

E2240 Účinky stresorů v ekosystémech

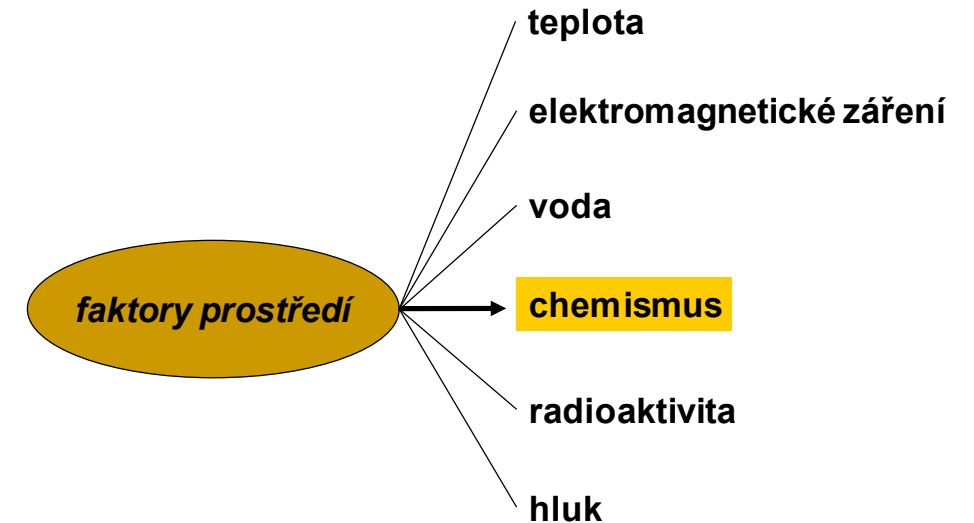
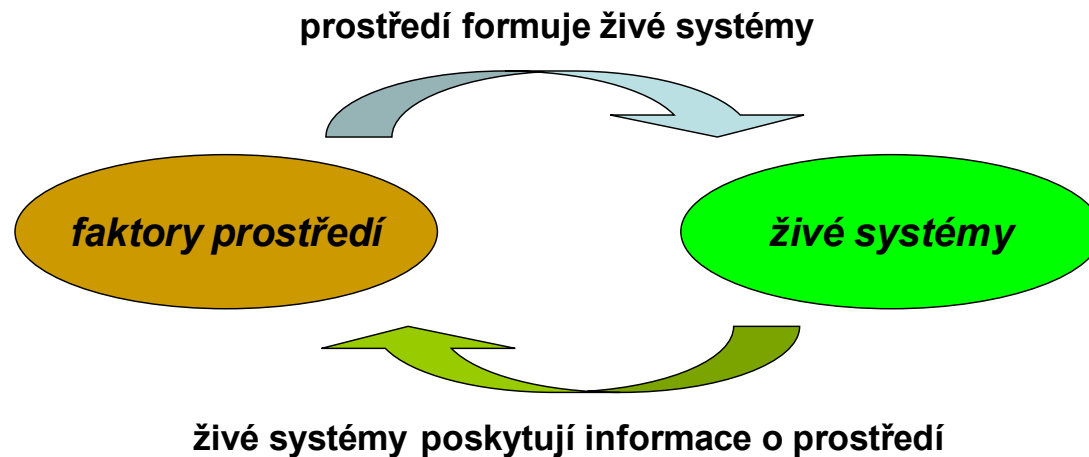
05 Bioindikace v suchozemských ekosystémech – 1. část

Jakub Hofman

Úvod - připomenutí

Bioindikace

metoda, kdy se na základě vlastností biologických systémů odhadují vlastnosti prostředí



v širším slova smyslu tím označujeme všechny postupy, kde sledujeme reakce organismů (od jedinců po společenstva) přítomných v prostředí na stres

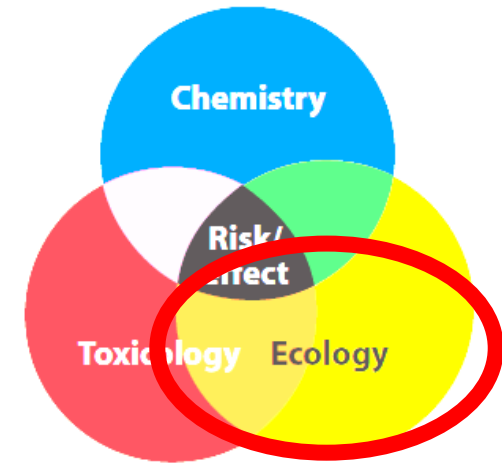
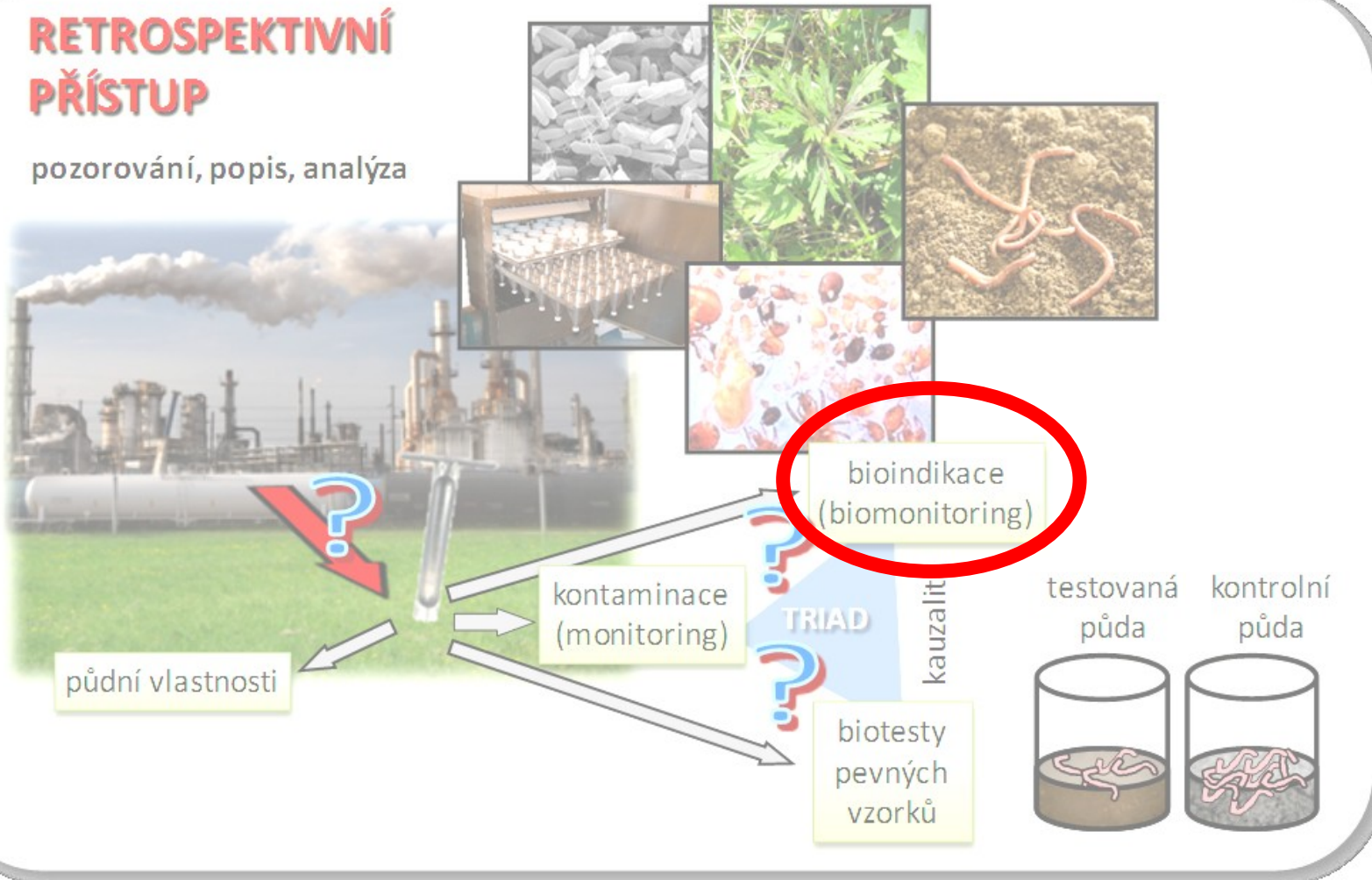
Bioindikace versus biomonitoring

- bio + monitoring
- bioindikace je postup
- biomonitoring je jeho použití v terénních studiích zejména na více lokalitách nebo opakovaně v čase

Bioindikace

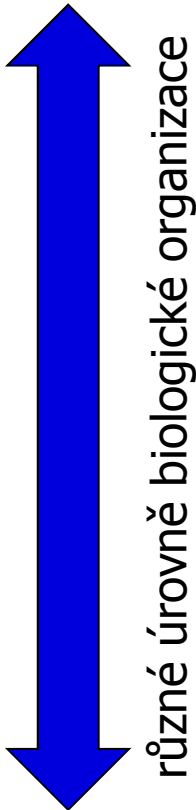
RETROSPEKTIVNÍ PŘÍSTUP

pozorování, popis, analýza



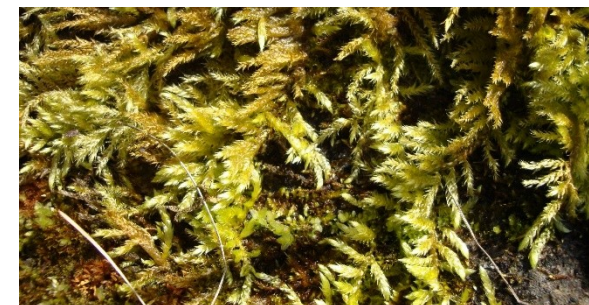
Bioindikace

- sledování chemických látek v odebraných vzorcích bioty
 - v čemkoliv, preferenčně tzv. bioakumulátory či bioindikační druhy/vzorky (jehličí)
- sledování bioty a její odezvy na faktory prostředí
 - biochemické markery
 - účinku (stresové proteiny – HSP – heat shock proteiny, chromozomové aberace ...)
 - expozice (methalothioneiny, EROD - ethoxyresorufin-O-deethylase ...)
 - indikátorové druhy - přítomnost/nepřítomnost indikuje určitou vlastnost ekosystému
 - citlivé druhy (např. pošvatky, horské ploštěnky, lišejníky)
 - oportunní druhy (např. pakomáři, pijavky ...)
 - stav a funkce organismů
 - populace - počty organismů, distribuce, věkové složení ...
 - společenstvo – druhové složení a zastoupení, biodiverzita
 - stav ekosystému, krajiny – struktura, dynamika, funkce



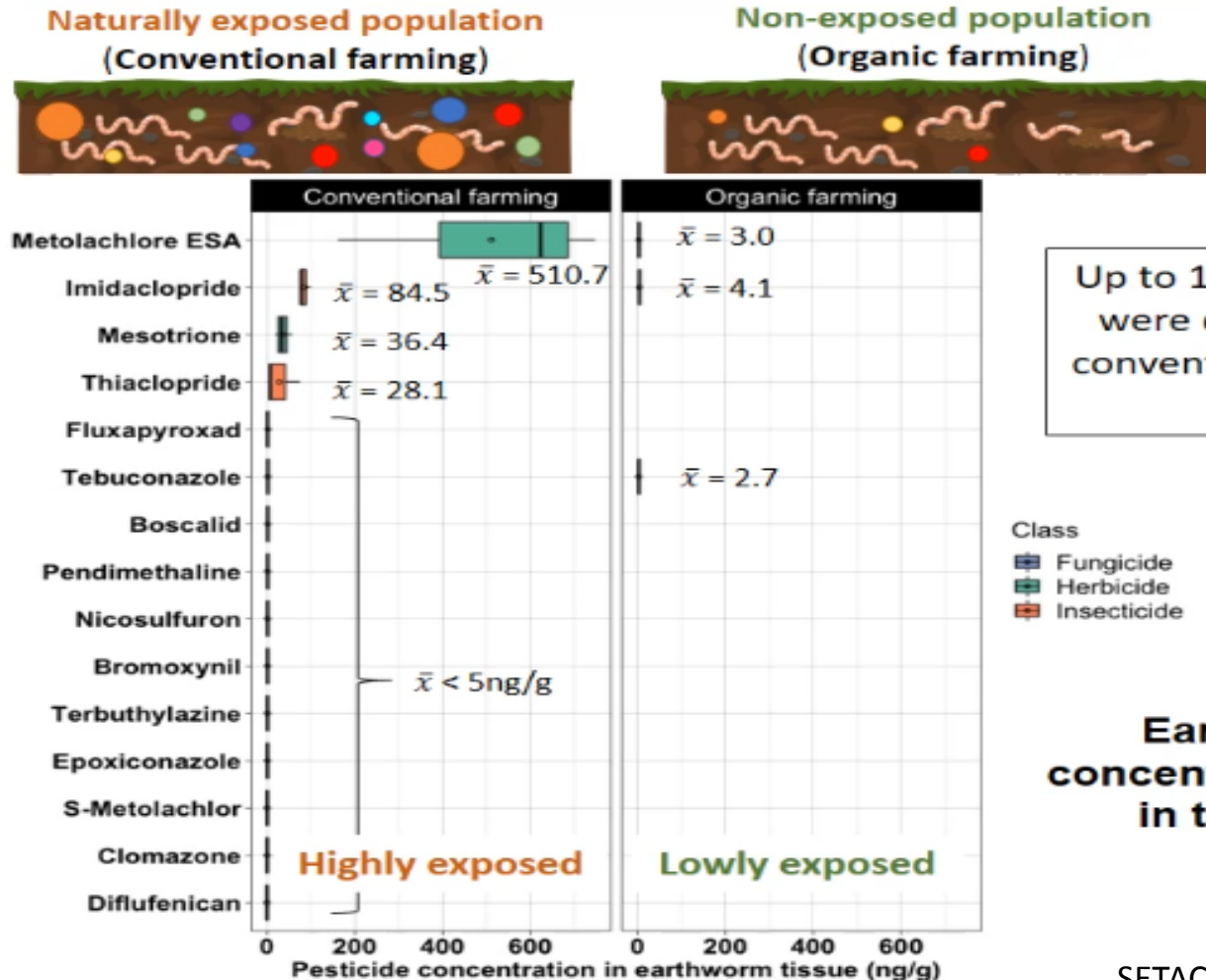
Akumulační bioindikátory

- mechorosty – bryomonitoring
- lišejníky – kumulace těžkých kovů a radionuklidy
- jehličí – smrk, borovice - kumulace těžkých kovů a POPs
- vajíčka ptáků
- žížaly, šneci



Akumulační bioindikátory - příklad

Residual pesticide contamination in naturally exposed and non-exposed earthworms



Up to 11 of the 73 selected pesticides were detected in earthworms from conventional farming against only 3 in organic farming

Earthworms cope with high concentrations of several chemicals in their natural environment

SETAC 2020: 1.04.8 Deciphering the molecular mechanisms of pesticide tolerance of the soil engineer biodiversity

Bioindikace

- na začátku je nutno si dobře **definovat, jaké organismy/parametry budeme sledovat pro posouzení působení stresu:**
 - vztah k působení stresu
 - hodnocené skupiny:
 - producenti – rostlinná společenstva
 - konzumenti – bezobratlí, plazi, ptáci, savci ...
 - destruenti – půdní mikroorganismy
 - klíčové druhy, bioindikátory, nebo více druhů, společenstvo
 - parametry hodnocení
 - strukturní (taxonomické parametry, biomasa, abundance ...)
 - funkční (produkce/respirace, potravní řetězce ...)

Bioindikace

- **vlastní provedení odběrů a analýz bioty:**
 - návrh a rozložení vzorkovacích míst
 - vzorkování – podle typů organismů
 - charakterizace a stanovení definovaných biotických parametrů
 - techniky botanických, zoologických, mikrobiologických a ekologických disciplin
 - charakterizace a stanovení kontaminace bioty
 - techniky analytické chemie a chemie životního prostředí

Půdní kvalita a její bioindikace

Půdní kvalita – definice

**současná a do budoucna
udržitelná schopnost půdy
fungovat jako živý systém
uvnitř ekosystému
zabezpečující jeho důležité
funkce a služby, podporující
biologickou produktivitu,
odolávající erozi, nesnižující či
zlepšující kvalitu ovzduší,
podzemní a povrchové vody a
podporující zdraví rostlin,
zvířat i lidí**



Indikátory půdní kvality

Musí vyhovovat těmto kritériím:

- korelace s procesy v ekosystémech (modelování)
- musí zahrnovat všechny (většinu) vlastnosti půd a tak být použitelné pro odhad vlastností, které se nedají snadno měřit
- musí být snadno měřitelné v terénu
- musí být citlivé na změny technologií a přírodních poměrů (klíma), avšak necitlivé na krátkodobé změny
- soubor indikátorů musí zahrnovat již sledované charakteristiky

Indikátory půdní kvality

- kvalitativní (např. půda je dobře oživená)
- kvantitativní (např. biomasa mikroorganismů je 1450 $\mu\text{g C}_{\text{bio}}/\text{g}$ půdy)
- v terénu / v laboratoři
- složité analýzy pro vědce vs karty pro farmáře



Indicator Table

Indicator	Poor	Medium	Good
<i>Earthworms</i>	0-1 worms in shovelful of top foot of soil. No casts or holes.	2-10 in shovelful. Few casts, holes, or worms.	10+ in top foot of soil. Lots of casts and holes in tilled clods. Birds behind tillage.
<i>Organic Matter Color</i>	Topsoil color similar to subsoil color.	Surface color closer to subsoil color.	Topsoil clearly defined, darker than subsoil.
<i>Organic Matter Roots/Residue</i>	No visible residue or roots	Some residue few roots	Noticeable roots and residue
<i>Subsurface Compaction</i>	Wire breaks or bends when inserting flag.	Have to push hard, need fist to push flag in.	Flag goes in easily with fingers to twice the depth of plow layer.
<i>Soil Tilth Mellowness Friability</i>	Looks dead. Like brick or concrete, cloddy. Either blows apart or hard to pull drill through.	Somewhat cloddy, balls up, rough pulling seedbed.	Soil crumbles well, can slice through, like cutting butter. Spongy when you walk on it.
<i>Erosion</i>	Large gullies over 2 inches deep joined to others, thin or no topsoil, rapid run-off the color of soil.	Few rills or gullies, gullies up to two inches deep. Some swift runoff, colored water.	No gullies or rills, clear or no runoff.
<i>Water Holding Capacity</i>	Plant stress two days after a good rain.	Water runs out after a week or so.	Holds water for a long period of time without puddling.
<i>Drainage, Infiltration</i>	Water lays for a long time, evaporates more than drains, always very wet ground.	Water lays for short period of time, eventually drains.	No ponding, no runoff, water moves through soil steadily. Soil not too wet, not too dry.
<i>Crop Condition (How well it grows)</i>	Problem growing throughout season, poor growth, yellow or purple color.	Fair growth, spots in field different, medium green color.	Normal healthy dark green color, excellent growth all season, across field.
<i>pH</i>	Hard to correct for desired crop.	Easily correctable.	Proper pH for crop.
<i>Nutrient Holding Capacity</i>	Soil tests dropping with more fertilizer applied than crops used.	Little change or slow down trend.	Soil tests trending up in relation to fertilizer applied and crop harvested.

Indikátory půdní kvality

- Příklad souboru vlastností půd využitelných jako indikátory kvality a zdraví půdy a vztah indikátorů k funkcím půdy

skupina indikátorů	indikátor	funkce půdy					lidské zdraví	odolnost proti erozi	komentář vztahu k funkci a stavu půdy	
		kvalita ŽP		podpora produkce a kvality		rostliny				živočichové
		kvalita vody	kvalita ovzduší							
fyzikální	textura	X	X	X				X	transport a zadržení vody a chemikálií	
	hloubka půdy, organominerálního horizontu a prokořenění	X		X				X	odhad produktivity a eroze	
	infiltrace a objemová hmotnost	X		X				X	potenciál pro vyluhování, produktivitu a erozi	
	retenční vodní kapacita	X	X	X	X			X	transport a održitelnost vody	
chemické	organická hmota (C a N)	X		X			X		definuje půdní úrodnost, stabilitu a rozsah eroze	
	pH	X	X	X			X		definuje hranice biologické a chemické aktivity	
	elektrická vodivost	X	X	X	X		X		definuje hranice rostlinné a mikrobiální aktivity	
	extrahovatelný N, P, K	X		X					dostupnost živin pro rostliny, možnost ztráty N	
biologické	mikrobiální biomasa (C a N)	X		X					mikrobiální katalytický potenciál a časné varování při změnách v OM	
	mineralizovatelný dusík	X		X					odhad půdní produktivity a potenciální zásobárna N	
	respirace půdy	X	X	X					odhad mikrobiální aktivity	

Indikátory půdní kvality

- snaha propojit s ekosystémovými službami půdy

Ecosystem service	Important ecological parameters
Supply of nutrients	Food web including earthworms Primary production Ratio of bacteria/fungi (De)nitrification
Water regulation	Earthworms Abundance and ratio bacteria/fungi pH, content of soil organic matter, groundwater level
Soil Structure	Earthworms Abundance and ratio of bacteria/fungi pH, content of soil organic matter Nematode Channel Ratio
Supply of clean shallow groundwater	Specific activity of bacteria and fungi Clean soil (concentration of pollutants lower than a maximum concentration) Extent of leaching of nitrogen, phosphate, and halogenated pollutants (EOX) Activity of the nitrogen cycle
Supply of clean deep groundwater	Amount and biodiversity of bacteria and fungi Clean soil Extent of washout of nitrogen and phosphate
Pest control in agriculture	Plant Parasitic Index of nematodes Amount and ratio of bacteria and fungi Mycorrhiza fungi
Changeability of soil use	Diversity of soil organisms Concentration of nitrogen and phosphate in the soil
Resilience and resistance	Diversity (within functional groups)

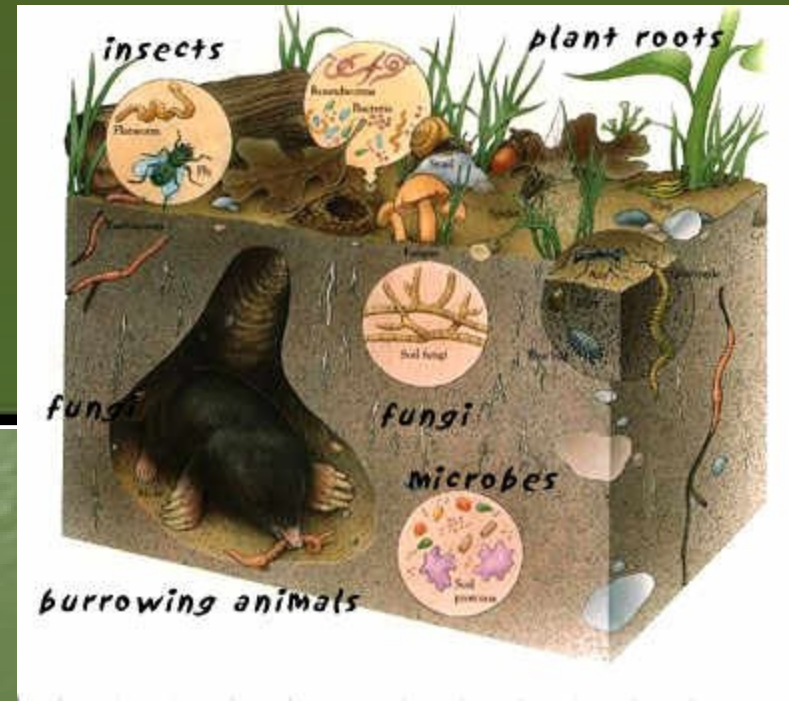
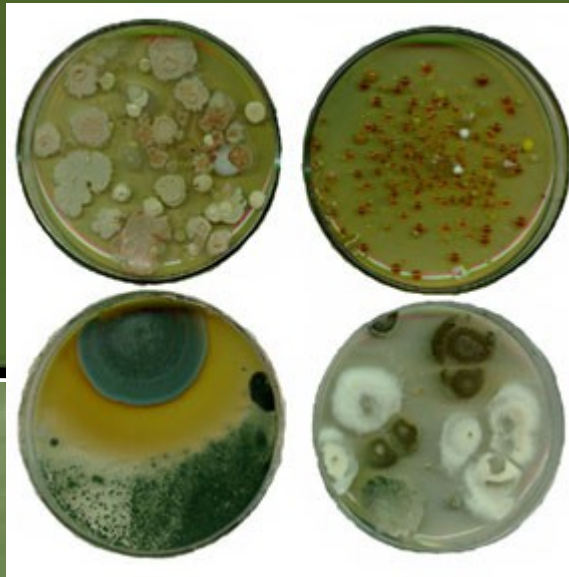
Jensen & Mesman (2006)

Půdní mikroorganismy

Mikrobiální společenstvo půdy

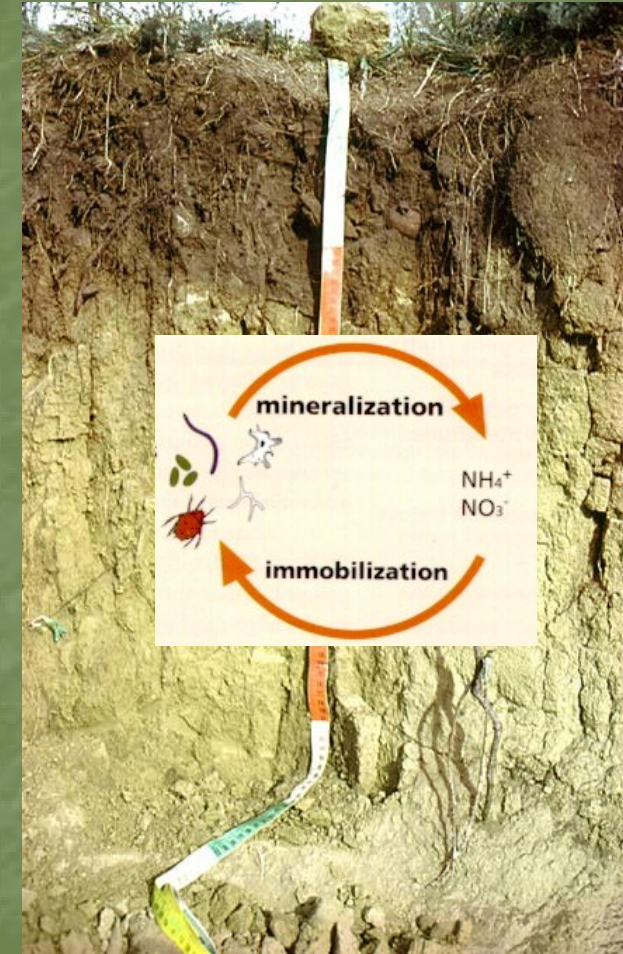
Mikrobiální společenstvo půdy =

- bakterie (řetízky či kolonie)
- aktinomycéty (pseudomycelia)
- houby (hyfy)
- řasy
- prvoci
- kvasinky
- viry



Význam mikroorganismů v půdě

- stěžejní v cyklech živin a energií
- stojí na počátku potravních řetězců
- rozklad organické hmoty (mineralizace)
- syntéza nových sloučenin (immobilizace)
- tvorba humusu
- udržování půdní struktury, stabilita agregátů
- prospěšný vliv na půdní úrodnost a pro růst rostlin
- vliv na vodní a vzdušný režim půdy
- degradace celé řady polutantů



Proč mikroorganismy ?

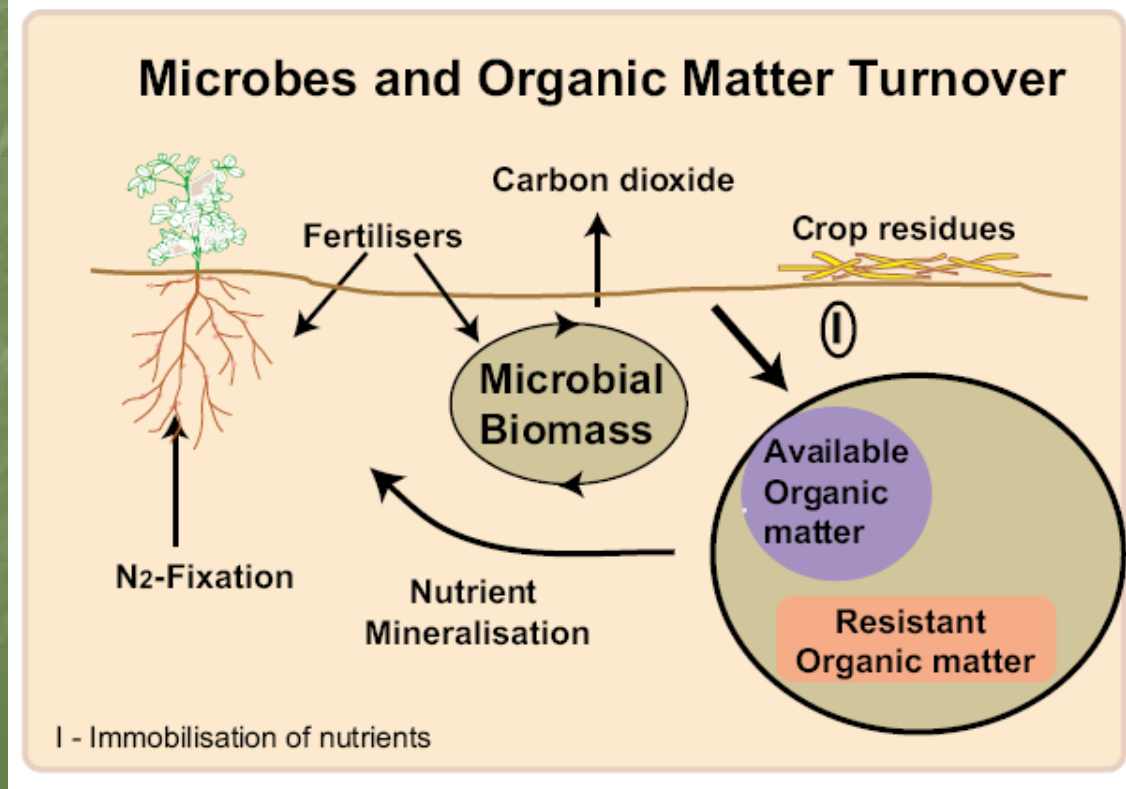
- sledováním stavu půdních mikroorganismů můžeme **nepřímo posuzovat stav celého terestrického ekosystému**
- na stresové faktory můžeme **upozornit velmi brzy**
- vynikající **indikátor biologického potenciálu půd** i v přítomnosti stresových faktorů v půdním prostředí
- dávají odpověď na přítomnost stresujících faktorů v jejich životním prostředí zejména **změnou velikosti společenstva nebo aktivity**
- změny v parametrech mohou časně varovat před hrozícím **snížením produktivity systému** vlivem jakýchkoli stresujících faktorů
- **možnost hodnotit:** efektivitu zemědělské, lesní rekultivace, zemědělského obhospodařování, hnojení, dále vlivů geneticky upravených organismů vpravených do půdy, vlivů eroze, odlesňování, zasolování apod.
- půdní mikrobiální ekotoxikologie může přispět k objektivnímu hodnocení rizik spojených s různými antropogenními zásahy

Kolik je v půdě mikroorganismů ?

- 0,05 - 0,5% hmoty půdy jsou mikroorganismy
- 10^5 až 10^9 jedinců v 1 g suché půdy
- toto množství stačí na zabezpečení veškerých procesů mineralizace a imobilizace a dalších procesů

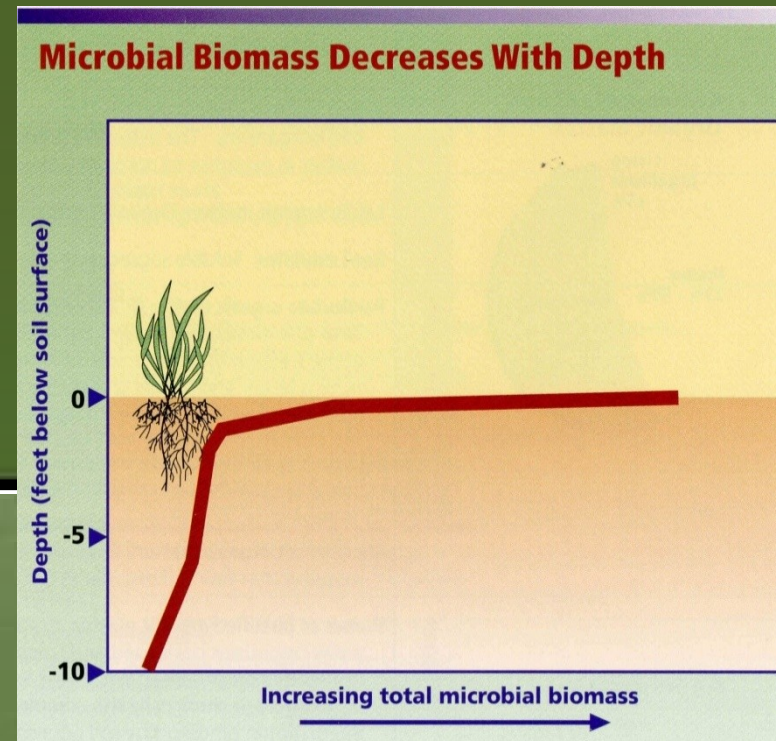


"Živý uhlík" (1-5%)
= Mikrobiální biomasa
(C_{BIO})



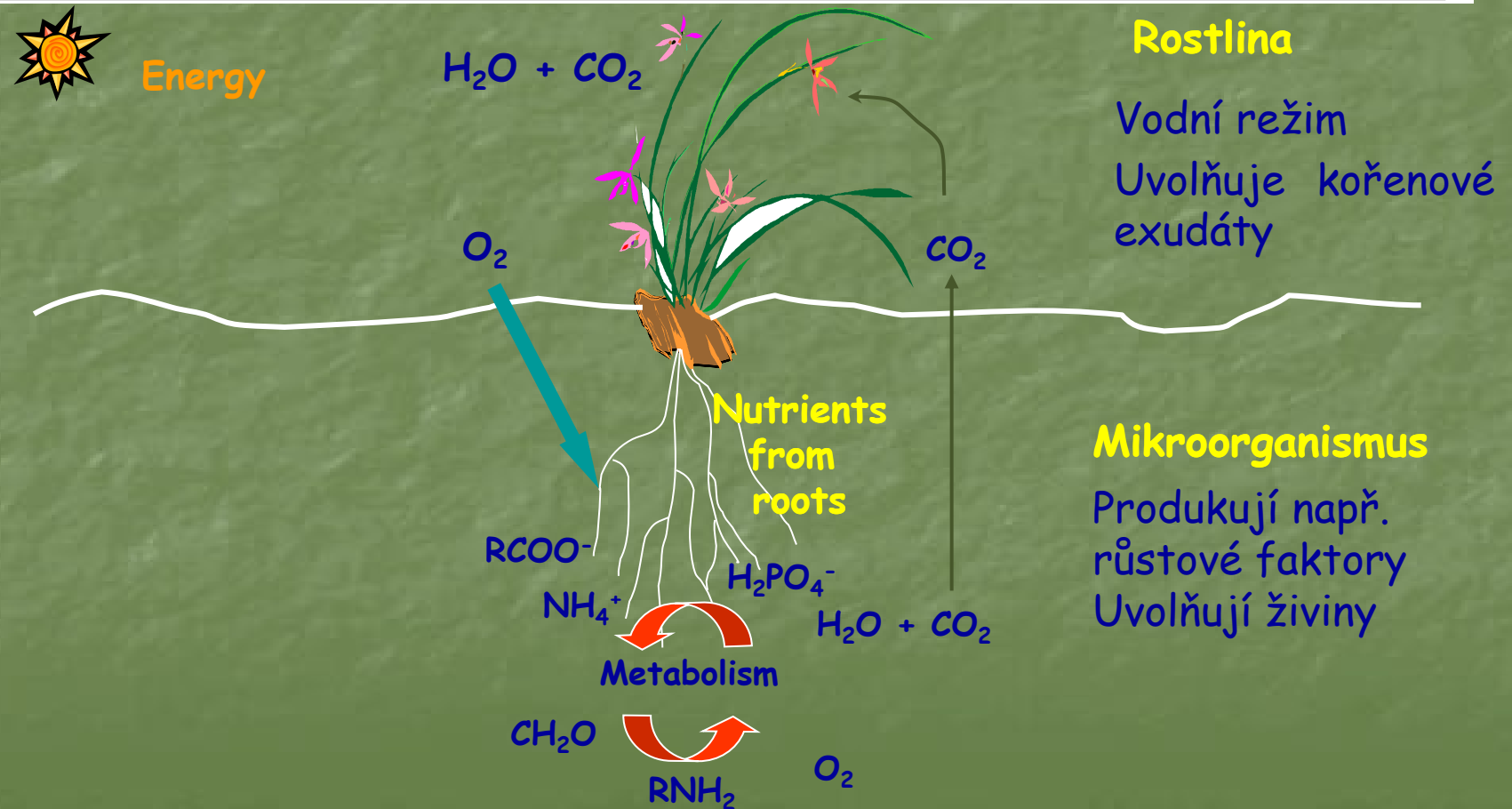
Kde se v půdě MO vyskytují?

- největší biomasa mikroorganismů je v humusovém horizontu, v rizosféře a s hloubkou dochází k poklesu
- fotolitotrofní mikroorganismy jsou samozřejmě vázané pouze na nejvrchnější vrstvičku půdy
- obligátně anaerobní mikroorganismy se nachází spíše ve spodní části horizontů (bez přístupu kyslíku)
- mikroorganismy uzavřené v mikroagregátech jsou dobře chráněné před predací protozoí, ale naopak mohou strádat nedostatkem substrátu



Kde se v půdě MO vyskytují?

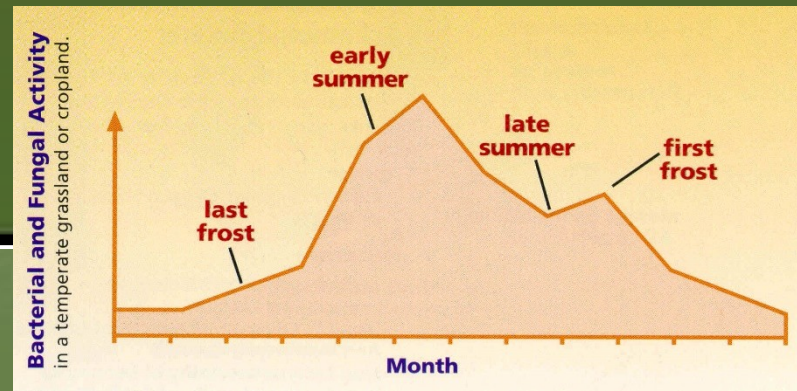
- **Rhizosféra**
- Ekologická vazba mikroorganismů na kořeny rostlin
- V okolí kořenů je jiné prostředí než jinde v půdě



Půdní MO jsou ve velmi silné interakci s vlastnostmi půdy

- nutriční vlastnosti půdy (zdroj živin pro mikroorganismy)
- fyzikálně-chemické vlastnosti: teplota, pH, vlhkost, redoxní potenciál, obsah jílu, složení půdního vzduchu, půdního roztoku, kontaminanty atd.
- struktura půdy, sorpční komplex, půdní typ, půdní druh, využití půdy atd.
- půdní roztok
- půdní vzduch (N: 78-80%; O₂: 0,1-20%; CO₂: 0,1-15%)
- sorpce/desorpce; půdní komplex; biodostupnost substrátů a kontaminantů
- mikroorganismy samy sorbují (G+ více než G-); jíl zvyšuje sorpci
- na povrchích částic se sorbují substráty i extracelulární enzymy (urychlení reakcí a zvýšení stability extracelulárních enzymů)
- vlastnosti působí buď přímo, či nepřímo

■ sezonalita



Bioindikace pomocí mikroorganismů

- zachycují skutečnou reakci organismů v přírodních podmínkách
- kontaminaci půd nelze plánovat a tedy **spočívají v popisu dané konkrétní situace**, která je obtížně srovnatelná s jinými případy z důvodu rozdílných koncentrací a typů polutantů, doby kontaminace nebo i půdního typu
- měly by být spíše **dlouhodobými** výzkumy (minimálně jeden rok) vzhledem k výraznému **sezónnímu charakteru** aktivity půdních mikroorganismů
- kontaminace z reálného zdroje zahrnuje zpravidla více druhů polutantů - **environmentální směsi**
- biologická data doplnit chemickým rozborem a rozborem půdních vlastností
- problém s nalezením odpovídající **kontrolní lokality**, se kterou by bylo možné srovnávat zjištěné změny v parametrech mikrobiálního společenstva
- je nutno očekávat značné ovlivnění výsledků **parametry prostředí** a dále i **sezónním chováním** mikrobiologických parametrů (**velká časová i prostorová variabilita**)

Metodická východiska ekotoxikologie půdních MO

Výzkumy vedoucí k odhadu druhů, množství a metabolických aktivit biomasy, biodiverzity, stability, funkceschopnosti atd. v půdě zahrnují:

- metody determinace uspořádání a výskytu mikroorganismů v půdě
- izolace a charakterizace podskupin a druhů
- odhadu množství a typů organismů v půdě
- měření biomasy (kvantita a stabilita)
- detekce a měření metabolických procesů (obecných i specifických)
- měření aktivity mikroorganismů (růst, ATP apod.)
- měření diverzity mikrobiálních společenstev
- sledování interakcí (mykorhiza, rhizosféra)

Množství i standardizovaný metod

Standardy půdních mikrobiálních metod - ISO



ISO 14238:2012	Soil quality — Biological methods — Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
ISO 15685:2012	Soil quality — Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification — Rapid test by ammonium oxidation
ISO 18187:2016	Soil quality — Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of <i>Arthrobacter globiformis</i>
ISO 17155:2012	Soil quality — Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
ISO/TS 10832:2009	Soil quality — Effects of pollutants on mycorrhizal fungi — Spore germination test
ISO/CD 23265	Soil quality — Test for estimating organic matter decomposition in contaminated soil
ISO 16072:2002	Soil quality — Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
ISO 14240-1:1997	Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method
ISO 14240-2:1997	Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method
ISO 23753-1:2019	Soil quality — Determination of dehydrogenases activity in soils — Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)
ISO 23753-2:2019	Soil quality — Determination of dehydrogenases activity in soils — Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)
ISO/TS 29843-1:2010	Soil quality — Determination of soil microbial diversity — Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis
ISO/TS 29843-2:2011	Soil quality — Determination of soil microbial diversity — Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the simple PLFA extraction method
ISO 11063:2020	Soil quality — Direct extraction of soil DNA
ISO 17601:2016	Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil
ISO 20130:2018	Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates
ISO/TS 20131-1:2018	Soil quality — Easy laboratory assessments of soil denitrification, a process source of N ₂ O emissions — Part 1: Soil denitrifying enzymes activities
ISO/TS 20131-2:2018	Soil quality — Easy laboratory assessments of soil denitrification, a process source of N ₂ O emissions — Part 2: Assessment of the capacity of soils to reduce N ₂ O
ISO 11266:1994	Soil quality — Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under aerobic conditions
ISO 15473:2002	Soil quality — Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under anaerobic conditions
ISO 14239:2017	Soil quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions

biomass

enzyme
activity

diversity
• structural
• genetic
• functional

denitrification

Odběry půdních mikroorganismů

Odběry jako první krok ekotoxikologie MO

- díky vlastnostem mikroorganismů je téměř nemožné je sledovat přímo v terénu (*in situ*) - jen výjimky (složitá interpretace)
- je tedy potřeba reprezentativní vzorek, se kterým je nakládáno jako se živým systémem, aby se biologické společenstvo příliš neovlivnilo (např. vysušení vzorků, zmrazení, v ledničce ...)
- i tak je vždy laboratorní vzorek něco jiného než „reálný svět“
- je tedy nutná určitá standardizace hlavních podmínek

Techniky odběrů

- zejména kvantifikace může být odběrem a nakládáním se vzorky silně zkreslena
- také kvalitativní parametry (aktivita, diverzita) jsou ovlivnitelné odběrem, zpracováním a manipulací se vzorky
- **Hlavním cílem je:**
 - 1) získat reprezentativní vzorek
 - 2) minimálně či standardně (víme jak, o kolik) odběrem a manipulací změnit kvantitu
- Existuje mnoho metod a teorie kolem vzorkování pro půdu:

ISO 10381-6:2009 - Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory

TABLE 7.1
Comparison of microbial sampling approaches in major natural environments

Environment	Access	Numbers	Sampling devices	Sample processing
Air	Direct	Low	Filters, Andersen samplers	Concentration on filters
Water	Direct or remote	High or low	Nets, containers, filters	Dilution or concentration
Sediment	Remote	High	Grabs, corers	Serial dilution
Soil	Direct	High	Shovels, corers	Serial dilution

Techniky odběrů

- většinou vysoké obsahy mikroorganismů => **stačí aseptické techniky** (rýče, vzorkovací tyče - odeberou směsný vzorek, či celé jádro)
- **další techniky:** zakopaná sklíčka, pedoskop apod.

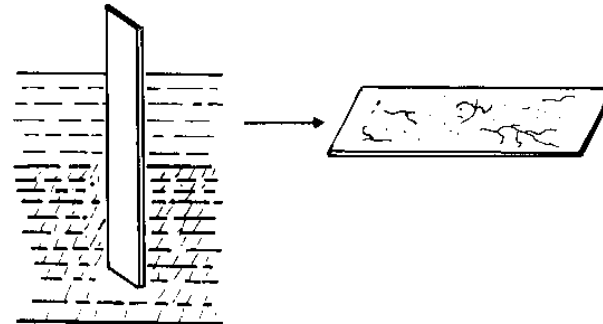
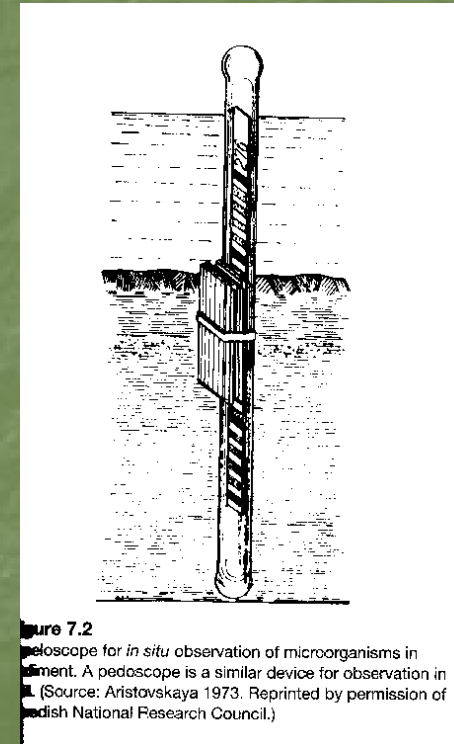


Figure 7.1
Schematic representation of buried slide technique for collection and enumeration of microorganisms.



Kvantifikace půdních mikroorganismů

Přímé mikroskopické počítání bakterií (direct bacterial counts)

- jde vlastně o první ze dvou "počítacích" technik (druhá je tzv. viable / indirect counts, neboli počítání po předchozí izolaci a kultivaci)
- většinou vyšší počty než při viable counts (pouze 10% je kultivovatelných); rozdíl lze zjistit tzv. direct viability counts (DVC) - inkubace s nalidixovou kyselinou - Krogurovou metodou (viz. dále)
- u půdy je potřeba nejdříve dispergace a separace od půdních částic (ty jsou při těchto technikách vážný problém)
- pro zlepšení pozorování se užívá řada barviv (FDA, AO, DAPI, FITC atd.)
- z přímých počtů lze i odvodit biomasu (musíme ale znát např. průměrnou velikost buněk bakterií či délku hyf hub)

TABLE 9.2 Equations for Calculating Biomass

Calculation of bacterial numbers in soil:

$$N_g = N_f \frac{A}{A_m} \frac{V_{sm}}{V_{sa}} D \frac{W_w}{W_d}$$

N_g = number of bacteria per gram dry soil

N_f = bacteria per field

A = area (mm²) of smear (or filter)

A_m = area (mm²) of microscope field

V_{sm} = volume (ml) of smear of filter

V_{sa} = volume (ml) of sample

D = dilution

W_w = wet weight soil

W_d = dry weight soil

Bacterial biomass as carbon:

$$C_b = N_g V_b e S_c \frac{\%C}{100} \times 10^{-6}$$

C_b = bacterial biomass carbon ($\mu\text{g/g-soil}$)

N_g = number of bacteria per gram soil

V_b = average volume (μm^3) of bacteria (r^2L ; r = bacterial radius, L = length)

e = density (1.1×10^{-3} in liquid culture)

S_c = solids content (0.2 in liquid culture, 0.3 in soil)

$\%C$ = carbon content (45% dry weight)

Calculation of fungal biomass carbon:

$$C_r = \pi r^2 L S_c \%C \times 10^{10}$$

C_r = fungal carbon ($\mu\text{g carbon/g-soil}$)

r = hyphal radius (often 1.13 μm)

L = hyphal length (cm/g-soil)

e = density (1.1 in liquid culture, 1.3 in soil)

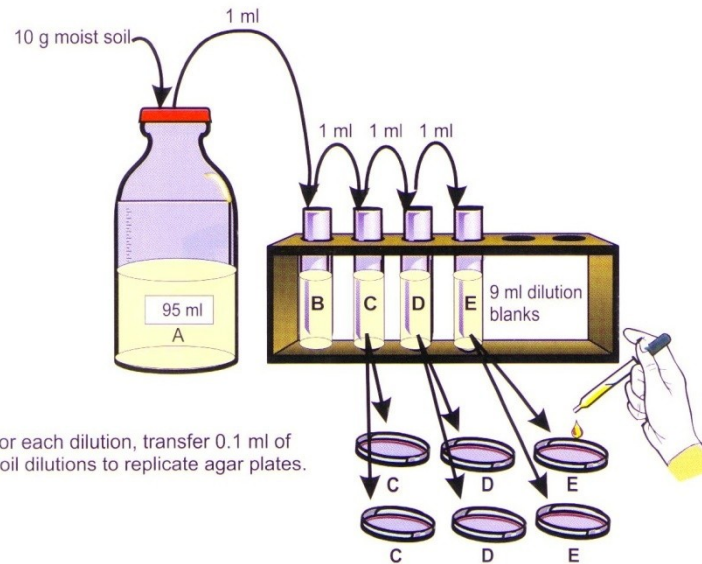
S_c = solids content (0.2 in liquid culture, 0.25–0.35 in soil)

Izolace a kultivace MO z půdy

- potřeba pro různé účely, např. identifikace specifických mikroorganismů, měření diverzity atd.
- počítání mikroorganismů - tzv. viable / indirect counts - použití metod MPN (most probable number) a počítání CFU (colony forming units)
- u půdy vhodná extrakce (např. použití surfaktantu Tween 80 s disperzním činidlem pyrofosfát sodný) následuje násobné ředění (vodou, fyziologickým roztokem či pufrem ...)
- následují obecné kultivační techniky - metoda agarových ploten: **poured a spread plate counts**; Výstupem jsou CFU / hmotnost či objem vzorku

Izolace a kultivace MO z půdy

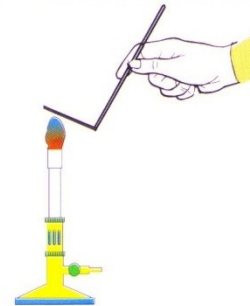
Step 1. Make a 10-fold dilution series.



Step 2. For each dilution, transfer 0.1 ml of soil dilutions to replicate agar plates.

Schéma spread plate counts

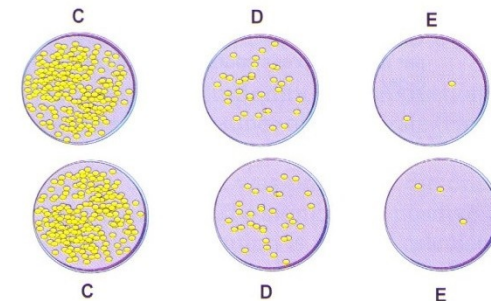
Step 3a. A glass spreading rod is flame sterilized.



Step 3b. Sample is spread on the surface of the agar. This is done by moving the spreader in an arc on the surface of the agar while rotating the plate.

Step 4. Incubate plates under specified conditions.

Step 5. Count dilutions yielding 30-300 colonies per plate. Express counts as CFUs per g dry soil.



From: Maier et al. (2000):
Environmental Microbiology,
Academic Press

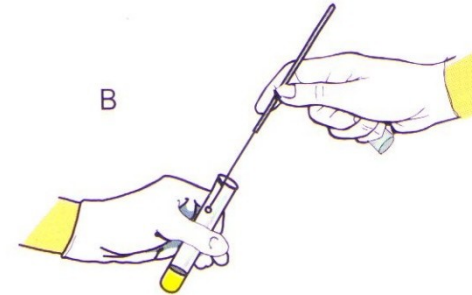
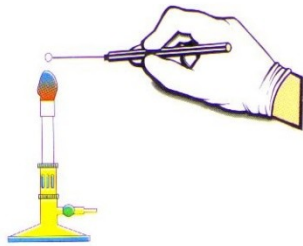
FIGURE 10.1 Dilution and spread plating technique. Here, soil that initially contains billions of microbes is diluted prior to being spread plated to enable discrete colonies to be seen on each plate. Numbers of colonies on each plate can be related to the original soil microbial population. (Adapted from Pepper *et al.*, 1995).

Izolace a kultivace MO z půdy

Izolace jednotlivých druhů půdních MO

- využití při potřebě izolovat jednotlivé mikroorganismy, například při analýze biodiverzity či při identifikacích např. systémem BIOLOG apod.

Step 1 Sterilize inoculating loop

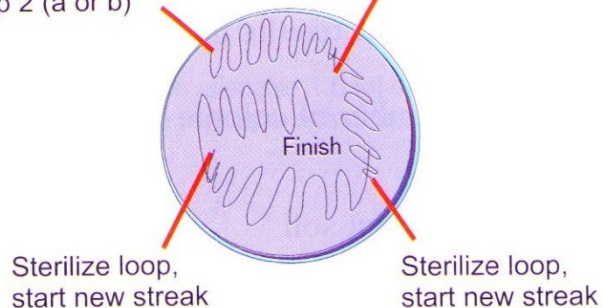


Step 2 Obtain culture from an agar plate (A) or from broth (B).

Step 3 Make successive streaks on an agar plate to isolate single colonies

Start here with inoculation loop full of culture from step 2 (a or b)

Sterilize loop, start new streak



Step 4 Incubate agar plate producing isolated colonies

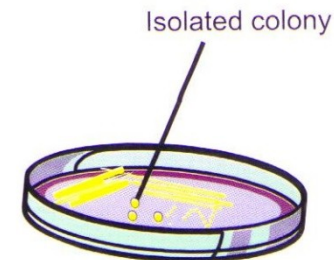


FIGURE 10.3 Isolation of a bacterial colony using the streak plate technique.

From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

Izolace a kultivace MO z půdy

Dominantní kultivovatelné půdní bakterie

organismus	charakteristika	funkce
Arthrobacter	heterotrofní, aerobní, gramvariabilní. Až 40% kultivovatelných půdních bakterií.	Cykly živin a biodegradace.
Streptomyces	Grampozitivní, heterotrofní, aerobní aktinomyceta. 5-20% kultivovatelných bakterií.	Cykly živin a biodegradace. Produkce antibiotik, např. Streptomyces scabies.
Pseudomonas	Gramnegativní heterotrof. Aerobní nebo fakultativně anaerobní. Vlastní velké množství enzymatických systémů. 10-20% kultivovatelných bakterií.	Cykly živin a biodegradace, včetně těžko rozložitelných organických látek.
Bacillus	Grampozitivní aerobní heterotrof. Vytváří endospory. 2-10% kultivovatelných půdních bakterií.	Cykly živin a biodegradace.

Měření biomasy

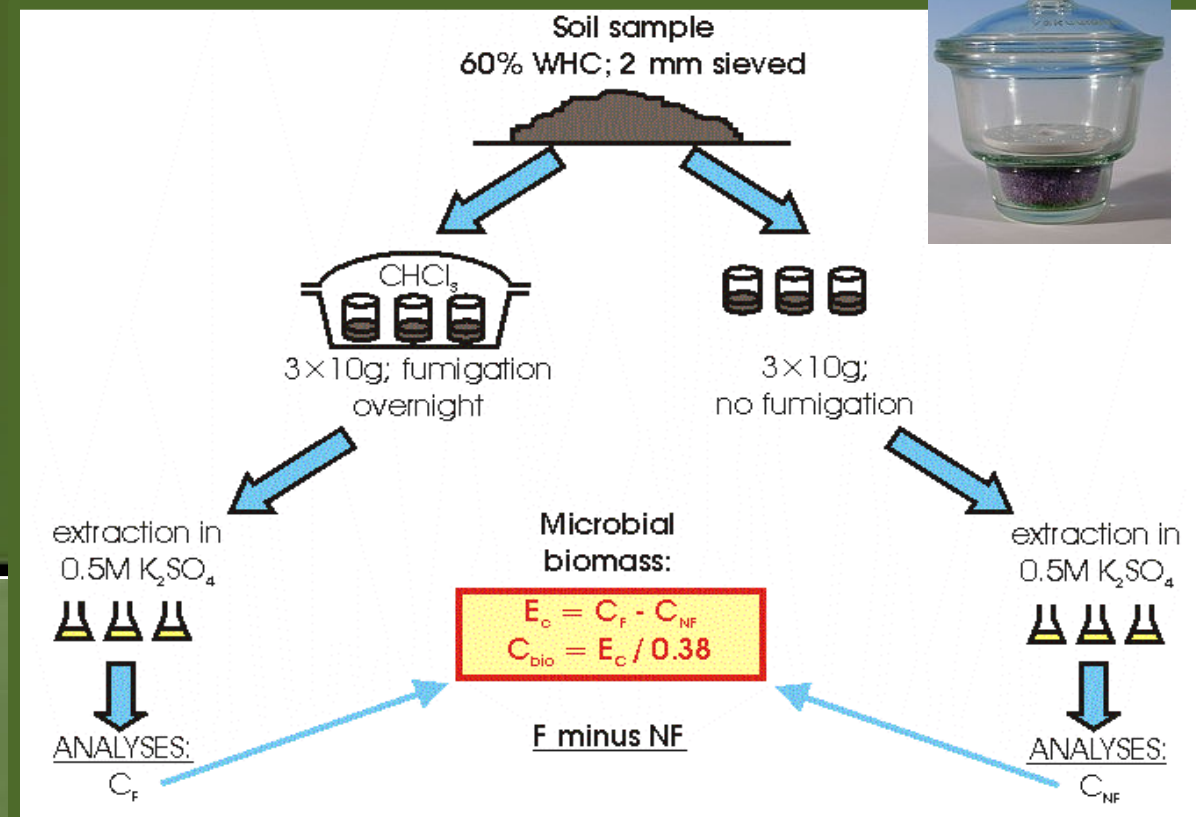
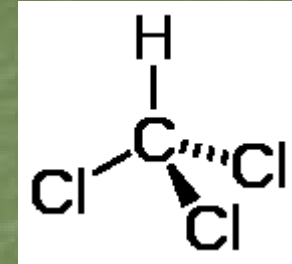
- **BIOMASA** = definována (zejména pro půdu) jako žijící část organické hmoty, jako organismy menší než $10 \mu\text{m}^3$
- nejčastěji se vyjadřuje v jednotkách hmotnosti např. $\mu\text{g } C_{\text{bio}}/\text{g}_{\text{suš.}}$
- tyto parametry mají zastřešující povahu - "**overall / general parameters**" - tzn. stanovujeme mikrobiální biomasu a nevíme co se děje uvnitř ("**black box of microbial biomass**")
- nevychází ze separace či izolace mikroorganismů, stanovují se přímo ve vzorcích půdy
- u půdy je C_{bio} cca 1 - 5% C_{org}

Dva hlavní typy využití parametrů:

- 1) stanovení *in situ* mikrobiální biomasy - posouzení biologické kvality půd - bioindikace půdní kvality
- 2) stanovení v kontrolovaném laboratorním pokuse - změny pod vlivem kontrolovaného faktoru (testy toxicity)

Mikrobiální biomasa v půdě

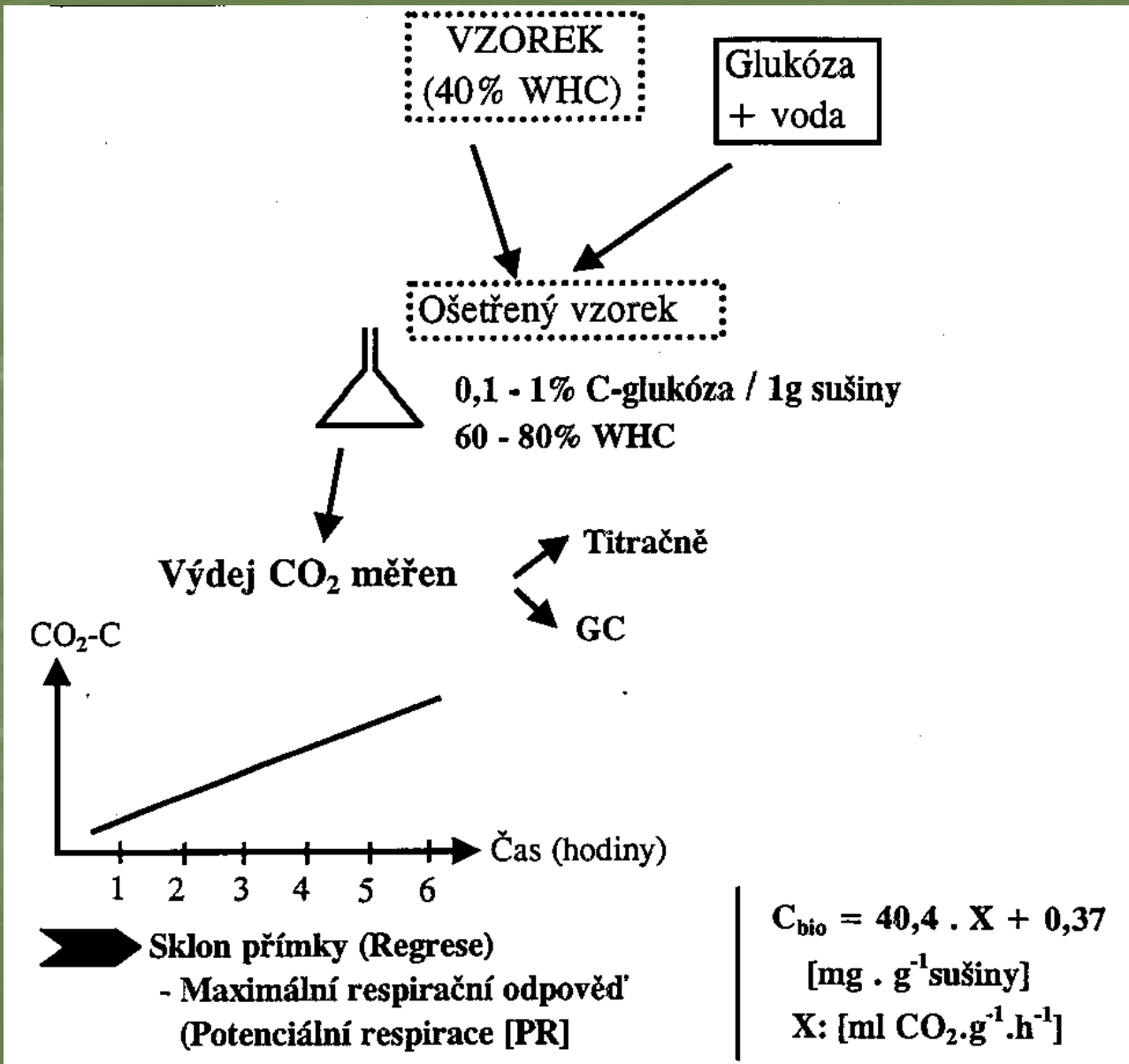
- **Chloroform-fumigační extrakční metoda (FE metoda, CFEM)**
- ISO 14240-2 (1997): Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method
- opět probíhá fumigace, ale vzniká extrakt z obou variant (F a NF), který je analyzován na obsah uhlíku; výhodou je, že extrakt může být analyzován prakticky na cokoliv
- pokud je analyzován uhlík, lze to provést:
 - dichromanovou oxidací a následnou titrací či spektrofotometricky
 - oxidací působení $K_2S_2O_8$ (persulfátu) a UV - vznikne CO_2 a ten je měřen IRGA
- výsledek je udáván v $\mu g \cdot g_{suš.}^{-1}$



Mikrobiální biomasa v půdě

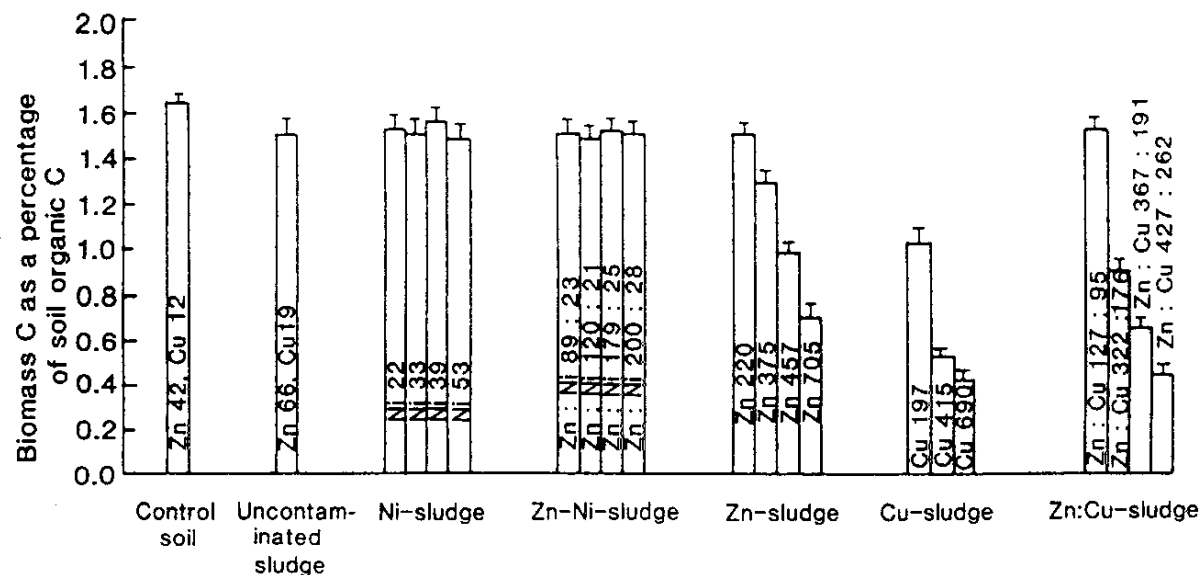
- **Metoda substrátem indukované respirace (SIR)**
- ISO 14240-1 (1997): Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- založena na empirickém vztahu mezi mikrobiální biomasou a potenciální respirací (respirační rychlost během prvních hodin po přidání maximálně využitelného substrátu - glukózy - v saturující koncentraci)
- někdy využívána jako údaj o aktivní složce mikrobiální biomasy
- rozsah empirického koeficientu ve validačních studiích: 15 - 54!!
- => lépe používat pouze pro měření potenciální respirace – PR (značí se nejčastěji jako SIR)

Mikrobiální biomasa v půdě



- Effects of Zn, Cu, and Ni in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam soil.
- Zejména $C_{\text{bio}}/C_{\text{org}}$ v půdě je citlivý indikátor dlouhodobých degradací půdní organické hmoty, neboť C_{bio} se snižuje daleko rychleji než celkový organický uhlík
- Toxicita pro C_{bio} v pořadí $\text{Cu} > \text{Zn} \gg \text{Ni} > \text{Cd}$

Fig. 4 Microbial biomass C expressed as a percentage of total soil organic C in Gleadthorpe soils (SEM shown). Values given in boxes are the total soil metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ soil). From Chander and Brookes (1993). Reproduced by permission of the publisher



Aktivity půdních mikroorganismů

Aktivity mikroorganismů

Mají velmi úzký vztah k jejich funkcím v ekosystému

- jsou smysluplným a zcela nezbytným doplněním údajů o kvantitě mikroorganismů = nestačí jen vysoké množství mikroorganismů, ale hlavně aby byly funkční, tedy aktivní
- co se týká aktivity, je důležitá nejen její úroveň, ale i mnohostranost, diverzita metabolických funkcí
- bohužel, téměř vždy (s výjimkou *in situ* technik) dochází ke zkreslení při přenosu z reálného ekosystému

Příklady často využívaných / měřených mikrobiálních aktivit:

- měření respirace; měření mineralizace dusíku; měření fixace dusíku; měření ATP; produkce tepla; měření nitrifikace, sulfurikace, oxidace železa apod.; měření denitrifikace, desulfurikace; měření enzymových aktivit; atd. atd.

Bazální respirace

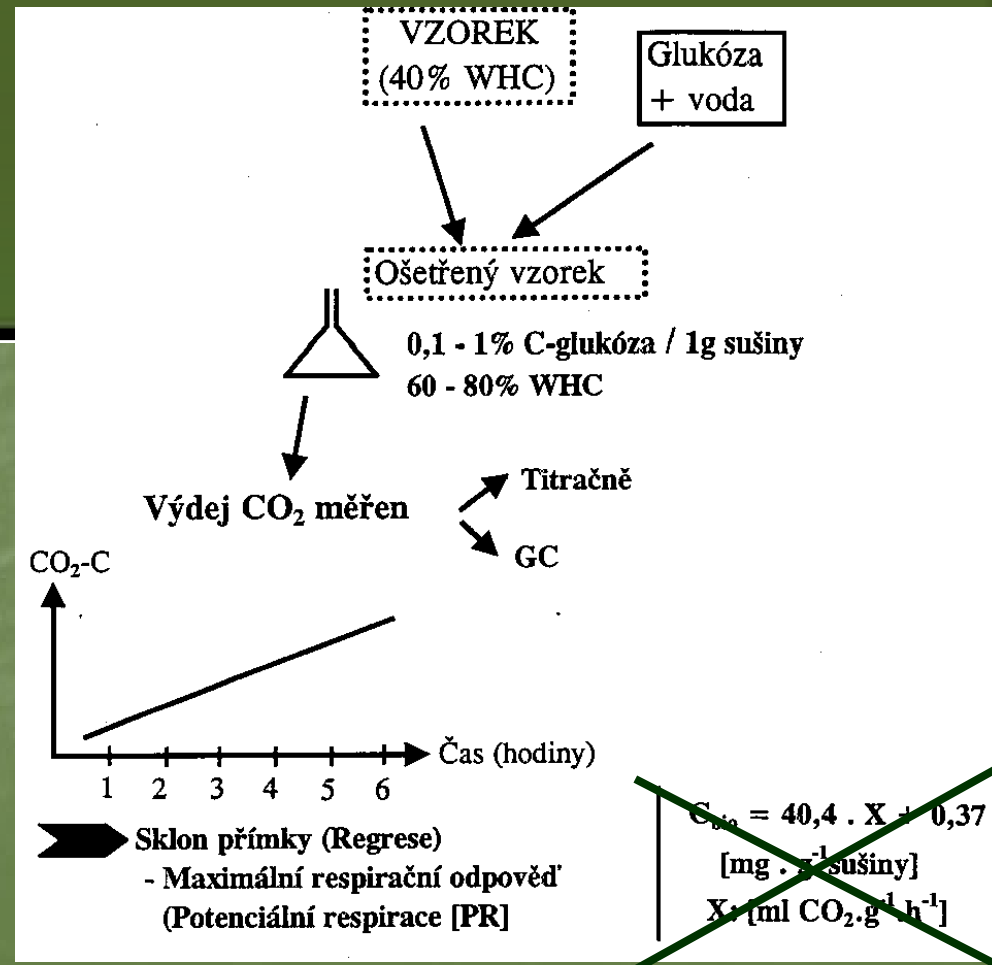
- jako bazální mineralizace (= bez přídavku substrátu) koreluje s obsahem organické hmoty (C_{org})
- ISO 16072 (2002): Soil quality - Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
- Důležitý parametr pro biologickou kvalitu půdy – BR (basal respiration)

Limity a nevýhody:

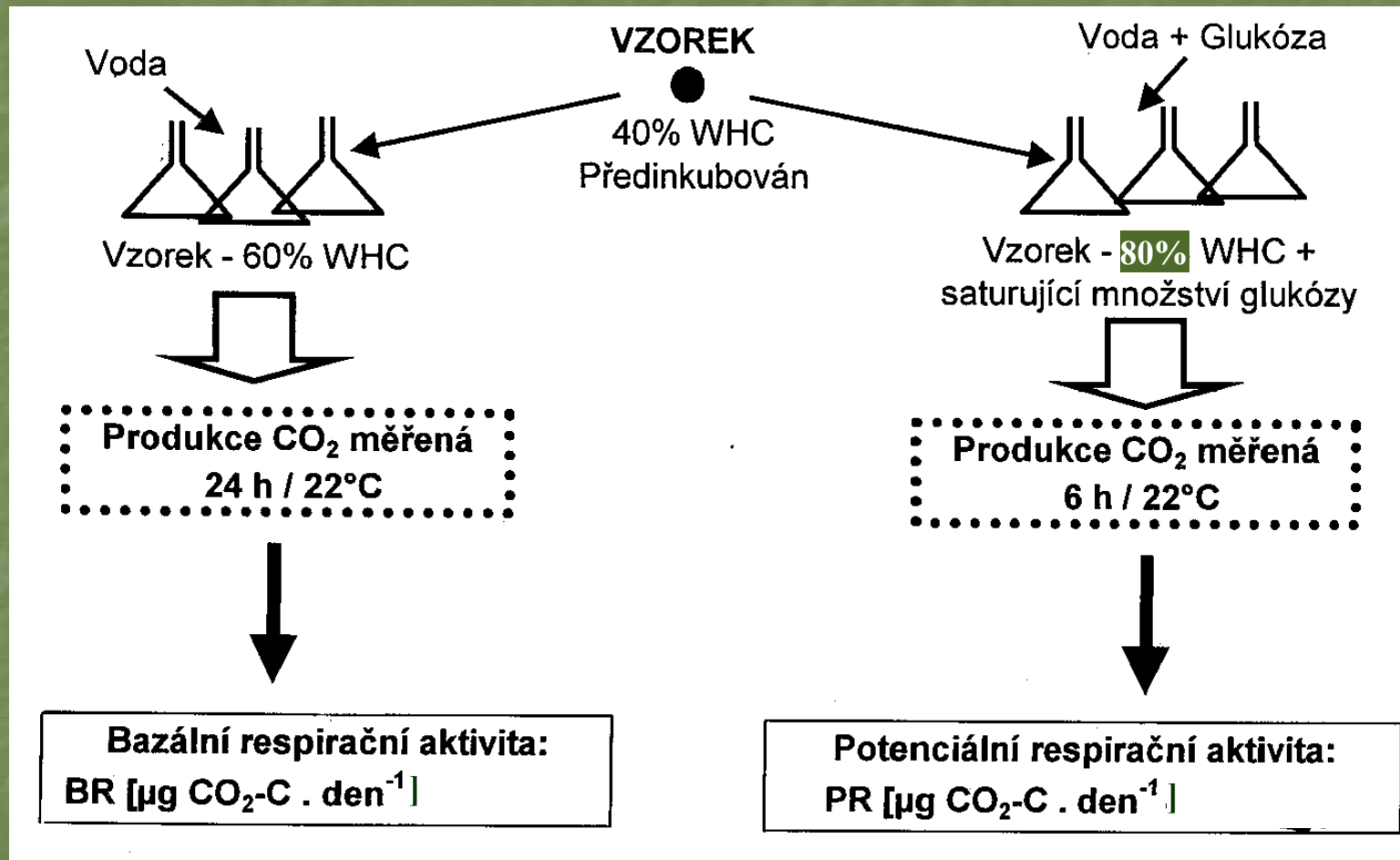
- aktuální přídavek substrátu ovlivňuje podíl aktivních mikroorganismů
- relativní necitlivost k malým dávkám kontaminantů
- nutno kombinovat s jinými parametry (např. mikrobiální biomasa) či potenciální respirace (po přídavku substrátu)
- nutno interpretovat s ohledem na obsah a dostupných organických látek v půdě
- u terénních měření nutno stanovovat opakovaně v čase – silná sezónní závislost

Potenciální respirace

- po přidavku lehce využitelného substrátu není již respirace limitována substrátem a dostáváme obraz potenciální respirace - PR - která odráží skutečné energetické potřeby a mineralizační aktivitu mikrobiálního společenstva
- měření např. jako produkce CO₂ v metodě SIR

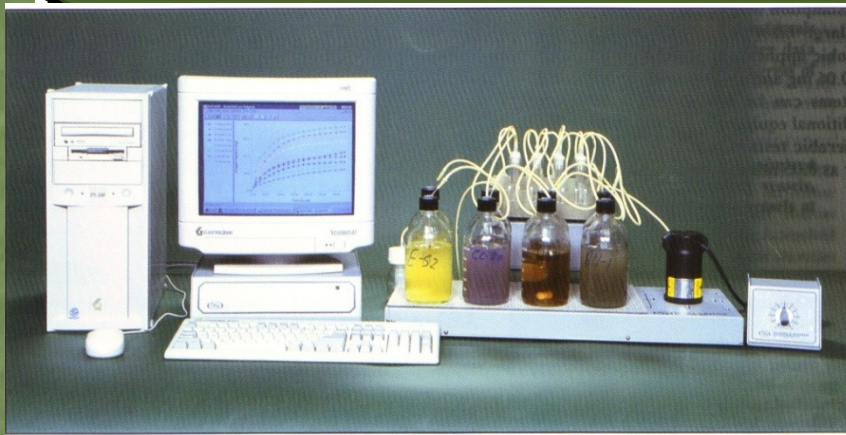


Potenciální vs. bazální respirace

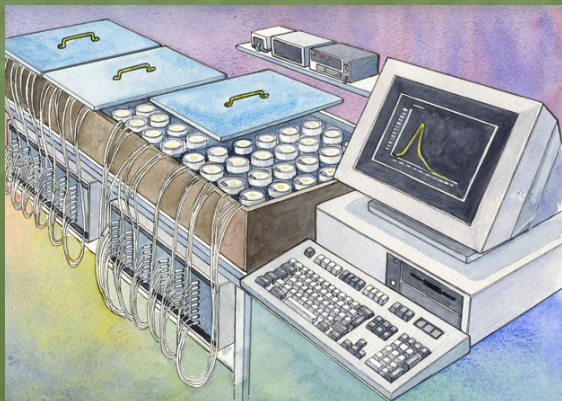


Mineralizace / respirace / využití C substrátů

- **Respirometrie** - systémy kontinuálně měřící respiraci, přesněji spotřebu kyslíku či produkci oxidu uhličitého
- Různé metody detekce, různý design přístrojů
- Využití pro aerobní i anaerobní aplikace, pro studium biodegradací, kinetiku růstu sledovanou pomocí produkce produktu atd.



OxiTOP – měření respirace pomocí změny tlaku



Example of application using OxiTOP – measuring results

Růstové křivky měřené pomocí produkce CO₂

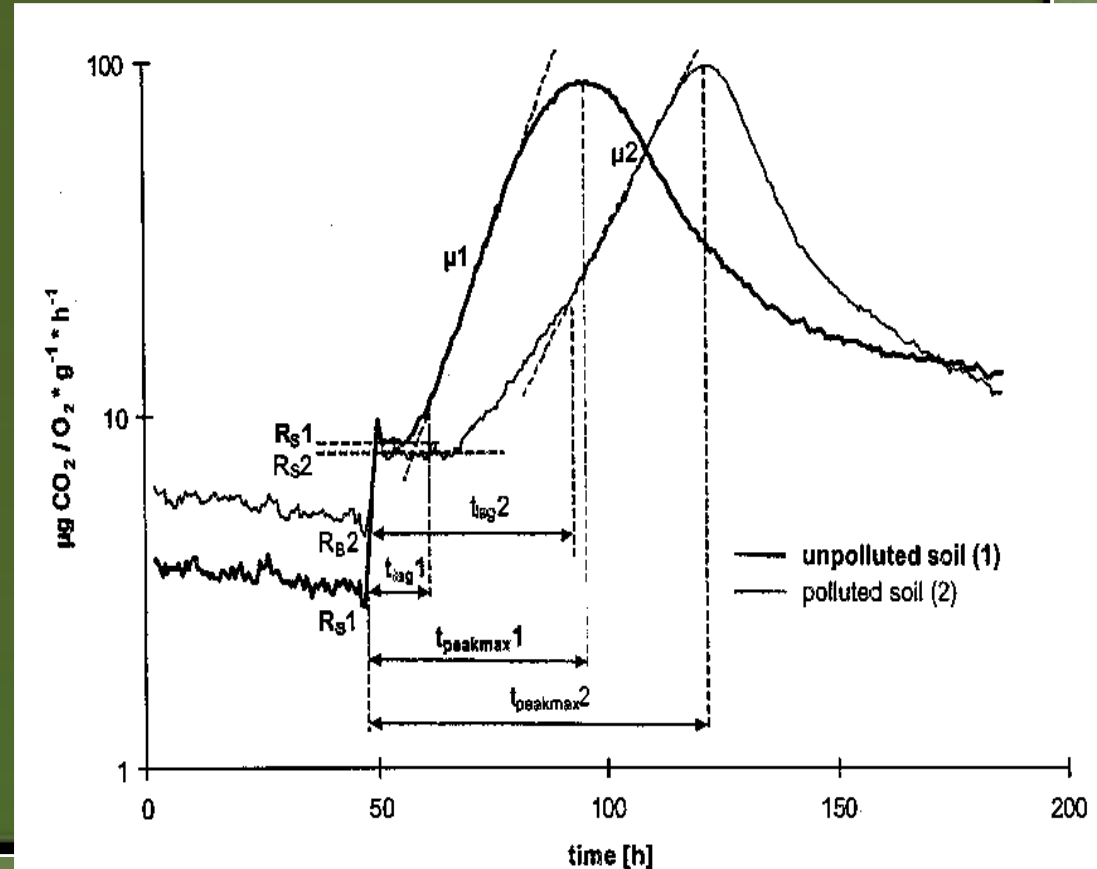
- ISO 17155 (2002): Soil quality - Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
- metoda stanovení "kontaminace" půdy (tzv. ecotoxic potential) a efektu kontaminace v laboratorních studiích

Důležité parametry:

- lag time - čas od přidavku substrátu do počátku exponenciálního růstu – reflektuje vitalitu "growers,,
- růstová rychlost μ
- aktivační koeficient respirace:
 $Q_R = R_B/R_S$
- čas k dosažení píku

Znečištěná půda:

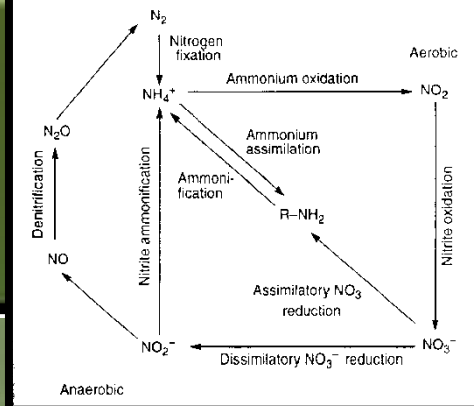
- $Q_R > 0,3$
- lag > 20h
- $t_{\text{peakmax}} > 50\text{h}$



Aktivity spojené s přeměnami dusíku

Mikroorganismy jsou naprosto stěžejní:

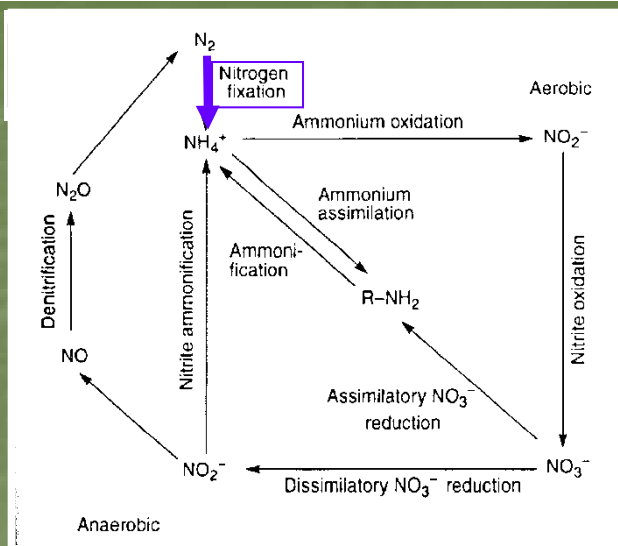
- 1) kromě sinic a symbiotických bakterií nedovedou organismy poutat N_2
- 2) zpětné uvolňování dusíku do atmosféry
- 3) transformace forem dusíkatých sloučenin



AKTÉRIE A PROCESY ZÚČASTNĚNÉ NA KOLOBĚHU DUSÍKU.

Fixace dusíku		Oxidace sloučenin dusíku (tvorba dusitanů a dusičnanů)		Redukce dusičnanů (tvorba amoniaku a denitrifikace)
Nesymbiotické bakterie (volně žijící bakterie)		<i>Nitrobacteraceae</i>		Baktérie způsobující amonifikaci a denitrifikaci, využívající NO_2^- a NO_3^- jako akceptory vodíku
Symbiotické bakterie (žijící symbioticky s vřkovitými rostlinami)		Jiné bakterie oxidující NO_2^- na NO_3^-		
<i>Azotobacteraceae</i>	Jiné bakterie	Oxidace		
		NH_3 na NO_2^-	NO_2^- na NO_3^-	
<i>Azotobacter</i> <i>Azomonas</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Nocardia</i> <i>Clostridium</i> <i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrospina</i> <i>Nitrococcus</i>
			<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> Některé druhy rodu <i>Bacillus</i> aj.

Fixace dusíku



- N_2 je fixován do NH_3 : $N_2 + 6e^- \rightarrow 2NH_3 (+630 \text{ kJ/mol})$

- sinice (hlavně ve vodách - *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Anabaena*); symbiotické bakterie (*Rhizobacteriaceae* - luštěniny); kolem 100 druhů volně žijících bakterií aerobních i anaerobních (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Clostridium*)

- systémy se liší v množství poutaného dusíku; nejvíce fixují symbiotické asociace, neboť v okolí kořenů je přísun živin

- jde o proces spotřebovávající energii; probíhá jen v dobrých podmínkách; **je tedy citlivý endpoint ke stresu**

- **inhibující vliv** má obecně amoniak a pro volně žijící fixátory vysoké koncentrace kyslíku; některé ale mají systém chránící nitrogenázu před působením kyslíku

Organism groups ^a	kg N fixed ha ⁻¹ year ⁻¹
Free-living heterotrophic bacteria	1 – 2
Cyanobacteria	5 – 30
Symbiotic associations (e.g., <i>Rhizobium</i> -clover)	100 – 200

Pozn.: organismy kterým stačí N_2 jako jediný zdroj dusíku se nazývají diazotrofní

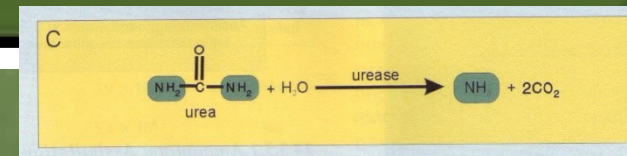
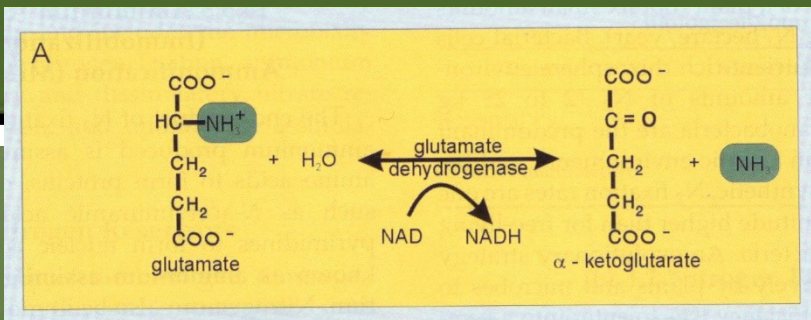
Fixace dusíku

Měření: Acetylene reduction assay (ARA)

- využívá větší afinity nitrogenázy pro acetylen
 - systém s půdou, případně i s rostlinami, je vzduchotěsný
 - prostor nad půdou se z 10% nasatí acetylenem či směsí acetylen-kyslík a po několika hodinách se měří ethylen
 - redukovaný ethylen se stanovuje GC s FID detektorem
 - užívá se faktor 3 molů ethylenu na 1 mol fixovaného N_2
-
- je velmi citlivou, levnou a jednoduchou metodou
 - alternativou je měření fixace ^{15}N - nutná drahá instrumentace (IRMS)
 - může se také sledovat rychlost růstu organismů na médiu bez dusíku
 - často se sleduje také přítomnost hlízek u cílových rostlin

Amonifikace

- proces kdy se NH_3 uvolňuje z glutamátu (uvnitř buněk)
- či proces kdy enzymem ureázou se štěpí močovina
- nebo extracelulární degradace proteázami, lysozomy, nukleázami
- Závislost na množství N v prostředí:
 - při poměru C:N < 20 převládá amonifikace
 - při C:N > 20 asimilace
- Metodicky lze rozlišit amonifikaci jako bazální úroveň mineralizace N - obdoba bazální respirace v cyklu C; a potenciální amonifikaci po přidavku substrátu (argininu) - obdoba potenciální respirace



Mineralizace dusíku

- AMONIFIKACE JE SOUČÁSTÍ ŠIRŠÍHO POJMU: MINERALIZACE DUSÍKU
- NEBOŤ ČÁST NH_3 SE DÁLE OXIDUJE PŘI NITRIFIKACI
- metodicky nelze obě fáze příliš dobře oddělit!!!
- pokud chceme znát skutečnou (ne potenciální) amonifikaci je jedinou možností měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^+$ či vytvořit anaerobní prostředí zatopením vzorků

Amonifikace

Měření: Amonifikace - AMO (postup UKZUZ)

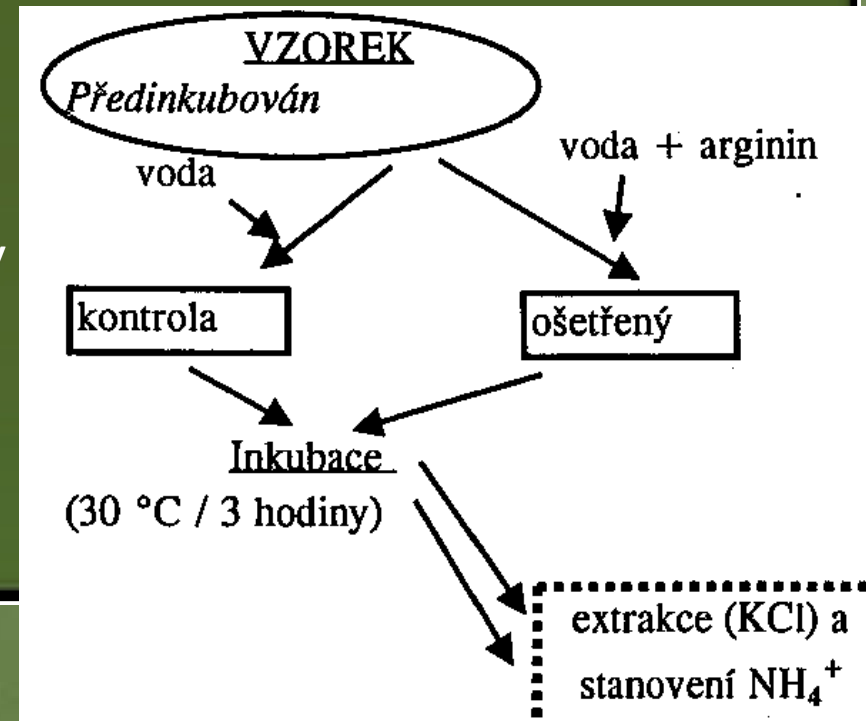
- vzorek zatopený vodou je inkubován týden při 40°C
- stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 1M KCl (1:5) spektrofotometricky (ISO 14256): při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným (salicylanem sodným), katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)
- jinou možností je stanovení iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE): amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidávkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného
- vyjadřuje se jako $\mu\text{g NH}_4^{+}\text{-N} \cdot \text{g}_{\text{suš.}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
- Alternativou je měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^{+}$

Amonifikace - potenciální

Měření: Potenciální amonifikace (PAMO) - test s argininem

- přidavek substrátu (argininu) a stanovení amonných kationtů po 3h inkubace půdy při 30°C
- stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 2M KCl (1:4) spektrofotometricky (ISO 14256): při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným (salicylanem sodným), katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)
- jinou možností je stanovení iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE): amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidavkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného

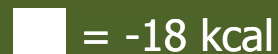
- Metoda dává falešné výsledky v kyselých půdách a v půdách po aktuálním přidavku organické hmoty
- PAMO není selektivně inhibována cycloheximidem či streptomycinem a proto nelze odděleně měřit amonifikaci bakterií a hub



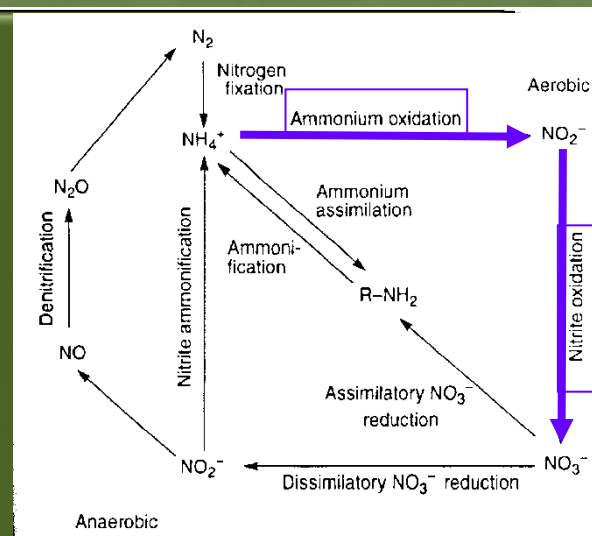
Nitrifikace

- významný proces, umožňuje mobilitu dusíku v půdě

Dva kroky:



- oba kroky jsou **striktně aerobní**
- zastává jej jen několik rodů, v půdě první krok např. rod *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* a druhý krok např. rod *Nitrobacter*
- zdrojem uhlíku je pak CO_2
- enzym pro první krok je amoniak monooxygenáza (AMO), která má širokou substrátovou specifitu a může kometabolicky oxidovat i některé polutanty např. TCE či alkany až do C8
– **využití při bioremediacích !!!**



Genus	Species
Ammonium oxidizers	
<i>Nitrosomonas</i>	<i>europaea</i> <i>eutroplus</i> <i>marina</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>nitrosus</i> <i>mobilis</i> <i>oceanus</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>briensis</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>multiformis</i>
<i>Nitrosoumbria</i>	<i>tenuis</i>
Nitrite oxidizers	
<i>Nitrobacter</i>	<i>winogradskyi</i> <i>hamburgensis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Nitrospina</i>	<i>gracilis</i>
<i>Nitrococcus</i>	<i>mobilis</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>marina</i>

Nitrifikace

Velmi dobrý indikátor stresu, je silně inhibována polutanty - důvody:

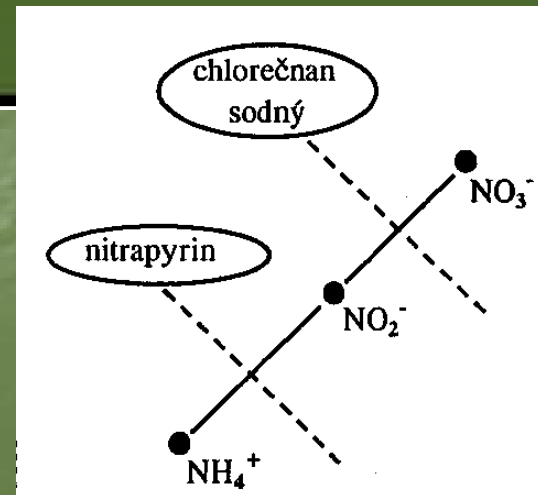
- 1) celý systém zisku energie je velmi náročný: 1. krok potřebuje oxidaci 34 molů amoniaku k fixaci jednoho molu CO_2 , druhý krok dokonce oxidaci 100 molů NO_2^- !!
- 2) dva kroky s přičiněním různých populací, druhý krok je méně energeticky výtěžný (jen 70 kJ/mol!) - pokud kroky navazují, nedochází k negativní kumulaci dusitanů (snižuje pH prostředí, toxický ..) dusitany inhibují první krok !!!
- 3) obecně už tak dost citlivý proces k environmentálním podmínkám: pH optimum je 6,6 - 8,0; při pH < 4,5 se zastaví

Pozn: existují i mikroorganismy heterotrofní, které provádí nitrifikaci a není známo proč; představují minoritní význam ve srovnání s autotrofní nitrifikací

Nitrifikace

Potenciální nitrifikace (SNA) (NEA - nitrifier enzyme activity) (potential ammonium oxidation - PAO)

- ISO 15685 (2004): Soil quality - Determination of potential nitrification - Rapid test by ammonium oxidation
- půda je inkubována v pufované suspenzi s roztokem chlorečnanu sodného (inhibuje oxidaci dusitanů na dusičnany) s přídatkem saturujícího množství síranu amonného (substrát pro oxidaci amoniaku na dusitany)
- po 6 hod či déle, eventuálně každé 2 hodiny se měří koncentrace NO_2^-
- koncentrace dusitanů se měří po extrakci KCl spektrofotometricky reakcí s sulfanilamid a Griess-Ilosvay činidlem = N-(1-naftyl)ethylen-diamin dihydrochlorid
- jako referenční látku lze užít nitrapyrin



Nitrifikace

Měření: Nitrifikace (LNA)

- Delší inkubace se příliš nedoporučují, neboť mohou probíhat změny společenstva.
- ISO 14238 - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
- půda inkubována po přidavku 1% síranu amonného; po 1-3 týdnech stanovení zbylého NH_4^+ či vzniklého NO_3^-
- jak pro stanovení jako parametru kvality půdy
- tak pro testování toxicity látek na N mineralizaci

Test toxicity:

- půda pro test toxicity musí být s Corg 0,5 - 1,5% a nízkým obsahem jílu
- přidává se organický zdroj dusíku - vojtěška (C:N = 16)
- testovaná látka se přidá v cca 5 koncentracích a po 28 denní inkubaci se měří NO_3^-
- výsledkem je procentuální inhibice

N mineralizační potenciál

- Při stanovení mineralizace dusíku se často spojují oba procesy (amonifikace a nitrifikace) v tzv. N mineralization potential
- je to vyprodukovaná suma $\text{NH}_4^+ + (\text{NO}_2^-) + \text{NO}_3^-$ v půdě na konci inkubace (extrakce roztokem KCl)
- pokud testujeme vliv chemické látky, dostáváme klasický vztah dávka odpověď s IDs
- Stanovení koncentrace dusičnanových a dusitanových aniontů v půdách:

Dusitany

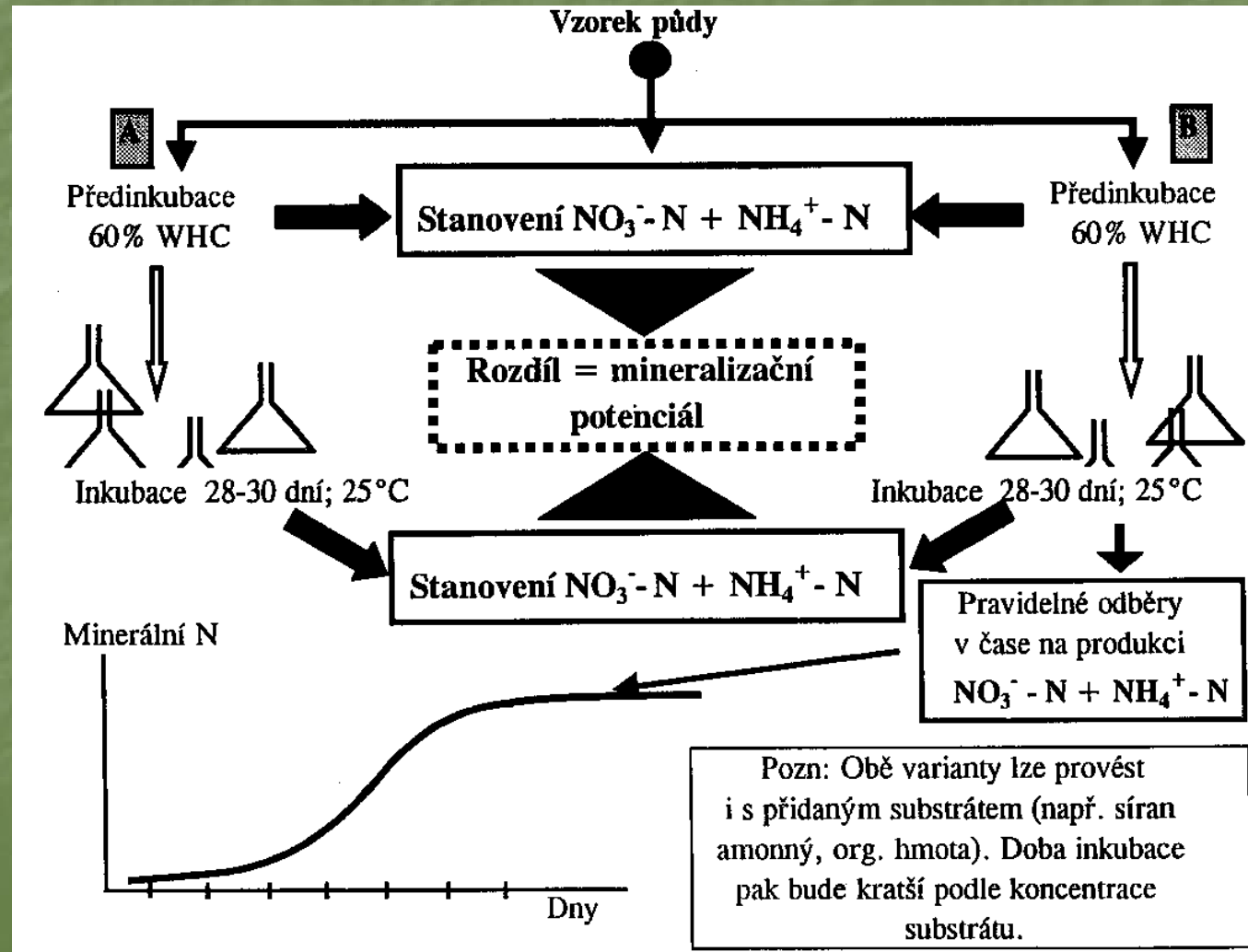
- dle ISO 14256 spektrofotometricky - reakcí s Griess-Ilosvayovým činidlem (sulfanilamid a N-1-naftyl etylendiamin chlorid) tvoří azobarvivo (543 nm)

Dusičnany

- nejprve nutno redukovat na dusitany (reduktor z kadmia – Devardova slitina) a pak stejné stanovení
- nebo UV spektrofotometrií při 210 nm
- nebo iontově selektivní elektrodou ISE
- v dnešní době existují automatické analyzátoři: FIA - flow injection analyzer

N mineralizační potenciál

- ISO 14238 (1997): Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes



Denitrifikace

- v anaerobních podmínkách
- dusitany a dusičnany slouží jako TEA
- N₂O – skleníkový plyn !!!
- Měření: kolorimetrickými technikami, iontově selektivními elektrodami, metodou "acetylene block" (zablokuje N₂O reductázu a N₂O je měřen GC)

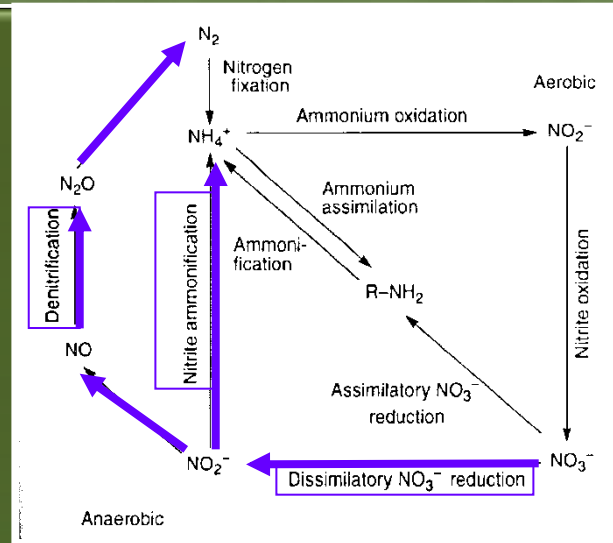
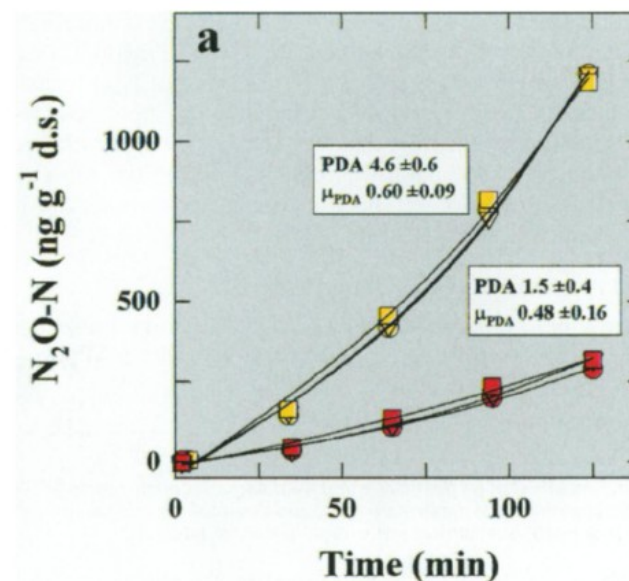


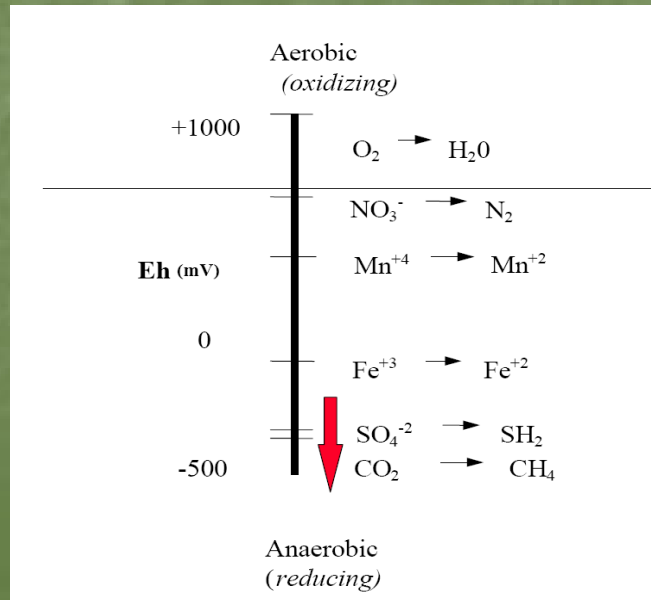
Figure 1. Examples of (a) potential denitrification activity (PDA); and (b) potential ammonium oxidation activity (PAO) patterns in soil without (yellow symbols) and with (red symbols) the addition of 100 μg loxynil per gram dry soil. The different symbols (\bullet , \blacksquare , \blacktriangle) are three replicates of the same test. (Units given for PDA are $\text{ng N}_2\text{O-N g}^{-1}$ dry soil (d.s.) min^{-1} and for μ_{PDA} hr^{-1} , and units for PAO are $\text{ng NO}_2^{-}\text{-N g}^{-1}$ d.s. min^{-1} .)



Respirace - typy

„Anaerobní respirace“

Typ respirace	Redukční reakce Akceptor elektronů \Rightarrow produkt	Oxidační reakce Donor elektronů \Rightarrow produkt
Aerobic	$O_2 \Rightarrow H_2O$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Denitrifikace	$NO_3^- \Rightarrow N_2$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce Mn	$Mn^{4+} \Rightarrow Mn^{2+}$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce dusičnanů	$NO_3^- \Rightarrow NH_4^+$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce síranů	$SO_4^{2-} \Rightarrow HS^-, H_2S$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Methanogeneze	$CO_2 \Rightarrow CH_4$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$



Enzymatické aktivity

Sledování enzymatických aktivit - enzymy v půdě

- obecný princip spočívá v přidavku nadbytku substrátu a sledování jeho úbytku či produkce produktu za současné inhibice růstu mikroorganismů
- měří se enzymatický potenciál či kinetické parametry V_{max}

Nejčastěji sledovány:

- dehydrogenázy
- proteázy - inkubace s kaseinátem sodným
- ureázy - inkubace s močovinou
- amidázy
- fosfatázy
- celulázy
- β - galaktozidázy

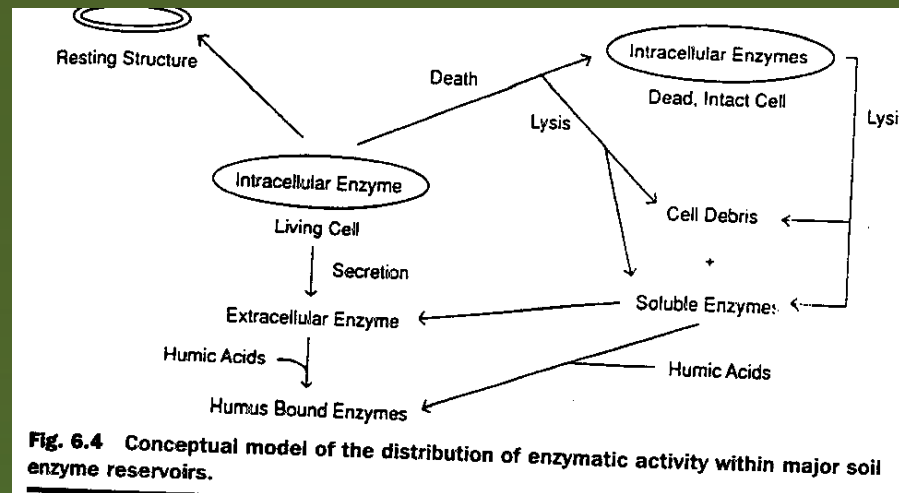


Fig. 6.4 Conceptual model of the distribution of enzymatic activity within major soil enzyme reservoirs.

Dehydrogenázová aktivita

- enzym, který z ekotoxikologického hlediska vysoce převažuje všechny ostatní
- dehydrogenázová aktivita je tedy **mírou celkové mikrobiální aktivity**

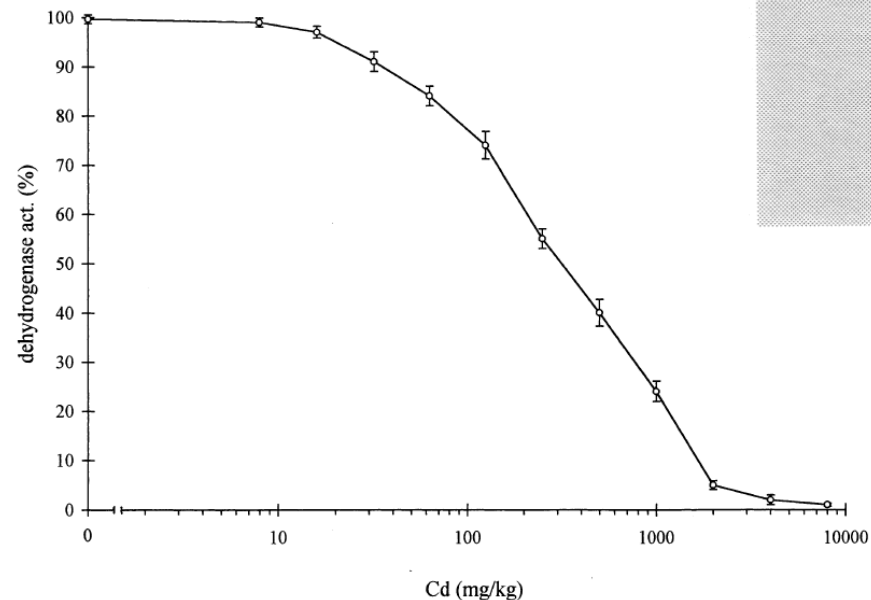
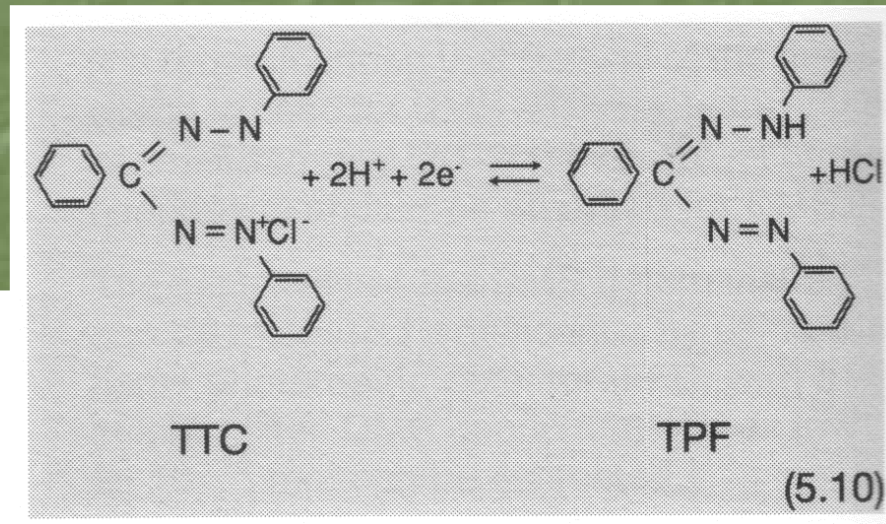
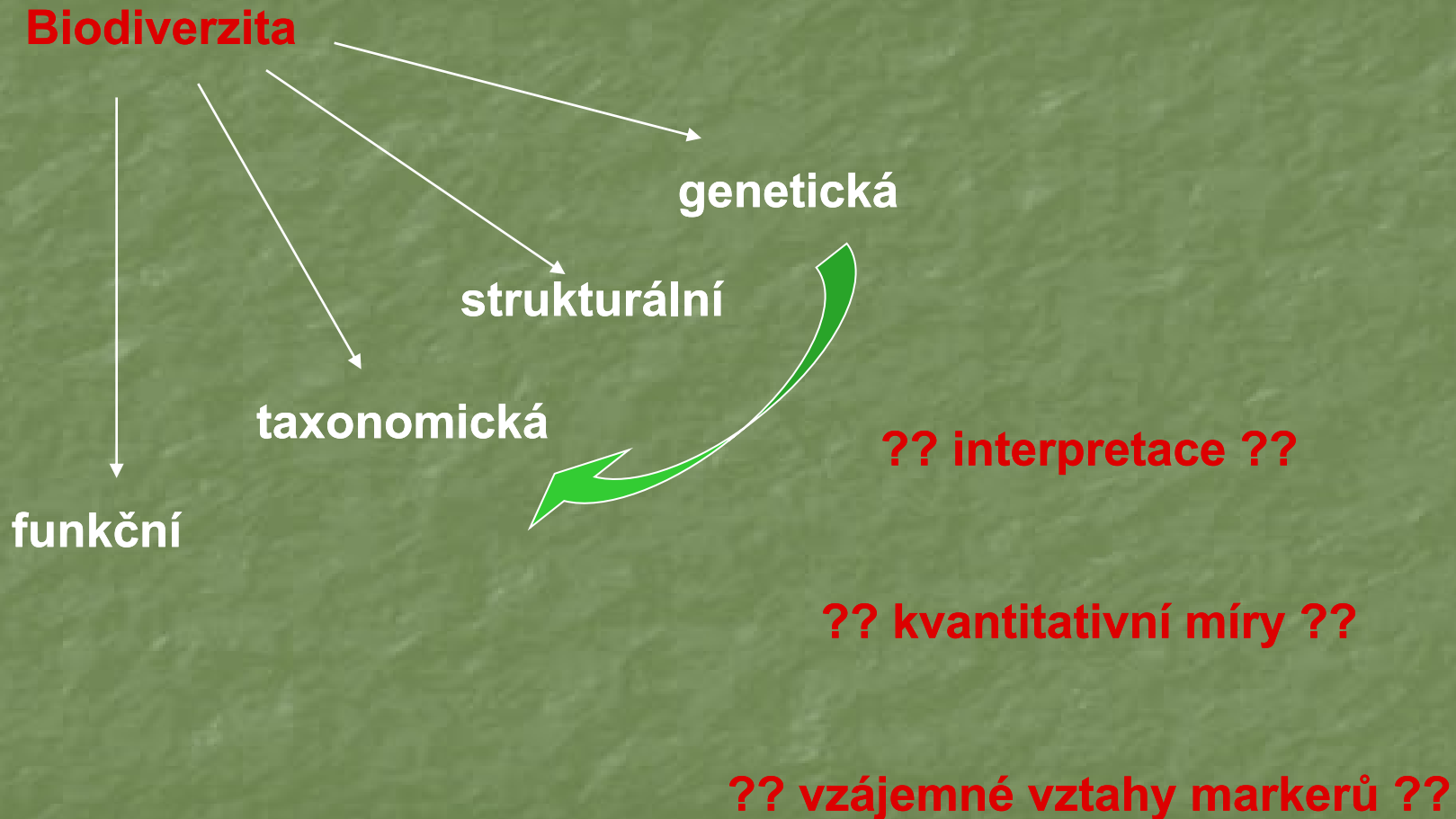


FIG. 1. Dose-response curve for Cd (as $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and soil samples from the surface horizon of a Calcaric Regosol (dehydrogenase test; mean responses marked with 95% confidence limits).



Diverzita půdních mikroorganismů

Biodiverzita půdních mikroorganismů



Analýza lipidů

- PLFA jako biomarkery
- informují o složení mikrobiálního společenstva:

větvené PLFA	typicky bakteriálního původu
PUFA, zejména 18:2	charakteristické pro Eukaryota
suma relativní abundance iso a anteiso izomerů 15:0 větvených PLFA	reprezentují bakterie
poměr mezi iso(anteiso) 15:0 větvenými PLFA a 16:0 větvenými PLFA	= relativní zastoupení bakterií
18:2 ω FA	= houby

- poskytují ale i další informace:

poměr cis a trans izomerů MUFA	pokud vyšší než 1 může značit strádání či env. stres
poměr nasycených / nenasycených	indikace stresu
poměr cyklopropyl FA / jejich monoenoic prekursorů	
poměr iso 15:0 / anteiso 15:0 a iso 17:0 / anteiso 17:0	

Funkční diverzita – systém Biolog

Table 1

Carbon substrates in Biolog ECO microplates. Assignment to biochemical categories follows that of Insam (1997)

C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phe
D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-S
E4 L-Threonine	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3	E4 L-T
F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 GI GI
G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G1 D-1 G P al
H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol	H3 D-Malic Acid	H4 D-Malic Acid	H P

Polymers

α -cyclodextrin
glycogen
Tween 40
Tween 80

Carbohydrates

D-cellobiose^a
i-erythritol
D-galactonic acid γ -lactone
N-acetyl-D-glucosamine
glucose-1-phosphate
 β -methyl-D-glucoside
D,L- α -glycerol phosphate
 α -D-lactose
D-mannitol
D-xylose^a

Carboxylic acids

γ -hydroxybutyric acid
 α -ketobutyric acid
D-galacturonic acid
D-glucosaminic acid
itaconic acid
D-malic acid^a
pyruvic acid methyl ester

Amino acids

L-arginine^a
L-asparagine
glycyl-L-glutamic acid
L-phenylalanine
L-serine
L-threonine

Amines

phenyl ethylamine
putrescine

Phenolic compounds

2-hydroxybenzoic acid^a
4-hydroxybenzoic acid^a

^a Indicates substrates not present in GN plates.

Nejčastější metody pro získání „genetického fingerprintu společenstva“

- ARDRA - amplifikovaná ribosomální DNA restrikční analýza
- RFLP - restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů
- T-RFLP - koncová restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů
- DGGE - denaturující gradientová gelová elektroforéza
- TGGE - teplotní gradientová gelová elektroforéza
- ARISA - automated ribosomal intergenic spacer analysis - různorodost délek mezi geny malé a velké ribozomální podjednotky
- Microarrays - mikročipy
- SIP (stable isotope probing) – značení stabilními izotopy

Kombinace přístupů

Kombinace přístupů

Grouping of the Soil Microflora According to Possibilities to Study Populations and Activities at Different Functional Levels

Functional level	Examples of observations
Organisms	Genetic changes Enzyme activities
Populations	Physiological changes, e.g., growth Biomass (bacterial, fungal, total) Number of populations, e.g., actinomycetes, bacteria, fungi Specific organisms, e.g., ammonifiers, cellulose degraders, cyanobacteria, denitrifiers, ligninolytic organisms, mycorrhiza (ecto, arbuscular), nitrifiers (ammonium oxidizers, nitrite oxidizers), proteolytic organisms, <i>Rhizobium</i> spp.
Activities	ATP-measurement, CO ₂ production, heat production, O ₂ consumption Ammonification, cellulose decomposition, denitrification, litter decomposition, nitrogen fixation (<i>Rhizobium</i> , heterotrophs, cyanobacteria), straw decomposition, sulfur oxidation
Interactions	Combination of activity and biomass data, giving specific activities Mycorrhiza (ecto, arbuscular), pathogens, physiological changes, <i>Rhizobium</i> , rhizosphere organisms (associate nitrogen-fixers, producers of growth stimulating or inhibiting substances) Soil aggregate stabilization (bacteria, fungi)

Kombinace přístupů

Soil ecosystem parameter		Microbial indicator
Function	C-cycling	Soil respiration
		Metabolic quotient (qCO_2)
		Decomposition of organic matter
		Soil enzyme activity
Function	N-cycling	N-mineralization
		Nitrification
		Denitrification
		N-fixation
Function	General activities	Bacterial DNA synthesis
		RNA measurements
		Bacterial protein synthesis
		Community growth physiology
Function	Root-activity	Mycorrhiza
Biodiversity	General biomass	Microbial biomass: direct methods
		Microbial biomass: indirect methods
		Microbial quotient
		Fungi
Biodiversity	Biodiversity	Fungi-bacteria ratio
		Protozoa
		Structural diversity
		Functional diversity
Biodiversity	Bioavailability of contaminants	Marker lipids
		Suppressiveness to pathogens
		Biosensor bacteria
		Plasmid-containing bacteria
Biodiversity	Bioavailability of contaminants	Biomarker species
		Incidence and expression of catabolic genes

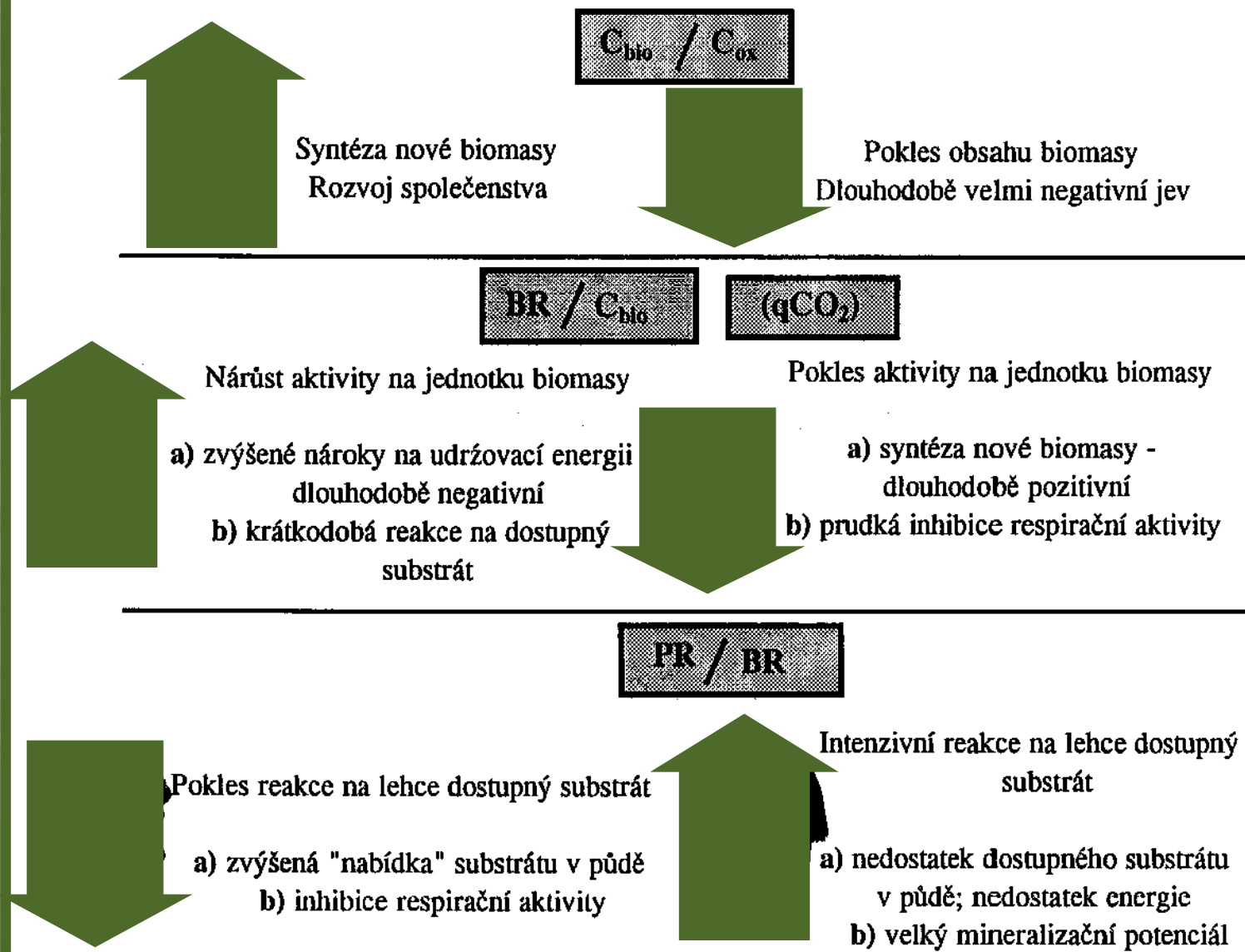
Doelman & Eijsackers (2004)

Kombinace přístupů

	Ecological relevance	Integration of soil properties	Sensitivity to change	Documentation	Reproducibility	Economy/practicality
ate	High	High	Intermediate	High	High	Good (10-day tion)
	Intermediate-high	High	Intermediate	High	High	Good (10-day tion)
1	Intermediate-high	High	Intermediate	High	Intermediate	Intermediate
	Intermediate-high	High	High	Intermediate	Intermediate	Good (10-day tion)
aliza-	High	High	Intermediate	Intermediate	High	Good (10-day tion)
	High	Intermediate	Very high	Low- intermediate	High	Good
ration	High	High	High	Intermediate	High	Intermediate
	Intermediate-high	High	High	High	Intermediate- high	Poor-interme

Kombinace přístupů

Obsah mikrobiální biomasy a respirační testy - reálná interpretace



Ukázky metod hodnocení mikrobiální kvality půd

- viz cvičení E2241

Literatura

Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (1997): Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford. ISBN 0851991580.

Doran, J. W., Parkin, T. B. (1994): Defining and assessing soil quality. In: Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA special publication number 35. SSSA, Inc., American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA, 1994, pp. 3 – 21.

Sáňka, M., Materna, J. (2004): Indikátory kvality zemědělských a lesních půd ČR. Edice Planeta. Odborný časopis pro životní prostředí. Ročník XII, číslo 11/2004, ISSN 1213-3393.

Jensen J. & Mesman M. (2006). Ecological risk assessment of contaminated land. Decision support for site specific investigations. Report 711701047. RIVM, Netherlands

Doelman P. & Eijsackers H.J.P. (2004): Vital Soil - Function, Value and Properties. Elsevier. 358 p. ISBN: 0-444-51772-3

Maier, R.N., Pepper, I.L, Gerba, C.P. (2000): Environmental Microbiology. Academic Press, ISBN: 0124975704, 608 pp.

Atlas, R.M., Bartha, R. (1997): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications (4th Edition). Addison-Wesley Pub Co, ISBN: 0805306552, 306 pp.

Paul, E.A., Clark, F.E. (1996): Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, ISBN: 0125468067, 340 pp.

Tate, R.L. (2000): Soil Microbiology (2nd Edition). John Wiley & Sons, ISBN: 0471317918, 536 pp.

Alef, K., Nannipieri, P. (1995): Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, ISBN: 0125138407, 576 pp.

Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D. (1998): Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press, ISBN: 0195092236.

Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R. (2002): Manual of Environmental Microbiology. Amer Society for Microbiology, ISBN: 155581199X, 1138 pp.

Pepper, I., Gerba, C. (2005): Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. Academic Press.

Gill, R., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. Nature 491, 105–108 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11585>