

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**

**Přírodovědecká fakulta**

**2010**



**magisterská práce**

**Fosfor v biomase půdních mikroorganismů a její  
odhad pomocí extrakčně-fumigační metody**

**vypracoval: Bc. Petr Čapek**

**školitel: Prof. Ing. HANA ŠANTRŮČKOVÁ, Csc.**

## Magisterská práce

**Čapek P., 2010: Fosfor v biomase půdních mikroorganismů a jeho odhad pomocí extrakčně-fumigační metody. [Microbial biomass phosphorus measured by extraction-fumigation method.] - 55 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.**

### **Anotace:**

The aim of this study was to assess possible sources of unaccuracy in measurement of soil microbial phosphorus by extraction-fumigation method. The biggest one is the correction for sorption in two forest soils of watershed Plešné lake and Čertovo lake and one waterlogged soil. We also tried to assess the correction factor ( $K_p$ ) for these soils, but we were unsuccessful. We would like to assess extractability of phosphorus sorbed during fumigation and assess  $K_p$  factor in future. Therefore we set up an appropriate methodology.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích, dne

.....

Na tomto místě bych rád poděkoval Prof. Ing. Haně Šantrůčkové Csc za skvělé vedení. Dále bych rád poděkoval Karolině Tahovské, Danielu Vaňkovi, Tomáši Pickovi a všem zaměstnancům či studentů katedry biologie ekosystémů. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a Katce Leštinové.

## **Obsah:**

1. Úvod.....	1
2. Literární rešerše.....	2
1. Půda a půdní mikroorganismy.....	2
2.1.1. Půdní mikroorganismy.....	2
2.1.1.1. Životní prostor půdních mikroorganismů.....	3
2.1.1.2. Význam půdních mikroorganismů.....	4
2.2. Úloha půdních mikroorganismů v cyklu P.....	6
2.2.1. Fosfor v biomase půdních mikroorganismů.....	7
2.2.1.1. Množství fosforu jednotlivých buněčných struktur.....	8
2.2.2. Stanovení biomasy půdních mikroorganismů.....	10
2.3. Ekologická stechiometrie.....	10
2.3.1. Stechiometrie půdních mikroorganismů.....	11
2.3.2. Stechiometrie mikrobiální biomasy v půdách povodí Plešného a Čertova jezera.....	12
2.3.2.1. Možné příčiny kolísání stechiometrie půdních mikroorganismů.....	13
2.3.2.2. Metodické chyby.....	14
2.4. Cíle práce .....	17
3. Materiál a metody.....	18
3.1. Popis studovaného území.....	18
3.2. Odběr a zpracování půdních vzorků.....	18
3.3. Analýza vzorků.....	19
3.3.1. Stanovení sorpce P půdami.....	19
3.3.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným.....	20
3.3.3. Stanovení vlivu biologické sorpce na extrahovatelnost P hydrogenuhličitanem sodným.....	20
3.3.4. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na hodnoty $P_{mic}$ .....	20
3.3.5. Stanovení korekčního faktoru $K_p$ .....	21
3.4. Statistické zpracování dat.....	23

4. Výsledky.....	25
4.1. Stanovení sorpce P půdami.....	25
4.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným.....	26
4.3. Stanovení vlivu biologické sorpce na extrahovatelnost P hydrogenuhličitanem sodným.....	27
4.3. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na hodnoty $P_{mic}$ .....	28
4.4. Stanovení korekčního faktoru $K_p$ .....	31
5. Diskuse.....	35
5.1. Stanovení sorpce P půdami.....	35
5.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným a vliv biologické sorpce na tyto hodnoty.....	36
5.3. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na hodnoty $P_{mic}$ .....	38
5.4. Stanovení korekčního faktoru $K_p$ .....	39
5.5. Korekce $P_{mic}$ měřených v půdách PL a CT z let 2004 - 2008.....	41
6. Závěr.....	45
7. Seznam použité literatury.....	46

## **1. Úvod**

Fosfor (P) je jedním z nejdůležitějších biogenních prvků, který je nezbytný pro přežití všech živých organismů. V přírodě je však jeho zastoupení poměrně řídké. Půda je sice po oceánech druhým největším zásobníkem P na Zemi (Paul a Clark, 1996), ale díky chemické povaze svých sloučenin je P velice těžce přístupný organismům žijícím v půdě, či na jejím povrchu. Většina P v půdě je totiž vázána do nerozpustných forem s kovy, nebo jinak zneprístupněna. V půdě existuje spojitě kontinuum různých zásobníků P, které mezi sebou mohou volně přecházet (Barrow, 1983; Lookman et al., 1995). Na rozdělení P mezi těmito zásobníky se podílejí především půdní mikroorganismy (Olander a Vitousek, 2004). A půdní mikroorganismy také tvoří jeden z těchto zásobníků, který je přímo dostupný půdním organismům a současně je aktivní částí celkového P v půdě (Sylvia et al., 1999). Především skrze mikrobiální biomasu pak P ovlivňuje cykly dalších biogenních prvků, zvláště pak dusíku (N). Hraje totiž významnou roli v procesu mineralizace organického N, fixace vzdušného N a mikrobiální immobilizace (Sylvia et al., 1999).

Pro studium půdy a v ní probíhajících procesů je nezbytný co možná nejpřesnější odhad množství P v biomase půdních mikroorganismů ( $P_{mic}$ ). V současné době se pro tento odhad nejčastěji používá extrakčně fumigační metoda, která však může být zatížena chybami. Je tedy důležité posoudit, zda získané hodnoty  $P_{mic}$  odpovídají skutečnosti. Jedním z takových způsobů je stanovení poměru tří základních biogenních prvků C:N:P v biomase půdních mikroorganismů, který je dán (vymezen) složením buněk půdních mikroorganismů a jejich fyziologickými pochody (Sterner a Elser, 2002). V měřeních, která se provádí v půdách povodí Plešného a Čertova jezera je hraniční poměr hodnot C:P a N:P často přesahován. U lesních půd šumavských smrčín je  $P_{mic}$  zřejmě nadhodnocován a stanovené poměry C:N:P jsou neúměrně nízké. Na druhé straně jsou hodnoty  $P_{mic}$  v půdách mokřých luk Hamru stanovené extrakčně fumigační metodou nereálně nízké až záporné.

Cílem mé magisterské práce bylo určit faktory, které ovlivňují stanovení fosforu v biomase půdních mikroorganismů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera a půdách mokřých luk Hamru a Záblatí a současně stanovit postup pro jeho zpřesnění.

## **2. Literární rešerše**

### **2.1. Půda a půdní mikroorganismy**

Půda je svrchní zvětralá vrstva zemského pláště, která obsahuje organickou hmotu, minerální látky a živiny, podporující růst rostlin (Sylvia et al., 1999). Půda je jednou z nejzákladnějších a nejdůležitějších součástí všech terestrických ekosystémů, je jejich organizačním centrem (Coleman et al., 1998). Její význam spočívá především v procesu rozkladu a mineralizace organické hmoty, jež se odehrává na povrchu a uvnitř půdy. Především díky této schopnosti je významným činitelem v koloběhu všech důležitých biogenních prvků, včetně uhlíku (Bloem et al., 1997). Z hlediska lidské populace má půda nezastupitelný význam pro rostlinnou a živočišnou produkci, koloběh vody a dále pro stavebnictví, či dopravu (Vinding et al., 2005).

Půda je komplexní a nesmírně složitý systém. Na malé ploše může vedle sebe existovat mnoho mikroprostředí, lišící se v čase a prostoru, obývané různými druhy organismů (Stozky, 1997). A právě půdní organismy a především mikroorganismy, jsou podstatnou součástí půdy, která nese její biologickou a biochemickou aktivitu. Ta je nezbytná pro to, aby půda mohla plnit všechny své funkce. Kvalita půdy, čili její nejzákladnější charakteristika je definována jako schopnost dané půdy fungovat jako vitální, živý systém, přirozený či obhospodařovaný, podporovat růst rostlin a zdraví živočichů, udržovat či zlepšovat kvalitu vzduchu a vody a podporovat lidské zdraví (Doran a Safley, 1997; BBodSchG, 1998).

#### **2.1.1. Půdní mikroorganismy**

Půdní mikroorganismy mohou tvořit 75 – 98% celkové živé biomasy v půdě (Beare, 1997). Ačkoliv jsou poměrně malou frakcí půdní organické hmoty, probíhá jejich prostřednictvím 80 – 90 % všech biochemických procesů v půdě (Coleman a Crossley, 1996; Nannipieri et al., 2003). Navíc přes heterotrofní mikroorganismy, které v půdě převažují, prochází 90% veškeré energie vstupující do půdy s rostlinným opadem (Nannipieri et al., 2003). Z těchto důvodů se také množství mikrobiální biomasy v půdě, vyjádřené jako množství uhlíku (C) obsaženého ve všech buňkách, uvádí jako nejdůležitější indikátor zdraví půdy (Arias et al., 2005).

### *2.1.1.1 Životní prostor půdních mikroorganismů*

Pro pochopení chování a aktivity půdních mikroorganismů, je nezbytná znalost jejich životního prostoru (Sylvia et al., 1999). Půdní mikroorganismy jsou v půdě vázány na vodní film (Stozky 1977), ze kterého přijímají rozpuštěné látky a vylučují meziproducty rozkladu organické hmoty, odpadní látky a extracelulární enzymy. 80 – 90% půdních mikroorganismů se nachází na povrchích půdních částic (Hattori, 1973), na kterých je současně vázána voda a tvoří se zde vodní film. Při vazbě mikroorganismů na půdní částice se uplatňují především elektrostatické interakce a Van der Waalovy síly (Ehlers et al., 2008), z menší části pak adheze způsobená produkcí exopolysacharidů. Část mikroorganismů je dále uzavřena v půdních agregátech (Riis et al., 1997). Vazba mikroorganismů na půdní částice je významná. Kromě toho že chrání mikroorganismy před vyplavováním a poskytuje jim stálejší prostředí, mění také jejich aktivitu (např. Fletcher, 1991).

V půdě je aktivní jen malá část mikroorganismů. Většina z nich je v klidové fázi a stávají se aktivními až při určité změně abiotických faktorů (teploty, půdní vlhkosti, dostupnosti živin apod.; Nannipiery et al., 2003). Aktivní mikroorganismy jsou v půdě rozděleny diskrétně (Stozky, 1977). Existují zde místa se zvýšenou mikrobiální aktivitou a to především v blízkosti půdních agregátů s rozdílnými chemicko-fyzikálními faktory od okolní půdy a dále v okolí rhizosféry, místech s nahromaděným rostlinným opadem, nebo výkalech (Sextone et al., 1985).

V půdě působí na mikroorganismy mnoho faktorů ovlivňujících jejich druhové složení a aktivitu. Mezi ty nejdůležitější patří množství a formy C, zdroje energie, minerální látky, růstové faktory, iontová síla půdního roztoku, množství vody, teplota, tlak, složení půdního vzduchu, pH, redoxní potenciál, vlastnosti půdních povrchů, elektromagnetická radiace, interakce s ostatními půdními organismy a vlastní genetika půdních mikroorganismů. Všechny tyto faktory se mohou na malém prostoru značně měnit a životní prostředí půdních mikroorganismů tedy můžeme považovat za dynamický systém (Nannipiery et al., 2003). Vlivy na různé skupiny půdních mikroorganismů mohou působit rozdílně, podle životní strategie dané skupiny. Tyto vlivy se mohou sčítat, navzájem rušit nebo dokonce násobit. Proto je vždy nutné posuzovat působení různých faktorů na specifické půdní procesy zvlášť.

### *2.1.1.2. Význam půdních mikroorganismů*

Půdní organismy se vyvíjely takovým způsobem, aby si v nepříznivém půdním prostředí mohli zajistit dostatek živin a energie potřebné k metabolismu, růstu a rozmnožování (Sylvia



et al., 1999). Protože půda je nespojitý, strukturovaný a heterogenní systém často s nedostatkem živin a značným kompetičním tlakem, vyvinuly si půdní mikroorganismy nejrůznější biochemické dráhy schopné zajistit všechny dosud známé biologické pochody (Nannipiery et al., 2003). Díky rychlému obratu buněk půdních mikroorganismů (mykorhizní houby – 5 dní, bakterie – 11 dní (Ostle et al., 2003)) a unikátní schopnosti horizontálního přenosu genetické informace (Lorenz a Wackernagel, 1987; Khanna a Stozky, 1993) existuje v půdě v současné době obrovská funkční a genetická diverzita mikroorganismů. Odhaduje se, že zde existuje až  $10^6$  prokaryot,  $1,5 \cdot 10^6$  hub,  $0,4 \cdot 10^6$  řas a  $0,2 \cdot 10^6$  protozoí (Schleifer, 2004). Tím půdní mikroorganismy významně přispívají k celkové genetické diverzitě na Zemi (Whitmann et al., 1998).

Pro fungování všech terestrických ekosystémů je ovšem významnější funkční diverzita půdních mikroorganismů, která jde samozřejmě ruku v ruce s diverzitou genetickou. Jakým způsobem jsou funkční a genetická diverzita navzájem propojeny však dosud není známo (Fitter et al., 2005). Právě díky své obrovské funkční diverzitě, která je důsledkem jejich snahy vypořádat se s nepříznivým půdním prostředím, zajišťují půdní mikroorganismy řadu důležitých procesů na globální úrovni. Tím nejdůležitějším a primárním procesem je mineralizace organické hmoty (Bloem et al., 1997). Protože se většina půdních mikroorganismů živí heterotrofně, je pro ně rostlinný opad zdrojem energie a uhlíku. Současně získávají půdní mikroorganismy z rostlinného opadu větší či menší část důležitých biogenních prvků, především dusíku (N), fosforu (P) a síry (S). Pokud je těchto prvků dostatek a jejich poměr k C je příznivý ( $C/N \square 25$ ;  $C/P \square 300$ ), uvolňují půdní mikroorganismy tyto prvky v minerálních, nebo jednoduchých organických formách do půdního roztoku, čímž mohou ovlivňovat produktivitu rostlin (Heijden et al., 2008). V tomto směru jsou pak významné další procesy jako fixace vzdušného dusíku a mykorhizní asociace zajišťující obranu rostlin před suchem, nedostatkem živin a patogeny (Heijden et al., 2008). Velký význam mykorhizních interakcí je zřejmý už jen z faktu že je tvoří téměř 80% všech rostlin (Smith a Read, 1997). Tyto a další významné ekosystémové procesy zajišťované půdními mikroorganismy jsou shrnuty v tab. 1.

Ekosystémový proces	Příslušná skupina mikroorganismů	Odhadovaný příspěvek příslušných mikroorganismů v procesu
<i>Cyklus uhlíku</i>		
Rostlinná produktivita	dusík fixující bakterie, mykorhizní houby	0 - 50%
	mikrobiální patogeny	-50 - 0%
Dekompozice rostlinného opadu	bakterie, houby	až 100%
<i>Cyklus dusíku</i>		
Dusík přijímaný rostlinami		
Fixace vzdušného dusíku	rhizobia, aktinomycety, volně žijící bakterie	0 - 20%
Příjem dusíku z půdy a půdního roztoku	mykorhizní houby	0 - 80%
Ztráty dusíku z ekosystému		
Denitrifikace	denitrifikační bakterie a houby	až 60%
Zvýšené vyplavování dusíku		??
způsobené nitrifikací	nitrifikační bakterie, Archea	
<i>Cyklus fosforu</i>		
Fosfor přijímaný rostlinami	mykorhizní houby, fosfor	0 - 90%
Ztráty fosforu mineralizací org. hmoty a vyplavováním	solubilizující bakterie	??
<i>Regulace rostlinné biodiverzity</i>		
Stimulace rostlinné biodiverzity	VAM houby, rhizobia	0 - 50%
Redukce rostlinné biodiverzity	VAM houby	-20 - 0%

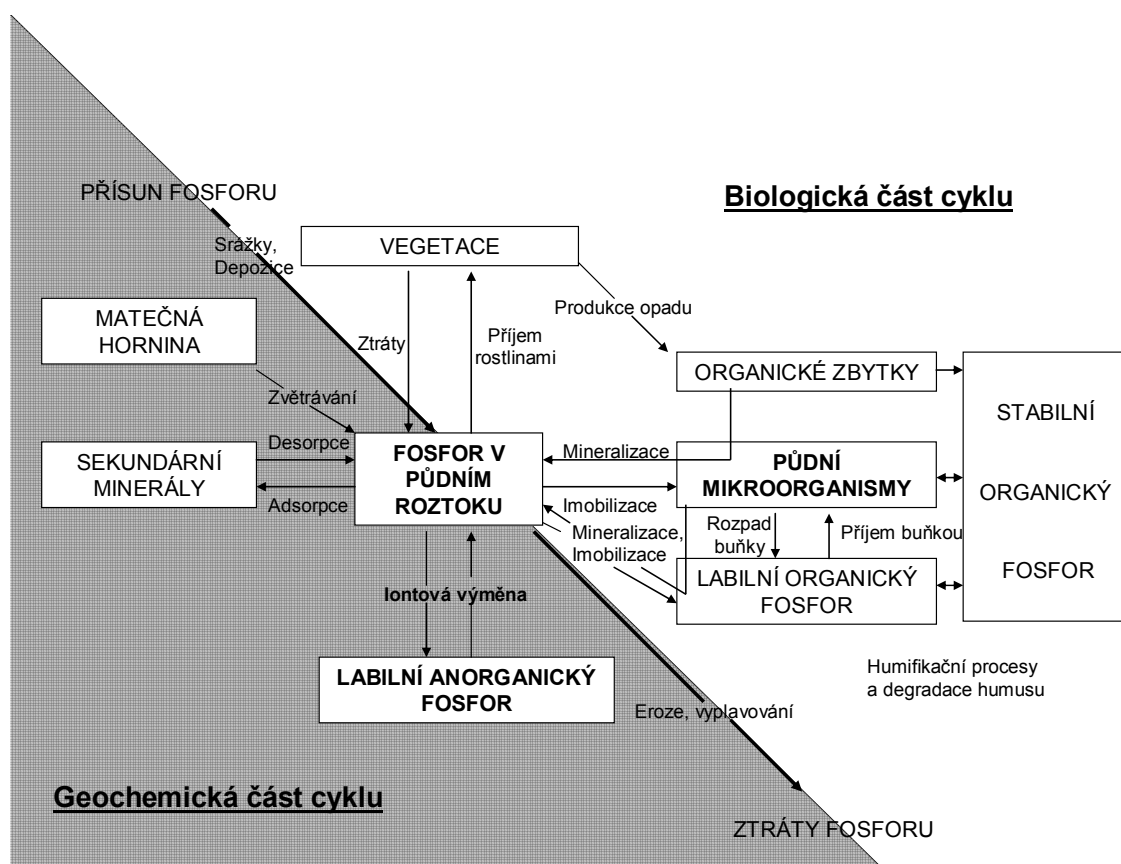
*Tab. 1: Význam půdních organismů v ekosystémových procesech (upraveno podle Heiden et al., 2008)*

Jak již bylo řečeno výše, primárním procesem zajišťovaným půdními mikroorganismy je mineralizace rostlinného opadu. Díky této schopnosti jsou půdní mikroorganismy klíčovými činiteli v koloběhu nejen C a důležitých biogenních prvků, ale také dalších mikroprvků. Svou činností a vedlejšími produkty své činnosti ovlivňují i řadu dalších procesů. V tomto směru je významná tvorba půdní organické hmoty, která má významný vliv na vlastnosti půdy. Ovlivňuje kationtovou i aniontovou výměnnou kapacitu půdy, způsobuje agregaci malých půdních částic do větších stabilních agregátů a také zlepšuje schopnost půd vázat kovy do inaktivních forem (Sylvia et al., 1999). Tvorba agregátů pak zvyšuje schopnost půdy zadržovat vodu a tím snižuje její odtok, snižuje erozi půdy, zlepšuje výměnu plynů a tím provzdušnění půdy.

Význam půdních mikroorganismů je obrovský a není možné ho detailněji popsat ve všech směrech. Výše uvedené procesy jsou nejdůležitější a jejich znalost je nezbytná pro studium dalších mikrobiálních procesů, ale i vlastností a funkcí půdy jako součásti ekosystému. Ve své práci se budu dále věnovat jen vlivu půdních mikroorganismů na cyklus fosforu (P).

## 2.2. Úloha půdních mikroorganismů v cyklu P

Cyklu fosforu se významným způsobem účastní půdní mikroorganismy (obr. 1). Podílejí se na rozpouštění anorganických sloučenin P (solubilizace), na rozkladu (dekompozici a mineralizaci) organických sloučenin a na imobilizaci P. Fosfor se v buňkách organismů vyskytuje vázaný ve fosfolipidech, DNA, RNA, ATP, koenzymech a inositolhexafosfátu prostřednictvím esterové vazby (C-O-P). Může také tvořit zásobní látky ve formě polyfosfátů. S odumřelými částmi organismů vstupuje P do půdy, kde je mineralizován a uvolňován do půdního roztoku ve formě fosforečnanů.



Obr. 1 – Zjednodušený cyklus fosforu (upraveno podle Walbridge, 1991)

Mikroorganismy (ale i kořeny rostlin) produkují enzymy – fosfatázy, které štěpí esterové vazby (Tate, 1984). Fosfatázová aktivita je přímo ovlivněna množstvím fosforečnanů v půdním roztoku (Spiers and McGill, 1979). K inhibici fosfatázové aktivity dochází při vysoké koncentraci P-PO<sub>4</sub> a k indukci naopak při nízké koncentraci P-PO<sub>4</sub> v půdním roztoku. Na aktivitu fosfatáz mají také vliv vlastnosti půdy. Fosfatázy mohou být v půdě rozkládány,

nebo může docházet k jejich sorpci na půdní organickou hmotu. Takto vázané enzymy mají maskovaná aktivní místa a nemůže již docházet k mineralizaci (Sylvia et al., 1999).

Procesy mineralizace P probíhají v půdě současně s procesy jeho imobilizace. To, zda dojde k rozkladu či k vazbě P do biomasy mikroorganismů, závisí především na obsahu P v rozkládajícím se organickém materiálu. Pokud je jeho poměr C/P vyšší než 300, dochází k imobilizaci P. Naopak převahu mineralizace můžeme očekávat při poměru nižším než 200 (Stevenson and Cole, 1999).

Další významnou úlohou půdních mikroorganismů je rozpouštění anorganických sloučenin P a tím uvolňování ortofosforečnanového iontu do půdního roztoku. Protože přímo dostupného P je v půdním roztoku velice málo, musí ho půdní organismy získávat z pevné fáze (Frossard et al., 2000). Fosforečnany v půdním roztoku se mohou vázat na povrch koloidních částic. Vazba se uskutečňuje prostřednictvím výměnných iontů ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Tento jev se nazývá koadsorpcí (Tan, 1993). Může také docházet k vazbám fosforečnanů na volné ionty kovů v roztoku ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Oba typy vazeb jsou velice pevné. Půdní mikroorganismy si však takto vázaný P mohou zpřístupnit (solubilizace) např. (1) produkcí nízkomolekulárních organických kyselin (př. kyselina malonová, citronová, šťavelová), které tvoří s kovy pevné komplexní sloučeniny (Harrold and Tabatabai, 2006), (2) tvorbou  $\text{H}_2\text{CO}_3$  a  $\text{HCO}_3^-$  v důsledku produkce  $\text{CO}_2$  respirací a (3) uvolňováním  $\text{H}^+$  v důsledku příjmu kationů.

Půdní mikroorganismy jsou tedy hlavními činiteli, které určují podíl P v různých zásobnících v půdě (Olander a Vitousek, 2004). Nejen že uvolňují P z různých zdrojů do půdního roztoku, ale svou činností mohou P i ukládat do vlastních buněk, nebo ho znepřístupňovat v procesu tvorby agregátů (viz 2.1.1.2.). V půdě tak mikrobiální aktivitou vzniká spojitě kontinuum různých zásobníků P, které mezi sebou mohou volně přecházet (Barrow, 1983; Lookman et al., 1995). V tomto kontinuu je významným zásobníkem P biomasa půdních mikroorganismů, která může činit velký podíl z celkového P v půdě, a která je současně důležitým faktorem určujícím dostupnost P v půdě (Stewart and Tiesen, 1987; Magid et al., 1996). Proto je také důležité znát množství P uloženého v mikroorganismech.

### **2.2.1. Fosfor v biomase půdních mikroorganismů**

Fosfor patří mezi prvky nezbytné pro přežití a růst všech organismů. Společně s uhlíkem (C), dusíkem (N), kyslíkem (O), vodíkem (H) a sírou (S) patří mezi tzv. makronutrienty, prvky jejichž procentuální množství přesahuje 1% podílu z celé buňky. Přestože je zastoupení

fosforu v zemské kůře poměrně nízké, v buňkách se vyskytuje ve značném množství. To svědčí o nezastupitelném postavení fosforu jako biogenního prvku. Podle Westheimera (1978, 1982) hraje P centrální roli v metabolismu buňky tím, že jednotlivým látkám, meziproductům metabolismu, dodává negativní náboj a zabraňuje tak úniku těchto látek přes buněčnou membránu. Určuje také negativní náboj buněčných polymerů (DNA, RNA), tím znemožňuje vazbu hydroxidů na tyto struktury a brání tak jejich depolymerizaci uvnitř buňky. Pautard 1978 uvádí, že fosfor má mezi látkami asimilovanými organismy speciální roli. Zatímco C, H, N a O jsou prvky tvořící kostru organismu, P je nástrojem její výroby.

Z širšího hlediska je fosfor v biomase půdních mikroorganismů (Pmic) velice významný jako součást biologicky dostupného fosforu v půdě (Brookes et al. 1984; Sparling et al. 1987; Srivastava and Singh 1988; Chen et al. 2000). Více než absolutní množství fosforu v biomase půdních mikroorganismů je však důležitý jeho molární poměr k C a N, který je určován stechiometrickým poměrem (viz 2.3.).

#### *2.2.1.1. Množství fosforu jednotlivých buněčných struktur*

Fosfor nalezneme v buňce ve všech důležitých buněčných strukturách a to v různých poměrech k uhlíku a dusíku. Všechny uvedené molární poměry jsou převzaty ze Sterner a Elser (2002).

Na povrchu buněk půdních mikroorganismů se nachází buněčná stěna. U gram pozitivních bakterií se fosfor v buněčné stěně nachází nejčastěji v poměru C:N:P = 193:58:1. Jednoznačné stanovení tohoto poměru u gram negativních bakterií je kvůli velké plasticitě jejich buněčné stěny nemožné. Buněčná stěna hub je tvořena chitinem, jehož základní složkou je N-acetyl-D-glukosamin a fosfor se tedy v této struktuře nevyskytuje.

Pod buněčnou stěnou, a u eukaryotických organismů také uvnitř buňky, se nachází struktury označované jako buněčné membrány. Ty jsou tvořeny glycerolem nebo sfingosinem s navázanými mastnými kyselinami různé délky a struktury a zbytkem kyseliny fosforečné, tvořící polární část celé struktury. Výjimkou mezi půdními mikroorganismy jsou archea, jejichž stavba buněčných membrán je odlišná. Složení buněčných membrán může být v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí značně proměnné. Délka, nasycení a prostorová konformace mastných kyselin v buněčné stěně bakterií se může měnit a tím také dochází ke změnám v poměru C:N:P. Uvádí se však, že tento poměr je obecně 162:35:1.

Buněčná stěna je dále napojena na síť kanálků endoplazmatického retikula. To je dále napojeno na golgiho aparát a jádro buňky. To platí pro eukaryotické organismy.

Prokaryotické organismy neobsahují endoplazmatické retikulum, golgiho aparát a nemají pravé jádro. Poměr C:N:P endoplazmatického retikula je v průměru 120:23:1, golgiho aparátu 97:16:1.

Rozdílné uložení genetické informace v podobě dvoušroubovice deoxyribonukleové kyseliny u eukaryot a prokaryot ovlivňuje také množství fosforu v poměru k C a N těchto struktur. Eukaryota mají pravé buněčné jádro ohraničené buněčnou membránou, v něm je uložena genetická informace. Samotná DNA je pak kondenzována s histony tvořící chromosomy. Poměr C:N:P je v průměru 29:10:1. Prokaryota nemají jádro a jejich DNA není uložena v podobě chromosomů, množství fosforu v poměru k dusíku je zde proto vyšší – 3,7. Celkový poměr C:N:P se pak pohybuje okolo 12:4:1.

Zbývajícimi dvěma buněčnými strukturami, ve kterých se fosfor nachází, jsou mitochondrie a ribozomy. Mitochondrie se nalézají pouze u eukaryot, jejich C:N poměr je stabilní, rozdíl je však v množství P. Toto množství závisí na velikosti vnitřní membrány a míře respirace dané mitochondrie. Čím vyšší je míra respirace, tím vyšší je poměr N:P. Důvodem je zvýšené množství enzymů bohatých na N na vnitřní straně membrány. Dýchací řetězec prokaryot, se narodil od eukaryot, nachází vně cytoplazmatické membrány, kde se při vyšší míře respirace mohou akumulovat enzymy bohaté na N, podobně jako u eukaryot. I zde může docházet ke změnám v poměru C:N:P. Ribozomy se nalézají u eukaryot i prokaryot, množství fosforu v poměru k C a N se však mezi nimi liší podle rozdílu ve stavbě. Ribozomy prokaryot se skládají z 55 proteinů, malé a velké podjednotky ribozomové RNA. Malá podjednotka obsahuje 16S rRNA, velká pak 5S a 23S rRNA. Ribozomy eukaryot pak tvoří 82 proteinů, malá podjednotka obsahující 18S rRNA a velká podjednotka obsahující 5,8S; 5S a 28S rRNA. Výsledkem je rozdílný poměr C:N:P. Zatímco u prokaryot je tento poměr 18:6:1, u eukaryot je to 21:7:2,1. Ribozomy jsou tedy společně s DNA nejbohatším zdrojem P v poměru k C a N ze všech buněčných struktur.

Chceme-li určit celkové množství P v poměru k C a N v biomase bakterií a hub, tedy dvěma nejvíce zastoupenými skupinami organismů v půdě, pak je toto množství přibližně 47:7:1 (Reiners, 1986) a 75:15:1 (Sterner a Elser, 2000). Tento poměr odpovídá stechiometrii a zastoupení buněčných struktur. Půdní mikroorganismy ale mohou ukládat ve svých tělech zásobní látky. Množství těchto látek a jejich poměr C:N:P je u každé skupiny mikroorganismů jiný a závisí na okolním prostředí. Především na přítomnosti dostupných forem živin v roztoku. Zásobní látky tak mohou celkovou stechiometrii buňky pozměnit (viz 2.3.1.).

### **2.2.2. Stanovení biomasy půdních mikroorganismů**

V současné době se ke stanovení živin v biomase půdních mikroorganismů používá extrakčně fumigační metoda (FE). Princip této metody spočívá v tom, že půdní mikroorganismy vystavené chloroformu hynou a jejich buněčný obsah se vylévá do půdního prostředí. Tento obsah je poté extrahován a z rozdílného množství daného prvku (C, N, nebo P) v extraktech před a po fumigaci se vypočítá jeho množství v biomase. Protože v půdním extraktu po fumigaci nelze stanovit veškeré množství prvku uvolněného z biomasy, musí se při výpočtu používat korekční faktory. Pro každý prvek je určen jiný korekční faktor. Ten udává, jaké množství prvku uvolněného z mikrobiální biomasy lze za daných podmínek při použití daného extrakčního činidla získat. Například pro fosfor je korekční faktor stanoven na 0,40. To znamená, že daným extrakčním činidlem lze z půdy vyextrahovat pouze 40% množství, které se do půdy skutečně uvolnilo. Zbytek tohoto množství není možné stanovit ze dvou důvodů. (1) Po vylití buněčného obsahu fosfor rychle reaguje s ostatními sloučeninami v půdním prostředí a minerálními povrchy. Na ty se může vázat tak pevně, že jeho extrakce a následné stanovení není možné. (2) Část fosforu zůstává ve stabilních organických sloučeninách, které opět není možné vyextrahovat a stanovit.

Jako extrakční činidlo se pro stanovení P v biomase půdních mikroorganismů používá 0,5 M roztok  $\text{NaHCO}_3$  o  $\text{pH}=8,5$ . Fosfor je stanoven spektrofotometricky (Murphy a Riley, 1962). Využívá se reakce  $\text{P-PO}_4$  s vianem antimonylo-draselným a molybdenanem amonným v kyselém prostředí za tvorby komplexní sloučeniny. Po její redukci kyselinou askorbovou vzniká fosfoantimolybdenanová modř, jejíž absorbance při určité vlnové délce je přímo úměrná koncentraci  $\text{P-PO}_4$ .

Výhodou extrakčně fumigační metody je, že její pomocí lze stanovit množství C, N i P v biomase půdních mikroorganismů. Je možné tak vypočítat molární poměry těchto prvků (stechiometrii), které jsou důležitou charakteristikou mikrobiální biomasy.

### **2.3. Ekologická stechiometrie**

Jedním z hlavních principů biogeochemie je, že organismy se skládají z C, N a P a to v určitém charakteristickém molárním poměru (Cleveland a Liptzin, 2007). Ačkoliv absolutní množství každého z prvků uvnitř těla organismu se může lišit, jejich vzájemný poměr bývá poměrně úzce definován a může být použit pro charakteristiku chování jednotlivých součástí ekosystému. Z tohoto důvodu se poměru CNP využívá při popisu dějů uvnitř terestrických ekosystémů (Sterner a Elser, 2002).

### 2.3.1 Stechiometrie půdních mikroorganismů

Společenstvo půdních mikroorganismů je specifické svou obrovskou diverzitou. Ve velkém množství bývají v půdě zastoupeny bakterie a houby, z menší části pak některé řasy, sinice a vláknité bakterie. Stechiometrie půdní mikrobiální biomasy je tedy závislá na poměru v zastoupení jednotlivých druhů a jejich fyziologickém stavu. Cleveland a Liptzin (2007) shromáždili data celkem ze 187 studií týkajících se půdní mikrobiální biomasy. Poměr C:N:P v biomase půdních mikroorganismů v průměru 60:7:1 se mezi jednotlivými studii z rozdílných ekosystémů příliš nelišil. Zatímco poměr C:N byl napříč všemi studii téměř stejný, poměry C:P a N:P byly více variabilní.

Je zřejmé, že CNP poměr půdní mikrobiální biomasy nemůže být vždy stejný. Jak již bylo řečeno, důvodem je rozdílné složení mikrobiální komunity, především rozdílné zastoupení bakterií a hub. Houby jako eukaryotické organismy se liší od prokaryotických bakterií, jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.1.1. Variabilní stechiometrický poměr může být kromě toho způsoben tím, že houby a bakterie mohou ve svých tělech akumulovat zásobní látky. Houby mohou akumulovat P ve vakuolách především ve formě polyfosfátů (Kulaev a Kulakovskaya, 2000). Ve stejné formě se P může nacházet i v cytoplazmě mikroorganismů a to především díky tomu, že jsou polyfosfáty osmoticky neaktivní. Do jaké míry se schopnost zdržet P mezi houbami a bakteriemi liší však není jednoznačné. Je prokázáno, že schopnost akumulovat polyfosfáty je druhově specifická. Například množství polyfosfátů bakterie *Actinobacteria johnsonii* může dosáhnout až 30% suché váhy buňky (Kulaev a Kulakovskaya, 2000).

Dalším faktorem ovlivňujícím CNP poměr mikrobiálního společenstva je fyziologický stav buněk. Nejbohatším zdrojem P v buňce jsou ribozomy společně s DNA. Množství DNA je v buňce víceméně fixní, avšak množství ribozomů je proměnlivé. Buňky v exponenciální fázi růstu mají více ribozomů než buňky, které nevykazují růst. Důvodem je zvýšená produkce proteinů potřebných k růstu a tedy větší množství ribozomů v buňce zajišťujících jejich produkci. Poměr C:N je v tomto případě stabilní, výrazně se však mění množství P a tedy i poměr C:P a N:P. Tímto jevem se zabývají studie zaměřené na fytoplankton. Ačkoliv poměr CNP fytoplanktonu je od biomasy půdních mikroorganismů odlišný, princip změny v množství P v poměru k N při různých růstových strategiích by měl být podobný. Arigo (2005) rozděluje organismy podle růstové strategie do tří skupin. Rychle rostoucí organismy s N:P poměrem menším než 10, pomalu rostoucí organismy až klidová stadia s poměrem N:P



vyšším než 30 a generalisty, kteří tvoří většinu biomasy a jsou na rozhraní obou růstových strategií. Jejich poměr N:P se blíží hodnotě 16.

Ačkoliv se stechiometrie půdní mikrobiální biomasy mezi různými typy půd liší, musí existovat hraniční hodnoty, ve kterých se nalézají hodnoty C:N:P všech půdních mikroorganismů. V řadě studií se ovšem vyskytují hodnoty poměru N:P = 3 a nižší, přestože žádná z buněčných struktur takového poměru nedosahuje.

### 2.3.2. Stechiometrie mikrobiální biomasy v půdách povodí Plešného (PL) a Čertova jezera (CT)

Molární stechiometrické poměry v biomase půdních mikroorganismů v půdách PL a CT jsou ukázány v tab. 2 (Šantrůčková et al., 2004; nepublikovaná data). Je patrné, že poměry C:N:P jsou daleko nižší než odhadované stechiometrické poměry biomasy půdních mikroorganismů popsané výše. Zvláště výrazný je tento rozdíl v poměru N:P, který je ve většině případů 1 - 3:1, ale také v poměru C:P pohybujícím se mezi 6 - 30:1. Přičemž poměr N:P půdní mikrobiální biomasy by se měl pohybovat okolo hodnoty 7 a poměr C:P okolo hodnoty 60. Množství P je tedy v poměru k N až 7 krát a v poměru k C dokonce 10 krát vyšší. Příčinou tohoto paradoxu může být určitý chemický či biologický proces (viz podrobněji dále), nebo chybné stanovení jednoho z prvků v půdní mikrobní biomase PL a CT. Zda se jedná o chybu ve stanovení C, N, nebo P může určit poměr C:N půdní mikrobiální biomasy PL a CT. Ten se pohybuje převážně mezi 2 - 27:1, tedy v intervalu zahrnujícím i předpokládanou hodnotu 8,3.

	2004			2006			2007			2008			2009		
	C:	N:	P	C:	N:	P	C:	N:	P	C:	N:	P	C:	N:	P
PLHO	8	2	1	10	4	1	12	2	1	28	3	1	27	1	1
PLHA	7	2	1	10	3	1	15	1	1	29	3	1	17	2	1
PLDO	7	3	1	15	5	1	26	3	1	34	4	1	29	2	1
PLDA	8	4	1	8	3	1	15	1	1	29	4	1	17	1	1
CHO	7	3	1	9	3	1	23	2	1	20	3	1	21	2	1
CHA	6	3	1	9	2	1	19	2	1	22	2	1	26	4	1
CDO	8	3	1	11	3	1	24	2	1	21	3	1	23	2	1
CDA	7	2	1	10	3	1	30	3	1	32	3	1	23	2	1

Tab. 2: Molární stechiometrické poměry půdní mikrobiální biomasy od roku 2004. PL - Plešné jezero; C - Čertovo jezero; H - horní pokusná plocha; D - dolní pokusná plocha; O - opadový horizont; A - humusový horizont

Pokud dále srovnáme naměřené hodnoty Cmic, Nmic a Pmic v půdách PL a CT s hodnotami uváděnými v literatuře, zjistíme, že zatímco hodnoty Cmic a Nmic se pohybují v rozmezí hodnot uváděných v literatuře, hodnoty Pmic odpovídají nejvyšším naměřeným hodnotám a dokonce je převyšují (tab. 3).

	naměřené hodnoty	literatura	zdroj
	µg.g <sup>-1</sup>		
Cmic	2000 - 6000	60 - 30000	Cleveland a Liptzin, 2007
Nmic	200 - 800	14 - 2500	Cleveland a Liptzin, 2007
Pmic	300 - 600	3,1 - 434	Cleveland a Liptzin, 2007

Tab. 3: Hodnoty C, N a P v biomase půdních mikroorganismů stanovených v půdách Plešného a Čertova jezera a hodnoty uváděné v literatuře

Je tedy pravděpodobné, že množství P v biomase půdních mikroorganismů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera stanoveného fumigačně extrakční metodou je spíše nadhodnocené a způsobené chybou stanovení. Z tohoto důvodu jsem se ve své magisterské práci zaměřil na faktory, které mohou ovlivnit hodnoty Pmic měřené fumigačně extrakční metodou.

#### 2.3.2.1. Možné příčiny kolísání stechiometrie půdních mikroorganismů

Kromě přirozeného kolísání obsahu P v buňkách, které je spojeno s metabolismem buňky a jejím fyziologickým stavem (2.2.1.1. a 2.3.1), může být obsah P v buňce pozměněn některými biologickými a chemickými procesy v půdě. V kyselých půdách je fosfor vázán především s železem, hliníkem a manganem. Takto vázaný fosfor může reagovat s aktivními povrchy biomasy mikroorganismů na principu ligandové výměny (Sanudo-Wilhelmy et al., 2004). Tento jev se běžně vyskytuje u biomasy fytoplanktonu a je přímo závislý na koncentraci P-PO<sub>4</sub> a kovů, s kterými se váže (Mn, Fe) (Fu et al., 2005). Fosfor se akumuluje na povrchu buněk a může významně ovlivňovat i poměr N:P biomasy, který je ve skutečnosti uvnitř buněk vyšší. Hodnota poměru N:P může být i 2 krát nižší (Fu et al., 2005). Není však jisté, zda se podobný mechanismus může vyskytovat i v půdním prostředí a zda může ovlivnit stanovení fosforu v biomase půdních mikroorganismů fumigačně extrakční metodou.

Vysoké množství fosforu v biomase půdních mikroorganismů v poměru k N a C může být také ovlivněno obsahem a dostupností Al. V silně kyselých půdách, většinou v důsledku antropogenní acidifikace, se Al uvolňuje ze svých přirozených rezervoárů a rozpouští se v

půdním roztoku. Pod  $\text{pH} = 5$  se Al vyskytuje jako  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  zkráceně označovaný jako volný  $\text{Al}^{3+}$ , který je toxický pro všechny živé organismy (Pina a Cervantes, 1996). Aby se mikroorganismy toxickému působení Al vyhnuly, vyvinuly k tomu řadu mechanismů. Tyto mechanismy spočívají v neutralizaci Al vazbou do nerozpustných sloučenin. Půdní mikroorganismy proto vylučují do svého okolí organické látky, nebo fosfor, se kterým se Al sráží do podoby nerozpustných sloučenin. K neutralizaci Al může ale docházet i přímo v cytoplazmě právě vazbou na P. Petterson et al., 1985b zjistil, že sinice (*Anabaena cylindrica*) vystavená toxickému  $\text{Al}^{3+}$  akumuluje Al na své buněčné stěně a uvnitř buňky v nerozpustných sloučeninách s P. Množství P v celé kultuře se tak zvýšilo. Stejně tak může docházet ke zvýšení množství P ve vakuolách hub, kde může být Al vázán na polyfosfáty. Poměr N:P biomasy půdních mikroorganismů tak může opět klesat. Tento pokles se může do jisté míry projevit i při stanovení extrakčně fumigační metodou.

#### 2.3.2.2. Metodické chyby

Různé fyzikálně chemické vlastnosti půd způsobují rozdílnou dostupnost i chování P v půdě. Stanovení P v biomase půdních mikroorganismů může být tak zkresleno během fumigace i následné extrakce. Další zkreslení může přinášet korekce na návratnost P z půdy (použití vnitřního standardu) a korekční faktor, který zohledňuje extrahovatelnost uvolněného mikrobiálního P.

#### *i - vliv fumigace*

Fumigace probíhá po dobu 24 hodin. Vzorek půdy je uvnitř exikátoru vystaven parám chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ). Po ukončení fumigace se opakovanou evakuací exikátoru všechny  $\text{CHCl}_3$  odstraní. Pro úspěšné usmrcení většiny půdních mikroorganismů je potřeba, aby vodní kapacita půdy byla 50-60% (Jenkinson, 1988). I přesto však existují různé rozdíly v úspěšnosti usmrcení půdních mikroorganismů v různých typech půd. Je třeba si uvědomit, že i malé rozdíly v účinnosti fumigace mohou způsobit velké zkreslení. Pokud fumigaci přežije pouze 1% všech mikroorganismů, znamená to, že v půdě zůstalo  $10^5 - 10^7$  buněk fumigací neovlivněných. Fumigaci jsou například schopny přežít mikroorganismy chráněné slizy nebo mikropory (Martin a Foster, 1985; Foster 1988).

Během fumigace může také docházet k uvolnění fosforu, který nepochází z biomasy ale anorganických rezervoárů (Jenkinson et al., 2004; Cleveland a Liptzin, 2007) a tím k nadhodnocování výsledků. To dokazují údaje z pokusu Morela et al. (1996), kteří fumigovali půdu sterilizovanou gama zářením. Přestože v těchto půdách nemohli půdní mikroorganismy

přežívat, množství extrahovatelného P se po fumigaci sterilizovaných půd chloroformem zvýšilo. Chyba způsobená uvolněním P do půdního roztoku sterilních půd se pohybovala mezi 4 - 8%. Chyba však bude pravděpodobně nižší. Lze totiž předpokládat, že se P mohl uvolnit rozpouštěním buněčných membrán mikroorganismů usmrčených ozářením (Morel et al., 1996).

### ii - vliv sorpce

Během 24 hodinové fumigace dochází k uvolnění P z buněk půdních mikroorganismů do půdy. Určitá část se přitom hydrolyzuje až na ortofosforečnanový iont, který se může v půdě sorbovat. Aby tedy nedocházelo k podhodnocování výsledků  $P_{mic}$ , přidává se během stanovení do půdy vnitřní standard v podobě P- $PO_4$  v množství  $25 \mu g \cdot g^{-1}$  půdy (Brokes et al., 1982). Tímto krokem se koriguje množství P, které může být v půdě během 24 hodinové fumigace zadrženo a následně v určitém rozsahu extrahováno. Avšak tento krok může stejně tak konečné výsledky nadhodnocovat. Při výpočtu se předpokládá, že každých  $25 \mu g$  P na gram půdy se sorbuje se stejnou účinností. Množství P, které se může v půdě sorbovat, však není lineární, ale sleduje určitou limitní hranici, nad kterou už jsou všechna sorpční místa v půdě nasycená. Pokud je množství P uvolněného z biomasy výrazně vyšší, nebo/a sorpční kapacita půdy příliš nízká, může se stát, že už se s tak vysokou účinností sorbovat nebude. Extrahovaného P tak bude více, než předpokládá sorpce a následná extrahovatelnost vnitřního standardu, a výsledky budou nadhodnocené.

K nadhodnocení výsledků  $P_{mic}$  při použití vnitřního standardu ke korekci na sorpci půdy může dojít i jiným způsobem. Na sorpci přidaného vnitřního standardu se může podílet biologická sorpce (Olander a Vitousek, 2005), která však během fumigace neprobíhá. Pokud biologická sorpce výrazně přispívá k celkové sorpci vnitřního standardu půdou, může dojít k přecenění sorpce a ve výsledku k nadhodnocení  $P_{mic}$ .

### iii - vliv extrakce

Jako extrakční činidlo se používá zásaditý roztok  $NaHCO_3$ . Toto extrakční činidlo bylo původně vyvinuto pro extrakci dostupných forem fosforu z alkalických a neutrálních půd (Olsen et al., 1954). V těchto půdách se fosfor vyskytuje především ve vazbě s Ca a  $NaHCO_3$  takto vázaný fosfor uvolňuje za tvorby  $CaCO_3$ . Z tohoto faktu vyplývá obava, že v kyselých půdách se účinnost extrakce snižuje, protože fosfor se v kyselých půdách vyskytuje v jiných formách. Je vázaný především na oxidy hliníku a železa, či manganu. Přesto však bylo

prokázáno, že  $\text{NaHCO}_3$  může být vhodným extrakčním činidlem i pro kyselé půdy (Fixen a Grove, 1990).  $\text{NaHCO}_3$  může reagovat s rozpustnými formami Al a Fe za vzniku hydratovaných oxidů, nebo zvyšovat záporný náboj minerálních povrchů. V obou případech může docházet k uvolnění P do roztoku (Kovar a Pierzynski, 2009). Přesto je pravděpodobné, že při použití  $\text{NaHCO}_3$  je z kyselých půd do extrakčního činidla uvolněno méně P než je tomu u půd zásaditých a neutrálních a získané výsledky mohou být podhodnocené. Chen a He (2004) porovnávali množství fosforu v biomase stanoveného za použití Olsenova ( $0,5\text{M NaHCO}_3$ ) a Breyova extrakčního činidla ( $0,03\text{ M NH}_4\text{F}-0,025\text{ M HCl}$ ) v 11 kyselých půdách. Současně pro každý typ půdy stanovili korekční faktor. Podle výsledků je zřejmé, že extrakce podle Breye extrahuje více mikroorganismy uvolněného fosforu, avšak rozdíly mezi jednotlivými půdami jsou veliké. Bez znalosti přesné hodnoty korekčního faktoru a sorpce P v půdě jsou vyšší účinnosti extrakce bezcenné.

*iv -vliv konečného výpočtu (korekčního faktoru,  $K_p$ )*

Při výpočtu množství fosforu v biomase půdních mikroorganismů se vychází z rozdílů mezi množstvím fosforu stanoveném v půdním extraktu před a po fumigaci. Přičemž se předpokládá, že účinnost extrakce fosforu mikrobiálního původu je 40%. To znamená, že pouze 40% mikrobiálního P je extrahovatelné v rozpuštěných formách. Zbytek v půdě zůstává vázán v nerozpustných a strukturních látkách. Korekční faktor byl stanoven tím, že byla půda inokulována vždy 2 druhy hub a 2 druhy bakterií značených  $\text{P}^{32}$  v určitém poměru. Po provedení fumigace bylo určeno množství vyextrahovaného  $\text{P}^{32}$ . Korekční faktor byl stanoven jako poměr mezi množstvím  $\text{P}^{32}$  inokula a  $\text{P}^{32}$  extrahovaného z půdy pomocí  $\text{NaHCO}_3$ . Diverzita půdních mikroorganismů je však daleko větší a s měnící se diverzitou se může měnit i účinnost fumigace a následné extrakce. Je známo, že houby uvolňují fosfor snáze a ve větším množství než bakterie (Badalluco et al., 1996). Na uvolnění tohoto fosforu mají vliv nejenom chemické procesy hydrolýzy organického P mikrobiálního původu, ale také biochemické procesy zajišťované extracelulárními enzymy, jejichž obsah se mezi půdami liší. Aktivita těchto enzymů v průběhu fumigace ovlivněna není. Může sice dojít k jejich částečné inhibici (Klose a Tabatabai, 2002), ale v závislosti na jejich aktivitě může dojít k uvolnění různého množství P v podobě ortofosforečnanového iontu do půdy. To indikuje, že se korekční faktor může měnit s typem půdy, složením půdního společenstva a biologické aktivitě půd. Příkladem je rozsah hodnot korekčního faktoru od 0,12 do 0,62 pro 11 půd stejného typu odebraných z různých míst (Chen a He, 2004). Z toho je patrné že chyba při

stanovení fosforu v biomase půdních mikroorganismů může dosahovat až 50% při použití nesprávného korekčního faktoru. To je největší slabina celé metody (Jenkinson et al., 2004).

#### **2.4. Cíle práce**

Cílem mé magisterské práce bylo určit příčiny nepřesných hodnot P v biomase půdních mikroorganismů půd kyselých lesních smrčín a zamokřených luk a navrhnout, jakým způsobem zpřesnit odhad  $P_{mic}$ . Zaměřil jsem se na možné metodické chyby stanovení P v mikrobiální biomase extrakčně fumigační metodou, které souvisí s použitím (i) vnitřního standardu a (ii) korekčního faktoru  $K_p$ .

Ve své práci jsem řešil následující dílčí cíle:

- 1) určit vliv sorpce na přesnost stanovení P v biomase půdních mikroorganismů
- 2) určit vliv koncentrace použitého vnitřního standardu na stanovení P v biomase půdních mikroorganismů
- 3) určit vliv biologické sorpce na množství extrahovatelného P
- 4) stanovit množství P v extrahovaných intaktních buňkách a v buňkách narušených chloroformem a podle toho určit hodnotu korekčního faktoru pro dané půdy

Pracoval jsem přitom s půdami z povodí Plešného a Čertova jezera a dále pak s půdami mokřých luk Hamru. V těchto půdách je mikrobiální fosfor měřen od roku 2006 a získávané hodnoty  $P_{mic}$  jsou variabilní, někdy dosahující záporných hodnot. To ukazuje na to, že variabilita je způsobena metodickými nedostatky.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Popis studovaného území**

Povodí Plešného jezera (PL) se nachází na 48°47' s.š. a 13°52' v.d., v nadmořské výšce 1090 m.n.m. Půdy v jeho povodí jsou z 38% tvořeny nevyvinutou organicky bohatou půdou, z 29% je půda řazena do kategorie podzolů a z 27% do kategorie dystrických kambizemí (TKSP) (Kopáček et al., 2002 a, b). Hodnoty aktivního pH v humusovém horizontu zde mohou klesat až k 2,5. Dominující vegetací je zde smrk ztepilý (*Picea abies*). Povodí Čertova jezera (CT) se nachází na 49°10' s.š. a 13°11' v.d., v nadmořské výšce 1030 m.n.m. Půdy povodí CT tvoří především dystrické kambizemě (58 %), dále se zde vyskytují podzoly (21 %) a organicky bohatá nevyvinutá půda (17 %) (Kopáček et al., 2002a, b). Hodnoty aktivního pH humusového horizontu se pohybují mezi 2,5 - 3,3. Dominující vegetací je zde smrk ztepilý (*Picea abies*). Podrobné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půd jsou shrnuty v Kopáček et al. (2002a, b.)

Pokusná plocha Hamr (H) se nachází na 49°09' s.š. a 14°46' v.d., v nadmořské výšce 415 m.n.m. v blízkosti řeky Nežárky. Území je klasifikováno jako aluviální mokřad s jílovitým půdním substrátem - gleyosolem. Dominující vegetací je zde ostřice měchýřkatá (*Carex vesicaria*) a ostřice štíhlá (*Carex acuta*).

#### **3.2. Odběr a zpracování půdních vzorků**

Vzorky půdy byly odebrány na konci vegetační sezony v listopadu roku 2009 z horní pokusné plochy v povodí Plešného jezera, dolní pokusné plochy Čertova jezera a z kontrolních ploch Hamru. Na každé pokusné ploše PL a CT byly odebrány vzorky humusového horizontu z pěti náhodných míst. Na pokusných plochách Hamru byly vzorky odebrány z deseti míst z hloubky 5 - 20 cm. Pro každou lokalitu byl vytvořen směsný vzorek, ten byl přesát přes síto o velikosti ok 5 mm a uložen v lednici při 4°C. Stručné fyzikálně chemické vlastnosti půd jsou uvedeny v tab. 4.

	pH (H <sub>2</sub> O)	C <sub>tot</sub>	N <sub>tot</sub>	Al <sub>ox</sub>	Fe <sub>cd</sub>	P <sub>tot</sub>	P <sub>ox</sub>
		mol.kg <sup>-1</sup>		mmol.kg <sup>-1</sup>			
PL	3.45	27.81	1.08	60.63	35.25	23.38	8.38
<i>sd</i>	0.14	8.08	0.26	30.88	22.12	8.36	7.12
CT	3.48	28.50	0.94	78.17	106.00	29.50	11.67
<i>sd</i>	0.19	8.78	0.31	32.76	87.12	8.70	3.09
H	4.74	8.03	0.54	<i>n</i>	<i>n</i>	50.55	15.05
<i>sd</i>	0.19	1.38	0.08			8.81	2.73

Tab 4: Vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky (C<sub>tot</sub>, N<sub>tot</sub>, P<sub>tot</sub> – celkový C, N, P; P<sub>ox</sub>, Al<sub>ox</sub> – P, Al v oxalátovém extraktu; Fe<sub>cd</sub> – Fe v citrát-hydrosulfidovém extraktu). V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (sd). Písmeno *n* v tabulce znamená, že půdní charakteristika nebyla u dané půdy stanovena (upraveno podle Kopáček et al., 2002 a, b; Mach 2010).

### **3.3. Analýza vzorků**

#### **3.3.1. Stanovení sorpce P půdami**

Cílem tohoto pokusu bylo určit, (1) jaké množství P uvolněného z buněk půdních mikroorganismů v podobě ortofosforečnanového iontu může daná půda zadržet během 24 hodinové fumigace a (2) jak významný je vliv sorpčních schopností půd na stanovení P<sub>mic</sub>. Do půdy jsem přidával P v určitém rozmezí hodnot. V tomto rozmezí by se mělo pohybovat předpokládané množství P uvolněného z buněk půdních mikroorganismů v podobě ortofosforečnanového iontu.

Sorpci přidaného anorganického P v jednotlivých půdách jsem stanovil podle Yuan a Lavkulich (1994). Vzorky přirozeně vlhké půdy PL, CT a H jsem navážil do 8 centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml tak, aby hmotnost sušiny v každé centrifugační zkumavce byla vždy 1 g. Těcho osm vzorků jsem po dobu 24 hodin paralelně vystavil 30 ml roztoku KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 0,002 M CaCl<sub>2</sub> se zvyšující se koncentrací PO<sub>4</sub>-P: 0-20-40-80-200-400-800-1200 μg g<sup>-1</sup>. CaCl<sub>2</sub> sloužil k udržení iontové síly roztoku.

Po 24 hodinách, kdy byly vzorky ponechány na horizontální třepače (170 ot/min), jsem vzorky centrifugoval po dobu 15 minut při 1000g a poté filtroval (skleněný filtr Macherey-Nagel, porosita 0,4 μm). Ve filtrátu jsem kolorimetricky stanovil koncentraci rozpuštěného reaktivního P (Murphy a Riley, 1962). Rozdíl mezi původní koncentrací P v roztoku a rovnovážnou koncentrací P ve filtrátu po proceduře jsem použil k výpočtu množství P zadržitého půdním sorpčním komplexem.



### **3.3.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným**

Hydrogenuhličitan sodný se používá jako extrakční činidlo při stanovení  $P_{mic}$ . Cílem tohoto pokusu bylo stanovit, jak závisí extrahovatelnost přidaného P (vnitřního standardu) na velikosti jeho přídatku. P jsem do půdy přidal v množství 20 - 1200  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Toto rozmezí zahrnovalo množství P běžně přidávané do půdy jako vnitřní standard sloužící ke korekci na sorpci půdy. V používané metodice se P přidává v množství 25  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Postup extrakce P odpovídal metodice stanovení  $P_{mic}$  podle Brokes et al. (1982). Každý půdní vzorek jsem rozvážil po 5 gmech do celkem 13 NTS lahví o objemu 100 ml. První tři vzorky sloužily jako nefumigovaná kontrola, druhé tři vzorky byly vloženy do exikátoru s kádinkou obsahující 30 ml čistého chloroformu bez příměsi ethanolu a fumigovány po dobu 24 hodin. Ke zbylým 7 vzorkům jsem před vlastní extrakcí přidal vnitřní standard v podobě jednorázového přídatku  $P-PO_4$  o zvyšující se koncentraci: 0-20-40-80-200-400-800-1200  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Všechny vzorky jsem extrahoval 75 ml 0,5 M roztoku  $NaHCO_3$  o  $pH = 8,5$  po dobu 45 minut na horizontální třepačce rychlostí 170 ot/min při teplotě 25°C. Po ukončení extrakce jsem vzorky centrifugoval při 1000g po dobu 10 minut. Vzorky jsem následně okyselil a po 24 hodinách přefiltroval. V takto připravených vzorcích jsem kolorimetricky stanovil koncentraci reaktivního rozpuštěného fosforu (Murphy a Riley, 1962). Rozdíl mezi koncentrací P v nefumigované kontrole a koncentrací P ve fumigovaných nebo obohacených vzorcích jsem použil k výpočtu množství extrahovatelného P. Koncentrace P ve fumigovaných vzorcích sloužily k výpočtu  $P_{mic}$  (viz 3.3.4.)

### **3.3.3. Stanovení vlivu biologické sorpce na extrahovatelnost P hydrogenuhličitanem sodným**

Cílem tohoto pokusu bylo určit, jakým způsobem může biologická aktivita ovlivnit sorpci a následnou extrakci P přidaného do půdy v podobě jednorázového přídatku. V tomto pokusu jsem postupoval stejným způsobem jako v části 3.3.2., ale s tím rozdílem, že jsem v půdních vzorcích omezil mikrobiální aktivitu. Inhibici mikrobiální aktivity jsem docílil snížením okolní teploty na 4°C (Morel a kol., 1996; Olander a Vitousek, 2005).

### **3.3.4. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na hodnoty $P_{mic}$**

Cílem tohto pokusu bylo určit, zda může zvolená koncentrace vnitřního standardu ovlivňovat výpočet  $P_{mic}$ . Údaje o extrahovatelnosti vnitřního standardu získané v části 3.3.2. a 3.3.3.

jsem použil k výpočtu množství P v biomase půdních mikroorganismů ( $P_{mic}$ ). Hodnoty  $P_{mic}$  jsem vypočítal podle běžně používaného vzorce:

$$P_{mic} = (St \cdot (A_f - A_{nf})) / (A_{st} - A_{nf}) / 0,4$$

$St$  - množství přidaného P na gram suché půdy (vnitřní standard)

$A_{st}$  - absorbance nefumigovaného vzorku s přídavkem vnitřního standardu

$A_{nf}$  - absorbance nefumigovaného vzorku

$A_f$  - absorbance fumigovaného vzorku

0,4 - korekční faktor  $K_p$  (Hedley a Stewart, 1982)

Pro každou jednotlivou koncentraci přidaného P použitou v části 3.3.2 a 3.3.3. jsem vypočítal hodnoty  $P_{mic}$ .

### 3.3.5. Stanovení korekčního faktoru $K_p$

Cílem tohoto pokusu bylo stanovit množství P v intaktních mikrobiálních buňkách, cytoplasmě a zbytku nerozpustných buněčných struktur, které zůstávají v půdě po fumigaci.

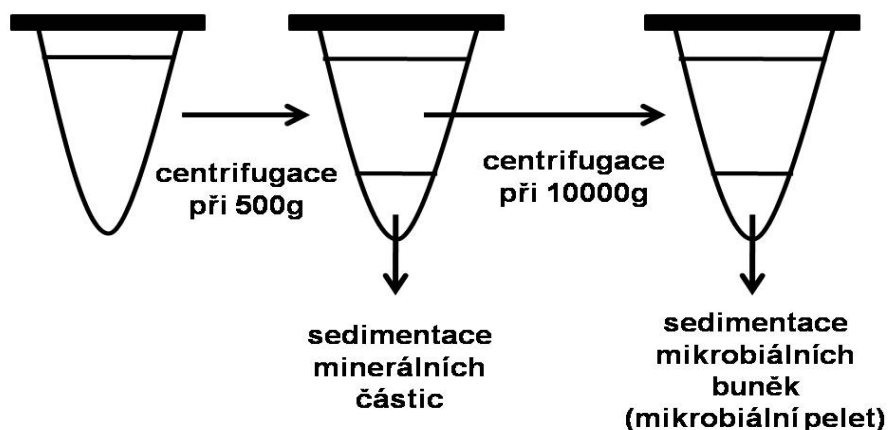
(1) Tímto způsobem jsem chtěl určit poměr mezi množstvím celkového P v mikrobiální biomase a množstvím mikrobiálního P stanoveného extrakčně fumigační metodou a tak stanovit korekční faktor  $K_p$  pro tyto půdy. (2) Dále jsem sledoval možnou sprpci anorganického P na mikrobiální buňky. Vzhledem k časové náročnosti tohoto pokusu jsem pro analýzu použil jen vzorky PL a H.

#### 1) množství P v mikrobiálních buňkách před a po centrifugaci:

Tato část pokusu sloužila k určení hodnoty korekčního faktoru  $K_p$ . Půdu jsem smíchal se sterilním pískem (velikost zrn 1 - 2mm) v poměru 25:5. Do této směsi jsem přidal kultivační medium o následujícím složení - sacharóza (16 g.l<sup>-1</sup>); kvasinkový extrakt (0,2 g.l<sup>-1</sup>); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g.l<sup>-1</sup>); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,4 g.l<sup>-1</sup>); FeSO<sub>4</sub> (0,04 g.l<sup>-1</sup>); CaCl<sub>2</sub> (0,04g.l<sup>-1</sup>); NH<sub>4</sub>Cl (2 g.l<sup>-1</sup>) (Veldkamp, 1970). Takto připravené vzorky jsem inkuboval při 20°C až do stacionární fáze růstu. Cílem tohoto kroku bylo: i) co nejvíce zředit pozad'ové vlivy koncentrace celkového půdního P; ii) získat a namnožit mikrobiální společenstvo reprezentativní pro danou půdu; iii) maximálně snížit adhezi mikroorganismů na pevnou složku půdy. Během inkubace jsem pomocí oxitopových hlavic měřil spotřebu kyslíku půdními mikroorganismy, abych věděl, v jaké růstové fázi se mikrobiální společenstvo nachází. Vzorky jsem inkuboval až do

docílení stacionární fáze růstu půdních mikroorganismů a poté použil k analýzám. V exponenciální fázi růstu dochází k akumulaci polyfosfátů v mikrobiálních buňkách a výsledky by tak mohly být ovlivněny (Kulaev a Kulakovskaya, 2000).

Po ukončení inkubace jsem vzorky rozvážil do NTS lahví vždy po 5 gramech v 8 opakováních. 4 opakování jsem před extrakcí fumigoval, zbylé 4 opakování jsem extrahoval ihned. K extrakci jsem použil 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> o pH = 8,5. Po zalití fumigovaných i nefumigovaných vzorků extrakčním činidlem jsem vzorky 1 minutu sonikoval a poté třepal na horizontální třepače rychlostí 170 ot/min. Mikrobiální buňky jsem od pevné složky oddělil postupnou centrifugací (Faegri et al., 1977; obr. 2). Extrakt jsem nejprve centrifugoval při zatížení 500g, aby došlo k sedimentaci minerálních částic půdy, a poté při zatížení 10 000g. Pelet usazený na dně centrifugační zkumavky po druhé centrifugaci představoval extrahované mikrobiální buňky. V tomto peletu, a pro kontrolu i v extraktu po centrifugaci při 500g a po centrifugaci při 10 000g, jsem stanovil celkový P (Kopáček a Hejzlar, 1991; 1993) a přepočítal ho na celkové množství použitého extraktu a vzorku.



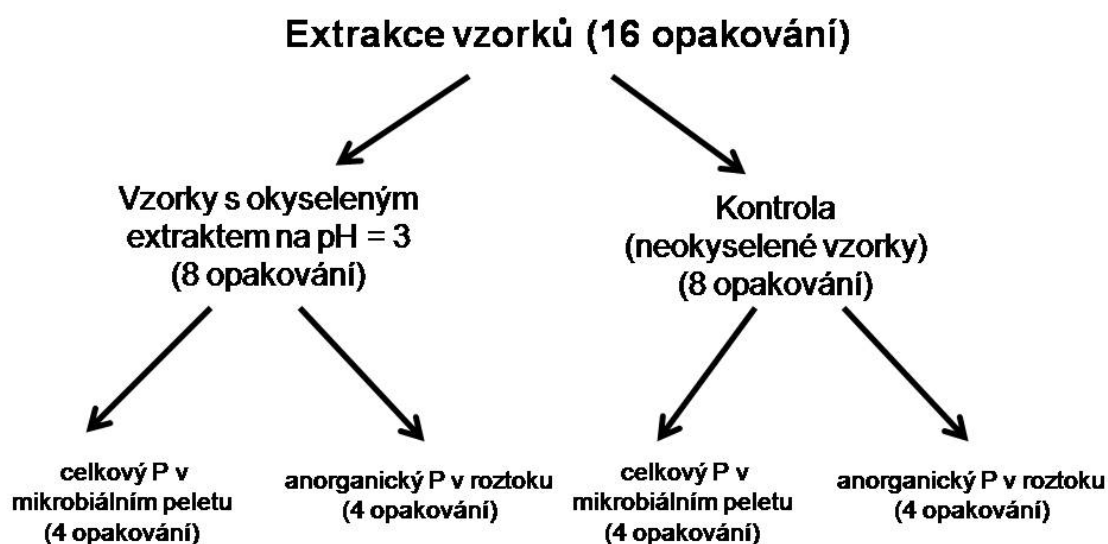
Obr. 2: Metoda postupné centrifugace. Na obrázku jsou znázorněny jednotlivé frakce půdy získané po centrifugaci při 500g a 10 000g

## 2) sorpce anorganického P na mikrobiální pelet

Půdu jsem smíchal se sterilním pískem v poměru 25:1, abych ještě více zředil vliv pozadí. Tyto vzorky jsem inkuboval stejným způsobem jako v předchozí části.

Schéma této části pokusu je znázorněno na obr. 3. Po ukončení inkubace jsem vzorky rozvážil do NTS lahví vždy po 5 gramech v celkem 16 opakováních. Všech 16 opakování

jsem ihned extrahoval stejným způsobem jako v předchozí části pokusu. Před první centrifugací jsem extrakty prvních 8 opakování okyselil na  $\text{pH} = 3$ , abych docílil flokulace anorganických částic do větších celků. Zbýlých 8 opakování sloužilo jako kontrola. Poté jsem vzorky centrifugoval, jako v předchozí části pokusu. V peletu po poslední centrifugaci jsem ve 4 vzorcích stanovil množství celkového P a zbylé 4 vzorky jsem použil ke stanovení množství P, které se na vzniklý pelet může navázat. To jsem stanovil následujícím způsobem: K mikrobiálnímu peletu jsem přidal 20 ml roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o množství  $\text{P-PO}_4 = 500\mu\text{g}$  na 20ml a po promýchání jsem stanovil množství reaktivního rozpuštěného P v roztoku (Murphy a Riley, 1962).



Obr. 3: Schéma pokusu sloužící k minimalizaci anorganického znečištění mikrobiálního peletu

### **3.4. Statistické zpracování dat**

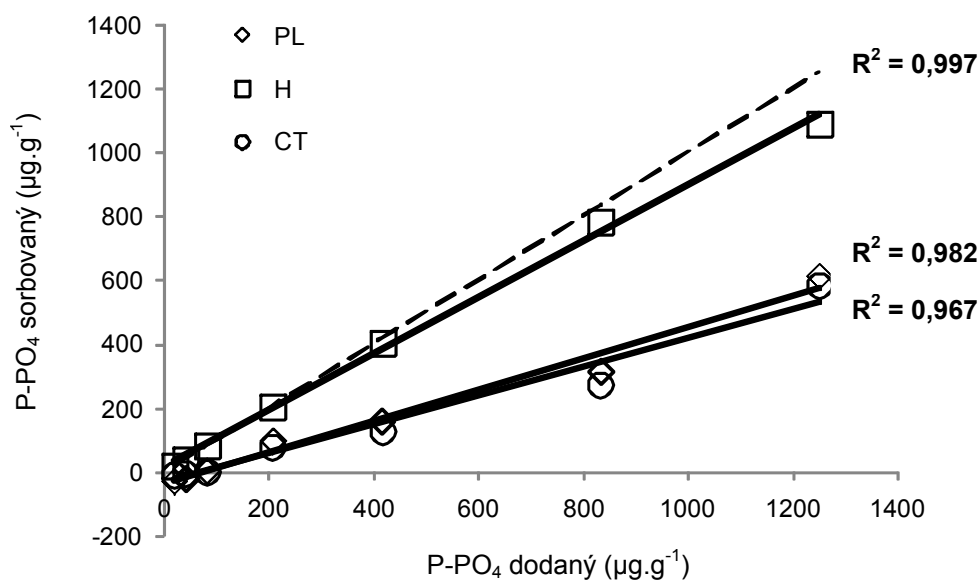
Ke statistickému hodnocení dat jsem použil různé statistické testy. K porovnání dvou průměrů jsem použil oboustraný t-test. K vyhodnocení dat části týkající se minimalizace anorganického znečištění mikrobiálního peletu jsem použil faktoriální ANOVU s pevnými efekty s  $\text{pH}$  roztoku a formě stanoveného P jako faktory. Homogenitu variancí jsem otestoval Hartley-Cochran-Bartlettovým testem. Protože získaná data neměla normální rozdělení, použil jsem ke zvýšení homogenity rozptylu logaritmickeou transformací dat. K vyjádření závislosti dvou proměnných jsem použil jednoduchou lineární regresi. Data jsem hodnotil

v programu STATISTICA 9.0 pro Windows. Veškeré grafy a tabulky jsem zpracoval v programu Microsoft Office 2007.

## 4. Výsledky

### 4.1. Stanovení sorpce P půdami

V grafu 1 jsou vyneseny závislosti sorpce půd PL, CT a Hamru na množství přidaného P-PO<sub>4</sub>. Půdy Hamru dokázaly zadržet veškerý přidaný P až do množství P-PO<sub>4</sub> = 400 µg.g<sup>-1</sup>. Ve vyšších množstvích se účinnost sorpce nepatrně snížila o 2 - 9% (tab. 5) dodaného P. Schopnost půd PL a CT zadržovat P byla téměř shodná. Pokud bylo k půdám přidáno množství 20 - 40 µg.g<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub>, P se vyplavoval z půd do roztoku a hodnoty zadrženého P byly záporné (tab. 6). K zadržení P docházelo až v množstvích přidaného P-PO<sub>4</sub> vyšších než 80 µg.g<sup>-1</sup>. Účinnost sorpce přidaného P v půdách PL a CT byla v rozmezí použitých koncentrací výrazně nižší než v půdách Hamru a dosahovala maximálně 48,9 a 46,7% přidaného P.



Graf 1: Závislost množství zadrženého P-PO<sub>4</sub> na množství přidaného P-PO<sub>4</sub> v půdách PL, CT a Hamru (H). Čárkovaná čára vyjadřuje poměr přidaného k zadrženému P-PO<sub>4</sub> 1:1. V grafech jsou uvedeny regresní koeficienty

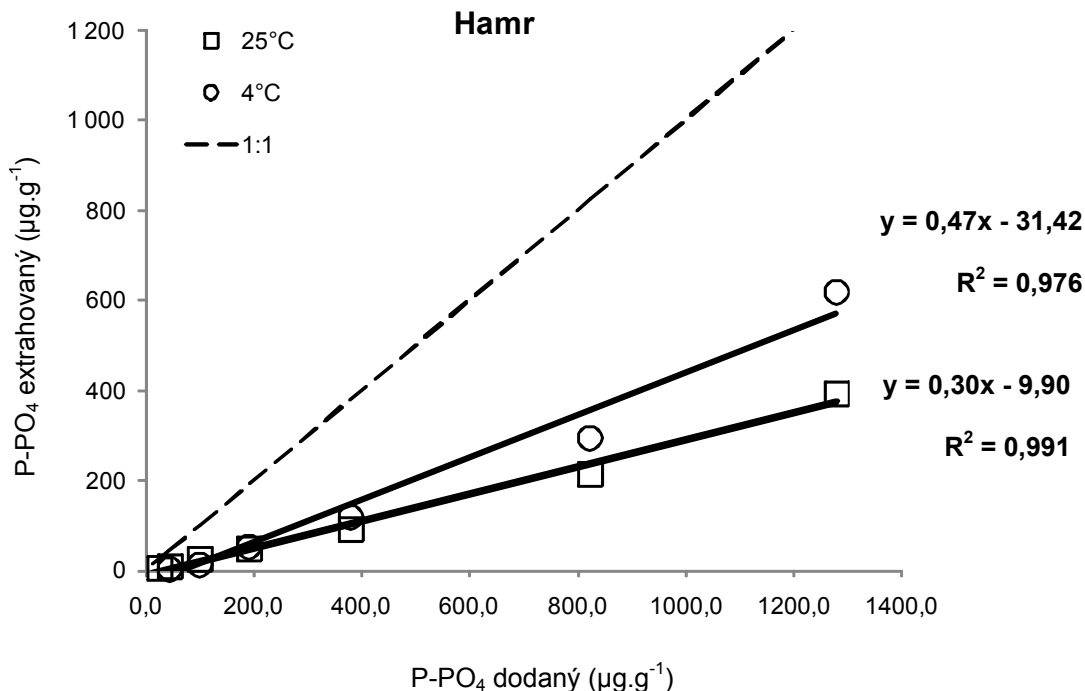
Ve sledovaném rozmezí přídavku P se množství sorbovaného P zvyšovalo lineárně se zvyšujícím se přídavkem P ve všech půdách. K úplnému nasycení půdního sorpčního komplexu nedošlo ani v jednom případě.

H		PL		CT	
PO <sub>4</sub> -P dodaný μg g <sup>-1</sup>	PO <sub>4</sub> -P zadrženy %	PO <sub>4</sub> -P dodaný μg g <sup>-1</sup>	PO <sub>4</sub> -P zadrženy %	PO <sub>4</sub> -P dodaný μg g <sup>-1</sup>	PO <sub>4</sub> -P zadrženy %
0	0.0	0	0.0	0	0.0
21	97.1	21	-131.4	21	-39.5
42	98.1	42	-46.4	42	-9.3
83	99.2	83	3.1	83	4.0
208	98.6	208	47.1	208	38.5
417	96.9	417	38.4	417	30.7
833	94.0	833	37.8	833	32.9
1250	87.1	1250	48.9	1250	46.7

Tab. 5: Množství P sorbovaného jednotlivými půdami vyjádřené jako % přidaného P

#### 4.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným a vliv biologické sorpce na tyto hodnoty

Množství P extrahovatelného z půdy Hamru pomocí NaHCO<sub>3</sub> dosahovalo v rozmezí použitých koncentrací 16 - 30% přidaného P (graf 2). Nejméně P bylo extrahováno v rozmezí hodnot přidaného P 10 - 40 μg.g<sup>-1</sup> (v průměru 11,7%) a nejvíce v rozmezí 80 - 1200 μg.g<sup>-1</sup> (24,3 - 30,7% přidaného P).



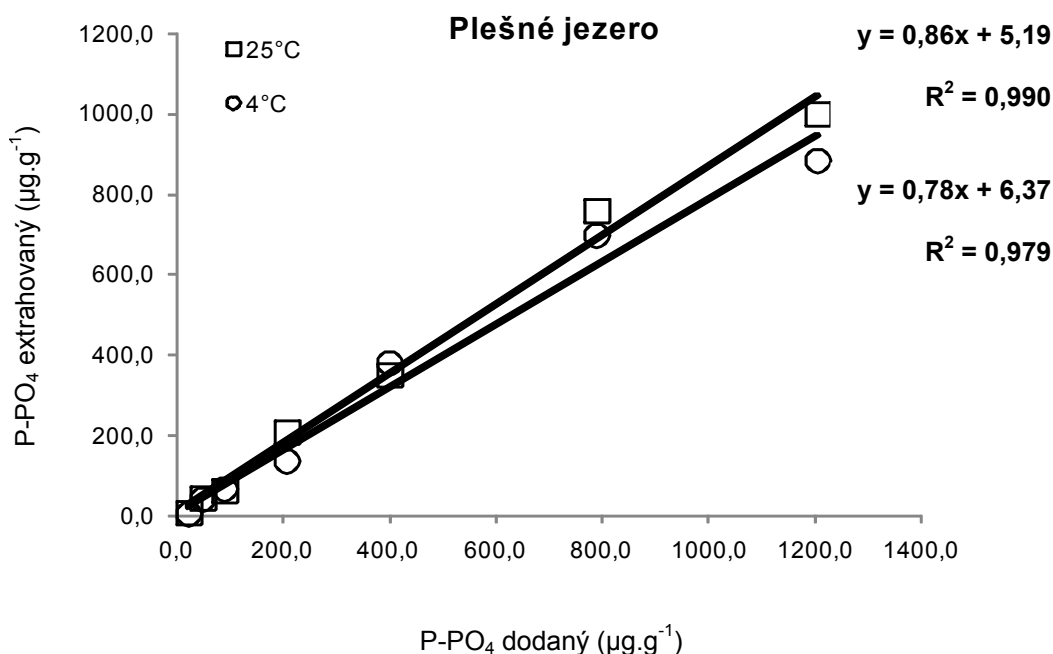
Graf 2: Závislost množství extrahovatelného P-PO<sub>4</sub> na množství přidaného P-PO<sub>4</sub> v půdách Hamru při 25°C a 4°C. Čárkovaná čára vyjadřuje poměr extrahovaného k přidanému P-PO<sub>4</sub> 1:1. V grafu jsou uvedeny regresní rovnice s příslušnými regresními koeficienty

V půdách PL a CT byla extrakce účinnější. V půdách PL se pohybovala mezi 82 - 100% (graf 3). Nejméně P bylo možné extrahovat při množství přidaného P 20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a to 28,9%. V půdách CT se množství extrahovatelného P pohybovalo mezi 91 - 100% přidaného P (graf 4). Nejméně P se vyextrahovalo po přidavcích P v množství 20 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a to 61,8 a 46,7%.

V rozmezí použitých přidavků bylo množství P extrahovaného z půd přímo úměrné množství P, které bylo do půdy přidáno. Účinnost extrakce byla vyšší u půd PL a CT než u půd Hamru.

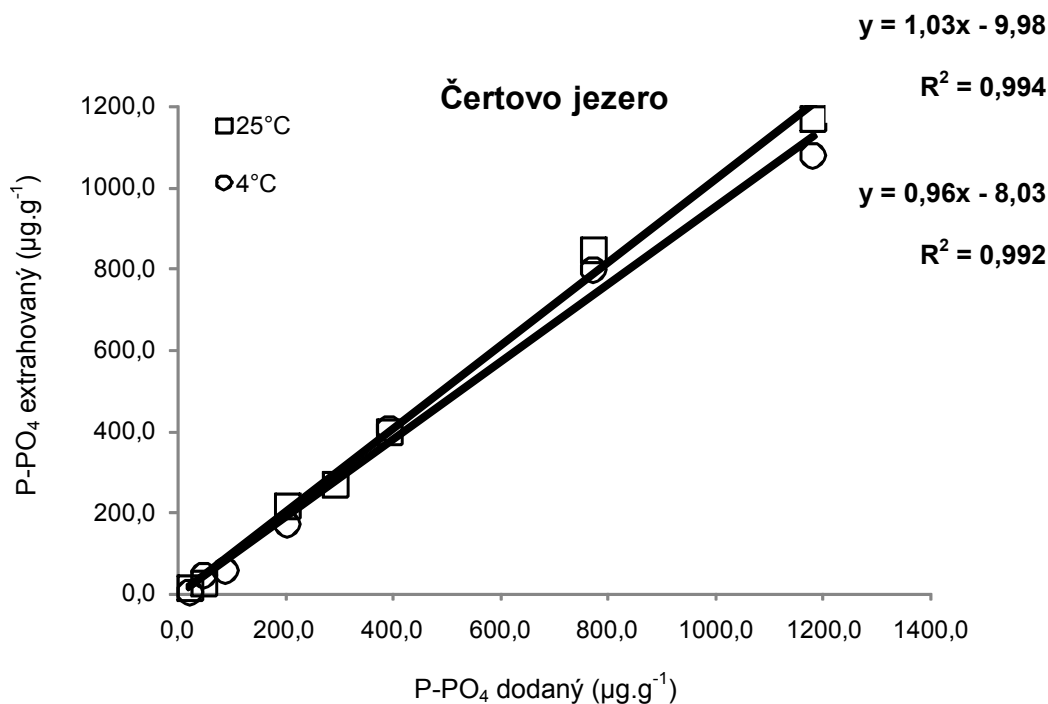
#### **4.3. Vliv biologické sorpce na extrahovatelnost P**

Vliv biologické sorpce na množství P extrahovatelného z půdy byl rozdílný v půdách Hamru od půd PL a CT. V půdách Hamru vedlo snížení biologické aktivity půd při 4°C ke zvýšení extrahovatelného P o 9,2% pokud byl přírůstek vyšší než 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (graf 2). Naopak v půdách PL a CT vedlo snížení biologické aktivity ke snížení množství extrahovatelného P o 11,3 a 5,2% při přidavku vyšším než 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (graf 3 a 4). Při použití nízkých přidavků okolo 20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  se množství extrahovatelného P snížilo o 13,0 v půdách PL a 48,0% v půdách CT.



*Graf 3: Závislost množství extrahovatelného P-PO<sub>4</sub> na množství přidaného P-PO<sub>4</sub> v půdách povodí Plešného jezera při 25°C a 4°C. V grafu jsou uvedeny regresní rovnice a příslušné regresní koeficienty*





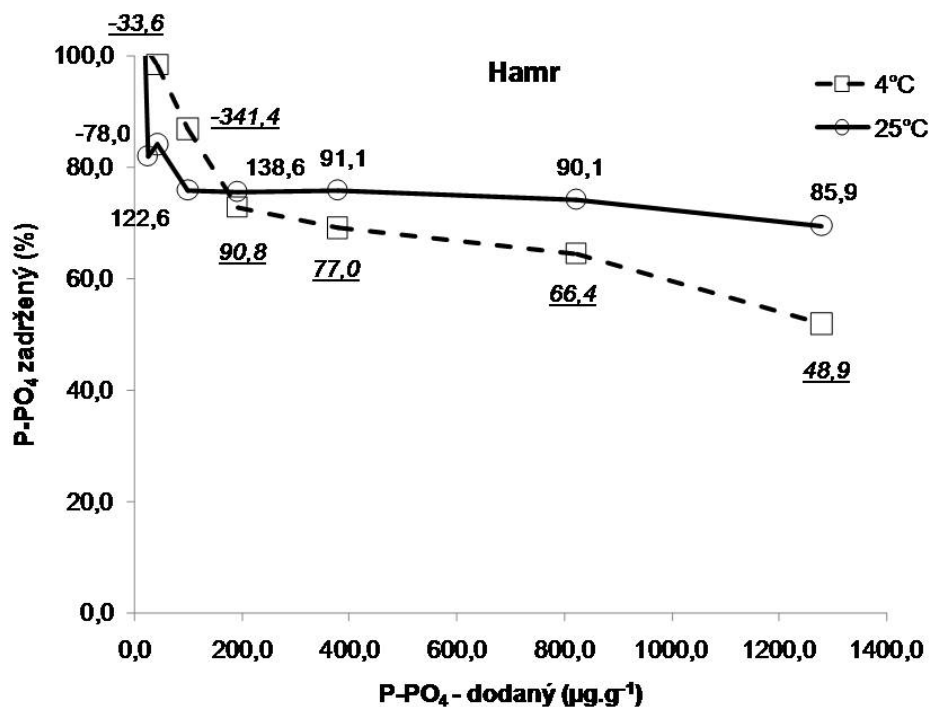
Graf 4: Závislost množství extrahovatelného P-PO<sub>4</sub> na množství přidaného P-PO<sub>4</sub> v půdách povodí Čertova jezera při 25°C a 4°C. V grafu jsou uvedeny regresní rovnice s příslušnými regresními koeficienty

#### **4.4. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na hodnoty P<sub>mic</sub>**

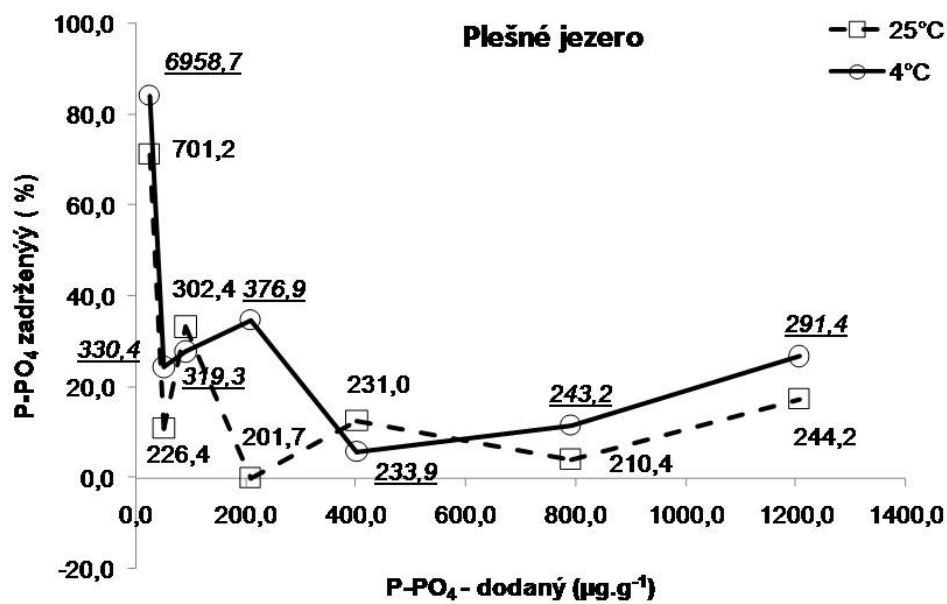
V grafech 5 - 7 je znázorněna závislost extrahovatelnosti vnitřního standardu na jeho koncentraci. Ke každé koncentraci vnitřního standardu je uvedena vypočítaná hodnota P<sub>mic</sub>. Ve všech půdách byla extrahovatelnost vnitřního standardu nízká, pokud byl použit vnitřní standard o nízké koncentraci P. Při použití koncentrace vnitřního standardu nad 200 µg.g<sup>-1</sup> se jeho extrahovatelnost zvyšovala.

Vypočítané hodnoty P<sub>mic</sub> se pro jednotlivé koncentrace vnitřního standardu značně lišily. Mezi nejvyšší a nejnižší vypočítanou hodnotou dosahoval rozdíl až 200,7% v půdách Hamru (graf 5), 474,9% v půdách PL (graf 6) 330,1% v půdách CT (graf 7). Pokud byla ve vzorcích omezena biologická sorpce, tyto rozdíly se ještě prohloubily a dosahovaly až 6000, 8000 a 1700% mezi nejvyšší a nejnižší vypočítanou hodnotou P<sub>mic</sub> v půdách PL, CT a půdách Hamru. V rozmezí hodnot použitého vnitřního standardu 200 - 800 µg.g<sup>-1</sup> se vypočítané hodnoty P<sub>mic</sub> ve většině případů průkazně nelišily a rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší vypočítanou hodnotou P<sub>mic</sub> činil maximálně 17,7; 42,5 a 17,6 % v půdách H, PL a

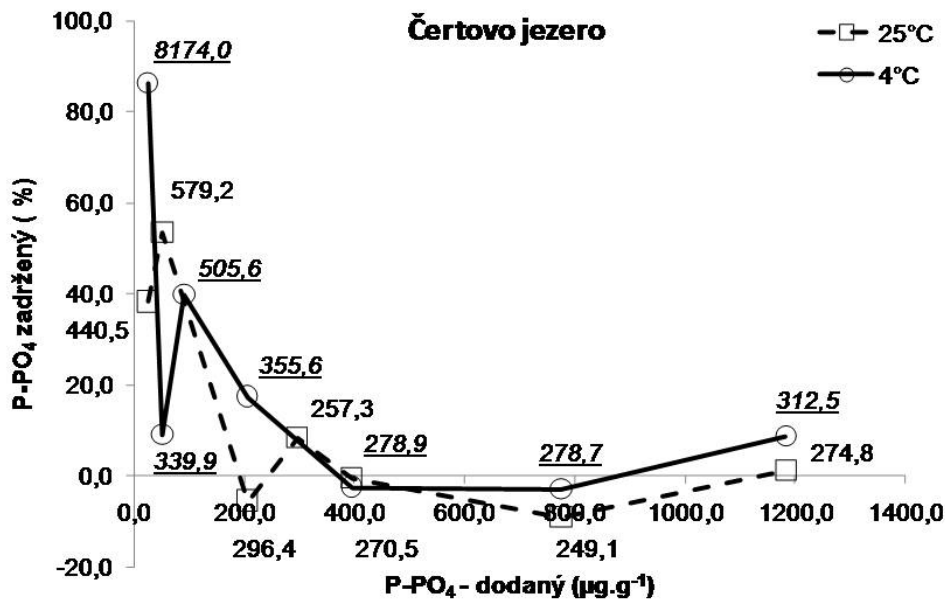
CT. V tom samém rozmezí při omezené biologické sorpci byly rozdíly vyšší (142% pro H; 135% pro PL a 76% pro CT).



Graf 5: Závislost množství zadržného P na množství P dodaného v půdách Hamru. Ke každému přidanému množství je spočítán  $P_{mic}$  ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) za použití daného množství jako vnitřního standardu podle rovnice uvedené v kap. 3.3.4.. Podtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 4°C, kdy byla omezena biologická sorpce, a nepodtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 25°C



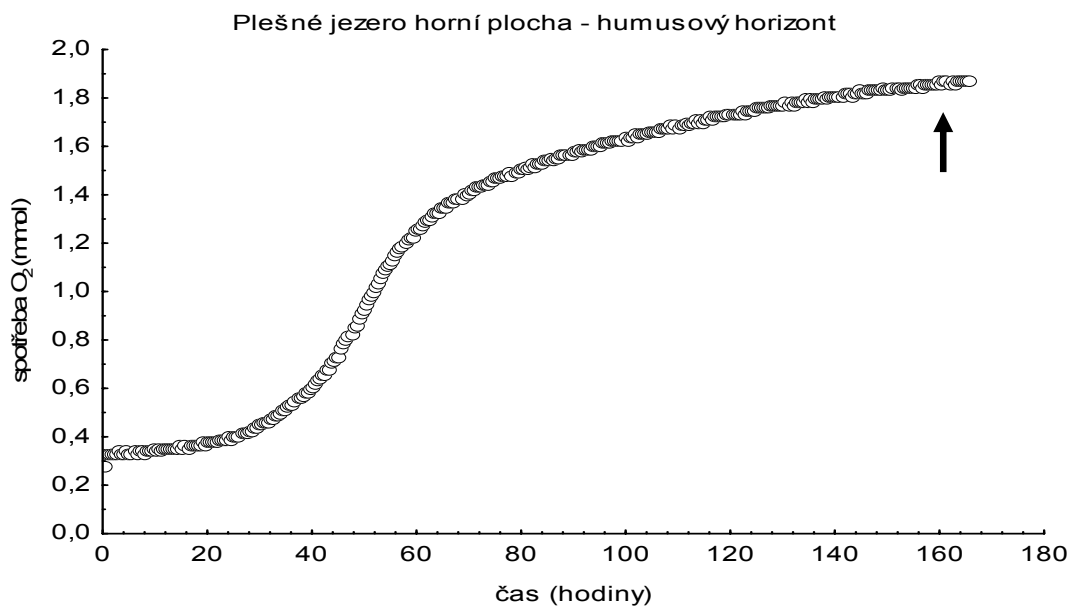
Graf 6: Závislost množství zadrženého P na množství P dodaného v půdách PL. Ke každému přidanému množství je spočítán  $P_{mic}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za použití daného množství jako vnitřního standardu podle rovnice uvedené v kap. 3.3.4.. Podtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 4°C, kdy byla omezena biologická sorpce, a nepodtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 25°C.



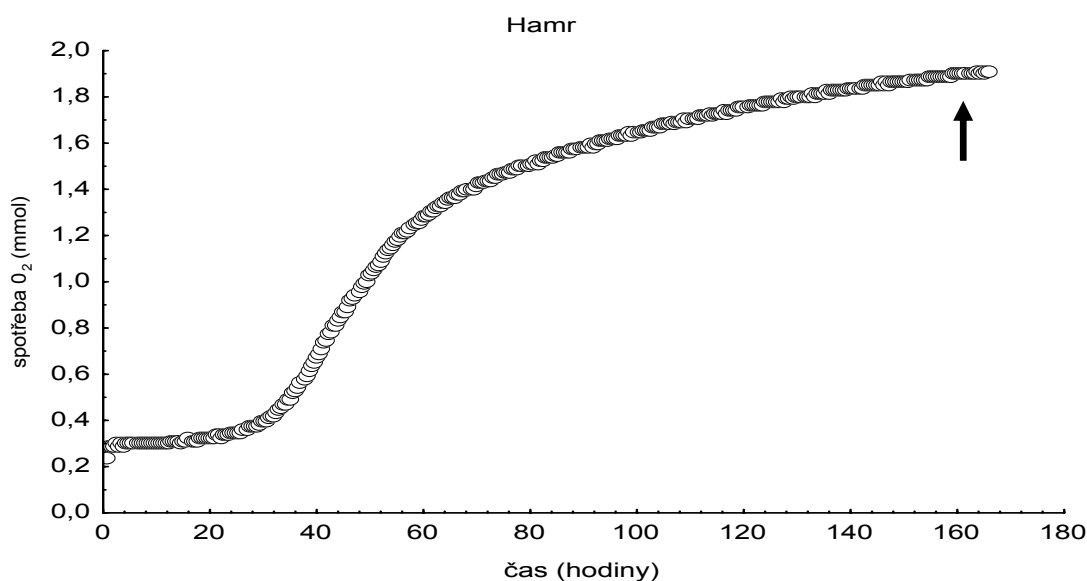
Graf 7: Závislost množství zadržného P na množství P dodaného v půdách CT. Ke každému přidanému množství je spočítán  $P_{mic}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za použití daného množství jako vnitřního standardu podle rovnice uvedené v kap. 3.3.4.. Podtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 4°C, kdy byla omezena biologická sorpce, a nepodtržená čísla ukazují vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  při měření při 25°C

#### 4.5. Stanovení korekčního faktoru $K_p$

V grafu 8 a 9 jsou vyneseny růstové křivky půdních mikroorganismů v půdách PL a Hamru.



Graf 8: Růstová křivka půdního společenstva půd Plešného jezera stanovená pomocí spotřeby  $O_2$  mikrobiálním společenstvem. Šipka označuje moment, ve kterém byl vzorek použit k analýze.



Graf 8: Růstová křivka půdního společenstva půd Hamru stanovená pomocí spotřeby  $O_2$  mikrobiálním společenstvem. Šipka označuje moment, ve kterém byl vzorek použit k analýze.

Lag fáze skončila u obou půd po 30 hodinách. Během dalších 20 hodin probíhala exponenciální fáze růstu půdních mikroorganismů a stacionární fáze růstu dosáhlo mikrobiální půdní společenstvo obou půd po 80 hodinách. Nebyly zjištěny významné rozdíly v mikrobiální aktivitě použitých půd. Vzorky na stanovení P v mikrobiálních buňkách byly odebrány po 168 hodinách inkubace.

### 1) množství P v mikrobiálních buňkách před a po centrifugaci

V tab. 6 je množství celkového P v půdním extraktu po centrifugaci při 500g, po centrifugaci při 10 000g a v peletu fumigovaných a nefumigovaných vzorků. Množství celkového P se po fumigaci vzorků ve všech frakcích zvýšilo. Rozdíly mezi fumigovanými a nefumigovanými vzorky v extraktech ze vzorků PL nejsou statisticky průkazné, v extraktech ze vzorků H jsou významné rozdíly. Množství P v mikrobiálním peletu po centrifugaci při 10 000g bylo ve vzorcích PL a Hamru vyšší, ačkoliv tento rozdíl není pro vzorky PL statisticky významný.

PL	nefumig Ptot (µg)	fumig	F	df	p
extrakt po 500g	192.44	199.69	1.74	6	0.11
s.d.	7.04	10.96			
extrakt po 10000g	173.71	201.80	2.42	6	0.31
s.d.	14.69	51.06			
mikrobiální pelet	3.77	4.26	12.09	6	0.36
s.d.	0.43	0.84			
H	nefumig Ptot (µg)	fumig	F	df	p
extrakt po 500g	13.04	45.31	<b>4.04</b>	<b>6</b>	<b>&lt;&lt; 0,05</b>
s.d.	9.31	4.64			
extrakt po 10000g	9.63	41.96	<b>4.45</b>	<b>6</b>	<b>&lt;&lt; 0,05</b>
s.d.	4.17	8.80			
mikrobiální pelet	1.85	3.15	<b>1.41</b>	<b>6</b>	<b>&lt; 0,05</b>
s.d.	0.77	0.65			

Tab. 6 - Množství celkového P (Ptot) v extraktu po centrifugaci při 500g, při 10000g a v mikrobiálním peletu ve vzorcích PL a H před a po fumigaci. V tabulce jsou uvedeny průměry se směrodatnými odchylkami (s.d.)  $n = 4$  a výsledky oboustranného t-testu porovnávající množství Ptot v jednotlivých frakcích fumigovaných a nefumigovaných vzorků

### 2) sorpce anorganického P na mikrobiální pelet

Okyselení extrakčního činidla před centrifugací vedlo ke statisticky průkaznému snížení množství celkového P v mikrobiálním peletu (PL:  $F = 8,59$ ;  $df = 12$ ;  $p < 0,05$ ), (HL:  $F = 115,55$ ;  $df = 12$ ;  $p < 0,05$ ) (tab. 7). Významný vliv mělo okyselení na množství rozpuštěného reaktivního P, který se uvolnil z mikrobiálního peletu po přidavku P-PO<sub>4</sub>. Ve všech případech se vyplavoval P do roztoku a množství P-PO<sub>4</sub> se v roztoku zvýšilo. V neokyseleném extraktu bylo množství celkového P v mikrobiálním peletu průkazně vyšší než množství reaktivního rozpuštěného P, který se uvolnil z peletu do přidaného roztoku P-PO<sub>4</sub> (tab. 7). Po okyselení extraktu tomu bylo naopak (PLHA:  $F = 10,13$ ;  $df = 12$ ;  $p < 0,05$ ), (HL:  $F = 10,67$ ;  $df = 12$ ;  $p < 0,05$ ). Tato chyba mohla být způsobena rozdílnou citlivostí použitých metod při takto

nízkých koncentracích P. Můžeme říci, že je množství celkového P peletu a reaktivního rozpuštěného P uvolněného z peletu stejné.

PL	celkový P v mikrobiálním peletu μg	P-PO <sub>4</sub> v roztoku μg	P-PO <sub>4</sub> uvolněný z mikrobiálního peletu μg
vzorky s okyseleným extraktem	4,47 0,65	507,14 0,60	7,14 0,60
kontrolní vzorky	8,97 0,34	507,28 2,41	7,28 2,41
H	P <sub>tot</sub> μg	P-PO <sub>4</sub> μg	
vzorky s okyseleným extraktem	5,37 1,36	506,20 0,58	6,20 0,58
kontrolní vzorky	19,72 0,74	512,86 3,47	12,86 3,47

Tab. 7: Množství celkového P v mikrobiálním peletu a množství rozpuštěného reaktivního P (P-PO<sub>4</sub>) v roztoku P-PO<sub>4</sub> (500 μg) poté co byl promýván s mikrobiálním peletem. V tabulce jsou uvedeny hodnoty se směrodatnými odchylkami (s.d.) n = 4

## **5. Diskuze**

### **5.1. Stanovení sorpce P půdami**

Během 24 hodinové fumigace se P postupně uvoňuje z buněk půdních mikroorganismů do půdního roztoku a může být sorbován na půdní částice. Stanovení sorpce P půdami metodou podle Yuan a Lavkulich (1994) je jedním z prostředků jak zjistit, do jaké míry sorpce P na půdní částice během fumigace ovlivňuje stanovení P<sub>mic</sub>. Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že sorpční vlastnosti půdy mohou významným způsobem ovlivňovat stanovení P v půdní mikrobiální biomase extrakčně fumigační metodou. Během fumigace totiž dochází k sorpci P uvolněného z buněk půdních mikroorganismů v podobě ortofosforečnanového iontu na půdní sorpční komplex. Množství P, které se může uvolnit z buněk půdních mikroorganismů, nepřevyšuje ani v jedné z půd, její sorpční maximum, kdy jsou veškerá sorpční místa v půdě nasycena. V celém rozsahu použitých koncentrací přidaného P je totiž množství zadrženého P lineární. Účinnost sorpce se však mezi jednotlivými půdami liší a tím se bude lišit velikost vlivu sorpce na stanovení P<sub>mic</sub> v těchto půdách.

Množství P, které po uvolnění z mikrobiálních buněk může půda Hamru sorbovat je vysoké. Toto množství dosahuje téměř 98% uvolněného P až do množství, kdy je během fumigace do půdy uvolněno 400  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . I nad touto hodnotou je sorpce půdy významná a dosahuje téměř 86%. V půdách povodí Plešného a Čertova jezera je pak sorpce P uvolněného půdními mikroorganismy méně významná. Množství P, které jsou tyto půdy schopné během fumigace sorbovat, dosahuje maximálně 46% uvolněného P a to jen v případě, že je z buněk půdních mikroorganismů do půdy uvolněno dostatečné množství P přesahující 80  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Pod touto hranicí je sorpce P těmito půdami zanedbatelná. Naměřené záporné hodnoty sorpce P pod hranicí 80  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  jsou výsledkem přítomnosti rozpustných forem P v půdě. Pokud je koncentrace P přidaného roztoku příliš nízká, tyto formy P se do něj uvolňují (Brady a Weil, 2002).

Množství P sorbovaného půdou tak, jak bylo stanoveno v tomto pokusu, ale neodpovídá s naprostou přesností množství P sorbovaného během fumigace poté, co dojde k uvolnění P z buněk půdních mikroorganismů. Chování uvolněného mikrobiálního P v půdě totiž může být lehce odlišné od chování přidaného anorganického P v půdě (Wu et al., 2000). Díky vysokým sorpčním schopnostem půd Hamru a půd PL a CT nad hranicí 80  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  je ale možné tento rozdíl zanedbat. Stejně tak můžeme tento rozdíl zanedbat u půd PL a CT pod hodnotou 80  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , protože zde k sorpci téměř nedochází. Lze říci, že množství zadrženého P



tak, jak bylo stanoveno v tomto pokusu, se velice blíží skutečné situaci, která nastává v půdě během fumigace. P je při tomto stanovení, podobně jako během fumigace, zadržen půdním sorpčním komplexem a vliv biologické sorpce je minimální (Kaňa a Kopáček, 2002).

Na základě tohoto pokusu můžeme říci, že sorpční vlastnosti půd mokrých luk Hamru mohou významným způsobem ovlivnit stanovení  $P_{mic}$ . Značná část P uvolněného z buněk půdních mikroorganismů do půdy může být během 24 hodin trvající fumigace navázána na sorpční komplex půdy. V půdách PL a CT je toto množství až do hodnoty  $80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  zanedbatelné a při vyšších množstvích může dosahovat téměř poloviny uvolněného P. Důležité je ale vědět, jaké množství z takto navázaného P můžeme uvolnit extrakcí  $\text{NaHCO}_3$ .

## **5.2. Stanovení extrahovatelnosti P hydrogenuhličitanem sodným a vliv biologické sorpce na tyto hodnoty**

Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že pomocí  $\text{NaHCO}_3$  je možné z půd PL a CT extrahovat téměř veškerý přidaný P (vnitřní standard). V půdách Hamru je toto množství výrazně nižší a dosahuje maximálně 30% uvolněného P. Vysoké účinnosti extrakce v půdách PL a CT odpovídají hodnotám naměřeným Blissem et al. (2004), kteří zjistili, že návratnost P přidaného do kyselých půd v množství  $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dosahuje v humusových horizontech 94%. Na druhou stranu naše výsledky neodpovídají výsledkům Wu et al. (2000). Ti naopak zjistili, že návratnost P přidaného do půdy při použití  $\text{NaHCO}_3$  jako extrakčního činidla nepřesahuje v kyselých půdách 20%.

Vnitřní standard se přidává do půdy proto, aby se výpočet biomasy korigoval na sorpci P, který se uvolní z mikrobiálních buněk během fumigace, a které není možné vyextrahovat  $\text{NaHCO}_3$ . To znamená, že se předpokládá, že mechanismy sorbující P mikrobiálního původu v půdě během fumigace jsou podobné jako mechanismy sorbující vnitřní standard a působí na vnitřní standard stejným způsobem. Jak ale ukázal Morel et al. (1996), sorpce P v půdě mimo jiné závisí také na tom, po jak dlouhou dobu je půda v kontaktu s roztokem P. Chování P v půdě je jiné během 24 hodin trvající fumigace, než chování P v půdě po jednorázovém přidavku. Porovnání výsledků sorpce P a extrahovatelnosti vnitřního standardu P  $\text{NaHCO}_3$  ukazuje, že sorpce vnitřního standardu P se liší od sorpce P během 24 hodinového kontaktu s půdou. Zdá se, že použití vnitřního standardu pro korekci na sorpci půdy, tak jak se používá při stanovení  $P_{mic}$ , je nevhodné a může se stát zdrojem chyb. Na základě výsledků stanovení sorpce a extrahovatelnosti P  $\text{NaHCO}_3$  není v tuto chvíli možné stanovit přesné množství P, které se uvolní z buněk půdních mikroorganismů během fumigace v podobě

ortofosforečnanového iontu. Pro stanovení skutečné extrahovatelnosti P  $\text{NaHCO}_3$ , který se uvolní fumigací a naváže na půdní sorpční komplex, by bylo v budoucnu vhodné stanovit pro každou půdu extrahovatelnost P, který zůstal navázaný v sedimentu po 24 hodinové sorpci P (viz kap. 4.1.). Pro extrakci P ze sedimentu by se měl použít stejný postup jako při extrakci vnitřního standardu.

Na sorpci P uvolněného při fumigaci se zřejmě uplatňují především mechanismy chemické a fyzikální sorpce, které určují sorpční kapacitu půd (Kaňa a Kopáček, 2002). Při přidavku vnitřního standardu P se ale může uplatňovat i biologická sorpce (Olander a Vitousek, 2005) a ta může být zdrojem chyb. Výsledky uvedené v této práci ukazují, že se biologická sorpce na sorpci vnitřního standardu v podobě jednorázového přídavku P podílet může. V půdách mokrých luk Hamru došlo totiž po omezení mikrobiální aktivity a tedy biologické sorpce ke zvýšení extrahovatelného P v průměru o 9,2%, ale jen pokud bylo k půdám přidáno dostatečné množství P přesahující  $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Biologická sorpce tedy pravděpodobně přispívá k odlišnému chování P v půdě, nemůže však sama o sobě vysvětlit protikladné výsledky sorpce a extrahovatelnosti P v půdách PL a CT. V půdách PL a CT došlo sice k nepatrnému snížení extrahovatelného P po přidavku vnitřního standardu o vyšších koncentracích P ( $200 - 1200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), ale oproti očekávání došlo k ještě většímu poklesu hodnot extrahovatelného P po přidavku vnitřního standardu o nižších koncentracích P ( $20 - 80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Došlo tedy k ještě většímu prohloubení rozdílů v sorpci a extrahovatelnosti P při těchto koncentracích. Je možné, že i v půdách PL a CT biologická sorpce přispívá k sorpci vnitřního standardu a pokles hodnot extrahovatelného P je způsoben citlivostí mikrobiálního společenstva k použitému extrakčnímu činidlu. V případě kdy není biologická sorpce omezena, mohou půdní mikroorganismy část přidaného P imobilizovat a po zalití extrakčním činidlem uvolnit. Podobné výsledky byly publikovány ve studii Ahmeda et al. 2008. Ten zjistil, že po přidání bakteriální kultury do fumigované půdy se množství extrahovatelného P  $\text{NaHCO}_3$  oproti fumigovaným vzorkům bez přidané bakteriální kultury zvýšilo o 7%. Výsledky byly interpretovány tak, že během extrakce může docházet k desorpci P z půdy způsobené přidanou bakteriální kulturou. Je však také možné, že došlo k částečné extrakci P vázaného v buňkách bakteriální kultury

Z výsledků předložených v této práci vyplývá, že biologická sorpce je jednou z příčin zkreslení výsledků stanovení  $P_{mic}$  extrakčně fumigační metodou. Je ale zřejmé, že samotný mechanismus biologické sorpce nemůže vysvětlit rozdílné hodnoty sorpce a extrahovatelnosti P v půdách PL a CT. Pro stanovení  $P_{mic}$  je ale důležité, že použití vnitřního standardu pro

korekci P na sorpci půdy je pravděpodobně nevhodné, protože použitím vnitřního standardu v podobě jednorázového přídatku P není možné napodobit skutečnou sorpci P uvolněného z buněk půdních mikroorganismů v podobě ortofosforečnanového iontu během 24 hodinové fumigace. Tím pádem není možné určit ani následnou extrahovatelnost takto vázaného P z půdy.

### **5.3. Stanovení vlivu koncentrace vnitřního standardu na výpočet $P_{mic}$**

Z vypočítaných hodnot  $P_{mic}$  podle běžně používaného postupu s použitím různých koncentrací vnitřního standardu P je patrné to, že započítání vnitřního standardu při stanovení  $P_{mic}$  za účelem korekce na sorpci půdy je zdrojem velkých chyb. Vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  se mezi jednotlivými koncentracemi vnitřního standardu, které jsem použil k výpočtu, liší dokonce o více než 200%. Ve všech půdách dochází k největšímu zkreslení  $P_{mic}$  při použití nízkých koncentrací vnitřního standardu P. V půdě Hamru, ve které jsem zjistil vysokou sorpci přidaného P, byly hodnoty  $P_{mic}$  dokonce záporné. To mohlo být způsobeno tím, že přidaná koncentrace vnitřního standardu byla natolik malá, že došlo k jeho úplné sorpci. Rozdíl mezi množstvím P v půdě bez přídatku P a v půdě s přídatkem vnitřního standardu P byl nulový až záporný a to vedlo k záporným hodnotám vypočítaného  $P_{mic}$ . V půdě PL a CT naopak nízké koncentrace vnitřního standardu ( $< 80 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) vedly k neúměrnému nadhodnocení výsledků. Sorpce vnitřního standardu P v půdě byla nadhodnocená (viz graf 6 a 7) a to vedlo ke zvýšení vypočítaných hodnot  $P_{mic}$ . Je patrné, že v případě, kdy je do půdy přidán P v množství nižším než  $80 \mu\text{g.g}^{-1}$ , tedy v množství při kterém se výsledky sorpce a extrahovatelnosti P rozcházejí nejvíce, jsou vypočítané hodnoty  $P_{mic}$  nejvíce odlišné od všech ostatních. V těchto koncentracích se pohybuje běžně používaný vnitřní standard. Vysoké hodnoty  $P_{mic}$  měřené v půdách Plešného a Čertova jezera a neúměrně nízké až záporné hodnoty  $P_{mic}$  půd mokřých luk Hamru jsou nejspíše způsobeny použitím nízké koncentrace vnitřního standardu ke korekci na sorpci půdy (Zhao et al., 2008).

### **5.4. Stanovení korekčního faktoru $K_p$**

Dalším zdrojem chyb při výpočtu  $P_{mic}$  může být korekční faktor  $K_p$ . V této práci se mi bohužel nepodařilo stanovit hodnoty korekčního faktoru pro půdy PL, ani pro půdy Hamru. Hlavním důvodem bylo znečištění mikrobiálního peletu po centrifugaci při 10 000g a částečně také variabilita a nepřesnost získaných výsledků.

Znečištění peletu bylo způsobeno nejspíše oxidy hliníku (Al) a železa (Fe), jejichž velikost je natolik malá (0,1 $\mu$ m; Brady a Weil, 2002), že tyto částice nesedimentují při zatížení 500g s ostatními půdními částicemi, ale stejně jako mikrobiální buňky až při zatížení 10 000g. To potvrzuje i Ehlers et al. (2008). Tyto částice jsou schopné vázat na sebe P uvolněný během fumigace z buněk půdních mikroorganismů. Množství P v peletu po fumigaci vzorku se tak oproti očekávání zvyšuje. Protože účelem tohoto pokusu bylo určit množství P v intaktních buňkách a v nerozpustných zbytcích mikrobiálních buněk po fumigaci, nebylo možné na základě takovéhoto výsledku hodnotu  $K_p$  stanovit. Proto jsem se rozhodl, že budu testovat, jestli je možné minimalizovat znečištění peletu do té míry, aby stanovení  $K_p$  nerušilo. Abych docílil sedimentace oxidů Al a Fe již při 500g, okyselil jsem před centrifugací roztok na pH = 3. Při této hodnotě pH by mělo docházet k flokulaci oxidů Al a Fe do větších celků díky změně jejich povrchového náboje. Výsledky potvrzují, že okyselením extrakčního činidla došlo ke snížení celkového množství P v peletu (viz tab. 7). Došlo také ke snížení množství reaktivního rozpuštěného P vyplaveného z peletu.

Naše výsledky ale také naznačují, že se do mikrobiálního peletu dostala jen malá část mikrobiálních buněk ze vzorku. Důvodem proč se do peletu po centrifugaci 10 000g část mikrobiálních buněk nedostala, mohla být buď (i) malá účinnost extrakce použitého činidla, nebo (ii) sedimentace mikrobiálních buněk již při 500g. Pravděpodobnější příčinou je sedimentace mikrobiálních buněk již při nižším zatížení.

(i) Hydrogenuhličitan sodný je účinný extraktant a pravděpodobnost, že v provedeném pokusu nebyly mikrobiální buňky ze vzorku vyextrahovány je nízká. Při použití  $\text{NaHCO}_3$  jako extrakčního činidla by měla být ze vzorku uvolněna většina mikrobiálních buněk. Účinnost extrakce byla zvýšena také tím, že na začátku pokusu byla půda smíchána se sterilním pískem a tyto vzorky byly inkubovány. Tím, jak se půdní společenstvo ve vzorku rozrůstá, uvolňují se půdní mikroorganismy z vazby na půdní částice a účinnost extrakce se zvyšuje. Je to díky tomu, že adheze půdních mikroorganismů na částice písku je slabá. To dokazuje i vysoká účinnost extrakce půdních mikroorganismů v půdách s vysokým obsahem písku (Riis et al., 1997; Mayr et al., 1999) a to 70 - 90%. Také samotné vlastnosti extrakčního činidla, které jsem pro tento pokus zvolil, by měly zaručovat extrakci většiny půdních mikroorganismů. Je to díky jeho smáčivým účinkům a vysoké hodnotě pH. Vlivem vysokého pH roztoku totiž dochází ke změnám povrchového náboje půdních mikroorganismů, což vede k jejich snažšímu uvolnění z vazby na pevné částice (Ehlers et al., 2008).

(ii) Důvodem proč se do peletu část mikrobiálních buněk nedostala, je nejspíš jejich sedimentace při 500g. Tendence sedimentovat v roztoku při různém zatížení je dána především průměrem a hustotou částic, v tomto případě mikrobiálních buněk, rozplavených extrakčním činidlem a viskozitou činidla. Nejmenší půdní bakterie může dosahovat velikosti pouze 0,14  $\mu\text{m}$  (Bölter et al., 2002). Většina bakterií v půdách na chudých stanovištích se pohybuje mezi 0,3 - 0,5  $\mu\text{m}$  (Christensen et al., 1999; Baath, 1996). K oddělení těchto bakterií od minerálních částic půdy se proto používá zatížení 750g nebo 600g (Furtado a Casper, 2000). Při tomto zatížení ale také dochází k sedimentaci houbových hyf, které dosahují větších velikostí než bakteriální buňky. Ve výsledku je pelet tvořen především bakteriálními buňkami. V půdách, které se vyskytují na živinami bohatších stanovištích, však mohou bakteriální buňky dosahovat větších velikostí. Pokud je i v tomto případě použito k oddělení půdních mikroorganismů od půdních částic zatížení 600g, dochází i k sedimentaci bakteriálních buněk větších než 1,9  $\mu\text{m}$  (Riis et al., 1997). Protože společenstvo půdních mikroorganismů bylo v našem pokusu inkubováno v prostředí bohatém na živiny, je možné, že bakteriální buňky v tomto prostředí dosáhly větších velikostí, což vedlo k jejich sedimentaci již při 500g. Jiným důvodem je možná převaha hub v mikrobiálním společenstvu vzorků a tedy jejich sedimentace při 500g.

Kvůli problémům, které se vyskytly v průběhu pokusu, nebylo možné určit poměr mezi množstvím P obsaženým v intaktních mikrobiálních buňkách a množstvím P v nerozpustných zbytcích po fumigaci. Přesto by bylo v budoucnu vhodné stanovit metodou použitou v této části hodnotu korekčního faktoru, aby došlo ke zpřesnění hodnot  $P_{mic}$  stanovených extrakčně fumigační metodou. Na základě prostudované literatury a vlastní zkušenosti jsem zvolil následující postup, který by měl minimalizovat anorganické znečištění mikrobiálního peletu a současně maximalizovat množství mikrobiálních buněk, které se do tohoto peletu dostanou.

Smíchat půdu se sterilním pískem v poměru písek:půda 25:1., obohatit kultivačním médiem (Veldkamp, 1970) a inkubovat až do dosažení stacionární fáze růstu půdních mikroorganismů. Z tohoto vzorku odebrat 5g, těchto 5g smíchat se sterilním pískem v poměru 25:5 a opět inkubovat do dosažení stacionární fáze růstu. Tímto krokem se sníží obsah minerálních částic půdy a zvýší obsah mikrobiálních buněk ve vzorku. Současně se zvýší přesnost stanovení. Další postup je následující:

- a) postupná extrakce a ultrasonikace vzorku
  - ultrasonikace po dobu 1 minuty

- 4 násobná extrakce destilovanou vodou o pH = 8 (upraveno NaOH) v poměru vzorek/extrakční činidlo (m/v) 1:10 (5 g vzorků + 50 ml činidla - konečný objem 200 ml) po dobu 45 minut
- b) 1. centrifugace roztoku po dobu 5 minut při 200g a 4°C
- c) 2. centrifugace supernatantu z předchozího kroku po dobu 30 minut při 10 000g a 25°C
- d) rozplavení peletu (směsi mikrobiálních buněk a oxidů Al a Fe) 50 ml extrakčního činidla
- e) okyselení roztoku na pH = 3 (flokulace oxidů Al a Fe)
- f) postupná centrifugace roztoku podle bodu b) (sedimentace oxidů Al a Fe) a c) (sedimentace mikrobiálních buněk)
- g) stanovení celkového P v mikrobiálním peletu

Spoučasně je třeba kontrolovat v jednotlivých frakcích přítomnost/nepřítomnost mikrobiálních buněk buď stanovením DNA, nebo fluorescenční mikroskopií při použití barvení DAPI.

### **5.5. Korekce P<sub>mic</sub> měřených v půdách PL a CT z let 2004 - 2008**

Na základě získaných výsledků zatím stále není možné přesně odhadnout množství P v biomase půdních mikroorganismů a provést korekci dříve získaných výsledků, protože se kvůli metodickým problémům nepodařilo odhadnout hodnotu korekčního faktoru  $K_p$ . Podařilo se však prokázat, že běžně používaný vnitřní standard způsobuje velké zkreslení výsledků, především při nízkých koncentracích vnitřního standardu. Provedl jsem proto předběžnou korekci dat P<sub>mic</sub> z let 2004 - 2008. Ke korekci jsem použil vnější standardy (kalibrační přímku) a množství P<sub>mic</sub> jsem stanovil pouze z rozdílů mezi nefumigovanými vzorky a vzorky po fumigaci. Tento postup jsem zvolil na základě dat Zhao et al. (2008). V jejich studii bylo do půdy přidáváno zvyšující se množství P a byl sledován vliv pozad'ové hodnoty P na stanovení P<sub>mic</sub> ve 2 obhospodařovaných půdách. Z jejich dat vyplývá, že dochází k nadhodnocování množství P extrahovatelného NaHCO<sub>3</sub> stanoveného pomocí vnitřního standardu 25 μg.g<sup>-1</sup> podobným způsobem jako u půd PL a CT. Dále zjistili, že přesnost stanovení P je větší, pokud se k výpočtu P extrahovaného z půdy použijí vnější standardy (kalibrační přímka). Toho jsem tedy využil ke korekci výsledků P<sub>mic</sub>. Při výpočtu jsem použil běžně doporučený korekční faktor 0,4 (Hedley and Stewart, 1982) i když může být

zdrojem nepřesností. Výsledky jsou znázorněny v tab. 8. Podle těchto hodnot jsem pak přepočítal molární stechiometrické poměry uvedené v tab. 2. Tyto poměry jsou znázorněny v tab. 9.

		2004			2005			2006			2007			2008			2009				
		Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %	Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %	Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %	Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %	Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %	Pmic ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pmic - kh ( $\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P sorp. %		
Plešné jezero	horní pokusná plocha	opad	617,97 20,0	298,63 11,6	51,67 1,4	514,97 162,8	189,78 23,8	60,40 10,5	447,03 15,5	267,88 3,7	40,05 1,2	564,93 63,8	241,04 37,4	57,14 6,9	506,98 78,2	251,59 29,8	49,40 8,7	472,53 88,3	153,10 32,3	66,39 11,1	
		humus	534,84 147,1	242,66 18,1	52,02 11,0	385,44 66,1	137,02 22,6	63,38 9,6	279,04 48,4	163,03 17,2	41,10 4,9	413,77 116,8	148,30 29,6	63,56 3,3	305,13 39,4	185,83 14,4	38,68 4,6	345,88 53,1	75,04 15,6	78,31 2,9	
		minerál	61,58 33,7	31,77 13,5	41,82 13,7	31,57 13,4	7,33 2,6	75,83 5,7	45,83 11,5	32,76 8,0	28,37 1,7	86,46 4,3	30,16 2,0	65,13 1,0	23,18 9,6	14,71 6,4	36,55 8,6	n	n	n	
	dolní pokusná plocha	opad	620,97 227,1	215,28 37,9	62,19 10,4	440,29 97,2	302,07 68,4	31,21 7,0	371,14 51,2	200,60 5,5	45,31 7,0	538,53 42,1	267,61 11,5	49,99 6,1	469,61 48,9	290,48 40,2	37,21 12,7	540,44 57,9	169,72 10,6	68,39 2,9	
		humus	473,49 242,1	194,81 66,9	55,92 7,5	310,24 54,7	210,12 30,9	31,90 4,4	384,87 43,6	167,25 12,1	56,35 3,1	455,06 49,2	279,38 13,6	38,26 5,3	301,98 42,6	191,28 46,3	37,10 9,8	327,70 32,5	105,57 13,4	67,79 2,6	
		minerál	n	n	n	n	n	n	169,92 31,1	95,79 11,8	43,20 3,7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	Čertovo jezero	horní pokusná plocha	opad	503,43 92,1	160,82 18,2	67,62 3,5	575,73 189,9	278,12 114,7	50,97 14,1	519,60 8,3	399,75 12,5	23,06 2,4	454,04 9,7	227,71 5,4	49,83 1,7	447,02 96,8	194,39 50,8	56,17 8,0	492,38 45,0	297,93 69,0	39,60 11,7
			humus	420,27 54,1	152,12 14,9	63,52 3,6	427,54 81,7	133,76 25,9	68,31 5,6	315,79 58,0	193,68 6,4	37,58 9,0	389,28 64,2	151,06 2,8	60,61 5,3	494,84 94,8	136,11 23,6	71,97 4,7	242,62 86,6	99,25 24,1	57,53 5,6
			minerál	36,78 21,5	7,12 6,6	83,43 6,4	41,36 14,2	6,20 2,1	84,80 3,0	62,87 3,1	27,10 0,9	56,82 2,5	79,21 5,3	26,00 2,9	67,18 2,8	78,57 19,7	22,01 2,3	71,02 4,9	n	n	n
dolní pokusná plocha		opad	493,89 45,7	177,67 12,7	63,92 1,9	628,65 187,1	245,97 73,7	59,59 13,1	410,88 10,1	274,45 5,9	33,16 2,9	429,26 11,5	238,30 1,8	44,46 1,3	617,41 23,1	287,23 22,1	53,41 4,2	449,93 73,8	320,98 35,7	27,95 6,7	
		humus	357,33 77,2	92,03 17,1	73,73 4,3	331,29 73,8	116,40 49,2	66,04 9,9	323,49 11,9	104,18 7,0	67,76 2,6	248,45 27,4	83,95 13,9	66,32 1,9	342,05 54,6	104,35 27,6	69,26 8,2	318,74 64,3	210,23 42,1	34,03 1,7	
		minerál	47,76 14,6	11,66 4,8	75,98 4,1	38,05 27,2	3,65 3,3	90,48 3,1	59,70 13,5	12,35 1,9	78,96 3,2	34,80 2,2	13,49 3,0	61,40 7,2	129,91 22,3	21,90 13,6	82,83 10,4	n	n	n	

Tab. 8: Hodnoty Pmic půd PL a CT pro různé odběrové plochy a půdní horizonty stanovené klasickou metodou (Brokes et al., 1982) s použitím vnitřního standardu a bez něj. P sorp. se rovná procentu vnitřního standardu zadržitého půdou, Pmic - kh jsou korigované hodnoty Pmic. V tabulce jsou uvedeny průměry se směrodatnými odchylkami n se mezi roky a půdními horizonty liší a pohybuje se mezi 3 - 12



	2004	2006	2007	2008	2009
	C: N: P	C: N: P	C: N: P	C: N: P	C: N: P
PLHO	17 5 1	17 6 1	27 4 1	55 7 1	83 2 1
PLHA	15 4 1	17 5 1	41 4 1	47 5 1	77 8 1
PLDO	21 10 1	28 10 1	52 5 1	55 6 1	93 6 1
PLDA	20 9 1	17 7 1	25 2 1	45 6 1	54 3 1
CHO	23 9 1	12 3 1	45 5 1	47 8 1	34 4 1
CHA	18 8 1	14 4 1	48 4 1	80 9 1	63 9 1
CDO	22 7 1	16 5 1	44 4 1	45 7 1	33 3 1
CDA	28 9 1	32 9 1	97 9 1	104 10 1	35 3 1

Tab. 9: Přepočtené molární stechiometrické poměry půdní mikrobiální biomasy od roku 2004. PL - Plešné jezero; C - Čertovo jezero; H - horní pokusná plocha; D - dolní pokusná plocha; O - opadový horizont; A - humusový horizont

Je vidět, že hodnoty C:P i N:P se zvýšily. Poměr C:P dosahuje hodnot mezi 15 - 104, ale ve většině případů se pohybuje okolo hodnoty 50 a zřetelně se přiblížil odhadované hodnotě 60 (Cleveland a Liptzin, 2007). Poměr N:P se pak pohybuje mezi 2 - 10. I zde se molární poměr přiblížil odhadované hodnotě 7 (Cleveland a Liptzin, 2007), avšak stále jsou některé hodnoty příliš nízké. Je tedy pravděpodobné, že korekční faktor 0,4 pro výpočet  $P_{mic}$  může být zdrojem chyb a měl by být v budoucnu stanoven. Avšak na základě těchto molárních stechiometrických poměrů můžeme říci, že odhad množství fosforu v biomase půdních mikroorganismů v půdách PL a CT se výrazně zpřesnil.

## **6. Závěr**

Cílem mé magisterské práce bylo určit příčiny nepřesných hodnot P v biomase půdních mikroorganismů půd kyselých lesních smrčín a zamokřených luk.

Zjistil jsem že:

- 1) sorpce P může mít v závislosti na sorpční vlastnosti půdy vliv na přesnost stanovení  $P_{mic}$ . P uvolněný z buněk půdních mikroorganismů může být během fumigace navázán na půdní sorpční komplex a zneprístupněn tak stanovení. Vliv sorpce v půdách H je výraznější než v půdách PL a CT.
- 2) vnitřní standard, který se běžně používá ke korekci výsledků  $P_{mic}$  na sorpci půdy, toto stanovení zkresluje. V budoucnu by bylo vhodné zpřesnit stanovení  $P_{mic}$  určením extrahovatelnosti P navázaného na půdní sorpční komplex během 24 hodinové fumigace z kap. 4.1. a vnitřní standard nepoužívat.
- 3) vliv biologické sorpce na množství extrahovatelného P je minimální a je možné ho zanedbat.
- 4) určit množství P v extrahovaných intaktních buňkách a v buňkách narušených chloroformem a podle toho určit hodnotu korekčního faktoru  $K_p$  pro dané půdy se nepodařilo. Pro zpřesnění stanovení  $P_{mic}$  by bylo v budoucnu vhodné hodnotu  $K_p$  pro dané půdy stanovit podle postupu navrženého v kapitole 5.4.

## **Seznam použité literatury**

- Ahmed et al., 2008: Phosphorus adsorption in some Australian soils and influence of bacteria on the desorption of phosphorus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 1269–1294
- Arias et al., 2005: Soil health: A new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology* 8: 13 - 21
- Arigo R. K. 2005: Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437: 349 - 355
- Badalucco et al., 1996: Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1135 - 1142
- Barrow N. J., 1983: A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil. *Journal of Soil Science* 34: 733 - 750 In Frossard et al., 2000: Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality* 29: 15 - 23
- Baath, E., 1996: Thymidine incorporation of bacteria sequentially extracted from soil using repeated homogenization-centrifugation. *Microbial Ecology* 31: 153–166
- BBodSchG (Bundes-Bodenschutzgesetz), 1998. Gesetz zum Schutz des Bodens in der Fassung der Bekanntmachung vom 17.03.1998. *Bundesgesetzblatt I*, pp. 502–510 In Vinding et al., 2005: The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 230 - 248
- Beare, 1997. Fungal and bacterial pathways of organic matter decomposition and nitrogen mineralization in arable soils. In: Brussaard, L., Ferrera-Cerrato, R. (Eds.), *Soil Ecology in Sustainable Agricultural Systems*. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 37–70.
- Bliss et al., 2004: Determination of microbial phosphorus  $K_p$  factors in a spodosol: influence of extractant, water potential, and soil horizon. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1925–1934
- Bloem et al., 1997: Soil food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. In: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington HME (eds) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp 245-278
- Bölter et al., 2002: Enumeration and biovolume determination of microbial cells – a methodological review and recommendations for applications in ecological research. *Biology and Fertility of soil* 36: 249 - 259
- Brady N. C. and Weil R. R. 2002: *Nature and properties of soil*, 13th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey
- Brookes et al., 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 319–329
- Brookes et al., 1984: Phosphorus in the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 169 - 175 In Frossard et al., 2000: Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality* 29: 15 - 23
- Cleveland C. C., Liptinz D., 2007: C:N:P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio“ for the microbial biomass? *Biogeochemistry* 85:235-252
- Coleman, D.C. and Crossley, D.A. 1996. *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic Press, London, pp 502
- Coleman et al., 1998. Ecosystem health: an overview. In: Wang, P.H. (Ed.), *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. Soil Science Society of America Special Publication No. 52, Madison, WI, pp. 1–20
- Doran, J.W. and Safley, M., 1997: Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, pp. 1–28
- Ehlers et al., 2008: Extraction of soil bacteria from Ferrasol. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1940 - 1946

- Raegri et al., 1977: Bacterial and fungal activities in soil: Separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 105 - 112
- Fitter et al., 2005: Biodiversity and ecosystem function in soil. *Functional ecology* 19: 369 - 377
- Fixen, P.E. and Grov J.H. 1990: Testing soils for phosphorus. p. 141-180. *In* Westerman R. L. (ed.) *Soil Testing and Plant Analysis*. SSSA, Madison, WI
- Fletcher M. 1991: The physiological-activity of bacteria attached to solid surfaces. *Advances in Microbial Physiology* 32: 53–85
- Frossard et al., 2000: Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality* 29: 15 - 23
- Foster R. C. 1988: Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 6: 189-203
- Fu et al., 2005: The biological and biochemical consequences of phosphate scavenging onto phytoplankton cell surfaces. *Limnology and Oceanography* 50: 1459 - 1472
- Furtado A. S. and Casper P. 2000: Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 41: 249–257
- Harrold S. A., Tabatabai M. A., 2006. Release of inorganic phosphorus from soils by low molecular weight organic acids. *Communication in soil science and plant analysis*, 37: 1233 – 1245
- Hattori, T. 1973: *Microbial Life in Soil*. Marcel Dekker, New York
- Hedley M. J., and Stewart J. W. B. 1982. Method to measure microbial phosphate in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 14:377–385
- Heijden et al., 2008: The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296 - 310
- Chen et al., 2000: Microbial biomass phosphorus and its significance in predicting phosphorus availability in red soils. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 31: 655-667
- Chen G. C. and He Z. L., 2004: Determination of soil microbial biomass phosphorus in acid red soils from southern China. *Biology and Fertility of Soils* 39: 446–451
- Christensen et al., 1999: Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Application in Environmental Microbiology* 65:1753–1761
- Jenkinson D. S. 1988: Determination of soil microbial biomass carbon and nitrogen in soil. *In* Wilson J. R.: *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*, CAB International, Wallingford.
- Jenkinson et al., 2004: Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 5–7
- Kaňa J. and Kopáček J., 2005. Impact of soil sorption characteristics and bedrock composition on phosphorus concentration in two Bohemian forest lakes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 173: 243–259
- Khanna, M. & Stotzky, G. 1992: Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1930–1939
- Klose S. and Tabatabai M. A. 2002: Response of phosphomonoesterases in soils to chloroform fumigation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 429 - 434
- Kovar L. J. and Pierzynski G. M. 2009: *Methods of Phosphorus Analysis for Soils, Sediments, Residuals, and Waters*, 2nd Edition. Southern Cooperative Series Bulletin No. 408

- Kopáček et al., 2001a: Element budgets in three Bohemian Forest lakes and their watersheds in the 2000 hydrological year: Čertovo Lake, *Silva Gabreta* 6, 35–52
- Kopáček et al., 2001b: Element budgets in three Bohemian Forest lakes and their watersheds in the 2000 hydrological year: Plešné Lake, *Silva Gabreta* 6, 73–86.
- Kopáček et al., 2002a: Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes: I. Plešné Lake. *Silva Gabreta* 8: 43 - 62.
- Kopáček et al., 2002b: Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes: II. Čertovo and Černé Lakes. *Silva Gabreta* 8: 63 - 93
- Kulaev I. and Kulakovskaya T. 2000: Polyphosphate and phosphate pump. *Annual Review of Microbiology* 54: 709 - 739
- Lookman et al. 1995: Longterm kinetics of phosphorus released in soil. *Environmental Science and Technology* 29: 1569 - 1575 *In* Frossard et al., 2000: Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality* 29: 15 - 23
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1987: Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2948–2952. *In* Nannipieri et al., 2003: Microbial diversity and functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655 - 670
- Magid et al., 1996: Dynamics of organic phosphorus in soils under natural and agricultural ecosystems. *In* Piccolo A (ed) *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam
- Mach J., 2010: Effects of two-year nutrient loading on microbial community and N transformations in mineral and organic soils of wet meadows. Mgr. thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic
- Martin J. K. and Foster R. C. 1985: A model system for studying the biochemistry and biology of the soil-root interface. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 261-269 *In* Badalucco et al., 1996: Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1135 - 1142
- Mayr et al., 1999: Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method. *Journal of Microbiological Methods* 36: 29–33
- Morel et al., 1996: Correction for P-sorption in the measurement of soil microbial biomass P by  $\text{CHCl}_3$  fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 1699 - 1706
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962: A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36
- Nannipieri et al., 1996: Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 107 - 112
- Nannipieri et al., 2003: Microbial diversity and functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655 - 670
- Olander, L.P. and Vitousek, P.M., 2004: Biological and geochemical sinks for phosphorus in soil from a wet tropical forest. *Ecosystems* 7, 404–419
- Olander, L.P. and Vitousek, P.M., 2005: Short-term controls over inorganic phosphorus during soil and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 651–659
- Olsen et al., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular 939. U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- Ostle et al., 2003: Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a  $(\text{CO}_2)\text{-C}^{13}$  spike. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 877–885.

Paul E. A. and Clark F. E., 1996: Soil Microbiology and Biochemistry, Second Edition. Academic Press, San Diego, pp. 340

Pettersson et al., 1985a: Physiological and structural responses of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to aluminium. *Physiology of Plants* 63: 153-158 In Pina R. G. and Cervantes C. 1996: Microbial interaction with aluminium. *Biometals* 9: 311 - 316

Pina R. G. and Cervantes C. 1996: Microbial interaction with aluminium. *Biometals* 9: 311 - 316

Prach, K. (2002): Human impact on vegetation around Rožmberk pond In: J. Květ, J. Jeník and L. Soukupová (eds.) *Freshwater wetlands and Their Sustainable Future. A Case Study of Třeboň Basin Biosphere Reserve, Czech Republic*. UNESCO and Parthenon Publishing Group, Boca Raton, Florida, US. pp. 187-193

Ramsay, A.J., 1984. Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts autoradiography. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 475-481.

Riis et al., 1997: Extraction of microorganisms from soil: Evaluation of efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1573 - 1581

Sanudo-Wilhelmy et al., 2004: The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Fedfield stoichiometry. *Nature* 432: 897 - 901

Sexstone et al., 1985. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 49: 645-651. In Nannipieri et al., 2003: Microbial diversity and functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655 - 670

Schleifer K. H. 2004: Microbial diversity: Facts, problems and prospects. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 3 - 9

Smith, S.E. and Read, D.J. 1997: *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, London, UK

Sparling et al., 1987: Effect of soil moisture regime on the microbial contribution to Olsen phosphorus values. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 30: 79 - 84

Strivastava S. C. and Singh J. S. 1988: Carbon and phosphorus in the soil biomass of some tropical soils of India. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 743 - 747

Sterner W. R. and Elser J. J. 2002: *Ecological stoichiometry*. Princeton University Press, New Jersey

Stewart J.W.B and Tiessen H. 1987: Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* 4:41-60

Stewenson F. J., Cole M. A., 1999: *Cycles of Soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*, John Wiley and sons. Urbana, Illinois: pp. 448

Stotzky, G. 1997: Soil as an environment for microbial life. van Elsas JD, Trevors JT, Wellington HME (eds) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp 245-278

Sylvia et al., 1999: *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, Inc., New Jersey

Tan K. H., 1993: *Principles of Soil Chemistry*, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York

Tate K. R., 1984: Biological transformation of P in soil. *Plant soil*, 76: 245-256

Veselý J., 1994. Investigation of the nature of the Šumava lakes: a review. *Časopis Národního Muzea, Řada přírodovědná* 163 (1 - 4): 103 - 120

Vinding et al., 2005: The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 230 - 248

Westheimer F. H. 1987: Why nature choose phosphates. *Science* 235: 1173 - 1178 In Sterner W. R. and Elser J. J. 2002: *Ecological stoichiometry*. Princeton University Press, New Jersey

Whitman et al. 1998: Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings in National Academy of Science* 95: 6578–6583

Wu et al., 2000: Quantifying microbial biomass phosphorus in acid soils. *Biology and Fertility of Soils* 32: 500–507.

Yuan G., Lavkulich L. M., 1994: Phosphate sorption in relation to extractable iron and aluminium in spodosols. *Soil science society of America journal*, 58: 343 - 346

Zhao et al., 2008: Interference of soil-extractable phosphorus in measuring soil microbial biomass phosphorus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 1367–1374