

OxiTop v měření půdní respirace

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



OxiTop v měření půdní respirace

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Matyáš Malý

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

© 2015 ČZU v Praze

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „OxiTop v měření půdní respirace“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Matyáš Malý

OxiTop v měření půdní respirace

Děkuji prof. Ing. Karlovi Voříškovi, CSc. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a neocenitelné rady, jež mi velice pomohly při zpracování této práce.

OxiTop v měření půdní respirace

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na prověření vlivu doby skladování na hodnoty respirační aktivity půdních mikroorganismů. Navazuje na bakalářskou práci „Možnosti využití přístroje OxiTop pro měření půdní respirace“ a rozšiřuje metodiku pro práci s měřicí soustavou OxiTop® OC. Na otázku vhodnosti skladování vzorků půdy po odběru není jednotný názor ani v rámci metodik sledujících stejný cíl, proto by tato práce mohla nastínit odpověď na tento rozpor.

Vliv skladování je testován na měření respirační aktivity deseti vzorků odebraných na jednom stanovišti v průběhu let 2012 a 2013. Každý z těchto vzorků byl rozdělen na dvě partie, z nichž každá prošla totožným procesem homogenizace. První z variant byla ihned po homogenizaci určena k měření a druhá varianta byla skladována po dobu tří až pěti týdnů v temnu v uzavřeném kontejneru při teplotě 4 °C a následně s ní bylo zahájeno shodné měření jako s první variantou. Každá z těchto variant byla založena ve třech opakováních a dvou podvariantách: první byla obohacena o živný roztok D-glukózy, jako podvarianta stanovující substrátem indukovanou respiraci; druhá podvarianta (rovněž tři opakování), reflektující respiraci basální, byla pouze ovlhčena demineralizovanou vodou.

Vzorky půdy 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 kontrolní varianty pšenice seté ozimé (*Triticum aestivum*).

Klíčová slova: půdní mikroorganismy, půdní respirace, OxiTop, skladování půdních vzorků

Summary

The aim of this diploma thesis is to examine how the microbial soil respiration is influenced by time of sample storage. It is a continuation and extend of my bachelor thesis aimed on start-up of new soil respirometric apparatus OxiTop® OC, it's proper set-up for practical experiments and creating methodology.

Influence of sample storage was tested by measuring of respiration activity of ten samples collected over the years 2012 and 2013 at one particular stand. Each of those samples was divided into two lots who goes thru the exactly same process of homogenization. Measurement of one lot was commenced right after the homogenization, so there is no storing time. The second one was stored for a period of three to five weeks in dark closed container at 4 °C and afterwards the measurement of this one was also started. Both of those variants is set up in three repetitions with adding the nutrient solution of D-glucose for determination of substrate induced respiration and in three repetitions with adding just demineralised water for determination of basal respiration.

Soil samples were taken out of the long-term experimental field managed by KAVR FAPPZ ČZU of the control variant with growth of *Triticum aestivum*, that has place on school experimental field.

Key words: soil microorganisms, soil respiration, OxiTop, soil sample storing

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle práce a hypotézy	10
2.1. Cíle práce.....	10
2.2. Hypotézy	10
3. . Literární rešerše	11
3.1. Diverzita mikroorganismů.....	11
3.1.1. Původ mikroorganismů	11
3.1.2. Původ uvolňování kyslíku	11
3.1.3. Původ eukaryotních mikroorganismů.....	12
3.2. Půdní mikroorganismy	12
3.2.1. Půdní mikrobiální biomasa.....	13
3.3. Faktory ovlivňující variabilitu půdních mikroorganismů	13
3.3.1. Obsah živin v půdě	13
3.3.2. Vliv hospodaření.....	14
3.3.3. Vliv plodiny.....	15
3.3.4. Vliv sezóny.....	16
3.3.5. Vliv vlhkosti	17
3.3.6. Vliv teploty	18
3.3.7. Vliv půdního pH.....	19
3.3.8. Vliv půdní struktury a textury	19
3.3.9. Vliv pesticidů	20
3.3.10. Vliv těžkých kovů.....	21
3.4. Odběr vzorků.....	22
3.4.1. Principy vzorkování půdy v mikrobiologické analýze.....	22
3.4.2. Mechanismy vzorkování.....	23
3.4.3. Doba a termín vzorkování	25
3.4.4. Množství a velikost odběru půdních vzorků	25
3.4.5. Úprava před skladováním	25
3.4.6. Uchování vzorků.....	26
3.4.7. Vliv úpravy a skladování některé vlastnosti půdního vzorku	26
3.5. Půdní respirace.....	28
3.5.1. Basální půdní respirace (BR).....	28
3.5.2. Substrátem indukovaná půdní respirace (SIR).....	29

OxiTop v měření půdní respirace

3.6.	Mikroorganismy a koloběh látek	29
3.6.1.	Uhlík	29
3.6.2.	Dusík.....	30
3.6.3.	Fosfor	31
3.6.4.	Síra.....	32
4.	Materiál a metodika.....	34
4.1.	Zařízení OxiTop OC.....	34
4.2.	Půdní vzorky	34
4.2.1.	Schéma a systém odběru	35
4.2.2.	Úprava vzorků před skladováním a měřením	35
4.2.3.	Skladování vzorků.....	36
4.3.	Ostatní použitý materiál a vybavení	36
4.4.	Metodika pokusu	36
4.4.1.	Schéma řídicí jednotky (kontroloru)	38
4.4.2.	Schéma měřicí soustavy	39
4.4.3.	Metodika měření s přístrojem OxiTop OC	40
4.4.4.	Pracovní postup přípravy	40
4.4.5.	Popis funkcí kláves na řídicí jednotce	40
4.4.6.	Nastavení řídicí jednotky.....	41
4.4.7.	Spuštění měření	42
4.4.8.	Vyvolání průběžných hodnot	42
4.4.9.	Vyvolání dat po skončení doby měření.....	43
4.4.10.	Převedení dat počítače.....	43
5.	Výsledky	45
5.1.	Odběr 5. 11. 2012.....	46
5.2.	Odběr 28. 11. 2012.....	47
5.3.	Odběr 21. 12. 2012.....	47
5.4.	Odběr 18. 4. 2013.....	48
5.5.	Odběr 7. 5. 2013.....	48
5.6.	Odběr 4. 7. 2013.....	49
5.7.	Odběr 26. 7. 2013.....	49
5.8.	Odběr 29. 8. 2013.....	50
5.9.	Odběr 24. 10. 2013.....	50
5.10.	Odběr 28. 11. 2013.....	51

OxiTop v měření půdní respirace

5.11.	Souhrnné hodnocení.....	51
6.	Diskuze	53
7.	Závěr.....	56
7.1.	Cíle práce a hypotézy	56
8.	Použitá literatura.....	57
9.	Přílohy	65
9.1.	Příloha 1. Grafy průměrných hodnot průběhu měření.....	65
9.2.	Příloha 2. Odvození výpočtu počtu potřebných vzorků půdy dle Tana (2003).....	71

1. Úvod

Společenstvo půdních mikroorganismů hraje klíčovou roli v koloběhu prvků a v zemědělství je to jeden z faktorů ovlivňujících udržitelnost půdní úrodnosti. Klíčovou roli nehraje jen celková mikrobiální biomasa jako taková, ale je třeba rozlišovat mezi jednotlivými druhy, jejich poměrným zastoupením či stádiu života, ve kterém se nacházejí. Půdní mikrobiologie je obor tak široký, že se můžeme domnívat, že jeho podstatná část ještě nebyla popsána. K poznání této oblasti vědy vede cesta přes soustavnou experimentální činnost, jejíž nezbytnou součástí je i zefektivnění kroků a sestavování metodik pro mikrobiologické analýzy.

Cílem této práce je hlouběji prozkoumat nový pohled na stanovení půdní respirace, která je klíčovou a exaktní možností jak stanovit míru mikrobiální aktivity, a to jak aktuální - basální, tak potenciální – substrátem indukované. Metoda měření půdní respirace pomocí přístroje OxiTop® OC, kterou byly pokusy provedeny, není jedinou možností, jak tuto aktivitu exaktně měřit, ale v praxi není ještě zcela obvyklou a právě proto by tato práce mohla být pro obor přínosem.

Prověření a praktické použití, bylo provedeno na zkoumání vlivu skladování na respirační aktivitu půdních vzorků. Právě pohled na otázku potřeby, vhodnosti a způsobu skladování půdních vzorků pro mikrobiální analýzy není napříč metodikami jednotný a proto bylo jako médium této diplomové práce zvoleno právě toto téma.

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle práce

Ověřit do jaké míry skladování půdních vzorků ovlivňuje intenzitu mikrobiální respirace.

Provéřit respirační aktivitu půdních vzorků přístrojem OxiTop® OC a rozšířit metodiku pro práci s ním.

2.2. Hypotézy

Intenzita půdní respirace může být ovlivněna v závislosti na době skladování vzorků.

Termín odběru má vliv na potřebu poodběrové stratifikace půdy.

3. Literární rešerše

3.1. Diverzita mikroorganismů

3.1.1. Původ mikroorganismů

Země je okolo 4,5 miliard let stará (England et al., 2007). Obecně přijímaná teorie o vzniku života na zemi říká, že první život se na zemi objevil v době, kdy se zemský povrch ochladil natolik, aby teploty umožňovaly existenci vody v kapalném stavu. Tato fáze nastala zhruba 500 milionů po vzniku Země. Prvními živými organismy byly Archea, která byla svou stavbou velice srovnatelná s dnešními prokaryotickými bakteriemi a Archei (Olson et al., 2013). Giri et al. (2005) ale tvrdí, že některé druhy mohou být evolučně ještě mnohem starší a že jejich život mohl probíhat již od počátku existence Země. Toto tvrzení podpírá tím, že i dnes můžeme najít mikroorganismy, jejichž niku tvoří vroucí voda, případně že existují bakterie (například *Deinococcus radiodurans*), které jsou schopné přežít dávky radioaktivního záření 3000x vyšší, než je letální dávka pro člověka. Navíc uvádí, že slunce v té době vyzařovalo zhruba o třetinu menší energii než dnes.

Diverzita nejen půdních mikroorganismů má mnohem delší evoluční historii, než, jakýkoli jiný druh a tak měly mnohem více času k vytvoření různých forem. Mikroorganismy byly vystaveny a přežily daleko extrémnější kataklyzmatické podmínky, než které mohly provázet vývoj vyšších rostlin a živočichů. Během posledních stovek miliónů let byly totiž podmínky pro život na Zemi, vyjma několika období zvýšené vulkanické aktivity a kolizí s ostatními vesmírnými tělesy, velmi stabilní a relativně klidné. Mikroorganismy během celé své evoluce prokazovaly schopnost velice dobře čelit obtížným podmínkám a postupně obsadily veškeré ekologické niky na Zemi. Pomocí procesů probíhajících v souvislosti s jejich životními projevy přetransformovaly na Zemi panující podmínky, z nichž některé učinily zemi obyvatelnou pro ostatní živočišné a rostlinné druhy, které se objevily mnohem později (Giri et al., 2005).

3.1.2. Původ uvolňování kyslíku

Na dobu před 2,5 až 2 miliardami let datujeme zásadní změnu zemské atmosféry. V této době se v atmosféře začíná v nezanedbatelném množství objevovat kyslík, což bylo způsobeno projevy mikrobiálních metabolických procesů. Přestože se již

v této době nacházel kyslík v mnoha sloučeninách, volně v atmosféře doposud nebyl. Nejstarší důkazy o přítomnosti volného kyslíku v atmosféře nám poskytují půdy s obsahem železa, které se v nich nachází v oxidované formě. Jak můžeme usuzovat z fosilních nálezů stromatolitů, oxidativní kyslík byl zřejmě produkován cyanobakteriemi. Cyanobakterie byly pravděpodobně hlavním původcem až desetinového zastoupení kyslíku v zemské atmosféře, což umožnilo rozvoj organismů spotřebovávajících kyslík (Wuebbles, 2013).

3.1.3. Původ eukaryotních mikroorganismů

Protože většina eukaryot je závislá na přítomnosti kyslíku je možné tvrdit, že eukaryotní mikroorganismy jsou vývojově mladší než mikroorganismy prokaryotní a to i přes to, že někteří zástupci třídy protozoa jsou schopní žít v bezkyslíkatém prostředí. Řasy se pravděpodobně objevují jako další vývojová větev cyanobakterií, neboť jejich chloroplasty jsou odvozeny právě od cyanobakterií. Stáří prvních hub je pravděpodobně v řádu několika stovek milionů let. Vzhledem k mnoha vývojovým podobnostem se má za to, že houby se vyvíjely na souši souběžně s rostlinami a do dnes uvažujeme houby jako převážně suchozemské organismy (Salysers et Witt, 2011)

3.2. Půdní mikroorganismy

Schlöter et al. (2003) definuje mikrobiální biomasu v půdě jako organismy žijící v půdě, jejichž tělesná schránka je zpravidla nedosahuje rozměrů přes 10 μm . Tato říše zahrnuje bakteriální druhy, houby kvasinky, řasy a prvoky. Každý z těchto druhů zastává v půdě specifickou roli, vzájemně se doplňují a tvoří spolu jeden funkční celek.

Na základě molekulárních studií Ovreas et Torsvik (1998) usuzují, že 1 g půdy obsahuje miliardu kusů bakterií zastupujících více než 10.000 bakteriálních druhů. Vzhledem k tokům energie a přenosu živin v půdních ekosystémech je z mikrobiologického hlediska největší pozornost upřena na houby a bakterie (Burke et al., 2012).

Schlöter et al. (2003) ještě zdůrazňují fakt, že půdní mikrobiální biomasa má složky metabolicky aktivních a metabolicky neaktivních organismů a upozorňuje, že

v mnoha metodikách stanovení mikrobiální biomasy, zejména nepřímých biochemických, není tato skutečnost reflektována a výsledky měření tak mohou být v některých případech zavádějící.

3.2.1. Půdní mikrobiální biomasa

Půdní mikrobiální biomasa jako živá součást půdní organické hmoty tvoří necelých 5% z celkového množství půdní organické hmoty. V poměru k rostlinám však zaujímá velice významnou pozici, neboť v rámci ekosystémů slouží jako zdroj a zásobárna okamžitě přístupných živin a účastní se jejich přeměny. Kromě toho jsou půdní mikroorganismy schopny mineralizace pesticidů, či jiných xenobiotických i přirozených polutantů (Chihching et al., 2008). Další druhy mikroorganismů žijí s rostlinami v mykorhizickém vztahu a působí jako biologická ochrana proti rostlinným patogenům, mají půdotvorný charakter a podílejí se tvorbě půdních agregátů (Haeryong et al., 2008).

Celé spektrum mikroorganismů v půdě má schopnost degradovat organický materiál. Celkové projevy jejich metabolických procesů podávají informace o homogenitě půdní populace jako celku, ale neinformují o jednotlivých populacích. Stanovení celkového množství mikrobiální biomasy tak nereflkuje rozdíly mezi metabolicky aktivní, neaktivní a odumřelou složkou mikrobiální biomasy. Zároveň je důležité brát v potaz celkové počty jednotlivých organismů s ohledem na jejich velikost a rychlost metabolismu, neboť jedna bakterie přispěje k celkovému metabolismu půdy naprosto jiným způsobem, než jedno tělo půdní houby. Z těchto údajů je pak vhodné vycházet při stanovování celkové aktivity půdy a při zpracování výsledků (Silvana et al., 2004).

3.3. Faktory ovlivňující variabilitu půdních mikroorganismů

Časová a prostorová variabilita mikrobiálních společenstev a jejich parametrů je způsobována nejrůznějšími podněty a procesy probíhajícími v daném prostředí.

3.3.1. Obsah živin v půdě

Obsah živin v půdě je limitujícím faktorem produktivity terestriálních systémů a mikrobiální biomasa tak zásadně koreluje s podílem organické hmoty v půdě. Zvýšením přísunu hydrolyzovatelného uhlíku dosáhneme u většiny půd rapidního

růstu mikrobiální aktivity a následně i mikrobiální biomasy. Pokud dojde ke zvýšení přísunu obtížněji mineralizovatelných forem uhlíku, například ve formě ligninu, je mikrobiální reakce pomalejší a obtížnější. Recipročně je tento proces možné sledovat při zvýšeném odběru uhlíku během růstu rostlin, nebo při dlouhodobém zamezení jeho přísunu (Kramer et Gleixner, 2006) Obdobný proces může nastat i při dlouhodobějším skladování půdních vzorků, kdy dochází k vyčerpání substrátu (Forster, 1995). Wardle et Parkinson (1992) pak zkoumali změnu projevů mikrobiální biomasy v souvislosti se změnami přísunu dusíku a konstatovali, že jeho vliv je vždy odvozen od poměrného obsahu uhlíku a dusíku a dále záleží na tom, jestli a jaké množství je již imobilizováno mikrobiální biomasou. Právě poměr substrátového a mikrobiálního uhlíku je pak určujícím pro změnu vlivu obohacení substrátu o dusík. Na přísun minerálního dusíku reagují půdní mikroorganismy různě. Podle Starkové et al. (2008) jsou studie zaměřené na tuto problematiku ve značném rozporu. Většina z nich poukazuje na velmi malý efekt a jsou známy i případy, kdy po dodání minerálního dusíku došlo k úbytku mikrobiální biomasy.

Množství mikrobiální biomasy zřejmě nekoreluje s obsahem půdního minerálního dusíku. Lze tedy předpokládat, že prostorové a časové kolísání jeho obsahu nepatří k podstatně limitujícím faktorům, jež by měly vliv na regulaci velikosti populace a aktivitu mikrobiální biomasy. Pokud dojde současně k obohacení substrátu o uhlík a dusík organickým hnojením, dojde ke stimulaci mikrobiální biomasy a tedy k pozitivnímu přírůstku mikrobiální biomasy (Stark et al., 2008).

Kromě změn v obsahu uhlíku a dusíku, mají na mikrobiální společenstva vliv i ostatní živiny obsažené v minerálních hnojivech. Pro jednotlivá komerční průmyslová hnojiva není takovýto vliv stanovován. Vliv jednotlivých prvků je obtížně generalizovatelný, neboť záleží na konkrétních podmínkách daného stanoviště, zastoupení jednotlivých živin, výchozí struktuře mikrobiálního společenstva i vzájemných poměrech jednotlivých živin (Denef, 2003).

3.3.2. Vliv hospodaření

Zajímavým fenoménem je vliv změny systému hospodaření na strukturu půdního mikrobiálního společenstva. Ovreas et Torsvik (1998) ve své studii sledovali vliv hospodaření se systémem použití minerálních hnojiv a vliv hospodaření za použití humusotvorných organických hnojiv na mikrobiální diverzitu a strukturu půdního

společenstva v rámci jednoho pozemku. Na obou pozemcích byly statisticky neprůkazné rozdíly v celkovém množství mikrobiální biomasy, ale na půdách hnojených organicky byla prokázána větší rozmanitost druhů půdních mikroorganismů.

Význam organické hmoty pro nárůst počtu půdních mikroorganismů je patrný i z vertikálního rozmístění mikrobiální biomasy. Což může být patrné při experimentech zaměřených na rozdíly jejího obsahu mezi oranou zemědělskou půdou a pozemcích, na kterých je dlouhodobě aplikována minimalizační technologie. Na minimalizačně obhospodařovaných pozemcích je většina mikrobiální biomasy v povrchových horizontech, kde zůstávají posklizňové zbytky, a u oraných pozemků je mikrobiální biomasa rovnoměrně rozložena v celé hloubce kultivované části profilu. Podobná je situace s distribucí uhlíku imobilizovaného v mikrobiální biomase. Proto by měření mikrobiální biomasy mohla být vhodným indikátorem kvalitativních změn způsobených orbou (Stromberger et al., 2007). Také čerstvě zorněná nebo jiným způsobem zkultivovaná půda, jejíž vrstvy byly promíseny a provzdušněny, je vzhledem k zvýšené aeraci obvykle doprovázena nárůstem mikrobiální biomasy (Denef, 2003).

3.3.3. Vliv plodiny

V okolí kořenové soustavy se zpravidla nachází větší množství snadno dostupných forem uhlíku a dusíku. Proto je vliv rostlinného pokryvu pro mikrobiální biomasu zpravidla stimulační, což je způsobeno tokem půdního roztoku směrem ke kořenům a vlivem kořenových exudátů. Tím je zapříčiněno i zvýšené množství mikrobiální biomasy v blízkosti kořenů (Wardle et Parkinson, 1992). Množství mikrobiální biomasy je obvykle vyšší u meristematičtých částí pletiv části kořenů a naopak výrazná redukce je patrná s rostoucím stářím kořenů, kde je pozorovatelný úbytek kořenového vlášení. Fakt, že v kořenové zóně rostlin je pozorovatelný zvýšený obsah mikrobiální biomasy značí, že substráty uvolňované rhizosférou jsou pro půdní mikroorganismy snadněji využitelné. Zemědělská orná půda je proto za určitých podmínek z hlediska početnosti populace půdních mikroorganismů teoreticky výhodnějším stanovištěm, než charakterem podobné pozemky dlouhodobě neobhospodařované nebo pozemky s trvalou rostlinnou kulturou (Denef, 2003). Vývoj a změna rostlinného společenstva jsou tak spojeny s vývojem a změnami

mikrobiální biomasy, která během rychlé sukcese způsobuje silné konkurenční vztahy a limituje dostupnost základních živin pro půdní mikroorganismy, zejména pak fosforu. Sukcese mikrobiální biomasy koreluje pozitivně i negativně se sukcesí rostlin a změnami v rozvrstvení půdní organické hmoty (Schipper et al., 2001). Rozdílná rychlost růstu libovolného rostlinného materiálu, případně rychlost zapojení porostu na půdách s obdobným charakterem obvykle odpovídajícím způsobem zapříčiní i rozdíly v hladině mikrobiální biomasy a tak je ovlivněna i kvalita a množství organické hmoty vrácené zpět do půdy. Mikrobiální biomasa se zdá být početnější a tím je poměr biologicky vázaného uhlíku k celkovému množství organického uhlíku v půdě užší za principu hospodaření s rozmanitým osevním postupem oproti monokulturnímu systému, neboť se zde pravděpodobně odráží větší diverzita lokalit zásobených širším spektrem reziduálních látek (Fierer et al., 2010). Půdy, na kterých jsou intenzivně pěstovány kulturní plodiny, shodně vykazují nižší hladiny mikrobiální biomasy než co do charakteru půdy srovnatelné louky a pastviny, ale méně biomasy než srovnatelné plochy přirozené vegetace (Sarathchandra et al., 2001).

3.3.4. Vliv sezóny

Reakce půdních mikroorganismů na změny v rámci sezóny způsobuje fluktuaci mikroorganismů, jež jsou následně zodpovědné za dostupnost živin a potažmo i výživu rostlin jako takovou. Sezónnost může ovlivňovat mikrobiální biomasu přímo, vyvoláním reakce na půdní vlhkost a teplotu okolí, případně nepřímo, tím, že dochází ke změnám v produktivitě rostlin (Deneš, 2003). Smith et al. (2001) sledovali společenství půdních bakterií v porostu pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) na pokusném pozemku v Nizozemí. Z výsledků vyplývá, že až na výjimky se pozorovatelná diverzita zvyšuje směrem k létu přímo úměrně nárůstu teplot.

Reakce mikroorganismů na sezónu je vyšší v polárním a subpolárním prostředí, což je pravděpodobně způsobeno rychlým přechodem mezi zimou a podmínkami, za kterých se během letního či jarního voda vyskytuje v kapalném skupenství a nutností mikrobiálního společenstva na tuto skutečnost okamžitě reagovat, tak aby bylo maximálně využito potenciálu nastalé situace. Reakce na příchod zimního období je opět poměrně rychlá a razantní, během arktické zimy dochází k poklesu aktivity na absolutní minimum (Sistla et Schimel, 2013). V podmínkách ekosystémů mírného pásma, kde dochází k odezvám na čtyři samostatné sezónní vlivy, jsou reakce

komplikovanější a ne vždy jednoznačné. Například pokud dojde k pozitivní odezvě na zvýšení půdní vlhkosti, může zároveň nastat negativní odezva na zavodnění půdy. Veskrze pozitivní odezva co se aktivity týče, bývá na zvýšení teploty, se kterou zpravidla souvisí i zvýšení růstu kořenové hmoty. Sezónní faktory se vzájemně prolínají a dotvářejí limitující prostředí pro reakci půdních mikroorganismů. Vždy samozřejmě záleží na druhové skladbě a charakteristických půdních podmínkách. Fluktuace mikrobiální biomasy mezi jednotlivými sezónami je nejvýraznější v podmínkách teplého klimatu, přestože jsou změny v projevu jiné sezóny objektivně nejméně patrné, z čehož lze usuzovat, že právě sezónní cyklus je hlavní příčinou fluktuace, která může být extrémně prudká i za velmi málo kolísavých podmínek (Hannamaria et Sarjala, 2004).

3.3.5. Vliv vlhkosti

Množství půdní mikrobiální biomasy klesá s úbytkem půdní vlhkosti, ale při opětovném ovlhčení má značně regenerační potenciál. Doba potřebná k zdvojnásobení mikrobiální populace může být za optimálních podmínek v případě bakterií jen několik hodin. Půdní mikromycety reagují vzhledem k pomalejší reprodukci v řádu několika dnů. Důležité jsou však i ostatní limitující faktory a tak například na půdách s omezenou dostupností živin nemusí být reakce na ovlhčení pozorovatelná (Hannamaria et Sarjala, 2004). Pozitivní reakce mezi vlhkostí a mikrobiální biomasou však nemusí být obecně platné, neboť v případě zejména boreálních podmínek může současně dojít k většímu výskytu mikrovorních organismů (Huhta et al., 1998), případně může během suchého období dojít ke stimulaci růstu druhů tolerujících sucho a tyto druhy pak vytváří konkurenční tlaky na potenciální novou populaci. Butenschoen et al. (2011) uvádí, že opětovné ovlhčení vyschlé půdy může vyvolat negativní reakci mikrobiální biomasy skrze stres vyvolaný změnou osmotického tlaku, avšak zdůrazňuje nutnost determinovat původce reakce, protože změnu osmotického tlaku může vyvolat i změna salinity půdy.

Součástí mikrobiální biomasy je i spektrum druhů schopných reagovat na extrémní zavlhčení nebo naopak extrémní sucho, neboť se část takového společenstva může nacházet v dormantním stádiu a tak sucho negativně ovlivní pouze vegetativní složku populace, případně se aktivní mikrobiální složka postupným nástupem suchých podmínek přetransformuje na dormantní. Takováto rezistentnější společenstva

obvykle nacházíme v oblastech, kde dochází k častým nebo radikálním změnám hodnot půdní vlhkosti (Stolpovsky et al., 2011).

Odolnost půdních mikroorganismů vůči vysychání je také vyšší v podmínkách, kde je dostatek organického uhlíku. Suché podmínky současně negativně ovlivňují dostupnost živin a to jak pro rostliny, tak pro mikroorganismy, z čehož lze usuzovat, že mikroorganismy schopné snášet sucho mají i vyšší odolnost proti dlouhodobějšímu nedostatku potřebných živin v přijatelné formě (Hannamaria et Sarjala, 2004).

3.3.6. Vliv teploty

Teplota půdy je v úzké souvislosti s půdní vlhkostí a obdobně ovlivňuje půdní mikrobiální biomasu. Vlivem zvyšování teploty dochází i aktivnějším projevům života mikroorganismů, ale pokud teplota přesáhne mez 35°C, dochází k odumírání. Pokud dochází k odumírání mikroorganismů v teplotách nepřesahujících tuto hodnotu, nebývá příčinou odumírání vliv teploty (Pierzynski et al., 2005).

Při přechodu na teploty pod určitou hranici může v rámci mikrobiálního společenstva docházet k větší imobilizaci dusíku a dalších živin, konkrétní teplota pro konkrétní společenstvo je závislá na zastoupení jednotlivých druhů, neboť každý druh má jiné teplotní optimum (Butenschoen et al. 2011).

Lze předpokládat, že půdní mikroorganismy z chladnějších oblastí mají vyšší toleranci k nízkým teplotám než ty z prostředí teplejšího. To lze usuzovat například z faktu, že vzorky zmrzlé půdy odebrané v arktických oblastech vykazují daleko vyšší aktivitu při kultivaci v teplotách pod bodem mrazu, než vzorky zmrzlé půdy odebrané během zimní sezóny v podmínkách mírného podnebného pásu (Sistla et Schimel, 2013).

Mikroorganismy ze vzorků půdy odebíraných v extrémních podmínkách arktické tundry severní Kanady projevovaly respirační aktivitu i při zchlazení na teplotu -10°C. Cyklické zamrzání a rozmrzání půdy v jarním období může ovlivnit uvolňování uhlíku z půdní biomasy a podněcovat tak i aktivitu půdních mikroorganismů (Edwards et al., 2006).

3.3.7. Vliv půdního pH

Mikrobiální biomasa je obvykle ovlivněna hodnotami půdního pH tak, že s hodnotami směřujícími k oběma krajním hodnotám klesá její množství i diversity mikrobiálního společenstva. Tento jev koreluje i s rychlostí reakce přítomných mikroorganismů na změny v půdním prostředí, což je možné pozorovat na efektu vápnění na extrémně kyselých půdách, což pozorovali například Aciego-Pietri et Brookes (2009). Se stoupající acidifikací zemědělských půd, jež může být způsobena i pouhými rozkladnými procesy rostlinných zbytků, při němž dochází k uvolňování oxidu siřičitého, může docházet k redukci objemu mikrobiální biomasy. Avšak k výrazným změnám dochází až při poklesech půdního pH na 2 až 3. Rozdílná je i reakce na různé druhy kyselin, případně na jednu kyselinu v rozdílných podmínkách. Variabilní jsou například reakce na kyselinu dusičnou, která může mít stimulační i inhibiční charakter (Denef, 2003).

3.3.8. Vliv půdní struktury a textury

Textura je důsledek souboru vlastností půdy jako je pórovitost, soudržnost půdních agregátů, vodopropustnost, provzdušněnost, pevnost či chemická a fyzikální sorpční schopnost, které určují charakter půdy (Hillel, 1998). Jedno z možných rozdělení druhů půd je dle Šarapatky (1996) podle zastoupení zrnitostních frakcí menších než 0,01 mm:

Písčité	0-10 % částic menších než 0,01 mm (půdy lehké)
Hlinitopísčité	10–20 % částic menších než 0,01 mm (půdy lehké)
Písčitohlinité	20–30 % částic menších než 0,01 mm (půdy střední)
Hlinité	30–45 % částic menších než 0,01 mm (půdy střední)
Jílovitohlinité	45–60 % částic menších než 0,01 mm (půdy těžké)
Jílovité	60–75 % částic menších než 0,01 mm (půdy těžké)
Jíl	> 75 % částic menších než 0,01 mm (půdy těžké)

Tab. 1: Rozdělení půdy podle procenta obsahu částic menších než 0,01

Z pohledu zemědělské praxe jsou pro většinu pěstovaných plodin nejvhodnější půdy hlinité, protože zpracování není energeticky příliš náročné, mají dobré fyzikální, mechanické i biochemické vlastnosti. Půdy písčité jsou náchylné k vysychání, promývání živin i k erozi. Jílovité půdy jsou pak nepórovité, špatně propouštějí vodu i vzduch, jsou biochemicky málo aktivní a vyžadují důsledné, na mechanizaci i energii náročné zpracování (Šarapatka, 1996).

Poznání a porozumění způsobu ovlivnění mikroorganismů charakteristikami půdy je základním předpokladem pro pochopení míry vlivu na procesy, jako je amonifikace, denitrifikace, biologická fixace dusíku, koloběh dusíku a uhlíku, stabilita půdní struktury, biodegradace organických polutantů, půdotvorných procesů apod. Mikroorganismy v půdě žijí v ekosystému, který je dominantně složen z pevných částic, jejichž měrný povrch je značně velký. Koloidní frakce těchto částic projevují permanentní schopnost na svém povrchu poskytovat životní prostor půdním mikroorganismům. Neobsazený aktivní povrch půdních částic je však mnohonásobně větší než povrch, který je okupován půdními mikroorganismy a ne všechny půdní mikroorganismy žijí na povrchu takovýchto částic (Chenu et Stotzky, 2002).

Interakce mezi mikroorganismy a půdními částicemi mohou být děleny na biologické, mezi které řadíme růst a množení buněk či sekreci organických sloučenin, jako jsou enzymy a další biopolymery a abiotické zahrnující fyzikální a fyzikálně chemické interakce (Brady et Weil, 1996).

Interakce mezi půdními částicemi a mikroorganismy jsou ovlivňovány v obou směrech. Půdní částice například mají vliv na biologické projevy mikroorganismů tím, že udržují charakteristiky pórů, ve kterých mikroorganismy žijí, absorbují jejich metabolity či poskytují životní prostor mikrovorům. A naopak mikroorganismy mají schopnost modifikovat vzájemné postavení půdních částic, agregují je, degradují organické částice či napomáhají zvětrávání (Chenu et Stotzky, 2002).

3.3.9. Vliv pesticidů

Rezidua pesticidů v půdě jsou vždy zdrojem změny mikrobiální aktivity (Pino et Peñuela, 2011). Z běžně prováděných testů na měření nitrifikace a čerpání uhlíku žádné konkrétní změny nebývají patrné, dle Jacobsena et Hjelmso (2014) je to způsobeno rychlou degradací v současnosti používaných pesticidů. Jejich rezidua je pak nutné sledovat na základě obtížněji mineralizovatelných sloučenin, které byly

součástí účinných, nebo pomocných látek daného pesticidu nebo, jako to ve svém pokusu učinil například Yousaf et al. (2013), je možné pozorovat vliv určitého pesticidu pomocí změn v hodnotách respirace odebraného vzorku. Fungicidy už svojí podstatou působí na mikrobiální společenstva negativně, neboť výrazně negativně ovlivňují zastoupení půdních hub. V rámci celého společenstva mají inhibiční vliv na nitrifikaci a amonifikaci (Černošlávková, 2009).

3.3.10. Vliv těžkých kovů

Vysoké koncentrace těžkých kovů působí toxicky na rostliny ve všech fázích vývoje a současně působí i na růst mikroorganismů, na které mají poměrně výrazný vliv. Projevy takové intoxikace jsou pak patrné zejména na půdních houbách podílejících se na mykorrhize. Měření mikrobiální biomasy proto bývá často použito jako bioindikátor zamoření půdy těžkými kovy. Pokud nedojde po znečištění k důsledné dekontaminaci, tak může být snížení obsahu mikrobiální biomasy patrné ještě několik desítek let po kontaminaci. Pokud je v literatuře zmiňována toxicita kovů, má se obecně za to, že jde o antropogenní znečištění nebo redistribuci toxických kovů v terestriálním ekosystému. Zdrojem takového znečištění může být spad, déšť, či jiná kontaminovaná voda, stejně tak jako zemědělská činnost, průmysl či odpady různého původu (Gadd, 2005). Avšak ne veškerý obsah těžkých kovů v půdách je zaviněn znečištěním, protože některé matečné horniny je přirozeně obsahují (Giri et al., 2005).

Kovy jsou v půdě ve formě volných iontů, rozpuštěných komplexů, výměnných kovových iontů, jako součásti organických sloučenin, nerozpustných komplexů ve formě oxidů či hydroxidů. Toxicita pro mikroorganismy je pak určena jejich přijatelností, což může být definováno jako schopnost transformace kovů z půdní částice nebo roztoku do živého organismu. V závislosti na aktuálních podmínkách může toxicita ovlivnit téměř každou mikrobiální aktivitu a i přes to je řada mikroorganismů schopna takové podmínky přežít, některé druhy úspěšně vzkvétají a jsou schopné adaptace či tolerance toxicity a proto se takových mikroorganismů hojně využívá k detoxikačním účelům (Gadd, 2005).

3.4. Odběr vzorků

3.4.1. Principy vzorkování půdy v mikrobiologické analýze

Brady et Weil (2007) definují půdu jako nezávislý přírodní organismus s unikátní strukturní stavbou ve všech svých jednotlivých vrstvách od povrchu až k matečné hornině. Půda je produktem biochemického zvětrávání půdotvorného materiálu a její tvorba je ovlivněna následnými půdotvornými faktory: klimatem, reliéfem krajiny, matečnou horninou, rostlinami, půdními živočichy a mikroorganismy v závislosti na čase.

V Soil Survey Staff (2002) se pak mluví o takzvaném půdním těle, které si můžeme představit jako jednotku, v jejímž rámci má půda téměř shodné vlastnosti. Takové půdní tělo je pak tvořeno jednotkami nazývanými pendony, jež jsou pak v každém jednotlivém půdním těle, co se charakteru týče velice podobné. Pendon zpravidla zaujímá plochu 1-2 m² a je vertikálně ohraničen napříč všemi půdními horizonty až do úrovně matečné horniny. Jednotlivé půdní horizonty jsou pak rozlišeny na základě rozdílů v textuře, struktuře, permeabilitě či biologické aktivitě. Svrchní horizonty jsou nazývány epipendony, spodní jsou pak nazývány subpendony. Ve sféře epipendonů probíhá růst kořenů a je zde také nejvyšší podíl mikrobiální aktivity. Sféra subpendonů je tak z hlediska mikrobiologické analýzy méně významnou, avšak významně udává charakter sféry epipendonů, zejména pak ovlivňují půdní aeraci a perkolaci a tím i růst a produkci rostlin.

Při odběru vzorků je prakticky nemožné přenést do laboratorního prostředí celé půdní tělo, a proto je třeba vhodně zvolit systém odběrů, tak aby ho mohl výsledný směsný vzorek reprezentovat. Zvláště je třeba vybrat místa odběru, tak aby v odebraném vzorku byly pro dané půdní tělo typické obsahy půdní organické hmoty, minerálů, živin, či půdní vlhkosti.

Velikost směsného vzorku a počet dílčích vzorků je pak odvozen zejména na základě:

-homogenity zkoumané jednotky. Čím je homogenita nižší, tím je vyšší pravděpodobnost chybovosti v rámci pokusu.

-vzorkovací metodě. Rozdílné způsoby odběru generují rozdílné množství odebrané půdy a zároveň se v rámci jednotlivých metodik odběru odebírá různé množství

dílčích vzorků. Vzorky mohou být v závislosti na typu mechanismu odběru odebírány pomocí půdního vrtáku, sondýrky, duté jehly, či lopatky. Počet dílčích vzorků pak má vliv na reprezentativnost směsného vzorku. Z čím více, byť menších vzorků je konečný vzorek, tím pak bude reprezentativněji odpovídat pondonu ze kterého byl odebrán (Tan, 2005).

3.4.2. Mechanismy vzorkování

3.4.2.1. Mělké vzorkování

NEPORUŠENÉ VZORKY - neporušenost vzorku spočívá v jeho maximální podobnosti se stavem půdy před započítáním vzorkování. Vzorky jsou odebírány zejména pomocí odběrného válečku, případně jiného odběrného nástroje o určitém známém objemu který je opatrně zasouván do povrchové vrstvy půdy, následuje jeho podříznutí pomocí nože, a odebrání z půdního profilu. Pokud to půdní struktura dovolí a účel měření vyžaduje, vzorek se ořízne souběžně s ostřím odběrného nástroje. Neporušené půdní vzorky jsou odebírány pro určení hmotnostních a objemových poměrů pevných, kapalných a plyných složek půdy a dalších fyzikálních vlastností půdy (Hillel, 1998).

PORUŠENÉ VZORKY – Odebírání porušených půdních vzorků je nejběžnější praxí napříč obory, které pro své analýzy vyžadují půdní vzorkování. Existuje několik možností odběru, přičemž výběr nejvhodnějšího pro danou situaci vždy záleží na konkrétním účelu vzorkování půdy. Vzorky jsou odebírány pomocí půdních vrtáků, jehel, sondýrek, lopatek či rýčů. V případě použití lopatek či rýčů je vzorek vykrojen do tvaru písmene V do požadované hloubky. Následuje vyříznutí a vyzvednutí centrální části vzorku. V případě použití zařízení na principu vrtáku je pak příslušný nástroj vpraven do patřičné hloubky, čímž dojde k oddělení vzorku od půdy a po jeho vytažení je vzorek z nástroje odebrán pro další laboratorní analýzu (Carter et Gregorich, 2008).

3.4.2.2. Hlubkové vzorkování

Hlubkové vzorky jsou nejčastěji odebírány pomocí sondýrek, půdních vrtáků, lopatek, rýčů či použitím výkopových metod. Při použití metod, při kterých nástroj

prochází do potřebné hloubky přes jednotlivé půdní horizonty, se však může zvýšit možnost jejich prolnutí či kontaminace, proto se při větších požadavcích na čistotu vzorku častěji využívá metod výkopových (Tan, 2005).

3.4.2.3. Vzorkování celého půdního profilu

Vzorky odebírané přes všechny půdní horizonty napříč celým půdním profilem slouží pro zjišťování fyzikálně-chemických vlastností půdy či mineralogické analýzy, kteréžto poskytují odpovědi na otázky týkající se geneze půdy, morfologie, či klasifikace půd. V rámci chemické analýzy slouží ke zjišťování půdní úrodnosti a mikropedologickým potřebám (Tan, 2005). Unger et Kaspar (1994) zdůrazňují potřebu tohoto způsobu vzorkování při popisu penetrace rostlinných kořenů jednotlivých půdních horizontů, přičemž poukazují na rozličné chemické prostředí jednotlivých vrstev.

Při studiu půdotvorných procesů, morfologie a klasifikace jsou pak pro zjednodušení analýzy a interpretace výsledků používány srovnávací vzorky, které reprezentují hlavní kategorie půdních druhů a typů. Protože se jednotlivé vlastnosti různých typů půd mohou vzájemně lišit závisle na způsobu jejich formování, je třeba ještě rozlišovat kritéria, která půdotvorbu ovlivňují (Ponomarenko, 2013). Tan (2003) proto uvádí pět nejdůležitějších kritérií, které lze vhodně zvolenou metodou vzorkování zohlednit:

- Klimosekvence, která může reflektovat výsledky ovlivněné změnami v klimatu
- Lithosekvence, která přináší informace o vlivu změn v mateční hornině či geologických formacích
- Biosekvence, která poukazuje na efekt rozdílů pěstovaných plodin, případně rozdílném vlivu typu kultury (lesní, luční, zemědělská,...) na půdě s podobnou mateční horninou.
- Toposekvence, která poskytuje informace o vlivu změn na topografii, případně krajinný ráz.
- Chronosekvence, která sbírá informace o časovém efektu na formaci půdy.

Zároveň je třeba poukázat na fakt, že každé z těchto kritérií může ovlivnit ty další. Jako příklad Tan (2003) uvádí to, že klimatické změny mají obvykle signifikantní vliv na změny ve vegetaci.

3.4.3. Doba a termín vzorkování

Přesná vhodná doba odběru vzorků nebývá v odběrových metodikách specifikována. Obecně platí, že je lepší vzorky odebírat za podmínek pro danou dobu typických a průměrných. Za teplých slunných dnů to tak může být v dopoledních či podvečerních hodinách, kdy není teplota a sluneční aktivita na maximu. V rámci ročního cyklu v mírném podnebném pásu je nejvhodnějším obdobím pro odběry pro mikrobiologické účely doba od pozdního jara do časného podzimu. Není vhodné a někdy ani možné provádět odběry v zimním období, kdy je půda zmrzlá a mikrobiální aktivita je značně omezena, nebo během a po deštivém období, kdy je půda do velké míry nasycena vodou, čímž je omezena aktivita zejména aerobních mikroorganismů (Taok et al., 2007).

3.4.4. Množství a velikost odběru půdních vzorků

Množství odebíraných vzorků je primárně závislé na velikosti jednotlivého odběru a celkové potřebě materiálu pro konkrétní analýzu. Dále na heterogenitě půdního prostředí a požadované přesnosti měření. V neposlední řadě je množství ovlivněno velikostí zkoumaného areálu, časovou náročností zvoleného typu odběru a finanční dotací daného projektu. Pokud bude odebíráno větší množství menších vzorků, bude dosaženo větší přesnosti při odebrání stejného objemu zeminy, ale následná pracnost při zpracování v laboratoři zůstává téměř neměnná. Mezi těmito faktory je třeba nalézt rovnovážnou míru, kde větší váhu má otázka dostatečného počtu odebraných vzorků vztážená k velikosti možné chyby ve výsledku měření. Tan (2005) navrhuje nejprve stanovení míry akceptovatelné chyby a následný výpočet počtu potřebných odběrů pro náhodné, systematické a stratifikované odběrové schéma. Odvození výpočtu je v Příloze 2. této práce.

3.4.5. Úprava před skladováním

Dílčí vzorky se promísí, po odběru, nebo ještě v místě odběru, se odstraní viditelné části půdního skeletu, rostlinné zbytky a živočichové. Následně se vzorek proseje

obvykle přes 2 mm síto. Nevýhodou prosívání může být, že s hrubší částí připravíme vzorek o mikroorganismy vázané na větší fragmenty půdy (Öhlinger, 1996).

3.4.6. Uchování vzorků

Pro skladování vzorků neexistují žádná obecně platná pravidla, nejvhodnější je co možná nejvíce omezit manipulaci, zajistit stabilní aerační podmínky a co nejdříve vzorky uložit ve tmě. Podstatou veškerého zacházení se vzorky je jejich udržení ve stavu, který se charakteristikami a vlastnostmi co nejvíce podobá půdě na původním stanovišti před započítáním odběru. Tan (2005) nedoporučuje delší dobu uchovávat vzorky o původní vlhkosti, protože ve vlhké půdě neustále dochází k chemickým a biochemickým procesům, které mění charakteristiku odebraného vzorku. Pro dlouhodobější uchování se doporučuje vzorek pozvolně vysušit, tak aby došlo postupnému utlumení mikrobiálních projevů a nedošlo k narušení půdních agregátů. V případě krátkodobého skladování se doporučuje uchovávat vzorek v teplotě pod 10°C v temnu z důvodu prevence růstu řas. Pansu et al. (2001), ale tvrdí, že vysušení vzorku nevratně poškodí kontinuitu mikrobiálních pochodů. Uchování vzorků při původní vlhkosti je vhodné při stanovení vlastností, které by vysušení nenávratně změnilo nebo znemožnilo. Mezi takové patří determinace pesticidních reziduí, dusíkatých iontů či basální a substrátem indukované respirace. Pro stanovení mikrobiálních pochodů se často doporučuje započít analýzy v co nejkratší době po odběru (Wutzler et al., 2012) nebo vzorek hloubkově zmrazit (Pansu et al., 2001).

Neméně důležité je precizní označení všech vzorků a uchování označení až do vyhodnocení měření a zaznamenání všech potřebných doplňujících informací o podmínkách a místě odběru.

3.4.7. Vliv úpravy a skladování některé vlastnosti půdního vzorku

Během skladování a přípravy vzorku může docházet ke kontaminující adsorpci plynů, jako jsou oxidy síry, dusíku, či čpavek z okolí. Pokud by vzorky mohly být ve skladovém prostoru vystaveny radioaktivnímu záření a analyzovaný jev by tím mohl být ovlivněn, je třeba zvolit odpovídající ochranná opatření. Skladový prostor by měl

být dobře ventilovatelný, s nízkou relativní vlhkostí a možností nastavení potřebné teploty. Při vhodném skladování vysušených vzorků je většina parametrů pozorovatelná i po čtyřech letech (Pansu et al., 2001).

Dle Tana (2005) dochází během úpravy a skladování vzorků ke změnám, které mohou mít vliv na následně naměřené hodnoty.

VLIV NA VLHKOST PŮDNÍHO VZORKU - Skladování vysušeného vzorku musí probíhat v hermeticky uzavřeném obalu, protože takový vzorek je silně hygroskopický a nasákl by vzdušnou vlhkostí. Obdobně by mělo probíhat skladování vzorku s původní vlhkostí, neboť by mohlo docházet k odvětrání části vlhkosti, je také vhodné změřit vlhkost vzorku před skladováním a před analýzou, protože během skladování může dojít k úbytku vlhkosti výparem, což je patrné ze vzniku vodního kondenzátu na vnitřní straně skladovacích obalů. Nehledě na vlhkost skladovaného vzorku je třeba počítat s určitou mírou chybovosti.

VLIV NA PŮDNÍ pH - Vysoušení obvykle snižuje hodnotu pH. Tento jev souvisí s obsahem síry, která vlivem vyšších teplot snadněji oxiduje. Ve vlhkých vzorcích může oxid siřičitý reagovat s vodou za vzniku slabého roztoku kyseliny sírové, která bude reagovat kysele a pH tak opět bude mít klesající tendenci.

VLIV NA OBSAH PŮDNÍHO ORGANICKÉHO UHLÍKU - Na celkový obsah organického uhlíku nemá vliv pozvolné vysoušení, ale při rychlém sušení při vysokých teplotách, například v troubě, může dojít k oxidaci organické hmoty za vzniku oxidu uhličitého a zároveň k umrtvení části nebo všech mikroorganismů, čímž dojde ke změně poměru uhlíku vázaného v živých organismech k celkovému organickému uhlíku.

VLIV NA OBSAH DUSÍKU - Na celkový obsah dusíku bude mít úprava a skladování poměrně malý vliv, ale bude docházet ke změnám poměrů mezi formami, ve kterých se dusík bude vyskytovat. Vzrůstá obsah dusíku v nitrátové formě na úkor formy amonné, a to vlivem zvyšování teploty, neboť nitrifikační mikroorganismy mají obvykle pozitivní reakci na vyšší teploty, tak i v průběhu času, kdy u vlhkých vzorků kdy dochází k odparu vlhkosti, na což opět lépe reagují nitrifikační mikroorganismy. Opětovnou hydratací dojde k opačnému jevu.

3.5. Půdní respirace

Půdní respirace je životním projevem půdních mikroorganismů. Největší podíl na respiračních parametrech půdy má biomasa mikromycet a bakterií. Jejich vzájemný poměr a podíl na produkci oxidu uhličitého je jedním z faktorů hodnocení kvality půd. (Denef, 2003).

Život buněk je závislý na přísunu energie, v případě mikroorganismů na přeměně energeticky bohatých organických látek na látky jednodušší pomocí redoxních reakcí založených na přenosu elektronu od donora k akceptoru. Respirace je oxidací organických látek aerobními mikroorganismy, při které dochází k přijetí elektronu za uvolnění oxidu uhličitého a vody. Metabolické aktivity půdních mikroorganismů tak mohou být charakterizovány pomocí měření produkce CO₂, nebo O₂. V průběhu respirace prochází zdroj energie procesem glykolýzy a citrátovým cyklem až do elektronového respiračního řetězce (Nannipieri et al., 1990).

Při měření půdní respirace je podle Pella et al. (2006) třeba brát v potaz i další zdroje oxidu uhličitého, který může být během měření najímán. Mezi tyto procesy patří například uvolňování oxidu uhličitého z uhlíčanů, fermentace, respirace kořenů rostlin, které se na celkové produkci oxidu uhličitého podílí 12 - 30 %. Pokud tak chceme dospět k relevantním výsledkům, musíme celkové naměřené hodnoty poměrně snížit. Za respiraci musíme považovat i anaerobní procesy, při kterých jsou například NO₃⁻, Fe³⁺ či SO₄²⁻ využity jako akceptory elektronů a molekula kyslíku spotřebovávána jako tomu je při aerobní respiraci.

3.5.1. Basální půdní respirace (BR)

Basální 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 et al., 1996). Zdrojem energie je v tomto případě zásoba živin v půdě. Hodnoty basální respirace reflektují množství a kvalitu zdroje uhlíku. Měření basální

respirace je obvykle způsobem zkoumání vlivu polutantů na mikrobiální biomasu (Pell et al., 2006).

3.5.2. Substrátem indukovaná půdní respirace (SIR)

Substrátem indukovaná půdní respirace je reakcí mikrobiální populace na přidání živného substrátu (ISO 16072, 2001). Po přidání takového substrátu do půdy dojde k rychlému nárůstu mikrobiální populace a zvýšení respirační aktivity. Tento nárůst aktivity se nazývá „Priming Efekt“. Projevy zvýšené aktivity jsou pozorovatelné i po vyčerpání všech živin, které byly substrátem dodány. V závislosti na množství obohacené půdy a množství dodaných živin je pak pozorovatelný efekt opačný. V přírodě se podmínky pro substrátem indukovanou respiraci se přirozeně nevyskytují a množství dostupných živin dovoluje mikrobiálním společenstvům utvořit jen několik generací do roka. Nejčastěji používaným živným médiem pro měření SIR je roztok glukózy (Langer et Rinklebe, 2011).

3.6. Mikroorganismy a koloběh látek

3.6.1. Uhlík

Půda má velké množství funkcí a většina z nich je výrazně ovlivněna množstvím a kvalitou půdní organické hmoty. Tento faktor je zásadní pro diverzitu a životaschopnost půdních organismů, výživu rostlin, schopnost půdy poutat a udržet vodu, udržet si strukturu či pro protierozní působení. Tím je současně vyzdvížena důležitost půdního organického uhlíku vzhledem k jeho globálnímu cyklu (Bernoux et al., 2002).

Změny v dynamice pohybu uhlíku v půdě jsou úzce spojeny, nebo přímo řízeny mikrobiální aktivitou (Zhongkui et al., 2014).

V zásadě je půdní uhlík organického původu produktem aktivity autotrofních organismů – vyšších rostlin a autotrofních mikroorganismů. Odumřelý rostlinný materiál a zbytky těl mikroorganismů jsou zároveň hlavním zdrojem energie pro půdní mikroorganismy. Organické zbytky jsou jimi mineralizovány, rozloženy a prodýchány ve formě oxidu uhličitého nebo humifikovány (Kandele et al., 2005). Rozklad půdní organické hmoty je dynamický, postupný proces, ve kterém je čerstvý

materiál nejprve částečně rozložen, přičemž dochází k uvolňování oxidu uhličitého a dalších anorganických sloučenin. Během dalších fází dochází k rozkladu organických sloučenin, jako jsou polysacharidy a další cukry, proteiny a aminokyseliny, tuky a lignin a k tvorbě v alkalickém prostředí rozpustných huminových kyselin, v kyselém prostředí rozpustných fulvokyselin a huminů, v alkalickém prostředí nerozpustných (Allard, 2006).

3.6.1.1. Koloběh uhlíku

Cyklus koloběhu uhlíku probíhá mezi atmosférou, oceány, biosférou a geosférou v rámci všech jeho forem. V rámci tohoto mechanismu prochází uhlík několika procesy a deponiemi z nichž jednou je právě deponie mikrobiální, která tvoří zhruba 2-3 % celkového organického uhlíku. Cyklus uhlíku je jedním z hlavních biogeochemických cyklů jeho forma je primárně rozdělena na geologickou a biologickou fázi. Geologický uhlíkový cyklus probíhá v horizontu několika milionů let, oproti tomu cyklus biologický trvá několik dnů až tisíců let (Kandler et al., 2005).

Geologický cyklus zahrnuje procesy probíhající v rámci vzniku uhličitánů z uhlikatých kyselin, přes jejich horninotvornou fázi až po jejich zpětný rozklad na oxid uhličitý, který probíhá vlivem zvětrávání.

Biologický cyklus pak zahrnuje pohyb uhlíku mezi jednotlivými deponiemi skrze fotosyntézu a respiraci. Přičemž biologický cyklus je oproti geologickému co do koloběhu uhlíku více než tisícinásobný.

V rámci jednotlivých deponií koluje uhlík v množství tisíců miliard tun. Jen rostliny a mikroorganismy fixují a následně respirací uvolňují ročně okolo 10^{14} kg oxidu uhličitého (Kandeler et al., 2005).

Hlavní zásobárnou uhlíku je obecně organická hmota buněk živých organismů a produkty jejich degradace, anorganický uhlík vázaný v horninách většinou ve formě uhličitánu vápenatého a atmosférické plyny (Denef, 2003).

3.6.2. Dusík

Dusík je základním prvkem pro výživu rostlin, živočichů i mikroorganismů, neboť se jedná jeden z makrobiotických prvků, který je součástí aminokyselin, bílkovin, či ribonukleových kyselin (Rick et Stuart, 2001)

Přístupnost dusíku je klíčovým faktorem regulujícím biologickou produktivitu mnoha ekosystémů. Půdní mikroorganismy hrají významnou roli v transformačních

procesech týkajících se dusíku. Asimilace dusíku do organických forem a následně probíhající proces uvolňování anorganického dusíku probíhá za pomoci činnosti řady prokaryotních i eukaryotních mikroorganismů a představuje jádro koloběhu dusíku v přírodě. Čistě bakteriální procesy fixace molekulárního dusíku, nitrifikace a denitrifikace představují širší cyklus dusíku a v jednotlivých ekosystémech mohou ovlivnit přijatelnost různých forem dusíku. Amonifikace je proces, kterého se účastní celé spektrum bakterií, avšak další transformace dusíku jsou z bakteriálního pohledu poměrně specializované. Chemoautotrofní nitrifikace se účastní jen několik obligatorně aerobních půdních bakterií. Zatímco některé oxidují amonnou formu na formu dusitanovou - mezi takové patří bakterie z rodu *Nitrosomonas* a *Nitrococcus*, další z rodu *Nitrobacter* následně oxidují dusitanové formy na formu dusičnanovou. Některé aktinomycety a bakterie rodu *Arthrobacter* jsou také schopny heterotrofní nitrifikace, ale v celkovém objemu je jejich produkce dusičnanů zanedbatelná. Dalším, co do objemu zapojeného dusíku, důležitým procesem je symbiotická fixace vzdušného dusíku bakteriemi rodu *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* probíhající na podzemních částech převážně bobovitých rostlin (Giri et al., 2005).

Význam půdních hub na transformacích všech látek je vzhledem k jejich podílu na celkovém množství půdní mikrobiální biomasy a jejich chemoheterotrofním metabolismu poměrně zásadní. Z hlediska koloběhu dusíku v půdě je role hub důležitá pro amonifikaci organického dusíku nebo nitrifikaci probíhající na kyselých lesních půdách avšak v dalších procesech je jejich role poměrně minoritní (Tiehang, 2011).

3.6.3. Fosfor

Fosfor je považován za nejvíce limitující růstovou živinu, ale na rozdíl od dusíku je jsou hlavní zásobárnou horniny a sedimenty, kde se nachází ve formě fosforečnanů. Jedná se o základní stavební jednotku buněčné energie ATP či buněčných struktur jako jsou DNA, RNA a fosfolipidy. (Ezawa et al., 2002).

Role bakterií v cyklu fosforu není úzce specializovaná. Téměř všechny bakteriální druhy mají význam pro krátkodobou imobilizaci fosforu a mineralizaci organických forem fosforu. Rody *Pseudomonas* a *Bacillus* hrají významnější roli v rozkladu anorganického fosforu. Bakterie rozkládající sloučeniny fosforu zároveň snižují půdní pH, neboť produkují množství organických kyselin, jako jsou kyselina mravenčí, octová, propionová, mléčná, glykolová, fumarová a jantarová (Chalot et al., 2002).

Větší objemy rozkladu fosforu než bakterie zastupuje široké spektrum půdních hub. Půdní mycety žijící v mykorhizní symbióze s rostlinami se účastní zejména mineralizace organických látek, uvolňování vázaného fosforu do půdního roztoku, a transportu fosforu v půdním prostředí. Podobně jako bakterie i mycety okyselují prostředí produkcí organických kyselin, čímž zvyšují rozpustnost anorganických sloučenin fosforu. Vlákná hub mají schopnost pronikat půdou poměrně bez obtíží na velké vzdálenosti (Elsas et al., 2007). Mykorhizní houby vytvářejí bohatě rozvětvené a půdu prostupující soustavy mycelií, jež jsou vzhledem ke své velikosti schopné prorůst a obalovat půdní agregáty a částice půdní organické hmoty, čímž se zásadně zvětšuje oblast, ze které může být fosfor získáván. Lepší přijatelnost fosforu mykorhizními houbami ve srovnání například s bakteriemi nebo vyššími rostlinami způsobuje fakt, že houby jsou schopné fosfor přijímat i při poměrně nízké koncentraci v půdním roztoku. Podobně jako i další půdní mikroorganismy, jsou mykorhizní houby schopny extracelulární fosfatázy, která mineralizuje organické fosforečné sloučeniny (Pierzynsky et al., 2005).

Fosfor přijímaný mykorhizními aktivitami půdních hub může být následně využíván i jejich rostlinnými symbionty (Elsas et al., 2007).

3.6.4. Síra

Síra je důležitým prvkem pro biologické a geochemické procesy v půdě, ale pro růst organismů není limitujícím prvkem. Tvoří kolem 1 % sušiny mikrobiální biomasy, kde zastává mnoho strukturálních a enzymatických funkcí. Je součástí enzymů cystein a metionin i některých bílkovin a enzymů. Význam má i jako donor a akceptor elektronů při řadě mikrobiálních metabolických procesů. V půdě se síra nachází v celé škále forem od redukované sulfidické až po oxidovanou sulfátovou. Nejčastěji přijímanou formou je síranový aniont. Přestože je převážná většina síry v půdě vázaná v organické formě, větší dynamiku pohybu vykazuje síra anorganicky vázaná (Susana et al., 2013).

Mikrobiální transformace síry jsou úzce spjaté s uhlíkovým cyklem, během kterého se síra účastní anaerobní i aerobní respirace, při které je oxidována jako vedlejší produkt. Spektrum mikroorganismů, které se tohoto procesu účastní, je značně široké. Imobilizace síry je proces velice rychlý, opět řízený mikrobiální aktivitou. Anaerobní siřné bakterie produkují zejména sirovodík. Některých dalších procesů

OxiTop v měření půdní respirace

transformace se účastní půdní houby a aktinomycety, které působí oxidativně, patří mezi ně rody *Aspergillus*, *Penicillum* či *Microsporeum* (Giri et al., 2005).

4. Materiál a metodika

Pokusy proběhly v letech 2012-2013 v laboratoři Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Základem měření byla měřicí soustava OxiTop® OC pro měření půdní respirace, kterou byly stanovovány hodnoty respirace půdních vzorků odebraných v různých termínech agrotechnického roku 2012/2013 na školním Pokusném a Demonstračním Pozemku.

4.1. Zařízení OxiTop OC

Řada OxiTop® německé firmy WTW je určena pro měření biochemických a respiračních projevů půdních nebo vodních mikroorganismů. Základem měření pro tuto diplomovou práci byla soustava OxiTop OC Control A12 s řídicí jednotkou OxiTop OC 110 a lahvemi typu B pro měření půdní aerobní respirace. Měřicí hlavice spolu s lahvemi tvoří manometrickou soustavu pracující na principu měření podtlaku v uzavřené soustavě. Podtlak v soustavě vzniká prodýcháním kyslíku aerobními mikroorganismy, při čemž současně dochází k produkci CO₂, který je zachycován absorpčním činidlem. Změny tlaku v nádobě se tedy děje přímo úměrně spotřebě kyslíku. Změnu tlaku automaticky zaznamenává membránové tlakové čidlo umístěné ve spodní části měřicí hlavice a to vždy, nezávisle na nastavené době měření, v pravidelných intervalech 360x za dobu měření. Výhodou zařízení je možnost sledování průběhu respirační aktivity v průběhu času. Pomocí řídicí jednotky je také možné odečítat a zaznamenávat průběžné hodnoty kdykoli během měření a to maximálně desetkrát v rámci jedné hlavice. Průběžné i finální hodnoty lze sledovat graficky ztvárněné na displeji řídicí jednotky. Po skončení měření se pomocí řídicí jednotky přes infračervené rozhraní odebírají naměřená data. Z řídicí jednotky pak lze naměřené hodnoty přenášet do počítače k dalšímu zpracování pomocí programu Achat OC 2.03.

4.2. Půdní vzorky

Vzorky půdy byly odebrány z dlouhodobého pokusu Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze a to celkem pro deset měření v deseti termínech: 5.

11. 2012, 28. 11. 2012, 21. 12. 2012, 18. 4. 2013, 7. 5. 2013, 4. 7. 2013, 26. 7. 2013, 29. 8. 2013, 24. 10. 2013 a 28. 11. 2013.

Vzorky byly odebrány z nehnojené kontrolní varianty pšenice seté ozimé (*Triticum aestivum*) a to zejména kvůli tomu, že půdním mikroorganismům na této parcele není v průběhu roku obohacováno životní prostředí o živiny, které by mohly metabolizovat a není tak předpoklad, že by mělo docházet k ovlivnění míry respirace vlivem změny struktury metabolizovatelných živin. Zároveň se tato parcela nachází na okraji celého pokusného pozemku, díky čemuž bylo minimalizováno ovlivnění souběžně probíhajících pokusů a měření ostatních studentů a zaměstnanců školy. Zároveň s odběrem proběhlo zaznamenání doby odběru, teploty vzduchu naměřené meteorologickou stanicí ČZU a přibližné aktuální fenologické fáze porostu pšenice seté ozimé (*Triticum aestivum*).

4.2.1. Schéma a systém odběru

K odběru vzorků bylo zvoleno systematické schéma rozmístění jednotlivých míst odběru. Pomocí půdního vrtáku bylo vždy odebráno deset dílčích vzorků z hloubky profilu do 15-20 cm. Z těchto jednotlivých odběrů byl ještě na poli vytvořen směsný vzorek mechanicky rozmělněn v polyetylenovém pytli. Počet dílčích vzorků byl stanoven tak aby směsný vzorek měl vypovídající hodnotu o daném pozemku a zároveň došlo k co možná nejmenšímu ovlivnění jeho celkového charakteru. Potřeba materiálu pro veškerou analýzu všech opakování a pro měření půdní sušiny byla jen 300g upraveného směsného vzorku, ale celkem vždy bylo odebráno a zpracováno okolo 2 kg zeminy.

4.2.2. Úprava vzorků před skladováním a měřením

Z čerstvého vzorku byly po přenesení do laboratoře odstraněny rostlinné zbytky, semena, větší půdní skelet a v jednom případě i půdní živočichové. Následně byl znovu důkladně mechanicky rozmělněn a promísen. Poté bylo požadované množství vzorku proseto na 2 mm síť nebo, v případě vyšší vlhkosti znemožňující prosetí na síť, byl směsný vzorek nastrouhán na 2 mm struhadle.

4.2.3. Skladování vzorků

Část upravených vzorků byla skladována nestlačeně v plastových kontejnerech bez přístupu vzduchu v temnu v lednici při konstantní teplotě 4 °C a část byla okamžitě použita k měření na OxiTopu a ke stanovení vlhkosti. Doba skladování byla v rozmezí tří až pěti týdnů.

4.3. Ostatní použitý materiál a vybavení

Jako absorpční činidlo pro oxid uhličitý byl zvolen 2 M roztok hydroxidu sodného připravený rozpuštěním 8 g perličkového NaOH v demineralizované vodě na celkový objem 100 ml. Pro obohacení vzorku k měření substrátem indukované respirace byl použit 25 % roztok D-glukózy. Samotné měření probíhalo v komorovém termostatu při teplotě 30 °C. Navážky vzorků byly prováděny na laboratorních vahách s přesností $d=0,1$ g.

4.4. Metodika pokusu

Bylo provedeno 10 odběrů. Z každého odběru byly založeny dvě základní varianty - varianta vzorků čerstvých a vzorků stratifikovaných, přičemž u každé z variant byly dvě podvarianty, jedna pro měření basální respirace a druhá pro měření potenciální substrátem indukované respirace, každá z podvariant měla vždy tři opakování. Doba měření byla 14 dní.

Z homogenizovaného a potřebně upraveného materiálu bylo do každé z inkubačních lahví naváženo 20 g. Nezbytné je substrát rovnoměrně rozprostřít po dnu láhve, tak aby bylo možné substrát patřičně upravit a aby měla každá půdní částice srovnatelné podmínky. Následně byl u varianty pro měření potenciální substrátem indukované respirace vzorek rovnoměrně obohacen 25 % roztokem D-glukózy v množství 0,8 ml na 20 g zeminy a u varianty pro měření basální respirace byl vzorek ovlhčen adekvátním množstvím demineralizované vody. Do absorpční nádoby bylo nepipetováno 5ml 2 M roztoku hydroxidu sodného. Soustava byla uzavřena těsněním a měřicí hlavicí a v komorovém termostatu bylo odstartováno měření.

K založení měření čerstvých vzorků došlo v co možná nejkratší době po odběru. Materiál pro měření stratifikovaných vzorků byl řádně uložen ke stratifikaci a při

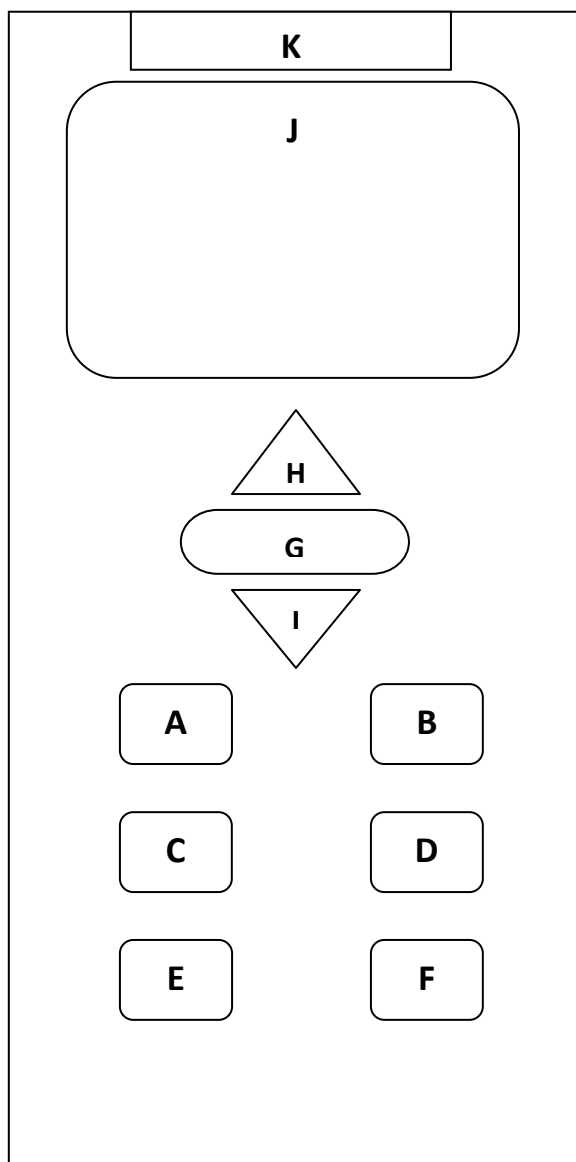
OxiTop v měření půdní respirace

dalším odběru vzorků půdy, který následoval v horizontu tří až pěti týdnů, byl založen. Současně s ním bylo ukončeno měření čerstvého vzorku z prvního odběru a založeno další měření čerstvého vzorku. Analogickým způsobem se pokus odehrával až do posledního odběru. V průběhu měření byly několikrát namátkově odečteny průběžné hodnoty.

Jako doplňkové informace byly zaznamenávány tyto údaje: sušina vzorků po odběru i po stratifikaci, datum a čas odběru, teplota vzduchu, orientační stav porostu (BBCH).

Sledován byl zejména vliv poodběrového skladování vzorků půdy na mikrobiální respirační aktivitu. K vyhodnocení výsledků bylo využito programů Statistica a MS Excel 2009.

4.4.1. Schéma řídicí jednotky (kontroloru)

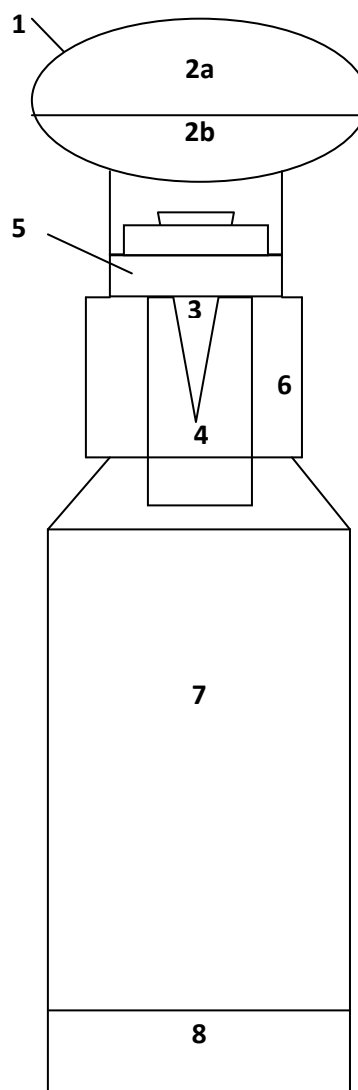


Seznam kláves a funkčních prvků

- 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-** „infračervený port“

4.4.2. Schéma měřicí soustavy

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



4.4.3. Metodika měření s přístrojem OxiTop OC

Jako výchozí byla zvolena následující metodika pro měření půdní respirace s pomocí přístroje OxiTop OC (Malý, 2012).

4.4.4. Pracovní postup přípravy

Všechny části měřící soustavy, které mají přijít do kontaktu s půdou je třeba pečlivě umýt a opláchnout demineralizovanou vodou. Dále je třeba je nechat rozložené vyschnout tak, aby se před použitím na žádné z částí nenacházela nakondenzovaná 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 a pomůcky, které se budou používat (pipety, injekční stříkačky, nádobky na absorpční činidlo, živný roztok, voda, atd.).

Do lahví, ve kterých se měří potenciální substrátem indukovaná respirace, se stejnoměrně přidá živný substrát - 25 % roztok D-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 nebo odměří 5 ml adekvátně koncentrovaného roztoku NaOH.

Opatrně a pevně se sešroubuje naplněná nádobka na absorpční činidlo (4) a těsnění (5), vloží se do hrdla inkubační láhve (8) a dotáhne uzávěrem (6). Skrz těsnění (5) se nasadí vložka (3) a našroubuje se měřící hlava (1) tak, aby byl cítit dostatečný odpor, je ovšem třeba utahovat opatrně, neboť hlavice je plastová a mohlo by dojít ke stržení závitu.

4.4.5. Popis funkcí kláves na řídicí jednotce

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

- B- Zobrazení seznamu vzorků s ikonou ukazatele průběhu měření (prázdná či nedokončená ikona značí aktuálně měřený vzorek, plná ikona a označení \surd značí dokončené měření). Po stisku se jako první zobrazí naposledy založené vzorky, stiskem či držením kurzorové klávesy H je možné se dostat k dříve odstartovaným starším vzorkům. V průběhu spuštěného měření se tento seznam zobrazí ihned po zapnutí řídicí jednotky.
- C- Po výběru požadovaného vzorku ze seznamu zobrazí jeho hodnoty v grafické i číselné formě. U vzorků, u kterých právě probíhá měření, udává číselná hodnota naposledy odečtenou hodnotu podtlaku. U ukončeného měření udává 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 po horizontální ose grafu.
- D- Řídicí jednotku je možné pomocí infračerveného rozhraní připojit ke speciální laboratorní tiskárně TD100 a stiskem této klávesy iniciovat tisk naměřených dat.
- E- Umožňuje veškeré nastavení, kontrolu i údržbu měřicí soustavy, jako například nastavení provozních režimů, doby měření, změnu jazyka, mazání nepotřebných dat z paměti, atd.
- F- Zapnutí a vypnutí řídicí jednotky
- G- Potvrzení volby zadání, spouštění měření v některých složkách menu slouží k návratu o krok zpět.
- H- Kurzorová klávesa sloužící k pohybu směrem nahoru v menu displeje, zvyšuje hodnoty při nastavení měření, pohyb kurzoru směrem vlevo v rámci grafu.
- I- Kurzorová klávesa sloužící k pohybu směrem dolů v menu displeje, snižuje hodnoty při nastavení měření, pohyb kurzoru směrem vpravo v rámci grafu.

4.4.6. Nastavení řídicí jednotky

Řídicí jednotka se zapne stiskem klávesy F. Následně se provede základní požadované nastavení.

Stisknutím klávesy E se zobrazí menu údržby, ve kterém se vybere volba nastavení (*settings*), potvrdí se klávesou G, jejím opakovaným stiskem na příslušné volbě nastavení se zvolí pracovní režim (*operation mode*) v případě této diplomové práce byl zvolen provozní režim tlak p (*pressure p*), pomocí kurzorových kláves H a I se

nastaví doba měření (*measuring time*), a nastaví aktuální datum a čas (*date/time*), OxiTop OC110 neumí automaticky přenastavovat zimní a letní čas. Je vhodné vypnout režim GLP (*good laboratory practice*), který neumožňuje uchování nastavených parametrů. Jeho vypnutím se ušetří opětovné nastavování před každým měřením, jenž pro práci v provozním režimu „tlak p“ není podstatné. Pokud nejsou data zálohována po každém měření, je vhodné nastavit pod volbou paměť (*memory*) a manuální mazání naměřených hodnot. V opačném případě dojde při započítí nového měření k automatickému vymazání celé paměti a tím ztratě dat o ukončených měřeních. Dále je možné nastavit automatické úsporné vypnutí (*switch-off interval*) v rozmezí 5-15 minut, hodnotu limitního tlaku (*limit pressure*) v rozmezí 50-500 hPa a jazyk komunikace displeje (*language*). Na výběr je angličtina a němčina.

Všechny výše zmíněné volby potvrzujeme klávesou G.

4.4.7. Spuštění měření

Po provedení základního nastavení je možné započít měření. Stiskem klávesy A se zvolí start měření (*start sample*), řídicí jednotka nabídne kontrolu informací o nastavení a době ukončení měření. Po kontrole se volba potvrdí. Na displeji se zobrazí výzva k namíření řídicí jednotky na měřící hlavici (*please hold controller to ρ*). Řídicí jednotka se ze vzdálenosti několika centimetrů namíří na měřící hlavici. Po úspěšném spuštění se ozve zvukový tón a na displeji se objeví *!started!*, za několik vteřin se znovu objeví nabídka startu měření, takto lze pokračovat až do odstartování všech hlavic. Poté je možné přístroj vypnout.

4.4.8. Vyvolání průběžných hodnot

a) všech vzorků najednou

Po zapnutí řídicí jednotky se na displeji objeví seznam právě měřených vzorků. Stiskem klávesy A dojde k výzvě na výběr akce. Zvolí se možnost „*call up all data*“. Řídicí jednotka se přidrží ve vzdálenosti do 1 m od všech aktivních měřících hlavic, infračervené porty na hlavicích postupně červeně zablikají a ozve se zvukový signál. Nyní je možné stisknout klávesu B, kurzory nalézt požadovaný vzorek a stisknutím

klávesy C vyvolat informace o momentální hodnotě tlaku v láhvi a graf dosavadního průběh měření.

b) jednotlivých vzorků

Po zapnutí řídicí jednotky se na displeji objeví seznam právě měřených vzorků. Stiskem klávesy A dojde k výzvě na výběr akce. Zvolí se možnost „*momentary value*“ a řídicí jednotka přidrží ve vzdálenosti několika centimetrů od odpovídající měřící hlavice. Po světelném a zvukovém signálu se na displeji objeví zjištěná průběžná hodnota a dotaz s možností jejího uložení (*save*). Po této volbě se řídicí jednotka vrátí do základního menu „*momentary value*“.

Průběžných hodnot lze nezávisle na formě vyvolání pro každou hlavici uložit maximálně 10.

4.4.9. Vyvolání dat po skončení doby měření

Postup sběru dat po skončení měření je obdobný jako u vyvolání 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*“. Řídicí jednotka se přidrží ve vzdálenosti do 1 m od všech měřících hlavic, infračervené porty na hlavicích postupně vydají červený světelný signál a ozve se zvukové znamení. Po stisku klávesy B, volbě konkrétního vzorku a stisknutí klávesy C je možné vidět výsledné hodnoty a konečný graf.

Ihned 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 + ✓).

4.4.10. Převedení dat počítače

Pro převedení dat je třeba mít nainstalovaný program Achat OC 2.03 nebo vyšší, tabulkový editor typu MS Excel a počítač se slotem typu RS 232, nebo jiný devíti-pinový slot a příslušnou redukci. Redukce ze slotu RS 232 na USB 2.0 neposkytuje kompatibilní přenos. Po spuštění programu Achat OC 2.03, připojení řídicí jednotky

OxiTop v měření půdní respirace

přes interface kabel a zapnutí přístroje dojde k automatickému načtení seznamu zástupců všech měřených dat Pro tabulkové zobrazení všech odečtených hodnot změn tlaku je nutné jednotlivě vzorky otevřít. Zobrazí se popisné informace o jednotlivých opakováních a tabulka s 360-ti naměřenými hodnotami a časy v minutách, ve kterých byla měření provedena. Převod do tabulkového editoru se provede zadáním příkazu kopírovat, kdy je třeba mít kurzor kdekoli v okně tabulky s hodnotami a následně vložit do požadované buňky editoru. Hodnoty v Achat OC 2.03 není možné označit a kopírovat tak například jen jejich část, výše uvedeným způsobem lze vždy převést pouze veškeré informace. V Achat OC 2.03 nelze data upravovat ani jinak spravovat, slouží pouze jako komunikační mezistupeň mezi řídicí jednotkou a tabulkovým editorem.

5. Výsledky

Výsledky všech měření byly přes program Achat OC 2.0 z řídicí jednotky převedeny do tabulkového editoru MS Excel a následně byly v programech Statistica a MS Excel provedeny výpočty:

Analýza rozptylu (ANOVA) hodnot jednotlivých opakování. Byly porovnány vždy tři shodně založená opakování jednotlivých podvariant.

H_0 = neexistují statisticky významné rozdíly mezi hodnotami respirační aktivity v rámci jednotlivých opakování

H_A = mezi jednotlivými opakováními jsou statisticky významné rozdíly v hodnotách respirační aktivity

$\alpha = 0,05$; $n = 360$

Vzhledem ke skutečnosti, že v žádné z podvariant nebyly touto analýzou při dané hladině významnosti a počtu opakování zjištěny statisticky významné rozdíly, proto byla u všech opakování přijata H_0 .

Dvouvýběrový F-test podvariant. Na základě výsledků analýzy ANOVA byly z jednotlivých opakování vytvořeny průměrné hodnoty. Tyto hodnoty byly vytvořeny pro obě podvarianty – basální respirace i substrátem indukované respirace. Výsledky jsou graficky znázorněny v Příloze 1. Výsledky průměrů podvariant měření čerstvých vzorků byly pomocí dvouvýběrového F-testu s výsledky průměrů podvariant měření stratifikovaných vzorků.

H_0 = neexistují statisticky významné rozdíly mezi hodnotami respirační aktivity v rámci vzorků čerstvých a skladovaných

H_A = doba skladování má statisticky významný vliv na hodnoty respirační aktivity

$\alpha = 0,05$; $f = 359$; kritická hodnota F-testu pro $\alpha = 0,05$; $f_{tab} > 100 = 1,96$

Výsledky těchto testování jsou uvedeny u popisu jednotlivých odběrů.

Dvouvýběrový F-test variant. V rámci celého pokusu byly porovnány průměry hodnot průměrů všech podvariant čerstvých vzorků s průměry hodnot průměrů všech podvariant stratifikovaných, zvláště pro basální respiraci a zvláště pro substrátem indukovanou respiraci. Nulová a alternativní hypotéza byla v tomto případě stejná jako u dvouvýběrového F-testu podvariant.

H_0 = neexistují statisticky významné rozdíly mezi hodnotami respirační aktivity v rámci vzorků čerstvých a skladovaných

H_A = doba skladování má statisticky významný vliv na hodnoty respirační aktivity

$\alpha = 0,05$; $f = 359$; kritická hodnota F-testu pro $\alpha = 0,05$; $f_{\text{tab}} > 100 = 1,96$

Výsledky jsou uvedeny v souhrnném hodnocení.

5.1. Odběr 5. 11. 2012

Hodnoty basální i potenciální respirace jsou uvedeny v hPa

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
7,5	84,21	10:00	11

Tab. 2: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-5,52	-5,46
Směrodatná odchylka	5,31	4,10
Rozptyl	28,18	16,85
Hodnota F-testu	0,13	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$		

Tab. 3: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-83,66	-79,36
Směrodatná odchylka	45,61	51,57
Rozptyl	2080,52	2659,68
Hodnota F-testu	0,02	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$		

Tab. 4: statistické zhodnocení výsledků

5.2. Odběr 28. 11. 2012

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
6,4	79,84	9:30	14

Tab. 5: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	17,34	16,99
Směrodatná odchylka	1,57	1,70
Rozptyl	2,47	2,90
Hodnota F-testu	0,13	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 6: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-105,08	-104,90
Směrodatná odchylka	48,16	47,44
Rozptyl	2319,29	2250,23
Hodnota F-testu	0,77	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 7: statistické zhodnocení výsledků

5.3. Odběr 21. 12. 2012

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
-1,4	83,22	11:00	16

Tab. 8: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	1,05	0,89
Směrodatná odchylka	9,78	9,59
Rozptyl	95,58	91,89
Hodnota F-testu	0,71	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 9: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-124,74	-124,03
Směrodatná odchylka	46,89	43,67
Rozptyl	2198,22	1907,17
Hodnota F-testu	0,18	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 10: statistické zhodnocení výsledků

5.4. Odběr 18. 4. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
18,2	84,37	9:30	25

Tab. 11: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-3,34	-3,08
Směrodatná odchylka	4,58	4,76
Rozptyl	20,97	22,66
Hodnota F-testu	0,46	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 12: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-107,50	-107,20
Směrodatná odchylka	38,68	38,35
Rozptyl	1495,87	1471,02
Hodnota F-testu	0,874017	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 13: statistické zhodnocení výsledků

5.5. Odběr 7. 5. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
17,6	83,11	9:30	32

Tab. 14: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-1,36	-1,26
Směrodatná odchylka	5,38	5,27
Rozptyl	28,99	27,81
Hodnota F-testu	0,70	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 15: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-111,11	-109,09
Směrodatná odchylka	38,16	44,71
Rozptyl	1455,92	1999,31
Hodnota F-testu	0,002732	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 16: statistické zhodnocení výsledků

5.6. Odběr 4. 7. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
19,2	84,01	11:30	81

Tab. 17: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-2,61	-2,42
Směrodatná odchylka	3,76	3,77
Rozptyl	14,14	14,24
Hodnota F-testu	0,95	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 18: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-102,81	-101,43
Směrodatná odchylka	33,64	33,89
Rozptyl	1131,48	1148,56
Hodnota F-testu	0,89	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 19: statistické zhodnocení výsledků

5.7. Odběr 26. 7. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
23,8	83,02	10:00	89

Tab. 20: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	12,39	12,03
Směrodatná odchylka	2,84	3,14
Rozptyl	8,07	9,86
Hodnota F-testu	0,06	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 21: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-104,14	-101,75
Směrodatná odchylka	44,38	49,04
Rozptyl	1969,68	2404,53
Hodnota F-testu	0,06	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 22: statistické zhodnocení výsledků

5.8. Odběr 29. 8. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
16,5	83,09	9:30	bez porostu

Tab. 23: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	13,41	12,83
Směrodatná odchylka	2,70	2,61
Rozptyl	7,31	6,84
Hodnota F-testu	0,53	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 24: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-98,50	-96,71
Směrodatná odchylka	48,88	46,77
Rozptyl	2389,60	2187,86
Hodnota F-testu	0,40	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 25: statistické zhodnocení výsledků

5.9. Odběr 24. 10. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
13,2	84,23	10:00	9

Tab. 26: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	20,78	20,19
Směrodatná odchylka	1,41	1,88
Rozptyl	2,00	3,52
Hodnota F-testu	0,001	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 27: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-105,22	-104,80
Směrodatná odchylka	45,55	44,58
Rozptyl	2075,12	1987,17
Hodnota F-testu	0,681826	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 28: statistické zhodnocení výsledků

5.10. Odběr 28. 11. 2013

Ø denní teplota [°C]	Sušina půdy [%]	Doba odběru	BBCH porostu
1,9	84,62	9:00	13

Tab. 29: Podmínky odběru

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	42,87	41,33
Směrodatná odchylka	2,08	2,34
Rozptyl	4,31	5,48
Hodnota F-testu	0,02	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 30: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-101,09	-100,10
Směrodatná odchylka	36,35	41,88
Rozptyl	1321,42	1753,92
Hodnota F-testu	0,007	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 31: statistické zhodnocení výsledků

5.11. Souhrnné hodnocení

Basální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	9,50	9,20
Směrodatná odchylka	3,66	3,62
Rozptyl	13,38	13,08
Hodnota F-testu	0,83	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 32: statistické zhodnocení výsledků

Potenciální respirace	Čerstvý vzorek	Stratifikovaný vzorek
Průměr hodnot	-104,39	-102,94
Směrodatná odchylka	42,26	43,37
Rozptyl	1786,13	1880,69
Hodnota F-testu	0,63	
$\alpha = 0,05$; $n = 360$; hodnoty uvedeny v [hPa]		

Tab. 33: statistické zhodnocení výsledků

OxiTop v měření půdní respirace

V rámci měření všech odběrů byly hodnoty dvouvýběrového F-testu pod hodnotou 1,96 která je dle tabulek kritických hodnot Studentova t-rozdělení při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro stupeň volnosti $f > 100$ kritickou pro prokázání statisticky významného rozdílu (Mrkvička a Petrášková, 2006). Obdobná je situace při aplikování dvouvýběrového F-testu na průměrné hodnoty všech opakování. Ani při této analýze nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi čerstvými a stratifikovanými vzorky.

6. Diskuze

Na základě výše uvedených výsledků nelze než konstatovat, že v tomto konkrétním postupu měření není rozdíl mezi měřením čerstvých a stratifikovaných vzorků půdy.

Matematickým porovnáním aritmetických průměrů všech naměřených hodnot zjistíme, že čerstvé vzorky dosahují v součtu sum všech hodnot vyšší respirační aktivity než vzorky stratifikované, avšak tyto hodnoty jsou při, v zemědělství obvyklém, předpokladu chybovosti 5 % statisticky neprůkazné.

Zajímavé zjištění, které plně koresponduje s výše uvedenou poznámkou o porovnání aritmetických průměrů, je, že ve všech případech bez výjimky byly sumy všech 360 hodnot (v tabulkách reprezentované aritmetickými průměry) vyšší u variant s měřením čerstvých vzorků. To nasvědčuje tomu, že mikrobiální aktivita je v původních přirozených podmínkách vyšší, než v podmínkách laboratorních, což může být způsobeno kromě vlivu samotného odběru například poodběrovou úpravou, která má kvůli požadavkům na důkladnou homogenizaci poměrně destruktivní charakter a mikrobiální biomasa na tento šok reaguje omezením aktivity, nebo i přímo fatálně, jak může být patrné například ze studie Ehlotové a kol. (1998), kdy ve dvou pokusech byla stanovovány celkové změny mikrobiální biomasy v průběhu času. Bakteriální biomasa v obou případech zaznamenala růst, ale co do objemu významnější biomasa mikromycetů byla výrazně redukována. V době do devíti dnů po odběru došlo k poklesu celkové mikrobiální biomasy na polovinu. Během dalších zhruba dvou týdnů se celková mikrobiální biomasa zvýšila na přibližně dvou třetinovou hodnotu oproti původnímu stavu a na této zůstaly hodnoty téměř konstantní po dalších pět set dní.

Další nevýhodou přípravy vzorků je odstranění půdních agregátů větších, než je oko síta nebo struhadla. Tyto agregáty, které jsou zdrojem diverzity mikrobiálního společenstva, se do analyzovaného vzorku nedostanou a s nimi ani mikroorganismy na ně vázané. Půda, která právě vysychá, bude mít s vzrůstající hloubkou vyšší vlhkost a protože vlhčí půda je soudržnější než půda suchá, dostane se do prosetých vzorků na úkor spodních vrstev spíše vrchní vrstvy půdy.

Možným řešením je tedy před analýzami půdu skladovat po dobu delší než cca tři týdny. Ehlotová a kol. (1998), dokonce navrhuje nejméně dva měsíce, nebo, jak vyplývá z výsledků této práce, půdu neskladovat vůbec a analyzovat vzorky čerstvé.

Černošlávková (2006) uvádí jako vhodnou dobu pro stratifikaci půdy interval tří týdnů až tří měsíců, přičemž pravděpodobně vychází z normy OECD 216 (2000), kde je doba skladování po tři měsíce uváděna jako limitní.

Vypuštění skladování výrazně urychlí a zjednoduší celý proces analýzy. Časová dotace potřebná pro samotné měření na OxiTopu je dva týdny a při vypuštění stratifikace skladováním se prodlouží jen o několik málo hodin potřebných na odběr a úpravu vzorků a založení měření, což by mohlo zvýšit důležitost a prestiž celého oboru měření půdní respirace.

Další časovou úsporu, a především eliminaci ovlivnění měření odstraněním a narušením větších půdních agregátů, by mohla přinést změna postupu podběrové úpravy vzorků. Pokud by se vzorky neprosévaly a k analýzám by byla použita jen mechanicky promísená půda, mohly by výsledky více korespondovat se situací v podmínkách in situ. Podobné řešení, zvláště u příliš vlhké půdy, navrhuji i Krištůfek a Šimek (1998). Tvrdí, že stačí ze vzorku odstranit jen větší části skeletu a dále již vzorek neupravovat. Žádná ze studií a metodik, které byly použity k psaní či přípravě této práce neřeší vliv založení pokusu na výsledky pokusu. Přitom navázení stratifikované půdy a zahájení měření svým způsobem kazí vliv stratifikace samotné. Při stratifikaci během skladování dochází podle řady studií k omezení biologických a fyzikálně-chemických změn způsobených vytržením půdy z jejího přirozeného prostředí (např. Forster, 1995) a záleží tedy na tom, který z vlivů má větší váhu. Ověření tohoto předpokladu by však vyžadovalo hlubší analýzu, která nebyla cílem této práce.

Dalším zajímavým a neprvoplánovým výstupem této práce je skutečnost, že OxiTop poskytuje zcela konzistentní výsledky. Všechna měření byla zakládána ve třech opakováních, neboť panuje obecně přijímaný názor, že pro průkaznost výsledků je nezbytné mít vždy minimálně právě tři opakování. Ve všech případech v rámci jednotlivých podvariant nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými opakováními. Svědčí to o tom, že pokud jsou pokusy založeny s velkou dávkou přesnosti a s důrazem na eliminaci chyb je možné dosahovat konzistentních výsledků i při založení menšího počtu opakování. Zároveň tento výstup poukazuje na výhody již diskutované důkladné homogenizace. Pokud by výsledky jednotlivých opakování byly výrazně rozdílné, jednalo by se pravděpodobně o projev heterogenity

jednotlivých navážek půdy, protože ostatní fáze pracovního postupu založení měření nejsou tak náchylné k chybě. Množství navážené půdy je přesně dané a možnost chyby z nepozornosti je tak mizivá. Podobná je situace i u ovlhčení či přidání živného substrátu, kdy je pro všechna současně zakládána měření míchán roztok D-glukózy naráz a teprve poté je aplikován injekční stříkačkou s jehlou na vzorek půdy do inkubační lahve. Pro tento živný roztok prováděna navážka na laboratorních vahách o $d = 0,01$ g. Další kroky popsané v metodice této práce je třeba provádět s rozvahou a opatrně, aby nedošlo k vylištění absorpčního činidla z nádoby pro něj určené. V krajním případě, kdyby počet disponibilních lahví nedovoloval založit více opakování, nebo v případě kdy možná chyba měření nezpůsobí škody či zásadní desinformaci, by tak bylo možné založit i jediné opakování.

Na základě získaných výsledků je možné konstatovat, že dvě opakování jsou při práci s OxiTopem dostačující. Tato skutečnost tak v dalších experimentech nabízí možnost více variant měření, nebo práci na více pokusných projektech najednou.

7. Závěr

Předpokládám, že přístroj OxiTop® OC se v budoucnu stane standardně používaným prostředkem pro mikrobiologické respirační analýzy, jeho nenáročná obsluha a eliminace chyb způsobených průběhem měření hovoří značně v jeho prospěch. V neprospěch naopak hraje vyšší pořizovací cena, která však k letošnímu roku oproti původní pořizovací ceně z roku 2006 klesla zhruba na polovinu. Vzhledem k tomu a vzhledem k vzrůstající frekvenci vědeckých článků s odkazem na OxiTop® OC lze předpokládat, že si tento přístroj získává stále větší oblibu.

7.1. Cíle práce a hypotézy

Cíl práce ověření míry ovlivnění intenzity mikrobiální respirace skladováním půdních vzorků byl splněn s tím, že k němu stanovená hypotéza, totiž že intenzita půdní respirace může být ovlivněna v závislosti na době skladování vzorků, nebyla potvrzena a za dodržení metodiky shodné s touto prací, je možné upustit od stratifikace vzorků před měřením půdní respirace přístrojem OxiTop® OC.

Cíl práce prověřit respirační aktivitu půdních vzorků přístrojem OxiTop® OC a rozšířit metodiku pro práci s ním byl rovněž splněn, neboť pro všechna měření byl použit právě tento přístroj a původní metodika pro práci s ním byla částečně upravena a rozšířena o kapitulu o zpracování vzorků

Stanovená hypotéza, totiž že termín odběru má vliv na potřebu podběrové stratifikace půdy nebyla prokázána a během celého agrotechnického roku je tak možné provádět měření respirační aktivity půdy přístrojem OxiTop® OC na čerstvých vzorcích.

8. Použitá literatura

- Aciego-Pietri, J. C., Brookes, P. C. 2009. Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass, activity and community structure in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (7). 1396-1405.
- Alef, K., Nannipieri, P. (eds.). 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London, p. 576. ISBN 0-12-513840-7.
- Allard, B. 2006. A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit: Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions. *Geoderma* 130 (1-2). 77-96.
- Bernoux, M., Conceiao, S. C. M. da, Volkoff, B., Cecrri, C. C. 2002. Brazil's carbon stocks. *Soil Science Society American Journal* 66 (10). 888-896.
- Brady, N. C., Weil, R. R. 1996. *The Nature and Properties of Soils*. Prentice Hall. New Jersey, p. 980. ISBN-10: 013227938X.
- Burke, D. J., Smemo, K. A., López-Gutiérrez, J. C., DeForest, J. L. 2012. Soil fungi influence the distribution of microbial functional groups that mediate forest greenhouse gas emissions. *Soil Biology and Biochemistry* 53 (10). 112-119.
- Butenschoen, O., Scheu, S., Eisenhauer, N. 2011. Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (9). 1902-1907.
- Carter, M. R., Gregorich, E. G. 2008. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. CRC Press. Boca Raton, p. 1264. ISBN-10: 0849335868.
- Cavalier-Smith, T. 2013. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European Journal of Protistology* 49 (2). 115-178.
- Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambiliote, R., Cooke, R., Sentenac, H., Wipf, D., Botton, B. 2002. An uptake on nutrient transport processes in Ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 244 (2). 165-175.

Chenu, C., Stotzky, G. 2002. Interactions between Microorganisms and Soil Particles: An Overview, p. 3-40. In Huang, P. M., Bollag, J. M., Senesi, N. (eds.), *between Soil Particles and Microorganisms*. John Wiley and Sons, LTD. West Sussex, p. 566. ISBN-0: 471-60790-8.

Černohlávková, J. 2006. Stanovení dlouhodobé půdní respirace systémem OxiTop. Recetox. Brno, 5 s.

Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J. 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (1). 80-85.

Denef, K. 2003. The Relationship between Soil Aggregation, Organic Matter and Microorganisms as Affected by Clay Mineralogy. Dissertation. Katholieke Universiteit Leuven. Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen. Leuven, p. 187.

Edwards, K. A., McCulloch, J., Kershaw, J. P., Jefferies, L. R. 2005. Soil microbial and nutrient dynamics in a wet Arctic sedge meadow in late winter and early spring. *Soil Biology and Biochemistry* 38 (9). 2843-2851.

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.

England, P., Molnar, P., Richter, F. 2007. John Perry's neglected critique of Kelvin's age for the Earth: A missed opportunity in geodynamics. *GSA Today* 17 (1). 4–9.

Ezawa, T., Smith, S. E., Smith, F. A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* 224 (1-2). 221-230.

Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J. M. 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161 (8). 635-642.

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.

Gadd, G. M., 2005. Microorganisms in Toxic Metal-Polluted Soils. In Buscot, F., Varma, A. (eds). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0.

Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, D., Varma, A. 2005. Microbial Diversity in Soils, p. 19-55. In Buscot, F., Varma, A. (eds). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0.

Haeryong, J., Kyu-Dong, S., Neppolian, B., Heechul, C. 2008. Effect of soil organic matter (SOM) and soil texture on the fatality of indigenous microorganisms in intergrated ozonation and biodegradation. *Journal of Hazardous Materials* 150 (3). 809-817.

Hannamaria, P., Sarjala, T. 2004. Seasonal fluctuation in microbial biomass and activity along a natural nitrogen gradient in a drained peatland. *Soil Biology and Biochemistry* 36 (7). 1047-1055.

Hillel, D. 1998. *Environmental Soil Physics*. Academic Press. San Diego, p. 771. ISBN 0-12-348-525-8.

Huhta, V., Tryggve, P., Setälä, H. 1998. Functional implications of soil fauna diversity in boreal forests. *Applied Soil Ecology* 10 (3). 277-288.

Chihching , C., Yumei K., Changchieh, C., Chunwei , H., Chihwei, Y., Weijen, Y. 2008. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 20 (3). 359-363.

Kandeler, E., Stemmer, M., Gerzabek, M. H. 2005. Role of Microorganisms in Carbon Cycling in soils, p. 139-176. In Buscot, F., Varma, A. (eds). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Berlin, p. 419. ISBN 3-540-22220-0.

Kramer, C., Gleixner, G. 2006. Variable use of plant and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38 (11). 3267-3278.

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.

Langer, U., Rinklebe, J. 2011. Priming effect after glucose amendment in two different soils evaluated by SIR- and PLFA-technique. *Ecological Engineering* 37 (3). 465-473.

Malý, M. 2012. Možnosti využití přístroje OxiTop pro měření půdní respirace. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha, p.51.

Mrkvička, T., Petrášková, V. 2006. Úvod do statistiky. Jihočeská Univerzita. České Budějovice, p. 150. ISBN 80-7040-894-4.

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.

Olson, S. L., Kump, L. R., Kasting, J. F. 2013. Quantifying the areal extent and dissolved oxygen concentrations of Archean oxygen oases. *Chemical Geology* 362 (12). 35-43.

Ovreas, L., Torsvik, V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 36 (3). 303-315.

- Pansu, M., Gautheyrou, J., Loyer, J. Y. 2001. Soil Analysis, Sampling, Instrumentation and Quality Control. A.A. Balkema Publishers. Lisse, p. 500. ISBN-10: 9054107162.
- 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.
- Pierzynski, G. M., Vance, G. F., Sims, T. J. 2005. Soils and Environmental Quality. CRC Press. Boca Raton, p. 584. ISBN-10: 0-8493-1616-2.
- Pino, N., Peñuela G. 2011. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterior Biodegrad* 65 (8). 827–831.
- Ponomarenko, A. G. 2013. Earlier Steps of the Soil Ecosystems Evolution. *Zhurnal Obshchei Biologii* 74 (6). 420-433
- Rick, W. Y., Stuart, M. T. 2001. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology* 4 (3). 307-312.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D. 2011. Microbiology: Diversity, diseases and the environment. Fitzgerald Science Press. Bethesda, p. 638. ISBN-10: 1891786016.
- Sarathchandra, S. U., Ghani, A., Yeates, G. W., Burch, G, Cox, N. R. 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (7–8). 953-964.
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds.). 1996. Methods in Soil Microbiology. Springer. Berlin, p. 425. ISBN 3-540-59055-2.
- Schipper, L. A., Degens, B. P., Sparling, G. P., Duncan, L. C. 2001. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (15). 2093-2103.
- Schloter, M., Dilly, O., Munch, J. C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment* 98 (2). 255-262.

Silvana, A. M. C., Sueli, S. F., Claudio, A. 2004. Microcalorimetric measurements of the metabolic activity by bacteria and fungi in some Brazilian soils amended with different organic matter. *Thermochimica Acta* 417 (2). 275-281.

Sistla, A. S., Schimel, P. J. 2013. Seasonal patterns of microbial extracellular enzyme activities in an arctic tundra soil: Identifying direct and indirect effects of long-term summer warming. *Soil Biology and Biochemistry* 55 (12). 78-84.

Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Broek, J. van den, Mil, S. van den, Wernars, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuation of the dominant members of the bacterial soil community in wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5). 2284-2291.

Soil Survey Staff. 2002. *Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*. U.S. Government Printing Office. Washington D.C, p. 870.

Stark, C. H., Condon, L. M., O'Callaghan, M., Alison, S., Hong, J. D. 2008. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (6). 1352-1363.

Stolpovsky, K., Martinez-Lavanchy, P., Heipieper, J. H., Cappellen, P. van, Thullne, M. 2011. Incorporating dormancy in dynamic microbial community models. *Ecological Modelling* 222 (17) 3092-3102.

Stromberger, M., Shah, Z., Westfall, D. 2007. Soil microbial communities of no-till dryland agroecosystems across an evapotranspiration gradient. *Applied Soil Ecology* 35 (1). 94-106.

Susana, C. B., Lehmann, J., Dawit, S., Caires, F. E., Alleoni, L. R. F. 2013. Sulfur forms in organic substrates affecting S mineralization in soil. *Geoderma* 200–201 (6). 156-164.

Šarapatka, B. 1996. *Pedologie*. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 235 s. ISBN 80-7067-590.

- Tan, K. H. 2003. Chemical Processes. p. 26-56. In Benbi, D. K., Nieder, R. (eds), Handbook of Processes and Modeling in the Soil-Plant System. Food Products Press. Binghamton, p. 762. ISBN-10: 1560229152.
- Tan, K. H. 2005. Soil Sampling, Preparation and Analysis. CRC Press. Boca Raton., p. 623.
- Taok, M., Cochet, N., Pauss, A., Schoefs, O. 2007. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology* 43 (6). 335-340.
- Tiehang, W. 2011. Can ectomycorrhizal fungi circumvent the nitrogen mineralization for plant nutrition in temperate forest ecosystems?. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (6). 1109-1117.
- Unger, P. W., Kaspar, T. C. 1994. Soil compaction and root growth. *Agronomy Journal* 86 (5). 759-766.
- Wardle, D. A., Parkinson, D. 1992. Influence of the herbicides-2, herbicide-4-D and herbicide-glyphosate on soil microbial biomass and activity - a field experiment. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (1). 185-186.
- Wuebbles, D. J. 2013. Oxygen cycle. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. In Hens, L., Quynh, L. X. (eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press. San Diego, p. 1356. ISBN: 978-0-12-409548-9.
- Wutzler, T., Blagodatsky, S. A., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. 2012. Soil microbial biomass and its activity estimated by kinetic respiration analysis – Statistical guidelines. *Soil Biology and Biochemistry* 45 (2). 102-112.
- Yousaf, S., Khan, S., Aslam, M. T. 2013. Effect of pesticides on the soil microbial activity. *Pakistan Journal of Zoology* 45 (4). 1063-1067.
- Zhongkui, L., Enli, W., Fillery, I. R. P., Lynne M. M., Huth, N., Baldock, J. 2014. Modelling soil carbon and nitrogen dynamics using measurable and conceptual soil organic matter pools in APSIM. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 186 (3). 94-104.

OxiTop v měření půdní respirace

OECD 216. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD (on line). 21. Leden 2000. (cit. 2014-03-16). Dostupné z <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948317.pdf>.

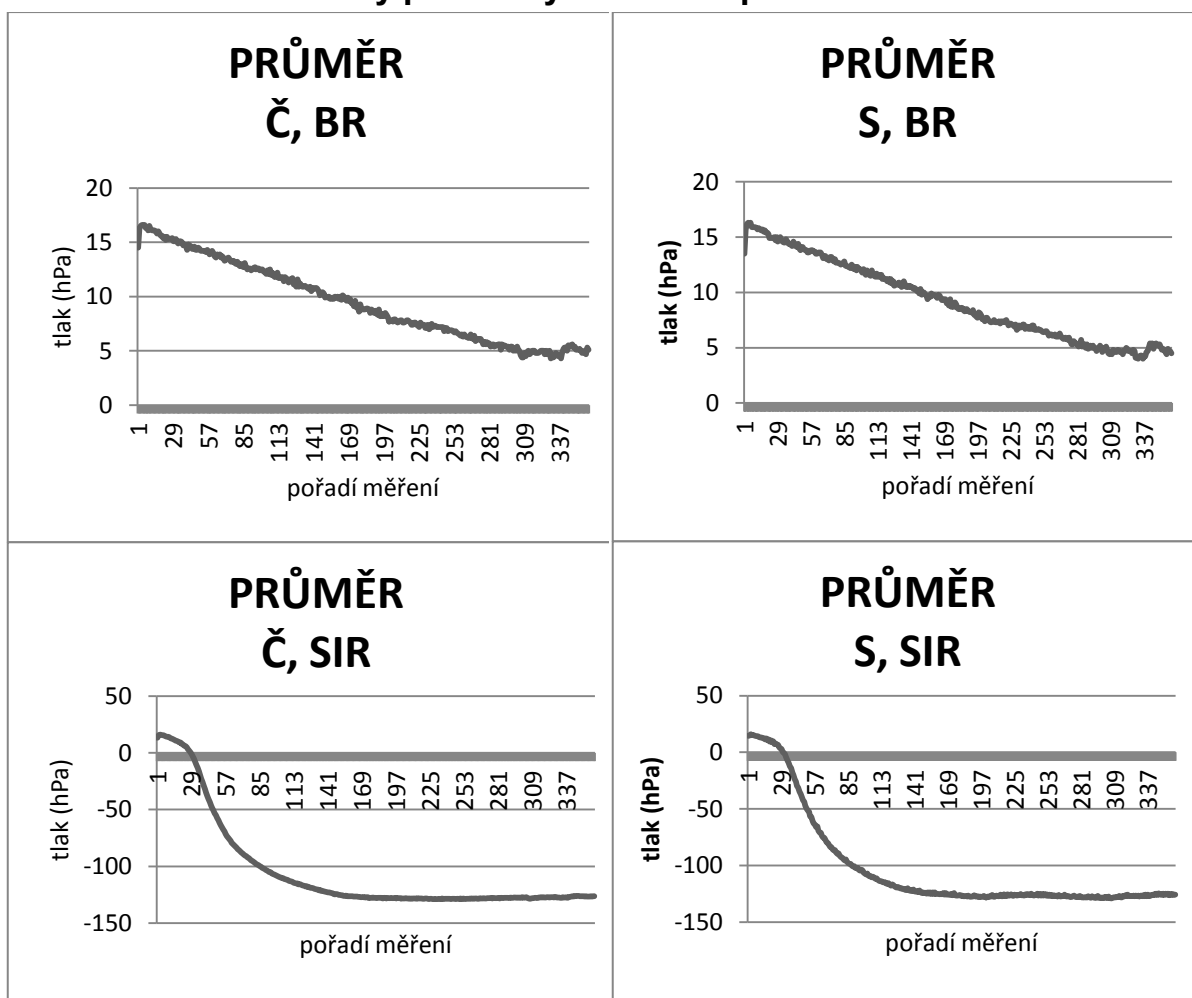
ISO 16072. Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. 2001. International organization for standardization, p. 19.

9. Přílohy

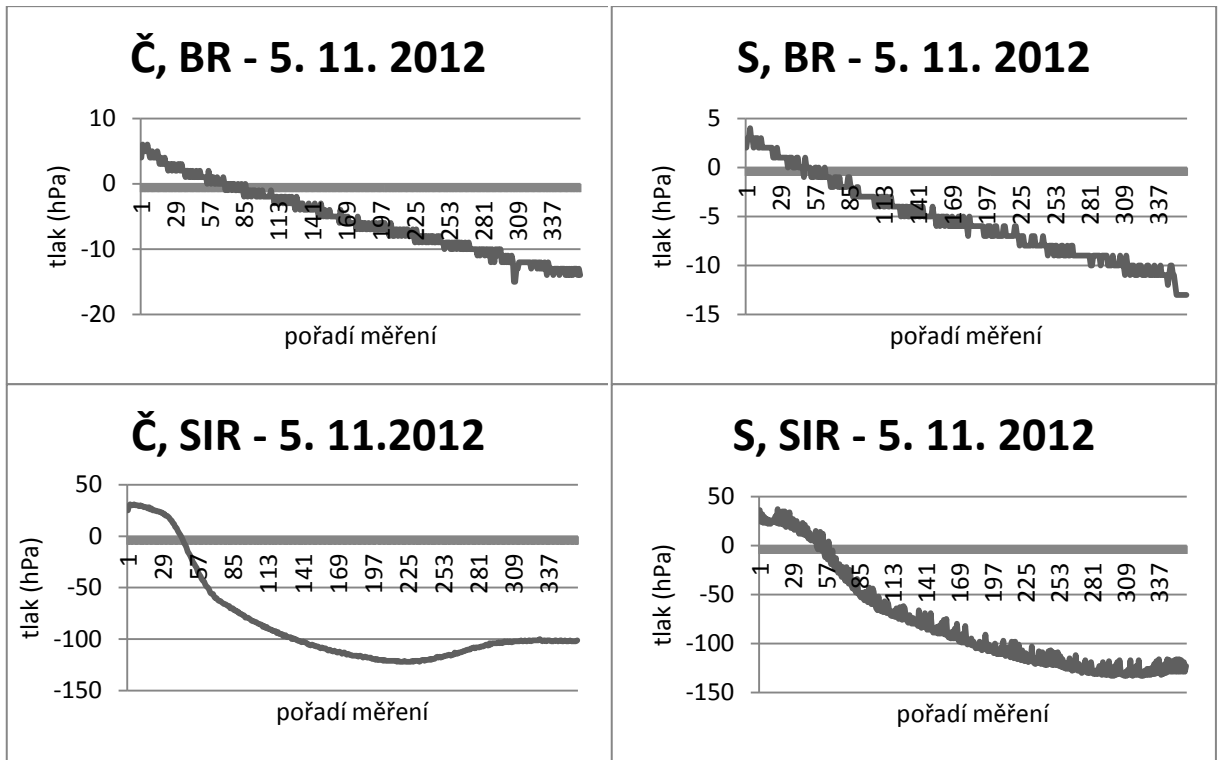
V názvu grafu je použito zkratk (BR) pro basální respiraci, (SIR) pro substrátem indukovanou respiraci, (Č) pro čerstvý vzorek a (S) pro skladovaný vzorek.

Hodnoty osy x (pořadí měření) odpovídají průběžným odečtům měřící hlavice. Každá jednotka je tak 1/360 doby měření, což při době měření 14 dní, jak tomu bylo v této práci, odpovídá 56-ti minutám.

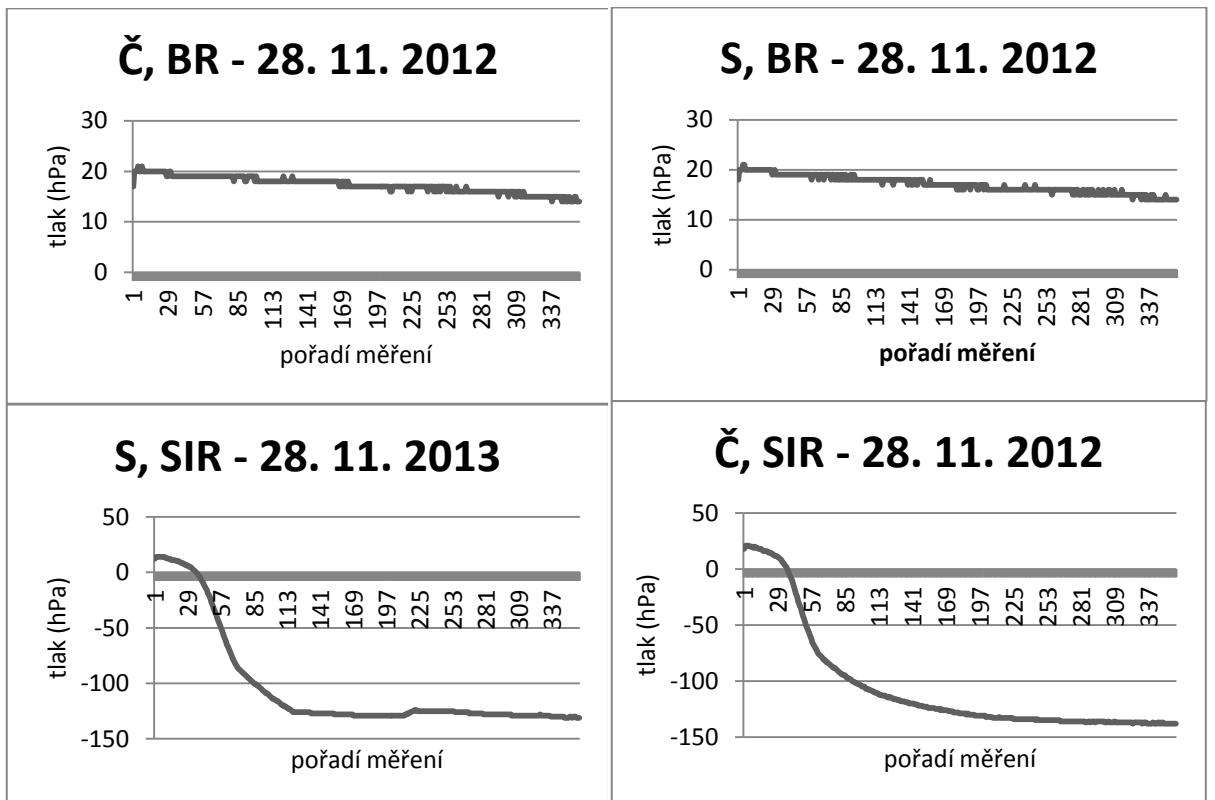
9.1. Příloha 1. Grafy průměrných hodnot průběhu měření



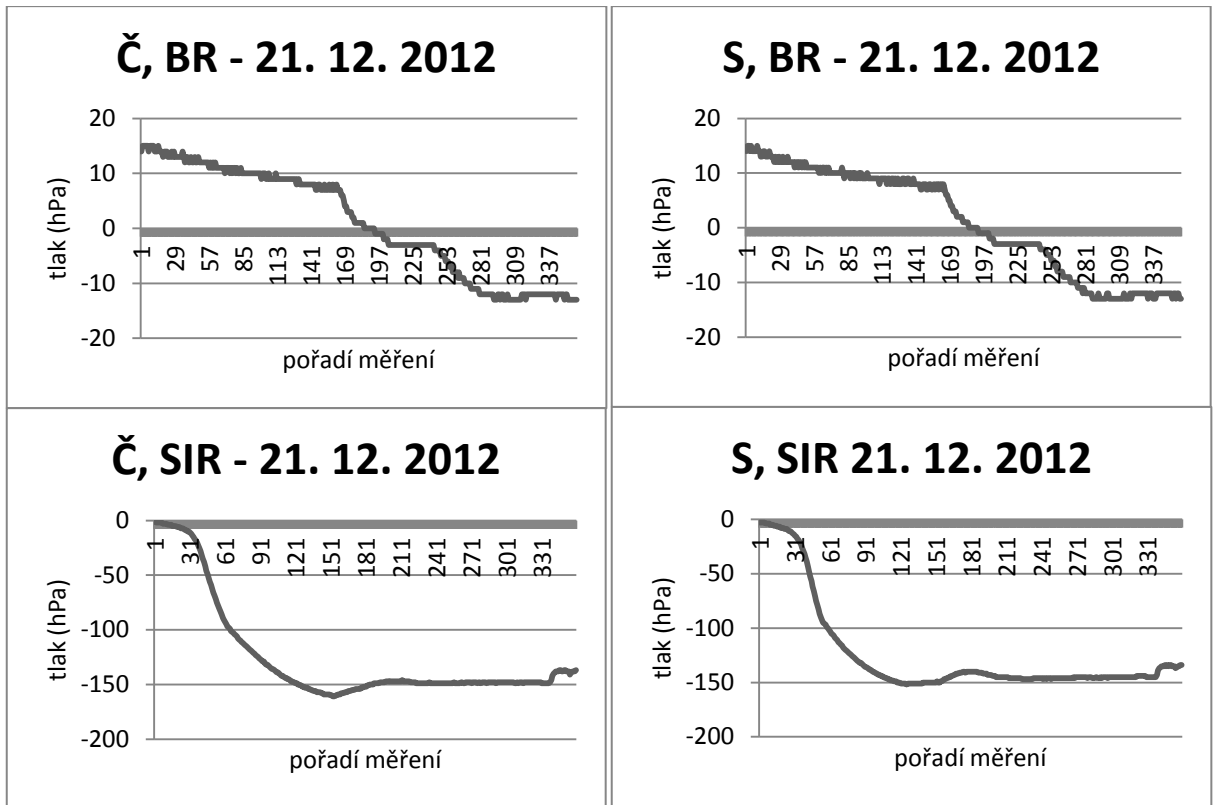
Grafy 1: průměrné průběhy půdní respirace



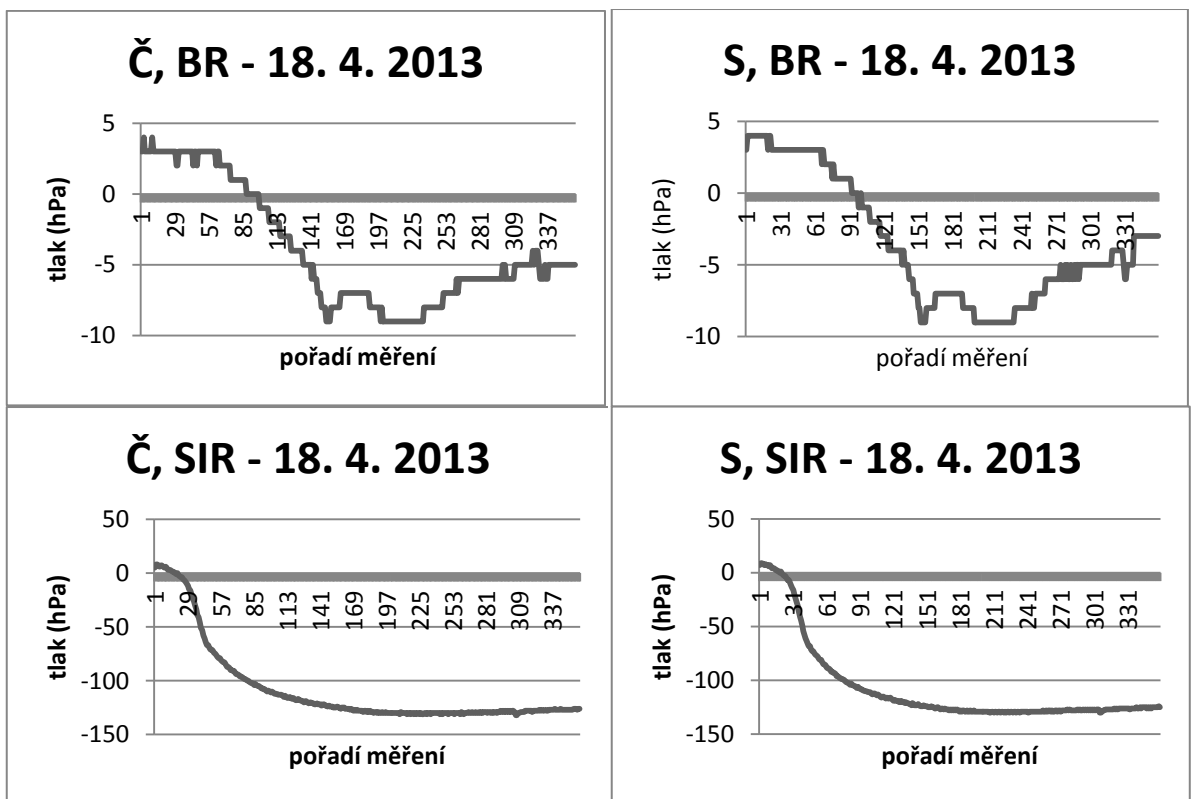
Grafy 2: průběhy 1. Odběru



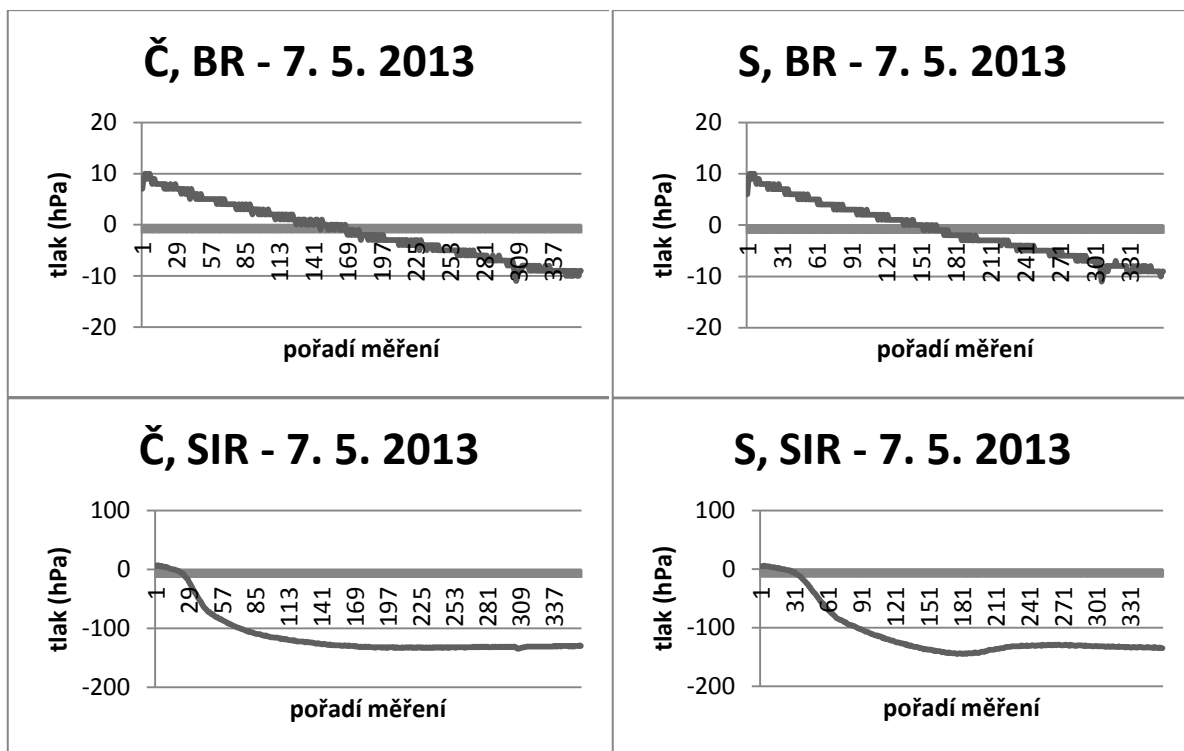
Grafy 3: průběhy 2. odběru



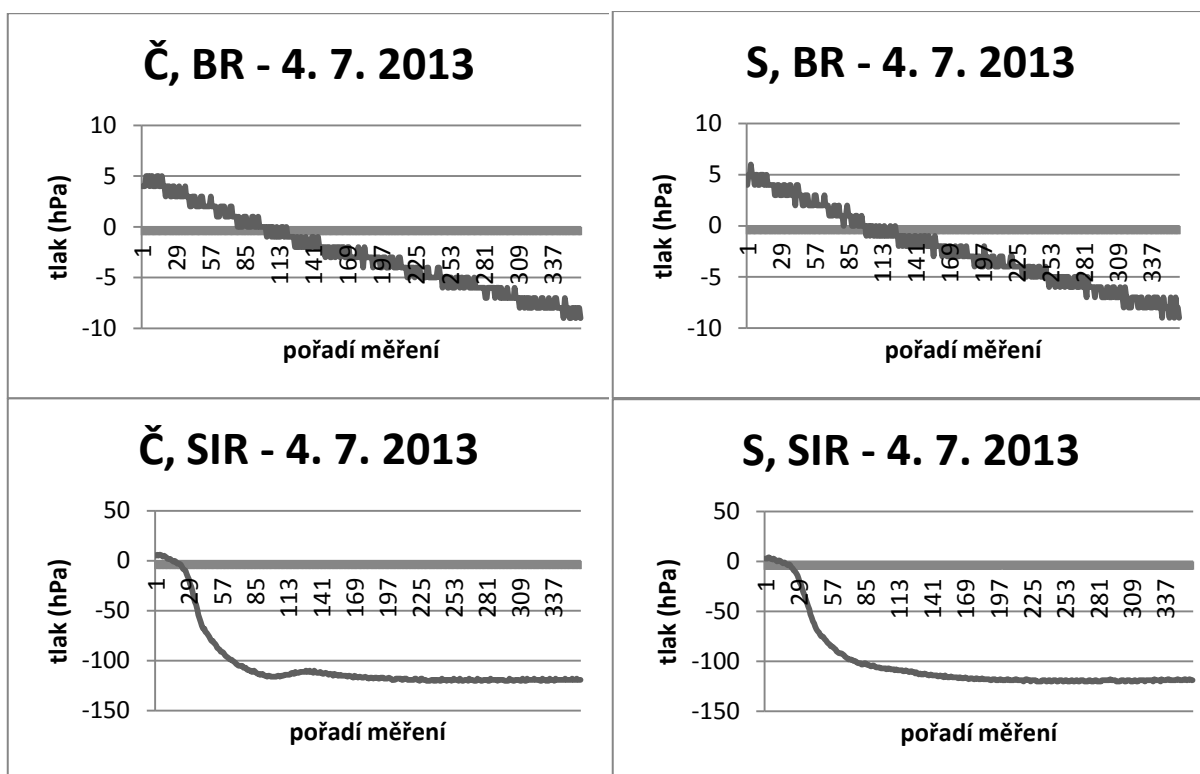
Grafy 4: průběhy 3. Odběru



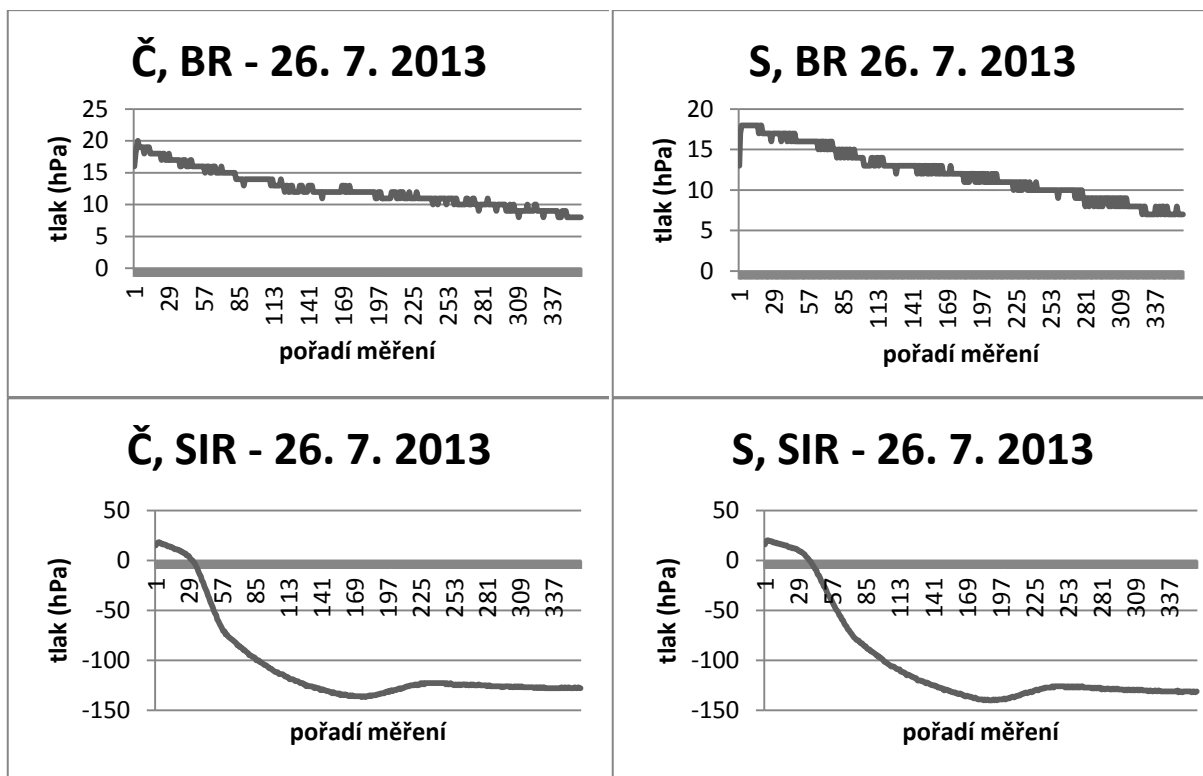
Grafy 5: Průběhy 4. odběru



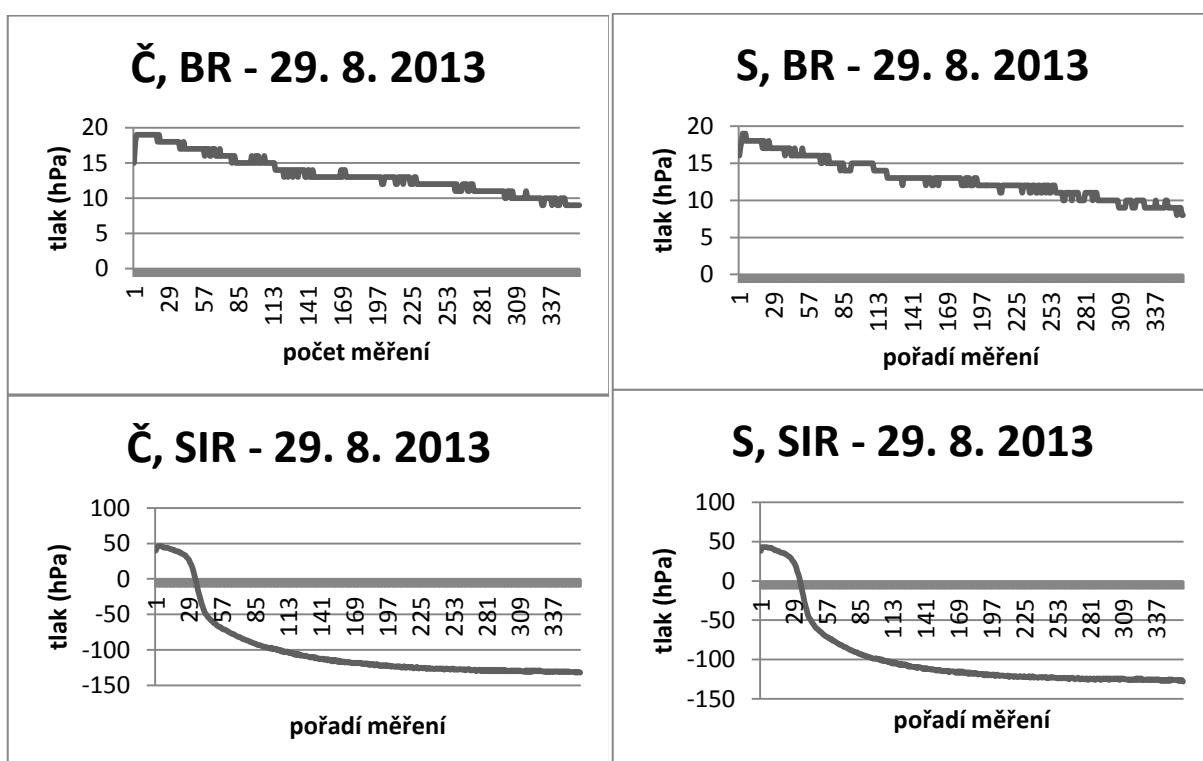
Grafy 6: Průběhy 5. Odběru



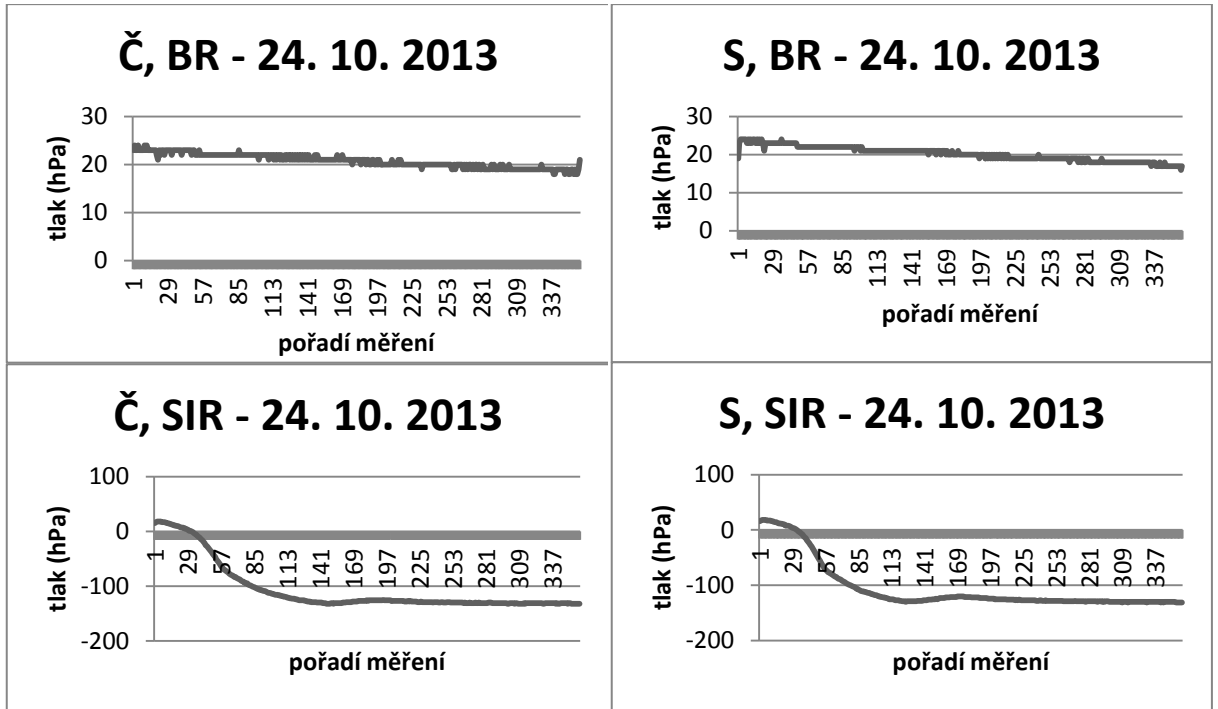
Grafy 7: Průběhy 6. odběru



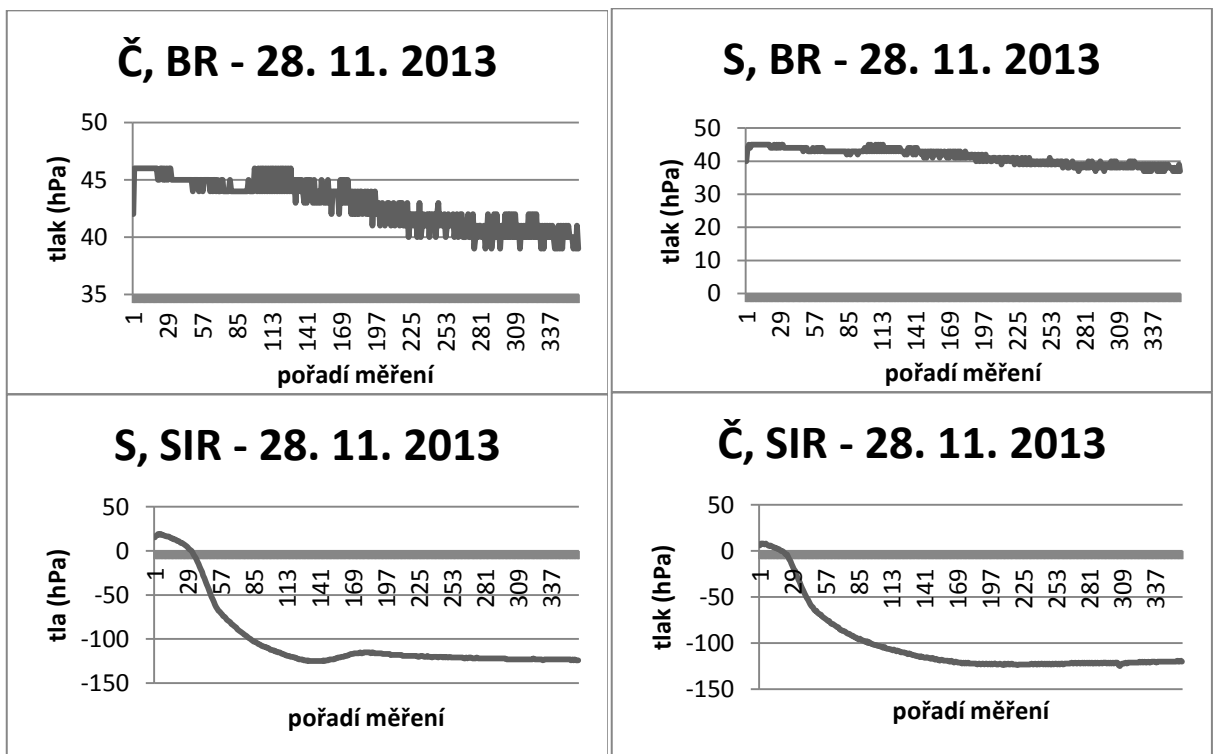
Grafy 8: průběhy 7. Odběru



Grafy 9: průběhy 8. odběru



Grafy 10: Průběhy 9. odběru



Grafy 11: průběhy 10. odběru

9.2. Příloha 2. Odvození výpočtu počtu potřebných vzorků půdy dle Tana (2003).

$$E = \pm t (V)^{0,5}$$

$$V = (S^2)/n$$

kde t = hodnota t-testu, V = odchylka, S^2 = součet (suma) čtverců a n = počet opakování (odběrů).

Požadované množství odběrů (n) určených akceptovatelnou chybou určujeme tímto vzorcem:

$$n = 4\sigma/E^2$$

případně

$$n = t^2 S^2 / E^2$$

kde n = počet vzorků a σ = směrodatná odchylka základního souboru a t = hodnota t-testu.

Směrodatná odchylka σ se vypočítá dle následujícího standardního vztahu:

$$\sigma = \sqrt{\Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

kde x_i = naměřená hodnota a \bar{x} = aritmetický průměr daných hodnot.

Součet (sumu) čtverců S^2 pak vypočteme analogicky rovnicí:

$$S^2 = \Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)$$