

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

ROSTLINNÁ VÝROBA

Plant Production

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

9

VOLUME 46
PRAHA
ZÁŘÍ 2000
ISSN 0370-663X

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gestí 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

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

Členové – Members

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

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

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

Doc. Ing. Václav Hosnedl, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)

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

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

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

Doc. Ing. Jan Moudrý, CSc. (Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ČR)

Prof. RNDr. Lubomír Nátr, DrSc. (Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze, 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 v Brně, 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 Slávik, DrSc. (Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, ČR)

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

Doc. Ing. Pavel Tlustoš, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)

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

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

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

Prof. Dr. hab. Kazimiera Zawislak (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska)

Prof. Ing. Josef Zimolka, CSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ČR)

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, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12krát ročně), ročník 46 vychází v roce 2000.

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 2000 je 816 Kč.

Aktuální informace najdete na URL adrese: <http://www.uzpi.cz>

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, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 46 appearing in 2000.

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 2000 is 195 USD (Europe), 214 USD (overseas).

Actual information are available at URL address: <http://www.uzpi.cz>

NITRIFIKACE V PŮDĚ – TERMINOLOGIE A METODOLOGIE (STUDIE)

NITRIFICATION IN SOIL – TERMINOLOGY AND METHODOLOGY (REVIEW)

M. Šimek

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

ABSTRACT: Nitrification is defined as a biological oxidation of ammonium to nitrite and nitrate, or more generally as the biological transformation of reduced forms of nitrogen to oxidized forms. In many soils nitrification is a key process in nitrogen transformations as it converts the exchangeable cation, NH_4^+ , to the mobile anions NO_2^- and NO_3^- , which rapidly undergo other transformations (denitrification to N_2 and N_2O , assimilatory and dissimilatory nitrate reduction to ammonia, nitrate respiration; Fig. 1) or are easily leached from the soil. High rates of nitrification thus usually lead to high losses of nitrogen from soil. Moreover, as the oxidation of nitrogen compounds during nitrification produces hydrogen ions (H^+), nitrification results in acidification of the soil. Most nitrification is carried out by chemolithoautotrophic bacteria belonging to the family *Nitrobacteraceae*. The family consists of two main groups, the ammonia-oxidizing or *nitrosobacteria* and the nitrite-oxidizing or *nitrobacteria* (Tab. I). Nitrifying bacteria are obligate aerobes and gain energy from the oxidation of reduced nitrogen compounds to fix CO_2 to organic carbon. Although nitrite and nitrate are main nitrification products, there is an increasing evidence that also some gaseous nitrogen species, namely NO and N_2O , are produced as by products during the autotrophic nitrification. In addition to chemolithoautotrophic nitrifying bacteria, many other (heterotrophic) soil bacteria and fungi have an ability to oxidize reduced nitrogen compounds, both mineral (NH_4^+) and organic in the process called heterotrophic nitrification – heterotrophy is related to use of organic compounds as a source of carbon for biomass synthesis. Heterotrophic nitrifiers apparently do not obtain energy from the process and thus its physiological importance is not clear. Nevertheless, heterotrophic nitrification can prevail in (micro)sites with unfavorable conditions for autotrophic nitrifiers in, for example, acidic forest soils. As with autotrophic nitrification, nitrogen gases may also be produced during heterotrophic nitrification, although the significance of both autotrophic and heterotrophic sources of NO and N_2O has not been clearly demonstrated. It has been recently found that substantial amounts of NO and N_2O can be produced by autotrophic nitrifiers under conditions with lowered pO_2 . At high pO_2 the organisms use molecular oxygen to oxidise NH_4^+ during nitrification, which depletes the O_2 in their microenvironment. In order to maintain catabolism, nitrifying bacteria may switch to using either nitrate or nitrite as an electron acceptor in respiration reactions, saving any remaining O_2 for activation of NH_4^+ by ammonium monooxygenase enzyme. This in fact means that they carry out denitrification reactions which were found to be an important source of nitrogen gases. The process is called nitrifier denitrification and is believed to contribute substantially to NO and N_2O production in many soils. Nitrification is controlled by many environmental variables (Fig. 2), but the principal regulatory factors are ammonium as the substrate and partial pressure of molecular oxygen. The latter is a result of balance between soil air and soil moisture content, which is controlled both directly and indirectly by many environmental conditions. The only practical way for controlling the rate of nitrification in the field is thus the use of specific chemical compounds known as nitrification inhibitors (Tab. II), or to manage soil N to prevent substantial NH_4^+ accumulation at times when plant demand is small. Several techniques for estimation of nitrification rates in soil were developed, of which short-term nitrifying enzyme assay is a promising tool for the indication of recent capacity of the soil to nitrify.

Keywords: autotrophic nitrification; heterotrophic nitrification; mineralization; aeration status; pH; inhibitors

ABSTRAKT: Nitrifikací se rozumí biologická oxidace amoniaku na nitrit a nitrát, podle širší definice pak biologická přeměna anorganických a organických sloučenin dusíku z redukovaných forem na oxidovanější. Nejčastější formou nitrifikace ve většině půd je chemolitoautotrofní nitrifikace prováděná gramnegativními bakteriemi čeledi *Nitrobacteraceae*, které nitrifikaci získávají energií. Pravděpodobně mnohem více, než se donedávna předpokládalo, se však v půdě uplatňuje také heterotrofní nitrifikace některých bakterií, aktinomycet a mikromycet. Substrátem chemolitoautotrofní nitrifikace je amoniak, který se uvolňuje při mineralizaci organických látek a v menší míře vzniká i asimilační a disimilační redukcí nitrátu. Reakčními produkty nitrifikace jsou nitrit a nitrát, ale také plynné dusíkaté sloučeniny, zejména oxid dusný, oxid

dušnatý a molekulární dusík. Z hlediska následných emisí těchto plynů z půdy do atmosféry a jejich úlohy v chemii atmosféry je zvláště významná tvorba oxidů dusíku nitrifikací, jež může i převážít nad tvorbou těchto látek denitrifikací. Intenzita nitrifikace je v půdě regulována mnoha faktory prostředí, z nichž důležitý je např. poměr mezi obsahem vody a vzduchu v půdě, dále teplota, půdní reakce aj. Nitrifikační aktivita v půdě se měří laboratorními inkubačními metodami.

Klíčová slova: autotrofní nitrifikace; heterotrofní nitrifikace; mineralizace; aerační status; pH; inhibitory

ÚVOD

Většina významných procesů přeměn dusíku v půdě a prostředí vůbec byla objevena již asi před sto lety, přesto stále trvá úsilí o jejich lepší poznání. Zatímco dříve byl výzkum zaměřen zejména na agronomické problémy, s hlavním úkolem zvýšit efektivitu používaných hnojiv a zvýšit rostlinnou produkci, v současnosti mnohdy dominuje hledisko ochrany životního prostředí (Powlson, 1993). Do popředí se dostaly otázky ztrát dusíku vyplavováním, volatilizací a emisemi plyných dusíkatých sloučenin, avšak ani agronomické aspekty nejsou zcela opomíjeny.

V půdě je naprostá většina dusíku vázána v organických látkách. Např. ve 106 orných půdách v Anglii (měřeno vždy na podzim v období 1989 až 1992) byl ve vrstvě půdy 0 až 25 cm zjištěn průměrný obsah minerálních forem $76 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, avšak organického dusíku kolem $7 \text{ t N} \cdot \text{ha}^{-1}$, přičemž rozpětí činilo 2,7 až $14,6 \text{ t N} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Jarvis et al., 1996). Vyjádřeno v hmotnostních procentech, minerální půdy obsahují ve svrchních vrstvách kolem 0,02 až 0,5 % N. Celkové množství dusíku vázaného v půdní organické hmotě bylo odhadnuto na $150 \cdot 10^9 \text{ t}$, zatímco jeho množství v biomase suchozemských rostlin jen na $15 \cdot 10^9 \text{ t}$ a v biomase živočichů na $0,2 \cdot 10^9 \text{ t}$ (Jenkinson, 1990).

Půdní organická hmota je hlavní zásobárnou dusíku pro půdní mikroorganismy a pro rostliny, a to i v mnoha (hnojených) agroekosystémech (např. Jenkinson, Parry, 1989; Vaněk et al., 1989; Powlson, 1993). Množství dusíku v organických látkách se většinou mění jen velmi pomalu. Procesy uvolňování dusíku z organických do anorganických forem (**mineralizace N**) a zároveň procesy syntézy a resyntézy organických látek (**imobilizace N**) přesto v půdě probíhají nepřetržitě, byť s proměnlivou intenzitou. Odhaduje se, že v podmínkách mírného pásma se ročně mineralizuje 1 až 3 % celkového půdního dusíku (Brady, 1990) a maximální denní rychlost čisté mineralizace může činit až 3 až $4 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Jarvis, 1996). Procesy mineralizace a imobilizace jsou časově a místně řízeny řadou faktorů prostředí, z nichž jsou významné např. teplota a vlhkost půdy. Zásadním způsobem ovlivňuje procesy mineralizace a imobilizace i dodávka organické hmoty (např. ve formě posklizňových zbytků, hnoje apod.) a její složení. Je-li vstupující organická hmota bohatá na dusík (čili má úzký poměr C/N), podporují se obecně procesy mineralizace; je-li naopak poměr C/N v dodané organické hmotě široký, podporují se procesy imobilizace. Kritický poměr C/N byl některými autory stanoven na 15 (Jarvis

et al., 1996), je však ovlivněn mnoha faktory a závisí nejen na složení látky, ale i na okolnostech jejího rozkladu, na faktorech prostředí atd. Vztah mezi mineralizací a imobilizací není významný jen z hlediska osudu vnesených organických látek. Při intenzivnější mineralizaci se začíná v půdě hromadit amoniak (NH_4^+), který je výchozí formou dusíku pro řadu procesů. Určitá část NH_4^+ je asimilována rostlinami a mikroorganismy, část fixována půdním sorpčním komplexem, část uniká (volatilizuje) do atmosféry a někdy značný podíl mineralizací uvolněného NH_4^+ je oxidován procesem nitrifikace.

Cílem této studie, jež navazuje na předchozí příspěvek o denitrifikaci v půdě (Šimek, 1998), je přiblížit i méně známé a někdy nesprávně interpretované aspekty nitrifikace (např. autotrofní verze vs. heterotrofní nitrifikace, resp. tvorba plyných sloučenin při nitrifikaci), dále podat přehled o biologii a ekologii nitrifikace a poukázat na moderní přístupy k měření a kvantifikaci nitrifikace v půdě.

AUTOTROFNÍ A HETEROTROFNÍ NITRIFIKACE – FYZIOLOGIE A TERMINOLOGIE

Nitrifikací se rozumí biologická *oxidace amoniaku na nitrát* (Peoples et al., 1995), případně *oxidace amoniaku na nitrát přes nitrit jako meziprodukt*. Obsažnější definice zahrnuje i tvorbu nitritu a nitrátu z jiných redukováných sloučenin, než je amoniak a popisuje nitrifikaci jako *biologickou přeměnu organických a anorganických sloučenin dusíku z redukováných forem na oxidovanější* (Alexander et al., 1960, cit. Gundersen, Rasmussen, 1990).

Nitrifikace je v mnoha půdách a ekosystémech klíčovým procesem, neboť transformuje **relativně nepohyblivou formu** (NH_4^+) na **velmi pohyblivou formu** (NO_3^-) dusíku:

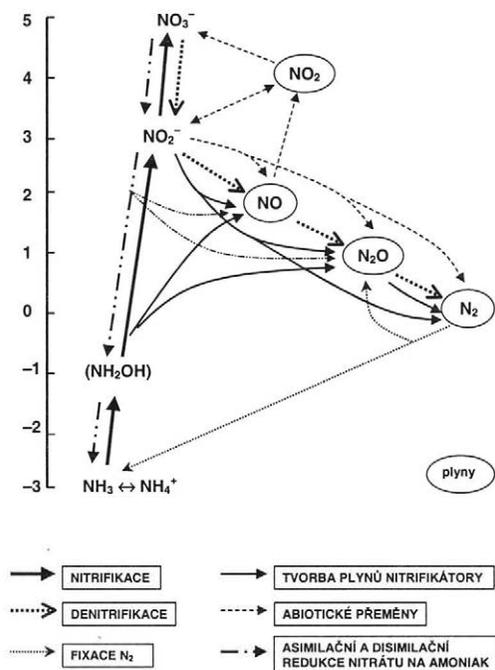


Tím se dusík jednak zpřístupňuje jako dobře využitelná živina, jednak se vytvářejí předpoklady pro jeho ztráty vyplavováním a denitrifikací. Ze sumární rovnice také vyplývají další důležité skutečnosti, že nitrifikace je **obligátně aerobní proces** (spotřebovává molekulární kyslík O_2) a že při nitrifikaci dochází k **okyselení (acidifikaci) půdního prostředí**, neboť se produkují protony H^+ . Úplnější zápis sekvence nitrifikačních reakcí zahrnuje i tvorbu meziproduktů – hydroxylaminu (NH_2OH) a dalších nestabilních sloučenin (Peoples et al., 1995):



Z tohoto zápisu vyplývá, že v průběhu nitrifikace mohou vznikat i plynné sloučeniny dusíku, tj. oxid dusnatý (NO), ale byla prokázána také tvorba oxidu dusného (N₂O). Tyto dva plyny ovšem vznikají v půdě typicky denitrifikací a mohou být produkovány i dalšími procesy přeměn dusíku i abioticky (Šimek, 1998, obr. 1). Jak je dále zřejmé z obr. 1, dusík je při nitrifikaci převáděn ze svého nejredukovanějšího stavu (-3) na stav nejoxidovanější (+5).

oxidační stav N



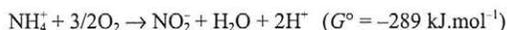
1. Změny oxidačního stavu dusíku při biologických a abiotických procesech a tvorba a spotřeba plynných dusíkatých látek; mechanismy některých procesů nejsou plně známy – Changes in oxidation state of nitrogen during biological and abiotic processes and production and consumption of gaseous nitrogen substances; mechanisms of some processes are not fully known (Davidson, 1991; Conrad, 1996)

Pojmem **nitrifikace** se nejčastěji označuje proces **autotrofní nitrifikace** nebo přesněji **chemolitoautotrofní nitrifikace**. Jak vyplývá z úplného názvu, mikroorganismy provádějící nitrifikaci využívají jako zdroj energie chemická látka (*chemo-*), zdrojem protonů a elektronů je anorganická látka (*-lito-*) a zdrojem uhlíku jejich biomasy je CO₂ (*-autotrofní*) – k trofickým skupinám mikroorganismů podrobněji např. Šimek (1998); je také vhodné připomenout, že fixace CO₂ probíhá u těchto bakterií principiálně stejně jako v listech rostlin

nebo u fotoautotrofních mikroorganismů v Calvinově cyklu s využitím NADH a NADPH k redukci CO₂. Hlavním zdrojem energie nitrifikačních bakterií je oxidace NH₄⁺ (na NO₂⁻), resp. NO₂⁻ (na NO₃⁻). Tyto sloučeniny jsou zároveň donory elektronů, akceptorem elektronů je molekulární kyslík O₂. Nitrifikátory jsou tedy aerobní bakterie, stejně jako většina jiných chemolitoautotrofů (tj. jako vodíkové bakterie oxidující H₂, karboxydobakterie oxidující CO, sirmé bakterie oxidující S a jiné sirmé sloučeniny nebo železité bakterie oxidující Fe²⁺).

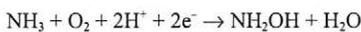
Autotrofní nitrifikace probíhá ve dvou oddělených krocích, uvnitř buněk dvou různých skupin bakterií. Prvním krokem je oxidace amoniaku na nitrit, druhým krokem je oxidace nitritu na nitrát.

Oxidaci amoniaku na nitrit lze sumárně zapsat takto (Atlas, Bartha, 1993):

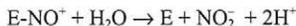


[Různí autoři udávají výtěžek energie odlišně, např. Alef (1995): $G^\circ = -273,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]

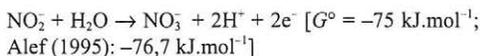
Proces je tvořen sekvencí reakcí, v první z nichž se činností enzymu amoniummonoxygenasy tvoří hydroxylamin. Amoniummonoxygenasa je vázána na buněčnou membránu a elektrony pro reakci jsou pravděpodobně odebrány z oblasti ubichinon-cytochrom *b* elektronového transportního řetězce (Wood, 1986):



V navazující reakci je hydroxylamin oxidován na nitrit činností hydroxylaminoxidoreduktasy, rozpustného enzymu nacházejícího se v periplazmě. Anderson, Hooper (1983, cit. Wood, 1986) navrhli reakční schéma této oxidace:



Druhým krokem nitrifikace je **oxidace nitritu na nitrát**. Příslušný enzym se nazývá nitritoxidoreduktasa a je pravděpodobně lokalizovaný na cytoplazmatické straně buněčné membrány (Wood, 1986). Reakce probíhá bez detekovatelných meziproduktů:



Přestože je energetický výtěžek nitrifikačních reakcí poměrně velký, značná část energie se spotřebuje v samotném procesu a pro biosyntézu může být využito jen asi 5 až 15 %. Tate (1995) uvádí, že na 1 C zabudovaný do biomasy nitrifikátorů musí být oxidováno 14 až 70 NH₄⁺-N, resp. 76 až 135 NO₂⁻-N. Přesto schopnost nitrifikátorů získávat energii oxidací anorganických sloučenin dusíku a jejich autotrofie, tj. schopnost využívat oxid

uhlíčitý jako zdroj uhlíku pro tvorbu biomasy, zvýhodňuje tyto mikroorganismy před jinými skupinami. Autotrofní nitrifikátoři se běžně vyskytují v půdě a připadá na ně většina nitrifikační aktivity. V některých půdách nebo dočasně za určitých podmínek může však nabýt na významu tzv. heterotrofní nitrifikace.

Termín **heterotrofní nitrifikace** vyhovuje širší definici nitrifikace jako procesu *biologické přeměny organických a anorganických sloučenin dusíku z redukováných forem na oxidovanější*. Pro praktické účely může být heterotrofní nitrifikace definována jako *produkce nitrátů nebo nitrátů neautotrofními mikroorganismy* (Conrad, 1996), a to oxidací anorganických (NH_4) nebo organických sloučenin dusíku. Od autotrofní nitrifikace se heterotrofní nitrifikace odlišuje tím, že je prováděna heterotrofními mikroorganismy, přičemž je třeba zdůraznit, že **heterotrofie nesouvisí s nitrifikovaným substrátem** (ten může být anorganický i organický), ale je dána tím, že tyto mikroorganismy využívají jako zdroj uhlíku pro tvorbu biomasy organické látky. Heterotrofní nitrifikátoři patří taxonomicky mezi bakterie, aktinomycety a mikromycety. Z hlediska zařazení do trofických skupin (Šimek, 1998) jsou heterotrofní nitrifikátoři: a) chemolitoheterotrofní (oxidují anorganickou látku – amoniak), b) chemoorganoheterotrofní (oxidují organickou látku):



I když lze heterotrofní nitrifikaci formálně zapsat těmito vztahy, její biochemický průběh není dosud přesně poznán, stejně jako není jasný fyziologický význam této reakce pro zúčastněné mikroorganismy. Rychlost heterotrofní nitrifikace (v čistých kulturách mikroorganismů) činí jen asi 1 až 0,1 % rychlosti autotrofní nitrifikace (Robertson, Kuenen, 1991). Přesto může být heterotrofní nitrifikace velmi významná v prostředích, kde nejsou přítomni autotrofní nitrifikátoři nebo kde je jejich aktivita potlačena např. nedostatkem O_2 nebo NH_4 , nízkým pH apod. Gundersen, Rasmussen (1990) shrnují literární údaje o nitrifikaci v kyselých lesních půdách, kde by podle vžitě představy měla být nitrifikace inhibována nízkým pH. Přesto v těchto půdách nitrifikace evidentně běžně probíhá; je tedy otázkou, zda jde o nitrifikaci autotrofními nitrifikátory adaptovanými na nízké pH, nebo zda se jedná o heterotrofní nitrifikaci necitlivou na půdní reakci. O tom, že často může převažovat právě heterotrofní nitrifikace, a to zejména nitrifikace mikromycetami, existují mnohé důkazy (Gundersen, Rasmussen, 1990). Role mikromycet jako heterotrofních nitrifikátorů v kyselých lesních půdách nijak nepřekvapuje vzhledem k tomu, že mikromycety obvykle tvoří v těchto půdách většinu biomasy mikroorganismů (úloha pH jako regulačního faktoru nitrifikace viz dále).

Rozlišení autotrofní a heterotrofní nitrifikace v půdě je nesnadné. Z analýzy, kterou vypracoval Conrad (1996),

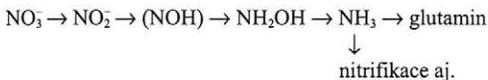
vyplývá, že dosavadní metodické přístupy ke studiu nitrifikace neumožňují spolehlivě rozlišit nejen cestu vzniku nitrátů (a nitrátů) jako produktů nitrifikace, ale ani původ plyných metabolitů (NO , N_2O), jež se sice tradičně přiřazují denitrifikátorům, ale které nepochybně také v nemalé míře vznikají při autotrofní i heterotrofní nitrifikaci. Za heterotrofní nitrifikaci se obvykle považuje ta část nitrifikace, která není citlivá na inhibici acetylenem nebo nitrapyrimem. Tyto dvě sloučeniny (i jiné) totiž inhibují reakce enzymu amoniummonooxygenasy autotrofních nitrifikátorů. Je zřejmé, že heterotrofní nitrifikátoři, kteří oxidují organické sloučeniny dusíku, aniž by jako intermediát vytvářeli amoniak, nepotřebují aktivitu amoniummonooxygenasy, a proto nejsou citliví na nitrapyrim. Jestliže tedy není nitrifikace inhibována acetylenem nebo nitrapyrimem, můžeme se domnívat, že jde o heterotrofní nitrifikaci. Pravděpodobně také heterotrofní nitrifikace využívá spíše organický dusík než volný amoniak jako substrát pro tvorbu nitrátů; jde tedy častěji o chemoorganoheterotrofní nitrifikaci než o chemolitoheterotrofní nitrifikaci. Jestliže však acetylen vyvolá inhibici nitrifikace, může se jednat jak o autotrofní nitrifikaci, tak o nitrifikaci heterotrofní využívající amoniak (chemolitoheterotrofní nitrifikace). U některých bakterií (*Alcaligenes faecalis*, *Thiosphaera pantotropha*) byla navíc zjištěna částečná inhibice heterotrofní nitrifikace typickými inhibitory nitrifikace. Tyto bakterie proto zřejmě používají enzym amoniummonooxygenasu pro aktivaci amoniaku, stejně jako autotrofní nitrifikátoři. Alternativní reakce nevyžadující molekulární kyslík (O_2), tj. konverze amoniaku na hydroxylamin reakcí dehydrogenas není příliš pravděpodobná, neboť probíhá jen při velmi vysokém redox potenciálu: $E_0 = +906 \text{ mV}$ pro $\text{NH}_4/\text{NH}_2\text{OH}$ (Conrad, 1996). Existují však důkazy o spojené oxidaci amoniaku s redukcí nitrátu nebo nitrátu za nepřítomnosti O_2 (viz dále).

MINERALIZACE ORGANICKÝCH LÁTEK – HLAVNÍ, NE VŠAK JEDINÝ ZDROJ AMONIÁKU PRO NITRIFIKACI

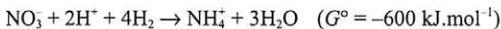
Mikroorganismy sice mohou často asimilovat i jednodušší organické látky (aminosloučeniny), avšak většina přijímaného dusíku je ve formě minerálních sloučenin (mnohé prokaryotické organismy mohou přijímat, resp. fixovat i molekulární dusík N_2 ; reakce je katalyzována enzymem nitrogenasou a představuje hlavní mechanismus vazby N_2 v biosféře). Mineralizaci organických dusíkatých látek se většinou myslí proces amonifikace, tj. konverze organických sloučenin na amoniak. Amonifikaci provádějí mnohé mikroorganismy, ale i rostliny a živočichové. Amoniak a další formy dusíku uvolněné mineralizací vstupují do různých procesů, jak je zmíněno již v úvodu této studie. Mineralizace, či přesněji amonifikace, je mimo jiné také hlavním procesem tvorby amoniakální formy dusíku jako substrátu pro nitrifikaci. Kromě toho se většinou menší, někdy však

významné množství amoniaku může tvořit i dalšími biologickými procesy přeměn dusíku v půdě, a to asimilační nebo disimilační redukcí nitrátů a nitritů (Šimek, 1998).

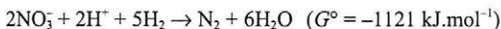
Při **asimilační redukcí nitrátu na amoniak** je nitrát redukován pomocí rozpustných cytoplazmatických enzymů (nitrátreduktasou a nitritreduktasou, které na rozdíl od disimilačních reduktas nejsou napojeny na tvorbu ATP) na amoniak, který je potom využit v biosyntéze nejrůznějších látek nebo může podstoupit další přeměny (např. nitrifikaci). Prvním krokem biosyntézy je obvykle inkorporace amoniaku do glutaminu za pomoci enzymu glutaminsyntetasy (White, 1995):



Disimilační redukce nitrátu na amoniak probíhá podle vztahu (Stouthamer, 1988):



a je potřeba ji odlišovat od disimilační redukce nitrátů na N_2O a N_2 (tj. od respirační denitrifikace, Šimek, 1998):



Účelem disimilační redukce nitrátu na amoniak je zjevně získání energie. Je regulována parciálním tlakem O_2 a často probíhá v podobných prostředích jako respirační denitrifikace. Příslušné enzymy jsou nitrátreduktasy vázané na membrány a nitritreduktasy; obě skupiny enzymů jsou nejen funkčně, ale i strukturně podobné reduktasám respiračních denitrifikátorů i rozpustným reduktasám zapojeným do asimilační metabolické dráhy. Disimilační redukcí nitrátu na amoniak provádějí mnohé půdní mikroorganismy, které často patří do skupiny obligátně nebo fakultativně anaerobních bakterií (druhy rodů *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* aj., Tiedje, 1994). Zdá se, že v mnoha případech jsou tyto mikroorganismy v půdách a sedimentech početnější než respirační denitrifikátoři (Tiedje, 1988) a mnohé mají schopnost obou disimilačních přeměn NO_3^- , tj. jak disimilační redukce nitrátu na amoniak, tak respirační denitrifikace na N_2O a N_2 . Prostředí dlouhodobě nebo trvale anoxické a bohaté na organické látky vede k selekci populací provádějících disimilační redukcí nitrátu na amoniak, zatímco prostředí s proměnlivou koncentrací O_2 je obýváno spíše respiračními denitrifikátory, kteří mohou tzv. přepínat metabolismus z oxického na anoxický a naopak. Při asimilační i disimilační redukcí nitrátů a nitritů na amoniak mohou vznikat i plynné metabolity, NO a N_2O (Stouthamer, 1988, obr. 1).

SCOJENÁ NITRIFIKACE–DENITRIFIKACE, TVORBA PLYNNÝCH METABOLITŮ

Nitrifikace (oxidace redukováných N-sloučenin) a denitrifikace (redukce oxidovanáných sloučenin na plyny) jsou dva dominantní procesy přeměn dusíku v půdě (Robertson, Kuenen, 1991). Učebnice obvykle charakterizují nitrifikaci jako typický oxický (aerobní) proces a denitrifikaci jako typický anoxický (anaerobní) proces. Mohlo by se tedy na první pohled zdát, že simultánní, tj. současně probíhající, nitrifikace a denitrifikace je nesmysl a podobně mohou působit pojmy jako *aerobní denitrifikace* či *anaerobní nitrifikace* nebo *nitrifikace denitrifikátory* či *denitrifikace nitrifikátory*.

Aerobní denitrifikace je jev, kdy denitrifikující mikroorganismus dokáže současně (mixotrofně) využívat jak molekulární kyslík, tak nitrát nebo nitrit jako akceptor elektronů, a to i při relativně vysoké saturaci prostředí kyslíkem (Robertson, Kuenen, 1984). Robertson, Kuenen (1991) shrnují výsledky experimentů s aerobně denitrifikující bakterií druhu *Thiosphaera pantotropha*. Autoři zjistili vysokou růstovou rychlost při zásobování kultury bakterií oběma akceptory elektronů, O_2 a NO_3^- . Protože využití NO_3^- jako finálního akceptoru elektronů je z hlediska zisku energie méně výhodné než využití O_2 , musí být pro simultánní využití obou akceptorů jiný důvod než energetický. U *T. pantotropha* byla zjištěna omezená rychlost přenosu elektronů ze substrátu na O_2 . Možnost simultánního využití i jiné elektronové transportní cesty pak tento problém překonává (Robertson, Kuenen, 1991). Schopnost aerobní denitrifikace (tj. přesněji simultánního využití O_2 a NO_3^- nebo NO_2^- jako akceptorů elektronů v elektronovém transportním řetězci) byla prokázána i u mnoha dalších denitrifikátorů (Robertson, Kuenen, 1991; Lloyd, 1993).

Ve zmíněných experimentech s *T. pantotropha* byla současně s důkazem aerobní denitrifikace zjištěna i heterotrofní nitrifikace, když denitrifikací vznikající nitrit ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) byl dočasně doplňován nitritem vznikajícím heterotrofní nitrifikací ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$) (Robertson, Kuenen, 1988; Robertson, Kuenen, 1990). **Většina heterotrofních nitrifikátorů se zdá být současně i aerobními denitrifikátory** (Robertson, Kuenen, 1991), avšak v tomto případě stěžejní půjde o typickou respirační denitrifikaci (Tate, 1995; Šimek, 1998). Castignetti, Hollocher (1984) se domnívají, že **schopnost heterotrofní nitrifikace je vlastní mnoha denitrifikátorům** včetně zástupců nejrozšířenějších rodů (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*). Podle této představy se takto vybavené mikroorganismy s výhodou uplatňují v prostředí s kolísajícím parciálním tlakem O_2 , tedy např. v půdě. Za aerobních podmínek se může heterotrofní nitrifikací tvořit nitrit nebo nitrát, který je pak k dispozici pro denitrifikaci, když se prostředí změní na anaerobní. Poth (1986) prokázal u některých chemolitoautotrofních nitrifikátorů **anaerobní nitrifikaci** – přesněji růst nitrifikátorů, kteří produkovali N_2O a N_2 a využívali nitrit místo molekulárního kyslíku jako

akceptor elektronů (obr. 1, tvorba plyných produktů nitrifikací).

Za nejvýznamnější proces tvorby plyných dusíkatých metabolitů v půdě (obr. 1) se považuje denitrifikace, resp. respirační denitrifikace. Tímto procesem vznikají NO, N₂O i N₂ jako hlavní metabolity (přitom oxidy NO a N₂O mohou být a také zčásti jsou denitrifikací spotřebovávány). Méně známá, avšak v poslední době stále častěji připomínaná a akceptovaná, je **tvorba plyných dusíkatých sloučenin při nitrifikaci**. Jak je znázorněno na obr. 1, hlavním produktem nitrifikační oxidace amoniaku je nitrit a dále nitrát, přesto při oxidaci hydroxylaminu nebo redukcí nitritu vznikají jako vedlejší produkty NO, snad i N₂, ale zejména N₂O. Biochemické mechanismy těchto procesů jsou poznány jen velmi málo. Není např. jasné, zda NO vzniká jen jako produkt při denitrifikaci nitrifikátory za mikroaerofilních podmínek nebo také přímou oxidací amoniaku (Abeliovich, 1992) (obě tyto možnosti jsou naznačeny na obr. 1). Firestone, Davidson (1989) uvádějí, že obvyklý poměr produktů (NO₃/N₂O) je při nitrifikaci větší než 100, tj. že na N₂O připadá méně než 1 % N. První krok nitrifikace, oxidace amoniaku na nitrit, spotřebovává relativně mnoho molekulárního kyslíku (viz výše). Při poklesu parciálního tlaku O₂ pod určitou mez je pro normální průběh oxidačních reakcí kyslíku nedostatek a nitrifikační bakterie začnou jako terminální akceptor elektronů využívat vlastní produkt – nitrit, nebo dokonce nitrát či nitrit z okolního prostředí. Právě při těchto procesech, jejichž podstata je analogická s podstatou denitrifikačních reakcí denitrifikátorů, vzniká mnohem více plyných dusíkatých sloučenin, a to vedle N₂O také značný podíl NO. Tato tzv. **denitrifikace nitrifikátorů** je v mnoha případech hlavním procesem tvorby NO v půdách (Firestone, Davidson, 1989; Davidson, 1991). Kromě chemolitoautotrofní nitrifikace (kdy NO a N₂O

vznikají zejména v prvním kroku při oxidaci amoniaku), jež jako nitrifikační producent plynů převažuje, mohou NO a N₂O vznikat i během heterotrofní nitrifikace (Tortoso, Hutchinson, 1990). Stejně plyné metabolity, i když většinou již v menším množství, se tvoří i při dalších přeměnách dusíku: při asimilační i disimilační redukcí nitrátů a nitritů na amoniak, při fixaci N₂ a abiotickými procesy chemodenitrifikací (obr. 1).

EKOLOGIE AUTOTROFNÍ NITRIFIKACE

Nitrifikátory

Nitrifikační bakterie patří do čeledi *Nitrospiraceae*. Jsou to gramnegativní bakterie, které se dělí na dvě skupiny: bakterie oxidující amoniak (nitrifikační bakterie, *nitroso-bakterie*) a bakterie oxidující nitrit (nitratační bakterie, *nitro-bakterie*).

Bakterie oxidující amoniak jsou převážně chemolitoautotrofní: jako zdroj energie, protonů a elektronů využívají chemickou anorganickou látku (NH₄⁺), jako zdroj uhlíku biomasy využívají CO₂. V malé míře však mohou asimilovat i organické látky. Jsou mesofilní, optimální růstová teplota je kolem 30 °C, optimální pH 7,5 až 8. Vyskytují se všude v přírodě, v půdách, oceánech, řekách a jezerech, v sedimentech a v kalcích odpadních vod. Základní charakteristika jednotlivých rodů je uvedena v tab. I.

Bakterie oxidující nitrit jsou také obecně chemolitoautotrofní: jako zdroj energie, protonů a elektronů využívají chemickou anorganickou látku (NO₂⁻), jako zdroj uhlíku biomasy využívají CO₂. Jedinou známou výjimkou je rod *Nitrobacter*, který je mixotrofní (chemolitoautotrofní i chemoorganoheterotrofní). Jeho chemoorganoheterotrofní růst je však pomalý a ne-

I. Základní charakteristika nitrifikačních bakterií – Basic characteristic of nitrifying bacteria (Holt et al., 1994)

Skupina	Rod	Tvar buněk	Velikost buněk (μm)	Další údaje
Amoniak oxidující (<i>nitroso-bakterie</i>)	<i>Nitrosomonas</i>	rovné tyčinky	0,7–1,5 × 1,0–2,4	pohyblivé, polární bičíky půdní i vodní
	<i>Nitrosococcus</i>	kulovité nebo elipsoidní	1,5–1,8 × 1,7–2,5	trs bičíků většinou vodní (mořské)
	<i>Nitrosospira</i>	spirální, 3–20 otoček	0,3–0,8 × 1,0–8,0	peritrichální bičíky půdní, sladkovodní
	<i>Nitrosolobus</i>	pleiomorfní lalokovité	1,0–1,5 × 1,0–2,5	peritrichální bičíky pouze půdní
	<i>Nitrosovibrio</i>	tenké zakřivené tyčinky	0,3–0,4 × 1,1–3,0	většinou polární bičíky půdní, na kamenech apod.
Nitrit oxidující (<i>nitro-bakterie</i>)	<i>Nitrobacter</i>	hruškovité nebo pleiomorfní tyčinky	0,5–0,8 × 1,0–2,0	polární nebo laterální bičíky půdní i vodní (mořské)
	<i>Nitrococcus</i>	kulovité	1,5	1–2 polární bičíky mořské, obligátně halofilní
	<i>Nitrospira</i>	spirálovité	0,3–0,4 × 0,8–1,0	nepohyblivé mořská voda je nezbytná pro růst
	<i>Nitrospina</i>	tenké tyčinky	0,3–0,4 × 1,7–6,6	nepohyblivé mořské, obligátně halofilní

vyvážený, tvoří se mnoho zásobních látek typu poly- β -hydroxybutyrátů a polyfosfátů. Granule těchto látek vyplňují buňky a narušují jejich tvar i velikost. Bakterie oxidující nitrit jsou mesofilní, optimální teplota pro jejich růst je 28 °C, optimální pH 7,6 až 7,8. Vyskytují se v aerobních, ale i anaerobních prostředích, v půdách, oceánech, řekách a jezerech, v sedimentech a v kalech odpadních vod, na povrchu i uvnitř kamenů, kamenných soch, ve stěnách historických budov, na betonových podkladech, v tunelech apod. Základní charakteristika jednotlivých rodů je uvedena v tab. I. Terestrické formy patří všechny do rodu *Nitrobacter*, ostatní byly izolovány z mořské vody a jsou obligátně halofilní.

Nitrifikační bakterie se jen obtížně studují obvyklými mikrobiologickými technikami. Vzhledem k pomalému růstu je jejich izolace obtížná; ze stejného důvodu se špatně udržují v kulturách. Většina informací o nitrifikačních bakteriích proto pochází ze studia pouze několika kmenů rodů *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Téměř neznámá je diverzita nitrifikátorů *in situ* a nitrifikační aktivita jednotlivých populací jejich společenstva (Schmidt, Belser, 1994).

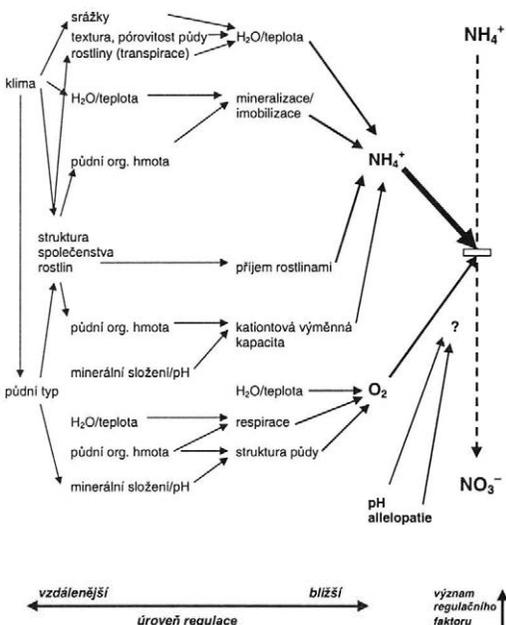
Regulační faktory nitrifikace

Aktivita nitrifikačních bakterií je ovlivňována mnoha faktory prostředí. Robertson (1989) navrhl modelové schéma regulačních faktorů nitrifikace, které zahrnuje relativní význam jednotlivých faktorů. Faktory ovlivňující nitrifikační aktivitu na buněčné (organismální) úrovni jsou v tomto schématu označeny jako blízké, faktory vnějšího prostředí pak jako vzdálené (obr. 2).

Ve většině půd je rychlost nitrifikace přirozeně silně závislá na **dostupnosti amoniaku**; druhým nezbytným předpokladem pro autotrofní nitrifikaci je **dostatečný přísun kyslíku**. Zásobenění nitrifikujících buněk těmito dvěma látkami přímo závisí na obsahu, složení, koncentraci a dalších vlastnostech půdního roztoku, kterým difundují molekuly látek k jednotlivým mikrobiálním buňkám. Pro průběh nitrifikace v půdě je důležitá určitá **rovnováha mezi obsahem vody a vzduchu** v půdě. Zjednodušeně lze říci, že nízký obsah vody v běžné minerální půdě sice umožňuje dobrou aeraci a výměnu plynů mezi půdou a atmosférou (a tedy přísun O_2 do půdy), ale zároveň při vysychání půdy se ztenčuje vodní film na povrchu půdních částic, a tím se prodlužuje a komplikuje cesta pro difuzi molekul v půdním prostředí. Nedostatek vody také přímo inhibuje mikrobiální aktivitu, neboť se snižuje vnitrobuněčný vodní potenciál a redukuje hydratace, a tím aktivita enzymů (Stark, Firestone, 1995). Naopak, zvyšuje-li se obsah vody v půdě, usnadňuje se pohyb molekul v půdním roztoku, avšak současně se od určité hranice podstatně zpomaluje výměna plynů, a tím se snižuje dostupnost O_2 pro nitrifikátory. Např. v experimentech s písčitohlinitou půdou byla zjištěna maximální nitrifikační aktivita při plném nasycení pórů vodou uvnitř agregátů a současně

při zaplnění pórů mezi agregáty vzduchem (Grundmann et al., 1995). Aerační stav půdy závisí nejen na obsahu vody v půdě a na struktuře a textuře půdy, ale velmi těsně souvisí i s teplotou. Studium vztahu teplota–obsah vody v půdě ukázalo, že optimální relativní obsah vody v půdě pro nitrifikaci byl nejnižší při teplotě kolem 25 °C. Při nižší i vyšší teplotě byl pro maximální nitrifikační aktivitu potřebný vyšší obsah vody v půdě (Grundmann et al., 1995). Absolutní hodnoty charakterizující aerační status půdy a nasycenost půdy vodou optimální pro nitrifikaci se nepochoybně liší u různých půd; uvedený příklad však dobře ilustruje, jak jednotlivé regulační faktory mohou vzájemně interferovat, rušit nebo naopak zesilovat své účinky v závislosti na jiných faktorech prostředí. Určitá nitrifikační aktivita (a obecně každá mikrobiální aktivita) je pak dána průnikem vlivu mnoha faktorů prostředí.

Vzhledem k obvyklé proměnlivosti teploty a vlhkosti půdy během roku, ke kolísání aeračního statusu půdy i ke změnám rychlosti mineralizace (a tím zásobování nitrifikátorů amoniakem) kolísá nepochoybně i nitrifikační aktivita v půdě. O velikosti aktuální nitrifikační aktivity v půdě za určitých hodnot důležitých kontrolních faktorů nitrifikace je známo velmi málo, a to zejména z metodických důvodů. Měření aktivity nitrifikačních enzymů (Schmidt, Belser, 1982 – viz dále) však ukazují, že i při podmínkách pro nitrifikaci nepříznivých existují



2. Kontrolní a regulační faktory nitrifikace v půdě; intenzita vlivu jednotlivých faktorů je znázorněna tloušťkou šipky – Control and regulatory factors of nitrification in soil; intensity of the impact of individual factors is shown as arrows width (Robertson, 1989)

v půdě populace nitrifikačních bakterií schopné velmi rychle reagovat na změnu podmínek. Např. Bramley, White (1989) zjistili poměrně malé kolísání potenciální nitrifikace (aktivity nitrifikačních enzymů) v půdě v průběhu roku, aniž by prokázali statisticky významnou závislost potenciální nitrifikace na teplotě nebo vlhkosti půdy.

Významným regulačním faktorem nitrifikace je **půdní reakce**. Jak poznamenávají Bramley, White (1989), regulační úlože pH byla v minulosti věnována značná pozornost, avšak většina experimentálních dat se týká čistých kultur nitrifikátorů, nebo byly údaje získány při dlouhodobých inkubačních experimentech v laboratorních podmínkách. Autoři zjistili ve dvou půdách optimální pH pro aktivitu nitrifikačních enzymů 5,91 a 6,31, přičemž pH těchto půd bylo 5,18 a 6,14 – tyto výsledky svědčí o adaptaci společenstva nitrifikátorů na přirozené pH půdy (Bramley, White, 1989; Bramley, White, 1990). Je také vidět, že pH optimální pro aktivitu nitrifikačních enzymů v půdě je nižší než pH optimální pro nitrifikaci kulturami nitrifikátorů (Holt et al., 1994 – viz výše). Autotrofní nitrifikace pravděpodobně neprobíhá při pH pod 4 (Persson, Wirén, 1995), ačkoliv studie nitrifikace v lesních půdách naznačují, že kromě heterotrofní nitrifikace, typické pro kyselé lesní půdy, může i v tomto prostředí být autotrofní nitrifikace významná (Killham, 1990; také tamtéž citovaná literatura). V zásadité oblasti půdní reakce je inhibována oxidace NO_2 na NO_3 (Paul, Clark, 1996). Kromě intenzity nitrifikace ovlivňuje pH také množství a poměr plyných dusíkatých sloučenin produkovaných nitrifikací (jakož i dalšími procesy přeměn N v půdě) (Stevens et al., 1998). Tento aspekt regulační úlohy pH při tvorbě plyných dusíkatých látek v půdách je velmi významný zejména z hlediska následných emisí plynů z půd do atmosféry – zcela jiný dopad mají emise N_2O a NO (potenciálně velký) než emise N_2 (žádný).

Inhibice nitrifikace

Autotrofní nitrifikace v půdě je řízena, tj. stimulována i inhibována, řadou faktorů prostředí, jak již bylo naznačeno. Striktně vzato, inhibičně působí obecně všechny možné regulační faktory a jejich kombinace v oblasti mimo své optimum. Inhibiční účinek některých faktorů prostředí je však poznán lépe. Nitrifikaci inhibuje zejména nízké pH, nízká nebo naopak velmi vysoká koncentrace amoniaku, za určitých podmínek intenzita viditelného světla (420 nm) a UV záření, rostlinné látky fenolické povahy, některé humusové látky aj. (Abeliovich, 1992). Nitrifikaci může také inhibovat nedostatek některé živiny včetně stopových prvků a různé látky s allelopatickým účinkem, zjištěné zejména v lesních půdách (Killham, 1990).

V zemědělsky využívaných půdách se v souvislosti s inhibitory nitrifikace většinou uvažují látky, jimiž lze nitrifikaci ovlivňovat. Cílem inhibice nebo zpomalení nitrifikace v půdě je snížení koncentrace nitrátů produkovaných nitrifikací. Důvodem může být snaha zmenšit ztráty dusíku z půdy vyplavováním nebo snížit obsah nitrátů v plodinách. Látek s inhibičním účinkem na nitrifikaci (na nitritaci, tj. oxidaci amoniaku na nitrit, nebo na nitrataci, tj. oxidaci nitritu na nitrát) je známo velké množství a některé z nich byly již využity i komerčně (např. Zacheri, Amberger, 1990; Prasad, Power, 1997; Hagopian, Riley, 1998). Mezi nejznámější inhibitory nitrifikace patří různé chemické látky, např. nitrapyridin, dikyandiamid, thiomočovina a mnoho dalších sírných sloučenin (tab. II) i látky biologického původu. Praktické použití inhibitorů nitrifikace však naráží na četné obtíže, a to z různých biologických, ekologických a ekonomických důvodů (např. Keeney, 1986; Hagopian, Riley, 1998). Efektivitu inhibitorů nitrifikace v polních podmínkách ovlivňuje řada různých faktorů. Kromě fyzikálně chemických vlastností samotných inhibitorů to

II. Některé chemické látky s inhibičním účinkem na nitrifikaci – Some chemicals with inhibitory effect on nitrification (Keeney, 1986; Caffrey, Miller, 1995; Hagopian, Riley, 1998)

Název (zkratka)	Vzorec	Volatilita	Rozpustnost ve vodě	Poznámka
dikyandiamid (DCD)	$\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$	nízká	vysoká	také pomalu využitelné hnojivo
sírouhlík a jeho deriváty	CS_2	vysoká	vysoká	fumigant; inhibitor nitrifikace v nízkých koncentracích
thiosíran amonný (ATS)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$	nízká	vysoká	také inhibitor ureázy
nitrapyridin (NP)	2-chlor-6-(trichlormethyl) pyridin	střední	nízká	komerčně využívaný
etridiazol (ED)	5-ethoxy-3-trichlormethyl-1,2,4-triadiazol	střední	vysoká	fungicid
ATC	4-amino-1,2,4-triazol.HCl	nízká	vysoká	
acetylen	C_2H_2	vysoká	vysoká	inhibice i jiných procesů
methyl fluorid	CH_3F	vysoká	vysoká	
azid sodný	NaN_3	nízká	vysoká	
chloman sodný	NaClO_3	nízká	vysoká	využití při měření aktivity nitrifikačních enzymů

Skupina	Faktor	Poznámka
Vlastnosti inhibitorů	rozpusťnost ve vodě volatilita sorpace stabilita (odolnost rozkladu)	ovlivňuje způsob aplikace a vymývání ovlivňuje ztráty z povrchu půdy a pohyb v půdě ovlivňuje způsob vymývání a pohyb v půdě hlavní faktor ovlivňující perzistenci v půdě
Chemické a fyzikální vlastnosti půd	pH velikost povrchu půdních částic, jejich náboj pórovitost (velikost a distribuce pórů) dostupnost N-sloučenin	ovlivňuje stabilitu inhibitorů a aktivitu nitrifikátorů ovlivňuje sorpci inhibitorů, aktivitu nitrifikátorů, mobilitu amoniaku, pufruje změny pH ovlivňuje např. aerační status půdy, mobilitu plyných inhibitorů
Biologické vlastnosti půd	populace nitrifikátorů energie (C)	schopnost růstu populací a jejich diverzita vyšší mikrobiální aktivita v půdě může zvýšit rozklad inhibitorů
Abiotické faktory prostředí	teplota vodní status půdy	hlavní faktor ovlivňující nitrifikační aktivitu a rozklad inhibitorů ovlivňuje nitrifikační aktivitu, teplotu půdy, vyplavování látek
Technologické aspekty	forma hnojiva způsob aplikace	acidifikace nebo alkalizace půdního prostředí při transformacích a využití hnojiv větší volatilizace při povrchové aplikaci

jsou fyzikálně chemické i biologické vlastnosti půdy, abiotické faktory prostředí a technologické aspekty, jako např. forma a způsob aplikace hnojiva (tab. III). Přes současné problémy s praktickým využitím inhibitorů nitrifikace v polních podmínkách představují tyto látky poměrně slibný a účinný nástroj pro regulaci procesů přeměny dusíku v půdách, kterým by bylo možné omezit obecně ztráty dusíku a zejména emise dusíkatých plynů ze zemědělsky využívaných půd.

METODY STUDIA NITRIFIKACE

Pro studium nitrifikace byla vyvinuta celá řada metod. Celkové počty autotrofních nitrifikátorů (jak amoniak oxidujících, tak nitrit oxidujících bakterií) se obvykle stanovují metodou maximálního zředění (MPN – most probable number), neboť klasické kultivační techniky selhávají kvůli relativně pomalému růstu nitrifikačních bakterií na kultivačních médiích. Metoda MPN je však velmi náročná časově a výsledky mají obvykle velký rozptyl. Mnozí autoři nadto zjistili, že většinou silně podhodnocuje skutečnou velikost populací nitrifikátorů v půdě (Belsler, 1979; Robertson, Vitousek, 1981; Belsler, Mays, 1982). Pro kvantifikaci populací nitrifikátorů se též používají imunofluorescenční techniky (FA – fluorescent antibody), které patrně zachytí větší část populací než metody MPN (Woldendorp, Laanbroek, 1989). Přesto je zřejmé, že ve většině případů počty bakteriálních buněk nesouvisí s aktivitou bakterií. Z těchto důvodů se často dává přednost měření nitrifikační aktivity před stanovováním počtů nitrifikátorů.

Princip stanovení nitrifikační aktivity je vcelku jednoduchý: půda se inkubuje za definovaných podmínek; na začátku inkubace a po určité době se stanoví obsah NH_4^+ , NO_2^- a NO_3^- a z těchto údajů se vypočte velikost nitrifikace. Vzhledem k tomu, že proces nitrifikace je těsně spjat s procesem mineralizace organického dusíku a že rychlost nitrifikace je většinou vyšší než rychlost mineralizace (Kubát, 1993), se však velmi často inkubačními metodami stanoví spíše parametry mineralizace než nitrifikace (Schinner et al., 1995). Při měření potenciální nitrifikace se půdní vzorky inkubují s přidavkem NH_4^+ , např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a při vyšší teplotě, např. 25 °C. Inkubace probíhá za aerobních podmínek a v jejím průběhu se odebírají subvzorky na stanovení obsahu nitrátů a někdy i nitritů. Metody se v zásadě dělí podle délky inkubace na dlouhodobé (inkubace 3 až 5 týdnů i déle) a krátkodobé (inkubace několik hodin). Při dlouhodobých inkubacích se někdy detailněji analyzuje a modeluje průběh nitrifikace (Novák, 1993), avšak často dochází k nepostřehitelným změnám ve skladbě (a aktivitě) mikrobiálního společenstva v průběhu dlouhodobé inkubace (Alef, 1995). Proto se často dává přednost metodám založeným na krátkodobé inkubaci. **Metoda krátkodobé inkubace** se používá ke stanovení maximální rychlosti nitrifikace v půdě. Vzorky půdy se inkubují v laboratorních podmínkách a optimalizuje se obsah vody, aerační status, množství NH_4^+ a přijatelný fosfor (Hart et al., 1994). Někdy se používá přidavek chlornanu sodného, který inhibuje oxidaci NO_2^- . Fakticky se tak měří oxidace amoniaku čili aktivita enzymů amoniummonooxygenasy a hydroxylaminoxydoreduktasy; protože se stanovuje nitrit jako produkt, je metoda citlivější než při měření nitrátu jako produktu nitrifikačních reakcí

(Belser, Mays, 1980). Vzhledem k citlivosti metody může inkubace trvat jen několik hodin, a metoda tak může sloužit ke stanovení aktivity nitrifikačních enzymů (NEA – nitrifying enzyme activity) nitrifikátorů přítomných v půdě v době měření. Dovoluje to relativně velmi nízká reprodukční rychlost nitrifikačních bakterií, takže nitrifikační aktivitu stanovenou při krátkodobé inkubaci lze přiřadit nitrifikujícím buňkám přítomným ve zkoumaném vzorku na začátku inkubace.

Přehled moderních metod studia nitrifikace včetně detailních metodických postupů lze najít v mnoha soudobých metodicky zaměřených publikacích (např. Hart et al., 1994; Alef, 1995; Schinner et al., 1995).

Poděkování

Autor děkuje kolegům T. Pickovi a J. Fajtlvi za připomínky k první verzi rukopisu a D. W. Hopkinsovi za revizi abstraktu. Práce byla podpořena grantem GA ČR č. 206/99/1410.

LITERATURA

Abeliovich A. (1992): Transformations of ammonia and the environmental impact of nitrifying bacteria. *Biodegradation*, 3: 255–264.

Alef K. (1995): Nitrogen mineralization in soils. In: Alef K., Nannipieri P. (eds.): *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, Acad. Press: 234–245.

Atlas R. M., Bartha R. (1993): *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Redwood City, The Benjamin Cummings Publ. Comp.

Belser L. W. (1979): Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 309–333.

Belser L. W., Mays E. L. (1980): Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Envir. Microbiol.*, 39: 505–510.

Belser L. W., Mays E. L. (1982): Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Appl. Envir. Microbiol.*, 43: 505–510.

Brady N. C. (1990): *The nature and properties of soils*. 10th ed. New York, MacMillan Publ. Comp.

Bramley R. G. V., White R. E. (1989): The effect of pH, liming, moisture and temperature on the activity of nitrifiers in a soil under pasture. *Austral. J. Soil Res.*, 27: 711–724.

Bramley R. G. V., White R. E. (1990): The variability of nitrifying activity in field soils. *Pl. Soil*, 126: 203–208.

Caffrey J. M., Miller L. G. (1995): A comparison of two nitrification inhibitors used to measure nitrification rates in estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17: 213–220.

Castignetti T., Hollocher T. C. (1984): Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Appl. Envir. Microbiol.*, 47: 620–623.

Conrad R. (1996): Metabolism of nitric oxide in soil and soil microorganisms and regulation of flux into the atmosphere. In: Murrell J. C., Kelly D. P. (eds.): *Microbiology of atmospheric trace gases*. Berlin, Springer: 167–203.

Davidson E. A. (1991): Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from terrestrial ecosystems. In: Rogers J. E., Whitman W. B. (eds.): *Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane nitrogen oxides, and halomethanes*. Washington, D.C., ASA: 219–235.

Firestone M. K., Davidson E. A. (1989): Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: Andreae M. O., Schimel D. S. (eds.): *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*. New York, John Wiley and Sons: 7–37.

Grundmann G. L., Renault P., Rosso L., Bardin R. (1995): Differential effects of soil water content and temperature on nitrification and aeration. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 59: 1342–1349.

Gundersen P., Rasmussen L. (1990): Nitrification in forest soils: effects from nitrogen deposition on soil acidification and aluminum release. *Rev. Envir. Contam. Toxic.*, 113: 1–45.

Hagopian D. S., Riley J. G. (1998): A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacult. Engng.*, 18: 223–244.

Hart S. C., Stark J. M., Davidson E. A., Firestone M. (1994): Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. In: Weaver R. W. et al. (eds.): *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties*. Madison, SSSA: 985–1018.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.

Jarvis S. C. (1996): Future trends in nitrogen research. *Pl. Soil*, 181: 47–56.

Jarvis S. C., Stockdale E. A., Shepherd M. A., Powlson D. S. (1996): Nitrogen mineralization in temperate agricultural soils: processes and measurement. *Adv. Agron.*, 57: 187–235.

Jenkinson D. S. (1990): An introduction to the global nitrogen cycle. *Soil Use Mgmt*, 6: 56–61.

Jenkinson D. S., Parry L. C. (1989): The nitrogen cycle of the Broadbalk Wheat Experiment: a model for the turnover of nitrogen through the soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 535–541.

Keeney D. R. (1986): Inhibition of nitrification in soils. In: Prosser J. I. (ed.): *Nitrification*. Oxford, IRL Press: 99–115.

Killham K. (1990): Nitrification in coniferous forest soils. *Pl. Soil*, 128: 31–44.

Kubát J. (1993): Metody studia mineralizace N a nitrifikace. In: Šimek M., Novák F., Šantrůčková H. (eds.): *Metody studia přeměn dusíku v půdě*. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 73–78.

Lloyd D. (1993): Aerobic denitrification in soils and sediments: from fallacies to facts. *TREE*, 8: 352–356.

Novák F. (1993): Analýza průběhu nitrifikace. In: Šimek M., Novák F., Šantrůčková H. (eds.): *Metody studia přeměn dusíku v půdě*. České Budějovice, ÚPB AV ČR: 121–130.

Paul E. A., Clark F. E. (1996): *Soil microbiology and biochemistry*. 2nd ed. San Diego, Acad. Press.

Peoples M. B., Freney J. R., Mosier A. R. (1995): Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: Bacon P. E. (ed.): *Nitrogen fertilization in the environment*. New York, Marcel Dekker, Inc.: 565–602.

- Persson T., Wirén A. (1995): Nitrogen mineralization and potential nitrification at different depths in acid forest soils. *Pl. Soil*, 168–169: 55–65.
- Poth M. (1986): Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Appl. Envir. Microbiol.*, 52: 957–959.
- Powlson D. S. (1993): Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use Mgmt*, 9: 86–94.
- Prasad R., Power J. F. (1997): Soil fertility management for sustainable agriculture. Boca Raton, Lewis.
- Robertson G. P. (1989): Nitrification and denitrification in humid tropical ecosystems: potential controls on nitrogen retention. In: Proctor J. (ed.): Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystems. Boston, Blackwell Sci.: 55–69.
- Robertson G. P., Vitousek P. M. (1981): Nitrification potentials in primary and secondary succession. *Ecology*, 62: 376–386.
- Robertson L. A., Kuenen J. G. (1984): Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, 139: 351–354.
- Robertson L. A., Kuenen J. G. (1988): Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha* – oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 857–863.
- Robertson L. A., Kuenen J. G. (1990): Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 139–152.
- Robertson L. A., Kuenen J. G. (1991): Physiology of nitrifying and denitrifying bacteria. In: Rogers J. E., Whitman W. B. (eds): Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane nitrogen oxides, and halomethanes. Washington, D.C., ASA: 189–199.
- Schmidt E. L., Belsler 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.
- Schmidt E. L., Belsler L. W. (1994): Autotrophic nitrifying bacteria. In: Weaver R. W. et al. (eds.): Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. Madison, SSSA: 159–177.
- Schinner F., Ohlinger R., Kandeler E., Margesin R. (1995): Methods in soil biology. Berlin, Springer.
- Stark J. M., Firestone M. (1995): Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61: 218–221.
- Stevens R. J., Laughlin R. J., Malone J. P. (1998): Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and dinitrogen. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1119–1126.
- Stouthamer A. H. (1988): Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In: Zehnder A. J. B. (ed.): Biology of anaerobic microorganisms. New York, John Wiley and Sons: 245–303.
- Šimek M. (1998): Denitrifikace v půdě – terminologie a metodologie (studie). *Rostl. Výr.*, 44: 385–394.
- Tate R. L. III (1995): Soil microbiology. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Tiedje J. M. (1988): Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder A. J. B. (ed.): Biology of anaerobic microorganisms. New York, John Wiley and Sons: 179–244.
- Tiedje J. M. (1994): Denitrifiers. In: Weaver R. W. et al. (eds.): Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. Madison, SSSA: 245–267.
- Tortoso A. C., Hutchinson G. L. (1990): Contributions of autotrophic and heterotrophic nitrifiers to soil NO and N₂O emissions. *Appl. Envir. Microbiol.*, 56: 1799–1805.
- Vaněk V., Vostal J., Čínková D., Vlková O. (1989): Vliv doby aplikace močoviny na odběr a využití dusíku ozimou pšenicí. *Rostl. Výr.*, 35: 681–688.
- White D. (1995): The physiology and biochemistry of prokaryotes. New York, Oxford Univ. Press.
- Woldendorp J. W., Laanbroek H. J. (1989): Activity of nitrifiers in relation to nitrogen nutrition of plants in natural ecosystems. In: Clarholm M., Bergstrom L.: Ecology of arable land. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ.: 149–160.
- Wood P. M. (1986): Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser J. I. (ed.): Nitrification. Oxford, IRL Press: 39–62.
- Zacheri B., Amberger A. (1990): Effect of nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertil. Res.*, 22: 37–44.

Došlo 20. 1. 2000

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Miloslav Šimek, CSc., Ústav půdní biologie AV ČR; Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Na sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: + 420 38 530 01 74, fax: + 420 38 530 01 33, e-mail: misim@upb.cas.cz

Změna publikačního jazyka ve vědeckých časopisech ČAZV

Předsednictvo České akademie zemědělských věd přijalo na zasedání dne 6. 4. 2000 usnesení, kde mj. doporučuje změnu publikačního jazyka ve vědeckých časopisech vydávaných pod gescí ČAZV. Předsednictvo navrhuje Vydavatelské radě ČAZV zavést angličtinu jako jediný jazyk ve všech vědeckých časopisech od 1. 1. 2001. Redakce časopisu Rostlinná výroba přijímá od 1. 7. 2000 příspěvky psané pouze v angličtině.



A change of publication language in Scientific Journals of the Czech Academy of Agricultural Sciences

At its session on the 6th April 2000, the Presidium of the Czech Academy of Agricultural Sciences adopted a resolution recommending, among other things, to change the publication language in scientific journals published under the Academy patronage. The Presidium proposes to the Publishing Board of the Academy to introduce English as the only language in all scientific journals from the 1st January 2001. The papers written exclusively in English are accepted by the editor's office of the journal Rostlinná výroba (Plant Production) from the 1st July 2000.

THE EFFECT OF ELEVATED AMBIENT CO₂ AND TEMPERATURE INCREASE ON RHIZOSPHERE OF PERENNIAL RYEGRASS (*LOLIUM PERENNE* L.)

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO₂ A TEPLoty NA RHIZOSFÉRU JÍLKY VYTRVALÉHO (*LOLIUM PERENNE* L.)

H. Šantrůčková^{1,2}, D. Elhottová¹, P. Loiseau³, F. Soussana³

¹*Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*

²*Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic*

³*INRA, Clermont-Ferrand, France*

ABSTRACT: The consequences of the elevated CO₂ and the elevated CO₂ with an increased temperature on rhizosphere of perennial ryegrass were investigated. Ryegrass grown in the loamy soil treated with two different doses of mineral N (160 and 530 kg N.ha⁻¹.year⁻¹) was continually kept in experimental climate conditions for approximately two and half years. The amount of C and N compounds (total extractable C, carbohydrate, reducing sugars, ninhydrin reactive N and ammonium N), fluorescein diacetate (FDA) hydrolytic activity, proteolytic activity of extracellular enzymes and the composition of microbial communities (CFU on elective media) were measured 15, 20 and 27 months of plant growth in the experimental conditions. The contents of extractable C and carbohydrates increased with plant age in all climate conditions, while the contents of reducing sugars, ninhydrin-reactive N and ammonium N did not. We found significant positive effect of the experimental climate conditions on the contents of C and N compounds and on FDA activity after 15 months of ryegrass growth. At the end of the experiment, after 27 months of plant growth in the experimental conditions, all these parameters were affected negatively. The decrease of the values was slowed by N fertilisation but not eliminated. Proteolytic activity was significantly higher in the experimental climate conditions in most sampling. The numbers of CFU on various media were decreased in the elevated CO₂ conditions in June 1994 and 1995, and in the elevated CO₂ with increased temperature conditions in June 1995. Again, N fertilisation did not entirely eliminate the negative effect of the experimental climate conditions. Our results demonstrate that the positive effect of changing climate on the content of organic compounds in rhizosphere and on activity of rhizosphere microflora of ryegrass was only a short-term one.

Keywords: elevated CO₂; increased temperature; N fertilisation; rhizosphere; ryegrass; C and N compounds; microbial and enzymatic activities; CFU

ABSTRAKT: Byl sledován vliv zvýšené koncentrace CO₂ (700 μl.l⁻¹) a vliv zvýšené koncentrace CO₂ v kombinaci se zvýšenou teplotou (700 μl.l⁻¹, +3 °C) na mikrobiální aktivitu v rhizosféře jílky vytrvalého. Jílek byl po dobu dva a půl roku pěstován v řízených atmosférických podmínkách, v hlinité půdě hnojené dvěma dávkami minerálního N (160 a 530 kg N.ha⁻¹.rok⁻¹). Po 15, 20 a 27 měsících růstu rostlin v řízených podmínkách bylo v rhizosféře měřeno množství C a N látek (celkový extrahovatelný C, polysacharidy, redukující cukry, ninhydrin-reaktivní forma N a NH₄⁺-N), fluorescein diacetát (FDA) hydrolytická aktivita, proteolytická aktivita extracelulárních enzymů a skladba mikrobiálního společenstva (KTJ na elektivních médiích). Obsah extrahovatelného C a polysacharidů se zvyšoval se stářím rostlin ve všech klimatických podmínkách, zatímco obsah redukujících cukrů, ninhydrin-reaktivního N a NH₄⁺-N se výrazně neměnil. Průkazně kladný vliv pokusných klimatických podmínek na obsah C a N látek a na FDA aktivitu byl zjištěn po 15 měsících. Na konci pokusu, po 27 měsících růstu v pokusných podmínkách, byly všechny tyto parametry ovlivněny negativně. Hnojení N tento negativní vliv zpomalovalo, ale zcela neeliminovalo. Proteolytická aktivita byla průkazně vyšší v pokusných podmínkách u většiny odběrů. Počet KTJ na médiích s různým zdrojem C a N byl snížen v podmínkách zvýšeného CO₂ v červnu 1994 i 1995 a vzrostl v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ a zvýšené teploty v červnu 1995. Hnojení N opět neeliminovalo negativní vliv pokusných klimatických podmínek. Kladný účinek měnících se klimatických podmínek na obsah organických látek v rhizosféře a následně na rhizosférickou mikroflóru jílky vytrvalého byl pouze krátkodobý.

Klíčová slova: zvýšená koncentrace CO₂; zvýšená teplota; N hnojení; rhizosféra; jílek vytrvalý; C a N látky; mikrobiální a enzymová aktivita; počty bakterií

INTRODUCTION

Doubling of ambient CO₂ concentration from 350 to 700 μl.l⁻¹ often stimulates plant photosynthesis and growth, enhances carbon allocation belowground and increases plant nutrient uptake (Cure, Acock, 1986; Owensby et al., 1993; Jongen et al., 1995; Gorissen, 1996; Gregory et al., 1996). In the elevated CO₂ conditions, an increase of C input from belowground parts into the soil mostly results in an increased amount of roots and stolons (Ball, 1997; Zak et al., 1993; Rouhier et al., 1994). Although root exudation rate can also be enhanced (Pateron et al., 1996), this response cannot be generalised and depends on plant species, plant age, soil nutrient status and other factors of the soil environment (Curl, True-love, 1986). In terms of the C quality, plant material produced in the elevated CO₂ conditions often has higher C : N or lignin : N ratios (Cotrufo, Ineson, 1996) and a higher portion of phenolics and tannins (Gebauer et al., 1998; Penuelas, Estiarte, 1998). It could slow down the decomposition of plant material in the elevated CO₂ conditions.

Microorganisms in the rhizosphere preferentially utilise easily available rhizodepositional material, but under nutrient limitation, microorganisms also decompose soil organic matter in a great extent to get the nutrients that they need for building of cell material (Cardon, 1996). In the elevated CO₂ conditions, the increased input of rhizodepositional material is higher and N content is lower. It might induce decomposition of soil organic matter (Zak et al., 1993).

This paper examines the extent to which the elevated CO₂ and the elevated CO₂ with an increased temperature influence rhizosphere of ryegrass under two different N regimes. The objectives were to obtain information on the effect of changing climate conditions and N supply on contents of available C and N compounds, microbial and enzymatic activities and on a composition of microbial communities in rhizosphere of ryegrass grown in the experimental climate conditions for 15, 20 and 27 months.

MATERIAL AND METHODS

We analysed rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L., cv. Préférence) from a long term experiment of INRA, Clermont Ferrand, France. The experiment was designed to study changes in productivity, and C and N balance of soil grown perennial ryegrass swards in the conditions of elevated CO₂ and temperature increase. Perennial ryegrass was sown in containers (0.5 m², 45 cm deep) filled with loamy soil. Soil consisted of 42% sand, 42% loam, 15% clay and 1% organic C with a C : N ratio 10. The pH (water) was 6.9, CEC 17.4 meq per 100 g of dry soil. In March 1993, 18 months after sowing, the containers with swards were put into ventilated plastic tunnels with different climatic conditions: outdoor climate (350 μl CO₂.l⁻¹; control), el-

evated CO₂ (700 μl CO₂.l⁻¹), elevated CO₂ with an increased temperature (700 μl CO₂.l⁻¹, +3 °C). Within each tunnel (70 m²), the air and temperature was regulated (Casella et al., 1996). The swards were grown continuously in these conditions till June 1995. All swards were cut simultaneously on five occasions each year. Each treatment was annually supplied with inorganic N fertilizer (NH₄NO₃) and two rates of N fertilizer were compared: 160 kg N.ha⁻¹.year⁻¹ and 530 kg N.ha⁻¹.year⁻¹. More detailed description of experimental design is given by Casella et al. (1996). Rhizosphere for analyses was sampled in June and November 1994 and in June 1995. Intact soil blocks of 10 × 10 × 15 cm were always taken in three replications from each treatment immediately after cutting the sward. Roots with adjacent soil were hand-picked from the blocks in the same day.

One part of collected roots was kept at -20 °C and later used for a determination of bacterial counts. The other part of roots was washed in Na-pyrophosphate (0.1%, 1 : 4 w/v, 15 min, oscillating shaker). The roots were then removed and soil suspension was immediately analysed for enzymatic activities and N content. For measurements of C compounds, the suspension was centrifuged at 9500 rpm, supernatant was acidified to pH value of 2 with sulphuric acid and stored at -20 °C before analyses. All analyses were performed in three to four replications and results were expressed per gram dry soil. A significance of differences between treatments were evaluated using ANOVA, *P* < 0.01.

Fluorescein diacetate (FDA) hydrolytic activity was measured using a slight modification of the method of Schnürer, Rosswall (1982). Hydrolysis of FDA was stopped by addition of 2 ml 0.1% HgCl₂ (Fontvieille et al., 1992). Proteolytic and amylolytic activity of exocellular enzymes was measured in the suspension after addition of several drops of toluen and after centrifugation (7000 rpm, 5 min) by a colorimetric technique. The proteolytic activity was determined according to Vágnerová, Macura (1974) and the amylolytic activity according to Zemek, Kuniak (1983). Numbers of colony forming units (CFU) of bacteria in rhizosphere soil were counted on elective agar media. CFU of proteolytic bacteria was counted on casein medium (Martley et al., 1970), N₂ fixing bacteria on N free medium (Doberreiner, Day, 1974). Media with the same mineral base but different in sources of N and C were used for counting bacteria requiring C and N sources of different complexity (Lochhead, Chase, 1943; Taylor, 1951). Mineral N (ammonium) and glucose were used as the first level of complexity, amino acids as the second and yeast and soil extracts as the last ones. Total extractable C (C_{ext}) was measured by dichromate semi-micro method (Hejzlar, Kopáček, 1990), total carbohydrate content (C_{ch}) using phenol sulphuric acid method (Šafařík, Šantrůčková, 1992). An amount of reducing sugars (C_{rs}) was measured using colorimetric method and expressed as glucose C (Somogyi, 1952). Extractable N compounds (N_{min}) were determined with the ninhydrin reagent using procedure described by

Joergensen, Brookes (1990). Ammonium N (N_{NH_4}) was measured with indophenol method (Zbiral et al., 1997).

RESULTS

We compared the values of parameters measured in the experimental climate conditions with those obtained from the control climate conditions in the corresponding sampling times.

In the control climate conditions ($350 \mu\text{l CO}_2\text{ l}^{-1}$), the level of C_{ext} and C_{ch} in rhizosphere of ryegrass significantly increased with the plant age at both rates of N fertilizer (Tab. I). The amount of N_{min} , which was the highest in June 1994, did not increase with the plant age. The

The effects of the elevated CO_2 , and the elevated CO_2 with an increased temperature on the measured parameters related to those measured in the control climate conditions are shown in Figs. 1 and 2. Both experimental climate conditions increased the level C_{ext} , C_{ch} , N_{min} and FDA activity of microflora in June 1994 when the plants were grown in the experimental climate conditions for 15 months. The positive effect of the experimental climate conditions ceased with prolonged time of the plant growth and it was mostly negative after 27 months of the plant growth in these conditions. The high N treatment promoted the positive effect of the experimental climate conditions but did not entirely eliminate the negative effect at the end of investigation. The content of C_{rs} was reduced in the experimental climate conditions only in

I. The amount of extractable carbon (C_{ext}), carbohydrates (C_{ch}), reducing sugar (C_{rs}), ninhydrin reactive compounds (N_{min}) and ammonium N (N_{NH_4}) in the rhizosphere of perennial ryegrass grown under outdoor climate conditions ($350 \mu\text{l CO}_2\text{ l}^{-1}$, control); plants were supplied with 160 and 530 kg N.ha⁻¹.year⁻¹; mean values from four replications and standard deviations are given, different letters indicate significant differences (ANOVA, $P < 0.01$)

Date	N dose (kg.ha ⁻¹)	C_{ext} ($\mu\text{g C.g}^{-1}$)	C_{ch} ($\mu\text{g C.g}^{-1}$)	C_{rs} ($\mu\text{g C.g}^{-1}$)	N_{min} ($\mu\text{g N.g}^{-1}$)	N_{NH_4} ($\mu\text{g N.g}^{-1}$)
June 94	160	66.3 ± 0.9 ^a	16.2 ± 2.0 ^a	ND	8.13 ± 0.30 ^b	ND
Nov. 94	160	347.0 ± 7.5 ^b	59.7 ± 9.3 ^b	6.07 ± 0.76 ^a	6.23 ± 0.47 ^a	2.25 ± 0.14 ^a
June 95	160	788.3 ± 8.9 ^c	160.9 ± 2.1 ^c	5.76 ± 0.91 ^a	7.57 ± 0.40 ^{ab}	2.30 ± 0.22 ^a
June 94	530	120.6 ± 0.9 ^a	24.7 ± 2.4 ^a	ND	11.27 ± 0.26 ^b	ND
Nov. 94	530	377.1 ± 12.9 ^b	71.5 ± 9.3 ^b	7.71 ± 0.76 ^a	6.80 ± 0.12 ^a	1.89 ± 0.17 ^a
June 95	530	506.4 ± 5.9 ^c	273.7 ± 2.2 ^c	8.49 ± 1.10 ^a	7.30 ± 0.18 ^a	1.64 ± 0.12 ^a

ND = not defined

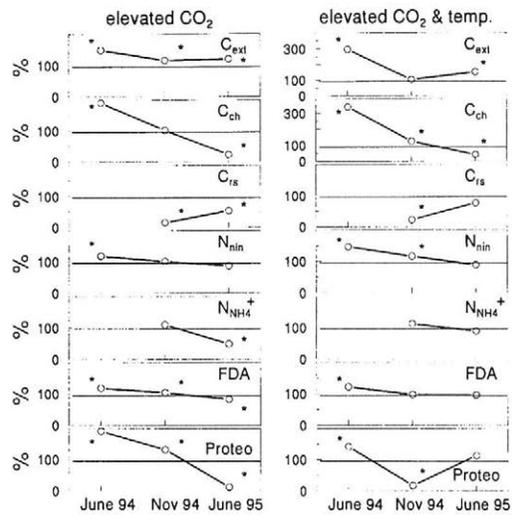
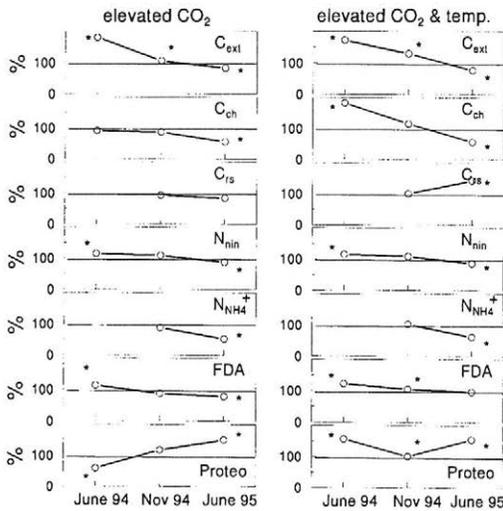
amounts of C_{rs} and N_{NH_4} did not change in the course of investigation. We found a consistent positive effect of the high N treatment on C_{ch} and C_{rs} (Tab. I). C_{ext} and N_{min} were positively affected in the high N treatment only in June 1994. N_{NH_4} was even lower in the high N than in the low N treatment. Although the metabolic activity of a rhizosphere microflora measured as FDA activity did not increase with the plant age, it was higher in the high N treatment as related to low N treatment (Tab. II). Proteolytic activity of extracellular enzymes was higher in the spring than in the autumn samplings in both N treatments (Tab. II).

the high N treatments (Fig. 2). The content of N_{NH_4} was lowered after 27 months of the plant growth in the experimental climate conditions in both N treatments. The effect of the experimental climate conditions on proteolytic activity varied but was positive in the most cases.

Amylolytic activity of extracellular enzymes being measured in June 1995 was significantly higher in the high N than in the low N treatments in all conditions (Tab. III). As compared to the control climate conditions, the amylolytic activity was reduced in the elevated CO_2 conditions. It was, however, increased in the elevated CO_2 and temperature conditions (Tab. III).

II. FDA hydrolytic activity and proteolytic activity in the rhizosphere of perennial ryegrass grown under outdoor climate conditions ($350 \mu\text{l CO}_2\text{ l}^{-1}$, control); plants were supplied with 160 kg N and 530 kg N.ha⁻¹.year⁻¹; mean values from four replications and standard deviations are given, different letters indicate significant differences (ANOVA, $P < 0.01$)

Date	160 kg N.ha ⁻¹		530 kg N.ha ⁻¹	
	FDA ($A_{490}\text{.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	proteolytic activity (mg.g^{-1})	FDA ($A_{490}\text{.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	proteolytic activity (mg.g^{-1})
June 94	1.49 ± 0.06 ^a	0.94 ± 0.02 ^c	2.29 ± 0.01 ^b	0.85 ± 0.06 ^b
Nov. 94	1.79 ± 0.05 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	1.96 ± 0.02 ^a	0.04 ± 0.02 ^a
June 95	1.39 ± 0.04 ^a	0.43 ± 0.04 ^b	1.97 ± 0.06 ^a	0.83 ± 0.13 ^b



1. Relative amount of extractable carbon (C_{ext}), carbohydrates (C_{ch}), reducing sugar (C_{rs}), ninhydrin reactive compounds (N_{nin}), ammonium N ($N_{NH_4^+}$), FDA activity and proteolytic activity of extracellular enzymes in the rhizosphere of perennial ryegrass grown under the elevated CO_2 ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$) and under the elevated CO_2 and increased temperature conditions ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$, $+3 \text{ } ^\circ C$); plants were supplied with $160 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{year}^{-1}$; values of the parameters that determined in the control climate conditions are 100%; significant difference ($P < 0.01$) from the control is marked with asterisk

2. Relative amount of extractable carbon (C_{ext}), carbohydrates (C_{ch}), reducing sugar (C_{rs}), ninhydrin reactive compounds (N_{nin}), ammonium N ($N_{NH_4^+}$), FDA activity and proteolytic activity of extracellular enzymes in the rhizosphere of perennial ryegrass grown under the elevated CO_2 ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$) and under the elevated CO_2 and increased temperature conditions ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$, $+3 \text{ } ^\circ C$); plants were supplied with $530 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{year}^{-1}$; values of the parameters that determined in the control climate conditions are 100%; significant difference ($P < 0.01$) from the control is marked with asterisk

The number of CFU on elective agar media determined in June 1994 and 1995 was affected by the experimental climate conditions (Figs. 3, 4). The elevated CO_2 conditions led to decrease of CFU on all the media used. The decrease was partly eliminated in the high N treatments. We did not find any important changes in the distribution of bacteria to the nutritional groups. Only a slight shift towards proteolytic was detected in the low N treatments. The elevated CO_2 and increased temperature conditions caused the decrease in CFU in the low N treatment. A shift towards proteolytic bacteria was apparent only in June 1995.

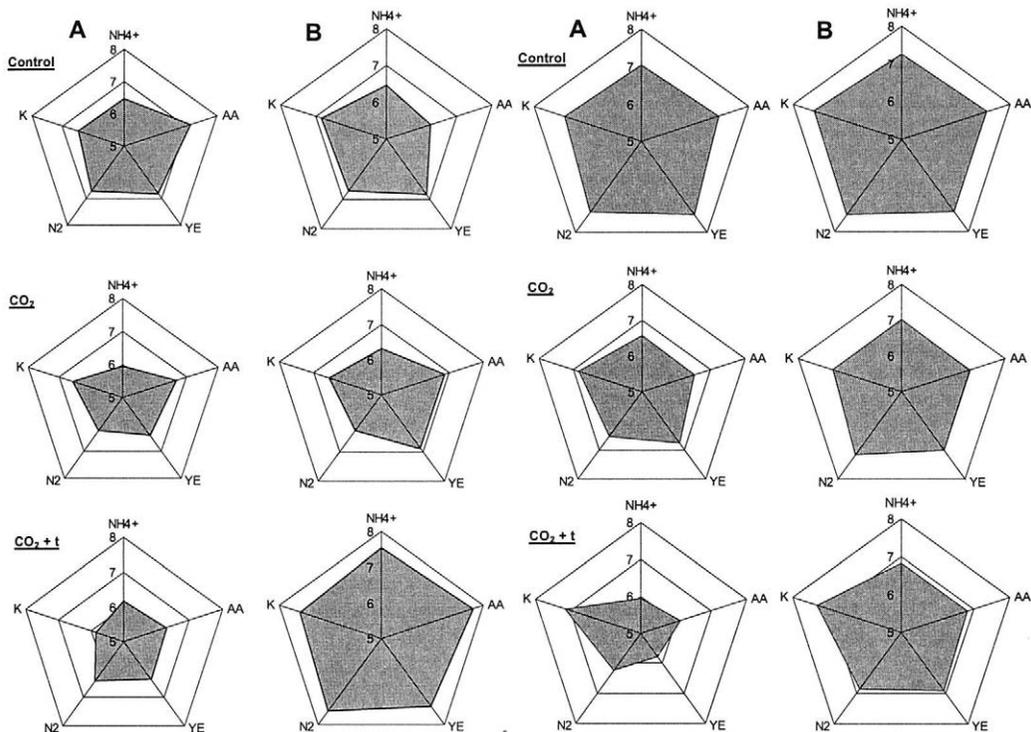
DISCUSSION

The elevated CO_2 conditions and the elevated CO_2 with increased temperature conditions positively affected the contents of C and N compounds and FDA activity of microflora in the rhizosphere of ryegrass when the plants were grown under experimental climate conditions for 20 months. The positive effect gradually ceased during the extension of the experiment. After 27 months of the plant growth, the experimental climate conditions mostly restricted the measured parameters. The results indicate that the increase of CO_2 and temperature can positively affect C release from roots to the surrounding soil and, consequently, microbial activity (Geijn, Veen, 1993). However, the positive effect appears to be, at least for ryegrass, only transitional.

III. Amylolytic activity ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) in rhizosphere of perennial ryegrass grown under various climate conditions: outdoor climate conditions ($350 \mu l CO_2 l^{-1}$, control), elevated CO_2 ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$), elevated CO_2 and temperature ($700 \mu l CO_2 l^{-1}$, $+3 \text{ } ^\circ C$); plants were supplied with 160 and $530 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{year}^{-1}$; the data from June 1995, mean values from four replications and standard deviations are given, different letters indicate significant differences (ANOVA, $P < 0.01$)

The contents of C_{ext} and C_{ch} in the rhizosphere increased with the plant age while C_{rs} , N_{nin} , and $N_{NH_4^+}$ did not change. Thus, the increase of C_{ext} was linked to the accumulation of complex material such as polysaccharides, proteins and phenolic compounds but not to the accumulation of low molecular compounds. Consistently with our findings, Zagal (1994) documented an increase of C content in the rhizosphere with the plant age and Jones, Darrah (1993) found a gradual increase of the content of high molecular compounds while that of sugars and amino acids did not change.

Treatment	Amylolytic activity ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	
	160 $\text{kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$	530 $\text{kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$
Control	1.54 ± 0.06 ^b	2.54 ± 0.24 ^b
700 $\mu l CO_2 l^{-1}$	1.27 ± 0.09 ^a	1.64 ± 0.10 ^a
700 $\mu l CO_2 l^{-1}$ +3 $^\circ C$	2.15 ± 0.14 ^c	2.11 ± 0.16 ^b



3. Colony forming units (CFU.g^{-1}) in the rhizosphere of ryegrass grown in the control, the elevated CO_2 ($700 \mu\text{l CO}_2.\text{l}^{-1}$) and the elevated CO_2 and increased temperature ($700 \mu\text{l CO}_2.\text{l}^{-1}$, $+3^\circ\text{C}$) conditions; in low N (A) and high N (B) treatments; on the axis log of CFU on media with ammonium and glucose (NH_4^+), with amino acids (AA), yeast extract (YE), casein (K) and on medium without nitrogen (N_2) are plotted; the values from the sampling in June 1994 are given

4. Colony forming units (CFU.g^{-1}) in the rhizosphere of ryegrass grown in the control, the elevated CO_2 ($700 \mu\text{l CO}_2.\text{l}^{-1}$) and the elevated CO_2 and increased temperature ($700 \mu\text{l CO}_2.\text{l}^{-1}$, $+3^\circ\text{C}$) conditions; in low N (A) and high N (B) treatments; on the axis log of CFU on media with ammonium and glucose (NH_4^+), with amino acids (AA), yeast extract (YE), casein (K) and on medium without nitrogen (N_2) are plotted; the values from the sampling in June 1995 are given

In the control climate conditions, $C_{\text{ext}} : C_{\text{ch}}$ ratio did not change (low N treatment) or decreased (high N treatment) indicating a proportional or a higher accumulation of carbohydrates than the accumulation of other complex compounds. In the experimental climate conditions in both N treatments, the increased $C_{\text{ext}} : C_{\text{ch}}$ ratio pointed to the accumulation of phenolic and non-carbohydrate compounds.

CFU do not represent the total number of bacteria and the results should be therefore interpreted with great care. Nevertheless, they can, in combination with additional criteria, indicate certain changes in the communities of bacteria. The decrease of CFU in June 1995 coincided with the decrease in FDA activity and in the content of C and N compounds. The shift in the distribution of bacteria into nutritional groups towards the proteolytic bacteria in the experimental climatic conditions in the low N treatments corresponded to a higher proteolytic activity of extracellular enzymes and to a lower

C : N ratio of root material (Loiseau, pers. commun.). The presented results display a breakdown of more complex organic material and support the hypothesis that the decomposition of more complex organic compounds can be promoted in the conditions of the climate change to cover N demand for microbial growth and maintenance (Geijn, Veen, 1993; Zak et al., 1993).

We used data of root phytomass in the sampling dates (Soussana et al., 1996; Loiseau, Soussana, 1999) estimating an input of C_{ext} per hectare of soil (Tab. IV). The input of C_{ext} was about three orders lower than the input of C from the root phytomass. The experimental climate conditions affected positively C_{ext} input in November 1994. In June 1995, the amount of C_{ext} per hectare was enhanced only in the elevated CO_2 conditions and the enhancement was caused by a larger root system rather than by a higher exudation.

The presented results demonstrate that the positive effect of the climate change on C release from roots and stimu-

IV. The amount of C_{ext} per hectare of soil ($kg\ C\ ha^{-1}$) as estimated from root phytomass (Soussana et al., 1994; Loiseau, Soussana, 1999) and mean value of C_{ext} content in the rhizosphere in particular sampling dates

	160 kg N.ha ⁻¹			530 kg N.ha ⁻¹		
	control	700 $\mu l\ CO_2.l^{-1}$	700 $\mu l\ CO_2.l^{-1}+3\ ^\circ C$	control	700 $\mu l\ CO_2.l^{-1}$	700 $\mu l\ CO_2.l^{-1}+3\ ^\circ C$
June 94	1.59	1.69	1.93	0.93	2.48	4.04
Nov. 94	14.39	53.01	31.68	24.48	31.90	40.57
June 95	18.89	28.07	13.57	10.84	32.53	19.50

lation of microbial activity in the rhizosphere is only a short lasting one and that the decomposition of complex soil organic material can be enhanced. They confirm that long-term experiments in natural undisturbed conditions are required to permit shifts between negative and positive effects of elevated CO_2 level on soil microbial response and ecosystem feedback (Hu et al., 1999).

Acknowledgment

Support of this research was provided by INRA (France), by a grant of the Commission EC (CROPCHANGE, EV5V-CT92-0169) and by grants of GA CR 206/99/1410 and MSM 1231 00004. We thank to J. Hejzlar for carbon analyses, E. Chrastinová for technical assistance, M. Shortemeyer for valuable comments to manuscript and to H. Beverly for language correction.

REFERENCES

Ball A. S. (1997): Microbial decomposition at elevated CO_2 levels: effect of litter quality. *Glob. Change Biol.*, **3**: 379–386.

Cardon Z. G. (1996): Influence of rhizodeposition under elevated CO_2 on plant nutrition and soil organic matter. *Pl. Soil*, **187**: 277–288.

Casella E., Soussana J. F., Loiseau P. (1996): Long-term effects of CO_2 enrichment and temperature increase on a temperature grass sward. I. Productivity and water use. *Pl. Soil*, **182**: 83–99.

Cotrufo M. F., Ineson P. (1996): Elevated CO_2 reduces field decomposition rates of *Betula pendula* (Roth) leaf litter. *Oecologia*, **106**: 525–530.

Cure J. D., Acock B. (1986): Crop response to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agric. For. Meteorol.*, **38**: 127–145.

Curl E. A., Truelove, B. (1986): *The rhizosphere*. New York, Springer-Verlag.

Doberreiner J., Day J. M. (1974): Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton W. E., Nyman C. J. (eds.): *Proc. 1st Int. Symp. of nitrogen fixation*. Vol. 2. Washington, Univ. Press Pullman: 518–555.

Fontvieille D. A., Outaguerouine A., Thevenot D. R. (1992): Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludge. *Envir. Technol.*, **13**: 531–540.

Gebauer R. L. E., Strain B. R., Reynolds J. R. (1998): The effect of elevated CO_2 and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia*, **113**: 29–36.

Geijn S. C. van de, Veen, J. A. van (1993): Implications of increased carbon dioxide levels for carbon input and turnover in soil. *Vegetatio*, **104/105**: 283–292.

Gorissen A. (1996): Elevated CO_2 evokes quantitative changes in carbon dynamics in plant/soil system: Mechanisms and implications. *Pl. Soil*, **187**: 289–298.

Gregory P. J., Palta J. A., Batts G. R. (1996): Root systems and root : mass ratio-carbon allocation under current and projected atmospheric conditions in arable crops. *Pl. Soil*, **187**: 221–228.

Hejzlar J., Kopáček J. (1990): Determination of low chemical oxygen demand values in water by the dichromate semi-micro method. *Analyst*, **115**: 1463–1465.

Hu S., Firestone M. K., Chapin III. F. S. (1999): Soil microbial feedbacks to atmospheric CO_2 enrichment. *Trends Ecol. Evol.*, **14**: 433–437.

Joergensen R. G., Brookes P. C. (1990): Ninhydrin – reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K_2SO_4 extracts. *Soil Biol. Biochem.*, **22**: 1023–1027.

Jones D. L., Darrah P. R. (1993): Resorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. *Pl. Soil*, **153**: 47–59.

Jongen M., Jones M. B., Hebeisen T., Blue H., Hendrey G. (1995): The effects of elevated CO_2 concentrations on the root growth of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* grown in a FACE system. *Glob. Change Biol.*, **1**, 161–371.

Lochhead A. G., Chase F. E. (1943): Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant flora. *Soil Sci.*, **55**: 185–195.

Loiseau P., Soussana J. F. (1999): Elevated $[CO_2]$, temperature increase and N supply effects on the turnover of below-ground carbon in a temperate grassland ecosystem. *Pl. Soil*, **210**, 233–247.

Martley F. G., Jayashankar S. R., Lawrence R. C. (1970): An improved agar medium for detection of proteolytic organisms to total bacterial counts. *J. Appl. Bact.*, **33**: 363–370.

Owensby C. E., Coyene P. I., Auen L. M. (1993): Nitrogen and phosphorus dynamics of a tallgrass prairie ecosystem exposed to elevated carbon dioxide. *Pl. Cell Envir.*, **16**: 843–850.

Paterson E., Rattray A. S., Killham K. (1996): Effect of elevated atmospheric CO_2 concentration on C-partitioning and rhizosphere C-flow for three plant species. *Soil Biol. Biochem.*, **28**: 195–201.

- Penuelas J., Estiarte M. (1998): Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends Ecol. Evol.*, *13*: 20–24.
- Rouhier H., Billes G., El Kohen A., Mousseau M., Bottner P. (1994): Effect of elevated CO₂ on carbon and nitrogen distribution within a tree (*Castanea sativa* Mill.) – soil system. *Pl. Soil*, *162*: 281–292.
- Schnürer J., Rosswall T. (1982): Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.*, *43*: 1256–1261.
- Somogyi M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, *19*: 195–197.
- Soussana J. F., Casella E., Loiseau P. (1996): Long-term effects of CO₂ enrichment and temperature increase on a temperate grass sward. II. Plant nutrient budgets and root fraction. *Pl. Soil*, *182*: 83–99.
- Šafařík I., Šantrůčková H. (1992): Direct determination of total soil carbohydrate content. *Pl. Soil*, *143*: 109–114.
- Taylor C. B. (1951): The nutritional requirements of the predominant flora of the soil. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.*, *14*: 101–111.
- Vágnerová K., Macura J. (1974): Determination of protease activity of plant roots. *Folia Microbiol.*, *19*: 322–328.
- Zagal E. (1994): Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system with barley (*Hordeum vulgare* L.) ryegrass (*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a ¹⁴CO₂-atmosphere. *Pl. Soil*, *166*: 63–74.
- Zak D. R., Pregitzer K. S., Curtis P. S., Teeri J. A., Fogel R., Randlett, D. L. (1993): Elevated atmospheric CO₂ and feedback between carbon and nitrogen cycles. *Pl. Soil*, *151*: 105–117.
- Zbírál J., Honsa I., Malý S. (1997): Analýza půd III. ÚKZÚZ, Brno.
- Zemek J., Kuniak L. (1983): Determinations of activities of biopolymer hydrolases by tablet chromolytic tests. *Bull. VP Bratislava*, *22*: 251–261.

Received on March 30, 2000

Corresponding author:

Doc. Ing. Hana Šantrůčková, CSc., Ústav půdní biologie AV ČR; Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: + 420 38 777 57 64, fax: + 420 38 530 01 33, e-mail: hana@upb.cas.cz

*Potřebujete informace o novinkách ve výrobě potravin,
inovaci potravinářských výrobků, balení potravin,
hodnocení kvality potravin, potravinářské legislativě apod.?*

SVĚTOVÝ ZDROJ INFORMACÍ Z OBLASTI POTRAVINÁŘSTVÍ

FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY ABSTRACTS (FSTA)

**Databáze obsahuje přes 500 000 anotovaných záznamů v anglickém jazyce
s retrospektivou od roku 1969**

Ze světové odborné literatury pokrývá následující oblasti: potravinářská věda a technologie, potravinářské inženýrství, biotechnologie, hygiena a toxikologie potravin, potraviny rostlinného a živočišného původu, kvasný a nápojový průmysl, balení, obaly, ekonomika a legislativa.

Informace poskytujeme formou:

- retrospektivních rešerší na požadovaná témata z celé či vymezené retrospektivy
- průběžných rešerší na základě trvalých objednávek ze čtvrtletních přírůstků databáze

ČESKÁ POTRAVINÁŘSKÁ BÁZE DAT

Rešerše z FSTA doplňujeme informacemi z databáze

ALIMIS-CS

Databáze obsahuje v retrospektivě od roku 1993 asi 20 000 záznamů v českém jazyce

o článkách z vědeckých a odborných časopisů, o knihách, ročenkách, sbornících z konferencí, patentech a normách. Primární zdroje informací lze nalézt v *Ústřední zemědělské a potravinářské knihovně* v budově ÚZPI.

Výstupy z obou databází jsou k dispozici v tištěné formě či na disketách, případně je můžeme zaslat e-mail poštou.

Bližší informace podají: *Ing. H. Slezáková*, vedoucí sekce DATA

Mgr. T. Oldřichová, Ing. M. Macháčková

Vaše dotazy a objednávky adresujte na ÚZPI – sekce DATA

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ



Slezská 7, 120 56 Praha 2

tel.: (02) 24 25 79 39/l. 469, 276, (02) 24 25 74 75

fax: (02) 24 25 39 38, e-mail: reserse@uzpi.cz

<http://www.uzpi.cz>

HODNOCENÍ ZÁTĚŽE PŮD RIZIKOVÝMI STOPOVÝMI PRVKY MIKROBIOLOGICKÝMI A BIOCHEMICKÝMI METODAMI

ASSESSMENT OF SOIL POLLUTION BY MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL METHODS

E. Podlešáková¹, J. Němeček², H. Macurová¹

¹Research Institute for Soil and Water Conservation, Prague, Czech Republic

²Czech University of Agriculture in Prague, Czech Republic

ABSTRACT: Studies of soils contaminated in the field conditions or of soils with geogenic extreme concentrations of trace elements proved that the responses in the participation of microorganisms and biochemical processes occur only in extreme cases of the anthropogenic soil contamination and in the soils characterized by the strongest acidity. But we encounter problems of the relative comparability of soil samples with a different combination (trace elements, organic xenobiotics) and different features (anthropogenic, geogenic) of trace elements loads, their mobilities and the different backgrounds of soil – biological processes due to taxonomical – lithological soil units. Investigations of soils with a simulated pollution showed: great differences in the participation of soil microorganisms and their activities in the samples from soil units under study, the most expressive responses on contamination with trace elements have *Azotobacter* (free-living N₂ fixing bacteria), oligotrophic bacteria and actinomycetes, differentiated influence of single trace elements, especially Zn, Cu, in a lesser degree Cd on the depression of the biochemical activities, especially of dehydrogenases and basal and potential nitrification, Hg stimulated often some groups of microorganisms. The findings of these interrelations enable us to reveal the soil sensibility to pollution with hazardous elements in cases of the increased mobility. The results contribute to the deepening of soil vulnerability assessment in connection with the study of changes of mobilities following the inputs of mobile species into soils. But it cannot lead to set up critical soil loads for the transfer pathway soil – plant.

Keywords: soils; simulated pollution; field contamination; responses; microorganisms; biochemical activities

ABSTRAKT: Studium odezvy mikroorganismů a biochemických procesů na přírodní zátěž půd rizikovými prvky a jejich extrémní geogenní obsahy ukazuje průkazné reakce pouze v extrémních případech. Studium půd se simulovanou zátěží poskytují výraznější odezvy. Ze sledovaných prvků vyvolává největší stres pro mikroorganismy Zn a Cu. Tato zátěž se projevuje snížením intenzity biochemických pochodů, zejména nitrifikace (akumulace amonných iontů), a oxidoredukčních pochodů, vyjádřených prostřednictvím dehydrogenázové aktivity. U zranitelnějších půd je významné i potlačení potenciální respirace. Ze sledovaných mikrobiálních skupin se projevila nejvyšší odezva na kontaminaci rizikovými prvky u volně žijících bakterií poutajících dusík (*r. Azotobacter*) a u oligotrofních bakterií a aktinomycet. Cd a Ni neměly na biochemické procesy významný vliv, zatímco Hg způsobila zmnožení určitých skupin mikroorganismů. Tyto výsledky přispívají k hodnocení zranitelnosti půd v návaznosti na studium změn mobility rizikových prvků po vstupu simulované zátěže.

Klíčová slova: půdy; simulovaná zátěž; přírodní zátěž; odezvy; mikroorganismy; biochemické aktivity

ÚVOD

Mikroorganismy mohou sloužit k rychlému určení znečištění půd. Mají poměrně krátký životní cyklus, a proto rychle reagují na změny v životním prostředí (Pérez Garcia et al., 1993). Mikrobiologické parametry jsou tedy velmi užitečné pro monitorování životního prostředí, ale žádný z těchto parametrů nemůže být užít univerzálně. Měřené vlastnosti musí indikovat zne-

čištění, metoda musí být dostatečně robustní, aby nevyvolávala nesprávné závěry, a měla by být validována. Mikrobiologické aktivity, jako jsou respirace, C a N mineralizace, biologická fixace dusíku a některé půdní enzymy, musí být měřeny zároveň s množstvím půdní mikrobiální biomasy. Poměrné hodnoty, jako např. specifická respirace půdy, jsou pak citlivými ukazateli znečištění životního prostředí, a mohou tak nahradit nákladné polní pokusy (Brookes, 1995).

Těžké kovy jsou zabudovávány do různých vazeb v půdě, kde zůstávají dlouhou dobu. V závislosti na těchto vazbách působí na půdní mikroflóru, která je zodpovědná za esenciální nutriční cykly. Sledování interakce těžkých kovů a mikrobiálních procesů je tedy významnou metodou diagnostiky půdních zátěží. Vzhledem k tomu, že mikroorganismy jsou ovlivňovány převážně lehce rozpustnými a výměnnými formami těžkých kovů, je nutno hledat vztah právě mezi takto stanovenými speciemi, rizikovými prvky a biologickými procesy.

Valsecchi et al. (1996) zjistili úzce negativní vztah mezi poměrem C biomasy a organického C a těžkými kovy. Těžké kovy způsobují změnu v metabolickém cyklu organického C a zhoršují rozdělení energie v mikroorganismech. Za nejvýznamnější index považují specifickou respiraci (poměr produkce CO_2 a C mikrobiální biomasy). Tato hodnota společně s poměrem C biomasy k organickému C se ukazuje jako signifikantní ukazatel stavu metabolismu půdní mikroflóry, jež je dostatečně stresována. Chander et al. (1991) zjistili, že tyto ukazatele nejvíce ovlivňují Cu a Zn v koncentracích, jež převyšují hodnoty půdních limitů země EU alespoň dva až čtyřikrát, zatímco Cd v takové koncentraci mikroflóru neovlivňuje. Rovněž Aoyama, Naguamo (1997a) zjistili, že rozklad rostlinných zbytků a mikrobiální biomasa jsou nejsilněji inhibovány Cu a v menší míře Pb. Vliv As byl zanedbatelný. Přídavek rizikových prvků zvyšuje respiraci vztaženou na jednotku biomasy půdního C, přičemž specifická respirace biomasy vykazuje vysoce zápornou exponenciální korelaci s množstvím biomasy C. Aoyama, Naguamo (1997b) v další práci prokázali, že množství mikrobiální biomasy C a N, vyjádřené jako půdní organický C a celkový půdní N, jakož i aktivita hydrogenáz, korelovaly negativně s celkovým obsahem Cu a s obsahem Cu extrahované v 0,1M HCl a 0,1M CaCl_2 . Závislosti byly vyjádřeny jako logaritmická funkce. Korelační koeficient pro Cu extrahovanou v 0,1M CaCl_2 byl nejvyšší pro biomasu C a N a nejnižší pro aktivitu hydrogenáz. Půdní respirace, přepočtená na jednotku celkového obsahu C, nekorelovala s celkovým obsahem Cu, avšak korelovala s Cu extrahovatelnou 0,1M CaCl_2 .

Enzymy mohou být též dobrými indikátory mikrobiální aktivity ve vztahu k těžkým kovům, ale je důležité rozlišovat mezi extracelulárními a endocelulárními enzymy. Např. dehydrogenáza jako endocelulární enzym snižuje svou aktivitu působením těžkých kovů na rozdíl od fosfatázy, která působí i mimo žijící buňku. Půdní dehydrogenázová aktivita odráží veškeré oxidační aktivity půdní mikroflóry a její hodnota, vztažená na jednotku organického C, dobře koreluje s s vodorozpustnými a výměnnými formami rizikových prvků (Aoyama, Naguamo, 1996).

Těžké kovy však mohou mít i stimulační účinek. Dušek (1995) sledoval účinky Cd a zjistil, že v hodnotách 10 mg Cd/kg půdy má pozitivní vliv na nitrifikaci. Vysvětluje to tím, že působením Cd jsou určité

druhy usmrceny a odolnější druhy mají z takovýchto mrtvých buněk lehce dostupné zdroje živin. Ke stejným výsledkům dospěli i Bielek, Matůšková (1998). Maliszewska et al. (1985) při sledování vlivu Cu, Zn, As, Pb a Hg na bakterie, aktinomyceety, mikromyceety a diazotrofní bakterie zjistili pozitivní vliv HgCl_2 ve velmi vysokých koncentracích (500 až 1000 mg Hg/kg půdy) na aktinomyceety. Je to způsobeno zřejmě tím, že vysoká koncentrace určitého polutantu selektivně potlačí některé skupiny, a tak dává možnost růstu určitým rezistentním druhům.

Zviagintsev et al. (1997) sledovali účinky Pb na celkový počet mikroorganismů, mikrobiální biomasu, počet bakterií ekologických a systémových skupin a dalších biochemických ukazatelů (Filip, 1994). Pro detekci znečištění Pb se ukázaly nejcitlivější biochemické testy, a to produkce CO_2 , denitrifikační aktivita, fixace N_2 , ureázová a dehydrogenázová aktivita, a z mikrobiologických počtů volně žijící bakterie pouťající dusík a oligotrofní bakterie.

Dar (1997) se zabýval studiem písčítých, hlinitých a jílovitých půd kontaminovaných olovem. Zjistil signifikantní relativní korelaci mezi Pb extrahovatelným DTPA a toxickými účinky Pb na mineralizaci u písčítých půd, zatímco u půd s vysokými sorpčními vlastnostmi je tento efekt zanedbatelný. Amonifikaci kontaminace Pb téměř neovlivňuje, zatímco nitrifikační bakterie jsou na kontaminaci citlivé.

Na základě těchto skutečností lze konstatovat, že pro studium vztahu těžkých kovů a půdních mikroorganismů jsou nejlepšími ukazateli C biomasy (stanovený fumigací dle ISO 14240-1) vztažený k organickému C, dále pak specifická respirace, stanovení dehydrogenázové aktivity, mineralizace organického N a nitrifikace (ISO 14238) a jako doplňující hodnoty mohou být užity počty KTJ (kolonie tvořících jednotek) zejména oligotrofních bakterií, aktinomyceet a volně žijících bakterií pouťajících dusík.

Příspěvek navazuje na předchozí práci (Němeček et al., 1998):

- do popředí se kladou vztahy mezi zátěží půd stopovými prvky (vyjádřenou v konkrétní formě obsahu a mobilitami rizikových prvků, z kterých je možno odvodit míru antropické a geogenní zátěže) a odezvami v zastoupení hlavních skupin mikroorganismů a v jejich biochemických aktivitách,
- výrazná pozornost se soustřeďuje na rozdílné odezvy mikroorganismů a jejich aktivit při simulované zátěži jednotlivých hlavních reprezentantů půd (bez regulace pH a s úpravou půdní reakce na neutrální) a při přírodním zatížení těchto půd stopovými prvky,
- systematicky se zkoumá, do jaké míry jsou odezvy v zastoupení hlavních skupin mikroorganismů a jejich aktivitách na obsah a mobilitu rizikových stopových prvků závislé na půdních jednotkách (geneticko-substrátových) a na podmínkách, které dočasně způsobují výrazný posun rovnovážného stavu (regulace pH, hydrotermického režimu).

Nesdílíme snahu udělat z mikrobiologických a biochemických testů expeditivní metodu, indikující zatížení půdy v podobě obecných kritických hodnot zátěže půd. Takové obecné hodnoty nebyly nalezeny ani po úsilí německých půdních biologů, připravujících kritéria pro nový německý zákon o půdě (Bo.Sch.Ges. 1998/1999) na úrovni hodnot preventivních, vyplývajících z principu obezřetnosti (Vorsorgewerte). Prosadil se názor, že kritické hodnoty rizik zátěže půd musí být odvozeny specifickými způsoby pro každou transferovou cestu (např. půda – rostlina) z hlediska zootoxicity a ovlivnění potravního řetězce a z hlediska fytotoxicity. Jde o to, ukázat na konkrétním experimentálním materiálu, jaká je míra ovlivnění mikrobiálních společenstev a jejich činnosti rizikovými stopovými prvky.

Nežásadnějším problémem obtíží studia odezvy mikroorganismů na zátěž půd stopovými prvky zůstává:

- možnost srovnání zátěže různých půd pouze po simulované zátěži čistých půd, která však neodpovídá vazbám stopových prvků v půdě,
- obtížnost srovnatelnosti zátěže půd v terénních podmínkách v důsledku specifiky půd, úprav půdních režimů, zátěží půd kombinací prvků a eventuálně i dalších kontaminantů (POP) a specifiky zátěže (antropické, geogenní).

MATERIÁL A METODY

Zkoumaný soubor půd zahrnuje jednak hlavní reprezentanty půd ČR, vyvinuté na substrátech pro ně typických, dále pak půdy různého typu zátěže stopovými prvky.

Pokusy se simulovanou zátěží byly provedeny na černozemi modální (CEm Řepín), luvisemi kyselé (LUa Arnoltice), kambizemi dystrické (KAd Míkulov), kambizemi eutrofní (KAe Malečov), kryptopodzolu modálním (Kpm Zhůří) a kambizemi arenické (KAr Kelské Vinice). Geogenní zátěže se vyskytují u uvedených kambizemí:

- eutrofní (svahoviny čedičů s vysokými obsahy Cr, Ni)
- dystrické (svahoviny rul s vysokým obsahem As, Mn, Pb, Zn)
- arenické (s nízkým obsahem všech prvků)

Se simulovanou zátěží byly realizovány dva pokusy:

- bez úpravy pH při přidání 10 mg.kg^{-1} Cd a 500 mg.kg^{-1} Zn k CEm, LUa, Kpm a KAr a 150 mg.kg^{-1} Ni k KAe,
- bez úpravy pH a s úpravou pH na hodnotu 7 při podání 10 mg.kg^{-1} Cd, 500 mg.kg^{-1} Zn, 200 mg.kg^{-1} Cu a 20 mg.kg^{-1} Hg k CEm, LUa, KAd, KAr a Kpm.

Veškeré kovy pro simulaci byly dodávány ve formě chloridů.

Dále bylo provedeno srovnávací studium odezvy společenstev mikroorganismů a jejich aktivity na zátěž půd

vzniklou v přírodních podmínkách (bez simulace, bez úpravy pH) u půd:

- s antropickou zátěží v Praze-Roztyly (Pb, Cu, Zn)
- s antropogenní zátěží Cd v severočeském regionu (kambizem modální Chlumec)
- s antropogenní zátěží Cd a s geogenní zátěží ze svahovin kyselých hornin
 - As, Pb, Zn, Mn (kambizem dystrická KAd, Malečov)
 - Pb, Zn (kambizem modální KAm, Brandov)
- s geogenní zátěží Ni a Cr (kambizem eutrofní ze svahovin čedičů, Malečov)
- s fluvialní antropickou zátěží Cd, Zn, Pb, Cu (Cr, Mn, As) (fluvizemě Píšťany a Litávka)

Všechny půdy pro mikrobiologické a biochemické testy byly odebrány z Ap horizontu v měsíci dubnu. Směsné vzorky (pět samostatných odběrů z plochy 200 m^2) byly preinkubovány po dobu čtyř týdnů při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ při udržování vlhkosti na 60 % MKVK. Každý test byl založen ve třech opakováních a uváděné hodnoty jsou jejich průměrem. Nejistoty měření se pohybují u mikrobiologických testů v rozmezí 25 až 30 % a biochemických testů v rozmezí 20 až 25 %. Počty mikroorganismů byly stanoveny deskovými zředovacími metodami (Filip, 1994). Celkový počet bakterií (kolonie tvořících jednotek) byl určen na živném masopeptonovém agaru (ŽA), oligotrofní bakterie na téměř médium 100krát zředěném, aktinomycety na glycín-glycerinovém agaru, mikromycety na Martinově agaru s bengálskou červení a streptomycinem a azotobakter (volně žijící bakterie poutající dusík) na Ashbyho agaru. C biomasy byl stanoven fumigačně extrakční metodou (ISO 14240-2), produkce CO_2 po 48h inkubací titrační metodou (Stotzky, 1965). Pro stanovení dehydrogenáz byla využita redukce 2,3,5 triphenyltetrazoliumchloridu (TTC) na triphenylformazan (TPF). Nitrifikace, amonizace a mineralizace byly stanoveny po 30denní inkubaci (při $28 \text{ }^\circ\text{C}$ a udržování stálé vlhkosti) extrakcí 1M KCl (ISO 14238) a průtokovou analýzou se spektrometrickou detekcí. Pro určení potenciální mineralizace byla ke vzorku přidána vojtěšková moučka v množství $0,25 \text{ g}$ moučky na 10 g půdy, což odpovídá 500 mg organického N na 1 kg půdy. Potenciální mineralizace je definována jako rozdíl minerálního N na začátku a konci inkubace s přidavkem vojtěšky. Minerální N je vyjádřen jako suma amoniakálního a dusičnanového N, neboť hodnota dusitanového N je zanedbatelná. Potenciální nitrifikace je v tabulkách označována jako rozdíl obsahu N-NO_3 po 30denní inkubaci a hodnoty aktuální, tj. před inkubací. V tomto případě nebyl přidáván žádný zdroj organického N. Aktuální stav je v dalším textu označován jako bazální.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Mikrobiologické a biochemické testy s půdami kontaminovanými v přírodních podmínkách, a to buď antropogenně či geogenně (tab. I), prokázaly rozdílnost

	Lokalita ¹	Půda ²	Kontaminace ³	pH	C _{ex} (%)	Mikrobiální testy ⁴ (KTJ)					Dehydrogenázy ⁹ (mg TPF.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	C biomasy ¹⁰ (mg.kg ⁻¹)	Nitrifikace ¹¹ (mg.kg ⁻¹)			
						Bakterie živný agar ⁵ 10 ⁶	Aktinomyceety ⁶ 10 ⁴	Plísně ⁷ 10 ³	Oligotrofní bakterie ⁸ 10 ⁶	Azotobacter 10 ⁷			aktuální ¹² N:NO ₃	po inkubaci ¹³ N:NO ₃ *	po mineralizaci ¹⁴ N:NO ₃ *	potenciální nitrifikace ¹⁵ N:NO ₃ *
1	Brandov	KAm	G,A	5,3	3,0	127	1,4	2,1	78	979	14	224	10,1	113	105	103
2	Chlumec	KAm	A	6,8	2,1	251	16,7	7,0	57	842	25	332	119	156	388	37,0
3	Mikulov	KAd	G,A	4,0	4,3	4	2,6	2,6	77	1085	4	226	7,7	1,9	16,5	-5,8
4	Příšřany	FLm	A	6,8	3,6	159	1,5	3,0	54	417	14	288	30,4	209	715	179
5	Roztyly	AN	A	6,1	4,4	88	9,9	15,6	156	2411	99	545	28,1	115	490	86,8
6	Malečov	KAe	G	5,3	2,0	29	0,7	4,0	45	255	5	109	14,1	77,4	319	63,4
7	Litávka	FLm	A	5,2	5,2	76	1,0	0,2	102	41	10	405	7,2	78,9	68,7	71,6

KTJ = počty jednotek tvořících kolonie – CFU = colony forming units

* 30denní inkubace – 30 days incubation

¹site, ²soil, ³contamination, ⁴microbial tests, ⁵bacteria nutritive agar, ⁶actinomycetes, ⁷micromycetes, ⁸oligotrophic bacteria, ⁹dehydrogenases, ¹⁰microbial biomass C, ¹¹nitrification, ¹²actual, ¹³after incubation, ¹⁴after mineralization, ¹⁵nitrification potential

KAm = orthic (eutric) Cambisol

KAd = dystic Cambisol

FLm = orthic Fluvisol

KAe = eutrophic Cambisol

v počtech jednotek tvořících kolonie u sledovaných půd. Nejnižší počty plísní a azotobaktera byly zjištěny na silně kontaminované (Cd, Zn, Mn, Pb, Cu, As) fluvizemi (tab. II) na lokalitě Litávka. Tato lokalita se vyznačuje nízkou půdní aciditou, vysokým obsahem humusu nízké kvality, a především vysokou relativní mobilitou rizikových prvků. Dále bylo zjištěno výrazné snížení bakterií na ŽA na kambizemi dystrické na lokalitě Mikulov s antropogenní zátěží Cd a s geogenní zátěží As a Zn. Tato půda se vyznačuje nejvyšší hodnou pH z celého sledovaného souboru půd. Nejvyšší počty oligotrofních bakterií a aktinomycet a nízký počet bakterií na ŽA vykazovala kambizem eutrofní na lokalitě Malečov s geogenní zátěží Cr a Ni a nízkou hodnotou pH. U posledně jmenovaných půd byla zjištěna kombinace negativních odezev v aktivitě dehydrogenáz a v množství biomasy C. V ukazatelích chování N projevujících se nízkou bazální nitrifikací, nitrifikací po inkubaci, nízkou nitrifikací po mineralizaci a nízkou či dokonce zápornou potenciální nitrifikací se vyazuje fluvizem na lokalitě Litávka a kambizem dystrická na lokalitě Mikulov. Společným znakem těchto půd je zvýšený obsah mobilních specií Cd, Zn, Ni a Mn. Z údajů o ostatních půdách je zřejmé (tab. II), že geogenní zátěže samy o sobě se neprokazují svým vlivem na půdní mikroorganismy a jejich činnost, neboť jsou doprovázeny nízkou efektivní mobilitou stopových prvků. Ale ani výrazně zatížená fluvizem z Příšřan s neutrální půdní reakcí nevykazuje deprese ani v počtech, ani v činnosti půdních mikroorganismů. Přes podrobné informace o typu půd, výši zátěže, původu

zátěže a relativní mobilitě mobilních a potenciálně mobilních specií je velice obtížné získané výsledky generalizovat.

Sledování různě zatížených půd z terénních odběrů naráží na podstatný problém srovnávacího vzorku nezatíženého, resp. s definovanou geogenní zátěží jedním prvkem. Obtížnost je dána nejen zátěží mnoha škodlivin (včetně organických), ale i vlastnostmi ovlivňujícími mobilitu stopových prvků.

Tyto poznatky vedly k návratu k testování simulované zátěže rozdílných půd (tab. III). Použití geneticky a substrátově odlišných půd ukázalo opět rozdíly v zastoupení mikroorganismů a v jejich činnosti, dané půdou.

Kontrolní nekontaminované vzorky ukazují v prvním pokusu rozdíly mezi půdami, zejména v KTJ bakterií na živném agaru a v počtu oligotrofních bakterií, a to v sledu CEm a KAe > KpM > KAa > LUa. Bylo nalezeno významně snížený počet azotobaktera u luvizemě kyselé a extrémně vysoký obsah plísní u kryptopodzolu. O specifice v zastoupení určitých skupin mikroorganismů v půdách, tedy o jakémsi pozadí této charakteristiky, publikoval údaje Mišustin (1983). Podle nich se od sebe liší i počty mikroorganismů a zastoupení některých druhů mezi půdami s odlišnými termickými režimy, kde jejich činnost je bržděna po větší část roku (kryosoly a kalci-soly). Výrazně se pak liší tyto ukazatele mezi půdami s rozdílným trofismem – např. mezi černozeměmi a podzoly (resp. luvizeměmi). Významnější vliv zatížení stopovými prvky se v našem pokusu projevuje snížením počtu bakterií, aktinomycet a azotobaktera vlivem Zn u nej-

II. Zatížení půd rizikovými prvky a jejich relativní mobilita – Soil loads by hazardous substances and their relative mobilities

Lokalita ¹	Půda ²	pH	C _{ox}	Specie ³	Mn	Cd	Zn	Ni	Pb	Cu	Cr	As
Mikulov	KAd	4,0	4,3	TO	2170	1,26	241	42,9	119	47,7	57,2	1540
				ED/TO	20,4	43,0	13,9	32,0	44,24	40,8	0,38	1,15
				MC/TO	1,57	3,43	0,64	1,20	0,06	0,20	0,02	0,02
				MN/TO	1,00	6,10	0,63	0,71	0,08	0,52	0,03	0,04
Brandov	KAa	5,3	3,0	TO	655	0,69	219	18,5	191	115	44,5	50,4
				ED/TO	24,6	35,4	10,4	4,14	60,7	48,8	0,46	3,09
				MC/TO	1,90	1,84	0,14	0,28	0,06	0,31	0,02	0,10
				MN/TO	0,26	3,86	0,39	0,11	0,05	0,65	0,02	0,08
Chlumeč	KAm	6,8	2,1	TO	691	0,67	146	34,8	48,1	33,7	82,7	27,9
				ED/TO	43,7	60,4	32,5	38,2	57,1	24,1	0,46	3,96
				MC/TO	0,67	1,06	0,12	0,19	0,10	0,28	0,02	0,59
				MN/TO	0,35	1,49	0,05	0,07	0,21	0,22	0,01	0,23
Malečov	KAe	5,3	2,0	TO	1123	0,45	102	48,6	30,1	27,3	214	11,2
				ED/TO	20,0	30,4	23,4	20,7	38,8	21,5	0,22	11,0
				MC/TO	0,10	1,11	0,05	0,12	0,17	0,22	0,01	0,36
				MN/TO	0,11	0,80	0,02	0,05	0,33	0,21	0,00	0,25
Příšťany	FLm	6,8	3,6	TO	1259	2,73	604	42,5	109	94,2	546	25,4
				ED/TO	58,6	29,3	67,0	54,0	89,3	67,9	0,75	20,5
				MC/TO	0,13	0,91	0,08	0,20	0,13	0,42	0,01	0,22
				MN/TO	0,15	1,71	0,09	0,05	0,09	0,72	0,01	0,47
Litávka	FLm	5,2	5,2	TO	6187	47,4	5451	31,8	2340	114	74,3	447
				ED/TO	22,5	96,0	55,6	31,4	81,6	75,0	0,69	77,8
				MC/TO	1,87	19,2	8,89	3,84	0,03	0,16	0,01	0,03
				MN/TO	1,96	15,2	9,59	3,77	0,08	0,12	0,01	0,01

TO = celkový obsah rizikových prvků – total content of hazardous elements (mg.kg⁻¹)

ED = extrakt 0,025M Na₂EDTA – extractable in 0,025M Na₂EDTA

MC = extrakt 0,01M CaCl₂ – extractable in 0,01M CaCl₂

MN = extrakt 1M NH₄NO₃ – extractable in 1M NH₄NO₃

C_{ox} = oxidovatelný C – oxidizable C (%)

poměrné hodnoty v % – ratio of values in %

KAd = dystic Cambisol

KAa = acid Cambisol

KAm = orthic (eutric) Cambisol

KAe = eutrophic Cambisol

FLm = orthic Fluvisol

¹site, ²soil, ³species

kyselejších ze sledovaných půd – luvizemě kyselá (lokalita Arnoltice). U této půdy vyvolává Zn rozmnožení plísni a oligotrofních bakterií.

Specifika půd se odráží rovněž ve výsledcích biochemických testů (tab. III). Nejvýrazněji je patrná v ovlivnění činnosti dehydrogenáz a potenciálu respirace po přidání vojtěšky. Uvedené testy indikují tento sled ubývající aktivity půd: CEm > Kpm, KAe > LUa, KAR. Respirace po přidání glukózy je potlačena u KAR a LUa z nedostatku N. Kontaminace Zn se projevuje obecně snížením činnosti dehydrogenáz a depresí respirace po přidání vojtěšky u všech půd. Jak Zn, tak i Cd vyvolaly depresi respirace po přidání glukózy u KAR.

Mezi zkoumanými půdami nalézáme rozdíly v režimu N (tab. III). Při minimálních rozdílech mezi aktuálními obsahy N-NH₄⁺ a obsahy N-NH₄⁺ po inkubaci u všech půd je třeba interpretovat výrazné rozdíly v N-NO₃⁻ jako výsledky výrazné nitrifikace. Nejvyšší hodnoty bazální

i potenciální nitrifikace u Kpm je možné vysvětlit optimalizací teplotního režimu u půdy při vysoké účasti mobilních organických látek.

U KAR a LUa dochází vlivem Zn k potlačení nitrifikace, jak je patrné ze zvýšených hodnot N-NH₄⁺ a snížení N-NO₃⁻ hodnot. Vysoké obsahy aktuálního N-NH₄⁺ jsou u těchto půd vyvolány dlouhodobým narušením dusíkatého cyklu přítomnosti Zn v půdách. Tyto poznatky potvrzují velice nízké, u KAR dokonce záporné hodnoty potenciální nitrifikace. Tab. III a IV svědčí o skutečnosti, že Zn se uplatňuje v relaci jeho relativní mobility (100×MC/TO, MC – mobilní frakce v 0,01M CaCl₂, TO – celkový obsah): KAR 61 %, LUa 57 %, Kpm 10 %, CEm 0,8 %. Kontaminace Cd ovlivnila nevýrazně počet některých mikroorganismů u půdy s největší zranitelností, s nejvyšší relativní mobilitou 29 % (LuA).

Vliv Cd na režim N není ve srovnání se Zn tak výrazný, naopak jeho působení vyvolávalo u všech

III. Mikrobiologické a biochemické testy; půdy se simulovanou zátěží Cd, Zn a Ni (pokus č. 1) – Microbiological and biochemical tests; soils with a simulated pollution with Cd, Zn and Ni (experiment No. 1)

	Půda ¹	Lokalita ²	Kontaminace ³	pH	Mikrobiální testy ⁴ (KTJ)					Biochemie ⁹				pH	Amonizace ¹³ (mg N-NH ₄ ⁺ .kg ⁻¹)			Celková mineralizace ¹⁷ N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₃ ⁻ (mg.kg ⁻¹)	Nitrifikace ¹⁸ (mg N-NO ₃ ⁻ .kg ⁻¹)			
					bakterie živný agar ⁵ 10 ⁶	aktinomycety ⁶ 10 ⁴	plísně ⁷ 10 ⁴	oligotrofní bakterie ⁸ 10 ⁶	Azotobacter 10 ²	dehydrogenázy ¹⁰ (mg TPF.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	C biomasy ¹¹ (mg.kg ⁻¹)	respirace ¹² *	resprace**		aktuální ¹⁴	po inkubaci ¹⁵	po mineralizaci ¹⁶ *		aktuální	po inkubaci	po mineralizaci*	potenciální nitrifikace ¹⁹ N-NO ₃ ⁻
1	CEm	Řepín	0	6,8	18	195	2	48	505	62	274	31,2	35,6	6,9	0,97	0,12	320	1293	25,9	37,2	1000	11,3
2			Cd	22	167	6	46	285	51	276	29,4	30,4			1,36	0,25	58,6	1616	20,2	35,0	1580	14,9
3			Zn	21	30	3	33	395	39	243	26,3	30,3			0,99	0,12	526	1288	21,6	32,5	784	10,9
4	KAr	Kelské Vinice	0	6,0	10	242	7	28	889	20	98	27,3	6,2	6,0	0,44	1,21	68,1	508	27,3	37,9	468	10,5
5			Cd	9	207	5	19	116	21	68	26,3	3,9			0,98	0,98	59,1	644	25,1	36,8	611	11,7
6			Zn	8	137	7	25	846	5,5	53	16,5	3,1			11,7	15,4	555	531	12,0	4,8	0,6	-7,1
7	KPm	Zhůří	0	5,2	11	269	159	33	388	48	441	31,8	22,4	5,3	5,03	9,0	138	3216	457	1993	3540	1536
8			Cd	15	176	134	57	253	63	426	31,8	21,6			3,38	6,5	539	2489	430	2083	2383	1653
9			Zn	30	225	117	65	345	38	452	26,2	21,2			22	10,5	91,0	3138	356	2025	3425	1669
10	LUa	Arnoltice	0	4,3	6	201	4	10	136	25	286	23,8	7,3	4,3	0,12	1,06	528	2415	52,7	77,0	1941	24,2
11			Cd	2	103	3	4	151	24	233	22,9	7,5			1,93	0,97	520	2573	31,6	74,5	2087	42,9
12			Zn	1	87	5	28	23	11	244	12,2	7,2			15,4	15,6	978	1531	50,6	55,3	619	4,7
13	KAe	Křemýž	0	6,2	12	499	8	31	355	35	767	32,2	33,7	6,2	1,31	0,39	460	2792	286	1255	2619	969
14			Ni	28	398	10	51	317	28	820	30,2	35,5			1,28	0,67	307	2813	311	1369	2819	1058

inkubace a mineralizace 30 dní – 30 days of incubation and mineralization

KTJ = počty jednotek tvořících kolonie – CFU = colony forming units

* přidavek vojtěšky – addition of lucerne meal (mg.CO₂.100 g⁻¹.h⁻¹)** přidavek glukózy – addition of glucose (mg.CO₂.100 g⁻¹.h⁻¹)

CEm = calcic Chernozem

KAr = arenic Cambisol

KPm = cambic Podzol

LUa = glossalbic Luvisol

KAe = eutrophic Cambisol

¹soil, ²site, ³contamination, ⁴microbiological tests, ⁵bacteria nutritive agar, ⁶actinomycetes, ⁷micromycetes, ⁸oligotrophic bacteria, ⁹biochemistry, ¹⁰dehydrogenases, ¹¹microbial biomass C, ¹²respiration, ¹³ammonization, ¹⁴actual, ¹⁵after incubation, ¹⁶after mineralization, ¹⁷total mineralization, ¹⁸nitrification, ¹⁹nitrification potential

	Půda ¹	CEm		KPM		LUa		KAr	
		0	+10	0	+10	0	+10	0	+10
Cd	TO	0,33	13,04	0,43	12,96	0,31	12,85	0,29	11,22
	ED	0,14	13,10	0,15	9,28	0,12	10,66	0,04	7,03
	MC	0,001	0,044	0,004	0,563	0,034	3,710	0,090	1,00
	ED/TO	42,4	100	34,9	71,6	38,7	82,9	13,8	62,6
	MC/TO	0,30	0,34	0,93	4,3	11,0	28,9	31,0	8,91
			0	+500	0	+500	0	+500	0
Zn	TO	64	607	68	536	50	502	17	589
	ED	15	327	4	347	4	482	3	293
	MC	0,14	2,63	0,25	54	1,28	258	0,68	179
	ED/TO	23,4	53,9	5,9	64,7	8,0	96,0	17,6	49,7
	MC/TO	0,22	0,80	0,37	10,1	2,6	56,8	4,0	61,1
			0	+500	0	+500	0	+500	0

¹soil

CEm = calcic Chernozem
KPM = cambic Podzol

LUa = glossalbic Luvisol
KAr = arenic Cambisol

sledovaných půd mírné zvýšení potenciální nitrifikace. Dušek (1995) tento jev vysvětluje nárůstem lehce přístupných živin pro půdní mikroorganismy, které v půdě vznikly usmrcením senzitivních druhů vlivem Cd.

Ani kontaminace KAe ze svahovin čedičů se zvýšeným geogenním obsahem kolem 50 mg.kg⁻¹ Ni dávkou 150 mg.kg⁻¹ Ni v podobě rozpustné soli nevedla k depresi biologické činnosti půdy. Zvýšila rozpustnost Ni (100×MC/TO) z 0,24 % na 0,63 %. Svědčí to o vysoké odolnosti této půdy vůči Ni (o nízké zranitelnosti Ni).

Veškeré dosud uvedené případy potvrzují výsledky dřívější práce (Němeček et al., 1998), že Zn má výrazný vliv na mikroorganismy v pořadí zranitelnosti půdy tímto prvkem, určené vazbami Zn v jednotlivých půdách.

Druhý pokus se simulovanou zátěží byl rozšířen o varianty kontaminované Cu a Hg, o variantu s úpravou půdní reakce na pH 7 a o kambizem dystrickou s geogenní zátěží.

Na základě výsledků druhého pokusu (tab. V) můžeme opět konstatovat specifické jevy půdních jednotek v počtu mikroorganismů. Podle počtu bakterií (na živném agaru) lze půdy seřadit takto: CEm > KAd, KPM > LUa > KPr. Nejcitlivěji reaguje azotobakter v pořadí: CEm, KAr, KAd, LUa a KPM. Oligotrofní bakterie vykazují toto pořadí četnosti podle pH: KAd > LUa > KPM > KAr, CEm, aktinomycety ve sledu: KPM > CEm > KAr > KAd > LUa.

Vápnění nejvýrazněji ovlivňuje počty bakterií (živný agar) u kyselých a okyselených půd (LUa a KAd). Následují KPM a KAr. Počty (KTJ) oligotrofních bakterií jsou maximálně ovlivněny (stoupání obsahu) u KAd a LUa, zřejmě mobilizací mobilních organických látek. Počty aktinomycet rovněž maximálně stoupají po vápnění u kyselých půd (LUa, KPM a KAd).

Na přidání stopových prvků reagují v tomto pokusu stresem půdní organismy, hlavně po přidání Cu a Zn u LUa a KAr, po přidání Zn i CEm. K tomuto efektu nedochází

u KAd a KPM, vyznačujících se výraznějším poutáním Zn i Cu do pevnějších vazeb. U vápněných variant je tento stres do značné míry potlačen u LUa. U KAd a KPM se objevuje deprese po aplikaci Cd, která zřejmě souvisí s vytěsněním Cd ze sorpčního komplexu. Zajímavé je výrazné zvýšení počtu KTJ u všech sledovaných mikrobiálních skupin po aplikaci HgCl₂, což je v naprosté shodě s poznatky, které získali Maliszewska et al. (1985). Je to zřejmě způsobeno selektivním potlačením určitých druhů, což umožňuje růst jiných rezistentních druhů. Nejvýraznější je toto zvýšení u oligotrofních bakterií u KAd a KPM u bakterií na ŽA a azotobaktera u LUa.

Činnost dehydrogenáz a biomasa C (tab. VI) jsou diferencovány takto: KPd, KPM > CEm > LUa > KAr. Potenciální respirace sleduje pořadí: CEm > KAd, KPM > LUa > KAr. Nejnížší hodnoty vykazují LUa a KAr. V bilanci přeměn N se mezi půdami vyznačuje CEm omezenou bazální mineralizací následovanou nitrifikací a vysokou potenciální mineralizací, následovanou vysokou nitrifikací. Je to důsledek systému s příznivou půdní reakcí, biologickou činností a vysokou stabilitou organických látek. U LUa a KAd zjišťujeme výraznou bazální mineralizaci při omezené nitrifikaci, zejména potenciální. KPM je charakterizována omezenou mineralizací, ale vysokou potenciální nitrifikací. KAr se vyznačuje nízkou mineralizací a nitrifikací. Nejnázorněji je vliv jednotlivých rizikových prvků na režim N vyjádřen podílem (%) N-NH₄⁺ v potenciální mineralizaci N po přidání vojtěšky (tab. VII). Tento podíl, odrážející do značné míry inhibici nitrifikace, závisí obecně na pH (nezatížená půda, zátěž Cd). U Cu a Hg je tento vztah modifikován mezi LUa a KAd vzhledem k možnosti vytvoření pevnějších vazeb těchto prvků u KAd. U Zn se ve schopnosti inhibovat nitrifikaci přidává vedle pH absence koloidů a na přední místo se dostává (spolu s KAd

V. Mikrobiologické testy půd se simulovanou kontaminací Cd, Zn, Cu, Hg (KTJ) – Microbiological tests of soils with simulated pollution with Cd, Zn, Cu, Hg (CFU)

Půda ¹	Kontaminace ²	Bez úpravy ³ pH					Po úpravě ⁹ pH (7,0)				
		bakterie ⁴		<i>Azotobacter</i> 10 ³	aktinomycety ⁷ 10 ⁵	plísňe ⁸ 10 ⁵	bakterie		<i>Azotobacter</i> 10 ³	aktinomycety 10 ⁵	plísňe 10 ⁵
		živný agar ⁵ 10 ⁵	oligotrofní ⁶ 10 ⁵				živný agar 10 ⁵	oligotrofní 10 ⁵			
CEm Řepín pH = 6,8	0	195	92	92	70	54	195	92	92	70	54
	Cd	110	100	80	80	58	110	100	80	80	58
	Zn	50	47	71	38	10	50	47	71	38	10
	Cu	240	121	75	131	82	240	121	75	131	82
	Hg	260	101	146	184	133	260	101	146	184	33
LUa Arnoltice pH = 4,3	0	65	225	14	25	100	420	455	64	850	58
	Cd	45	240	10	55	62	750	775	10	55	62
	Zn	30	700	2	20	115	490	1410	2	20	115
	Cu	35	475	4	100	55	275	1600	4	100	55
	Hg	320	410	129	255	106	670	620	129	255	106
KAd Mikulov pH = 4,0	0	135	300	25	50	129	220	3750	40	113	111
	Cd	100	200	61	55	119	200	6950	50	73	119
	Zn	100	150	14	63	109	140	4050	14	63	109
	Cu	160	300	15	66	109	170	3650	15	66	109
	Hg	80	1100	150	96	86	150	1450	150	96	86
Kpm Zhůří pH = 5,2	0	135	115	15	108	28	101	84	17	108	33
	Cd	66	128	7	90	22	112	102	25	130	26
	Zn	185	216	7	145	32	100	212	31	166	23
	Cu	61	219	11	117	26	130	173	23	111	27
	Hg	452	1065	34	102	25	790	1375	54	227	38
KAr Kelské Vinice pH = 6,0	0	50	86	40	65	58	74	81	50	90	59
	Cd	58	56	43	37	36	70	75	57	70	40
	Zn	30	21	7	17	29	53	72	34	49	52
	Cu	16	27	7	5	29	31	33	11	18	59
	Hg	136	153	88	153	30	226	234	87	188	37

KTJ = počty jednotek tvořících kolonie – CFU = colony forming units

¹soil, ²contamination, ³without regulation, ⁴bacteria, ⁵nutritive agar, ⁶oligotrophic, ⁷actinomycetes, ⁸micromycetes, ⁹after regulation

CEm = calcic Chernozem

LUa = glossalbic Luvisol

KAd = dystic Cambisol

Kpm = cambic Podzol

KAr = arenic Cambisol

VI. Biochemické testy půd se simulovanou kontaminací Cd, Zn, Cu, Hg (přepočteno na sušinu) – Biochemical tests of soils with simulated contamination with Cd, Zn, Cu, Hg (in d.w.)

Půda ¹	Kontaminace ²	Bez úpravy ³ pH								Po úpravě ¹⁰ pH							
		dehydrogenázy ⁴ (mg TPFG ⁻¹ .d ⁻¹)	potenciální respirace ⁵ (mg CO ₂ -100 g ⁻¹ .h ⁻¹)	C biomasy ⁶ (mg.kg ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ po inkubaci ⁷ (mg.kg ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ po mineralizaci ⁸ (mg.kg ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ po inkubaci (mg.kg ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ po mineralizaci (mg.kg ⁻¹)	% N-NH ₄ ⁺ v celkové mineralizaci ⁹	dehydrogenázy (mg TPFG ⁻¹ .d ⁻¹)	potenciální respirace (mg CO ₂ -100 g ⁻¹ .h ⁻¹)	C biomasy (mg.kg ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ po inkubaci (mg.kg ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ po mineralizaci (mg.kg ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ po inkubaci (mg.kg ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ po mineralizaci (mg.kg ⁻¹)	% N-NH ₄ ⁺ v celkové mineralizaci
CEm Řepín pH = 6,8	0	48	21	238	0,20	2,37	220	938	0,3	48	21	238	938	0,20	2,37	220	0,3
	Cd	56	25	138	0,81	2,63	267	697	0,4	56	25	138	697	0,81	2,63	267	0,4
	Zn	36	11	115	0,69	18,9	239	610	3,0	36	10	115	610	0,69	19	239	3,0
	Cu	36	14	238	1,31	1,55	263	619	0,3	36	14	238	619	1,31	1,6	263	0,3
	Hg	30	19	84	0,17	0,89	289	527	0,2	30	19	84	527	0,17	0,89	289	0,2
LUa Arnoltice pH = 4,3	0	19	9	132	64	169	243	217	44	33	7,1	-	241	3,2	0,55	298	0,2
	Cd	21	9	158	58	144	180	221	39	51	7,6	-	212	2,4	0,7	307	0,3
	Zn	14	10	144	97	146	87	60	71	21	8,5	-	139	3,7	82,1	239	37,1
	Cu	9	8	148	94	307	87	104	75	19	8,2	-	172	1,3	8,1	241	4,5
	Hg	14	8	140	97	268	83	110	71	41	8,2	-	131	65	90	150	40,8
KAd Mikulov pH = 4,0	0	67	16	314	46	271	222	216	56	167	19,2	-	627	4,7	1,9	339	0,3
	Cd	59	15	302	40	263	263	264	50	146	17,0	-	634	5,2	2,3	341	0,4
	Zn	35	15	341	107	658	63	180	78	142	16,3	-	250	4,4	95	289	27,5
	Cu	23	14	262	98	494	143	209	70	93	14,4	-	211	9,3	87	293	29,3
	Hg	42	15	206	89	296	172	224	57	156	16,0	-	270	4,5	3,8	320	1,4
Kpm Zhůří pH = 5,2	0	48	15	302	3,8	152	657	678	18	62	15,6	-	746	4,7	6,6	700	0,9
	Cd	49	14	182	4,1	178	659	654	21	90	18,3	-	777	5,4	3,3	659	0,4
	Zn	43	16	175	103	259	478	483	35	59	17,2	-	812	6,6	8,7	667	1,1
	Cu	27	15	246	7,4	295	800	579	34	26	16,3	-	691	6,1	5,9	746	0,8
	Hg	31	19	270	102	210	563	534	28	53	21,8	-	662	8,4	19,8	700	2,9
KAr Kelské Vinice pH = 6,0	0	14	2,3	70	0,04	3,7	254	202	1,8	12	3,7	-	107	0,04	4,6	235	4,1
	Cd	11	3,0	74	0,04	3,7	272	152	2,4	11	3,7	-	158	0,56	2,3	226	1,4
	Zn	2	1,6	53	86	71	57	22	76,1	7	1,6	-	81	83	13	85	13,8
	Cu	8	1,6	48	1,3	4,3	246	81	5,0	8	1,8	-	133	0,19	2,8	278	2,1
	Hg	11	3,0	40	0,6	4,0	407	57	6,5	10	3,4	-	49	0,04	4,1	367	7,8

inkubace a mineralizace 30 dní – incubation and mineralization 30 days
 mineralizace – přidavek vojtěšky – mineralization – lucerne addition

¹soil, ²contamination, ³without regulation, ⁴dehydrogenases, ⁵potential respiration, ⁶microbial biomass C, ⁷after incubation, ⁸after mineralization, ⁹in the total mineralization, ¹⁰after pH regulation

CEm = calcic Chernozem
 LUa = glosalbic Luvisol
 KAd = dystric Cambisol
 Kpm = cambic Podzol
 KAr = arenic Cambisol

Půda ¹	Lokalita ²	pH	Simulovaná zátěž stopovými prvky ³				
			0	Cd	Zn	Cu	Hg
CEm	Řepín	6,8	0,3	0,4	3,0	0,2	1,8
KAr	Kelské Vinice	6,0	1,8	2,4	76,1	5,0	6,5
KPm	Zhůří	5,2	18,3	21,4	34,9	33,7	28,2
LUa	Arnoltice	4,3	43,7	39,5	70,9	74,7	70,9
KAd	Mikulov	4,0	55,7	49,8	78,5	70,3	56,9

rozdíl sumy N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻ na konci a začátku 30denní inkubace – difference of the sum N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻ at the beginning and at the end of the 30 days incubation

¹soil, ²site, ³simulated pollution with trace elements

CEm = calcic Chernozem

KPm = cambic Podzol

KAd = dystic Cambisol

KAr = arenic Cambisol

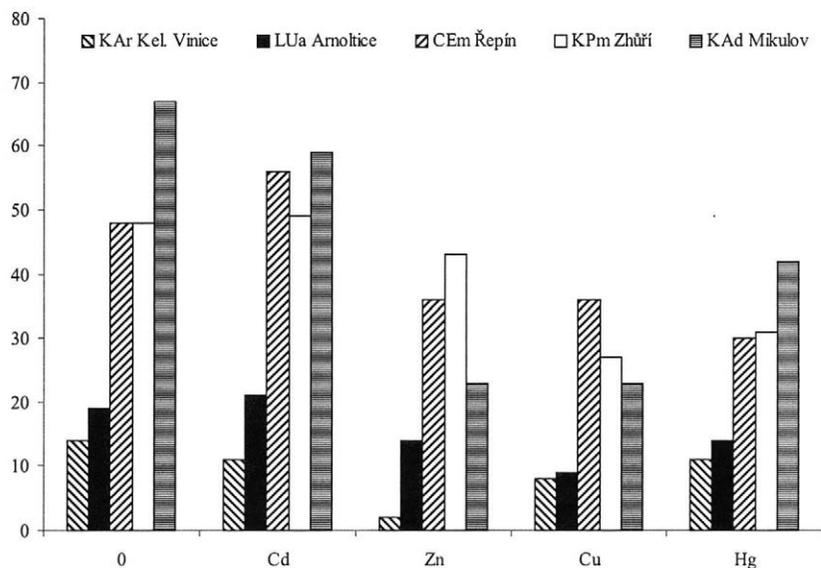
LUa = glossalbic Luvisol

a LUa) lehká půda (KAr) před kyselější KPM s výrazným zastoupením volných oxidů Fe. Černozem představuje stabilní systém, který pufruje dokonale zátěže rizikových prvků.

Ovlivnění biochemických aktivit vápněním se projevuje nejvýznamněji zvýšením aktivity dehydrogenáz, zejména u KAd, v menší míře u KPm a LUa. Potenciální respirace není podstatně ovlivněna.

Simulovaná kontaminace Zn, Cu a většinou i Hg se projevuje vlivem na biochemické aktivity zejména na aktivitu dehydrogenáz (obr. 1). Činnost dehydrogenáz potlačuje hlavně přídavek Zn a Cu, méně přídavek Hg. Odezva na Cd je nevýznamná. Vápnění tento efekt zmírňuje.

Významně jsou stopovými prvky ovlivněny transformační procesy N, a to především nitrifikace. Nejvýrazněji se potlačení bazální i potenciální nitrifikace projevuje u nejkyselějších půd (LUa a KAd). Ke stresu přispívá zejména Zn, Cu a Hg, ale i Cd. Stres je potlačen vápněním. U KPm vyvolal přídavek Zn a Hg snížení bazální a potenciální nitrifikace, přídavek Cu pouze potenciální nitrifikace. Deprese je vyrovnána vápněním. KAr je charakterizována pouze depresí bazální a potenciální nitrifikace vlivem Zn. U ČMm se slabý stres projevuje pouze v potenciální nitrifikaci po přidání Zn. Tyto efekty souhlasí především s pH.



1. Vliv přídavku rizikových prvků na aktivitu dehydrogenáz – Influence of the simulated pollution of trace elements on the activity of dehydrogenases

LITERATURA

- Aoyama M., Nagumo T. (1996): Factors affecting microbial biomass and dehydrogenase activity in apple orchard soils with heavy metals accumulation. *Soil Sci. Pl. Nutr.*, 42: 821–831.
- Aoyama M., Nagumo T. (1997a): Comparison of the effects of Cu, Pb and As on plant residue decomposition, microbial biomass and soil respiration. *Soil Sci. Pl. Nutr.*, 43: 613–622.
- Aoyama M., Nagumo T. (1997b): Effects of heavy metal accumulation in apple orchard soils on microbial biomass and microbial activities. *Soil Sci. Pl. Nutr.*, 43: 601–612.
- Bielek P., Matúšková L. (1998): Biologické vlastnosti znečištěných a neznečištěných půd. *Věd. Práce VÚPÚ Bratislava*, 21: 7–12.
- Brookes P. C. (1995): The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils*, 19: 269–279.
- Dar G. H. (1997): Impact of lead and sewage sludge on soil microbial biomass and carbon and nitrogen mineralization. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 58: 234–240.
- Dušek L. (1995): The effect of cadmium on the activity of nitrifying population in two different grassland soils. *Pl. Soil*, 177: 43–53.
- Filip Z. (1994): Methods of soil analysis for research project Development and evolution of biological methods for the characterisation undisturbed or anthropogenic polluted soils, Langen.
- Chander K., Brookes P. C. (1991): Effects of heavy metals from past application of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam UK soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 927–932.
- Maliszewska W., Dec S., Wierbicka H., Woźniakowska A. (1985): The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil microorganisms. *Envir. Pollut. (Ser. A)*, 37: 195–215.
- Mišustin E. I. (1983): Zony prírody V. V. Dokučajeva i ich otaženije v cenozach počevnyh mikroorganizmov. *Počvovedenje*, 6: 22–38.
- Němeček J., Podlešáková E., Macurová H. (1998): Indikace zátěží půd rizikovými prvky pomocí mikrobiologických a biochemických metod. *Rostl. Výr.*, 40: 409–417.
- Pérez García A., Codina J. C., Cazorla F. M., Vicente A. de (1993): Rapid respirometric toxicity test: Sensitivity to metals. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 50: 703–708.
- Stotzky G. (1965): Microbial respiration. In: Black, Evans, White et al. (eds.): *Methods of soil analysis*. Madison, Wisconsin, USA, Amer. Soc. Agric. Publ.
- Valsecchi G., Gigliotti G., Farini A. (1996): Microbial biomass activity and organic matter accumulation in soil contaminated with heavy metals. *Biol. Fertil. Soils*, 20: 253–259.
- Zvyagintsev D. G., Kurakov A. V., Umarov M. M., Filip Z. (1997): Microbiological and biochemical indicators of lead pollution in Soddy podzolic soil. *Počvovedenje*, 9: 1124–1131.
- ISO 14238 (1997): Stanovení mineralizace dusíku a nitrifikace v půdách a vliv chemikálií na tyto procesy.
- ISO 14240-1 (1997): Stanovení půdní mikrobiální biomasy – respirační metoda.
- ISO 14240-2 (1997): Stanovení půdní mikrobiální biomasy – fumiagačně extrakční metoda.

Došlo 30. 3. 2000

Kontaktní adresa:

Prof. RNDr. Jan Němeček, DrSc., Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: + 420 2 24 38 27 52, fax: + 420 2 20 92 03 12, e-mail: jan.nemecek@af.czu.cz

Česká potravinová legislativa

Soubor české potravinové legislativy ve znění změnových právních předpisů s případnými komentáři, průběžně aktualizovaný v závislosti na vydávání novel nebo nových předpisů, soustředěný v jednom svazku (jako veškerá relevantní legislativa) včetně souvisejících zákonů a prováděcích vyhlášek i s jejich změnami.

Materiál je vydáván formou volných listů formátu A5, které se zakládají do pořadače a v případě změn se vyměňují příslušné listy.

První část obsahuje konsolidované znění tří následujících prováděcích vyhlášek k zákonu o potravinách, jejichž novelty byly vydány v březnu 2000:

- 220/1998 o posuzování shody – s komentářem*
- 326/1997 o zmrazených potravinách*
- 335/1997 o nealkoholických a alkoholických nápojích*

Druhá část obsahuje 6 komoditních vyhlášek novelizovaných v dubnu 2000:

- 327/1997 o mase, rybách, vejcích a výrobcích z nich*
- 328/1997 o mléce a výrobcích*
- 330/1997 o kávě a čaji*
- 332/1997 o ovoci, zelenině, bramborách a houbách a výrobcích z nich*
- 333/1997 o mlýnských, pekařských a cukrářských výrobcích a těstovinách*
- 334/1997 o cukru, medu, cukrovinkách, kakau a čokoládě*

Ve třetí části se předpokládá konsolidované znění zákona 110/1997 Sb., jehož novela se v nejbližší době očekává, v dalších doplňcích budou zpracovány komentáře, ostatní již dříve novelizované potravinové předpisy a předpisy s potravinami související a předpisy, které budou postupně novelizovány.

Cena první části v rozsahu 90 stran 130 Kč

Cena druhé části v rozsahu 190 stran 180 Kč

Cena pořadače (není podmínkou objednávky) 85 Kč

Materiál je možné si objednat na adrese:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
Slezská 7, 120 56 Praha 2
kontaktní osoba: Ing. Suková
tel.: 02/24 25 79 39 I. 223, fax: 02/22 51 40 03
e-mail: vyziva@uzpi.cz
<http://www.uzpi.cz>

RESPONSES OF MYCOFLORA AND SORGHUM TO PRE-PLANTING SOIL INCORPORATION WITH LINURON HERBICIDE

REAKCE MYKOFLÓRY A ČIROKU NA PŘEDSEŤOVÉ OŠETŘENÍ PŮDY HERBICIDEM LINURONEM

H. A. H. Hasan, M. A. Abdel-Sater

Faculty of Science, Assiut University, Egypt

ABSTRACT: The responses of soil fungi and sorghum to pre-planting soil treatment with three doses, 2, 10 and 20 kg a.i./ha, of linuron were studied. The mycoflora was promoted after 1 week of soil treatment, but it was suppressed after long periods especially with the highest dose. Linuron had promotion effect on shoot length and viability of sorghum at zero and long time of soil treatment. Metabolic responses of three common soil-borne fungi to liquid medium treatment with four concentrations, 10, 30, 70 and 100 ppm a.i., of linuron were studied. Mycelial growth, nitrate consumption, extracellular protein and cellulase activity of *Aspergillus flavus*, *Emericella nidulans* and *Nectria haematococca* were promoted by the lower doses and inhibited at the highest one. Ammonia was accumulated in the external medium of all tested fungi at the higher concentrations. *E. nidulans* represents the best degrading fungus to linuron in liquid medium and in soil.

Keywords: soil mycoflora; sorghum; linuron; pre-planting treatment

ABSTRAKT: Sledovali jsme reakci hub v půdě a čiroku na předseťové ošetření půdy třemi dávkami linuronu (2, 10 a 20 kg ú. l./ha). První týden po ošetření byla půdní mykoflóra stimulována, po delším období, zejména u nejvyšší dávky, byla potlačena. Linuron měl stimulační účinek na délku výhonů a životaschopnost čiroku na počátku a po delší době ošetření půdy. Dále jsme sledovali metabolické reakce tří běžných půdních hub v tekutém živném prostředí ve čtyřech koncentracích (10, 30, 70 a 100 ppm ú. l.). Nižší dávky stimulovaly u *Aspergillus flavus*, *Emericella nidulans* a *Nectria haematococca* růst mycelia, spotřebu dusičnanů, mimobuněčné bílkoviny a aktivitu celulázy, zatímco nejvyšší dávka tyto parametry inhibovala. Amoniak se při vyšších koncentracích akumuloval ve vnějším prostředí všech testovaných hub. *E. nidulans* je houbou nejlépe odbourávající linuron v tekutém médiu i v půdě.

Klíčová slova: půdní mykoflóra; čirok; linuron; předseťové ošetření

INTRODUCTION

Herbicides are chemicals introduced into the soil through pre-sowing, pre-emergence and post-emergence treatments. They may alter the soil flora and may even affect the other microbial processes adversely or otherwise (Deshmukh, Shrikhande, 1974).

Linuron, 3-(3-4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methyl urea, is used as a pre-planting and pre-emergence herbicide against annual gramineous and dicotyledonous weeds at a rate of 4 kg of the formulation (2 kg a.i.) per hectare (Gruzdjev et al., 1983). It significantly reduced cotton wilt incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vas-infectum* and inhibited the activity of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in soil (El-Khadem, Papavizas, 1984; Radke, Grau, 1986).

Very little attention has been devoted to the problem of physiological effects of linuron on specific crops and soil-borne fungi. Thus, the aim of this work was to in-

vestigate the physiological and ecological responses of soil fungi and sorghum, to pre-planting soil treatment with different levels of linuron. Also, the effect of linuron on metabolic activities of three common soil fungi in liquid medium and their ability to degrade it in soil were studied.

MATERIAL AND METHODS

The soil was collected from the Botanical Garden at Assiut University and transferred to the laboratory. Soil samples were placed in polyethylene bags and thoroughly mixed with three doses of linuron (2, 10 and 20 kg a.i./ha). The water content of the soil was adjusted to 25% of its water holding capacity. Treatments were set up in duplicates and incubated at 28 °C for 10 weeks. Water lost through evaporation was compensated weekly.

Determination of soil mycoflora: After 1, 3, 5, 7 and 10 week intervals, soil samples were taken for assaying the soil fungi by the dilution-plate method of Johnson, Curl (1972). Modified-Czapek's agar medium in which 3% sucrose was substituted with 1% glucose was used.

Germination of grains: Sorghum grains were planted in plastic pots, at zero time and 10 weeks of soil treatment. The pots were irrigated with tap water enough to keep the water content in soil at 60% of the holding capacity. The pots were incubated in dark at 28 °C for 6 days. The length of shoot system and percentage of germination were assayed for each treatment. The method described by Nelson (1944) and modified by Naguib (1965) was used for determination of water-soluble reducing sugars.

Metabolic activity of common soil fungi: Three species commonly isolated in the current work (*A. flavus*, *E. nidulans* and *N. haematococca*) were used to study the effect of linuron on their activities. 25 ml of cellulose-Czapek's liquid medium (g/l: carboxymethyl cellulose, 10; KNO₃, 4; KH₂PO₄, 1; KCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5) were dispensed in 100 ml Erlenmeyer conical flask. After autoclaving, linuron was added to give final concentrations of 10, 30, 70 and 100 ppm a.i. A concentration of 10 ppm is equivalent to the recommended dose of 2 kg/ha. Flasks were inoculated with 1 ml of spore suspension from 7-day old cultures of tested fungi and incubated as submerged cultures on a rotatory shaker (150 r.p.m.) at 28 °C for 7 days. Mycelium was collected on Whatman filter paper No. 1, washed with distilled water, dried at 80 °C for 24 h and used for estimation of mycelial dry weight. Culture filtrate was made up to a known volume with distilled water and assayed for cellulase activity, extracellular protein, ammonia and nitrate-nitrogen.

Estimation of nitrate-N: Nitrate was determined using sodium salicylate method modified by Muller, Widemann (1955).

Estimation of ammonia: Nessler's reagent-tetraiodomercuriate from which a yellow-orange complex of oxidimercurammonium iodide is obtained (Baruah, Barthakur, 1997). The intensity of the coloured complex was measured on a spectrophotometer at a wavelength of 410 nm.

Estimation of extracellular protein: Protein was determined according to the method described by Lowry et al. (1951).

Estimation of cellulase activity: Endo- β -1,4-glucanase (C_x enzyme) activity was assayed according to the method described by Nelson (1944) and modified by Naguib (1965).

Biodegradation of linuron in soil: *A. flavus*, *E. nidulans* and *N. haematococca* were cultured in Petri-dishes for 2 weeks on Czapek's agar medium in the presence of 10 ppm linuron for fungal adaptation. The adapted cultures were used for linuron degradation in soil. The soil was air-dried, passed through a 4mm sieve and each of 100 g of nonsterile soil was packed in polyethylene

bags. The soil was then re-moistened to 20%, to permit good aeration, with sterile distilled water. The following variants were set up in triplicate: soil + linuron (control), soil + linuron + inoculum (test). Linuron was added at 10, 30 and 100 mg a.i./kg soil. The bags were incubated at 25 °C for 1 week. The available ammonia was extracted with 0.2N Na₂SO₄ and determined using Nessler's reagent-tetraiodomercuriate. The NH₃ produced by the fungi in test was compared to the NH₃ produced in the control.

Statistical analysis of the results: Triplicate data of each experiment were analyzed by one way analysis of variance (PC-state computer program).

RESULTS AND DISCUSSION

The selective effect of linuron on soil-borne fungi was investigated at three doses (2, 10 and 20 kg a.i./ha), the lowest one was the recommended dose by the producing company. Linuron induced promotive effect on the total count and counts of *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Emericella nidulans*, *Humicola grisea* and *Nectria haematococca* after 1 week of soil treatment (Tab. I). By proceeding the incubation period, the herbicide exerted promotive effect on: *A. fumigatus* at medium dose after 3 weeks, *H. grisea* at low and medium doses after 5 weeks and *N. haematococca* at high dose after 7 weeks, but inhibited the soil mycoflora after 3, 5, 7 and 10 weeks especially by the highest dose. Previously, Heinonen-Tanski et al. (1986) reported that, linuron increased the total number of microorganisms in soil. But recently, Leach et al. (1991) have suggested that soil application of the linuron selectively inhibited soil microflora.

The results in Tab. II show the effect of pre-planting soil treatment with linuron on shoot length, germination percentage as well as the reducing sugars of sorghum at zero time and after 10 weeks of soil treatment. Shoot length was significantly increased by linuron at zero time and 10 weeks of treatment. Also, the reducing sugars of germinated sorghum seeds increased at zero and long time of soil treatment (Tab. II). However, percentage of germination was decreased by all doses at zero time and by 20 kg a.i. after 10 weeks of treatment. Thus, the viability of sorghum increased by increasing treatment dose of linuron at zero time. But after 10 weeks of soil treatment, this promotion gradually decreased. This may indicate the degradation of linuron and consumption of urea by mycoflora after this time of incorporation. Linuron (10 ppm equivalent 2 kg/ha) was degraded through 1 week in soil especially by *A. flavus*, *E. nidulans* and *N. haematococca* (Fig. 1). This degradation was achieved by measuring the ammonia liberated.

Effect of different concentrations of linuron on metabolic activities of three common fungi (*A. flavus*, *E. nidulans* and *N. haematococca*) in liquid was shown in Tab. III. The mycelial growth was promoted by 10 and 30 ppm a.i. in both *A. flavus* and *N. haematococca*.

I. Counts (colony forming units per mg dry soil) of common fungal genera and species after different periods of soil treatment with three doses of linuron herbicide

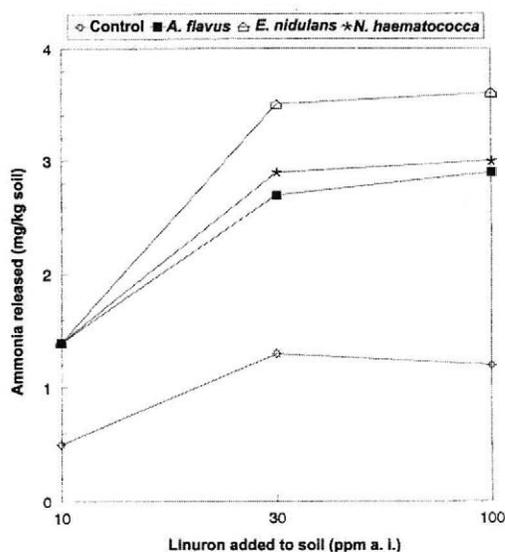
Fungal genera and species	Weeks after treatment																			
	1				3				5				7				10			
	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H	C	L	M	H
Total count	18.6	23.4*	26.4*	34.6*	59.2	34.8*	29.4*	23.4*	55.8	32.4*	24.0*	13.2*	48.6	43.8	38.2*	34.0*	53.4	28.8*	22.6*	17.4*
<i>Aspergillus</i>	10.2	13.2	12.6	14.8	24.6	21.6	18.6*	12.0*	47.4	15.6*	8.4*	6.6*	36.6	28.0*	26.4*	19.6*	36.6	21.6*	16.2*	13.2*
<i>A. flavus</i> Link	0.6	1.2	1.8*	2.2*	3.6	2.4	4.2	1.8*	3.8	5.4	2.4	1.2*	18.6	9.6*	9.2*	8.2*	12.0	4.2*	1.8*	1.2*
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	6.6	5.4	4.2*	3.0*	3.8	2.4	7.2*	3.6	10.0	4.2*	1.2*	1.8*	3.0	3.4	4.2	0.0*	4.2	1.2	8.4	4.8
<i>A. niger</i> V. Tiegh.	0.6	0.6	0.6	1.8*	6.6	8.4	5.4	4.2	6.0	1.8*	1.8*	1.8*	4.8	4.2	4.2	0.0*	4.8	5.4	1.2*	1.8*
<i>A. tamarii</i> Kita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.4	6.6	3.6*	1.2*
<i>A. terreus</i> Thom	2.4	6.0*	6.0*	7.8*	10.0	8.4	1.2*	2.4*	27.0	3.0*	2.4*	1.2*	10.2	10.8	7.6	11.4	7.2	3.6*	1.2*	4.2*
<i>Emericella</i>	4.2	3.0	3.6	4.8	5.4	6.0	3.6*	0.6*	3.0	4.2	3.6	1.2*	1.2	1.2	1.2	1.2	6.6	4.2	1.6*	2.4*
<i>E. nidulans</i> (Eidam) Vuillemin	3.6	1.8	3.0	4.8*	5.4	5.4	3.6*	0.6*	1.2	2.4	2.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	4.2	1.8*	0.6*	1.2*
<i>Humicola grisea</i> Traaen	1.2	4.2*	3.6*	3.6*	10.8	4.3*	3.0*	3.6*	1.8	6.0*	8.4*	1.2	3.0	1.2*	1.0*	0.6*	0.6	0.6	0.0	0.0
<i>Nectria haematococca</i> Berk. & Brown	1.8	0.6	3.6*	4.8*	7.8	1.2*	0.6*	1.8*	1.8	3.0	1.8	3.0	1.8	2.4	3.0	7.2*	3.0	1.8	2.4	1.2*
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	1.2	1.2	0.6*	9.0	9.2	2.4*	3.6*	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i> Thom	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	1.2	1.2	0.6*	7.2	8.6	1.2*	1.2*	-	-	-	-

C = control, L = low dose (2 kg/ha), M = medium dose (10 kg/ha), H = high dose (20 kg/ha); asterisked values mean significant difference from the control

II. Effect of pre-planting soil treatment with different levels of linuron on shoot length, germination percentage and reducing sugar of sorghum

Periods after soil treatment	Doses (kg a.i./ha)	Shoot length (cm)	Percentage of germination	Vigour index	Reducing sugars (mg/g dry seed)
Zero time	0	5.3	100	530.0	66
	2	7.4*	82	606.8*	77*
	10	7.5*	84	630.0*	75
	20	7.8*	85	663.0*	81*
10 weeks	0	4.3	70	301.0	33
	2	5.9*	80	472.0*	43*
	10	4.7*	75	352.5*	40*
	20	4.7*	65	305.5*	33

* significant difference compared to the control



1. Production of ammonia by fungal species after 1 week of soil treatment with linuron at 25 °C

The higher doses (70 and 100 ppm) induced suppressive effect on the three organisms. The consumed nitrate and extracellular protein were also increased with the lower doses but decreased by increasing of linuron concentration. Ammonia exerted in the medium due to linuron degradation or nitrate reduction show significantly increase by the higher doses especially with *E. nidulans*. Previously, Naguib et al. (1982) noticed that the large amount of ammonia nitrogen in patoran media is an indication of failure to incorporate it into organic nitrogen and/or degradation of the mycelial organic nitrogen constituents to simple ammonia.

Linuron increased cellulase activity at 10 ppm in *E. nidulans* and *N. haematococca* and 30 ppm in *A. flavus*.

This indicates the improvement effect of linuron to the soil fertility through hydrolytic process of plant residue. But strongly decreased their synthesis or activity in all tested fungi at 70 and 100 ppm a.i. This result agrees with the finding of Ramanujam et al. (1978) who found that phenyl carbamates strongly decreased cellulose degradation by *Trichoderma viride*, whereas this was corresponding with an inhibition of the enzyme synthesis.

A. flavus, *E. nidulans* and *N. haematococca* were adapted under laboratory conditions in the presence of linuron. The 10 ppm of linuron (contains 2.4 ppm urea) were completely degraded by the fungal species after 1 week of soil treatment (Fig. 1). Increasing concentration of linuron in soil retarded the fungal growth and this

III. Effect of different concentrations of linuron on mycelial growth, nitrogen metabolism and cellulase activity of three fungal species in liquid medium

Fungal species	Doses (ppm a.i.)	Mycelial dry weight (mg/25 ml)	Nitrogen metabolism			Cellulase activity (µg glucose/ml)
			nitrate consumed (mg/25 ml)	ammonia produced (µg/25 ml)	extracellular protein (mg/25 ml)	
<i>Aspergillus flavus</i>	0	126	65.9	14	3.3	85.1
	10	172*	81.0	11	7.2*	87.1
	30	184*	41.3	15	12.0*	110.8*
	70	93*	38.9*	40*	3.0	26.7*
	100	94*	26.0*	38*	2.8	22.7*
<i>Emericella nidulans</i>	0	167	74.3	13	4.3	77.4
	10	136	87.2	19	5.9	93.0*
	30	108*	78.8	25*	5.5	47.2*
	70	89*	36.6*	61*	3.9	36.2*
	100	79*	11.8*	67*	3.2	31.9*
<i>Nectria haematococca</i>	0	125	64.3	11	3.0	113.0
	10	170*	81.0	19	5.3	150.7*
	30	132	83.0	13	4.8	88.0
	70	77*	47.9*	23*	3.1	56.6*
	100	72*	43.4*	34*	2.9	43.7*

* asterisked values mean significant difference from the control

was obvious by retreating its degradation. *E. nidulans* represents the best degrading fungus of linuron in liquid medium and in soil. In this respect, bacteria were able to degrade isoproturon and chlortoluron as urea derivatives (Cernakova, 1995).

As far as we are aware, references indicating the effects of linuron on the metabolism of fungi and sorghum or other plants are not available. The bulk of results obtained in the present study suggests that the recommended rate (2 kg/ha) of linuron might promote the seedling growth of weeds through affecting their metabolic biosynthesis and consequently increasing enzyme activities and metabolism in a way similar to that obtained with sorghum and fungal species. This promotion encourages the use of these adapted fungal species in linuron degradation as well as plant residues in soil.

REFERENCES

- Baruah T. C., Barthakur H. P. (1997): A textbook of soil analysis: soil fertility. Vikas Publ. House: 142–318.
- Cernakova M. (1995): Biological degradation of isoproturon, chlortoluron and fenitrothion. *Folia Microbiol.*, 40: 201–206.
- Deshmukh V. A., Shrikhande J. G. (1974): Effect of pre- and post-emergence treatment of herbicides on soil microflora and two microbial processes. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, 22: 36–42.
- El-Khadem M., Papavizas G. C. (1984): Effect of the herbicides S-ethyl diporpylthio carbamate and linuron on cotton diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Pl. Pathol.*, 33: 411–416.
- Gruzdyev G. S., Zinchenko V. A., Kalinin V. A., Stovtsov R. I. (1983): In: Gruzdyev G. S., Leib G. (eds.): Herbicides urea derivatives, in the chemical protection of plants: 390–401.
- Heinonen-Tanski H., Siltanen H., Kilpi S., Simojoki P., Rosenberg C., Makinen S. (1986): The effect of the annual use of some pesticides on soil microorganisms, pesticide residues in soil and carrot (*Daucus carota*) yields. *Pestic. Sci.*, 17: 135–142.
- Johnson L. F., Curl E. A. (1972): Methods for research on ecology of soil-borne pathogens. Minneapolis, Burgess Publ. Co.
- Leach S. S., Murdoch C. W., Grdon C. (1991): Response of selected soil-borne fungi and bacteria to herbicides utilized in potato crop management system in Maine (USA). *Amer. Potato J.*, 68: 269–278.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 256–275.
- Muller R., Widemann O. (1955): Die Bestimmung des Nitrations im Wasser. *Jb. V. Wass.*, 22: 247–271.
- Naguib M. I. (1965): Effect of ascorbic acid on respiration and carbohydrate metabolism of *Cunninghamella* sp. *Folia Microbiol.*, 10: 215–223.

- Naguib M. I., Haikal N. Z., Ali F. F. (1982): Effect of large doses of patoran and diuron on growth and nitrogen metabolism during the formation of fungi felts of *Cunninghamella echinulata*. Egypt. J. Bot., 25: 13–22.
- Nelson N. (1944): A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375–380.
- Radke V. L., Grau C. R. (1986): Effect of herbicides on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. Pl. Dis., 70: 19–23.
- Ramanujam T., Batistic L., Bellinck C. (1978): Effect of herbicides on the decomposition of cellulose by *Trichoderma viride* in soil and *in vitro*: Influence on the activity of cellulase. Rev. Ecol. Soil, 15: 159.

Received on September 29, 1998

Corresponding author:

Dr. H. A. H. Hasan, Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, A.R.E.71516, Egypt,
e-mail: yzhasan@yahoo.com

STANOVENÍ ZMĚNY PRODUKČNÍHO POTENCIÁLU JARNÍHO JEČMENE S VYUŽITÍM RŮSTOVÉHO MODELU CERES-BARLEY

CHANGE OF SPRING BARLEY PRODUCTION POTENTIAL USING CROP MODEL CERES-BARLEY

Z. Žalud¹, M. Trnka¹, M. Dubrovský²

¹*Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Czech Republic*

²*Institute of Atmospheric Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Hradec Králové, Czech Republic*

ABSTRACT: The main goal of this work was to determine a production potential of spring barley at the given location and its possible changes related to the climate change. The experimental field used for CERES-Barley model validation is situated in the potato-growing region, 560 meters above sea level. Stochastic weather generator Met&Roll was used together with GCM-based climate change scenario to prepare input weather data for the crop model. Sensitivity analysis was performed to reveal the role of key meteorological elements in spring barley production process. This approach makes possible to pinpoint and quantify influence of these weather elements and may help in search for adaptation measures. It was found that the positive direct effect (through higher intensity of photosynthesis) of increased ambient CO₂ concentration will be overwhelmed by yet stronger negative indirect effect due to changed climate conditions. In combination of both effects, the stressed yield of spring barley will be reduced by 14% in doubled CO₂ conditions. This decrease is mainly due to increased air temperature which shortens the growing period. The barley production potential (ratio of stressed to potential yields) in this location will decrease from present 72 to 60% in 2×CO₂ conditions when both direct and indirect effects are considered.

Keywords: spring barley; production potential; crop model; climate change; sensitivity analysis

ABSTRAKT: Cílem příspěvku bylo posoudit možný vývoj produkčního potenciálu jarního ječmene ve vztahu ke změně klimatu. S využitím růstového modelu CERES-Barley, který byl validován pro podmínky bramborářské výrobní oblasti, stochastického generátoru Met&Roll a na GCM (General Circulation Model) založeném scénáři klimatu byly připraveny denní meteorologické série pro 1,5×CO₂ a 2×CO₂ klima, které byly použity jako vstupní data pro růstový model. Význam jednotlivých meteorologických prvků v produkčním procesu jarního ječmene byl testován uplatněním principů citlivostní analýzy, neboť právě tento přístup může usnadnit hledání nevhodnějších adaptačních opatření. Modelovými výpočty bylo zjištěno, že pozitivní přímý efekt (změna koncentrace CO₂) bude méně významný než negativní nepřímý efekt (změna klimatických podmínek). Kombinace obou vlivů vykazuje redukcí stresovaného výnosu o 14 % v podmínkách 2×CO₂ klimatu. Zjištěné snížení je pravděpodobně způsobeno zkrácením doby růstu, jehož příčinou je očekávané zvýšení teploty. V podmínkách 2×CO₂ klimatu klesne podle skutečných simulací produkční potenciál jarního ječmene (poměr mezi stresovaným a potenciálním výnosem) ze současných 72 na 60 %.

Klíčová slova: jarní ječmen; produkční potenciál; růstový model; změna klimatu; citlivostní analýza

ÚVOD

Rozvoj výpočetní techniky a rostoucí míra poznání jednotlivých prvků agrosystému stojí v pozadí současného stupně využívání technologie počítačových simulací. Tato metoda vědecké práce může být využita v plné míře jen tehdy, je-li k dispozici dostatečné množství poznatků a dat o základních součástech agrosystému, resp. o jejich vzájemných vazbách a zároveň existuje možnost integrace těchto údajů v jeden celek

(Wit, 1986). Vývoj v této oblasti trvá více než třicet let a přináší nejen velmi zajímavé poznatky, ale skrývá v sobě potenciál srovnatelný s objevy minerálního hnojení či chemické ochrany rostlin.

Na základě výstupů růstových modelů lze učinit kvalifikovanější rozhodnutí, než bylo možné v minulosti, ať již jde o rozhodnutí globální, např. posouzení dopadů nárůstu produkce skleníkových plynů a následně možné změny klimatu na pěstování rostlin (Iglesias, 1995; Semenov, Porter, 1995; Wolf, Diepen, 1995), nebo o roz-

hodnutí denní praxe, jako např. volba nevhodnějších agrotechnických opatření (Wolf, Keulen, 1989; Easterling et al., 1992).

Cílem práce bylo:

- Provést validaci modelu CERES-Barley (Hoogenboom et al., 1994) porovnáním simulovaných a reálných výnosů a srovnáním simulované a reálné doby vegetace v období 1985 do 1994.
- Pomocí simulací modelem CERES-Barley a při použití syntetických meteorologických řad připravených stochastickým generátorem Met&Roll (Dubrovský, 1996a, b) posoudit dopad očekávané změny klimatu na růst a vývoj jarního ječmene v testované lokalitě. Parametry generátoru jsou odhadnuty z pozorovaných řad a modifikovány v souladu se scénářem změny klimatu (Nemešová et al., 1999) založeného na výstupu z modelu GCM ECHAM3/T42 (obr. 1).
- Stanovit index produkčního potenciálu pro 1×CO₂ a 2×CO₂ klima jako podíl mezi stresovaným a potenciálním výnosem.
- Provést citlivostní analýzu vystihující vztah jednotlivých meteorologických prvků k růstu a vývoji ječmene.

MATERIÁL A METODY

Pedologická a klimatická charakteristika pokusného místa

Zkušební pozemky se nacházejí v bramborářské oblasti (lokalita Domanínek, 49° 32' SŠ, 16° 15' VD) v nadmořské výšce 560 m. Půdní typ byl stanoven jako typická kambizem – varieta kyselá [morfologický klasifikační systém půd MKSP (Hraško et al., 1991)], půdní druh hlinitopísčité. Půdním substrátem je pro tuto část Českomoravské vysočiny deluvium savorové ruly (tab. I).

Průměrná roční teplota lokality činí 6,5 °C. Zajištění závlahy polních kultur je ve většině let dostatečné, průměrný roční úhrn srážek dosahuje 651 mm, což je dáno především nadmořskou výškou a zeměpisnou polohou. Chod průměrných měsíčních teplot a průměrných úhrnů srážek za normálové období (1931 až 1960) je zachycen v tab. II.

Jako testovanou odrůdu jsme zvolili Orbit, což je nesladovnická, poloraná až polopozdní odrůda nízkého typu, vhodná do všech poloh. Zrno je středně velké až menší. K hlavním přednostem patří výnosová stabilita (Pařízek, Jurečka, 1996).

Stručný popis modelu CERES-Barley

Model CERES-Barley se řadí do skupiny dynamických, všeobecných, vysvětlujících a verifikovatelných růstových modelů. Model se skládá ze souborů podporujících vstupní údaje, samotných matematických vztahů vyjadřujících procesy růstu a vývoje a souborů tvořících výstup z uskutečněné simulace.

Existují čtyři skupiny vstupních dat, a to data meteorologická, fyziologická data a parametry, data pedologická a informace o agrotechnice. Jakákoliv simulace není možná bez získání a parametrizace dat ze všech čtyř skupin. Vstupní meteorologická data musí zahrnovat denní údaje o maximální a minimální teplotě, srážkách a globální radiaci. Většina fyziologických charakteristik použité odrůdy je obsažena v genetických koeficientech, které vystihují jejich klíčové vlastnosti. Informace o půdních podmínkách byly získány z půdní sondy (tab. I). Nezbytné agrotechnické informace zahrnují jak data setí, vzházení a sklizně, tak i údaje o množství a způsobu hnojení, zpracování půdy apod. (Trnka, 1999).

Model bere v úvahu několik procesů současně, tak aby zajistil co největší soulad se skutečností. Simulace probíhá v několika na sebe navazujících krocích:

- fenologický vývoj a průběh jednotlivých fází,
- tvorba biomasy listů, stonku a kořenů a její rozdělení,
- stav půdní vláhly a využití vody rostlinou,
- odběr půdního dusíku a jeho distribuce jednotlivým orgánům.

I. Chemická analýza vzorků z diagnostických horizontů – Chemical analysis of soil samples from the diagnostic horizons

Horizont ¹	A _{ap}	B _v	C
Hloubka ² (m)	0 – 0,28	0,28 – 0,58	0,58 – +
Obsah humusu ³ (%)	1,30	0,41	0,18
Kationtová výměnná kapacita ⁴ (mekv/kg)	103,8	91,4	88,0
pH (H ₂ O)	5,5	5,7	5,7
pH (KCl)	4,7	5,3	5,3
Obsah fosforu ⁵ (mg/kg) Mehlich II	90	13	13
Obsah draslíku ⁶ (mg/kg) Mehlich II	235	89	89

¹horizont, ²depth, ³humus content, ⁴cations exchangeable capacity, ⁵content of phosphorus, ⁶content of potassium

II. Průměrné měsíční teploty a průměrné úhrny srážek za normálové období (1931 až 1960) – Standard monthly mean temperatures and precipitation (1931 to 1960)

Měsíc ¹	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Průměrná teplota ² (°C)	-3,9	-2,5	1,4	6,2	11,9	14,6	16,6	15,6	11,8	6,6	1,4	-2,0
Úhrn srážek ³ (mm)	42	37	32	47	64	75	77	80	53	54	49	41

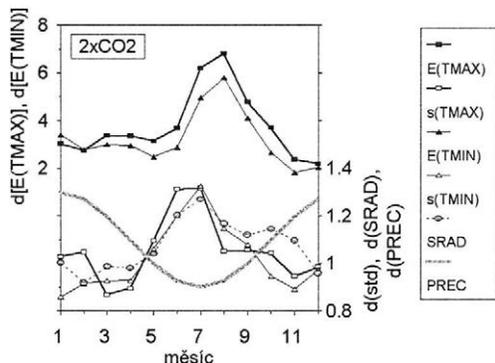
¹month, ²mean temperature, ³precipitation

Výstupní data obsahují informace o nadzemní sušině a v ní obsaženém dusíku a informace o stavu pro rostlinu dostupné vody a dusíku v půdě. Mnohé další informace jsou přístupné v prostředí DSSAT, ve kterém model pracuje. Model je schopen simulovat nejen výnos limitovaný vodou a živinami, ale též výnos potenciální, přičemž umožňuje v obou výnosových úrovních použití citlivostní analýzy, a tím posouzení vlivu jednotlivých vstupních údajů na výstupní charakteristiky.

Spojení modelu CERES-Barley a scénářů klimatické změny

Zdvojnásobení obsahu skleníkových plynů v atmosféře vyvolá podle současných znalostí nárůst průměrné globální teploty o 2,5 °C (Houghton, 1998) a s tím související změnu klimatu. Problém, který je třeba řešit, je vliv této změny na výnosy důležitých zemědělských plodin.

Pro každý jednotlivý scénář klimatu a každou referenční koncentraci CO₂ (obr. 1) byla pro stanici Domaníněk



1. Scénář změny klimatu pro 2xCO₂ (rok 2075); d[E(TMAX)] a d[E(TMIN)] jsou aditivní změny průměrných hodnot denních maximálních a minimálních teplot, d[s(TMAX)] a d[s(TMIN)] jsou multiplikační změny směrodatných odchylek TMAX a TMIN; d[SRAD] jsou multiplikační změny průměrné hodnoty i směrodatné odchylky denních úhrnů globálního slunečního záření; d[PREC] jsou multiplikační změny denních úhrnů srážek – Climate change scenario for 2xCO₂ (year 2075); d[E(TMAX)] and d[E(TMIN)] are additive changes of the means of daily maximum and minimum temperatures; d[s(TMAX)] and d[s(TMIN)] represent the multiplicative changes of standard deviations of TMAX and TMIN; d[SRAD] are the multiplicative changes of the mean and standard deviation of daily sums of global solar radiation; d[PREC] is the multiplicative change of monthly precipitation sums

provedena 99letá modelová simulace výnosové řady, z níž pak byly odhadnuty vybrané statistické charakteristiky. V této simulaci byly použity syntetické meteorologické řady vytvořené generátorem Met&Roll, přičemž změny parametrů generátoru odhadnuté z pozorované řady (Domaníněk, 1967 až 1997), rok 1995 byl vynechán

(přístroje na meteorologické stanici byly dlouhodobě poškozeny), byly modifikovány v souladu se scénářem změny klimatu odvozeného z výstupu GCM (General Circulation Model) modelu ECHAM3/T42 (Nemešová et al., 1999). Žádné adaptace odrůd jarního ječmene na změněné podmínky (delší vegetační doba, vyšší koncentrace CO₂) nebyly do této citlivostní analýzy zahrnuty.

Určení indexu produkčního potenciálu

Analýza byla provedena jak pro reálný, tak i pro potenciální výnos. Rozdíl mezi potenciálním výnosem a realitou může být významným ukazatelem pro posouzení změny produkčního potenciálu daného území. Zavedení indexu produkčního potenciálu Z (%), jakožto podílu mezi reálným (RV) a potenciálním výnosem (PV):

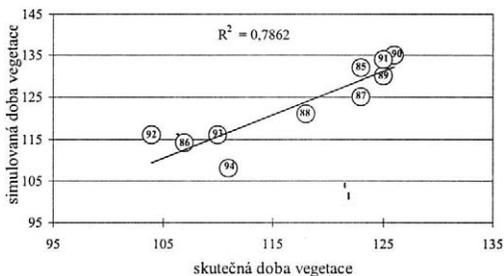
$$Z = \frac{RV}{PV} \cdot 100 \quad (1)$$

umožní vyjádřit míru limitujících faktorů a jejich změny v rámci změny klimatu. Čím více se hodnota indexu blíží jedné, tím vyšší je relativní efektivnost jednotlivých agrotechnických faktorů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

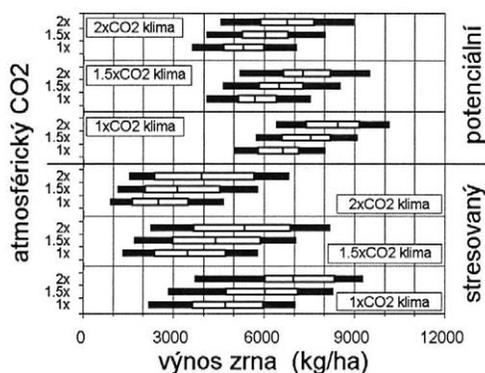
Model CERES-Barley byl úspěšně validován s pomocí experimentálních hodnot doby vegetace (zasetí – fyziologická zralost) a výše výnosu (Trnka, 1999). Jako experimentální data byly použity výsledky odrůdových pokusů s odrůdou Orbit v letech 1985 až 1994. Pro ilustraci uvádíme výsledky validace doby vegetace (obr. 2).

Jako typický ročník pro posouzení přímého (zvýšené koncentrace CO₂), nepřímého (změny meteorologických podmínek) a kombinovaného vlivu zvýšení hladiny CO₂ v atmosféře na produkční potenciál jarního ječmene byl



2. Validace doby vegetace; přímkou je vyznačena lineární regresní závislost mezi dobou vegetace pozorovanou a simulovanou (limitovanou vodou a živinami); čísla v kroužku reprezentují jednotlivé roky – Validation of the vegetation period; the straight line represents the linear regression function relating the observed and simulated lengths of the vegetation period (water and nutrients limited); each year is marked as number in the middle of the ring

vybrán z důvodu úspěšné validace rok 1993. Z obr. 3 vyplývá několik důležitých závěrů, které naznačují především pravděpodobné snížení výnosu jarního ječmene



3. Stresované a potenciální modelové výnosy ječmene při různých úrovních přímého a nepřímého vlivu CO₂; vodorovné pásy vyznačují 5., 25. (dolní kvartil), 50. (medián), 75. (horní kvartil) a 95. hodnotu z 99 simulovaných výnosů při použití 99leté syntetické meteorologické řady; ostatní vstupní data odpovídají roku 1993, který byl vybrán jako reprezentativní; dolní polovina grafu zachycuje výnosy v podmínkách limitovaných vodou a živinami a horní polovina výnosy potenciální – Stressed and potential model yields of barley simulated under various levels of direct and indirect effects of increased CO₂; the horizontal bars represent the quartiles [5th, 25th (lower quartile), 50th (median), 75th (upper quartile) and 95th] from the set of 99 yields simulated with use of 99-year synthetic daily weather series; the other crop model input data are based on year 1993 which was selected as a representative year; the bottom part of the graph displays the water and nutrient limited yields, the top part displays the potential yields

v této lokalitě v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ (přibližně o 14 % při 2×CO₂). Hlavním činitelem způsobujícím tento pokles bude změna klimatických podmínek – v důsledku samotného nepřímého vlivu by reálné výnosy poklesly cca o 45 %. Tento pokles výnosů nevyrovná ani fertilizační efekt zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře. Při zachování současného stavu klimatu a zvýšení koncentrace CO₂ by se přímý vliv CO₂ projevil poměrně značným zvýšením výnosů. Podle údajů z literatury jsou C₃ rostliny podstatně více stimulovány vyššími koncentracemi CO₂ než C₄ rostliny. Kostrej et al. (1998) uvádějí, že při dvojnásobném zvýšení CO₂ (na 662 ppm) vzroste rychlost fotosyntézy u C₃ rostlin o 28 %, zatímco u C₄ rostlin jen o 9 %. V našem případě by přímý vliv zvýšené koncentrace CO₂ způsobil nárůst potenciálního výnosu přesně o 14,1 % při koncentraci 1,5×CO₂ a o 27,7 % při koncentraci 2×CO₂. Uvažujeme-li kombinovaný vliv CO₂, lze podle simulací uskutečněných v souladu se scénářem změny klimatu očekávat mírné zvýšení potenciálních výnosů, a to přibližně o 4 %.

Index produkčního potenciálu Z zachycuje míru výtečnosti limitujících faktorů. Čím více se hodnota indexu

blíží jedné, tím vyšší je dosažená efektivita jednotlivých (mj. i agrotechnických) vstupů. S růstem CO₂ se hodnota Z snižuje (tab. III), což je způsobeno poklesem výnosů v podmínkách limitovaných vodou a živinami a nárůstem výnosů potenciálních. V konečném důsledku pokles indexu potenciálu znamená zvýšení nákladů, které bude muset farmář vynaložit na udržení současné výnosové hladiny. V případě lokality Domaníněk je hodnota Z_{1×CO₂} = 72,3 %, Z_{1,5×CO₂} = 67,9 % a Z_{2×CO₂} = 59,7 %. Obdobné studie pro pšenici a kukuřici provedli Žalud et al. (1999) a Dubrovský, Žalud (1999).

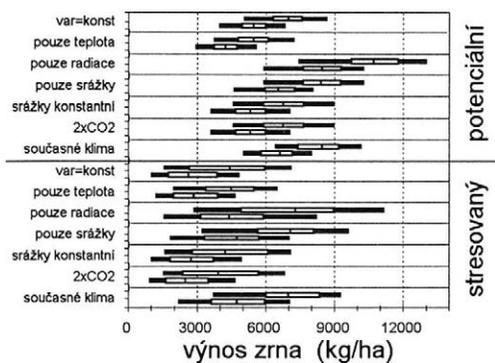
III. Změna produkčního potenciálu (%) v závislosti na velikosti přímého a nepřímého vlivu zvýšené koncentrace CO₂ – Change of the production potential (%) depending on the direct and indirect effects of changed CO₂ concentration

	Přímý vliv ¹ (změna obsahu CO ₂ v atmosféře ²)		
	1×CO ₂ (současný stav ⁵)	1,5×CO ₂	2×CO ₂
Nepřímý vliv ³ (změněné klimatické podmínky ⁴)			
1×CO ₂ (současné klima ⁶)	100,0	109,0	115,8
1,5×CO ₂	85,1	93,9	101,3
2×CO ₂	68,0	75,7	82,6

¹direct effect, ²change of CO₂ concentration in atmosphere, ³indirect effect, ⁴changed climatic conditions, ⁵present concentration, ⁶present climatic conditions

Z obr. 3 lze rovněž odvodit zvýšení variability výnosů v podmínkách limitovaných vodou a živinami, což odpovídá očekávanému nárůstu četnosti výskytu extrémních jevů, především dlouhých bezesrážkových period. Lokalita Domaníněk se vyznačuje závislostí produkce na rovnoměrném rozložení srážek během vegetačního období, protože s ohledem na půdní podmínky a výšku hladiny podzemní vody nelze uvažovat o jiném zdroji vláhy.

Vliv změn jednotlivých meteorologických prvků a koncentrace CO₂ je prezentován na obr. 4. Jde o souhrn výsledků citlivostní analýzy, která zahrnovala nejen dopady změn jednotlivých faktorů, ale i některých jejich kombinací. Z obr. 4 je především patrné, že změny jednotlivých meteorologických faktorů ve většině případů vedou ke zvýšení variability výnosů. Vzestup teplot vede ke snížení výnosů, což lze vysvětlit zkrácením vegetační doby při vyšších teplotách (McMaster, 1996; Moot et al., 1996). Zkrácení vegetační doby v konečném důsledku znamená i méně času na tvorbu biomasy. Pouhá změna srážkových úhmů v souladu se scénářem změny klimatu by vedla jen k nevýznamnému zvýšení výnosů, přičemž kombinace změny srážek a zvýšené koncentrace CO₂ by výnos významně zvýšila, a to přibližně o 44 %. Toto zvýšení lze pravděpodobně přičíst vyšší produkční efektivnosti využití vody rostlinou, tzv. WUE (water use efficiency) v podmínkách vyšší koncentrace CO₂.



4. Výnosy jarního ječmene; analýza citlivosti na změny klimatických charakteristik; jednotlivé páry pruhů (význam pruhů viz obr. 3) se vztahují k současné (330 ppm) a dvojnásobné koncentraci CO₂; v dolní polovině jsou zachyceny vodou a živinami limitované výnosy, v horní polovině výnosy potenciální – The yields of the spring barley; analysis of the sensitivity to changes in climatic characteristics; the pairs of the bars (see Fig. 3 for the meaning of the bars) represent the yields modelled in present (330 ppm) and doubled ambient CO₂; the bottom part of the graph displays the water and nutrient limited yields, the top part displays the potential yields

Scénáře – Scenarios:

současné klima – present climate

2xCO₂ = modifikace všech faktorů podle scénáře změny klimatu (obr. 1) – the parameters of the generator are modified according to the 2xCO₂ climate change scenario (Fig. 1)

srážky konstantní = jako 2xCO₂, jen srážky zůstávají nezměněny – as 2xCO₂, but the precipitation are unmodified

pouze srážky = pouze změna srážek – only precipitation is modified

pouze radiace = pouze změny charakteristik globální radiace – only solar radiation characteristics are modified

pouze teplota = pouze změny teplotních charakteristik – only temperature characteristics are modified

var=konst = jako 2xCO₂, ale standardní odchylky TMAX, TMIN a SRAD zůstávají nezměněny – as 2xCO₂ but the standard deviations of TMAX, TMIN and SRAD are left unmodified

Z analýzy změn potenciálního výnosu lze usoudit na vysokou citlivost jarního ječmene na zvýšení hodnot globální radiace. Jarní ječmen je obilnina, která ve srovnání s ostatními C₃ rostlinami je především ve fenofázi kvetení relativně náročnější na její intenzitu. Např. McMaster (1996) zavádí do svých modelových simulací produkčního procesu ječmene modul nazvaný světelný stres. Tento jev, projevující se především v oblastech s vyšší nadmořskou výškou, může být z pohledu růstu a vývoje jarního ječmene v řadě testovaných variant jedním z rozhodujících faktorů produkčního procesu.

Kombinace zvýšené radiace spolu s nárůstem koncentrace CO₂ by zvedla úroveň potenciálního výnosu o více

než 30 % v porovnání se současností. Opačně se pak i zde projevuje zvýšení teploty, které s sebou nese již zmíněné zkrácení vegetační doby. Zajímavým jevem je snížení variability potenciálního výnosu, což nepřímo potvrzuje, že hlavním meteorologickým činitelem, který bude za zvyšující se teploty ovlivňovat hospodaření v této oblasti, bude rozložení srážek během vegetačního období.

ZÁVĚR

Porovnání s podobnými pracemi ukazuje, že v některých rysech se chování jarního ječmene ve změněných klimatických podmínkách podobá jiným plodinám, v jiných rysech se naopak liší. Podobně jako u dalších regionálních studií např. pro kukuřici (lokality Žabčice, odrůda Dea, model CERES-Maize) a pšenici (lokality Žabčice, odrůda Hana, model CERES-Wheat) (Žalud et al., 1999) platí:

- přímý vliv zvýšené koncentrace CO₂ je pozitivní,
- nepřímý vliv zvýšené koncentrace CO₂ je negativní (pouze v případě kukuřice a potenciálního výnosu je nepřímý vliv pozitivní),
- velikost přímého i nepřímého vlivu je u stresovaných výnosů větší než u potenciálních výnosů,
- zvýšení teplot vede ke zkrácení vegetační doby, a tím ke snížení výnosů v důsledku zkráceného času na tvorbu biomasy,
- zvýšení úhrnů slunečního záření zvýší potenciální výnosy.

Na rozdíl od kukuřice je negativní nepřímý vliv výraznější než pozitivní přímý vliv, což znamená že při kombinaci obou vlivů lze v podmínkách 2xCO₂ očekávat snížení výnosů ječmene. Z výsledků simulací při použití modelu CERES-Wheat (odrůda Hana) v lokalitě Žabčice (kukuřičná výrobní oblast) dále vyplývá nárůst hodnoty indexu produkčního potenciálu, jehož hodnota se mění z 59 % pro 1xCO₂ klima na 64 % pro 1,5xCO₂ klima a na 69 % pro 2xCO₂ klima. Při simulacích s modelem CERES-Barley byl naopak zjištěn pokles indexu Z s rostoucí koncentrací CO₂ (ze 72 % pro 1xCO₂ klima na 60 % pro 2xCO₂ klima).

Veškeré námi dosažené výsledky podporují teorii, že dopady klimatické změny je nutné řešit v závislosti na lokálních podmínkách a při případné generalizaci postupovat nanejvýš obezřetně.

Poděkování

Autoři článku děkují pracovníkům společnosti Zemservis, s. r. o., zkušební stanice Domanínky za poskytnutí základních dat. Výsledků bylo dosaženo za podpory GA ČR (projekt č. 521/97/P089).

LITERATURA

- Dubrovský M. (1996a): Met&Roll: Stochastický generátor denních klimatických dat pro růstový simulační model. Meteorol. Zpr., 49: 97–105.
- Dubrovský M. (1996b): Validace stochastického generátoru Met&Roll. Meteorol. Zpr., 49: 129–138.
- Dubrovský M., Žalud Z. (1999): Application of the weather generator for crop growth simulations in climate change impact studies. ESA Int. Symp. Modelling cropping system, Lleida Spain: 169–170.
- Easterling W. A., McKenney M. S., Rosenberg N. J., Lemon K. M. (1992): Simulations of crop response to climate change: effects with present technology and currently available adjustments (the smart farmer scenario). Agric. For. Meteorol., 59: 75–102.
- Hoogenboom G., Jones J. W., Wilkens P. W., Batchelor W. D., Bowen W. T., Hunt L. A., Pickering N. B., Singh U., Godwin D. C., Bear B., Boote K. J., Ritchie J. T., White J. W. (1994): Crop models, DSSAT Version 3.0. International Benchmark sites Network for Agrotechnology Transfer. Honolulu, Univ. Hawaii.
- Houghton J. (1998): Globální oteplování. Praha, Academia.
- Hraško J., Linkeš V., Němeček J., Novák P., Šála R., Šurina B. (1991): Morfogenetický klasifikačný systém pôd ČSFR. 2. vyd. Bratislava, VÚPÚ.
- Iglesias A. (1995): Modelling the effects of climate change on crops at the regional scale – effects on wheat and maize in Spain. In: Harrison P. A., Butterfield R. E., Downing T. E. (eds.): Climate change and agriculture in Europe – Assessment of impacts and adaptations. [Výzkumná zpráva.] Univ. Oxford: 310–319.
- Kostrej A., Danko J., Jureková Z., Zima M., Gáborčík N., Vidovič J. (1998): Ekofyziológia produkčného procesu porastu a plodín. Nitra, SPU.
- McMaster G. S. (1996): Phenology, development, and growth of the wheat (*Triticum aestivum* L.) shoot apex: A review. Adv. Agron., 59: 63–118.
- Moot D. J., Henderson A. L., Porter J. R., Semenov M. A. (1996): Temperature, CO₂ and the growth and development of wheat: changes in the mean and variability of growing conditions. Clim. Change, 33: 350–368.
- Nemešová I., Kalvová J., Dubrovský M. (1999): Climate change projections based on GCM-simulated daily data. Stud. Geophys. Geodet., 43: 201–222.
- Pařízek P., Jurečka D. (1996): Přehled odrůd jarního ječmene 1996. 1. vyd. Brno, ÚKZÚZ.
- Semenov M. A., Porter J. R. (1995): Climatic variability and the modelling of crop yields. Agric. For. Meteorol., 73: 265–283.
- Trnka M. (1999): Dopady možné klimatické změny na produkci jarního ječmene. Brno, MZLU.
- Wit C. T. de (1986): Modelling agricultural production. Introduction. In: Keulen H. van, Wolf J. (eds.): Modelling of agricultural production: weather, soils and crops. Simulation Monographs. Wageningen, Pudoc: 3–10.
- Wolf J., Diepen C. A. van (1995): Effects of climate change on grain maize yield potential in the European Community. Clim. Change, 29: 299–331.
- Wolf J., Keulen H. van (1989): Modelling long-term crop response to fertiliser and soil nitrogen (Comparison with field results.) Pl. Soil, 120: 23–38.
- Žalud Z., Dubrovský M., Šťastná M. (1999): Modelling climate change impacts on maize and wheat growth and development. ESA Int. Symp. Modelling Cropping System, Lleida Spain 277–278.

Došlo 28. 1. 2000

Kontaktní adresa:

Dr. Ing. Zdeněk Žalud, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, tel.: + 420 5 45 13 30 83, fax: + 420 5 45 13 30 83, e-mail: zalud@mendelu.cz

INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ

PHOSPHOLIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF TOBACCO SEEDS

FOSFOLIPIDOVÉ A AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ SEMEN TABÁKU

M. Zlatanov¹, N. Menkov²

¹Department of Organic Chemical Technology, University of Plovdiv, Bulgaria

²Department of Process Engineering, Higher Institute of Food Industry, Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT: Phospholipid and fatty acid composition of seeds of two Bulgarian species of tobacco are presented. The total content of glyceride oil in Rila 89 (oriental) and Coker 254 (Virginia) tobacco seeds was found to be 34.5% and 39.0%, respectively. The general content of phospholipids is 0.3% in both samples. Phosphatidylinositol (21.2% and 30.5%), phosphatidylcholine (25.5% and 11.4%) and phosphatidylethanolamine (7.7% and 14.1%) predominate in the phospholipid fraction. The main fatty acid components in the seed glyceride oils are linoleic acid (48.8% and 14.9%) and oleic acid (23.3% and 43.8%).

Keywords: tobacco seeds; phospholipid acid; fatty acids

ABSTRAKT: Bylo studováno fosfolipidové a aminokyselinové složení semen dvou bulharských druhů tabáku. Celkový obsah glyceridové silice dosahoval v semenech tabáku Rila 89 (orientální typ) 34,5 % a Coker 254 (virginský typ) 39,0 %. Celkový obsah fosfolipidů v obou vzorcích činil 0,3 %. Ve fosfolipidové frakci mají dominantní podíl fosfatidylinositol (21,2 %, resp. 30,5 %), fosfatidylcholin (25,5 %, resp. 11,4 %) a fosfatidyletanolamin (7,7 %, resp. 14,1 %). Hlavními složkami mastných kyselin v glyceridových silicích semen jsou kyseliny linolová (48,8 %, resp. 14,9 %) a olejová (23,3 %, resp. 43,8 %).

Klíčová slova: semena tabáku; fosfolipidy; mastné kyseliny

INTRODUCTION

The seeds of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) are rich in glyceride oil. The fatty acid composition of the oil was reported by Koiwai et al. (1983). The major fatty acids are the linoleic, linolenic and palmitic acids. According to Frega et al. (1991) linolenic acid predominates in the glyceride fraction. Fatty acid and phospholipid composition varies significantly depending on climatic and agricultural conditions. On the other hand recent seed analyses suggest that fatty acids and phospholipids have taxonomic significance and evolutionary implications for higher plant classification and can be used to differentiate or related taxa at several hierarchical levels. Information about content and composition of phospholipids in the seeds was not published.

The aim of this paper is to widen the knowledge of the phospholipid and fatty acid composition of the seeds of two Bulgarian species of tobacco and to make comparison with the composition of the other varieties of tobacco.

MATERIAL AND METHODS

Material

The investigations were carried out with seeds of two different tobacco varieties – Rila 89 (oriental) grown in Rila town and Coker 254 (Virginia) grown in the village Lechtchevo, both grown in South Bulgaria, crop 1997. The used reagents were of analytical purity. Phospholipids and methyl esters delivered from Merck, Fluka and Sigma were used as standards. The gas chromatography materials were purchased by Scotia Pharmaceuticals Ltd., Carlisle (UK).

Methods

The seeds were powdered and extracted with freshly distilled n-hexane in Soxhlet apparatus for 8 h. After distillation of the solvent under vacuum, the extracted oils were weighed.

The polar lipids were recovered from the rest of the nuts according to the procedure of Folch et al. (1957) with mixed solvent chloroform : methanol 2 : 1 v/v. The glycerin oils and polar lipids were combined and hydrated with water (3% v) at 60 °C for precipitation of all phospholipids. The precipitated phospholipids were treated several times with cold acetone at 0 °C to remove the rest of nonpolar lipids.

The individual phospholipids were separated by means of two-dimensional thin-layer chromatography on 20/20 cm plates covered with 0.25 mm layer of Silicagel 60 G Merck and impregnated with 1% (NH₄)₂SO₄ solution. The samples were developed in chloroform : methanol : ammonia 65 : 25 : 5 v/v/v (I. direction) and in chloroform : methanol : ammonia : acetic acid : water 50 : 20 : 10 : 10 : 5 (II. direction). After drying the spots of the individual phospholipids were visualized and identified by spraying with specific reagents (Kates, 1972):

- iodine vapors for all lipids
- Dragendorff reagent for phospholipids with choline group, such as phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and sphingomyelin
- ninhydrin reagent for ethanolamine and serine – containing phospholipids, such as phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine
- Schiff reagent for phosphatidylinositol and phosphatidylglycerols

In addition *R_f* and witness were compared for completely identification of the individual phospholipids. The quantitative evaluation was carried out spectrophotometrically at 700 nm, using Bartlett technique (Kates, 1972). The repeatability of the method used for determination of phospholipids gave a coefficient of variation of less than 5.0%.

The fatty acid composition of glyceride oils and individual phospholipids was identified by capillary gas chromatography of their methyl esters. The esterification was carried out by Metcalfe and Wang technique (Metcalfe, Wang, 1981). Methyl esters were purified by thin-layer chromatography on plates, covered with 0.25 mm Silicagel 60 G Merck and mobile phase n-hexan : diethyl ether 97 : 3.

Determination was accomplished on a Pay Unicam 304 unit, provided with flame-ionization detector, 30 mm capillary column Innowax impregnation and conditions as follows: column temperature 165 °C to 225 °C, with a change 4 °C/min, detector temperature 300 °C, injector temperature 280 °C, gas-carrier (N₂).

RESULTS AND DISCUSSION

The content of oil in the seeds was found to be relatively high, ranging from 34.5% in Rila 89 seeds to 39.0% in Coker 254 seeds. These values are close to those obtained from the other common oil-bearing seeds (e.g. sunflower). Total content of phospholipids in oils was 0.3% in both seeds.

The qualitative analysis based on response to specific spray reagents on thin-layer chromatography and comparison with authentic samples indicated the presence of almost all phospholipid classes (Tab. I).

I. Phospholipid composition of tobacco seeds

Phospholipids (PL)	Content (% wt total PL)	
	Rila 89	Coker 254
Phosphatidylcholine (PC)	25.5	11.4
Phosphatidylinositol (PI)	21.2	30.5
Phosphatidylethanolamine (PE)	7.7	14.1
Phosphatidic acids (PA)	8.7	11.8
Lysophosphatidylcholine (LPC)	9.3	10.0
Lysophosphatidylethanolamine (LPE)	10.3	5.6
Phosphatidylserine (PS)	4.7	5.6
Monophosphatidylglycerol (MPGI)	4.3	5.4
Diphosphatidylglycerol (DPGI)	4.7	5.6
Sphingomyelin	3.5	4.1

Phosphatidylcholine, phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine seem to be the major components in the both types of seeds. The highest content of phosphatidylcholine was found to be in Rila 89 seeds (25.5%), followed by phosphatidylinositol (21.2%) and lysophosphatidylcholine (10.3%). Phosphatidylinositol was the major component in Coker 254 seeds (30.5%), followed by phosphatidylethanolamine (12.3%), phosphatidic acids (11.8%) and phosphatidylcholine (11.4%). Small quantities of other phospholipids – phosphatidylserine, lysophosphatidylethanolamine, monophosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerols and sphingomyelin were detected in the seeds. The composition and distribution of fatty acid in glyceride oils of the tobacco seeds are presented in Tab. II.

II. Fatty acid composition of tobacco glyceride oils

Fatty acids	Fatty acids content (% wt)	
	Rila 89	Coker 254
14 : 0	6.1	8.7
16 : 0	17.7	29.3
16 : 1	1.1	1.1
17 : 0	1.0	0.7
18 : 0	1.3	1.4
18 : 1	23.3	43.8
18 : 2	48.8	14.9
18 : 3	0.7	0.1

In the Rila 89 seed glyceride oil linoleic acid was the predominant component comprising 48.8% of the total fatty acid content, followed by oleic acid (23.3%), palmitic acid (17.7%) and myristic acid (6.1%) as major fatty acids. The content of linoleic acid however was signifi-

cantly lower than that reported by Koiwai et al. (1981) when the percentage of this acid was about 65.0 to 75.0%. Palmitoleic, margaric, stearic and linolenic acid were the minor components in this sample. In the Coker 254 glyceride oil oleic acid predominated (43.8%), followed by palmitic acid (29.3%) and linoleic acid (14.9%). This quantitative composition was significantly different from the other varieties of tobacco seeds, where mainly linoleic acid predominated (Frega et al., 1991; Koiwai et al., 1981). These differences can be explained with the different climatic and agricultural conditions for cultivation of tobacco plants.

- Frega N., Bocci F., Conte L., Testa F. (1991): Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68: 29–33.
- Kates J. (1972): *Techniques of lipidology*. New York, Elsevier Publ.
- Koiwai A., Suzuki F., Matsuzaki T., Kawashima N. (1983): The fatty acid composition of seeds and leaves of *Nicotiana* species. *Phytochemistry*, 22: 1409–1412.
- Metcalfe L., Wang C. (1981): Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base catalyzed transesterification. *J. Chromatogr. Sci.*, 19: 530–533.

Received on December 27, 1999

REFERENCES

- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 492–495.

Corresponding author:

Ing. Nikolay Menkov, PhD., Higher Institute of Food Industry, Department of Process Engineering, 26, Maritza blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria, e-mail: nimenkov@hiffi-plovdiv.acad.bg

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Prague 2, Czech Republic

tel.: + 420 2 24 25 79 39, fax: + 420 2 24 25 39 38, e-mail: redakce@uzpi.cz

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 abstracts in English or in English with abstracts in Czech or Slovak.

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	195,-	214,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	195,-	214,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	195,-	214,-
Journal of Forest Science	12	195,-	214,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	159,-	167,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinářské vědy)	6	92,-	97,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	62,-	64,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	62,-	64,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	62,-	64,-
Research in Agricultural Engineering	4	62,-	64,-

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

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 jednotky 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 zkratky 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 jej (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.

Metoda 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 nedostatecích 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 PSČ, 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 – CONTENTS

Šimek M.:	
Nitrifikace v půdě – terminologie a metodologie (studie)	
Nitrification in soil – terminology and methodology (review).....	385
Šantrůčková H., Elhottová D., Loiseau P., Soussana F.:	
The effect of elevated ambient CO ₂ and temperature increase on rhizosphere of perennial ryegrass (<i>Lolium perenne</i> L.)	
Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ a teploty na rhizosféru jílku vytrvalého (<i>Lolium perenne</i> L.).....	397
Podlešáková E., Němeček J., Macurová H.:	
Hodnocení zátěže půd rizikovými stopovými prvky mikrobiologickými a biochemickými metodami	
Assessment of soil pollution by microbiological and biochemical methods.....	405
Hasan H. A. H., Abdel-Sater M. A.:	
Responses of mycoflora and sorghum to pre-planting soil incorporation with linuron herbicide	
Reakce mykoflóry a čiroku na předset'ové ošetření půdy herbicidem linuronem.....	417
Žalud Z., Trnka M., Dubrovský M.:	
Stanovení změny produkčního potenciálu jarního ječmene s využitím růstového modelu CERES-Barley	
Change of spring barley production potential using crop model CERES-Barley.....	423
INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ – INFORMATION – STUDY – REPORT	
Zlatanov M., Menkov N.:	
Phospholipid and fatty acid composition of tobacco seeds	
Fosfolipidové a aminokyselinové složení semen tabáku.....	429