

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

ROSTLINNÁ VÝROBA

Plant Production

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

9

VOLUME 45
PRAHA
ZÁŘÍ 1999
ISSN 0370-663X

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Redakční rada – Editorial Board

Předseda – Chairman

Doc. Ing. Josef Šimon, CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)

Členové – Members

Prof. Dr. Márta Birkás (Agrártudományi Egyetem, Gödöllő, Hungária)

Ing. Helena Donátová, CSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Prof. Ing. Václav Fric, DrSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Prof. Dr. Günter Kahnt (Institut für Pflanzenbau und Grünland, Universität Hohenheim, Stuttgart, BRD)

Prof. Ing. Josef Kozák, DrSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Prof. Ing. Lubomír Minx, DrSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, ČR)

Ing. Timotej Mištin, CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Piešťany, SR)

Doc. Ing. Jan Moudrý, CSc. (Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, ČR)

Prof. RNDr. Lubomír Nátr, DrSc. (Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Praha, ČR)

Dr. Peter Newbould (The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Scotland, UK)

Ing. Jaromír Procházka, CSc. (Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko u Brna, ČR)

Prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, ČR)

Doc. Ing. Vlastimil Rasocha, CSc. (Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod, ČR)

Prof. Dr. Heinrich W. Scherer (Agrikulturchemisches Institut der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität, Bonn, BRD)

Doc. Ing. Ladislav Slavík, DrSc. (Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, Praha, ČR)

Prof. Ing. Václav Vaněk, CSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Ing. Marie Vánková, CSc. (Zemědělský výzkumný ústav, Kroměříž, ČR)

Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Doc. Ing. František Vrkoč, DrSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)

Prof. Dr. hab. Kazimiera Zawislak (Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn, Polska)

Vedoucí redaktorka – Editor-in-Chief

RNDr. Eva Stříbrná

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, výsledky výzkumu, studie a analýzy z oblasti rostlinné výroby, především pěstování rostlin, tvorby výnosů plodin, kvality jejich produktů, semenářství, fyziologie rostlin, agrochemie, pedologie, mikrobiologie, meliorací a agroekologie. Časopis je citován v bibliografickém časopise *Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences*. Abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: *Agricola*, *Agris*, *CAB Abstracts*, *Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences*, *Czech Agricultural Bibliography*, *Toxline Plus*, *WLAS*.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 45 vychází v roce 1999.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Eva Stříbrná, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. Den doručení rukopisu do redakce je publikován jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1999 je 816 Kč.

Aims and scope: Original scientific papers, results of research, review studies and analyses from the crop production sector, particularly care of crops, crop yield formation, quality of plant products, seed production, plant physiology, agrochemistry, soil science, microbiology and agri-ecology are published in this periodical.

The journal is cited in the bibliographical journal *Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences*. Abstracts from the journal are comprised in the databases: *Agricola*, *Agris*, *CAB Abstracts*, *Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences*, *Czech Agricultural Bibliography*, *Toxline Plus*, *WLAS*.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 45 appearing in 1999.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Eva Stříbrná, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1999 is 195 USD (Europe), 214 USD (overseas).

ORGANIC CARBON CYCLE, INCIDENCE OF MICROORGANISMS AND RESPIRATION ACTIVITY IN LONG-TERM FIELD EXPERIMENT

CYKLUS ORGANICKÉHO UHLÍKU, VÝSKYT MIKROORGANISMŮ A RESPIRAČNÍ AKTIVITA V DLOUHODOBÉM POLNÍM POKUSU

J. Kubát, J. Nováková, O. Mikanová, R. Apfelthaler

Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: In order to determine long-term effects of organic and mineral fertilisers on soil organic matter, soil microorganisms and their activity and further soil properties, Novák has started a small plot field experiment in 1958. To eliminate the effect of cultivated plants, he decided to carry out this experiment as a bare fallow. The experiment was founded on Luvi-haplic Chernozem in Prague-Ruzyně. It consists of seven variants. Soil samples have been taken twice a year till 1979 and once a year since that time. Several chemical and microbiological analyses were performed over the whole time of the experiment. The long-term data basis of this experiment was used to evaluate organic and mineral fertilisation on the total carbon dynamics in soil, respiration activity, biomass and the incidence of soil microorganisms in soil. High doses of organic manure increased the soil organic carbon content. The carbon accumulation in these plots proceeded for about 13 years (1958 to 1971, the first time period). During this time period, the effect of organic manure on the carbon content in soil was approximately additional. Exponential and polynomial regression curves showed, however, a better correlation coefficients. None of these functions reflected the increasing mineralisation rate of the already present organic matter in soil. Later (1972 to 1989, the second time period), there was no further apparent carbon accumulation. A steady state equilibrium can be supposed in this time period, which might be characterised by a slightly declining regression line. Accumulated organic matter decomposition occurred later on, when no further manuring was applied (1990 to 1998, the third time period). Slight decrease (about 0.1% C_{ox}) of the carbon concentration occurred in control and mineral fertilised variants over the whole time of the experiment. This decrease was about doubled in the tilled variants. Organic manuring increased basal respiration rate, mainly in the stationary time period. Average respiration rate was more or less the same in the control and mineral fertilised variants in the first period. It increased in all these variants during the stationary phase and dropped down in the third period. Potential respiration (NG – glucose and ammonium sulphate added) has shown similar trends as those for the basal respiration. The most remarkable result is the drop down of the potential respiration rate in mineral fertilised variants in the second time period, already. This is an evident change in the soil functionality caused by high doses of mineral fertilisers. Average values of the biomass carbon in the third period resembles the basal respiration rate and total carbon content in soil. The amount of biomass carbon per unit of the total carbon was similar in organic and control variants, while it was depressed in mineral fertilised variants. Organic manuring increased the average number of bacteria about twice, as compared to unfertilised controls, while mineral fertilisation decreased their number to about a half of that in controls. Number of bacteria dropped down in organic variants to the values determined in controls in the third period, when no further manuring was applied. Number of micromycetes was much less affected by organic manuring and mineral fertilisation. Their number increased in mineral fertilised variants in the third period. Incidence of bacteria in soil samples was evidently dependent on the presence of fresh organic matter rather than on the total carbon content in soil.

Keywords: long-term field experiments; organic carbon cycle; microorganisms; respiration activity

ABSTRAKT: V roce 1958 založil Novák v Praze-Ruzyni dlouhodobý maloparcelkový polní pokus, jehož cílem bylo sledování dlouhodobého vlivu minerálního a organického hnojení na půdní organickou hmotu, půdní mikroorganismy a jejich aktivity a na další půdní vlastnosti. Pokus byl založen jako černý úhor, aby byl eliminován vliv pěstovaných rostlin. Půdní vzorky byly odebírány jednou až dvakrát ročně. Pokus zahrnoval sedm variant. Na parcelkách hnojených vysokými dávkami organického hnojení se zvyšoval obsah půdního organického uhlíku. Akumulace uhlíku na těchto parcelkách pokračovala asi 13 let. Během této doby byl efekt organického hnojení na obsah uhlíku v půdě přibližně aditivní, charakterizovaný lineární regresní přímkou. Exponenciální nebo polynomiální regresní křivky však vykazovaly vyšší korelační koeficienty. Žádná z těchto funkcí nevyjadřovala zvyšující se mineralizační rychlost půdní organické hmoty, která souvisela s její rostoucí koncentrací. Později k další akumulaci uhlíku v půdě nedocházelo. Předpokládaná dynamická rovnováha mezi inputem a rozkladem organické hmoty trvala dalších 18 let. Toto období charakterizuje mírně klesající regresní přímkou. Rozklad akumulované půdní organické hmoty následoval po roce 1989, kdy bylo ukončeno pravidelné hnojení. V kontrolní variantě došlo během celého období

pokusu k poklesu koncentrace organického uhlíku (asi 0,1 %) a podobně tomu bylo také ve variantách minerálně hnojených. Tento pokles byl téměř dvojnásobný u překopávaných variant v důsledku vyšší aerace. Organické hnojení zvyšovalo bazální respirační aktivitu, zvláště ve stacionární fázi. Průměrná respirační aktivita byla více méně stejná v první periodě u kontroly a u minerálně hnojených variant. Její hodnoty stoupaly ve všech variantách během stacionární fáze a klesaly ve třetí periodě. Potenciální respirace (NG) vykazovala stejný trend jako bazální respirace. Nejpozoruhodnějším výsledkem je pokles aktivity potenciální respirace u minerálně hnojených variant již v druhé časové periodě. Tato výrazná změna půdní funkce byla způsobena vysokými dávkami minerálních hnojiv. Průměrná hodnota biomasy uhlíku ve třetí periodě se podobá bazální respirační aktivitě a obsahu celkového uhlíku v půdě. Množství uhlíku biomasy na jednotku celkového uhlíku bylo stejné u organicky hnojených variant a u kontroly, zatímco u minerálně hnojených variant došlo k poklesu. Organické hnojení zvyšovalo průměrný počet bakterií přibližně na dvojnásobek ve srovnání s nehnojenými kontrolami. U minerálně hnojených variant klesl počet bakterií téměř na polovinu oproti kontrole. Ke snížení počtu bakterií u organicky hnojených variant došlo až ve třetí periodě, kdy přestal být aplikován hnůj. Počet mikromycet byl mnohem méně ovlivňován organickým a minerálním hnojením. Jejich počet vzrostl v minerálně hnojených variantách po roce 1989. Je zřejmé, že výskyt bakterií v půdních vzorcích závisí na přítomnosti čerstvé organické hmoty více než na obsahu celkového uhlíku v půdě.

Klíčová slova: dlouhodobé polní pokusy; cyklus organického uhlíku; mikroorganismy; respirační aktivita

INTRODUCTION

Soil organic matter is an important component of soils on which most of the ecological functions are closely depending. It is a subject of continuous transformations mediated by edafon, particularly soil microflora. Soil organic matter is, however, heterogeneous. It consists of many different substances having different chemical structures, that are located in different microlocalities in the soil and interact by means of physico-chemical mechanisms with mineral particles. Dynamics of soil organic matter is, therefore, an extremely complex phenomenon. It proceeds by means of short-term reactions and processes mediated mainly by soil organisms. As a result, adaptation mechanisms take place, including changes in number and composition of soil microflora and its activities. This can be easily demonstrated in short term laboratory experiments and *in situ* measurements, as well.

However, besides of the short term reactions, long-term processes occur, lasting several years or decades in natural conditions. Each change in land use, cropping, tillage or fertilisation starts long-term processes that tend to reach a new equilibrium. Körschens (1994) reported that it took 28 years to reach a new equilibrium of soil organic carbon in individual variants of organic and mineral fertilisation in the long-term field experiment in Bad Lauchstädt. As a result of changes in the long-term soil processes, changes in all ecological soil functions took place – production function, transformation function, regulation function and biotop function, to mention the most important ones.

Long-term investigations are, therefore, required to understand adequately the concepts of soil protection and sustainable agriculture in varying soil and environmental conditions. Long-term field experiments are, therefore, indispensable means for the study of agroecosystems and their agronomical and ecological functions. It is the only approach using analysis of the long-term data and to extrapolate small scale sequences of events to large scale processes.

The value of the long-term experiments results from the accumulation of data acquired over decades. Number of the long-term field experiments is relatively limited. The high cost of conducting continuous field trials was the reason for the fact that a number of long-term field experiments were discontinued in the past. At the present time only about 65 field experiments are known worldwide, duration of which is longer than 50 years (Körschens, 1997).

The value of the long-term field experiments, their archive samples and their databases is also in the fact that they are irreplaceable experimental objects, that can be used for elucidation of new scientific questions.

There are five long-term experiments in the Czech Republic lasting more than 40 years, the bare fallow experiment in Prague-Ruzyně being one of them. Novák has initiated this small plot field experiment, in order to determine long-term effects of organic and mineral fertilisers on soil organic matter, soil microorganisms and their activity and further soil properties (Novák, Apfelthaler, 1971; Novák et al., 1971). To eliminate the effect of cultivated plants, he decided to carry out this experiment as a bare fallow. The effect of organic and mineral fertilisers on organic carbon in soil, soil microorganisms and their respiration activity over 40 years of the experiment is presented in this paper.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was founded on Luvi-haplic Chernozem in Prague-Ruzyně in 1958. It consists of seven plots 1.5 x 2 m that have been treated once a year as follows:

- I. control (untreated soil)
- II. manured with 80 t of composted manure per ha and year, mixed within 10 cm layer (FYM)
- III. manured with 160 t composted manure per ha and year, mixed within 20 cm layer (2FYM)
- IV. fertilised with mineral fertilisers (ammonium sulphate, mono calcium phosphate and potassium

chloride) in the equivalent doses of N, P, and K as in II, mixed within 10 cm layer (NPK)

V. the same fertilisers in doses equivalent to III, mixed within 20 cm layer (2NPK)

VI. no fertilisers tilled to 10 cm (Tilled)

VII. no fertilisers tilled to 20 cm (Tilled)

In 1971, the depth of tillage was changed to 20 cm in all plots (except plot I) and ammonium sulphate was substituted by urea. Second change occurred in 1989. No manure and fertilisers have been applied and the plots have not been tilled. The plots have been maintained bare and weeds have been removed mechanically over the whole time of the experiment.

Soil samples have been taken twice a year till 1979 and once a year since that time. Depth of sampling was 20 cm in all plots. Immediately after sampling, the soil samples were sieved through 2 mm sieve and several analyses were performed, e.g. numbers of microorganisms by the plate dilution method, determination of respiration activity (basal and potential) according to Novák, Apfelthaler (1971). Biomass was determined by fumigation-extraction method (Vance et al., 1987). The results were calculated to oven dry matter. Oxidisable carbon (C_{ox}) was determined in air dried soil samples by wet combustion according to Alten et al. (1935).

RESULTS AND DISCUSSION

Most of the data are available from 1965 and the following years. We have, therefore, taken this year as a starting one for the evaluation. The original organic carbon concentration in 1958 was estimated to 1.3% C_{ox} .

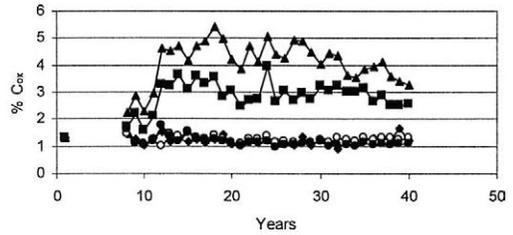
Soil organic carbon content

The data concerning organic carbon content in individual plots over the whole time of the experiment are shown in Fig. 1.

High doses of organic manure (farm yard manure compost) increased the soil organic carbon content substantially. Changes in organic carbon content in the control, mineral fertilised and tilled variants were relatively low.

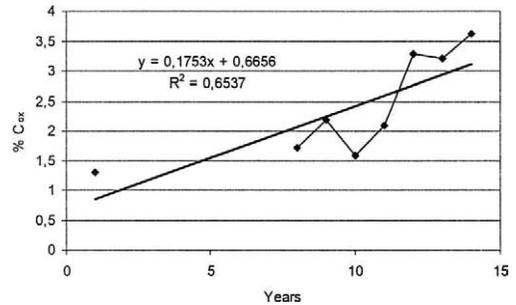
Carbon accumulation in organic manured plots proceeded for about 13 years (first time period of the organic matter accumulation). During this time period, the effect of organic manure on the carbon content in soil seemed to be approximately additional. This can be demonstrated in Fig. 2, in which linear regression line was calculated for the data of the plot II (FYM).

Linear regression line represents a simple concept of an additive effect of organic manuring on the organic carbon accumulation in soil, supposing a constant humification coefficient. This could be true for a short period of time as the experimental values suggest. The increasing content of the organic matter in soil should



1. Organic carbon content in soil samples from individual plots

◆ Control
■ FYM
▲ 2FYM
○ NPK
● Tilled



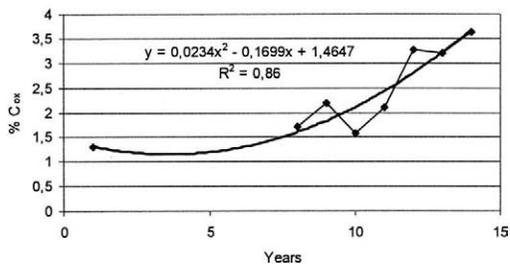
2. Organic carbon accumulation in soil in the initial period of the experiment in plot II

increase its mineralisation rate, in consequence of which the increments of the net organic matter accumulated should decrease over the years passing. For this reason, more realistic functions might be a power function or logarithmic function. To evaluate a similarity of the experimental values with simple functions, several regression functions and their correlation coefficients were calculated. Results are presented in Tab. I.

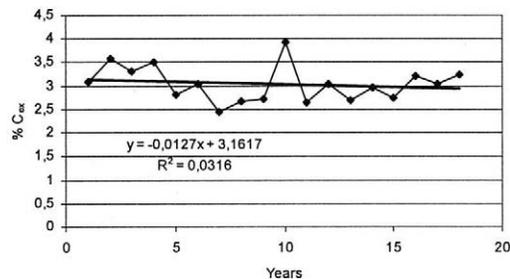
The correlation coefficients for both power and logarithmic functions are lower than those for the linear function. The best correlation coefficient was found for polynomial function, which is demonstrated in Fig. 3. Correlation coefficient for this function is surprisingly high, however, the background for this is not clear.

I. Regression functions of the organic carbon accumulation in FYM plot (II) in the first time period (1958 to 1971)

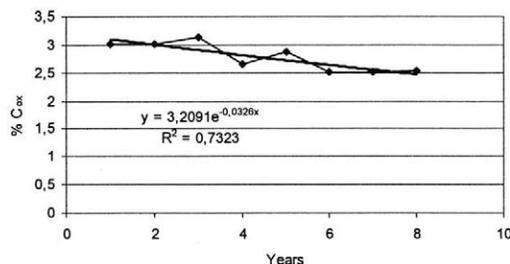
| Function | Equation | R^2 |
|-------------|------------------------------------|--------|
| Linear | $Y = 0.1753x + 0.6656$ | 0.6537 |
| Power | $Y = 1.1624x^{0.3133}$ | 0.509 |
| Logarithmic | $Y = 0.658\ln(x) + 1.0042$ | 0.4148 |
| Exponential | $Y = 1.0303e^{0.0793x}$ | 0.7243 |
| Polynomial | $Y = 0.0234x^2 - 0.1699x + 1.4647$ | 0.86 |



3. Organic carbon accumulation in soil in the initial period of the experiment in plot II



4. Organic carbon content in soil in the second (steady state) period in plot II (FYM)

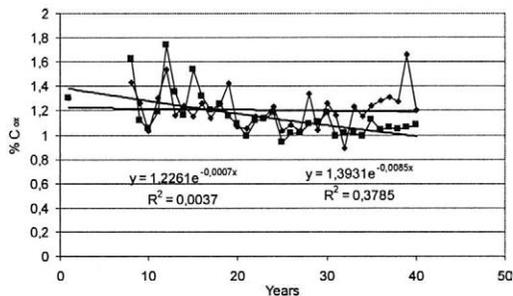


5. Organic carbon content in soil in the third (decline) period in plot II (FYM)

After this first period (since about 1972), there was no further apparent carbon accumulation in this plot. Taking into account the variability of annual measurements, we can suppose that a steady state had been reached in this soil (second time period). Steady state should be characterised by an equilibrium in inputs and outputs of the organic carbon in the soil and the carbon content in soil should be constant. Experimental data for this time period are shown in Fig. 4.

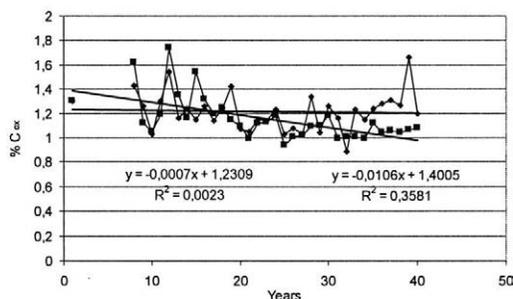
Linear regression line shows a slight decline, while the experimental values vary substantially.

In 1989 a decision was made to stop the application of fertilisers and tillage and to look at the accumulated organic matter decomposition later on (third time pe-



6. Organic carbon content in soil in the control and tilled variants over the whole time of the experiment and exponential regression of the values obtained

◆ Control
■ Tilled



7. Organic carbon content in soil in the control and tilled variants over the whole time of the experiment and linear regression of the values obtained

◆ Control
■ Tilled

riod). The drop down of organic carbon content consequently occurred and can be seen in Fig. 5.

Organic matter decomposition should follow the first order kinetics which can be expressed by a simple exponential function. The calculated exponential regression curve fits quite well to the experimental data, correlation coefficient is relatively high.

Fig. 6 shows the values of the organic carbon in control and tilled plots over the whole time of the experiment. According to the same concept, exponential regression curve and appropriate correlation coefficients were calculated. The correlation coefficient was higher for the values obtained for the tilled plot, however, both were rather low. The same values and linear regression lines and equations are presented in Fig. 7.

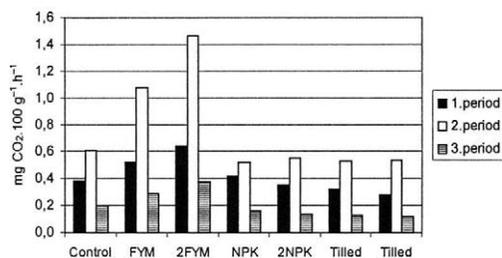
Slight decrease (about 0.1% C_{ox}) of the carbon concentration occurred in the control and mineral fertilised variants. This decrease was about doubled in the tilled variants. There are no distinct differences in the time periods mentioned above.

Respiration activity

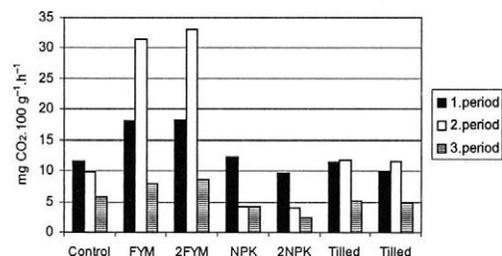
Respiration activity of the soil samples indicates the intensity of metabolic processes occurring *in situ*. It is, therefore, an important characteristics of the carbon dynamics in soil.

The values determined over the whole time of the experiment showed a high variability. To make the picture simpler, the results were grouped in three time periods according to the soil organic carbon accumulation in organic manured variants mentioned above. The first period of the carbon accumulation was from the beginning of the experiment till 1971. The second period of the steady state equilibrium took place till 1989 and the third period of the carbon decomposition took the following years till 1997. Average values were calculated for individual time periods. Results for the basal respiration are presented in Fig. 8.

Basal respiration rate was slightly enhanced in organic manured variants in the first, accumulation, period of the experiment. Average basal respiration increased remarkably in the stationary phase, evidently due to the increase in organic carbon concentration in soil, in which the net mineralisation of organic carbon added reached or surpassed its input. In the third (mineralisation) period, the average respiration rate dropped down due to the change in manuring (no further input of organic carbon). Besides of this, however, this result was affected by the change in the method of the determination of this activity: till 1989, CO₂ produced was determined after 24 hours of incubation, while later it was determined after 72 hours of incu-



8. Average basal respiration rate in time periods



9. Average potential (NG – glucose and ammonium sulphate added) respiration rate in time periods

bation. The respiration rate was then calculated per hour in both cases.

Average respiration rate was more or less the same in the control and mineral fertilised variants in the first period. It increased in all these variants during the stationary phase and dropped down in the third period. This drop down may be, similarly, explained by the change in methodology, however, the decrease in average respiration rate may be noticed in mineral fertilised and tilled variants, in comparison with the control.

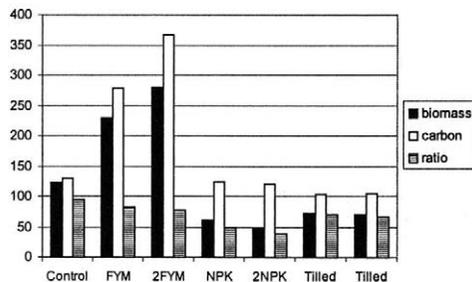
Besides of the basal respiration rate, several potential respiration rates were determined, as well. Fig. 9 shows the average potential respiration rates in time periods.

The values obtained in organic manured variants show similar trends as those for the basal respiration. The most remarkable result is the drop down of the potential respiration rate in mineral fertilised variants in the second time period, already. This is an evident change in the soil functionality caused by high doses of mineral fertilisers. The decrease in this value in control and tilled variants in the third period is hard to explain (the method of the determination of this value was the same during the whole time of the experiment).

Biomass and number of soil microorganisms

Metabolic processes in soil are mainly mediated by soil microflora. Number of several cultivation groups has been determined over the whole time of the experiment. During the third period, determination of biomass by fumigation-extraction method (Vance et al., 1987) was included, as well.

Average values of the biomass carbon in the third period are presented in Fig. 10. Biomass carbon content resembles the basal respiration rate and total carbon content in soil. Average values of carbon content for this time period was, therefore, included in this figure, and the value of biomass carbon related to total carbon unit, as well. It is interesting to note that the amount of biomass carbon per unit of the total carbon was similar in organic and control variants, while it was depressed in mineral fertilised variants.



10. Average biomass carbon content ($\mu\text{g C} \cdot \text{g}^{-1}$), total oxidisable carbon content ($\text{mg C} \cdot 10 \text{g}^{-1}$) and biomass related to total oxidisable carbon unit in the third period ($\text{mg C}_{\text{micr}} \cdot 10 \text{g}^{-1} \text{C}_{\text{ox}}$)

Numbers of several groups of microorganisms were determined by plate dilution technique. That of bacteria growing on Thornton agar and of micromycetes growing on Jensen agar are presented in Figs 11 and 12.

In the first time period, organic manuring increased the average number of bacteria growing on Thornton agar about twice, as compared to unfertilised controls, while mineral fertilisation decreased its number to about a half of that in controls. Tillage slightly decreased their number, probably due to the higher mineralisation rate in tilled soils.

Number of bacteria did not increase in the second time period, as did the respiration activity. On the contrary, its number dropped down in all variants except for the 2NPK variant.

Similarly, the drop down of the number of bacteria in the second period in controls as compared to the first period may be explained by the decrease in the decomposable organic matter in soil. Mineral fertilisation compared to tilled and control variants depressed the number of bacteria substantially in all time periods.

Average number of bacteria growing on Thornton agar in the organic manured variants dropped down to the level of the control in the third time period, indicating a direct relationship of this value to the fresh organic matter input. Unlike bacteria, micromycetes reacted another way to the treatments applied in this experiment. Results are shown in Fig. 12.

Average number of micromycetes was much less affected by organic manuring and mineral fertilisation. The most remarkable result probably is the increase of

the number of micromycetes in mineral fertilised variants in the third period. In this period number of micromycetes doubled in mineral fertilised variants, while number of bacteria dropped down.

CONCLUSIONS

High doses of organic manure increased the soil organic carbon content. The carbon accumulation in these plots proceeded for about 12 years. During this period, the effect of organic manure on the carbon content in soil was approximately additional. Exponential and polynomial regression curves showed, however, better correlation coefficients. None of these functions reflected the increasing mineralisation rate of the already present organic matter in soil.

Later, there was no further apparent carbon accumulation. A steady state equilibrium can be supposed in this time period, which might be characterised by a slightly declining regression line.

Accumulated organic matter decomposition occurred later on, when no further manuring was applied.

Slight decrease (about 0.1% C_{ox}) of the carbon concentration occurred in control and mineral fertilised variants over the whole time of the experiment. This decrease was about doubled in the tilled variants.

Organic manuring increased basal respiration rate, mainly in the stationary time period. Average respiration rate was more or less the same in control and mineral fertilised variants in the first period. It increased in all these variants during the stationary phase and dropped down in the third period.

Potential respiration (NG) has shown similar trends as those for the basal respiration. The most remarkable result is the drop down of the potential respiration rate in mineral fertilised variants in the second time period, already. This is an evident change in the soil functionality caused by high doses of mineral fertilisers.

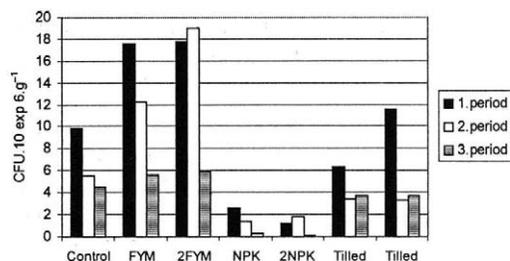
Average values of the biomass carbon in the third period resembles the basal respiration rate and total carbon content in soil. The amount of biomass carbon per unit of the total oxidisable carbon was similar in organic and control variants, while it was depressed in mineral fertilised variants.

Organic manuring increased the average number of bacteria about twice, as compared to unfertilised controls, while mineral fertilisation decreased their number to about a half of that in controls.

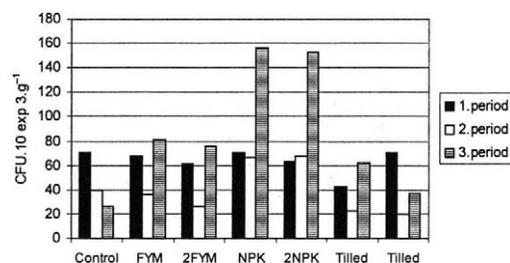
Number of bacteria dropped down in organic variants to the values determined in controls in the third period, when no further manuring was applied.

Number of micromycetes was much less affected by organic manuring and mineral fertilisation. Its number increased in mineral fertilised variants in the third period.

Incidence of bacteria in soil samples was evidently dependent on the presence of fresh organic matter rather than on the total carbon content in soil.



11. Average number of bacteria determined on Thornton agar in time periods



12. Average number of micromycetes determined on Jensen agar in time periods

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Agriculture, Czech Republic (project No. EP0960006470).

REFERENCES

- Alten F., Wandrowski B., Knippenberg E. (1935): Beitrag zur Humusbestimmung. *Ergebn. Agrikulturchem., IV B*: 61–69.
- Körschens M. (1994): Der Statische Düngungsversuch Bad Lauchstädt nach 90 Jahren. Stuttgart-Leipzig, B. G. Teubner Verlagsgesellschaft: 179.
- Körschens M. (1997): Die wichtigste Dauerversuche der Welt. Übersicht, Bedeutung, *Ergebn. Arch. Acker- Pfl.-Bau Bodenkd.*, 42: 157–168.
- Novák B., Apfelthaler R. (1971): Effect of manuring and fertilizing on carbon and nitrogen transformations in soil. *Studies about Humus. Transact. Int. Symp. Humus et Planta V, Praha*: 73–76.
- Novák B., Bönischová S., Apfelthaler R., Pokorná-Kozová J. (1971): Effect of manuring and fertilizing on the biochemical properties of soil. *Studies about Humus. Transact. Int. Symp. Humus et Planta V, Praha*: 77–80.
- Vance E. D., Brookes P. C., Jenkinson D. S. (1987): An extraction method for measuring soil microbial biomass carbon. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 703–707.

Received on March 25, 1999

Contact Address:

Ing. Jaromír Kubát, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: 02/33 02 23 53, fax: 02/33 31 06 36, e-mail: kubat@hb.vurv.cz

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zasílaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Pérovky mohou být zpracovány jako předloha pro skenování nebo mohou být dodány též jako bitmapa ve formátu *.TIF (600 DPI). Pro skenování by grafy neměly obsahovat šedivé plochy. Místo šedi se mohou použít různé typy černobílého šrafování.

Jestliže jsou **grafy vytvořeny v programu EXCEL**, je potřeba je dodat uložené v tomto programu (nestačí grafy naimportované do programu WORD).

Obrázky **nezasílejte** ve formátu **Harvard Graphics**, nýbrž vyexportované do některého z výše uvedených formátů.

ORGANIC NITROGEN CYCLE, AMMONIFICATION AND NITRIFICATION ACTIVITY IN LONG-TERM FIELD EXPERIMENT

CYKLUS ORGANICKÉHO DUSÍKU, AMONIFIKAČNÍ A NITRIFIKAČNÍ AKTIVITA V DLOUHODOBÉM POLNÍM POKUSU

J. Kubát, J. Nováková, D. Cerhanová, R. Apfelthaler

Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: Results concerning carbon cycle, incidence of microorganisms and respiration activity of the bare fallow field experiment in Prague-Ruzyně were presented in our previous paper (Kubát et al., 1999). This paper summarises results concerning nitrogen cycle, incidence of microorganisms participating in the nitrogen cycle and ammonification and nitrification activities. High doses of organic manure increased the soil organic nitrogen content, similarly to the organic carbon content. Nitrogen accumulation in these plots has shown the same dynamics as the organic carbon accumulation. Similar trends were also demonstrated for other variants over the whole time of the experiment. The results have shown that nitrogen cannot be accumulated in soil for a longer time period except in the soil organic matter. All mineral nitrogen applied to the mineral fertilised plots was lost. The increase of the C/N ratio in control and mineral fertilised variants indicates the fact that nitrogenous components of the soil organic matter are more vulnerable to decomposition than those not containing nitrogen in its molecule. This supports the hypothesis concerning the peripheric nitrogenous components of the humic acids molecules. Organic manuring increased the average number of proteolytic bacteria, while mineral fertilisation decreased their number to about a half of that in control. Their number dropped down in organic variants in the third period to a level at the control, while the inhibitory effect of mineral fertilisation on these bacteria was maintained. Average number of the free living N_2 -fixing bacteria was lower in tilled variants as compared to non-tilled control and it decreased continuously over the whole time of the experiment. These bacteria were almost eliminated in mineral fertilised soils. Average ammonia concentrations in organic manured plots were the highest during the second (steady state) period in which the net nitrogen mineralisation increased. Proteolytic activity correlated quite well with the number of proteolytic bacteria in soil samples. Mineral fertilisation decreased proteolytic activity in soil samples to less than a half of that in controls. Nitrate nitrogen content in soil samples has shown basically the same trends as those of the ammonia nitrogen. Nitrification activity has shown a positive effect of organic manuring and inhibitory effect of extremely high doses of mineral fertilisation on this activity.

Keywords: long-term field experiments; organic nitrogen cycle; proteolytic bacteria; ammonification activity; nitrification activity

ABSTRAKT: Výsledky dlouhodobého pokusu, týkající se koloběhu uhlíku, výskytu mikroorganismů a respirační aktivity, byly popsány v předchozím sdělení (Kubát et al., 1999). Tento příspěvek sumarizuje výsledky týkající se koloběhu dusíku, výskytu mikroorganismů účastnících se koloběhu dusíku, amonifikační a nitrifikační aktivity. Vysoké dávky organického hnojení zvýšily obsah organického dusíku v půdě, podobně jako organického uhlíku. Akumulace organického dusíku v těchto variantách vykazovala stejnou dynamiku jako v případě organického uhlíku. Podobné trendy se projevíly také v ostatních variantách během celé doby trvání pokusu. Výsledky ukázaly, že dusík nemůže být dlouhodobě v půdě akumulován jinak než v půdní organické hmotě. Veškerý minerální dusík, který byl aplikován v průběhu pokusu na minerálně hnojených parcelách, byl z půdy ztracen (v procesech nitrifikace, vyplavování, denitrifikace apod.). Zvýšení poměru C/N v kontrole, překopávaných variantách a ve variantách minerálně hnojených ukazuje, že dusíkaté součásti půdní organické hmoty jsou náchylnější k rozkladu a mineralizaci než součásti bez dusíku. To potvrzuje hypotézu, že dusíkaté sloučeniny tvoří periferní součásti molekul huminových kyselin. Organické hnojení zvýšilo průměrné počty proteolytických bakterií v půdě, zatímco minerální hnojení je snížilo přibližně na polovinu oproti kontrole. Průměrné počty proteolytických bakterií v organicky hnojených variantách poklesly ve třetí časové periodě (po ukončení organického hnojení) na úroveň kontroly, zatímco inhibiční vliv minerálního hnojení na tuto skupinu bakterií přetrvával ve variantách dříve minerálně hnojených. Průměrné počty volně žijících diazotrofních bakterií byly nižší v překopávaných variantách než na kontrole během celé doby trvání pokusu. Tyto bakterie byly téměř eliminovány v minerálně hnojených variantách. Průměrné hodnoty koncentrace amonného iontu v organicky hnojených variantách byly nejvyšší v období dynamické rovnováhy (druhá časová perioda), kdy čistá mineralizace dusíku byla nejvyšší. Proteolytická aktivita korelovala s výskytem proteolytických bakterií. Minerální hnojení snížilo tuto aktivitu na méně než

polovinu oproti kontrole. Obsah nitrátového dusíku v půdních vzorcích vykazoval v podstatě stejné trendy jako obsah amonického dusíku. Výsledky stanovení nitrifikační aktivity potvrdily pozitivní vliv organického hnojení a inhibiční vliv vysokých dávek minerálního hnojení na tuto aktivitu.

Klíčová slova: dlouhodobé polní pokusy; cyklus organického dusíku; proteolytické bakterie; amonifikační aktivity; nitrifikační aktivity

INTRODUCTION

Organic carbon cycle, incidence of microorganisms and their respiration activity in the long-term bare fallow field experiment were described in our previous paper (Kubát et al., 1999). Organic nitrogen cycle, ammonification and nitrification activity and the incidence of bacteria participating at the organic nitrogen transformations in soil are presented in this paper.

MATERIAL AND METHODS

The bare fallow field experiment was described in our previous paper (Kubát et al., 1999). Soil samples have been taken twice a year till 1979 and once a year since that time. Depth of sampling was 20 cm in all plots. Immediately after sampling, the soil samples were sieved through 2 mm sieve and several analyses were performed, e.g. numbers of microorganisms by the plate dilution method, determination of ammonia nitrogen, proteolytic activity and nitrate nitrogen according to Pokorná et al. (1964). Nitrification activity was determined according to Apfelfthaler (1992). The results were calculated to oven dry matter. Organic carbon was determined in air dried soil samples by Kjeldahl method and with Leco analyser since 1995.

RESULTS AND DISCUSSION

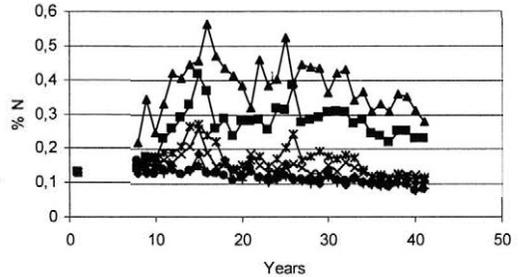
Total and organic nitrogen content in soil

Nitrogen cycle was similar to that of the organic carbon cycle. There was a higher total mineral nitrogen content in fertilised plots till 1989 due to the annual input of mineral nitrogen fertilisation (Fig. 1).

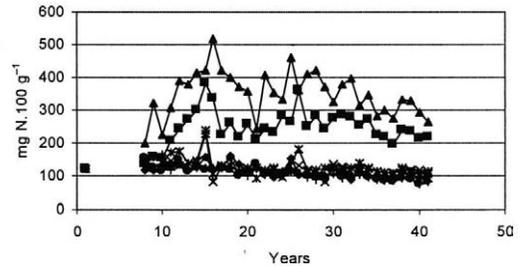
We have, therefore, subtracted mineral nitrogen content to get the values of the organic nitrogen, results are presented in Fig. 2.

Organic manured variants have shown an organic nitrogen accumulation period during the first 13 years of the experiment similar to the organic carbon accumulation. These accumulation processes were the best characterised by polynomial function, as well (Fig. 3). Similarity to the organic carbon accumulation exists in correlation coefficients for other functions that are presented in Tab. I, as well.

Organic nitrogen content in soil in the second period that was supposed to be a steady state period is presented in Fig. 4. Regression line is slightly declining,



1. Total nitrogen content in soil samples from individual plots



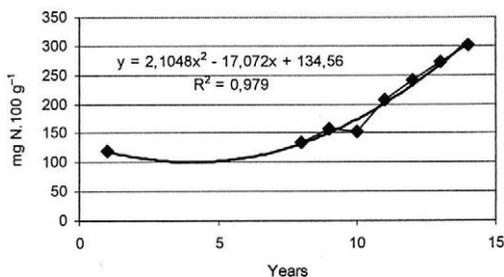
2. Organic nitrogen content in soil samples from individual plots

- Control
- FYM
- ▲— 2FYM
- ×— NPK
- *— 2NPK
- Tilled
- +— Tilled

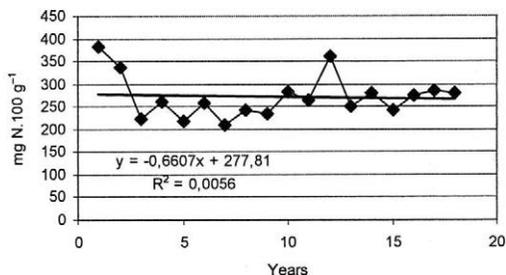
similarly to that for organic carbon. The same was true for the third (decline) period, in which the drop down of the organic nitrogen content was similar to that of the organic carbon. Results are shown in Fig. 5. Correlation coefficient for the exponential regression curve is, however, lower than that for the organic carbon values.

Organic nitrogen content in soil in the control plot over the whole time of the experiment is shown in Fig. 6. Exponential regression curve and an appropriate correlation coefficient were calculated of the experimental data. The value of the correlation coefficient is higher than that for the organic carbon content in this plot, so the fit was better.

Organic C/N ratio varied over the time, however, linear regression shows an increase in the control and

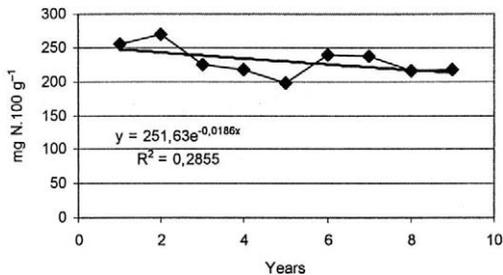


3. Organic nitrogen accumulation in the initial period of the experiment in plot II

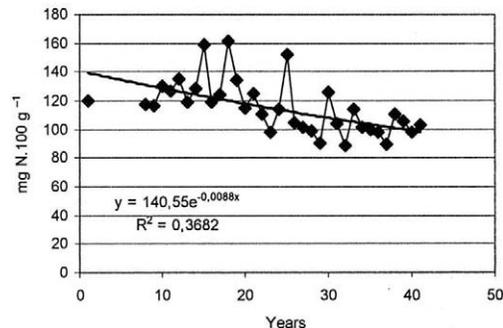


4. Organic nitrogen content in soil in the second (steady state) period in plot II (FYM)

mineral fertilised plots, while the C/N ratio was slightly decreasing in organic manured plot. This was probably due to the fact that the humification processes in the organic manured plot were not yet completed at the time of sampling. In the third time period, when no further manure was applied, C/N ratio dropped down in this plot. As calculated from the regression lines, C/N ratio varied between 8.5 and 12.5 in the control plot and in a narrower range in the other plots. Results are presented in Fig. 7 and Tab. II.



5. Organic nitrogen content in soil in the third (decline) period in plot II (FYM)



6. Organic nitrogen content in soil in the control variant over the whole time of the experiment and exponential regression of the values obtained

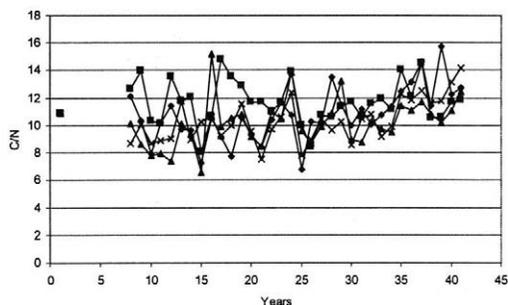
The results presented show that nitrogen cannot be accumulated in soil for a longer time period except in the soil organic matter. All mineral nitrogen applied to the mineral fertilised plots was lost via nitrification and following leaching or denitrification or, perhaps, via other processes of nitrogen transformation and transport.

I. Regression functions of the organic carbon accumulation in FYM plot (II) in the first time period (1958 to 1971)

| Function | Equation (nitrogen) | R ² nitrogen | R ² carbon |
|-------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Linear | $Y = 13.925x + 62.803$ | 0.6997 | 0.6537 |
| Power | $Y = 105.54x^{0.2788}$ | 0.4915 | 0.509 |
| Logarithmic | $Y = 50.558\ln(x) + 93.247$ | 0.4142 | 0.4148 |
| Exponential | $Y = 91.89e^{0.0738x}$ | 0.764 | 0.7243 |
| Polynomial | $Y = 2.1048x^2 - 17.072x + 134.56$ | 0.979 | 0.86 |

II. Linear regression of the C/N ratio in four selected variants of the long-term bare fallow field experiment over the whole time of the experiment

| Variant | Equation | R ² | C/N range |
|---------|-------------------------|----------------|---------------|
| Control | $Y = 0.0961x + 8.4555$ | 0.2766 | 8.45 - 12.4 |
| FYM | $Y = -0.0012x + 11.708$ | 0.0007 | 11.66 - 11.71 |
| NPK | $Y = 0.0524x + 8.9402$ | 0.0981 | 8.94 - 11.09 |
| Tilled | $Y = 0.0727x + 8.6046$ | 0.2533 | 8.60 - 11.58 |



7. Organic C/N ratio in four selected variants of the long-term bare fallow field experiment over the whole time of the experiment

- ◆ Control
- FYM
- ▲ NPK
- × Tilled

The increase of the C/N ratio in control and mineral fertilised variants indicates the fact that nitrogenous components of the soil organic matter are more vulnerable to decomposition than those not containing nitrogen in its molecule. This supports the hypothesis concerning the nitrogenous peripheral components of the humic acids molecules.

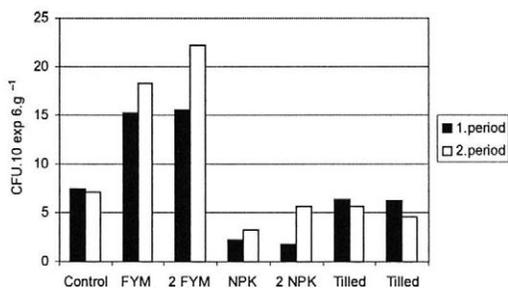
Number and composition of soil microorganisms

Numbers of several groups of microorganisms were determined by plate dilution technique. Those directly contributing to the nitrogen cycle are mentioned in this paper: proteolytic bacteria growing on meat-peptone agar, spore-forming bacteria on meat peptone agar and free-living N_2 -fixing bacteria on Ashby agar.

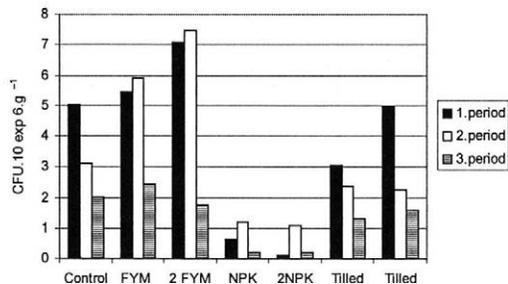
The values determined over the whole time of the experiment were grouped in three time periods according to the soil organic carbon and nitrogen accumulation in organic manured variants mentioned above. Fig. 8 shows the average number of proteolytic bacteria. This group was not determined after 1989, so the average number for the first two periods only are presented in Fig. 8.

Organic manuring increased the average number of proteolytic bacteria about twice, as compared to unfertilised controls, while mineral fertilisation decreased its number to about a half of that in control. Tillage slightly decreased their number, probably due to a higher mineralisation rate in tilled soils.

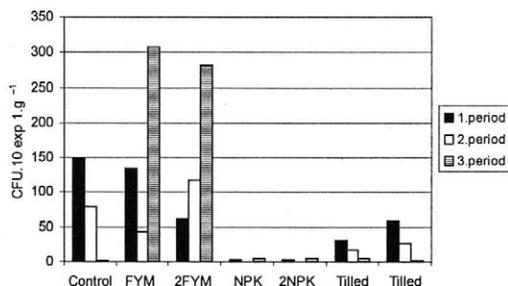
The next group were spore-forming bacteria, average number of which is presented in Fig. 9. This group of bacteria has been determined over the whole time of the experiment. Effect of organic manuring and mineral fertilisation on this group of bacteria was similar to that on the total proteolytic bacteria mentioned above. The most remarkable result probably is the drop down of these bacteria number in organic variants in the third period. The values are approximately the same as in the



8. Average number of proteolytic bacteria growing on meat-peptone agar in time periods



9. Average number of spore forming bacteria growing on meat-peptone agar in time periods



10. Average number of the free-living N_2 -fixing bacteria (azotobacters) growing on Ashby agar in time periods

controls in this period. Number of spore-forming bacteria dropped down in controls in the second and third period, maybe due to the diminishing content of the easily decomposable organic substances. Number of spore forming bacteria in mineral fertilised variants is about five times lower, compared to controls, indicating a detrimental effect of high doses of mineral fertilisers on this group of soil bacteria.

The last group of bacteria determined over the whole experiment was so-called azotobacters cultivated on Ashby agar. The values are presented in Fig. 10.

Average number of azotobacters was lower in tilled variants as compared to not tilled control and it decreased continuously over the whole time of the experi-

ment. The reason may be the diminuation of the easily decomposable organic matter that is a source of energy for elemental nitrogen fixation by these bacteria. These bacteria were almost eliminated in mineral fertilised soils.

In organic manured variants the azotobacters number was similar to that in not tilled control in first and second period, however, it doubled in the third period, in which no further manure was added. This is a surprising result regarding the changes in number of the other bacteria. Soil organic matter mineralisation should release enough mineral nitrogen (C/N ratio being close to 10), however, enough organic substrate (source of energy) a very good soil structure in these plots, aeration and drainage may have created suitable conditions for this group of bacteria. The drop down of azotobacters number in control plots in the third period is, no doubt, connected with the lack of organic substrate and thus source of energy.

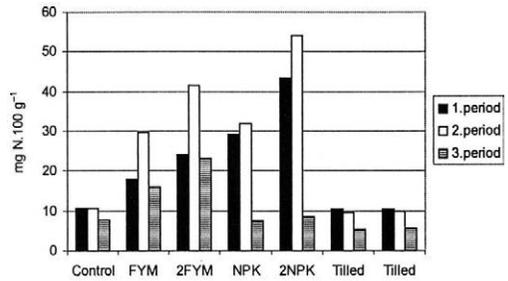
Ammonification and nitrification activity

Two important processes of the nitrogen cycle were measured over the whole time of the experiment: ammonification and nitrification. Average ammonia nitrogen content in soil samples in time periods is presented in Fig. 11. Its average concentration was almost the same in the control and tilled variants in the first and second time period and dropped down in the third period more deeply in the tilled variants than in the control. This corresponds with the mineralisation of the decomposable organic matter and limiting the turnover rate in the tilled variants.

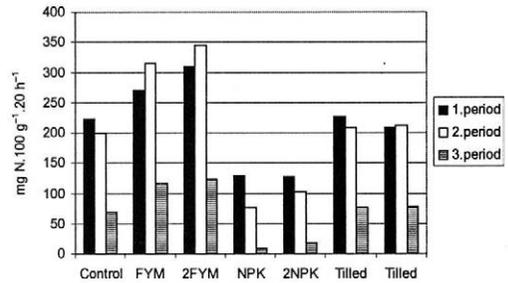
Average ammonia concentration in mineral fertilised variants was the highest due to the annual application of ammonia sulphate (till 1971) and urea (till 1989). It dropped down at the level of the control in the third time period, confirming the above-mentioned statement that mineral nitrogen cannot be accumulated in soil for a longer time period.

Nevertheless, it is worth of mentioning that the basic dose of mineral fertilisers caused about the same level of ammonia concentration in the first and second time period, while this was not true for the double dose (2NPK). The explanation might be in an enhanced inhibition of nitrification in the second time period in this variant.

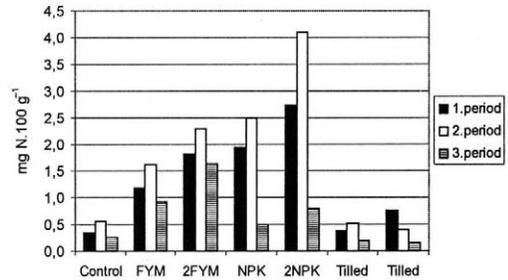
Average ammonia concentrations in organic manured plots are, however, the most interesting. They are approximately the same at the first and the third time period, in the double dose variant (2FYM) being, of course, higher (Fig. 11). In both variants, the average ammonia concentrations are the highest in the second time period. This result corresponds very well with the concept of the three time periods: accumulation, steady state and mineralisation ones. Part of the organic nitrogen applied during the accumulation period was accumulated and a part of it was subject of the net mineralisation. Under the conditions of steady state, gross



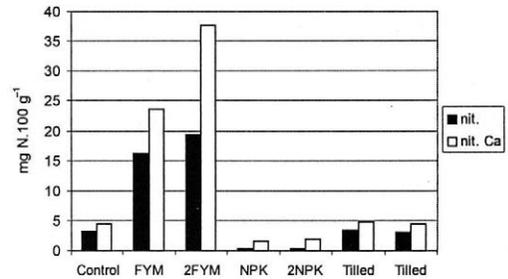
11. Average content of ammonia nitrogen in soil samples in time periods



12. Average values of proteolytic activity of soil microflora in soil samples in time periods



13. Average content of nitrate nitrogen in soil samples in time periods



14. Average values of the potential nitrification activity with and without addition of calcium carbonate in the third time period

mineralisation increased, while the input remained the same. That is why the net nitrogen mineralisation increased and ammonia concentration was elevated in this time period.

Ammonification (proteolytic) activity was measured by means of the ammonium determination in soil samples amended with peptone after 20 hours incubation at 28 °C. Average values in individual time periods are presented in Fig. 12.

Proteolytic activity is mediated mainly by proteolytic bacteria. It correlates quite well with the number of proteolytic bacteria in soil samples. Organic manuring increased the average values of proteolytic activity, as compared to unfertilised controls in the first and the second time period, similarly to the number of the proteolytic or sporeforming bacteria. Proteolytic activity dropped down in the third time period in the organic manured variants, similarly to number of the same bacteria. Mineral fertilisation decreased proteolytic activity in soil samples to less than a half of that in controls.

The drop down of the values of the proteolytic activity of control and tilled variants in the third period, may be due to the diminishing content of the easily decomposable organic substances and lower number of the proteolytic bacteria.

Nitrate nitrogen content in soil samples is presented in Fig. 13. Its average concentration has shown basically the same trends as those of the ammonia nitrogen. All that has been told about ammonia nitrogen dynamics over the whole time of the experiment can be almost at the same way repeated about the nitrate nitrogen dynamics.

Nitrification activity was measured in the third time period only, either with the addition of calcium carbonate or without its addition. The average values are presented in Fig. 14. Nitrification activity reflected very well the soil biological activity and the soil quality. The distinct differences between organic manured variants and control, as well as between control and mineral fertilised variants are a remarkable indication of the beneficial organic manuring effect on the nitrification activity in soil and inhibitory effect of extremely high doses of mineral fertilisation on this.

CONCLUSIONS

High doses of organic manure increased the soil organic nitrogen content, similarly to the organic carbon content. Nitrogen accumulation in these plots has shown the same dynamics as the organic carbon accumulation.

Similar trends were also demonstrated for other variants over the whole time of the experiment.

The results have shown that nitrogen cannot be accumulated in soil for a longer time period except in the soil organic matter. All mineral nitrogen applied to the mineral fertilised plots was lost.

The increase of the C/N ratio in control and mineral fertilised variants indicates the fact that nitrogenous components of the soil organic matter are more vulnerable to decomposition than those not containing nitrogen in its molecule. This supports the hypothesis concerning the peripheral nitrogenous components of the humic acids molecules.

Organic manuring increased the average number of proteolytic bacteria, while mineral fertilisation decreased their number to about a half of that in control. Their number dropped down in organic variants in the third period to a level at the control, while the inhibitory effect of mineral fertilisation on these bacteria was maintained.

Average number of the free living N₂-fixing bacteria was lower in tilled variants as compared to not tilled control and it decreased continuously over the whole time of the experiment. These bacteria were almost eliminated in mineral fertilised soils.

Average ammonia concentrations in organic manured plots were the highest during the second (steady state) period in which the net nitrogen mineralisation increased.

Proteolytic activity correlated quite well with the number of proteolytic bacteria in soil samples. Mineral fertilisation decreased proteolytic activity in soil samples to less than a half of that in controls.

Nitrate nitrogen content in soil samples has shown basically the same trends as those of the ammonia nitrogen.

Nitrification activity has shown a positive effect of organic manuring and inhibitory effect of extremely high doses of mineral fertilisation on this activity.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Agriculture, Czech Republic (project No. EP0960006470).

REFERENCES

- Apfelthaler R. (1992): Metodiky stanovení chemických a biochemických charakteristik půdy. Metodiky OBP VÚRV, Praha.
- Kubát J., Nováková J., Mikanová O., Apfelthaler R. (1999): Organic carbon cycle, incidence of microorganisms and respiration activity in long-term field experiment. Rostl. Vyr., 45 (9): 389–395.
- Pokorná-Kozová J., Löbl F., Apfelthaler R., Novák B. (1964): Zur Methodik der Feststellung der Ammonifizierung in Bodenproben. Zbl. Bakt. II, 118: 368–373.

Received on March 25, 1999

Contact Address:

Ing. Jaromír Kubát, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: 02/33 02 23 53, fax: 02/33 31 06 36, e-mail: kubat@hb.vurv.cz

P-SOLUBILIZAČNÍ AKTIVITA KMENŮ RODU *RHIZOBIUM*

P-SOLUBILIZATION ACTIVITY OF *RHIZOBIUM* SPECIES STRAINS

G. Štorkánová¹, K. Voříšek¹, O. Mikanová², D. Randová¹

¹Czech University of Agriculture, Praha, Czech Republic

²Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: An occurrence of soil microorganisms, which are able to solubilize hard-soluble inorganic P-compounds, is known for a long time from works of many authors (Sperber, 1958; Barea et al., 1976; Illmer, Schinner, 1992). An attention was given also to bacteria species *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, which are used in agriculture as N₂-fixators (Halder et al., 1991; Mikanová, Kubát, 1994; Mikanová et al., 1995). Phosphorus is an essential macrobiogenic element for plant growth and development, it has an important effect on photosynthesis, nitrogen fixation, crop maturation, root development and improvement of crop quality. The total amount of phosphorus in soil ranges from 0.01 to 0.5%, but only a small part (0.05 to 0.07%) from this total content is available to plants (Goldstein, 1986). One of the possibilities for the enhancement of available supply of phosphorus in soil is the inoculation of legumes with P-solubilizing strains *Rhizobium* or *Bradyrhizobium*. In the present work, 12 strains of *Rhizobium* have been tested for their ability to solubilize hardly soluble inorganic phosphate as affected by the different level of water-soluble phosphate in the liquid submersed stationary cultures. The strains D1, D17, D27, D39, D47, D55, D57, D559, D560, D562, D564 and D656 originated from the collection of rhizobia at the Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně. 1 ml of inoculum was pipetted into 30 ml sterile nutrient solution (glucose 10 g, asparagin 1 g, K₂SO₄ 0.2 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, yeast extract 0.2 g to 1 l of distilled water) supplemented with 20 mg Ca₃(PO₄)₂ and such amount of KH₂PO₄ that final concentration of the solution was 0, 5, 10 and 30 mmol.l⁻¹ and by the more detailed evaluation 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 and 20 mmol.l⁻¹. The pH value of medium was adjusted by 5% KOH to 6.8. Erlenmayer flasks were cultivated for seven days at the temperature 28 ± 1 °C. After the incubation, the pH value in medium was determined, as well as the content of soluble phosphorus (Murphy, Riley, 1962; Macháček, Kotek, 1987). Seven strains did not solubilize mineral tricalcium phosphate. The strains D560, D562 and D656 were able to solubilize tricalcium phosphate only without presence of the soluble source of phosphorus. Two strains D559 and D564, having ability to solubilize Ca₃(PO₄)₂ also by the 5 mmol.l⁻¹ concentration of soluble phosphate in medium, were investigated in more details. Strain D559 showed the statistically significant ability of P-solubilization at following levels of KH₂PO₄ concentrations: 0, 2.5, 5, 7.5 mmol.l⁻¹, strain D564 by 0, 2.5, 5 mmol.l⁻¹. P-solubilization was linked with the statistically significant decrease of pH value.

Keywords: phosphate solubilization; influence of soluble phosphate; *Rhizobium*

ABSTRAKT: V tekutých submerzních kulturách s přidavkem Ca₃(PO₄)₂ a o různé koncentraci rozpustného fosfátu (0, 5, 10, 30 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄) byla sledována P-solubilizační schopnost 12 kmenů rodu *Rhizobium*. Po týdenní kultivaci byl v médiu stanoven obsah rozpuštěného fosfátu a změněno pH a výsledek porovnán s kontrolou. U sedmi testovaných kmenů nedošlo ke zvýšení hladiny přístupného fosfátu. Kmeny D560, D562 a D656 byly schopny solubilizovat tricalciumfosfát pouze za nepřítomnosti snadno přístupného zdroje fosforu v médiu. Dva kmeny D559 a D564, které byly P-solubilizačně aktivní i při 5 mmol.l⁻¹, byly testovány podrobněji. Kmen D559 projevil statisticky významnou schopnost P-solubilizace při koncentracích 0, 2,5, 5 a 7,5 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, kmen D564 pouze při 0, 2,5 a 5 mmol.l⁻¹. P-solubilizace byla spojena se statisticky významným snížením hodnoty pH.

Klíčová slova: solubilizace fosfátu; vliv rozpustných fosforečnanů; *Rhizobium*

ÚVOD

Výskyt půdních mikroorganismů, schopných rozpouštět těžko rozpustné minerální sloučeniny fosforu, je znám již dlouhou dobu z prací mnoha autorů (Sperber, 1958; Barea et al., 1976; Illmer, Schinner, 1992). Tato schopnost byla zjištěna např. u rodu *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Bacillus* nebo *Penicillium*. Pozornost byla věnována i testaci bakterií rodu *Rhizobium* a *Bradyrhizobium*, které jsou zeměděl-

sky využívány pro jejich N₂-fixační aktivitu a u nichž by schopnost P-solubilizace byla dalším přínosem (Halder et al., 1991; Mikanová, Kubát, 1994; Mikanová et al., 1995).

Fosfor patří mezi nezastupitelné makrobiogenní prvky, nezbytné pro růst a vývin rostlin; ovlivňuje fotosyntézu, fixaci N₂, vývin kořenů, kvetení, tvorbu plodů i kvalitu plodin. I když rostliny mohou fosfor snadno reutilizovat, neexistuje u nich možnost (s výjimkou plodů) vytváření větších rezerv pro následné využití, z če-

hož vyplývá nutnost stálého příjmu fosforu v průběhu celé ontogeneze. Celkové množství fosforu v půdě kolísá od 0,01 do 0,5 %, přičemž pouze malá část (0,05 až 0,07 %) z tohoto celkového obsahu je rostlinami přijatelná (Goldstein, 1986).

Alternativou ke hnojení fosforečnými hnojivými (které má ekologická i ekonomická úskalí) pro zajištění dostatečného množství fosforu v půdním roztoku je snaha o získání a aplikaci takových kmenů mikroorganismů, které by zpřístupňovaly fosfor rostlinám a udržely si tuto schopnost i při vyšších hladinách rozpustného fosforu v půdě, a to v delším časovém horizontu.

MATERIÁL A METODA

Pro testování P-solubilizační aktivity v tekutých submerzních stacionárních kulturách byly použity kmeny

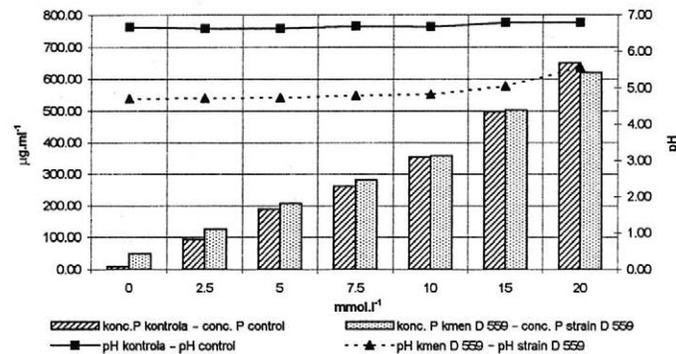
rodu *Rhizobium* (D1, D17, D27, D39, D47, D55, D57, D559, D560, D562, D564, D656), které pocházejí ze sbírky Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. 1 ml inokula daného kmenu byl zaočkován do 30 ml sterilního živného roztoku (P-bujon: glukóza 10 g, asparagin 1 g, K_2SO_4 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,4 g, kvasničný autolyzát 0,2 g na 1 l destilované vody) s přidavkem 20 mg $Ca_3(PO_4)_2$ a s takovým množstvím KH_2PO_4 , aby výsledná koncentrace roztoku byla 0, 5, 10, resp. 30 $mmol \cdot l^{-1}$, případně při podrobnějším hodnocení 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, resp. 20 $mmol \cdot l^{-1}$. Hodnota pH byla upravena 5% KOH na 6,8 (měřeno pH-metrem). Každá varianta měla tři opakování. Erlenmayerovy baňky byly kultivovány sedm dní při teplotě 28 ± 1 °C za občasného promíchání. Po skončení kultivace bylo u kultur stanoveno pH a množství rozpuštěného fosforu postupem s molybdenanem amonným a kyselinou askorbovou

I. Schopnost solubilizace $Ca_3(PO_4)_2$ v tekuté kultuře s přidavkem KH_2PO_4 u kmenů rodu *Rhizobium* – *Rhizobium* tricalciumphosphate solubilization in liquid culture with KH_2PO_4 addition

| Kmen ¹ | Změna koncentrace rozpuštěného P v médiu působením kmenu ² ($\mu g \cdot ml^{-1}$) | | | | Změna pH média působením kmenu ³ | | | |
|-------------------|---|---------|---------|----------|---|--------|--------|-------|
| | koncentrace KH_2PO_4 v médiu před inkubací ⁴ ($mmol \cdot l^{-1}$) | | | | | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 30 | 0 | 5 | 10 | 30 |
| D1 | -7,92* | -35,00* | -38,33* | -46,67 | 0,92* | -0,25* | -0,20* | 0,03 |
| D17 | -6,83* | -32,50 | -1,67 | -33,33 | 0,92* | -0,21* | -0,13* | 0,05 |
| D27 | -6,00* | -31,67* | -30,00* | 0,00 | 0,11 | -0,27* | -0,14* | 0,02 |
| D39 | -7,00* | -34,17* | -46,67* | -73,33* | 0,46* | -0,22* | -0,15* | 0,01 |
| D47 | -6,67* | 37,50 | 136,67 | -250,00 | 0,35 | -0,22* | -0,09 | 0,06* |
| D55 | -5,67 | -28,33* | -40,00* | -20,00 | 0,57* | -0,31* | -0,36 | 0,42 |
| D57 | -9,17* | -34,17* | -48,33* | -126,67* | 1,04* | -0,13* | 0,06 | 0,16* |
| D559 | 42,75* | 22,92* | 20,00 | -26,67 | -1,78* | -1,68* | -1,71* | 0,07 |
| D560 | 24,25* | 2,50 | -38,33 | 0,00 | -1,78* | -2,08* | -1,41* | -0,09 |
| D562 | 47,00* | 15,00 | -10,83 | 0,00 | -1,91* | -1,72* | -1,80* | -0,02 |
| D564 | 37,17* | 23,33* | 6,67 | -53,33 | -1,90* | -1,65* | -1,72* | 0,14 |
| D656 | 29,25* | 4,17 | -40,00 | 0,00 | -1,78* | -2,05* | -1,77* | -0,44 |

* statisticky významná změna ($\alpha \leq 0,05$) v porovnání s neinokulovanou kontrolou – statistically significant change ($\alpha \leq 0,05$) compared with non-inoculated control

¹strain, ²solved P changes after *Rhizobium* strains incubation, ³pH changes after *Rhizobium* strains incubation, ⁴ KH_2PO_4 concentration in liquid medium before incubation



1. P-solubilizační aktivity rodu *Rhizobium* (kmen D559) – Tricalciumphosphate solubilization activity of *Rhizobium* (strain D559)

osa x: koncentrace KH_2PO_4 – x axis: concentration of KH_2PO_4
osa y vlevo: koncentrace rozpustného P – y axis left: concentration of soluble P

(Murphy, Riley, 1962; Macháček, Kotek, 1987) v supernatantu po desetiminutové centrifugaci při 5 000 otáčkách. Intenzita zabarvení byla změřena na spektrofotometru ULTROSPEC III při vlnové délce 710 nm, pH kultur pomocí pH-metru (ATC pH meter PICCOLO 2). Statistické vyhodnocení bylo provedeno analýzou rozptylu jednoduchého třídění, k podrobnějšímu vyhodnocení byl použit Scheffeho test (PC program SYSTAT).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro zhodnocení P-solubilizační aktivity každého testovaného kmenu bylo směřodlatné jeho porovnání s kontrolou. Pozornost byla věnována případné schopnosti daného kmenu udržet si tuto aktivitu i za podmínek zvyšující se koncentrace přístupného fosforu v médiu. Z 12 testovaných kmenů nedošlo u kterékoli varianty oproti kontrole ke zvýšení hladiny přístupného fosforu, které by bylo staticky významné, u těchto sedmi kmenů: D1, D17, D27, D39, D47, D55 a D57. Naopak u některých variant u těchto kmenů došlo ke statisticky významnému snížení hladiny fosforu v prostředí (tab. I).

Kmeny D560, D562 a D656 byly schopné solubilizovat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ v médiu ve statisticky významné míře za nepřítomnosti KH_2PO_4 , u variant s koncentrací 5, 10 a 30 mmol.l^{-1} rozpustného fosforečnanu již nevykazovaly P-solubilizační aktivitu (tab. I).

Dva kmeny D559 a D564, které solubilizovaly fosfát jak při koncentraci 0 mmol.l^{-1} , tak 5 mmol.l^{-1} KH_2PO_4 v médiu (tab. I), byly dále podrobněji testovány. Kmen D559 projevil statisticky významnou schopnost P-solubilizace při koncentracích KH_2PO_4 0, 2,5, 5 a 7,5 mmol.l^{-1} (tab. II, obr. 1), kmen D564 pouze při 0, 2,5 a 5 mmol.l^{-1} (tab. II, obr. 2). Vyšší hladiny přístupného fosforu v médiu vedly k zastavení P-solubilizační činnosti.

Ve všech uvedených případech byla P-solubilizace spojena se statisticky významným poklesem hodnoty pH. Snížení této hodnoty se ale objevilo i u některých kmenů, u nichž nebylo zjištěno P-solubilizační působení. I když byl někdy tento pokles pH statisticky významný, nedošlo k tak výraznému snížení pH jako u kmenů vykazujících P-solubilizaci.

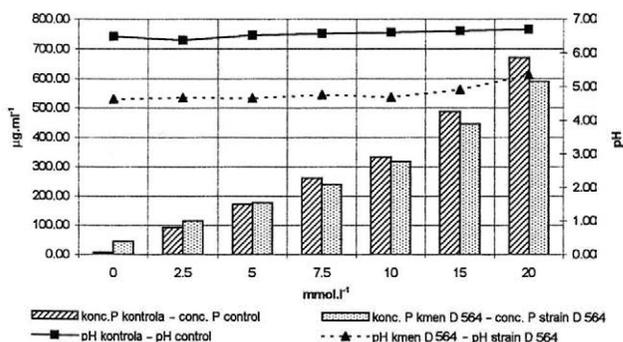
Souvislost mezi mírou P-solubilizace a poklesem pH u rodů *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* publikovali Mikánová, Kubát (1994). Jak uvádějí Halder et al. (1991),

II. Schopnost solubilizace $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ v tekuté kultuře s přidavkem KH_2PO_4 u detailně testovaných kmenů rodu *Rhizobium* – *Rhizobium* tricalciumphosphate solubilization in liquid culture with KH_2PO_4 addition in detail

| Koncentrace KH_2PO_4 v médiu před inkubací ¹ (mmol.l^{-1}) | Změna koncentrace rozpustného P v médiu působením kmenu ² ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) | | Změna pH média působením kmenu ³ | |
|--|--|---------|---|--------|
| | D559 | D564 | D559 | D564 |
| 0 | 40,08* | 36,50* | -1,96* | -1,86* |
| 2,5 | 33,33* | 21,67* | -1,91* | -1,70* |
| 5 | 18,33* | 3,33* | -1,90* | -1,85* |
| 7,5 | 21,25* | -21,55* | -1,90* | -1,80* |
| 10 | 3,33 | -15,00* | -1,83* | -1,91* |
| 15 | 4,17 | -41,67* | -1,73* | -1,74* |
| 20 | -30,00 | -80,00* | -1,23* | -1,34* |

* statisticky významná změna ($\alpha \leq 0,05$) v porovnání s neinokulovanou kontrolou – statistically significant change ($\alpha \leq 0,05$) compared with non-inoculated control

¹ KH_2PO_4 concentration in liquid medium before incubation, ²solved P changes after *Rhizobium* strains incubation, ³pH changes after *Rhizobium* strains incubation



2. P-solubilizační aktivita rodu *Rhizobium* (kmen D564) – Tricalciumphosphate solubilization activity of *Rhizobium* (strain D564)

osa x: koncentrace KH_2PO_4 – x axis: concentration of KH_2PO_4

osa y vlevo: koncentrace rozpustného P – y axis left: concentration of soluble P

P-solubilizace u bakterií rodu *Bradyrhizobium* se přímo vztahovala k poklesu pH média během kultivace a zůstala neovlivněna zvyšující se koncentrací rozpustného fosforu v médiu. Tato skutečnost ale neodpovídá zjištěným autorů, věnujících pozornost genetickým aspektům P-solubilizace. Goldstein (1986) předpokládá u bakterií existenci genů pro solubilizaci minerálních fosfátů, přičemž nízká hladina rozpustného fosfátu indukuje a vysoká potlačuje tuto P-solubilizační schopnost. Vliv vnější hladiny rozpustného fosfátu na aktivitu P-solubilizujících kmenů rodu *Rhizobium* prokazují i naše výsledky.

LITERATURA

- Barea J. M., Navarro E., Montoya E. (1976): Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bact.*, 40: 129–134.
- Goldstein A. H. (1986): Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Amer. J. Alter. Agric.*, 1: 51–57.
- Halder A. K., Mishra A. K., Chakrabarty P. K. (1991): Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 29: 28–31.
- Illmer P., Schinner F. (1992): Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 389–395.
- Macháček V., Kotek J. (1987): Zkušenosti s fotometrickou metodou ke stanovení fosforu. *Agrochémia*, 18: 93–94.
- Mikanová O., Kubát J. (1994): Uvolňování fosforu z málo rozpustných fosfátů půdní mikroflórou. *Rostl. Výr.*, 40: 833–840.
- Mikanová O., Kubát J., Voříšek K., Randová D. (1995): Schopnost kmenů *Rhizobium leguminosarum* zpřístupňovat fosfor. *Rostl. Výr.*, 41: 423–425.
- Murphy J. P., Riley J. R. (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*, 27: 31–36.
- Sperber J. I. (1958): The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Austral. J. Agric. Res.*, 9: 778–781.

Došlo 25. 3. 1999

Kontaktní adresa:

Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc., Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel: 02/24 38 47 54, fax: 02/20 92 03 12, e-mail: vorisek@af.czu.cz

PRACTICAL USE OF P-SOLUBILIZATION ACTIVITY OF RHIZOBIUM SPECIES STRAINS

PRAKTICKÉ VYUŽITÍ P-SOLUBILIZAČNÍ AKTIVITY KMENŮ RODU RHIZOBIUM

O. Mikanová, J. Kubát

Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: Besides the nitrogen fixation, some of the *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains have shown the ability to release soluble phosphates from hardly soluble mineral P compounds. Seven *R. japonicum* and *B. japonicum* strains from the Czech Rhizobia Collection possessing a similar nitrogenase activity and the effectivity of nitrogen fixation were tested for their P-solubilization activity in liquid shaken cultures. Four of them, which had shown a high P-solubilization activity were used for the production of an innovated Rizobin preparation. This preparation was then tested in non-sterile soil in a pot experiment, in comparison with strains without P-solubilization activity and non inoculated control. It was shown that the inoculation of soybean with Rizobin significantly increased the grain yield in all variants of P fertilization, in comparison with non inoculated control. The same was true when Rizobin inoculation was compared with that inoculated by P-minus strains, except for the variant fertilized by superphosphate. The inoculation with Rizobin also increased the content of labile P in soil at the end of the experiment in variants fertilized by rock phosphate and in non fertilized variant.

Keywords: microbial P-solubilization; *Rhizobium japonicum*; *Bradyrhizobium japonicum*; P fertilization

ABSTRAKT: Některé kmeny rodu *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* mají kromě schopnosti poutat vzdušný dusík také schopnost uvolňovat fosfor z těžko rozpustných minerálních fosfátů. V tekutých třepaných kulturách bylo testováno na P-solubilizační aktivitu sedm kmenů *R. japonicum* a *B. japonicum* (sbírka rhizobií Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Praha-Ruzyně) se srovnatelnou nitrogenázovou aktivitou. Čtyři z kmenů, které vykazovaly vysokou P-solubilizační aktivitu, byly vybrány pro výrobu inovovaného inokulantu Rizobin. Tento inokulant byl testován v nádobovém pokusu ve srovnání s variantou inokulovanou kmeny bez P-solubilizační aktivity a s neinokulovanou kontrolou. Výsledky ukázaly, že inokulace sóji preparátem Rizobin (vyrobeným z kmenů s P-solubilizační aktivitou) zvýšila výnos semen, a to u všech variant hnojení, ve srovnání s neinokulovanou kontrolou. Pokud porovnáme varianty inokulované Rizobinem a varianty inokulované kmeny bez P-solubilizační aktivity, také u nich inokulace Rizobinem zvýšila výnos semen u všech variant, kromě varianty hnojené superfosfátem. Inokulace preparátem Rizobin také zvýšila obsah labilního P v půdě na konci pokusu u varianty hnojené Gafsa fosfátem a u varianty nehnojené.

Klíčová slova: mikrobiální solubilizace P; *Rhizobium japonicum*; *Bradyrhizobium japonicum*; hnojení fosforem

INTRODUCTION

Phosphorus is one of the essential nutrients for the growth and development of plants. Its total content is 0.03 to 0.13% in arable layers in middle European soils which is 1000 to 4000 kg P.ha⁻¹. However, plants and microorganisms must obtain P in a soluble ionic form (Goldstein, 1986). Förster (1983) reported that about 1600 to 2000 kg P.ha⁻¹ is unavailable for plants, 400 to 800 kg P.ha⁻¹ may be available after desorption and only about 0.5 to 1 kg P.ha⁻¹ is in the soil solution. Similar data were mentioned by Goldstein, Liu (1987): only 1/1500 to 1/2000 of the total P present in soil is in solution at any given time and P is almost immobile in the soil. These conditions often make P an important limiting factor for the growth of plants and micro-

organisms in natural environments. The most of the cultivated crops thus require additional soluble P resources to achieve high yields.

The most common practice in supplying crops with P is extensive fertilization by mineral P fertilizers. Problems with this technology include energy-intensive processes and the need for large scale mechanical application. Efficiency of mineral P fertilization is rather low. In the Middle European soils it has been estimated to be 10 to 30%. In fact, 70 to 90% of the added P is transformed into hardly soluble forms, which are practically not available for plants. Besides of the cost of mineral P-fertilizers, the possibility to input higher amounts of toxic elements to soils should be mentioned, in particular, Cd and As. Last but not least, the resources of rock phosphates are limited, and their cost

will grow up when easily available resources will be exhausted.

Both plants and microorganisms evolved highly efficient mechanisms for absorbing mineral phosphates from very dilute solutions. Many plants can achieve maximum growth rates with soil solution P levels of 2 μmol or less (Goldstein, Liu, 1987). In bacteria, there is evidence for inducible phosphate uptake systems and, in addition, some bacteria have evolved an enhanced capability to solubilize exogenous organic and mineral P substances.

It is known, that soil microflora is able to release P from hardly soluble organic and mineral P-substances by several direct and indirect mechanisms (Dommergues, Manganot, 1970). Besides of the associative microflora, the ability to release P from hardly soluble compounds was found also in bacteria of the *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* genera (Halder, Chakrabarty, 1993; Abd-Alla, 1994; Mikanová, Kubát, 1994). These bacteria are commonly used for the inoculation of the legume crops cultivated in the Czech Republic. A commercial preparation Rizobin has been produced for more than 40 years and it is commonly used by farmers. There was an easy possibility to improve this commercial preparation and to introduce the effective P-solubilizing bacteria in the practical use.

MATERIAL AND METHODS

Seven *Rhizobium* and *Bradyrhizobium japonicum* strains from Czech Rhizobia Collection that had shown a high nitrogenase activity were tested in submersion shaken cultures. Inoculum was prepared from the collection strains destined for testing in liquid culture. 1 ml of the inoculum was put into 100 ml of sterile nutrient solution (Domey, 1987), in which 50 mg of non soluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ was added. Cultivation went on in flasks for 7 days at 28 °C by constant shaking. Each variant had three replications. The content of soluble P was determined (Murphy, Riley, 1962; Macháček, Kotek, 1987) at the end of experiment. The pH value of the medium was determined by glass electrode.

Four of the strains tested (D563, D504, D538 and D574) that have shown a high nitrogenase activity and also a high P-solubilization activity were used for the production of an innovated preparation for soybean. The effectivity of this preparation was tested with soybean in a pot experiment in non sterile soil.

Soybean (*Glycine max* L.), variety Marple Arrow, was used as an experimental plant. Soybean was planted into plastic pots filled with 6 kg of sieved soil from the zero plot of the long term field experiment in the Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyně.

Three variants of fertilization and three variants of inoculation were included: 1. Fertilizing with Gafsa rock phosphate in quantity corresponding to 40 kg P.ha⁻¹. 2. Fertilizing with superphosphate in a quantity corresponding to 40 kg P.ha⁻¹. 3. No fertilizing. In each of

these variants the soybean seeds were alternatively inoculated: 1. Inoculated by innovated Rizobin (produced from the strains possessing P-solubilization activity). 2. Inoculated by the mixture of the *Rhizobium* and *Bradyrhizobium japonicum* strains showing low or zero P-solubilization activity, however, a similar nitrogenase activity (P-minus). 3. Not inoculated. Each treatment had six replications. At the end of the experiment, grain yield of soybean and available P in soil were determined (Bray, Kurtz, 1945). Statistic evaluation was done by multiple way variance analysis and consecutive comparison of mean levels by Tukey's method.

RESULTS AND DISCUSSION

Liquid culture. The content of solubilized P in the culture medium after 7 days of incubation is shown in Tab. I.

The strains D563, D504, D538 and D574 have shown a high P-solubilization activity comparable to the most effective associative microorganisms (Mikanová, Kubát, 1994). There was approximately indirect relationship between the content of solubilized P and pH of the medium, after the incubation, indicating, that the drop down of pH was the main P-solubilization mechanisms. The strains D576, D344 and D216 have shown little or no P-solubilization activity, however, a similar nitrogenase activity as the previous ones.

Effectivity of the inoculation by innovated Rizobin. The strains D563, D504, D538 and D574 that have shown both high nitrogenase and P-solubilization activities were used for the production of the commercial preparation Rizobin for soybean. This preparation has been produced for more than 40 years to all legume crops cultivated in the Czech Republic. Until recently, the strains were selected according to the crop yield, number of nodules and the nitrogenase activity. For the innovated Rizobin, the P-solubilization activity of the strains was included.

The innovated Rizobin was tested in pot experiment in comparison to the inoculation by P-minus strains, e.g. strains D576, D344 and D216, that have shown

I. The content of the solubilized P in the culture medium after seven days of incubation

| Strain | Solubilized P (mg P.l ⁻¹) | pH |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-----|
| D563 <i>Rhizobium japonicum</i> | 64.7 | 5.1 |
| D504 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 58.3 | 4.6 |
| D538 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 56.4 | 4.8 |
| D574 <i>Rhizobium japonicum</i> | 43.7 | 7.6 |
| D576 <i>Rhizobium japonicum</i> | 1.8 | 8.6 |
| D344 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 0.0 | 7.7 |
| D216 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 0.0 | 8.2 |
| No inoculation | 6.1 | 7.1 |

II. The average grain yield of soybean and labile P content in soil at the end of the experiment

| Inoculation | Fertilizer | Grain yield (g per pot) | Labile P (mg P.kg ⁻¹) |
|--------------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Rizobin | Gafsa rock P | 42.2 BCD* | 15.0 |
| | superphosphate | 50.2 D | 33.0 |
| | 0 | 48.7 D | 21.0 |
| P-minus strains | Gafsa rock P | 33.6 ABC | 0.3 |
| | superphosphate | 44.8 CD | 41.3 |
| | 0 | 33.2 AB | 4.3 |
| Control (no inoculation) | Gafsa rock P | 25.6 A | 4.7 |
| | superphosphate | 22.5 A | 72.3 |
| | 0 | 23.9 A | 11.3 |

* levels in the column designed by the same letter do not differ in a statistically significant way ($P = 0.05$)

a similar nitrogenase activity and small or no P-solubilization activity. The results are shown in Tab. II. The average grain yield increased by 31.3%, 99.5% and 38.9% in variants fertilized by Gafsa rock phosphate, superphosphate and zero fertilization, respectively, after the inoculation by P-minus strains in comparison to non inoculated control. The yield increase is due to the nitrogen fixation, which was the highest in the variant fertilized by superphosphate (the growth was not limited by the lack of P).

The inoculation by innovated Rizobin, however, further increased the grain yields, in comparison, to the inoculation with P-minus strains. The average grain yield was 25.6%, 12.1% and 31.6% higher in variants fertilized by Gafsa rock phosphate, superphosphate and zero fertilization, respectively. This yield increase can be attributed to the P-solubilization activity of the inoculant.

Besides of the yield increase, the inoculation by the innovated Rizobin increased the labile P content in soil, at the end of the experiment in zero variant and in the variant fertilized by Gafsa rock phosphate. This was not true in the variant fertilized by superphosphate, in which a lot of labile P remained by the end of experiment in the variants inoculated by P-minus strains or in

the non inoculated control. There was also lower grain yield and P-uptake in these variants.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture, Czech Republic (project No. EP0960006468).

REFERENCES

- Abd-Alla M. H. (1994): Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiol.*, 39: 53–56.
- Bray R. H., Kurtz L. T. (1945): Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.*, 59: 39–40.
- Domey S. (1987): Untersuchungen zur mikrobiellen Phosphatmobilisierung in der Rhizosphäre von Winterweizen, Winterroggen und Luzerne. [Dissertation.] Jena, IPE.
- Dommergues Y., Mangenot F. (1970): *Ecologie microbienne du sol*. Paris, Masson et Cie. 796 pp.
- Förster I. (1983): Mikrobielle Phosphormobilisierung im Boden. Halle/Saale, Martin Luther Univ. 78 pp.
- Goldstein A. H. (1986): Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Amer. J. Alter. Agric.*, 1: 51–57.
- Goldstein A. H., Liu S. T. (1987): Molecular cloning and regulation of mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology*, 5: 72–74.
- Halder A. K., Chakrabarty P. K. (1993): Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.*, 38: 325–330.
- Macháček V., Kotek J. (1987): Experiences with a new photometric method for the determination of phosphorus. *Agrochimica*, 18: 93–94. (In Czech)
- Mikanová O., Kubát J. (1994): Phosphorus solubilization from hardly soluble phosphates by soil microflora. *Rostl. Vyr.*, 40: 833–840. (In Czech)
- Murphy J. P., Riley J. P. (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*, 27: 31–36.

Received on March 25, 1999

Contact Address:

Ing. Olga Mikanová, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: 02/33 02 22 73, fax: 02/33 31 06 36, e-mail: mikanova@hb.vurv.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION
Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic
Fax: (00422) 24 25 39 38

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

| Periodical | Number of issues per year |
|---|---------------------------|
| Rostlinná výroba (Plant Production) | 12 |
| Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba) | 12 |
| Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech) | 12 |
| Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics) | 12 |
| Journal of Forest Science | 12 |
| Zemědělská technika (Agricultural Engineering) | 4 |
| Plant Protection Science (Ochrana rostlin) | 4 |
| Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění) | 4 |
| Zahradnictví (Horticultural Science) | 4 |
| Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy) | 6 |

THE FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN IN SOME FABACEAE SPECIES

FIXACE VZDUŠNÉHO DUSÍKU U NĚKTERÝCH DRUHŮ BOBOVITÝCH ROSTLIN

J. Pelikán, J. Hofbauer

Research Institute for Fodder Plants, Ltd., Troubsko, Czech Republic

ABSTRACT: In two replications performed on different dates the fixation of atmospheric nitrogen was measured in some species of the family *Fabaceae*. The first replication involved 48 species and the second 49 species. On the basis of the results obtained the species were divided into four groups. Besides *Lathyrus sativus* the best nitrogen fixers were *Trifolium incarnatum*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium ambiguum* and annual species of *Trifolium resupinatum* and *Trifolium alexandrinum*. In the first replication the tested species of the genus *Lupinus* were very good nitrogen fixers. However, in the second replication these species formed no nodules on the roots. To make the comparison of the species tested more effective it is recommended to calculate nitrogenase activity per 1 g of root dry matter. On the basis of the calculations *Lathyrus sativus*, *Trifolium pratense* 4 n, *Trifolium repens* and *Vicia cracca* were good nitrogen fixers in both replications.

Keywords: *Fabaceae*; nitrogenase activity; atmospheric nitrogen fixation

ABSTRAKT: Ve dvou časových opakováních byla měřena fixace vzdušného dusíku u některých druhů čeledi *Fabaceae*. V prvním časovém opakování šlo o 48 druhů a ve druhém o 49 druhů. Na základě dosažených výsledků byly druhy rozděleny do čtyř skupin. Jako nejlépe fixující se vedle *Lathyrus sativus* ukázaly druhy *Trifolium incarnatum*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium ambiguum* a jednoleté druhy *Trifolium resupinatum* a *Trifolium alexandrinum*. V prvním časovém opakování velice dobře fixovaly zkoušené druhy rodu *Lupinus*. Ve druhém časovém opakování však u těchto druhů nebyly na kořenech zjištěny hlízky. Pro lepší srovnání jednotlivých zkoušených druhů je vhodné přepočítat aktivitu nitrogenázy na 1 g sušiny kořenů. Po tomto přepočtu se v obou časových opakováních ukázaly jako dobře fixující *Lathyrus sativus*, *Trifolium pratense* 4 n, *Trifolium repens* a *Vicia cracca*.

Klíčová slova: *Fabaceae*; aktivita nitrogenázy; fixace vzdušného dusíku

INTRODUCTION

Fixation of atmospheric nitrogen by symbiotically living microorganisms on the roots of plants is an important element in nitrogen cycle in the ecosystem.

The ability to fix atmospheric nitrogen and to enrich a soil with the nutrient for successive crops is very important. Nitrogen fixation has received great attention worldwide. In clover the average N fixation is about $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Marečková, 1983). According to some authors the average N fixation is estimated to be from 100 to $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Nitrogen obtained in this way is very cheap and therefore there is an effort to exploit this character. In introducing new species into cultivation under the conditions of the Czech Republic it is essential to know the situation of fixation at the time of introduction of the species.

MATERIAL AND METHODS

To study the activity of nitrogenase under natural conditions the seeds of the species tested were sown in

the open ground in Troubsko (mean year temperature 8.56°C , total annual precipitation 547 mm). For the first measurement the seeds were sown on April 16 and for the second measurement on June 25. As the plants were annual, biennial and perennial species with different rates of growth and development the measurements could not be made at the same stage of development.

Nitrogenase activity was measured by indirect method utilizing acetylene reduction to ethylene (Škrdleta et al., 1976; Šimek et al., 1987). Prior to the measurement, the plants were removed from the soil and placed into airtight containers and acetylene was added to individual samples. The measurement itself was always made on the roots of three plants. After 1 hour incubation nitrogenase activity was measured by determining ethylene quantity by gas chromatography (gas chromatograph Chrom 5, flame ionization detection, glass column with Porapak N filling). Each measurement was compared with standard ethylene manufactured by the Supelco company. For better comparison dry matter of the roots was measured and calculation per 1 g of dry matter was

I. Values of nitrogenase activity in individual species and conversion to 1 g of root dry matter and the ranking of species

| Species | Measurement 1 | | | | | | Measurement 2 | | | | | |
|--|---------------|----|----------|----|-----------|----|---------------|----|--------|----|-----------|----|
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| <i>Phaseolus coccineus</i> | 10 | 26 | 639.10 | 7 | 1 354.00 | 26 | | | | | | |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>nanus</i> | 10 | 26 | 1 133.20 | 5 | 6 220.50 | 9 | | | | | | |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>communis</i> | 10 | 26 | 107.80 | 21 | 492.10 | 30 | | | | | | |
| <i>Pisum sativum</i> (semi-leafless) | 18 | 46 | 41.20 | 33 | 309.30 | 35 | | | | | | |
| <i>Pisum sativum</i> (green seeds) | 18 | 46 | 44.60 | 32 | 262.35 | 36 | | | | | | |
| <i>Pisum sativum</i> (yellow seeds) | 18 | 46 | 1 464.00 | 4 | 7 952.90 | 3 | | | | | | |
| <i>Lathyrus sativus</i> | 11 | 39 | 2 539.60 | 1 | 11 435.80 | 1 | 18 | 64 | 731.90 | 1 | 5 996.08 | 3 |
| <i>Cicer arietinum</i> (brown seeds) | 11 | 39 | 0.00 | | 0.00 | | 8 | 74 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Cicer arietinum</i> (yellow seeds) | 11 | 39 | 0.00 | | 0.00 | | 8 | 74 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus nanus</i> | 11 | 39 | 776.00 | 6 | 4 084.20 | 11 | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus affinis</i> | 8 | 42 | 0.00 | | 0.00 | | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus albus</i> | 11 | 39 | 1 739.40 | 2 | 7 906.40 | 4 | 8 | 74 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus pubescens</i> | 8 | 42 | 1 680.00 | 3 | 8 000.00 | 2 | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus mutabilis</i> | 8 | 42 | 0.00 | | 0.00 | | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lupinus luteus</i> | 13 | 37 | 0.00 | | 0.00 | | | | | | | |
| <i>Tetragonolobus purpureus</i> | 11 | 39 | 0.00 | | 0.00 | | 18 | 64 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Galega officinalis</i> | 13 | 50 | 0.00 | | 0.00 | | 12 | 61 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Lotus ornithopodioides</i> | 13 | 50 | 0.00 | | 0.00 | | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Medicago litoralis</i> | 13 | 50 | 89.20 | 25 | 985.00 | 28 | 14 | 68 | 513.47 | 2 | 12 086.01 | 2 |
| <i>Vicia angustifolia</i> | 21 | 42 | 133.80 | 18 | 1 941.90 | 21 | | | | | | |
| <i>Vicia tetrasperma</i> | 39 | 24 | 40.10 | 34 | 1 560.30 | 24 | 29 | 53 | 89.20 | 15 | 294.78 | 34 |
| <i>Trigonella coerulea</i> | 11 | 52 | 0.00 | | 0.00 | | 12 | 71 | 167.25 | 8 | 2 310.08 | 11 |
| <i>Trigonella foenum graecum</i> | 11 | 52 | 47.60 | 30 | 443.70 | 32 | 12 | 97 | 466.27 | 3 | 18 933.8 | 1 |
| <i>Medicago lupulina</i> | 11 | 52 | 126.40 | 19 | 2 744.60 | 17 | 14 | 69 | 63.99 | 23 | 1 257.45 | 19 |
| <i>Melilotus albus</i> (biennial) | 11 | 52 | 44.60 | 31 | 330.70 | 34 | 12 | 71 | 38.78 | 26 | 324.07 | 33 |
| <i>Trifolium campestre</i> | 11 | 52 | 35.70 | 35 | 1 441.30 | 25 | 14 | 68 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Medicago sativa</i> | 11 | 52 | 105.60 | 22 | 463.70 | 31 | 12 | 71 | 96.95 | 14 | 538.89 | 27 |
| <i>Onobrychis viciifolia</i> | 11 | 52 | 303.30 | 13 | 2 391.70 | 20 | 14 | 69 | 37.80 | 27 | 155.05 | 35 |
| <i>Trifolium incarnatum</i> | 11 | 52 | 190.30 | 15 | 2 966.00 | 16 | 12 | 83 | 223.01 | 6 | 4 414.72 | 5 |
| <i>Trifolium resupinatum</i> | 13 | 50 | 518.90 | 8 | 4 405.00 | 10 | | | | | | |
| <i>Trifolium alexandrinum</i> | 11 | 52 | 352.30 | 12 | 3 510.90 | 14 | | | | | | |
| <i>Medicago truncatula</i> | 8 | 60 | 118.40 | 20 | 1 560.90 | 23 | 14 | 68 | 33.16 | 28 | 557.74 | 26 |
| <i>Vicia hirsuta</i> | 24 | 39 | 13.90 | 36 | 400.40 | 33 | 36 | 73 | 146.98 | 10 | 1 739.87 | 13 |
| <i>Anthyllus vulneraria</i> | 13 | 55 | 9.20 | 37 | 132.40 | 37 | 46 | 49 | 27.88 | 29 | 343.35 | 31 |
| <i>Trifolium hybridum</i> | 11 | 57 | 449.10 | 10 | 3 471.90 | 15 | 36 | 59 | 69.69 | 21 | 3 893.3 | 7 |
| <i>Trifolium pratense</i> 2 n | 11 | 57 | 422.90 | 11 | 3 534.40 | 13 | 12 | 71 | 79.51 | 18 | 1 191.57 | 20 |
| <i>Trifolium pratense</i> 4 n | 11 | 57 | 96.90 | 24 | 7 392.15 | 5 | 14 | 69 | 277.29 | 5 | 2 819.08 | 10 |
| <i>Trifolium repens</i> | 11 | 57 | 149.20 | 17 | 7 380.31 | 6 | 12 | 71 | 86.29 | 16 | 1 688.33 | 14 |
| <i>Lotus corniculatus</i> | 11 | 57 | 61.50 | 29 | 7 371.52 | 7 | 14 | 69 | 84.35 | 17 | 938.39 | 21 |
| <i>Coronilla varia</i> | 47 | 21 | 104.60 | 23 | 1 176.00 | 27 | 36 | 47 | 42.66 | 25 | 662.38 | 24 |
| <i>Trifolium ambiguum</i> | 11 | 57 | 509.00 | 9 | 3 861.40 | 12 | 14 | 81 | 353.08 | 4 | 1 371.85 | 17 |
| <i>Trifolium aureum</i> | 13 | 55 | 80.00 | 27 | 2 525.20 | 19 | 41 | 68 | 16.22 | 32 | 1 583.18 | 15 |
| <i>Lathyrus pratensis</i> | 47 | 21 | 0.00 | | 0.00 | | 41 | 68 | 14.19 | 33 | 921.80 | 23 |
| <i>Vicia cracca</i> | 29 | 39 | 276.80 | 14 | 2 708.40 | 18 | 36 | 47 | 72.72 | 20 | 3 466.50 | 8 |
| <i>Trifolium montanum</i> | | | | | | | 39 | 43 | 27.45 | 30 | 575.47 | 25 |
| <i>Galega orientalis</i> | | | | | | | 41 | 61 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Astragalus cicer</i> | | | | | | | 36 | 59 | 142.17 | 11 | 1 419.05 | 16 |
| <i>Astragalus glycyphylus</i> | | | | | | | 41 | 68 | 5.07 | 35 | 432.16 | 29 |

| Species | Measurement 1 | | | | | | Measurement 2 | | | | | |
|---------------------------------|---------------|----|--------|----|----------|----|---------------|----|--------|----|----------|----|
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| <i>Medicago distiformis</i> | | | | | | | 18 | 77 | 130.08 | 13 | 4 296.87 | 6 |
| <i>Trifolium fragiferum</i> | | | | | | | 36 | 59 | 167.25 | 9 | 1 742.74 | 12 |
| <i>Trifolium glomeratum</i> | | | | | | | 36 | 59 | 167.26 | 7 | 1 314.51 | 18 |
| <i>Melilotus albus</i> (annual) | 11 | 52 | 181.37 | 16 | 1 739.90 | 22 | 12 | 70 | 49.18 | 24 | 923.75 | 22 |
| <i>Trifolium semipilosum</i> | 13 | 50 | 89.20 | 26 | 874.50 | 29 | 36 | 73 | 3.04 | 36 | 153.20 | 36 |
| <i>Lotus uliginosus</i> | | | | | | | 36 | 59 | 75.63 | 19 | 5 730.87 | 4 |
| <i>Trifolium panonicum</i> | | | | | | | 26 | 69 | 130.08 | 12 | 399.08 | 30 |
| <i>Lupinus polyphylus</i> | 18 | 50 | 0.00 | | 0.00 | | 39 | 44 | 0.00 | | 0.00 | |
| <i>Trifolium medium</i> | 13 | 55 | 78.40 | 28 | 7 369.48 | 8 | 18 | 77 | 69.69 | 22 | 327.34 | 32 |
| <i>Trifolium arvense</i> | | | | | | | 39 | 70 | 7.60 | 34 | 2 872.73 | 9 |
| <i>Trifolium alpestre</i> | | | | | | | 41 | 68 | 18.25 | 31 | 449.51 | 28 |

A = number of days from sowing to emergence

B = number of days from emergence to measurement

C = nitrogenase activity per plant per hour (in nM)

D = ranking

E = nitrogenase activity per 1 g of root (in nM)

F = ranking

performed. The values of nitrogenase activity given in the table are the average of the three measurements and they are converted to nmol/plant/hour (Škrdleta et al., 1976; Šimek et al., 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

All the results obtained in both measurements are presented in Tab. I which also gives the number of days from sowing to emergence and the number of days from emergence to measurement for each species. The values of nitrogenase activity obtained at the measurement and their conversion per 1 g of dry matter of roots are presented with the ranking of species within the total population. On the basis of the results obtained the species tested can be divided into four groups. The group 1 includes the species which showed values that were highly significantly higher than the median of the population, the group 2 are the species whose values are within the limits of the interval estimate of the median

(at $P = 99\%$), the group 3 comprises the species whose values are highly significantly lower than the interval estimate of the median, and the group 4 contains the species which showed no nitrogenase activity. The percentage of species in individual groups is given in Tab. II which also gives some basic statistical characteristics.

In the measurement 1 no fixation of atmospheric nitrogen was found in 11 species, which is 22.92% of the total and in measurement 2 in 13 species (26.53% of the total). In both measurements no N_2 fixation was recorded in *Cicer arietinum* (dark-seeded and light-seeded type), *Lupinus affinis*, *Lupinus mutabilis*, *Tetragonolobus purpureus*, *Galega officinalis*, *Lotus ornithopodioides* and *Lupinus polyphylus*. In the measurement 1 no N_2 was fixed in *Lupinus luteus*, which failed to emerge for measurement 2, and also in *Trigonella coerulea* and *Lathyrus pratensis*, which, however, fixed nitrogen in the measurement 2. Another four species, which fixed N_2 in the measurement 1, did not fix N_2 in the measurement 2. These were *Lupinus nanus*, *Lupinus albus*, *Lupinus pubescens* and *Trifolium campestre*. No N_2 fixa-

II. Proportions of species in groups and basic statistical values of the population

| Group | Measurement 1 | | Measurement 2 | |
|--|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| | nitrogenase activity | NA/g of root dry matter | nitrogenase activity | NA/g of root dry matter |
| 1 | 14.58% | 20.83% | 12.24% | 12.24% |
| 2 | 18.75% | 22.92% | 32.65% | 28.57% |
| 3 | 43.75% | 35.42% | 28.57% | 32.65% |
| 4 | 22.92% | 22.92% | 26.53% | 26.53% |
| Maximum | 2 539.60 | 11 435.80 | 731.90 | 18 933.82 |
| Minimum | 9.20 | 132.40 | 3.04 | 153.20 |
| Mean | 399.82 | 3 316.25 | 131.26 | 2 447.93 |
| <i>n</i> | 37 | 37 | 36 | 36 |
| Interval estimate of mean ($P = 99\%$) | 166.37–633.27 | 2 135.14–4 497.36 | 66.80–195.72 | 960.20–3 935.66 |

tion was found in *Galega orientalis*, which did not emerge for measurement 1. No nitrogen fixation in *Tetragolobus purpureus* and *Lotus ornithopodioides* was found at earlier measurements. In red clover the results of nitrogenase activity corresponded with the conclusions of other authors (Užik, 1996).

In the measurements 1 and 2 the highest values of nitrogenase activity were found in *Lathyrus sativus* (2539.6 and 731.9, resp.). In the measurement 1 the following species were classified into the group 1: *Phaseolus coccineus* (*Phaseolus multiflorus*), *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*, yellow-seeded *Pisum sativum*, *Lupinus nanus*, *Lupinus albus* and *Lupinus pubescens*. In the measurement 2 the species of the genera *Phaseolus* and *Pisum* were not included and in the species of the genus *Lupinus* nitrogenase activity was not proved. In this measurement besides *Lathyrus sativus* the group comprised *Medicago litoralis*, *Trigonella foenum-graecum*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium ambiguum* and *Trifolium pratense* (4 n). Overall, the group 1 included seven species in the first measurement which is 14.58% of the total population and six species (12.24%) in the second measurement. The lowest value for putting the species into this group was 633.3 nmol/plant/hour in measurement 1 and 195.7 nmol/plant/hour in the measurement 2.

To make comparison easier nitrogenase activity was calculated per 1 g of root dry matter. In the measurement 1 the highest values were found in *Lathyrus sativus*, *Lupinus pubescens*, yellow-seeded type of *Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Trifolium pratense* 4 n, *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium medium*, *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*, *Trifolium resupinatum*, *Lupinus nanus*, *Trifolium ambiguum*, *Trifolium pratense* 2 n, *Trifolium alexandrinum*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium incarnatum*, *Medicago lupulina*, *Vicia cracca*, *Trifolium aureum* and *Onobrychis viciifolia*, in the measurement 2 in *Trigonella foenum graecum*, *Medicago litoralis*, *Lathyrus sativus*, *Lotus uliginosus*, *Trifolium incarnatum*, *Medicago distiformis*, *Trifolium hybridum*, *Vicia cracca*, *Trifolium arvense*, *Trifolium pratense* 4 n, *Trigonella coreulea*, *Trifolium fragiferum*, *Vicia hirsuta*, *Trifolium repens*, *Trifolium aureum*, *Astragalus cicer*, *Trifolium ambiguum*, *Trifolium glomeratum*, *Medicago lupulina* and *Trifolium pratense* 2 n. All the species showed significantly higher values than the interval estimate of the median value of the population. In the measurement 1 this group involved 20.8% of the species tested and in the measurement 2 it included 12.2% of the species. The lowest values for nitrogenase activity

for inclusion into this group in the measurements 1 and 2 were 4497.4 and 3935.7 nmol/plant/hour, respectively.

N₂ fixation measurement is affected by temperature, humidity, light intensity and other factors (sampling under field conditions). The fact that some species did not fix nitrogen was due to their origin. Some species which are not native to our conditions did not form active nodules due to the absence of specific rhizobia. Without adding artificially produced rhizobia in the form of inoculant specific for each species, it is ineffective to grow these species as previous crops with the aim of increasing soil N contents. On the other hand, a number of non-native species was found which showed nitrogenase activity and subsequently atmospheric nitrogen fixation. These species accept rhizobia belonging to the species commonly grown in our country. The best previous crops appear to be *Lathyrus sativus*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Trifolium hybridum*, *Lotus corniculatus* and of non-native species *Trifolium ambiguum* and annual *Trifolium alexandrinum* and *Trifolium resupinatum*. As for the genus *Lupinus*, the experiments should be repeated because in the measurement 1 the species gave good results whereas in the measurement 2 they did not show any activity and no nodules were formed on their roots. They might have been damaged by pulling out of the soil but most probably they negatively responded to the lack of rainfall and extremely high temperatures of the air and the soil during July and August.

The aspects of nitrogenase activity were studied as part of the research project NAZV ČR EP0960006288. The use of forage and other plant species in agriculture and landscaping.

REFERENCES

- Marečková H. (1983): Biological fixation of nitrogen and its utilization. Stud. Inform. ÚVTIZ, Ř. Půdoznal., 3: 48.
- Šimek M., Vacek V., Úlehlková B. (1987): Determination of N fixation in *Trifolium repens* L. Rostl. Vyr., 33 (3): 225–230.
- Škrdleta V., Našinec V., Havlová M. (1976): Relationship between acetylene reduction and some indices of symbiotic N fixation in pea (*Pisum sativum* L.). Rostl. Vyr., 22 (8): 881–883.
- Užik M. (1996): Evaluation of atmospheric nitrogen fixation after red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties. Roč. Genet. Zdr. Rastl. Nitra: 34–42.

Received on January 8, 1999

Contact Address:

Ing. Jan Pelikán, CSc., Výzkumný ústav picinářský, s. r. o., 664 41 Troubsko, Česká republika, tel.: 05/47 22 73 80, fax: 05/47 22 73 85, e-mail: vupt@brno.ics.muni.cz

VLIV SKLADOVÁNÍ PŮDNÍCH VZORKŮ NA MIKROBIÁLNÍ BIOMASU A JEJÍ AKTIVITU

INFLUENCE OF STORAGE OF SOIL SAMPLES ON MICROBIAL BIOMASS AND ITS ACTIVITY

M. Šimek, H. Šantrůčková

Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic; University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: Sampling of soil causes changes in its natural environment: among others, soil structure and aeration status are disrupted and soil temperature and moisture are usually affected. This results in changes of soil microbial biomass and disruption of important biological processes. Although in general not recommended (Anderson, 1987), soil samples are often stored after sampling and before analyses, as for various reasons they cannot be processed immediately. The objective of this study was to assess the impact of soil storage on microbial biomass and its activities. Soils were sampled in several sites in the Czech Republic, mostly from plots of long-term field experiments (soils Jaro, Lipa, Luka, Iva) or from ordinary fields (soils from Netřebice and Chelčice). Microbial biomass, basal and glucose-induced respirations and nitrifying activity were determined using standard methods; the results are expressed per gram of dry soil. As shown in Fig. 1, storage of most soils at 4 ± 2 °C influenced microbial biomass. After one week storage, both increase and decrease of microbial biomass were recorded. During further storage (after 18 as well as 60 weeks) decrease of microbial biomass was found. However, only small fluctuations of microbial biomass but large increases of basal respiration were found in soil stored at constant moisture at laboratory conditions (18 to 25 °C) for 56 weeks (Tab. I). Microbial biomass in air-dried soil first increased, but then decreased, while basal respiration was slightly increased (Tab. II). Glucose-induced respiration fluctuated at the beginning of soil storage at 4 ± 2 °C and decreased later on (Fig. 2). Nitrifying enzyme activity was determined in refrigerated (4 ± 2 °C) as well as in frozen (-20 °C) soils, the latter defrosted quickly (2 hours) and/or slowly (2 days) before the measurements. As shown in Fig. 3, it was enhanced in soils after 2 and 11 weeks of storage at 4 ± 2 °C. When the frozen soils were defrosted quickly, the activity was significantly lower, while in soils defrosted slowly it was significantly higher in comparison with soils stored at 4 ± 2 °C. The results showed that microbial biomass and its activities can be substantially changed during the storage of soils after sampling. It was also found that various soils (that is soils from different sites or differently fertilized soils) can respond differently. It is likely that after sampling there is a few days' fluctuation period of control and regulatory factors, which is then reflected in fluctuation of microbial biomass and activities. Although Stenberg et al. (1998) recommend freezing when soils are to be stored, our results show that microbial activities in defrosted soils can be substantially changed. When processing frozen soils, the critical step is defreezing. We suggest that refrigeration of soils at about 4 °C is the most careful mode of storage but not even in this case uncontrolled changes in soils can be excluded.

Keywords: storage of samples; soil; microbial biomass; respiration; nitrifying activity

ABSTRAKT: Odběr půdních vzorků vede k narušení přirozených poměrů v půdě, které se při následném skladování projevuje změnami mikrobiální biomasy a její aktivity. Uložení půdních vzorků při 4 ± 2 °C vedlo ke kolísání mikrobiální biomasy a glukózou indukované respirace během prvních několika dnů skladování a později k jejich poklesu. Aktivita nitrifikačních enzymů byla naopak při stejném způsobu uložení zvýšena. Vysušení půdy znamenalo ještě významnější zásah do poměrů v půdě než zchlazení půdy a vedlo k podstatnému snížení mikrobiální biomasy. Kritickým krokem při uchovávaní zmrazených půdních vzorků je jejich rozmrazování před analýzou. Nelze-li provést stanovení mikrobiální biomasy a její aktivity v půdních vzorcích ihned po odběru, nejšetrnějším způsobem uložení je zchlazení na cca 2 až 5 °C. I tak však v uložených vzorcích může dojít k těžko kontrolovatelným změnám.

Klíčová slova: skladování vzorků; půda; mikrobiální biomasa; respirace; nitrifikační aktivity

ÚVOD

Mezi odběrem půdních vzorků a jejich zpracováním pro stanovení nejrůznějších půdně-biologických, che-

mických i fyzikálních parametrů může uplynout různě dlouhá doba. Je to dáno mnoha okolnostmi, např. vzorky je nutné po odběru převést do laboratoře, jednotlivé analýzy jsou pracné, málokdy je k dispozici dostatek

pracovních, materiálových a přístrojových kapacit na okamžité provedení všech požadovaných stanovení. Někdy je výhodné či dokonce potřebné vykonat jednotlivé analýzy postupně (pro jistou analýzu musíme mít již k dispozici údaje z jiných zkoumání) apod. Skladováním půdních vzorků se však zvyšuje míra nejistoty, s jakou lze zjištěné údaje považovat za reprezentativní a dobře charakterizující danou půdu. Situace není většinou nijak kritická při stanovování většiny fyzikálních a chemických charakteristik, dodrželi-li se vyzkoušené postupy, i když i v těchto případech může během skladování půdních vzorků docházet k zásadním a nekontrolovatelným změnám např. anorganických forem dusíku (Růžek, Moučková, 1998; Trávník et al., 1998) nebo pH (Prodromou, Pavlatou-Ve, 1998).

V případě mikrobiálních parametrů je téměř jisté, že v průběhu skladování půdy dojde k jejich ovlivnění. Mezi významné příčiny změn mikrobiálních parametrů při skladování půd patří narušení původního stavu mnoha faktorů prostředí. Již odběrem půdních vzorků se zásadně změní aerační status půdy a dojde k porušení přirozené struktury půdy. Při následné manipulaci a transportu se obvykle změní teplota půdy, při skladování se vedle toho téměř vždy mění i půdní vlhkost. Nicméně striktní požadavek na okamžité zpracování půdních vzorků ihned po odběru (Anderson, 1987) lze dodržet jen zřídka a půdní vzorky je tedy nutné skladovat. Prakticky existují čtyři možnosti, jak půdní vzorky (zejména s ohledem na teplotu a vlhkost) skladovat: uložení při laboratorní teplotě, uložení v chladničce, většinou při 2 až 5 °C, zmrazení na -20 až -80 °C a vysušení.

Problematické odběru, úprav a skladování půdních vzorků se na našem pracovišti věnujeme systematicky již delší dobu (Šimek et al., 1998; Šimek, Webster, 1999). Cílem předloženého příspěvku je informovat o výsledcích studia vlivu skladování půdních vzorků na mikrobiální biomasu a některé mikrobiální aktivity. Tyto parametry mikrobiálního společenstva půd se stále častěji stanovují na různých výzkumných pracovištích v ČR. Naše zkušenosti mohou být vodítkem při rozhodování, jakým způsobem a jak dlouho půdní vzorky skladovat nebo raději neskladovat vůbec.

MATERIÁL A METODA

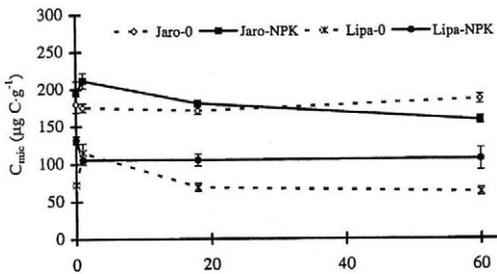
Vzorky půd byly odebírány na několika lokalitách z maloparcelkových polních pokusů i z provozních ploch. Půda označená Jaro je z polního pokusu Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) v Jaroměřicích n. R. (písčitohlinitá kambizem, Jaro-0 nehnojená, obsah oxidovatelného uhlíku [C_{ox}] 1,00 %, obsah celkového dusíku [N_{tot}] 0,10 %, pH_{H_2O} 6,27; Jaro-NPK hnojená NPK a hnojem, vápněná, C_{ox} 1,18 %, N_{tot} 0,11 %, pH_{H_2O} 6,35). Půda Lipa je ze stejného pokusu ÚKZÚZ v Lípě (písčitohlinitá kambizem, Lipa-0 nehnojená, C_{ox} 1,02 %, N_{tot} 0,10 %, pH_{H_2O} 5,79; Lipa-NPK hnojená NPK a hnojem, vápněná, C_{ox} 1,20 %, N_{tot} 0,14 %, pH_{H_2O} 6,23). Půda Luka je z polního pokusu

Výzkumného ústavu rostlinné výroby (VÚRV) v Lukavci (písčitohlinitá kambizem, Luka-0 nehnojená, C_{ox} 1,22 %, N_{tot} 0,21 %, pH_{H_2O} 6,86; Luka-NPK hnojená NPK a hnojem, C_{ox} 1,37 %, N_{tot} 0,21 %, pH_{H_2O} 6,60). Půda Iva je ze stejného pokusu VÚRV v Ivanovicích na Hané (hlinitá degradovaná černozem, Iva-0 nehnojená, C_{ox} 1,55 %, N_{tot} 0,22 %, pH_{H_2O} 8,05; Iva-NPK hnojená NPK a hnojem, C_{ox} 1,65 %, N_{tot} 0,22 %, pH_{H_2O} 7,77). Půda z Netřebic byla odebrána z provozního hõnu (písčitohlinitá kambizem, C_{ox} 1,02 %, N_{tot} 0,11 %, pH_{H_2O} 5,66) a půda z Chelčic z pokusné lokality Ústavu půdní biologie Akademie věd České republiky (ÚPB) České Budějovice (písčitohlinitá kambizem, C_{ox} 1,16 %, N_{tot} 0,12 %, pH_{H_2O} 6,00). Půdy byly po odběru homogenizovány a frakce < 2 mm použita k experimentům.

Mikrobiální charakteristiky půd byly stanovovány standardními metodami: mikrobiální biomasa metodou fumigační extrakční (Vance et al., 1987), glukózu indukovaná respirace byla měřena jako aerobní produkce CO_2 po 1 a 2 h po obohacení 10 g půdy 50 mg glukózy a CO_2 byl stanoven plynovou chromatografií, bazální respirace byla měřena jako produkce CO_2 během 10denní inkubace při 25 °C. Aktivita nitrifikačních enzymů byla stanovena při krátkodobé inkubaci (8 h) při teplotě 28 °C metodou inhibice oxidace nitritů (Schmidt, Belsler, 1982). Nitrity byly stanoveny kolorimetricky (Keeney, Nelson, 1982). Všechny výsledky jsou uvedeny v přepočtu na 1 g suché půdy. Statistická průkaznost rozdílů mezi průměry byla hodnocena analýzou variance a Student-Newman-Keulsovým testem, $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Na obr. 1 jsou uvedeny výsledky měření mikrobiální biomasy v čerstvě odebraných půdách Jaro a Lipa a v půdách uložených při 4 ± 2 °C v polyetylenových sáčcích ve tmě po dobu 60 týdnů. Mikrobiální biomasa v uložených vzorcích půdy byla stanovena po 1, 18 a 60 týdnech. Po vyjmutí z chladicího boxu byly vždy půdy rozváženy do baněk a ponechány 1 h při laboratorní teplotě; poté byla stanovena mikrobiální biomasa. Jak vyplývá z obr. 1, po 1 týdnu skladování bylo zjištěno jak snížení (Jaro-0, Lipa-NPK), tak zvýšení (Lipa-0, Jaro-NPK) mikrobiální biomasy v půdě. Snížení či zvýšení mikrobiální biomasy tak evidentně nesouviselo s hnojením nebo nehnojením těchto půd. Při jiných podobných měřeních (Elhottová et al., 1998) jsme zjistili, že mikrobiální biomasa může velmi kolísat v období několika dnů až týdnů po odběru, patrně jako důsledek změny aeračního stavu půdy a dalších faktorů, a to bez ohledu na podmínky skladování. Jak dále vyplývá z obr. 1, po 18 týdnech skladování byla ve všech čtyřech půdách zjištěna nižší mikrobiální biomasa než v půdách ihned po odběru; v půdě Lipa-NPK bylo toto snížení statisticky průkazné. Po 60 týdnech byla u tří půd zjištěna statisticky průkazně nižší mikrobiální biomasa než v půdách ihned po odběru; výjimkou byla půda Jaro-0, kde došlo k mírnému (nepřukaznému) ná-



I. Mikrobiální biomasa (C_{mic}) v průběhu skladování nehněných (0) a hnojených (NPK) půd z lokality Jaroměřice (Jaro-0; Jaro-NPK) a Lípa (Lipa-0; Lipa-NPK) při 4 ± 2 °C po dobu 60 týdnů; průměry ze 4 opakování a \pm směrodatné odchylky – Microbial biomass (C_{mic}) during storage of unfertilized (0) and fertilized (NPK) Jaroměřice (Jaro-0; Jaro-NPK) and Lípa (Lipa-0; Lipa-NPK) soils at 4 ± 2 °C for 60 weeks; means of 4 replicates and \pm standard deviations

osa x: týdny – x axis: weeks

růstu mikrobiální biomasy. V půdě uložené v laboratoři při 18 až 25 °C a průběžně dovhlčované na původní vlhkost jsme naproti tomu zjistili jen mírné změny mikrobiální biomasy (tab. I), avšak velmi výrazné zvýšení bazální respirace, a to i po 56 týdnech. Tento výsledek je o to překvapivější, že šlo o půdu s jen průměrným obsahem organické hmoty (C_{ox} , 1,02 %), avšak s poměrně vysokým obsahem mikrobiální biomasy (539 mg $C_{mic} \cdot g^{-1}$). Zásoba mineralizovatelného C přesto musela být dosti vysoká k tomu, aby nedošlo k postupnému vyčerpání substrátu (Coxson, Parkinson, 1987) a aby se po dobu jednoho roku v půdě nejen udržela, ale dokonce podstatně zvýšila bazální respirace. Skladování půdních vzorků vysušených na vzduchu vedlo nejprve ke zvýšení mikrobiální biomasy a později k jejímu výraznému poklesu (tab. II). Bazální respirace ve vysušených půdních vzorcích (před měřením ovhlčených na původní vlhkost) byla stimulována i u vzorků uložených 630 dnů, pravděpodobně v důsledku zvýšení obsahu využitelného uhlíku odumřením některých populací mikroorganismů.

Na obr. 2 je uvedena glukózou indukovaná respirace (GIR) v nehněné (Jaro-0) a hnojené (Jaro-NPK) půdě z lokality Jaroměřice, měřena celkem šestkrát během 28 dnů skladování při 4 ± 2 °C. Půdy byly uloženy v polyetylenových sáčcích ve tmě. Uložené půdy byly po vyjmutí z chladicího boxu rozváženy do inkubačních lahví a ponechány 2 h při teplotě 25 °C. Při téže teplotě byla po obohacení vzorků glukózou měřena respirace. Je zřejmé, že přes jisté počáteční kolísání došlo v obou půdách nejprve k mírnému zvýšení respirační aktivity a později k jejímu snížení. Po 28 dnech uložení byla v obou půdách stanovena nižší GIR než v čerstvě odebraných půdách a v případě nehněné půdy (Jaro-0) byl tento rozdíl statisticky průkazný.

Aktivita nitrifikačních enzymů (NEA) byla měřena v půdách skladovaných při 4 °C po dobu 2 a 11 týdnů a v půdách 11 týdnů zmrazených na -20 °C. Půdy ulo-

I. Mikrobiální biomasa (C_{mic}) a bazální respirace půdy (Resp) v průběhu skladování půdy z lokality Netřebice v laboratorních podmínkách (18–25 °C) při konstantní vlhkosti; průměry ze 4 opakování, v závorkách směrodatné odchylky; různá písmena značí statisticky průkazné rozdíly (analýza variance, $P < 0,05$) – Microbial biomass (C_{mic}) and basal soil respiration (Resp) during storage of Netřebice soil at constant moisture in laboratory conditions (18–25 °C); means of 4 replicates, in brackets standard deviations; different letters indicate significant differences (analysis of variance, $P < 0,05$)

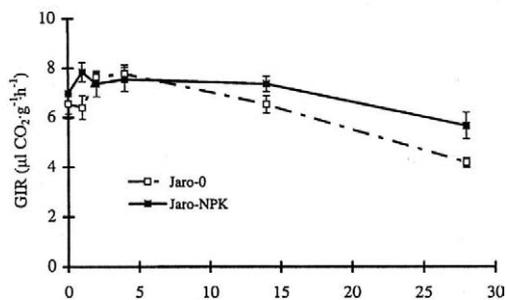
| Doba skladování ¹ (týden ²) | C_{mic} ($\mu g C \cdot g^{-1}$) | Resp ($\mu g CO_2 \cdot C \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$) |
|---|---|--|
| 0 | 539,2 (13,8) ab | 27,1 (1,4) a |
| 22 | 521,3 (7,2) a | 56,9 (1,7) b |
| 56 | 558,5 (4,9) b | 68,7 (3,6) c |

¹time of storage, ²week

II. Mikrobiální biomasa (C_{mic}) a bazální respirace půdy (Resp) v průběhu skladování půdy vyschlé na vzduchu z lokality Chelčice; průměry ze 4 opakování, v závorkách směrodatné odchylky; různá písmena značí statisticky průkazné rozdíly (analýza variance, $P < 0,05$) – Microbial biomass (C_{mic}) and basal soil respiration (Resp) during storage of air-dried Chelčice soil; means of 4 replicates, in brackets standard deviations; different letters indicate significant differences (analysis of variance, $P < 0,05$)

| Doba skladování ¹ (den ²) | C_{mic} ($\mu g C \cdot g^{-1}$) | Resp ($\mu g CO_2 \cdot C \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$) |
|---|---|--|
| 0 | 324 (12,7) a | 14,9 (0,5) a |
| 1 | 369 (8,6) b | 14,8 (0,2) a |
| 7 | 419 (21,4) c | 16,8 (0,4) b |
| 60 | 200 (9,3) d | 16,6 (0,7) b |
| 630 | 110 (7,4) e | 21,5 (0,5) c |

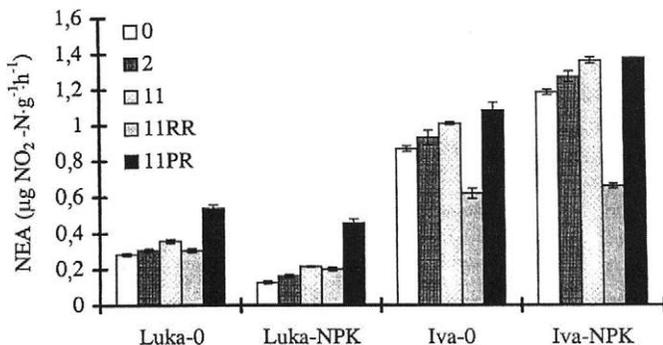
¹time of storage, ²day



2. Glukózou indukovaná respirace (GIR) v nehněné (Jaro-0) a hnojené (Jaro-NPK) půdě z lokality Jaroměřice během 28 dnů skladování při 4 ± 2 °C; průměry ze 4 opakování a \pm směrodatné odchylky – Glucose induced respiration (GIR) in unfertilized (Jaro-0) and fertilized (Jaro-NPK) Jaroměřice soils stored at 4 ± 2 °C for 28 days; means of 4 replicates and \pm standard deviations

osa x: dny – x axis: days

žené při 4 ± 2 °C byly po vyjmutí z chladicího boxu rozváženy do inkubačních lahví a ponechány 1 h při teplotě 28 °C. Poté byl přidán optimalizační roztok a stanovena NEA. Zmrazené vzorky byly rozmrazeny



3. Aktivita nitrifikačních enzymů (NEA) v nehnojných (0) a hnojných (NPK) půdách z lokalit Lukavec (Luka-0; Luka-NPK) a Ivanovice (Iva-0; Iva-NPK) v čerstvě odebraných půdách (0), v půdách uložených při 4 ± 2 °C po dobu 2 týdnů (2) a 11 týdnů (11) a v půdách uložených 11 týdnů při -20 °C rozmrazených před měřením rychle během 2 h (RR) a pomalu během 2 dnů (PR); průměry ze 3 opakování a \pm směrodatné odchylky – Nitrifying enzyme activity (NEA) in unfertilized (0) and fertilized (NPK) Lukavec (Luka-0; Luka-NPK) and Ivanovice (Iva-0; Iva-NPK) fresh soils (0), in soils stored at 4 ± 2 °C for 2 weeks (2) and 11 weeks (11) and in soils stored for 11 weeks at -20 °C defrosted quickly during 2 hours (RR) or slowly during 2 days (PR); means of 3 replicates and \pm standard deviations

buď pomalým, nebo rychlým způsobem. Pomalé rozmrazování probíhalo ve třech etapách: nejdříve 33 h při 5 °C, pak 12 h při 20 °C a 3 h při 25 °C. Rychlé rozmrazování, při kterém byla půda v polyetylenovém sáčku ponořena do vodní lázně 30 °C teplé, trvalo 2 h. Aktivita nitrifikačních enzymů se v průběhu skladování půd při 4 ± 2 °C zvyšovala. Toto zvýšení nebylo po 2 týdnech skladování průkazné, ale po 11 týdnech byla ve všech půdách zjištěna statisticky průkazně vyšší NEA než v čerstvě odebraných půdách (obr. 3). Na aktivitu nitrifikačních enzymů v půdách uložených při -20 °C měl zásadní vliv způsob rozmrazení. Při rychlém rozmrazení byla ve vzorcích zjištěna statisticky průkazně (kromě půdy Luka-NPK) nižší NEA než v půdách uložených 11 týdnů při 4 ± 2 °C. U půd ze stanoviště Ivanovice byl pokles NEA velmi výrazný. Naproti tomu při pomalém rozmrazování bylo u všech půd pozorováno zvýšení NEA, které u půd ze stanoviště Lukavec bylo statisticky průkazné.

Výsledky měření mikrobiální biomasy, bazální respirace, glukózu indukované respirace a aktivity nitrifikačních enzymů v čerstvě odebraných půdách a v půdách skladovaných rozdílným způsobem a různě dlouhou dobu ukázaly, že během skladování může dojít k zásadnímu ovlivnění mikrobiálních charakteristik. Míra ovlivnění se dá jen těžko odhadnout, neboť zkoumané půdy reagovaly někdy velmi odlišně. Přesto výsledky ukazují, že po odběru dochází v půdních vzorcích k určitému rozkolísání kontrolních a regulačních faktorů, které se projevuje poklesem nebo nárůstem biomasy mikroorganismů, posuny ve skladbě mikrobiálního společenstva (bakterie versus mikromycety, Elhottová et al., 1998) a změnami mikrobiálních aktivit. Po určité době uskladnění, která může trvat několik týdnů až měsíců, se pravděpodobně podmínky v uložené půdě ustálí. Zůstává nezodpovězená otázka, zda je vhodnější vyčkat tohoto ustálení, nebo zda je vhodnější půdní vzorky zpracovat brzy po odběru, tj. velmi pravděpodobně

v období rozkolísání. Metodiky ISO i OECD nedoporučují skladování půd déle jak tři měsíce (Stenberg et al., 1998) a za vhodnou teplotu považují 4 ± 2 °C. Nikde však není zmínka o minimální době skladování v případě, že půdní vzorky není možné zpracovat ihned po odběru. Zvláště problematické se ukazuje zmrazování půdních vzorků, byť je některými autory doporučováno (Stenberg et al., 1998), místo uložení při teplotách kolem 0 °C. Podle našich zkušeností je v tomto případě kritický způsob rozmrazování, zejména teplota a doba působení vyšší teploty. Je-li doba rozmrazování příliš krátká, nemusí zřejmě dojít k obnově biologické aktivity v půdě; při delší době rozmrazování naopak dojde snadno ke stimulaci rozvoje mikroorganismů. V obou případech se stanovená aktivita vzdaluje od aktivity v půdě v době odběru vzorků.

Poděkování

Autoři děkují pracovníkům ÚKZÚZ Brno (J. Staňovi, B. Vítkovi, J. Petrovi a spolupracovníkům) a VÚRV Praha-Ruzyně (P. Růžkovi a spolupracovníkům) za možnost odběru půdních vzorků z polních pokusů.

Práce byla částečně podpořena z grantu GA AV ČR č. A 6066901.

LITERATURA

- Anderson J. P. E. (1987): Handling and storage of soil for pesticide experiments. In: Somerville L., Greaves M. P. (eds): Pesticide effects on soil microflora. London, Taylor and Francis: 45–60.
- Elhottová D., Šantrůčková H., Petersen S. (1998): Změny mikrobiální biomasy během skladování vzorků při 4 °C. In: Šimek M., Šantrůčková H., Křišťůfek V. (eds): Odběr, skladování a zpracování půdních vzorků pro biologické

- a chemické analýzy. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 65–68.
- Coxson D. S., Parkinson D. (1987): Winter respiratory activity in aspen woodland forest floor litter and soil. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 49–59.
- Keeney D. R., Nelson D. W. (1982): Nitrogen-inorganic forms. In: Page L. A. et al. (eds): *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison, ASA, SSSA: 643–698.
- Prodromou K. P., Pavlatou-Ve A. S. (1998): Changes in soil pH due to the storage of soils. *Soil Use Mgmt.*, 14: 182–183.
- Růžek P., Moučková H. (1998): Odběr a zpracování půdních vzorků pro stanovení anorganického dusíku v půdě. In: Šimek M., Šantrůčková H., Křišťůfek V. (eds): *Odběr, skladování a zpracování půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy*. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 39–43.
- Schmidt E. L., Belser L. W. (1982): Nitrifying bacteria. In: Page L. A. et al. (eds): *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison, ASA, SSSA: 1027–1042.
- Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjødahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L. (1998): Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 393–402.
- Šimek M., Šantrůčková H., Křišťůfek V. (1998): Odběr, skladování a zpracování půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 114 s.
- Šimek M., Webster E. A. (1999): Persistence of denitrifying enzyme activity in refrigerated and air-dried cambisols. *Pl. and Soil*, (v tisku).
- Trávník K., Zbírál J., Němec P. (1998): Vliv úpravy vzorků na stanovení dusičnanového a amonného dusíku. In: Šimek M., Šantrůčková H., Křišťůfek V. (eds): *Odběr, skladování a zpracování půdních vzorků pro biologické a chemické analýzy*. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 29–34.
- Vance E. D., Brookes P. C., Jenkinson D. S. (1987): An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 703–707.

Došlo 25. 3. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. Miloslav Šimek, CSc., Ústav půdní biologie AV ČR; Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Na sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: 038/422 60, fax: 038/410 01, e-mail: misim@upb.cas.cz

CIZÍ EXPANZIVNÍ PLEVELE ČESKÉ REPUBLIKY A SLOVENSKÉ REPUBLIKY

V. Jehlík (ed.)

Praha, Academia. 1998. 506 s.

Pod vedením editora RNDr. Vladimíra Jehlíka, CSc., vypracoval autorský kolektiv: RNDr. Slavomil Hejný, DrSc., RNDr. Zdeněk Kropáč, CSc., RNDr. Marie Lhotská, CSc., Ing. Karel Kopecký, DrSc., RNDr. Bohumil Slavík, CSc. a RNDr. Zdenka Svobodová, CSc., dokonalou studii, kterou jako přehlednou příručku vysoké kvality vydalo nakladatelství Academia Praha za finanční podpory Fondu AV ČR pro vydávání vědecké literatury. Toto kompendium lze doporučit především zájemcům o plevelné rostliny, neboť zahrnuje všechny dosud poznané cizí tzv. expanzivní plevely, rostoucí na území nejen ČR, ale v současné době i SR.

V úvodní kapitole jsou definovány cizí expanzivní plevely jako rostliny cizího původu opakovaně k nám zavlekané. Vyznačují se schopností samoreprodukce se značnou adaptabilitou a projevují se osídlováním nových synantropních ekotypů, přičemž mohou při proniknutí na obdělávané půdy v budoucnosti snižovat jejich úrodnost.

Obecná část popisuje metody, objekty a základní předměty karpologického, floristického i ekologického výzkumu. V těchto kapitolách je pojednáno o šíření těchto rostlin a jejich postupu včetně primárních ohnisk výskytu nově zavlečených taxonů. V obecné části jsou rovněž popsány cizí expanzivní plevely z pohledu alergických onemocnění. Tuto partii uzavírá kapitola, která

je věnována karanténním opatřením na území ČR a SR a je doplněna přehledem o vývoji rostlinolékařské péče.

Ve speciální části autoři dokonalou formou zpracovali celkem čtyřicet druhů plevelů s ohledem na původní rozšíření i druhotný výskyt, a to v ČR i SR, jakož i podrobný přehled lokalit s instruktivní mapkou výskytu většiny cizích expanzivních plevelů. Každá kapitola přináší ekologickou charakteristiku popisovaného taxonu, dále prognózu šíření a způsoby omezování, opomenuto není ani hledisko hospodářského významu.

Seznam literatury, která je výběrem prioritních prací, podává podrobný přehled citovaných pramenů k jednotlivým adventivním druhům. Kniha je doplněna velmi zdařilou obrazovou dokumentací, řadou map a černobílých fotografií. Obsahuje též české, anglické, německé a ruské resumé.

Odborné veřejnosti, pracovníkům zemědělského výzkumu, pedagogům a studentům přírodovědeckých, biologických a agronomických fakult, ale i všem zájemcům o synantropní botaniku a agrobotaniku připravil autorský kolektiv významné česko-slovenské dílo, které jako základní kompendium v oboru ochrany zemědělských rostlin vůči nově se šířícím cizím plevelům lze pro svou užitečnost i dokonalé grafické zpracování doporučit jak profesionálům, tak amatérům.

Doc. Ing. Karel Dolejš, CSc.

VLIV STUPŇOVANÝCH DÁVEK NIKLU A ARZENU NA RŮST ŘEDKVIČKY A PŮDNÍ MIKROFLÓRU

THE EFFECT OF INCREASING RATES OF NICKEL AND ARSENIC ON THE GROWTH OF RADISH AND SOIL MICROFLORA

T. Šimon

Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: In 1997 the pot experiment with step contamination by Ni (as nickel chloride) and As (as sodium arsenite) was organized. Two soils were used (heavy soil: clay-loam from Ruzyně, light soil: sandy-loam from Lukavec) and four levels of contamination were selected, based on the natural abundance of the elements in the soil used: no addition (0), addition to the limit (L) allowed by Czech standards, twice (2L), five (5L) and ten (10L) times the limit for Ni and As, respectively. During 1997 and 1998 radish was intensively planted. In the experiment the influence of elevated levels of described heavy metals on the plants growth was evaluated. Simultaneously, the effect of both toxic elements on occurrence and activity of soil microorganisms was determined. Total concentration and mobile fractions of Ni and As in soils were measured. Soil samples were microbiologically analyzed (using the plate dilution technique) and total bacteria, spore-forming bacteria, micromycetes, oligotrophs and *Azotobacter* were counted. Besides of that, biochemical analyses were performed (test of potential ammonification TPAM and nitrification TPNIT, potential respiration RESP NG, dehydrogenase activity) and microbial biomass was determined. Additionally, so called pad technique (using sterile cloth to transfer the parent microbial colonies from non-contaminated agar to agar contained increased levels of heavy metals) for searching of sensitive and resistant microorganisms in soil samples was realized. Test of colony growth on Thornton agar (everyday counting of colonies appeared in ten days period) in order to determine fast and slow growers in soil samples was the last method used. In 1997 and 1998 addition of Ni to the both soils negatively influenced radish growth and in the case of the highest contaminated treatment the total inhibition of plant germination was recorded (Fig. 1a). Lower reduction of plant growth especially in light more acidic soil from Lukavec was recorded when As contamination was used (Fig. 1b). Plant tolerance to Ni and As cohered with the content of mobile fractions of both elements (Tab. III). Extractability of As fractions (using CaCl_2) was considerably lower than Ni in the light soil (Tab. II), and the toxicity of As during the time strongly decreased. High values of mobile fractions of Ni in the highest contamination proved a higher accessibility for plants. Concentration of Ni and As in plants was 17 to 160 times higher in highly contaminated treatments comparing to zero variants (Fig. 2). In tubers twice more pollutants were accumulated than in leaves. An addition of Ni in the highest amounts caused significant drop down of total number of bacteria and number of sensitive *Azotobacter*. Simultaneously, due to high contamination (especially Ni) numbers of micromycetes increased (Tab. IV). These data document changes that took place in soil environment. Addition of As had no adverse effect. Using all biochemical tests the negative effect of contamination by Ni was recorded, when 2L was exceeded (Tab. V). The same was true for microbial biomass. In Fig. 3 percentages of colonies that are able to grow on increased levels of Ni and As in agar are shown. Microorganisms from treatments 0, L and 2L (both metals) were more sensitive to increased levels of elements than microorganism from 5L and 10L, which testify to induced resistance of microorganisms in highly contaminated treatments. After evaluation of colony growth speed of microorganisms on agar it was found that in soil samples with increased contamination of Ni and As number of fast-growers dropped down and slow-growers increased (Tab. VI). Results from this experiment, which will continue, show in the meantime that in soils after two years presence of high concentration of described heavy metals prevailed slow growing microorganisms with decreased diversity, that have higher resistance to metals and decreased biochemical activities.

Keywords: heavy metals; radish; soil microorganisms; diversity; activity

ABSTRAKT: V roce 1997 byl založen nádobový vegetační pokus (těžká a lehká půda) se zvyšujícími se dávkami Ni a As. Na základě maximálně přípustných hodnot obsahu rizikových prvků v půdách byly vybrány čtyři hladiny kontaminace a nekontaminovaná kontrola. V nádobách byla během let 1997 a 1998 pěstována ředkvička (duben až září). Cílem pokusu bylo sledování vlivu zvyšující se zátěže Ni a As na růst ředkvičky a na biologické vlastnosti a aktivitu mikroorganismů v půdách. V obou letech byla po kontaminaci Ni zaznamenána deprese růstu rostlin u půdy z Ruzyně od hladiny 5L, u půdy z Lukavce od hladiny L a po kontaminaci As u obou půd od hladiny 5L (u půdy z Lukavce však výrazně nižší). U nejvíce kontaminovaných variant byla zjištěna mnohonásobně (17 až 160krát v případě lehké půdy) vyšší koncentrace Ni, resp. As v orgánech rostlin než u kontrolních variant. Tolerance rostlin k Ni a As přímo souvisela s obsahem mobilních frakcí obou prvků v půdě. Byly nalezeny silné negativní korelace mezi výnosem bŕev a obsahem mobilních frakcí kovů v půdách. Mikrobiologické

rozbory vzorků půd prokázaly patrný pokles celkového počtu bakterií u nejvíce zatížených variant Ni a nárůst počtů mikro-mycet. Biochemické testy vybraných aktivit (potenciální amonifikace, nitrifikace, respirace, aktivita dehydrogenáz) a měření mikrobiální biomasy svědčí o negativním vlivu kontaminace Ni při překročení hladiny 2L. Vliv As na uvedené charakteristiky byl nízký. Navazujícími laboratorními metodami (razítková metoda přenosu rodičovských mikrobiálních kolonií na agar se zvyšujícími se hladinami Ni, resp. As, sledování rychlosti růstu kolonií na agaru) bylo zjištěno, že v půdách po dvouleté přítomnosti vysokých koncentrací Ni a As postupně převládají pomaleji rostoucí skupiny mikroorganismů s nižší diverzitou, které mají vyšší rezistenci k použitým kovům a sníženou biochemickou aktivitu.

Klíčová slova: těžké kovy; ředkvička; půdní mikroorganismy; diverzita; aktivita

ÚVOD

V oblasti výzkumu zatížení zemědělských půd rizikovými prvky existuje řada přístupů, jak toto zatížení hodnotit a jaká použít konkrétní kritéria. Nejčastěji je zátěž půd hodnocena z hlediska fyto-toxicity, zootoxicity a z hlediska toxicity pro člověka. Vliv rizikových prvků na rostliny se běžně hodnotí pozorováním klíčení testačních rostlin, hodnocením rychlosti růstu, produkce biomasy a porovnáním obsahů kontaminantů v jednotlivých orgánech rostlin pěstovaných na nezatížených půdách s obsahy v rostlinách pěstovaných na půdách zatížených (Beneš, 1994). Jako měřítko ovlivnění plodin rizikovými prvky z půdy se uvádí např. index tolerance, koeficient přenosu nebo koncentrační faktor (Borůvka, 1997 a další). Pro hodnocení vlivu rizikových prvků na rostliny je nutné znát koncentrace těchto prvků v půdách. Za tímto účelem v ČR od roku 1993 probíhá celostátní monitoring výskytu rizikových prvků v půdách, jehož experimentální základna je založena na chemických analytických postupech. Získané výsledky těchto analýz však mohou jenom omezeně sloužit k posouzení rizikovitosti zatížení půd škodlivými látkami z hlediska jejich mobility, vstupu do potravních řetězců a zejména vlivu na klíčové procesy půdního metabolismu a zachování ekologických funkcí půdy. Je proto potřebné volit i další přístupy, které doplňují zavedené postupy hodnocení zátěže půd. Mezi tyto přístupy patří v poslední době využití mikrobiologických a biochemických metod (Kubát et al., 1996; Němeček et al., 1998).

Biochemické vlastnosti půd a mikrobiálních společenstev v nich obsažených jsou citlivější a rychleji reagují na zatížení půd než chemické a fyzikální vlastnosti (Nannipieri et al., 1997) a právě bioindikace, která se ve světě i u nás začíná prosazovat, opírající se o řadu mikrobiologických a biochemických metod, může postihnout změny ve výskytu, složení a funkci půdního edafonu (Domsch, 1991; Doelman et al., 1994; Filip, 1995 a další). Mikroorganismy jsou zvláště vhodné k tomu, aby sloužily jako první indikátor znečištění prostředí a působily jako varovný systém. Jejich různorodost, adaptabilita, krátká generační doba a variabilita metabolických drah však neumožňují najít a použít jednoduchou a opakovatelnou univerzální metodu k hodnocení např. vlivu těžkých kovů na půdní mikroflóru jako celku. Je nutné proto používat řadu metod a tyto metody dále modifikovat.

Pro hodnocení vlivu těžkých kovů na půdní mikroflóru lze v zásadě využívat půdy vystavené více či méně

ně dlouhodobému vlivu emisí těžkých kovů nebo jiným zdrojům znečištění (např. aplikaci průmyslových a komunálních odpadů), nebo použitím umělého kontaminaci solemi těžkých kovů. Obě možnosti mají svá úskalí. V prvním případě jde sice o reálné zátěže v terénu, ale z hlediska exaktnosti je obtížné nacházet srovnávací nezatížené kontrolní půdy s jinak stejnými parametry jako půdy zatížené. Navíc jsou takovéto půdy většinou zatíženy řadou kontaminantů dohromady, a není tedy možné hodnotit vliv jednotlivých kontaminantů odděleně. Druhou možností je použití přesně stupňované zvyšující se zátěže půd těžkými kovy z rozpustných solí. Tento způsob zaručuje srovnatelnost s nekontaminovanou kontrolou a možnost použití nejprve jednorvkové zátěže půd a na základě získaných výsledků přistoupit k různým kombinacím víceprvkové zátěže, blízkého se reálným zátěžím v terénu. Při tomto způsobu neodpovídá mobilita vnesených prvků reálným situacím v půdě (Němeček et al., 1998), a je proto nutné dlouhodobě oba způsoby kombinovat, a využít tak pozitivní možnosti, které poskytují.

Při plánování laboratorních a polních pokusů za účelem hodnocení vlivu těžkých kovů na mikrobiologické a biochemické vlastnosti půd, které jsou založeny na druhém popsaném způsobu, je nutné brát v úvahu určité aspekty a problémy. Nannipieri et al. (1997) mezi ně řadí znalost fyzikálně-chemických vlastností kovů, jejich metabolismu a toxických vlivů na organismy. Jako důležité dále uvádějí dávkování kovů (v rozsahu 0 až 10násobku požadových koncentrací v půdách) a vhodnou kontrolní variantu. Při použití solí kovů je nutné též brát v úvahu vedlejší efekt ostatních iontů vybraných solí. Významnou roli hrají i vlhkostní a teplotní parametry zakládaných pokusů. Je rovněž nutné pamatovat na to, že kovy jsou aplikovány do dynamického systému, ve kterém jsou jednotlivé procesy závislé na čase.

Cílem našeho dlouhodobého pokusu je sledování vlivu zvyšující se zátěže solemi Ni a As na růst ředkvičky a na biologické vlastnosti a aktivitu mikroorganismů ve dvou půdách pomocí tradičních i novějších mikrobiologických metod. Představujeme tak úvodní část dlouhodobého výzkumu v této oblasti.

MATERIÁL A METODA

Na jaře roku 1997 byl založen nádobový vegetační pokus se zvyšujícími se dávkami Ni a As, ve kterém

byly použity dvě půdy: těžká půda ze stanoviště Praha-Ruzyně [Ru] [černozem luviská, jílovitohlinitá: C_1 1,382, N_1 0,116 (%), C_{mikr} 0,134 (mg C.g^{-1}), $N\text{-NO}_3$ 8,21, $N\text{-NH}_4$ 0,07 ($\mu\text{g.g}^{-1}$) pH_{KCl} 6,8] a lehká půda ze stanoviště Lukavec u Pacova [Lu] [kambizem, písčitohlinitá: C_1 1,811, N_1 0,166 (%), C_{mikr} 0,258 (mg C.g^{-1}), $N\text{-NO}_3$ 8,39, $N\text{-NH}_4$ 0,27 ($\mu\text{g.g}^{-1}$) pH_{KCl} 5,8]. Zemina byla pro-sáta, dohnouze NPK a po jednotlivých variantách do ní byly vmíchány roztoky solí Ni a As (Ni ve formě $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, As ve formě NaAsO_2). Byly vybrány čtyři hladiny kontaminace a nekontaminovaná kontrola. Hladiny byly zvoleny tak, aby byly dosaženy koncentrace odpovídající násobkům maximálně přípustných hodnot obsahu rizikových prvků v půdách podle vyhlášky MŽP ČR 13/1994 Sb. §2, zde označovaných jako limit (Ni: 80 mg.kg^{-1} – těžké půdy, 60 mg.kg^{-1} – lehké půdy, As: 30 mg.kg^{-1} – všechny půdy). Šlo o tyto varianty: 1) bez kontaminace, 2) doplnění do povoleného limitu (L), 3) 2xL, 4) 5xL, 5) 10xL. Půda byla dostatečně promíchána a po 5 kg plněna do nádob. Každá varianta pokusu měla šest opakování. V nádobách byla během let 1997 a 1998 pěstována ředkvička (odrůda Rampouch) vždy ve třech etapách pěstování (duben až září). Před vegetační sezonou v roce 1998 byly podle aktuálního stavu dodány živiny a zemina byla promíchána. V průběhu obou let proběhla sklizeň rostlin a byla sledována produkce bulev a nadzemní části (uvedeny jsou výsledky výnosů bulev) a obsahy Ni, resp. As ve vegetačních orgánech (mineralizace 60% HNO_3 , ICP spektrometr). Byly odebrány vzorky půdy pro stanovení celkové koncentrace Ni a As (mineralizace v lučavce královské, ICP spektrometr) a určení množství mobilních frakcí (extrakce 0,01M CaCl_2 , ICP spektrometr). Stejně vzorky půd byly použity pro mikrobiologické rozborů [zřeďovací metoda, počítání CFU (jednotek tvořících kolonie) – celkové počty bakterií: Thornton agar, sporotvorné bakterie: MP agar, mikromycety: Martin agar, oligotrofní bakterie: 100x ředěný MP agar, *Azotobacter*: Ashby agar]. Ve vzorcích půd byla pravidelně stanovována mikrobiální biomasa [fumigačně-extrakční metoda (Vance et al., 1987)]. Byly prováděny testy potenciální amonifikace TPAM (přídavek peptonu před inkubací) a potenciální nitrifikace TPNIT (přídavek síranu amonného před inkubací) [modifikovaná

metoda (Löbl, Novák, 1964)]. Byla sledována potenciální respirace RESP NG (produkce CO_2 během 20 h při inkubaci s přidavkem glukózy a síranu amonného) (Filip, 1994). Dehydrogenázová aktivita byla měřena jako koncentrace trifenylyformazanu po inkubaci s TTC (Dick et al., 1996).

Vedle těchto standardních testů byla použita tzv. razítková metoda – metoda přenosu rodičovských mikrobiálních kolonií (získaných mikrobiologickým rozbozem vzorků půd – Thornton agar, ředění 10^{-4}) pomocí sterilního látkového razítka z čistého živného média na média doplněná zvyšujícími se obsahy Ni (20, 30, 50, 75, 100 mg.l^{-1}) a As (60, 100, 130, 160, 200 mg.l^{-1}) v médiu a sledování nárůstu vniklých kolonií za účelem stanovení citlivosti či rezistence mikroorganismů ve vzorcích půd k uvedeným kovům. Další metodou bylo 10denní hodnocení rychlosti růstu kolonií mikroorganismů na Thornton agaru (ředění 10^{-5}) a sledování kumulativních počtů pro stanovení, jaké skupiny mikroorganismů převládají ve vzorcích půd z hlediska rychlosti růstu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

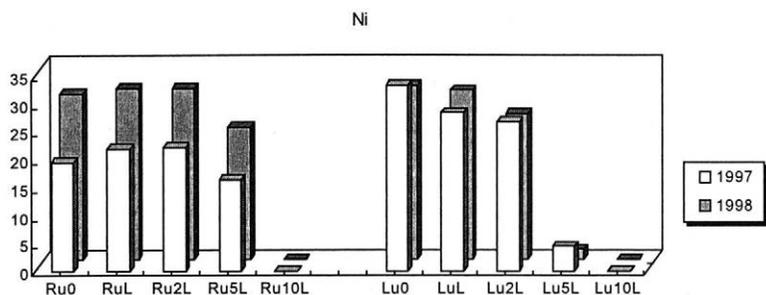
Před setím první etapy pokusu v roce 1998 byly vzorky půd analyzovány na obsah dodaných kovů. Celkové naměřené koncentrace Ni a As po jednoleté přítomnosti v půdách jsou uvedeny v tab. I. Hodnoty koncentrací těchto prvků přibližně odpovídají zvoleným násobkům limitních hladin tak, jak byly půdy těmito kovy doplněny.

Na obr. 1 jsou uvedeny celkové výnosy sušiny bulev ředkviček. V obou sledovaných letech je patrný podobný průběh: ve všech třech etapách pěstování se projevilo negativní vliv stoupajících koncentrací Ni v půdě na růst rostlin a produkci biomasy. Již od koncentrace přesahující hladinu 2L se snižovala produkce biomasy rostlin, koncentrace 5L redukovala růst bulev (v případě lehké půdy signifikantně) i nadzemní hmoty (průběh je podobný jako u bulev) a koncentrace 10L úplně inhibovala klíčení rostlin ředkvičky u obou půd. Rostliny bez následků tolerovaly hladiny Ni v těžké půdě z Ruzyně do přibližně 170 mg.kg^{-1} a v lehké půdě z Lukavce do

I. Koncentrace těžkých kovů v jednotlivých variantách pokusu po jednom roce od dodání (březen, 1998) – Concentration of heavy metals in treatments one year after addition (March, 1998)

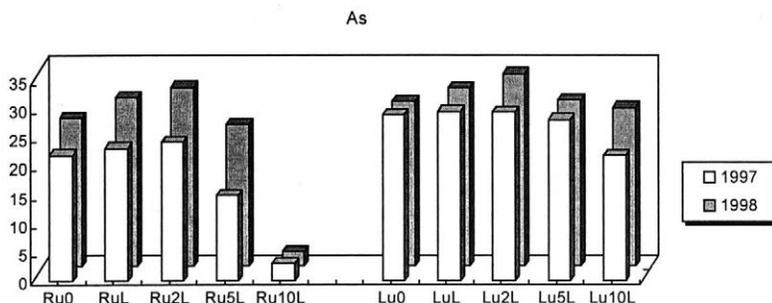
| Varianta ¹ | Označení ⁴ | Koncentrace ⁵ (mg.kg^{-1}) | | | |
|--------------------------------|-----------------------|--|--------|---------|--------|
| | | Ruzyně | | Lukavec | |
| | | Ni | As | Ni | As |
| Bez přídavku ² | 0 | 26,60 | 16,53 | 26,76 | 14,14 |
| Přídavek na limit ³ | L | 85,40 | 34,38 | 64,62 | 38,31 |
| 2x limit | 2L | 174,06 | 70,30 | 123,50 | 67,72 |
| 5x limit | 5L | 393,15 | 194,34 | 358,53 | 202,90 |
| 10x limit | 10L | 853,57 | 301,15 | 647,21 | 373,42 |

¹treatment, ²without addition, ³addition to limit, ⁴indication, ⁵concentration



I. Výnosy bulvů ředkviček ve sledovaných letech (celkové hodnoty tří etap pěstování) – Yield of radish tubers in investigated years (total values of three stage planting)

osa x: varianta – x axis: treatment
osa y: g/nádoba – y axis: g/pot



120 mg.kg⁻¹. V případě As byla hranice tolerance v těžké půdě posunuta ke koncentraci odpovídající 5L (přibližně 200 mg.kg⁻¹ půdy), která redukovala produkci bulvů i nadzemní hmoty. Koncentrace odpovídající 10L v obou letech silně (signifikantně) redukovala růst rostlin. Nejvyšší redukce růstu rostlin způsobená As byla zjištěna v lehké kyselé půdě z Lukavce, kdy ani nejvyšší hladina kontaminace nezpůsobila signifikantní redukci růstu rostlin (Šimon et al., 1998). Při porovnávání průměrných koncentrací Ni, resp. As v bulvůch ředkviček (obr. 2) jsou v obou letech patrně logicky se zvyšující hodnoty, odpovídající stoupající kontaminaci půd. U nejvíce kontaminovaných variant byla zjištěna mnohonásobně (17 až 160krát v případě lehké půdy)

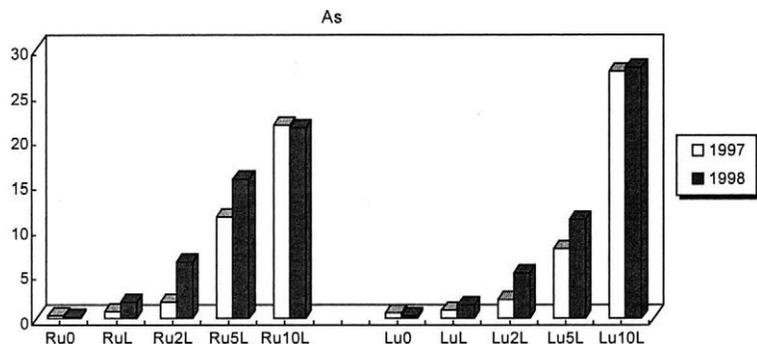
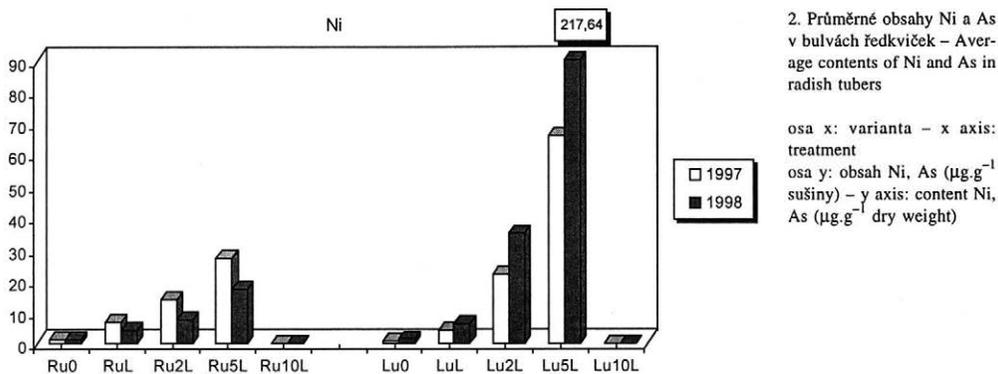
vyšší koncentrace Ni, resp. As v orgánech rostlin než u kontrolních variant. Zajímavá je též distribuce těchto prvků v rostlinách. Ve většině případů byla zjištěna, zvláště u nejvyšších hladin kontaminace, vyšší koncentrace Ni a As v bulvůch než nadzemní části, i když toto zvýšení bylo maximálně dvojnásobné. Koncentracím kovů odpovídala i kapacita akumulace rostlinami, která byla nejvyšší u variant 2L a 5L u Ni a 5L a 10L u As.

Tolerance rostlin k Ni a As přímo souvisela s obsahem mobilních frakcí obou prvků v půdě. Hodnoty těchto obsahů při použití 0,01M CaCl₂ jako slabého extrakčního činidla (Tlustoš et al., 1994) jsou uvedeny v tab. II, z níž jsou patrná velmi podobně se zvyšující množství extrahovatelných frakcí v obou letech u obou

II. Průměrné obsahy mobilních frakcí Ni a As (mg.kg⁻¹ suché půdy) (extrakce 0,01M CaCl₂) ve vzorcích půd stupňovitě kontaminovaných Ni a As na konci vegetace – Average contents of mobile fractions Ni and As (mg.kg⁻¹ dry soil) (extraction by 0.01M CaCl₂) in soil samples step contaminated by Ni and As at the end of vegetation period

| Varianta ¹ (přídavek ² Ni) | Rok ³ | | Varianta (přídavek As) | Rok | |
|---|------------------|--------|---------------------------|-------|-------|
| | 1997 | 1998 | | 1997 | 1998 |
| Ru0 | 0,03 | 0,08 | Ru0 | 0,09 | 0,07 |
| RuL | 0,14 | 0,14 | RuL | 0,09 | 0,13 |
| Ru2L | 0,35 | 0,45 | Ru2L | 0,42 | 0,31 |
| Ru5L | 1,42 | 2,61 | Ru5L | 3,61 | 2,46 |
| Ru10L | 14,43 | 13,38 | Ru10L | 10,19 | 11,54 |
| Lu0 | 0,09 | 0,10 | Lu0 | 0,08 | 0,05 |
| LuL | 0,46 | 0,65 | LuL | 0,18 | 0,28 |
| Lu2L | 4,87 | 6,38 | Lu2L | 0,57 | 0,68 |
| Lu5L | 28,02 | 39,72 | Lu5L | 2,34 | 2,55 |
| Lu10L | 138,70 | 134,66 | Lu10L | 5,74 | 8,31 |

¹treatment, ²addition, ³year



prvků současně se zvyšující se kontaminací půd. Celkově byly zjištěny podstatně vyšší extrahovatelné podíly Ni u vzorků půd z Lukavce než z Ruzyně, což do značné míry souvisí s nižším pH lehké půdy, které má rozhodující vliv na chování tohoto prvku v půdě a na jeho rozpustnost (Tyler, McBride, 1982). Vysoké hodnoty mobilních frakcí Ni u silně kontaminovaných variant během celého pokusu svědčily o jeho vyšší přístupnosti pro rostliny a méně pevných vazbách v půdě. Byly nalezeny silné negativní korelace mezi výnosem bulvů a obsahem mobilních frakcí v případě kontaminace Ni v obou letech pokusu (tab. III). V případě As je zřejmé, že As byl méně extrahovatelný než Ni, jeho koncentrace v půdním roztoku byla nižší a nižší byla i jeho toxicita pro rostliny zvláště v kyselejších půdách, kde ani nižší pH (5,8) nezvýšilo míru jeho extrahovatelnosti. V roce 1998 byla zaznamenána nižší závislost výno-

su bulvů na obsahu mobilních frakcí As v půdě (tab. III). Beneš (1994) uvádí, že As ve formě arzenitanů a arzeničnanů železa a hliníku je zvláště v kyselejších půdách málo rozpustný. Uvedené výsledky je nutné chápat jako ilustrativní, protože mobilita kovů při dlouhodobé zátěži v přirozeně rostlé půdě může být odlišná, tedy spíše nižší vzhledem k dlouhodobé tvorbě pevných vazeb v půdě. Avšak pro posouzení vlivu kovů na celý systém půda – rostlina v tomto pokusu jsou uvedené výsledky podstatné.

Tab. IV uvádí souhrnné výsledky mikrobiologických rozborů vzorků půd na konci vegetace ředkviček (září) v obou letech. Na základě získaných dat je možné pozorovat určité trendy v zastoupení mikroorganismů při prodlužující se přítomnosti zvyšujících se hladin kontaminantů v půdách. Stejně jako v roce 1997 je zvláště u Ni i v roce 1998 patrný pokračující výraznější pokles

III. Závislost výnosů bulvů ředkviček na obsahu mobilních frakcí v půdě – Dependence of yield of radish tubers on mobile fractions in the soil

| Kontaminace ¹ Ni | Mobilní frakce ² Ni | | Kontaminace As | Mobilní frakce As | |
|-----------------------------|--------------------------------|---------|----------------|-------------------|---------|
| | <i>r</i> | | | <i>r</i> | |
| | 1997 | 1998 | | 1997 | 1998 |
| Ruzyně | -0,9818 | -0,9981 | Ruzyně | -0,9916 | -0,9831 |
| Lukavec | -0,8109 | -0,8320 | Lukavec | -0,9665 | -0,5985 |

r = korelační koeficient³ ($p = 0,05$)

¹contamination, ²mobile fractions, ³correlation coefficient

IV. Mikrobiologický rozbor vzorků půd stupňovitě kontaminovaných Ni a As na konci vegetace 1997, 1998 [průměrné hodnoty CFU (jednotek tvořících kolonie).g⁻¹] – Microbiological analysis of soil samples step contaminated by Ni and As at the end of vegetation period 1997, 1998 [average values of CFU (colony forming units).g⁻¹]

| Přídavek ¹ | Varianta ² | Celkový počet bakterií ³ x 10 ⁵ | | Sporotvorné bakterie ⁴ x 10 ⁵ | | Mikromycety ⁵ x 10 ⁴ | | Oligotrofní bakterie ⁶ x 10 ⁶ | | Azotobacter x 10 ¹ | |
|-----------------------|-----------------------|---|------|---|------|--|----------------|---|------|-------------------------------|------|
| | | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 |
| Ni | Ru0 | 113,7 | 14,1 | 2,3 | 7,1 | 7,7 | 3,5 | 40,3 | 11,6 | 16,6 | 8,2 |
| | RuL | 114,8 | 18,5 | 1,5 | 8,1 | 3,5 | 1,2 | 50,6 | 13,0 | 6,5 | 2,3 |
| | Ru2L | 169,2 | 23,9 | 1,3 | 15,9 | 16,4 | 3,4 | 61,7 | 14,9 | 17,0 | 2,2 |
| | Ru5L | 148,0 | 16,8 | 2,2 | 7,8 | 8,8 | 2,2 | 25,8 | 8,6 | 7,0 | < 10 |
| | Ru10L | 35,3 | 7,1 | 0,5 | 8,3 | 10,6 | 17,8 | 15,8 | 10,1 | 0,6 | < 10 |
| | Lu0 | 53,5 | 17,0 | 2,8 | 8,5 | 6,1 | 8,5 | 71,8 | 17,9 | < 10 | < 10 |
| | LuL | 97,5 | 24,6 | 4,4 | 7,4 | 7,1 | 23,4 | 33,9 | 17,9 | < 10 | < 10 |
| | Lu2L | 101,2 | 12,9 | 5,0 | 9,4 | 9,8 | – ⁺ | 56,1 | 15,6 | < 10 | < 10 |
| | Lu5L | 85,4 | 7,4 | 7,6 | 2,5 | 18,9 | – | 114,7 | 13,8 | < 10 | < 10 |
| | Lu10L | 7,3 | 8,4 | 5,1 | 4,8 | 11,0 | – | 115,9 | 5,2 | < 10 | < 10 |
| As | Ru0 | 113,7 | 14,1 | 2,3 | 7,1 | 7,7 | 3,5 | 40,3 | 11,6 | 16,6 | 8,2 |
| | RuL | 125,4 | 25,3 | 2,5 | 11,5 | 33,0 | 3,5 | 54,2 | 11,5 | 10,6 | 16,1 |
| | Ru2L | 147,2 | 11,4 | 2,3 | 14,8 | 21,4 | 1,1 | 62,3 | 11,4 | 18,4 | 13,7 |
| | Ru5L | 107,8 | 15,9 | 3,1 | 4,5 | 35,0 | 3,4 | 53,1 | 15,7 | 45,4 | 15,9 |
| | Ru10L | 93,9 | 14,4 | 2,2 | 7,2 | 8,9 | 6,0 | 61,8 | 12,6 | 17,8 | 4,8 |
| | Lu0 | 53,5 | 17,0 | 2,8 | 8,5 | 6,1 | 8,5 | 71,8 | 17,9 | < 10 | < 10 |
| | LuL | 72,8 | 24,7 | 3,2 | 10,6 | 4,2 | 14,1 | 66,7 | 18,9 | < 10 | < 10 |
| | Lu2L | 83,5 | 23,7 | 6,2 | 5,9 | 7,4 | 7,1 | 61,2 | 17,4 | < 10 | < 10 |
| | Lu5L | 102,7 | 40,3 | 4,9 | 9,8 | 19,4 | 8,6 | 72,3 | 24,8 | < 10 | 3,7 |
| | Lu10L | 99,1 | 23,0 | 4,0 | 7,3 | 31,7 | 6,1 | 73,9 | 16,7 | < 10 | 1,2 |

⁺ misky přerostlé rodem *Rhizopus* – dishes overgrown by *Rhizopus*

¹addition, ²treatment, ³total number of bacteria, ⁴spore-forming bacteria, ⁵micromycetes, ⁶oligotrophs

celkového počtu bakterií u nejvíce zatížených variant u obou sledovaných půd. Podobný pokles je po silnější kontaminaci Ni zaznamenán též u citlivých mikroorganismů, jakými jsou volně žijící diazotof *Azotobacter* v těžké půdě. Naopak u vyšších hladin Ni v půdě byl pozorován nárůst počtů mikromycet, které jsou k těžkým kovům méně citlivé, při současném snižování jejich druhové různorodosti. Mikromycety ve více kontaminovaných variantách postupně převládaly nad jinými skupinami mikroorganismů. U kontaminace As byly poklesy celkových počtů mikroorganismů u obou půd menší a na konci vegetace v roce 1998 nebyly patrné. Též vliv této kontaminace na jednotlivé druhy mikroorganismů byl nízký. Údaje z mikrobiologických rozborů, zvláště u půd kontaminovaných Ni, dokládají změny, ke kterým postupně s přibývajícím časem dochází, tedy změnu skladby mikroorganismů směrem k chudší biocenóze. Atlas (1984) uvádí, že v kontaminovaných půdách dochází ke snižování diverzity vlivem odumírání druhů, které postrádají dostatečnou odolnost ke stresům, a naopak k posílení určitých druhů, které i při záteži přežívají.

Uvedené změny dokumentuje tab. V, zahrnující výsledky některých biochemických testů a hodnoty mikrobiální biomasy vzorků půd. Z tab. V je patrný v obou

letech úbytek mikrobiální biomasy u variant silněji kontaminovaných Ni. Stanovení C mikrobiální biomasy představuje první dobrý indikátor vlivu zásahů do půdy na její biologické a biochemické vlastnosti, změny v mikrobiální biomase jsou patrné dříve, než je možné detekovat jakékoliv změny celkového uhlíku v půdách (Nannipieri, 1984; Carter, 1986). Frostegård et al. (1996) ve svých laboratorních studiích potvrzují, že změny ve struktuře mikrobiální komunity vlivem kontaminace těžkými kovy souvisejí se snižující se mikrobiální biomasou. Podobné výsledky byly získány i v tomto našem experimentu. Při použití testů potenciální amonifikace, nitrifikace a dále měření potenciální respirace a aktivity dehydrogenáz byl zaznamenán podobný pokles hodnot v obou letech jako u mikrobiální biomasy. U všech těchto testů v případě kontaminace Ni docházelo u obou půd již po překročení hladiny 2L k poklesu naměřených hodnot. U kontaminace půd As je zvláště na lehké půdě z Lukavce patrné, že negativní vliv As během doby zeslábl a půda se zotavila natolik, že parametry její biologické aktivity jsou příznivé (ať již jde o mikrobiální biomasu, aktivitu dehydrogenáz nebo respiraci) i v případě nejvyšší kontaminace (tab. V). Výsledky testů do značné míry souvisejí se zjištěnými hodnotami rozpustných frakcí těžkých kovů v půdách

V. Mikrobiální biomasa (C_{mikr}) a biochemická charakteristika vzorků půd stupňovitě kontaminovaných Ni a As na konci vegetace 1997, 1998 (průměrné hodnoty) – Microbial biomass (C_{mikr}) and biochemical characteristic of soil samples step contaminated by Ni and As at the end of vegetation period 1997, 1998 (average values)

| Přídavek ¹ | Varianta ² | C_{mikr} ($\mu\text{g g}^{-1}$) | | TPAM (mg N.100 g^{-1}) | | TPNIT (mg N.100 g^{-1}) | | RESP NG (mg C.100 g^{-1}) | | Aktivita dehydrogenáz ³ ($\mu\text{g TPF.100 ml}^{-1}$) | |
|-----------------------|-----------------------|---|--------|--------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|---|-------|---|---------|
| | | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 | 1997 | 1998 |
| Ni | Ru0 | 142,57 | 184,83 | 87,96 | 86,16 | 23,41 | 27,29 | 39,03 | 39,73 | 385,7 | 683,7 |
| | RuL | 152,95 | 170,61 | 81,26 | 86,47 | 24,35 | 21,28 | 42,99 | 41,45 | 315,0 | 672,3 |
| | Ru2L | 158,17 | 144,12 | 76,91 | 82,03 | 25,16 | 19,74 | 39,19 | 36,84 | 290,3 | 469,3 |
| | Ru5L | 124,21 | 181,30 | 64,64 | 81,28 | 15,75 | 10,07 | 28,90 | 29,45 | 248,3 | 386,3 |
| | Ru10L | 100,52 | 101,26 | 44,98 | 70,58 | 0 | 0 | 4,98 | 15,45 | 71,2 | 245,7 |
| | Lu0 | 162,53 | 254,64 | 55,30 | 79,54 | 15,32 | 16,09 | 35,07 | 44,20 | 801,7 | 1 239,0 |
| | LuL | 184,26 | 283,10 | 91,02 | 84,55 | 17,22 | 16,73 | 41,01 | 45,70 | 832,7 | 938,0 |
| | Lu2L | 183,43 | 260,98 | 49,13 | 56,26 | 12,46 | 11,89 | 40,28 | 43,66 | 658,0 | 826,3 |
| | Lu5L | 129,49 | 134,52 | 42,72 | 13,81 | 3,44 | 8,13 | 24,18 | 16,86 | 298,0 | 256,7 |
| | Lu10L | 90,93 | 118,71 | 9,12 | 2,01 | 0 | 6,65 | 10,19 | 15,28 | 155,7 | 233,7 |
| As | Ru0 | 142,57 | 184,83 | 87,96 | 86,16 | 23,41 | 27,29 | 39,03 | 39,73 | 385,7 | 683,7 |
| | RuL | 117,50 | 163,45 | 88,63 | 91,29 | 17,87 | 22,00 | 38,88 | 38,08 | 530,3 | 675,3 |
| | Ru2L | 127,93 | 153,45 | 79,30 | 78,02 | 20,01 | 22,05 | 31,80 | 42,03 | 854,0 | 845,0 |
| | Ru5L | 147,77 | 163,78 | 79,33 | 94,29 | 14,25 | 20,60 | 29,19 | 37,65 | 456,0 | 645,0 |
| | Ru10L | 148,88 | 152,60 | 72,05 | 81,42 | 0 | 19,68 | 28,94 | 33,62 | 310,7 | 537,3 |
| | Lu0 | 162,53 | 254,64 | 55,30 | 79,54 | 15,32 | 16,09 | 35,07 | 44,20 | 801,7 | 1 239,0 |
| | LuL | 192,04 | 279,61 | 55,15 | 73,73 | 15,20 | 17,27 | 33,82 | 43,58 | 872,3 | 1 144,3 |
| | Lu2L | 178,20 | 290,46 | 48,12 | 53,66 | 14,09 | 13,56 | 28,09 | 44,30 | 896,0 | 1 177,7 |
| | Lu5L | 192,41 | 285,22 | 65,05 | 74,28 | 16,90 | 16,09 | 33,47 | 48,55 | 865,0 | 1 210,0 |
| | Lu10L | 209,99 | 267,07 | 81,71 | 72,50 | 25,31 | 17,46 | 31,69 | 46,19 | 1 113,3 | 1 156,0 |

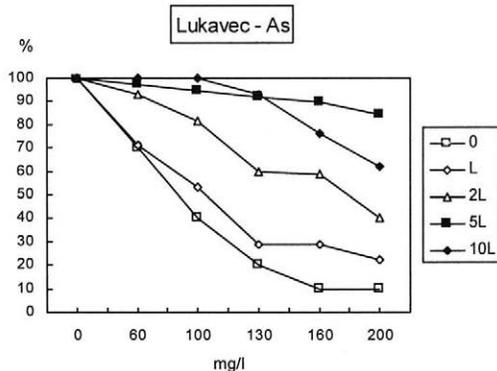
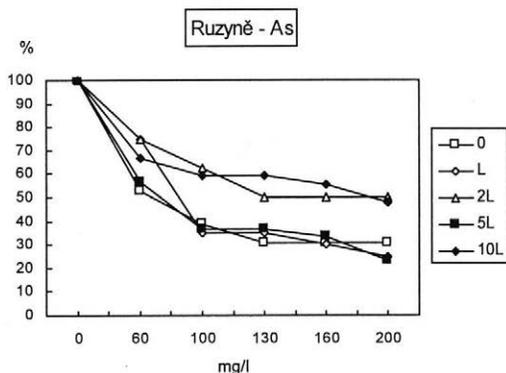
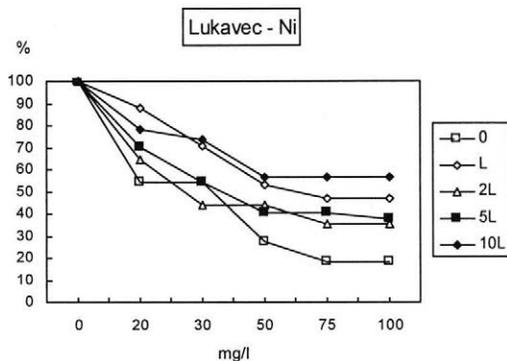
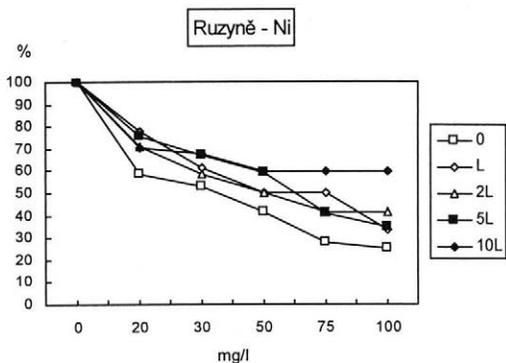
¹addition, ²treatment, ³dehydrogenase activity

(tab. II). Např. Hattori (1992) uvádí, že množství roz-pustných forem kovů v půdě hraje důležitější roli při potlačení produkce CO_2 než celková koncentrace kovů v půdách. Použité testy vybraných aktivit patří mezi ty, které jsou označovány jako dobrý indikátor znečištění půd (Doelman, 1986; McGrath et al., 1988; Wilke, 1991). Jiné aktivity (aktivita fosfatáz, mineralizace pří-rodního půdního C a N) jsou k přítomnosti těžkých ko-vů v půdách méně citlivé (Brookes et al., 1984).

Vedle uvedeného hodnocení vzorků půd byly pro dokumentaci změn v půdách po dodání kontaminantů použity laboratorní metody, pomocí kterých může být posouzen zvláště vliv kontaminace na jejich citlivost k uvedeným kontaminantům a na rychlost růstu urči-tých skupin mikroorganismů. Metodou přenosu rodi-čovských mikrobiálních kolonií (získaných mikrobiolo-gickým rozbohem vzorků půd) z čistého média na média doplněná zvyšujícími se koncentracemi Ni, resp. As jsme se v roce 1998 pokusili ohodnotit citlivost mikroorganismů k těmto prvkům po jejich roční přítomnosti v půdě. Výsledky testu jsou souhrnně znázor-něny na obr. 3. Hodnoty celkových počtů kolonií narostlých na jednotlivých koncentracích Ni, resp. As v agaru po přenosu z čisté kontrolní misky byly za úče-lem porovnání poklesů nárůstů kolonií převedeny na procenta s tím, že nárůst na misce bez přídavku kovu představuje vždy 100%. Při hodnocení testu je možné

konstatovat, že nárůsty kolonií ze vzorků půd (Ruzyně i Lukavec) kontaminovaných Ni a As v dávkách 0, L a 2L vykázaly silnější pokles, zároveň se zvyšující se koncentrací Ni, resp. As v agaru v porovnání s počty kolonií ze vzorků 5L a 10L. Tyto údaje dokládají sku-tečnost, že již ročním působením vysokých hladin Ni a As v půdě byla vyvolána rezistence mikroorganismů k těmto prvkům a mikroorganismy ze silně kontami-novaných variant jsou proto schopny růst ve větším počtu na vyšších koncentracích Ni i As v živném médiu. Zá-roveň z výsledků těchto testů vyplynulo, že toxicita Ni pro mikroorganismy je vyšší než toxicita As a mikro-organismy byly schopné růst na dvakrát vyšší koncen-traci As v porovnání s Ni. Duxbury, Bicknell (1983) ukázali, že počty rezistentních bakterií ve více kontami-novaných půdách Cd, Cu, Ni a Pb byly až 15krát vyšší než v méně kontaminovaných půdách. Na základě sle-dování citlivosti bakteriální mikroflóry k Zn a Cd vy-pracovali Doelman et al. (1994) index sensitivity-rezis-tence, který považují za dobrý biomonitor zatížení půd těžkými kovy. Z této jejich studie vyplývá, že vyvolání rezistence k těžkým kovům je doprovázeno snížením schopnosti těchto mikroorganismů degradovat přiroze-né aromatické sloučeniny.

V dalším laboratorním testu, který byl realizován v roce 1998, byla hodnocena rychlost růstu kolonií mikroorganismů na Thornton agaru s cílem zjistit, jaké



3. Procentuální vyjádření růstu citlivých a rezistentních mikroorganismů ve vzorcích půd kontaminovaných Ni a As (razítková metoda) – Percentual statement of the growth of sensitive and resistant microorganisms in soil samples contaminated by Ni and As (pad technique)

osa x: koncentrace Ni, As v agaru – x axis: concentration of Ni, As in agar
osa y: % růstu kolonií – y axis: % of colony growth

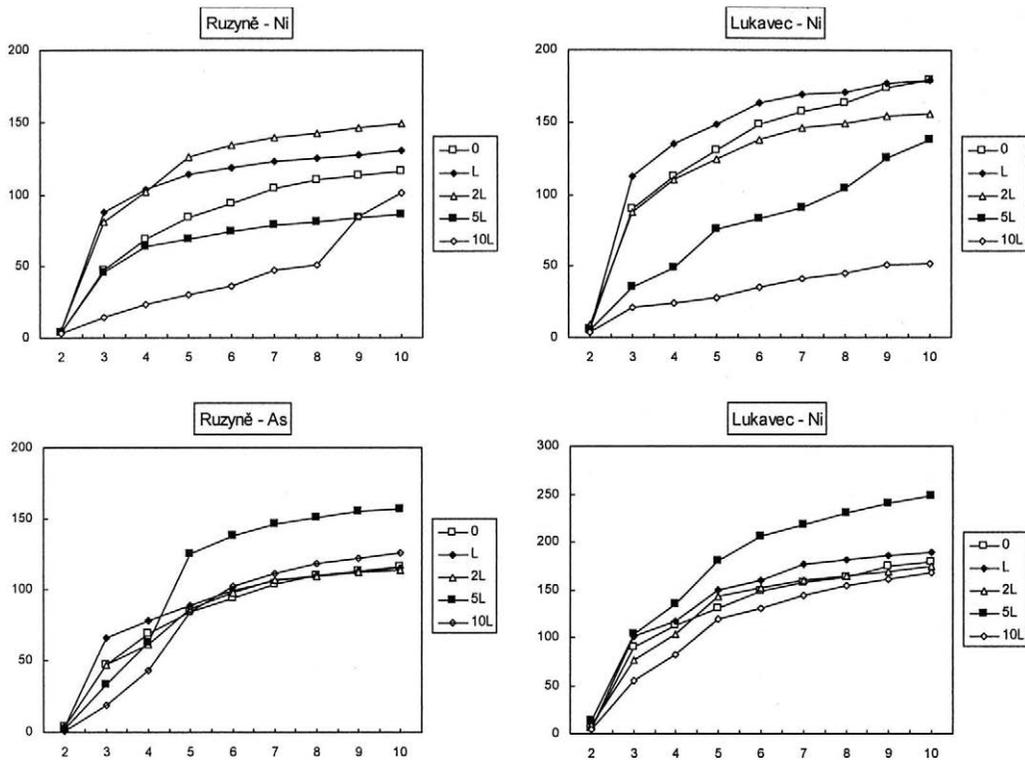
VI. Procentuální porovnání rychle a pomalu rostoucích kolonií mikroorganismů ve vzorcích půd stupňovitě kontaminovaných Ni a As – Percentual comparison of fast and slow growing colonies of microorganisms in soil samples step contaminated by Ni and As

| Varianta ¹ | % rychle rostoucích kolonií ² (1.–4. den ⁴) | % pomalu rostoucích kolonií ³ (5.–10. den) | Varianta | % rychle rostoucích kolonií (1.–4. den) | % pomalu rostoucích kolonií (5.–10. den) |
|-----------------------|--|---|----------|---|--|
| RuNi0 | 59,5 | 40,6 | LuNi0 | 62,6 | 37,4 |
| RuNiL | 79,2 | 20,8 | LuNiL | 75,4 | 24,6 |
| RuNi2L | 68,5 | 31,5 | LuNi2L | 70,5 | 29,5 |
| RuNi5L | 74,4 | 25,6 | LuNi5L | 35,5 | 64,5 |
| RuNi10L | 22,8 | 77,2 | LuNi10L | 46,2 | 53,8 |
| RuAs0 | 59,5 | 40,5 | LuAs0 | 62,6 | 37,4 |
| RuAsL | 67,8 | 32,2 | LuAsL | 61,9 | 38,1 |
| RuAs2L | 53,5 | 46,5 | LuAs2L | 59,2 | 40,8 |
| RuAs5L | 40,1 | 59,9 | LuAs5L | 54,4 | 45,6 |
| RuAs10L | 34,1 | 65,9 | LuAs10L | 49,1 | 50,9 |

¹treatment, ²of fast growing colonies, ³of slow growing colonies, ⁴day

mikroorganismy převládají ve vzorcích půd se zvyšující se zátěží Ni a As, jde-li o pomalu nebo rychle rostoucí skupiny. Zároveň byly zjišťovány kumulativní počty mikroorganismů. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny

na obr. 4 a v tab. VI. Z výsledků vyplývá, že se zvyšující se zátěží Ni a As v půdách klesají počty rychle rostoucích mikroorganismů a naopak se zvyšují počty pomaleji rostoucích mikroorganismů. Tento trend je



4. Kumulativní počty kolonií mikroorganismů sledované během 10denního testu (vzorky půd kontaminované Ni a As) – Cumulative numbers of colonies during 10 days test (soil samples contaminated by Ni and As)

osa x: den – x axis: day

osa y: CFU/miska – y axis: CFU/dish

zřejmý hlavně u nejvyšší kontaminace oběma těžkými kovy. V případě kontaminace Ni počty mikroorganismů ze silněji kontaminovaných vzorků půd 5L a 10L nedosahují po ukončení pokusu (ve fázi, kdy se již denní přírůstky ustálily na stabilních hodnotách) počtů mikroorganismů z méně kontaminovaných vzorků a kontrolní varianty. Tato skutečnost je nejlépe pozorovatelná u lehké půdy. U těžké půdy došlo u varianty 10L až v závěru hodnocení k prudkému zvýšení počtu kolonií. Celkový nárůst mikroorganismů ze vzorků půd silněji kontaminovaných As nebyl přítomnosti As výrazněji omezen, naopak nejvíce kolonií narostlo shodně na obou půdách u varianty 5L a i v tomto případě šlo o pomaleji rostoucí mikroorganismy. Z uvedeného testu vyplývá skutečnost, že kontaminace půd těmito kovy brzdí rychlost růstu a množení mikroorganismů a v půdách potom převládají pomalu rostoucí mikroorganismy. V případě Ni jsou i jejich celkové počty nižší. U silněji kontaminovaných variant As převládají též pomaleji rostoucí mikroorganismy, ale jejich celkové počty nejsou redukovány. Právě na základě rychlosti růstu kolonií mikroorganismů vytvořili De Leij et al. (1993) systém hodnocení struktury mikrobiální komu-

nity, který nazvali r/K strategie (r-strategists = rychle rostoucí mikroorganismy, K-strategists = pomalu rostoucí mikroorganismy). Citovaní autoři zjistili, že rychleji rostoucí mikroorganismy jsou citlivější k toxickým látkám než pomalu rostoucí mikroorganismy. Kozdrój (1995) potom při hodnocení reakcí mikrobiálního společenstva na přidávek Cd a Cu touto strategií ověřil, že po umělé kontaminaci těmito kovy v půdě převládaly pomalu rostoucí skupiny mikroorganismů.

Podobné závěry zatím vyplývají i z našich výsledků, přičemž lze konstatovat, že v půdách po dvouleté přítomnosti vysokých koncentrací Ni a As postupně převládají pomaleji rostoucí skupiny mikroorganismů s nižší diverzitou, které mají vyšší rezistenci k uvedeným kovům a sníženou biochemickou aktivitu.

LITERATURA

Atlas R. M. (1984): Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: Klug J., Reddy C. A. (eds): Current perspectives in microbial ecology. Amer. Soc. Microbiol. Washington: 540-545.

- Beneš S. (1994): Obsahy a bilance prvků ve sférách životního prostředí. II. část. MZe ČR, Praha: 91–134.
- Borůvka L. (1997): Formy Cd, Pb a Zn ve vybraných půdách ČR. [Dizertace.] Praha, ČZU.
- Brookes P. C., McGrath S. P., Klein D. A., Elliott E. T. (1984): Effects of heavy metals on microbial activity and biomass in field soils treated with sewage sludge. In: Environmental contamination. Edinburgh, CEP: 574–583.
- Carter M. R. (1986): Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. *Soil Till. Res.*, 7: 29–40.
- De Leij F. A. A. M., Whips J. M., Lynch J. M. (1993): The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbiol. Ecol.*, 27: 81–97.
- Dick R. P., Breakwell D. P., Turco R. F. (1996): Soil enzymes activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran J. W., Jones A. J. (eds): Methods for assessing soil quality. SSSA Spec. Publ. No. 49, Soil Sci. Soc. Amer. Madison, Wisconsin: 247–271.
- Doelman P. (1986): Resistance of soil microbial communities to heavy metals. In: Jensen V., Kjoller A., Sorensen L. H. (eds): Microbial communities in soil. FEMS Symp. No. 33, Copenhagen, Elsevier Appl. Sci. London: 369–398.
- Doelman P., Jansen E., Michels M., Van Til M. (1994): Effect of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soils*, 17: 177–184.
- Domsch K. H. (1991): Status and perspectives of side-effect testing. *Toxicol. Environ. Chem.*, 30.
- Duxbury T., Bicknell B. (1983): Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol. Biochem.*, 15: 243–250.
- Filip Z. (1994): Methods of soil analysis for research project. Development and evaluation of biological methods for characterization of undisturbed or antropogenic polluted soil. Langen. 48 s.
- Filip Z. (1995): Microbiological and biochemical assessment of soil quality: The conception and some preliminary results of an international proposal. *Proc. Int. Conf. From soil survey to sustainable farming, Stará Lesná.*
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. (1996): Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.*, 28: 55–63.
- Hattori H. (1992): Influence of heavy metals on soil microbial activities. *Soil Sci. Pl. Nutr.*, 38: 93–100.
- Kozdrój J. (1995): Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. *Soil. Biol. Biochem.*, 27: 1459–1465.
- Kubát J., Cerhanová O., Mikanová O., Hanzlíková A., Filip Z. (1996): Vliv dlouhodobého hnojení a antropogenní zátěže na aktivitu půdní mikroflóry. *Rostl. Vyr.*, 42: 399–404.
- Löbl F., Novák B. (1964): Beitrag zur Methodik der Nitrifikation Bestimmung. *Zbl. Bakt.* II, 118: 374–378.
- McGrath S. P., Brookes P. C., Giller K. E. (1988): Effects of potentially toxic metals in soil derived past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biol. Biochem.*, 20: 415–424.
- Nannipieri P. (1984): Microbial biomass and activity in soil, ecological significance. In: Klug J., Reddy C. A. (eds): Current perspectives in microbial ecology. Amer. Soc. Microbiol. Washington: 515–521.
- Nannipieri P., Badalucco L., Landi L., Pietramellara G. (1997): Measurement in assessing the risk of chemicals to the soil ecosystem. In: Zelikoff J. T. (ed.): Ecotoxicology: Responses, biomarkers and risk assessment. OECD Wkshp, SOS Publ. Fair Haven, NJ, USA: 507–534.
- Němeček J., Podlešáková E., Macurová H. (1998): Indikace zatížení půd rizikovými prvky pomocí mikrobiologických a biochemických metod. *Rostl. Vyr.*, 44: 409–417.
- Šimon T., Mikanová O., Kubát J. (1998): The growth of radish and activity of soil microorganisms in soils polluted by Ni and As. In: Voříšek K. (ed.): Pathways and consequences of the dissemination of pollutants in the biosphere. *Proc. Symp. Praha*: 242–258.
- Tlustoš P., Van Dijk D., Száková J., Pavlíková D. (1994): Uvolňování Cd a Zn vybranými vyluhovacími. *Rostl. Vyr.*, 40: 1107–1121.
- Tyler L. D., McBride M. B. (1982): Mobility and extractability of cadmium, copper, nickel and zinc in organic and mineral soil columns. *Soil Sci.*, 134: 198–205.
- Vance E. D., Brookes P. C., Jenkinson D. S. (1987): An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 703–707.
- Wilke B. M. (1991): Effects of single and successive additions of cadmium, nickel and zinc on carbon dioxide evolution and dehydrogenase activity in a sandy luvisol. *Biol. Fertil. Soils*, 11: 34–37.

Došlo 25. 3. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. Tomáš Šimon, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: 02/33 02 22 53, fax: 02/33 31 06 36, e-mail: simont@hb.vurv.cz

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Prof. Ing. Andrej Fábry, DrSc., osmdesátiletý

Prof. Ing. Andrej Fábry, DrSc., pochází ze Slovenska. Narodil se 17. 9. 1919 v Koltě, v okrese Nové Zámky. Oba jeho rodiče zahynuli za války v koncentračních táborech, on sám se skrýval v Maďarsku. Po válce přišel studovat do Prahy na Fakultu zemědělského a lesního inženýrství ČVUT a po ukončení studia v roce 1950 zůstal na katedře speciální produkce rostlinné jako asistent.

Již od počátku vědecké kariéry se věnoval výzkumu olejnin, hlavně řepky. Nejprve se zabýval vývojovou biologii, zimovzdorností a hlavně pěstováním, sklizní a kvalitou řepky. Výsledky výzkumné práce shrnul ve své první monografii *Olejniny* (Praha, ČSAZV 1957). Praktické zkušenosti pak publikoval v metodice *Biologická kontrola v agrotechnice ozimé řepky* (Praha, ÚVTIZ 1976). Zde také uplatnil svoje poměrně rozsáhlé výzkumy s využitím regulátorů růstu u ozimé řepky. Za připomenutí stojí též skutečnost, že jako první ověřil a zavedl přímou sklizeň ozimé řepky, která se do té doby sklízela dělenou technologií. Byl rovněž průkopníkem moderních způsobů zakládání porostů ozimé řepky, včetně minimálního zpracování půdy. Další prvenství, které mu patří, je zavedení Systému výroby řepky, který byl později uplatňován u ostatních plodinových systémů v ČR a SR. Tento pěstitelský systém přinesl našemu zemědělství velkou prosperitu a jeho výsledky nás vynesly na přední místo v Evropě v pěstování řepky. Tato tradice pokračovala s dalším vývojem odrůdové skladby, se zavedením bezerukových odrůd řepky a s uplatněním výnosných a kvalitních odrůd řepky, vhodných pro potřeby zpracovatelského průmyslu. Naše zemědělství trvale těží z těchto zkušeností a řepka se stala jedinou rychle se rozšiřující plodinou a dosud nejlépe ceněnou komoditou naší rostlinné produkce. Rozvoj pěstování

řepky v ČR bude navždy spojen se jménem prof. Fábryho. Jako odborník je uznáván i v zahraničí, kde se stal členem Světové organizace pro řepku (GCIRC). K jeho zahraničním aktivitám patří i působení v Etiopii, kde se podílel na vybudování velké zemědělské farmy.

Nelze rovněž opomenout oblast pedagogické činnosti jubilanta. Jeho odborně fundované přednášky, bohaté na vědecké i praktické poznatky, plynoucí z jeho širokého pojetí výzkumu a soustavného styku s praxí, byly studenty velmi ceněny a hojně navštěvovány. Jeho náročnost u zkoušek byla pověstná. Prof. Fábry vychoval řadu svých následovníků, diplomantů a aspirantů, dnes již vynikajících odborníků v pěstování řepky. Vykonal též mnoho pro rozvoj výzkumu na katedře rostlinné výroby, zasloužil se o vybavení pokusných stanic a usiloval též o prosperitu Školního zemědělského podniku v Lánech, zejména ve funkci prorektora pro školní podniky.

Publikační činnost prof. Fábryho je velmi rozsáhlá. Mezi jeho hlavní knižní publikace patří již zmíněná monografie, dále *Pěstování rostlin IV.* (Bratislava, SNPL 1957), *Řepka, hořčice, mák a slunečnice* (Praha, SZN 1976) a *Agrotechnika kvalitativně odlišných odrůd ozimé řepky* (Praha, IVV MZe ČR 1992). Samostatnou bohatou řadu tvoří publikace pro Systém výroby řepky. Publikoval celkem 70 vědeckých publikací, 280 odborných publikací a referátů, řadu metodik pro praxi, skript a též vynikajících učebních pomůcek.

S jubilantem se setkáváme na naší katedře již 49 let a obdivujeme jeho pracovní aktivitu a duševní svěžest. I když již ukončil svoji pedagogickou dráhu, pracuje dosud například ve Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin, účastní se řady odborných seminářů, konferencí i „polních kázání“ a sleduje pokusy vedené v rámci SPZO. Stále se ještě věnuje publikační činnosti.

Prof. Ing. Jiří Petr, DrSc.

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Prof. Ing. Václav Fric, DrSc., sedmdesátiletý

Prof. Ing. Václav Fric, DrSc., se narodil 28. 9. 1929 a odborné veřejnosti je znám především jako přední specialista-chmelař. Jako vysokoškolský profesor v oboru rostlinné výroby se celých 46 let intenzivně věnoval výzkumné a pedagogické činnosti. Na katedru rostlinné výroby Vysoké školy zemědělské v Praze nastoupil po ukončení studia na Agronomické fakultě, a zahájil tak vědeckou a pedagogickou činnost, u níž zůstal až dodnes, jmenovitě lze uvést například jeho přednášky pro specialisty. Habilitoval se v roce 1966, profesorem byl jmenován v roce 1980. Výčet jeho odborné i pedagogické práce je rozsáhlý. Publikoval více než 150 prací, z toho 110 vědeckých, napsal 12 učebnic a řadu skript. Léta působil ve funkci předsedy komise státních závěrečných zkoušek.

Podněty pro svou odbornou činnost čerpal převážně z praxe, s kterou je stále v úzkém spojení. Realizaci praktických záměrů v návaznosti na teoretické základy daného oboru řešil náročnou problematiku, jako jsou moderní technologie pěstování a posklizňové úpravy chmele. Ve spolupráci s kolegy z Chmelařského institutu v Žatci propracoval tyto metody na špičkovou úroveň, odpovídající české chmelařské tradici. Jeho činnost byla po zásluze oceněna i nejvyšším mezinárodním významáním, které v oboru chmelařství existuje: *Rytíř chmelového řádu*.

Jubilant odvedl neméně rozsáhlou práci organizační. Na Vysoké škole zemědělské (nyní České zemědělské univerzitě) v Praze zastával jedno funkční období funkci proděkana Agronomické fakulty, dvě funkční období byl vedoucím katedry rostlinné výroby a také předsedou komise Agronomické fakulty pro udělování vědeckých hodností. V roce 1990 se stal ředitelem Výzkumného ústavu chmelařského (později Chmelařského institutu) v Žatci a v této funkci setrval až do letošního roku, kdy odešel do důchodu.

Dosud však vykonává úřad prezidenta vědecké komise Mezinárodního sdružení pěstitelů chmele, což představuje vysoké ocenění nejen jeho osobní, ale českého chmelařství vůbec. Je třeba připomenout také dlouholetou intenzivní práci jubilanta v redakční radě časopisu Rostlinná výroba, kde svoji erudicí výrazně přispívá k vědecké úrovni tohoto časopisu.

Prof. Fric vychoval řadu svých následovníků, dnes již významných odborníků, výsledky jeho dlouholeté výzkumné práce jsou známé v celém vědeckém světě a hojně využívané širokou zemědělskou praxí. Ve svém okolí stále rozdává nejen odborné poznatky a zkušenosti, ale s elánem jemu vlastním i tolik potřebný životní optimismus.

*Prof. Ing. Josef Šroller, CSc.
Doc. Ing. Václav Hosnedl, CSc.*

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem (včetně klíčových slov).

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nesmí přesáhnout 12 strojopisných stran včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotku odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Vlastní úprava rukopisu: formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojité mezery. K rukopisu je třeba přiložit disketu s prací pořízenou na PC a s grafickou dokumentací. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratk nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Musí obsahovat klíčová slova. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

Rozšířený souhrn (Abstract) je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné je (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována, a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému.

Metody se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

Výsledky – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura by měla sestávat hlavně z lektorovaných periodik. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSC, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Rukopis nebude redakcí přijat k evidenci, nebude-li po formální stránce odpovídat pokynům pro autory.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary (including key words).

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed 12 typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript layout: quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript. A PC diskette should be provided with the paper and graphical documentation. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract is an information selection of the subject and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise basic numerical data including statistical data. It must contain key words. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The section **References** should preferably contain reviewed periodicals. The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number or e-mail.

The manuscript will not be accepted to be filed by the editorial office if its formal layout does not comply with the instructions for authors.

OBSAH

| | |
|--|-----|
| Kubát J., Nováková J., Mikanová O., Apfelthaler R.: Cyklus organického uhlíku, výskyt mikroorganismů a respirační aktivita v dlouhodobém polním pokusu | 389 |
| Kubát J., Nováková J., Cerhanová D., Apfelthaler R.: Cyklus organického dusíku, amonifikační a nitrifikační aktivita v dlouhodobém polním pokusu..... | 397 |
| Štorkánová G., Voříšek K., Mikanová O., Randová D.: P-solubilizační aktivita kmenů rodu <i>Rhizobium</i> | 403 |
| Mikanová O., Kubát J.: Praktické využití P-solubilizační aktivity kmenů rodu <i>Rhizobium</i> | 407 |
| Pelikán J., Hofbauer J.: Fixace vzdušného dusíku u některých druhů bobovitých rostlin | 411 |
| Šimek M., Šantrůčková H.: Vliv skladování půdních vzorků na mikrobiální biomasu a její aktivitu... | 415 |
| Šimon T.: Vliv stupňovaných dávek niklu a arzeny na růst ředkvičky a půdní mikroflóru..... | 421 |
| Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA | |
| Petr J.: Prof. Ing. Andrej Fábry, DrSc., osmdesátiletý..... | 431 |
| Šroller J., Hosnedl V.: Prof. Ing. Václav Fric, DrSc., sedmdesátiletý..... | 432 |
| RECENZE | |
| Dolejš K.: V. Jehlík (ed.): Cizí expanzivní plevele České republiky a Slovenské republiky..... | 420 |

PLANT PRODUCTION

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Kubát J., Nováková J., Mikanová O., Apfelthaler R.: Organic carbon cycle, incidence of microorganisms and respiration activity in long-term field experiment (in English)..... | 389 |
| Kubát J., Nováková J., Cerhanová D., Apfelthaler R.: Organic nitrogen cycle, ammonification and nitrification activity in long-term field experiment (in English)..... | 397 |
| Štorkánová G., Voříšek K., Mikanová O., Randová D.: P-solubilization activity of <i>Rhizobium</i> species strains (in Czech) | 403 |
| Mikanová O., Kubát J.: Practical use of P-solubilization activity of <i>Rhizobium</i> species strains (in English) | 407 |
| Pelikán J., Hofbauer J.: The fixation of atmospheric nitrogen in some <i>Fabaceae</i> species (in English) | 411 |
| Šimek M., Šantrůčková H.: Influence of storage of soil samples on microbial biomass and its activity (in Czech)..... | 415 |
| Šimon T.: The effect of increasing rates of nickel and arsenic on the growth of radish and soil microflora (in Czech)..... | 421 |