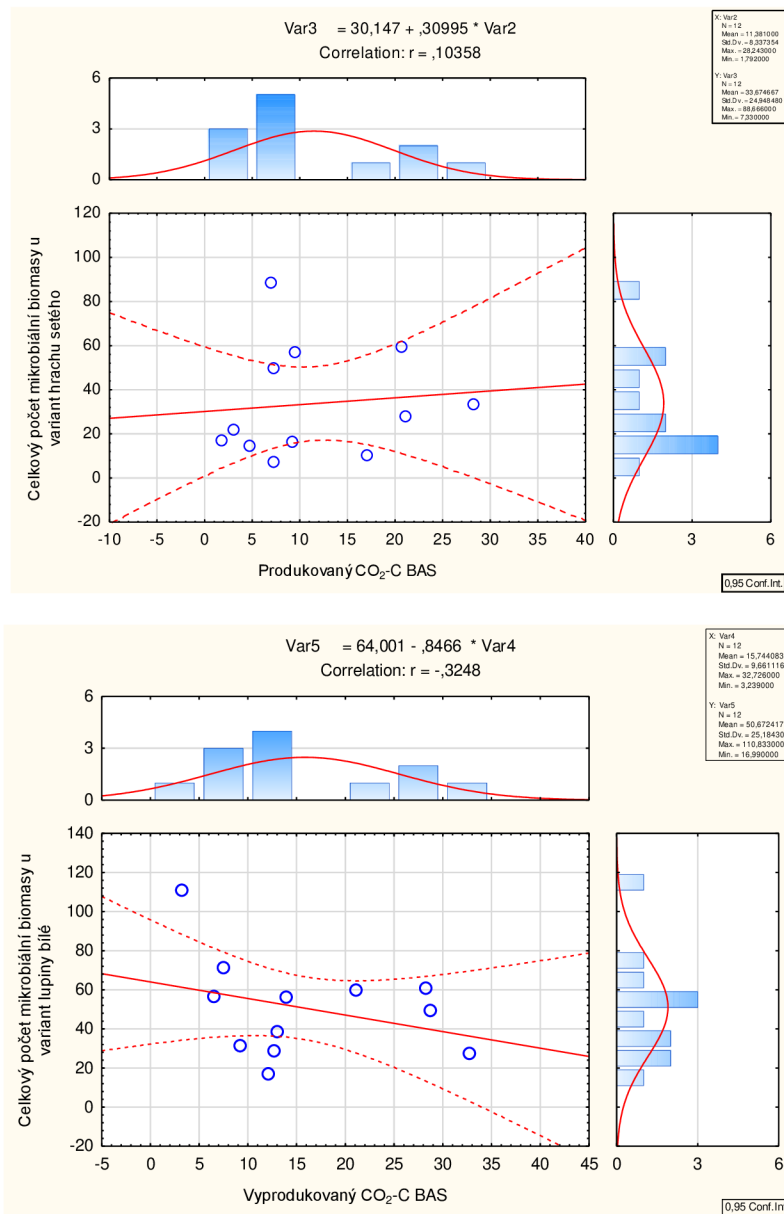


Obr. 23: Statistické vyhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ množství CO₂-C BAS u variant lupiny bílé s hodnotami F a p.

Tab. 15: Statistické zhodnocení jednofaktorové „ANOVA“ pomocí Scheffeho testu (na hladině významnosti $p<0,05$). Černé hodnoty jsou statisticky homogenní. Tabulka zobrazuje výsledek vyprodukovaného množství CO₂-C BAS u variant lupiny bílé.

Cell No.	Var8	{1}	{2}	{3}	{4}
		5,7337	11,964	19,277	26,001
1	1		0,711240	0,163053	0,030931
2	2	0,711240		0,605959	0,144623
3	3	0,163053	0,605959		0,663442
4	4	0,030931	0,144623	0,663442	

Na základě korelační analýzy vztahů mezi CPM a naměřených hodnot bazální respirace u sledovaných plodin hrachu setého a lupiny bílé byly vyhotoveny dva grafy (Obr. 24). Horní graf ukazuje na korelaci vztahů u variant hrachu setého, kde můžeme vidět kladnou hodnotu r , která ukazuje na vztah mezi CPM a vyprodukovaným $\text{CO}_2\text{-C}$. Spodní graf zobrazuje zápornou hodnotu r , tudíž není nalezena korelace vztahů u variant lupiny bílé mezi CPM a vyprodukovaným $\text{CO}_2\text{-C}$.



Obr. 24: Korelační vztahy CPM a naměřené bazální respirace u sledovaných plodin hrachu setého a lupiny bílé

5.2 Diskuze

Po laboratorním měření vývoje počtu mikrobiální biomasy se nepotvrdily hypotézy o vlivu pěstování hrachu setého a lupiny bílé na počet mikroorganismů v půdě. U všech měřených variant došlo ke statisticky neměnnému stavu mezi začátkem a koncem sledovaného období, s výjimkou vývoje počtu mikroskopických hub u sledovaných variant hrachu setého, kde dokonce došlo k poklesu.

Wobeng et al. (2020) potvrdil, že pěstování různých druhů leguminóz nemá vliv na zvyšování mikrobiální biomasy s výjimkou sóji luštěniné, avšak má značný vliv na diverzitu mikrobiálních druhů v půdě. Zvyšující se diverzitu mikrobiálních společenstev v půdě díky pěstování leguminóz potvrzuje i Kimura et al. (2022). To potvrzují i závěry práce, které nevyvodily odlišné trendy v růstu půdní mikrobiální biomasy mezi variantami pěstovaných leguminóz a kontrolním pozemkem úhoru. Zajímavý je pokles mikroskopických hub ve variantách hrachu setého. Výzkum mikroskopických hub na základě analýzy mykotoxinů v půdě ukazuje na odlišné složení a počet společenstev mikroskopických hub u různých druhů leguminóz (Kononenko & Burkin, 2019).

V rámci zhodnocení výsledků vyprodukovaného oxidu uhličitého v rámci bazální respirace půdních mikroorganismů je značný nárůst mikrobiální činnosti. Jak u variant hrachu setého, tak u lupiny bílé je zřejmý trend růstu mikrobiální činnosti v průběhu vegetace. Li et al. (2022) dokazují, že pěstování leguminóz má vliv na mikrobiální aktivitu, neboť v těchto půdách nalezneme větší síť biologické diverzity bakterií a mikroskopických hub a lepší přístupnost živin rostlinám, což odkazuje na větší mikrobiální rozklad půdní organické hmoty než na půdách, na kterých jsou pěstovány jiné kulturní plodiny. Zařazování leguminóz do osevních postupů a přerušování obilných sérií zvyšuje mikrobiální aktivitu a zvyšuje činnost důležitých enzymů pro biochemické děje v půdě, jako jsou třeba fosfatázy, β -glukosidázy nebo proteázy (Borase et al., 2020).

Výsledky laboratorních prací ukázaly, že ačkoliv se statisticky nezměnilo množství půdní mikrobiální biomasy, ať už se jedná o bakterie nebo mikroskopické houby, zvýšila se bazální respirace a tím pádem činnost mikrobiálních společenstev. Li et al. (2012) zkoumali vliv pěstování různých druhů leguminóz na mikrobiální aktivitu v půdě a popisují, že ačkoliv se zvýšila bazální respirace mikroorganismů na půdách s leguminózami, bylo zapotřebí 3 až 5 let, aby byla mikrobiální biomasa zcela obnovena. Kromě toho je důležitá kvalita půdy, protože nejenom půdní druh a půdní typ, ale i momentální stav půdy způsobuje proměnlivost mikrobiální aktivity (Bolat, 2019).

Ve variantách hrachu setého (*pisum sativum*) a lupiny bílé (*lupinus albus*) byl tedy zjištěn stejný trend odpovídající konstantnímu počtu mikrobiální biomasy, avšak došlo k navýšení vyprodukovaného oxidu uhličitého mikroorganismy. Nyawade et al. (2019) provedli výzkum, kde srovnávali mikrobiální aktivitu u pěstovaných brambor ve srovnání s mezíplodinami leguminóz. Tyto mezíplodiny podpořily uvolňování půdní organické hmoty až o 21 % ve srovnání s bramborami a tím pádem zvýšily činnost půdních mikroorganismů. Půdní mikrobiální respirace byla u leguminóz vyšší až o 34 % oproti bramborám.

6 Závěr

Laboratorní kultivací CPM nebylo zjištěno, že pěstováním leguminóz dochází k množení půdních mikroorganismů, a to ani u jedné z variant hrachu setého nebo lupiny bílé. Avšak s výsledky bazální respirace půdní bioty můžeme říct, že pěstování leguminóz aktivuje mikrobiální činnost. Na základě studií, které pokládají bazální respiraci za stěžejní znak mikrobiální aktivity, můžeme potvrdit pracovní hypotézy o vlivu pěstování hrachu setého a lupiny bílé. Můžeme také předpokládat nedokonalé měření CPM kultivačními metodami. Přesnější výsledky by byly na základě studií zajištěny výzkumem sledovaných plodin alespoň tří vegetačních období po sobě.

Seznam použité literatury:

- Aerts R. (1997): Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos*. 79, 439-449.
- Ananyeva, N. D., Castaldi, S., Stolnikova, E. V., Kudryarov, V. N., & Valentini, R. (2014): Fungi-to-bacteria ratio in soils of European Russia. *In Archives of Agronomy and Soil Science* 61(4), 427-446.
- Baldrian. P. (2009): Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environ*, 55, 370-378.
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P.; Merhautová, V., Lisá L., Valášková V. (2011): Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*, 338, 111-125.
- Berg, B. (2000): Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*. 133, 13-22.
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. (2013): Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*. 67, 192–211.
- Bloem, J., Hopkins D. W., Benedetti, A. (2006): Microbiological methods for assessing soil quality. *Wallingford: CABI Publishing*, 320 s. ISBN 978-0-0851-99-098-9.
- Bolat, I. (2019): Microbial biomass, basal respiration, and microbial indices of soil in diverse croplands in a region of northwestern Turkey. *In Environmental Monitoring and Assessment*. 191(11), 695.
- Bollmann, A. (2006): Nitrification in Soil. In J. Bloem, D. W. Hopkins, and A. Benedetti, eds. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. *CABI Publishing*. 136–141.
- Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alpehi, J., Scheu, S. (2000): Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology*. 36, 135-147.
- Borase, D. N., Murugesan, S., Nath, C. P., Hazra, K. K., Singh, S. S., Kumar, N., Singh, U., & Praharaj, C. S. (2020): Long-term impact of grain legumes and nutrient management practices on soil microbial activity and biochemical properties. *In Archives of Agronomy and Soil Science*. 67(14), 2015–2032.
- Bressan, M. et al. (2008): Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental microbiology*. 10(8), 2184-2187.
- Brezinska M., Stepniewska, Z., Stepniewski, W. (2001): Dehydrogenase and catalase activity of soil irrigated with municipal waste water. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(5), 307–311.

- Chowdury, T. R., Dick, R. P. (2012): Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*. 285-291.
- Cornejo, F.H., Verela, A., Wrightsource, J. (1994): Tropical forest litter decomposition under seasonal drought: Nutrient release, Fungi and Bacteria. *Oikos*. 70, 183-190.
- Cowen D., Meyer Q., Stafford W., Muyanga S., Cameron R., Wittwer P. (2005): Metagenomic gene discovery – past, present and future. *Trends in Biotechnology*. 23(6), 321-329.
- Das, S. K., Varma, A. (2011): Role of enzymes in maintaining soil health. *Soil enzymology*. New York: Springer. 25–42.
- Deng, Q., Zhou, G., Liu, J. et al. (2010): Responses of soil respiration to elevated carbon dioxide and nitrogen addition in young subtropical forest ecosystems in China. *Biogeosciences*. 7(1), 315–328.
- Duchene, O., Vian, J.-F., & Celette, F. (2017): Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *In Agriculture, Ecosystems & Environment*. 240, 148–161.
- Dumas-Gaudot, E. et al. (2000): Modulation of Host Defence Systems. In Y. Kapulnik and D. D. Douds, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht: Springer Netherlands, 173–200.
- Dumontet S., Cavoski I., Ricciuti P., Mondelli D., Jarrar M., Pasquale V., Crecchio C. (2017): Metabolism and genetic patterns of soil microbial communities in response to different amendments under organic farming system. *Geoderma*. 296, 79-85.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L. (2003): The priming effect of organic matter: a question of microbial competition. *Soil Biology and Biochemistry*. 25, 837-843
- Galazka, A. et al., (2016): Biodiversity of Soil Environment: Overview of Parameters and Methods in Soil Biodiversity Analyses, *IUNG*. 100.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003): Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*. 131(3), 872-877.
- Hang, M., Xiao-Yu, X., Zhen-Mei, L., He, L. (2004): Comparison of DNA extraction methods for PCR DGGE analysis of the soil bacterial community. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 13(3), 377-381.
- Hessen, D. O., Agren, G. I., Anderson, T. R., Elser, J.J., De Ruiter, P.C. (2004): Carbon sequestration in ecosystems: the role of stoichiometry. *Ecology*. 85, 1179-1192.
- Hill, G. T., Mitkowski N. A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L. R., Jurkonie, D. D., Ficke A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S. T., Nelson, E. B. (2000): Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applies Soil Ecology*. 25-28.

- Kimura, A., Uchida, Y., & Madegwa, Y. M. (2022): Legume Species Alter the Effect of Biochar Application on Microbial Diversity and Functions in the Mixed Cropping System-Based on a Pot Experiment. *In Agriculture*. 12(10), 1548.
- Kononenko, G. P., & Burkin, A. A. (2019): Secondary Metabolites of Micromycetes in Plants of the Family Fabaceae, Genera Lathyrus, Vicia. *In Biology Bulletin*. 46(3), 219-224.
- Laciaková, A. et al. (2011). Mikroskopické vláknité huby a mykotoxiny v potravinách a krmivách. *Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie*. 278. ISBN 978-80-8077-252-9.
- Li, J. H., Jiao, S. M., Gao, R. Q., & Bardgett, R. D. (2012): Differential Effects of Legume Species on the Recovery of Soil Microbial Communities, and Carbon and Nitrogen Contents, in Abandoned Fields of the Loess Plateau, China. *In Environmental Management*. 50(6). 1193-1203.
- Li, Y., Han, C., Dong, X., Sun, S., & Zhao, C. (2022): Soil microbial communities of dryland legume plantations are more complex than non-legumes. *In Science of The Total Environment*. 822. 153560.
- Maier, R. M., Pepper I. L., Gerba C. P. (2000): Environmental microbiology. *Academic Press London*. 261. 331-340.
- Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R. (2007): The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Env. International*. 34, 265-276.
- Malíř F., Ostrý V., Bárta I., Buchta V., Dvořáčková I., Paříková J., Severa J., Škarková J. (2003). Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. *Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů*. Vol. 1, 349s. ISBN 80-7013-395-3.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002): Multiplex PCR – a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 16, 47-51.
- Marquard V.T., Roscher C., Schumacher J., Buchmann N. (2009): Plant species richness and functional composition drive over yielding in a 6-year grassland experiment. *Ecology*. 90. 3290-3302.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008): How to get more out of molecular fingerprints: practical tool for microbial ecology. *Env. Microbiology*. 10 (6), 1571-1581.
- Matías, L., Castro, J., Zamora, R. (2012): Effect of simulated climate change on soil respiration in a mediterranean-type ecosystem: rainfall and habitat type are more important than temperature or the soil carbon pool. *Ecosystems*. 15(2), 299–310.
- Mikanová, O., Šimon, T., Cerhanová, D. (2010): Hodnocení kvality půdy biologickými metodami. *Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby*, 26 s. ISBN 978-80-7427-044-4.

Mukerji, K. G., Manoharachary, Ch., Singh, J. (2006): Microbial activity in the rhizosphere. *Berlin: Springer*, 350 s. ISBN 10 3-540-29182-2.

Nielsen, M. N., Winding, A. (2002): Microorganisms as indicators of soil health. *Aarhus: National Environmental Research Institute – Ministry of the Environment of Denmark*, 84 s. ISBN 87-7772-658-8.

Nyawade, S. O., Karanja, N. N., Gachene, C. K. K., Gitari, H. I., Schulte-Geldermann, E., Parker, M. L. (2019): Short-term dynamics of soil organic matter fractions and microbial activity in smallholder potato-legume intercropping systems. *In Applied Soil Ecology*. 142, 123–135.

Pelz, O., Chatzinotas, A., Zarda-Hess, A., Abraham, W. R., Zeyer, J. (2001): Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using ¹³C-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*. 38, 121-131.

Prahbu, K. H. et Bhute, A. (2012): Plant based dyes and mordant: A Review. *Journal of Natural Product and Plant Resources. Scholars Research Library*, 649-664. ISSN 2231-3184.

Rivastava, P. K. (2010): Microbial activity and nutrient status in oak and pine oriented forest soil of mid altitude Central Himalaya. *Gene Conserve*, 9, 29–39.

Scheu, S. (1990). Changes in microbial nutrient status during secondary succession and its modification by earthworms. *Oecologia*. 84, 351-358.

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J. (2014): Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34(1-3), 43-104.

Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017): Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1-13.

Stone, G. N., Raine, N. E., Matthew Prescott et Pat Wilmerr, G. (2003): Pollination ecology of acacias (Fabaceae, Mimosoideae). *Australian Systematic Botany*. 16(1), 103-118.

Sutton, M. A. (2011): The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives. *New York: Cambridge University Press*, 612 s. ISBN 11-070-0612-0.

Šimek, M., Cooper, J.E. (2006). Biogeochemical cycles of elements: an introduction to behaviour of the main mineral nutrients of plants and microorganism. *University of South Bohemia, Faculty of biological sciences*, 97.

Šimek, M., Elhotová, D., Pižl, V. (2015): Živá půda. *Praha: Akademie věd ČR*, 20 s. ISBN 978-80-200-2567-8.

Šimek, M., Virtanen, S., Křišťůfek, V. et al. (2011): Evidence of rich microbial communities in the subsoil of a boreal acid sulphate soil conducive to greenhouse gas emissions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140(1-2), 113–122.

Tran Ba L., Le Van K., Van Elsacker S., Cornelis W. (2016): Effect of cropping system on physical properties of clay soil under intensive rice cultivation. *Land Degradation and Development*. 27, 973-982.

Uhlík, O., Ječná, K., Macková, M., Leigh, M. B., Demnerová, K., Macek, T. (2007): Využití značení stabilními izotopy pro detekci mikroorganismů aktivních při degradaci xenobiotik. *Chem. Listy*. 102, 474-479.

Van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., Van Straalen, N. M. (2008): The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *In Ecology Letters*. 11(3), 296–310.

Van Elsas, J.D.; Tam, L., Jansson, J. K., Trevors, J. (2006): Microbial Interactions in Soil. *Modern Soil Microbiology CRC Press*. 177-211.

Voroney, R. P. (2007): The Soil Habitat. In Eldor, A. P. ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier. 25-49.

Wobeng, N. B. M., Banfield, C. C., Megueni, C., Mapongmetsem, P. M., & Dippold, M. A. (2020): Impact of legumes on soil microbial activity and C cycle functions in two contrasting Cameroonian agro-ecological zones. *In Pedobiologia*. 81–82.

Yan, N., Marschner, P., Cao, W. et al. (2015): Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*. 3(4), 316–323.

Záhora, J. (2012): Interakce mezi půdou a organismy. In: Vopravil, J. *Vzdělávací modu ochrana životního prostředí v oblasti půda. Náměšť nad Oslavou: ZERA*, s. 119–151. ISBN 978-80-87226-15-5.

Zhang, X., Dong, W., Dai, Y. et al. (2015): Responses of absolute and specific soil enzyme activities to long term additions of organic and mineral fertilizer. *Science of the Total Environment*. 536, 59–67.

Seznam zkratek

ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BAS	bazální respirace
CFE	fumigačně extrakční metoda
CG	plynová chromatografie
CPM	celkový počet mikroorganismů
DHA	dehydrogenázová aktivita
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
IRGA	gasometrický analyzátor
MKK	maximální kapilární kapacita
NAD	nikotinamiddinukleotid
NADP	nikotinamiddinukleotidfosfát
PCR	polymerase chain reaction
PLFA	analýza lipidových profilů
RNA	ribonukleová kyselina
SIR	substrátem indukovaná respirace
SOM	půdní organická hmota
SNA	krátkodobá potenciální nitrifikace
SR	půdní respirace
YEA	yeast extract agar
YEA+	yeast extract agar s antibiotiky