

Zborník vybraných príspevkov z konferencie

Život v pôde

s tematickým zameraním:

Antropogenní ovlivnění života v půde

7. - 8. februára 2012 v Lednici

**Zborník vybraných príspevkov z konferencie Život v pôde s tematickým zameraním:
Antropogenní ovlivnění života v půde**

Vedeckí garanti:

Ing. Jiřina Kučerová Foukalová, PhD.
doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.

Organizační garanti:

RNDr. Olívia Ďugová, CSc.
doc. Ing. Lubomír Růžek, CSc.
doc. Ing. Eduard Pokorný, PhD.
Mgr. Monika Vítězová, PhD.
Ing. Martin Brtnický
Ing. Jana Maková, PhD.

Editori:

doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.
Ing. Jana Maková, PhD.
Ing. Juraj Medo, PhD.

Lektori:

prof. Ing. Ján Gaduš, PhD.
doc. Ing. Erika Gömöryová, CSc.
doc. Ing. Janette Musilová, PhD.
doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.
doc. Ing. Peter Kováčik, CSc.
doc. RNDr. Alexandra Šimonovičová, CSc.
Ing. Martin Vivodík, PhD.

Schválil rektor SPU v Nitre dňa 8. 4. 2013 ako zborník vedeckých prác na CD nosiči

ISBN: 978-80-552-1008-7

OBSAH

Elbl J. - Kintl, A. - Záhora, J.: Dynamika úniku klíčových živin z jímací oblasti pro zásobování města Brna pitnou vodou	7
Javoreková, S. - Maková, J. - Medo, J. - Majerčíková, K. - Kováčsová, S. - Mašková, Z.: Vplyv aplikácie kompostu, dnového sedimentu a biokalu na pôdnu mikroocenózu.....	19
Javoreková, S. - Maková, J. - Medo, J. - Kováčsová, S. Genetická diverzita mikrobiálneho spoločenstva v pôde	31
Jirout, J. - Tříška, J. - Vrchotová, N. - Elhottová, D: Analýza reziduí tetracyklinových antibiotik v půdním prostředí.....	39
Kintl A. - Elbl J. - Záhora J. - Tůma I.: Vliv vyšší dostupnosti minerálních forem dusíku na množství volně žijících fixátorů dusíku v alpské louce	49
Kováčsová, S. - Javoreková, S. - Maková, J. - Medo, J. - Majerčíková, K.: Diverzita mikroorganizmov v pôde po aplikácii biokalu a biologického prípravku AZOTER.....	55
Majerčíková, K. - Kováčsová, S. - Javoreková, S. - Maková, J. - Medo, J.: Charakteristika mikroorganizmov v pôde po aplikácii biokalu a prípravku AZOTER metódou BIOLOG®	65
Maková, J. - Javoreková, S - Kačániová, M. - Medo, J. - Majerčíková, K. - Kováčsová, S.: Hodnotenie hygienicky významných skupín mikroorganizmov v bioplynovej stanici z hľadiska možnosti aplikácie vyhnitého kalu do pôdy.....	77
Růžek, L. - Foukalová, J. - Růžková, M. - Brtnický, M: Vybrané parametry černozemí (HPJ 01-08) jižní Moravy	85
Šimek, M. - Chroňáková, A. - Elhottová, D. - Křišťůfek, V. - Virtanen, S. - Simojoki A. - Yli-Halla M.: Bohatá mikrobiální spoločenstva v kyselé sulfátové pôde a jejich potenciál pro emise skleníkových plynů.....	91
Šimek M. - Hynšt J. - Chroňáková, A. - Elhottová D. - Šustr V. - Semanová S. - Procházková, H.: Tvorba a spotřeba metanu v půdě terestrického ekosystému	99

Vážení účastníci konferencie a ďalší čitatelia,

začiatok roka 2012 bol už po dvanásťkrát spojený s uskutočnením konferencie Život v pôde. Dostáva sa Vám do rúk Zborník, síce až s rokom vydania 2013, v ktorom je publikovaná iba časť príspevkov (11), ktoré boli prezentované na konferencii. Konferencia bola organizovaná pracovníkmi z Ústavu agrochemie, pôdoznanstvá, mikrobiologie a výživy rastlín, Mendelovej univerzity v Brne, v dňoch 7. - 8. 2. 2012, v príjemnom prostredí penziónu Včelařský dvůr v Lednici. Prezentovaných na nej bolo 26 príspevkov formou prednášok a 10 posterov z rôznych oblastí pôdnej ekológie. Väčšina príspevkov bola zameraná na oblasť sledovania mikrobiálneho spoločenstva a jeho aktivít v pôdach orných, v pôdach s trvalými trávnyimi porastmi, v pôdach na výsypkách po ťažbe uhlia, v arktických pôdach tundry, v pôdach archeologických nálezísk, v pôdach vznikajúcich spontánne na obnaženej materskej hornine, v zasolených pôdach alebo v pôdach v blízkosti cestných komunikácií. Menšia časť príspevkov bola zameraná na oblasť interakcií pôdneho zooedafónu s rastlinami a pôdnymi organizmami. Odbornú a vedeckú komunitu by mohli zaujať publikované príspevky s problematikou šírenia antibiotickej rezistencie a analýzy rezíduí antibiotík v pôde, hodnotenia vybraných parametrov černoze, dostupnosti foriem dusíka v pôde alpských lúk, vplyvu aplikácie biokalov, kompostov a biohnojív na pôdne mikrobiálne spoločenstvo, genetickej diverzity mikrobiálneho spoločenstva v pôde, dynamiky úniku kľúčových živín z oblasti zachytávania pitnej vody a možno tiež oblasti tvorby a spotreby plynov v pôde terestrického ekosystému.

I napriek tomu, že nastali určité problémy s vydaním tohto Zborníka, veríme, že i keď s určitým časovým oneskorením, aspoň táto časť publikovaných príspevkov z konferencie bude pre Vás inšpiratívna a bude prospešná aj v prípade riešenia nových vedeckých problémov zo zaujímavého a komplikovaného a v mnohých oblastiach ešte nepoznaného života v pôde.

doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.
za vedecký výbor konferencie

DYNAMIKA ÚNIKU KLÍČOVÝCH ŽIVIN Z JÍMACÍ OBLASTI PRO ZÁSOBOVÁNÍ MĚSTA BRNA PITNOU VODOU

DYNAMICS OF RELEASE OF KEY NUTRIENTS FROM THE CATCHMENT AREA FOR THE SUPPLY OF DRINKING WATER IN BRNO

Elbl Jakub, Kintl Antonín, Záhora Jaroslav

Department of Agrochemistry, Soil science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno

Abstract

The present article deals with contamination of the underground source of drinking water. This water source is lying in the region of Březová nad Svitavou. The source is contaminated by the key nutrient from the soil ecosystem. The groundwater is polluted by nitrogen compounds that are released from soil of different ecosystems. The main goal of this article is the remittance at connection with utilization of the soil and groundwater contamination. The obtained results from the present article helped us to understand connection between the escape of nitrogen to the underground source of drinking water and land use. From observed values, implies the connection between land use for agricultural activities and saturation of soil by nitrogen.

Key words: Drinking water source, indication wells, leaching, nitrogen, pollution

Úvod

Město Brno je druhým největším sídelním útvarem v České republice. Pro jeho obyvatele je již samozřejmostí, že každý den mají přístup ke kvalitní pitné vodě, dostupné z městské vodovodní sítě. Zdroje pitné vody pro město Brno a jeho nejbližší okolí lze obecně rozdělit na povrchové a podpovrchové. Nejvýznamnějším povrchovým a podpovrchovým zdrojem jsou zásoby podzemní vody v lokalitě Březová a povrchová nádrž Vír I. Za klíčové půdní živiny, které představují vážné ohrožení kvality pitné vody je považován dusičnanový a amonný dusík (resp. amoniakální N). Dusičnanový N (dusičnan) představuje riziko v podobě přímé kontaminace podzemních vod a amoniakální N představuje riziko, jakožto přirozená zásoba materiálu vhodného k nitrifikaci - vzniku dusičnanů. Od druhé poloviny 70. let 20. století je zaznamenán trend mírného a pravidelného zvyšování koncentrace dusičnanů ve vodě z jímací oblasti Březová nad Svitavou. Uvedený trend pokračuje i v současnosti a to přes razantní změny v oblasti aplikace hnojiv s vysokým obsahem nitrátů.

Kontaktní adresa: Ing. Jakub Elbl,

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno 13

email: jakub.elbl@mendelu.czwww.uapmv.af.mendelu.cz

tel: +420 545 133 324

Následkem zásahů člověka dochází ke změně globálního koloběhu dusíku. Mění se vstup dusíku do půdy – převládá minerální (hnojením anebo kyselými dešti). Člověk svou činností více než zdvojnásobil množství N, vstupujícího do suchozemských ekosystémů prostřednictvím atmosférické depozice (Galloway, 1995).

Největší nebezpečí pro kvalitu pitné vody představují dusičnany (NO_3^-). Jedná se o chemické sloučeniny, ve kterých dusík dosahuje hodnoty oxidačního čísla +V. Kontaminace podzemních vod dusičnany je rychlá a velmi snadná. Dochází k ní díky nízké sorpční schopnosti organominerálního komplexu půdy vůči záporně nabitým iontům. Tyto ionty pak snadno procházejí celým půdním profilem až do velmi vzdálených míst, kde může dojít ke kontaktu s hladinou podzemní vody. Hlavním zdrojem dusičnanů nemusí být pouze nitrátová hnojiva, ale může jim být i zvýšená dávka amoniakálních hnojiv. Hnojiva např. typu NH_2SO_4 mají díky větší vaznosti na jílové částice zpomalenou průchodnost půdním profilem. Dochází tak k situaci, kdy jsou tato hnojiva s obsahem amonného N nitrifikována za vzniku NO_3^- a to dříve, než dojde k jejich absorpci rostlinami. Do podzemních vod tak proniká NO_3^- , vzniklý mineralizací organicky vázaného N. Dusičnany jsou za výjimečných podmínek stabilní, jsou to: dostatečný parciální tlak kyslíku, absence imobilizace nitrátů a absence pohybu půdního roztoku půdním profilem. V prostředí bez dostatečného přístupu kyslíku podléhají dusičnany biologické denitrifikaci za vzniku N_2O a N_2 . Nebezpečnost zvýšeného výskytu NO_3^- v pitné vodě spočívá v možnosti jejich redukce bakteriemi v gastrointestinálním traktu člověka na toxický NO_2^- . Limit koncentrace dusičnanů v pitné vodě je stanoven vyhláškou ministerstva zdravotnictví č. 254/2004 Sb. na hodnotu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Za hlavní přirozený zdroj amoniakálního N lze považovat rozklad N organických látek, rostlinného a živočišného původu za pomoci amonizačních bakterií a hub. Zvýšená koncentrace amoniakálního N se ve vodním prostředí může objevit až po několikerém pobytu v mikrobiálních a rostlinných tělech. Přímo aplikovaný amonný N (ve formě hnojiv) je v půdě imobilizován v sorpčním komplexu nebo nitrifikován. Ve vodách se amoniakální N vyskytuje v iontové NH_4^+ a neiontové formě NH_3 . V rámci celé ČR je uváděna průměrná hodnota obsahu amoniakálního N v podzemních zdrojích pitné vody $0,09 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a v povrchových zdrojích dosahuje hodnoty $0,12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Pitter, 2009).

Znalost systému vytváření zásob podzemní vody v oblasti Březová nad Svitavou je nezbytná ke komplexnímu pochopení problematiky úniku půdních živin, které způsobují kontaminaci zásob podzemní vody. Zdroj Březová nad Svitavou lze rozdělit na jímací oblast (Ochranné pásmo vodního zdroje I. stupně – OPVZ), kde dochází k samotnému odběru pitné vody a infiltrační oblast (OPVZ II. st.), ve které dochází k infiltraci atmosférických srážek. Infiltrovaná srážková voda je pak za pomoci systému kolektorů a izolátorů dopravována do jímací oblasti. Infiltrační oblast se nachází ve východním okraji české křídové pánve. V této oblasti dochází k mírnému zvlnění ve formě plochých a protáhlých synklinál (navzájem odděleny antiklinálami). Nejvýznamnější je ústecká synklinála, která je uzavřena brachysynklinálním uzávěrem. Geologická stavba oblasti tak vytváří přirozený rezervoár, vhodný pro akumulaci podzemní vody. Rezervoár je vyplněn systémem kolektorů a izolátorů. V rámci ústecké synklinály považujeme za nejvýznamnější střední (první zvoďen) a spodní (druhá zvoďen) turonský kolektor. Střední turon je převážně tvořen slínovci a slíny, ve větších

hloubkách pak skvrnitými písčitymi slínovci. Střední turon je nejlépe dostupný, jelikož se vyskytuje v hloubce od 16 m. Právě z této oblasti je čerpáno největší množství pitné vody. Spodní turon (mocnost 70 – 80m) je tvořen převážně různými typy jemnozrnných glaukonitických vápnných a křemičitých pískovců (Krčmář, 1987).

Akumulace podzemních vod probíhá v křídových souvrstvích, a to z důvodu příznivých geologických poměrů. Srážková voda, doplňující střední a spodní zvodeň, může být infiltrována pouze v oblastech, kde svrchní část určitého kolektoru vystupuje na povrch. Velikost objemu takto akumulované podzemní vody záleží na velikosti infiltrační oblasti pro doplňování zásob podzemní vody v zájmovém území (I. a II. zvodeň). Názor na rozlohu zmíněné infiltrační oblasti je poměrně různorodý a nejčastěji se pohybuje kolem hodnoty 250 km² (Krčmář, 1986; Popelářová, 1996). Většina zásob podzemní vody je doplňována atmosférickými srážkami. Z tohoto důvodu je stávající rozloha a ochrana dané oblasti rozhodující pro zachování vydatnosti a kvality vody jímané v Březové nad Svitavou.

Práce čerpá z dílčích výsledků, shromážděných v rámci projektu *Sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v ochranném pásmu vodního zdroje II. stupně Březová nad Svitavou*, uvedený projekt byl pak implementován do bakalářské práce: *Dynamika úniku klíčových živin z jímací oblasti pro zásobování města Brna pitnou vodou*, která se stala základním podkladem pro vypracování předkládané práce.

Cílem předkládaného příspěvku je poukázat na příčinné souvislosti mezi způsoby využívání konkrétního území, které slouží jako infiltrační oblast pro tvorbu zásob podzemní vody a kontaminací podzemních vod minerálními a organickými látkami z půdního prostředí v dané oblasti.

Materiál a metody

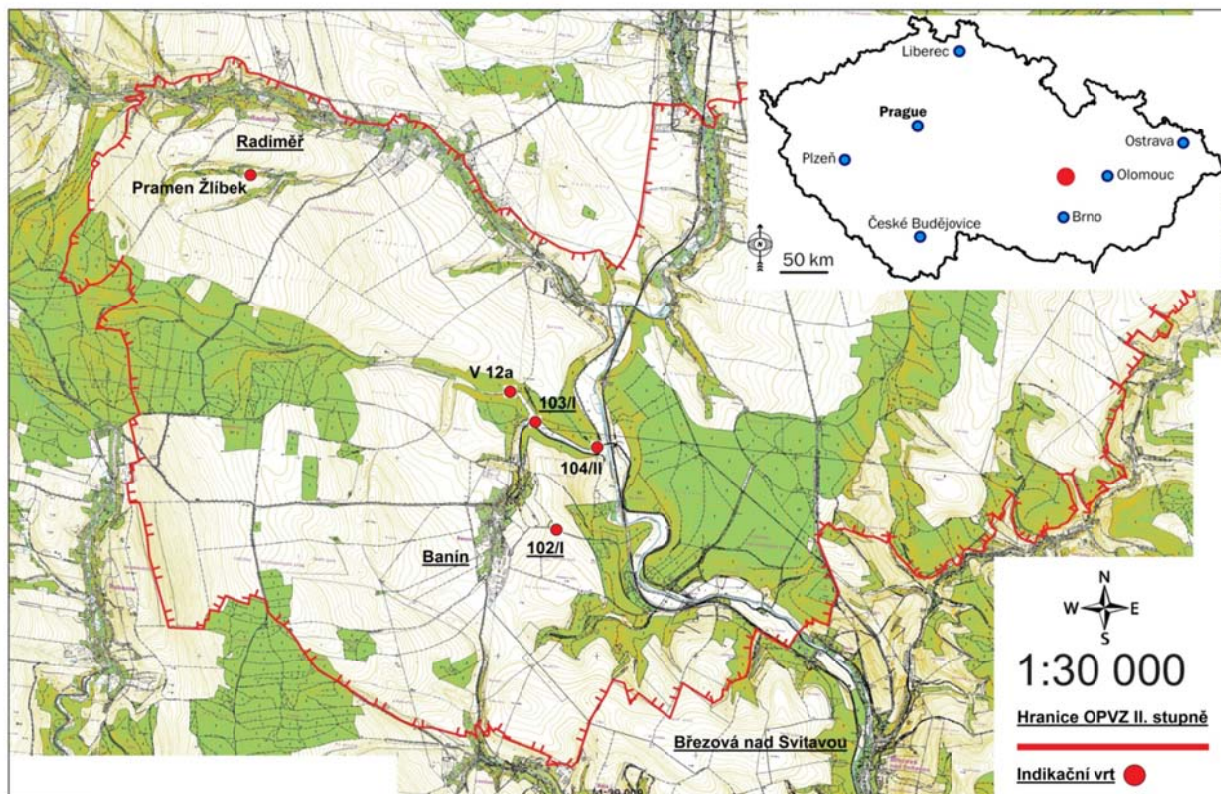
Metodiku předkládaného příspěvku lze rozdělit na dvě dílčí oblasti. První oblastí je sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v OPVZ II. st. Březová nad Svitavou a druhou sledování vývoje koncentrace dusičnanového dusíku v podzemních vodách OPVZ II. st. Březová nad Svitavou pomocí systému indikačních vrtů.

Zájmová oblast

Zájmovou oblast vymezuje ochranné pásmo vodního zdroje (OPVZ) II. st. Březová nad Svitavou (obr. 1), které náleží dle nitrátové směrnice (nařízení vlády č. 103/2003 Sb.) do zranitelných oblastí a dále je součástí celkového oběhu podzemní vody v oblasti ústecké synklinály. Stěžejním důvodem pro zvolení OPVZ II. st., jako zájmové oblasti pro zjišťování příčinných souvislostí mezi únikem N_{\min} z půdy do podzemních vod a využíváním půdního krytu, je jeho význam pro obnovu a tvorbu zásob podzemních vod v dané lokalitě. Přímo v OPVZ II. st. a v jeho nejbližším okolí dochází k infiltraci atmosférických srážek, a proto stav půdního prostředí v zájmové oblasti je plně odpovědný za kvantitu a především kvalitu podzemní vody jímané v lokalitě Březová nad Svitavou. Samotná jímací oblast náleží do OPVZ I. st.

OPVZ II. st. zahrnuje půdy s různým využitím (les, orná půda, TTP atd.), které jsou součástí katastrálního území dvanácti obcí (pro srovnání OPVZ I. stupně se rozprostírá pouze na

k. ú. čtyř obcí). Součástí zájmové oblasti jsou i povodí Radiměřského a Banínského potoka, která kvalitou vody ve svých vodotečích významně ovlivňují chemické složení podzemní vody v jímací oblasti, a to z důvodu hydrologického hlediska, kdy nemají samostatný oběh podzemní vody.



Obr. 1 Ochranné pásmo vodního zdroje II. stupně Brezová nad Svitavou (BVK, a.s.)

Sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v OPVZ. II stupně Brezová

Sledování úniku minerálního dusíku bylo prováděno v oblasti povodí Radiměřského a Banínského potoka, přesněji v rámci katastrálního území obce Banín a Radiměř. V obou povodích jsou znatelné projevy lidské činnosti, většina půdy je využívána k zemědělskému hospodaření anebo jiným způsobem nepřímo ovlivněna lidskou činností. Potvrzením zmíněného faktu je i stupeň lesnatosti, který pro povodí Banínského potoka dosahuje hodnoty 39 % a pro povodí Radiměřského potoka má hodnotu pouze 18,7 %. Obě lokality jsou součástí OPVZ II. st. a tím i infiltrační oblasti pro doplňování zásoby podzemní vody. Poskytují nám tak zřetelný příklad využití půdy v zájmové oblasti. Většinu rozlohy obou povodí tvoří pozemky využívané k zemědělské činnosti.

Únik minerálního dusíku z vybraných půd různých ekosystémů byl sledován za využití směsných iontoměničů (IER, poměr katex : anex, 1:1). Iontoměniče byly umístěny v novodurovém pouzdře, které bylo z obou stran kryto polyamidovou síťovinou o rozměrech oka 42 μ m. Byly použity novodurová pouzdra o průměru 70 mm a výšce 4 mm. Ve vybraných ekosystémech (orná půda – v letech 2004 až 2006 střídání pšenice ozimé a řepky ozimé, louka, pastvina a zimovací obora) byly vykopány půdní sondy. Jednotlivá pouzdra s iontoměniči byla

vsazena do čela půdní sondy o rozměrech v cm (h*š*d) 65*30*100 v hloubce 20 a 50 cm. Po dokončení aplikace iontoměníčů bylo čelo půdní sondy překryto geotextilií a sonda opětovně uzavřena půdou při současném respektování genetických půdních horizontů. Iontoměníče byly do půdy umístěny ve vegetačním období (rok 2005) a v období vegetačního klidu (2005/2006). Při každé výměně pouzder bylo provedeno posunutí čel sond o 10 cm. Počet opakování pro jednu hloubku jedné studované varianty byl stanoven na 8. Po ukončení měření se provedla resorpce nasorbovaných iontů pomocí 10% roztoku NaCl. Uvolněné ionty se pak stanovily příslušnými laboratorními metodami. Každá půdní sonda byla lokalizována za pomoci systému GPS.

Sledování vývoje koncentrace dusičnanového dusíku v podzemních vodách OPVZ II. stupně Březová pomocí systému indikačních vrtů

K vyhodnocení vývoje koncentrace dusičnanového dusíku byly využity chemické analýzy, prováděné pro jednotlivé vzorky vody (vzorky) odebírané jak z první tak i z druhé zvodně za pomoci systému indikačních vrtů (dále IV). Analýzy prováděla společnost Brněnské vodárny a kanalizace (BVK), a.s. za účelem ověření, zda parametry, zjištěné při analýzách jednotlivých vzorků odebraných z IV odpovídají vyhlášce č. 252/2004 Sb. hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost kontrol. Primární pozornost byla věnována oblasti I. zvodně, kde díky nízké hloubce hladiny podzemní vody a rozsáhlé infiltrační oblasti hrozí největší riziko kontaminace nitráty.

Pro II. zvodně je riziko z hlediska kontaminace nitráty nižší, a to z důvodu minimální infiltrační plochy, která se nachází především v oblastech na západě a východě OPVZ II. st. Kromě minimální rozlohy infiltrační oblasti má příznivý vliv na omezení úniku minerálního dusíku i způsob využití pozemků v této oblasti. Protože se jedná o lesní porosty a plochy využívané minimálně k zemědělské činnosti. Nedochozí tak k dodávání minerálního dusíku ve formě hnojiv, ale pouze z atmosférických depozic a odumřelé biomasy.

Pro zjištění dynamiky vývoje koncentrace dusičnanového N v podzemních vodách zájmové oblasti byly vybrány IV: 12a, 102/I a 103/I (vyznačeny na obr. 1), které byly doplněny o údaje pramene Žlíbek jakožto představitele přirozeného vývěru podzemní vody I. zvodně. Pro potvrzení minimálního obsahu dusičnanového N ve vodách II. zvodně byl vybrán IV 104/II.

Každý IV byl posuzován z hlediska průměrné koncentrace dusičnanového dusíku v mg/l za časové období od roku 2002 do roku 2009. Zohledňována byla průměrná měsíční koncentrace pro období 2002 až 2009 a průměrná roční koncentrace pro jednotlivé roky uvedeného období. Pro každou variantu (měsíční i roční) byl zpracován vývoj koncentrace dusičnanového dusíku graficky. Při hodnocení jednotlivých vrtů se posuzovala nejen samotná hodnota koncentrace, ale i způsob využití půdy v nejbližší okolí vrtu a vývoj hodnoty koncentrace vůči limitní hodnotě 50 mg·l⁻¹.

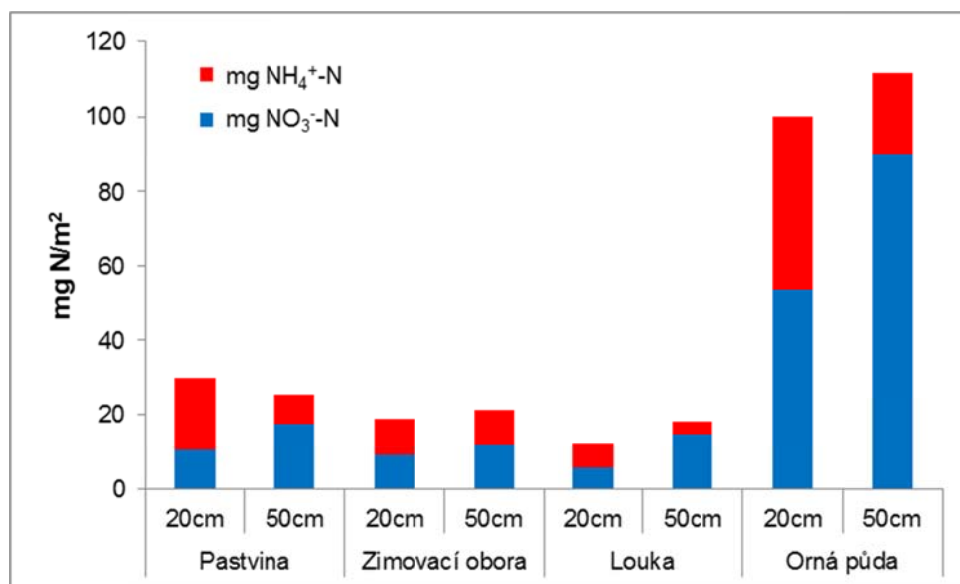
Výsledky a diskuze

Hlavním předmětem zájmu byla dynamika vývoje koncentrace dusičnanového dusíku v první zvodni v období od roku 2002 do roku 2009 a únik minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v zájmové oblasti OPVZ II. stupně.

Únik minerálního dusíku

Sledování úniku minerálního dusíku bylo prováděno v období vegetační sezóny (2005) a vegetačního klidu (2005/2006). Na obr. 2 a 3 jsou graficky vyjádřeny naměřené hodnoty kumulativního záchytu minerálního N v $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Přesněji se jedná o průměrné hodnoty záchytu amonného a dusičnanového dusíku v hloubkách 20 a 50 cm v půdách čtyř různých ekosystémů během vegetačního období a následně během vegetačního klidu. Zjištěné hodnoty poukazují na zřetelné rozdíly mezi množstvím zachyceného minerálního dusíku v jednotlivých půdách různých ekosystémů. Záhora (2001) uvedený stav vysvětluje, tak že množství zachycených amonných nebo nitrátových iontů na zrnech iontoměníčů je přímo úměrné schopnosti biotických složek ekosystému nenávratně ztratit klíčovou živinu z uzavřených vnitřních cyklů.

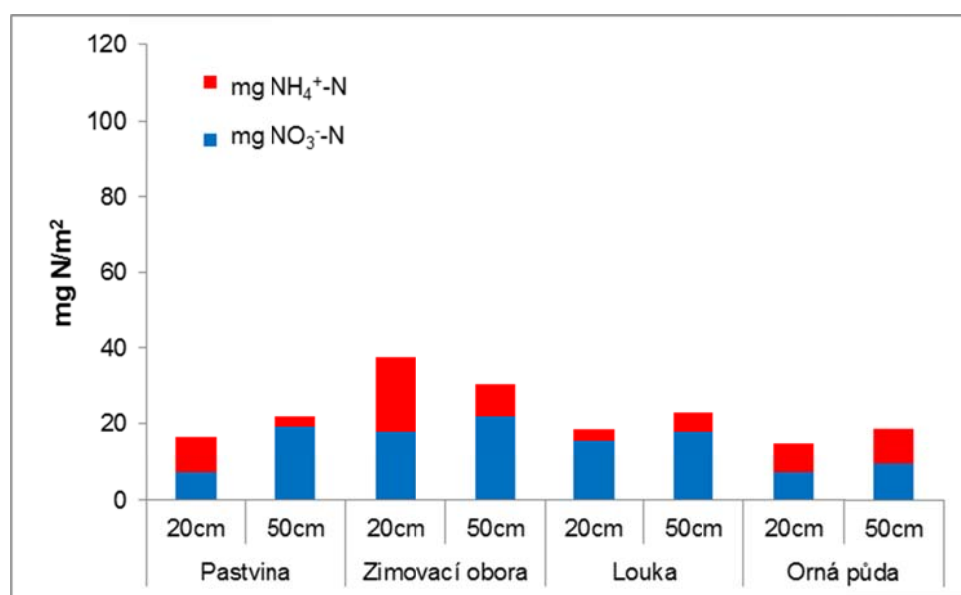
Zvýšené úniky N_{min} z orné půdy během vegetačního období, tak potvrzují sníženou mikrobiální aktivitu v těchto půdách. Uvedený pokles mikrobiální aktivity v rhizosféře, která je klíčová pro zadržení N v půdním prostředí, je způsoben nevhodnou zemědělskou praxí. Přesněji užíváním minerálních hnojiv, absencí leguminóz a klidového období v osevních postupech.



Obr. 2 Amonný a nitrátový N zachycený v IER pouzdrech v hloubkách 20 a 50 cm v půdách různých ekosystémů za vegetační sezónu 2005. Vyznačeny jsou mediány z osmi opakování.

Na obr. 2 jsou uvedeny záchyty minerálního dusíku během vegetačního období a na obr. 3 během vegetačního klidu. Pro vegetační období je charakteristická rozdílnost v záchytu minerálního N mezi jednotlivými ekosystémy. Nejvyššího záchytu dusičnanového N (nitrátů) bylo dosaženo v ekosystému orné půdy, kde při hloubce 50 cm bylo sorbováno $90 \text{ mgN}\cdot\text{m}^{-2}$. Zjištěná hodnota sice nepředstavuje extrémně vysoký únik, ale lze ji označit za značně rizikovou z hlediska nebezpečí možné kontaminace podzemní vody. Protože podle Záhory *et al.* (2008) N_{min} zachycený v hloubce 50 cm lze považovat za nitrátový kontaminant podzemních vod. Důvodem je skutečnost, že v této hloubce se již nedá očekávat významnější mikrobiální aktivita či odčerpávání N látek rostlinami. Kromě uvedené skutečnosti, další

nebezpečí představuje pedologická a geologická charakteristika zájmové oblasti. Typická je velká mozaika více než 30 BPEJ, v místě měření převažovala HPJ 31 (genetický půdní představitel: hnědé půdy, půdní druh: lehké půdy), která je tvořena propustnými půdními substráty (pískovce). Geologickou stavbu OPVZ II. st. a její vliv na tvorbu a vlastnosti podzemní vody v oblasti Březová nad Svitavou popisuje (Krčmář, 1987). Uvedený autor mimo jiné popisuje způsob obnovy zásob podzemní vody v této lokalitě. Ze kterého je patrné, že zvýšená koncentrace N_{\min} v hloubce 50 cm představuje „zdroj“ nitrátů pro kontaminaci podzemní vody v zájmové oblasti. Jelikož infiltrační plochu v této oblasti představuje orná půda (v místě měření na katastrálním území Banín představovala 81 % z výměry). Ostatní varianty nepřesáhly hodnotu kumulativního zachytu minerálního N $30 \text{ mg N} \cdot \text{m}^{-2}$.



Obr. 3 Amonný a nitrátový N zachycený v IER pouzdech v hloubkách 20 a 50 cm v půdách různých ekosystémů za období vegetačního klidu 2005/2006. Vyznačeny jsou mediány z osmi opakování.

Během mimo-vegetačního období se nevyskytují výrazné rozdíly mezi jednotlivými variantami. Pouze u varianty „zimovací obora“ dochází k nárůstu zachytu minerálního dusíku v období vegetačního klidu oproti vegetačnímu období, naopak pastvina vykazuje pro oba časové úseky stálé hodnoty. Uvedený deficit je způsoben v rozdílnosti dodávky organické hmoty (exkrementů) o obsahu N. V prostoru zimovací obory tak ve vegetačním období vzniká diferenciační stav v množství dodávané organické hmoty, protože zimovací obora je využívána hospodářskými zvířaty pouze v zimních měsících. Oproti zimovací obore je pastvina využívána k celoroční intenzivní pastvě a z toho důvodů má stálou dotaci exkrementů.

Sledování vývoje koncentrace dusičnanů

Vývoj koncentrace dusičnanů byl sledován v období od roku 2002 do roku 2009. Porovnávána byla průměrná koncentrace v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a to jak za jednotlivé měsíce (leden až prosinec pro celé

sedmileté období), tak i za jednotlivé roky. Údaje o koncentraci dusičnanů ve vybraných indikačních vrtech poskytla společnost BVK, a.s.

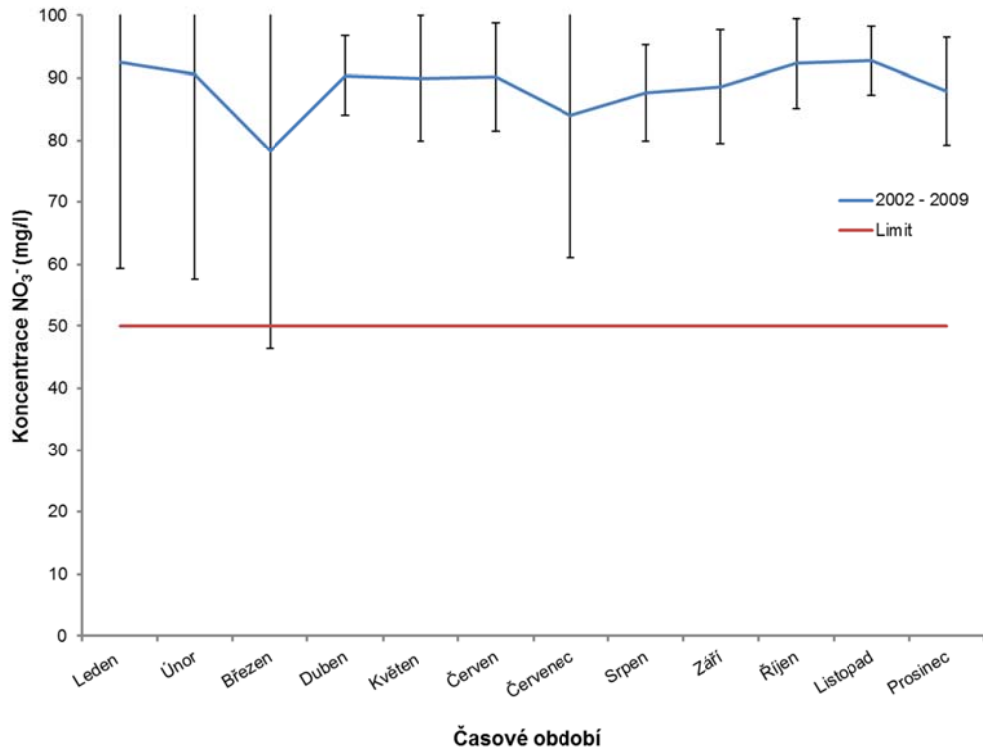
Pro zájmové období, oproti vývoji v počátcích 90. let je charakteristická situace „určité stabilizace“. Koncentrace dusičnanového dusíku ve vzorcích, odebraných z první zvodně extrémně nerostla ale pravidelně u některých indikačních vrtů, v různých obdobích přesahovala limitní hodnotu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V rámci porovnávání jednotlivých indikačních vrtů první zvodně byly nalezeny odlišné trendy vývoje koncentrace dusičnanů v návaznosti na využívání okolní půdy.

Vzorky odebrané z indikačních vrtů umístěných v lesních lokalitách, nebo obklopených trvalým travním porostem, vykazovaly nižší hodnoty průměrné měsíční i roční koncentrace dusičnanů. Tyto hodnoty nepřesahovaly hranici $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Oproti tomu vzorky odebrané z vrtů, které se nacházejí v zemědělských oblastech, vykazovaly výrazně zvýšené hodnoty koncentrace dusičnanů. Naměřené hodnoty průměrné měsíční a roční koncentrace přesahovaly hranici $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace dusičnanů ve vzorcích odebraných z druhé zvodně nepřesáhla hodnotu $28 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Uvedenou hodnotu lze označit za nízkou v porovnání se zjištěných hodnot pro IV první zvodně.

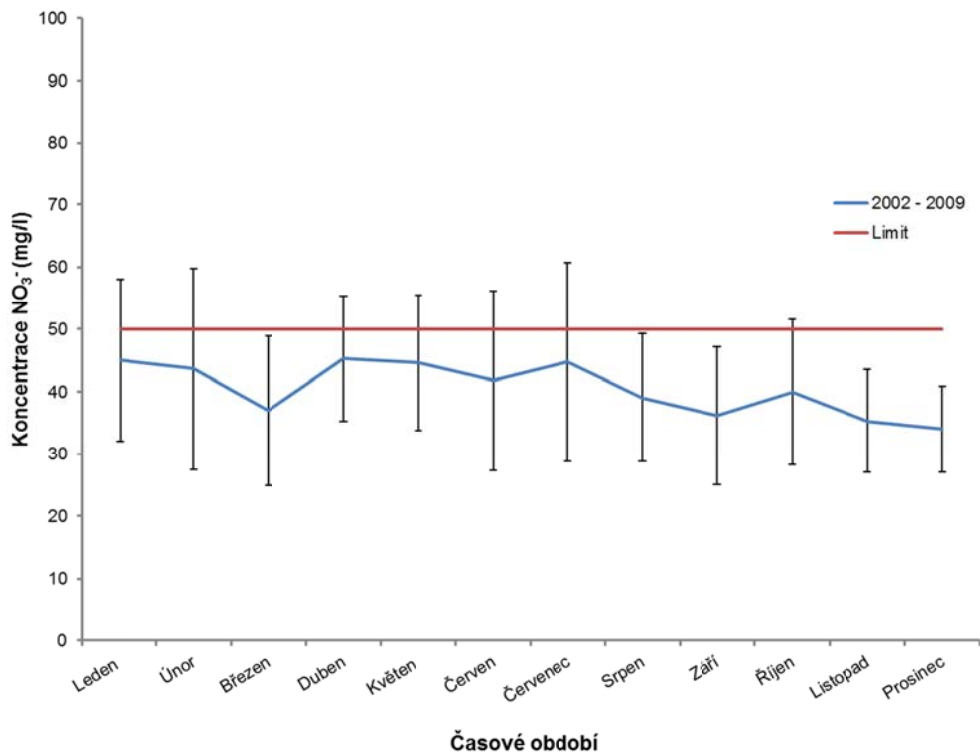
Jako modelový příklad byly vybrány dva indikační vrty, 102/I a 103/I. Rozdílnost vrtů spočívá v jejich umístění. Indikační vrt 102/I se nachází v zemědělsky intenzivně využívané oblasti. Při této poloze vykazoval ve vzorcích odebraných v období 2002-2009 vysoké hodnoty průměrné měsíční a roční koncentraci dusičnanů. Pravidelně docházelo k překročení limitu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Z průběhu grafu na obr. 4 je patrné, že nejvíce je půda ohrožena na počátku a na konci vegetačního období. Uvedený fakt koresponduje s hodnotami, které byly uvedeny v předešlé části. Únik dusíkatých látek z půdního prostředí u půd dotovaných minerálním dusíkem (orná půda) je skokový v závislosti na termínu dodávání těchto látek do půdy (např. hnojením). Zcela jiné hodnoty poskytl indikační vrt 103/I nacházející se v zalesněné oblasti. Průměrná roční koncentrace v odebraných vzorcích nepřesáhla limit $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrná měsíční koncentrace dusičnanového dusíku měla stabilní průběh a hodnoty pod touto kritickou hranicí (obr. 5).

Hodnoty naměřené při sledování úniku minerálního N z půdního profilu poukazují na nebezpečí rychlého vyplavování N z orných půd. Na základě hodnot zjištěných pro IV 102/I lze konstatovat, že půdy které jsou v zájmové oblasti využívány pro zemědělskou činnost, vykazují rostoucí dynamiku úniku dusičnanového dusíku do podzemních vod. Nebezpečí úniku minerálního N do podzemních vod z orné půdy ve vegetačním období potvrzují i zjištěné hodnoty během měření za využití iontoměničů.

Grafy na obr. 4 a 5 reprezentují průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (5% hladina významnosti, $p < 0,05$).



Obr. 4 Průměrná měsíční koncentrace dusičnanového dusíku v indikačním vrtu 102/I za období 2002 až 2009.



Obr. 5 Průměrná měsíční koncentrace dusičnanového dusíku v indikačním vrtu 103/I za období 2002 až 2009.

Závěr

Během posledních dvou století lidská populace výrazně změnila globální koloběh dusíku a to prostřednictvím antropogenních vstupů, mezi které patří aplikace minerálních dusíkatých hnojiv, chov zvířat, městské a zemědělské odtoky, průmyslové odpady a splaškové vody (Donatella *et al.*, 2010). Dochází tedy k nadměrnému vstupu místně „nepůvodního“ dusíku.

Dusík v půdě následně reaguje za vzniku jednoduchých organických látek (aminokyseliny) a anorganických sloučenin (dusičnanový dusík). S rostoucím množstvím dusíku v půdě může dojít k situaci, kdy půda je dusíkem nasycena a rostliny ani mikroorganismy nejsou schopny nadbytečný dusík imobilizovat. Aber *et al.* (1989) definují nasycení půdy dusíkem jako stav, kdy dostupnost amonného a dusičnanového dusíku je vyšší než celková kombinovaná rostlinná a mikrobiální nutriční poptávka. Při takovémto nasycení lze hovořit o znečištění půdy dusíkem. Z nasycené půdy je dusík například v podobě dusičnanového dusíku vyplavován do zdrojů podzemních vod, kde dochází k jejich rozsáhlé kontaminaci.

Kontaminace podzemních vod sloučeninami dusíku je způsobena přesycením půdních ekosystémů dusíkem. Dusík je vylučován z půdních ekosystémů po překročení akumulací kapacity. Geologická stavba zájmové oblasti (pískovce, provzdušněné půdy) umožňuje rychlou perkolaci dusičnanového dusíku. Spolu s nízkou sorpční schopností organominerálního komplexu půdy vůči záporně nabitým iontům, umožňuje rychlý pohyb dusičnanů půdním profilem a tím i kontaminaci podzemních vod. Nejvíce je půda ohrožena v klidovém období, v počátcích a na konci vegetačního období, kdy hrozí nejvyšší úniky dusíkatých látek z půdních ekosystémů. Největší nebezpečí představují zemědělsky využívané půdy, kde existuje příčinná souvislost mezi způsobem využívání půdy a dynamikou úniku dusičnanového dusíku. Půdy, které jsou v zájmové oblasti využívány pro zemědělskou činnost, vykazují rostoucí dynamiku úniku dusičnanového dusíku do podzemní vody. Hodnota úniku překračuje kritickou hranici $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Vyplavování dusíku z orných půd je rychlejší než z půd ostatních a pro změnu negativního trendu je nezbytné provést opatření v osevních postupech. Další možností je změna ve využití půdy (převod orné půdy na trvale travní porosty nebo pozemky určené k plnění funkce lesa).

Poděkování

Práce byla vypracována s podporou výzkumného záměru č. MSM6215648905 „Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. Zpracování dat bylo podpořeno projektem NAZV ev. č.: QJ1220007 „Možnosti zadržení reaktivního dusíku ze zemědělství ve vodohospodářsky nejzranitelnější oblasti“ QJ1220007. Důležité podklady pro vypracování práce poskytla společnost Brněnské Vodárny a Kanalizace, a.s. zastoupena Ing. Petrem Nohelem.

Použita literatura

ABER, J. D. – NADELHOFFER, P. S. – MELILLO, A. J. M. 1989. Nitrogen saturation in northern forest ekosystém: excess nitrogen from fossil fuel combustion may stress the biosphere. In *BioScience*, roč. 39, 1989, č. 6, s. 338-378.

- DONATELLA, A. – MATTEO, D. M. – ALESSIO, C. 2010. Screen printed biosensors for detection of nitrates in drinking water. In *20th European symposium on computer aided process engineering: ESCAPE-20*. Amsterdam : Elsevier, 2010, s. 283-288. ISBN 978-044-4535-696.
- ELBL, J. 2010. Dynamika úniku kľúčových živin z jímacej oblasti pro zásobování města Brna pitnou vodou : bakalářská práce, Brno : MENDELU, 2010. 75 s.
- GALLOWAY, J. N. 1995. Acid deposition: perspectives in time and space. In *Water, Air & Soil pollution*, roč. 85, 1995, č. 1, s. 15-24.
- KRČMÁŘ, A. – KRÍŽ, H. 1987. *Studia Geographica 89: Vliv geografických podmínek na využívání podzemní vody v jímacím území u Březové nad Svitavou*. Brno : Geografický ústav ČSAV, 1989. 231 s. ISSN 0587-1247.
- NOHEL, P. – ZÁHORA, J. – MEJZLÍK, L. 2008. Sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v OPVZ II. stupně Březová nad Svitavou. In *SOVAK*, roč. 17, 2008, č. 7-8, s. 48-51.
- PITTER, P. 2009. *Hydrochemie*. 4. vyd. Praha : VŠCHT, 2009, 568 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
- POPELÁŘOVÁ, V. 1996. Březovský vodovod: Stanovení podmínek účinné ochrany vodního zdroje : diplomová práce, Brno : MUNI, 1996. 62 s.
- ZÁHORA, J. 2001. Dostupnost dusíku v půdě vřesovišť Národního parku. In *Thayensia*, roč. 4, 2001, s. 169-181. ISSN 1212-3560.
- ZÁHORA, J. – MEJZLÍK, L. 2007. Vyplavování minerálního dusíku do podzemních vod z půdního prostředí rozdílných ekosystémů. In *Ekológia travného porastu VII*. Banská Bystrica : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu – Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva, 2007, s. 170-174. ISBN 978-80-88872-69-6.

VPLYV APLIKÁCIE KOMPOSTU, DNOVÉHO SEDIMENTU A BIOKALU NA PÔDNU MIKROCENÓZU

EFFECT OF APPLICATION OF COMPOST, SEDIMENT AND BIOSLUDGE ON SOIL MICROECENOSIS

Javoreková Soňa, Maková Jana, Medo Juraj, Majerčíková Kamila, Kováčsová Silvia, Mašková Zuzana

Katedra mikrobiológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Abstract

In our work, we observed the changes of microbial community composition using PCR DGGE and the numerous representations of bacteria and microscopic fungi using classic plate dilution method after application of three different organic substrates (compost, bottom sediments, biosludge) to the agricultural soil in laboratory conditions. According to the results of the cluster analysis of PCR DGGE, the addition of compost, bottom sediments and biosludge to the soil caused changes in bacterial and fungal community. The diversity of bacteria was the least influenced by the addition of compost (similarity from 48 to 62 %) and it was the most influenced by the addition of sewage sludge (33 %), on the 1st as well as on the 105th day of incubation in both of tested doses. The statistically significant differences in numbers of bacteria (ANOVA, Tukey test, $P \leq 0.05$) were found only on the 1st day of incubation for all three substrate additions. The structure of the community of microscopic fungi was influenced primarily by the addition of sewage sludge, but only on the 105th day of incubation. The addition of bottom sediment caused statistically significant changes of the numerous representations of microscopic fungi only on the 105th day of incubation. It was caused by the presence of microscopic fungus *Penicillium simplicissimum*.

Key words: microbial community, PCR DGGE, soil, compost, biosludge, bottom sediment

Úvod

Pôda je prostredím do ktorého sa v prípade poľnohospodárskej výroby aplikujú rôzne, najmä organické látky (komposty, biokaly, dnové sedimenty, pesticídy, čistiarenské kaly atď.) za účelom zvyšovania produkčných vlastností pôdy. Avšak tieto látky môžu po aplikácii vyvolať dočasné alebo trvalé zmeny pôvodnej kvality pôdy. Podľa Marschner *et al.* (2003) sa aplikáciou organických a minerálnych hnojív do pôdy okrem dodávania živín pre rastliny môžu ovplyvniť fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy, a s nimi aj mikrobiálne populácie. Na sledovanie týchto zmien sa v súčasnosti využívajú najmä molekulárne metódy Kirk *et al.* (2004), a to predovšetkým génové sondy (Ka *et al.*, 1994), PCR metódy (Rubio *et al.*, 2005) a lipidové biomarkery (Stephen *et al.*, 1999). Jednou z často využívaných PCR metód na analýzu štruktúry mikrobiálneho spoločenstva z pôdy je metóda PCR DGGE.

Kontaktná adresa: doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.

Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Tr. A. Hlinku 2,

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 949 76 Nitra,

e-mail: sona.javorekova@uniag.sk

Táto metóda sa už využila napr. pri sledovaní zmien druhovej diverzity mikroorganizmov v pôde Yellowstonekého Národného Parku vplyvom prudkého zvýšenia pôdnej teploty geotermálnou aktivitou (Norris *et al.* 2002), v prípade sledovania účinku teploty a hnojenia na aktivitu a štruktúru spoločenstva baktérií oxidujúcich amoniak, nachádzajúcich sa v poľnohospodárskej a lúčnej pôde (Avrahami *et al.*, 2003) a tiež na sledovanie vplyvu rôznych typov obhospodarovania vysokohorských pasienkov v Škótsku na štruktúru rizosférového spoločenstva *Archaea* (Nicol *et al.*, 2003).

Cieľom našej práce bolo sledovanie zmien zloženia mikrobiálneho spoločenstva v kultivácii rekultivovanej po aplikácii dvoch rôznych dávok (20 a 80 t.ha⁻¹) kompostu, sedimentu a biokalu v laboratórnych podmienkach metódou PCR DGGE a sledovanie zmien početného zastúpenia mikroorganizmov klasickou platňovou zriedovacou metódou.

Materiál a metodika

Laboratórny pokus sme založili z pôdy odobratej zo záhrady (pestovanie najmä zeleniny) v lokalite juhozápadného Slovenska Velké Zálužie (48°18'N, 17°56'E) na jar v roku 2009 pred sejbou plodín. Jednalo sa o pôdny typ hnedozem a pôdny druh hlinito-ílovitý. Po 8 týždňovej preinkubácii pôdy pri 4±1 °C (stabilizácii pôdnych vlastností) sme vytvorili varianty (tab. 1) s prídavkom substrátov (kompost, sediment, biokal), ktoré sme aplikovali v dávkach 20 t.ha⁻¹ (a) a 80 t.ha⁻¹(b) a inkubovali za aeróbnych podmienok v termostate (BT 120M) 105 dní, pri teplote 28 °C a vlhkosť pôdy sme udržiavali na 30 % PVK. Ako kontrolný variant sme použili preinkubovanú vzorku zeminy bez substrátov (S0). Všetky merania sme uskutočnili po 1.dni inkubácie (S1) a po 105.dni (S105).

Variant	Substrát	Dávka t.ha ⁻¹	Deň merania	Označenie
I.	Pôda + Kompost	20	1.	S1+Ka
II.		20	105.	S105+Ka
III.		80	1.	S1+Kb
IV.		80	105.	S105+Kb
V.	Pôda + Sediment	20	1.	S1 +Sea
VI.		20	105.	S105+Sea
VII.		80	1.	S1+Seb
VIII.		80	105.	S105+Seb
IX.	Pôda + Biokal	20	1.	S1+Ba
X.		20	105.	S105+Ba
XI.		80	1.	S1+Bb
XII.		80	105.	S105+Bb

Tab 1. Varianty pokusu a ich označenie. K-kompost, B-biokal, Se-sediment

Charakteristika aplikovaných substrátov

Aplikovaný kompost (K) sme odobrali vo firme BP AGRO Centrum Hlohovec v spolupráci s Centrom výskumu živočíšnej výroby v Nitre. Bol vyrobený z vedľajších jatočných odpadov zo spracovania králikov (vnútornosti, časti kože, kosti). Hotový kompost bol uskladnený na dvore firmy za aeróbnych podmienok (bez prikrytia), kde ďalej vyzrieval 3 roky. Odobratý kompost predstavoval stabilizovanú, nezapáchajúcu hnedú až čiernu homogénnu hmotu,

hrudkovitej štruktúry podobnú zemine. Vzorku dnového sedimentu (Se) sme odobrali do hĺbky 0,15 m z vypustenej vodnej nádrže Veľký Kolpašský tajch, po 32 rokoch prevádzky. Tretím aplikovaným substrátom do pôdy bol polroka vyhnitý biokal (B), ktorý bol vyrobený anaeróbnym rozkladom poľnohospodárskych odpadov (maštalný hnoj a hnojovica ošípaných s prídavkom trávnych miešaniiek) za mezofilných podmienok. Substrát sme odobrali z bioplynovej stanice vo Vysokoškolskom poľnohospodárskom podniku SPU v Kolíňanoch. Biokal predstavoval tmavú, nepáchnuću, heterogénnu suspenziu pevných a tekutých koloidných látok.

Izolácia DNA a PCR DGGE

Celkovú DNA sme izolovali priamo z 0,25 g pôdnej vzorky použitím PowerSoil DNA Kit (MoBio Laboratories). Koncentráciu a kvalitu vyizolovanej DNA sme zistili spektrofotometricky (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) aj elektroforeticky na 1 % agarózovom géli (horizontálna elektroforéza) v 1 x TAE (Tris Acetate EDTA pufoer) (Ascher *et al.*, 2009) s farbivom GelRed™ (Biotium). Následnú vizualizáciu prúžkov na géli sme uskutočnili vo videodokumentačnom zariadení Gel Logic 212 PRO Imaging System (Carestream Health, Inc., USA). PCR amplifikáciu DNA baktérií špecifického úseku bakteriálnej DNA (16S rDNA) sme uskutočnili v termocykléri Biometra TPersonal a použili sme pár primerov podľa Brons a van Elsas, (2008). PCR amplifikáciu špecifického úseku DNA mikroskopických húb (18S rDNA génov) sme uskutočnili pomocou páru primerov podľa Vainio a Hantula (2000). DGGE analýzu sme uskutočnili na prístroji Ingeny PhorU2 (Ingeny International, Goes, Holandsko) podľa inštrukcií výrobcu a modifikáciou niektorých častí odporúčaného postupu. Bližšie podmienky sú uvedené v dizertačnej práci Selešiová (2011). Kvantitu a intenzitu prúžkov získaných metódou DGGE sme vyhodnotili programom CARESTREEM. Dendrogramy podobnosti zloženia populácií mikroorganizmov v jednotlivých pôdnych vzorkách sme urobili v programe MVSP (Multi-variate statistical package) použitím UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) zhlukovej analýzy. Na stanovenie diverzity pôdneho mikrobiálneho spoločenstva sme použili Jaccardov index podobnosti.

Početné zastúpenie mikroorganizmov

Sledovali sme ako početné zastúpenie baktérií tak aj mikroskopických húb klasickou platňovou zriedovacou metódou. V prípade baktérií a ich spór využívajúcich organický dusík na mäsopeptónovom agare (MPA) (BioMark Laboratories, India), pričom kultivácia prebiehala v aeróbných podmienkach 48 hod., pri teplote 28 °C a očkovanie inokula (riedenie 10^{-5}) bolo uskutočnené zaliatím. Mikroskopické huby sme stanovili na Czapek-Doxovom agare (Cz-DA) (BioMark Laboratories, India), kultivácia prebiehala v aeróbných podmienkach 5-7 dní, pri teplote 25 °C a očkovanie inokula (riedenie 10^{-3}) bolo uskutočnené povrchovo.

Stanovené počty baktérií a mikroskopických húb boli štatisticky analyzované v programe STATGRAPHICS 5.0 metódou ANOVA a štatisticky preukazné rozdiely sme stanovili Tukey testom ($P \leq 0,05$).

Výsledky

Hodnotenie aplikovaných substrátov; kompost, sediment, biokal

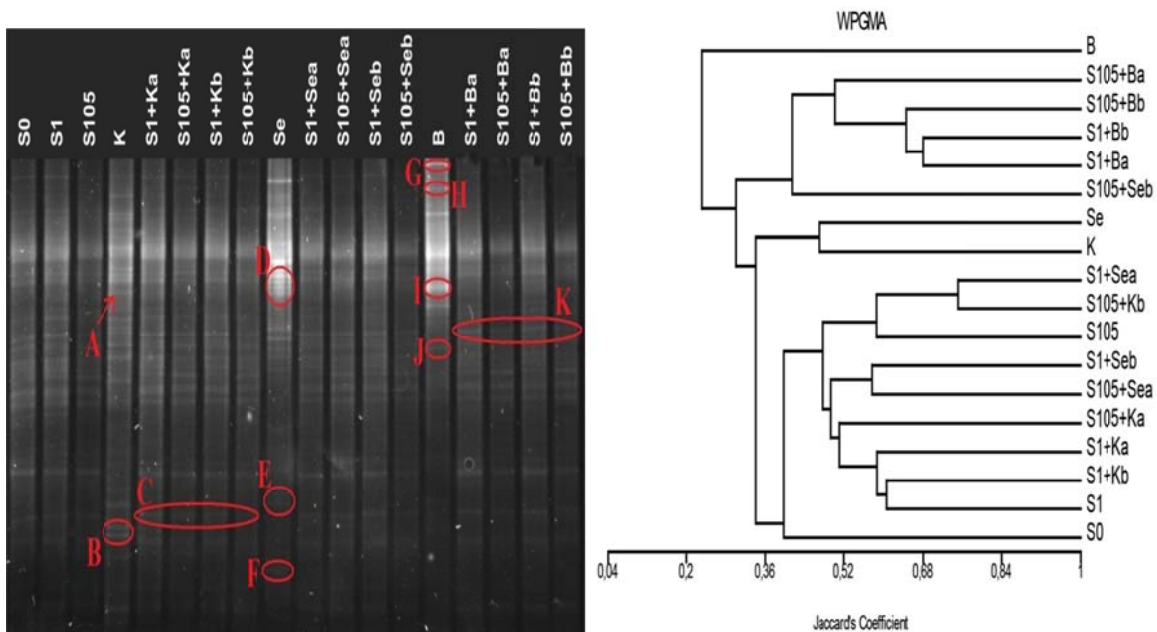
Už na základe hodnotenia aplikovaných substrátov; kompost, dnový sediment a biokal možno konštatovať, že sa navzájom od seba odlišovali svojimi základnými vlastnosťami, a to najmä rôznou vlhkosťou, C_{ox} , N_{tot} , C_{mic} a a tiež sledovanými enzymatickými aktivitami (tab. 2). Podľa výsledkov testov fytoxicity najmä dnový sediment nedosahoval 90 % klíčivosti použitej žeruchy. Sediment sa vyznačoval najmä silne kyslou aktívnou reakciou pH, nízkymi hodnotami N_{tot} , C_{ox} a najmä DHA (tab. 2). Kompost vysoko prevyšoval (viac ako trojnásobne) podľa C_{mic} sedimenty i pôdu (v biokale sa nám nami používanou metódou nepodarilo stanoviť C_{mic}), avšak z bakteriologického hľadiska predstavoval hygienicky rizikový materiál, nakoľko výskyt koliformných baktérií, termotolerantných koliformných baktérií a enterokokov bol vyšší ako predpisuje platná legislatíva (Maková *et al.*, 2010). Z hľadiska vysokého obsahu organických látok v aplikovaných substrátoch do pôdy sa biokal javil najvhodnejším substrátom, nakoľko obsah C_{ox} , pomer C:N i mineralizačná aktivita (DHA, FDA hydrolýza) boli v porovnaní s ostatnými najvyššie (tab. 2).

Ukazovateľ	Použitá metóda	Aplikovaný substrát			
		Pôda	Kompost	Sediment	Biokal
Vlhkosť [%]	Gravimetricky	17,31	43,55	45,92	60,75
Sušina [%]	Gravimetricky	82,69	56,45	54,08	39,25
pH H ₂ O	Potenciometricky	7,65	6,6	4,7	6,60
Test klíčivosti [%]	Žerucha	91,34	98,00	86,00	98,66
C_{ox} [%]	Tjurinova metóda	1,33	12,42	1,55	25,90
N_{tot} [%]	Kjeldahlova metóda	0,21	2,35	0,18	2,20
C : N		6:1	5:1	8:1	11:1
C_{mic} [mg.kg ⁻¹]	Vance <i>et al.</i> , 1987	202,71	725,54	292,78	–
C_{mic}/C_{ox}		1,52	0,58	1,89	
DHA [µg TPF.g ⁻¹ .hod ⁻¹]	Casida <i>et al.</i> , 1964	12,41	8,46	0,55	41,43
FDA [ΔA.g ⁻¹ .hod ⁻¹]	Schnürer, Rosswal, 1982	0,15	0,57	0,21	1,21
FA [µg PNF.g ⁻¹ .hod ⁻¹]	Tabatabai, Bremner, 1969	9,95	30,38	16,91	2,45
Spolu baktérie a ich spóry na MPA [10 ⁵ KTJ.g ⁻¹ suš.]	Platňová zriedovacia	15,4	61,1	23,9	35,9
Mikroskopické huby na Cz-DA [10 ³ KTJ.g ⁻¹ suš.]	Platňová zriedovacia	20,2	100,4	19,8	3,9

Tab. 2. Vybrané chemické a biologické parametre v pôde, komposte, biokale a sedimente na začiatku pokusu

PCR DGGE analýza mikrobiálneho spoločenstva

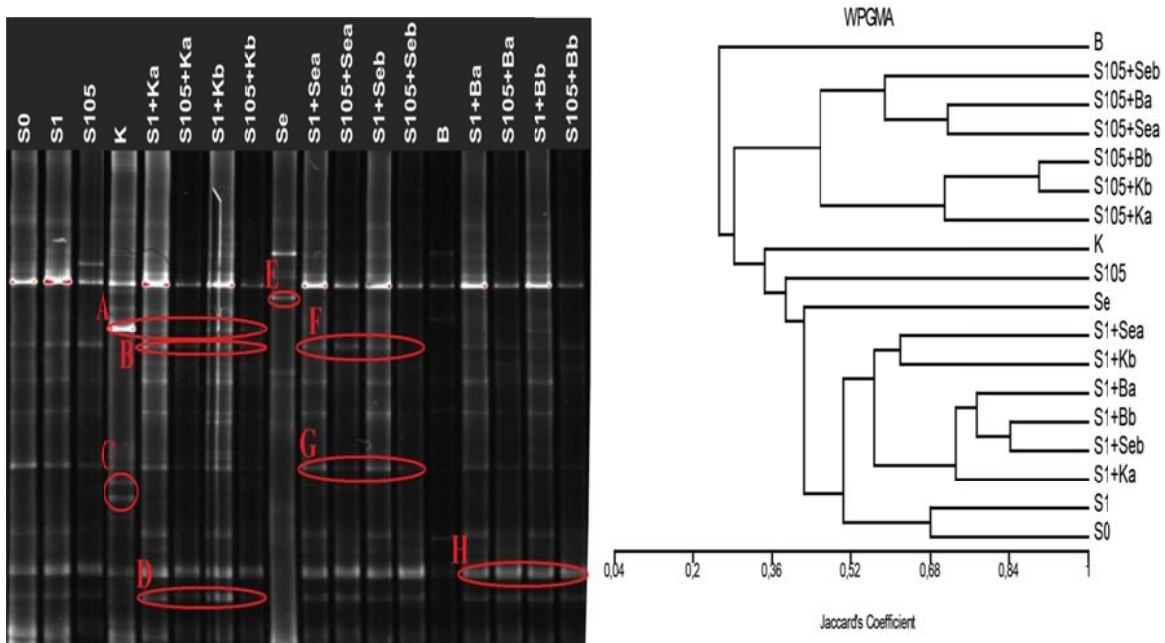
Na základe výsledkov PCR DGGE analýzy schéma prúžkov bakteriálneho spoločenstva (obr. 1) možno vidieť rozdiely v prítomnosti špecifických pásov (bandov) vo vzorkách samotných organických substrátov ako aj po ich aplikácii do pôdy. Iba vo vzorke kompostu bol viditeľný prúžok (A) a dvojica jedinečných prúžkov (B). Iba vo vzorke sedimentu bola viditeľná štvorica prúžkov (D), dvojica prúžkov (E) a v spodnej časti gélu jeden prúžok (F). Vo vzorke biokalu boli viditeľné 4 jedinečné prúžky (G, H, I, J). Ďalšie prúžky sa zas nachádzali iba vo variantoch pôdy s pridanými substrátmi, a to prúžok (C) pôda s kompostom (S1+Ka, S105+Ka, S1+Kb, S105+Kb) a prúžok (K), ktorý v biokale nebol prítomný. Dendrogram podobnosti spoločenstva baktérií (obr. 1) nám všetky varianty zoskupil do dvoch hlavných zhlukov podobných na 20 %, z ktorých jeden bol tvorený samotným variantom biokalu a druhý bol rozdelený do dvoch podskupín podobných na 32 %. Do prvej podskupiny s podobnosťou 42 % sme zaradili všetky varianty pôdy s biokalom po 1. aj 105. dni a variant s vyššou koncentráciou sedimentu po 105. dni inkubácie a do druhej podskupiny s podobnosťou 34 % sa zaradili varianty s pôdou pred inkubáciou, kontrolné varianty po 1. aj 105. dni a všetky varianty s kompostom a sedimentom (105. deň len nižšia dávka) na začiatku aj na konci inkubácie.



Obr. 1. Vizualizácia štruktúry a dendrogram podobnosti PCR DGGE profilov spoločenstva baktérií

V DGGE profile spoločenstva húb (obr. 2) sme zaznamenali vo variantoch s kompostom prúžok (A) a dvojicu jedinečných prúžkov (C). V sedimente sa nachádzal jeden jedinečný prúžok (E) a v príslušných variantoch s pôdou niekoľko prúžkov (F, G), ktoré boli prítomné iba v neošetrenej pôde (S0, S1, S105). Zaujímavý bol prúžok H, ktorý mal pomerne vysokú intenzitu, možno vidieť v každej dráhe gélu okrem variantov so sedimentami, ale vo variantoch s biokalom sa síce vyskytoval, no len veľmi slabý prúžok. Dendrogram podobnosti spoločenstva húb (obr. 2) ktorý podobne ako u baktérií potvrdil, že samotný biokal je

podobný s ostatnými variantmi iba na 26 % a štruktúra spoločenstva húb (ako aj baktérií) je teda v porovnaní s ostatnými substrátmi v ňom výrazne odlišná. Druhú skupinu tvorili pôda pred inkubáciou (S0), obe kontroly (S1 a S105) a všetky varianty po 1. dni inkubácie zoskupené v jednom zhluku s podobnosťou na 42 %. Od kontrolnej vzorky pôdy (S0) sme v spoločenstve húb zaznamenali výrazné zmeny po 105. dni inkubácie po prídavku všetkých testovaných substrátov v oboch dávkach. Najmenej sa zmenila štruktúra spoločenstva húb (podobnosť 88%) v prípade pôdy s prídavkom biokalu a kompostu po 105. dni inkubácie v dávke 80 t.ha⁻¹.



Obr. 2. Vizualizácia štruktúry a dendrogram podobnosti PCR DGGE profilov spoločenstva húb

Početné zastúpenie prítomných mikroorganizmov

Priemerné hodnoty celkového počtu baktérií stanovených platňovou zriedňovacou metódou boli počas inkubácie od 1,87.10⁶ KTJ.g⁻¹ (v neošetrenej pôde po 1. dni inkubácie) do 8,46.10⁶ KTJ.g⁻¹ (v pôde s dávkou sedimentu 20 t.ha⁻¹ v 105. dni inkubácie). Počty mikroskopických húb boli nižšie, od 1,27.10⁴ KTJ.g⁻¹ (v pôde s dávkou kompostu 80 t.ha⁻¹ v 105. dni inkubácie) až 16,11.10⁴ KTJ.g⁻¹ (v pôde s dávkou sedimentu 80 t.ha⁻¹ v 105. dni inkubácie). Štatisticky preukazné rozdiely v počte baktérií a húb medzi dvomi rôznymi aplikovanými dávkami (20 t.ha⁻¹ a 80 t.ha⁻¹) sme v prípade žiadneho organického substrátu nezaznamenali (tab. 3). Prídavok kompostu v množstve 20 t.ha⁻¹ spôsobil zvýšenie početného zastúpenia baktérií v oboch sledovaných dňoch, avšak štatisticky ($P \leq 0,05$) sa jeho vplyv na toto spoločenstvo potvrdil iba na začiatku inkubácie, po 1. dni (tab. 3). Vplyv rovnakého množstva kompostu na spoločenstvo húb bol tak na začiatku ako aj na konci experimentu negatívny (štatisticky nepreukazný). Aplikáciou kompostu v dávke 80 t.ha⁻¹ sme zaznamenali po 1. dni inkubácie štatisticky preukazné ($P < 0,05$) zvýšenie počtu baktérií a nepreukazný nárast počtu mikroskopických húb. Po 105. dňoch sme zaznamenali pokles početného zastúpenia mikroskopických húb aj baktérií.

V porovnaní s neošetrenou pôdou bola priemerná hodnota celkového počtu baktérií v pôde s oboma aplikovanými dávkami sedimentu vyššia, a to v každom sledovanom dni inkubácie. Štatistickú významnosť sme však potvrdili len v 1. dni pokusu ($P \leq 0,05$) (tab. 3). Kým na začiatku inkubácie spôsobil sediment v oboch aplikovaných dávkach štatisticky nepreukazný pokles počtu mikroskopických húb, po 105 dňoch sme zaznamenali signifikantný, viac ako 4-násobný nárast ich počtu vplyvom dávky 20 aj 80 t.ha⁻¹.

Aplikáciou biokalu v dávke 20 t.ha⁻¹ sme v pôde zaznamenali štatisticky signifikantné zvýšenie ($P \leq 0,05$) počtu baktérií po 1. dni trvania experimentu, avšak po 105 dňoch bol ich počet v porovnaní s neošetrenou pôdou nižší (štatisticky nepreukazne) (tab. 3). Dávka biokalu 20 t.ha⁻¹ štatisticky nevýznamne spôsobila pokles počtu mikroskopických húb v oboch sledovaných dňoch inkubácie. Prídavok biokalu v dávke 80 t.ha⁻¹ spôsobil zvýšenie počtu baktérií v oboch sledovaných dňoch, avšak štatisticky ($P \leq 0,05$) sa jeho vplyv na toto spoločenstvo potvrdil iba po 1.dni inkubácie. Kým na začiatku experimentu sme zistili vplyvom vyššej dávky biokalu pokles mikroskopických húb, na konci táto skupina mikroorganizmov štatisticky nepreukazne vzrástla (tab. 3).

Označenie	1. deň		105. deň	
	Baktérie	huby	baktérie	Huby
S	186,82 ^a	3,62 ^a	614,65 ^{ab}	3,66 ^a
S+Ka	532,51 ^c	2,32 ^a	678,85 ^{ab}	2,53 ^a
S+Kb	410,36 ^{bc}	3,82 ^a	435,50 ^a	1,27 ^a
S+Sea	420,55 ^{bc}	2,53 ^a	846,17 ^b	15,12 ^b
S+Seb	477,39 ^{bc}	2,66 ^a	674,73 ^{ab}	16,11 ^b
S+Ba	243,15 ^{bc}	1,89 ^a	590,48 ^{ab}	2,87 ^a
S+Bb	353,82 ^b	2,81 ^a	629,37 ^{ab}	5,61 ^a

Tab. 3. Výsledky analýzy variácií celkových počtov baktérií a húb [10^4 KTJ.g⁻¹ s.z.] stanovených klasickou platňovou zriedňovacou metódou po 1. a 105. dni inkubácie medzi jednotlivými variantmi (Tukey test, $P \leq 0,05$). Rozdiely medzi hodnotami (v jednom stĺpci), ktoré sú označené rovnakým písmenom v indexe nie sú štatisticky preukazné.

Diskusia

Významným ukazovateľom kvality a zdravia pôdy je množstvo organickej hmoty v pôde a nadväzne aj aktivita a početné zastúpenie mikroorganizmov. Nedostatok organickej hmoty v ornej pôde spôsobujú viaceré faktory, z ktorých najvýznamnejšie sú nevyvážené bilancie v neustálom odbere organických látok vo forme úrod a na druhej strane nedostatok maštalného hnoja (v rámci SR výrazná redukcia chovu hovädzieho dobytku) vo forme ktorého by bol zabezpečený návrat organických látok späť do pôdy. Podľa Marschner *et al.* (2003) sa však aplikáciou organických a minerálnych hnojív do pôdy okrem dodávania živín pre rastliny môžu ovplyvniť fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy, a s nimi aj populácie, zloženie a funkcie pôdnych mikroorganizmov.

Aplikácia dnových sedimentov i kalov do pôdy v rámci Slovenska je ošetrená Zákonom č.188/2003 (doplnená Zákonom č.203/2009) a Smernicou Rady Európy č. 86/278/EHS o ochrane životného prostredia, predovšetkým pôdy. V prípade dnových sedimentov je potrebné zvážiť či sa bude jednať o abiotické využitie (podložie pod budovanie ciest, tehliarsky

a keramický priemysel atď.) alebo sa bude jednať o biotické využitie, ako je priama aplikácia sedimentov do poľnohospodárskych pôd (Holobradý, Ilka, 1997). Canet *et al.* (2003) po obohatení poľnohospodárskej pôdy sedimentami odobratými z jazera vo Východnom Španielsku zistili v pôde vyššiu úrodnosť a lepšiu schopnosť zadržiavania vody a výmeny kationov. Baniulyte *et al.* (2009) skúmali zmenu mikrobiálneho spoločenstva riečného sedimentu po jeho aplikácii do pôdy. Zistili, že celková mikrobiálna biomasa sa počas trvania pokusu nezmenila, ale nastali signifikantné zmeny v zložení jednotlivých skupín mikrobiálneho spoločenstva. Pomocou metódy PLFA zistili zvýšenie diverzity húb, aktinomycét a G⁺ baktérií. Metódou T-RFLP zistili tiež preukaznú zmenu v zložení bakteriálneho spoločenstva po 1 roku od aplikácie sedimentu. Podľa našich výsledkov sme v prípade aplikácie sedimentu do pôdy v dávke 80 t.ha⁻¹ zistili výraznejšiu zmenu štruktúry oboch spoločenstiev po 105 dňoch trvania experimentu, kedy podobnosť baktérií medzi kontrolnou a ošetrovanou pôdou bola o 18 % nižšia a podobnosť húb o 20 % nižšia ako po 1. dni inkubácie. Z hľadiska mikroskopických húb práve tento substrát štatisticky preukazne zvýšil ich početné zastúpenie po 105 dňoch trvania pokusu. Spôsobila to najmä prítomnosť zástupcov mikroskopickej huby *Penicillium simplicissimum*, ktorá sa vyskytovala vo veľmi vysokých počtoch vo všetkých opakovaníach. Táto huba je často popisovaná v pôde, ale aj z hľadiska biotechnologického využitia v prípade produkcie organických kyselín (najmä kyseliny citrónovej) a zvyšovania rozpustnosti ťažkých kovov z priemyselných odpadov a hornín (Franz *et al.*, 1991, Burgstaller *et al.*, 1992), pri odfarbovaní textílií (Bergsten-Torralba *et al.*, 2009) alebo pri degradácii dlhých reťazcov alkénov (Yamada-Onodera *et al.*, 2002).

Z hľadiska vstupných parametrov použitého biokalu (tab. 2) sa práve tento substrát javil ako najvhodnejší a na základe výsledkov z PCR DGGE aj najodlišnejší podľa štruktúry prítomnej bakteriocenózy aj mykocenózy. Možné riziko negatívneho ovplyvnenia indikátorov kvality a zdravia pôdy, po jeho aplikácii, by mohol byť vysoký obsah ťažkých kovov. Potvrdili to viacerí autori zaoberajúci sa štúdiom vplyvu ťažkých kovov nachádzajúcich sa v aplikovanom biokale na mikrobiálne spoločenstvo v pôde využitím metódy PLFA alebo BIOLOG[®]. Zistili negatívny vplyv na štruktúru a aktivitu mikroorganizmov, ktorý bol priamo úmerný zvyšujúcej sa koncentrácii kovov v pôde (Frostegård *et al.*, 1996; Bååth *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003). V našej práci sme do pôdy pridávali biokal, ktorý obsahom ťažkých kovov – Pb (8,296 mg.kg⁻¹), Cd (0,451 mg.kg⁻¹) a As (0,681 mg.kg⁻¹) neprekročil medzné hodnoty koncentrácie týchto prvkov stanovené Zákonom č. 203/2009. Zistili sme, že z hľadiska diverzity spoločenstva baktérií a húb sa biokal najviac odlišoval od ostatných substrátov a ich príslušných variantov (76 % v bakteriálnej štruktúre a 74 % v druhovom zložení húb) a spôsobil najväčšiu zmenu bakteriálneho spoločenstva v pôde, ktorá sa prejavila už po 1. dni inkubácie a zostala rovnaká aj v posledný deň experimentu. Podobnosť variantov s oboma dávkami biokalu s kontrolnou pôdou na začiatku aj na konci inkubácie bola len 33 %. Vplyv biokalu na zloženie spoločenstva húb bol rovnaký ako u ostatných aplikovaných substrátov. Na 105. deň inkubácie sa štruktúra spoločenstva húb podobala kontrolnej pôde len na 30 %, pričom po 1. dni to bolo 50 %. Banerjee *et al.* (1997), ktorí vo svojej práci aplikovali do pôdy biokal v množstve 50 a 100 t.ha⁻¹, zistili výraznú redukciu diverzity mikrobiálneho

spoločenstva pri pridaní vyššej dávky, avšak zároveň sa pôdna mikrobiálna biomasa a mineralizačný potenciál zvýšili, alebo zostali rovnaké.

Záver

Podľa výsledkov zhlukovej analýzy PCR DGGE prídavok kompostu, sedimentu a biokalu do pôdy inkubovanej v laboratórnych podmienkach sme potvrdili zmeny ako v spoločenstve baktérií, tak aj v spoločenstve mikroskopických húb. Kompost najmenej ovplyvnil diverzitu baktérií v pôde a najviac prídavok biokalu, a to ako v 1. tak aj v 105. deň, v oboch testovaných dávkach. Z hľadiska početného zastúpenia baktérií sme štatisticky preukazné rozdiely zaznamenali iba v 1. deň inkubácie a to po prídavku všetkých troch substrátov. Štruktúru spoločenstva mikroskopických húb ovplyvnil najmä prídavok biokalu a dnového sedimentu, ale iba v 105. deň inkubácie.

Podakovanie

Táto práca bola napísaná a prezentovaná za finančnej podpory Ministerstva školstva SR z projektov VEGA 1/0404/09 a KEGA 003SPU-4/2011. Zároveň sa chceme poďakovať Mgr. Zuzane Selešiovej, PhD. a Bc. Henriete Blaškovičovej za uskutočnenie laboratórnych meraní a odber vzoriek.

Použitá literatúra

- ASCHER, J. - CECCHERINI, M.T. - LANDI, L. - MENCH, M. - PIETRAMELLARA, G. - NANNIPIERI, P. - RENELLA, G. Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after in situ stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*. 2009, vol. 41, s. 351-359.
- AVRAHAMI, S. - LIESACK, W. - CONRAD, R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ. Microbiol.*, vol. 5, 2003, s. 691-705.
- BÅÅTH, E. - DÍAZ-RAVIÑA, M. - FROSTEGÅRD, Å. - CAMPBELL, C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, 1998, s. 238-245.
- BANERJEE, M.R. - BURTON, D.L. - DEPOE, S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. In *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 66, 1997, s. 241-249.
- BANIULYTE, D. - FAVILA, E. - KELLY, J.J. Shifts in Microbial Community Composition Following Surface Application of Dredged River Sediments. *Microb Ecol.*, vol. 57, 2009, s. 160-169.
- BERGSTEN-TORRALBA, L.R. - NISHIKAWA, M.M. - BAPTISTA, D.F. - MAGHALHES, D.P. - da SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, 2009, s. 808 - 817.

- BRONS, J.K. - VAN ELSAS, J.D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, 2008, s. 2717-2727.
- BURGSTALLER, W. - STRASSER, H. - WÖBKING, H. - SCHINNER, F. Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and stoichiometry. *Environ Sci Technol*, vol. 26, 1992, s. 340-346.
- CAMPBELL, C.D. - CHAPMAN, S.J. - CAMERON, C.M. - DAVIDSON, M.S. - POTTS J.M. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, 2003, s. 3593-3599.
- CANET, R. - CHAVES, C. - POMARES, F. - ALBIACH, R. Agricultural use of sediments from the Albufera Lake (Eastern Spain). *Agric Ecosyst Environ*, vol. 95, 2003, s. 29-36.
- CASIDA, L.E. - KLEIN, D.A. - SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil science*, vol. 98, 1964, s. 371-376.
- FROSTEGÅRD, Å. - TUNLID, A. - BÅÅTH, E. Changes in microbial community structure during long-term incubation two soils experimentally contaminated with metals. In *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 28, 1996, s. 53-63.
- FRANZ, A. - BURGSTALLER, W. - SCHINNER, F. Leaching with *Penicillium simplicissimum*: Influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production, vol. 57, 1991, no.3, s. 769-774.
- HOLOBRADÝ, K.-ILKA, P. *Metodika priamej aplikácie stabilizovaných čistiarenských kalov a dnových sedimentov na pôdu*. Bratislava: Výskumný ústav pôdnej úrodnosti, 1997, 50 s.
- KA, J. - HOLBEN, W.E. - TIEDJE, J.M. Use of gene probes to aid in recovery and identification of functionally dominant 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading populations in soil. *Appl Environ Microbiology*, vol. 60, 1994, no. 4, s. 1116-1120.
- KIRK, J. - BEAUDETTE, L. - HART, M. *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 58, 2004, no. 2, s. 169-188.
- MAKOVÁ, J. - JAVOREKOVÁ, S. - SELEŠIOVÁ, Z. - JURÍK, L. - GADUŠ, J. Hodnotenie hygienickej neškodnosti odpadov s možnosťou ich využitia v rastlinnej produkcii. *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, mimoriadne číslo, s. 417-424.
- MARSCHNER, P. - KANDELER, E. - MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 35, 2003, no. 3, s. 453-461.
- NICOL, G.W. - GLOVER, L.A. - PROSSER, J.I. The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.*, vol. 5, 2003, s. 152-162.
- NORRIS, T.B. - WRAITH, J.M. - CASTENHOLZ, R.W. - MCDERMOTT, T.R. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, s. 6300-6309.
- RUBIO, M.B. - HERMOSA, M.R. - KECK, E. - MONTE, E. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. In *Microbiol. Ecol.*, vol. 49, 2005, no. 1, s. 25-33.

- SCHNÜRER, J. - ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. In *Applied and environmental microbiology*, vol. 43, 1982, no. 6, s.1256-1261.
- STEPHEN, J.R. - CHANG, Y.J. - GAN, Y.D. - PEACOCK, A.D. - PFIFFNER, S.M. - BARCELONA, M.J. - WHITE, D.C. - MACNAUGHTON, S.J. 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) - based approach. *Environmental Microbiology*, vol. 3, 1999, no. 1, s. 231-241.
- SELEŠIOVÁ, Z. Charakteristika mikrobiálnych spoločenstiev v prostredí s využitím metód molekulárnej biológie. Nitra, 2011. Dizertačná práca. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra mikrobiológie.
- TABATABAI, M.A. - BREMNER, J.M. Use of p - nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, vol. 1, 1969, no. 3, s. 301-307.
- VAINIO, E.J. - HANTULA, J. Direct analysis of woodinhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, vol. 104, 2000, s. 927-936.
- VANCE, E.D. - BROOKES, P.C. - JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. In *Soil biology and biochemistry*, vol. 19, 1987, s. 703-707.
- YAMADA-ONODERA K. - MUKUMOTO, H. - KATSUYAMA, Y. - TANI, Y. Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, no. 30, s. 828-831.

GENETICKÁ DIVERZITA MIKROBIÁLNEHO SPOLOČENSTVA V PÔDE

GENETIC DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITY IN SOIL

Javoreková Soňa, Maková Jana, Medo Juraj, Kováčsová Silvia

Katedra mikrobiológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Abstract

The genetic diversity of microorganisms in soil was based on the results of the total DNA in collected samples in the soil profile with quantitative real time PCR (qPCR). Soil samples were obtained in soil profile from 7 locations in Slovakia. Four soil types were represented (fluvisol, brown earth, pseudogley, cambisol). Samples differed from each other with the land management, because they were used as grasslands (park, pasture), vineyard, unfertilised plough land, or fertilised plough land with organic or inorganic fertilizers. The quantitative determination of isolated DNA was determined photometrically (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech). Specific primers were used for bacterial 16S rDNA (968F and 1401R) and ITS1, ITS2 for 18S rDNA of fungi. The amount of total determined DNA was in interval 2,65 – 21,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, the determined values differed in monitored horizons. The highest content of the total DNA was determined in I. horizon of Víglaš locality (21,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and Velká Fatra locality (12,12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), the values decreased with depth (except Stolické vrchy locality). The highest content of bacterial DNA (3,58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and fungal DNA (1,45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) was recorded in Víglaš locality, but only in unfertilised variant.

Key words: soil, microbial genetic diversity, Real Time PCR, microbial DNA

Úvod

Genetická diverzita určuje genetickú a genotypovú variáciu v rámci druhu. Aplikáciou molekulárnych metód v ekológii pôdy a mikroorganizmov je možné okrem sledovania celkového zloženia a štruktúry mikrobiálnych spoločenstiev, dynamiky jednotlivých populácií alebo génov spoločenstva (Sayler *et al.*, 1990) aj kvantitatívne stanoviť veľkosť mikrobiálneho spoločenstva. Na kvantitatívne hodnotenie prítomného mikrobiálneho spoločenstva sa využíva aj kvantitatívna metóda Real Time PCR (qPCR), ktorá je založená na meraní intenzity uvoľneného fluorescenčného signálu, ktorý zodpovedá množstvu DNA vytvorenej počas DNA amplifikácie (Wittwer *et al.*, 1997; Fillion *et al.*, 2002). Detekciu umožňujú fluorescenčné sondy (TaqMan) (Mohammadi, 2003) alebo farbivá (SYBR® Green I dye) (Horz *et al.*, 2005), ktoré sa pridávajú do reakcie. Výhodou kvantitatívneho hodnotenia, za použitia Real Time PCR je, že si nevyžaduje ďalšie analýzy ako je gélová elektroforéza alebo rádioaktívna hybridizácia (Farelly *et al.*, 1995).

Kontaktná adresa: doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.

Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Tr. A. Hlinku 2,
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 949 76 Nitra,
e-mail: sona.javorekova@uniag.sk

Cieľom nášho príspevku bolo prvotné hodnotenie mikrobiálnych populácií stanovených v pôdnom profile na základe stanovenia obsahu celkovej vyizolovanej DNA v pôdnych vzorkách (rôzne pôdne typy, lokality i spôsoby využívania a obhospodarovania) a kvantifikácia DNA baktérií a húb metódu Real Time PCR.

Materiál a metodika

Odber vzoriek

Vzorky pôdy sme odobrali ručne kopanými pôdnymi sondami v spolupráci s pracovníkmi Katedry pedológie a geológie FAPZ SPU Nitra, náhodným výberom, v celom pôdnom profile, z jednotlivých pôdnych horizontov (tab. 1). Odobraté boli zo 7 lokalít, pričom prvá vzorka bola odobratá v parkovej časti areálu Slovenskej poľnohospodárskej univerzity (SPU), charakterizovaná ako pôdny typ fluvizem, druhá vzorka s pôdnym typom hnedozem bola odobratá vo vinohrade v lokalite Tokaj-Viničky, tretia vzorka bola orná pôda s pôdnym typom pseudoglej odobratá v lokalite Víglaš a štvrtá až siedma vzorka z vysokohorských pasienkov s pôdnym typom kambizem z lokalít Veľká Fatra-pod Ploskou, Malá Fatra-Strungový príslop, Donovaly-Kečka a Stolické vrchy-Diel. V rámci lokality Víglaš boli ešte vykopané tri sondy: 1. sonda bola vykopaná na nehojenom území, 2. sonda pochádzala z pôdy hnojenej organickými hnojivami a 3. sonda pochádzala z pôdy hnojenej anorganickými hnojivami (NPK).

Horizont	Lokalita odberu pôdnych vzoriek				
	Nitra SPU	Tokaj	Víglaš-Sonda 1	Víglaš – Sonda 2	Víglaš – Sonda 3
I. (Ao)	<0,10	<0,25	<0,24	<0,3	<0,47
II. (Bg ₁)	0,11-0,60	0,26-0,80	>0,24	>0,30	>0,47
III. (Bg ₂)	0,61-1,05	>0,80	-	-	-
	Veľká Fatra	Malá Fatra	Donovaly	Stolické vrchy	
I. (Aog)	<0,28	<0,32	<0,27	<0,05	
II. (Bv ₁)	0,29-0,70	0,33-1,20	0,28-1,00	0,06-0,45	
III. (Bv ₂)	-	-	-	0,46-0,75	

Tab. 1. Lokality odberu a odberové hĺbky (m) pôdnych vzoriek v pôdnom profile Ao-ochrický plytký povrchový horizont, Aog-ochrický pseudoglejový horizont, Bv – kambický B horizont, Bg-kambický pseudoglejový horizont

Pôdne vzorky z lokalít Nitra, Tokaj a Víglaš boli odobraté v mesiacoch apríl - máj, zatiaľ čo vzorky zo zvyšných, vyššie položených lokalít Veľká Fatra, Malá Fatra, Donovaly, Stolické vrchy, v mesiacoch august - september. Samotné stanovenia sme uskutočnili po 8-týždňovej preinkubácii (4±1 °C) pôdnych vzoriek. Výsledky DNA udávame v µg na 1 g suchej zeminy (s.z.).

Príprava štandardov

Na kvantifikáciu vzoriek DNA baktérií sme použili čistú kultúru *Streptomyces* sp., pričom kultivácia prebiehala na Krajinského agare pri 20 °C 10 dní. Na kvantifikáciu vzoriek DNA húb sme použili čistú kultúru *Alternaria* sp., izolovanú na PCA (zemiakovo-mrkvový) agare, ktorú sme kultivovali pri 25 °C, 1 týždeň. Z čistej kultúry sme izolovali DNA použitím UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories).

Bakteriálny štandard sme nariesili do koncentrácií $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ a štandard pre DNA húb sme použili v koncentráciách $4,5 \cdot 10^0$, $4,5 \cdot 10^{-1}$, $4,5 \cdot 10^{-4}$.

Izolácia DNA

Izoláciu celkovej DNA, ktorú sme uskutočnili pomocou PowerSoil DNA Kit (MoBio Laboratories). Purifikovanú DNA sme spektrofotometricky zmerali (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) pri vlnovej dĺžke 260 nm (pomer 260:280 sa pohyboval okolo 1,6) v spolupráci s ÚGBR SAV v Nitre.

Použité PCR primery

Do PCR reakcie sme použili dva súbory párov primerov, ktoré boli komerčne nasyntetizované (Invitrogen) a použité na oddelenú amplifikáciu DNA húb a baktérií. Na amplifikáciu špecifického úseku DNA baktérií sme použili univerzálny pár primerov (Bárta *et al.*, 2006):

968F (968-984): 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'

1401R (1385-1401): 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC

Na amplifikáciu špecifického úseku DNA húb sme použili univerzálny pár primerov (Bárta *et al.*, 2006):

ITS1F: 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'

ITS2R: 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'

Real-time PCR

Koncentráciu (množstvo) DNA húb a baktérií v pôde sme stanovili metódou Real Time PCR. Real Time PCR amplifikáciu 433 bp fragmentu DNA baktérií sme robili v celkovom objeme 20 μ l, pričom každá reakčná zmes obsahovala nasledovné zložky: 10 μ l 2 \times koncentrovaného Dynamo SYBR[®] Green Mix (Biotech), 0,5 μ l z každého primeru (0,5 μ M) a 30-50 ng templátovej DNA. Samotná PCR prebiehala v termocykléri MJ Mini Opticon Real time PCR System (Biotech). Real-time PCR amplifikáciu 800 bp fragmentu DNA húb sme robili v celkovom objeme 20 μ l, pričom každá reakčná zmes obsahovala nasledovné zložky: 10 μ l 2 \times koncentrovaného Dynamo SYBR[®] Green Mix (Biotech), 0,5 μ l z každého primeru (0,5 μ M) a 30-50 ng templátovej DNA. Koncentráciu DNA, húb i baktérií, prítomnej v jednotlivých pôdnych vzorkách metódou Real Time PCR za prítomnosti špecifických primerov a flourescenčného farbiva (SYBR[®] Green) sme zistili z nárastu flourescenčného signálu farbiva (tzv. threshold-hranica) v určitom PCR cykle. Stanovený hraničný cyklus (C_T) (tab. 2), zodpovedal logaritmu množstva amplifikovanej DNA. Na kvantifikáciu DNA z pôdnych vzoriek sme vytvorili štandardné krivky, ktoré sme získali riedením DNA známej koncentrácie izolovanej z čistej kultúry. Na základe štandardných kriviek sa nám potvrdila

lineárna korelácia medzi log hodnotami DNA baktérií i húb (tab. 2) a hraničného cyklu Real Time PCR.

Výsledky a diskusia

V odobratých pôdnych vzorkách sme stanovili množstvo celkovej mikrobiálnej DNA od 2,65 do 21,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.z.}$ (tab. 3). Na porovnanie nám môžu slúžiť údaje získané napr. z pôd pôdneho typu luvisol v zahraničí (USA), kde sa vyextrahovaná DNA pohybovala v rozsahu od 2,5 do 26,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Zhou *et al.* 1996). Najvyšší obsah celkovej DNA (21,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.z.}$) sme zaznamenali v I. horizonte lokality Víглаš (bez hnojenia). V tomto horizonte, kde je najbohatšia zásoba prístupného uhlíka sme s výnimkou lokality Stolické vrchy potvrdili najvyšší obsah DNA, ktorý sa pohyboval v rozsahu od 4,34 do 21,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.z.}$.

Lokalita	H	Bakteriálna DNA				DNA húb			
		T	C _t	R ²	T _m	T	C _t	R ²	T _m
Nitra SPU	I.	0,0079	25,52	0,783	80	0,0004	23,44	0,994	67
	II.	0,0079	19,86	0,783	80,5	0,0004	20,03	0,994	67
	III.	0,0079	19,64	0,783	79	0,0004	20,44	0,994	71
Tokaj	I.	-	-	-	-	0,0004	23,31	0,994	79
	II.	0,0079	25,15	0,783	76,5	-	-	-	-
	III.	-	-	-	-	-	-	-	-
Víглаš Sonda 1	I.	0,0079	19,25	0,783	79	0,0004	16,12	0,994	80
	II.	0,0079	27,29	0,783	71	0,0004	20,03	0,994	79
Víглаš Sonda 2	I.	0,0079	21,20	0,783	80,5	-	-	-	-
	II.	0,0079	23,68	0,783	78,5	-	-	-	-
Víглаš Sonda 3	I.	0,0079	30,24	0,783	78	-	-	-	-
	II.	0,0079	26,36	0,783	79,5	-	-	-	-
Veľká Fatra	I.	0,0079	21,00	0,783	68	0,0004	23,61	0,994	67
	II.	0,0079	22,94	0,783	80	-	-	-	-
Malá Fatra	I.	-	-	-	-	-	-	-	-
	II.	0,0079	25,04	0,783	67,5	-	-	-	-
Donovaly	I.	-	-	-	-	-	-	-	-
	II.	-	-	-	-	-	-	-	-
Stolické vrchy	I.	0,0079	22,09	0,783	76,5	0,0004	19,54	0,994	80
	II.	0,0079	20,46	0,783	68,5	0,0004	20,40	0,994	80
	III.	0,0079	20,73	0,783	80	0,0004	19,01	0,994	79

Tab. 2. Základné údaje získané z Real Time PCR reakcie. L1- areál SPU, L2-Tokaj, L3.1-Víглаš-Sonda 1, L3.2-Víглаš-Sonda2, L3.3-Víглаš-Sonda3, L4-Veľká Fatra, L5-Malá Fatra, L6-Donovaly, L7-Stolické vrchy, L-lokality, H-horizont, T-threshold-hraničná hodnota, C_t- hraničný cyklus, R²-korelačný koeficient, T_m-teplota topenia

Tak ako aj v prípade klasickými metódami stanovené počty mikroorganizmov s hĺbkou klesajú (Javoreková, 2008, Javoreková *et al.*, 2009) aj v prípade molekulárnych metód sa táto

tendencia potvrdila. Najnižšie koncentrácie celkovej DNA sme zaznamenali v III. horizonte od 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$ do 4,57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$ Prekvapivé však bolo zistenie, že v ornej pôde v porovnaní s pôdou odobratou vo vinohrade, v parku i z pasienkov sme stanovili najvyššiu koncentráciu celkovej DNA, ale aj DNA baktérií (3,58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$) ako aj DNA mikroskopických húb (1,45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$). V prípade porovnania s výsledkami z biochemických mikrobiálnych metód ako je stanovenie C_{mic} (Javoreková *et al.*, 2008) trvalé trávne porasty, pasienky a lúky majú vždy vyššie stanovené hodnoty ako orné pôdy.

Lokality odberu/pôdny typ	Horizont	pH _(H₂O)	Celková DNA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$)	DNA baktérií ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$)	DNA mikroskopických húb ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.z.}$)
Areál SPU/fluvizem	I.	6,43	9,95	1,75	0,16.10 ⁻³
	II	6,30	6,63	1,27	0,85.10 ⁻³
	III	6,25	2,65	*	0,10.10 ⁻³
Tokaj/hnedozem	I.	7,34	7,80	*	0,05
	II.	7,20	6,86	3,17.10 ⁻³	*
	III.	7,10	4,57	*	*
Víglaš/pseudoglej Sonda 1	I.	6,76	21,07	3,58	1,45
	II.	6,33	11,2	0,25.10 ⁻³	0,10
Víglaš Sonda 2	I.	6,98	9,60	0,35	*
	II.	5,51	5,60	0,02	*
Víglaš Sonda 3	I.	6,62	8,45	0,38	*
	II.	6,45	4,34	0,74.10 ⁻³	*
Velká Fatra/kambizem	I.	5,62	12,12	0,58	8,26.10 ⁻³
	II.	5,82	5,26	0,04	*
Malá Fatra/kambizem	I.	5,92	5,07	*	*
	II.	5,93	4,27	3,50.10 ⁻³	*
Donovaly/kambizem	I.	5,51	5,27	*	*
	II.	5,62	3,89	*	*
Stolické vrchy/kambizem	I.	5,36	4,34	0,12	0,30
	II.	5,54	5,26	0,85	0,16
	III.	5,49	3,43	0,62	0,06

Tab. 3. Podiel DNA mikroskopických húb a baktérií z celkovej DNA izolovanej v pôdnych vzorkách
* nestanovená hodnota

Rovnako to bolo i v prípade porovnania výsledkov z hľadiska sledovaného pôdneho typu, nakoľko najvyššie namerané hodnoty všetkých sledovaných parametrov v pôdnom type pseudoglej nekorenšpondovali s doterajšími poznatkami stanovenými klasickými metódami. Pseudoglej patrí medzi pôdy, ktoré formoval hydromorfný pôdotvorný proces, s prevládajúcimi anaeróbnymi podmienkami, a preto aj sú to pôdy nie s výrazným mikrobiálnym zastúpením (Javoreková *et al.*, 2008). Porovnaním stanovených výsledkov koncentrácií bakteriálnej DNA a DNA mikroskopických húb, v prípade bakteriálnej DNA

sme stanovili vyššie hodnoty, a to od $0,25 \cdot 10^{-3}$ do $3,58 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s.z.}$. V prípade DNA húb od $0,10 \cdot 10^{-3}$ do $1,45 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s.z.}$. Tieto výsledky sú v súlade s predpokladným, na základe klasických mikrobiálnych metód stanoveným vyšším početným zastúpením baktérií ako húb v pôde.

Záver

Uvádzané výsledky sú naším pracoviskom iba prvý krát stanovené hodnoty, ktoré nie je možné v rámci Slovenska so žiadnymi inými publikovanými výsledkami porovnávať. Bude potrebné tieto výsledky ďalej sledovať a potvrdiť. Avšak podľa Liesack *et al.* (1997) by sa molekulárne metódy mali kombinovať s klasickými mikrobiálnymi metódami, ktoré bližšie charakterizujú mikrobiálne spoločenstvo aj z hľadiska funkčnej diverzity jednotlivých mikrobiálnych druhov v pôde.

Podakovanie

Príspevok vznikol a bol prezentovaný za finančnej podpory projektu MŠ SR KEGA 003SPU-4/2011.

Použitá literatúra

- FARELLY, V. – RAINLEY, F.A. – STACKEBRANDT, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 34, pp. 537-542.
- FILION, M. – ST-ARNAUD, M. – JABAJI-HARE, S.H. 2002. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. In *J. Microb. Meth.*, vol. 53, pp. 67-76.
- HORZ, H.P. – VIANNA, M.E. – GOMES, B.P.F.A. – CONRADS, G. 2005. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. In *J. Clin. Microb.*, vol. 43, pp. 5332-5337.
- JAVOREKOVÁ, S. 2008. Biologická charakteristika pôdných typov černozem a hnedozem. In *Agrochémia*. Roč. 12, č.3, s. 18-22.
- JAVOREKOVÁ, S. - KRÁLIKOVÁ, A. – LABUDA, R. – LABUDOVÁ, S. – MAKOVÁ, J. 2008. Biológia pôdy v agroekosystémoch. 401 s. ISBN 978-80-552-0007-1
- JAVOREKOVÁ, S. – CHLPÍK, J. – NOVÁK, J. 2009. Biologická charakteristika pôdných typov kambizem a regozem. In *Agrochémia*. Vol. XIII., 2009, No. 1, s. 25 – 28.
- LIESACK, W. - JANSSEN, P. H. - RAINEY, F. A. - RAINEY, N.L.W. - STACKEBRANDT, E. 1997. Microbial Diversity in Soil: The Need for a Combined Approach Using Molecular and Cultivation Techniques. In: *Modern Soil Microbiology*. van Elsas, J.D. - Trevors, J.T. - Wellington, E.M.H. (eds), New York: Marcel Dekker, p.375 – 439. ISBN 0-8247-9436-2
- MOHAMMADI, T. – REESINK, H.W. – VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. – SVELKOUK, P.H.M. 2003. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, p. 4796-4798.
- SAYLER, G.S. – LAYTON, A.C. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. In *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 44, p. 625 – 648.

WITTWER, C.T. – HERRMAN, M.G. – MOSS, A.A. – RASMUSSEN, R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. In *BioTechniques*, vol. 22, p. 130-138.

ZHOU, J.- BRUNS, M.A.- TIEDJE, J.M. 1996. Dna recovery from soils of diverse composition. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, No. 2, p. 316-322.

ANALÝZA REZIDUÍ TETRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ

ANALYSIS OF RESIDUES OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SOIL ENVIRONMENT

¹ Jirout Jiří, ² Tříška Jan, ² Vrchotová Naděžda, ¹ Elhottová Dana

¹Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie

²Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i., Laboratoř metabolomiky a izotopových analýz

Abstract

Tetracycline antibiotics represent about 50 % of all antibiotics used in veterinary medicine in the Czech Republic. Tetracycline antibiotics are sorbed after administration, but up to three quarters of them are then excreted in active form. In soil, antibiotics are partially degraded or sorbed. The presence of active antibiotics as well as their residues has the potential to influence the microbial communities in the environment. Selective pressure may lead to the development of bacterial communities resistant to that antibiotic. The activity of tetracycline antibiotics and their residues is variable in different environments. With regard to the possibility of the spread of antimicrobial resistance in the environment, it is important to monitor the fate and movements of antibiotics. For monitoring in various matrices, there is a wide range of possibilities of extraction, purification and determination of tetracycline antibiotics. Selecting options is always a good idea to adapt to the needs of the application on the environment, including the limit of detection, financial means and laboratory equipment. The aim of this work is to summarize the literature on the issue of analysis of tetracycline antibiotics in the environment with emphasis on the specifics of the soil.

Key words: tetracycline, residues, resistance, analytical chemistry

Úvod

Z definice vyplývá, že antibiotikum je sloučenina nebo látka, která ničí nebo zpomaluje růst bakterií (Waksman, 1947). Antibiotika jsou používána k léčbě a kontrole mnoha typů infekčních chorob jak v lidské, tak veterinární medicíně. V některých zemích jsou navíc antibiotika stále používána v chovech domácích zvířat jako růstové stimulanty v subterapeutických dávkách. V zemích Evropské unie byl tento postup pro vybraná antibiotika zakázán od roku 1998 (EMEA, 1999). Od roku 2006 se v subterapeutických dávkách mohou podávat pouze kokcidostatika a histomonostatika, i ta jsou ale povolena pouze do roku 2013. Po tomto datu bude možné ve veterinární praxi používat antibiotika pouze jako léčiva na předpis (EC 1831/2003).

Kontaktní adresa: RNDr. Jiří Jirout, Ph.D., Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, 370 05, České Budějovice, email: jirout.jiri@email.cz

Celosvětově je cca 52 % antibiotik používáno v humánní medicíně, 33 % ve veterinární medicíně a 15 % jako růstové stimulanty v potravě chovaných zvířat (Barton, 2001). V členských státech Evropské unie byla v roce 1999 spotřeba antibiotik odhadována na 8500 tun v rámci humánní medicíny a 4700 tun ve veterinární medicíně (FEDESA, 2001; Hamscher et al., 2004). Jelikož až 75 % antibiotik se do prostředí vrací v aktivní formě (Hamscher et al., 2003), dochází aplikací hnoje nebo kejdy k přenosu aktivních antibiotik do půdy, kde se mohou akumulovat, nebo být vyplaveny do povrchových i spodních vod. Přestože v půdě může docházet ke snížení antimikrobiální aktivity, přítomnost reziduí antibiotik přispívá ke změně struktury a funkcí mikrobiálních společenstev a k rozvoji společenstev rezistentních k danému antibiotiku (Halling-Sørensen et al., 2002); tyto bakterie následně mohou vstupovat do potravních řetězců (Chee-Sanford et al., 2001) a ohrozit tak zdraví lidí (Boxall et al., 2003).

Tetracykliny

Tetracykliny – širokospektrá, polyketidová antibiotika – působí proti mnoha druhům G⁺ i G⁻ bakterií, chlamydií, mykoplazmat, riketsií a prvoků (Chopra – Roberts, 2001). Tetracyklinová antibiotika blokuji proteosyntézu navázáním na aktivní místo 30S podjednotky bakteriálních ribozómů (Chopra et al., 1992). Mechanismus účinku je bakteriostatický a reverzibilní, dochází tak pouze k omezení růstu a množení bakterií (Chopra et al., 1992). Poměrně nízká cena a absence významných vedlejších účinků (Chopra – Roberts, 2001) vedly ke značnému rozšíření tetracyklinů při léčbě bakteriálních infekcí.

Ve veterinární medicíně se tetracyklinů spotřebuje podstatně více, než ostatních druhů antibiotik (Michalová et al., 2004). Do roku 1997 tvořily tetracykliny 66 % celkové spotřeby antibiotik užívaných při léčbě zvířat v členských státech Evropské unie (EMA, 2011). V České republice mezi roky 1997 a 2010 používání tetracyklinů slabě klesalo a v současné době tvoří tetracykliny přibližně 50 % všech používaných antibiotik ve veterinární medicíně (Hera et al., 2011).

Tetracykliny v prostředí

Hamscher et al. (2003) nebo Boxall et al. (2003) uvádějí několik zásadních cest, jimiž se (nejen) tetracyklinová antibiotika dostávají do prostředí: prostřednictvím exkrementů „domácích mazlíčků“ nebo zvířat chovaných ve velkochovech, prostřednictvím živočišných produktů (maso, mléko, atd.), použitím živočišných odpadů nebo čistírenských kalů jako hnojiva, nesprávným zacházením s obalovými materiály a nespotřebovanými léčivy, přímou aplikací antibiotik v akvakulturách nebo také přímo z výrobního prostředí.

Tetracykliny v prostředí prochází procesem degradace (Halling-Sørensen et al., 2002) nebo se mohou, díky chelatačním vlastnostem molekul tetracyklinů, vázat v aktivní či transformované formě na povrchy půdních částic (Chopra et al., 1992). Při degradaci tetracyklinových antibiotik mohou vznikat i produkty, které jsou pro mikroorganismy více toxické než původní látky (Halling-Sørensen et al., 2002). Vazba tetracyklinů a produktů jejich degradace na půdní částice je poměrně silná a díky ní mohou tetracyklinová antibiotika zůstat v půdě poměrně dlouhou dobu. Aga et al. (2005) udávají přítomnost tetracyklinů nebo jejich metabolitů až 2 roky po vstupu do prostředí. „Poločas mizení“ tetracyklinů se pohybuje v aerobním prostředí

mezi 8 a 46 dny, v anoxickém se prodlužuje až na 62 dnů; tato doba výrazně závisí na půdních podmínkách (Aga et al., 2005; Yang et al., 2009).

V různých prostředích může být aktivita tetracyklinů a jejich reziduí značně rozdílná a je proto nutné se na jejich osud a pohyb v prostředí zaměřit. Dalším důvodem ke sledování osudu antibiotik v prostředí je také platná direktiva EU (KOM (2011)748; Akční plán proti rostoucím hrozbám antimikrobiální rezistence).

Analýza tetracyklinů v půdě, sedimentech a exkrementech

Úspěšná analýza tetracyklinů v prostředí má tři základní kroky – extrakci, přečištění a determinaci (Díaz-Cruz et al., 2003), přičemž existuje poměrně široká řada metodických postupů, které mohou být využity pro specifické typy substrátů.

Extrakce

Extrakci a následným analýzám tetracyklinů z různých prostředí (tkáň zvířat, moč, trus, půda, povrchové a spodní vody) se věnuje značné množství pozornosti a dostupných literárních údajů je tak poměrně velké množství (např. Oka et al., 2000; Hamscher et al., 2002; Anderson et al., 2005; O'Connor – Aga, 2007; Martínez-Carballo et al., 2007; Aust et al., 2008; Kemper et al., 2008; Yang et al., 2009; Wang et al., 2010). Ve většině případů jsou pro extrakci tetracyklinů používány metody založené na **extrakci kapalinou**. V případě vzorků s pevným podílem (půda, exkrementy) je vhodné na vzorek působit mechanicky, např. mícháním nebo ultrazvukem (Blackwell et al., 2004). Zároveň by mělo být bráno v úvahu, že tetracyklinová antibiotika patří mezi termo- (Bogialli et al., 2006) a fotolabilní (Chen et al., 2011) sloučeniny. Rozsáhlý přehled o možnostech použití různých kombinací rozpouštědel pro extrakci podává Oka et al. (2000). Mezi nejpoužívanější patří např. směs Na₂EDTA a McIlvaine pufru (Blackwell et al., 2004; Martínez-Carballo et al., 2007), ethylacetát (Hamscher et al., 2002), směs acetonu, kyseliny chlorovodíkové a vody (Wang et al., 2010), směs kyseliny citronové, kyseliny šťavelové, methanolu a vody (Wang – Yates, 2008), nebo okyselená směs methanolu s vodou (Aust et al., 2008).

Pro analýzu tetracyklinových antibiotik v půdě je významná zejména jejich **chelatační schopnost** (Chopra et al., 1992). Síla vazby závisí na mnoha faktorech půdního prostředí, převážně na obsahu jemných koloidních částic, pH nebo množství divalentních iontů (Mg, Zn, Ca, Fe, atd.). Ve složitějších matricích, jako je půda, se mohou vytvářet různé kombinace vazeb tetracyklin-ion najednou (Tongaree et al., 1999). Tetracykliny se v půdě nejsilněji vážou na ionty Mg²⁺, nejméně pak na Ca²⁺ (Tongaree et al., 1999; Newman – Frank, 1976). Tvorba komplexů je navíc umocněna schopností tetracyklinů existovat ve formě zwitterionických iontů, tj. mají současně kladný i záporný náboj a tím pádem se mohou vázat na kationty i anionty půdních částic (O'Connor – Aga, 2007). Charakter „zwitter“ iontů mají tetracykliny v rozmezí pH 3-8; komplexace tetracyklinů v běžných půdách (s pH mezi 6-8) tak může značně znesnadnit úspěšnou extrakci (Wessels et al., 1998; O'Connor – Aga, 2007). EDTA jako další silné chelatační činidlo může přispět k odstranění problému s komplexací (Anderson et al., 2005).

Na úspěšnost extrakce tetracyklinů z přírodní matrice má kromě pH značný vliv i **rozpustnost** tetracyklinů v různých rozpouštědlech. Nejvyšší rozpustnost mají tetracykliny

v alkoholech, jejich rozpustnost se snižuje v dalších organických rozpouštědlech (aceton, acetonitril). Při nižších koncentracích ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) jsou tetracykliny rozpustné ve vodných roztocích pufrů. V rozpouštědlech tvořených nasycenými uhlovodíky jsou tetracykliny nerozpustné (The Merck Index, 2006).

Přečištění extraktů

Přečištění (tzv. clean-up) extraktů před vlastní analýzou je důležitým krokem před vlastním stanovením (O'Connor – Aga, 2007). Pro jednoduché odstranění pevných částic z extraktu je možné použít **membránovou filtraci** (Wang et al., 2010). Takto připravené vzorky ale většinou (vzhledem k obsahu solí a dalších interferujících látek) nelze použít pro analýzu hmotností spektroskopii (O'Connor – Aga, 2007) a jsou tak použitelné pro jiné metody determinace (HPLC-DAD, TLC).

Podstatně rozšířenější možností je použití **extrakce pevnou fází** (SPE). Tato metoda je vhodná buď jako samostatný extrakční krok (Kemper et al., 2008), nebo zejména jako možnost přečištění a zakonzentrování velkých objemů vzorků najednou (Martínez-Carballo et al., 2007; Aust et al., 2008). Mezi nejrozšířenější pevné fáze patří hydrofilně-lipofilní kopolymer (Oasis HLB, Waters, USA), srovnatelné výsledky byly dosaženy použitím sorbentu Strata-X (Phenomenex, USA), který obsahuje podobné funkční skupiny (O'Connor – Aga, 2007). Méně vhodné je použití kolonek s náplní C18 (oktadecyl-silikagel), která obsahuje volné silanolové skupiny. Ty interagují s chelatačními místy tetracyklinů a dochází tak ke ztrátám výtěžnosti tetracyklinů (Pena et al., 2007).

Při extrakci tetracyklinů z půdy dochází ke společné extrakci dalších organických látek, zejména huminových kyselin (O'Connor – Aga, 2007), které interferují s absorpcí tetracyklinů v UV oblasti (254 nm). Tyto látky lze úspěšně odstranit použitím sorbentu se silnou aniontovou výměnnou kapacitou (SAX) (O'Connor – Aga, 2007). SAX kolonky se zapojují jako první v tandemu s HLB nebo Strata-X (např. Blackwell et al., 2004; O'Connor – Aga, 2007). Účinek přečištění vzorků pomocí SPE lze zvýšit výběrem vhodného elučního činidla. Na základě rozpustnosti je nejlepšími výsledky dosaženo elucí methanolem. Účinnost eluce lze zvýšit okyselením methanolu např. kyselinou šťavelovou, trifluoroctovou nebo mravenčí (Aga et al., 2005).

Detekce tetracyklinů

Pro detekci a stanovení množství tetracyklinů v přečištěných extraktech se nabízí celá řada možností. Patří mezi ně metody **mikrobiologické** – komerční testy (např. Unisensor Tetrasensor[®], Charm ROSA[®], R-Biopharm Premi[®]Test) (např. Alfredsson et al., 2005; Cantwell - O'Keeffe, 2006), ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) – i **metody analytické chemie** – tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektroskopií (LC-MS) (Oka et al., 2000).

Komerčně dostupné mikrobiologické testy slouží pro rychlé a jednoduché stanovení nadlimitního množství antibiotik v závislosti na citlivosti daného testu (cca 10 - 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

Metoda ELISA je vhodná pro celkové stanovení tetracyklinů najednou (Aga et al., 2005), nedokáže ale rozlišit jednotlivé druhy tetracyklinů mezi sebou (O'Connor – Aga, 2007).

Pro kvantifikaci tetracyklinových antibiotik jsou vhodnější metody analytické chemie. Mezi méně instrumentálně náročné metody determinace tetracyklinů patří TLC za použití organických rozpouštědel a jejich směsí. V případě TLC jsou pak tetracykliny nejcitlivěji detekovány pomocí UV ($\lambda = 370\text{nm}$) po reakci s MgCl_2 (shrnutí různých systémů TLC uvádí např. Oka et al., 2000).

Za nejvhodnější, přesné a citlivé systémy pro detekci tetracyklinových antibiotik se považují **HPLC-DAD** (např. Kühne et al., 2000; Wang – Yates, 2008) nebo **LC-MS(/MS)** (např. Aust et al., 2008; Hamscher et al., 2002; Kemper et al., 2008; Martínez-Carballo et al., 2007). V případě (HP)LC-DAD i LC-MS systémů závisí výsledek stanovení na řadě faktorů.

Jedním z hlavních faktorů je **výběr chromatografické kolony**. Použití kolon s reverzní fází (RP) není obecně doporučováno vzhledem k chelatačním schopnostem tetracyklinů; během separace dochází k chvostování, tzv. „tailingu píků“. U některých C8 nebo C18 kolon (modifikovaný silikagel se zablokovanými volnými silanolovými skupinami), zejména při použití okyselené mobilní fáze k tailingu píků nedochází. Nejlepších výsledků je pak možné dosáhnout použitím PS-DVB (polystyren-divinylbenzen) kopolymeru, který neobsahuje volné silanolové skupiny (Anderson et al., 2005; Oka et al., 2000).

Dalším faktorem ovlivňujícím analýzu pomocí (HP)LC je **výběr mobilní fáze**. V mobilní fázi se nejčastěji používá acetonitril nebo methanol ve směsi s pufrům nebo kyselinou (trifluoroctová, šťavelová, fosforečná) (Anderson et al., 2005; Blackwell et al., 2004). Pro separaci tetracyklinů se používá jak isokratická (neměnná) (Oka et al., 2000), tak gradientová eluce (Aga et al., 2005).

Posledním důležitým faktorem je **výběr detektoru**. Nejčastěji se používají tři typy detektorů: detektor s diodovým polem (DAD), fluorescenční detektor (FLD) a hmotnostní spektrometr (MS). DAD detektory mohou měřit absorpenci v UV oblasti a detektor FLD fluorescenci. Při detekci tetracyklinů se využívá spíše UV detekce při $\lambda = 350 - 370\text{ nm}$. Fluorescence se totiž zvyšuje, pokud jsou tetracykliny v roztoku ve formě chelátů (Day et al., 1978); tím dochází k nadhodnocování množství tetracyklinů ve vzorku. Citlivost metody se při použití DAD-UV pohybuje řádově v desítkách ng/g. MS detekce je v poslední době nejdoporučovanější metodou kvantifikace tetracyklinů (O'Connor – Aga, 2007). Limit detekce je vzhledem k možnosti zaměřit se pouze jeden vybraný analyt podstatně nižší a dosahuje až k desetínám ng/g (Oka et al. 2000). Použití MS detektoru má také určitá negativa – vyšší pořizovací náklady, složitější obsluha, nutnost dalších úprav extraktu před analýzou (odsolení, potlačení látek z matrice, optimalizace nastavení) (O'Connor – Aga, 2007).

Závěr

Pro analýzu tetracyklinových antibiotik v půdě existuje řada úskalí, která je nutno překonat. Na druhou stranu, existuje velmi rozsáhlá literatura, popisující tato úskalí a nabízející řešení kombinací od extrakce k analytické koncovce. Pro půdní prostředí jsou typické problémy spojené se snížením výtěžnosti tetracyklinů: chelatace tetracyklinů, rozdílná rozpustnost v různých rozpouštědlech během extrakce a přečišťování, ko-extrakce dalších látek z půdy

(zejména huminových kyselin) a výběr a nastavení analytické koncovky s ohledem na potřeby aplikace na dané prostředí, včetně limitu detekce. Zásadním problémem analýzy tetracyklinových antibiotik zůstává chybějící souhrnná metoda, postihující osud tetracyklinových antibiotik od podání léčiva po jeho přenos skrze léčený subjekt do prostředí a další šíření v něm. Se šířením (nejen) tetracyklinových antibiotik pak úzce souvisí i šíření rezistence k antibiotikům v rámci mikrobiálních společenstev.

Poděkování

Studium reziduí tetracyklinových antibiotik v půdním prostředí je podporováno grantem GAČR č. P504/10/2077 (Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry antibiotické rezistence v půdě) a projektem CzechGlobe – Centrum pro studium dopadů globální změny klimatu č. CZ.1.05/1.1.00/02.0073.

Použita literatura

- AGA, D.S. – O'CONNOR, S. – ENSLEY, S. – PAYERO, J.O. – SNOW, D. – TARKALSON, D. 2005. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 53, 2005, č. 18, s. 7165-7171.
- ALFREDSSON, G. – BRANZELL, C. – GRANELLI, K. – LUNDSTRÖM, Å. 2005. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. In *Analytica Chimica Acta*, roč. 529, 2005, č. 1-2, s. 47-51.
- ANDERSON, C.R. – RUPP, H.S. – WU, W.H. 2005. Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. In *Journal of Chromatography A*, roč. 1075, 2005, č. 1-2, s. 23-32.
- AUST, M.-O. – GODLINSKI, F. – TRAVIS, G.R. – HAO, X. – MCALLISTER, T.A. – LEINWEBER, P. – THIELE-BRUHN, S. 2008. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. In *Environmental Pollution*, roč. 156, 2008, č. 3, s. 1243-1251.
- BARTON, M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. In *Nutrition Research Reviews*, roč.13, 2000, č. 2, s. 279-299.
- BLACKWELL, P.A. – LÜTZHØFT, H.-C.H. – MA, H.-P. –HALLING-SØRENSEN, B. – BOXALL, A.B.A. – KAY, P. 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. In *Talanta*, roč. 64, 2004, č. 4, s. 1058-1064.
- BOGIALLI, S. – CURINI, R. – DI CORCIA, A. – LAGANÀ, A. – RIZZUTI, G. 2006. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 54, 2006, č. 5, s. 1564-1570.

- BOXALL, A.B.A. – KOLPIN, D.W. – HALLING-SØRENSEN, B. – TOLLS, J. 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? In *Environmental Science*, roč. 37, 2003, č. 15, s. 286A-294A.
- CANTWELL, H. – O'KEEFFE, M. 2006. Evaluation of the Premi® Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. In *Food Additives and Contaminants*, roč. 23, 2006, č. 2, s. 120-125.
- CHEE-SANFORD, J.C. – AMINOV, R.I. – KRAPAC, I.J. – GARRIGUES-JEANJEAN, N. – MACKIE, R.I. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. In *Applied and Environmental Microbiology*, roč. 67, 2001, č. 4, s. 1494-1502.
- CHEN, Y. – LI, H. – WANG, Z. – TAO, T. – HU, C. 2011. Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺. In *Journal of Environmental Sciences*, roč. 23, 2011, č. 10, s. 1634-1639.
- CHOPRA, I. – ROBERTS, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. In *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, roč. 65, 2001, č. 2, s. 232-260.
- CHOPRA, I. – HAWKEY, P.M. – HINTON, M. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, roč. 29, 1992, č. 3, 245-277.
- DAY, S.T. – CROUTHAMEL, W.G. – MARTINELLI, L.C. – MA, J.K.H. 1997. Mechanism of fluorometric analysis of tetracycline involving metal complexation. In *Journal of Pharmaceutical Sciences*, roč. 67, 1997, č. 11, s. 1518-1523.
- DÍAZ-CRUZ, M.S. – LÓPEZ DE ALDA, M.J. – BARCELÓ, D. 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. In *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 22, 2003, č. 6, s. 340-351.
- EMA. 1999. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines, EMEA/CVMP/342/99-corr-Final. London, United Kingdom.
- EMA. 2011. EUROPEAN MEDICINES AGENCY: Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009) (EMA/238630/2011).
- FEDESA, 2001. Antibiotic use in farm animals does not threaten human health, a new study suggests. European Federation of Animal Health, Press release, June 13th 2001.
- HALLING-SØRENSEN, B. – SENDELØ, G. – TJØRNELUND, J. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. In *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, roč. 42, 2002, č. 3, s. 263-271.
- HAMSCHER, G. – SCZESNY, S. – HÖPER, H. – NAU, H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. In *Analytical Chemistry*, roč. 74, 2002, č. 7, s. 1509-1518.
- HAMSCHER, G. – PAWELZICK, H.T. – SCZESNY, S. – NAU, H. – HARTUNG, J. 2003. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? In *Environmental Health Perspectives*, roč. 111, 2003, č. 13, s. 1590-1594.
- HAMSCHER, G. – PAWELZICK, H.T. – HÖPER, H. – NAU, H. 2004. Antibiotics in soil: Routes of entry, environmental concentrations, fate and possible effect. In *Pharmaceuticals in*

the environment: sources, fate, effects, and risks. 2nd ed. New York: Springer, 2004, s. 139-148. ISBN 3540213422.

HERA, A. – KOUTECKÁ, L. – DORN, D. – POKLUDOVÁ, L. Spotřeba antibiotik a antiparazitik ve veterinární medicíně v ČR V letech 2003 – 2010. In: [online]. [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/informace/tiskove-centrum/tiskprohl>.

KEMPER, N. – FÄRBER, H. – SKUTLAREK, D. – KRIETER, J. 2008. Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. In *Agricultural Water Management*, roč. 95, 2008, č. 11, s. 1288-1292.

KOM(2011)748 v konečném znění: SDĚLENÍ KOMISE EVROPSKÉMU PARLAMENTU A RADĚ. Akční plán proti rostoucím hrozbám antimikrobiální rezistence. Brusel, 2011.

KÜHNE, M. – IHNEN, D. – MÖLLER, G. – AGTHE, O. 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. In *Journal of Veterinary Medicine Series A*, roč. 47, 2000, č. 6, s. 379-384.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E. – GONZÁLEZ-BARREIRO, C. – SCHARF, S. – GANS, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. In *Environmental Pollution*, roč. 148, 2007, č. 2, s. 570-579.

MICHALOVÁ, E. – NOVOTNÁ, P. – SCHLEGLOVÁ, J. 2004. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. In *Veterinarni Medicina – UZPI*, roč. 49, 2004, č. 3, s. 79-100.

NEWMAN, E.C. – FRANK, C.W. 1976. Circular dichroism spectra of tetracycline complexes with Mg^{+2} and Ca^{+2} . In *Journal of Pharmaceutical Sciences*, roč. 65, 1976, č. 12, s. 1728-1732.

O'CONNOR, S. – AGA, D.S. 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. In *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 26, 2007, č. 6, s. 456-465.

OKA, H. – ITO, H. – MATSUMOTO, H. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. In *Journal of Chromatography A*, roč. 882, 2000, č. 1-2, s. 109-133.

PENA, A. – LINO, C.M. – ALONSO, R. – BARCELÓ, D. 2006. Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 55, 2006, č. 13, s. 4973-4979.

REGULATION (EC) No 1831/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. In: *Official Journal of the European Union*. Brussels, L 268, 2003, s. 29-43.

The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14th ed. Whitehouse Station: Merck and Co., Inc., 2006, 1756 s. ISBN 09-119-1000-X.

TONGAREE, S. – FLANAGAN, D.R. – POUST, R.I. 1999. The interaction between oxytetracycline and divalent metal ions in aqueous and mixed solvent systems. In *Pharmaceutical Development and Technology*, roč. 4, 1999, č. 4, s. 581-591.

WAKSMAN, S.A. 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? In *Mycologia*, roč. 39, 1947, č. 5, s. 565-569.

WESSELS, J.M. – FORD, W.E. – SZYMCZAK, W. – SCHNEIDER, S. 1998. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{+2} and Ca^{+2} : A Spectroscopic Study. In *The Journal of Physical Chemistry B*, roč. 102, 1998, č. 46, s. 9323-9331.

WANG, Q. – YATES, S.R. 2008. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 56, 2008, č. 5, s. 1683-1688.

WANG, R. – WEI, R. – CHEN, M. – WANG, T. 2010. A new, simple and rapid HPLC method for determination of chlortetracycline in pig solid manure. In *Italian Journal of Animal Science*, roč. 9, 2010, č. 2, s. 190-193.

YANG, J.-F. – YING, G.-G. – ZHOU, L.-J. – LIU, S. – ZHAO, J.-L. 2009. Dissipation of oxytetracycline in soils under different redox conditions. In *Environmental Pollution*, roč. 157, 2009, č. 10, s. 2704-2709.

VLIV VYŠŠÍ DOSTUPNOSTI MINERÁLNÍCH FOREM DUSÍKU NA MNOŽSTVÍ VOLNĚ ŽIJÍCÍCH FIXÁTORŮ DUSÍKU V ALPÍNSKÉ LOUCE

IMPACT OF INCREASED AVAILABILITY OF MINERAL NITROGEN FORMS ON THE NUMBER OF WILD RETAINERS OF NITROGEN IN ALPINE MEADOW

Kintl Antonín, Elbl Jakub, Tůma Ivan, Záhora Jaroslav,

Department of Agrochemistry, Soil science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno

Abstract

The aim of this paper was to describe the effect of different amounts of added mineral nitrogen (2 g N/m²/yr⁻¹ and 15 g N/m²/yr⁻¹) on the soil microbial activities in alpine meadow. Experiment was carried out at the site Salatín. The Salatín study site is located in the Western Tatra Mountains. Availability of mineral nitrogen was measured "in situ" using ion exchange resins applied into upper soil horizon. Based on presented results, we can conclude that the ability to immobilize nitrogen in microbial and plant communities in the alpine meadows is exhausted. Increased dosage of nitrogen has a negative effect on the leaching of mineral nitrogen and on microbial community in soil, especially on retainers of mineral nitrogen. Increasing the ecosystem capacity to immobilize N and microbial activity can be achieved by adding phosphorus. Because phosphorus lacking in these soils.

Key words: Mineral nitrogen, Alpine meadow, microbial retainers of nitrogen

Úvod

Atmosférické depozice dusíku jsou považovány za nejvýznamnější hrozbu pro biologickou rozmanitost v Evropě, zvláště na přirozeně chudých stanovištích jako jsou alpínské louky, které se nachází v nadmořské výšce 1900 m n. m. na hlavním hřebenu Západních Tater, Roháčů, pod vrcholem Salatín (2047 m n. m.) (Kintl et al. 2011). Uvolňování dusíkatých sloučenin do ovzduší se zvýšilo v průběhu 20. století, a to zejména ve formě amoniaku ze zemědělství a oxidů dusíku z průmyslové výroby. Vyšší vstup dusíku do citlivých alpínských ekosystémů se promítá i do aktivit mikrobiálních společenstev, které jako první reagují na tyto změny. Dusík je navíc živinou, jejíž transformace uvnitř ekosystému jsou téměř výlučně regulovány biologickými procesy (Záhora, 2001). Růst všech organismů vždy závisel na dostupnosti minerálních živin a málokterá je svým významem srovnatelná s dostupností dusíku, který je vyžadován ve velkém množství jako základní složka proteinů, nukleových kyselin a dalších buněčných složek.

Kontaktní adresa: Ing. Antonín Kintl

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno 13

email: antonin.kintl@mendelu.cz, www.uapmv.af.mendelu.cz, tel: +420 545 133 324

Největší zásobník dusíku, atmosféra, obsahuje dusík ve formě téměř inertního plynu. Jak uvádí (Betina-Nemec, 1977) je atmosférický molekulární dusík navzdory tomu, že tvoří až 79 % zemské atmosféry, chemicky mimořádně nereaktivní a nevhodný jako živina pro většinu organismů. Přírozeným vstupem dusíku do ekosystémů, resp. do živých organismů, je jeho biologická fixace symbiotickými a nesymbiotickými baktériemi, fixátory dusíku. Významnými zástupci volně žijících fixátorů dusíku je zejména rod *Azotobacter*. Vyskytují se především v půdách s neutrálním pH a vyšším obsahem organických látek (Šimon, 2010). Předpokládá se, že naprostá většina dusíku vázaného dnes v biomase organismů, v odumřelé organické hmotě, v humusových látkách i v nerostech organického původu (uhlí, rašelina) byla v minulosti fixována z atmosféry procesem biologické fixace molekulárního dusíku (Betina-Nemec, 1977). Obecně se uvádí, že biologická fixace dusíku volně žijícími fixátory jako jsou bakterie rodu *Azotobacter* se pohybuje ročně od 5 do 10 kg·ha⁻¹ N, vyšší fixace až 30 kg·ha⁻¹ N·rok⁻¹ je dosahovaná při vyšší vlhkosti a teplotě půdy a při vyšším zásobení půdy organickou hmotou (Šimon, 2010). Tyto bakterie využívají atmosférický dusík pro syntézu buněčných proteinů. Po odumření bakterií podléhají mineralizaci a tím přispívají k dostupnosti dusíku pro jeho další využití a udržení v ekosystému.

Současné atmosférické depozice v Západních Tatrách na zájmové lokalitě činí ročně cca 12 kg N·ha⁻¹ a 11 kg S·ha⁻¹. To je více než ve Vysokých Tatrách, kde je celkový kumulativní vstup mezi roky 1850 a 2000 odhadován na 960 kg N·ha⁻¹ a 1 100 kg S·ha⁻¹ (Kopáček et al., 2001). Výskyt a počty bakterií rodu *Azotobacter* a jejich schopnost fixovat vzdušný dusík velmi úzce souvisí s obsahem dusíku v půdě. Je známo, že aplikace průmyslových N hnojiv potlačuje nitrogenázovou aktivitu v půdě a tedy N₂ fixační aktivitu těchto bakterií (Šimon, 2010).

Při použití metody záchytu dostupného půdního minerálního dusíku pomocí iontoměničů je zachováno působení přírodních faktorů na mikrobiální společenstva jako je pH, půdní vlhkost, teplota (Binkley, 1984). Naměřené hodnoty byly porovnány s výsledky z kultivačních pokusů, z čehož byl odvozen vliv množství dostupných forem dusíku na množství volně žijících fixátorů dusíku v alpské louce na lokalitě Salatín v Západních Tatrách.

Materiál a metodika

V blízkosti vrcholu Salatín (2047 m) v Západních Tatrách, (TANAP), na Slovensku, se nacházejí alpské louky. Vegetaci lze charakterizovat jako vyfoukávané alpské trávníky svazu *Juncion trifidi* (Chytrý, 2001). Jedná se o druhově chudá společenstva s dominující pěchavou dvouřadou (*Oreochloa disticha*), sítinou trojklannou (*Juncus trifidus*) a kostřavou nízkou (*Festuca supina*), rostoucí na mělkých a chudých půdách vytvořených na kyselých silikátových horninách. Extrémní ekologické podmínky nejvyšších horských poloh výrazně umocňuje zejména účinek větru, který mechanicky i fyziologicky ovlivňuje rostliny, způsobuje vysušování půd a odnos půdních částic. Účinkem větru je v zimě vegetace kryta jen tenkou vrstvou sněhu, což umožňuje promrzání půdy (Chytrý, 2001).

Byly vytýčeny čtyři bloky (varianty) a v každé variantě čtyři opakování. Dostupnost a pohyb dusíku byl sledován aplikací směsných ionexů v sondě z polyamidové síťoviny (viz Záhora, 2001). Každá sonda byla do půdy zapravena pomocí ocelového bodce pod úhlem 45°.

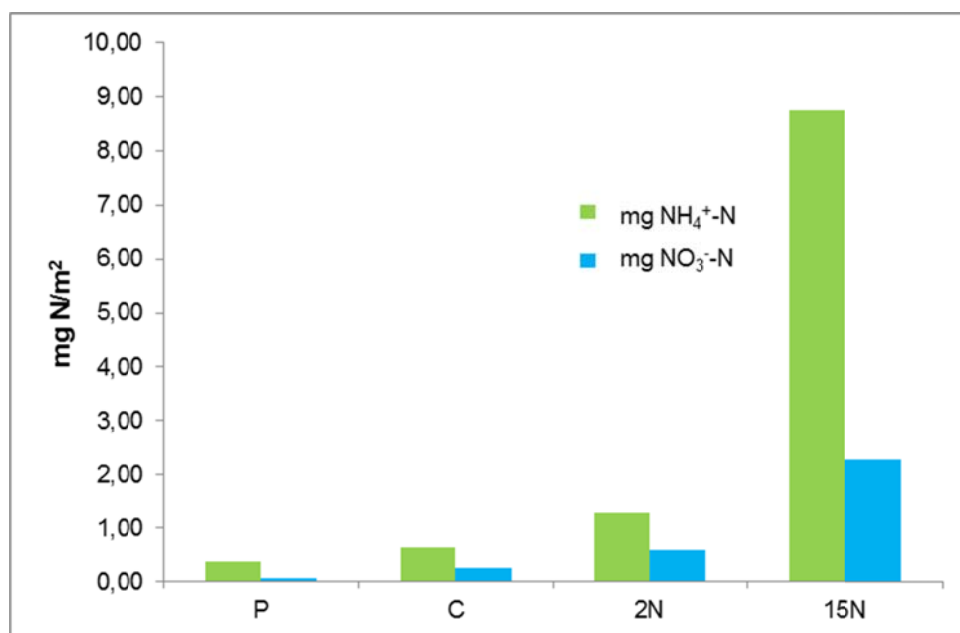
Dohromady tak bylo vytvořeno 16 pokusných ploch o rozměrech 1,5 x 1,5 m, na kterých byly aplikovány třikrát během vegetačního období (30. června – 6. října 2010) různé experimentální dávky dusíku a fosforu. Jednalo se o tyto **varianty**:

- C:** **kontrola** (byla aplikována pouze voda ve stejném množství)
P: **6g P m⁻² · rok⁻¹** aplikován KH₂PO₄ v roztoku (množství souběžně aplikovaného K odpovídalo 6,3g K.m⁻². rok⁻¹)
2N: **2g N m⁻² · rok⁻¹** aplikován NH₄NO₃, tedy ve stejném poměru redukováného (NH₄⁺-N) a oxidovaného dusíku (NO₃⁻-N)
15N: **15g N m⁻² · rok⁻¹** aplikován NH₄NO₃, tedy ve stejném poměru redukováného (NH₄⁺-N) a oxidovaného dusíku (NO₃⁻-N)

Pro izolaci bakterií byly odebírány čerstvé půdní vzorky z hloubky 0-10 cm. Jako živné médium byl použit Ashbyho agar (složení: mannitol 10,0 g, K₂HPO₄ 0,2 g, MgSO₄·7 H₂O 0,2 g, NaCl 0,2 g, CaSO₄ 0,1 g, CaCO₃ 5,0 g, agar 15 g, destilovaná voda 1000 ml, pH 7,0). Základní suspenze vzorků pro izolaci bakterií byla připravena naředěním 10 g z dokonale zhomogenizovaného půdního vzorku v 90 ml sterilní destilované vody se skleněnými kuličkami. Ze základní suspenze byla připravena řada desetinásobných ředění postupným pipetováním 1 ml suspenze do připravených zkumavek s 9 ml sterilní destilované vody. Ředící řada byla připravena od prvního do pátého ředění. Do připravených sterilních Petriho misek byl odpipetován 1 ml z každého ředění suspenze (ve třech opakováních) na dno Petriho misky, potom byla nalita ochlazená živná půda, která byla ihned důkladně promíchána. Po utužení živných půd byly misky uloženy k inkubaci do termostatu při teplotě 28 °C. Po pěti dnech byly misky s narostlými koloniemi bakterií vyjmuty z termostatu (Šimon, 2010). Z Petriho misek byla odečtena množství KTJ (kolonie tvořící jednotku).

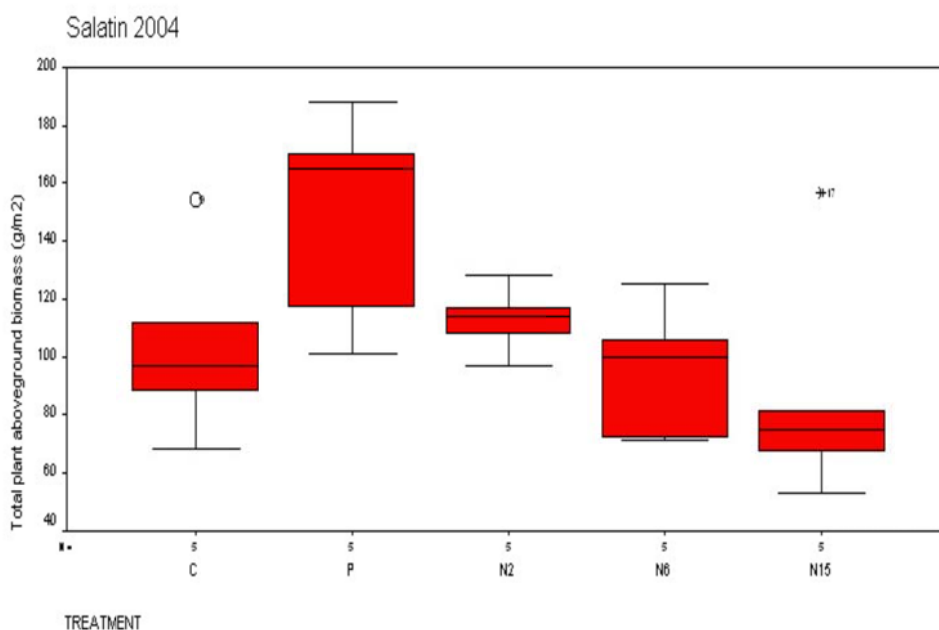
Výsledky a diskuze

Množství dusíku zachyceného na iontoměničích odráželo množství simulovaných vstupů živin, což je patrné z obr. 1. Největší záchyt byl u varianty s dotací 15 g N m⁻² · rok⁻¹, následovala varianta s dotací 2 g N m⁻² · rok⁻¹ a kontrola. Z uvedeného tedy vyplývá, že vysoká míra uvolňování dusíkatých iontů, poukazuje na vyčerpání akumulací schopnosti ekosystému. Nejnižším záchytem (NH₄⁺) a (NO₃⁻) iontů se vyznačuje varianta s dotací fosforu. V této variantě, zároveň také s celkově největší biomasou porostu (viz obr. 2.) vyšší nabídka fosforu pravděpodobně umožnila zvýšené zabudování dusíkatých látek do buněk mikroorganismů a vyšších rostlin. Aplikace fosforu (spolu s draslíkem) mohla stimulovat využití dusíku a zvýšená rostlinná primární produkce zabezpečovat zásobování mikrobiálních společenstev uhlíkatými látkami ve formě kořenových exudátů, které slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy (Halada et al. 2009). Tyto látky mohou mít významný vliv na složení mikrobiálních společenstev v blízkosti kořenů a na biochemické procesy ve rhizosféře a mohou tak pozitivně ovlivňovat i množství fixátorů N.



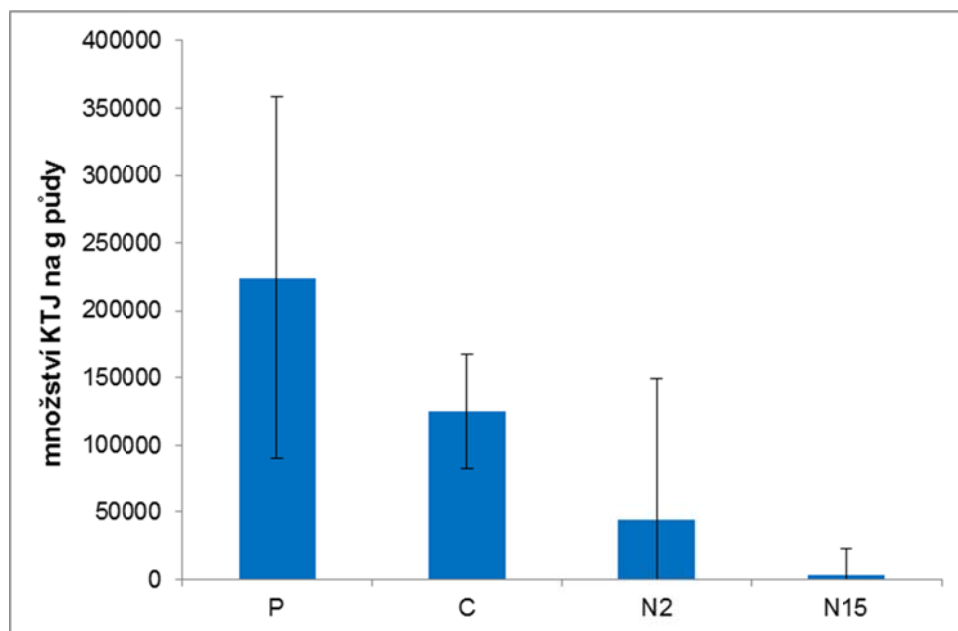
Obr. 1. Množství dostupných forem dusíku zachycených v období od 30. června do 6. září 2010 na iontoměničích (Kintl et. el., 2011).

Redukce molekul N₂ je energeticky velmi náročný a z toho vyplývá nutnost zajištění dostatečných zdrojů uhlíku. V půdě jsou to různé organické zbytky, odumřelé tkáně a buňky rostlin a živočichů, kořenové exudáty a jiné organické sloučeniny (Šimek, 2003). Ve variantě s vyšší produkcí biomasy může vstupovat větší množství naprodukované organické hmoty do dekompozičních řetězců a být tak k dispozici půdním mikrorganismům. O pozitivní reakci fixátorů na množství organických látek v půdě píše např. (Šimon, 2010).



Obr. 2. Celková nadzemní rostlinná biomasy (g.m⁻²) v roce 2004 (Halada, 2009).

Z námi zjištěných výsledků je patrné, že počty KTJ u volně žijících kultivovatelných fixátorů dusíku dosahují nejvyšší hodnot právě ve variantě s přidáním fosforu (obr. 3.). Z grafu na obr. 3 a 2 je zřejmé, že mikrobiální společenstva fixující N ve variantě s přidavkem fosforu pozitivně reagovala na zvýšenou rostlinnou primární produkci (Šimon, 2010).



Obr. 3. Průměrné množství volně žijících fixátorů dusíku v různých variantách vstupů živin (+směrodatná odchylka).

Porovnáme-li naše výsledky zobrazené v grafech (obr. 1 a 3) zjistíme, že ve variantě s přidavkem fosforu je nejvyšší počet fixátorů N a zároveň nejmenší množství volně přístupného dusíku v půdním roztoku. Naopak ve variantě s nejvyšším simulovaným vstupem dusíku je při nejvyšším množství zachyceného minerálního dusíku v půdě zjištěn nejmenší počet volně žijících kultivovatelných fixátorů N. Významný pokles počtu bakterií u varianty 15 g N m⁻². rok⁻¹ může být tak způsobeno samotnou přítomností dostupných minerálních forem dusíku v rhizosféře, což potvrzují také nejvyšší hodnoty zachyceného N v půdním roztoku (obr. 1.). Toto potvrzují i publikované údaje o nepřímo úměrném vlivu množství dostupného dusíku na množství volně žijících fixátorů dusíku (Šimon, 2010).

V pořadí druhé nejvyšší množství fixátorů N bylo nalezeno ve variantě s nižším vstupem N. Zde mohlo sehrát svou roli i malé množství dusíku dodávané na list ve vegetační době, které vedlo oproti kontrole k mírnému zvýšení produkce biomasy rostlin. Toto vyšší množství přítomné organické hmoty tak mohlo pozitivně ovlivnit počet fixátorů, ovšem v mnohem menší míře než ve variantě s vyšším vstupem fosforu. Reakce mikroorganismů na změnu podmínek při jejich kultivaci nedovoluje vyvodit zcela jasné závěry o jejich závislosti na množství dostupných forem dusíku, neboť při interpretaci kultivačních experimentů jsme odkázáni na určité procento těch mikroorganismů, které byly schopny zareagovat na umělé podmínky nastavené při kultivaci. Nicméně při respektování uvedeného interpretačního omezení se ukazuje, že vyšší dostupnost dusíkatých látek a fosforu v alpínské půdě má na množství volně žijících kultivovatelných fixátorů dusíku jistý vliv.

Závěr

I přes opatrnou interpretaci výsledků laboratorních experimentů (v návaznosti na terénní zjištění), lze usuzovat na pozitivní vliv zvýšené dostupnosti fosforu a naopak negativní vliv vyššího vstupu dusíku na množství volně žijících kultivovatelných fixátorů dusíku i v tak extrémním ekosystému, jako jsou alpská travní společenstva.

Poděkování

Práce byla zpracována s podporou Výzkumného záměru č. MSM6215648905 Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu.

Použitá literatura

- BETINA, V. – NEMEC, P. 1977. Všeobecná mikrobiologie. 1. vyd. Bratislava : Alfa, 1977. 477 s.
- BINKLEY, D. 1984. Ion exchange resin bags: factor affecting estimates of nitrogen availability. In *Soil Science Society of America Journal*, roč. 48, 1984, č. 5, s. 1181-1184.
- BOBBINK, R. – HORNING, M. – ROELOFS, J. G. M. 1998. The effect of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. In *Journal of Ecology*, roč. 86, 1998, č. 5, s. 731-738.
- HALADA, L. – DAVID, S. – HALABUK, A. 2009. Vegetation structure and aboveground biomass at Mount Salatín long-term ecological research site, the west Tatra Mts, Slovakia. In *Ekológia*, roč. 28, 2009, č. 2, s. 113-126.
- CHYTRÝ, M. 2001. Katalog biotopů České republiky. Praha : AOPK, 2001. 445 s. ISBN 978-80-87457-02-3
- KINTL, A. – TŮMA, I. – HOLUB, P. 2011. Effect of acidification on soil microbial activity in alpine meadow. In *MendelNet 2011 – Proceeding of the International Ph.D. Students Conference*. Brno : MENDELU, 2011, s. 607-612. ISBN 978-80-7375-534-8.
- KINTL, A. – ZÁHORA, J. – TŮMA, I. 2011. Hrdinné lomikameny na Roháčích v sousedství nejacidifikovanějšího alpského trávníku. In *Otazníky kolem CITES 2011*. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2011, s. 45. ISBN 978-80-7394-330-1.
- KOPÁČEK, J. – VESELÝ, J. – SUCHLÍK, E. 2001. Sulphur and nitrogen fluxes and budgets in the Bohemian Forest and Tatra Mountains during the Industrial Revolution (1850-2000). In *Hydrology and Earth System Sciences*, roč. 5, 2001, č. 3, s. 391-406.
- ŠIMEK, M. 2003 *Základy nauky o půdě: 3. Biologické procesy a cykly prvků*. 1. vyd. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 2003. 151 s. ISBN 80-704-0630-5.
- ŠIMON, T. – MIKANOVA, O. 2010. *Využití a podpora bakterií rodu Azobacter pro výživu rostlin*. Praha : Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. 23 s. ISBN 978-80-7427-040-6.
- ZÁHORA, J. 2001. Dostupnost dusíku v půdě vřesovišť Národního parku. In *Thayensia*, roč. 4, 2001, s. 169-181. ISSN 1212-3560.

DIVERZITA MIKROORGANIZMOV V PÔDE PO APLIKÁCI BOKALU A BIOLOGICKÉHO PRÍPRAVKU AZOTER

DIVERSITY OF MICROORGANISMS IN SOIL AFTER APPLICATION OF BIOSLUDGE AND AZOTER

Kováčsová Silvia, Javoreková Soňa, Maková Jana, Medo Juraj, Majerčíková Kamila

Katedra mikrobiológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Abstract

In laboratory assay, the diversity of bacteria and microscopic fungi in soil was observed after the addition of biosludge (40 t.ha⁻¹) from a biogas station and addition of bio-fertilizers - AZOTER (10 dm⁻³.ha⁻¹) with PCR-DGGE method. The diversity of microorganisms was the most influenced by the time. The occurrence of individual OTU differed after 105 days of incubation from the status after the 1st day of incubation. The differences in community of microscopic fungi were markedly higher among the soil with the additions and the soil without addition, after the 105th day of incubation in comparison to the 1st day. The small differences were recorded in the microbial diversity among variants according to the Shannon index.

Key words: Biosludge, Azotobacter, DGGE

Úvod

Spracovávanie odpadov rastlinného a živočíšneho charakteru za súčasnej výroby bioplynu v anaeróbných podmienkach je ekologicky a ekonomicky vhodnou alternatívou likvidácie odpadu a získava čoraz väčšiu popularitu. Vyhnitý kal z bioplynovej stanice ešte stále obsahuje značné množstvo živín a za predpokladu že spĺňa stanovené parametre, je možné ho použiť ako hnojivo (Arthurson, 2008). Existujú dôkazy, že aplikácia biokalu okrem zvyšovania množstva živín v pôde, zlepšuje rast rastlín, úrodu a kvalitu produkcie, pričom môže potláčať výskyt fytopatogénnych druhov (Jothi et al., 2003).

Produkčné parametre pôdy možno zlepšiť aj obohatením komunity pôdnych mikroorganizmov o niektoré druhy. Jednou z možností je aplikácia biologického prípravku – biohnojiva AZOTER. Tento prípravok obsahuje 3 druhy baktérií: *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasiliense* a *Bacillus megaterium*. *A. chroococcum* je dobre známa baktéria ktorá viaže vzdušný dusík, a tým obohacuje pôdu dusíkom, pravidelne zásobuje koreňový systém rastliny dusíkom počas celého vegetačného obdobia. Jej vplyv na produkčné vlastnosti pôdy skúmali už v Rusku v 40. rokoch 20. storočia (Allison, 1947). Podobné vlastnosti má aj *A. brasiliense*, ale lepšie znáša teploty nad 30 °C, a tým zásobuje koreňový systém rastliny dusíkom aj cez horúce letné mesiace (Shabaev et al., 1991).

Kontaktná adresa: Ing. Silvia Kováčsová, Katedra mikrobiológie, Fakulta Biotechnológie a potravinárstva, Tr. A. Hlinku 2, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 949 76 Nitra, e-mail: silvia.kovacsova@post.sk

B. megatherium umožňuje rastlinám prijímať imobilizovaný fosfor, ktorý v pôde existuje, avšak pre rastlinu v neprípustných formách (Sundara et al., 2002).

Komunita pôdnych mikroorganizmov je výrazne ovplyvňovaná pridávaním rôznych látok ako hnojivá alebo pesticídy. Metódy založené na analýze DNA ako je PCR DGGE sú vhodné na popísanie zmien v komunite pôdnych mikroorganizmov po takomto zásahu. Medzi výhody PCR-DGGE patrí vysoká detekčná schopnosť a možnosť ďalšej analýzy sekvencií (Ascher et al., 2009).

Cieľom práce bolo pomocou PCR-DGGE zistiť zmeny mikrobiálneho spoločenstva v pôde po prídavku vyhnitého kalu z bioplynovej stanice a biologického prípravku AZOTER počas 105 dní trvajúceho pokusu v laboratórnych podmienkach.

Materiál a metódy

Pôda

Pôda bola odobraná v lokalite Štefanov, v okrese Senica na Záhorí 2. 5. 2010 z hĺbky 0,00 – 0,20 m. Pôda bola odobraná pred výsevom plodín, v predchádzajúcom roku sa na pozemku pestovala kukurica. Typ sledovanej pôdy bol regozem a pôdny druh bol piesočnatá. Pôdu bola preosiata cez 2 mm sito a 8 týždňov preinkubovaná pri 4°C aby sa ustálili jej mikrobiologické vlastnosti.

Biokal

Prvým substrátom aplikovaným do pôdy bol vyhnitý substrát (biokal), ktorý bol vyrobený anaeróbnym rozkladom poľnohospodárskych odpadov (maštalný hnoj a hnojovica ošípaných). Biokal bol odobraný z bioplynovej stanice vo Vysokoškolskom poľnohospodárskom podniku SPU v Kolíňanoch. Biokal bola tmavá, nepáchnuca, heterogénna suspenzia pevných a koloidných látok.

AZOTER – bio-hnojivo

AZOTER je šedá, hustá kvapalina s charakteristickou melasovou vôňou, typickou pre tento prípravok. Celkový počet vitálnych mikroorganizmov jednotlivých druhov prípravku AZOTER bol: *A. chroococcum* 6.10^9 KTJ v 1 ml, *Azospirillum brasiliense* 5.10^9 KTJ v 1 ml, a *B. megatherium* $1,2.10^9$ KTJ v 1 ml. Prípravok AZOTER bol vyrobený v prevádzke Biozávod, Petrova Ves na Slovensku.

Experiment

Bol založený laboratórny pokus trvajúci 105 dní v nasledovných štyroch variantoch: I. variant – 50 g pôdy = kontrolný variant, II. variant - 50 g pôdy + biologický prípravok AZOTER v dávke $10 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$, III. variant – 50 g pôdy + vyhnitý kal v dávke $40 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, IV. variant – 50 g pôdy + vyhnitý kal v dávke $40 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ + AZOTER v dávke $10 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$.

Každý variant bol založený v 3 opakovaniach. Všetky vzorky sme inkubovali v aeróbnom termostate 105 dní pri teplote 28 °C a vlhkosť pôdy bola udržiavaná na 30 % PVK. V 1. a 105. dni inkubácie sme z každej vzorky izolovali DNA.

Izolácia DNA

Celková DNA bola izolovaná priamo z 0,25 g pôdnej vzorky použitím PowerSoil DNA Kit (MoBio Laboratories) podľa inštrukcií výrobcu a do ďalšieho použitia uchovaná pri teplote -20 °C. Koncentrácia a kvalitu vyizolovanej DNA bola zistená spektrofotometricky (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) aj elektroforeticky na 1 % agarózovom géli. Vzorky boli nariadené na rovnakú koncentráciu sterilnou deionizovanou vodou. Vyizolovanú DNA sme použili na analýzu pôdneho spoločenstva eubaktérií a húb prostredníctvom DGGE-PCR.

PCR

Všetky PCR reakcie prebiehali v termocykléri Biometra TPersonal. Na amplifikáciu špecifického úseku bakteriálnej DNA (16S rDNA) sme použili nasledovný pár primerov (Brons a Van Elsas, 2008):

F984GC: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3',

1401R (1385-1401): 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'.

Celkový objem reakčnej zmesi bol 50 µl, pričom zloženie bolo nasledovné: 5 µl templátovej DNA; 1 × PCR DreamTaq™ Green Buffer pufor; 0,2 mM dNTP; 3,5 mM MgCl₂; 2 % dimetyl sulfoxid; 10 µg.ml⁻¹ bovinny sérový albumín (BSA); 0,4 µM každého primeru (F984GC a 1401R) a 30 U/ml DreamTaq™ polymerázy (Fermentas).

PCR prebiehala v nasledovných krokoch: 95 °C 4 min; 10 (touchdown) cyklov so znižujúcou sa hybridizačnou teplotou o 0,5 °C na cyklus, s nasledovným profilom: 1 min. pri 94 °C; 1 min. pri 60 °C; 2 min. pri 72 °C. Následne 25 cyklov: 1 min. pri 94 °C; 1 min. pri 55 °C; 2 min. pri 72 °C; 72 °C 30 min.

PCR amplifikáciu špecifického úseku DNA mikroskopických húb (18S rDNA) sme uskutočnili pomocou nasledovného páru primerov (Vainio a Hantula, 2000):

FF390: 5'-CGATA-ACGAACGAGACCT-3'

FR1GC: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACCATTCAATCGGTAT-3'

Celkový objem reakčnej zmesi bol 50 µl, pričom zloženie bolo nasledovné: 5 µl templátovej DNA (približne 20 ng); 1 × PCR pufor s KCl; 0,2 mM dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 µM z každého primeru (FF390 a FR1GC) a 30 U/ml DreamTaq™ polymerázy (Fermentas). Amplifikácia prebiehala v termocykléri (Biometra TPersonal) v nasledovných krokoch:

95 °C 8 min; 30x(30 sek. pri 95 °C; 45 sek. pri 60 °C; 2 min. pri 72 °C); 10 min. pri 72 °C

Na kontrolu kvality a kvantity amplifikovaných PCR produktov sme použili elektroforézu na 1 % agarózovom géli za rovnakých podmienok ako pri kontrole extrakcie DNA.

Denaturovaná gradientová gélová elektroforéza

DGGE analýzu sme uskutočnili s použitím prístroja Ingeny PhorU2 (Ingeny International, Goes, Holandsko).

Pre bakteriálny (433 bp) PCR produkt sme použili 6 % polyakrylamidový gél (acrylamide: N,N'-methylenebisacrylamide, w/w, 37,5:1) so 45 – 65 % gradientom (Garbeva et al., 2004). Pre PCR produkt mikroskopických húb (390 bp) sme použili 45 – 60 % gradient a naniesli sme ho na 7,5 % polyakrylamidový gél (Vainio a Hantula, 2000). Samotná DGGE prebiehala

v 1 × TAE tlmivom roztoku (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) pri nasledujúcich podmienkach: pre bakteriálnu DNA: teplota 60 °C, napätie 110 V, čas 16 hodín; pre DNA húb: teplota 58 °C, napätie 90 V, čas 17 hodín

Gél bol farbený SYBR Green I farbivom (1:10 000, Fermentas) 1 hodinu. Vyhodnotenie gélov bolo realizované videodokumentačným systémom Gel Logic 212 PRO Imaging System (Carestream Health, Inc., USA).

Štatistické spracovanie

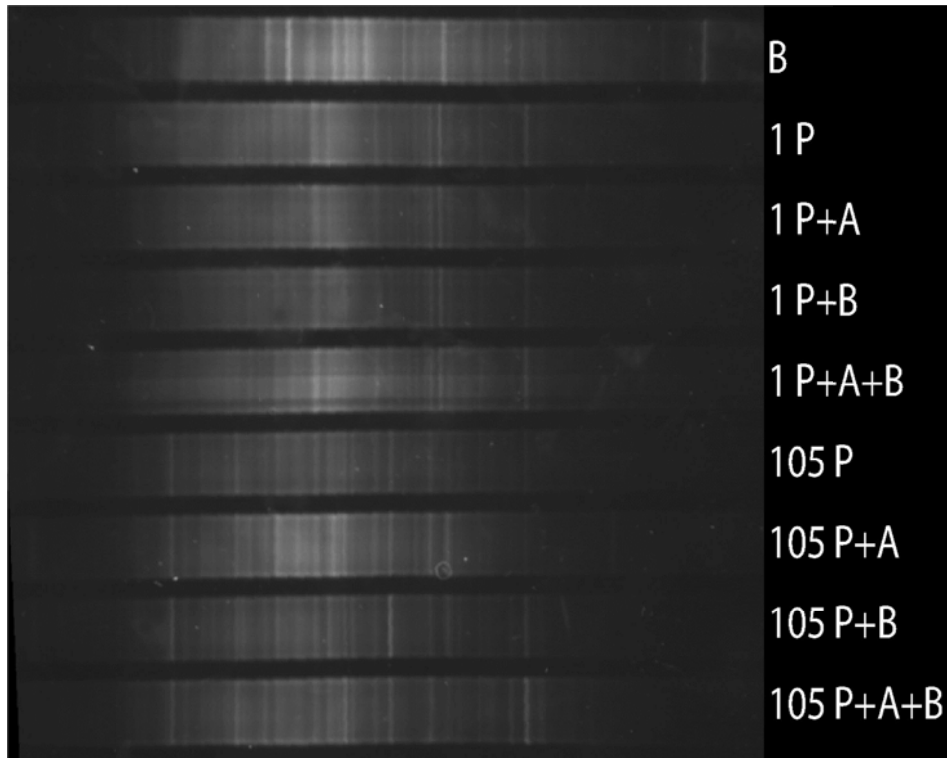
Kvantitu a intenzitu prúžkov získaných metódou DGGE sme vyhodnotili programom CARESTREEM. Analýza hlavných komponentov (PCA) bola počítaná v programe MVSP (Multi-variate statistical package) na základe prítomnosti ako aj relatívnej intenzity jednotlivých pásov (OTU). Shannonov index diverzity bol vyrátaný na základe relatívnej intenzity jednotlivých OTU.

Výsledky a diskusia

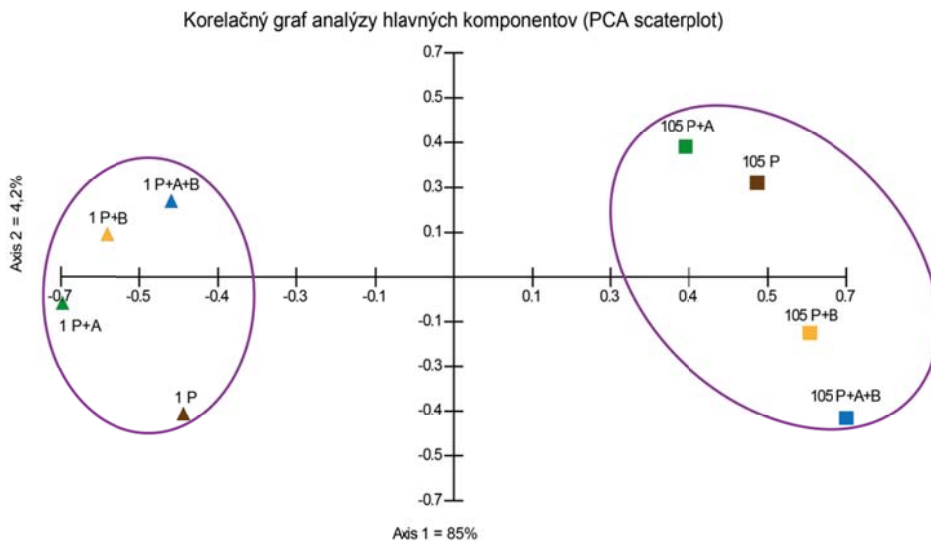
Na analýzu zmien v mikrobiálnom spoločenstve baktérií a húb po aplikácii biokalu a biologického prípravku AZOTER sme využili metódu PCR DGGE, ktorá patrí v súčasnosti medzi najpoužívanejšie v zisťovaní diverzity mikroorganizmov (Kraan et al., 2011). Pri analýze bakteriálnej DNA sme identifikovali 44 rôznych prúžkov (operatívnych taxonomických jednotiek- OTU). Najnižší počet bol zaznamenaný pri variante s prídavkom AZOTERu po 1 dni zatiaľ čo najvyšší počet sme zistili pri variantoch s pridaním AZOTERu a AZOTERu a biokalu po 105 dňoch (tab. 1, obr. 1)

Variant	Baktérie		Huby	
	Počet pásov *	Shannon index	Počet pásov	Shannon index
B	26 (28)	2,89	13 (14)	1,94
1 P	26 (26)	2,98	19 (20)	2,41
1 P+A	23 (28)	2,87	20 (22)	2,55
1 P+B	25 (26)	2,72	23 (25)	2,29
1 P+A+B	28 (29)	2,98	24 (25)	2,48
105 P	28 (31)	3,02	23 (25)	2,81
105 P+A	29 (33)	2,98	25 (25)	2,56
105 P+B	28 (30)	2,99	26 (27)	2,69
105 P+A+B	29 (31)	3,07	26 (28)	2,76

Tab.1. Počet pásov získaných z PCR DGGE profilov komunity baktérií a mikroskopických húb pre jednotlivé varianty prídavku biokalu a prípravku AZOTER. * Počet pásov ktoré sa vyskytovali aspoň v 2 opakovaníach, v zátvorke celkový počet pásov.

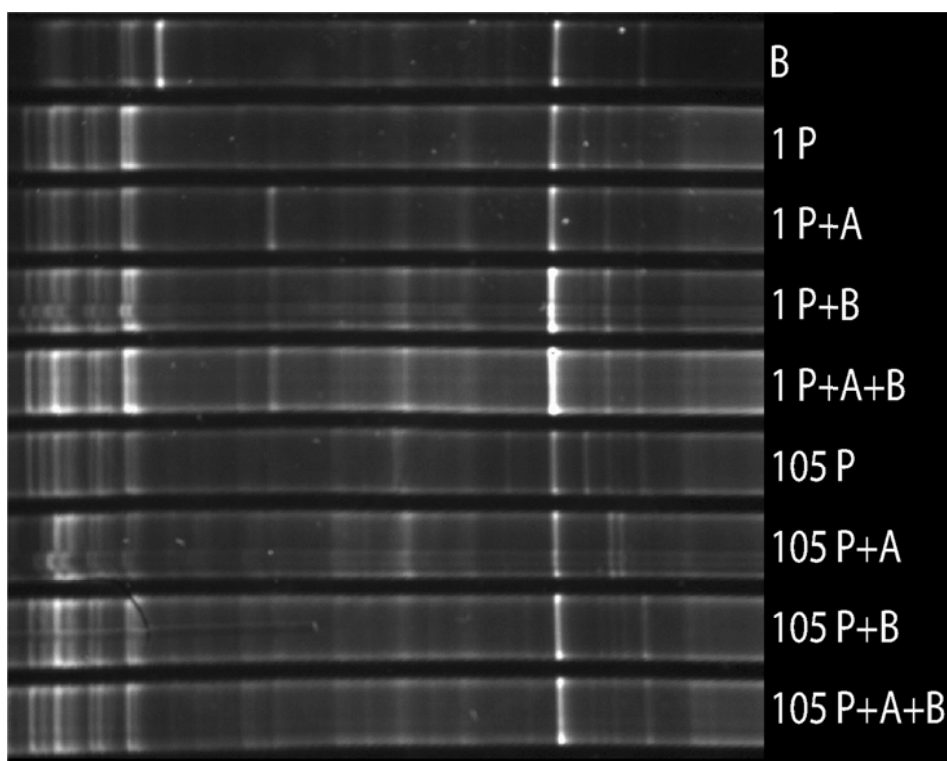


Obr.1. PCR DGGE profily komunity baktérií pre jednotlivé varianty prídavku biokalu a prípravku AZOTER

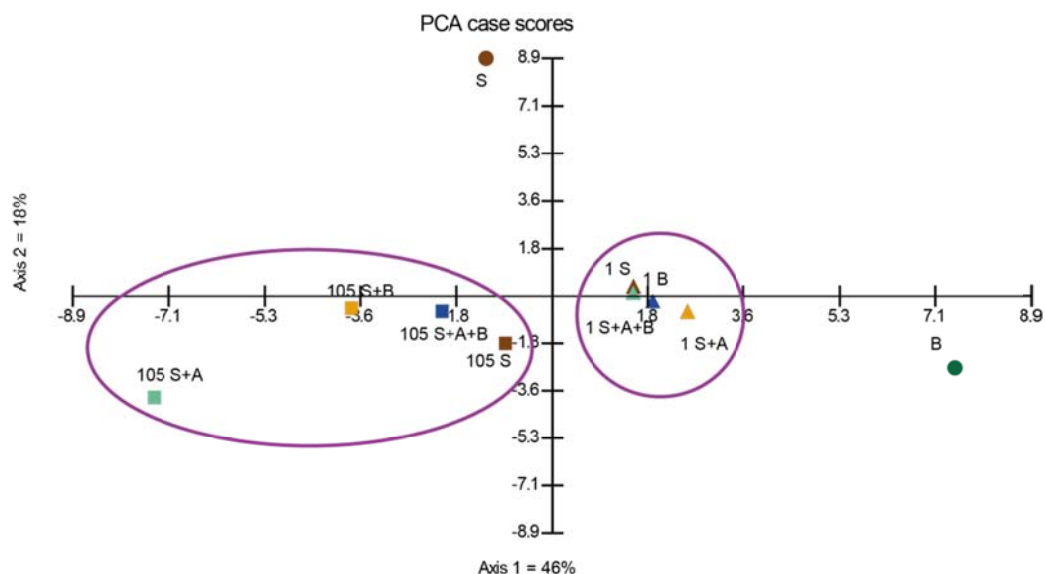


Obr.2. Podobnosť jednotlivých PCR DGGE profilov komunity baktérií pre jednotlivé varianty prídavku biokalu a prípravku AZOTER

Z výsledkov vyplýva, že najväčší efekt na diverzitu druhov OTU mal faktor času (obr. 2). Po 105 dňoch inkubácie bola komunita baktérií výrazne odlišná oproti prvému dňu. Rozdiely spôsobené jednotlivými prídavkami boli menšie ako rozdiely spôsobené 105 dňovou inkubáciou. Podobne ako na komunitu baktérii, aj na komunitu húb mal najväčší vplyv čas inkubácie (obr. 3,4). Po 105 dňoch kultivácie bola komunita mikroskopických húb výrazne odlišná od komunity na začiatku inkubácie.



Obr.3. PCR DGGE profily komunity mikroskopických húb pre jednotlivé varianty prídavku biokalu a prípravku AZOTER



Obr.4. Podobnosť jednotlivých PCR DGGE profilov komunity baktérií pre jednotlivé varianty prídavku biokalu a prípravku AZOTER

Najvyššia diverzita druhov húb bola zistená po 105 dňovej kultivácii pôdy s prídavkom biokalu ako aj s prídavkom biokalu a prípravku AZOTER a najnižšia pri variante pôdy bez prídavku na prvý deň. Po 105 dňoch kultivácie bola zaznamenaná výrazne vyššia diverzita húb, čo by mohlo byť zapríčinené ich relatívne pomalým rastom oproti baktériám. Mikroskopické huby teda na zmenené podmienky zapríčinené prídavkami reagovali s určitým oneskorením, avšak už po prvom dni bol pozorovaný nárast počtu OTU vo variantoch s

aplikovaným biokalom a biohnojivom. Prídavok biokalu poskytuje mikroorganizmom niekoľko potenciálnych benefitov. Okrem zvýšenia množstva a kvality organickej hmoty, poskytuje aj makro- a mikro-elementy a zlepšuje fyzikálne vlastnosti pôdy. Pozitívny vplyv aplikácie biokalu na množstvo druhov mikroskopických húb uvádza aj Anderson et al. (2008). Vplyvom dlhodobej aplikácie biokalu a kompostu na zloženie bakteriálnej komunity sa zaoberali Odlare et al. (2011), pričom nezistili významné zmeny v T-RFLP profiloch založených na 16S rDNA. Podobne nezistili významné zmeny v komunite baktérií po aplikácií maštalného hnoja, kompostu a priemyselných hnojív ani iní autori (Crecchio et al., 2004; Guanghua et al., 2008; Cherif et al., 2009). Naproti tomu existuje dosť veľká skupina dôkazov o výrazných zmenách komunity mikroorganizmov po hnojení organickým odpadom vrátane biokalu (Ge et al., 2008).

Pri PCR DGGE analýze sme použili aj vzorku biokalu, čím sme potvrdili odlišné druhy mikroorganizmov v komunite baktérií aj mikroskopických húb v biokale a v pôde. Napriek tomu že niektoré produkovali relatívne intenzívne prúžky na akrylamidovom géli, nepodarilo sa nám zachytiť ich vo vzorkách po prvom ani 105-tich dňoch po aplikácii biokalu. V predchádzajúcich pokusoch, avšak s iným typom pôdy a iným zložením biokalu boli tieto špecifické prúžky pozorované vo variantoch na prvý a čiastočne aj na 105 deň (Selešiová, 2011). PCR DGGE dokáže zachytiť mikroorganizmy s relatívnou abundanciou minimálne 2% (Muyzer et al., 1993), z čoho vyplýva že pôvodná komunita mikroorganizmov by musela byť početne oveľa väčšia než množstvo mikroorganizmov pridaných v prídavkoch. Toto sme však s použitím klasických kultivačných techník nepotvrdili.

Napriek tomu že sme predpokladali výskyt špecifických pásikov po aplikácii prípravku AZOTER predovšetkým pri analýze komunity baktérií, naše predpoklady sa nepotvrdili. Tento prípravok obsahuje 3 bakteriálne druhy zo skupiny eubaktérií ktorých DNA mala byť amplifikovaná pomocou použitých primerov. Celkový počet OTU bol však veľmi vysoký čo komplikovalo vyhodnocovanie gélov. Použitie špecifických primerov pre jednotlivé skupiny mikroorganizmov napr. (Nicolcheva a Bärlocher, 2004; Watanabe et al., 2004) by malo zvýšiť schopnosť detekcie týchto druhov a navyac umožní extrakciu DNA z pásikov a ich následnú identifikáciu pomocou sekvenovania.

Podakovanie

Práca bola vypracovaná a prezentovaná za finančnej podpory grantových agentúr MŠ SR VEGA 1/0404/09 a KEGA 003SPU-4/2011.

Použitá literatúra

- ALLISON, F. E. Azotobacter Inoculation of Crops: I. Historical. *Soil Science*, 1947, 64(5), 413-430.
- ANDERSON, I. C., PARKIN, P. I., CAMPBELL, C. D. DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(9), 2358-2365.
- ARTHURSON, V. Proper Sanitization of Sewage Sludge: a Critical Issue for a Sustainable Society. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17), 5267-5275.

- ASCHER, J., CECCHERINI, M. T., LANDI, L., MENCH, M., PIETRAMELLARA, G., NANNIPIERI, P., RENELLA, G. Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after in situ stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 2009, 41(3), 351-359.
- BRONS, J. K., VAN ELSAS, J. D. Analysis of Bacterial Communities in Soil by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries as Influenced by Different Reverse Primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, .02195-02107.
- CRECCHIO, C., CURCI, M., PIZZIGALLO, M. D. R., RICCIUTI, P., RUGGIERO, P. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(10), 1595-1605.
- GARBEVA, P., VAN VEEN, J. A., VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. [Review]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42, 243-270.
- GE, Y., ZHANG, J.-B., ZHANG, L.-M., YANG, M., HE, J.-Z. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(1), 43-50.
- GUANGHUA, W., JUNJIE, L., XIAONING, Q., JIAN, J., YANG, W., XIAOBING, L. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(1), 220-226.
- CHERIF, H., AYARI, F., OUZARI, H., MARZORATI, M., BRUSETTI, L., JEDIDI, N., HASSEN, A., DAFFONCHIO, D. Effects of municipal solid waste compost, farmyard manure and chemical fertilizers on wheat growth, soil composition and soil bacterial characteristics under Tunisian arid climate. *European Journal of Soil Biology*, 2009, 45(2), 138-145.
- JOTHI, G., PUGALENDHI, S., POORNIMA, K., RAJENDRAN, G. Management of root-knot nematode in tomato *Lycopersicon esculentum*, Mill., with biogas slurry. *Bioresource Technology*, 2003, 89(2), 169-170.
- KRAAN, G. M., BUIJZEN, F., KUIJVENHOVEN, C. A. T., MUYZER, G. Which Microbial Communities are Present? Application of PCR-DGGE: Case Study on an Oilfield Core Sample. In C. Whitby T. L. Skovhus (Eds.), *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems* 2011, (pp. 33-43): Springer Netherlands.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(3), 695-700.
- NIKOLCHEVA, L., BÄRLOCHER, F. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycological Progress*, 2004, 3(1), 41-49.
- ODLARE, M., ARTHURSON, V., PELL, M., SVENSSON, K., NEHRENHEIM, E., ABUBAKER, J. Land application of organic waste – Effects on the soil ecosystem. *Applied Energy*, 2011, 88(6), 2210-2218.
- SHABAEV, V. P., SMOLIN, V. Y., STREKOZOVA, V. I. The effect of *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen balance in soil under cropping with oats (*Avena sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 1991, 10(4), 290-292.

SELÉŠIOVÁ, Z. Charakteristika mikrobiálnych spoločenstiev v prostredí s využitím metód molekulárnej biológie – dizertačná práca, Nitra, Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2011, 175.

SUNDARA, B., NATARAJAN, V., HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 2002, 77(1), 43-49.

VAINIO, E. J., HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 2000, 104(8), 927-936.

WATANABE, T., ASAKAWA, S., NAKAMURA, A., NAGAOKA, K., KIMURA, M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(2), 153-163.

CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMOV V PÔDE PO APLIKÁCI BIOKALU A PRÍPRAVKU AZOTER METÓDOU BIOLOG®

CHARACTERISTICS OF MICROORGANISMS IN SOIL AFTER APPLICATION OF SEWAGE SLUDGE AND AZOTER USING BIOLOG®

Majerčíková Kamila, Kováčsová Silvia, Javoreková Soňa, Maková Jana, Medo Juraj

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of sewage sludge and biological preparation AZOTER on physiological characteristics of microorganisms. The laboratory experiment lasted 105 days. The community-level physiological profiling (CLPP) was evaluated using BIOLOG® Eco plates on the first and 105 day of the experiment. The highest community metabolic diversity (CMD) in BIOLOG® Eco plates was observed in a sample of the variant with AZOTER application taken in the first day of the experiment. The highest average metabolic response (AMR) was also detected in this sample. On the first day of experiment, values of CMD and AMR in the variant with sewage sludge application were lower than in the control variant. On the 105th day of experiment, we found a significant decrease in metabolic diversity and metabolic activity of microorganisms in comparison with samples of the variants from the first day of experiment in all tested variants.

According to the results of analysis of variance (LSD test, $P < 0.05$) the day of sampling and individual measuring during the incubation on BIOLOG® Eco plates had a statistically significant influence on the AMR and CMD values. The different variants influenced AMR values statistically significantly. On the other hand, different variants had not statistically significantly influence on the values of CMD.

Key words: sewage sludge, BIOLOG® Eco plates, AZOTER, CLPP

Úvod

V prípade hodnotenia kvality a zdravia pôdy sa okrem fyzikálnych a chemických vlastností pôdy stále častejšie hodnotia aj biologické vlastnosti a zvyšuje sa záujem o pôdne mikroorganizmy (Buscot, Varma, 2005; Liu et al, 2006).

Hospodárske hnojivá sú dôležité pre návrat živín do pôdy, ale môžu mať aj celý rad vedľajších účinkov na pôdu. V posledných rokoch však stavy hospodárskych zvierat v SR neustále klesajú, čo sa prejavuje aj v nedostatku maštalného hnoja. Čoraz častejšie sa do popredia dostáva otázka hľadania nových zdrojov organických hnojív (Ondrejčíková et al., 2009). Jednou z možností je využitie vyhnitého kalu získaného ako vedľajší produkt pri výrobe bioplynu. Doterajšie výsledky ukazujú, že biokal je dobre vyváženým organickým hnojivom poľnohospodárskych plodín a v podstate je adekvátnym hnojivom v porovnaní s maštalným hnojom (Pospíšil – Mano, 2007; Gaduš, 2007).

Kontaktná adresa: Ing. Kamila Majerčíková, Katedra mikrobiológie, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: kamila.majercikova@gmail.com

Jeho vplyv na fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy, a s nimi aj populácie, zloženie a funkcie pôdných mikroorganizmov skúmali Marschner et al. (2003), Chu et al. (2007) a Gu et al. (2009). Ako organické hnojivá sa v súčasnosti využívajú aj rôzne špeciálne mikrobiálne prípravky. Zvyčajne sú to viaczložkové prípravky a v prevažnej miere sú zložené z baktérií schopných fixovať atmosférický dusík (Ondrášek et al., 2005; Ondrášek, Martincová, 2007). Ako súčasť mnohých z nich sa používa *Azotobacter chroococcum* (Gutiérrez-Rojas et al., 2011).

Na sledovanie aktivity mikroorganizmov po aplikácii hnojív je dôležité mať vedomosti o funkcii spoločenstva mikroorganizmov a tiež ich funkčnej diverzite (Preston-Mafham et al., 2002). Meranie fyziologickej aktivity mikroorganizmov cez využívanie rôznych zdrojov uhlíka komerčne dostupnými BIOLOG[®] mikrotitračnými platňami predstavuje nový prístup, ktorý umožňuje štúdium vlastností mikrobiálnych spoločenstiev (Garland, Mills, 1991; Stefanowicz, 2006).

Cieľom práce v laboratórnych podmienkach bolo sledovanie vplyvu vyhnitého kalu a biologického prípravku AZOTER na funkčnú diverzitu pôdných mikroorganizmov metódou BIOLOG[®] Eco platní (BIOLOG ECO MicroPlate[™]).

Materiál a metódy

V roku 2010 sme založili laboratórny pokus na sledovanie vplyvu vyhnitého kalu po kontinuálnej výrobe bioplynu a biologického prípravku AZOTER na sledovanie funkčnej diverzity prítomných mikroorganizmov. Pôdu sme odobrali na jar z hĺbky 0,00 – 0,20 m v lokalite Štefanov (48° 23' j.z.š.; 17° 23' s.z.š.), v okrese Senica na Záhorí, SR. Pôdnym typom stanovišťa bola regozem, pôdny druh pôdy bol piesočnatý a aktuálne pH pôdy bolo kyslé (5,27). Po prevezení do laboratória sme pôdne vzorky preosiali cez 2 mm sito a následne založili laboratórny pokus. Pokus pozostával zo štyroch variantov: I. variant – kontrola – pôda; II. variant – pôda + biologický prípravok AZOTER v dávke 10 dm³.ha⁻¹; III. variant – pôda + vyhnitý kal v dávke 40 t.ha⁻¹; IV. variant – pôda + vyhnitý kal v dávke 40 t.ha⁻¹ + biologický prípravok AZOTER v dávke 10 dm³.ha⁻¹. V priebehu celej inkubácie sme pôdu ovlhčovali na 30 % PVK. Inkubácia prebiehala 105 dní pri teplote 28 °C za aeróbných podmienok.

Testovaný vyhnitý kal ako vedľajší produkt po kontinuálnej výrobe bioplynu bol nepáchnuci, z hygienického hľadiska neškodný, tmavý, amorfný, neplastický a predstavoval heterogénnu zmes suspenzných a koloidných látok. Vďaka svojmu chemickému zloženiu bol vhodný k priamemu hnojeniu i kompostovaniu (Pospíšil, Bitter, 2001; Pospíšil, Mano, 2007). Biokal bol pripravený ako vedľajší produkt po fermentácii sekundárnych produktov rastlinnej a živočíšnej výroby v bioplynovej stanici vysokoškolského poľnohospodárskeho podniku SPU v Kolíňanoch.

Biologický prípravok AZOTER bol šedá, hustá kvapalina s typickou melasovou vôňou. AZOTER bol vyrobený v prevádzke Biozávod, Petrova Ves na Slovensku. Ako uvádza výrobca, vyrába sa cieľným rozmnožovaním mikroorganizmov *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasiliense* a *Bacillus megatherium* z malého objemu až do 5 m³ za sterilných podmienok. Produkčné médium obsahuje melasu ako uhlíkatý zdroj, minerálne soli KH₂PO₄,

MgSO₄, CaCO₃, NaCl, CaCl₂ a ďalšie stopové prvky. Prípravok obsahuje vysoký počet baktérií *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasiliense*, ktoré sú schopné viazať dusík. Dusík využíva *Bacillus megatherium*, ktorý uvoľňuje v pôde viazaný fosfor potrebný pre rozmnožovanie baktérií z energetického hľadiska.

Diverzita na fyziologickej úrovni spoločenstva (CLPP)

Na hodnotenie diverzity mikroorganizmov na fyziologickej úrovni spoločenstva sme použili BIOLOG® Eco platne (BIOLOG ECO MicroPlate™, BIOLOG Hayward, CA 94545 USA).

Platne sme naočkovali pôdnym roztokom (riedenie 10⁻²) zo štyroch variantov založených v pokuse a inkubovali za aeróbnych podmienok v tme pri teplote 30 ± 1 °C. Každých 24 hodín, počas 8 dní (192 h), sme merali optickú hustotu (O.D.) pri vlnovej dĺžke 590 nm na čítačke mikroplatní (Microplate Reader; ELx808™; BioTek) a zaznamenávali farebné zmeny v jednotlivých jamkách.

Pre popis mikrobiálneho spoločenstva sme z nameraných hodnôt vypočítali dva parametre: priemernú metabolickú aktivitu mikroorganizmov (Average Metabolic Response, AMR) a priemernú metabolickú diverzitu mikrobiálnych spoločenstiev (Community Metabolic Diversity, CMD) (Laboratory for Microbial Ecology, 2004).

AMR sme vypočítali ako priemer rozdielov medzi O.D. jamiek (O.D. well) so zdrojom C a kontrolnej jamky s vodou (O.D. neg):

$$AMR = \frac{\Sigma(O.D. well - O.D. neg)}{31}$$

CMD sme vypočítali ako počet pozitívnych reakcií (fialovo sfarbených jamiek) pozorovaných po inkubácii každých 24 hodín.

Výsledky sme vyhodnotili matematicko – štatistickou analýzou variancie (ANOVA) a LSD-testom (P≤0,05). Skúmali sme tri parametre: variant (I. až IV.), deň (1. a 105.) a dĺžka inkubácie na BIOLOG® Eco platniach (každých 24 hodín počas 8 dní).

Štatistickú analýzu údajov sme vykonali metódou analýzy hlavných komponentov (PCA). Hodnoty priemernej metabolickej aktivity mikroorganizmov sme analyzovali na základe štatistického balíka MVSP 3.13r (Multi-Variate Statistical Package 3.13r, Kovach Computing Services).

Výsledky a diskusia

Pre environmentálnu štúdiu celých mikrobiálnych spoločenstiev sme použili BIOLOG® Eco platne. Podľa Classen et al. (2003) najväčšou výhodou Eco platní je, že obsahujú 31 substrátov (a kontrolnú jamku bez substrátu) hneď v 3 opakovaníach, čo zvyšuje pravdepodobnosť, že vytvorený fyziologický profil predstavuje študované mikrobiálne spoločenstvo.

Počas 192 hodín sme na fyziologickej úrovni spoločenstva (CLPP) zistili rozdielnú schopnosť mikroorganizmov metabolizovať dostupné substráty. Boli to karboxylové kyseliny (9 druhov), cukry (7 druhov), aminokyseliny (6 druhov), polyméry (4 druhy), amíny/amidy (2 druhy) a zmiešané druhy (3 druhy) (Tab. 1).

Zdroje uhlíka	1. deň/105. deň			
	I.	II.	III.	IV.
β -metyl-D-glukozid	-/-	+/-	-/-	-/-
Kys. D-galaktón γ -laktón	+/-	+/-	+/-	+/-
L-arginín	+/-	+/-	+/-	+/+
Metylester kys. pyruovej	+/+	+/+	+/+	+/+
D-xylóza	+/+	+/+	+/+	+/+
Kys. D-galakturónová	+/+	+/-	+/-	+/+
L-asparagín	+/+	+/-	+/-	+/+
Tween 40	+/+	+/-	+/-	+/-
L-erytritol	-/-	+/-	+/-	+/-
Kys. 2-hydroxybenzoová	+/-	-/-	+/-	-/-
L-fenylalanín	+/-	+/-	+/-	+/-
Tween 80	+/+	+/+	+/+	+/+
D-mannitol	+/-	+/-	+/-	+/+
Kys. 4-hydroxybenzoová	+/-	+/-	+/+	+/-
L-serín	+/-	+/-	+/-	+/-
α -cyklodextrín	-/-	+/-	+/-	-/-
N-acetyl-D-glukozamín	+/+	+/-	+/+	+/-
Kys. γ -hydroxybutyrová	+/-	+/-	+/-	+/-
L-treonín	+/-	+/-	+/-	+/-
Glykogén	-/-	+/-	-/-	-/-
Kys. D-glukozamínová	+/-	+/-	+/-	+/-
Kys. Itakónová	+/-	+/-	+/-	+/-
Kys. Glycyl-L-glutamínová	+/-	+/-	+/+	+/-
D-celobióza	+/+	+/-	+/-	+/-
Glukóza-1-fosfát	+/-	-/-	-/-	-/-
Kys. α -ketobutyrová	-/-	+/-	+/-	-/-
Fenyletylamín	+/-	+/-	+/-	+/-
α -D-laktóza	-/+	+/-	-/-	+/-
D,L- α -glycerolfosfát	-/-	+/-	+/-	+/-
Kys. D-malová	+/-	+/-	+/-	+/-
Putrescín	+/-	+/-	+/-	+/-
Množstvo využitých zdrojov uhlíka	24/9	29/3	27/6	25/7

Tab. 1. Fyziologická charakteristika spoločenstva mikroorganizmov vo vzorkách jednotlivých variantov odobratých 1. a 105. deň pokusu sledovaná na BIOLOG® Eco platniach po inkubácii za aeróbných podmienok v tme pri 30 ± 1 °C počas 192 hodín.

V porovnaní s pôdou (I. variant) sme zistili, že prídavok samotného AZOTERA v 1. deň pokusu podporil rozklad substrátov skoro na 94 %. Z dostupných substrátov boli navyše využité β -metyl-D-glukozid, L-erytritol, α -cyklodextrín, kys. α -ketobutyrová, α -D-laktóza a D,L- α -glycerolfosfát (Tab. 1). V prípade aplikácie samotného biokalu (III. variant) sme pozorovali zvýšenie metabolickej diverzity na 87 %. V porovnaní s variantom samotnej pôdy, sme navyše zistili využitie L-erytritol, α -cyklodextrín, kys. α -ketobutyrovú a D,L- α -glycerolfosfát. Vo variante s kombináciou pôda, biokal, AZOTER sme zaznamenali zvýšenie využitia

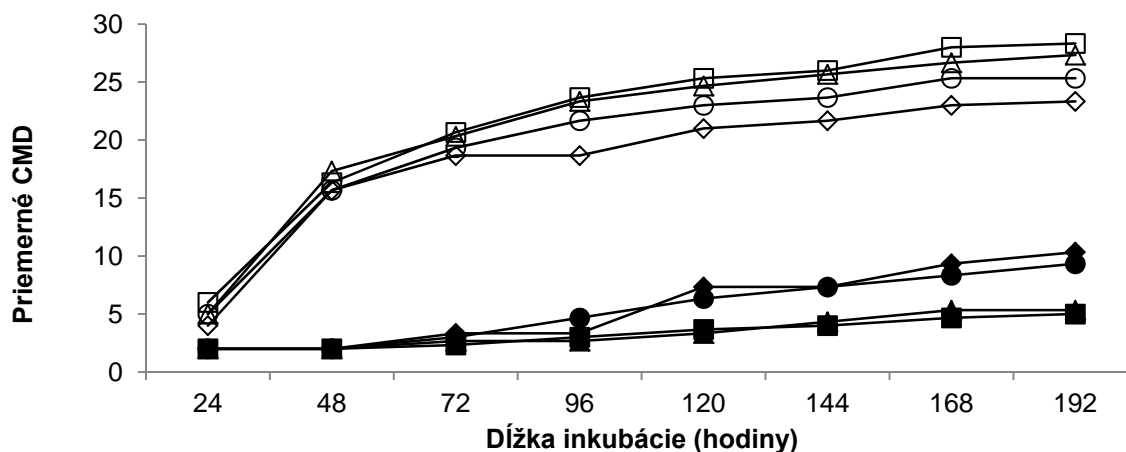
substrátov na 80,6 %, nakoľko počas inkubácie na BIOLOG® ECO platniach bola navyše využitá α -D-laktóza a L-erytritol.

Guanghai et al. (2008) v štúdiu zameranej na pozorovanie vplyvu hnojenia na štruktúru a funkciu spoločenstva mikroorganizmov tiež uvádzajú že, v prípade aplikácie organických hnojív sa schopnosť mikroorganizmov využívať dostupné zdroje uhlíka počas inkubácie na BIOLOG® Eco platniach v porovnaní so samotnou pôdou zreteľne zvýšila.

Výrazný pokles v počte využitých substrátov sme zaznamenali vo vzorkách variantov zo 105. dňa pokusu. Vo vzorke variantu so samotnou pôdou (I. variant) sme pozorovali najvyšší rozklad substrátov (29 %) a vo variante samotného AZOTERa najnižší (9,7 %).

Priemyselné a organické hnojivá sú využívané predovšetkým na zvýšenie dostupnosti živín pre rastliny, ale tiež môžu ovplyvniť pôdne mikroorganizmy (Marschner et al., 2003). Zatiaľ čo pri krátkodobých experimentoch a bez pravidelnej aplikácie hnojív neboli zaznamenané výrazné zmeny bakteriálneho spoločenstva (Crecchio et al., 2001; Marschner et al., 2001), pri dlhodobej aplikácii organických hnojív bola diverzita bakteriálneho spoločenstva v pôde vždy vyššia bez ohľadu na využívanie pôdy alebo ročného obdobia (Enwall et al., 2005; Wu et al., 2008). Dlhodobé hnojenie poľnohospodárskej pôdy organickým hnojivom preukázalo veľkú rozmanitosť v zložení mikrobiálneho spoločenstva (Franzluebbers et al., 2004).

Porovnaním sledovaných hodnôt CMD sme zistili rozdiely medzi 1. a 105. dňom pokusu (Obr. 1). Najvyššiu priemernú metabolickú diverzitu sme stanovili vo variante s prídavkom samotného biologického prípravku AZOTER v 1. deň pokusu (Tab. 1). Zvýšenie celkového počtu mikroorganizmov v prípade aplikácie bakteriálneho prípravku AZOTER tiež potvrdil Tóth (2009) v štúdiu zameranej na sledovanie vplyvu bakteriálnych prípravkov.



Obr. 1 Priemerná metabolická diverzita spoločenstva mikroorganizmov (CMD) pre jednotlivé varianty v 1. a 105. deň pokusu sledovaná na BIOLOG® Eco platniach po inkubácii za aeróbných podmienok v tme pri 30 ± 1 °C po dobu 192 h. 1. deň pokusu: I. variant - pôda (◇); II. variant - pôda + AZOTER (□); III. variant - pôda + biokal (Δ); IV. variant - pôda + biokal + AZOTER (○). 105. deň pokusu: I. variant (◆) II. variant (■), III. variant (▲), IV. variant (●)

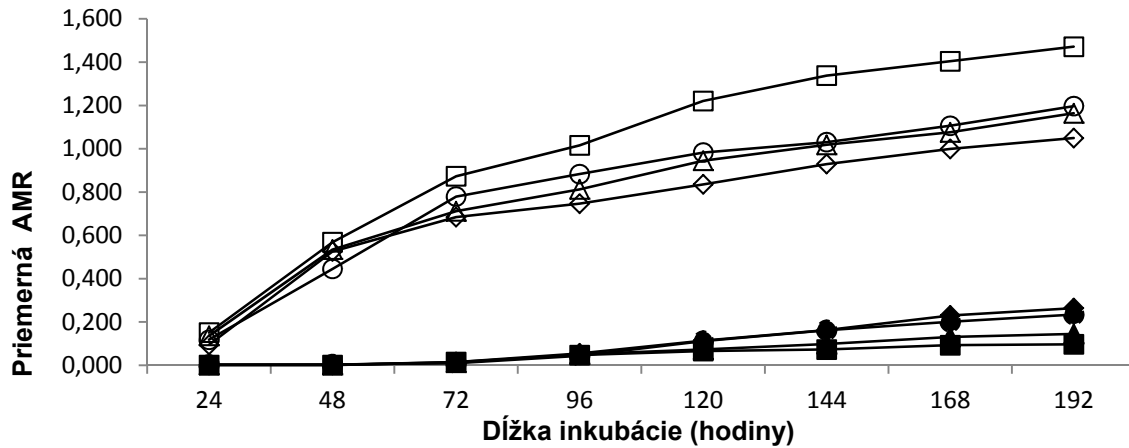
Najvyššiu zaznamenanú priemernú metabolickú diverzitu mikroorganizmov vo vzorkách odobratých na 105. deň pokusu (10,3) sme zistili vo variante samotnej pôdy. V porovnaní so vzorkami z 1. dňa pokusu bola 2,7 krát nižšia (Obr. 1).

Najnižšiu CMD sme vo vzorkách variantov odobratých na 105. deň od založenia pokusu zaznamenali vo variante ošetrovanom prípravkom AZOTER pravdepodobne kvôli tomu, že zemina, ktorú sme použili v pokuse bola piesočnatá, s nízkym obsahom organickej hmoty, slabo produkčná a menej úrodná. Podľa Števlíková, Kopčanová (1994) je schopnosť rodu *Azotobacter* aktívne sa rozmnožovať v pôde a uplatňovať svoje mnohostranné vlastnosti obmedzená nedostatkom ľahko prístupných organických látok a vysokými nárokmi na prostredie. *Azotobacter chroococcum* je veľmi náročný na podmienky prostredia, je prísne aeróbny, preto sa vyskytuje v pôdach dobre prevzdušených s pH vyšším ako 5, preto sa jeho stimulačný účinok prejavuje len na úrodných pôdach. (Števlíková, Kopčanová, 1994; Fecenko, Pollák, 2001).

		CDM	AMR
Deň	1.	20,3438 ^a	0,8390 ^a
	105.	4,5313 ^b	0,0788 ^b
Varianty	I.	12,185 ^a	0,42 ^a
	II.	12,375 ^a	0,43 ^{ab}
	III.	12,563 ^a	0,46 ^b
	IV.	12,625 ^a	0,53 ^c
Meranie	24 h	3,5 ^a	0,063433 ^a
	48 h	9,125 ^b	0,260333 ^b
	72 h	11,292 ^c	0,387542 ^c
	96 h	13,125 ^d	0,456904 ^d
	120 h	14,333 ^e	0,543613 ^e
	144 h	15,0 ^e	0,601554 ^f
	168 h	16,333 ^f	0,655075 ^g
192 h	16,792 ^f	0,702708 ^h	

Tab. 2. Štatisticky preukazné rozdiely pre hodnoty CMD a AMR medzi jednotlivými dňami pokusu, jednotlivými variantmi a jednotlivými meraniami počas inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach. Priemery v stĺpcoch označené rovnakým písmenom nie sú štatisticky preukazne odlišné (ANOVA, LSD test, P≤0,05)

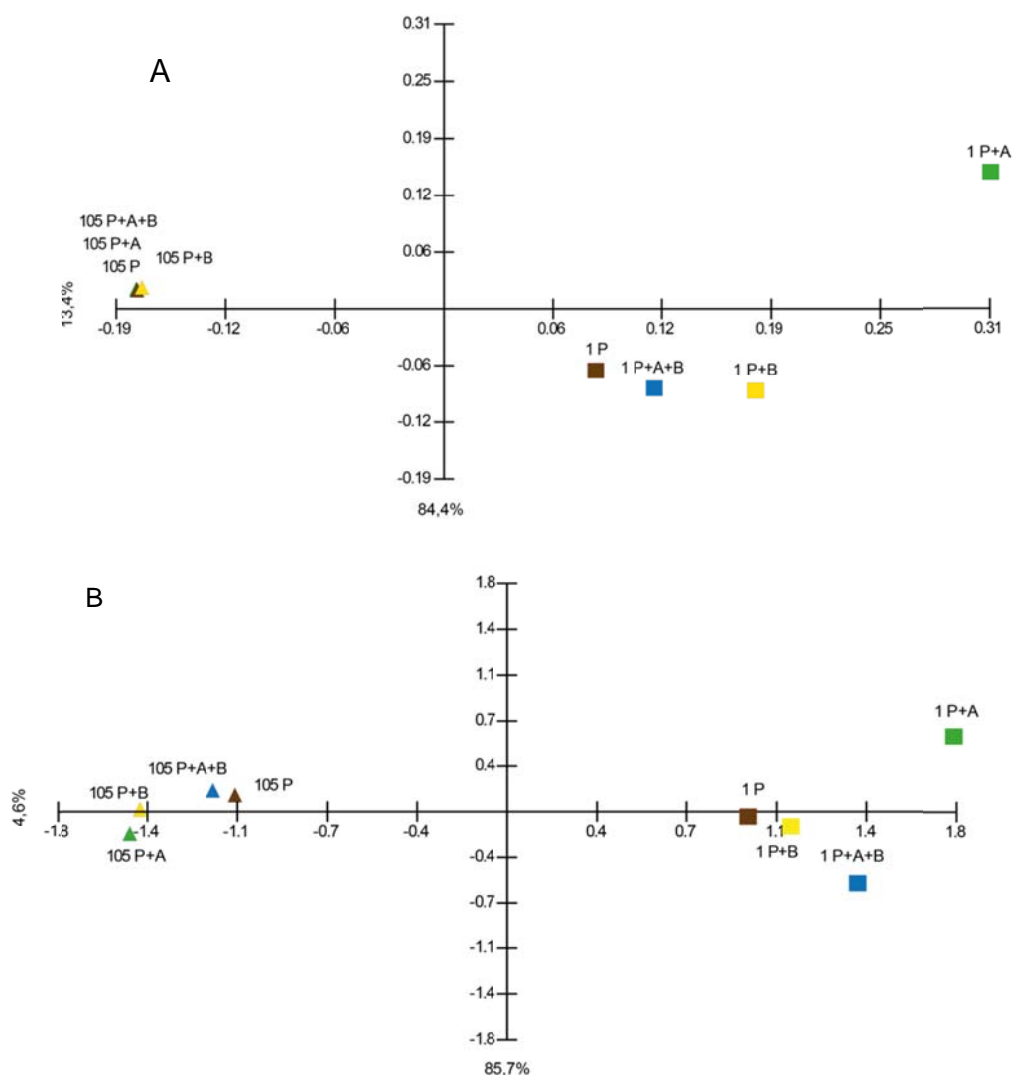
Analýzou variancie (LSD test, P < 0,05) zo získaných hodnôt CMD sme štatisticky preukazné rozdiely zistili medzi jednotlivými meraniami (24 až 120 hodín) na BIOLOG[®] Eco platniach (Tab. 2). Medzi meraniami po 120 a 144 hodinách inkubácie a po 168 a 192 hodinách inkubácie sme štatisticky preukazné rozdiely nepozorovali. Podobne sme štatisticky preukazné rozdiely nezistili ani medzi jednotlivými variantmi, ale medzi 1. a 105. dňom pokusu sme štatisticky preukazné rozdiely pozorovali. Z výsledkov analýzy variancie vyplýva, že hodnotu CMD štatisticky preukazne ovplyvňovali deň odobratia vzorky a dĺžka inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach, ale hodnotu CMD štatisticky nepreukazne ovplyvňovali jednotlivé varianty.



Obr. 2 Priemerná metabolická aktivita spoločenstva mikroorganizmov (AMR) pre jednotlivé varianty v 1. a 105. deň pokusu sledovaná na BIOLOG[®] Eco platniach po inkubácii za aeróbných podmienok v tme pri 30 ± 1 °C počas 192 h. 1. deň pokusu: I. variant - pôda (◇); II. variant - pôda + AZOTER (□); III. variant - pôda + biokal (Δ); IV. variant - pôda + biokal + AZOTER (○). 105. deň pokusu: I. variant (◆) II. variant (■), III. variant (▲), IV. variant (●)

Priemerná metabolická aktivita mikroorganizmov bola vypočítaná z meraných hodnôt optickej hustoty počas 192 hodinovej inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach. Vzorky variantov z 1. dňa pokusu sa preukázali zvýšeným využívaním substrátov v porovnaní so vzorkami odobratými na 105. deň pokusu (Obr. 2). Najvyššiu AMR sme, rovnako ako pri CMD, zaznamenali vo variante s biologickým prípravkom AZOTER (1,472) v porovnaní s ostatnými variantmi odobratými v 1. deň pokusu. Priemerná metabolická aktivita mikroorganizmov vo vzorkách všetkých variantov zo 105. dňa pokusu sa pohybovala v rozmedzí od 0,264 po 0,097, pričom najvyššiu hodnotu sme zaznamenali vo variante samotnej pôdy.

Analýzou variancie (LSD test, $P \leq 0,05$) pre hodnotu AMR (Tab. 2) sme štatisticky preukazné rozdiely zistili medzi jednotlivými meraniami počas 192 hodinovej inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach a medzi 1. a 105. dňom pokusu. V prípade jednotlivých variantov sme štatisticky preukazné rozdiely pozorovali medzi variantom ošetreným prípravkom AZOTER a ostatnými tromi variantmi a medzi variantom samotnej pôdy a variantom s kombináciou pôda, biokal a AZOTER. Štatisticky nepreukazné rozdiely sme analýzou variancie zistili medzi variantom samotnej pôdy a variantom ošetreným biokalom a tiež medzi variantom samotného biokalu a variantom pôda, biokal, AZOTER. Hodnotu AMR štatisticky preukazne ovplyvňovali jednotlivé varianty, deň odobratia vzorky variantov a tiež merania počas inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach.



Obr. 3. PCA analýza spoločenstva mikroorganizmov jednotlivých vzoriek variantov z 1. a 105. dňa pokusu na základe metabolickej aktivity pozorovanej na BIOLOG[®] Eco platniach po inkubácii za aeróbných podmienok v tme pri 30 ± 1 °C. **A.** AMR po 24 h inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach: I. variant (■) II. variant (■), III. variant (■), IV. variant (■), **B.** AMR po 192 h inkubácie na BIOLOG[®] Eco platniach: I. variant (▲) II. variant (▲), III. variant (▲), IV. variant (▲)

Na analýzu metabolických vzťahov medzi spoločenstvami mikroorganizmov jednotlivých variantov sme použili aj metódu analýzy hlavných komponentov (PCA) (Obr. 3). Na základe hodnotenia PCA grafov vyplýva, že doba kultivácie jednotlivých variantov mala výraznejší vplyv na diverzitu mikrobiálneho spoločenstva ako samotné varianty, pretože vzdialenosť medzi vzorkami variantov odoberatých na 1. a 105. deň pokusu je výrazne väčšia ako vzdialenosti jednotlivých vzoriek variantov z rovnakého dňa kultivácie.

Najväčšie rozdiely sme pozorovali vo vzorkách variantov odoberatých v 1. deň od založenia pokusu, v porovnaní so vzorkami variantov 105. dňa pokusu. Po 24 hodinách inkubácie (Obr. 3/A) na BIOLOG[®] Eco platniach bol najväčší zásadný rozdiel medzi vzorkami odoberatými v 1. deň pokusu a to vo variante ošetrenom biologickým prípravkom AZOTER (II. variant). Medzi vzorkami variantov odoberatých na 105. deň pokusu sme výrazné rozdiely po 24 hodinovej inkubácii na BIOLOG[®] Eco platniach nepozorovali, ale po 192 hodinovej (Obr. 3/B) inkubácii

sa menšie rozdiely prejavili. Menšie rozdiely sme tiež pozorovali vo vzorkách I. a III. variantu odobratých v 1. deň od založenia pokusu po 24 hodinovej inkubácii BIOLOG[®] Eco platniach a aj po 192 hodinovej inkubácii (Obr. 3/A,B). V prípade variantov ošetrených prípravkom AZOTER (II. a IV. variant), boli rozdiely po 192 hodinovej inkubácii na BIOLOG[®] Eco platniach väčšie.

Záver

V laboratórnom pokuse realizovanom počas 105 dní sme najväčšiu schopnosť mikroorganizmov metabolizovať rôzne substráty zaznamenali vo vzorkách variantov odobratých v 1. deň pokusu. Na základe výsledkov BIOLOG[®] Eco platní môžeme konštatovať, že najväčšia priemerná metabolická aktivita a priemerná metabolická diverzita mikrobiálnych spoločenstiev bola vo variante, kde sme k pôde pridali AZOTER. Diverzita mikrobiálneho spoločenstva v pôde sa zväčšila, čo sa prejavilo zvýšením schopnosti mikroorganizmov metabolizovať dostupné zdroje uhlíka.

Podakovanie

Práca bola vypracovaná a prezentovaná za finančnej podpory grantových agentúr MŠSR VEGA 1/0404/09 a KEGA 003SPU-4/2011.

Použitá literatúra

- BUSCOT, F. – VARMA, A. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Leipzig, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, 423 p. ISBN 3–540–22220–0.
- CLASSEN, A. T. – BOYLE, S. I. – HASKINS, K. E. – OVERBY, S. T. – HART, S. C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microb. Ecol.* 2003, vol. 44, p. 319–328.
- CRECCHIO, C. – CURCI, M. – MININNI, R. – RICCIUTI, P. – RUGGIERO, P. Short term effects of municipal solid waste compost amendments on soil carbon and nitrogen content, some enzyme activities and genetic diversity. *Biology and Fertility of Soils*. 2001, vol. 34, p. 311–318.
- ENWALL, K. – PHILIPPOT, L. – HALLIN, S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl. Environ. Microb.* 2005, vol. 71, p. 8335–8343.
- FECENKO, J. – POLLÁK, A. *Agronomická účinnosť prípravku AZOTER: výskumná správa*. Nitra: SPU, 2001, 20 s.
- FRANZLUEBBERS, A.J – WILKINSON, S.R. – STUEDEMANN, J.A. Bermudagrass management in the Southern Piedmont, USA: IX. Trace elements in soil with broiler litter application. *J. Environ. Qual.* 2004, vol. 33, p. 778–784.

- GADUŠ, J. Technické a technologické aspekty výroby bioplynu a jeho využitia. *Predpoklady využívania poľnohospodárskej a lesníckej biomasy na energetické a biotechnické využitie*. Nitra : SAPV. 2007, s. 24–31. ISBN 978–80–89162–32–1.
- GARLAND, J. L. – MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microb.* 1991, vol. 57, no. 8, p. 2351–2359.
- GU, Y. – ZHANG, X. – TU, S. – LINDSTRÖM, K. Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping. *European. J Soil Biol.* 2009, vol. 45, p. 239–246.
- GUANGHUA, W. -- JUNJIE, L. – XIAONING, Q. – JIAN, J. – YANG, W. – XIAOBING, L. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica.* 2008, vol. 28, n. 1, p. 220–226.
- GUTIÉRREZ-ROJAS, I. – TORRES-GERALDO, A. B. – MORENO-SARMIENTO, N. Optimising carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth. *Afr. J. Biotechnol.* 2011, vol. 10, n. 15, p. 2951–2958.
- CHU, H. – LIN, X. – FUJII, T. – MORIMOTO, S. – YAGI, K. – HU, J. – ZHANG, J. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biol. Biochem.* 2007, vol. 39, p. 2971–2976.
- LABORATORY FOR MICROBIAL ECOLOGY, Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences, University of Toledo. 2004. *Community level physiological profiling (CLPP)*. 2004, 6 p.
- LIU, X. – HERBERT, S.J. – HASHEMI, A.M. – ZHANG, X. – DING, G. Effects of agricultural management on soil organic matter and carbon transformation. *Plant, Soil and Environment.* 2006, vol. 52, n. 12, p. 531–543.
- MARSCHNER, P. – YANG, C.H. – LIEBEREY, R. – CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 2001, vol. 33, p. 1437–1445.
- MARSCHNER, P. – KANDELER, E. – MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 2003, vol. 35, 2003, no. 3, p. 453–461.
- ONDRÁŠEK, L. – MARTINCOVÁ, J. Testovanie účinku mikrobiálnych prípravkov na biologické vlastnosti pôdy a úrodu poloprirodného trávneho porastu. *Naše pole.* č. 6, 2007, s. 50–52.
- ONDRÁŠEK, L. – MARTINCOVÁ, J. – JANČOVÁ, L. – ČUNDERLÍK, J. – ROGOŽNÍKOVÁ, A. Výskum pôdno-biologických vlastností vo vzťahu k alternatívnym prátotechnickým systémom: záverečná správa za ČÚ 02 VE 02 projektu 2005 UO 27/050 02 03/050 02 03 „Opatrenia zohľadňujúce adaptáciu na klimatickú zmenu v oblasti lúkarstva, pasienkarstva a pestovania poľných plodín“, Banská Bystrica: SCPV – VÚTPHP, 2005, 41 s.
- ONDREJČÍKOVÁ, Z. – REŽO, L. – MAREČEK, J. – POSPIŠIL, R. Vplyv biokalu na kvantitatívne a kvalitatívne parametre slnečnice ročnej. *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*, Nitra: SPU, 2009, s. 512–516.

- POSPIŠIL, R. – BITTER, J. Vplyv využitia vyhnitého kalu po výrobe bioplynu na úrodnosť pôdy. *Naše pole*. 2001, roč. V, č. 10, s. 35-37.
- POSPIŠIL, R – MANO, M. Možnosti produkcie biomasy kukurice na siláž po hnojení biokalom po výrobe bioplynu. *Biomasa pre regionálnu energetiku*. Nitra: SPU, 2007, s. 135–140.
- PRESTON-MAFHAM, J. – BODDY, L. – RANDERSON, P. F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microb. Ecol.* 2002, vol. 42, p. 1–14.
- STEFANOWICZ, A. The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. *Polish J. Environ. Stud.* 2006, vol. 15, no. 5, p. 669–676.
- ŠTEVLÍKOVÁ, T. – KOPČANOVÁ, M. *Základy taxonómie baktérií*. 1. vyd. Nitra: SPU, 2005, 64 s. ISBN 80–8069–461–3.
- TÓTH, Š. Vplyv bakteriálnych preparátov a herbicídnych prípravkov na celkový počet mikroorganizmov v pôde. *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*. 2009, s. 661–671.
- WU, T. – CHELLEMI, D.O. – GRAHAM, J.H.– MARTIN, K.J. – ROSSKOPF, E.N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices, *Microbial Ecology*. 2008, vol. 55, p. 293–310.

HODNOTENIE HYGIENICKY VÝZNAMNÝCH SKUPÍN MIKROORGANIZMOV V BIOPLYNOVEJ STANICI Z HLADISKA MOŽNOSTI APLIKÁCIE VYHNITÉHO KALU DO PÔDY

EVALUATION OF HYGIENICALLY IMPORTANT GROUPS OF MICROORGANISMS IN BIOGAS PLANT IN OPPORTUNITY OF DIGESTED SLUDGE APPLICATION TO SOIL

Maková Jana, Javoreková Soňa, Kačániová Miroslava, Medo Juraj, Majerčíková Kamila, Kováčsová Silvia

Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Abstract:

The aim of this work was investigated the hygienic important groups of microorganisms in biogas plant. We observed coliform bacteria, thermotolerant coliform bacteria, enterococci and *Salmonella enterica ser. Typhimurium* DT096. The amount of these groups was depending on substrates, which used in biogas plant. The most of coliform bacteria and thermotolerant coliform bacteria were found in mixture of manure, liquid manure and plant *Amaranthus* and least of these groups were in mixture of manure, liquid manure and silage grass. The most of enterococci was in mixture of manure, liquid manure and biomass (hen kill, poultry manure, rabbit manure and silage maize) and mixture of manure, liquid manure and plant *Amaranthus*, too. We confirmed that *Salmonella enterica ser. Typhimurium* DT096 was presence in mixture of manure, liquid manure and plant *Amaranthus*. Anaerobic fermentation decreased amount of coliform bacteria, thermotolerant coliform bacteria and enterococci, too.

Key words: biogas plant, coliform bacteria, thermotolerant coliform bacteria, enterococci, *Salmonella*, digested sludge

Úvod

V bioplynových staniciach sú anaeróbnym vyhnívaním spracovávané rôzne typy mestských, poľnohospodárskych, potravinárskych a priemyselných odpadov. V poľnohospodársky zameraných krajinách sa významne využívajú najmä na stabilizáciu živočíšnych odpadov (Nielsen et al., 2004). Počas vyhnívania v bioplynovej stanici je organický materiál degradovaný za súčasnej produkcie metánu a redukcie zápachu. Degradácia je realizovaná mikrobiálnym spoločenstvom zloženým z baktérií a archea (Westermann, 1996). Ako vedľajší produkt sa pri výrobe bioplynu získava vyhnitý kal. Jeho aplikácia do pôdy predstavuje vynikajúcu možnosť recyklácie živín a organickej hmoty, ktoré kal obsahuje (Sánchez-Monderero et al., 2004, Lang a Smith, 2007).

Kontaktná adresa: Ing. Jana Maková, PhD., Katedra mikrobiológie FBP, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, tel.: ++421376414434, Jana.Makova@uniag.sk

Vyhnitým kalom sa však dostávajú do pôdy aj ďalšie mikroorganizmy a pri spracovaní živočíšnych odpadov hrozí aj výskyt patogénnych druhov ako *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Mycobacterium*, *Clostridium* a *Yersinia*. Z toho dôvodu, že mnoho patogénov môže byť prítomných v nízkych počtoch alebo sa ťažko resp. časovo náročne izolujú, používajú sa na detekciu ich možnej prítomnosti resp. vplyvu hygienického ošetrenia živočíšnych odpadov skupiny indikátorových mikroorganizmov. Indikátorové mikroorganizmy by mali spĺňať dve podmienky, a to: mali by byť vylučované z organizmu vo veľkých počtoch a mali by byť ľahko detekovateľné. K takým mikroorganizmom môžeme zaradiť koliformné baktérie, termotolerantné koliformné baktérie a enterokoky.

Cieľom práce bolo sledovať zastúpenie hygienicky významných skupín mikroorganizmov počas vyhnívania živočíšneho odpadu s rôznymi prímiesami v bioplynovej stanici a posúdiť možnosť využitia substrátu z fermentora ešte pred vstupom do skladovacej (dohnivacej) nádrže na aplikáciu do pôdy.

Materiál a metódy

Predmetom nášho štúdia bolo sledovanie hygienicky významných mikroorganizmov v demonštračnej bioplynovej stanici postavenej vo Vysokoškolskom poľnohospodárskom podniku SPU v Kolíňanoch pri Nitre, ktorá bola uvedená do prevádzky v roku 2001. Bioplynová stanica bola naprojektovaná na výrobu bioplynu a následne na kogeneračnú výrobu elektrickej (22 kWe) a tepelnej energie (45 kWt) s využitím exkrementov od 80 veľkých dobytčích jednotiek. Súčasťou bioplynovej stanice sú dva fermentory – prevádzkový a experimentálny. Získaná energia sa využíva na vykurovanie fermentorov, objektu laboratória a skleníka.

Pri našom sledovaní bol ako vstupný základný substrát na fermentáciu v bioplynovej stanici použitý živočíšny odpad:

80% hnojovica ošípaných a 20% maštalný hnoj, do ktorého boli pridávané rôzne prímiesi:

80% hnojovica ošípaných, 20% maštalný hnoj a 10% 1 ročná silážovaná tráva,

80% hnojovica ošípaných, 20% maštalný hnoj a plodina *Amaranthus* (10 kg na 250 l hnojovice), 80% hnojovica ošípaných, 20% maštalný hnoj a biomasa zložená zo zmesi z úhynu nosníc (tepelne opracované) 1kg/deň, hydínového trusu 20 kg/deň, králičieho hnoja 9 kg/deň a kukuričnej siláže 12 kg/deň.

Základný substrát bol najskôr zhomogenizovaný v hlavnej homogenizačnej nádrži a odtiaľ bol prečerpaný do malej homogenizačnej nádrže slúžiacej na experimentálne účely, do ktorej boli pridávané aj jednotlivé prímiesi (prímiesi boli v nádrži rozdrvené drvičom). Z homogenizačnej nádrže bol substrát prečerpaný do experimentálneho horizontálneho fermentora s objemom 5 m³, pracujúceho v mezofilných podmienkach 35 až 40°C, s dobou zdržania vo fermentore cca 20 dní. Po anaeróbnom vyhnití prechádza z fermentora substrát do skladovacej nádrže, kde sa uskladňuje cca 6 mesiacov. Funkčné schéma a popis zariadenia sú uvádzané v publikáciách Košík a Gaduš (2007); Gaduš et al. (2005).

Vzorky sme v bioplynovej stanici odoberali z troch miest: premiešaný vstupný substrát z malej homogenizačnej nádrže (1), z experimentálneho fermentora (2) a z miesta výstupu substrátu z fermentora do skladovacej nádrže (3). Vo vzorkách sme stanovili sušinu (%) a tri skupiny

hygienicky významných mikroorganizmov. Koliformné baktérie (KB) a termotolerantné koliformné baktérie (TKB) sme kultivovali na Endovom agare (BioMark Laboratories, India) pri teplote 37 °C a 42 °C 24-48 hodín a enterokoky na Slanecz-Bartley agare (BioMark Laboratories, India) pri teplote 37 °C, 24-48 hodín. Použili sme klasickú platňovú metódu v troch opakovaníach.

Vo vzorkách z 3. odberového miesta (výstup z fermentora do skladovacej nádrže) sme sledovali prítomnosť rodu *Salmonella*. Pre izoláciu DNA sme použili vyrastené kolónie baktérií na XLD agare (Biolife, Taliansko), vyizolované z jednotlivých vzoriek v čistej kultúre. Pred izoláciou DNA gramnegatívnych baktérií bola pripravená peptónová voda. Naočkované vzorky sme inkubovali 24 hodín, pri teplote 37 °C. Pre izoláciu DNA sme použili GenElue™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, St. Louis).

Amplifikáciu a kvantifikáciu DNA sme uskutočnili pomocou POWER SYBR Green PCR Master Mix od spoločnosti Applied Biosystem v prístroji Step ONE Real-time od Applied Biosystem (Applied Biosystems, USA). Príprava reakčná zmes: 15 µl POWER SYBR Green PCR Master Mix, 1,5 µl primerov (priamy + spätný), 3 µl vzorky po izolácii, 10,5 µl deionizovanej vody.

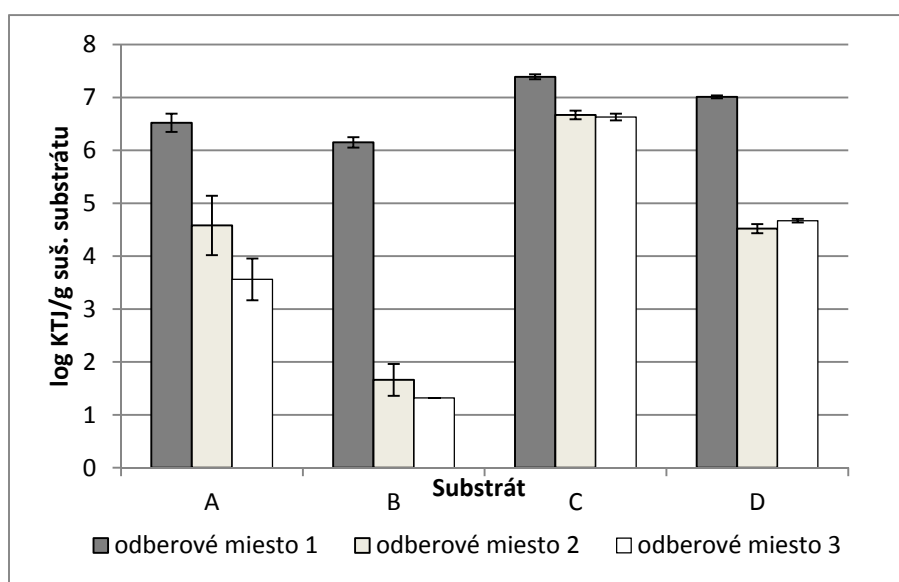
Pri molekulárnej diagnostike baktérií rodu *Salmonella* sme použili primery *stn* (*Salmonella enterica ser. Typhimurium* DT096). Jednotlivé primery a podmienky PCR reakcie boli nasledovné: *stn* gén: Primer Stn P1 5' TTG TGT CGC TAT CAC TGG CAA CC 3' a *stn* M 13 5' ATT GTT AAC CCG CTC TCG TCC 3'. Používali sme nasledovný teplotný profil: počiatková denaturácia 2 minúty pri 95 °C, nasledovaná 40 cyklami 1 sekundovej denaturácie pri 95 °C a 20 sekundového annealingu a elongácie pri 60 °C. Údaje boli zaznamenávané počas každého elongačného kroku. PCR produkty boli detegované sledovaním nárastu fluorescence v každom PCR cykle.

Výsledky sme štatisticky vyhodnotili v programe STATGRAPHICS (verzia XV.). Namerané hodnoty sme pretransformovali do logaritmickej hodnôt. Na štatistické hodnotenie sme použili ANOVU a na testovanie štatisticky preukazných rozdielov priemerov LSD test ($P \leq 0,05$).

Výsledky a diskusia

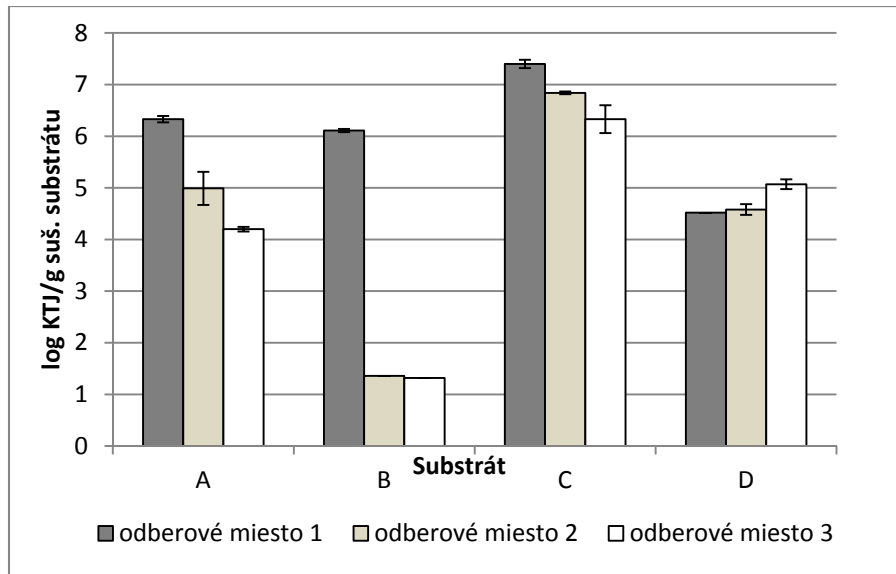
Potenciálne zdravotné riziko vyhnitého kalu z bioplynovej stanice čiastočne závisí od vstupného substrátu, s ktorým sa pracuje. Substráty obsahujúce exkrementy hospodárskych zvierat (hnojovica, maštalný hnoj) môžu okrem mikroorganizmov, ktoré sú bežnou súčasťou tráviaceho traktu obsahovať aj pôvodcov infekčných chorôb patriacich medzi baktérie a vírusy. Pri rastlinných materiáloch je epifytná mikrobiota veľmi pestrá zastúpená najmä baktériami rodu *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Clostridium* spp., môžu byť prítomné, ale v menšom množstve aj *Escherichia*, *Enterobacter*, zástupcovia mikroskopických húb a kvasiniek. V nami sledovaných vzorkách dodávaných do bioplynovej stanice sme zistili prítomnosť koliformných baktérií v rozsahu od 1,32 do 7,39 log KTJ/g suš. substrátu (obr. 1) a termotolerantných koliformných baktérií (obr. 2) od 1,32 do 7,40 log KTJ/g suš. substrátu. Ich početné zastúpenie preukazne záviselo od druhu použitého substrátu na fermentovanie (tab. 1). Najvyššiu hodnotu týchto skupín sme zistili pri hnojovici a maštalnom hnoji

s prídavkom plodiny *Amaranthus* (6,9 a 6,86 log KTJ/g suš. substrátu) a najnižšiu pri hnojovici a maštalnom hnoji s prídavkom silážovanej trávy (3,04 a 2,93 log KTJ/g suš. substrátu). *Amaranthus* patrí medzi energetické plodiny charakteristické vysokou produkciou biomasy, ktoré je možné pestovať aj na pôdach nižšej kvality s nedostatkom vody. Aj keď by nemal byť zdrojom týchto baktérií, zrejme pri pestovaní, zbere resp. skladovaní v bioplynovej stanici dochádzalo k jeho kontaminácii, pretože obsahoval až 4,5 a 4,1 log KTJ/g suš. substrátu koliformných a termotolerantných koliformných baktérií. Naopak, silážované plodiny by tieto skupiny mikroorganizmov v dôsledku konzervačného pôsobenia kyseliny mliečnej obsahovať nemali, čo sa nám aj štatisticky potvrdilo (tab.1). Sahlström et al. (2008) uvádza, že najviac patogénov ako *Salmonella* spp., *Shigella* spp. izolovali z biologických fekálne kontaminovaných odpadov, zatiaľ čo baktérie *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. izolovali z kuchynských odpadov a z odpadov ovocia a zeleniny. Podľa nami zistených údajov, potvrdených štatisticky, samotná fermentácia znížila počet koliformných a termotolerantných koliformných baktérií o 2 logaritmicke rády.



Obr.1. Koliformné baktérie v bioplynovej stanici (log KTJ so smerodajnou odchýlkou)

Ďalšou skupinou indikátorových mikroorganizmov, ktoré sme sledovali boli enterokoky. Podľa Hyucke (2002) sú to baktérie, ktoré sú schopné rásť v teplotnom rozsahu od 10 do 45°C, v rozsahu pH 4,8-9,6, za prítomnosti 28 % NaCl a prežívajú polhodinové zahriatie na 60 °C. Katabolizujú široké spektrum energetických zdrojov a patria medzi závažné podmiennečne patogénne druhy uplatňujúce sa ako jediné agens alebo nezriedka ako súčasť polymikrobiálnej infekcie (Bednář, et al., 1999). Pre človeka sú najdôležitejšie *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* a *E. durans*. Sahlström (2003) uvádza, že enterokoky sa zdajú byť zo všetkých indikátorových baktérií najvhodnejšími na sledovanie hygienického ošetrovania živočíšnych odpadov, ale existuje tu limitácia, z dôvodu ich likvidácie pri použití pasterizácie substrátu pri teplote, ktorá prekročí hodnotu 55 °C.



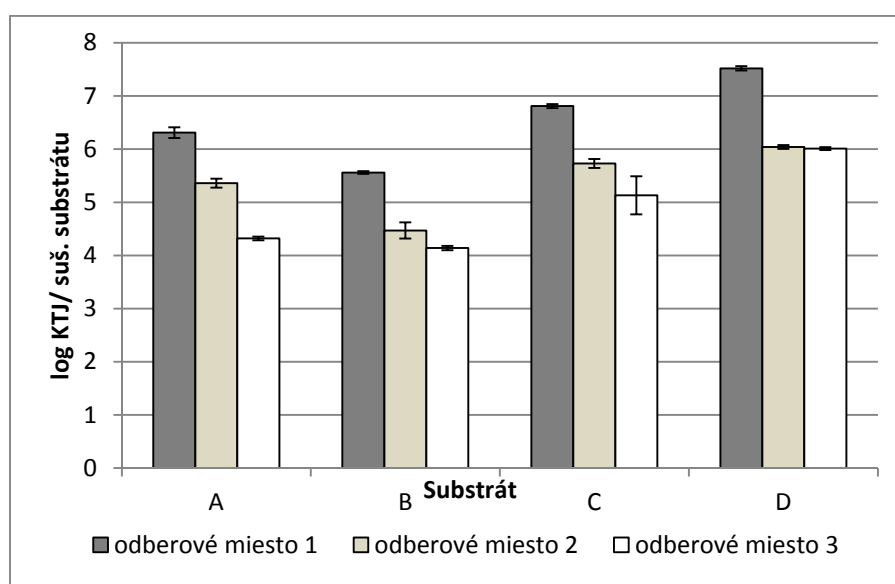
Obr. 2. Termotolerantné koliformné baktérie bioplynovej stanici (log KTJ so smerodajnou odchýlkou)

Substrát	log KTJ/g sušiny substrátu		
	Koliformné baktérie	Termotolerantné koliformné baktérie	Enterokoky
A - Maštalný hnoj, hnojovica	4,88 ^b	5,17 ^b	5,33 ^{ab}
B - Maštalný hnoj, hnojovica, sil. tráva	3,04 ^a	2,93 ^a	4,73 ^a
C - Maštalný hnoj, hnojovica, <i>Amaranthus</i>	6,90 ^c	6,86 ^c	5,89 ^{bc}
D - Maštalný hnoj, hnojovica, biomasa	5,39 ^b	4,73 ^b	6,52 ^c
	Odberové miesto		
1 - Homogenizačná nádrž	6,77 ^b	6,09 ^b	6,55 ^c
2 - Fermentor	4,36 ^a	4,44 ^a	5,40 ^b
3 - Výstup z fermentora	4,05 ^a	4,23 ^a	4,90 ^a

Tab.1. Priemerné hodnoty hygienicky významných mikroorganizmov podľa substrátu a odberového miesta v bioplynovej stanici $P < 0,5$; písmená v stĺpcoch vyjadrujú štatisticky preukazné rozdiely, $n=36$

Nami stanovené zastúpenie enterokokov v bioplynovej stanici, podobne ako v prípade koliformných a termotolerantných koliformných baktérií, záviselo od druhu substrátu. Najviac enterokokov obsahovala hnojovica s maštalným hnojom s prídavkom biomasy (úhyn nosíc, hydínový trus, králičí hnoj a kukuričná siláž), avšak ich hodnoty boli rovnocenné s hnojovicou a maštalným hnojom s prídavkom plodiny *Amaranthus* (6,52 a 5,89 log KTJ/g suš. substrátu) (tab. 1, obr. 3). Úbytok množstva životaschopných baktérií pri fermentovaní

v bioplynovej stanici je závislý od viacerých faktorov, ku ktorým patrí teplota, čas ošetrenia, pH a obsah unikavých kyselín. Pri mezofilných podmienkach fermentácie, ktoré sa využívajú v bioplynovej stanici v Koliňanoch môžeme konštatovať, že dochádza k čiastočnej likvidácii hygienicky významných baktérií. V porovnaní s 1. odberovým miesto dochádzalo k výraznému preukaznému poklesu počas fermentácie, tak ako pri koliformných a termotolerantných koliformných baktériách približne o 2 logaritmickej rády, tak aj v prípade enterokokov. Olsen a Larsen (1987) zistili že inaktivácia *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bacillus cereus* a *Clostridium perfringens* trvá pri termofilných podmienkach fermentácie 24 hodín, zatiaľ čo pri mezofilných podmienkach týždne až mesiace.



Obr. 3. Enterokoky v bioplynovej stanici (log KTJ so smerodajnou odchýlkou)

Zo vzoriek z 3. odberového miesta sme zisťovali aj prítomnosť rodu *Salmonella*. V skúmaných vzorkách sme zistili, že zo štyroch skúmaných substrátov, jeden substrát - C (hnojovica, maštalný hnoj s prídavkom plodiny *Amaranthus*) obsahoval druh *Salmonella enterica ser. Typhimurium* DT096. Hodnota Ct cyklu (treshold cyklus), v ktorom je prvý zistiteľný významný nárast fluorescence pozitívnej vzorky na salmonelu, bola 25,52.

Podľa zákona SR č. 188/2003 Z. z. o aplikácii čistiarenskeho kalu do pôdy a o doplnení zákona č. 223/2001 Z. z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov sa v čistiarenských kaloch sledujú termotolerantné koliformné baktérie a fekálne streptokoky t. j. enterokoky s medznou hodnotou $2 \cdot 10^6$ KTJ.g⁻¹ suš. kalu. Pri hodnotení substrátu podľa uvedeného zákona môžeme konštatovať, že vo všetkých vzorkách ešte pred vstupom do skladovacej (vyhňivacej) nádrže nebola prekročená medzná hodnota stanovená zákonom.

Avšak podľa nariadenia komisie (ES) č. 208/2006, ktorým sa dopĺňajú prílohy VI. a VIII. k nariadeniu (ES) č. 1774/2002, zo všetkých vzoriek iba vzorka substrátu B (hnojovica, maštalný hnoj a silážovaná tráva) zodpovedá citovanej smernici. Podľa nej vo vzorkách odobratých počas spracovania alebo ihneď po spracovaní v zariadení na výrobu bioplynu

musia *Escherichia coli* alebo *Enterobacteriaceae* musia spĺňať normy $n=5$, $c=1$, $m=1000$, $M=5000$ v 1 g a neprítomnosť *Salmonella* v 25 g substrátu - $n=5$, $c=0$, $m=0$, $M=0$.

Z uvedených skutočností vyplýva, že i napriek tomu, že po aplikácii vyhnitého kalu do pôdy skupiny baktérií, ktoré sú významné z hygienického hľadiska nenachádzajú v pôde vhodné podmienky (nie sú dobre adaptované na toto prostredie a s pôvodnou autochtónnou mikrobiotou pôdy súťažia o zdroje živín) je potrebné im venovať značnú pozornosť. Hygienické riziko predstavujú z hľadiska kontaminácie povrchových a podzemných vôd (ak je aplikácia vykonávaná po daždivom období), z aerosólov tvoriacich sa pri aplikácii vo veternom počasí môžu byť priamo infikovaní ľudia a zvieratá inhaláciou, kontaktom s kožou a príjmom potravy. Pri rizikových biologických odpadoch je potrebné vykonávať dôslednú pasterizáciu (hygienizáciu), pri ktorej sa patogénne druhy mikroorganizmov výrazne likvidujú.

Podakovanie

Práca vznikla za podpory agentúr VEGA č. 1/0404/09 a KEGA 003SPU-4/2011 a 005SPU-4/2011. Autori práce ďakujú pani Bc. H. Blaškovičovej a E. Čunderlíkovej za pomoc pri analýzach.

Použitá literatúra

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Marvil : Praha, 1999.

GADUŠ, J., ŠÁRGOVÁ, S., GONDA, L., KUNSKÝ, M. Alternatívne využitie trávnych porastov na Slovensku. In *Zemědělská technika a biomasa 2005*. Praha : Výskumný ústav zemědělské techniky, 2005, s. 29-32. ISBN 80-86884-07-4.

HUYCKE, M. M. Physiology of enterococcy. ed. GILMORE et al. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. ASM Press : Washington. 2002.

KOŠÍK, L., GADUŠ, J. Bioplyn z konského hnoja s kukuričnou silážou v procese anaeróbnej kofermentácie. *Biom.cz* [online]. 2007-11-23 [cit. 2012-01-25]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplyn-z-konskeho-hnoja-s-kukuricnou-silazou-v-procese-anaerobnej-kofermentacie>>. ISSN: 1801-2655.

LANG N. L., SMITH S. R. Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, vol. 103, no. 6, p. 2122-2131.

Nariadenie komisie (ES) č. 208/2006 zo 7. februára 2006, ktorým sa menia a dopĺňajú prílohy VI. a VIII. k nariadeniu Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002, pokiaľ ide o normy pre spracovanie pre zariadenia na výrobu bioplynu a kompostu a požiadavky na hnoj.

NIELSEN, H. B., MLADENOVSKA, Z., WESTERMANN, P. Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, vol. 86, no. 3, p. 291-300.

OLSEN, J.E., LARSEN, H.E. Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes*, 1987, vol. 21, p. 153-168.

SAHLSTRÖM, L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*. 2003, vol. 87, p. 161-166.

SAHLSTRÖM, L., BAGGE, E., EMMOTH, A., HOLMQVIST, M. L., DANIELSSON-THAM, A., ALBIHN. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, p. 7859-7865.

SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A., MONDINI, C., DE NOBILI, M., LEITA, L., ROIG, A., Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Management*, 2004, vol. 24, no. 4, p. 325-332.

WESTERMANN, P. Temperature regulation of anaerobic degradation of organic matter. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 12, no. 5, p. 497-503.

Zákon č. 188/2003 Z.z. SR o aplikácii čistiarenského kalu a dnových sedimentov do pôdy a o doplnení zákona č. 223/2001 Z. z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov

VYBRANÉ PARAMETRY ČERNOZEMÍ (HPJ 01-08) JIŽNÍ MORAVY

SELECTED PARAMETERS OF THE CHERNOZEMS IN SOUTH MORAVIA

¹Růžek Lubomír, ²Foukalová Kučerová Jiřina, ³Růžková Michaela, ²Brtnický Martin

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky FAPPZ, Česká zemědělská univerzita v Praze¹

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy univerzity v Brně²

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL - RO Praha³

Abstract

Chernozems, modal, luvic, calcaric, arenic and pelic from 24 localities in South Moravia (Czech Republic) were tested. Each main soil unit (HPJ) was represented by three localities. Microbial biomass carbon and soil organic matter were determined by microwave methods. In determining of potential respiration with N and C was used different levels of added nutrients, in the case of N-(NH₄)₂SO₄ 21% and 100%, in the case of C-glucose 40% and 100%. Reduction of nitrogen brought about significantly lower values, reduction of C-glucose had no effect. Reduction of nutrients compared to the original procedure (Novák and Apfelthaler 1964) is possible. Microbial biomass (microwave procedure) and soil organic carbon matter (microwave procedure) high significantly correlated ($r = 0.7496$; 99.9992%).

Key words: Chernozems, modal, luvic, arenic, pelic, microbial biomass, soil organic carbon, microwave methods, respiration

Úvod

Černoze země ve střední Evropě jsou užívány pro produkci obilnin již 7 000 let bez významného poklesu úrodnosti (Kunzová a Hejcman 2009). Růžková et al. (2011) uvádějí, že některé praktiky, například víceleté mulčování veškeré narostlé nadzemní biomasy rostlin, přispívají k akumulaci půdní organické hmoty, jiné, například opakovaná desikace zapleveleného porostu přípravkem Roundup, vedou k vysoce významnému poklesu aktivity arylsulfatasy (-28 %), a současně vzhledem k imobilizaci živin do buněk mikroorganismů k vysoce významnému nárůstu mikrobiální biomasy (+69 %), ale i k vysoce významnému růstu nitrátů v orniční vrstvě (+86 %). Němeček et al. (2001) definují černoze země jako půdy hlubokohumózní (0,4 – 0,6 m) s černickým horizontem Ac, vyvinuté z karbonátových sedimentů, sorpčně nasycené s obsahem půdní organické hmoty 2,0 – 4,5 % (t. j. 1,2 – 2,6 % C_{org}) v černickém horizontu Ac.

Kontaktní adresa: Doc. Ing. Lubomír Růžek, CSc., katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky FAPPZ, Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6 – Suchbátka
e-mail: ruzek@af.czu.cz

Hlavní půdní jednotky (HPJ) 01 – 08 zahrnují černozemě modální na spraši; (HPJ 01), černozemě luvické na spraši (HPJ 02), černozemě černické na spraši uložené na slínu (HPJ 03), černozemě arenické na písku, překrývajícím spraš (HPJ 04), černozemě vytvořené na středně mocné vrstvě spraši, překrývajících písek (HPJ 05), černozemě pelické a vertické na slínu a jílu (HPJ 06; HPJ 07) a černozemě smyté, erodované, převážně na spraši (HPJ 08). Studie je věnována vybraným vlastnostem černozemí jižní Moravy s ohledem na HPJ 01 – 08.

Materiál a metody

Vzorky černozemí byly na 24 lokalitách jižní Moravy odebrány 21. 9. 2011 z orničního horizontu Ap (0 - 200 mm). Po chlazené přepravě do laboratoře byly vzorky upraveny na jemnozeme (< 2 mm) a uchovány při teplotě 4 – 6 °C. 24 hodin před biologickými analýzami byly temperovány na teplotu 22 ± 2 °C. Použité testy zobrazuje Tabulka 1. Výsledky testů byly statisticky zpracovány s ohledem na osm hlavních půdních jednotek (One-way ANOVA [Analysis of variance; Multiple range tests]; Scheffe's test; $p \leq 0.05$). Ze zpracování byla vyloučena lokalita Vanovice, jejíž poměr A400/A600 (7,95) potvrdil, že nejde o černozem.

Sledovaný parameter	Označení
Uhlík mikrobiální biomasy - mikrovlnná metoda (Islam a Weil 1998a); (Růžek et al. 2009)	MBC-MW
Uhlík půdní organické hmoty – mikrovlnná metoda (Islam a Weil 1998b)	C _{org} -MW
Bazální respirace (Vaisala Carbon Dioxide Meter)	BR
Potenciální respirace s N-(NH ₄) ₂ SO ₄	NR
Potenciální respirace s C-glukosy	GR
Potenciální respirace s N-(NH ₄) ₂ SO ₄ a C-glukosy	NGR
Půdní organický uhlík extrahovaný 0,5 mol/l K ₂ SO ₄ (Růžek et al. 2009)	C-K ₂ SO ₄
Kvalita extrahovatelných humusových látek poměrem absorbancí	A400/A600

Tab. 1: Sledované parametry orniční vrstvy půdy

Výsledky a diskuse

Patnáct hodnocených parametrů je v následujících tabulkách 2 - 5 zpracováno podle hlavních půdních jednotek.

Mikrobiální biomasa, stanovená mikrovlnným postupem, a uhlík půdní organické hmoty, stanovený mikrovlnným postupem, vysoce významně korelují ($r = 0,7496$; 99,9992%). Neplatí

to ale pro C_{org} – Mendelu, kde žádný korelační vztah nebyl nalezen. Černozemě arenické HPJ 04 a černozemě vytvořené na středně mocné vrstvě spraší, překrývajících písek (HPJ 05) mají výrazně méně půdní organické hmoty, 0,85 – 0,87 % C_{org} – MW, lokalita Strachotín (HPJ 05) pouze 0,63 %. Němeček et al. (2001) uvádějí pro černozemě 1,2 – 2,6 % C_{org} . Uvedené pásmo splňují všechny černozemě s výjimkou HPJ 04 a HPJ 05.

	MBC-MW mg/kg sušiny	A400/A600 poměr	C_{org} -MW %	C_{org} -Mendelu %	C-K ₂ SO ₄ mg/kg sušiny
HPJ 01	287,5 ^A	3,76 ^A	1,59 ^{AB}	1,23 ^A	29,0 ^A
HPJ 02	330,6 ^A	3,81 ^A	1,67 ^{AB}	1,92 ^A	25,9 ^A
HPJ 03	249,1 ^A	4,01 ^A	1,26 ^{AB}	1,79 ^A	19,8 ^A
HPJ 04	129,4 ^A	4,65 ^A	0,87 ^A	1,64 ^A	16,7 ^A
HPJ 05	148,5 ^A	4,51 ^A	0,85 ^A	1,23 ^A	8,6 ^A
HPJ 06	426,4 ^A	4,09 ^A	1,90 ^{AB}	2,16 ^A	22,9 ^A
HPJ 07	311,4 ^A	4,05 ^A	2,38 ^B	2,08 ^A	9,6 ^A
HPJ 08	297,0 ^A	4,30 ^A	1,80 ^A	1,76 ^A	23,9 ^A

Tab. 2. Základní parametry černozemí jižní Moravy podle HPJ 01 – 08

Při stanovení potenciální respirace byly použity rozdílné hladiny přidávaných živin. V případě N-(NH₄)₂SO₄ 21 % a 100 %, v případě C-glukosy 40 % a 100 %. Snížení u dusíku přineslo statisticky významně nižší hodnoty respirovaného CO₂, v průměru na úrovni 76 % plné dávky

	BR (mg C/kg/hod)	NR 21 % N-(NH ₄) ₂ SO ₄	NR 100 % N-(NH ₄) ₂ SO ₄	NR (100 %N)/BR poměr
HPJ 01	0,74 ^A	1,03 ^A	1,61 ^A	2,16
HPJ 02	1,13 ^A	1,41 ^A	1,66 ^A	1,37
HPJ 03	0,99 ^A	1,03 ^A	1,29 ^A	1,45
HPJ 04	0,74 ^A	0,93 ^A	1,22 ^A	1,58
HPJ 05	0,60 ^A	0,63 ^A	0,84 ^A	1,39
HPJ 06	0,85 ^A	1,32 ^A	1,72 ^A	1,93
HPJ 07	1,12 ^A	1,19 ^A	1,44 ^A	1,28
HPJ 08	0,95 ^A	1,72 ^A	2,41 ^A	2,57

Tab. 3. Potenciální respirace s N-(NH₄)₂SO₄ černozemí jižní Moravy podle HPJ 01 – 08

	BR (mg C/kg/hod)	GR 40 % C-glukosy	GR 100 % C-glukosy	GR (100 % C)/BR poměr
HPJ 01	0,74 ^A	7,64 ^A	8,09 ^A	11,14
HPJ 02	1,13 ^A	10,02 ^A	10,90 ^A	11,28
HPJ 03	0,99 ^A	9,23 ^A	9,35 ^A	10,03
HPJ 04	0,74 ^A	7,63 ^A	6,97 ^A	9,77
HPJ 05	0,60 ^A	6,96 ^A	6,54 ^A	12,24
HPJ 06	0,85 ^A	8,47 ^A	9,60 ^A	11,93
HPJ 07	1,12 ^A	11,85 ^A	11,22 ^A	10,00
HPJ 08	0,95 ^A	10,23 ^A	9,81 ^A	10,55

Tab. 4. Potenciální respirace s C-glukosy černozemí jižní Moravy podle HPJ 01 – 08

Snížení u glukosy nemělo žádný vliv. Snížení živin proti originálnímu postupu (Novák a Apfelthaler 1964) je tedy možné. Extrémní hodnoty poměrů N/B, G/B a NG/B byly nalezeny na lokalitách Horní Věstonice (HPJ 08; N/B = 3,02) a Brod nad Dyjí (HPJ 05; G/B = 21,21 a NG/B = 40,49).

	BR (mg C/kg/hod)	NGR 21 % N + 40 % C	NGR 100 % N i C	NGR(100)/BR poměr
HPJ 01	0,74 ^A	16,54 ^A	16,76 ^A	22,92
HPJ 02	1,13 ^A	16,70 ^A	16,29 ^A	16,39
HPJ 03	0,99 ^A	17,21 ^A	18,29 ^A	21,70
HPJ 04	0,74 ^A	15,32 ^A	15,34 ^A	22,34
HPJ 05	0,60 ^A	14,88 ^A	14,17 ^A	25,82
HPJ 06	0,85 ^A	14,84 ^A	15,01 ^A	18,78
HPJ 07	1,12 ^A	17,94 ^A	18,17 ^A	16,23
HPJ 08	0,95 ^A	17,94 ^A	18,95 ^A	20,55

Tab. 5. Potenciální respirace s N-(NH₄)₂SO₄ a C-glukosy podle HPJ 01 – 08

Hodnoty uvedené v tabulkách 2 – 5 jsou srovnatelné s jinými autory, kteří černozemím věnovali pozornost v posledních letech. Například Nováková a Voříšek (2006) uvádějí pro zatravněný úhor na luvické černozemi (HPJ 2), po přepočtu na stejné jednotky (mg C/kg/hod) srovnatelné hodnoty u bazální respirace (1,55 ± 0,49) i u dvou potenciálních variant, se síranem amonným (2,89 ± 0,60), a s glukosou (13,09 ± 4,77). Kombinovaný test s oběma

přísadami současně (NGR) ale vyšel na desetiletém zatravněném úhoru, z poloviny sečeném, a z poloviny mulčovaném, na trojnásobné úrovni ($51,05 \pm 18,19$), a biomasa mikroorganismů na dvojnásobné úrovni (621 ± 169). Rozdíly mezi úhory a ornými půdami vysvětlují Polyanskaya et al. (2012). Úhory jsou bližší nenarušeným půdám a je pro ně charakteristická vyšší biomasa mikroorganismů než pro orné půdy. Na úhorech i na orných půdách má na biomase mikroorganismů dominantní podíl mycelium hub (od 90 % v povrchovém horizontu do 97 % v hlubších horizontech). Podíl prokaryotických mikroorganismů na mikrobiální biomase dosahuje na úhorech maximálně 10 %, ale například v kaštanových půdách (Chestnut soil), blízkých černozemím, jen 1 % (Polyanskaya et al. 1996). Na parametrech půdy má tedy dominantní podíl biomasa eukaryotických mikroorganismů, především vláknitých mikroskopických hub (< 99 %). Polyanskaya et al. (1996) ve stejném článku rovněž upozorňují na korelaci mezi biomasou mikroorganismů a intenzitou potenciální respirace a tím vysvětlují i výraznou odchylku orných černozemí jižní Moravy od zatravněného úhoru na luvické černozemi (HPJ 2) právě v potenciální respiraci NGR (Tabulka č. 5) a v biomase půdních mikroorganismů (MBC-MW; Tabulka č. 2).

Závěr

Černozemě arenické (HPJ 04) a černozemě vytvořené na středně mocné vrstvě spraší, překrývajících písek (HPJ 05), charakterizuje atypicky nízká zásoba uhlíku půdní organické hmoty ($C_{org} - MW; 0,85 - 0,87 \%$), což má negativní vliv na některé jejich další parametry.

Mikrobiální biomasa, stanovená mikrovlnným postupem, a uhlík půdní organické hmoty, stanovený mikrovlnným postupem, vysoce významně koreluje ($r = 0,7496; 99,9992\%$).

U potenciálních variant respirometrického testu lze proti originálnímu postupu (Novák a Apfelthaler 1964) snížit přidávané živiny až o 50 % bez výraznějšího vlivu na výsledek.

U potenciálního respiračního testu NGR byly dosaženy relativně nízké hodnoty proti autorům, kteří studovali desetiletý zatravněný úhor na luvické černozemi (HPJ 2), na což mohou mít vliv posklizňové zbytky, pravidelné hnojení orných černozemí jižní Moravy, a samotný charakter těchto intenzivně obdělávaných půd.

Poděkování

Řešeno za přispění záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6046070901

Použita literatura

- ISLAM, K.R. - WEIL, R.R., 1998a. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biology and Fertility of Soils* 27: 408-416
- ISLAM, K.R. - WEIL R.R., 1998b. A rapid microwave digestion method for colorimetric measurement of soil organic carbon. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 29: 2269-2284
- KUNZOVÁ, E. - HEJCMAN, M. 2009. Yield development of winter wheat over 50 years of FYM, N, P and K fertilizer application on black earth soil in the Czech Republic. *Field Crops Research*, 111: 226-234.

- NĚMEČEK, J. - MACKŮ, J. - VOKOUN, J. - VAVŘÍČEK, D. - NOVÁK, P. 2001. Taxonomický klasifikační systém půd České republiky, ČZU Praha, 78 s.
- NOVÁK B. - APFELTHALER R. 1964. Příspěvek ke stanovení respirace jako indikátoru mikrobiologických procesů v půdě. *Rostlinná Výroba* 10: 145-150.
- NOVÁKOVÁ, M. - VOŘÍŠEK, K. 2006. Microbiological parameters of soil set aside before and after desiccation. *Plant, Soil and Environment*, 52: 97-104.
- POLYANSKAYA, L.M. - SUKHANOVA, N.I. - CHAKMAZYAN, K.V. - ZVYAGINTSEV, D.G. 2012. Changes in the structure of soil microbial biomass under fallow. *Eurasian Soil Science*, 45: 710-716
- POLYANSKAYA, L.M. - GEIDEBREKHT, V.V. - STEPANOV, A.L. - ZVYAGINTSEV, D.G. 1996. Distribution of population and biomass of microorganisms with regard to profiles of zonal types. *Eurasian Soil Science*, 28: 85-94
- RŮŽEK, L. - RŮŽKOVÁ, M. - VOŘÍŠEK, K. - KUBÁT, J. - FRIEDLOVÁ, M. - MIKANOVÁ, O. 2009. Chemical and microbiological characterization of Cambisols, Luvisols and Stagnosols. *Plant, Soil and Environment*, 55: 231-237.
- RŮŽKOVÁ, M. - RŮŽEK, L. - VOŘÍŠEK, K. - VRÁBLÍK, P. - MUSILOVÁ, D. 2011. Microbiological characterization of land set-aside before and after Roundup desiccation. *Plant, Soil and Environment*, 57: 88-94.

BOHATÁ MIKROBIÁLNÍ SPOLEČENSTVA V KYSELÉ SULFÁTOVÉ PŮDĚ A JEJICH POTENCIÁL PRO EMISE SKLENÍKOVÝCH PLYNŮ

RICH MICROBIAL COMMUNITIES IN ACID SULFATE SOIL AND THEY POTENCIAL FOR EMISION OF GREENHOUSE GAS

^{1,2} Šimek Miloslav, ¹ Chroňáková Alica, ¹ Elhottová Dana, ¹ Křišťůfek Václav, ³ Virtanen Seija, ³ Simojoki Asko, ³ Yli-Halla Markku

¹ Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

² Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

³ Department of Food and Environmental Sciences, FI-00014 University of Helsinki, Finland

Abstract

Acid sulphate (AS) soils generate after aeration, due to e.g. cultivation for agricultural use, a number of problems, including sulphuric acid formation. The acidity of drainage waters and soils causes chronic toxicity and has been responsible for massive fish kills, decreases in soil fertility, and negative effects on plant growth. In some boreal AS soils, large stocks of either organic C and N were confirmed in subsoils. We found that deeper horizons of the AS soil located in Helsinki area contain rich microbial communities, characterized by high respiration and biomass. These findings suggest that AS soils could be, after subsoil aeration, a significant source of emissions of greenhouse gases.

Key words: microorganisms; respiration; soil profile; carbon dioxide; methane

Úvod

Kyselé sulfátové půdy (označované v anglicky psané literatuře jako *acid sulfate soils*) jsou zvláštní skupinou půd: podle jednoduché definice jsou to půdy, v nichž se může vytvářet, vytváří se nebo se vytvářela kyselina sírová ve větším množství (Fanning, 2002) a jejichž pH klesá pod 4, někdy až ke 2 (Ritsema et al., 2000). Pons (cit. in Fanning, 2002) uvádí, že je Linné nazýval *argilla vitriolacea*, což volně přeloženo znamená "jíl s kyselinou sírovou". Klasifikační systém Soil Taxonomy řadí tyto půdy do skupin *Sulfaquens*, *Sulfihemists* aj., zatímco systém FAO/UNESCO rozeznává *Thionic Fluvisols*, *T. Gleysols* a *T. Histosols* (viz např. Fanning, 2002).

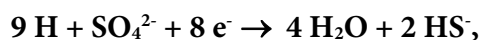
Zdrojem kyseliny sírové v KSP jsou sulfidy, a to hlavně sulfidy železa. Sulfidy se v budoucích KSP akumulují během vývoje těchto půd **sulfidizací**, jež je primárně biologický proces. Hlavní úlohu při sulfidizaci mají půdní bakterie ze skupiny bakterií redukujících sulfáty. Mezi typické představitele této skupiny bakterií patří r. *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Desulfobacter* aj.

Kontaktní adresa: Miloslav Šimek

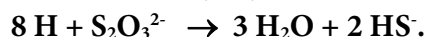
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

email: misim@upb.cas.cz

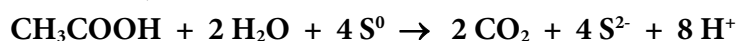
Tyto bakterie obývají i řadu extrémních prostředí, jako jsou hlubokomořské sedimenty, solná jezera, ropou nasycené horniny apod. Při disimilační redukci jsou sulfáty využity jako terminální akceptor elektronů a proces tedy slouží k získávání energie; donorem elektronů je H₂:



podobně může být využit thiosulfát:



Respirace síry může probíhat podle následujícího schématu (tak je tomu např. u bakterií *Desulfuromonas acetoxidans*):



Jedná se o analogii denitrifikace a dalších procesů disimilační redukce nitrátů. Podobně jako denitrifikace probíhá i disimilační redukce sulfátů v anaerobním prostředí: v sedimentech, v zaplavených půdách, ve znečištěných vodách apod., a to při poklesu redox potenciálu E_h na -100 až -200 mV (optimum kolem -300 mV při pH 7) a v podmínkách dostatečné zásoby organických látek (detaily viz Šimek, 2003).

Redukované sírné sloučeniny nahromaděné v anaerobním prostředí zaplavených půd a sedimentů se mohou při změně oxidoredukčních poměrů oxidovat procesem *sulfurizace*. Typicky k tomu dochází při poklesu hladiny spodní vody a při kultivaci těchto půd. Jedná se o přeměny abiotické i biotické, přičemž většinou jde o mikrobiální procesy v principu analogické s oxidací amoniakální formy dusíku nitrifikací (NH₄⁺ → NO₂⁻ → NO₃⁻). Oxidaci sírných sloučenin provádějí chemolitoautotrofní archae a bakterie včetně rodů *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Achromatium*, *Beggiatoa* a *Thermothrix*, fotoautotrofní mikroorganismy, tj. zelené a purpurové sírné bakterie a dále chemoorganoheterotrofní mikroorganismy, kam patří mnoho bakterií i mikromycet:



Sulfurizace, tedy vlastně tvorba kyseliny sírové, v aktivních KSP je jev nežádoucí. Stejně jako při nitrifikaci dochází při oxidaci sírných sloučenin k produkci vodíkových kationtů a tím k okyselení prostředí. Na rozdíl od velmi pomalé *sulfidizace* je *sulfurizace* většinou rychlá, a tak se může během několika týdnů až měsíců uvolnit z těchto půd obrovské množství síry ve formě kyseliny sírové. Z toho potom pramení velké problémy: okyselení půdy, vymývání kyseliny sírové do vod, následný úhyn ryb a jiných vodních živočichů, atp.

Kyselé sulfátové půdy jsou rozšířené hlavně v tropických a subtropických oblastech a zaujímají rozlohu nejméně 15 (Rabenhorst et al., 2002) až 24 (Ritsema et al., 2000) milionů hektarů, ale pravděpodobně jsou ještě rozšířenější. Vyskytují se také v severní Evropě při pobřeží Baltského moře a např. ve Finsku se zemědělsky využívají na ploše až 130 000 ha (Joukainen a Yli-Halla, 2003).

Kyselým sulfátovým půdám se věnovala a věnuje velká pozornost zvláště kvůli výše uvedeným environmentálním problémům a jejich chemické a fyzikální vlastnosti jsou poměrně dobře poznány a popsány (např. Dent a Pons, 1995; Yli-Halla, 1997; Ritsema et al., 2000). Naproti tomu existuje jen málo informací o biologii těchto půd. Z poslední doby existují informace o diverzitě bakterií (včetně acidofilů oxidujících redukované sírné sloučeniny) v umělých

mokřadech v Ohiu, USA (Nicomrat et al., 2008), o společenstvech bakterií v pobřežních slaniscích ve Španělsku (Lambais et al., 2008) nebo o abundanci a struktuře společenstev prokaryot v zaplavených půdách rýžovišť v jižní Číně (Liu et al., 2009). Naproti tomu o mikrobiologii boreálních KSP není známo skoro nic. Cílem této práce bylo testovat hypotézu, že spodní vrstvy KSP z boreální oblasti, které obsahují rozsáhlé zásoby C a N akumulované během vývoje těchto půd (Paasonen-Kivekas a Yli-Halla, 2005), obsahují mikrobiální společenstva schopná za určitých podmínek využívat akumulovanou organickou hmotu a produkovat plynné metabolity.

Materiál a metody

Na pokusné stanici Univerzity v Helsinkách na lokalitě poblíž pobřeží Finského zálivu Baltského moře (Mokma et al., 2000) byly v září 2009 odebrány vzorky z půdního profilu KSP a z profilu kontrolní (nesulfátové) půdy. Vzorky byly odebírány po jednotlivých genetických horizontech obou půd, a to celkem 7 vzorků z KSP a 6 vzorků z kontrolní půdy. Vzorky byly odebrány vždy v jednom profilu každé půdy v 10 opakováních. Pro účely odběru vzorků byly na stanovištích vybagrovány jámy o rozměrech cca 3x3 m do hloubky kolem 2 m a vzorky odebrány během 2 hodin. Během této doby byla prosakující spodní voda odčerpávána výkonnými čerpadly. Základní informace o půdách jsou uvedeny v tabulce 1.

Horizont	Hloubka cm	Textura			pH ^a		KVK ^b cmol	Celková S g kg ⁻¹
		písek %	prach %	jíl %	(1)	(2)		
KSP								
Ap	0 - 28	4	63	33	6.4	5.8	21.1	0.91
Bg1	28 - 36	2	66	32	5.0	4.8	16.6	0.86
Bg2	36 - 72	3	49	48	4.4	4.3	20.5	0.94
Bgjc	72 - 102	5	34	61	3.8	3.9	26.9	4.21
BCgc	102 - 128	4	39	57	4.2	3.5	27.8	4.57
Cg1	128 - 165	2	40	58	6.5	3.3	37.4	14.87
Cg2	165 - 180	2	34	64	7.5	3.4	40.9	18.97
Kontrola								
Ap	0 - 28	18	41	41	6.2	5.4	24.0	0.91
Bg1	28 - 60	16	40	44	4.9	4.6	14.2	0.84
Bg2	60 - 70	4	54	42	4.8	4.4	12.2	0.59
BC	70 - 100	3	13	84	4.4	4.2	23.4	0.89
1Cg	100 - 117	68	23	9	5.2	5,1	2.0	0.03
2Cg	117 - 165	2	12	86	6.2	5.6	21.2	0.52

Tab. 1. Vybrané fyzikální a chemické vlastnosti kyselé sulfátové půdy (KSP) a kontrolní půdy z experimentální stanice u Helsinek, Finsko (upraveno z Mokma et al., 2000). ^apH = ve vodě stanovené ihned po odběru (1) a po inkubaci vzorků v aerobních podmínkách (2), ^bKVK = potenciální kationtová výměnná kapacita.

Podrobnější údaje o půdách a lokalitách, jakož i další výsledky uvádějí Šimek et al. (2011). Vzorky byly převezeny do laboratoře, homogenizovány a ihned uloženy při +4°C. Během cca 2 měsíců byly provedeny analýzy mikrobiálních a chemických charakteristik. Použité metody uvádí podrobně Šimek et al. (2011).

Výsledky a diskuse

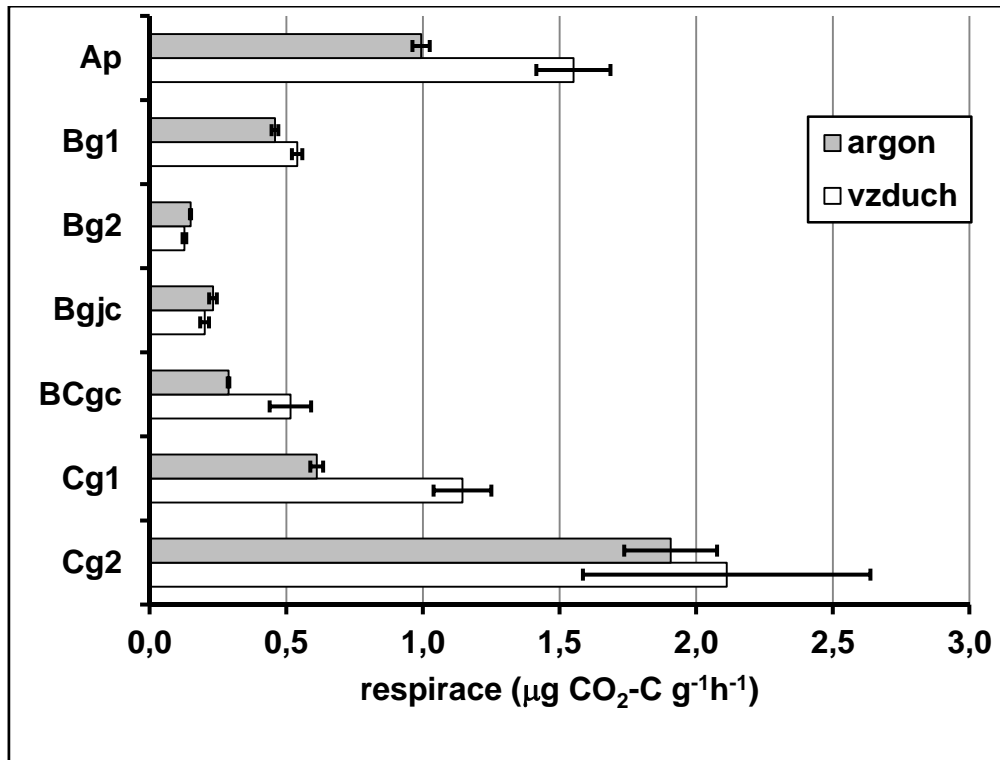
Z charakteristik obou půd (tabulka 1) je vidět, že podle předpokladu má půda z hlubších horizontů kyselé sulfátové půdy při provzdušnění velkou kapacitu produkovat aciditu (viz snížení pH v horizontu BCgc z hodnoty 4,2 na hodnotu 3,5, z horizontu Cg1 z hodnoty 6,5 na 3,3 a z horizontu Cg2 z hodnoty 7,5 na 3,4), zatímco u kontrolní půdy k tak výraznému snížení pH nedošlo. Poslední 4 spodní horizonty KSP také obsahují velké množství síry. Snížení pH a obsah síry tedy jasně prokázaly, že se jedná o kyselou sulfátovou půdu.

Respirace vzorků inkubovaných aerobně (ve vzduchu) a anaerobně (v argonu) z jednotlivých horizontů kyselé sulfátové půdy (A) a kontrolní půdy (B) je uvedena na obrázku 1. Z obrázku vyplývá řada informací. Porovnáme-li respiraci v horizontech kyselé sulfátové půdy u vzorků inkubovaných aerobně (tedy tak, jak se většinou tato charakteristika měří), vidíme, že v povrchové vrstvě Ap byla respirace relativně vysoká ($1,55 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$) ale rychle se snižovala a ve třetím horizontu (Bg2, hloubka 36-72 cm) byla již méně než 10% ($0,13 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$). Tento průběh v půdním profilu odpovídá zhruba běžnému snížení respirace, jak bylo mnohokrát zaznamenáno a publikováno. V hlubších horizontech ale bylo zjištěno opětovné zvýšení respirace a ta byla v nejhlubším horizontu Cg2 dokonce o 36% vyšší než ve svrchním horizontu Ap ($2,11$ versus $1,55 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$).

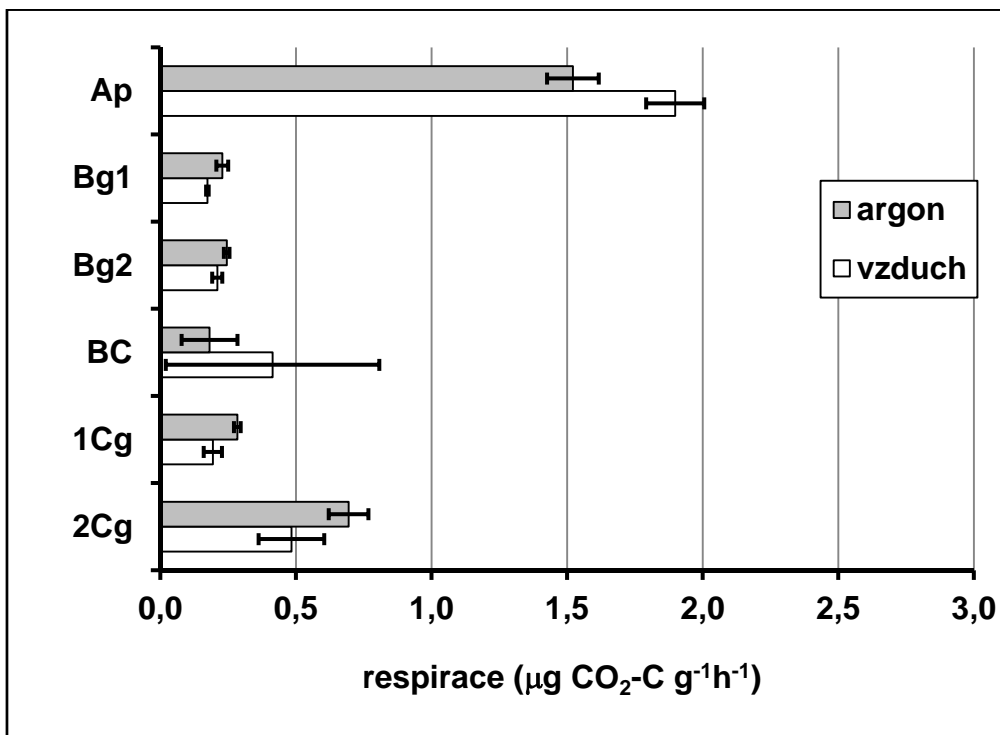
Kyselé sulfátová půda			Kontrolní půda		
Horizont	Hloubka (cm)	GIR ($\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Horizont	Hloubka (cm)	GIR ($\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$)
Ap	0 - 28	5,87 (0,60)	Ap	0 - 28	17,57 (0,49)
Bg1	28 - 36	4,80 (0,17)	Bg1	28 - 60	2,93 (0,02)
Bg2	36 - 72	2,07 (0,08)	Bg2	60 - 70	0,43 (0,01)
Bgjc	72 - 102	0,44 (0,02)	BC	70 - 100	0,89 (0,19)
BCgc	102 - 128	0,87 (0,30)	1Cg	100 - 117	2,58 (0,74)
Cg1	128 - 165	9,29 (1,88)	2Cg	117 - 165	7,50 (0,49)
Cg2	165 - 180	32,28 (1,45)			

Tab. 2. Glukosou indukovaná respirace vzorků z jednotlivých horizontů kyselé sulfátové půdy (KSP) a kontrolní půdy z experimentální stanice u Helsinek, Finsko. Jsou uvedeny průměry z 5 opakování a v závorkách směrodatné odchylky.

A



B



Obr. 1. Respirace vzorků inkubovaných aerobně (ve vzduchu) a anaerobně (v argonu) z jednotlivých horizontů kyselé sulfátové půdy (A) a kontrolní půdy (B). Jsou uvedeny průměrné hodnoty z 5 opakování a úsečkami znázorněny směrodatné odchylky.

Ze srovnání respirace aerobně a anaerobně inkubovaných vzorků je vidět, že v některých horizontech KSP byly podobné (Bg1, Bg2, Bgjc), ale ve většině horizontů KSP byla respirace aerobně inkubovaných vzorků vyšší. To se týká zejména hlubokých horizontů BCgc (zvýšení z

0,29 na 0,52 $\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$, tedy o 78%) a Cg1 (zvýšení z 0,61 na 1,15 $\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}\text{h}^{-1}$, tedy o 87%). Aerace půdy z hlubokých vrstev KSP tedy podstatně zvýšila aktivitu mikroorganismů a mineralizaci organické hmoty, a tedy produkci CO_2 z půdy.

Porovnání KSP a kontrolní půdy (obrázek 1 A a B) ukazuje, že respirace byla podobná v nejsvrchnějším horizontu Ap, v kontrolní půdě se také velmi výrazně snížila v hlubších horizontech a posléze ve spodním horizontu 2Cg byl zaznamenán nárůst respirace (jak u vzorků inkubovaných aerobně, tak i anaerobně). Zvýšení ale nebylo zdaleka tak výrazné, jako v půdě KSP.

Substrátem (glukosou) indukovanou respiraci (GIR) ve vzorcích z obou půd uvádí tabulka 2. Z tabulky vyplývá velmi podobná tendence, jako v případě respirace. V KSP se GIR snižovala až do horizontu Bgjc a poté velmi výrazně narůstala. Ve spodním horizontu Cg2 byla GIR dokonce 5,5 x vyšší, než ve svrchním horizontu Ap. Podobná, avšak podstatně méně výrazná tendence byla zjištěna i v kontrolní půdě, kde však GIR ve spodním horizontu Cg2 dosáhla pouze 43% GIR ve svrchním horizontu Ap. Protože substrátem indukovaná respirace má těsný vztah k biomase aktivních mikroorganismů ve vzorku (Anderson a Domsch, 1978), tyto výsledky ukazují na velmi bohaté mikrobiální společenstvo (= na velkou biomasu) v hlubokých horizontech studované KSP a potvrzují vysokou aktivitu, měřenou zde jako respirace půdy (viz výše). Existenci bohatých mikrobiálních společenstev v KSP potvrzují i další výsledky (Šimek et al., 2011).

Celkové počty bakterií stanovené epifluorescenční mikroskopií (barvení DAPI) byly v KSP a v kontrolní půdě v rozmezí 1,2–0,5 x 10⁹, respektive 1,74–0,3 x 10⁹ na gram suché půdy. Nejvyšší počty byly zjištěny ve svrchních horizontech Ap obou půd. V ostatních horizontech počty bakterií poklesly o 60 %, v horizontu Bg2 kontrolní půdy dokonce o 83%. Počty kultivovatelných bakterií (CFU), stanovených na neselektivním médiu R2A (Difco), byly o 2-3 řády nižší než celkové počty bakterií. V KSP byly CFU vysoké v horizontu Ap, výrazně se snížily v B horizontech a opět se zvýšily na nejvyšší hodnoty v C horizontech. Průměrné hodnoty (CFU x 10⁶ g⁻¹ suché půdy) pro Ap, Bgjc a C horizonty byly 27,89, 0,32 a 53,06. Tyto výsledky tedy potvrdily výše uvedená zjištění o vysoké respiraci a biomase (GIR) v horizontech C půdy KSP. Pro posouzení -r/K strategie bakterií v KSP bylo neočekávané zjištění, že poměr kultivovatelných k celkovým bakteriím (C/T) byl nejvyšší v nejhlubších horizontech, což indikuje přítomnost převážně r- bakteriálních strategií.

Závěr

Boreální kyselá sulfátová půda má velký potenciál generovat při provzdušnění aciditu. V této půdě byly již dříve zjištěny velké zásoby uhlíku a dusíku. Naše měření prokázala výskyt bohatých mikrobiálních společenstev v hlubokých (normálně trvale zaplavených) půdních horizontech. Mineralizace organické hmoty po případném provzdušnění těchto hlubších horizontů kyselá sulfátová půdy by mohla vést k produkci značného množství uhlíkatých a dusíkatých plynných metabolitů včetně významných tzv. skleníkových plynů, oxidu uhličitého, metanu a oxidu dusného. Tuto hypotézu je ovšem třeba dále testovat.

Poděkování

Výzkum byl podpořen grantem Grantové agentury ČR č. 526/09/1570, grantem MŠMT LC 06066 a grantem Univerzity Helsinky (BEET-projekt). L. Jíšová, E. Zadáková, V. Šlajchrtová, M. Collander, O. Nikolenko a M. Jääskeläinen provedly laboratorní analýzy.

Použita literatura

- ANDERSON, J.P.E., DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass of selected soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1978, 10, 215-221.
- DENT, D.L., PONS, L.J. A world perspective on acid sulfate soils. *Marine Pollution Bulletin*. 1995, 41, 319-326.
- FANNING, D.S. Acid sulfate soils, definition and classification. In: LAL, R., ed. *Encyclopedia of Soil Science*. New York: Marcel Dekker, 2002, 11-13. ISBN 0-8247-0634-X.
- JOUKAINEN, S., YLI-HALLA, M. Environmental impacts and acid loads from deep sulfidic layers of two well-drained acid sulfate soils in western Finland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2003, 95, 297-309.
- LAMBAIS, M.R., OTERO, X.L., CURY, J.C. Bacterial communities and biogeochemical transformations of iron and sulfur in a high saltmarsh soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40, 2854-2864.
- LIU, X.Z., ZHANG, L.M., PROSSER, J.I., HE, J.Z. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, 41, 687-694.
- MOKMA, D.L., YLI-HALLA, M., HARTIKAINEN, H. Soils in a young landscape on the coast of southern Finland. *Agricultural and Food Science in Finland*. 2000, 291-302.
- NICOMRAT, D., DICK, W.A., DOPSON, M., TUOVINEN, O.H. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40, 312-321.
- PAASONEN-KIVEKAS, M., YLI-HALLA, M. A comparison of nitrogen and carbon reserves in acid sulphate and non acid sulphate soils in western Finland. *Agricultural and Food Science*. 2005, 14, 57-69.
- RABENHORST, M.C., FANNING, D.S., BURCH, S.N. Acid sulfate soils, formation. In: LAL, R., ed. *Encyclopedia of Soil Science*. New York: Marcel Dekker, 2002, s. 14-18. ISBN 0-8247-0634-X.
- RITSEMA, C.J., van MENSVOORT, M.E.F., DENT, D.L., TAN, Y., van den BOSCH, H., van WIJK, A.L.M. Acid sulfate soils. In: SUMNER, M.E., ed. *Handbook of Soil Science*. Boca Raton: CRC Press, 2000, s. G-121 – G-153. ISBN 0-8247-0888-X.
- ŠIMEK, M. *Základy nauky o půdě. 3. Biologické procesy a cykly prvků*. České Budějovice: Biologická fakulta JU, 2003, 151 s. ISBN 80-7040-630-5.
- ŠIMEK, M., VIRTANEN, S., KRIŠTŮFEK, V., SIMOJOKI, A., YLI-HALLA, M. Evidence of rich microbial communities in subsoil of boreal acid sulphate soil conducive to greenhouse gas emissions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2011, 140, 113-122

YLI-HALLA, M. Classification of acid sulphate soils of Finland according to Soil Taxonomy and the FAO/Unesco legend. *Agricultural and Food Science in Finland*. 1997, 6, 247-258.

TVORBA A SPOTŘEBA METANU V PŮDĚ TERESTRICKÉHO EKOSYSTÉMU

PRODUCTION AND CONSUMPTION OF METHANE IN TERESTRIAL ECOSYSTEM SOIL

^{1,2}Šimek Miloslav, ¹Hynšt Jaroslav, ¹Chroňáková Alica, ¹Elhottová Dana, ¹Šustr Vladimír, ^{1,2}Semanová Stanislava, ¹Procházková Helena

¹Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

²Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Abstract

Soils play an important role in global methane cycling. Pasture soils can be either net source or sink of methane. In a field experiment on the cattle overwintering area, methane emissions were measured using 24 chambers during 81 days in the period from April to June. Relatively large emissions, reaching mean value of 13.11 mg CH₄-C m⁻²h⁻¹, were found during the experimental period. Average cumulative methane emissions were 31.2 kg CH₄-C ha⁻¹. At the end of experiment, however, also negative fluxes were sometimes determined, suggesting methane oxidation in the soil. In laboratory experiment the rate of methane oxidation in individual layers of the soil profile up to 16 cm depth were determined. The highest rate of methane oxidation, about 7 ng CH₄-C g⁻¹h⁻¹, was found in a depth of about 5 cm. In the soil layer 2-8 cm, the methane oxidation rate was about 3 times higher than in the soil layer of 14-16 cm. Results confirm large space heterogeneity and temporal variability of both methanogenesis and methane oxidation in the soil under study.

Key words: cattle; pasture soil; soil profile; methane; emission

Úvod

Metan je jeden z nejučinnějších tzv. skleníkových plynů, jeho současná koncentrace v atmosféře, přesněji v nižší troposféře, je kolem 1,8 μl l⁻¹ (1,8 ppmv) a stále se mírně zvyšuje. Atmosférická koncentrace metanu je výslednicí globální produkce a emisí metanu do atmosféry a globální oxidace metanu v atmosféře radikály OH a biologické spotřeby metanu v půdách, vodách a sedimentech.

Půdy jsou jedním z významných zdrojů metanu, zvláště půdy přirozených i umělých mokřadů, rýžových polí a také půdy některých pastvin. Metan vzniká v půdách činností metanogenních archeí za anaerobních podmínek – v těchto podmínkách může být metan hlavním koncovým uhlíkatým metabolitem při rozkladu organické hmoty. Naopak v aerobních nebo převážně aerobních podmínkách a mikroprostředích v půdách se metan oxiduje na CO₂ případně zabudovává do biomasy, a to činností metanotrofních mikroorganismů.

Kontaktní adresa: Miloslav Šimek

Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

email: misim@upb.cas.cz

Bilance metanu v půdě je tedy výsledkem vztahu mezi produkcí a spotřebou metanu. Uvádí se, že většina metanu, který v půdě vzniká (v hlubších vrstvách a v anoxických mikroprostředích) se ještě v půdě spotřebová (ve svrchních vrstvách a v oxických mikroprostředích) a tak je tedy netto (čistá) produkce metanu z půdy (=emise metanu z půdy do atmosféry) podstatně nižší, než celková hrubá produkce metanu v půdě (viz např. Galchenko et al., 1989). Některé půdy jsou z hlediska bilance metanu producenti, jiné konzumenti metanu. Tato role půdy se může měnit v čase a také vlivem využití dané půdy. Přibližně platí, že lesní půdy mohou oxidovat více metanu než půdy zemědělské, půdy travních porostů včetně pastevních půd oxidují více metanu než orné půdy, půdy nehnojené oxidují více metanu než hnojené půdy, atp. (Powlson et al., 1997).

Půdy extenzivních pastvin využívané pro pastvu dobytka s malým zatížením (malým počtem hospodářských zvířat na jednotku výměry pastviny) jsou pravděpodobně globálním spotřebitelem metanu a převládá v nich oxidace metanu nad jeho produkcí. V pastevních ekosystémech ale existují (v prostorovém a časovém smyslu) lokality a události, které podporují tvorbu metanu a mohou zvrátit celkovou bilanci pastevní půdy tak, že metan je z ní emitován do atmosféry. Pastevní půda při větším zatížení dobyt看em má zvýšený přísun organické hmoty a živin včetně dusíku v exkrementech, dobytek svým pocházením utužuje půdu a jinak přímo i nepřímo ovlivňuje strukturu půdy a její vodní a vzdušný režim. Za těchto okolností mohou v pastevní půdě převážet procesy tvorby metanu nad procesy jeho spotřeby a dochází k emisím metanu z půdy.

Cílem naší práce bylo kvantifikovat produkci a emise metanu a oxidaci metanu v pastevní půdě intenzivně využívané pro zimování skotu. Práce je součástí dlouhodobého výzkumu mikrobiálních procesů přeměn C a N v ekosystému zimoviště skotu (viz např. Šimek et al., 2006; Hynšt et al., 2007; Radl et al., 2007; Chroňáková et al., 2009; Hynšt a Šimek, 2009; Čuhel et al., 2010 a Čuhel a Šimek, 2011).

Materiál a metody

Studium probíhalo na farmě Borová nedaleko Českého Krumlova v jižních Čechách. Plocha o výměře asi 4 ha je využívána jako zimoviště pro zhruba 90 kusů skotu od roku 1995. Na této ploše byly studovány různé lokality s odlišným stupněm zatížení dobyt看em. Půda na ploše je charakterizována jako Haplic Phaeozem (WRB; Brůček et al., 2009). Více podrobností o výzkumné lokalitě uvádí Šimek et al. (2006) a Hynšt et al. (2007).

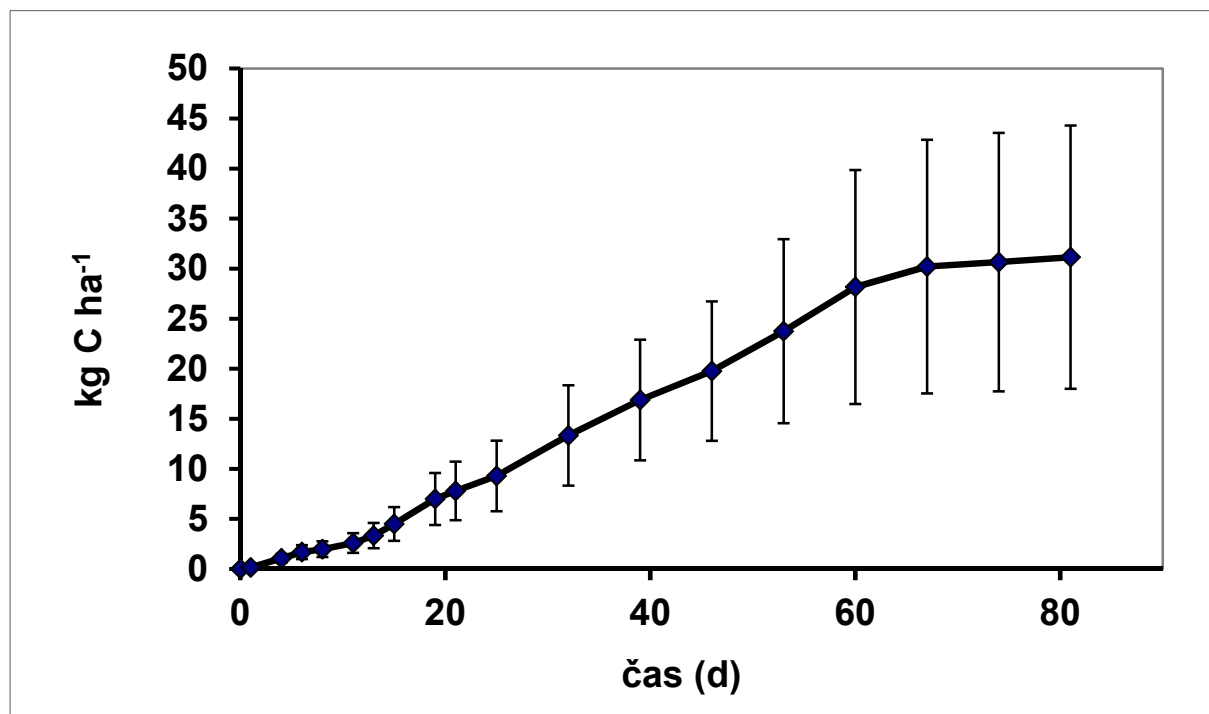
Měření emisí metanu v polních podmínkách probíhalo v období 7.4. až 27.6.2011 a jeho cílem bylo zjistit, jak velké jsou emise metanu z pastevní půdy a dále jak proměnlivé mohou být v čase a na ploše, tzn. jaká je heterogenita emisí. Emise byly měřeny pomocí 24 komor (Hynšt et al., 2007) instalovaných na dobu experimentu na lokalitě, která byla v předchozím zimním období, tj. od konce října 2010 do začátku dubna 2011, využita jako zimoviště skotu. Půda na lokalitě byla silně, ale nestejněměrně na stanovištích jednotlivých komor, ovlivněna skotem, jak vyplývalo i z obsahu C a N v půdě na začátku měření (data nejsou součástí tohoto příspěvku). Emise byly v daném období stanoveny celkem 19x. Vzorky plynů z emisních komor byly vždy převezeny do laboratoře v plynotěsných zkumavkách a CH₄ byl stanoven na plynovém chromatografu.

Laboratorní studium rychlosti oxidace metanu v půdě bylo provedeno na podzim 2011. Půdní vzorky byly odebrány jako neporušené monolity o průměru 7,8 cm z vrstvy půdy 0-12 až 16 cm (z technických důvodů, kvůli větším kamenům v půdě, jsme odebrali 4 monolity do 16 cm, 1 monolit do 14 cm a 3 monolity pouze do 12 cm), náhodně na vymezené ploše. Těsně před měřením mikrobiálních charakteristik byly monolity ostrým nožem rozděleny na jednotlivé díly o výšce 2 cm. Měření rychlosti oxidace metanu v půdě spočívalo ve stanovení úbytku CH_4 v inkubační atmosféře v lahvi s půdou během stanovené doby 72 hodin inkubace v definovaných podmínkách při 20°C. Kromě oxidace metanu byly měřeny i další charakteristiky včetně respirace půdy (produkce CO_2). Metan a oxid uhličitý byly stanoveny plynovou chromatografií.

Výsledky a diskuse

Emise metanu z půdy

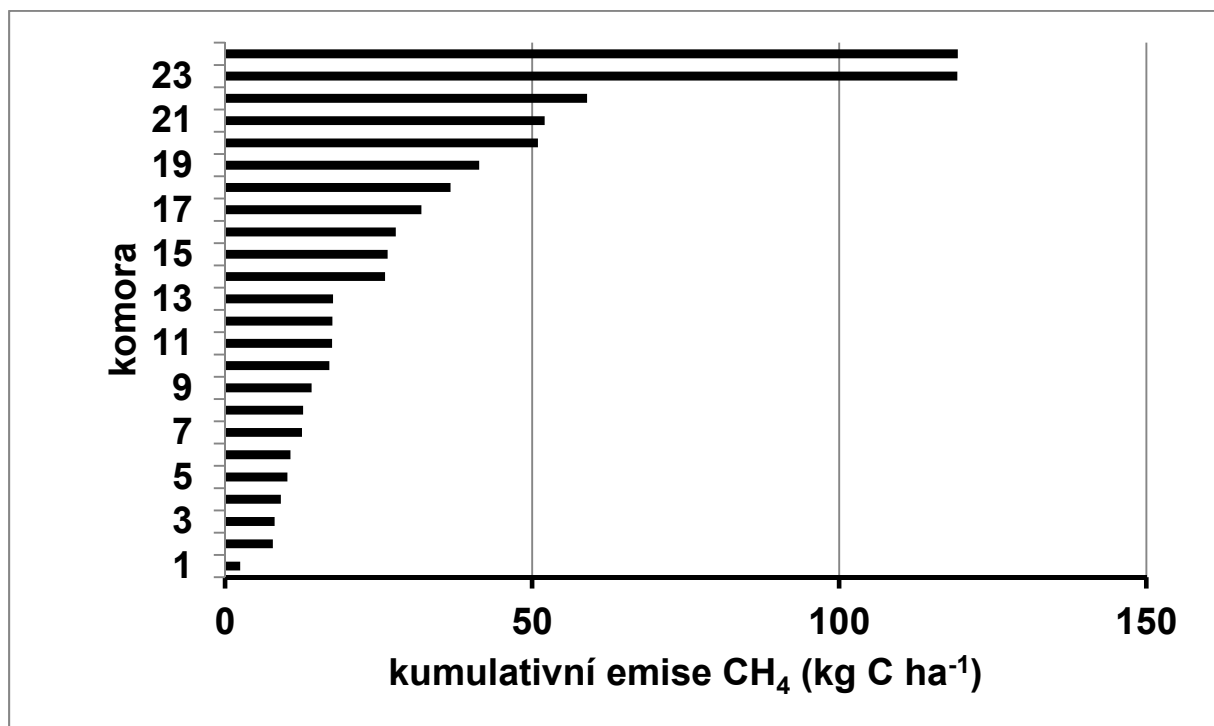
Kumulativní emise metanu v pokusném období 81 dnů uvádí obrázek 1. Jsou na něm znázorněny průměrné hodnoty z 24 komor a intervaly spolehlivosti průměrů pro pravděpodobnost 95%. Z obrázku vyplývá, že prvních asi 60 dnů, tedy víceméně v průběhu dubna a května, se průměrné kumulativní emise zvyšovaly přibližně lineárně. S velikostí kumulativních emisí také narůstala variabilita hodnot, jak vyplývá z rostoucích intervalů spolehlivosti průměrů, které jsou ke konci pokusného období velmi široké (bez ohledu na to, že pro měření emisí bylo použito 24 komor!).



Obr. 1. Průběh kumulativních emisí metanu během 81 dnů experimentu. Jsou zobrazeny průměry ($n=24$) a intervaly spolehlivosti pro P 95%.

To ukazuje na velmi velkou heterogenitu zkoumané lokality pokud se jedná o emise metanu z půdy. Velkou heterogenitu dokumentuje i obrázek 2. Na obrázku jsou znázorněny

kumulativní emise v jednotlivých komorách za pokusné období 81 dnů (seřazených od komory s nejvyšší hodnotou po komoru s nejnižší hodnotou kumulativních emisí metanu). V komoře s nejvyššími emisemi byly zjištěny emise 119,3 kg CH₄-C ha⁻¹ za pokusné období 81 dnů, zatímco nejnižší emise byly pouhých 2,5 kg CH₄-C ha⁻¹, což odpovídá průměrným maximálním a minimálním denním emisím 1,47, respektive 0,03 kg CH₄-C ha⁻¹ d⁻¹. Emise metanu na studované lokalitě se tedy lišily v rozsahu dvou řádů, v závislosti na pozici měřicí komory. Časová proměnlivost emisí na určitém místě pokusné plochy byla také extrémní, např. v komoře s maximální kumulativní hodnotou kolísaly emise v rozsahu 0,02 – 13,11 mg CH₄-C m⁻²h⁻¹ a průměrné emise (ve 24 komorách) v rozsahu 0,026 – 2,96 mg CH₄-C m⁻²h⁻¹. Podobně jako u kumulativních emisí za celé pokusné období jde o rozpětí 2 řádů. Ke konci experimentálního období byly v několika komorách dokonce zjištěny *negativní emise*, tedy spotřeba CH₄ v půdě namísto emisí CH₄ z půdy.



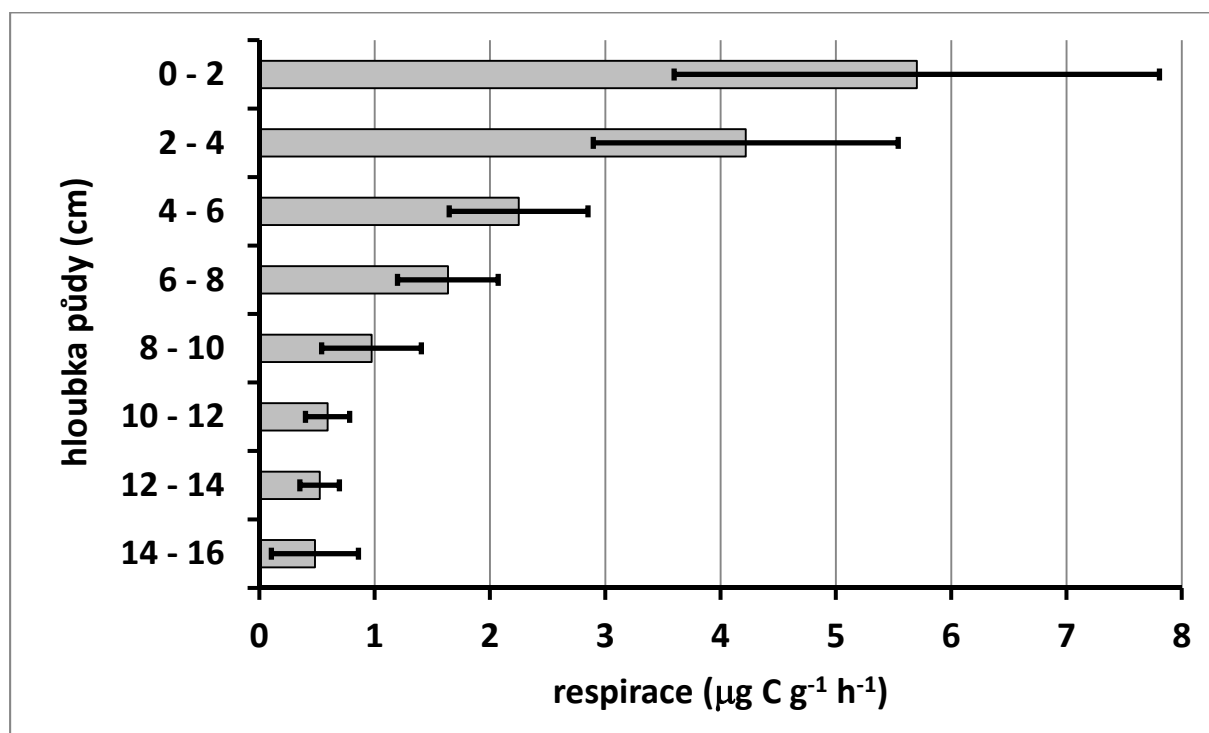
Obr. 2. Kumulativní emise metanu v jednotlivých měřicích komorách za 81 dnů experimentu. Komory jsou seřazené sestupně od nejvyšší k nejnižší hodnotě, bez ohledu na pozici komory na ploše.

Průměrná kumulativní hodnota emisí 31,2 kg CH₄-C ha⁻¹ za pokusné období 81 dnů, tedy 0,39 kg CH₄-C ha⁻¹ d⁻¹, vypovídá o celkově poměrně vysokých emisích metanu na pokusné lokalitě zimoviště skotu, srovnatelných s emisemi z rýžových polí (Qin et al., 2010), která platí za lokality s nejvyššími emisemi metanu vůbec. Je ovšem velmi ošidné přepočítávat emise na delší časové období, pokud nebyly měřeny kontinuálně a pokud tedy zjištěné hodnoty nejsou skutečným integrálem emisí za daný časový úsek. Kdybychom např. použili průměrnou hodnotu denních emisí (0,39 kg CH₄-C ha⁻¹ d⁻¹), jednoduchým výpočtem stanovíme roční emise na lokalitě na 142 kg CH₄-C ha⁻¹ rok⁻¹. Vzhledem k výše uvedené časové proměnlivosti emisí a jejich určité (ale neznámé) dynamice v průběhu roku je výpočet evidentně nesmyslný. Nepřesnost podobných přepočtů ještě násobí existence diurnálního (=během dne a noci,

během 24 hodin) kolísání emisí. Např. v této práci jsme diurnální kolísání zanedbali a denní emise byly vypočítány z emisí ve skutečnosti měřených mezi 9. a 10. hodinou dopolední. I když z jiných našich měření na lokalitě vyplývá, že v této denní době jsou emise přibližně průměrné v časovém období 24 hodin, jedná se nicméně o nepřesnost. Dále je třeba připomenout, že emise byly během 81 dnů měřeny pouze v 19 dnech (s intervaly mezi měřeními 2-7 dnů) a denní průměry poté vztahovány i na sousední (měřením nepokryté) dny. Všechny tyto úvahy vedou nutně k závěru, že i přes relativně velmi pracné a náročné měření (24 komor, 19 měřicích dnů) jsou nakonec zjištěné hodnoty pouhým přibližným odhadem skutečnosti, a smyslem tohoto příspěvku je mj. upozornit na malou výpovědní hodnotu zdánlivě přesných údajů o velikosti emisí (neboť mnohé z uvedeného lze zobecnit a neplatí jen pro daný experiment).

Oxidace metanu v půdě

Výsledky stanovení bazální respirace půdy v jednotlivých vrstvách půdních monolitů v experimentu se stanovením rychlosti oxidace metanu jsou uvedeny na obrázku 3. Z obrázku je zřejmé, že nejvyšší respirace byla zjištěna v povrchové vrstvě půdy (ve vrstvě 0-2 cm) a do hloubky se poměrně rychle snižovala, a to až do vrstvy 10-12 cm.

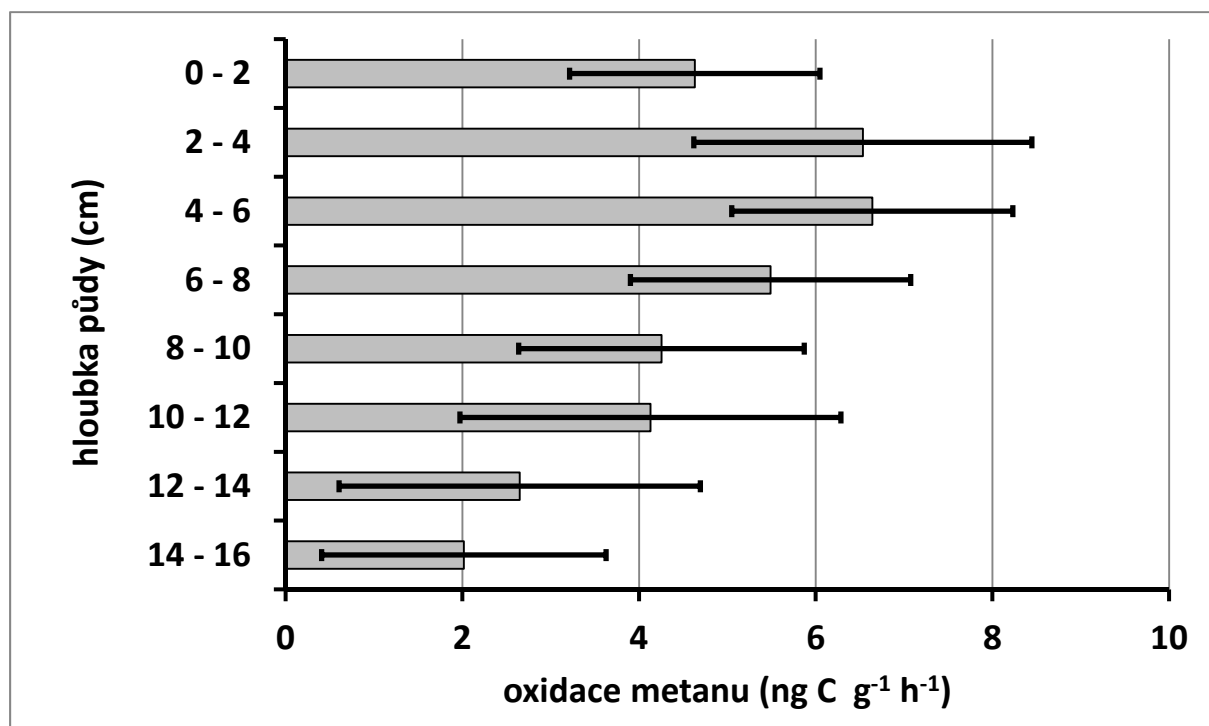


Obr. 3. Respirace v půdním profilu. Jsou uvedeny aritmetické průměry z 8 monolitů (vrstvičky 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10 a 10-12cm), z 5 monolitů (vrstva 12-14 cm) a 4 monolitů (vrstva 14-16 cm). Úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti průměrů pro P 95%.

Ve větší hloubce byla respirace ještě nižší, ale pokles již nebyl výrazný. Z obrázku také vyplývá velká prostorová heterogenita půdy, protože intervaly spolehlivosti průměrů jsou velké. Kvůli velké heterogenitě nebyly také často rozdíly mezi vrstvami půdy statisticky průkazné (hodnoceno podle překryvu intervalů spolehlivosti aritmetických průměrů).

Distribuce respirační aktivity v půdním profilu byla v souladu s obecným jevem, kdy v půdách pod travními ekosystémy i v jiných zemědělsky využívaných půdách se typicky nachází nejvíce mikrobů ve svrchní vrstvě několika centimetrů půdy a do hloubky půdy ubývá jak kořenů rostlin, tak organické hmoty a také mikroorganismů. Tento trend se tedy potvrdil i v naší sledované půdě a kromě mikrobiálních charakteristik byl doložen i rovnoměrným poklesem mikrobiální biomasy a obsahu organického uhlíku v půdním profilu (tato data zde nejsou uvedena).

Oxidace metanu je zajišťována specifickou skupinou tzv. metanotrofních bakterií. O jejich výskytu v půdách je známo mnohem méně než obecně o výskytu mikroorganismů. Domnívali jsme se, že by distribuce metanotrofních bakterií (a distribuce metanotrofní aktivity) mohla být stejná, jako nejčastěji uvažovaná distribuce mikroorganismů, s nejvyšším výskytem při povrchu půdy a snižujícím se výskytem v půdním profilu. Výsledky měření rychlosti oxidace metanu v půdních vzorcích z různých vrstev půdy jsou uvedeny na obrázku 4. Z obrázku je zřejmé, že se tento předpoklad nepotvrdil. Ukázalo se, že ve svrchní vrstvičce půdy (0-2 cm) je sice relativně vysoká rychlost oxidace metanu, vyšší, než v hloubce kolem 10 cm a níže, ale rychlost oxidace metanu ve vrstvách 2-4, 4-6 a 6-8 cm byla vyšší, než v povrchové vrstvě půdy.



Obr. 4. Rychlost oxidace metanu v půdním profilu. Úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti průměrů pro P 95%. Další detaily viz legenda obrázku 3.

Protože je půda heterogenní, v každém z odebraných půdních monolitů byly zjištěny poněkud rozdílné mikrobiální charakteristiky. Statistickou průkaznost rozdílů jsme hodnotili metodou intervalů spolehlivosti aritmetických průměrů, jednak proto, že jsme měli k dispozici různý počet vzorků pro jednotlivé vrstvy půdy a také proto, že metoda dobře vizuálně vyhodnocuje rozdíly mezi průměry (Vacková, 1985; Glantz, 1997). Z obrázku 4 vidíme, že většina rozdílů je statisticky neprůkazná. Intervaly spolehlivosti jsou totiž poměrně široké a to smazává rozdíly

mezi vrstvičkami půdy. Šířka intervalů spolehlivosti odpovídá rozpětí hodnot, z nichž se počítala průměrná hodnota. Je tedy vidět, že v našem případě byla heterogenita půdy, pokud jde o rychlost oxidace metanu, velmi vysoká. Heterogenita půdy ovšem obecně bývá vysoká, a to jak ve smyslu plošném, tak v půdním profilu. Tento fakt bohužel komplikuje studium půdy a dá se obejít jen tak, že se zkoumá mnoho půdních vzorků, čímž se zvýší výpovědní hodnota zjištěných informací a často se také snáze odhalí případné rozdíly mezi půdami apod. Nicméně nás zjištěné výsledky a jejich statistická analýza opravňují k tvrzení, že rychlost oxidace metanu v půdním profilu studované pastevní půdy byla různá a byla statisticky průkazně vyšší ve vrstvě půdy 2-8 cm než ve vrstvě půdy 14-16 cm. Ve vrstvě půdy 2-8 cm byla přibližně 3x vyšší než ve vrstvě půdy 14-16 cm. Výsledky také naznačují, že oblast nejvyšší rychlosti oxidace metanu v půdě by nemusela být v nejsvrchnější vrstvičce půdy, ale v hloubce kolem 5 cm; tyto indicie ale nejsou statisticky průkazné.

Závěr

Zjistili jsme, že v půdě ovlivněné skotem se ještě dva měsíce po odsunu skotu na jiné pastviny produkuje mnoho metanu. Emise metanu byly v některých lokalitách pokusné plochy velmi vysoké a dosahovaly až 13,11 mg CH₄-C m⁻²h⁻¹. Průměrné emise byly v průběhu 81 dnů experimentu v rozsahu 0,026 – 2,96 mg CH₄-C m⁻²h⁻¹ a průměrná kumulativní hodnota emisí činila 31,2 kg CH₄-C ha⁻¹ za pokusné období. Oxidace metanu v půdním profilu do 16 cm nebyla stejná, maximální rychlost oxidace kolem 7 ng CH₄-C g⁻¹h⁻¹ jsme zjistili v hloubce kolem 5 cm. Potvrdila se jednak velká plošná a prostorová heterogenita procesů tvorby a spotřeby metanu, jednak extrémní časová dynamika emisí. Pastevní půdy mohou být čistým zdrojem nebo spotřebitelem metanu.

Poděkování

Výzkum byl podpořen grantem Grantové agentury ČR č. 526/09/1570 a grantem MŠMT LC 06066. L. Jíšová, V. Šlajchrtová a M. Stehlíková provedly laboratorní analýzy.

Použita literatura

- BRŮČEK, P., ŠIMEK, M., HYNŠT, J. Long-term animal impact modifies potential production of N₂O from pasture soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2009, 46, 27-36.
- ČUHEL, J., ŠIMEK, M. Proximal and distal control by pH of denitrification rate in a pasture soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2011, 141, 230-233.
- ČUHEL, J., ŠIMEK, M., LAUGHLIN, R.J., BRU, D., CHÈNEBY, D., WATSON, C.J., PHILIPPOT, L. Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76, 1870-1878.
- GALCHENKO, V.F., LEIN, A., IVANOV, M. Biological sinks of methane. In: ANDREAE, M.O., SCHIMMEL, D.S., eds. *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*. Chichester: John Wiley and Sons, 1989, 59-71.
- GLANZ, S.A. *Primer of biostatistics*. 4. vydání. New York: MacGraw-Hill, 1997, 473 s.

- HYNŠT, J., ŠIMEK, M. N₂O emissions from low and moderately disturbed pasture soils - field tests of minimal and maximal N supply. *Plant Soil*. 2009, 320, 195-207.
- HYNŠT, J., ŠIMEK, M., BRŮČEK, P., PETERSEN, S.O.: High fluxes but different patterns of nitrous oxide and carbon dioxide emissions from soil in a cattle overwintering area. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2007, 120, 269-279.
- CHROŇÁKOVÁ, A., RADL, V., ČUHEL, J., ŠIMEK, M., ELHOTTOVÁ, D., SCHLOTER, M. Overwintering management on upland pasture causes shifts in an abundance of denitrifying microbial communities, their activity and N₂O-reducing ability. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, 41, 1132-1138.
- POWLSON, D.S., GOULDING, K.W.T., WILLISON, T.W., WEBSTER, C.P., HUTSCH, B.W. The effect of agriculture on methane oxidation in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 1997, 49, 59-70.
- RADL, V., GATTINGER, A., CHROŇÁKOVÁ, A., NĚMCOVÁ, A., ČUHEL, J., ŠIMEK, M., SCHLOTER, M., ELHOTTOVÁ, D. Effects of cattle husbandry on abundance and activity of methanogenic archaea in upland soils. *Nature ISME Journal*. 2007, 1, 443-452.
- QIN, Y., LIU, S., GUO, Y., LIU, Q., ZOU, J. Methane and nitrous oxide emissions from organic and conventional rice cropping systems in Southeast China. *Biology and Fertility of Soils*. 2010, 46, 825-834.
- ŠIMEK, M., BRŮČEK, P., HYNŠT, J., UHLÍŘOVÁ, E., PETERSEN, S.O. Effects of excretal returns and soil compaction on nitrous oxide emissions from a cattle overwintering area. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2006, 112, 186-191.
- VACKOVÁ, V. *Návody pro cvičení ze šlechtění rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1985, 109 s.

Názov: Zborník vybraných príspevkov z konferencie
Život v pôde s tematickým zameraním:
Antropogenní ovlivnění života v půde

Vydavateľ: Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre

ISBN: 978-80-552-1008-7

Rukopis neprešiel redakčnou úpravou vo vydavateľstve