

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



**Denitrifikace v půdách s různě velkými
vstupy živin**

Bakalářská diplomová práce

Gabriela Říhová

2007

Vedoucí práce: Prof. Ing. Miloslav Šimek, CSc.

ŘÍHOVÁ G., DENITRIFIKACE V PŮDÁCH S RŮZNĚ VELKÝMI VSTUPY ŽIVIN (DENITRIFICATION IN SOILS WITH DIFFERENT NUTRIENT INPUTS), 39 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this thesis was to estimate denitrification activity in four agricultural soils which are managed differently regarding type and amount of fertilizers. Potential denitrification, soil respiration and denitrifying enzyme activity were determined in laboratory experiments. In additional experiment, the impact of changes in soil pH on denitrification characteristics was studied.

Poděkování

Mé poděkování patří mému školiteli Miloslavu Šimkovi za vybrání tématu této práce ,za pomoc a rady při jejím zpracovávání a za trpělivost. Jaroslavu Hynštovi za pomoc při statistickém vyhodnocení a za věcné připomínky k obsahu. Dále chci poděkovat Veronice Šlajchrtové, Elišce Zadákové, Lindě Jíšové a Jiřímu Čuhelovi za pomoc při laboratorních experimentech. Ing. Pavlu Růžkovi, CSc. děkuji za poskytnutí půd k experimentům a za informace o vlastnostech těchto půd..

Práce vznikla při řešení grantového projektu GA AV ČR č. IAA 600660605 a byla podpořena i Centrem environmentální mikrobiologie LC06066.

Souhlasím s tím, že tato bakalářská práce bude uveřejněna na stránkách fakulty.

V Českých Budějovicích, 10. května 2007

.....

Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	4
2. Literární přehled.....	7
2.1. Proces denitrifikace.....	7
2.2. Další procesy, při kterých se uvolňuje N ₂ O.....	8
2.3. Faktory ovlivňující denitrifikaci.....	11
2.4. Procesy, na kterých se podílí N ₂ O.....	12
2.5. Dusík v půdě a jeho přístupnost pro mikroorganismy.....	14
2.6. Význam hnojení, druhy hnojiv.....	15
2.7. Nepříznivé dopady nadměrného hnojení.....	16
3. Materiál a metody.....	16
3.1. Pokusná plocha a studované půdy.....	16
3.2. Odběry a úprava vzorků půd.....	17
3.3. Laboratorní analýzy.....	17
3.3.1. Stanovení okamžité vlhkosti a tzv. sušiny půdy gravimetricky.....	17
3.3.2. Stanovení denitrifikačního potenciálu (DP).....	17
3.3.3. Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA).....	18
3.4. Statistická analýza výsledků.....	19
4. Výsledky.....	20
4.1. Potenciální denitrifikace v různě hnojených půdách - produkce N ₂ O.....	20
4.1.1. Půda nehnojená (č.111).....	20
4.1.2. Půda hnojená hnojem (č.211).....	21
4.1.3. Půda hnojená směsí kejdy skotu a slámy (č.611).....	22
4.1.4. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č.281).....	24
4.2. Potenciální denitrifikace v různě hnojených půdách - produkce CO ₂	25
4.2.1. Půda nehnojená (č.111).....	25
4.2.2. Půda hnojená hnojem (č.211).....	26
4.2.3. Půda hnojená směsí kejdy skotu a slámy (č.611).....	27
4.2.4. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č.281).....	29
4.3. Aktivita denitrifikačních enzymů v různě hnojených půdách s původním a pozměněným pH.....	30
4.3.1. Půda nehnojená (č.111).....	30
4.3.2. Půda hnojená hnojem (č.211).....	31
4.3.3. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č.281).....	33
5. Diskuse.....	34
6. Závěry.....	37
7. Literatura.....	38

1. Úvod a cíle práce

Dusík v biosféře podléhá mnoha procesům a přeměnám. K těm nejdůležitějším patří denitrifikace, která má výsadní pozici v interakci půda – atmosféra, protože jako jediná umožňuje zpětný návrat plynného molekulárního dusíku do atmosféry, odkud je odčerpáván biologickou i fyzikálně-chemickou a průmyslovou fixací. Obecně se jedná o disimilační proces, kdy jsou organické látky rozkládány na látky anorganické a nitrát (nebo nitrit) je využíván jako terminální akceptor elektronů místo molekulárního kyslíku. Pro průběh respirační denitrifikace je tedy nezbytné anaerobní prostředí. Takových je v půdě velmi mnoho, vyskytují se v půdních agregátech nebo v různých jiných mikroprostředích.

Chemicky je denitrifikace redukce nejoxidovanější formy dusíku, kdy nitrátové a nitritové anionty, které jsou snadno přístupné pro mikroorganismy, jsou přeměněny na oxidy, které mohou být jak meziprodukty, tak i finálními produkty a reakce jako taková končí u plynného dusíku unikajícího do atmosféry, který je její běžnou součástí.

Molekulární dusík nepředstavuje pro organismy žádné nebezpečí, ba naopak je nezbytně nutný pro sinice a bakterie fixující dusík, které jsou na něm závislé. Jinak je tomu však u oxidu dusného (N_2O), který je sice ve stopových množstvích běžnou součástí atmosféry, ale jeho koncentrace se stále zvyšuje. Oxid dusný je považován za jeden z velmi účinných skleníkových plynů a společně s oxidem dusičitým se podílí na narušování stratosferické ozonové vrstvy chránící život před nebezpečnými ultrafialovými paprsky, dále se podílí na vzniku fotochemického smogu sužujícímu velká města, na kyselých depozicích a na skleníkovém efektu (viz kapitola 2.5). Koncentrace oxidu dusného v atmosféře se pohybuje okolo 310 ppbv a roční přírůstek je odhadován na 0,6 – 0,9 ppbv za rok (Mosier, 1996) Odhaduje se, že zvýšení koncentrace N_2O na dvojnásobek by vedlo k poklesu množství stratosferického ozónu o 11 až 16% (<http://bezjedu.arnika.org>).

Největšími zdroji oxidu dusného jsou zemědělská činnost a půdy vůbec, průmyslová výroba organických a anorganických kyselin a v menší míře i doprava letecká a pozemní.

S neustálým zvyšováním nároků na zemědělskou výrobu a na její zefektivnění jsou do půdy přidávána hnojiva anorganického i organického původu a v různých formách pro zvýšení produkce biomasy hospodářských plodin. S poptávkou po stále vyšší produkci roste poptávka po látkách, které pomáhají lepší výživě plodin a které jsou do půdy dodávány ve stále větším množství. V ČR bylo např. za hospodářský rok 2004/2005 aplikováno 279 818 t minerálních hnojiv, z toho 73,8% hnojiv dusíkatých (Anonym, 2006). Vstup hnojiv do půdy

je veliký, ale jen malá část z něj je opravdu zabudována do biomasy. Podstatná část živin a zejména dusíku se v půdě nevyužije a ve formě plynů nebo rozpuštěných látek se z půdy uvolňuje - emituje do ovzduší a vyplavuje se do vod. Denitrifikaci je v tomto případě prisuzován velký podíl na ztrátách dusíku dodávaného do zemědělských půd (až 80%), tudíž je považována za nežádoucí proces v půdách. Při biotransformaci hnojiv ze zemědělsky obhospodařovaných půd se do atmosféry dostane ročně až 2,2 Gg N-N₂O (Hénault et Germon, 1995). Různé množství hnojiv dodávaných do půdy mění vlastnosti půdy a má vliv na půdní mikrobiální společenstvo, tudíž i na množství plynů emitujících do atmosféry. Ze zjednodušeného porovnání velikosti plynných ztrát N a vstupů N ve formě hnojiv vyplývá, že se zvyšujícími se vstupy vzrůstá denitrifikace. Různé studie ale také ukázaly, že druh i způsob hnojení má vliv na emise plynů do atmosféry a ztráty N denitrifikací nejsou nutně vždy větší při intenzivnějším hnojení.

Zjišťování skutečných hodnot emisí plynů do atmosféry je nesmírně ztíženo mnoha faktory z nichž nejdůležitější je velká heterogenita půdy jako takové, kdy místa s většími emisemi jsou nepravidelně rozmístěna v půdním profilu, dále pak sezonalita, změny v prostředí a v neposlední řadě i způsob využívání půdy. Kromě emisí plynů lze ovšem kvantifikovat i procesy, kterými plyny v půdě vznikají. Předložená práce spočívala v měření denitrifikační aktivity vzorků půd odebraných z polního experimentu, v němž se sledují účinky dlouhodobého vstupu živin ve formě hnojiv do půdy.

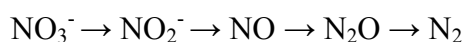
Cíle předložené bakalářské práce byly:

1. Naučit se pracovat v mikrobiologické a chemické laboratoři, zpracovat stručnou rešerši zvolené problematiky, zvládnout vybrané metody používané při studiu denitrifikace a naučit se vyhodnocovat získané výsledky pomocí standardních postupů.
2. V laboratorních podmínkách zjistit a porovnat u různě hnojených půd aktivitu denitrifikačních enzymů (tzv. DEA, tj. *denitrifying enzyme activity*).
3. V laboratorních podmínkách zjistit a porovnat u různě hnojených půd potenciální denitrifikaci (tzv. DP, tj. *denitrification potential*) a respiraci (produkci CO₂).
4. Stanovit vliv cíleně změněného pH půdy na aktivitu denitrifikačních enzymů a poměr dvou hlavních produktů denitrifikace (N₂ a N₂O).
5. Potvrdit hypotézu, že se zvyšujícím se vstupem živin do půdy ve formě hnojení se zvyšuje denitrifikační aktivita a produkce plyných dusíkatých metabolitů.

2. Literární přehled

2.1. Proces denitrifikace

Pro pojem denitrifikace neexistuje jednoznačná definice (Bremner, 1997). Obecně ji lze považovat za disimilační redukci nitrátů a nitritů na oxidy dusíku a molekulární dusík činností mikroorganismů. Jedná se o respirační bakteriální redukci oxidovaných forem dusíku až na volný molekulární dusík. Obecné schéma této reakce je:



Oxid dusný je nedílným meziproductem. Při denitrifikaci je uvolňován ve stopovém množství také NO a nebo je dále redukován na N₂O a N₂. Tento proces probíhá jen za nepřístupu O₂ nebo při velmi nízké koncentraci O₂, protože jako konečné akceptory elektronů slouží nitrity a nitráty místo O₂. Předáváním elektronů nitrátům a nitritům získávají mikroorganismy energii ve formě ATP, pomocí které mohou vytvářet novou biomasu a udržovat si biomasu stávající. Denitrifikátoři získávají elektrony umožňující redukci oxidovaných dusíkatých forem rozkladem různých organických sloučenin, mezi které patří zejména glukóza, další sacharidy, alkoholy, aceton a některé polutanty, ze kterých mikroorganismy získávají uhlík, který zabudovávají do své biomasy. Jde tedy o reakci disimilační.

Denitrifikační enzymy se nacházejí v periplazmě a v cytoplazmatické části přichycené na buněčnou membránu. Z vnějšího prostředí se z vodního roztoku dostane přes periplazmu do cytoplazmy NO₃⁻, který je nitrátoreduktázou přeměněn na nitrit. Nitrit se dostává do periplazmy, kde je nitritoreduktázou přeměněn na N₂O a NO. Vzniklé oxidy unikají do prostředí (a posléze do atmosféry) nebo jsou dále přeměněny reduktázou oxidu dusnatého na plynný dusík.

Půdní mikroorganismy mající schopnost redukovat oxidy dusíku za hypoxických podmínek jsou bakterie, které získávají energii ze světla (fototrofní) nebo z chemických látek (chemotrofní), redukční ekvivalent je buď látka organická (organotrofní) nebo anorganická (lithotrofní) a zdrojem uhlíku je látka organická (heterotrofní) nebo oxid uhličitý (autotrofní). Největší podíl denitrifikátorů patří do skupiny chemoorganoheterotrofních bakterií z rodů *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Kromě výše jmenovaných mají schopnost denitrifikace někteří fixátoři molekulárního dusíku, především z čeledi *Azotobacteraceae* a *Rhizobiaceae*. Schopnost provádět denitrifikaci byla zaznamenána i u fermentujících bakterií rodu *Bacillus*,

u některých druhů skupiny *Archea*, u některých bezbarvých sirných bakterií rodu *Thiobacillus* a u dalších taxonomických skupin. Bylo zjištěno, že schopnost denitrifikace má asi 30 rodů mikroorganismů (Šimek, 2004)

Vedle respirační denitrifikace existuje ještě nerespirační denitrifikace, kdy jsou nitráty a nitrity redukovány na N_2O , která probíhá v aerobních podmínkách. Její význam pro organismy je nejasný.

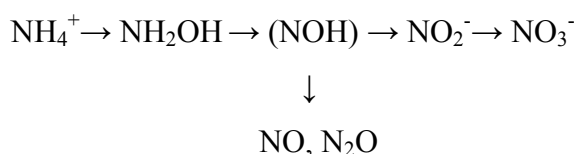
Denitrifikace ve vodě je považována za proces žádoucí, při kterém se snižuje koncentrace nitrátů. Jinak je tomu v půdě, kde je škodlivým procesem z důvodu produkce N_2O , který přispívá k procesům uvedených v kapitole 2.5, i z důvodu spotřeby minerálních forem N v půdě a ztrát N z půdy, což vyvolává další potřebu dodání živin do půdy ve formě hnojiv.

2.2. Další procesy, při kterých se uvolňuje N_2O

Nitrifikace

Při nitrifikaci dochází ke transformaci relativně nepohyblivé amoniakální formy dusíku (NH_4^+) na formu velmi pohyblivou, a to NO_3^- . Dochází ke spotřebě molekulárního kyslíku a k uvolňování iontů H^+ , které okyselují vnější prostředí. Jedná se o proces mikrobiální, kterého se účastní převážně organismy autotrofní, přesněji chemolithoautotrofní taxonomicky patřící do čeledi *Nitrobacteraceae*. Byly však objeveny a popsány i druhy heterotrofní schopné nitrifikace, taxonomicky patřící do aktinomycet, mikromycet i bakterií. Účel a funkce tohoto procesu není úplně objasněn a navíc je jeho rychlost oproti autotrofní nitrifikaci velmi nízká.

První krok je oxidace amonia na nitrit vedoucí přes meziproduct hydroxylamin, a to enzymem amoniummonooxidázou nacházejícím se v periplazmě. Při této reakci dochází k uvolnění části N ve formě N_2O a NO. Nitrity jsou dále oxidovány na nitráty činností enzymu nitritoxidoreduktáza; tento proces probíhá v buněčné membráně:



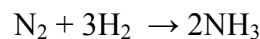
Nitrifikace není energeticky příliš výhodná a přírůstek biomasy je malý. Nitrifikace bývá inhibována za účelem snížení koncentrace produkovaných nitrátů a za účelem zmenšení ztrát N a snížení jejich koncentrace v rostlinách. Chemická inhibice nitrifikace se provádí např. nitrapyrimem, thiomocovinou nebo jinými látkami.

Respirace nitrátů

Probíhá za anaerobních podmínek a provádějí ji např. některé bakterie rodu *Klebsiella*. Její hlavní účel je získání energie. Při tomto procesu je rovněž uvolňováno stopové množství N₂O.

Fixace molekulárního dusíku

Biologická fixace dusíku patří k jednomu z nejdůležitějších biologických procesů vůbec. Jde o proces redukce plynného dusíku za vzniku amoniaku, který je fyziologicky dostupný pro půdní mikroorganismy:



Fixátoři molekulárního N₂ jsou výlučně prokaryotickými organismy, taxonomicky patří do sinic a bakterií. Všechny mikroorganismy fixující dusík mají velmi podobný aparát, jehož centrální složkou je enzym nitrogenáza, která je velmi citlivá na přítomnost O₂. Proces fixace molekulárního dusíku je energeticky velmi náročný z důvodu přítomnosti velmi pevné trojné vazby mezi atomy dusíku. Při tomto procesu je také uvolňován N₂O, většinou v malých množstvích.

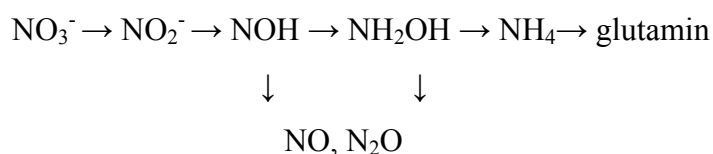
Fyziologicky představují fixátoři N₂ rozličné organismy: aerobní, anaerobní, autotrofní i heterotrofní. Někteří fixátoři žijí v symbióze s některými druhy rostlin významnými z hlediska zemědělské produkce, patřícími do čeledi *Fabaceae* (leguminózy). V agroekosystémech je tento proces velmi žádaný a řadí se k významným zdrojům N₂. Pro zvýšení fixace dusíku jsou do zemědělských půd přidávána bakteriální hnojiva označená pod komerčními názvy Rhizobin, Azobakterin, aj. (podle názvů bakterií patřících do čeledí *Rhizobiaceae* a *Azotobacteraceae*).

Disimilační redukce nitrátů na amonium

Při tomto procesu jsou nitráty redukovány na nitrity a amonium. Reakce probíhá v anaerobním prostředí bohatém na organické látky za účelem zisku energie. Vzniklé amonium se hromadí v půdě a vede k zadržování anorganických forem N a k omezení tvorby plynných metabolitů, které se při reakci uvolňují pouze ve stopovém množství. Provádějí ji obligátně či fakultativně anaerobní organismy patřící do rodů *Clostridium*, *Desulfovibrio* aj.

Asimilační redukce nitrátů na amonium

Tato reakce probíhá v cytoplazmě mikroorganismů při nízké koncentraci NH_4^+ za aerobního a anaerobního prostředí. Jde o enzymatický proces, který nevede k získání energie. Získané amonium je využito k biosyntéze různých organických látek. Při tomto procesu je rovněž uvolňováno stopové množství N_2O . Obecné schéma této reakce vypadá takto:



Mineralizace

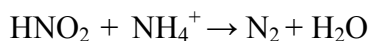
Mineralizace je rozklad složitých organických látek pro organismy nepřístupných na látky přístupné; nejčastější formou dusíku uvolněnou mineralizací je NH_4^+ . Současně se uvolňuje malé množství N_2O do atmosféry.

Chemodenitrifikace

Chemodenitrifikací se souhrnně označují procesy, při kterých je nitrit chemicky rozkládán v neutrálních a kyselých půdách za vzniku plynných sloučenin těkajících do atmosféry. Hlavní vliv na chemodenitrifikaci má půdní reakce a obsah organické hmoty v půdě. V kyselých půdách probíhá chemický rozklad HNO_2 za vzniku NO , který uniká do atmosféry, kde se formuje na HNO_3 , čímž přispívá k okyselování dešťů.



Nitrity reagují s NH_4^+ , močovinou, puriny, pyrimidiny, methylaminy za vzniku N_2 :



Dalším příkladem chemodenitrifikace je tzv. Van Slykeova reakce probíhající ve zmrzlých půdách.

Mezi dalšími nebiologickými zdroji plynných sloučenin N je významnější chemický rozklad hydroxylaminu a reakce nitritu s hydroxylaminem (Bremner, 1997)

2.3. Faktory ovlivňující denitrifikaci:

Obsah vody v půdě

Denitrifikace probíhá jen v anoxických podmínkách; bylo zjištěno, že pro denitrifikaci v půdě je nutný obsah vody přes 60–70%. Při obsahu vody 80-100% byl v prvních dvou dnech inkubace jediným plynem unikajícím z půdy N_2O , zatímco později vzrůstal podíl N_2 . (Nömmik, 1956).

Aerační status

Při striktně anaerobních podmínkách je hlavním produktem denitrifikace plynný dusík a s přibývajícím obsahem O_2 tento poměr klesá. Podle Bradyho a Weila (Brady et Weil, 1999) denitrifikace probíhá až do 10% zaplnění půdních pórů vzduchem.

Půdní reakce

Optimální pH pro denitrifikaci se nachází v rozmezí 6,0 - 8,0. Nömmik (1956) uvádí jako optimum pH 6,8 - 8,8. Denitrifikace bývá silně inhibována při pH pod 5. Při nízkých hodnotách (3 - 4) je hlavním produktem denitrifikace N_2O , se stoupající hodnotou půdní reakce se zvyšuje zastoupení N_2 a při pH okolo 8,0 je hlavním produktem N_2 .

Koncentrace nitrátů

Hlavní zdroje nitrátů jsou z procesu nitrifikace (viz kapitola 2.2) a z hnojení. Nitrátová forma dusíku je velmi aktivní, může se rozpuštěná pohybovat mezi anaerobním a aerobním prostředím, takže nitrifikace a denitrifikace může probíhat v půdě současně. Při vysokých koncentracích NO_3^- je hlavním produktem denitrifikace N_2O a N_2 se začíná uvolňovat až po

tom, kdy je většina nitrátů spotřebována. Dostupnost nitrátů závisí na půdní vlhkosti, která umožňuje jejich lepší difuzi do okolí denitrifikátorů a rostlin.

Teplota

Denitrifikace probíhá za podobného rozmezí teplot jako většina biologických procesů. Dolní hranice, při které byla denitrifikace zaznamenána, byla +3°C a horní hranice byla kolem +75 °C. V nižších teplotách byla denitrifikace částečně inhibována a hlavním produktem byl N₂O. Se zvyšující se teplotou poměr N₂O/ N₂ klesá. Podle Nömmika (Nömmik, 1956) se teplotní optimum nachází až do 65 °C. Při teplotě více než 50 °C se začíná ve větším měřítku projevovat dekompozice NO. V přírodě se teplotní optimum často nachází mezi 25-35 °C (Brady et Weil, 1999).

Půdní organická hmota

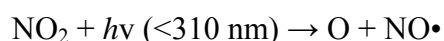
Obsah a složení půdní organické hmoty je dalším z velmi důležitých faktorů, protože oxidací organických sloučenin podstatná většina mikroorganismů získává elektrony nutné pro jejich životní pochody. Poměr N₂O/N₂ se zvětšuje při zmenšujícím se množství dostupného organického C.

2.4. Procesy, na kterých se podílí N₂O

Proces tvorby fotochemického smogu

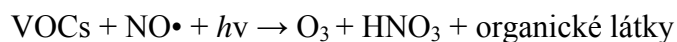
Fotochemický smog je rozklad oxidů dusíku v atmosféře na radikály za vzniku přízemního ozónu a dalších látek působením slunečního záření a uhlovodíků. Tento jev se vyskytuje hlavně v městských průmyslových aglomeracích, kde kvůli spalovacím procesům je velmi vysoká koncentrace oxidů dusíku (NO, N₂O, NO₂) a těkavých uhlovodíků souhrnně označených pod pojmem VOCs (*volatile organic compounds*). Působením slunečního záření se zvyšuje koncentrace reaktivních volných radikálů ve vzduchu. Společně s uhlovodíky dávají vznik ozónu, kyselině dusičné a různým organickým látkám.

Takto obecně probíhá vznik ozónu při fotochemickém smogu (Paul et Clark, 1996):



kde M je látka odvádějící nadbytečnou energii během reakce; takovou látkou může být například molekula O₂, N₂, aj.

Souhrnná reakce vzniku fotochemického smogu vypadá takto (Šimek, 2003):



Vzniklá kyselina dusičná přispívá k okyselování dešťů; mezi vznikající organické látky patří peroxyacetylnitráty (PANs), které jsou dráždivé.

Acidifikace

K přirozenému okyselování půd dochází při zvětrávání matečné horniny a při vyšších srážkách, kdy jsou ionty bazické vymývány a na jejich místa se na půdních koloidech navážou ionty kyselé, jako je H⁺ a Al³⁺.

Okyselování půd lidskou činností je způsobeno především dlouhodobým používáním některých minerálních hnojiv, např. síranu amonného.

Důležitým procesem probíhajícím v půdě, který vede k okyselování půd, je nitrifikace (viz kap. 2.2.).

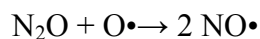
Největší vliv na okyselování půd mají tzv. kyselé srážky. Přirozená hodnota pH srážek je 5,6; pod tuto hodnotu pH jsou srážky považovány za kyselé. Okyselení je způsobeno přítomností kyselin, hlavně kyseliny sírové a dusičné v kapénkách srážek. Tyto látky vznikají reakcemi oxidů s vodou v atmosféře. Hlavními zdroji těchto látek je průmyslová výroba, doprava a zemědělství.

Reakce oxidu dusného za vzniku kyseliny dusičné a kyseliny dusité probíhá takto:

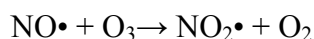


Odbourávání ozonu

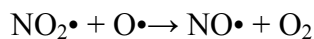
Ozonovou vrstvou se nazývá část stratosféry, kde se nachází vyšší koncentrace ozonu ve výšce 15-35 km nad zemským povrchem. Ozon chrání biosféru před účinky nebezpečného kosmického ultrafialového záření. Ve stratosféře dochází ke vzniku a fotolýze ozonu, kdy vznikají radikály, které tvoří nové molekuly ozonu anebo reagují s ostatními látkami. Mezi takové látky patří vedle mnoha dalších látek i oxid dusný, který reaguje s excitovaným atomem O[•] za vzniku dvou molekul radikálu oxidu dusného (Andrews et al., 2004)



Molekuly NO• pak napomáhají destrukci ozonu tímto způsobem:



Zpětná tvorba radikálu oxidu dusnatého probíhá reakcí radikálu oxidu dusičitého s velmi reaktivní formou kyslíku



Skleníkový efekt

Sluneční záření dopadající na zemský povrch je v atmosféře částečně odraženo a absorbováno molekulami plynů, různými částicemi a vodní parou či krystaly. Část záření je odfiltrována nebo dopadá na zemský povrch jako viditelné záření a infračervené záření. Odražené infračervené záření od zemského povrchu je absorbováno a opět uvolňováno částicemi a plyny nacházejícími se v atmosféře. Díky tomuto procesu je teplota povrchu Země přibližně o 30°C vyšší než kdyby byla Země bez atmosféry. Ke zvyšování skleníkového efektu dochází hlavně znečištěním ovzduší různými polutanty, které podporují absorpci a uvolňování IR záření. Mezi tyto polutanty patří zejména oxid uhličitý, methan, oxid dusný, ozon a kapalné či pevné částice rozptýlené v plynném prostředí a nepřímo i freony. Tyto látky se podílejí na oteplování zemského povrchu různou mírou.

2.5. Dusík v půdě a jeho přístupnost pro mikroorganismy

Dusík se přirozenou cestou dostává do půdy několika způsoby: elektrickým výbojem oxidujícím molekulární dusík se do půdy dostane 3 - 5 kg N . ha⁻¹. rok⁻¹, v půdě volně se vyskytující fixátoři N₂ navážou 10 – 15 kg N. ha⁻¹. rok⁻¹ a fixátoři N₂ symbioticky žijící s rostlinami mohou navázat 150 – 200 kg N. ha⁻¹. rok⁻¹.

Přístupnost živin pro rostliny a mikroorganismy velmi závisí na poměru C:N, který rozhoduje, zda bude látka imobilizována na biologicky nepřístupnou formu či zda bude mineralizována na přístupnou formu dusíku. U látek majících poměr C:N asi 9 - 25 dochází k mineralizaci, u látek s poměrem vyšším dochází k imobilizaci do půdní organické hmoty. Poměr C:N v biomase mikroorganismů bývá 10- 12.

2.6. Význam hnojení, druhy hnojiv

V půdách, které nejsou využívány pro zemědělskou výrobu, se látky potřebné pro výživu rostlin dostávají z atmosféry, odkud organismy získávají uhlík, vodík a kyslík a chloridy, které se vyskytují v nadbytku, a nebo ze zvětrávání matečné horniny (Šimek, 2004). Tyto látky jsou rostlinami přijímány ve formě minerálních živin. V půdách intenzivně obdělávaných obsah živin klesá a je nutno je uměle dodávat hnojením. Přidáváním organických či anorganických látek je zajištěn nejen přísun nejnужnějších živin, ale i zlepšení výživy rostlin vedoucí k jejich větším výnosům a někdy i kvalitě plodin.

Hnojiva organická poskytují širokou paletu živin, které slouží pro výživu rostlin a podílejí se na tvorbě humusu. Humusové látky přispívají k vytváření půdních agregátů, zvyšují pufrovací schopnost, příznivě ovlivňují vzdušný a vodní režim v půdě, podporují biologickou aktivitu v půdě a sorpční a výměnné procesy. Organická hnojiva pochází přímo ze zemědělské výroby nebo z jiných činností, kam se řadí například čistírenské kaly. Hnůj je zušlechtěná chlévská mrva, kterou zpravidla tvoří podestýlka a pevné a tekuté výkaly zvířat. Obsahuje hlavní živiny i mikroprvky, mikroorganismy, růstové látky a vodu. Zušlechtování spočívá v částečném rozkladu podestýlky za zachování co největšího množství živin a organických látek. Podle Jurčíka a kol. (Jurčík et al., 1975) se u dobře zušlechtěné chlévské mrvy ztrácí 20% N a 20% organických látek, u špatně uložené činí ztráta až 50% organických látek a 33% N. Močůvka je prokvašená moč hospodářských zvířat smíchaná s vodou. Používá se buď samostatně anebo v kombinaci s dalšími hnojivy. Dusík se v ní nachází převážně ve formě močoviny. Kejda je směs pevných a tekutých výkalů zředěná vodou. Zbytky obilovin zapravované do půdy bývají kvůli jejich nepříznivému poměru C:N smíchány s močůvkou či kejdou. Kompost je směs slámy či znehodnocených krmiv s bahnem, kaly či zeminou a s mikrobiálním substrátem, jakým je mrva či močůvka. Při zeleném hnojení se do půdy vpravuje biomasa hospodářských rostlin.

Minerální hnojiva v sobě obsahují koncentrované formy živin, ve kterých je hlavně dusík, fosfor a draslík a mikroprvky. Mezi dusíkatá hnojiva patří síran amonný, močovina, vysoce koncentrovaný bezvodý amoniak, různé ledky aj.

2.7. Nepříznivé dopady používání hnojiv

Živiny ve formě hnojiv jsou do půd dodávány v množství, které převyšuje potřeby rostlin a zbytek se dostává do atmosféry činností půdních mikroorganismů či je vyplavován nebo transportován v částicích. Rostliny využijí asi jen 20-80% poskytnutých živin. Dalším problémem je nevhodná aplikace tj. v nesprávnou dobu, za nepříznivých povětrnostních podmínek, nesprávnou aplikací do půdy. Obecně platí, že čím jsou hnojiva lépe zapravená do půdy, tím jsou jejich ztráty nižší. Velthof (2003) naopak uvádí, že při zapravení 5 cm pod povrch půdy velmi významně vzrostly přímé emise N₂O do atmosféry než při aplikaci hnojiv na povrch.

3. Materiál a metody

3.1. Pokusná plocha a studované půdy

Pokusná plocha patřící Výzkumnému ústavu rostlinné výroby (VÚRV) se nachází v Praze –Ruzyni v řepařské výrobní oblasti. Lokalita se nachází v nadmořské výšce 340 m, na 50°05' s. š. a 14° 20' v. d. Stratigrafie půdy je Ap (0 - 30 cm) – Bt1 (34 – 55 cm) - B/C (55- 80 cm) – Ck (80 – 120 cm).

Klimaticky je oblast řazena pod region mírně suchý (T2) s ročním úhrnem srážek 452 mm a průměrnou roční teplotou 7,8 °C. Studovaná půda je luvická hnědozem (*orthic luvisol*). Skupina půdního druhu je na rozhraní středně těžká až těžká půda jílovito-hlinitá. Matečnou horninou je spraš a obsah humusu činí 2,3%. Podle osevního sledu se na plochách střídavě pěstuje cukrovka a pšenice jarní.

Lokalita je rozdělena na menší plochy, kdy každá z nich je jinak hnojena. Půda s označením 111 není hnojena a slouží jako kontrolní plocha pro porovnání. Půda s označením 211 byla hnojena hnojem v dávce 21 t. ha⁻¹. Půda s označením 611 byla hnojena kejdou v dávce 60 t.ha⁻¹ a slámou. Půda s označením 281 byla hnojena hnojem v dávce 21 t.ha⁻¹ a minerálním hnojivem NPK v dávce 50 kg N. ha⁻¹. Plochy jsou hnojeny každý rok.

3.2. Odběry a úprava vzorků půd

Vzorky byly odebrány 20.10. 2005 pracovníky VÚRV Praha - Ruzyně. Na každé ploše byly odebrány vzorky z pěti dílčích míst rýčem z vrstvy 0-20 cm a následně byly smíchány a uskladněny v polyethylenových sáčcích. 21.10. 2005 byly půdy přesáty přes síto s velikostí ok 3 mm a byly zbaveny zbytků rostlin. Poté byly uskladněny v polyethylenových sáčcích při teplotě 4°C.

3.3. Laboratorní analýzy

3.3.1. Stanovení okamžité vlhkosti a tzv. sušiny půdy gravimetricky

Do předem zvážené hliníkové váženky se dalo asi 5 g přirozeně vlhké půdy. Váženka s vlhkou půdou se zvažila a nechala se sušit po dobu 5 hodin při 105°C ve vyhřáté sušárně. Po vysušení byla váženka znovu zvážena. Sušina půdy je udávána jako hmotnostní procenta suché půdy z půdy vlhké.

Výpočet:

$$\text{Sušina (\%)} = 100 \cdot \left(\frac{B - C}{B - A} \cdot 100 \right)$$

A.....hmotnost váženky

B.....hmotnost váženky s vlhkou půdou

C.....hmotnost váženky se suchou půdou

3.3.2. Stanovení denitrifikačního potenciálu (DP)

Ke změření denitrifikačního potenciálu je nutno vytvořit speciální (optimální) podmínky pro mikroorganismy. Tento parametr zavedli Yeomans et al. (1992) pod názvem denitrifikační potenciál. Optimalizace spočívá ve vytvoření anaerobního prostředí, kdy se vzduch v inkubační baňce vymění za helium a v dodání základních živin ve formě nitrátů jako výchozího substrátu pro denitrifikaci a glukózy jako snadno dostupného organického uhlíku. Po výměně atmosféry v lahvích se ještě přidá acetylen, který blokuje redukcí N₂O na N₂.

Postup:

12 g vlhké půdy se navážilo do 300 ml NTS lahví, u každého druhu půdy po čtyřech opakováních. Ty se uzavřely gumovým septem a šroubením. Poté se přidal uhlík a dusík v podobě 5 ml optimalizačního roztoku, který obsahoval 4320 mg KNO_3 a 1650 mg glukózy monohydrátu na 1 l. Vzduch byl vyměněn za helium na výměníku plynů 4x po 60s opakovanou evakuací a plněním heliem. Pak bylo přidáno 35 ml acetylenu, který inhibuje redukci N_2O na N_2 a vzorky se daly k inkubaci do termostatu. Produkce oxidu dusného byla stanovena v časech 0, 24, 48 a 72 hodin od začátku inkubace. Denitrifikační potenciál byl měřen v období 28.2. – 3.4. 2006. Vzorky inkubační atmosféry byly analyzovány na plynovém chromatografu HP5890 s detektorem elektronového záchyty (Hewlett Packard, USA).

3.3.3. Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA)

Touto metodou se měří potenciální aktivita denitrifikačních enzymů. Předpokládá se její těsný vztah k množství buněk denitrifikátorů, tudíž je považována za měřítko velikosti jejich populace v době měření. Zahrnuje pouze aktivitu enzymů právě se nacházejících v půdě, tedy nikoli aktivitu enzymů nově syntetizovaných. Pro měření potenciální aktivity je nutno zoptimalizovat podmínky. To se dosáhne přidáním glukózy a nitrátů zředěných v destilované vodě ve formě optimalizačního roztoku. Vzduch se vymění za helium. Pro inhibici redukce N_2O na N_2 se do inkubační atmosféry přidává acetylen.

Standardní postup:

25 g vlhké půdy se naváží do 100 ml NTS lahví a nechá se hodinu stát, aby se vzorky vytemperovaly na okolní teplotu. Každá varianta měla čtyři opakování. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 25 ml optimalizačního roztoku, ve kterém byl dodán dusík a uhlík v množství 101 mg KNO_3 a 198 mg glukózy na 1l. Lahve se uzavřely gumovým septem a kovovým šroubením. Vzduch se vymění na výměníku plynů opakovanou evakuací a plněním (4x 60s) za helium. Pak se odebírají vzorky inkubační atmosféry v čase 30 a 60 minut a okamžitě se analyzují na plynovém chromatografu. Množství vyprodukovaného N_2O se určí množstvím N_2O v čase 30 minut odečteného od množství N_2O naměřeného v čase 60 minut. Dále je tento údaj přepočten na hodnotu N- N_2O vyprodukovaného na gram suché půdy na hodinu.

Modifikovaný postup pro měření DEA při upraveném pH:

Půdy byly připraveny podobným způsobem jako při měření DEA. K 25 g přirozeně vlhké půdy bylo přidáno 20 ml destilované vody, případně pro okyselení bylo k 19,75 ml vody přidáno 0,25 ml 0,5 N H₂SO₄, pro posunutí pH do zásaditější oblasti bylo k půdám přidáno 0,25 ml 0,5M NaOH. Pro optimalizaci podmínek byl dále ke vzorkům přidán pětkrát koncentrovaný optimalizační roztok, aby koncentrace lehce dostupného uhlíku a dusíku byla v souladu s předepsanou metodikou. Koncentrace pětkrát koncentrovaného optimalizačního roztoku byla 505 mg KNO₃ a 990 mg glukózy monohydrátu rozpuštěných v 1l vody. Ihned po přidání optimalizačního roztoku bylo změřeno pH na elektrickém pH metru s kombinovanou elektrodou (typ pH 526, WTW). K polovině vzorků bylo přidáno injekční stříkačkou 10 ml acetyleny, aby došlo k inhibici redukce N₂O na N₂. Vzorky inkubační atmosféry byly odebírány v čase 30 a 60 minut. Ihned po odebrání byly změřeny na plynovém chromatografu HP5890 s detektorem elektronového záhytu (Hewlett Packard, USA).

Měření probíhala ve dnech 31.10.2006, 8.11. 2006, 14. – 15.11.2006 a 22.11. 2006. Pro toto měření byly z kapacitních důvodů použity pouze půdy s označením 111, 211 a 281.

3.5. Statistická analýza výsledků

Pro statistickou analýzu naměřených hodnot denitrifikačního potenciálu byla použita analýza variance (ANOVA), varianta repeated measures, a pro testování rozdílů mezi půdami byl použit Tukey HSD test. Průkazný rozdíl byl stanoven na 5% hladině významnosti ($p=0,05$).

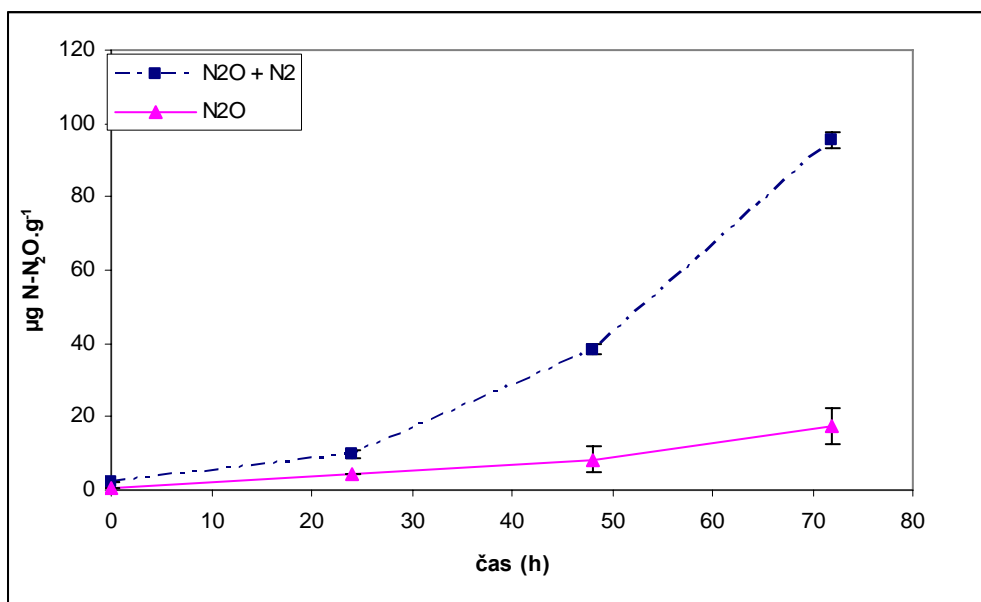
Pro statistickou analýzu naměřených hodnot aktivity denitrifikačních enzymů byla použita dvoucestná analýza variance a pro dílčí rozdíly mezi půdami byl použit Tukey HSD test. Průkazný rozdíl byl stanoven na 5% hladině významnosti ($p=0,05$).

4. Výsledky

4.1. Potenciální denitrifikace v různě hnojených půdách - produkce N₂O

4.1.1. Nehnojená půda (č.111)

U nehnojené půdy bylo zjištěno průkazné zvýšení produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem oproti produkci N-N₂O u půd inkubovaných bez acetyleny ($p < 10^{-6}$) (viz obrázek 1).



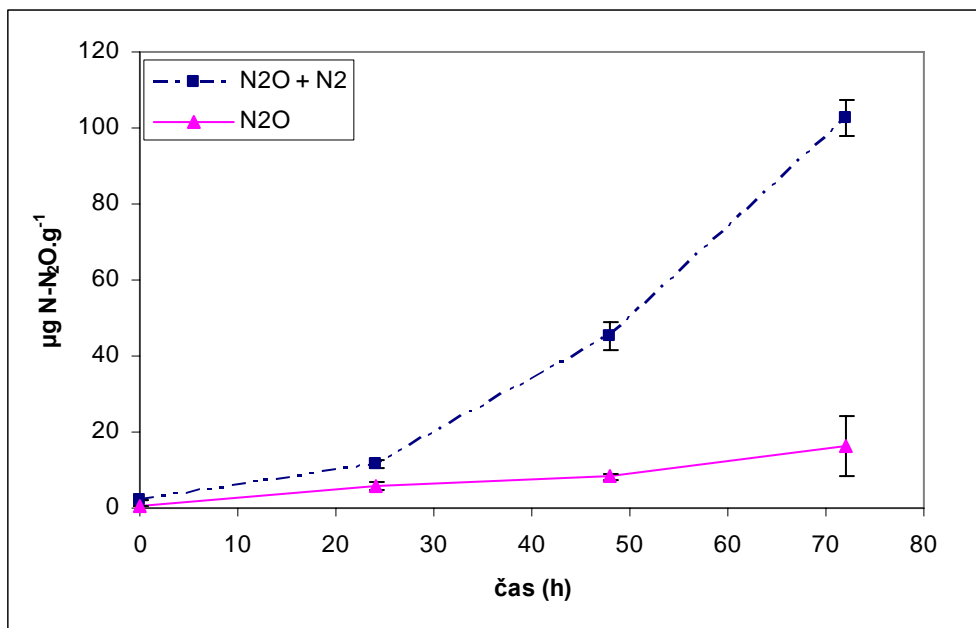
Obr 1: Produkce N-N₂O u nehnojené půdy při inkubaci s přidavkem (N₂O) a bez přidavku (N₂O+N₂) acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky.

Již po inkubaci 24 hodin byl zjištěn nárůst koncentrace N₂O v baňkách se vzorky, ale tento nárůst byl statisticky neprůkazný. Také rozdíly mezi oběma variantami inkubace byly neprůkazné, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace N₂O (9,7 µg N-N₂O.g⁻¹) než u půdy inkubované bez acetyleny (4,4 µg N-N₂O.g⁻¹). V čase inkubace 48 hodin byla produkce N-N₂O u půd inkubovaných bez acetyleny vyšší než v čase

inkubace 24 hodin. U půd inkubovaných s acetylenem byla produkce N-N₂O průkazně vyšší než produkce N-N₂O v čase 24 hodin ($p=0,0002$), u půd inkubovaných bez acetyleny byl tento rozdíl neprůkazný. U půd inkubovaných s acetylenem dosahovala hodnota produkce průkazně ($p=0,0002$) vyšších hodnot ($38,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($8,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$). V čase inkubace 72 hodin byla produkce N-N₂O průkazně vyšší než produkce N-N₂O v čase 48 hodin u půd inkubovaných s acetylenem i u půd inkubovaných bez acetyleny ($p=0,0002$). U půd inkubovaných s acetylenem dosahovala produkce N-N₂O průkazně vyšších hodnot ($101,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($17,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$).

4.1.2. Půda hnojená hnojem (č. 211)

U půdy hnojené hnojem byla zaznamenána průkazně vyšší produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem oproti produkci N-N₂O u půd inkubovaných bez acetyleny ($p < 10^{-6}$) (viz obrázek 2).

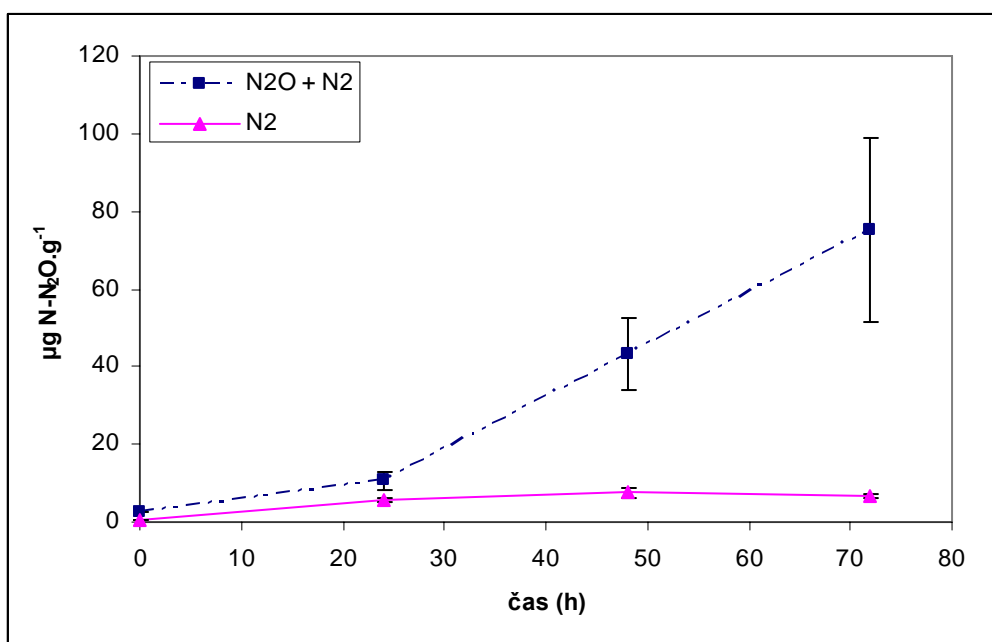


Obr.2: Produkce N-N₂O u půdy hnojené hnojem při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky.

Již po inkubaci 24 hodin byla zaznamenána zvýšená koncentrace N_2O v baňkách se vzorky a tento rozdíl byl statisticky průkazný ($p=0,03$). Rozdíly mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace N_2O ($11,5 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($5,9 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$). V čase inkubace 48 hodin byla produkce $N-N_2O$ u půd inkubovaných bez acetyleny vyšší, ale rozdíl oproti produkci $N-N_2O$ v čase 24 hodin byl neprůkazný. U půd inkubovaných s acetylenem byla produkce $N-N_2O$ vyšší oproti produkci $N-N_2O$ v čase 24 hodin a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p=0,0002$). Produkce $N-N_2O$ u půd inkubovaných s acetylenem dosahovala vyšší hodnoty ($45,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než produkce $N-N_2O$ u půd inkubovaných bez acetyleny ($8,3 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p=0,0003$). V čase inkubace 72 hodin byla produkce $N-N_2O$ u půd inkubovaných bez acetyleny vyšší než v čase inkubace 48 hodin, ale jejich rozdíly byly neprůkazné. U půd inkubovaných s acetylenem byla produkce $N-N_2O$ průkazně vyšší než v čase inkubace 48 hodin ($p=0,0002$). U půd inkubovaných s acetylenem dosahovala produkce $N-N_2O$ průkazně vyšších hodnot ($102,6 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půdy inkubované bez acetyleny ($16,3 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p=0,0002$).

4.1.3. Půda hnojená směsí kejdy skotu a slámy (č. 611)

U půdy hnojené směsí kejdy skotu a slámy byla zaznamenána průkazně vyšší produkce $N-N_2O$ u půdy inkubované s acetylenem oproti produkci $N-N_2O$ u půd inkubovaných bez acetyleny ($p=0,0002$) (viz obrázek 3). Již při inkubaci v čase 24 hodin byla zjištěna zvýšená koncentrace N_2O v baňkách se vzorky, ale tento rozdíl byl statisticky neprůkazný. Rozdíl mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace N_2O ($10,6 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($5,5 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$).

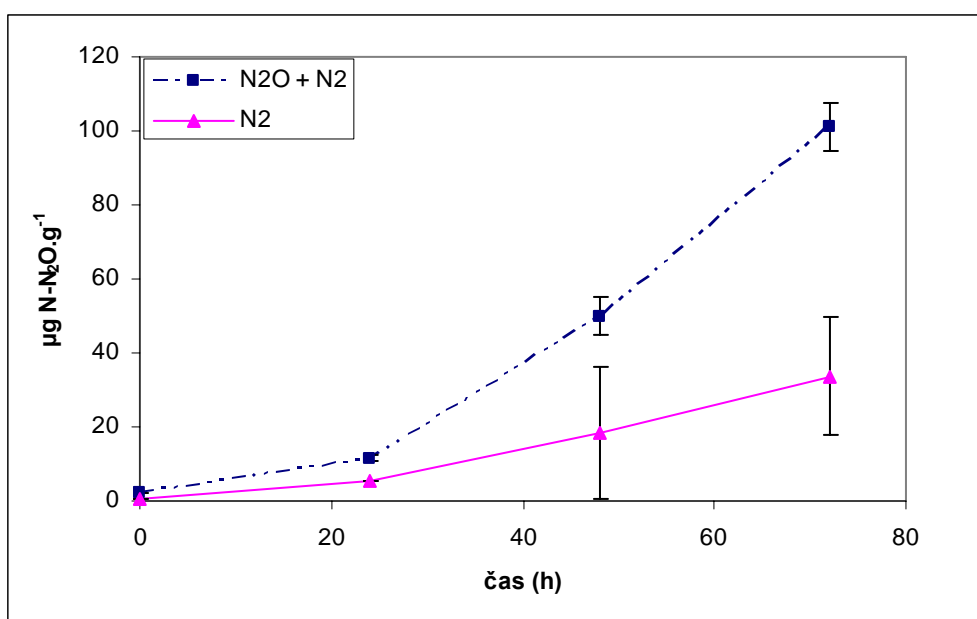


Obr.3: Produkce N-N₂O u půdy hnojené směsí kejdy skotu a slámy při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky.

V čase inkubace 48 hodin byla produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem průkazně vyšší než u produkce N-N₂O v čase 24 hodin ($p=0,001$). U půd inkubovaných bez acetyleny byla produkce N-N₂O vyšší než produkce N-N₂O v čase 24 hodin a jejich rozdíly byly neprůkazné. Produkce N-N₂O byla vyšší u půd inkubovaných s acetylenem ($43,2 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($7,6 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p=0,0003$). V čase inkubace 72 hodin byla produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem průkazně vyšší než produkce N-N₂O v čase 48 hodin ($p=0,01$). U půd inkubovaných bez acetyleny byla produkce N-N₂O nižší než v čase 48 hodin a jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné. Zaznamenaná produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem byla vyšší ($75,3 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($6,72 \mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p= 0,0001$).

4.1.4. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č. 281)

U půdy hnojené jak hnojem, tak minerálními hnojivy byla zaznamenána průkazně vyšší produkce N-N₂O u půdy inkubované s acetylenem oproti produkci N-N₂O u půd inkubovaných bez acetyleny ($p=0,00005$) (viz obrázek 4). Již při inkubaci 24 hodin byla zjištěna zvýšená koncentrace N-N₂O v baňkách se vzorky, tento rozdíl byl statisticky neprůkazný. Rozdíl mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace N₂O (11,6 $\mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny (5,2 $\mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$).



Obr.4: Produkce N-N₂O u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky.

V čase inkubace 48 hodin byla produkce N-N₂O u půd inkubovaných s acetylenem průkazně vyšší než produkce N-N₂O v čase 24 hodin ($p=0,0005$). U půd inkubovaných bez acetyleny byla produkce N-N₂O vyšší než v čase inkubace 24 hodin, ale jejich vzájemný rozdíl byl neprůkazný. U půd inkubovaných s acetylenem byla produkce N-N₂O vyšší (49,9 $\mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny (18,4 $\mu\text{g N-N}_2\text{O.g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly průkazné ($p=0,01$). V čase inkubace 72 hodin byla produkce N-N₂O průkazně vyšší u půd inkubovaných s acetylenem ($p=0,0002$) a u půd inkubovaných bez

acetyleny ($p=0,002$) než produkce $N-N_2O$ v čase 48 hodin. Produkce $N-N_2O$ u půd inkubovaných s acetylenem dosahovala vyšší hodnoty ($101,1 \mu\text{g } N-N_2O \cdot \text{g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($33,7 \mu\text{g } N-N_2O \cdot \text{g}^{-1}$) a jejich vzájemný rozdíl byl průkazný ($p=0,0004$).

Tab.1: Celková produkce ($N_2O + N_2$), jednotlivé plynné metabolity (N_2O ; N_2) a relativní podíl N_2O z celkové produkce (%) u čtyř půd různě hnojených. Hodnoty představují průměry ze 4 opakování, platí pro rozdíl inkubační doby 48 h – 24 h a jsou uvedeny v $\mu\text{g } N \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Všechny rozdíly mezi jednotlivými půdami v celkové produkci (N_2+N_2O), v produkci N_2 a v produkci N_2O jsou statisticky neprůkazné.

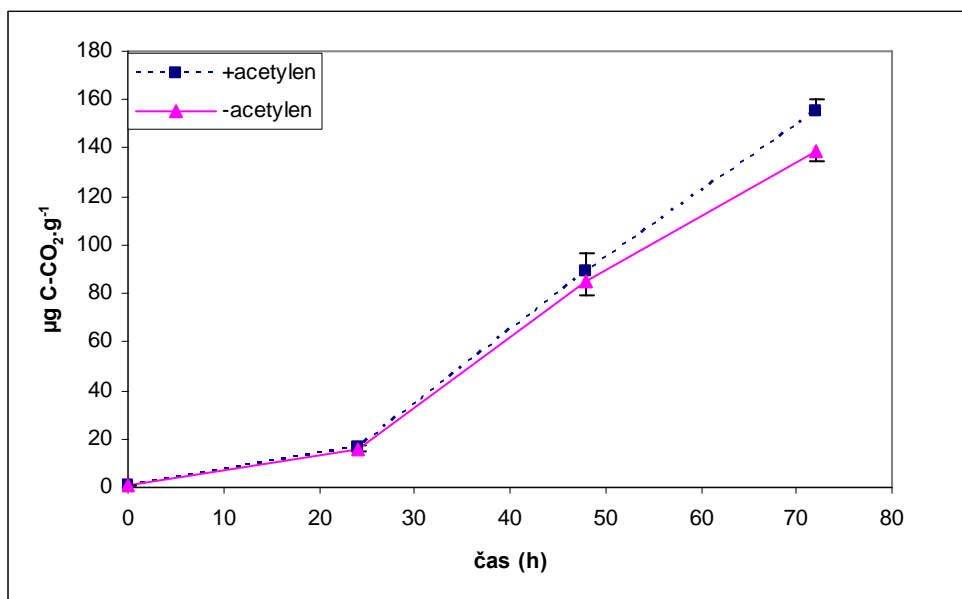
	Nehnojená	Hněj	Kejda + sláma	Hněj +NPK
$N_2O + N_2$	28,72	33,90	32,66	38,30
N_2O	3,94	2,42	2,05	13,20
N_2	24,78	31,48	30,61	25,10
% N_2O	13,70	7,10	6,30	34,50

4.2. Potenciální denitrifikace v různě hnojených půdách - produkce CO_2

4.2.1. Půda nehnojená (č. 111)

U půdy nehnojené byla zaznamenána průkazně vyšší produkce C- CO_2 u půdy inkubované s acetylenem oproti produkci C- CO_2 u půdy inkubované bez acetyleny ($p=0,001$) (obrázek 5). Již v čase inkubace 24 hodin byla zjištěna zvýšená produkce C- CO_2 a tento rozdíl byl statisticky průkazný pro půdy inkubované s acetylenem ($p=0,001$) i pro půdy inkubované bez acetyleny ($p=0,002$). Rozdíly mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace CO_2 ($16,4 \mu\text{g } C-CO_2 \cdot \text{g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($15,5 \mu\text{g } C-CO_2 \cdot \text{g}^{-1}$). V čase 48 hodin byla produkce C- CO_2 průkazně vyšší v půdě inkubované s acetylenem a bez acetyleny než velikost produkce C- CO_2 v čase 24 hodin ($p=0,0002$). Zaznamenaná produkce C- CO_2 byla $89,4 \mu\text{g } C-CO_2 \cdot \text{g}^{-1}$ v půdě

inkubované s acetylenem a $84,9 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ v půdě inkubované bez acetyleny a jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné. V čase inkubace 72 hodin byla produkce C-CO₂ průkazně vyšší než produkce C-CO₂ v čase 48 hodin v půdě inkubované s acetylenem a bez acetyleny ($p=0,0002$). Produkce C-CO₂ byla průkazně vyšší ($p=0,0002$) v půdě inkubované s acetylenem ($155,6 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$) než v půdě inkubované bez acetyleny, kde byla zaznamenaná produkce C-CO₂ $138,7 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$.

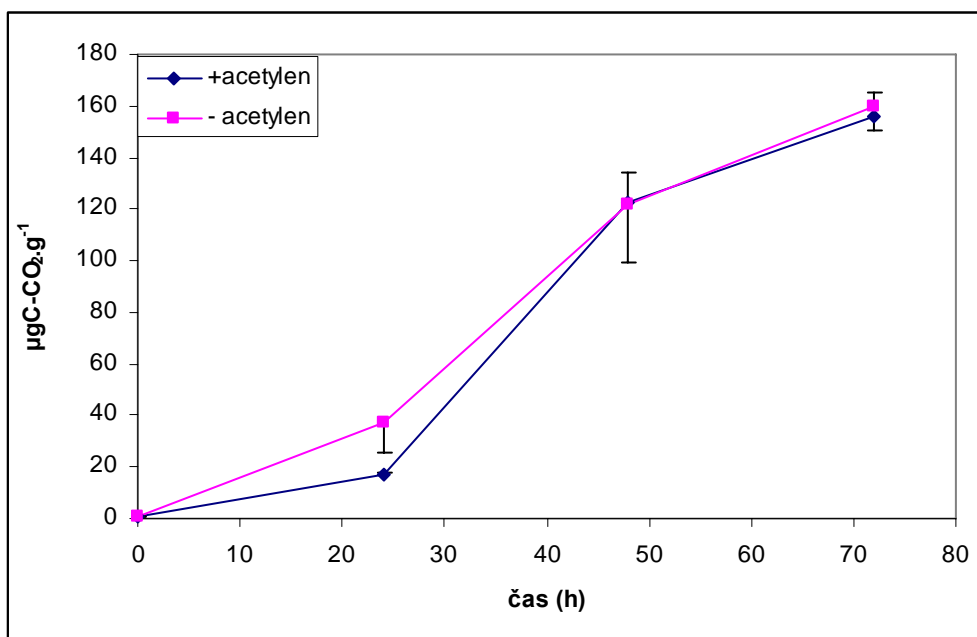


Obr.5: Produkce C-CO₂ u půdy nehnojené při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, minusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace bez acetyleny a plusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace s acetylenem.

4.2.2. Půda hnojená hnojem (č. 211)

U půdy hnojené hnojem nebyl prokázán vliv acetyleny na zvýšení produkce C-CO₂ (obrázek 6). Již v čase inkubace 24 hodin byla zjištěna zvýšená koncentrace CO₂ v baňkách se vzorky a tento rozdíl byl neprůkazný u půd inkubovaných s acetylenem. U půd inkubovaných bez acetyleny vyšel rozdíl průkazně ($p=0,04$). Rozdíl mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace CO₂ ($36,9 \mu\text{g C-CO}_2$

.g⁻¹) než u půd inkubovaných bez acetyleny (17,4 μg C-CO₂ .g⁻¹). V čase inkubace 48 hodin dosahovala produkce C-CO₂ stejné hodnoty (122 μg C-CO₂ .g⁻¹) v půdě inkubované s acetylenem i bez acetyleny a byla průkazně vyšší než produkce C-CO₂ v čase 24 hodin (p=0,0002). V čase inkubace 72 hodin byla produkce průkazně vyšší u půd inkubovaných s acetylenem (p=0,009) i bez acetyleny (p=0,003) než produkce C-CO₂ v čase 48 hodin. Produkce C-CO₂ byla u půdy inkubované s acetylenem byla 155,8 μg C-CO₂ .g⁻¹ a u půdy inkubované bez acetyleny 160 μg C-CO₂ .g⁻¹ a jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné.

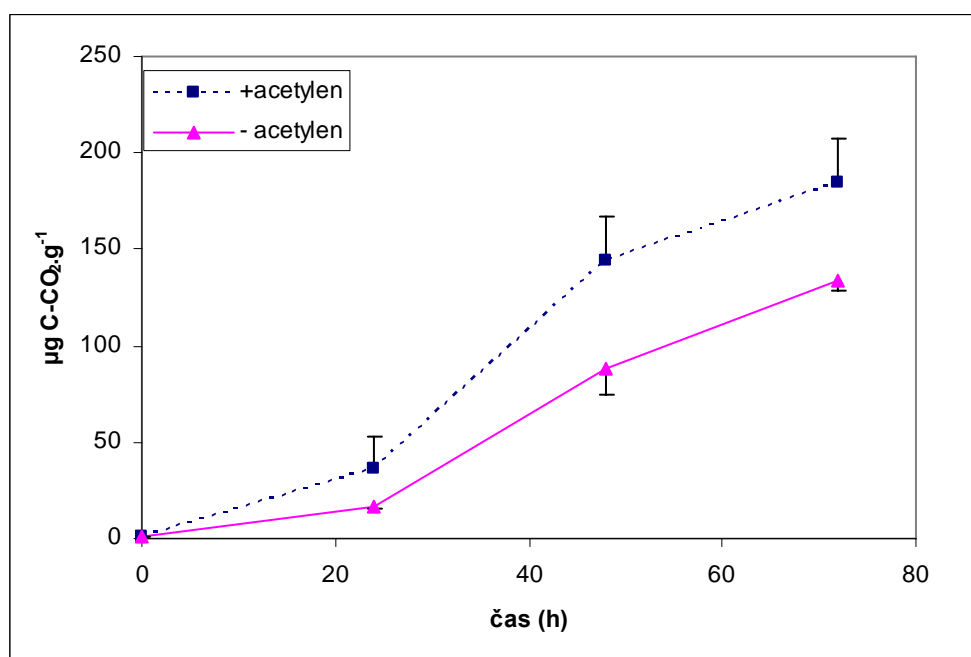


Obr.6: Produkce C-CO₂ u půdy hnojené hnojem při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, minusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace bez acetyleny a plusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace s acetylenem.

4.2.3. Půda hnojená směsí kejdy skotu a slámy (č. 611)

U půdy hnojené směsí kejdy skotu a slámy byla zaznamenána průkazně vyšší produkce C-CO₂ u půdy inkubované s acetylenem oproti produkci C-CO₂ u půdy inkubované bez acetyleny (p=0,006) (obrázek 7). Již při inkubaci v čase 24 hodin byla zjištěna vyšší

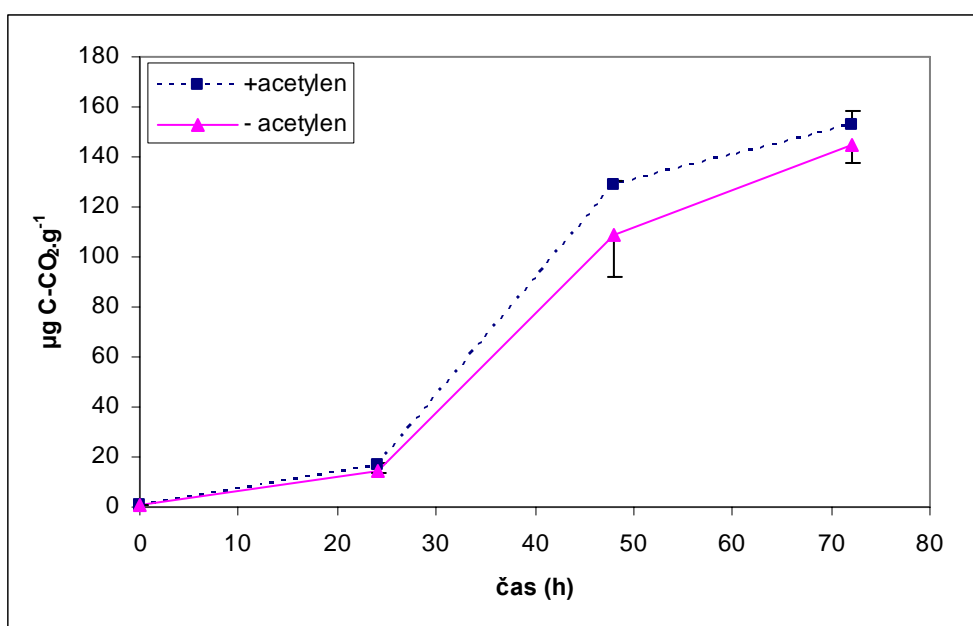
koncentrace C-CO₂ v baňkách se vzorky a tento rozdíl byl neprůkazný u půdy inkubované bez acetyleny; u půdy inkubované s acetylenem byl tento rozdíl průkazný (p=0,002). Rozdíl mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace CO₂ (37 μg C-CO₂ .g⁻¹) než u půd inkubovaných bez acetyleny (17 μg C-CO₂ .g⁻¹). V čase inkubace 48 hodin byla produkce C-CO₂ průkazně vyšší u půd inkubovaných s acetylenem (p=0,0002) i bez acetyleny (p=0,0002) než produkce C-CO₂ v čase inkubace 24 hodin. V půdě inkubované s acetylenem byla naměřena průkazně vyšší hodnota produkce (144 μg C-CO₂ .g⁻¹) než v půdě inkubované bez acetyleny (88 μg C-CO₂ .g⁻¹). V čase inkubace 72 hodin byla produkce C-CO₂ průkazně vyšší než produkce C-CO₂ v čase 48 hodin u půdy inkubované s acetylenem i bez acetyleny. Produkce C-CO₂ byla vyšší v půdě inkubované s acetylenem (184,6 μg C-CO₂ .g⁻¹) než u půdy inkubované bez acetyleny (134,0 μg C-CO₂ .g⁻¹), ale jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné.



Obr.7: Produkce C-CO₂ u půdy hnojené směsí kejdy skotu a slámy při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, minusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace bez acetyleny a plusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace s acetylenem.

4.2.4. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č. 281)

U půd hnojených směsí hnoje a minerálních hnojiv nebyl prokázán vliv acetyleny na produkci C-CO₂ (obrázek 8). Již při inkubaci v čase 24 hodin byla zjištěna vyšší koncentrace CO₂ v baňkách se vzorky a tento rozdíl nebyl statisticky průkazný u půd inkubovaných bez acetyleny, u půd inkubovaných s acetylenem byl tento rozdíl průkazný ($p=0,023$). Rozdíl mezi oběma variantami byl neprůkazný, i když ve variantě s přidavkem acetyleny byla zjištěna vyšší koncentrace CO₂ ($17,2 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($14,6 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$).



Obr.8: Produkce C-CO₂ u půdy hnojené směsí hnoje a minerálních hnojiv při inkubaci s přidavkem a bez přidavku acetyleny do inkubační atmosféry v průběhu 72 hodin. Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, minusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace bez acetyleny a plusové chybové úsečky představují směrodatné odchylky u varianty inkubace s acetylenem.

V čase inkubace 48 hodin dosahovala produkce průkazně vyšších hodnot u půd inkubovaných s acetylenem ($p=0,0002$) i u půd inkubovaných bez acetyleny ($p=0,0002$). Produkce u půd inkubovaných s acetylenem byla vyšší ($128,7 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$) než u půd inkubovaných bez acetyleny ($108,7 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$) a jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné. V čase inkubace 72 hodin byla produkce C-CO₂ průkazně vyšší u půd inkubovaných s acetylenem ($p=0,0006$) a u půd inkubovaných bez acetyleny ($p=0,0002$) než

v čase 48 hodin. Produkce C-CO₂ u půd inkubovaných s acetylenem dosahovala vyšších hodnot (153,0 μg C-CO₂ .g⁻¹) než u půd inkubovaných bez acetyleny (144,2 μg C-CO₂ .g⁻¹) a jejich vzájemné rozdíly nebyly průkazné.

U půdy nehnojené (č. 111) byla zaznamenána průkazně nižší respirace než u ostatních půd (č. 211, 611, 281) (p= 0,0005, 0,0003, 0,0003) (tabulka 2). U půdy nejvíce hnojené (č. 281) byla zaznamenána největší respirace, ale její rozdíl oproti půdě hnojené hnojem (č. 211) a půdě hnojené kejdou a slámou (č. 611) byl statisticky neprůkazný.

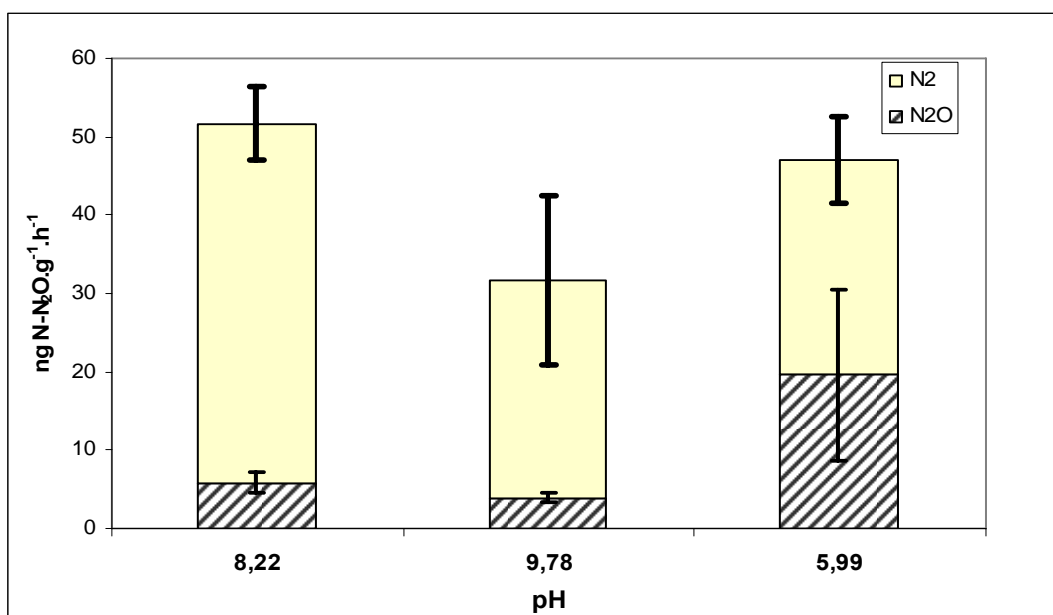
Tab.2: Produkce C-CO₂ při měření celkového DP. Hodnoty představují průměry ze 4 opakování, platí pro rozdíl inkubační doby 48 h – 24 h a jsou uvedeny v μg C – CO₂ .g⁻¹.d⁻¹.

	Nehnojená	Hněj	Kejda+sláma	Hněj + NPK
C- CO ₂	72,80	105,18	107,89	111,53

4.3. Aktivita denitrifikačních enzymů v různě hnojených půdách s původním a pozměněným pH

4.3.1. Nehnojená půda (č. 111)

U půdy nehnojené inkubace s acetylenem zvýšila průkazně produkci N₂O oproti půdě inkubované bez acetyleny při původní (pH 8,22; p = 0,0002), kyselé (pH 5,99; p = 0,0005) i zásadité reakci (pH 9,78; p = 0,0004) (obrázek 9).



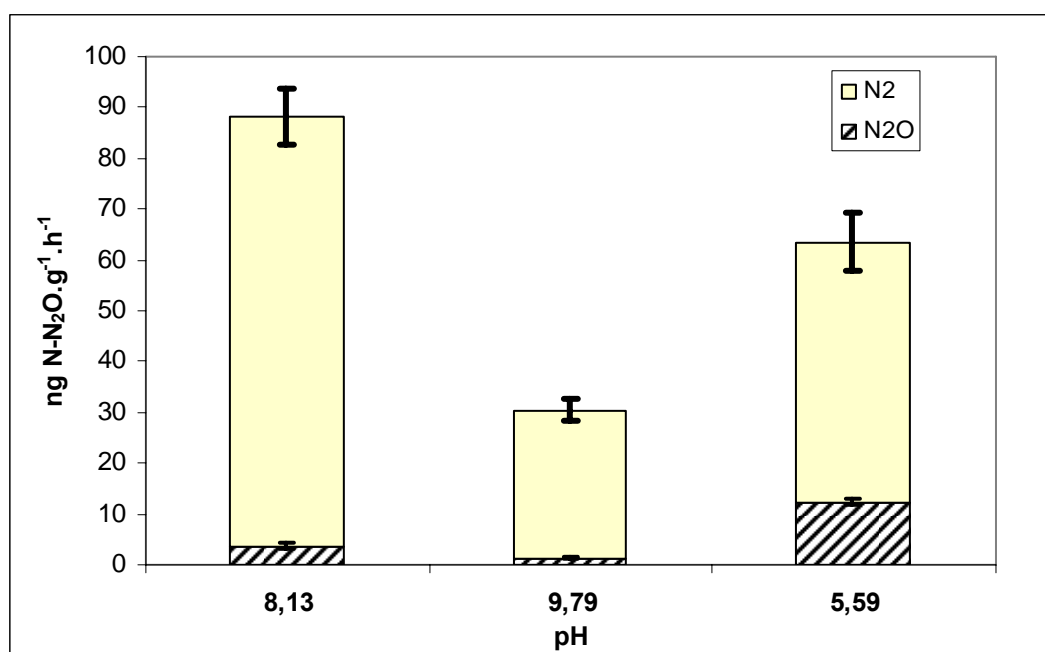
Obr.9: Aktivita denitrifikačních enzymů zjištěná při inkubaci vzorků s přidavkem acetylenu (celková aktivita, N₂O + N₂) a bez přidavku acetylenu (N₂O) v půdě nehnojené s původním pH (8,22) a ve stejné půdě s pH zásaditějším (9,78) a kyselějším (5,99). Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, tučněji zvýrazněné chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky celkové produkce, spodní chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky produkce N₂O.

Při inkubaci bez acetyleny byla produkce N₂O nejvyšší při kyselé reakci (19 ng N-N₂O g⁻¹h⁻¹), hodnoty zjištěné při původní (6 ng N-N₂O g⁻¹h⁻¹) a zásadité reakci (4 ng N-N₂O g⁻¹h⁻¹) byly nižší a rozdíly mezi nimi byly neprůkazné. Při inkubaci s acetylenem (obrázek 9) byla nejvyšší hodnota zaznamenána u půdy s přirozeným pH (52 ng N-N₂Og⁻¹h⁻¹), u půdy okyselené (47 ng N-N₂O g⁻¹h⁻¹) a její rozdíl od půdy s přirozeným pH vyšel neprůkazně; půda se zvýšeným pH (31 ng N-N₂O g⁻¹h⁻¹) dosahovala průkazně nižších hodnot (p=0,008) a jejich vzájemné rozdíly byly neprůkazné.

4.3.2. Půda hnojená hnojem (č. 211)

U půdy hnojené hnojem byla průkazně zvýšena produkce N₂O u půdy inkubované s acetylenem a bez acetyleny při přírodní (pH=8,13; p= 0,0002), zásadité (pH=9,79;

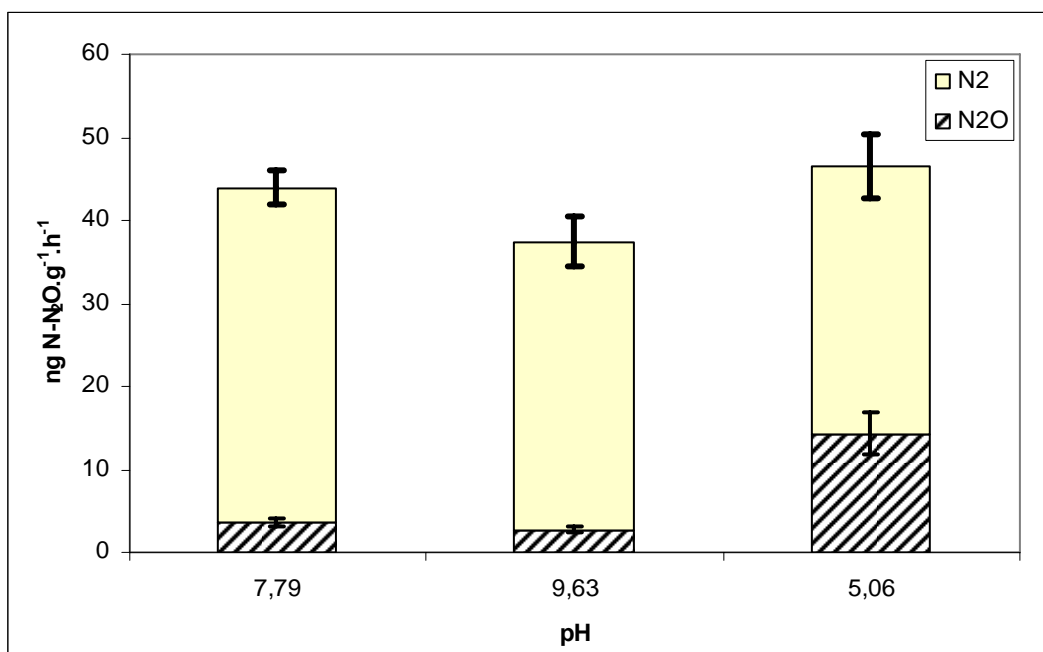
$p=0,0002$) i kyselé reakci ($\text{pH}=5,59$; $p= 0,0002$) (obrázek 10). Při inkubaci bez acetyleny byla produkce N_2O nejvyšší při kyselé reakci ($12 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$), hodnoty zjištěné při přírodní a zásadité reakci byly nižší a rozdíly mezi nimi byly neprůkazné. Nejnižší hodnota produkce N_2O byla zaznamenána u reakce zásadité ($1,4 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$) oproti reakci přirozené, u které byla naměřena hodnota $3,7 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$. Při inkubaci půd s acetylenem (obrázek 10) dosahovala nejvyšších hodnot půda s přirozeným pH ($88 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$) a průkazně se lišila od půdy s kyselou reakcí a s reakcí zásaditou. Celková produkce v půdě s kyselou reakcí byla průkazně vyšší ($p=0,0002$; $63 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$) než v půdě se zásaditou reakcí ($30 \text{ ng N-N}_2\text{Og}^{-1}\text{h}^{-1}$).



Obr.10: Aktivita denitrifikačních enzymů zjištěná při inkubaci vzorků s přidavkem acetyleny (celková aktivita $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$) a bez přidavku acetyleny (N_2O) v půdě hnojené hnojem s původním pH (8,13) a ve stejné půdě s pH zásaditějším (9,79) a kyselejším (5,59). Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, tučněji zvýrazněné chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky celkové produkce, spodní chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky produkce N_2O .

4.3.3. Půda hnojená hnojem a minerálními hnojivy (č. 281)

U půdy hnojené hnojem a třísloužkovým minerálním hnojivem (NPK) byla při inkubaci s acetylenem průkazně zvýšena produkce N_2O než u půd inkubovaných bez acetyleny v přírodní (pH = 7,79; $p= 0,0002$), zásadité (pH = 9,63; $p=0,0002$) a kyselé reakci (pH = 5,06; $p= 0,0002$) (obrázek 11). Při inkubaci bez acetyleny byla zaznamenána nejvyšší produkce N_2O u kyselé reakce (14 ng $N-N_2Og^{-1}h^{-1}$), která se průkazně lišila od reakce přírodní (3,7 ng $N-N_2Og^{-1}h^{-1}$, $p= 0,0002$) a zásadité (2,7 ng $N-N_2Og^{-1}h^{-1}$, $p= 0,0002$). Rozdíly hodnot u kyselého a zásaditého pH byly neprůkazné. U půd inkubovaných s acetylenem (obrázek 11) byla nejvyšší hodnota produkce u okyselené půdy (47 ng $N-N_2Og^{-1}h^{-1}$), které se průkazně lišila od reakce zásadité (37 ng $N-N_2Og^{-1}h^{-1}$, $p= 0,0003$) a rozdíl od přirozené reakce (43 ng $N-N_2O.g^{-1}h^{-1}$) vyšel neprůkazně. Rozdíl v produkci $N-N_2O$ u přirozené a zásadité reakce byl neprůkazný.



Obr.11 Aktivita denitrifikačních enzymů zjištěná při inkubaci vzorků s přidavkem acetyleny (celková aktivita, N_2O+N_2) a bez přidavku acetyleny (N_2O) v půdě hnojené hnojem a minerálními hnojivy s původním pH (7,79) a ve stejné půdě s pH zásaditějším (9,63) a kyselějším (5,06). Jsou zobrazeny aritmetické průměry ze 4 opakování, tučněji zvýrazněné chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky celkové produkce, spodní chybové úsečky představují \pm směrodatné odchylky produkce N_2O .

5. Diskuse

Dlouhodobé vstupy hnojiv do půdy ovlivňují mnoho vlastností půdy. Jak již bylo zmíněno, organická hnojiva se podílejí na tvorbě humusu, který mj. napomáhá k lepší tvorbě půdních agregátů, zlepšuje vodní a vzdušný režim půdy, má řadu účinků na půdní organismy, atd. Hnojení vyššími dávkami minerálních hnojiv ovlivňuje produkci N_2O několika způsoby (Velthof, 2003), a to formou dodávaného dusíku do půdy, který ovlivňuje jeho produkci při nitrifikaci a denitrifikaci, přítomností lehce dostupného uhlíku, který podporuje denitrifikační aktivitu a spotřebu O_2 a má vliv na biologické, chemické a fyzikální vlastnosti půdy v závislosti na změnách pH, které kolísá v důsledku přidavku dalších sloučenin (např. solí, vody).

V našem případě jsme původně předpokládali, že nejvyšší hodnoty DP a DEA budou zjištěny u půdy nejvíce hnojené (hnůj+NPK). Obecně by mělo platit, že čím je větší dlouhodobý přísun dusíku a dalších živin do půdy, tím bohatší je půdní mikrobiální společenstvo zejména s ohledem na výskyt denitrifikátorů a tudíž by v nejvíce hnojené půdě mělo docházet k největší produkci plyných metabolitů. Výsledky prvního pokusu (kapitola 4.1., tabulka 1) skutečně ukázaly, že nejvyšší denitrifikační potenciál (DP) byl zaznamenán u půdy nejvíce hnojené ($38,3 \mu\text{g N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Se snižováním množství dodaných živin denitrifikační potenciál klesal v pořadí: půda hnojená hnojem - půda hnojená kejdou a slámou a konečně půda nehnojená. Zřejmě nejlepší podmínky a tudíž i největší počet denitrifikátorů byly v půdě, do které bylo přidáváno nejvíce živin ve formě hnojiv. Tento nárůst byl nejspíše zapříčiněn dodáním dusíku v anorganických solích, které jsou pro mikroorganismy lépe dostupné než formy dusíku z hnojiv organických. Toto zjištění se shoduje s výsledky práce publikované Bowmanem (Bowman, 1996), který uvádí, že největší produkce N_2O pochází ze směsi organických a minerálních hnojiv. Hodnoty DP zjištěné v této práci celkově odpovídají hodnotám stanoveným u souboru 13 různých půd studovaných Šimkem a kol. (Šimek et al., 2000), kdy byl zjištěn DP v rozsahu $7,5 - 48 \mu\text{g N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Poměr N_2O/N_2 se u sledovaných půd lišil; nejnižší podíl těchto dvou metabolitů byl zaznamenán u půdy nejvíce hnojené. Toto zjištění může značit metabolický posun mikrobiálního společenstva nebo citlivost reduktázy oxidu dusného na některou z dodaných vedlejších složek minerálního hnojiva. Další možnou příčinou zvýšení podílu N_2O byla kyselější reakce než u ostatních půd. Snížení pH v důsledku dlouhodobého vstupu živin se shoduje s výsledky prací Šimka a kol. (Šimek et al., 1999; Šimek et al., 2002) a Mogge a kol. (Mogge et al., 1999). Mogge et al. (1999) zároveň uvádějí, že okyselení půd je

způsobeno vyšší intenzitou nitrifikace. Šimek et Hopkins (1999) naopak uvádějí, že v půdě, která byla hnojena směsí organických a minerálních hnojiv, docházelo k menší produkci oxidu dusného ve srovnání s půdou kontrolní. U půd hnojených pouze organickým hnojivem byl podíl oxidu dusného nejmenší (v porovnání s půdou kontrolní a nejvíce hnojenou). To může být způsobeno nižší koncentrací snadno dostupného organického uhlíku. Hlavním plynným metabolitem u všech čtyř půd byl molekulární dusík (N_2). Tento fakt může být způsoben mírně alkalickým pH, které mají všechny čtyři sledované půdy (7,79 - 8,22).

Dalším provedeným experimentem bylo porovnání půd v respiraci (produkci CO_2) (kapitola 4.2.). Na grafech, které ukazují produkci CO_2 , je vidět sigmoidální průběh typický pro mikrobiální růst v souladu s prací Ellise a kol. (Ellis et al., 1996). Produkce CO_2 stoupala se zvyšujícím se množstvím živin dodaných do půd ve formě hnojiv. Nejvyšší produkce C- CO_2 byla zaznamenána u půdy nejvíce hnojené. Toto zjištění se však neshoduje s výsledky práce Šimka a Hopkinse (Šimek et Hopkins, 1999), kteří uvádějí, že produkce C - CO_2 významně klesla oproti produkci u půdy kontrolní.

Při měření aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) (kapitola 4.3.) byla nejvyšší aktivita denitrifikačních enzymů zaznamenána u půdy hnojené hnojem (č. 211), zatímco u půdy nejvíce hnojené (č. 281) byla DEA nejnižší. Aktivita denitrifikačních enzymů zjištěná v této práci byla nižší než u půd studovaných v práci Šimka a Hopkinse (Šimek et Hopkins, 1999). V jejich práci byla zjištěna DEA kolem $120 \text{ ng N} - N_2O \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ u kontrolní nehnojené půdy, zatímco u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy byla DEA $70 \text{ ng N} - N_2O \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. Pro srovnání: v této práci dosahovala DEA $52 \text{ ng N} - N_2O \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ u kontrolní půdy a u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy $47 \text{ ng N} - N_2O \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. Tento rozdíl může být způsoben například odlišným pH u porovnávaných půd. Půdy studované v této práci mají pH kolem 8 a půdy s nimi porovnávané je mají kolem 6,2 (viz Šimek et Hopkins, 1999). Podle předchozích studií by bylo možno usoudit, že pH půd v této práci se nenachází ve zjištěném pH optimu, zatímco pH u půd porovnávaných je pH optimu blíže. V jiné práci publikované Šimkem a kol. (Šimek et al., 2000) byly zjištěny ještě výrazně vyšší hodnoty DEA, a to v rozmezí $90 - 523 \text{ ng N} - N_2O \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. Jde ovšem o jiné půdy z jiných oblastí a také s jiným zemědělským využitím, než je tomu u půd studovaných v této práci. Celkově lze nicméně říci, že půdy studované v předložené práci vykázaly spíše nižší hodnoty aktivity denitrifikačních enzymů v porovnání s jinými půdami v ČR.

Při vyšším pH půdy byl zaznamenán vyšší poměr N_2O/N_2 než u kontrolní půdy. Z toho vyplývá, že u všech studovaných půd byl u DP i u DEA zjištěn jako hlavní produkt N_2 . Potlačení aktivity denitrifikačních enzymů u nejvíce hnojené půdy může být zapříčiněno např.

vlivem anorganických hnojiv, kdy se s nimi do půdy dostávají různé příměsi, které mohou negativně působit na společenstvo denitrifikátorů, přílišným množstvím dodaných hnojiv ovlivňujících metabolismus denitrifikátorů či chybou v měření.

Při uměle změněném pH (kapitola 4.3.) došlo ke změně DEA u všech tří půd. Po přidavku anorganické silné zásady (NaOH) došlo k průkaznému snížení DEA. Tyto výsledky se shodují s výsledky publikovanými Šimkem a Hopkinsem (Šimek et Hopkins, 1999), kde DEA při uměle zvýšeném pH na 10 významně poklesla oproti DEA u půdy s původním pH.

Při změně pH dosahovaly neprůkazně nižších hodnot aktivity denitrifikačních enzymů u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy. U půdy hnojené hnojem a minerálními (NPK) hnojivy byla aktivita denitrifikačních enzymů dokonce vyšší u kyselého pH než u pH původního. Tento fakt může být zapříčiněn adaptabilitou mikroorganismů na posun pH do kyselější oblasti díky vysokým vstupům živin a vyšší mírou nitrifikace, při které se uvolňují H^+ ionty. U ostatních půd byla DEA neprůkazně nižší. Poměr N_2O/N_2 se zmenšil; u půd s okyseleným pH bylo zjištěno nejvyšší procentické zastoupení N_2O z celkové produkce. Tento fakt může být vysvětlen snížením pH a posunem v metabolismu v půdě se nacházejících denitrifikátorů. Posunutí poměru N_2O/N_2 ve prospěch oxidu dusného při snížení pH se shoduje s výsledky uvedenými v práci Šimka a kol. (Šimek et al., 2002) a Scholenfielda a kol. (Scholenfield et al., 1997), jakož i se závěry Firtha a Edwardse (Firth et Edwards, 1999). U zásadité reakce došlo k významnému poklesu DEA nejspíše z důvodů posunutí pH mimo optimum. pH po přidání roztoku silné anorganické zásady dosahovalo kolem 9,7. Hlavním produktem byl plynný dusík. Šimek et al. (2002) ve srovnatelné práci uvádějí, že při pH blízkému se 10 u půdy, u které se nacházelo pH optimum při podobné hodnotě pH (8,1), významně poklesla DEA a byl zjištěn vyšší poměr N_2O a N_2 než u půdy, u které nebylo pH pozměněno.

I když je zřejmé, že výsledky laboratorních experimentů nelze jednoduše přenášet do podmínek v terénu, a navíc v našem případě nejsou všechny výsledky zcela konzistentní, přesto výsledky provedených experimentů naznačují, že hnojení (organické i minerální) má vliv na odezvu půdních mikroorganismů na vstupy živin do zemědělské půdy. Změny v přísunu živin se tedy projevují v mikrobiálním společenstvu a následně ve velikosti produkce plyných metabolitů a ve změnách jejich poměru. Jednoduché laboratorní pokusy popsané v této práci nemohou dát odpověď na to, jestli vůbec a případně jak různé hnojení ovlivňuje produkci N_2O v půdě a jeho emise do atmosféry. Výsledky experimentů však nicméně naznačují, že vlivem dlouhodobého hnojení dochází ke změnám v mikrobiálním společenstvu a že tyto změny by mohly ovlivňovat i emise oxidu dusného v polních podmínkách.

6. Závěry

1. U čtyř studovaných půd byl zjištěn rozdílný denitrifikační potenciál (DP). Nejnižší DP byl zaznamenán u půdy nehnojené ($28,72 \mu\text{g N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). U půdy hnojené hnojem (č. 211) a u půdy hnojené směsí kejdy a slámy (č. 611) byly zjištěny velmi podobné hodnoty DP ($33,89$; $32,66 \mu\text{g N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Nejvyšší DP byl zjištěn u půdy nejvíce hnojené, tedy u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy, a to $38,29 \mu\text{g N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

2. U všech půd byl při měření denitrifikačního potenciálu hlavním produktem denitrifikace molekulární dusík (N_2). Podíl oxidu dusného (N_2O) z celkové produkce ($\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}$) byl u půdy nehnojené 13,7%, u půdy hnojené hnojem 7,1%, u půdy hnojené kejdou a slámou 6,3% a u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy 34,5%.

3. Respirace půdy (produkce CO_2) byla nejnižší u půdy nehnojené a nejvyšší u půdy hnojené hnojem a minerálními hnojivy.

4. U tří studovaných půd byla zjištěna rozdílná aktivita denitrifikačních enzymů. Nejvyšší DEA byla zjištěna u půdy hnojené hnojem a nejnižší u půdy nejvíce hnojené (tedy hnojené hnojem a minerálními hnojivy). Hlavní produkt denitrifikace byl ve shodě s výsledky měření DP vždy N_2 .

5. Při měření DEA v půdách po změně pH byla nejnižší produkce N_2O u zásadité reakce. Poměr $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ byl u zásadité reakce nejnižší. V půdě s kyselou reakcí byla produkce $\text{N-N}_2\text{O}$ vyšší a poměr $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ byl nejvyšší.

7. Literatura

ANDREWS J.E., BRIMBLECOMBE P., JICKELLS T.D., LISS P.S., REID B., 2004. An introduction to environmental chemistry (2nd edition). Blackwell Publishing, Padstow, Cornwall, UK. 296 p.

ANONYM, 2006. Statistická ročenka České republiky 2006. Scientia, Praha, 760 p.

BOWMAN A.F., 1996. Direct emissions of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 46, p 35 – 70.

BRADY N.C., WEIL R.R., 1999. The nature and properties of soils (13th edition). Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 960 p.

BREMNER, J.M., 1997. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49, p 7 – 16.

ELLIS S., DENDOOVEN L., GOULDING K.W.T., 1996. Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and N₂O evolution during denitrification. *Soil Biology and Biochemistry* 28, p 589-595.

FIRTH J.R., EDWARDS C., 1999. Effects of cultural conditions by *Pseudomonas Stutzeri* measured by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 87, p 353-358.

HÉNAULT C., GERMON J.C., 1995. Quantification de la dénitrification et des émissions de protoxyde d'azote (N₂O) par les sols. *Agronomie* 15, p 321 – 325.

JURČÍK F., BARÁK K., HAVELKA B., 1975. *Agrochemie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 222 p.

MOGGE B., KAISER E.A., MUNCH J.C., 1999. Nitrous oxide emissions and denitrification N-losses from agricultural soils in the Bornhöved Lake region: influence of organic fertilizers and land-use. *Soil Biology and Biochemistry* 31, p 1245-1252.

MOSIER A.R., DUXBURY J.M., FRENEY J.R., HEINEMEYER O., MIONAMI K., 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation. *Plant and Soil* 181. p. 95-108.

NÖMMIK H., 1956. Investigations on denitrification in soils. *Acta Agriculturae Scandinavica* 6, p 195-228.

PAUL E.A., CLARK F.E., 1996. *Soil microbiology and biochemistry* (2nd edition). Academic Press, San Diego, California, USA. 340 p.

SCHOLENFIELD D., HAWKINS J.M.B., JACKSON S.M., 1997. Use of a flowing helium atmosphere in incubation technique to measure the effects of denitrification controls applied to intact cores of a clay soil, *Soil Biology and Biochemistry* 29, p 1337-1344.

ŠIMEK, M., HOPKINS D.W., 1999. Regulation of potential denitrification by soil pH in long – term fertilized arable soils. *Biology and Fertility of Soils* 30, p 41 – 47.

ŠIMEK, M., COOPER J.E., PICEK T., ŠANTRŮČKOVÁ H., 2000. Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice. *Soil Biology and Biochemistry* 32, p 101-110.

ŠIMEK, M., JÍŠOVÁ, L., HOPKINS, D.W., 2002. What is so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology and Biochemistry* 34, p 1227-1234.

ŠIMEK M., 2003. *Základy nauky o půdě. 3. Biogeochemické cykly*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice, 151 p.

ŠIMEK M., 2004. *Základy nauky o půdě. 4. Degradace půdy*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice, 230 p.

VELTHOF G.L., KUIKMAN P.J., OENEMA O., 2003. Nitrous oxide emission from snimal manures applied to soil under controlled conditions. *Biology and Fertility of Soils*. P. 221-230.

YEOMANS, J.C., BREMNER, J.M., MCCARTHY, G.W., 1992. Denitrification capacity and denitrification potencial of subsurface soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 23, p 919 – 927.

Internet

<http://bezjedu.arnika.org>

