

Stanovení množství dusíku a uhlíku v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou

Michaela Bartuňková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela BARTUŇKOVÁ**
Osobní číslo: **T10588**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení množství dusíku a uhlíku v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se daného tématu (zaměřit se zejména na možnosti stanovení půdní biomasy).
2. Navrhnout a provést experimenty pro stanovení dusíku a uhlíku půdní mikrobiální biomasy fumigačně extrakční metodou.
3. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy BP.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Vědecké databáze (Web of Science), vědecká a odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

8. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 8. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Michaela Bartuňková

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 24. 5. 2013


.....

²⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Základní charakteristikou mikroorganismů tvořících půdní biomasu je obsah uhlíku a dusíku a změny poměru C:N v půdě odrážejí také změny v mikrobiální biomase. Stanovení celkové biomasy mikroorganismů v půdě většinou spočívá ve vyčíslení komponenty mikrobiální biomasy, nejčastěji uhlíku; nicméně je možné stanovit i další, např. dusík, síru nebo fosfor. Tyto komponenty musí být přítomny ve všech živých buňkách a po jejich odumření musí být buď rychle degradovány, nebo by se měly alespoň stát lehce extrahovatelné.

Ke stanovení celkového organického uhlíku (TOC) a celkového dusíku (TN) půdní biomasy, ve třech vzorcích zemědělských půd i ve směsném vzorku (zemina+kompost), byla využita fumigačně extrakční metoda. Fumigací chloroformem byly buňky mikroorganismů lýzovány a byla uvolněna čerstvá organická hmota. Stanovovaný dusík (TN) a uhlík (TOC) byly následně extrahovány síranem draselným z fumigovaných i nefumigovaných vzorků a rozdíl mezi nimi byl pak připisován dané komponentě mikrobiální biomasy.

Získané výsledky ukazují, že TOC v biomase testovaných půd se pohyboval v rozmezí 4,7-12,1 mg.25 g⁻¹ sušiny; TN pak v rozmezí cca 0,6-3 mg.25 g⁻¹ sušiny. Poměr C:N biomasy se pohyboval okolo 4-8:1.

U směsi zeminy s kompostem, kde byla inhibována respirace půdních mikroorganismů Anoxomerem, bylo prokázáno, že množství TOC a TN korelovalo se stavem půdní biomasy a může tedy signalizovat nepříznivé změny půdní organické hmoty.

Klíčová slova: fumigačně extrakční metoda, půdní mikrobiální biomasa, uhlík, dusík

ABSTRACT

The content of carbon and nitrogen is the basic characteristic of the soil microorganisms forming the biomass. The C:N ratio reflects with changes of soil microbial biomass. The determination of the total soil biomass includes analysis of carbon. Nitrogen, sulfur or phosphorus could be also determined. These components should be present in all living cells. These are rapidly degraded, or lightly extracted after cell death.

Fumigation extraction method was used for determination of the total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) in soil biomass. It was used three samples of agricultural soil and mixture of soil plus compost as well. The microorganism's cells were lysed by chloroform. Organic matter was released. The fumigated and non-fumigated samples were extracted by potassium sulphate. The TN and TOC were determined.

It was found that TOC was 4.7-12.1 mg.25 g⁻¹ dry weight and TN was 0.6-3 mg.25 g⁻¹ dry weight. The ratio of C:N in soil microbial biomass was about 4-8:1.

It was showed that amount of TOC and TN correlated with content of the soil biomass in the mixture of soil and compost incubated with Anoxomer. Soil microbial biomass could indicate a negative change of soil organic matter.

Keywords: fumigation-extraction method, soil microbial biomass, carbon, nitrogen

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Jančové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále patří mé poděkování paním laborantkám Věře Zbrankové a Monice Klofáčové.

Poděkování patří i mé rodině, především rodičům, bratrovi a příteli za podporu během celého studia.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PŮDA	13
1.1 VZNIK PŮDY	13
1.2 DĚLENÍ PŮDY	13
1.3 SLOŽENÍ PŮDY	14
1.3.1 Pevná složka.....	14
1.3.1.1 Anorganický podíl	14
1.3.1.2 Organický podíl	14
1.3.1.3 Půdní humus	15
1.3.2 Voda v půdě	15
1.3.3 Vzduch v půdě.....	16
1.4 VLIV ČLOVĚKA NA PŮDU	17
1.4.1 Půdní eroze.....	17
1.4.2 Hnojiva.....	17
1.4.3 Pesticidy	18
1.5 PŮDNÍ ORGANISMY	18
1.5.1 Půdní mikroorganismy	18
2 KOLOBĚH ŽIVIN V PŮDĚ	19
2.1.1 Koloběh uhlíku.....	19
2.1.2 Koloběh dusíku	20
3 METODY STANOVENÍ PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY	23
3.1 MĚŘENÍ PŮDNÍHO ATP.....	23
3.2 PŮDNÍ RESPIRACE	24
3.3 BARVENÍ A POČÍTÁNÍ MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK	24
3.4 ENZYMOVÁ AKTIVITA	25
3.4.1 Aktivita dehydrogenas	25
3.4.2 Aktivita arylsulfatasy	25
3.4.3 Aktivita ureasy	25
3.4.4 Aktivita invertasy	26
3.4.5 Aktivita celulasy.....	26
3.5 FUMIGACE EXTRAKCE	26
3.6 STANOVENÍ C.....	27
3.6.1 Dichromanová metoda	27
3.6.2 UV-persíranová metoda	28
3.6.3 Vysokoteplotní oxidace.....	28
3.7 STANOVENÍ N.....	28
3.7.1 Ninhydrin-reaktivní dusík	28
3.7.2 Celkový dusík.....	28
3.7.3 Mineralizace dle Kjeldahla	29
3.7.3.1 Coulometrické stanovení NH_4^+ s biamperometrickou indikací.....	29
3.7.3.2 Elektrody s přidavnými membránami – plynové elektrody.....	30
3.7.3.3 Acidimetrická titrace NH_4^+	31

3.7.3.4	Nesslerova metoda	31
II	PRAKTICKÁ ČÁST	33
4	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	34
5	CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	35
5.1	CHEMIKÁLIE.....	35
5.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	35
6	CHARAKTERISTIKA PŮDNÍCH VZORKŮ.....	36
7	METODY A POSTUPY	37
7.1	SUŠINA PŮDY.....	37
7.2	MAXIMÁLNÍ VODNÍ KAPACITA PŮDY (WHC _{MAX})	37
7.3	FUMIGAČNĚ EXTRAKČNÍ METODA	39
7.3.1	Fumigace	39
7.3.2	Extrakce.....	40
7.4	STANOVENÍ CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU	40
7.5	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU	41
8	VÝSLEDKY	42
8.1	CHARAKTERISTIKA PŮD	42
8.2	STANOVENÍ C V PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASE.....	43
8.3	STANOVENÍ N V PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASE.....	44
9	DISKUSE VÝSLEDKŮ	45
10	ZÁVĚR.....	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
	SEZNAM TABULEK.....	57

ÚVOD

Vznik půdy je do značné míry ovlivněn pěti různými faktory, kterými jsou podnebí, živé organismy, druh matečné horniny, topografie místa a čas, po který se základní materiál podrobuje formaci půdy. Díky těmto faktorům je půda definována jako dynamická přírodní složka mající vlastnosti odvozené od kombinovaného účinku klimatu, přírodních činností, působící na matečnou horninu přes časové období [1]. Půda je hlavní složkou ekosystému, její význam spočívá především v procesech, které probíhají jak uvnitř půdy, tak i na povrchu. Mezi tyto procesy řadíme rozklad a mineralizaci organické hmoty. Následkem těchto procesů dochází v půdě ke koloběhu důležitých látek. My se budeme zabývat uhlíkem a dusíkem, ale můžeme sem řadit i například fosfor a síru [2], [3].

Uhlík se vyskytuje všeobecně ve formě organické (uhlí, ropa, asfalt) a anorganické (soli kyseliny uhličitě) [4]. Organický uhlík můžeme zařadit mezi potravu pro půdní mikroorganismy. Fixujícím procesem je fotosyntéza pomocí, které se uhlík dostává do buněk [5]. Právě díky fotosyntéze dochází ke koloběhu uhlíku [3], kdy atmosféra je spojovatelem mezi koloběh uhlíku v moři a na pevnině [4].

Dusík se nachází z převážné části v atmosféře v elementární formě. Jedná se o biogenní prvek, tvoří aminokyseliny, které jsou součástí bílkovin. Přírodní nebo průmyslová hnojiva slouží k doplňování dusíku do půdy [4]. Koloběh dusíku nemůžeme brát izolovaně, je úzce spjat s koloběhem uhlíku a samotné přeměny dusíku, tak tedy ovlivňují koloběhy ostatních prvků [3].

Poměr C:N je důležitý ze dvou hlavních důvodů, (a) dochází k vysoké soutěživosti mezi mikroorganismy o dostupný půdní dusík ze zbytků, které mají vysoký C:N poměr přidaný do půdy, (b) C:N poměr je v půdě relativně konstantní, proto udržování C, tedy organické hmoty je omezeno výší půdního dusíku [1].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PŮDA

Jak už bylo řečeno, jedná se o hlavní složku ekosystému, která vzniká působením několika faktorů [1]. Je to heterogenní systém, který se skládá ze zemské kůry, živých organismů a jejich rozkladných produktů [3], z čeho nám vyplývá, že obsahuje živé a neživé složky [6]. Tyto složky jsou ve zdravé půdě navzájem propojeny a jsou schopny čelit nepříznivým vlivům zvenčí [7]. Je prostředím pro život organismů a zároveň jejich produktem [1]. Jelikož půda obsahuje, jak pevnou, tak i kapalnou a plynnou složku, řadíme ji z fyzikálního hlediska mezi třífázový disperzní systém [7].

1.1 Vznik půdy

Pedogeneze je dlouhodobý proces vedoucí ke vzniku půdy za pomoci 5 faktorů, kterými jsou podnebí, živé organismy, druh matečné horniny, topografie místa a čas [3], [8]. Tímto procesem vznikají půdní profily, jež se vytváří z půdních horizontů.

První horizont se skládá z organické hmoty, která se liší stupněm rozkladu živočišných a rostlinných materiálů, označuje se jako **horizont O** [1]. Další vrstva se skládá z rozloženého organického materiálu na povrchu [8] a má tmavé zabarvení, jedná se o **horizont A** [1]. Podpovrchový **B horizont** tvoří vlastní půdu, ve vlhkých oblastech se zde tvoří vrstvy s akumulací prvků a sloučenin, jako jsou železo, oxidy hliníku a silikátové jíly. **Horizont C** je nejméně zvětralá část [9], je mimo zóny velkých biologických aktivit a je obecně málo ovlivněná procesy, které jsou nad ní [1], vzniká rozpadem matečné horniny [8].

1.2 Dělení půdy

Podle způsobu vzniku se půdy dělí na **minerální**, ty vznikly zvětráváním, a horniny **organické**, které vznikly rozkladem a ukládáním organické hmoty [3].

Na tvorbě **minerální půdy** se podílí *fyzikální zvětrávání*, které je vyvoláno změnou teploty, vody, větru a působením vegetace. Druhým typem zvětrávání je *chemické zvětrávání*, při němž se uplatňuje voda, atmosférický kyslík a oxid uhličitý, dále produkty přeměn matečné horniny, což jsou rozpuštěné minerální látky [3].

V prostředí s nízkými teplotami, silnou kyselostí a zamokřením se vyskytují **půdy organické**, skládají se z organického materiálu, který je částečně rozložitelný [3].

1.3 Složení půdy

Půda se skládá z pevné složky, půdního roztoku, tedy kapalně složky a půdního vzduchu, což je plynná fáze. Obsahuje tři fáze a z tohoto důvodu ji můžeme označit jako třífázový disperzní systém [7].

1.3.1 Pevná složka

1.3.1.1 Anorganický podíl

Tvoří ho minerální částice, jejichž velikost je dána půdní texturou, dále jsou tyto částice charakterizovány tvarem a chemickým složením. Hrubší částice jako je štěrk, písek a hlína označujeme jako *primární minerály*. Nejhrubší částice mají písčité půdy, kde mají velikost větší než 2 mm, u hlinitých půd je velikost částic 0,02 mm. Nejjemnější částice, *sekundární minerály*, mají velikost částic 0,002 mm a označují se jako jílovité půdy [3].

Rozdíl mezi písčítými a jílovitými půdami je především ve schopnosti vázat živiny. U písčítých půd dochází ke snadnému vymývání živin, jsou tedy na ně chudé, kdežto u jílovitých půd dochází k zamokření a jsou schopné vázat velké množství živin. Jejich nevýhodou, ale je, že rostliny nemají dostatečný přísun vzduchu [3].

Matečná hornina ovlivňuje chemické složení minerálních částic a vstup živin do koloběhu, které se uvolňují zvětráváním hornin [3].

1.3.1.2 Organický podíl

Půdní organická hmota zahrnuje částečně rozpadlé a rozložené rostlinné a živočišné zbytky a jiné organické sloučeniny syntetizované půdními mikroorganismy. Takový materiál je neustále zpracováván a znovu syntetizován půdními mikroorganismy. V důsledku toho je organická hmota přechodnou složkou půdy, trvající pár hodin až několik stovek let [1]. Z tohoto plyne, že organický podíl je tvořen, jak organickou hmotou v různém stupni rozkladu, tak i živými organismy [3].

Obsah organického podílu je různý v závislosti na typu půdy; v chudých písčítých a zemědělských půdách je to 1 % organické hmoty a v rašelinných půdách je to až 80 % [3]. Organická hmota se s minerálními částicemi váže do granulí, které jsou z velké části zodpovědné za produktivitu půd a zvyšují množství vody, kterou půda může udržet [1].

Organická hmota, včetně rostlinných a živočišných zbytků, je hlavním zdrojem energie pro půdní organismy. Bez ní by se téměř zastavila biochemická aktivita. Je také zdrojem fosforu, síry a primárním zdrojem dusíku, to jsou tři prvky nezbytné pro růst rostlin [1].

1.3.1.3 Půdní humus

Půdní humus je přírodní produkt půdního prostředí. Vzniká v procesu *humifikace* jako těžko odbouratelný zbytek po biodegradaci rostlinných zbytků pomocí hub a bakterií [10].

Když je organický zbytek začleněn do půdy a je příznivý ekologický stav, půdní organismy jej začnou využívat jako zdroj uhlíku a energie. Rostlinné a živočišné polymery, včetně polysacharidů, ligninu a bílkovin jsou nejprve degradovány na menší organické molekuly. Ty jsou využívány organismy pro syntézu buněčných látek nebo jiných metabolických produktů, jsou dále degradovány na jednoduché anorganické látky, jako CO_2 , H_2O a NH_3 nebo podstupují enzymatické a chemické reakce za vzniku nových polymerů. Některé z těchto látek jsou relativně rezistentní k rozkladu a představují významný podíl půdního humusu [11].

Půdní humus je směs mnoha organických sloučenin, nicméně, *huminové kyseliny* a *polysacharidy* tvoří 90 % nebo i více. Půdní humus má obvykle černé nebo hnědé zabarvení. Je schopen zadržovat vodu a živiny. Malé množství humusu výrazně zvyšuje schopnost podporovat růst rostlin [1].

1.3.2 Voda v půdě

Voda v půdě zaplňuje volné prostory mezi pevnými částicemi tzv. *póry*, které mají různý tvar i velikost. Je velmi důležitou složkou půdy, jelikož v ní probíhají různé reakce, na jejím množství závisí transport rozpuštěných látek, pH prostředí, kvalita půdního vzduchu v pórech. V půdě je vázaná různými silami, jejichž velikost závisí na velikosti pórů a částic. Čím nižší velikost pórů, tím vyšší síla [3].

Voda v půdě je označována jako *půdní roztok*. Ten obsahuje malé, ale významné množství rozpuštěných anorganických a organických sloučenin, z nichž některé obsahují prvky, které jsou nezbytné pro růst rostlin (C, N, P). Další vlastností půdního roztoku je jeho pH, čili kyselost nebo zásaditost. Mnoho chemických a biologických reakcí je závislých na aktivitě vodíkových kationtů (H^+) a hydroxylových aniontů (OH^-) v půdě. Tyto

hodnoty ovlivňují rozpustnost a tím i dostupnost některých prvků, s vyšším pH klesá dostupnost manganu, železa a fosforu, s nižším pH roste toxicita hliníku [1], [3].

Optimální vlhkost je důležitá jak pro růst rostlin, tak i pro rozvoj a růst mikroorganismů. Nejsnadněji je voda dostupná po dlouhotrvajícím dešti, do spodních vrstev odtéká voda z velkých pórů a v půdě zůstává vázaná kapilárně v menších pórech. Jako optimální vlhkost se označuje vlhkost, kdy je zaplněno 50 – 80 % kapilárních pórů, tehdy je voda stále dostupná. Bodem vadnutí říkáme, že voda již není dostupná, v půdě je vázaná velmi pevně. Z čehož vyplývá, že pevnost vazby závisí na zrnitosti půdy, pórech a obsahu organické hmoty [3].

1.3.3 Vzduch v půdě

Půdní vzduch stejně jako okolní atmosféra se skládá z N_2 , O_2 a CO_2 . Díky omezenému pohybu a difúzi není složení konstantní jako ve volném prostoru [3]. Nicméně, půdní vzduch se od atmosférického v několika ohledech liší. Za prvé, složení půdního vzduchu je poměrně dynamické a výrazně se liší od místa k místu v dané půdě. V místních kapsách jsou některé plyny spotřebovávány kořeny rostlin a mikrobiální reakcí, zatímco jiné jsou uvolněny, čímž se významně mění složení půdního vzduchu. Za druhé, půdní vzduch má obvykle vyšší vlhkost než atmosféra. Za třetí, koncentrace oxidu uhličitého v půdním vzduchu je často několik set krát vyšší ve srovnání s koncentrací CO_2 běžně se vyskytující v atmosféře [1]. Koncentrace kyslíku může poklesnout pod 18 obj. %, v extrémních případech může dosahovat až nulových hodnot, v tomto případě koncentrace CO_2 narůstá na 10 obj. % z 1-2 obj. %, což může mít za následek akumulaci těkavých organických látek, methanu nebo sulfanu [3].

Obsah a složení půdního vzduchu jsou určeny převážně obsahem vody v půdě, jelikož vzduch zabírá ty půdní póry, které nejsou naplněny vodou.

V malých pórech je vázaná především kapilární voda, obsah vzduchu je nízký, rychlost difúze vzduchu dovnitř a ven z půdy se s atmosférou ustaluje pomalu. Výsledkem je vysoká hladina oxidu uhličitého a nízká hladina kyslíku, což jsou neuspokojivé podmínky pro optimální růst rostlin a pro některé půdní mikroorganismy. Tento příklad ilustruje vztah mezi fyzikálními vlastnostmi půdy a složení půdního vzduchu [1].

1.4 Vliv člověka na půdu

Člověk půdu ovlivňuje zejména svou zemědělskou činností, ke které potřebuje půdu získanou vykácením lesů, tím dochází k půdní erozi. Dále pro tuto činnost využívá hnojiva a pesticidy, kterými ovlivňuje vlastnosti půdy a život v ní [8].

1.4.1 Půdní eroze

Jedná se o přirozený proces, při kterém dochází k transportu částic za pomoci dvou činitelů, kterými jsou voda a vítr. K odnosu půdních částic může docházet za pomoci dešťových kapek, které dopadem částici obalí a odnesou. Při přívalových deštích dochází ke splachu, v těchto případech mluvíme o *vodní erozi*. Na půdní částice může také působit vítr, který proudí na povrchu a může odnášet sypké částice, tento jev označujeme jako *větrnou erozi* [12].

Tento proces probíhá v malé míře, ale pokud je oblast intenzivně využívána člověkem, tak se eroze zrychluje a pak dochází ke ztrátě humusu, snížení mocnosti ornice, ovlivnění mikrobiálního života v půdě, což způsobuje snížení kvality půdy a tím snížení výnosu zemědělských plodin [13]. Dalším nepříznivým účinkem eroze půdy je zanesení vodních toků a nádrží, znečištění ovzduší a má to také nepříznivý vliv na klíčící rostliny [12].

1.4.2 Hnojiva

Jsou přidávána především ve formě kombinovaných minerálních hnojiv jako zdroj živin pro rostliny, tím by měla být úrodnost půdy zvýšena. Kombinované minerální hnojivo je přípravek, v němž jsou sloučeniny prvků dusíku, fosforu a draslíku v určitém poměru [10]. Dále jako hnojivo mohou být využity kaly z čistíren odpadních vod [13] nebo odpady z živočišné výroby, např. chlévská mrva [10]. Řadíme je mezi organická hnojiva, která musí být biodegradována na jednoduché anorganické látky [10]. Obsahují velké množství biogenních prvků (dusík, fosfor), stopové prvky, ale i toxické látky [13].

Při nadměrném hnojení a tedy nadbytečném dodávání živin rostlinám nejsou tyto látky rostlinami zcela využívány, ale jsou ukládány do půdy. Při závlaze půdy se hnojiva dostávají do podzemních vod a při vysoké vodní erozi i do povrchových vod, kde sloučeniny fosforu spolu se sloučeninami dusíku způsobují eutrofizaci vod [13].

1.4.3 Pesticidy

Pesticidy jsou chemické látky sloužící k hubení plevelů a k ochraně rostlin před škůdci [6]. Aplikují se přímo na rostlinu nad povrchem půdy a i přesto se velká část chemické látky dostává do půdy. Odtud se mohou chemikálie odpařovat do atmosféry bez chemické přeměny, mohou podstoupit chemické přeměny jak na povrchu, tak uvnitř půdy, adsorbovat se na jílovitých částicích a humusu [1], čímž se ohrožují biologické pochody v půdě [13].

1.5 Půdní organismy

Mezi půdní organismy patří rostliny i živočichové, kteří jsou zodpovědní za degradaci a syntézu organického materiálu v půdě. Větší část půdních organismů patří k flóře. Přesto roli dalších organismů nesmíme opomíjet, a to zejména ve stádiích rozkladu organické hmoty. Většina půdních organismů je tak malá, že mohou být vidět pouze pomocí mikroskopu, říkáme jim *mikroorganismy*. Aktivita některých větších organismů, jako jsou hlodavci, mravenci, žížaly, má významný vliv na fyzikální vlastnosti půdy [1].

1.5.1 Půdní mikroorganismy

Velká část mikroorganismů tvoří v půdě živou biomasu a díky jejich přítomnosti probíhají v půdě všechny důležité biochemické procesy [2]. Celková biomasa mikroorganismů v půdě je definována jako žijící část organické hmoty, jako organismy menší než $10 \mu\text{m}^3$. Mikrobiální biomasa je považována za dobrý indikátor změn vlastnosti půd. Je měřítkem kvantity organismů a její pokles může signalizovat nepříznivé změny půdní organické hmoty [14]. Aktivita mikroorganismů v půdě je ovlivněna změnou vnějších podmínek jako jsou změny teploty a vlhkosti [6].

Vyšší výskyt mikroorganismů můžeme pozorovat v blízkosti kořenů rostlin, kde je zvýšený obsah uhlíkatých látek. Tento obsah se navyšuje díky kořenům rostlin, které spotřebovávají živiny a kyslík a vylučují CO_2 a další anorganické a organické sloučeniny [3].

Zdrojem uhlíku a energie pro heterotrofní mikroorganismy je rostlinný opad, z něhož získávají i biogenní prvky. Pokud je biogenních prvků dostatek, tak je vylučují v anorganické formě do půdního roztoku, odtud si je mohou brát rostliny pro své potřeby. Z tohoto popisu nám musí být jasné, že mikroorganismy jsou důležité z hlediska koloběhu důležitých biogenních prvků, zejména C, N a P [2].

2 KOLOBĚH ŽIVIN V PŮDĚ

Rostliny přijímají živiny ve formě anorganických iontů, které zabudovávají do biomasy, která je zdrojem potravy pro heterotrofní organismy. Mezi tyto živiny řadíme už několikrát zmiňovaný uhlík, dusík, síru a fosfor. Uhlík, dusík a síra mohou do svých cyklů vstupovat ve své plynné formě z atmosféry. Po smrti organismů musí být živiny z organické hmoty nějakým způsobem opět uvolněny a zpřístupněny pro rostliny, k tomu slouží *mineralizace*, což je přeměna organické hmoty na anorganickou [3].

2.1.1 Koloběh uhlíku

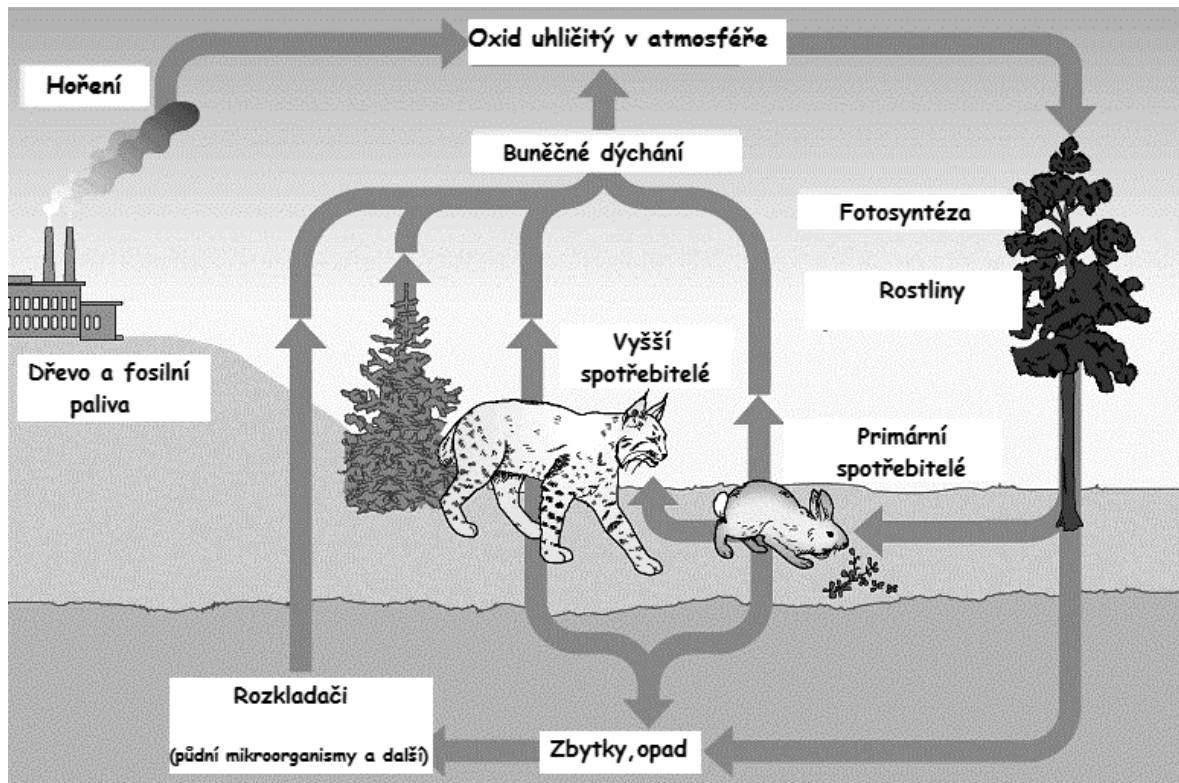
Organická hmota se rozkládá na oxid uhličitý, který je jedním z bezprostředních rozkladných produktů. Je to známka toho, že uhlík je společným meziproduktem a je zapojen ve všech životních procesech [1].

Heterotrofní organismy nejdříve rozkládají snadno rozložitelnou organickou hmotu. Potom se rozklad zpomalí a rozkládají se hůře rozložitelné látky jako je celulóza, hemiceľulosa, lignin a fenolické látky. Produkty těchto reakcí, se z části ukládají do mikrobiálních těl a také vznikají další metabolity, které se mohou dále rozkládat nebo naopak, z nich může vznikat stabilní organická hmota složená z aromatických látek a alifatických uhlovodíků s dlouhým řetězcem [3].

Rozklad organické hmoty může probíhat dvěma způsoby:

- a) *Aerobně*, to je za přítomnosti kyslíku. Organická hmota se pomocí mikroorganismů rozkládá na oxid uhličitý a vodu [3].
- b) *Anaerobně*, což je při nedostatku kyslíku a nedojde k úplné mineralizaci [3].

Průběh cyklu uhlíku je zakreslen na následujícím obrázku /viz Obr. 1/. Zde můžeme vidět, že rostliny přijímají CO_2 z atmosféry a za využití sluneční energie tvoří organické látky. Člověk a ostatní vyšší živočichové získávají energii z tělesných tkání a z rostlinných produktů, odpady a zbytky vrací do půdy. Makro a mikroorganismy stráví tyto organické materiály, uvolňují živiny pro rostliny a jsou uvolňovány CO_2 a humus jako relativně stabilní produkty. Celkový CO_2 se uvolňuje do atmosféry, kde je opět k dispozici pro rostliny a následnou fotosyntézu. Tento cyklus ukazuje, že uhlík je ústředním bodem energetických transformací [1].

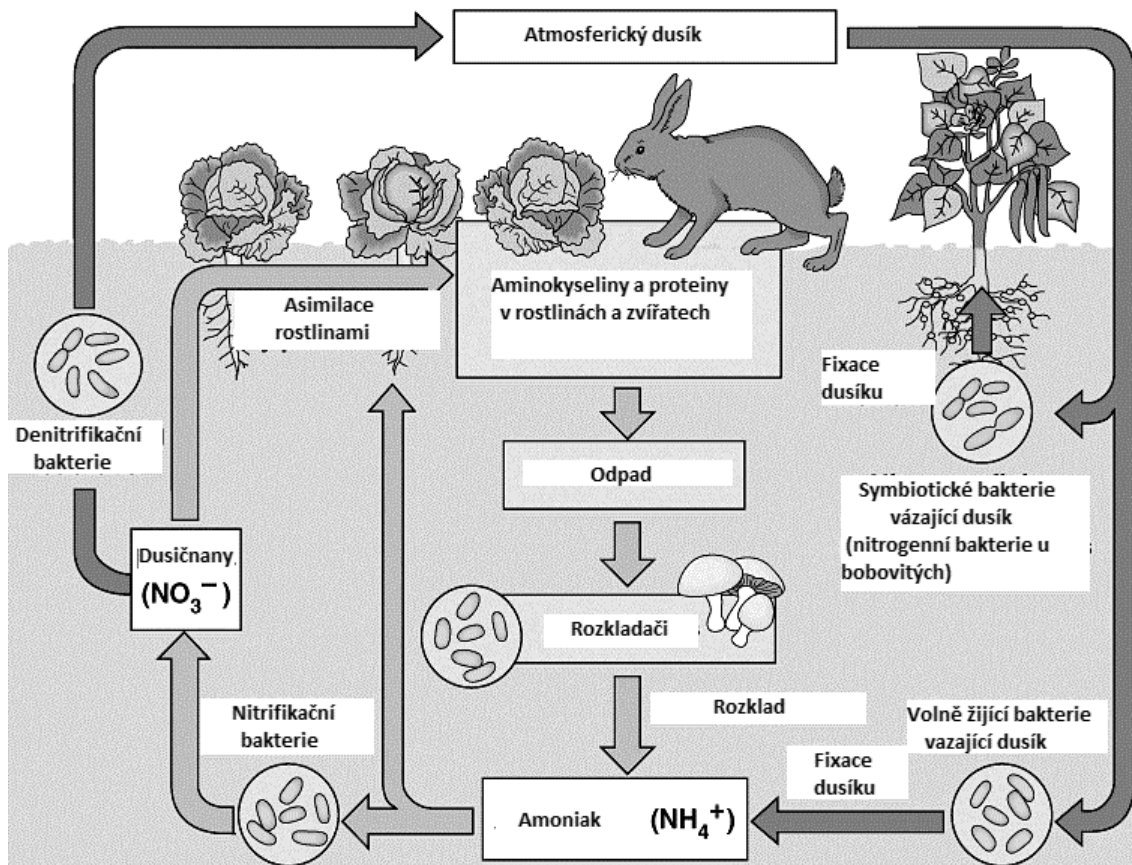


Obr. 1: Koloběh uhlíku [15]

Většina rozkladných procesů organické hmoty probíhá díky přítomnosti mikroorganismů, které potřebují pro svou funkci přísun živin, zejména N z anorganických látek v půdě, C a energii. Je tedy zřejmé, že koloběh uhlíku je propojen s koloběhy ostatních živin, proto jej nemůžeme sledovat odděleně [3].

2.1.2 Koloběh dusíku

Důležitým významným koloběhem je koloběh dusíku /viz Obr. 2/. V půdě dochází k jeho různým přeměnám na různé ionty a s těmito změnami dochází i ke změně pH půdního prostředí, čímž může být ovlivněn cyklus ostatních prvků. Stejně jako CO_2 v cyklu uhlíku i dusík vstupuje do půdy z atmosféry, ale také s rostlinnými a živočišnými zbytky a produkty [3].

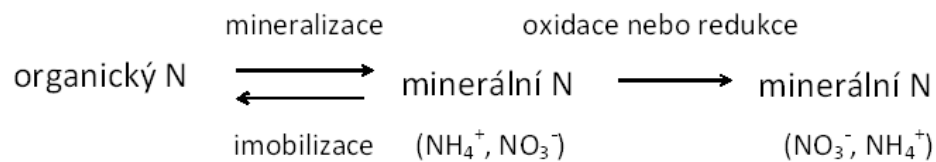


Obr. 2: Koloběh dusíku [16]

Souhrnně lze říci, že v půdě probíhají tři typy procesů přeměn dusíku /viz Obr. 3/: mineralizace, imobilizace a oxidace nebo redukce. V procesu mineralizace dochází k převodu organického dusíku na anorganický dusík za účasti půdních organismů a enzymů. Amoniak uvolněný mineralizací vstupuje do různých procesů, nejvíce však jako hlavní zdroj do nitrifikace. Nitrifikace je oxidační proces, kdy amonný dusík je postupně oxidován převážně autotrofními mikroorganismy přes dusitany až na dusičnany. Tento proces je v mnoha půdách klíčovým procesem, neboť transformuje relativně nepohyblivou amonnou formu na velmi pohyblivou dusičnanovou formu dusíku. Redukčním procesem je pak denitrifikace, při které jsou dusičnany za přítomnosti organických látek redukovány přes oxidy dusíku až na elementární dusík [17].

Proces imobilizace přispívá k ochraně před migrací dusíku z půdy. Z fixovaného dusíku je významnější imobilizace biologická, při níž minerální dusík vstupuje do biomasy rostlin a půdních mikroorganismů. Všechny procesy probíhají v půdě současně a vzájemně na sobě závisí. To jestli převáží v půdě mineralizace nebo naopak imobilizace závisí na

zásobení půdy dusíkem, na poměru C:N v rostlinné biomase a podmínkách prostředí[1], [3].



Obr. 3: Procesy přeměn dusíku [3]

Půdní mikroorganismy jsou schopny využívat organický i anorganický dusík, jejich koncové produkty metabolismu mohou být ve formě amoniaku i nitrátů. Umí vylučovat enzymy, které umožňují rozštěpení složitějších organických sloučenin na amonné ionty. Jsou také přizpůsobeny příjmu molekulárního dusíku, dusíku ve formě aminokyselin a nitrátů [3].

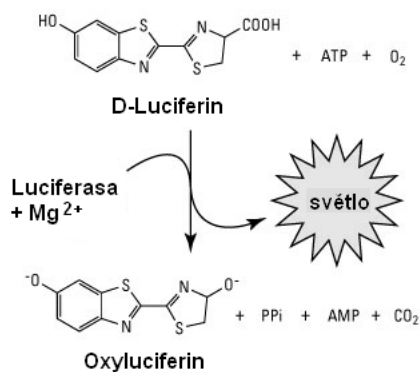
3 METODY STANOVENÍ PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY

Jak již bylo uvedeno výše, mikrobiální biomasa může být definována jako část organické hmoty v půdě, která je tvořena živými mikroorganismy $<10 \mu\text{m}^3$. Celková biomasa je měřítkem kvantity mikroorganismů. Půdní mikroorganismy jsou vhodným indikátorem půdní kvality a to díky jejich množství, všudypřítomnosti a důležité roli v potravních řetězcích a cyklech živin. Metod, kterými lze sledovat biologické pochody v půdě, je využívána v dnešní době celá řada. Některé jsou založeny na barvení a počítání mikrobiálních buněk, jiné zase na fyziologických parametrech jako je ATP, enzymové aktivity, respirace a výdej tepla. Pro svou poměrně malou technickou i časovou náročnost je možné aplikovat také extrakční techniky. Stanovení většinou spočívá ve vyčíslení komponenty mikrobiální biomasy, nejčastěji uhlíku. Nicméně, v extraktu získaném z půdního prostředí po usmrcení a lýzi mikrobiálních buněk je možno kvantitativně stanovit vedle organického uhlíku také celkový dusík, fosfor anebo další látky [18].

3.1 Měření půdního ATP

Adenosintrifosfát (ATP) je významnou energetickou sloučeninou v metabolismu všech živých organismů. Tato látka je přítomna v živých organizmech, nikoliv v organizmech mrtvých nebo v neživé hmotě, a právě proto je možné ji využít pro stanovení aktivity mikroorganismů [18]. ATP může být extrahován z buněk a jeho obsah se stanoví systémem luciferin-luciferasa /viz Obr. 4/. Obsah ATP v půdě, úzce souvisí s ostatními indexy biomasy, např. s C, N a může sloužit jako nezávislý odhad obsahu půdní biomasy [19].

Stanovení může být ovlivněno celou řadou problémů, mezi které patří: nedostatečná účinnost extrakce, přítomnost ATPas ve vzorcích půd nebo sorbce ATP na koloidní částice půdy [19].



Obr. 4: Reakční systém luciferin – luciferasa [20]

3.2 Půdní respirace

Respirační aktivita je nejčastěji používaným měřítkem aktivity půdní mikroflóry. Udává mineralizační aktivitu půdy ať již bez přidavku substrátu (bazální respirace) či s přidavkem substrátu (substrátem indukovaná respirace). Půdní respirace tedy probíhá vlivem mikrobiální aktivity, kdy se spotřebovává kyslík (O₂) a uvolňuje se oxid uhličitý (CO₂), jedná se tedy o výměnu plynů [18].

Za normálních podmínek existuje ekologická rovnováha mezi půdními organizmy a jejich aktivitou. Jedná se o tzv. bazální respiraci půdy. Pokud dojde k porušení rovnováhy (např. přidavkem degradovatelné organické sloučeniny) počet mikroorganismů naroste, tím i jejich aktivita a dojde i ke změně půdní respirace. Půdní respirace může být ukazatel půdní mikrobiální biomasy, rozkladu látek a kontaminantů v půdě [18].

Způsobů stanovení je více, je možno zachytávat CO₂ v roztoku hydroxidu sodného s následnou titrací a kolorimetrickým a respirometrickým měřením O₂, kdy tato metoda není tolik přesná a je časově náročná. Poloautomatizované techniky využívají plynovou chromatografii nebo infračervenou plynovou analýzu [21].

3.3 Barvení a počítání mikrobiálních buněk

Jelikož většina buněk a jejich vnitřních struktur je průhledných a bezbarvých, tudíž neabsorbují žádné světlo ve viditelné oblasti světla (VIS) a jsou prakticky nepozorovatelné, je nutné tyto buňky obarvit. Barvení se provádí buď pomocí vodných roztoků organických barviv, kdy se často jedná o soli (barviva je možno pak podle přítomnosti iontů dělit na bazická a kyselá – u bazických je barevnou složkou kationt a u kyselých aniont) [23], nebo pomocí fluorescenčních barviv (fluorochromy) [22], [23]. Pro celkové stanovení mikrobi-

álních buněk i při sledování určité skupiny mikroorganismů se často využívá právě fluorescenčního mikroskopu, který je vybaven intenzivním světelným zdrojem. Fluorescence nastává po absorpci záření určitých vlnových délek (250 až 750 nm) atomy či molekulami s následnou emisí záření o jiné vlnové délce [22].

3.4 Enzymová aktivita

Aktivita půdních enzymů může být ovlivněna změnami podmínek v půdě, jako je změna teploty, kdy se zvyšující se teplotou roste rychlost enzymatické reakce. Jelikož enzymy pro svou funkci potřebují optimální pH, většinou je to neutrální či mírně kyselé pH, tak i touto změnou můžeme aktivitu ovlivnit. Dále aktivitu enzymů ovlivňují půdní reakce, obsah živin a organické hmoty, vlhkost, vegetace, zpracování a hnojení [24].

3.4.1 Aktivita dehydrogenas

Dehydrogenasy jsou enzymy patřící do třídy oxidoreduktas, které katalyzují redoxní reakce – přenášejí vodík nebo kyslík, nebo pouze elektrony z jedné látky na druhou. Jsou součástí enzymatického systému mikroorganismů a v půdě se podílí na oxidaci organických látek [14], [24]. Výsledek testu dehydrogenasové aktivity signalizuje metabolickou aktivitu půdních organismů.

Metodika stanovení spočívá v inkubaci vzorků zeminy (po přidavku CaCO_3) s 2,3,5-trifenylnitrotetrazolium chloridem po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě [14], [25]. Po extrakci vzniká trifenyl forman, který je stanovován spektrofotometricky [14], [24].

3.4.2 Aktivita arylsulfatasy

Na koloběhu síry v půdě se podílejí enzymy sulfatasy. Tyto enzymy jsou mikrobního původu a jejich činností je mineralizace sloučenin, které obsahují síru a také hydrolyzují organické sírany. Nejznámější a nejsledovanější sulfatasou je arylsulfatasa, jejíž aktivitou je z 1,4-nitrofenylsulfátu draselného uvolňován nitrofenol, který je po extrakci a přidavku NaOH stanoven fotometricky při vlnové délce 420 nm [14].

3.4.3 Aktivita ureasy

Ureasa je stabilní půdní enzym, který je používán při hodnocení úrodnosti půdy. Jedná se o enzym podílející se na hydrolýze močoviny za vzniku NH_3 a CO_2 . Tímto způsobem se zpřístupňuje dusík do půdního prostředí a je zařazen do koloběhu dusíku [14].

Po přidavku močoviny ke vzorkům vlhké půdy je ke vzniklému amonnému iontu přidán salicylan sodný s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí. Vzniklý produkt je vhodný k fotometrickému stanovení při vlnové délce 660 nm [14], [24].

3.4.4 Aktivita invertas

V koloběhu uhlíku se uplatňuje enzym invertasa. Ten se stanovuje jako množství glukosy vzniklé hydrolyzou dodané sacharosy působením daného enzymu během inkubace [14].

3.4.5 Aktivita celulasy

Celulasa je komplex enzymů, který produkují jen některé mikroorganismy. Slouží ke štěpení celulosy na základní glukosové jednotky. Metoda stanovení aktivity celulasy je založena na váhovém úbytku celulosy (filtračního papíru) po inkubaci v půdních vzorcích [14].

3.5 Fumigace extrakce

Fumigačně extrakční metody se využívá ke stanovení celkové biomasy mikroorganismů v půdě. Výhodou metody je stanovení přímo ve vzorku bez nutnosti separace mikroorganismů. Fumigací, účinkem par chloroformu po dobu 24 h, se nejprve lýzují buňky mikroorganismů a uvolňuje se čerstvá organická hmota. Různé komponenty (nejčastěji uhlík) mikrobiální biomasy jsou poté extrahovány z fumigovaných i nefumigovaných vzorků a rozdíl mezi nimi se připisuje právě dané komponentě mikrobiální biomasy [19].

Fumigace půdy chloroformem (CHCl_3) a následná extrakce různými roztoky solí se používá ke stanovení celkového organického uhlíku, celkového dusíku, anorganického i organického dusíku, ninhydrin-reaktivního dusíku, celkové síry, fosfátů nebo celkového fosforu půdní mikrobiální biomasy [26]. Tato metoda byla poprvé použita ke stanovení S mikrobiální biomasy v roce 1981 (Saggar et al.). Rok poté bylo metody využito pro stanovení P (Brookes et al., 1982) a poté následovalo stanovení N biomasy (Brookes et al., 1985). I když je v dnešní době stanovení celkového C mikrobiální biomasy obecně považováno za nejspolehlivější a nejčastěji používanou metodu pro stanovení změn vlastností půd, tak fumigačně extrakční metody pro stanovení C bylo použito až v roce 1987 (Vance et al.) [19].

Biomasa je mnohem citlivější indikátor na změny půdních podmínek, než je například celkový obsah půdních organických látek. Biomasa může sloužit jako „časné varování“ těchto změn dlouho před tím než jsou zjistitelné jinými způsoby. Měření biomasy je užitečné ve studiích ochrany půdy. Měření biomasy půdních mikroorganismů pomocí fumigačně extrakční metody byly použity pro odhad environmentálních dopadů pesticidů a antibiotik [26].

Po chloroformové fumigaci půdy dojde k uvolnění organických a anorganických složek pocházejících z buněk půdních mikroorganismů. Membrány živých půdních mikroorganismů se částečně rozkládají pomocí fumigace chloroformem. Po 24 hodinách inkubace (vystavení parám chloroformu) je možné dosáhnout lýze buněk a uvolnění cytoplazmy do prostředí. Následně poté může být velká část složek mikrobiální biomasy extrahována. Organický C, celkový N, $\text{NH}_4\text{-N}$ a ninhydrin-reaktivní N lze stanovit v extraktu K_2SO_4 . Organický uhlík a celkovou síru lze stanovit po extrakci 0,01M CaCl_2 a fosfát nebo celkový fosfor po extrakci NaHCO_3 [26].

3.6 Stanovení C

Biomasa je pro půdu definována jako žijící část organické hmoty a její kvantitu je možné stanovit jako obsah extrahovatelného uhlíku obsaženého v buňkách (c_b). Během fumigace jsou buňky lýzovány chloroformem a c_b se uvolní do půdní matrice, odkud je extrahován nejčastěji $0,5\text{mol.l}^{-1}$ K_2SO_4 . Obsah c_b se stanoví z rozdílu mezi fumigovanými a nefumigovanými vzorky. Ke stanovení koncentrace organického uhlíku biomasy může být využita celá řada metod, ať už instrumentálních nebo analytických. Mezi ty nejčastěji používané metody pro stanovení uhlíku půdní biomasy patří dichromanová oxidace nebo oxidace peroxodisíranem [26]; je možné také využít metod spektrofotometrických v infračervené oblasti spektra, např. analyzátorů uhlíku [27].

3.6.1 Dichromanová metoda

Stanovení uhlíku biomasy dichromanovou metodou je založeno na oxidaci organické hmoty, přítomné v extraktu fumigované a nefumigované půdy, v přítomnosti silné kyseliny a dichromanu draselného. Množství nezreagovaného dichromanu je stanoveno zpětnou titrací $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$. Následně je dopočítáno množství zoxidovaného C [26].

3.6.2 UV-persíranová metoda

Po odstranění anorganického C okyselením je organický C v půdních extraktech oxidován pomocí UV záření při vlnové délce 210-260 nm v přítomnosti $K_2S_2O_8$ na CO_2 . Množství vzniklého CO_2 je měřeno pomocí infračerveného absorpčního detektoru [26].

3.6.3 Vysokoteplotní oxidace

Snadno rozložitelné materiály, jako je část půdní mikrobiální biomasy extrahované po fumigaci chloroformem, jsou kompletně oxidovány při $850^\circ C$ v přítomnosti platinového katalyzátoru. Vzniklý CO_2 je následně veden do detektoru, pracujícího v infračervené oblasti spektra [26].

Výhodou řady nových automatických analyzátorů pracujících na tomto principu je to, že je možné pracovat s malými objemy vzorků extraktů obsahujících velké množství solí [26].

3.7 Stanovení N

Po chloroformové fumigaci půdních vzorků a následné extrakci $0,5 \text{ mol.l}^{-1} K_2SO_4$, je možné v extraktu stanovit vedle celkového organického uhlíku (TOC) i celkový dusík (total N, TN), ale také nízké koncentrace ninhydrin reaktivního dusíku nebo amonného dusíku ($NH_4\text{-N}$) [26].

3.7.1 Ninhydrin-reaktivní dusík

Koncentrace ninhydrin reaktivních sloučenin uvolněných z mikrobiální biomasy v průběhu fumigace chloroformem a následně extrakce $0,5 \text{ mol.l}^{-1} K_2SO_4$ úzce koreluje s počátečním obsahem půdní mikrobiální biomasy C a N [26].

Sloučeniny obsahující ve své molekule α -amino dusík, NH_4^+ nebo volnou α -amino skupinu (jako aminokyseliny, peptidy, proteiny) reagují s ninhydrinem za vzniku purpurově zbarveného komplexu vhodného pro fotometrické stanovení při vlnové délce 570 nm [26].

3.7.2 Celkový dusík

Organicky vázaný dusík lze stanovit několika způsoby. Uplatnění nacházejí opět metody analytické i instrumentální. Metody instrumentální jsou metody novější, využívají

moderních automatických analyzátorů a zpravidla jsou založené na získávání oxidu dusnatého a chemiluminiscenční detekci [28].

Na druhou stranu je možno využít i metod analytických, mezi něž je řazena i prakticky stále používaná metoda dle Kjeldahla. I když je to metoda, která má řadu omezení, není univerzální, je to metoda stará několik desítek let, byla mnohokrát modifikována, tak ji lze použít zejména pro vodné vzorky [28], jimiž v naší práci získané extrakty jsou.

3.7.3 Mineralizace dle Kjeldahla

Organická látka je oxidována v prostředí koncentrované kyseliny sírové a dusík v ní obsažený je převeden na amonný ion. Cílem je tedy transformace organického dusíku na dusík ve formě amonného iontu pomocí mokré metody v koncentrované kyselině sírové v přítomnosti katalyzátoru [28].

Amonný ion je možno přímo stanovit v mineralizátu coulometrickou titrací nebo je možno po úpravě pH do silně alkalické oblasti měřit nedisociovaný amoniak pomocí plynoměrné iontově selektivní elektrody (ISE). Pokud je mineralizát zalkalizován a je vydestilován amoniak, je poté možno stanovit amonné ionty volumetricky (acidimetrickou titrací) nebo reakcí s Nesslerovým činidlem [28].

Amonný iont je tímto způsobem uvolněn z aminů, peptidů a aminokyselin v $0,5\text{mol.l}^{-1}$ K_2SO_4 půdních extraktů fumigovaných a nefumigovaných půdních vzorků. V silně kyselém prostředí a v přítomnosti $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$, práškového Zn a CuSO_4 jsou dusičnany dodatečně redukovány na amonný ion [26].

3.7.3.1 Coulometrické stanovení NH_4^+ s biamperometrickou indikací

Coulometrické stanovení je založeno na měření náboje, který je nutný k úplné chemické přeměně stanovované látky. Coulometrická analýza se může uskutečňovat za konstantního potenciálu pracovní elektrody nebo za konstantního proudu, a pak mluvíme o coulometrické titraci. Podle Faradayových zákonů je hmotnost m látky X vyloučené na elektrodě úměrné elektrickému náboji Q , který prošel článkem. Pak tedy platí:

$$m_x = \frac{M_x Q}{zF} = \frac{M_x It}{zF} \quad /1/$$

kde: m_x ... hmotnost látky vyloučené na elektrodě; [g],

M_x	...	molární hmotnost látky X; [g.mol ⁻¹],
Q	...	elektrický náboj prošlý článkem; [C],
z	...	počet elektronů vyměněných při elektrodové reakci; [1],
F	...	Faradayova konstanta; [C.mol ⁻¹]; $F = 96\,484,56\text{ C.mol}^{-1}$,
I	...	elektrický proud prošlý článkem; [A],
t	...	čas; [s] [29].

Stanovení NH_4^+ , např. v mineralizátu po Kjeldahlizaci, coulometrickou titrací je založeno na reakci s bromnanem, který vzniká v alkalickém prostředí z bromnanu, coulometricky vyrobeného z bromidu. Princip reakce je tedy následující:



Dosažení bodu ekvivalence je indikováno biamperometricky nárůstem indikačního proudu, kdy nadbytečný bromnan depolarizuje indikační katodu. V okamžiku, kdy indikační proud dosáhne nastavené hodnoty, dojde k automatickému ukončení coulometrické titrace [28].



Biamperometrie je založena na sledování protékajícího proudu při konstantně vloženém potenciálu na dvě polarizovatelné elektrody (zpravidla platinové). Velikost protékajícího proudu je závislá na poměru koncentrace redukované a oxidované formy depolarizátoru. Podmínkou pro průchod proudu při biamperometrické titraci tedy je, aby byly v roztoku obě formy redoxního systému [28].

3.7.3.2 *Elektrody s přidavnými membránami – plynové elektrody*

V plynových elektrodách se používají přidavné membrány, které jsou propustné pouze pro plyny. Membránou je tenká vrstva elektrolytu, s nímž je v kontaktu příslušná

iontově selektivní elektroda (ISE). Membrána je nejčastěji zhotovená z tenkého silikonového kaučuku nebo se používá mikroporézní teflonová membrána, převlečená přes skleněnou pH elektrodu. Mezi skleněnou a přídatnou membránou je tenký film elektrolytu, který je v kontaktu s objemnějším zásobníkem, do něhož bývá umístěna referentní elektroda. Celý měrný článek je tak umístěn v jednom elektrodovém tělese [30].

Plynová NH_3 elektroda (tzv. čpavková plynová elektroda) se používá především pro stanovení amonných iontů. Po mineralizaci vzorku podle Kjeldahla, kdy je dusík obsažený v organické látce převeden na amonný iont, je zkoumaný roztok zalkalizován přídatkem NaOH a membrána pak reaguje na uvolněný plynný amoniak [30].

Napětí tohoto měrného článku je dáno vztahem:

$$E = konst + 0,05916 \log p_{\text{NH}_3} \quad /6/$$

kde p_{NH_3} je parciální tlak amoniaku v proměřovaném vzorku.

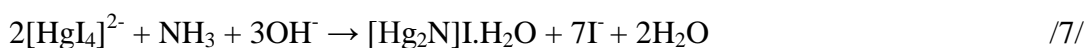
Koncentrace je pak úměrná množství amoniaku prodifundovaného skrz membránu [30].

3.7.3.3 Acidimetrická titrace NH_4^+

Po zalkalizování mineralizátu je vydestilován amoniak, který je jímán v odměrném roztoku 2% kyseliny borité a následně je titrován odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové [26] nebo kyseliny sírové [28], [31]. Jako indikátor je možno použít acidobazický indikátor TASHIRO (směs methylenové červeně a methylenové modři); bod ekvivalence je indikován změnou barvy ze zelené až do šedivo-fialové [31].

3.7.3.4 Nesslerova metoda

Tato metoda se používá zejména pro stanovení amoniakálního dusíku ve vodách. Ve splaškových vodách může být obsažen v desítkách mg.l^{-1} , v odpadních vodách ze zemědělství či průmyslu jeho koncentrace může dosahovat hodnot v g.l^{-1} [32], [33]. Nesslerovu metodu je možno použít i pro stanovení celkového dusíku v půdě po vhodné úpravě vzorků. Po extrakci půdy pomocí K_2SO_4 , následné mineralizaci dle Kjeldahla, alkalizaci mineralizátu a vydestilování amoniaku může být amoniak stanoven reakcí s hydroxidem alkalického kovu a Nesslerovým činidlem, což je tetrajodortuřnatan sodný nebo draselný. Reakční schéma je následující:



Vzniklou sloučeninou je oxidimerkuriaminjodid, tedy sloučenina, která při podmínkách stanovení a při malých koncentracích amoniakálního dusíku vytváří žlutohnědé koloidní roztoky a intenzitu zabarvení je tedy možno měřit spektrofotometricky [32], [33], [34].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo stanovit množství celkového uhlíku (TOC) a celkového dusíku (TN) v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou. Testovány byly tři druhy zemědělských půd.

Dalším cílem bylo využít stejných postupů a metod pro stanovení TOC a TN mikrobiální biomasy v dodané směsi (půda + kompost), ve které byl v rámci jiné práce testován Anoxomer a bylo známo, že tato směs má nižší hodnoty respirace oproti stejné směsi bez Anoxomeru. Tudiž bylo možné očekávat jisté změny z hlediska celkové biomasy mikroorganismů a tento fakt potvrdit právě stanovením TOC a TN fumigačně extrakční metodou.

5 CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY

5.1 Chemikálie

- **Ca(OH)₂** Hydroxid vápenatý; LACHEMA a.s., Brno, ČR
- **NaOH** Hydroxid sodný; PENTA, Chrudim, ČR
- **KOH** Hydroxid draselný; LACHEMA a.s., Brno, ČR
- **CHCl₃** Chloroform; PENTA, Chrudim, ČR
- **K₂SO₄** Síran draselný; LACHEMA a.s., Brno, ČR

5.2 Přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky

- **Laboratorní předvážky;** Kern WEW 1500-2M, Německo
- **Analytické váhy;** Kern 770, Německo
- **Elektrická sušárna;** UM 100M Emmert, Německo
- **Mrazák;** Samsung Calnex, ČR
- **Membránové čerpadlo;** VM 20 Q, ČR
- **Třepačka;** Yellow^{line} 2S 10 basic IKA, Německo
- **Analyzátor uhlíku TOC-5000 A;** Shimadzu Corporation, Japonsko
- **Analyzátor dusíku Formacs^{HT};** Skalar, Holandsko
- **Běžné laboratorní sklo** (kalibrováno při 20 °C) a vybavení

6 CHARAKTERISTIKA PŮDNÍCH VZORKŮ

Vzorky tří druhů zemědělských půd pocházejících z okolí Brna (Bratčice, Veverské Knínice, Ivaň), a také informace o půdním druhu těchto vzorků, byly získány od Ing. Jiřího Jandáka, CSc., MZLU Brno.

Vzorky z lokality Lužice byly dodány Bc. Petrem Ondříškem, který s těmito vzorky pracoval během své diplomové práce. Jednalo se o dvě směsi tvořené 2 díly zeminy a 5 díly kompostu. První směs sloužila jako standard (Lužice_s) a do druhé byl přidán Anoxomer (Lužice_{an}). U obou směsí byla měřena respirace mikroorganismů v uzavřeném respirometru po dobu asi dvou měsíců. Tyto vzorky jsme se rozhodly testovat z toho důvodu, že směs obsahující Anoxomer měla hodnoty respirace dvakrát nižší, tudíž se předpokládala velmi nízká aktivita mikroorganismů a tedy možné významné změny právě koncentrace C a N biomasy v těchto vzorcích.

Všechny vzorky byly prosety sítím o velikosti ok 2 mm, tak aby byly odstraněny kamínky a kořeny rostlin. Informace o všech půdách jsou uvedeny níže /viz Tab. I/.

Tab. I: Stanovení půdního druhu a zrnitostní třídy

Lokalita	Půdní druh	Zrnitostní třída
Bratčice	Černozem modální na spraši ^a	Prachovitá hlína ^a
Veverské Knínice	Hnědozem modální na spraši ^a	Prachovitá jílovitá hlína ^a
Ivaň	Fluvizem modální na nevápnitých aluviálních sedimentech ^a	Prachovitá hlína ^a
Lužice	Hnědozem ^b	Prachovitá hlína ^b

^a- informace získány od Ing. Jiřího Jandáka, CSc.

^b- informace získány od Bc. Petra Ondříška

7 METODY A POSTUPY

7.1 Sušina půdy

Principem stanovení sušiny u půdy je zahřát ji na takovou teplotu, při níž se voda odpaří. Z rozdílu hmotnosti před sušením a po něm se vypočítá obsah sušiny půdy v procentech.

Do Petriho misek, které byly předem zváženy, bylo naváženo 5 g půdy na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Takto připravené vzorky byly vysušeny v elektrické sušárně do konstantní hmotnosti při 105 °C. Poté se Petriho misky se vzorky nechaly zchladnout v exsikátoru na laboratorní teplotu a následně byly zváženy. Ze získaných dat byla vypočtena sušina půdy dle vztahu /8/. Stanovení probíhalo 3x vedle sebe pro jednotlivé druhy půd; výsledky byly poté zprůměrovány.

$$SU\check{S} = \frac{m_{\infty} - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad /8/$$

- Kde: $SU\check{S}$... sušina půdy; [%],
 m_{∞} ... hmotnost misky s vysušenou půdou; [g],
 m_1 ... hmotnost misky s čerstvou půdou; [g],
 m_0 ... hmotnost prázdné misky; [g].

7.2 Maximální vodní kapacita půdy (WHC_{max})

Maximální vodní kapacita půdy (Maximum Water Holding Capacity, WHC_{max}) je stav, kdy je půda schopna v přirozeném uložení udržet v kapilárních pórech největší množství vody. Principem stanovení je nasycení vzorku půdy vodou a následná nenásilná ztráta vody do ustavení rovnováhy. Z rozdílu hmotností se při znalosti obsahu sušiny spočítá WHC_{max} . Vyjadřuje se v jednotkách objemu vody na gram suché zeminy.

Pro každou půdu byly nachystány tři Erlenmeyerovy baňky do nichž byla vložena nálevka s filtračním papírem. Do dvou z nich bylo naváženo 10 g příslušné půdy, která byla přelita 100 ml destilované vody a zamíchána, aby se vytvořila homogenní směs. Poté byly nálevky zakryty alobalem a nechaly se stát při laboratorní teplotě do následujícího

dne. Nálevka se třetím filtračním papírem sloužila jako kontrola. Filtrační papír byl přelit 100 ml destilované vody, nálevka byla zakryta alobalem a stejně jako v případě vzorků půdy se nechala stát při laboratorní teplotě do následujícího dne. Druhý den byly zváženy s přesností $\pm 0,0001$ g filtrační papíry s nasycenou půdou i kontrola. WHC_{max} se spočítalo dle vztahu /9/.

$$WHC_{max} = \frac{M_{vz} - M_k - \frac{Suš}{100} \cdot N}{\frac{Suš}{100} \cdot N} \quad /9/$$

Kde: WHC_{max} ... maximální vodní kapacita; [$ml \cdot g^{-1}$],

M_{vz} ... hmotnost filtračního papíru s nasycenou půdou; [g],

M_k ... hmotnost filtračního papíru v kontrole; [g],

$Suš$... obsah sušiny; [%],

N ... navážka přirozeně vlhké půdy; [g].

Tímto způsobem bylo zjištěno množství vody, které je nutné přidat k půdě, aby její WHC bylo 100 %. Podle literárních zdrojů [19], [35] a České technické normy ISO 14240-2:1997 je doporučováno používat pro fumigačně extrakční metodu půdní vzorky s WHC 40-50 %. Aby bylo docíleno toho, že budou mít všechny naše vzorky půd stejné WHC, bylo potřeba najít nějaké „optimální“ WHC (X-WHC) a dopočítat množství vody, které je potřebné na případné dovlhčení půdy. Byla zjištěna hodnota WHC 44 % a přídavek destilované vody potřebný na dovlhčení 1 g přirozeně vlhké půdy na požadované WHC byl vypočítán podle vztahu /10/.

$$D = WHC_{max} \cdot \frac{X}{100} \cdot \frac{Suš}{100} - \left(1 - \frac{Suš}{100}\right) \quad /10/$$

Kde: D ... doplnění destilované vody při vlhčení 1 g přirozeně vlhké půdy na X % WHC; [ml],

WHC_{max}	...	maximální vodní kapacita; [ml.g ⁻¹],
X	...	požadované X-WHC ($X = 44$); [%],
$Suš$...	obsah sušiny; [%].

7.3 Fumigačně extrakční metoda

Jak již bylo zmíněno dříve, fumigačně extrakční metoda je založena na tom, že se nejprve fumigací (účinkem par chloroformu po dobu 24 h) lýžují buňky mikroorganismů a uvolňuje se čerstvá organická hmota. Organický uhlík i celkový dusík jsou poté extrahovány 0,5mol.l⁻¹ K₂SO₄ z fumigovaných i nefumigovaných vzorků a rozdíl mezi nimi se připsuje právě uhlíku a dusíku mikrobiální masy.

7.3.1 Fumigace

Do Petriho misek bylo naváženo s přesností $\pm 0,0001$ g vzorku přirozeně vlhké půdy o hmotnosti sušiny 25 g. Následně bylo ke vzorku půdy přidáno vypočtené množství destilované vody, aby bylo dosaženo požadované vlhkosti (WHC 44 %).

Takto připravená půda byla vložena do exsikátoru. Do prostoru exsikátoru byl také umístěn navlhčený filtrační papír; na dno exsikátoru pak Petriho miska se sorbentem (směs Ca(OH)₂, H₂O, NaOH a KOH) pro případný záchyt vznikajících toxických plynů. Dále byla do exsikátoru vložena kádinka s 30 ml chloroformu a třemi skleněnými perlami. Exsikátor byl uzavřen a pomocí membránové vývěvy evakuován, tak dlouho než se orosila kádinka s chloroformem /viz Obr. 5/. Následně byl exsikátor od vývěvy odpojen, a potom byl inkubován ve tmě při pokojové teplotě po dobu 24 h. Následující den po vyjmutí vlhkého filtračního papíru a kádinky s chloroformem z exsikátoru, proběhlo pomocí vývěvy několikanásobné odsátí zbylých par chloroformu.



Obr. 5: Fumigační zařízení [vlastní zdroj]

7.3.2 Extrakce

Vzorky, které byly fumigovány, byly kvantitativně převedeny do plastových láhví spolu s 200 ml $0,5\text{mol.l}^{-1}$ K_2SO_4 . Byly podrobeny extrakci na horizontální třepačce po dobu 45 minut při 150 ot.min^{-1} . Po této době byla směs filtrována přes skládaný filtr a získané extrakty byly uchovány při $-25\text{ }^\circ\text{C}$.

Nefumigované vzorky byly zpracovány obdobně jako vzorky fumigované, ale s tím rozdílem, že nebyly vystaveny parám chloroformu. Opět bylo tedy naváženo s přesností $\pm 0,0001\text{ g}$ vzorku přirozeně vlhké půdy o hmotnosti sušiny 25 g a následně byla doplněna voda na požadovanou vlhkost. Vzorky byly kvantitativně převedeny do plastových láhví spolu s 200 ml $0,5\text{mol.l}^{-1}$ K_2SO_4 , byly podrobeny extrakci, poté filtraci a získané extrakty byly uchovány při $-25\text{ }^\circ\text{C}$ až do vlastní analýzy.

7.4 Stanovení celkového organického uhlíku

K vlastnímu stanovení byly použity výše uvedené extrakty, které byly před analýzou nejprve rozmrazeny při pokojové teplotě, následně byly homogenizovány, a poté filtrovány do předem připravených a řádně označených zkumavek.

Samotné stanovení probíhalo na analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC-5000A. Principem stanovení celkového uhlíku (TC) byla oxidace veškerého uhlíku obsaženého ve vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při teplotě 680 °C. Vzniklý CO₂ byl veden do infračerveného (IČ) detektoru. Signál vzniklý absorpcí záření příslušné vlnové délky byl zaznamenán ve formě píků, kdy plocha píku byla přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku. Při stanovení anorganického uhlíku (IC) byl vzorek nastříknut v proudu kyslíku do nádoby s kyselinou fosforečnou, kde docházelo k vytěsnění CO₂. Opět zde byla jako koncovka použita IČ detekce. Celkový organický uhlík (TOC) byl následně získán odečtením IC od TC [36].

Jako blank byl používán roztok K₂SO₄, který se používal při samotných extrakcích. Přístroj je kalibrován pomocí standardních roztoků hydrogenftalátu draselného (stanovení TC) a standardních roztoků hydrogenuhličitanu sodného a uhličitanu sodného (stanovení IC). Jelikož zařízení umožňuje uložení až 18 kalibračních křivek, nemusí se kalibrace provádět při každém měření [36].

7.5 Stanovení celkového dusíku

Celkový dusík (TN) byl stanovován ve stejných extraktech jako celkový organický uhlík. Extrakty byly před analýzou opět přefiltrovány do připravených zkumavek a podrobeny analýze na analyzátoru Formacs^{HT}(Skalar). Stanovení celkového dusíku bylo založeno na katalytickém spalování a tepelném rozkladu dusíkatých látek až na konečný produkt oxid dusnatý, který byl detekován v chemiluminiscenčním detektoru [32].

Tento analyzátor je kombinovaný, umožňuje stanovení TN a TOC. Pro naši práci byl tento analyzátor využit pouze pro stanovení TN. Kalibrace metody se provádí metodou kalibrační přímky před každou analýzou pomocí směsného standardu síranu amonného a dusičnanu draselného [32].

8 VÝSLEDKY

8.1 Charakteristika půd

Pro půdy z okolí Brna (Bratčice, Veverské Knínice a Ivaň) byla stanovena sušina, a to pro každý vzorek 3x vedle sebe a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Dále byly pro tyto půdy stanoveny hodnoty WHC_{max} , v tomto případě pro každý vzorek 2x vedle sebe a výsledné hodnoty byly opět zprůměrovány. Z hodnot WHC_{max} byl následně vypočítán přídavek destilované vody potřebný k vlhčení 1 g přirozeně vlhké půdy na 44 % WHC; pro náš případ to je optimální WHC /viz Kapitola 7.2/. Získané hodnoty, jsou zaznamenány v Tab. II. Dále byly pro tyto vzorky půd získány od Bc. Jarmily Novákové i další charakteristiky jako je spalitelný podíl, pH (H_2O) a pH (KCl), které stanovila v rámci své diplomové práce /viz Tab. II/.

Tab. II: Charakteristika půd

Lokalita	Sušina [%]	WHC_{max} [$ml.g^{-1}$]	Přídavek vody pro 44% WHC [$ml.g^{-1}$]	Spalitelný podíl ^c [%]	pH (H_2O) ^c [1]	pH (KCl) ^c [1]
Bratčice	87,48	0,4519	0,0488	20,68	7,341	6,854
Veverské Knínice	87,47	0,5117	0,0716	23,64	7,125	6,724
Ivaň	76,37	0,7127	0,0032	25,51	7,653	6,452

^c - stanoveno v rámci diplomové práce Bc. Jarmily Novákové [37]

Pro vzorek Lužice, tedy směsi tvořené 2 díly zeminy a 5 díly kompostu, byly rovněž získány charakteristiky jako pH; dále byla stanovena sušina, WHC_{max} a bylo dopočítáno množství vody potřebné pro doplnění na požadovanou X % WHC /viz Tab. III/. Směs označená jako Lužice_s sloužila jako standard; druhá směs Lužice_{an} se od směsi Lužice_s lišila tím, že byl do ní přidán Anoxomer. Bylo známo, že směs obsahující Anoxomer měla hodnoty respirace dvakrát nižší, tudíž se dala předpokládat nižší aktivita mikroorganismů.

Tab. III: Charakteristika směsi (zemina z lokality Lužice:kompost; 2:5)

Lokalita	Sušina [%]	WHC _{max} [ml.g ⁻¹]	Přídavek vody pro 44% WHC [ml.g ⁻¹]	pH (KCl) ^b [1]
Lužice _s	58,35	1,3768	-0,0630	6,210
Lužice _{an}	59,64	0,9280	-0,1601	6,100

^b - stanoveno v rámci diplomové práce Bc. Petra Ondříška [38]

Jak si můžeme všimnout, tak u této směsi vychází přídavek vody pro 44% WHC záporně, to znamená, že vodu nepřidáváme, ale naopak, vypočtené množství musíme ze směsi odstranit sušením. Protože např. běžné mezofilní bakterie mají letální teplotu kolem 60-70 °C [39], byla směs sušena při nižších teplotách (40 °C), aby nedošlo k zahubení mikroorganismů.

8.2 Stanovení C v půdní mikrobiální biomase

Množství celkového organického uhlíku půdní mikrobiální biomasy (TOC_{PMB}) je vyjádřeno jako rozdíl celkového organického uhlíku fumigované půdy (TOC_F) a celkového organického uhlíku nefumigované půdy (TOC_N). Vzorky byly zpracovány 3x vedle sebe, hodnoty byly přepočítány na příslušné navážky přirozeně vlhké půdy a následně pak na 25 g sušiny půdy a získané výsledky byly zprůměrovány, /viz Tab. IV a Tab. V/.

Tab. IV: Uhlík v mg.25 g⁻¹ sušiny půdy

Lokalita	TOC _F [mg.25 g ⁻¹ sušiny]	TOC _N [mg.25 g ⁻¹ sušiny]	TOC _{PMB} [mg.25 g ⁻¹ sušiny]
Bratčice	12,870	7,788	5,082
Veverské Knínice	13,972	9,217	4,710
Ivaň	27,079	14,972	12,107

Tab. V: Uhlík v $\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny směsi (zemina:kompost; 2:5)

Lokalita	TOC_F [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TOC_N [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TOC_{PMB} [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]
Lužice _s	91,131	30,084	61,047
Lužice _{an}	67,013	28,598	38,415

8.3 Stanovení N v půdní mikrobiální biomase

Toto stanovení bylo prováděno na analyzátoru Formacs^{HT} (Skalar) 3x vedle sebe, kde byl stanoven obsah N v jednotkách $\text{mg}\cdot \text{l}^{-1}$, proto bylo nutné výsledky přepočítat na příslušné navážky přirozeně vlhké půdy a následně pak na 25 g sušiny.

Obsah celkového dusíku půdní mikrobiální biomasy (TN_{PMB}) byl vypočítán jako rozdíl celkového dusíku fumigované půdy (TN_F) a celkového dusíku nefumigované půdy (TN_N). Získaná data byla zprůměrována a výsledky jsou uvedeny níže, /viz Tab. VI a Tab. VII/.

Tab. VI: Dusík v $\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny půdy

Lokalita	TN_F [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TN_N [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TN_{PMB} [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]
Bratčice	1,977	1,379	0,598
Veverské Knínice	6,836	5,832	1,104
Ivaň	5,223	2,265	2,958

Tab. VII: Dusík v $\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny směsi (zemina:kompost; 2:5)

Lokalita	TN_F [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TN_N [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]	TN_{PMB} [$\text{mg}\cdot 25 \text{ g}^{-1}$ sušiny]
Lužice _s	23,757	20,515	3,242
Lužice _{an}	19,666	17,623	2,043

9 DISKUSE VÝSLEDKŮ

Mikrobiální biomasa je důležitá zásobárna živin a změny ve složení živin se odrážejí právě v mikrobiální biomase. Stanovení celkové biomasy mikroorganismů v půdě většinou spočívá ve vyčíslení komponenty mikrobiální biomasy, nejčastěji uhlíku. Tato komponenta musí být přítomna ve všech živých buňkách a po jejich odumření musí být buď rychle degradována, nebo by se měla alespoň stát lehce extrahovatelnou [14]. Právě možnosti extrakce dané komponenty využívá fumigačně extrakční metoda, která byla použita v této bakalářské práci a následně byly v extraktu stanoveny celkový organický uhlík (TOC) a celkový dusík (TN).

Existuje celá řada metod, kterými lze stanovit TOC i TN, /viz Kapitola 3.6 a 3.7/.

Pro stanovení celkového dusíku bylo prvotní myšlenkou stanovit amonné ionty coulometrickou titrací s biamperometrickou indikací po Kjeldahlizaci vzorku /viz Kapitola 3.7.3/. Pro první, orientační, zjištění množství dusíku ve vzorcích testovaných půd byla mineralizována samotná nefumigovaná půda a bylo odhadnuto, kolik dusíku se v mineralizátu zhruba nachází. Poté byl navržen postup, jak upravit a mineralizovat extrakty testovaných vzorků půd (fumigovaných, nefumigovaných) právě pro toto stanovení. Byla zde vyvinuta snaha o to, aby byly všechny testované mineralizáty i kalibrační standardy analyzovány za stejných podmínek (tzn., aby nedocházelo v průběhu analýzy např. k výměně katodických nebo anodických roztoků, apod.). Tento postup se ale nezdařil; při zvoleném objemu analyzovaného mineralizátu, titrace neproběhla. Což mohlo být způsobeno nižší koncentrací stanovovaného N, než jaká byla původně předpokládána. Zvýšit objem nástřiku, nepřicházelo v úvahu, protože by docházelo k rychlému vyčerpání pufrů, a bylo by potřeba během analýzy několikrát měnit katodický a anodický roztok, čímž by se mohly měnit podmínky analýzy a mohlo by docházet k významnému ovlivnění výsledků. Tytéž extrakty byly tedy zanalyzovány na analyzátoru dusíku Formacs^{HT}(Skalar), aby se potvrdilo, že extrakce a mineralizace vzorku byla úspěšná a dusík je v analyzovaném vzorku přítomen, jen se ho nepodařilo titrací prokázat. Z důvodů omezeného množství testovaných půd a časových důvodů bylo dohodnuto, že se ke stanovení celkového dusíku taktéž, stejně jako v případě stanovení TOC, využije analyzátoru.

Pro stanovení celkového organického uhlíku byl využit analyzátor uhlíku TOC-5000 A (Shimadzu). V případě stanovení TOC by mohlo být namítnuto, že vzhledem k fumigaci chloroformem (CHCl₃), je půda a poté následně získaný extrakt ovlivněn pří-

tomností uhlíku právě z chloroformu. Po fumigaci proběhlo několika násobné odsátí par chloroformu (6 krát, po dobu 2 min), a poté se předpokládalo, že odsátí bylo dokonalé a chloroformový uhlík nám neovlivnil výsledky. Nicméně práce amerických autorů [40] se zabývala možností ovlivnění výsledků právě chloroformovou extrakcí. Studie ukázala, že páry chloroformu mohou být sorbovány na jílovité částice – čím jílovitější půda je, tím vyšší sorpce nastává. Autoři uváděné studie se také zabývali možnostmi jak páry chloroformu ještě lépe ze vzorků odstranit. Bylo ale zjištěno, že ani zvýšení intervalu odsávání par po fumigaci nemá žádný významný vliv. Také byl nalezen chloroformový C ve dvou extraktech, odkud se ho snažili odstranit probubláváním dusíkem, bohužel ani v tomto případě nebylo odstranění 100%.

Naše zemědělské půdy jsou zrnitostní třída prachovitá hlína a jeden vzorek z nich prachovitá jílovitá hlína (z lokality Veverské Knínice, /viz Tab. I/). Proto by se mělo u fumigačně extrakční metody předpokládat jisté ovlivnění výsledků uhlíkem z chloroformu, převážně u významně jílovitých půd.

V následujících tabulkách /viz Tab. VIII a Tab. IX/ jsou shrnuty výsledky, zjištěné v rámci této bakalářské práce. Množství C a N v půdní mikrobiální biomase v zemědělských půdách i ve směsi zemina:kompost jsou zde uvedeny v mg na 25 g sušiny.

Tab. VIII: Shrnutí výsledků TOC a TN půdní mikrobiální biomasy testovaných vzorků

Lokalita	TOC_{PMB} [mg.25 g⁻¹ sušiny]	TN_{PMB} [mg.25 g⁻¹ sušiny]	C:N
Bratčice	5,082	0,598	8:1
Veverské Knínice	4,710	1,104	4:1
Ivaň	12,107	2,958	4:1

Tab. IX: Shrnutí výsledků TOC a TN mikrobiální biomasy testované směsi (zemi-
na:kompost; 2:5)

Lokalita	TOC _{PMB} [mg.25 g ⁻¹ sušiny]	TN _{PMB} [mg.25 g ⁻¹ sušiny]	C:N
Lužice _s	61,047	3,242	18:1
Lužice _{an}	38,415	2,043	18:1

Obsah TOC či TN půdní mikrobiální biomasy byl dán rozdílem fumigované a nefumigované půdy. Hodnoty TOC i TN byly vždy vyšší ve fumigovaných vzorcích půd, což je známkou toho, že se při fumigaci opravdu lýzovaly buňky mikroorganismů a jejich cytoplazma se uvolnila do prostředí.

Množství TOC a TN bývá v různých půdách různé. Dusíku bývá podstatně méně než uhlíku a obsah celkového N v půdě se často dává do vztahu s organickým C a vyjadřuje se poměrem C:N („optimum“ je udáváno jako 10-12:1). Za dostatečné zásobení dusíkem ještě považují někteří autoři poměr 15-18:1 [41]. Ke zdrojům uhlíku a dusíku v půdě patří mikrobiální biomasa, metabolity organismů a zbytky rostlin i živočichů. Díky této znalosti lze říct, že poměr mikrobiální biomasy uhlíku a dusíku je taktéž v nějakém poměru. Poměr C:N může v půdní mikrobiální biomase kolísat vlivem podmínek, které mohou ovlivnit mikroorganismy.

Výsledky naší práce ukazují, že fumigačně extrakční metodu lze použít pro extrakci a následné stanovení TOC a TN půdní biomasy. Metodu lze považovat za technicky, finančně i časově málo náročnou. Nicméně u této metody, biologické metody, je potřeba počítat nejen s ovlivněním výsledků díky chloroformové extrakci, ale je třeba brát v úvahu i parametry prostředí, a je proto potřeba doplnit biologická data také chemickými rozbory a rozbory půdních vlastností. V Tab. VIII jsou uvedeny výsledky stanovení a také poměry C:N mikrobiální biomasy. Hodnoty TOC a TN, zvláště pak jejich poměr vypovídají o kvalitě půdy. Lze tedy říct /viz Tab. IV a Tab. VI/, že zemědělské půdy testované v tomto experimentu jsou dostatečně zásobeny dusíkem.

Stanovením uhlíku v půdní mikrobiální biomase se zabývali i v Austrálii, kde odebírali půdu z 20 odběrových míst [42]. Půda byla odebírána z hloubky 10 cm po předchozím odebrání svrchní 5 cm vrstvy. Pro stanovení půdní mikrobiální biomasy byla použita fumi-

gačně extrakční metoda. Jednotlivé vzorky měly navážku 5 g a byly fumigovány 3x vedle sebe po dobu 24 h při teplotě 25 °C v temnu. Fumigované i nefumigované vzorky byly extrahovány 0,5 mol.l⁻¹ K₂SO₄ v poměru 1:4; 5 g půdy:20 ml K₂SO₄ [42]. Zde se pracovní postup od toho našeho trochu lišil; v našem případě se vycházelo z České technické normy a bylo navažováno 25 g sušiny půdy a k této navážce bylo vždy přidáno 200 ml K₂SO₄. Pro srovnání jsou některé z jejich výsledků TOC uvedeny v následující tabulce /viz Tab. X/. Hodnota TOC stanovená fumigačně extrakční metodou ve vzorcích se pohybovala v rozmezí 1,95-8,25 mg.25 g⁻¹ sušiny. Jimi získané výsledky TOC půdní biomasy korespondují s hodnotami získanými v naší studii, tedy v půdách z České republiky. Protože se autoři zabývali jen stanovením uhlíku, není možné porovnat poměr C:N s našimi výsledky.

Tab. X: Uhlík (TOC) půdní mikrobiální biomasy stanoven v australských oblastech [42]

Lokalita	TOC _{PMB} [mg.25 g ⁻¹ sušiny]
Kelley	8,250
Tudgey	6,750
Kadina	5,925
Walpeup	2,975
Fleming	1,950

Fumigačně extrakční metody bylo také použito pro stanovení TOC s TN ve směsi, tvořené 2 díly zeminy a 5 díly kompostu. Přítomností kompostu byly zlepšeny podmínky v půdě pro rozmnožování mikroorganismů a jejich růst, proto jsou hodnoty TOC ve srovnání s půdními vzorky vyšší. Tato směs byla připravena pro účely jiné práce, kde bylo testováno zda Anoxomer inhibuje půdní respiraci. Výsledky těchto respiračních testů ukázaly, že půda, ve které byl Anoxomer inkubován (Lužice_{an}) má výrazně nižší hodnoty respirace oproti stejné směsi bez Anoxomeru (Lužice_s); tyto hodnoty jsou zpracovány v rámci diplomové práce Bc. Petra Ondříška [38]. Tudíž bylo možné očekávat jisté změny z hlediska celkové biomasy mikroorganismů. Tento fakt se potvrdil, /viz Tab. IX/. I když zůstaly poměry C:N zachovány, je patrné, že množství TOC i TN se ve vzorku s Anoxomerem snížilo zhruba o 37 %, a tím se snížila i celková biomasa organismů v půdě.

10 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývá stanovením množství celkového dusíku (TN) a celkového organického uhlíku (TOC) v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou ve třech vzorcích zemědělských půd. Fumigačně extrakční metoda byla v této práci také aplikována na získaný směsný vzorek tvořený zeminou a kompostem, kdy do jedné směsi byl navíc přidán Anoxomer, tedy látka inhibující respiraci půdních mikroorganismů.

Obsah TOC či TN půdní mikrobiální biomasy byl dán rozdílem fumigované a nefumigované půdy. Hodnoty TOC i TN byly vždy vyšší ve fumigovaných vzorcích půd, což je známkou toho, že se při fumigaci opravdu lýzovaly buňky mikroorganismů a jejich cytoplazma se uvolnila do prostředí.

Množství TOC a TN bývá v různých půdách různé. Dusíku bývá podstatně méně než uhlíku a často se uvádí, že se tyto prvky nacházejí v půdě v poměru 10:1 (C:N). Podobné poměry lze nalézt i ve výsledcích této práce a lze konstatovat, že námi testované zemědělské půdy měly dostatečné zásobení dusíkem.

V testovaném směsném vzorku zeminy s kompostem, do které byl přidán Anoxomer, byla inhibována respirace půdních organismů. Zde bylo z hlediska TOC a TN prokázáno, že došlo k významnému úbytku celkové biomasy mikroorganismů v půdě.

Závěrem lze konstatovat, že stanovení celkového C mikrobiální biomasy, je tedy možno obecně považovat za nejspolehlivější a nejčastěji používanou metodu pro stanovení změn vlastností půd.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BRADY, Nyle C. *The Nature and Properties of Soils*. 10. vyd. New York: Macmillan Publishing Company, 1990. 599 s. ISBN 0023133619.
- [2] ČAPEK, Petr. *Fosfor v biomase půdních mikroorganismů a její odhad pomocí extrakčně-fumigační metody*. České Budějovice, 2010. Diplomová práce. Jihočeská univerzita. Přírodovědecká fakulta. Školitel Hana Šantrůčková.
- [3] RAJCHARD, Josef. *Ekologie III: struktura a funkce ekosystému, produkční ekologie, biogeochemické cykly, chemické faktory prostředí, základy ekologie půdy, ekologie vodního prostředí, aktuální celosvětové ekologické problémy*. 1. vyd. České Budějovice: Kopp, 2002. 197 s. ISBN 80-7232-191-9.
- [4] TOUŽÍN, Jiří. *Stručný přehled chemie prvků*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2003. 225 s. ISBN 80-2102-635-9.
- [5] KYNICKÝ, Jan. *Srovnání přirozené a inkubované půdní enzymatické aktivity na stanovištích suchých borů v jihovýchodní části Českého masivu*. Brno, 2009. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta. Vedoucí Pavel Samec.
- [6] RAUCH, Pavel. *Biochemie životního prostředí: vysokoškolský učební text pro posluchače MU Brno, UP Olomouc, VŠCHT Praha*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. 119 s. ISBN 80-7080-339-8.
- [7] HOFFMANN, Jaromír a Jan KUPEC. *Ochrana životního prostředí*. Brno: VUT, 1982, 121 s.
- [8] ČERVINKA, Pavel. *Ekologie a životní prostředí: učebnice pro střední odborné školy a učiliště*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství České geografické společnosti, 2005. 118 s. ISBN 80-8603-463-1.

- [9] PAUL, EldorAlvin. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 532 s. ISBN 978-0-12-546807-7.
- [10] KALAČ, Pavel a Jan TRÍSKA. *Chemie životního prostředí*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1998, 147 s. ISBN 80-7040-325-X.
- [11] MARTIN, J. P. a K. HAIDER. Microbial Activity in Relation to Soil Humus Formation. *Microbial Activity in Relation to Soil Humus Formation* [online]. 1970, roč. 111, č. 1 [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: http://journals.lww.com/soilsci/Citation/1971/01000/Microbial_Activity_in_Relation_to_Soil_Humus.7.aspx
- [12] NÁBĚLKOVÁ, Jana a Jana NEKOVÁŘOVÁ. *Chemie: chemie životního prostředí*. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. 197 s. ISBN 978-80-01-04534-3.
- [13] HYLMAROVÁ, Jana. *Ochrana půdy před negativními vlivy zemědělské výroby*. Hradec Králové, 2010. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Právnická fakulta. Vedoucí práce Jana Tkáčiková.
- [14] MIKANOVÁ, Olga, ŠIMON, Tomáš, CERHANOVÁ, Dana. *Hodnocení kvality půdy biologickými metodami. Metodika pro praxi*. V Praze: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2010. ISBN 978-80-7427-044-4. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-044-4.pdf>
- [15] Carbon cycle [obr.]. In: York Junior High [online]. [b.r.] [cit. 2013-05-17]. Dostupné z: <http://york.conroeisd.net/Teachers/jlutke/13F73FB200870B2F.1/Carbon%20Cycle.gif>
- [16] Nitrogen Cycle [obr.]. In: Biology: The Scientific Study of Life [online]. [2003] [cit. 2013-05-20]. Dostupné z: <http://bioh.wikispaces.com/More+Elemental+Cycles>
- [17] BALÍK, Jiří, Jindřich ČERNÝ a Daniela PAVLÍKOVÁ. *Systém dusíkaté výživy CULTAN u travních a jetelotravních porostů (certifikovaná metoda)* [online]. 2012 [cit. 2013-05-02]. ISBN 978-80-213-2330-8. Dostupné z:

<http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fdl.webcore.czu.cz%2Ffile%2FR1JUbnRwMDIDNHM9&ei=DB91UbXIA6Xg4QTrl4HYBg&usg=AFQjCNEecd2IKJjQ78l-3lv0I6XfxDB8ug&bvm=bv.45512109,d.bGE>

[18] HORÁKOVÁ, Dana a Miroslav NĚMEC. *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií* [online]. Masarykova univerzita v Brně, 2003 [cit. 2013-02-24]. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf. Laboratorní návody. Masarykova univerzita v Brně Přírodovědecká fakulta Katedra mikrobiologie.

[19] *Laboratory Manual of the Soil Microbial Biomass Group* [online]. 2006 [cit. 2013-02-24]. Dostupné z: <http://www.rothamsted.ac.uk/aen/smbweb1/downloads/labmanual.pdf>

[20] Pierce Firefly Luciferase Glow Assay Kit [obr.]. In: Thermo Scientific [online]. [b.r.][cit.2013-05-20]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=0F98C8F5-9570-BAFC-368A-C7F6FC73944E>

[21] HEINEMEYER, O., et al. Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and soil*, 1989, 116.2: 191-195. ISSN 1573-5036.

[22] JEŘÁBKOVÁ, Petra. *Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy*. Brno, 2010. Doktorská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Oldřich Zmeškal.

[23] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologická cvičení*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001, 66 s. ISBN 8073180170.

[24] PEŠKOVÁ, Michaela. *Aktivita půdních enzymů ve společenstvech trvalých travních porostů*. Olomouc, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Bořivoj Šarapatka.

- [25] CASIDA, L. E. Microbialmetabolicactivity in soil as measured by dehydrogenase-determinations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 34.6: 630-636.
- [26] MARGESIN, Rosa a Franz SCHINNER. *Manual for Soil Analysis—Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. Soil Biology*, Vol. 5. SpringerVerlag, Berlin, 2005. Dostupné z: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-28904-6_14?LI=true.
- [27] Celkový organický uhlík a chemická spotřeba kyslíku. *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2011 [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/125>.
- [28] HOUSER, Josef a Ladislav NOVOTNÝ. *Laboratorní cvičení ze speciálních metod instrumentální analýzy II: interní skriptum*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2002, 113 s. ISBN 80-7318-052-9.
- [29] HOLZBECHER, Závíš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 663 s.
- [30] VYTRÁS, Karel. *Kapitoly ze současné potenciometrie* [online]. Vyd. 2. Praha, 1997 [cit. 2013-05-25]. Dostupné z: http://kalch.upce.cz/add_on/potenciometrie.pdf
- [31] PANSU, Marc a Jacques GAUTHEYROU. *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Nizozemsko: Springer-VerlagBerlin Heidelberg, 2006. ISBN 13 978-3-540-31210-9.
- [32] HOUSER, Josef. *Laboratorní cvičení ze speciálních metod instrumentální analýzy I: interní skriptum*. Vyd. 1. Zlín: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000, 99 s. ISBN 80-2141-654-8.
- [33] SMELTOVÁ, Kateřina. *Kořenové čistírny odpadních vod*. Pardubice, 2010. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Jiří Palarčík.

- [34] VEČEŘOVÁ, Jitka. *Monitoring znečištění podzemních vod NO_3^- v oblasti Zábřežska*. Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Libor Kvítek.
- [35] JOST, Daphne Isabel, Rainer Georg JOERGENSEN a Albert SUNDRUM. Effect of cattle faeces with different microbial biomass content on soil properties, gaseous emissions and plant growth. *SpringerLink* [online]. 2013, č. 1 [cit. 2013-05-05].
Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00374-012-0697-y>
- [36] Instruction Manual Total Organic Carbon Analyzer Model TOC-5000A
- [37] NOVÁKOVÁ, Jarmila. *Biodegradace polyesterů a kopolyesterů s biodegradabilními plnivými*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Petra Jančová.
- [38] ONDŘÍŠEK, Petr. *Osud polymerního antioxidantu Anoxomeru v životním prostředí*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Markéta Julinová.
- [39] *Fyziologie mikroorganismů*. In: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Ústí nad Labem, [b.r.], [online] [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/6Fyziologie.pdf>
- [40] ALESSI, Daniel S.; WALSH, Dana M.; FEIN, Jeremy B. Uncertainties in determining microbial biomass C using the chloroform fumigation–extraction method. *Chemical Geology*, 2011, 280.1: 58-64.
- [41] Výživa a hnojení rostlin - Agrochemické vlastnosti půdy Dusík. In: *Agrokrom* [online]. [b.r.] [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: www.agrokrom.cz.
- [42] SETIA, Raj; VERMA, Suman Lata; MARSCHNER, Petra. Measuring microbial biomass carbon by direct extraction–Comparison with chloroform fumigation–extraction. *European Journal of Soil Biology*, 2012.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
c_b	Obsah extrahovatelného uhlíku obsaženého v buňkách
IC	Anorganický uhlík
IČ	Infračervený
ISE	Iontově selektivní elektroda
MZLU	Mendelova univerzita v Brně
TC	Celkový uhlík
TN	Celkový dusík
TN_F	Celkový dusík fumigované půdy
TN_N	Celkový dusík nefumigované půdy
TN_{PMB}	Celkový dusík půdní mikrobiální biomasy
TOC	Celkový organický uhlík
TOC_F	Celkový organický uhlík fumigované půdy
TOC_N	Celkový organický uhlík nefumigované půdy
TOC_{PMB}	Celkový organický uhlík půdní mikrobiální biomasy
VIS	Viditelná oblast světla
WHC_{max}	Maximální vodní kapacita
X-WHC	X% maximální vodní kapacita, (44% WHC)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Koloběh uhlíku [15]	20
Obr. 2: Koloběh dusíku [16]	21
Obr. 3: Procesy přeměn dusíku [3]	22
Obr. 4: Reakční systém luciferin – luciferasa [20]	24
Obr. 5: Fumigační zařízení [vlastní zdroj]	40

SEZNAM TABULEK

Tab. I: Stanovení půdního druhu a zrnitostní třídy.....	36
Tab. II: Charakteristika půd.....	42
Tab. III: Charakteristika směsi (zemina z lokality Lužice:kompost; 2:5)	43
Tab. IV: Uhlík v mg.25 g ⁻¹ sušiny půdy	43
Tab. V: Uhlík v mg.25 g ⁻¹ sušiny směsi (zemina:kompost; 2:5).....	44
Tab. VI: Dusík v mg.25 g ⁻¹ sušiny půdy.....	44
Tab. VII: Dusík v mg.25 g ⁻¹ sušiny směsi (zemina:kompost; 2:5).....	44
Tab. VIII: Shrnutí výsledků TOC a TN půdní mikrobiální biomasy testovaných vzorků.....	46
Tab. IX: Shrnutí výsledků TOC a TN mikrobiální biomasy testované směsi (zemina:kompost; 2:5).....	47
Tab. X: Uhlík (TOC) půdní mikrobiální biomasy stanoven v australských oblastech [42]	48