



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Bi6420

## Ekotoxikologie mikroorganismů

<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi6420/index.qwarp>

Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

[hofman@recetox.muni.cz](mailto:hofman@recetox.muni.cz)

jaro 2012



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Bi6420: Ekotoxikologie mikroorganismů

## Část 5: Hodnocení reálných společenstev mikroorganismů v prostředí



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Specifika z pohledu ekotoxikologie

- Analýza vlivu stresových faktorů na mikroorganismy v reálném prostředí spočívá především v **hodnocení vlivu na celé populace a společenstva mikroorganismů**
- Taxonomická a genetická **variabilita** ovlivněných populací
- Společenstvo interaguje s kontaminací prostředí jako se **selekčním faktorem**
- Schopnost rychlých fyziologických **adaptací** u určitých částí společenstva (získání značné resistance vůči stresovému faktoru) – selekce **rezistentních forem**
- Vliv stresových faktorů obvykle vyvolá pokles diverzity mikrobiálních společenstev – převaha **tolerantních** skupin
- **Redukce** celkového spektra enzymatických aktivit - nedostatečná mineralizace organické hmoty a její hromadění
- Celková **historie** zkoumaného mikrobiálního společenstva - jinak reaguje na opakované působení stejného faktoru a jinak na zcela nový stresový podnět

# Specifika z pohledu ekotoxikologie

---

- Měření převážně metabolické aktivity – úzký vztah k **funkceschopnosti** dané skupiny z ekologického hlediska
- Celkové **propojení** metabolických drah a návaznost procesů
- Narušení jedné komponenty může vyvolat i zvýšenou aktivitu jiné, jako **kompenzační reakci** - "Stimulace" toxickou látkou byla mnohokrát popsána pro velmi rozdílné populace mikroorganismů
- Pozorované jevy mohou mít více **stochastický** charakter než v kontrolovaných laboratorních podmínkách
- Samotné mikroorganismy mohou **ovlivňovat chemické formy polutantů**, např. mobilizace sorbovaných forem látky či změny specií kovů

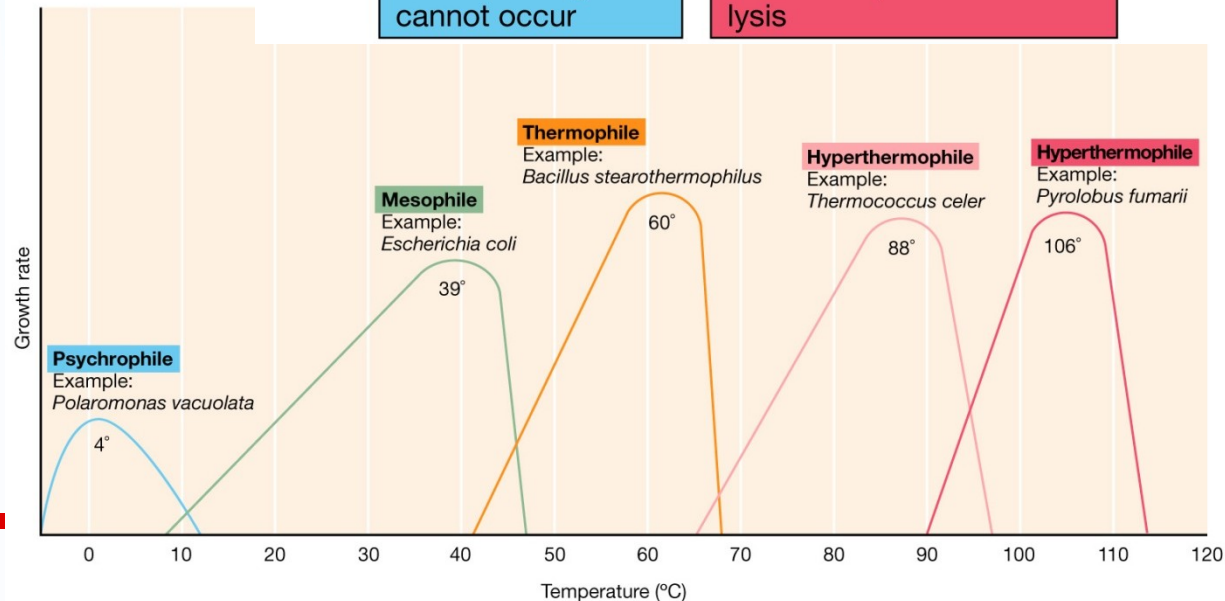
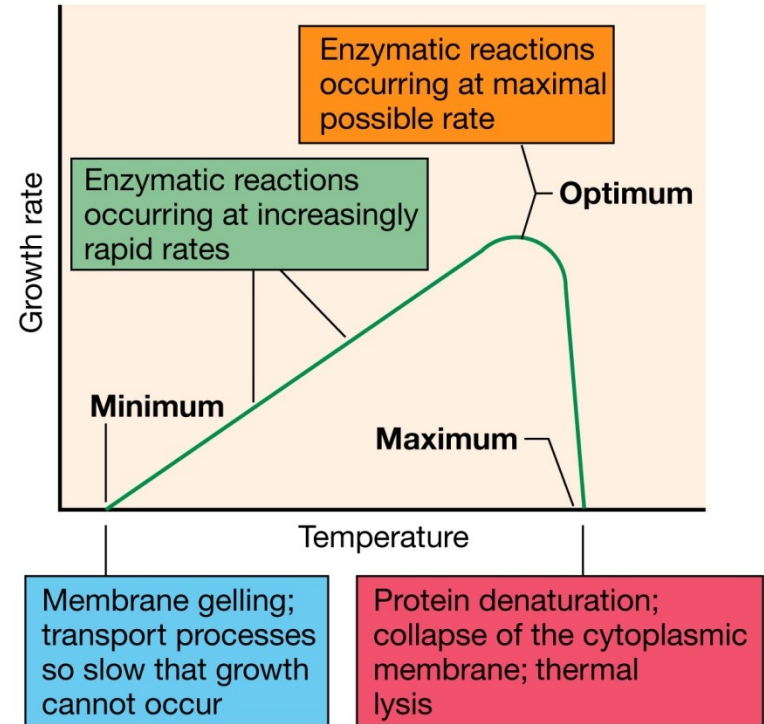


# Specifika z pohledu ekotoxikologie

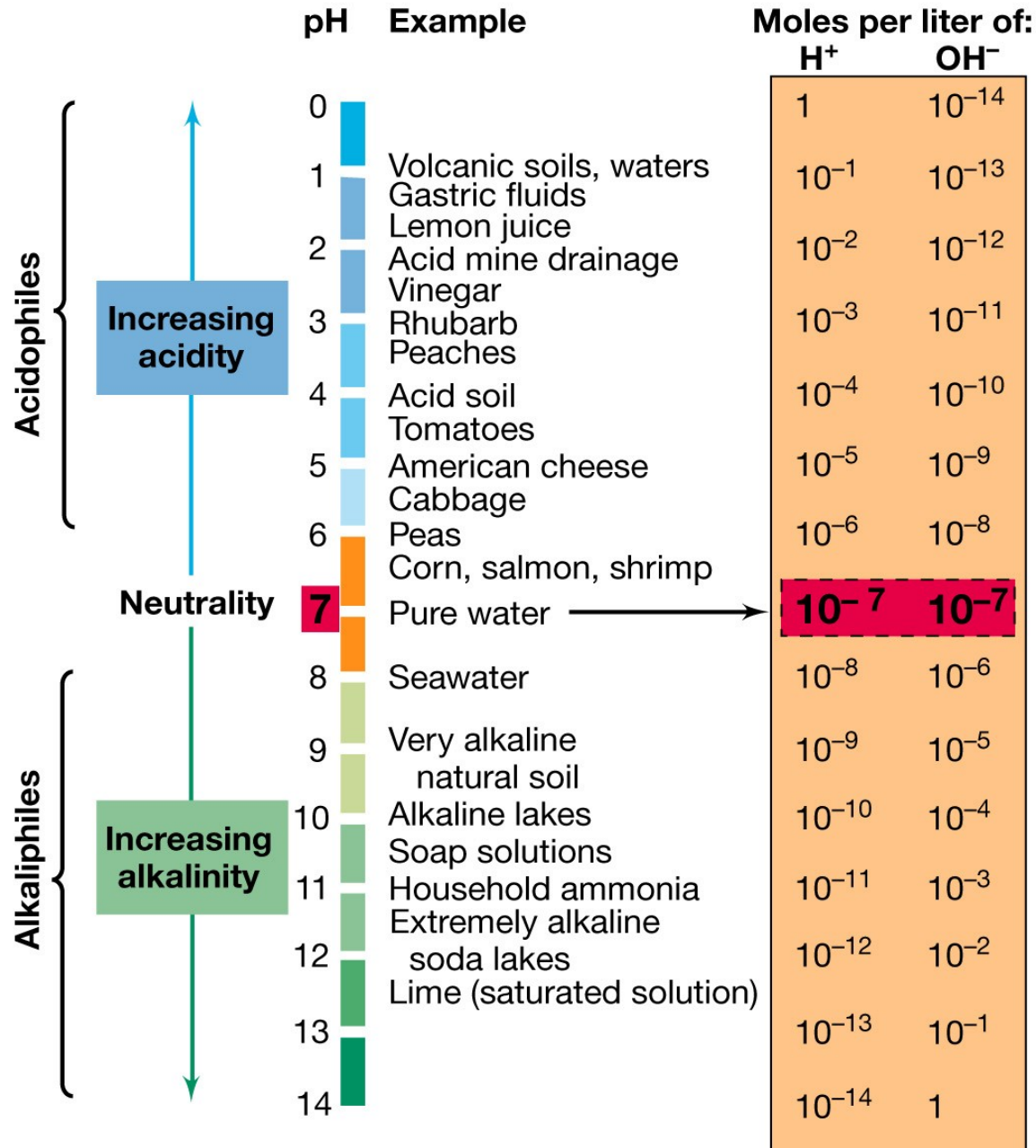
- I v nekontaminovaném prostředí mohou být mikroorganismy vystaveny vlivu **stresových faktorů**
  - I "**přirozené**" **stresové faktory** obdobně jako kontaminace jsou příčinou vyšší udržovací energie mikrobiálního společenstva
  - Suboptimální úroveň parametrů vnějšího prostředí **ovlivňuje i citlivost mikroorganismů** vůči toxickým látkám - ve stresujících přírodních podmínkách jsou mikroorganismy relativně citlivější na jakýkoli dodatečný podnět
  - Působení stresových faktorů vede k **redukci diverzity**, což je spojeno se ztrátou určité části enzymatického vybavení, což vede ke snížené schopnosti společenstva přizpůsobit se působení kontaminující látky (např. degradovat jistý typ látky)
- **Tyto skutečnosti komplikují interpretaci ekotoxikologických studií *in situ*, proto pro odhad vlivu kontaminující látky je nezbytné znát i jistou historii zkoumané lokality**

# Mikrobiální společenstva reálného prostředí

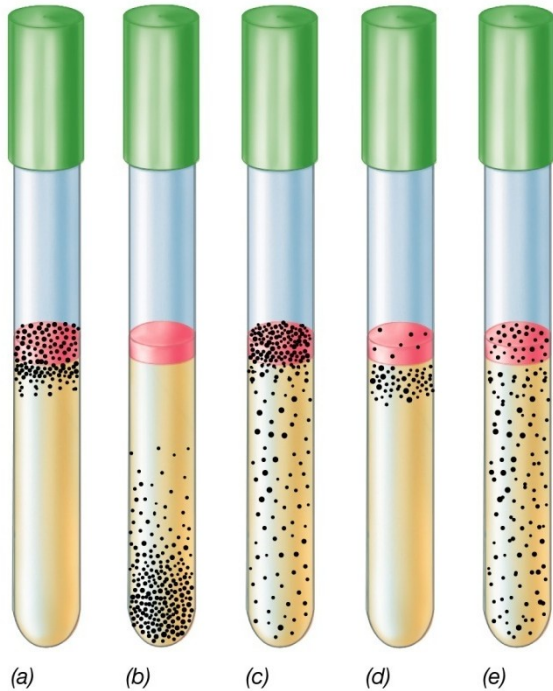
- Faktory prostředí jsou nezanedbatelné – interagují se vztahem mikroorganismus – kontaminant
- Je potřeba brát v potaz:
  - pH
  - redox status (aerobní vs anaerobní prostředí)
  - teplotu
  - vlhkost
  - salinitu
  - přítomnost živin
  - ...



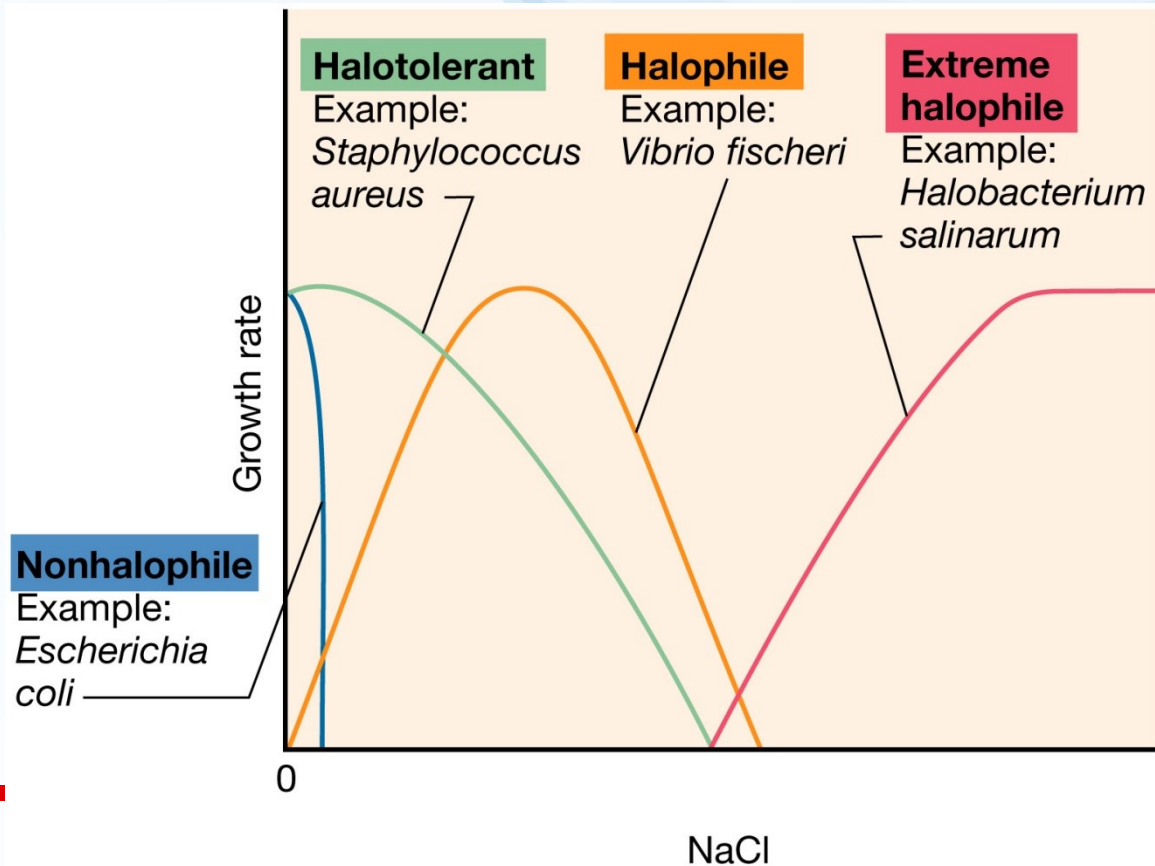
# Mikrobiální společenstva reálného prostředí



# Mikrobiální společenstva reálného prostředí

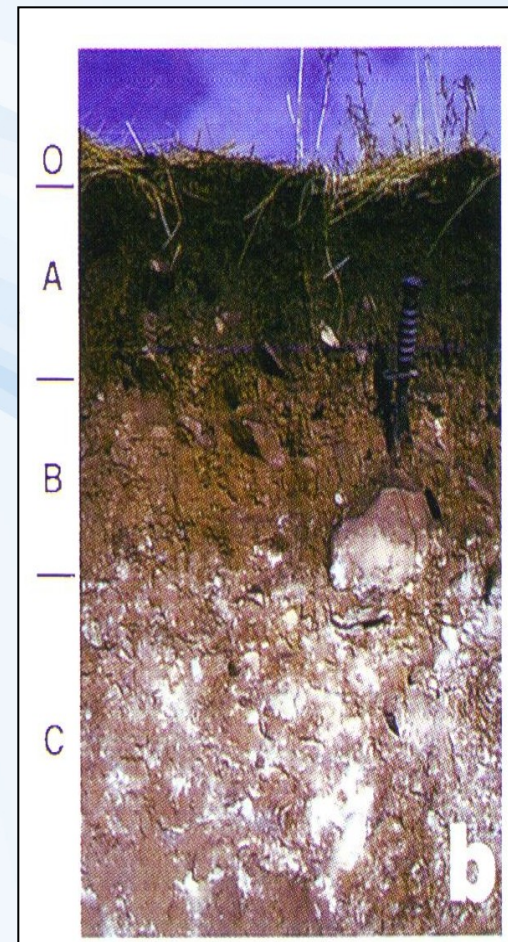
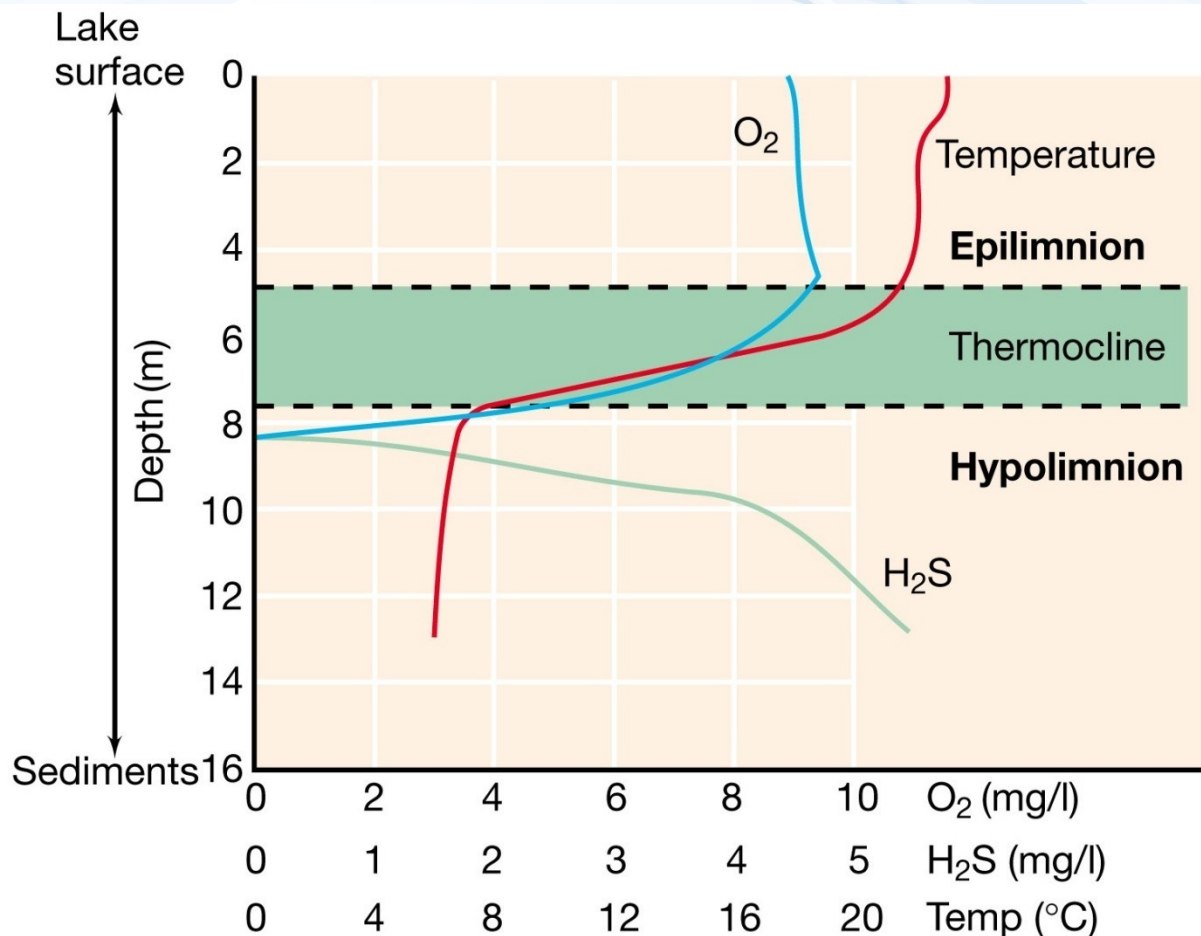


- a. Aerobic
- b. Anaerobic
- c. Facultative
- d. Microaerobic
- e. Aerotolerant





## V reálu nastává kombinace faktorů a důsledkem je stratifikace





Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Mikrobiální společenstva půdy



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Mikrobiální společenstva půdy

## Půda

- už v základní definici půdy je určeno, že půdou je, **pokud je oživená**
- živé organismy jsou jedním z pěti půdotvorných činitelů
- osídlena mikrobiálními společenstvy, rostlinami i živočichy
- složitý a heterogenní komplex
- popsatelný fyzikálními, chemickými, biologickými a pedologickými parametry
- je to dynamický nikoliv statický systém
- význam půdy pro lidstvo je nesmírný
- půda a její stav jsou propojeny s celým terestrickým ekosystémem
- viz. PEDOLOGIE

### O Horizon

An organic horizon composed primarily of recognizable organic material in various stages of decomposition.

### A Horizon

The surface horizon: Composed of various proportions of mineral materials and organic components decomposed beyond recognition.

### E Horizon

Zone of eluviation: Mineral horizon resulting from intense leaching and characterized by a gray or grayish brown color.

### B Horizon

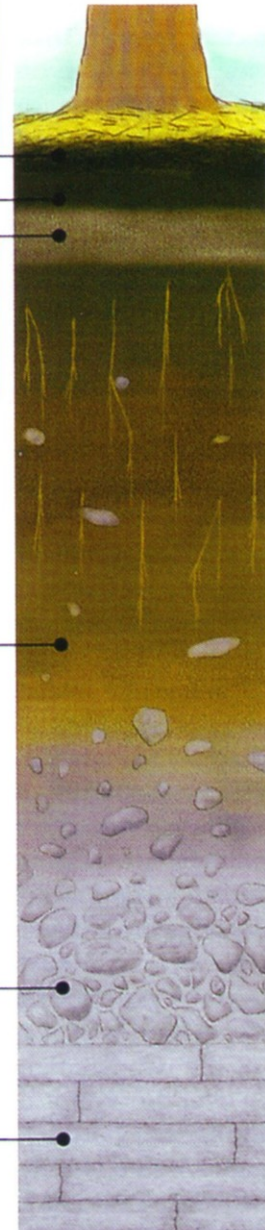
Zone of illuviation: Horizon enriched with minerals, e.g., clay, organic materials, or carbonates, leached from the A or E horizons.

### C Horizon

Horizon characterized by unweathered minerals that are the parent material from which the soil was formed.

### R Horizon

Bedrock.

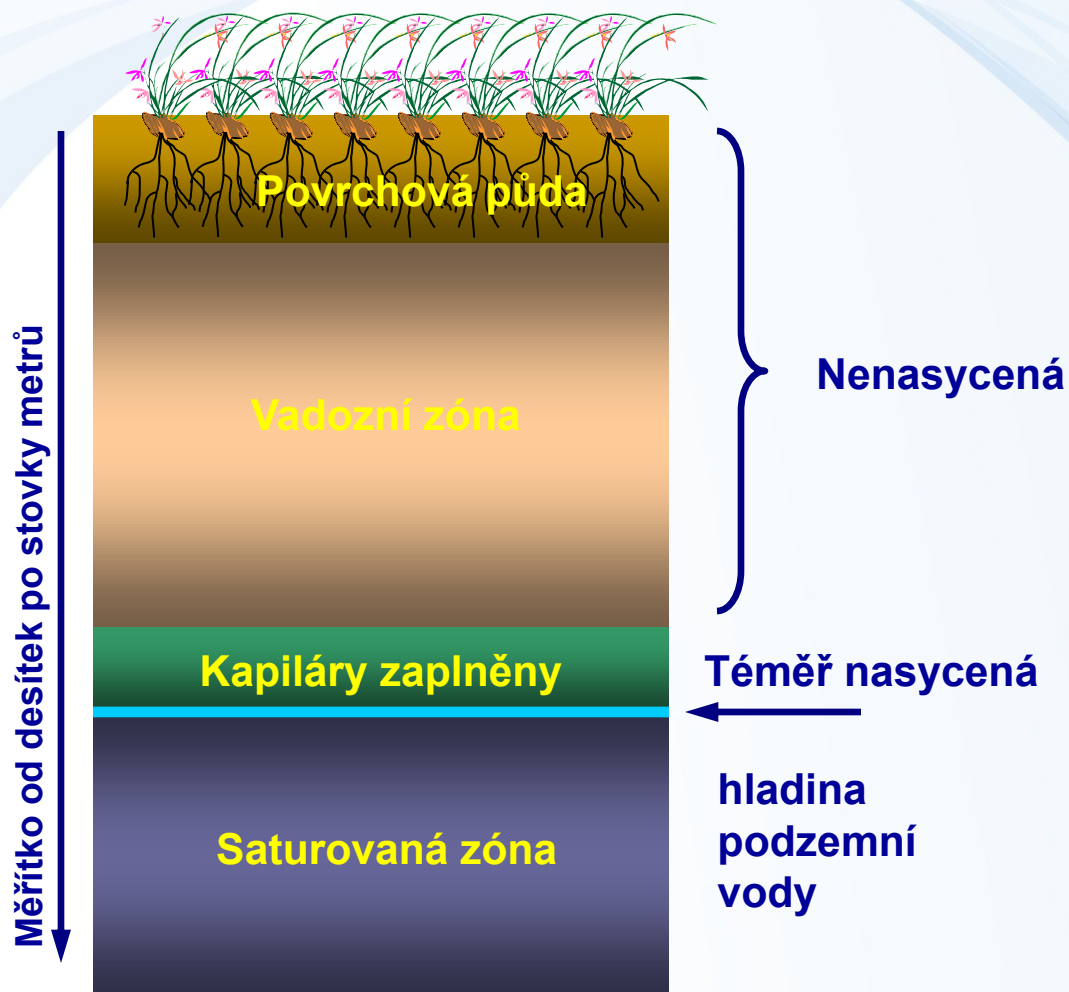




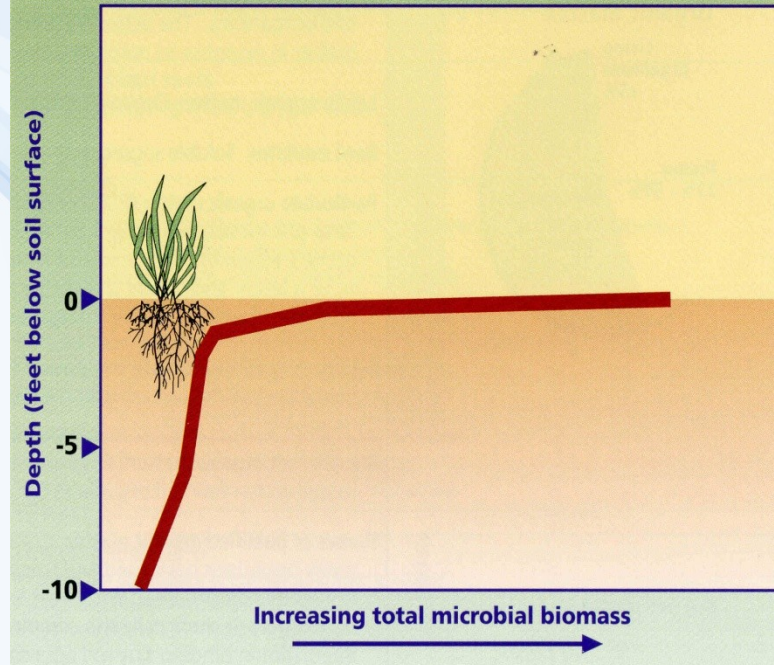
## Rozšíření mikroorganismů v půdě

- determinováno půdou jako prostředím
- obecně se abundance snižuje směrem do hloubky
- **alochtonní** = v půdě přirozené (např. bakterie rodů *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, houby *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* ...)
- **zymogenní** = jen v optimálních podmínkách, rychle rostoucí a silně aktivní (*Bacillus*, bičíkovci, sinice)
- **patogenní** - i pro člověka (*Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus anthracis* apod.)

# Mikrobiální společenstva půdy



## Microbial Biomass Decreases With Depth



## Rozšíření mikroorganismů v půdě

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

# Mikrobiální společenstva půdy

Total number of live and dead bacteria (a), dead bacteria in percent of total bacteria (b), number of bacteria on starch agar (c), and, metabolically active bacteria as a percent of live bacteria (d); numerator – means of 12 to 15 estimates in samples taken in spring, summer and autumn 1981 and 1982, denominator – range of respective data

Material	a $10^9 \cdot g^{-1}$	b <sup>1)</sup> %	c $10^9 \cdot g^{-1}$	d %
Green plants	$\frac{0.650}{0.262-1.126}$	$\frac{8.6}{1.2-12.6}$	-	-
Standing dead matter	$\frac{1.047}{0.423-1.469}$	$\frac{22.6}{14.2-31.8}$	$\frac{0.0146}{0.0035-0.0249}$	$\frac{1.80}{0.98-2.50}$
Aboveground plant litter	$\frac{38.730}{8.576-90.640}$	$\frac{21.8}{16.3-28.2}$	$\frac{3.33}{0.590-9.500}$	$\frac{10.99}{7.99-8.23}$
Roots <sup>2)</sup>	$\frac{11.754}{1.876-24.120}$	$\frac{5.7}{2.4-7.9}$	$\frac{2.889}{0.282-8.555}$	$\frac{25.90}{16.10-39.50}$
Rhizosphere soil	$\frac{7.810}{1.232-14.933}$	$\frac{12.8}{6.2-23.8}$	$\frac{0.880}{0.111-2.539}$	$\frac{13.69}{9.38-20.10}$
Root free soil <sup>2)</sup>	$\frac{1.470}{0.536-2.198}$	$\frac{21.6}{15.1-29.8}$	$\frac{0.035}{0.007-0.077}$	$\frac{2.96}{1.47-4.36}$

Amount (A) and distribution (B) of bacterial biomass in the grassland ecosystem

A	N	NF0	NF1	NF2	RF0	RF1	RF2
Experimental variant:							
g C per m <sup>2</sup> :	14.2	23.5	47.6	36.5	48.7	78.3	57.4
B <sup>1)</sup>	Bacterial biomass		C in the ecosystem				
	g C per m <sup>2</sup>	%	g C per m <sup>2</sup>	%			
Green plants	0.011	0.02	0.15	1.34			
Standing dead matter	0.031	0.02	0.06	0.54			
Aboveground plant litter	0.324	0.73	0.08	0.72			
Root free soil	12.877	29.09	9.22	82.91			
Rhizosphere soil	28.996	65.50					
Roots	2.049	4.63	1.61	14.48			
Ecosystem total	44.288	100.00	11.12	100.00			

<sup>1)</sup> ) mean of all experimental variants



# Mikrobiální společenstva půdy

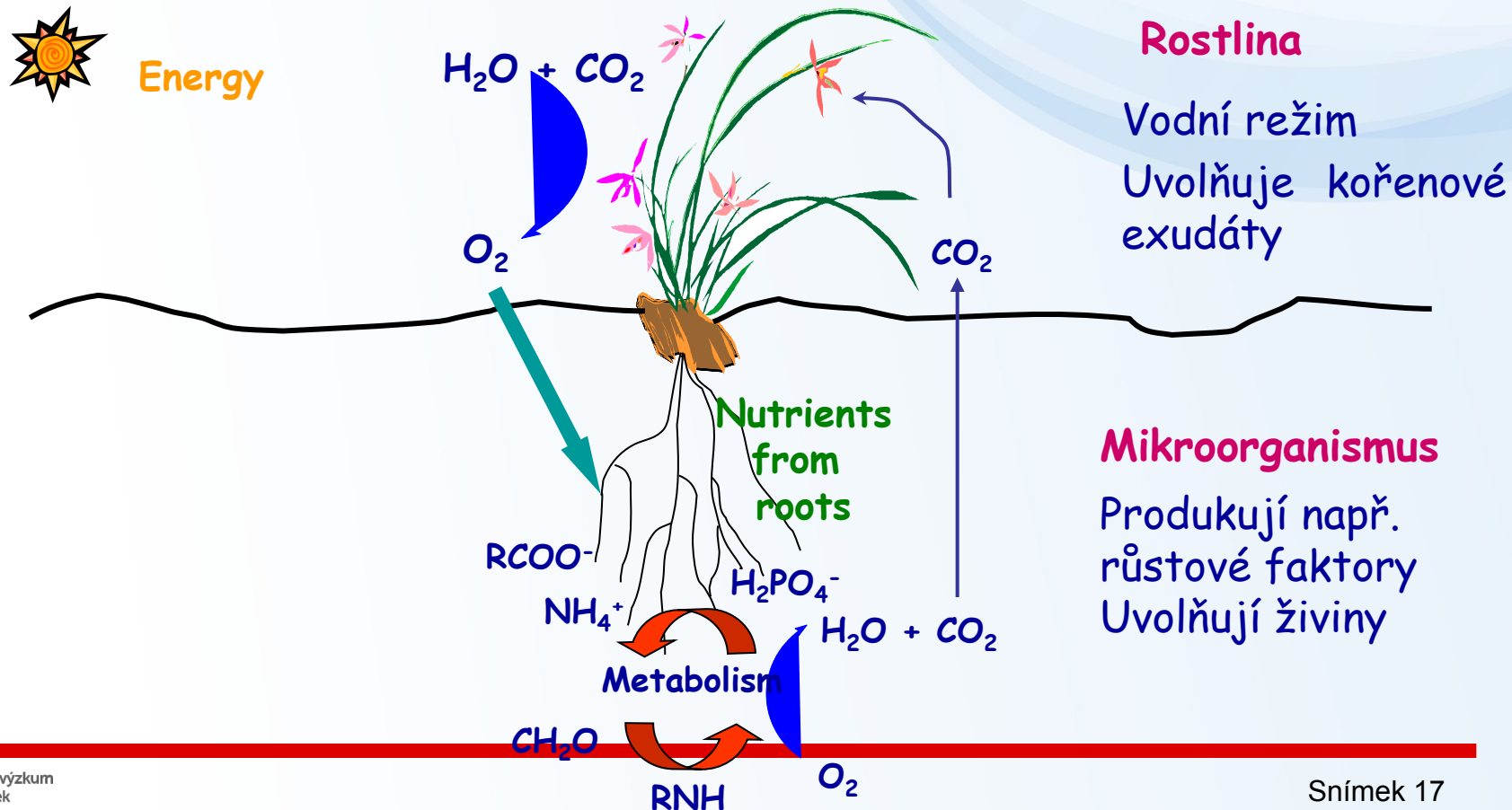
Presence of different physiological groups of micro-organisms in the grassland ecosystem. Means for all variants

		Spore-forming $10^7 \cdot g^{-1}$	N fixators $10^3 \cdot g^{-1}$	Oligotrophs $10^7 \cdot g^{-1}$	Oligonitrophils $10^7 \cdot g^{-1}$	Cellulolytic $10^6 \cdot g^{-1}$
Green plants	$\bar{x}$	0.21	0.47	0.39	2.21	0.136
	$s_{\bar{x}}$	0.12	0.41	0.29	0.97	0.129
	V %	55.2	87.2	73.4	43.7	95.2
Standing dead matter	$\bar{x}$	0.34	11.01	1.20	5.03	0.365
	$s_{\bar{x}}$	0.45	6.55	1.22	5.00	0.371
	V %	133.5	59.5	101.6	99.5	101.6
Litter	$\bar{x}$	12.67	43.04	192.47	181.02	221.6
	$s_{\bar{x}}$	7.87	37.24	147.23	124.19	97.1
	V %	62.1	86.5	76.5	68.6	43.8
Roots	$\bar{x}$	17.64	23.13	159.07	168.43	0.63
	$s_{\bar{x}}$	16.98	15.52	106.6	123.02	0.29
	V %	96.3	67.1	67.00	73.0	46.5
Rhizosphere soil	$\bar{x}$	12.25	14.63	85.46	87.29	3.99
	$s_{\bar{x}}$	19.00	12.11	97.00	84.91	2.53
	V %	155.15	82.8	113.50	97.30	63.4
Root-free soil	$\bar{x}$	0.91	8.73	11.88	6.57	0.10
	$s_{\bar{x}}$	1.04	8.42	13.38	5.22	0.05
	V %	106.1	96.4	112.7	79.50	50.0

# Mikrobiální společenstva půdy

## Ekologická vazba mikroorganismů na kořeny rostlin

je založena na tom, že v okolí kořenů je jiné prostředí než jinde v půdě  
tzv. **RHIZOSFÉRA**



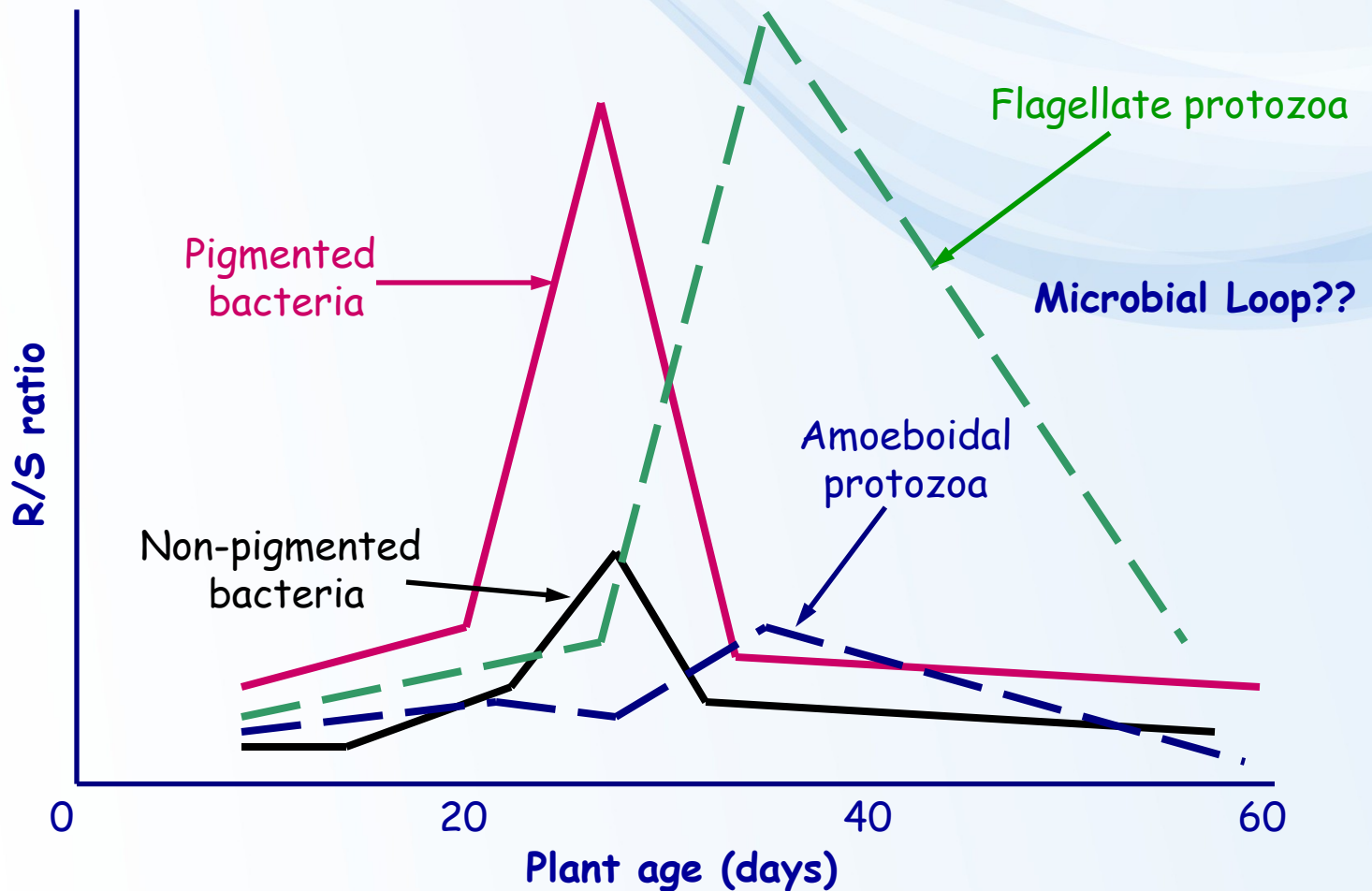


# Mikrobiální společenstva půdy

R/S poměr = počet mikroorganismů v rhizosféře (R) ku množství v půdě (S)

Normální půdy 5-20, (100) = 5-20 x více buněk v rhizosféře

Vliv má druh rostliny a její stáří



Dle K.T. Semple



## Rhizosféra

- ↑ vyšší počty Gram negativní, tyčkovité bakterie
- ↓ nižší množství G-, koků a pleomorfních bakterií
- Relativně abundantní jsou pohyblivé, rychle rostoucí bakterie např. *Pseudomonas* spp
- Kořenové exudáty
  - aminokyseliny
  - keto kyseliny
  - vitamíny
  - cukry
  - taniny
  - alkaloidy

# Mikrobiální společenstva půdy

Location: High-altitude plateau in Arizona.

Vegetation: Pine forest.

Uses: Timber.

Horizon Notes

O Pine needles in various stages of decomposition.

A Shallow horizon enriched with humic materials.

E Leached horizon with less organic matter and clay than the horizons above and below it.

B Horizon marked by accumulated clays: some limestone parent material present in the lower part.



Location: Montana.

Vegetation: Grassland.

Uses: Wheat farming.

Horizon Notes

O Native grass residues.

A Moderately deep zone of built-up humic materials.

B Horizon of heavy clay accumulation.

C Calcareous glacial till parent material.



Location: South-eastern desert of Arizona.

Vegetation: Creosote.

Uses: Limited grazing.

Horizon Notes

A Shallow A horizon with a small amount of organic material.

C Alluvial deposits. The numbered horizons, C1–C5, here denote successive deposition events that vary significantly in mineral composition and texture.

A

C1

C2

C3

C4

C5



**Obrovská variabilita půdních typů a druhů**

**Obrovská variabilita vlastností půd a lokalit**

**Sezónní variabilita**

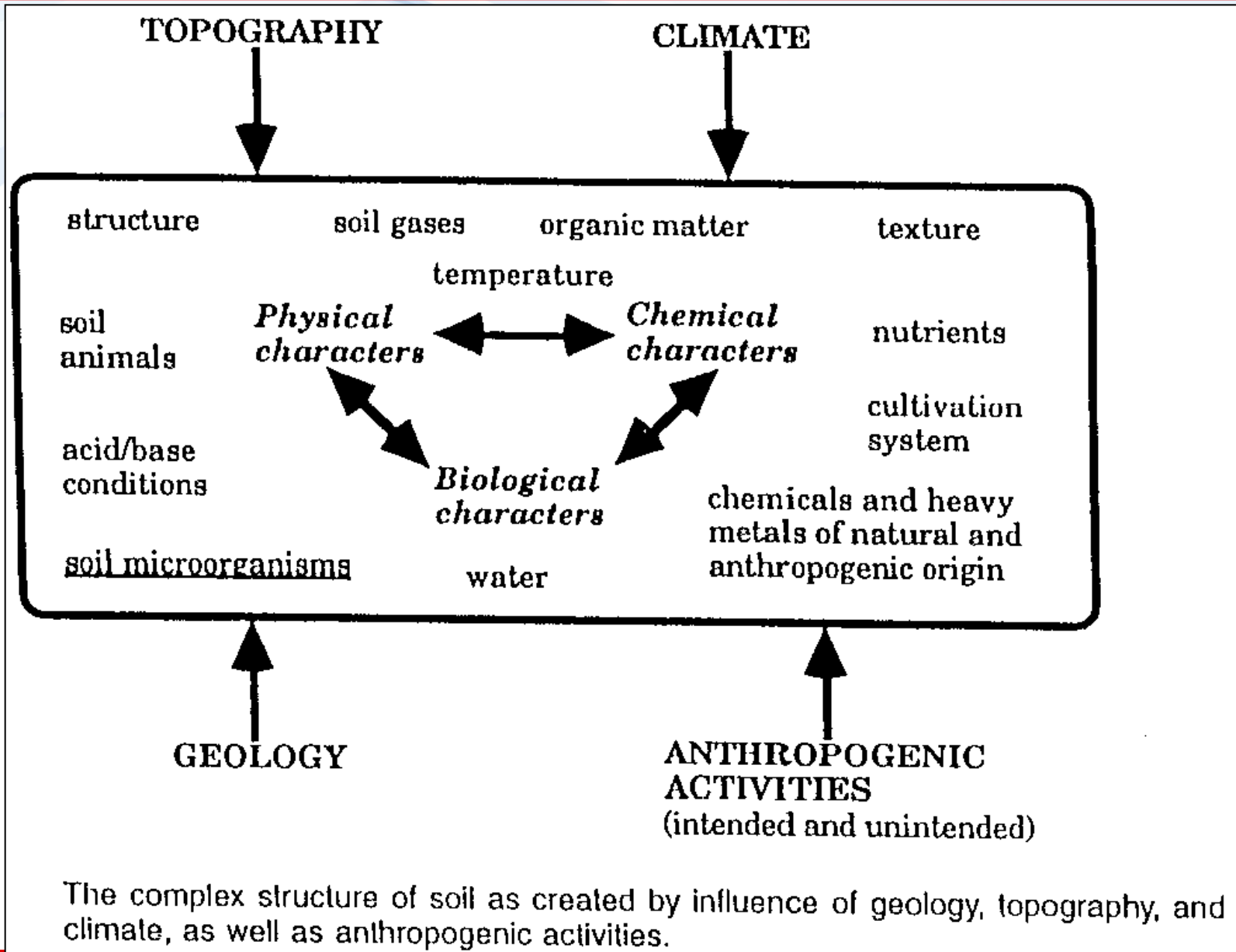
**→ vliv na množství, aktivity a složení mikrobiálního společenstva**



## Mikroorganismy jsou v interakci s vlastnostmi půdy

- nutriční vlastnosti půdy (zdroj živin pro mikroorganismy)
- fyzikálně-chemické vlastnosti: teplota, pH, vlhkost, redoxní potenciál, obsah jílu, složení půdního vzduchu, půdního roztoku, kontaminanty atd.
- struktura půdy, sorpční komplex, půdní typ, půdní druh, využití půdy atd.
- půdní roztok
- půdní vzduch (N: 78-80%; O<sub>2</sub>: 0,1-20%; CO<sub>2</sub>: 0,1-15%)
- sorpce/desorpce; půdní komplex; biodostupnost substrátů a kontaminantů
- mikroorganismy samy sorbují (G+ více než G-); jíl zvyšuje sorpci
- na povrchích částic se sorbují substráty i extracelulární enzymy (urychlení reakcí a zvýšení stability extracelulárních enzymů)
- vlastnosti působí buď přímo, či nepřímo
- vliv sezón

# Mikrobiální společenstva půdy



## Nutriční vlastnosti půdy

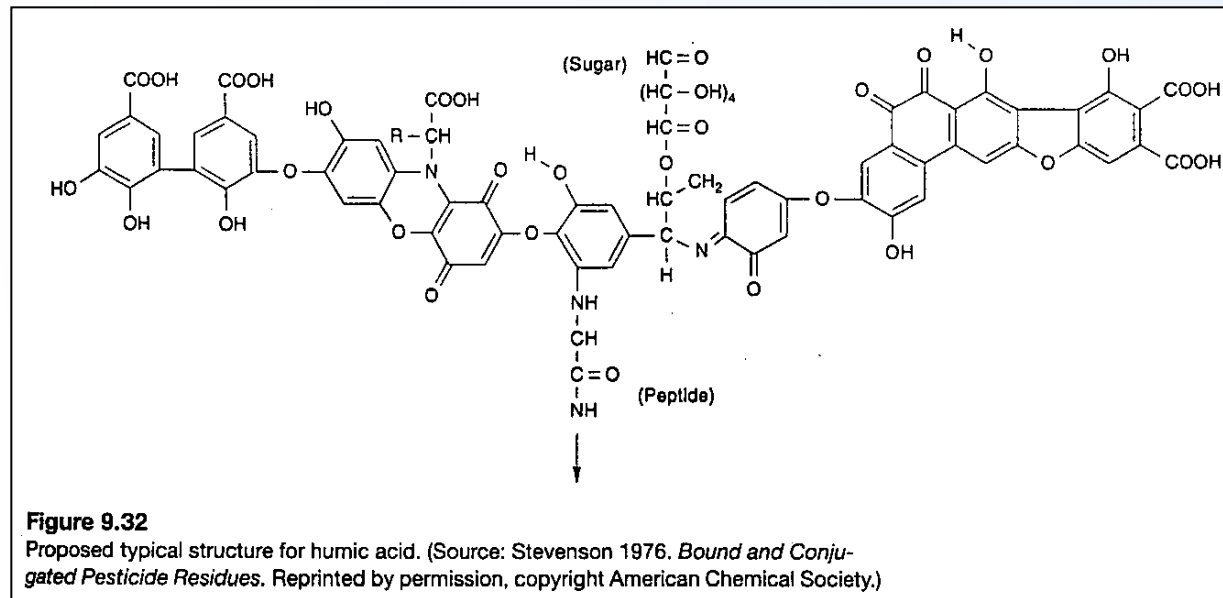
- zdroj energie (dle metabolické strategie)
- koncový akceptor elektronů
- makronutrienty (hlavně zdroj uhlíku), organická hmota pro chemoorganotrofy
- růstové faktory
- stopové prvky
- mají vliv na růst a aktivitu mikroorganismů

## Organická hmota

- hlavní faktor určující chování mikroorganismů v půdě s je zároveň produktem mikrobiálních aktivit
- mikrobiální biomasa = velmi malá, ale dynamická část celkové org. hmoty
- většina ekosystémů je limitována v přísunu organické hmoty
- množství lehce dostupné org. hmoty - základní příčina (i sezónních) fluktuací aktivit
- organická hmota může tlumit toxický účinek polutantů
- charakter organické hmoty určuje i mobilitu polutantů v půdní matici

## Organická hmota v půdě

- je stěžejní pro mikrobiální aktivity jako zdroj živin (makronutrientů) a zdroj energie
- lze parametrizovat pomocí: OM, TOC, C<sub>org</sub>, EX-C, HA:FA, Q<sub>4/6</sub> apod.
- vytváří organominerální komplex
- největší frakce organického uhlíku vstupujícího do půdy jsou zbytky rostlin
- cukry (amyloza, amylopektin, celuloza), lignin, tuky a voskové látky, proteiny a jiné látky obsahující N, buněčné stěny organismů, látky vylučované kořeny
- humusové látky (huminové kyseliny, fulvokyseliny a humíny)



## Vlhkost

- voda je potřeba pro fungování většiny metabolických procesů
- optimální vlhkost „spouští“ fungování mikroorganismů
- vlhkost ovlivňuje výměnu plynů v půdě
- ovlivňuje přístupnost nutrientů
- ovlivňuje teplotu půdy
- vytváří mikroprostředí pro mikroorganismy vpórech a na povrchích částic

## Měření půdní vlhkosti:

WHC (water holding capacity) plus stanovení sušiny



## Redoxní potenciál

- různé metabolické strategie mají různé požadavky
- dýchání ( $>0,2$  V); denitrifikace ( $0,15-0,2$  V); redukce síry ( $-0,1$  až  $-0,2$  V)

## pH

- ovlivňuje přímo mikroorganismy
- nepřímo skrze vliv na chování např. kovů v půdě
- měření ve vodném výluhu či KCl
- souvisí s kationtovou výměnnou kapacitou (CEC)
- extrémní pH může mikroorganismy značně stresovat

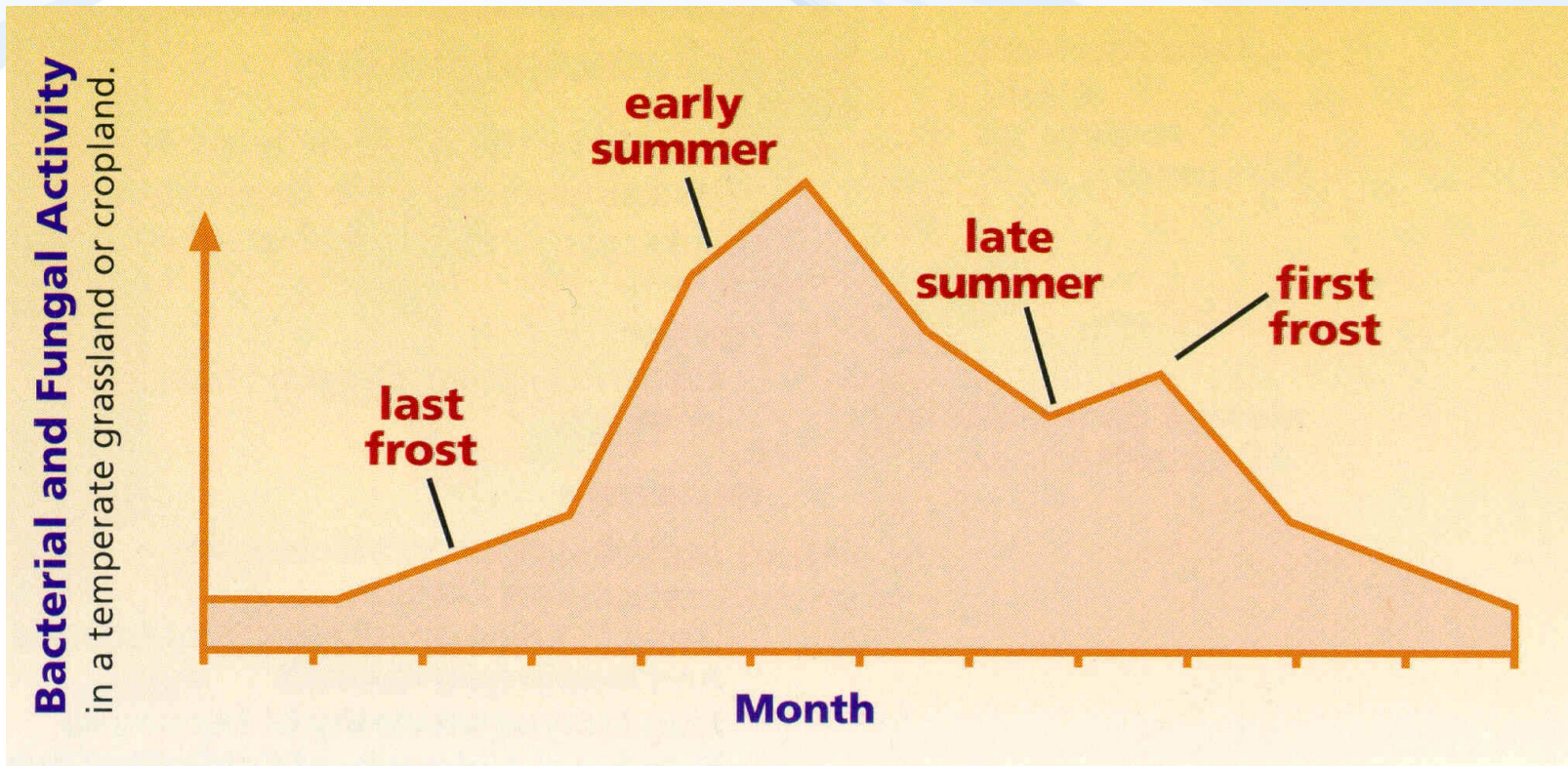
## Jíl

- fyzikální vlastnosti: velký aktivní povrch
- chemické vlastnosti: určují vlastnosti aktivního povrchu
- vazba s organickou hmotou
- sorpce a desorpce substrátů, enzymů, mikroorganismů a polutantů
- sekundární minerály (chemicky zvětralé); vodnaté silikáty = jílové minerály
- prvořadým činitelem, na němž závisí spektrum jílových minerálů v půdě je matečná hornina
- fyzikálním jílem nazýváme minerální podíl s velikostí zrn menší než 2  $\mu\text{m}$
- vysoký obsah jílu podporuje rychlejší nárůst biomasy při dodání substrátu
- absorpce živin a snížení úrovně dekompozice, stabilizace pH a ochrany mikroorganismů proti jejich predátorům
- C z mikrobiální biomasy často koreluje s obsahem půdních jílu
- snižuje inhibiční účinek polutantů na mikroflóru
- ovlivňuje půdní strukturu
- chrání mikroorganismy před predátory

## Agregáty

- mikroagregáty  $< 50 \mu\text{m}$  a makroagregáty  $> 50 \mu\text{m}$
- strukturní elementy jsou do agregátů poutány silami molekulárními, či pomocí tmelů (minerální sol v gel; koagulace a peptizace)
- vzniká organominerální komplex půdy, základ agregátové formace
- předchozí úrovně se pak spojují hlavně kořeny a hyfami hub do mikroagregátů spolu se zrny prachu, písku a v nich jsou také uzavřeny mikroorganismy
- vznikají tzv. imobilizované biologické systémy
- agregace je jeden z nejvýznamnějších faktorů kontrolujících mikrobiální aktivitu a obrat organického materiálu v půdě
- většina mikroorganismů žije mimo agregáty a v malých pórech mezi nimi, relativně malé množství uvnitř
- půdní agregáty ovlivňují interakci enzymů s jejich substráty
- adsorbované enzymy jsou chráněné proti hydrolýze způsobené jinými enzymy

## Sezonní variabilita





# Mikrobiální společenstva půdy

## Význam půdních parametrů při hodnocení rizik pro půdní mikroflóru

### Vliv kontaminace půdy na mikroflóru je podmíněn přítomností biologicky dostupných forem kontaminátů

Klíčovou otázkou je, která forma toxických látek je dostupná pro mikroflóru, především při srovnávání různých úrovní kontaminace u různých půd.

### I v nekontaminované půdě mohou být mikroorganismy vystaveny vlivu "přirozených stresových faktorů,,

Např. v důsledku změn teploty, půdní vlhkostí, přísunu organické hmoty atd. - klíčem k poznání jejich vlivu je znalost půdních parametrů. **V stresujících přírodních podmínkách jsou mikroorganismy relativně citlivější na jakýkoli dodatečný podnět.**

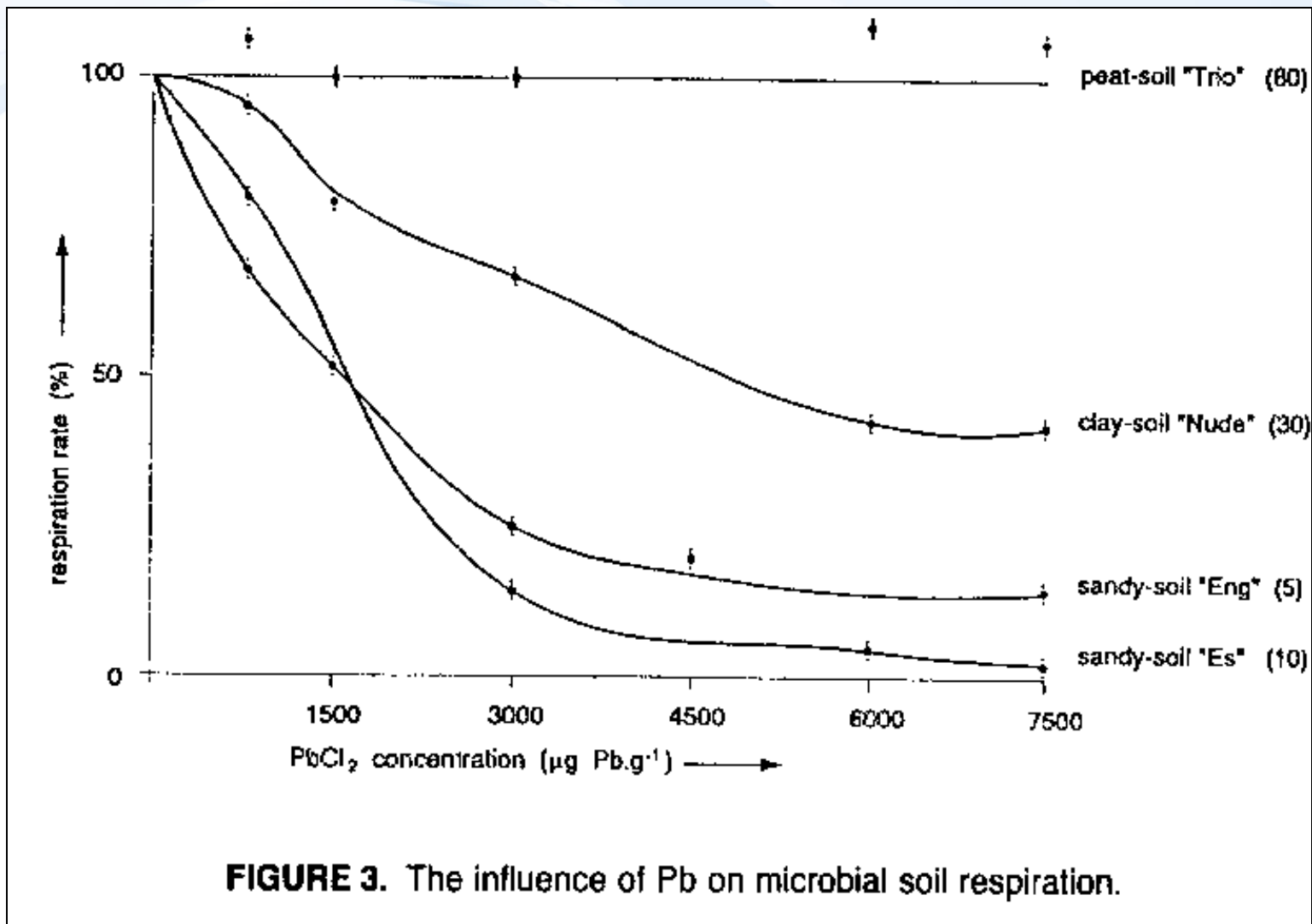
### Vstup a setrvání cizorodých látek v půdě ovlivňují fyzikálně chemické parametry půdního prostředí

Je třeba rozlišovat chování silně hydrofilních látek, které jsou z půdní matrice rychle vymývány a látek hydrofobních, které se mohou akumulovat již ve svrchním horizontu půd.

### Obecně je třeba současně s mikrobiálními parametry hodnotit:

- Filtrační schopnosti půdy a její sorpční kapacitu
- Pufrační schopnost půdy
- Charakter a rozsah chemických transformací toxických látek v půdě

# Mikrobiální společenstva půdy



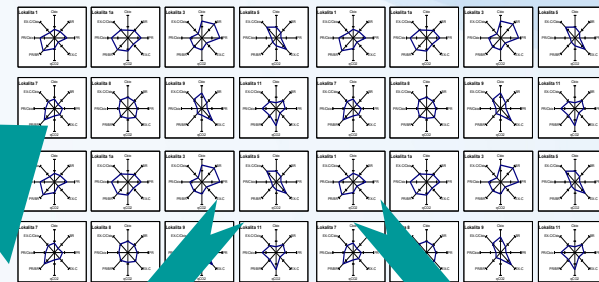
**FIGURE 3.** The influence of Pb on microbial soil respiration.



# Mikrobiální společenstva půdy

## MONITORING OF SOILS AROUND CZECH HIGHWAYS

- Environmental study carried out in 1999 by RECETOX and co-operating companies
- Total 34 soil samples from different ecosystems (grasslands, arable, forest ...)
- Sampling at several distances from the highway (1 - 500 m)
- Also contamination with heavy metals and POPs was measured



**13 soils with  
GOOD  
biological  
quality**

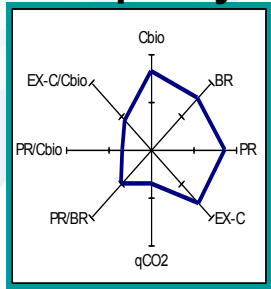
**13 soils with  
BAD  
biological  
quality**





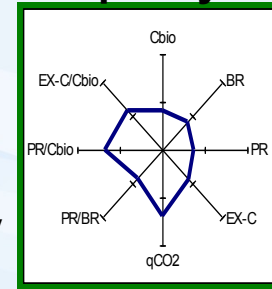
# Mikrobiální společenstva půdy

## soils with GOOD biological quality

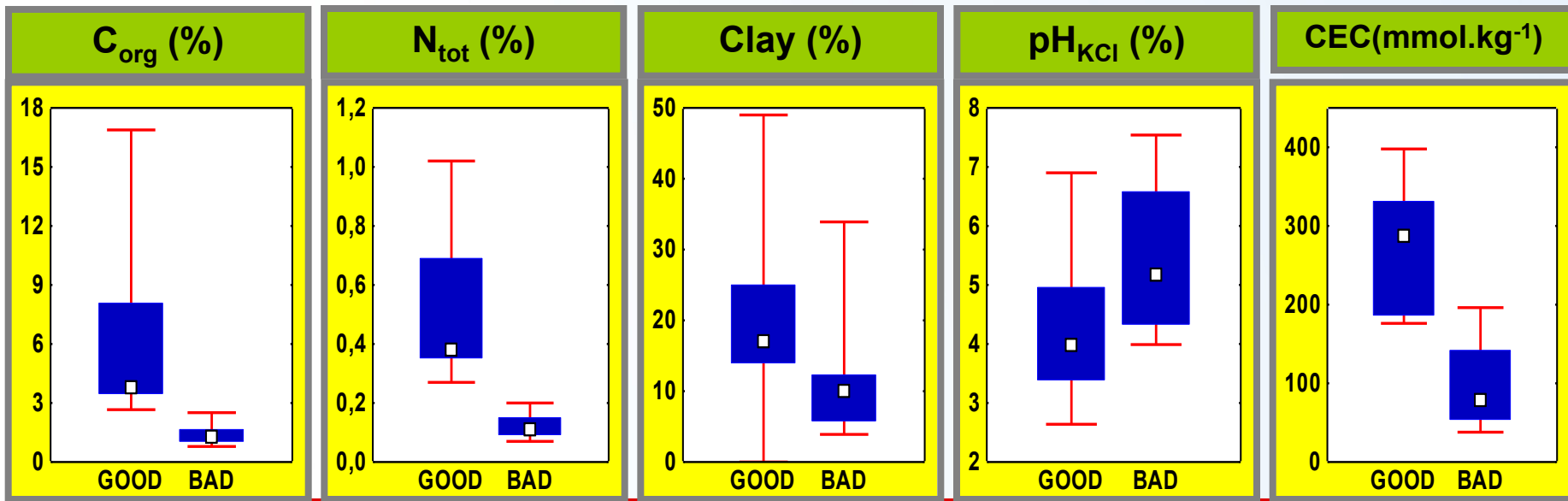


- mostly forest and grasslands soils
- farther from highway
- higher content of  $C_{org}$
- higher content of  $N_{tot}$
- higher content of clay
- lower pH
- higher CEC

## soils with BAD biological quality



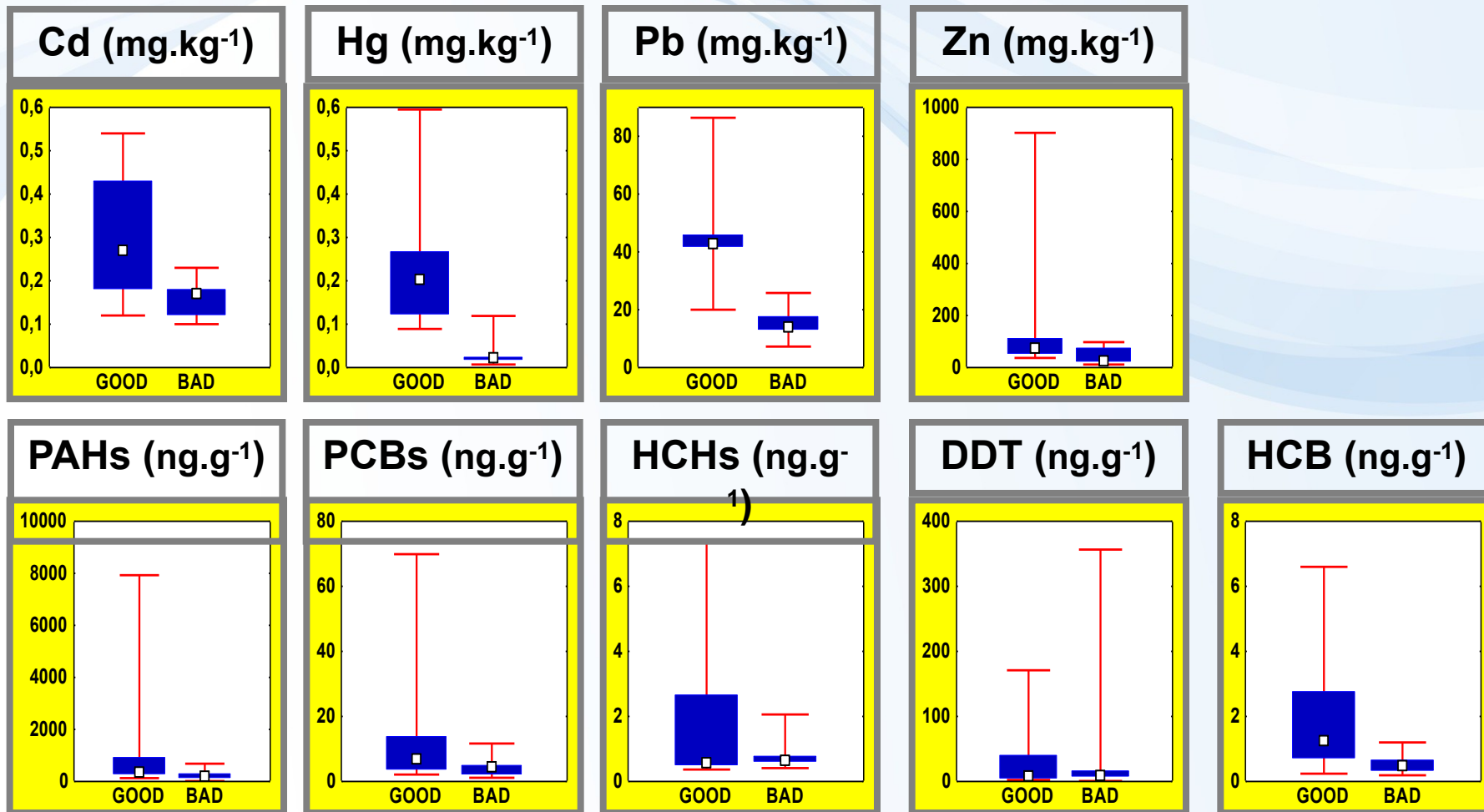
- mostly arable soils
- near to highway
- lower content of  $C_{org}$
- lower content of  $N_{tot}$
- lower content of clay
- more neutral pH
- lower CEC





# Mikrobiální společenstva půdy

**CONTAMINATION:** surprisingly, soils with **GOOD** biological quality display higher values of heavy metals and POPs !



- Is there possible long-term stimulation with slightly higher contamination?
- Is this only co-occurrence of both events caused by higher C<sub>org</sub> and clay contents?

## Shrnutí:

Parametry půdní prostředí mění osud a rizikovost půdní kontaminace

Parametry půdní prostředí určují i stav půdních mikrobiálních společenstev a ovlivňují tak jejich citlivost na stresové faktory

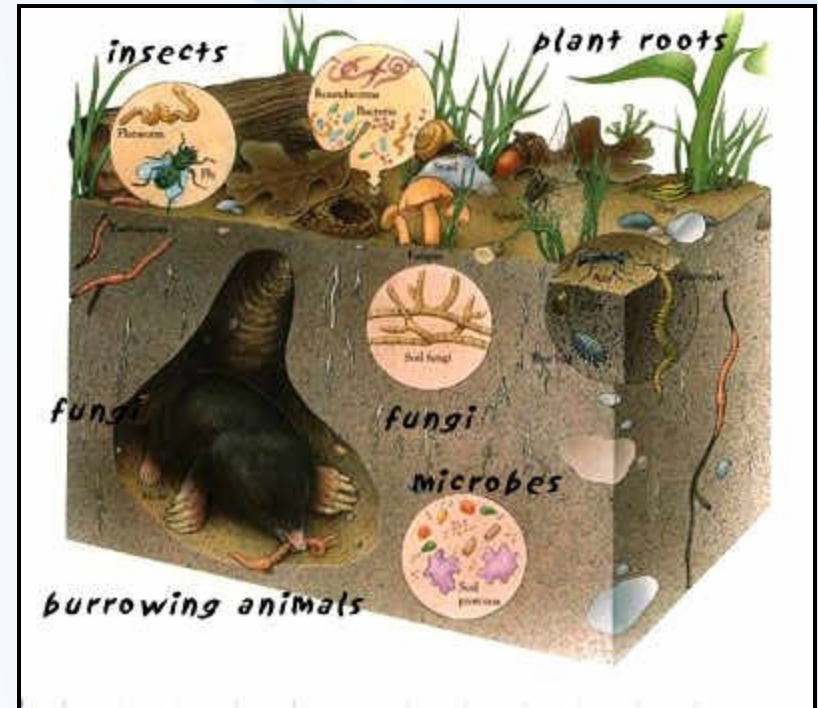
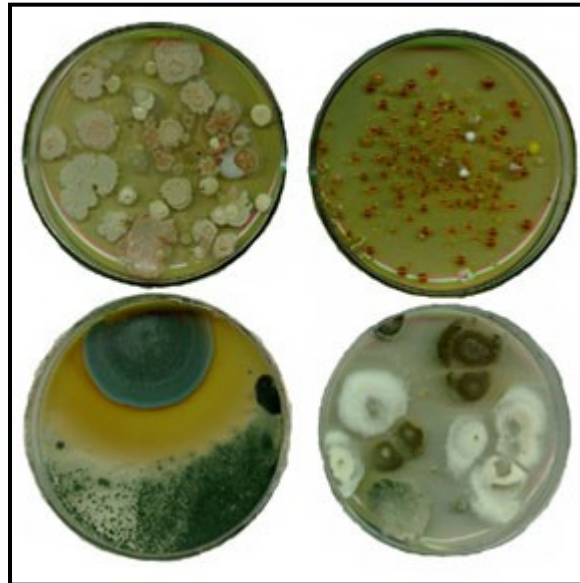
Charakteristika fyzikálně-chemických parametrů půdy je tedy nezbytnou součástí každé ucelené studie hodnotící rizika pro půdní prostředí.

Stějně důležitá je znalost pedologických charakteristik (půdní typ) a také využití lokality, potažmo vegetačního krytu (OP × TTP × LP)

# Mikrobiální společenstva půdy

**Mikrobiální společenstvo půdy =**

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



## Biomasa v půdě

Components of soil biota	Biomass (tons ha <sup>-1</sup> )
<b>Plant roots</b>	<b>Up to 90, but generally 20</b>
<b>Bacteria</b>	<b>1-2 !!!!</b>
<b>Actinomycetes</b>	<b>0-2</b>
<b>Fungi</b>	<b>2-5 !!!!</b>
<b>Protozoa</b>	<b>0.5</b>
<b>Nematodes</b>	<b>0.2</b>
<b>Earthworms</b>	<b>0.25</b>
<b>Other soil animals</b>	<b>0-0.5</b>
<b>Viruses</b>	<b>Negligible</b>

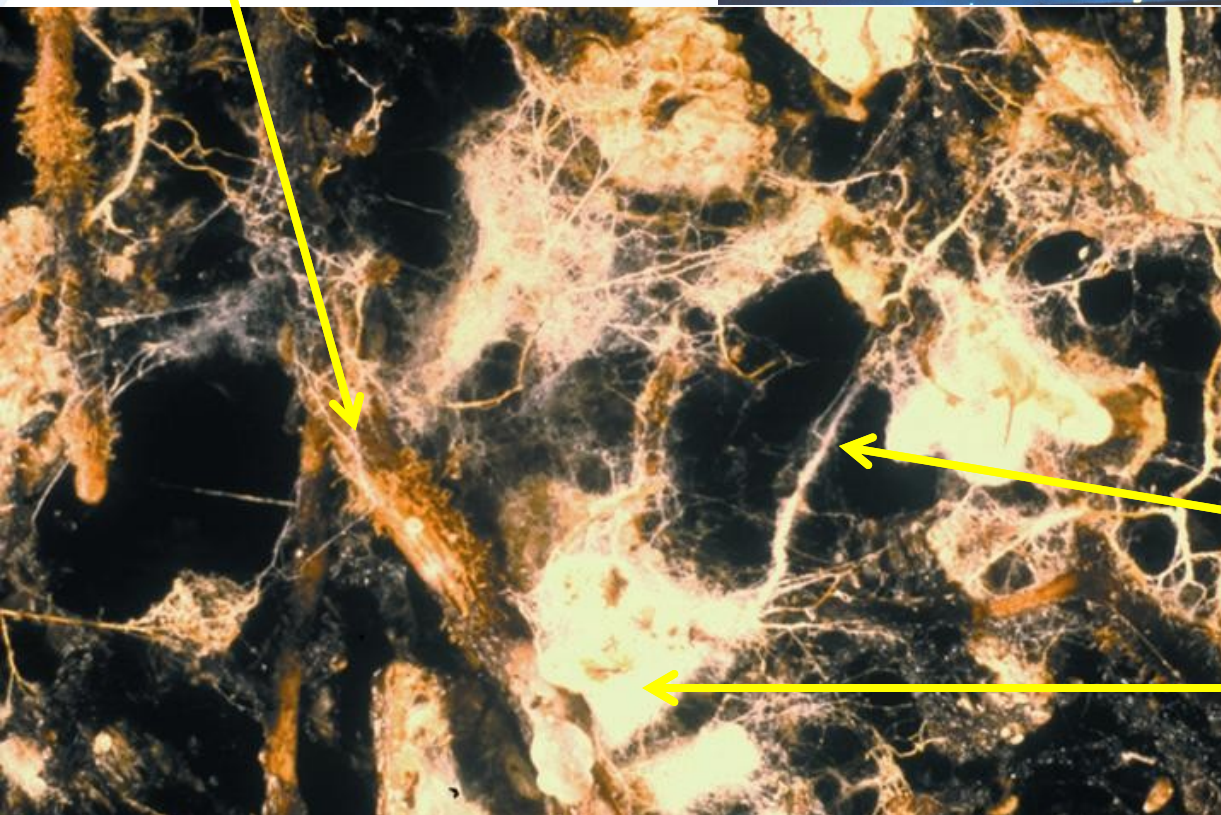


## Bakterie

- V půdě jsou nejpočetnější
- Mohou být aerobní i anaerobní (prostorová distribuce v půdě)
- Optimální pH 6-8
- Nejvíce metabolických možností – vysoká diverzita aktivit a funkcí

## Mykorrhiza

Kořen  
stromu



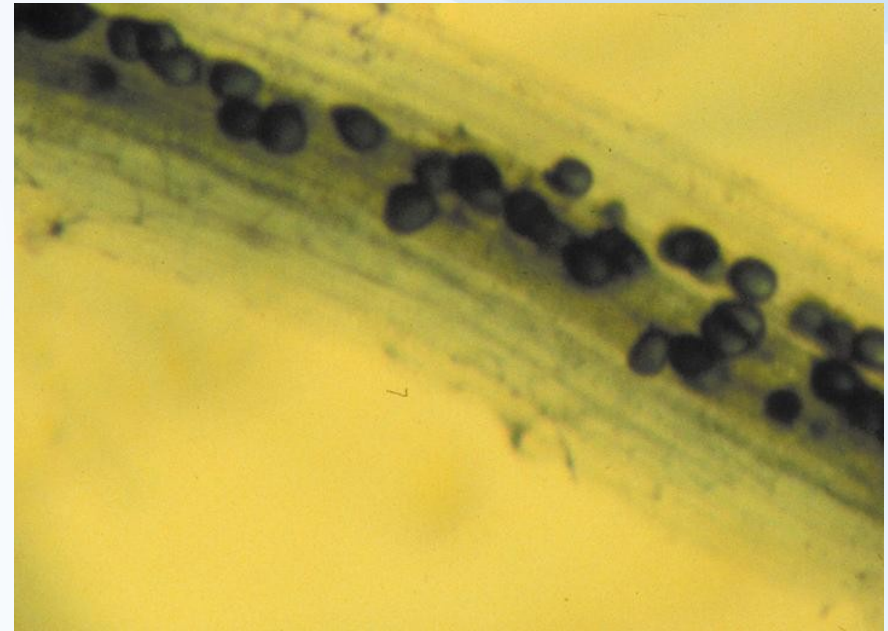
Vlákno  
houby

Mykorrhizní  
struktura

## Sledování arbuskulární mykorrhizy

houba (AM) roste intra- a intercelulárně na kořenech rostliny - několik typů, různé morfologie i fungování

houba získává z rostliny veškerý organický uhlík (až 10-20%  $\text{CO}_2$  asimilovaného rostlinou); oproti tomu rostlina získává minerální živiny (P, N, K, Ca, Mg, Zn a Cu) z houby

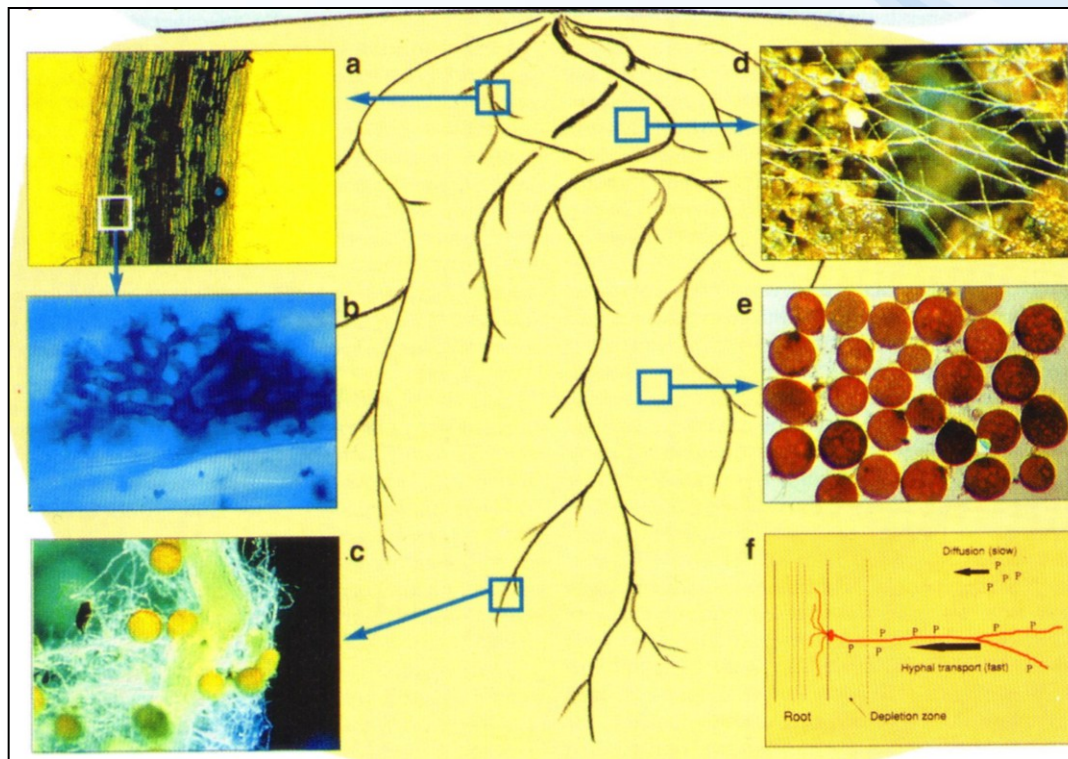






# Arbuscular Mycorrhiza in Soil Quality Assessment

- Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi constitute a living bridge for the **transport of nutrients from soil to plant roots**, and are considered as the group of soil microorganisms that is of most direct importance to nutrient uptake by herbaceous plants.
- AM fungi also contribute to the formation of soil aggregates and to the **protection of plants against drought and root pathogens**.
- Assessment of **soil quality, defined as** the capacity of a soil to function within ecosystem boundaries to sustain ecological productivity, maintain environmental quality, and promote plant health, should therefore include both quantitative and qualitative measurements of this important biological resource.
- Example of the application of these methods to assess the impact of pesticides on the mycorrhiza.

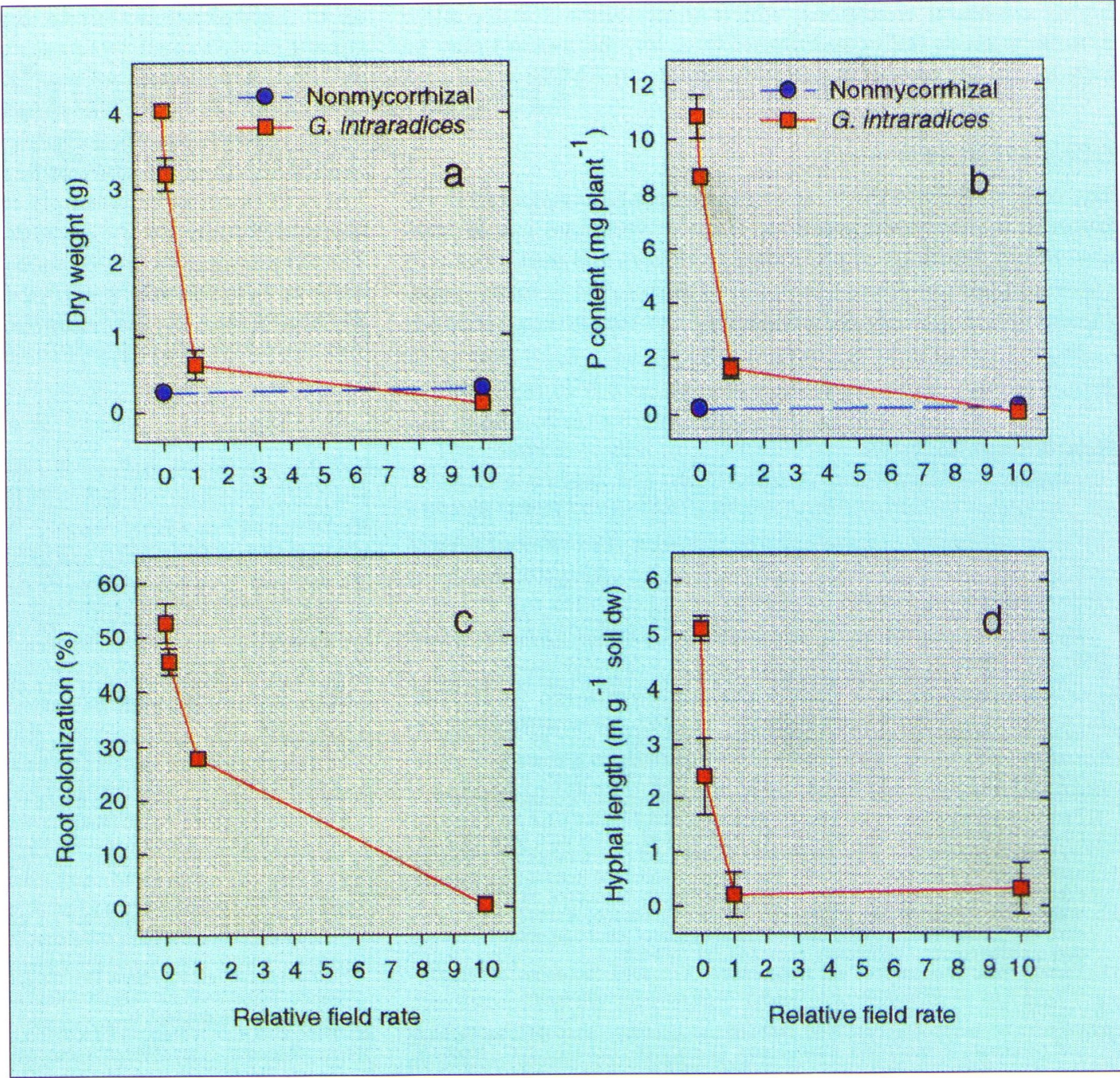




**Endpoints**

- a) Sušina rostlin
- b) celkový obsah fosfátů
- c) kolonizace kořenů
- d) délky hyf

AM symbioza ošetřená  
0, 0.1, 1.0, 10.0  
násobkem aplikační  
dávky carbendazimu

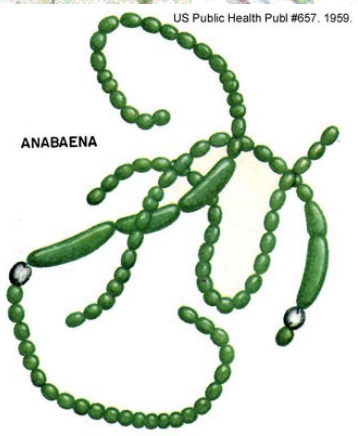
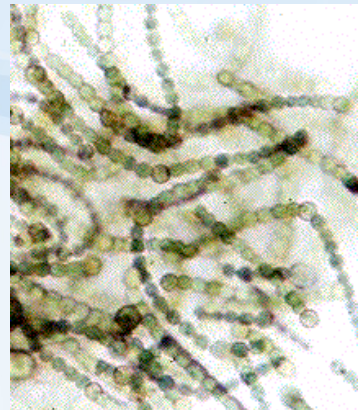
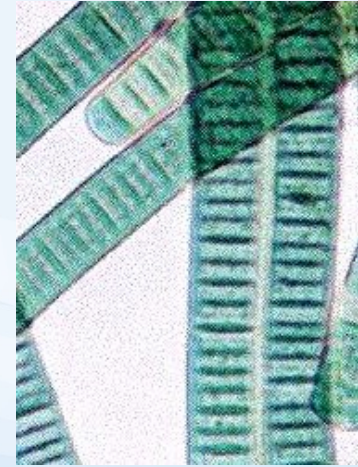




# Mikrobiální společenstva půdy

## Půdní sinice (*Cyanophyta*)

- jsou to prokaryota (nemají tedy chromatofory ani jádro atd.)
- asimilační barviva jsou rozptýlená v cytoplazmě; stélka vláknitá či jednobuněčná; některé asimilují vzdušný  $N_2$ ; v symbióze s houbami vytváří lišejníky
- v půdě význam pro **obohacování půdy dusíkem** a k **provzdušňování půd**; jsou producenti, tzn. obohacují půdu o nově syntetizovaný organický materiál
- rozšířené jsou rody *Nostoc*, *Anabaena*, *Gloeotrichia*, *Oscillatoria*, *Phormidium*



## Půdní řasy

- řasy jsou organismy obsahující chlorofyl, kromě dominantně vodních existují půdní a to nejen v horních, prosvětlených vrstvách půdy, ale i v hlubších díky sekundárnímu přechodu na heterotrofní způsob výživy
- jedno- či vícebuněčné, ne- či pohyblivé, vláknité či kulovité kolonie, zahrnují několik kmenů rostlin (nejsou taxonomickou skupinou)
- významné díky **provzdušňování půd**; jsou producenti, tzn. **obohacují půdu o nově syntetizovaný organický materiál**

### zelené řasy (*Chlorophyta*)

- mají chromatofory, fotosyntéza (*Chlamydomonas*, *Vlvox*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ulothrix*, *Cosmarium* atd.)

### rozsivky (*Diatomea*)

- jednobuněčné řasy se zkřemenělou schránkou, žluté, žlutohnědé
- v půdách rody *Monodus*, *Heterothrix*, *Melosira*, *Synedra*, *Diatoma*, *Fragillaria*

## Prvoci (*Protozoa*)

- v půdě několik set druhů, žijí ve vodním filmu na částicích či v pórech vyplněných vodou
- hojní v povrchovém humusu
- vyžadují dostatek vody, jinak tvoří neaktivní cysty
- **predátoři bakterií**, rozmnožení prvoků může vést k omezení počtu užitečných bakterií a k tzv. únavě půdy

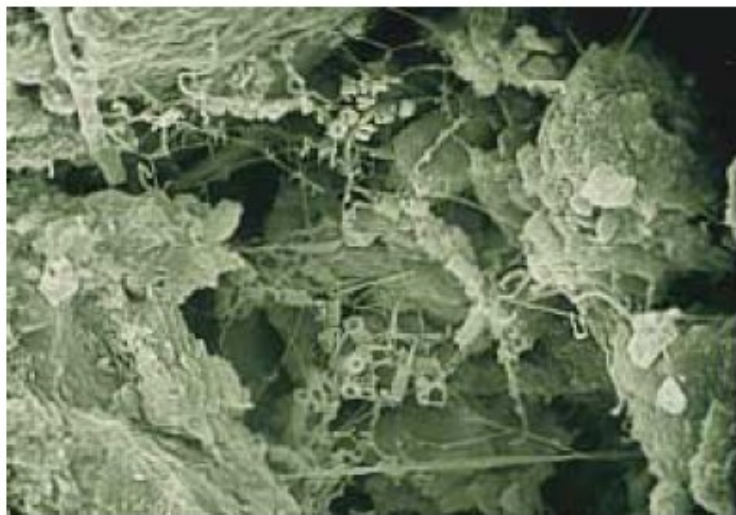
Bičíkovci (*Flagellata*) - rod *Bodo*, *Oicomonas*

Kořenonožci (*Rhizopoda*) - měňavky (amoebina) a krytenky (testacea - vytváří schránky z částic z venčí)

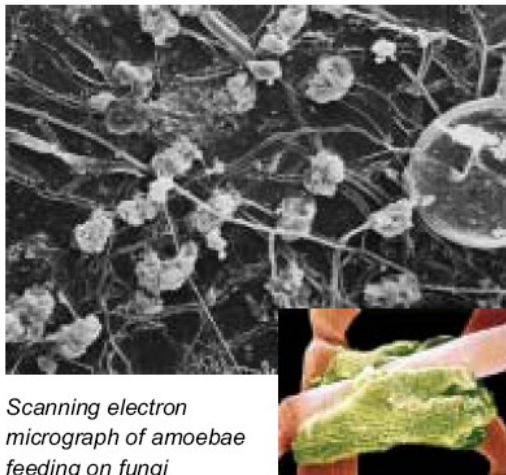
Nálevníci (*Ciliata*) - *Colpidium*, *Colpida*, *Vorticella*



# Mikrobiální společenstva půdy



*Scanning electron micrograph of fungi in a soil pore. Fungi find soil particles to form aggregates.*



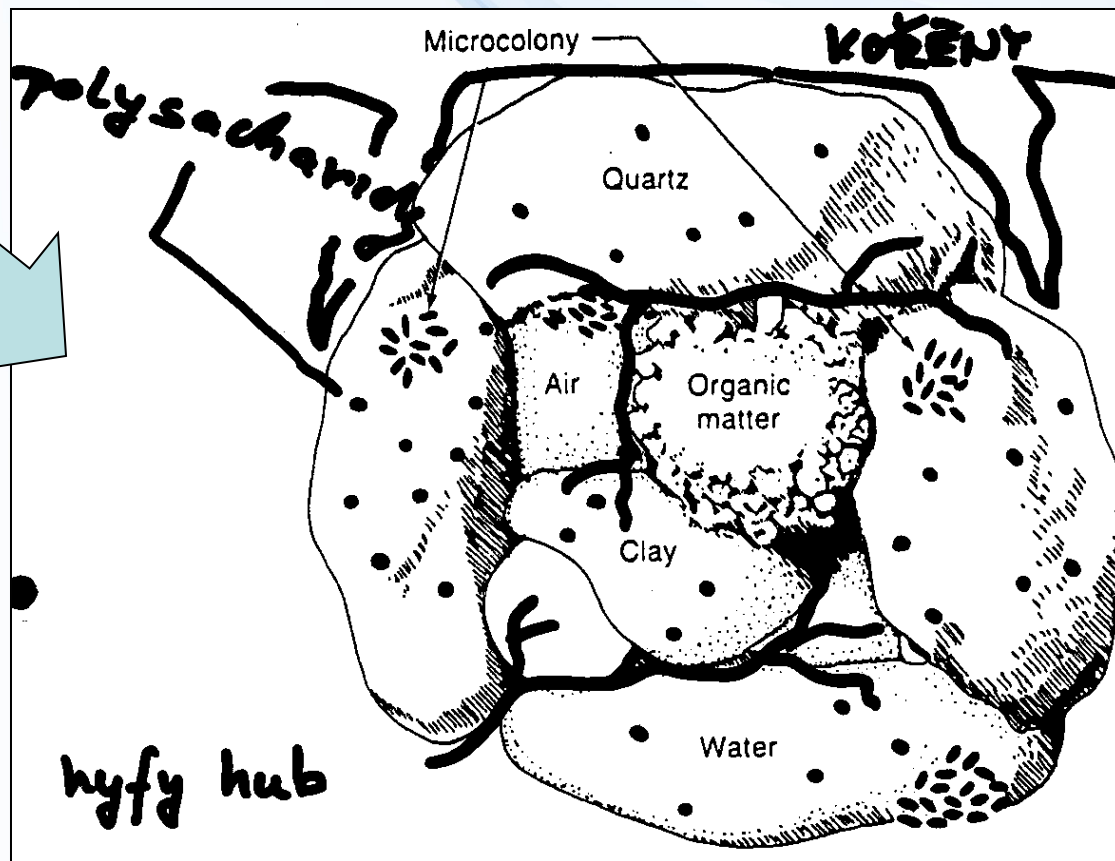
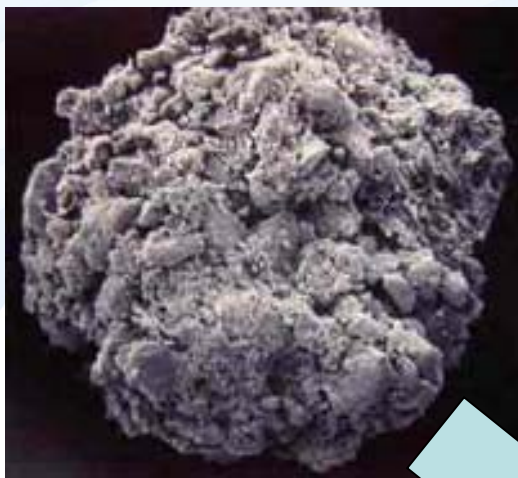
*Scanning electron micrograph of amoebae feeding on fungi associated with plant residues*



**FIGURE 3.3** Scanning electron micrograph of decomposing leaf litter. The bacteria tend to be hidden by slime but various sized filamentous organisms are readily apparent. (Photograph courtesy of R. Todd.)



# Mikrobiální společenstva půdy





# Mikrobiální společenstva půdy

MO se v půdě vyskytují volně, či ve složité a dynamické vazbě na površích a uvnitř agregátů a částic organominerálního komplexu

Půda je polyfázický systém  
Každá vrstva obsahuje

1. Pevnou minerální složku
2. Pevnou organickou složku
3. Kapalnou fázi
4. Plynnou fázi

Všechny jsou ve vzájemné interakci

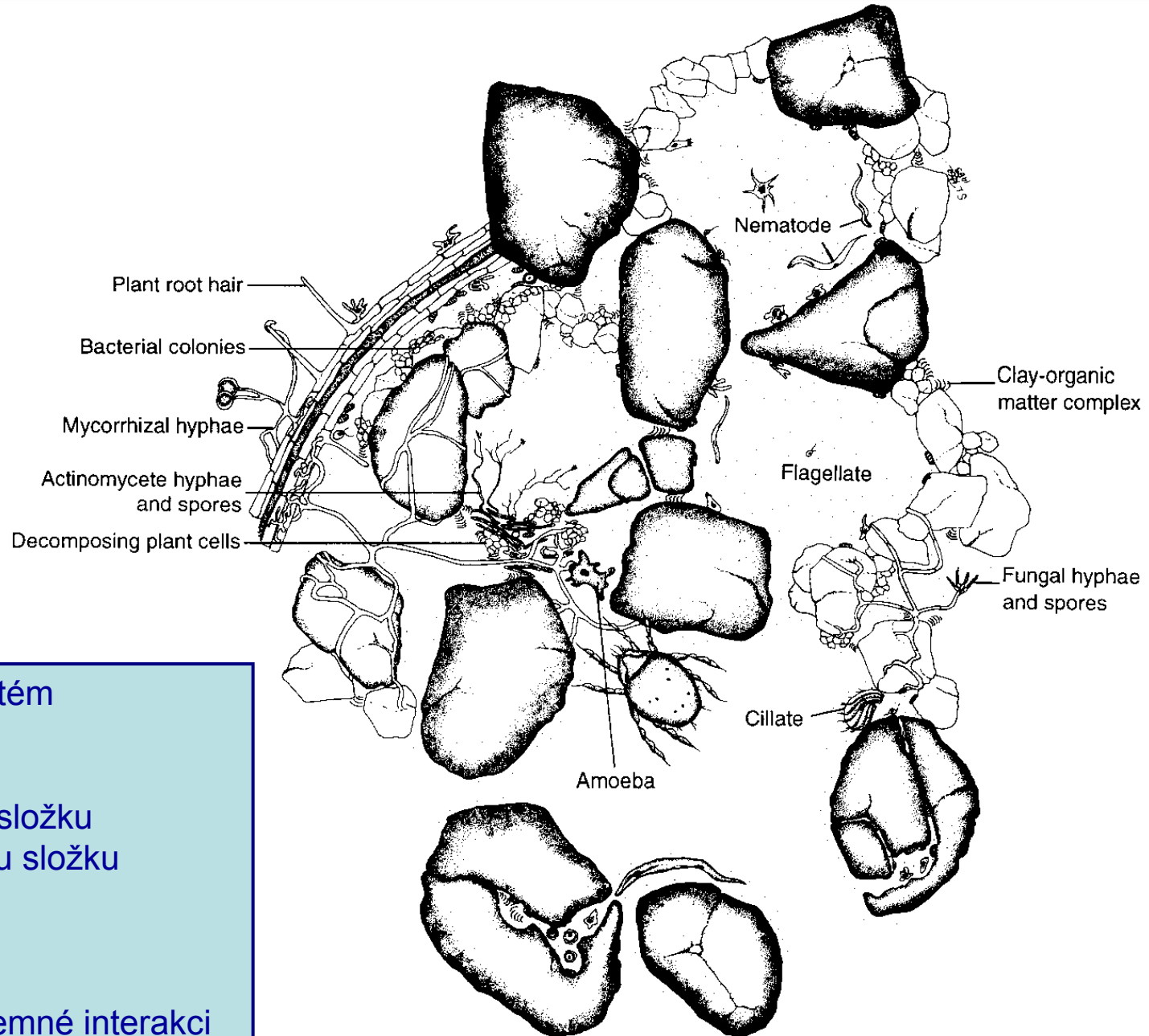


FIGURE 5.2 Diagrammatic representation of a plant root and associated biota approximately 1 cm<sup>2</sup> of a surface grassland horizon associated with a plant root. (Adapted from S. Rose and T. Elliott, personal communication.)

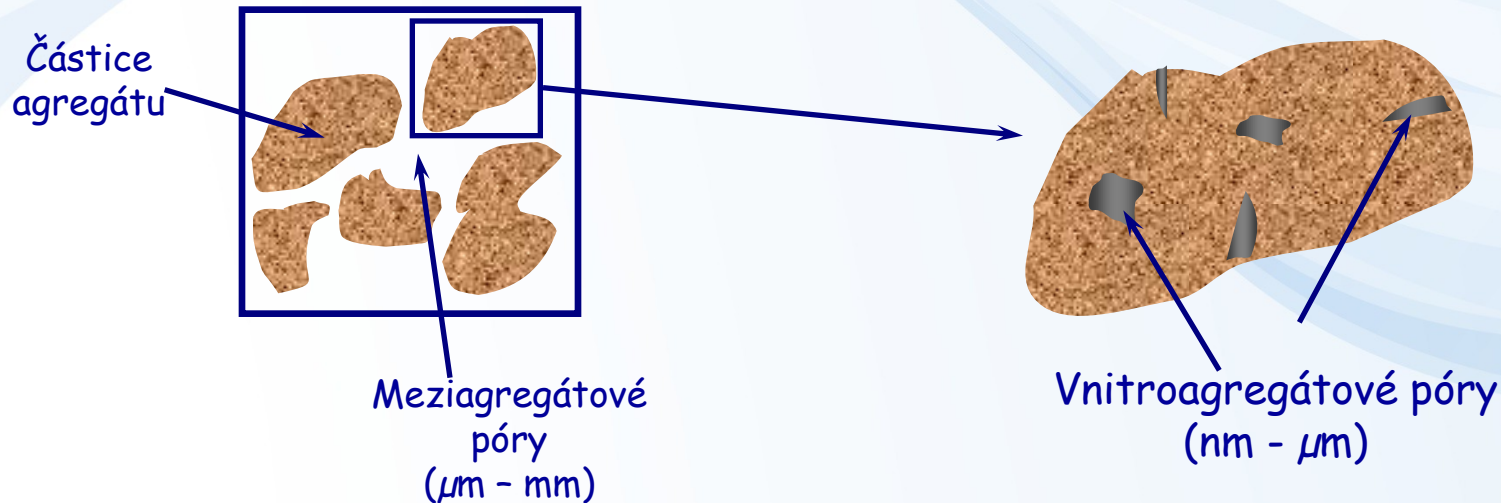
# Mikrobiální společenstva půdy

## Velikostní poměry v půdě (dle K. T. Semple)

Mineral constituents	Size	Organic and biological constituents
<b>Sand:</b> quartz, silicates, carbonates	<b>2 mm</b>	<b>Organic debris</b>
<b>Silt:</b> quartz, silicates, carbonates	<b>50 µm</b>	<b>Organic debris, large microorganisms</b> Fungi, actinomycetes, bacterial colonies
<b>Granulometric clays:</b> microcrystals of primary minerals <b>Phyllosilicates:</b> Inherited – illite, mica Transformed – vermiculite, high-charge smectite Neoformed – kaolinite, smectite Oxides and hydroxides	<b>2 µm</b>	<b>Amorphous organic matter</b> Humic substances Biopolymers  <b>Small microorganisms</b> Bacteria Fungal spores Large viruses
<b>Fine clays:</b> Swelling clay minerals Interstratified clay minerals Low range order crystalline compounds	<b>0.2 µm</b>	<b>Small viruses</b>

## Půdní pevná fáze (schéma dle K.T. Semple)

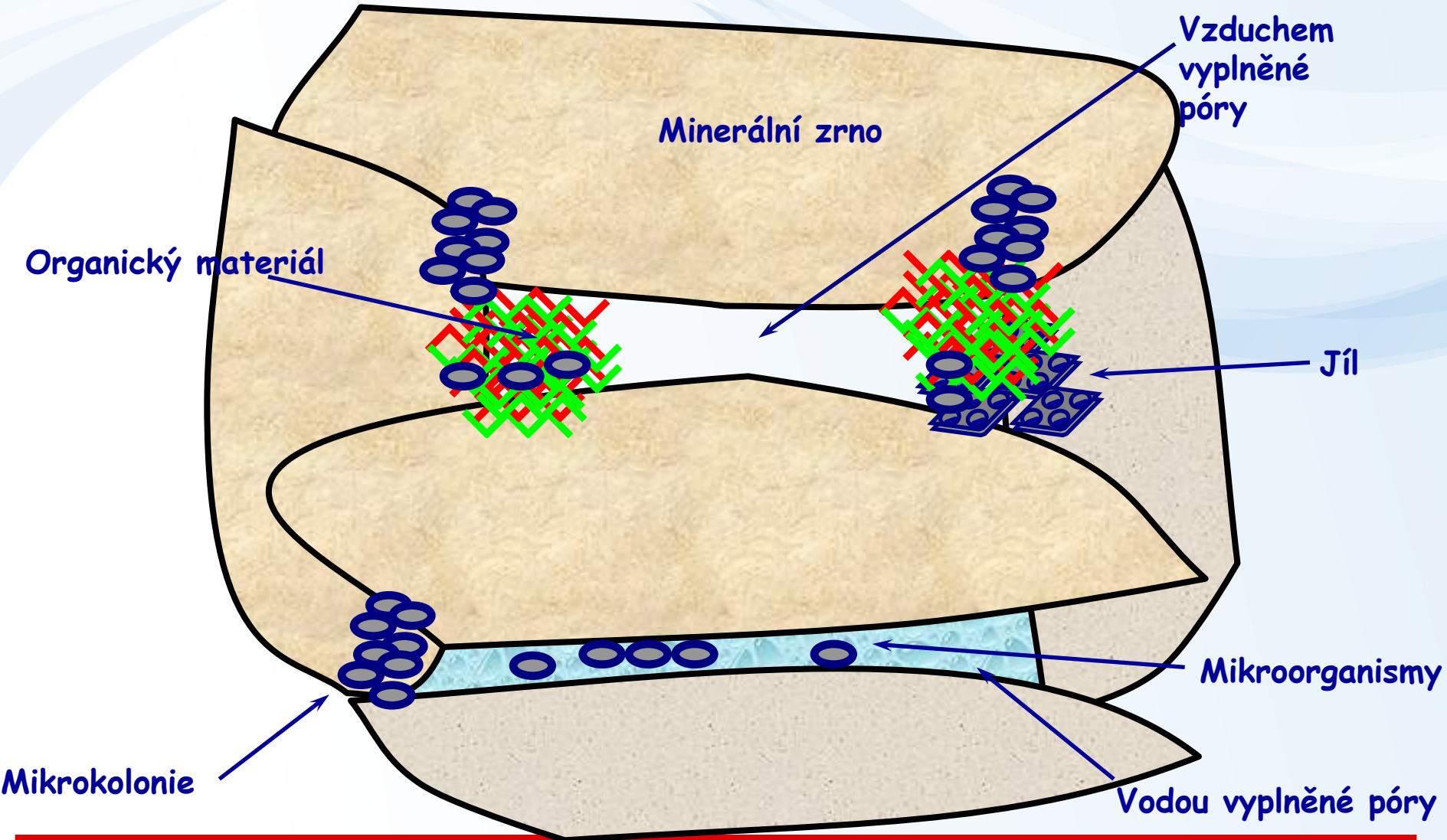
### Minerální frakce



### Organominerální komplex - interakce



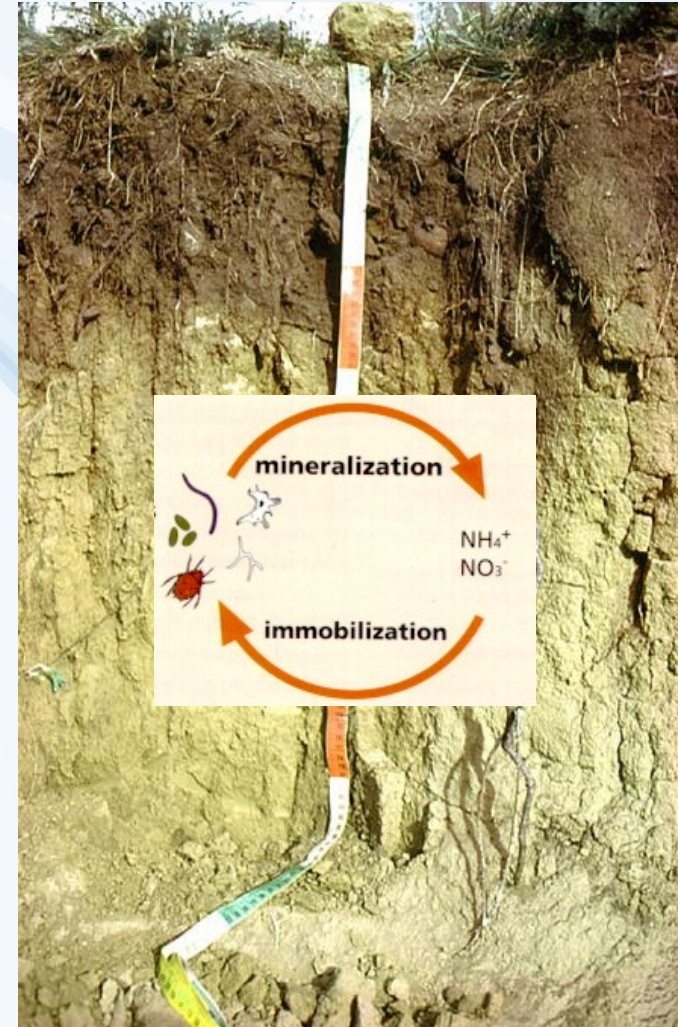
## Niky pro půdní mikroorganismy (dle K.T.Semple)





## Význam mikroorganismů v půdě

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

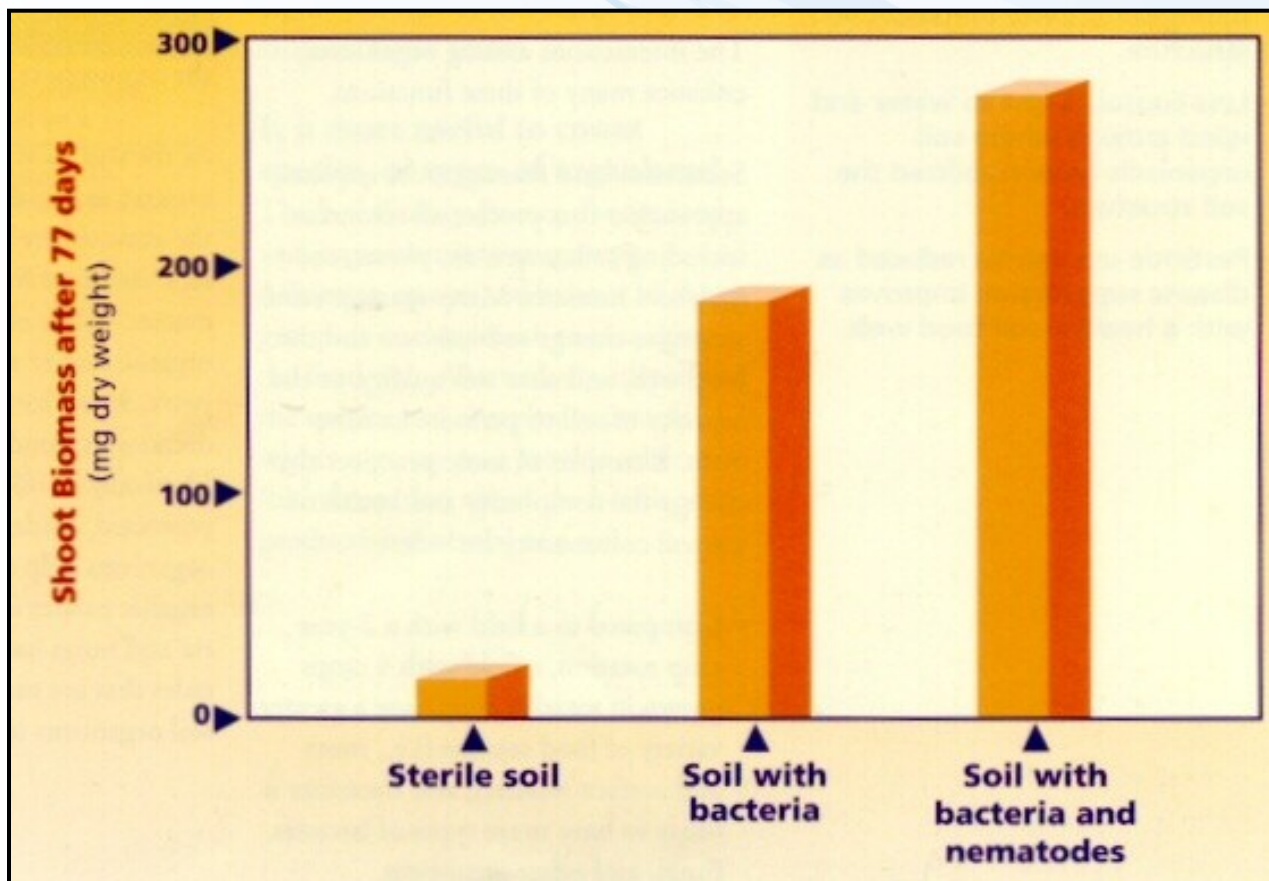






# Mikrobiální společenstva půdy

## Mikroorganismy naprosto nezbytné pro půdní úrodnost



# Mikrobiální společenstva půdy

## Funkce mikroorganismů v potravní síti (soil food web)

### Microflora

Bacteria and fungi have diverse metabolic capabilities and are the principle agents for the cycling of nutrients e.g. nitrogen, phosphorus and sulphur. They may be free living or symbiotic and active in the decomposition or build-up of organic matter. They also help in the formation of stable soil aggregates.

### Microfauna

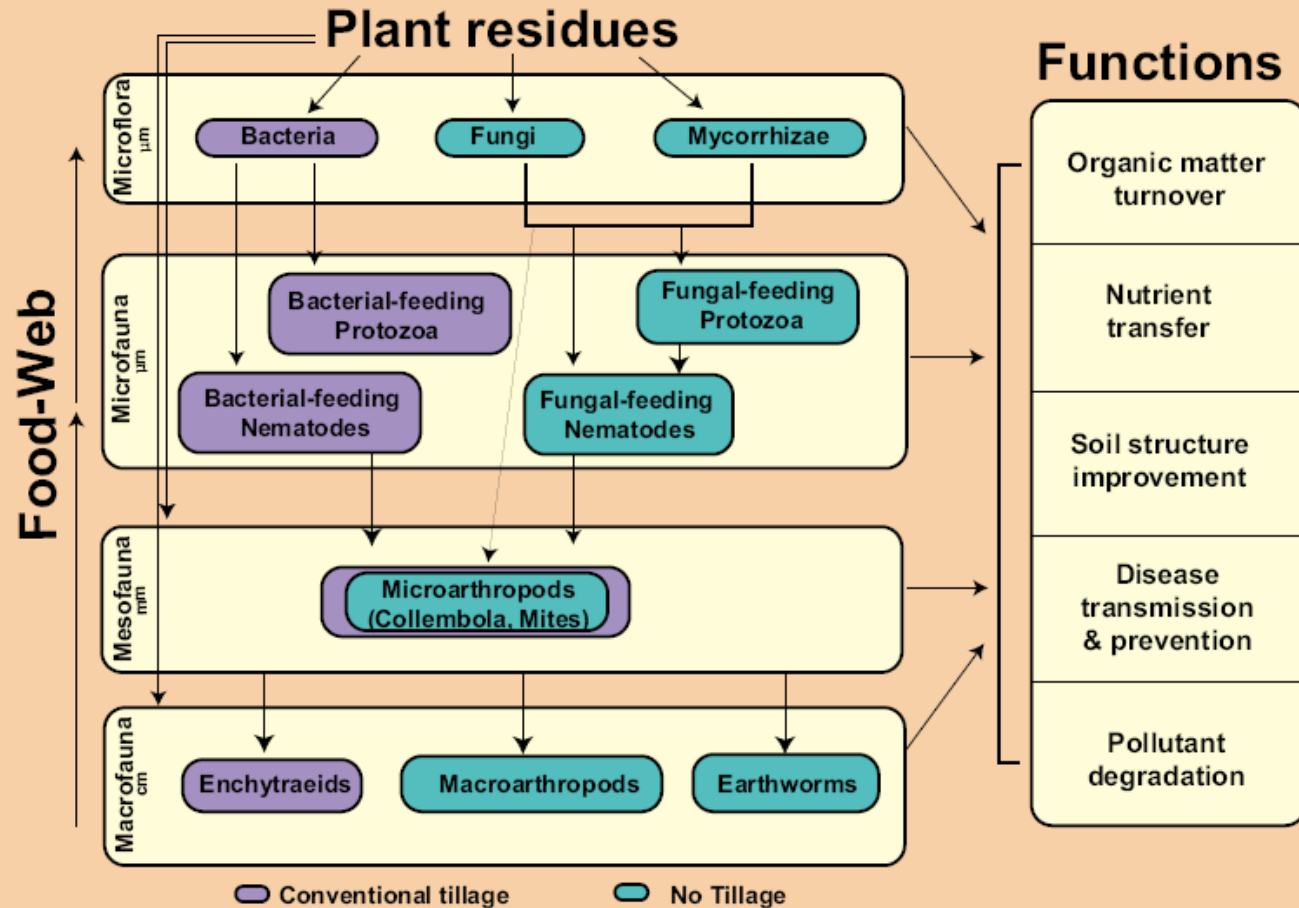
Protozoa and nematodes are a crucial link between microflora and larger fauna. They regulate the populations of bacteria and fungi and play a major role in the mineralisation of nutrients.

### Mesofauna

Mites and collembola feed on litter and help fragment organic residues. They are predators of fungi and microfauna, playing an important role in regulating microbial populations and nutrient turnover.

### Macrofauna

Earthworms, termites and dungbeetles, etc are important biological agents fragmenting organic residues and causing a large surface area to be exposed. They also help the formation of soil aggregates and soil pores.

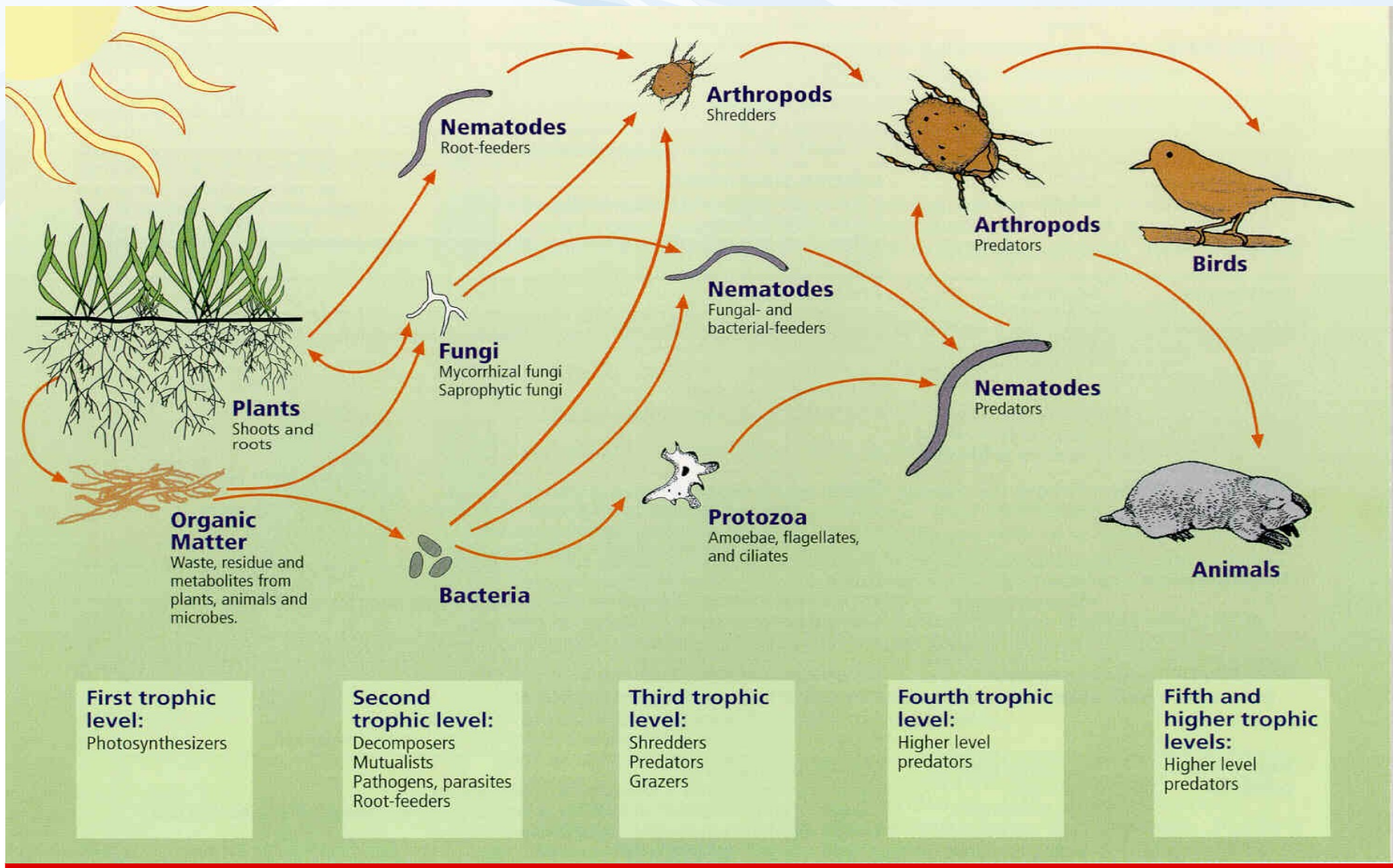


<http://www-crcslm.waite.adelaide.edu.au>



# Mikrobiální společenstva půdy

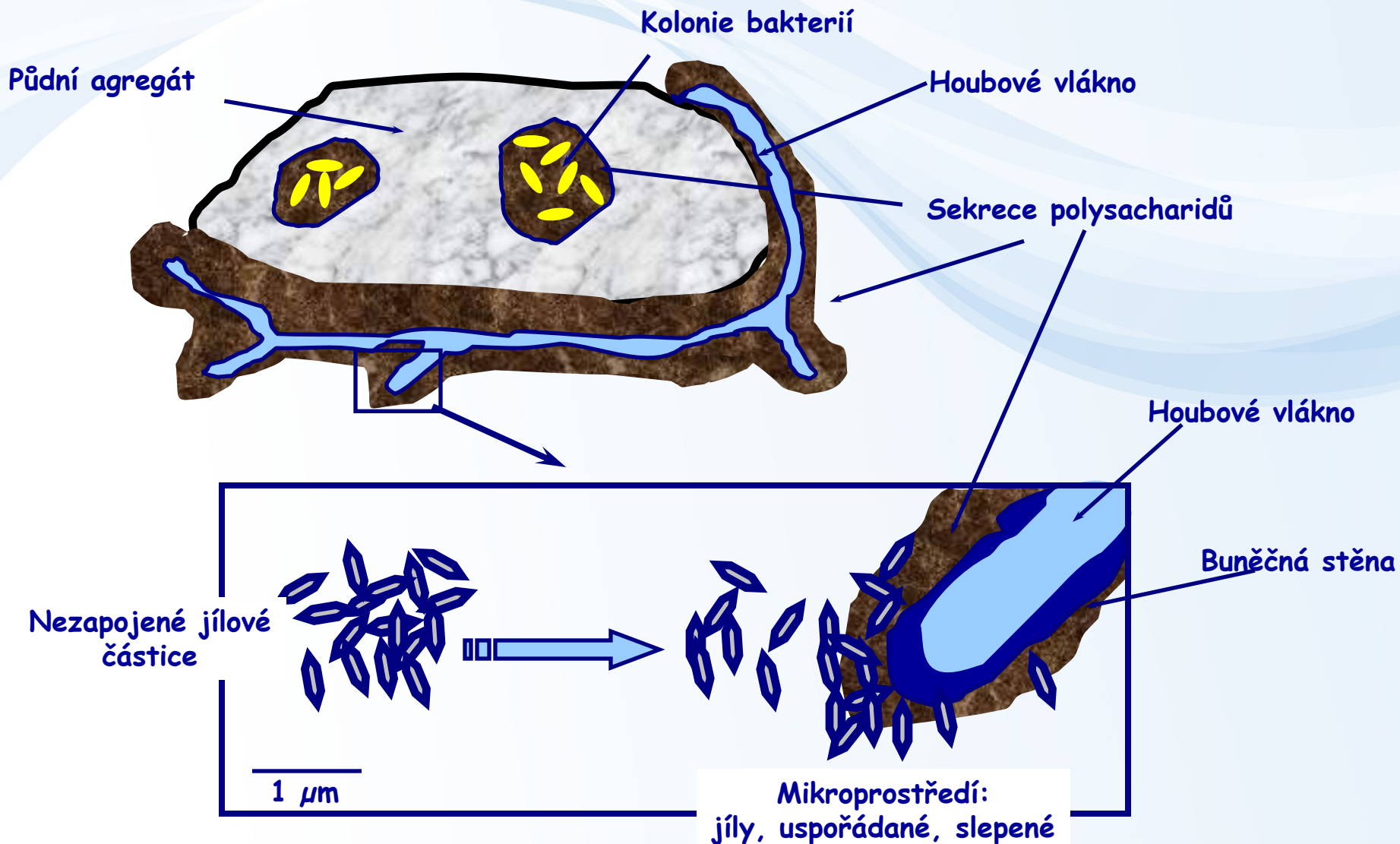
## Funkce mikroorganismů v potravní síti (soil food web)





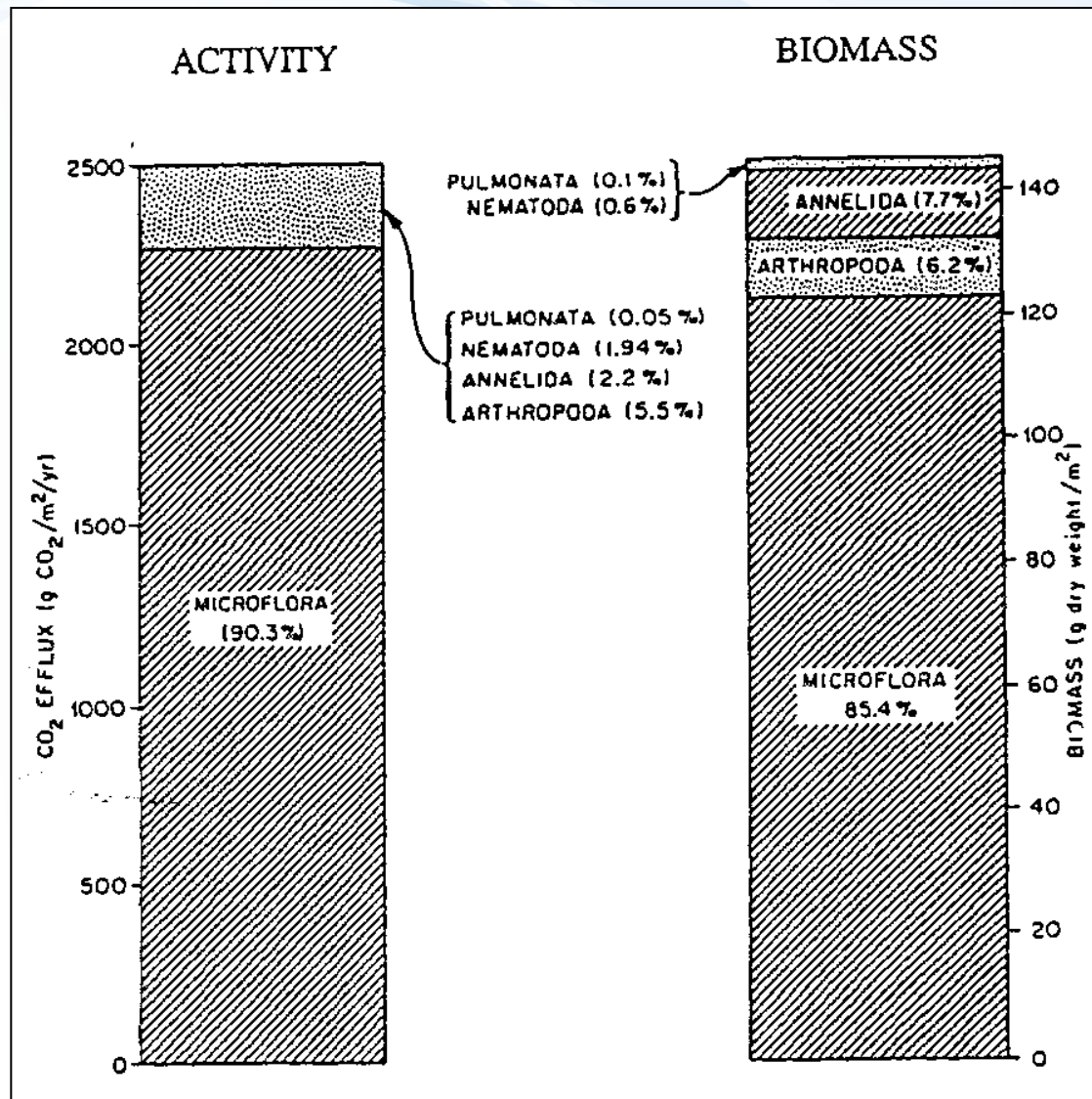
# Mikrobiální společenstva půdy

## Role mikroorganismů v půdní struktuře (K.T. Semple)



# Mikrobiální společenstva půdy

## Dekompozice organické hmoty



# Mikrobiální společenstva půdy

## Dekompozice organické hmoty

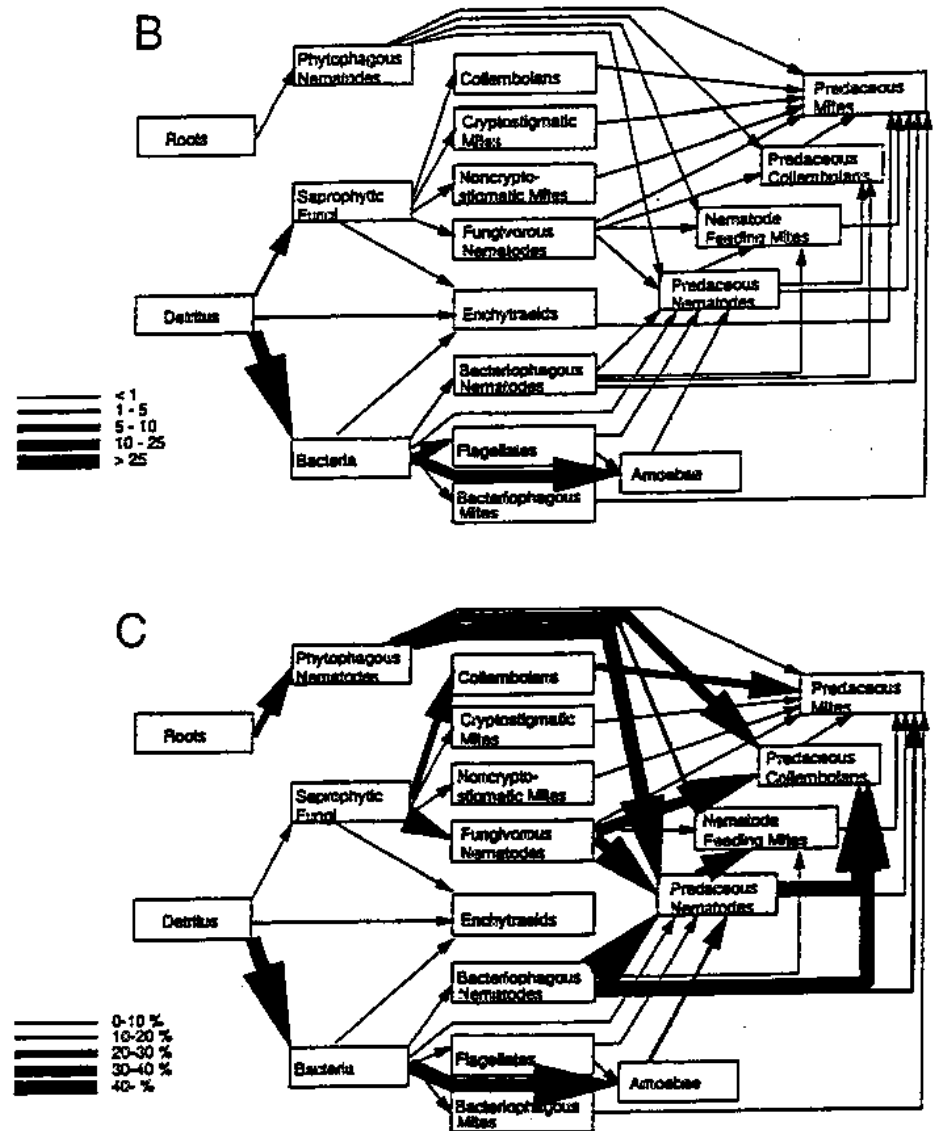


Diagram of a food web established for the fields of 'de Lovinkhoeve', an experimental farm in the Netherlands' Northeast polder.

B. Energy fluxes of the food web, in which the thickness of the arrows reflects their relative contribution to the energy cycle (in kg C ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>). C. Effect of change (0 < factor < 2) in the strength of an interaction on the stability of the system, expressed as the chance (%) of the system becoming unstable.



# Mikrobiální společenstva půdy

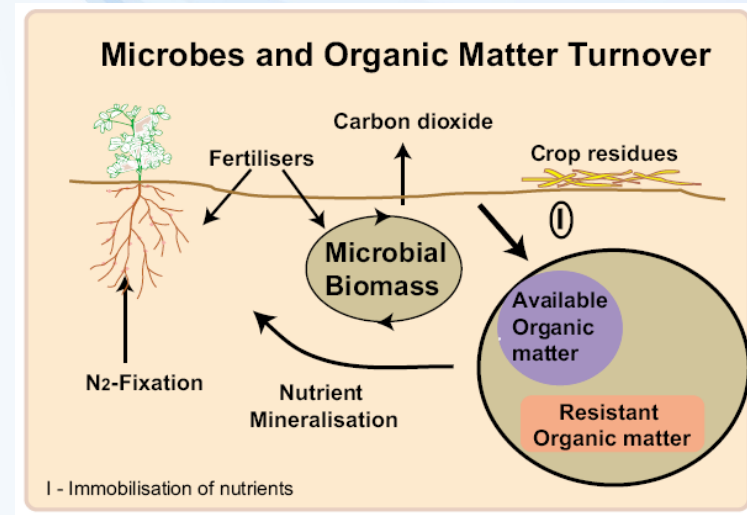
## Organická hmota vs mikrobiální biomasa

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



Celkový půdní organický uhlík  
(TOC,  $C_{ORG}$ )

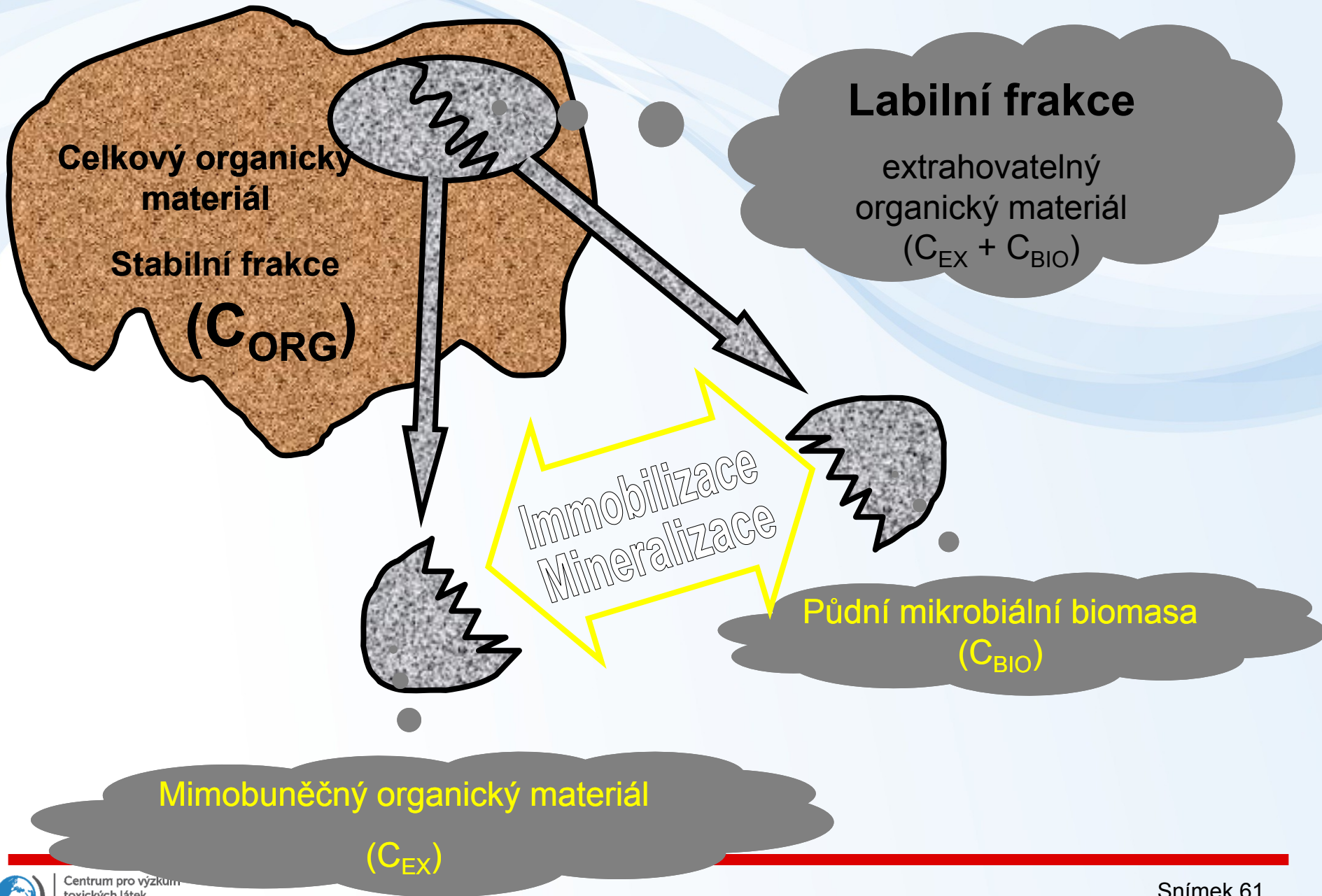
"živý uhlík" (1-5%)  
= Mikrobiální biomasa  
( $C_{BIO}$ )



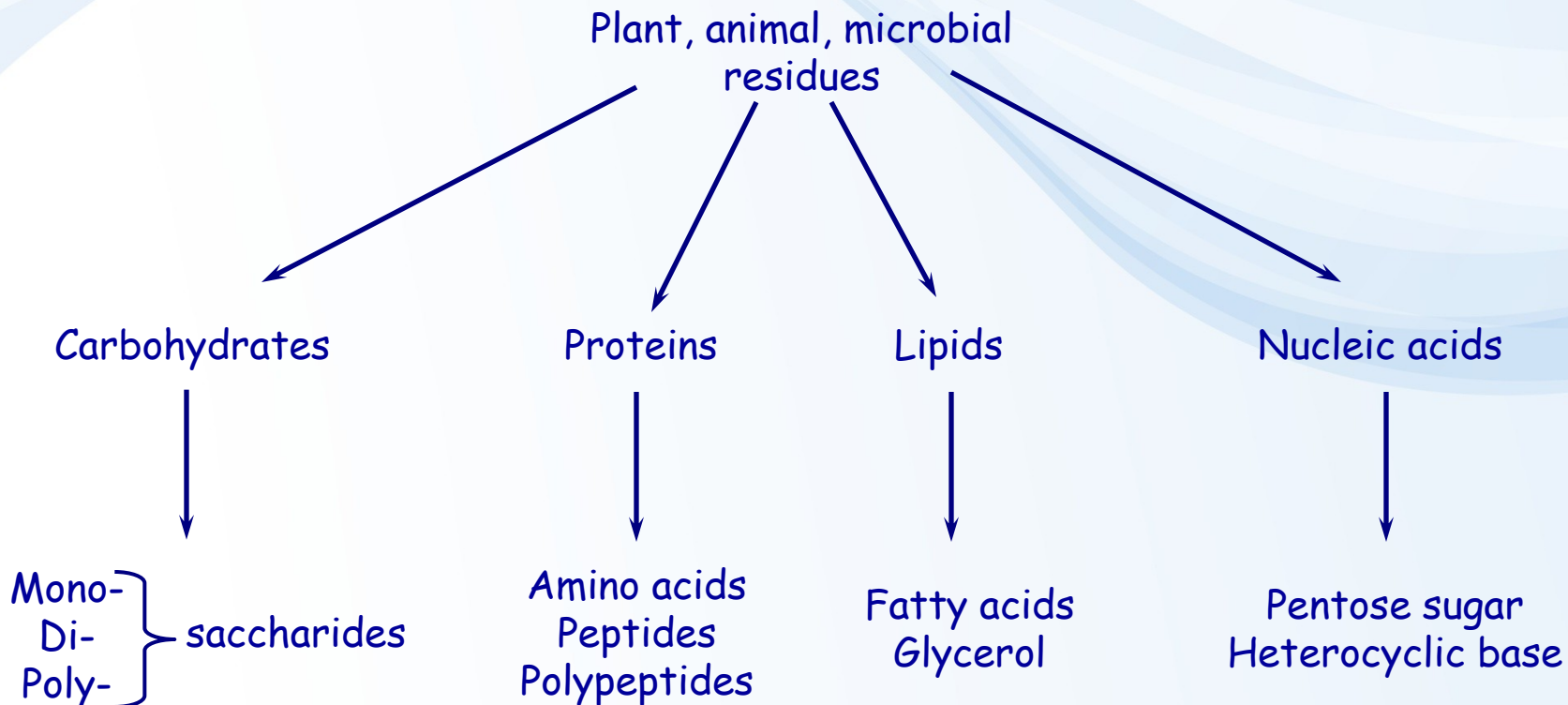
<http://www-crcslm.waite.adelaide.edu.au>



# Mikrobiální společenstva půdy



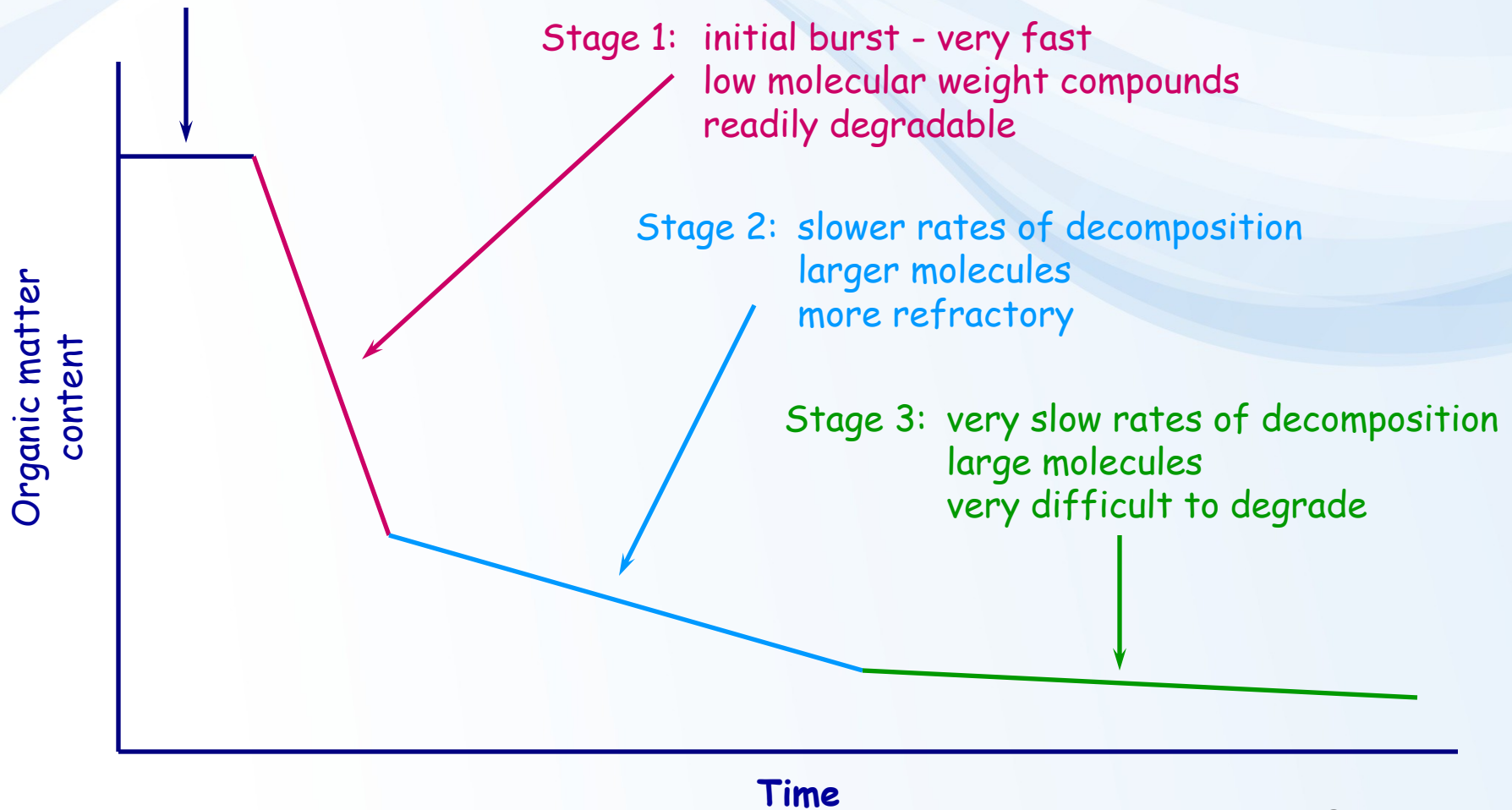
## Organická rezidua v půdě



Die K.T.Semple

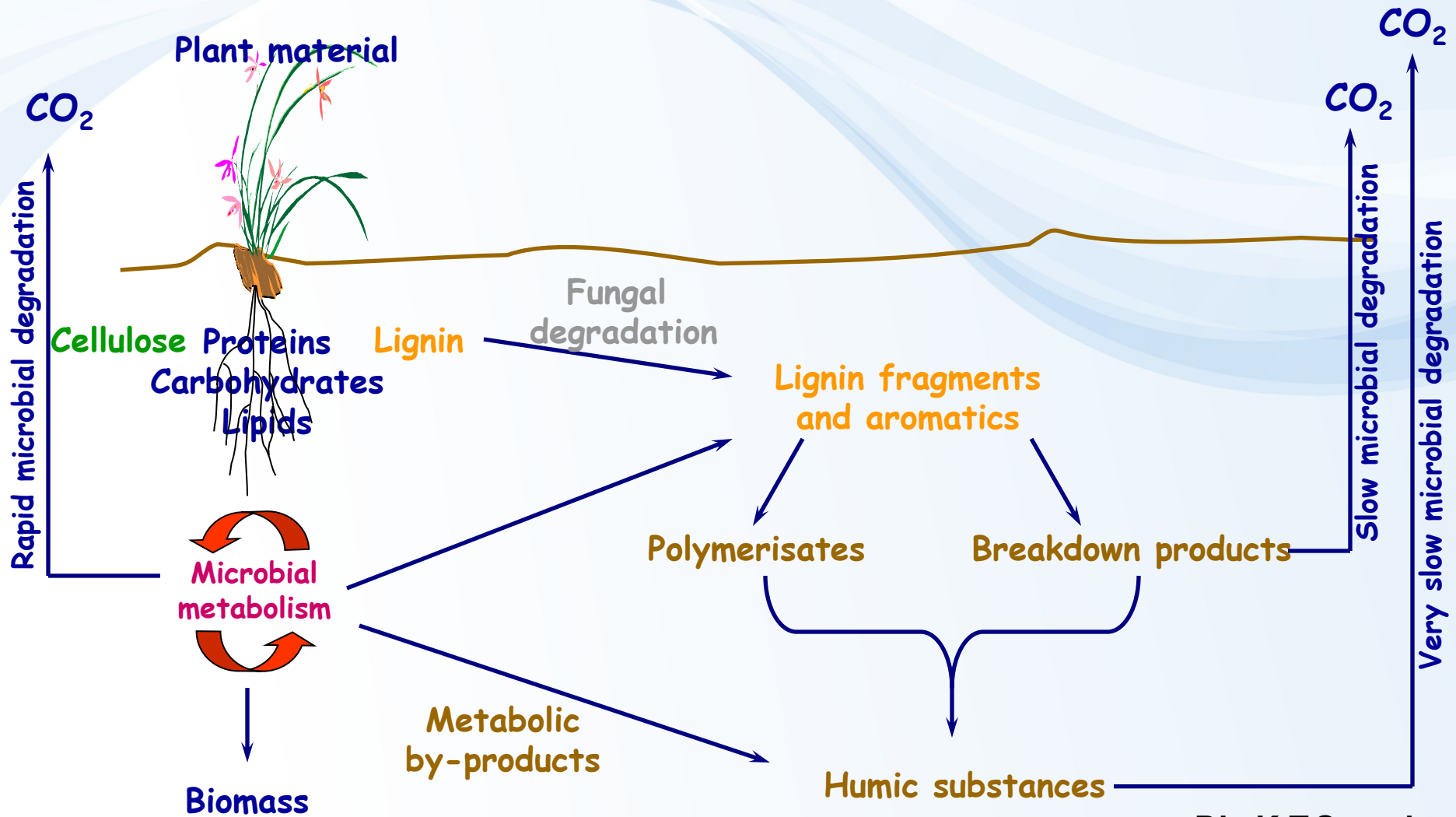
## Rychlost dekompozice

Organic matter input



Dle K.T.Semple

# Mikrobiální společenstva půdy



Dle K.T.Semple



## Proč není dekompozice jednoduchá, ale pomalá?

Mnoho reziduí má komplexní povahu

Forms of organic carbon	Relative amounts
<b>Cellulose</b>	<b>50%</b>
<b>Hemicelluloses</b>	<b>20%</b>
<b>Lignin</b>	<b>15%</b>
<b>Proteins</b>	<b>5%</b>
<b>Amino acids and sugars</b>	<b>5%</b>
<b>Waxes and pigments</b>	<b>1%</b>
<b>Pectin</b>	<b>1%</b>

Dle K.T.Semple

Chemical nature of organic carbon	Relative amounts
<b>Aromatic C</b>	<b>50%</b>
<b>N-associated C</b>	<b>20%</b>
<b>Carbohydrate</b>	<b>15%</b>
<b>Fatty acid and alkane C</b>	<b>15%</b>

## Rychlost turnoveru organického uhlíku

**Je ovlivněná:**

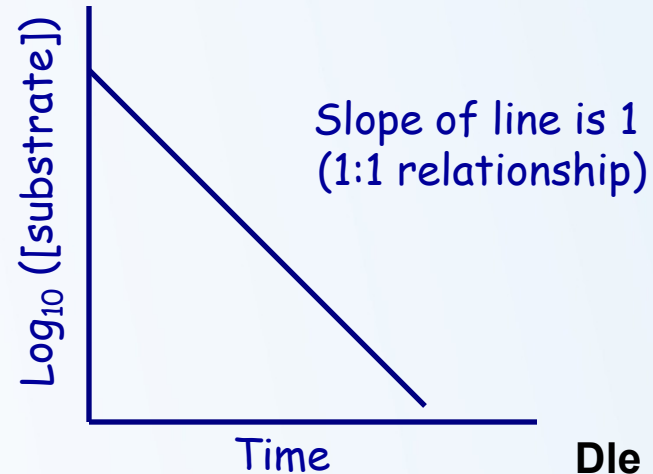
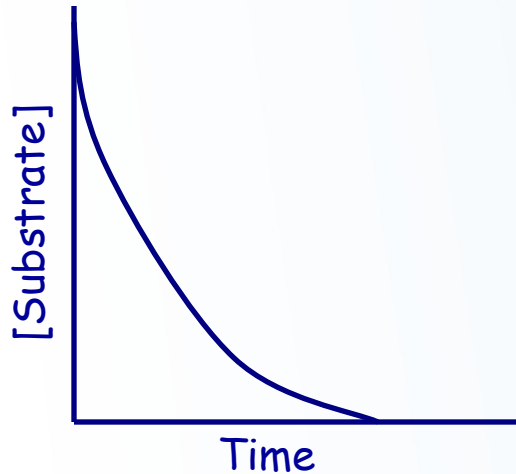
- Kvalitou a kvantitou OM
- Přítomností / nepřítomností potenciálních rozkladačů
- Biotickými interakcemi
- Fyzikálně – chemickými faktory prostředí

## Rychlost turnoveru organického uhlíku

Rychle degradovatelný substrát – kinetika prvního řádu  
= rychlost rozkladu je přímo úměrná koncentraci substrátu

$$D = dS/dt = dP/dt = kS$$

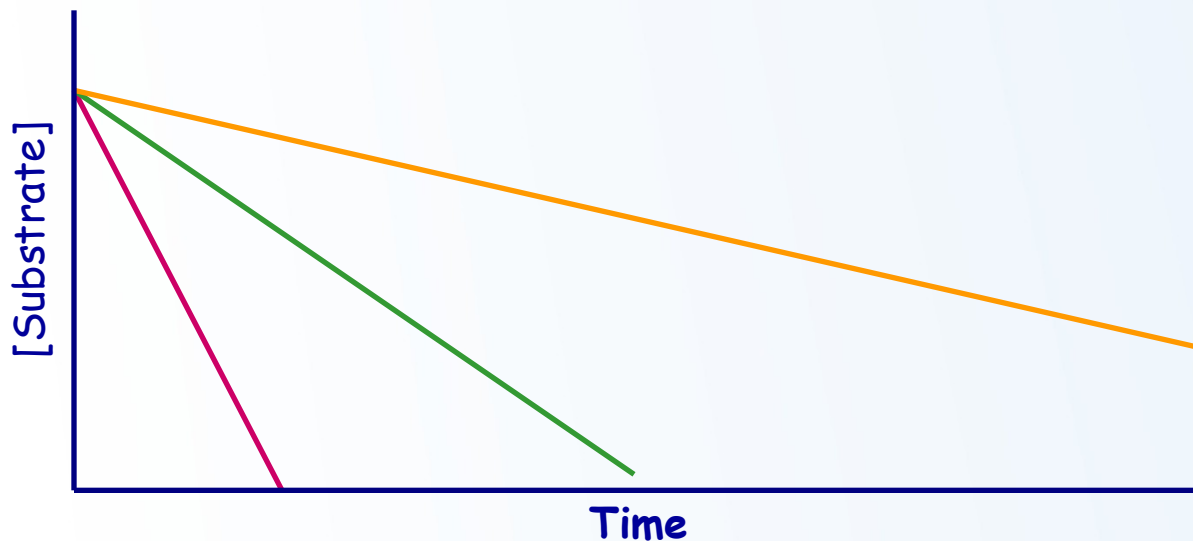
- $D$  = velocity of reaction (decomposition)  
 $dS/dt$  = rate of disappearance of the substrate with time  
 $dP/dt$  = rate of appearance of product with time  
 $S$  = substrate concentration at time  $t$   
 $K$  = first order rate constant



Dle K.T.Semple

# Mikrobiální společenstva půdy

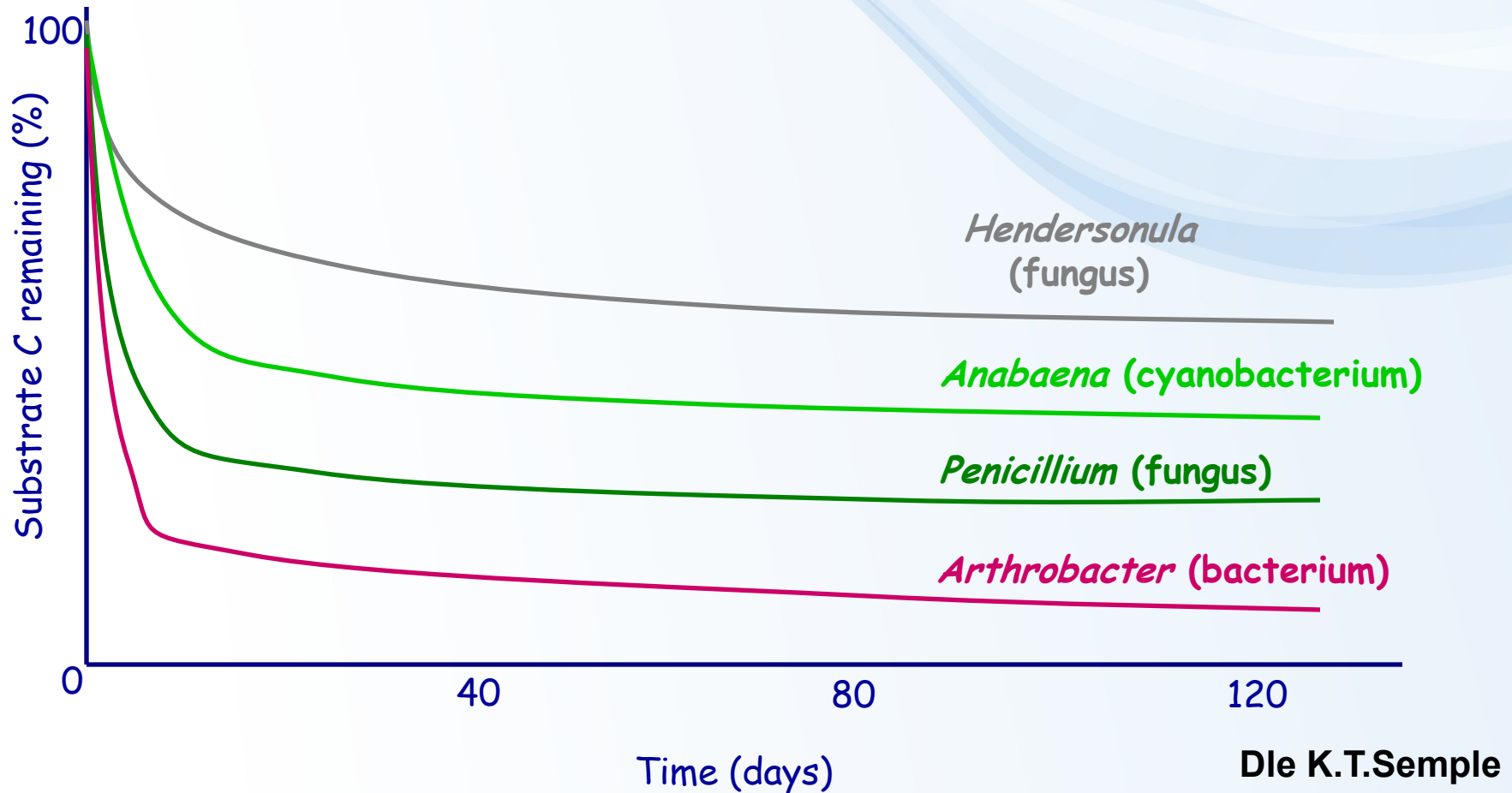
Form of C	Rate constant $k$ (day <sup>-1</sup> )	Turnover time $1/k$ (days)
Glucose	1	1
Cellulose	0.07	14
Lignin	0.002	500



Dle K.T.Semple



## Je závislá na druhu mikroorganismu



## Ovlivněna faktory prostředí

- **Temperature – climate**
  - Warmer = more rapid turnover
  - Cooler = slower turnover
- **Soil factors**
  - pH
  - Eh
  - Temperature
  - Water potential
  - Structure
- **Type of vegetation**
- **C:N ratio**
- **Low C:N ratios**
  - High resource quality
  - Rapid rates of decomposition
- **High C:N ratios**
  - Low resource quality
  - Slow rates of decomposition

All affect heterotrophic activity in soils → influence rate of C turnover

Dle K.T.Semple



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Otázky, na které lze odpovědět:

- Je testovaná látka (látky) potenciálně nebezpečná pro oživení konkrétního typu půdy (lokality)?
- Je další expozice již kontaminované půdy (lokality) únosná pro její biologický potenciál?
- Je půda (antropogenní, kontaminovaná, rekultivovaná) schopna „uživit“ vegetační kryt určitého typu?
- Je půda (antropogenní, kontaminovaná, rekultivovaná) schopna mineralizovat určitý typ organického substrátu?
- Jaký je optimální přídavek živin pro zajištění funkcí?
- Jsou „in situ“ přítomné mikroorganismy schopné biodegradace přítomných kontaminantů?
- Je mikroflóra v testované půdě (lokality) stresována (ve srovnání s kontrolní nebo jinak srovnávanou lokalitou)?



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

Ve srovnání s poznatky o efektech kontaminace na další organismy je známo jen velmi málo

Estimation of available toxicological data for  
2 000 High Production Volume Chemicals

Van Der Zandt and Van Leeuwen,  
1992, Directorate General for Environ.  
Protection, Hague  
Leeuwen and Hermens, 1995

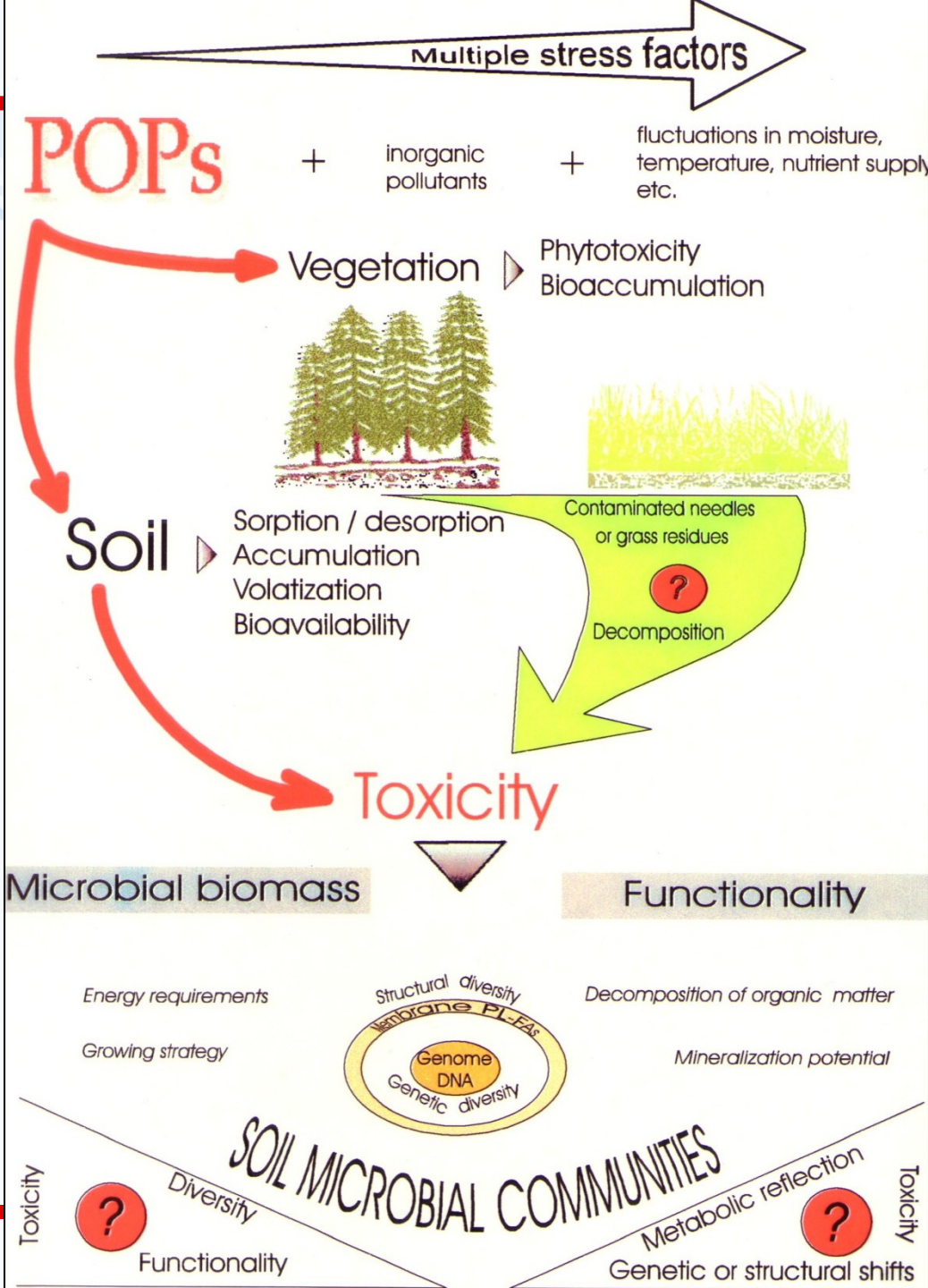
Acute toxicity - 90 %; Subacute toxicity - 30 %;  
Carcinogenicity - 10 %; Mutagenicity - 50 %;  
Retrospective toxicity - 10 %; Teratogenicity - 30  
%; Acute ecotoxicity (fish) - 50 %; Short-term  
toxicity (algae) - 5 %

Effects on soil microorganisms < 5%



## Množství poznatků se liší

Je známo hodně o kovech a pesticidech a velmi málo o efektech perzistentních organických polutantů (POPs)



## Antropogenní stresory půdních mikroorganismů

### Chemické:

- pesticidy (některé jsou mikroorganismy rozkládány, jiné je však hubí)
- těžké kovy
- PAHs

### Fyzikální:

- změna vzdušného, vodního či teplotního režimu, pH, obsahu jílu

### Mechanické:

- orba

**Způsob využití:** roslinná kultura (TTP × OP × LP)

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Proč půdní mikroorganismy v ekotoxikologii?

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



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Biologický potenciál půd

- půdní kvalita
- monitoring stavu půd
- retrospektivní hodnocení rizik

**Cíl:** zjistit, co se děje v mikroorganismy v kontaminovaném prostředí

## Ekotoxikologické testy

- polní řízené pokusy
- polní pozorovací studie
- laboratorní testy

**Cíl:** odhad toxicity látky, určení rizika nových chemikálií, pesticidů

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

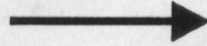
## Studium reálně kontaminované půdy přímo v terénu (polní studie; *in situ*):

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

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

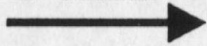
Studium reálně kontaminované půdy přímo v terénu (polní studie; *in situ*):

**SPECIFIKA**



Silně heterogenní systém v čase i prostoru (sezónní charakter dějů; směs minerálních a organických komponent s koloidními roztoky; prostorová variabilita)

**JAK  
TESTOVAT**



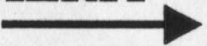
**A. Hledisko vstupu látek**

Látku aplikovat dle možností daných jejími chemickými vlastnostmi (vhodný organický roztok, fumigace), nejlépe v podobě odpovídající reálné situaci.

**B. Hledisko časové**

Lze testovat vliv jednorázových dávek nebo postupnou kumulaci zátěže. Systém testování by měl vycházet z charakteru expozice hodnoceného zdroje.

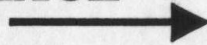
**CO MĚŘIT**



Základní nebo rozšířená sada parametrů

V širším pohledu je vhodné mikrobiologické testy doplnit o testy mobility látek v půdním profilu (vyplachování) nebo jejich dostupnosti pro rostliny (testy s rostlinami).

**PŘÍMÁ / NEPŘÍMÁ  
APLIKACE**



Dle reálné situace je cenné testovat vedle přímé aplikace do půdy i vstup kontaminantu společně s organickým substrátem (např. s listím).

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Laboratorní studie s půdou kontaminovanou v laboratoři:

- většinou o krátkodobé kultivace ( 1 - 2 měsíce), často s jednorázově aplikovanou dávkou polutantu
- výhodou je malá časová náročnost a dále značný potenciál při vysvětlování mechanismů účinku jednotlivých látek nebo jejich kombinací
- menší fluktuaace zkoumaných parametrů a možnost řízených změn vnějších faktorů
- problémem je přenos a zpracování půdy v laboratoři (vzorek standardizován přeseťím a předinkubací) = snížení variability parametrů, ale = snížená interpretace výsledků směrem k reálnému systému
- většinou jemnozem (< 2 mm), ale i sloupce půdy, bez narušení struktury
- spíše o testy akutní toxicity, pokud delší, může být naznačeny schopnosti mikroflóry adaptovat se
- nevýhodou je interpretovatelnost laboratorních výsledků k polním podmínkám spíše omezená.



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

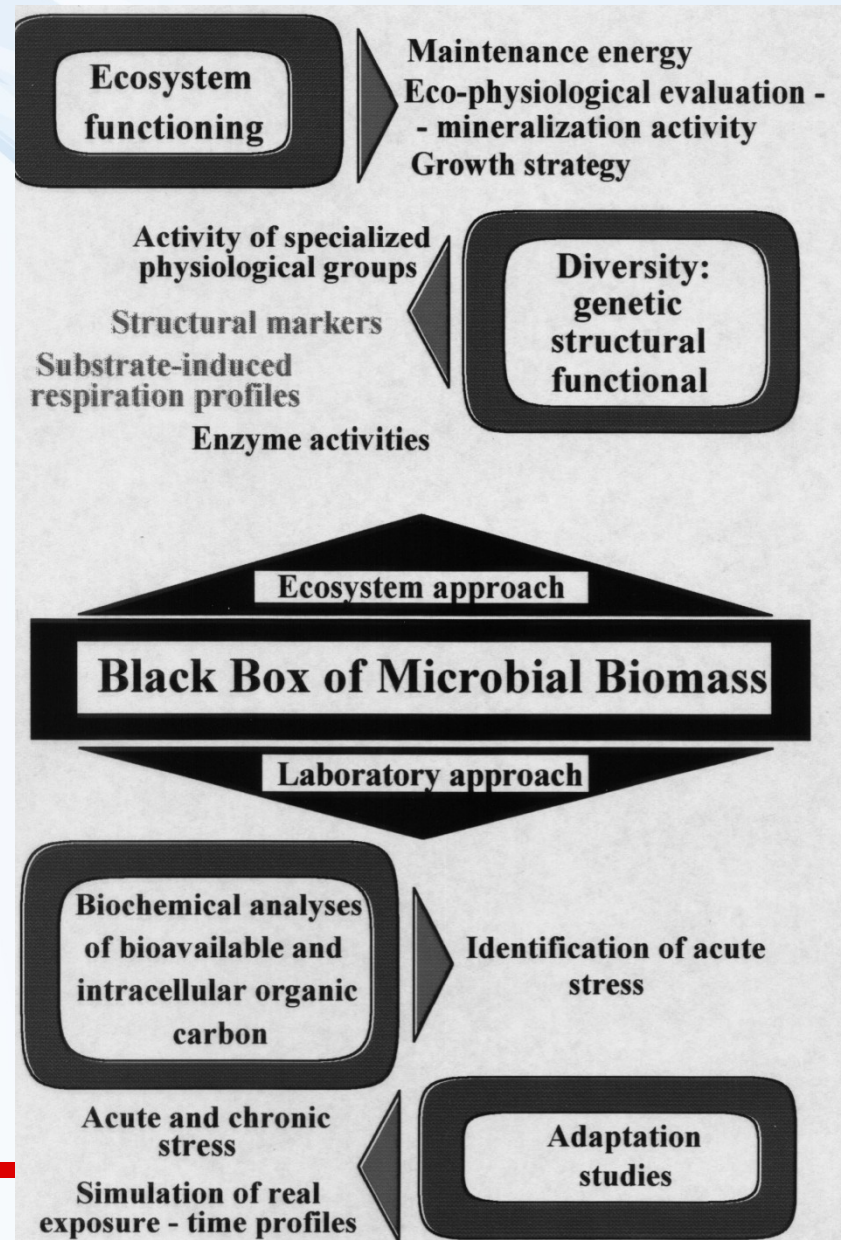
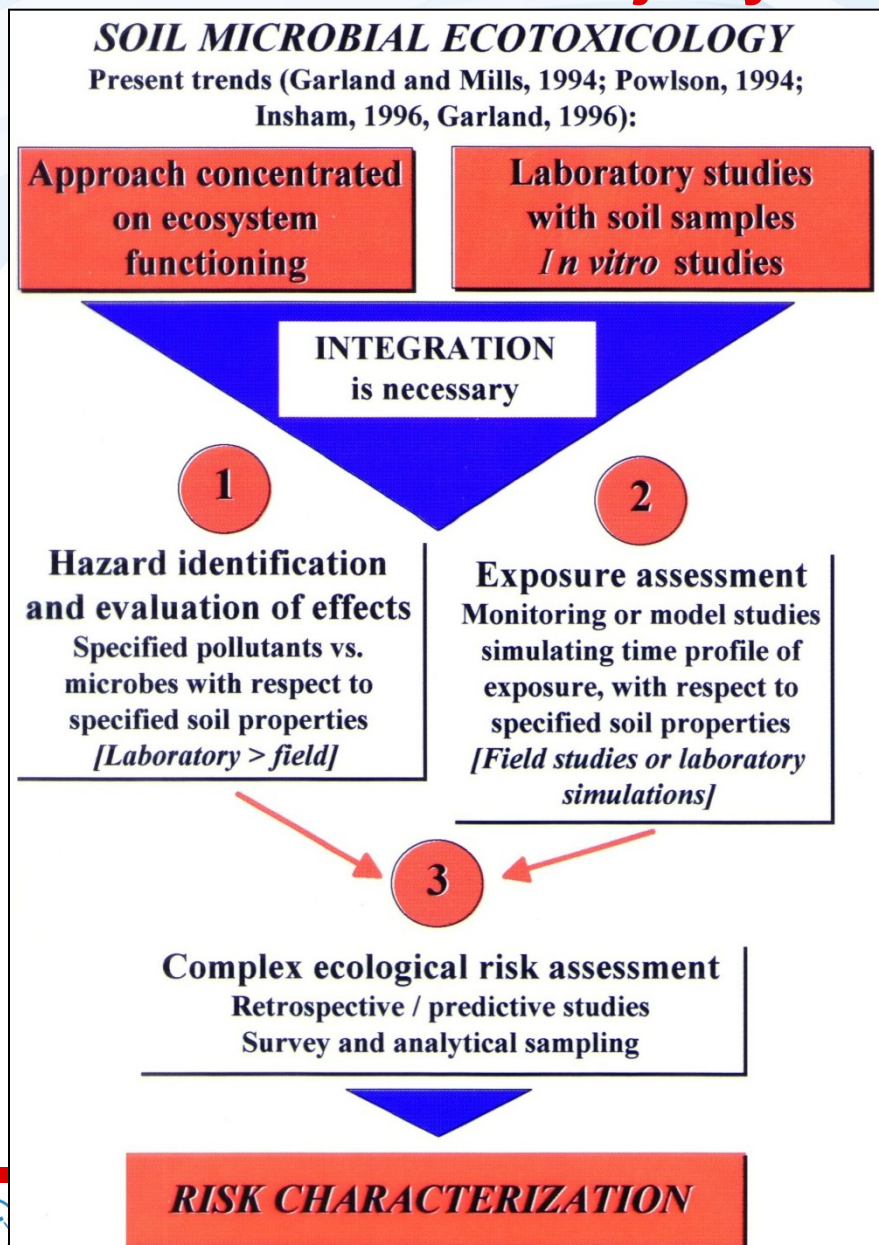
## Laboratorní studie s půdou kontaminovanou v laboratoři:

<b>NA ČEM TESTOVAT</b>	<p>a) Umělý substrát (např. OECD, 1984) - 70% křemenný písek; 20% jíl; rašelina 10%; Voda: 40 - 60% WHC; pH 6,0 0,5</p> <p>b) Přímě na zasažených (nebo potenciálně zasažených) vzorcích půd (nutná znalost: <math>C_{ox}</math>, pH, obsah jílu, písku, KVK, půdní typ)</p>
<b>JAK TESTOVAT</b>	<p>Látka (látky) přidané do půdy podle své chemické podstaty (vhodný roztok, smíchání, fumigace, v organickém rozpouštědle).</p> <p>Nutno založit <u>relevantní</u> kontrolu simulující i způsob aplikace. Pokus uspořádat dle požadavků ve formě "dávka - odpověď". Pokus lze uspořádat jako laboratorní (mikrokosmos, mezokosmos) nebo i polní.</p>
<b>JAK DLOUHO</b>	<p>Lze měřit akutní účinek látky (hodiny - dny) nebo chronické působení v dlouhodobých inkubacích (měsíce - roky)</p>
<b>CO MĚŘIT</b>	<p>Základní sada parametrů, případně doplněná dalšími testy s vhodnými substráty</p>
<b>VYHODNOCENÍ / INTERPRETACE</b>	<p>Křivky "dávka - odpověď" pro jednotlivé parametry. Potenciální vliv testovaných látek</p>



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

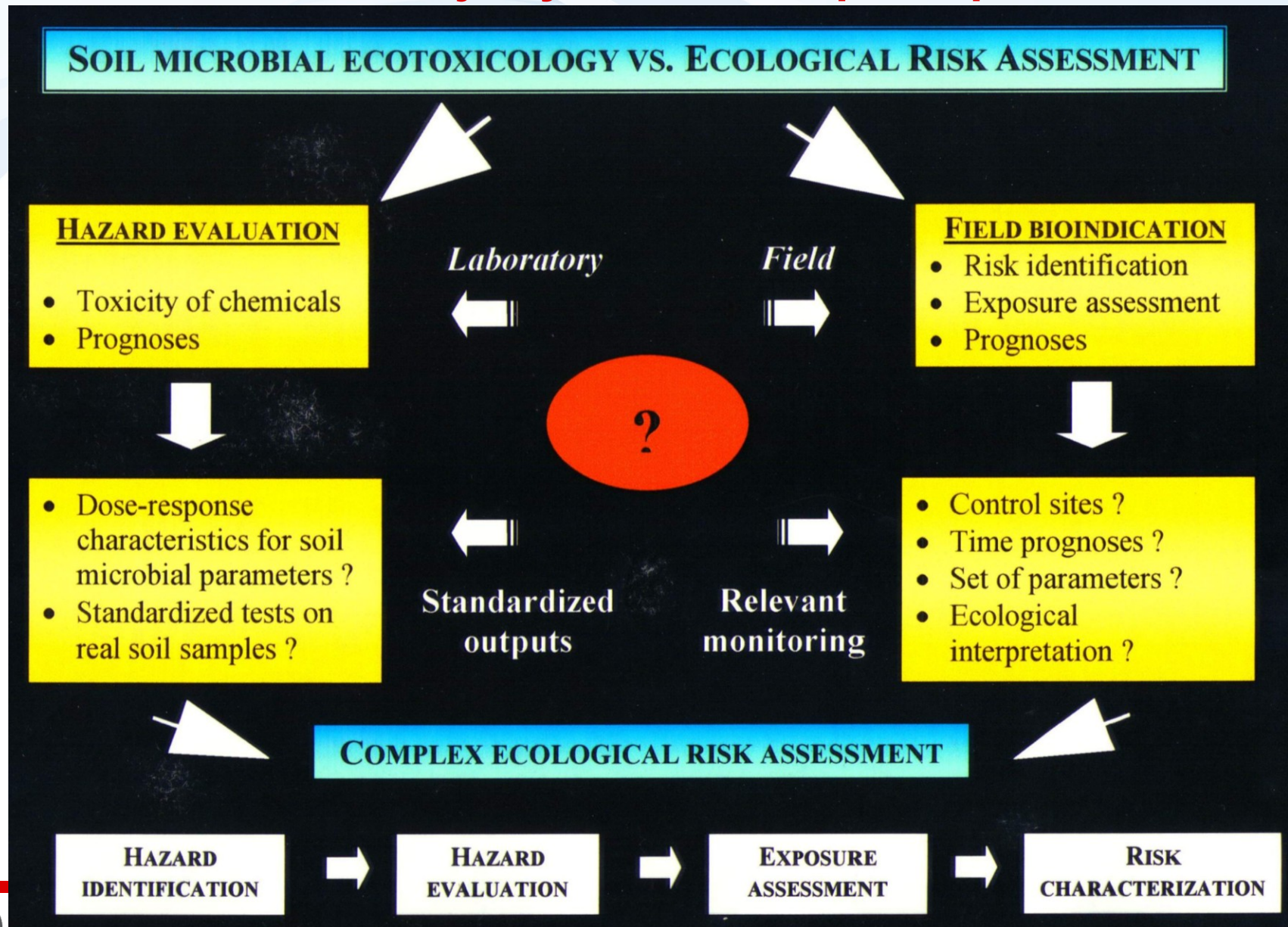
## Ideální je syntéza obou přístupů





# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

Ideální je syntéza obou přístupů



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

---

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

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



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

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

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

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

**Table 1. Considerations regarding the use of microbial processes and microorganisms for ecotoxicological testing in arid and semiarid ecosystems**

<i>Methodology</i>	<i>Ecological Relevance</i>	<i>Standardization<sup>b</sup></i>	<i>Documented Sensitivity</i>	<i>Comments</i>
Litter bag	High <sup>a</sup>	Moderate	Primarily a tool of soil ecologists, although used to assess contaminated soils (see De Jong 1998; Heath et al. 1964; Santos et al. 1981).	Time-tested protocol for studying decomposition in soil systems. Simple to use, although no standard ecotoxicological protocol exists. Considered as having high ecological relevance because it measures the decomposition that is actually occurring in situ. Of the microbial tests presented, this procedure is most highly recommended for assessing chemical toxicity in arid and semiarid soil ecosystems.
Carbon Mineralization / Substrate-Induced Respiration (SIR)	Moderate - high	Moderate	Primarily a tool of soil ecologists (Cheng and Coleman 1989); however, the technique is gaining recognition for its utility in assessing contaminated soils (e.g., Kuperman 1996; Kuperman and Carreiro 1997).	Carbon mineralization is a basic metric of microbial activity and represents microbial respiration of organic matter in the decomposition process. The instrumentation used to quantify substrate-induced respiration is considerably more complex and costly than the litter bag method.
Pollution-Induced Community Tolerance (PICT)	Moderate-high	Moderate	Used as a tool by ecotoxicologists from a system (Biolog <sup>®</sup> ) developed by microbial ecologists. To date, primarily used to assess metal toxicity (Bååth et al. 1998; Rutgers and Breure 1999; Rutgers et al. 1998).	PICT can be cost-effective and rapid, but it is as yet relatively untested and thus not fully standardized. PICT results are subject to interpretational differences, and the system is limited to bacterial analyses.
Soil enzymes	Moderate	Moderate	Used in the assessment of toxic impacts of metals in soil (Bardgett et al. 1994; Kuperman 1996; Kuperman and Carreiro 1997).	Indirectly representative of organic matter mineralization. Requires some analytical sophistication to accurately quantify enzymatic concentrations; its applicability as a direct metric for soil ecosystem function is questionable.
Microtox	Low	High	Used in the toxicity assessment of metals, high explosives, coal oils, and diesel fuels (to name only a few) in soil (Dorn et al. 1998; Marwood et al. 1998; Simini et al. 1995).	Microtox has the highest degree of standardization of all microbial tests. However, results of this test may not be applicable to understanding and assessing toxicity of dry soils.

<sup>a</sup> High ecological relevance; however, a definite confounding factor associated with the litter bag technique is that the test introduces “clean” material.

<sup>b</sup> Although most of these tests meet the highest criteria for standardization (i.e., equivalent to an American Society for Testing and Materials [ASTM]-published method) put forth by Menzie et al. (1996), the test variability associated with different soil matrices and compositions precludes scoring anything but the Microtox test in the “high” standardization category.

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

Table 2. Fulfilment of prerequisites for selected soil-quality indicators

Indicator	Ecological and scientific rationales as quality indicators				Methodology	
	Ecological relevance	Integration of soil properties	Sensitivity to change	Documentation	Reproducibility	Economy/practicability
Basal respiration rate	High	High	Intermediate	High	High	Good (10-day incubation)
SIR biomass	Intermediate-high	High	Intermediate	High	High	Good (10-day incubation)
CFE biomass	Intermediate-high	High	Intermediate	High	Intermediate	Intermediate
Metabolic quotient <sup>1</sup>	Intermediate-high	High	High	Intermediate	Intermediate	Good (10-day incubation)
Anaerobic N-mineralization	High	High	Intermediate	Intermediate	High	Good (10-day incubation)
PAO	High	Intermediate	Very high	Low-intermediate	High	Good
PDA	High	High	High	Intermediate	High	Intermediate
Mycorrhizal colonization	Intermediate-high	High	High	High	Intermediate-high	Poor-intermediate
Mycorrhizal P-transport	High	High	High	Low	Intermediate-high	Poor
Enzymes	Low-intermediate	High	Intermediate	High	Intermediate-high	Good
Community studies	Low-intermediate	High	High	Low-intermediate <sup>2</sup>	Intermediate-high	Poor-good

SIR, substrate-induced respiration; CFE, chloroform fumigation extraction; PAO, potential ammonium oxidation; PDA, potential denitrification activity.

<sup>1</sup> Quotient of basal respiration rate and SIR.

<sup>2</sup> Relatively new methodology; documentation is in many cases rapidly increasing.

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

⊙ laboratorní testy chemikálií (OECD, SETAC, BBA návody)

⊙ monitoring stavu půdních mikroorganismů

Biomonitoring kvality ekosystému  
Ochrana ŽP

Půdní  
mikrobiologie

## “Community level”

- strukturní diverzita
- funkční diverzita
- taxonomická diverzita
- fenotypová diverzita

## “Population level”

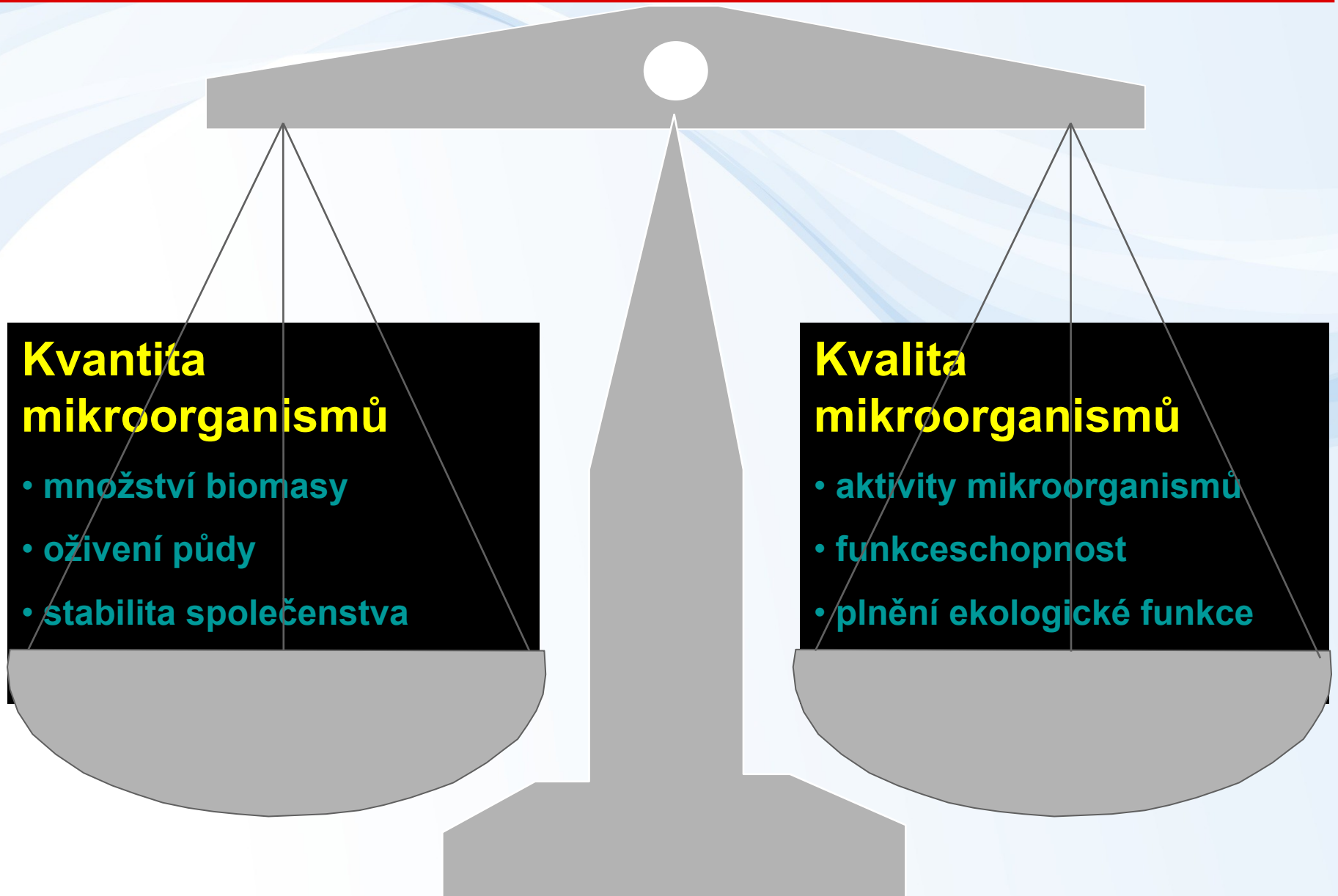
- speciální funkce a aktivity (např. nitrifikace, metanogeneze apod.)

## “Biomass level” přístup

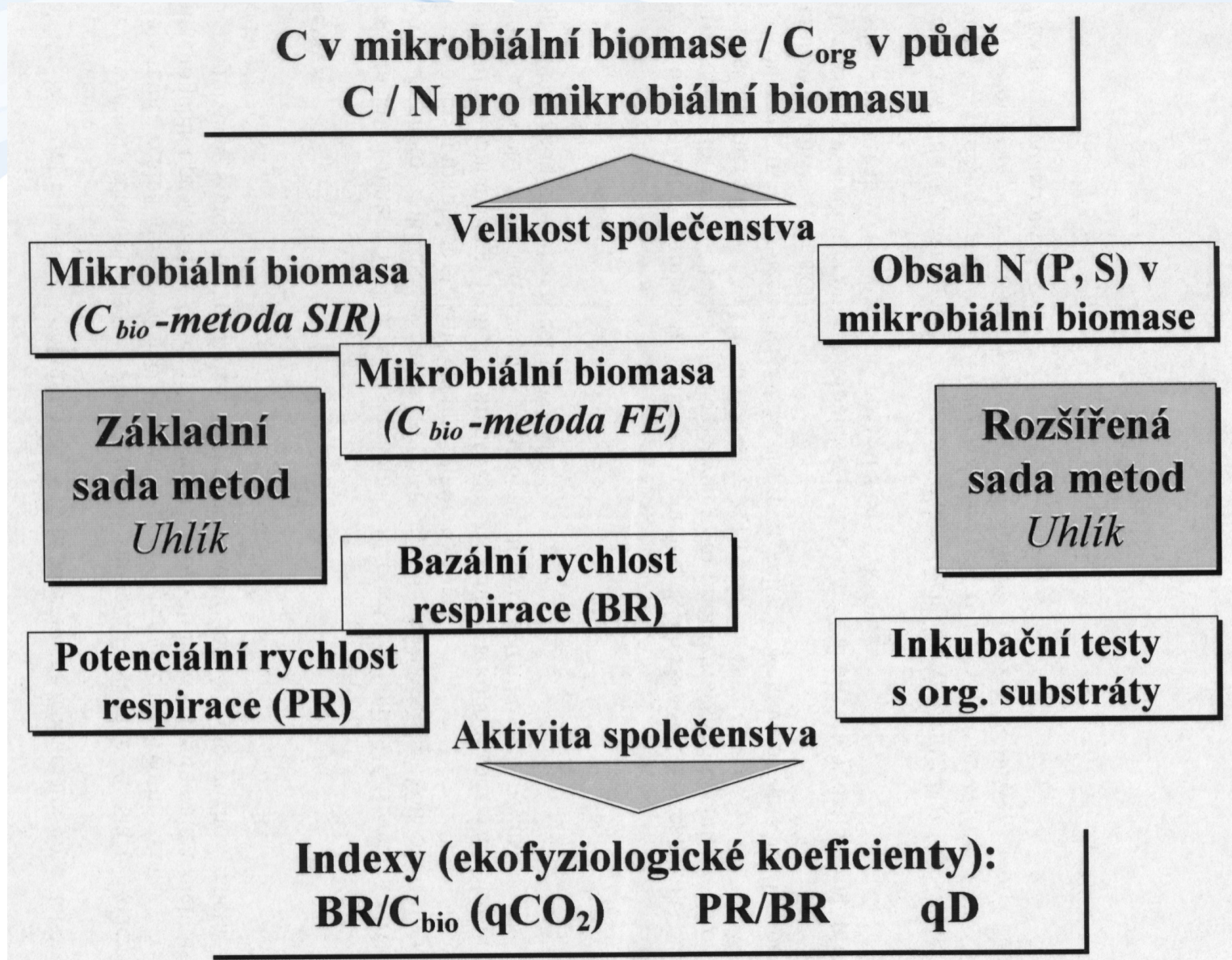
- kvantifikace celé biomasy (např.  $C_{bio}$ )
- aktivity celé biomasy (e.g. respiration)



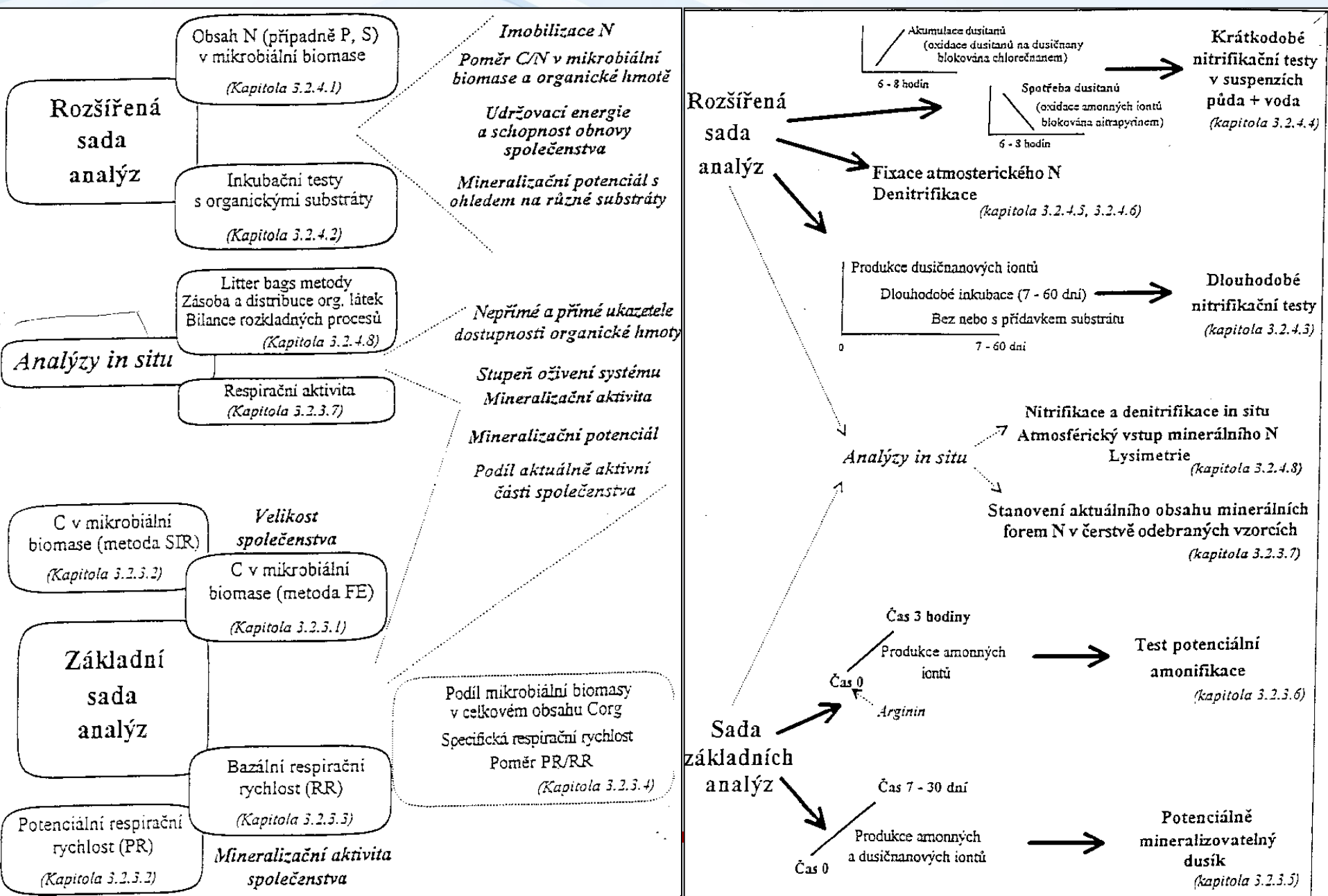
# Mikrobiální ekotoxikologie půdy



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Obsah mikrobiální biomasy a respirační testy - reálná interpretace výsledků

### Bohužel :

V absolutních hodnotách jsou tyto parametry odděleně obtížně interpretovatelné.

Vzhledem k proměnlivosti půd nelze vymezit univerzální limity; např. pro obsah mikrobiální biomasy.

### Naštěstí :

Již ze základních analýz lze v kombinaci metod odvodit řadu smysluplně interpretovatelných údajů:

$PR / C_{bio}$	Specifická potenciální respirace [ $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{den}^{-1} \cdot \text{mg C}_{bio}^{-1}$ ]
$BR / C_{bio}$ (q CO <sub>2</sub> )	Specifická bazální respirace [ $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{den}^{-1} \cdot \text{mg C}_{bio}^{-1}$ ]
$PR / BR$	Bezrozměrný poměr potenciální a bazální respirační aktivity
$C_{bio} / C_{ox}$	Relativní podíl mikrobiální biomasy v půdní organické hmotě



# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Obsah mikrobiální biomasy a respirační testy - reálná interpretace

$$C_{\text{bio}} / C_{\text{ox}}$$

↑  
Syntéza nové biomasy  
Rozvoj společenstva

↓  
Pokles obsahu biomasy  
Dlouhodobě velmi negativní jev

$$BR / C_{\text{bio}}$$

$$(q\text{CO}_2)$$

Nárůst aktivity na jednotku biomasy

Pokles aktivity na jednotku biomasy

↑  
a) zvýšené nároky na udržovací energii -  
dlouhodobě negativní  
b) krátkodobá reakce na dostupný  
substrát

↓  
a) syntéza nové biomasy -  
dlouhodobě pozitivní  
b) prudká inhibice respirační aktivity

$$PR / BR$$

↓  
Pokles reakce na lehce dostupný substrát

↑  
Intenzivní reakce na lehce dostupný  
substrát

a) zvýšená "nabídka" substrátu v půdě  
b) inhibice respirační aktivity

a) nedostatek dostupného substrátu  
v půdě; nedostatek energie  
b) velký mineralizační potenciál

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

---

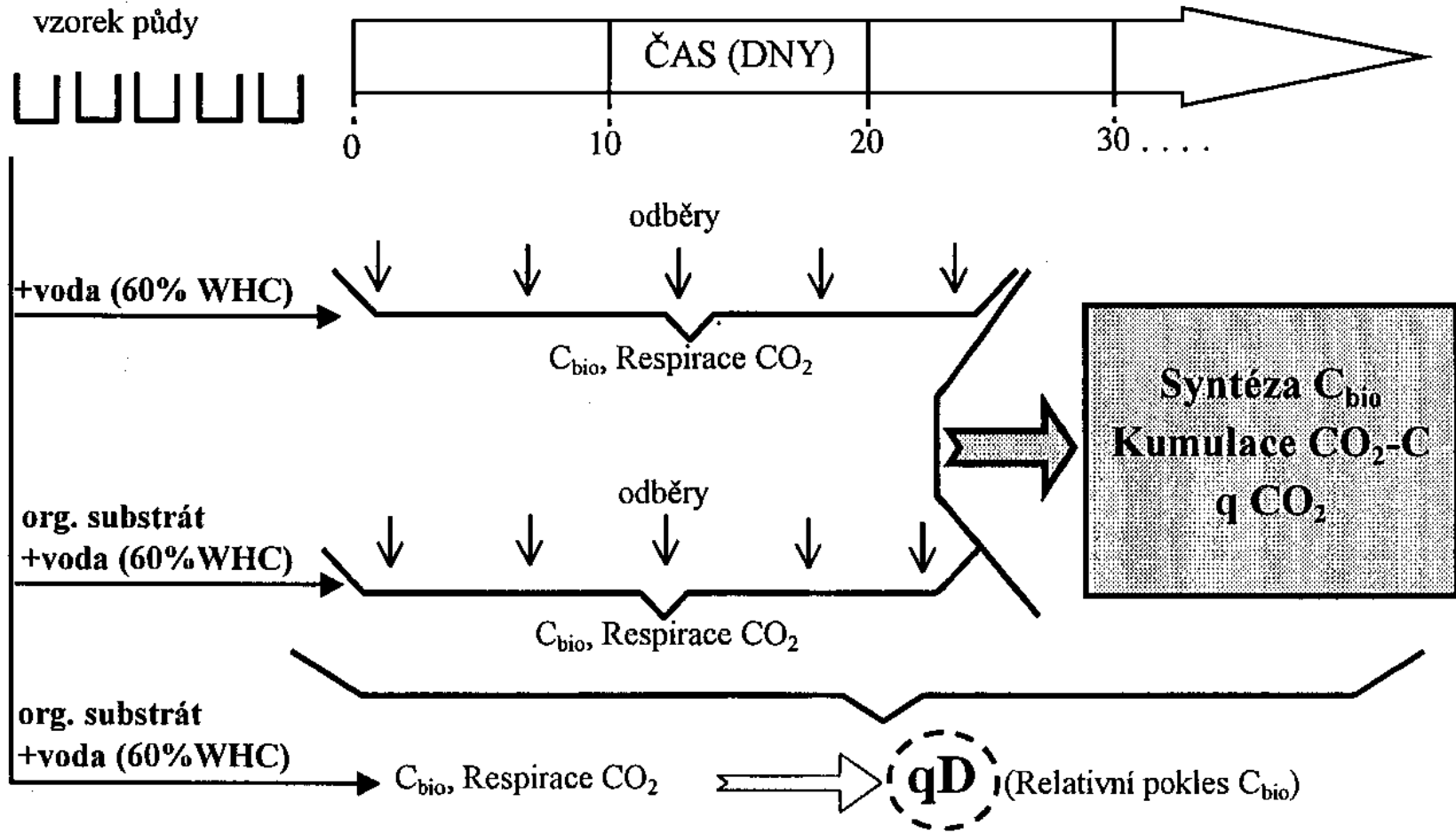
- $qCO_2$  v  $mg\ CO_2 / h / 100\ mg\ C_{bio}$
- v kompostu a zahradním substrátu cca 1
- nárůst cca do 2 – 3 spíše pozitivní
- několik desítek – nevyzdrálý kompost

# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

- I další koeficienty, např.  $C_{ex} / C_{bio}$  (%) – poměr dostupného uhlíku ku tomu, který je fixován v biomase
- dlouhodobý pokles je pozitivní a ukazuje na využitelnost mimobuněčného uhlíku
- respirace plus přidán síran amonný (fyziologicky dostupný dusík)
- $BR-N / BR$  je 2 – 1,5 = zlepšení přístupného dusíku
- na orných půdách je 1 a 1,2 – 1,5 dobrý stav
- 2 a více znamená nedostatek dostupného dusíku

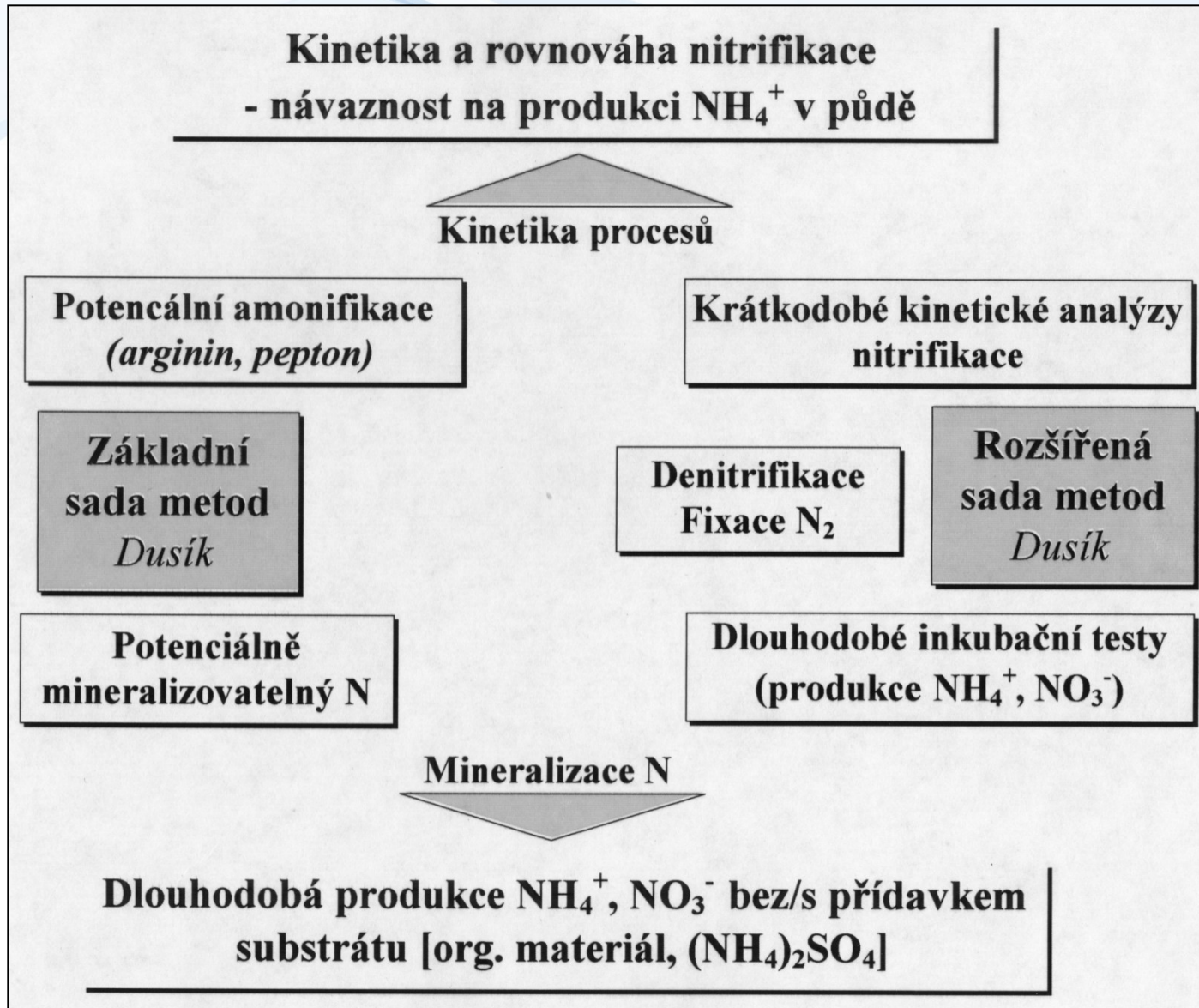
# Mikrobiální ekotoxikologie půdy

## Laboratorní inkubace - vysoce doporučené rozšíření základní sady metod





# Mikrobiální ekotoxikologie půdy



- 
- **AMO  $\mu\text{g NH}_4\text{-N / g / hod}$  – bývá tak 4 – 9 bez N přídávku**
  - **38 – 124 s přídávkem peptonu**
  
  - **NIT  $\mu\text{g NO}_3\text{-N / g / den}$  je cca 1,6 – 0,8**
  - **7 – 12 vyšší met. kapacita**
  - **snížení je pozitivní – půda neztrácí dusík**



# Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in agricultural soil.

## 1. Short-term effects on soil microbiology.

- autoři sledovali účinek LAS mikroorganismy písčité zemědělské půdy během 11-ti denní laboratorní inkubace
- 10 mikrobiálních parametrů:
  - degradace ethylenu
  - potenciální oxidace amoniaku
  - potenciální aktivita dehydrogenázy
  - $\beta$ -glukosidázová aktivita
  - redukce železa
  - populace cellulolytických bakterií, hub a aktinomycét
  - bazální respirace půdy
  - obsah PLFA

jako necitlivé se ukázaly  $\beta$ -glukosidázová aktivita, bazální respirace půdy a obsah PLFA, důvodem byla pravděpodobně kombinace stimulu a inhibice různých částí mikrobiálního společenstva

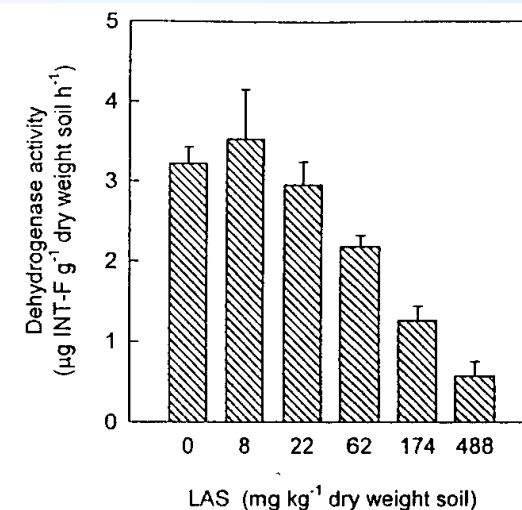
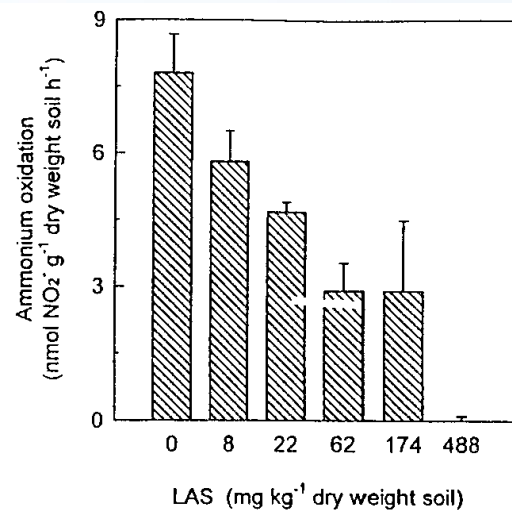
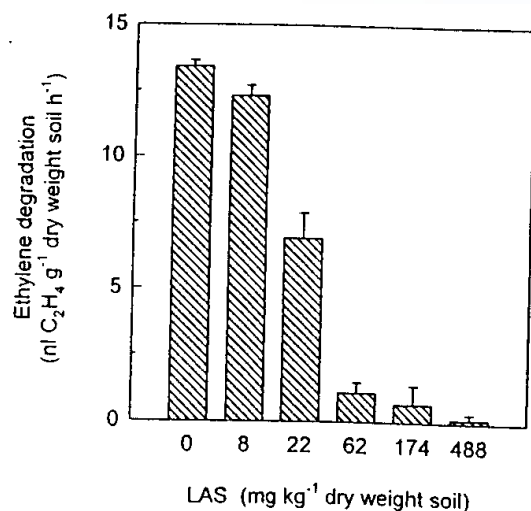


Fig. 1. Dose response of ethylene degradation in agricultural soil following linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for approximately 0.5 d. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation (vertical bars) of three pseudoreplicates.

Fig. 2. Dose response of potential ammonium oxidation in agricultural soil after linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 7 d. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation (vertical bars) of three replicates.

Fig. 3. Dose response of potential dehydrogenase activity in agricultural soil after linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 7 d. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation (vertical bars) of three replicates. INT-F = iodinitrotetrazolium formazan.

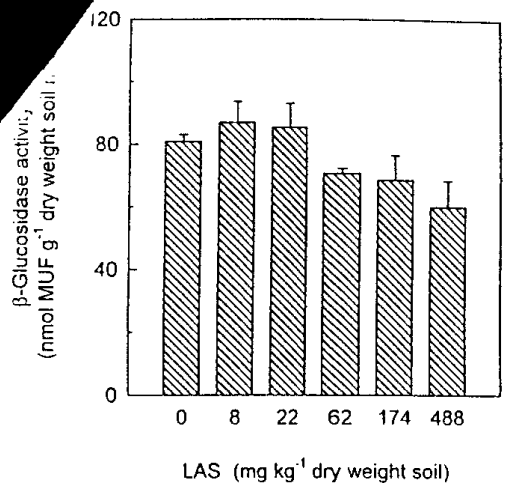


Fig. 4. Dose response of beta-glucosidase activity in agricultural soil after linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 7 d. Data represent the mean ± standard deviation (vertical bars) of three replicates. MUF = 4-methylumbelliferone.

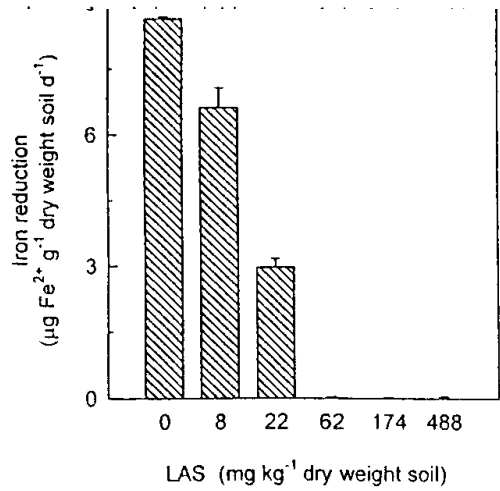


Fig. 5. Dose response of iron reduction in agricultural soil after linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 5 d. Data represent the mean ± standard deviation (vertical bars) of three replicates.

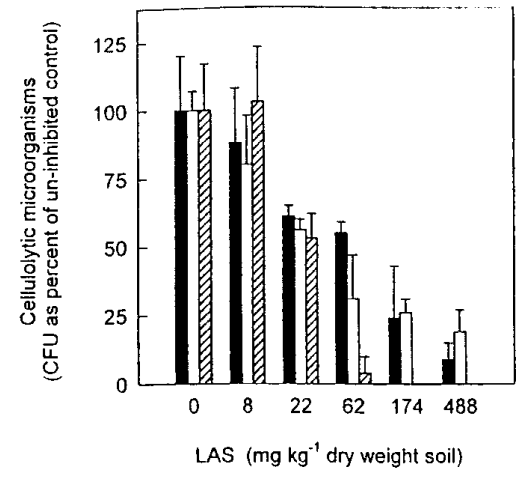


Fig. 6. Dose response of cellulolytic actinomycetes (solid bars), fungi (open bars), and bacteria (hatched bars) in agricultural soil after linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 7 d. The number of colony-forming units (CFU) per gram dry weight soil of the uninhibited control were  $9.1 \times 10^5$  for actinomycetes,  $1.1 \times 10^6$  for fungi, and  $3.4 \times 10^6$  for bacteria. Data represent the mean ± standard deviation (vertical) of three replicates.

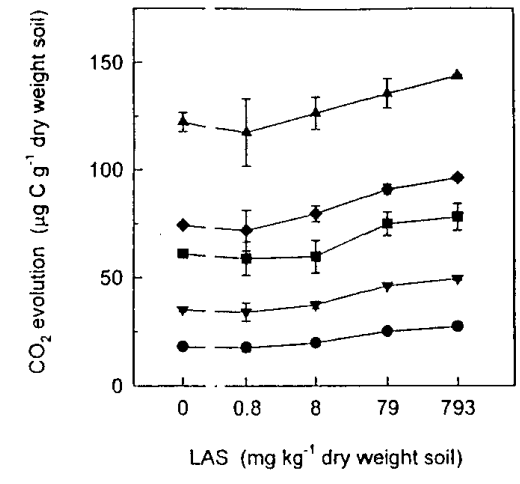


Fig. 7. Dose response of basal soil respiration (CO<sub>2</sub> evolution) in agricultural soil after incubation and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) exposure for 1 (●), 2 (▼), 4 (■), 5 (◆), and 9 (▲) d. Data represent the mean ± standard deviation (vertical bars) of two replicates.







Table 2. Effect concentrations (EC10, EC50, no-observed-effect concentration [NOEC], and lowest-observed-effect concentration [LOEC]) for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) toward microbial parameters in agricultural soil<sup>a</sup>

Microbial parameter	Incubation (d)	EC10	EC50	NOEC	LOEC
Ethylene degradation	0.5	9	24	NA	NA
Ammonium oxidation	7	<8	40	0	10
Dehydrogenase activity	7	22	128	22	62
β-Glucosidase activity	7	47	>488	174	488
Iron reduction	5	<8	17	0	8
Cellulolytic bacteria	7	11	24	8	22
Cellulolytic fungi	7	<8	32	8	22
Cellulolytic actinomycetes	7	8	80	8	22
Basal soil respiration	1-9	>793	>793	>793	>793
PLFA <sup>c</sup> content	11	>488	>488	>488	>488

<sup>a</sup> For EC10 and EC50, the 95% confidence limits are given in parentheses. Data for LAS in soil are presented as mg/kg dry weight.

<sup>b</sup> NA = not available.

<sup>c</sup> PLFA = phospholipid fatty acid.



**Table 2.** Illustration of the role of microbiological bioassays in setting soil loading guidelines for smelter emissions. Shown are the five most sensitive bioassays considered for setting soil critical load limits for atmospheric deposition of each of 6 metals/metalloids. For each bioassay, the reference source as cited in Bird *et al.* (1999) is shown and the corresponding dissolved free-ion concentration in soil ( $\text{mg L}^{-1}$ ) is given. The shaded references are those based on microbiological bioassays.

Cd	Cu	Ni	P	Zn	As
Ibekwe et al. 1996 <i>Medicago sativa</i> shoot yield reduction	0.0018 Miles and Parker 1979b <i>Andropogon scoparius</i> root dry weight	0.010 Paliouris and Hutchinson 1991 <i>Silene vulgaris</i> root length	0.01 Balba et al. 1991 <i>Lycopersicum esculantum</i> dry weight of fruit	0.011 Posthuma et al. 1997 <i>Enchytraeus crypticus</i> reproduction	0.28 Wetzel and Werner 1995 <i>Rhizobium meliloti</i> number of nodules
Ibekwe et al. 1996 <i>Rhizobium meliloti</i> number of nodules	0.0022 van Gestel et al. 1991 <i>Eisenia fetida</i> growth	0.021 Dixon 1988 mycorrhiza percent laterals	0.19 Balba et al. 1991 <i>Lycopersicum esculantum</i> dry weight of fruit	0.013 Smit and van Gestel 1996 <i>Folsomia candida</i> number at 4 weeks	0.05 Steevens et al. 1972 <i>Pisum sativum</i> fresh weight of shelled peas
Wetzel and Werner 1995 <i>Rhizobium meliloti</i> number of nodules	0.0090 Halsall 1977 <i>Phytophthora</i> on roots	0.022 Wilke 1988 dehydrogenase activity	0.22 Balba et al. 1991 <i>Lycopersicum esculantum</i> dry weight of fruit	0.017 Sheppard et al. 1993 <i>Brassica rapa</i> time to first bloom	0.06 Jacobs et al. 1970 <i>Phaseolus vulgaris</i> fresh weight of pods
Bingham et al. 1975 <i>Spinacia oleracea</i> shoot yield	0.06 Chang and Broadbent 1981 microbial activity reduction in $\text{CO}_2$ evolution	0.024 Dixon and Buschena 1988 ectomycorrhiza reduced	0.26 Miles and Parker 1979b <i>Andropogon scoparius</i> root dry weight	0.03 Chang and Broadbent 1981 microbial activity $\text{CO}_2$ evolution	0.07 Woolson 1973 <i>Phaseolus vulgaris</i> plant yield
Bingham et al. 1975 <i>Glycine max</i> dry bean yield	0.07 Schat and Ten Bookum 1992 <i>Silene vulgaris</i> root growth	0.058 Dixon 1988 <i>Quercus rubra</i> leaf area	0.38 Seiler and Paganelli 1987 <i>Picea rubens</i> shoot and root growth	0.12 Sheppard et al. 1993 <i>Lumbricus terrestris</i> survival	0.13 Woolson 1973 <i>Phaseolus vulgaris</i> plant yield



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Vodní ekosystémy



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



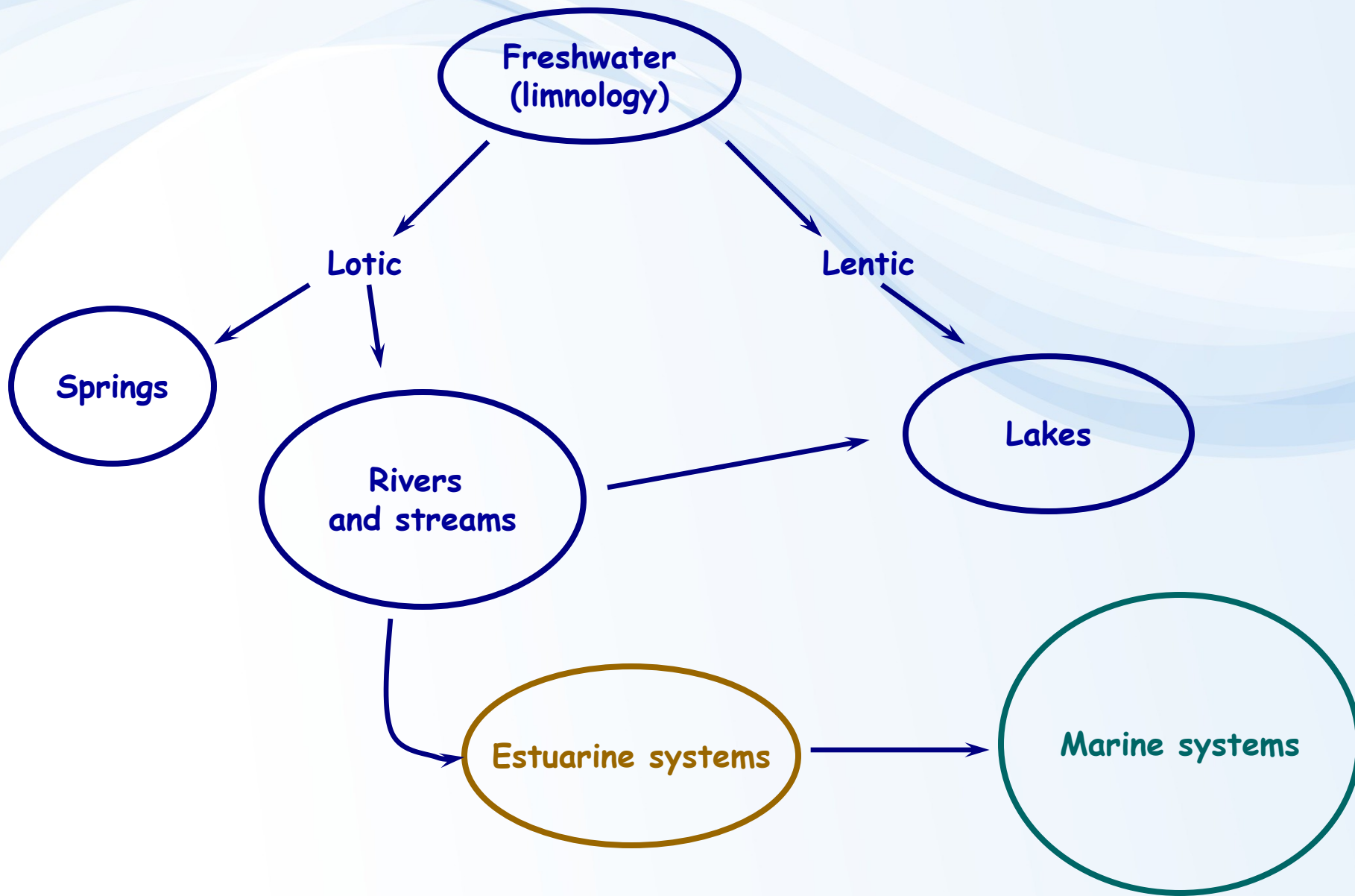


## Specifika mikroorganismů ve vodním ekosystému

- pohyb – mnohem aktivnější protorové přesuny než v půdě
- rostou za velmi nízkých koncentrací živin – jsou schopny jejich „vychytávání“
- tomu se přizpůsobují i např. tvarem – zvýšení aktivního povrchu
- mikroorganismy zastávají také roli producentů – heterotrofní producenti – **microbial loop**

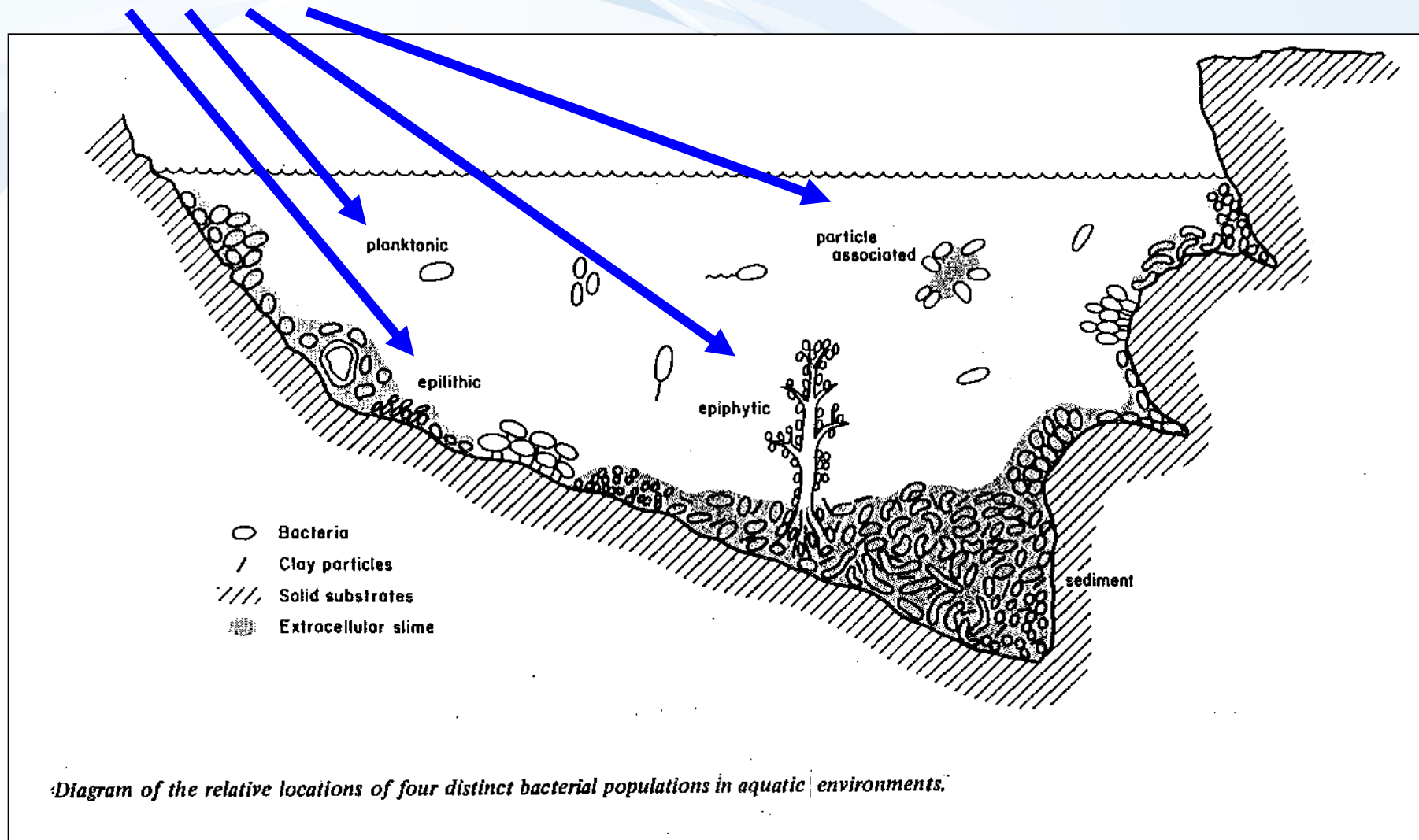


# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů



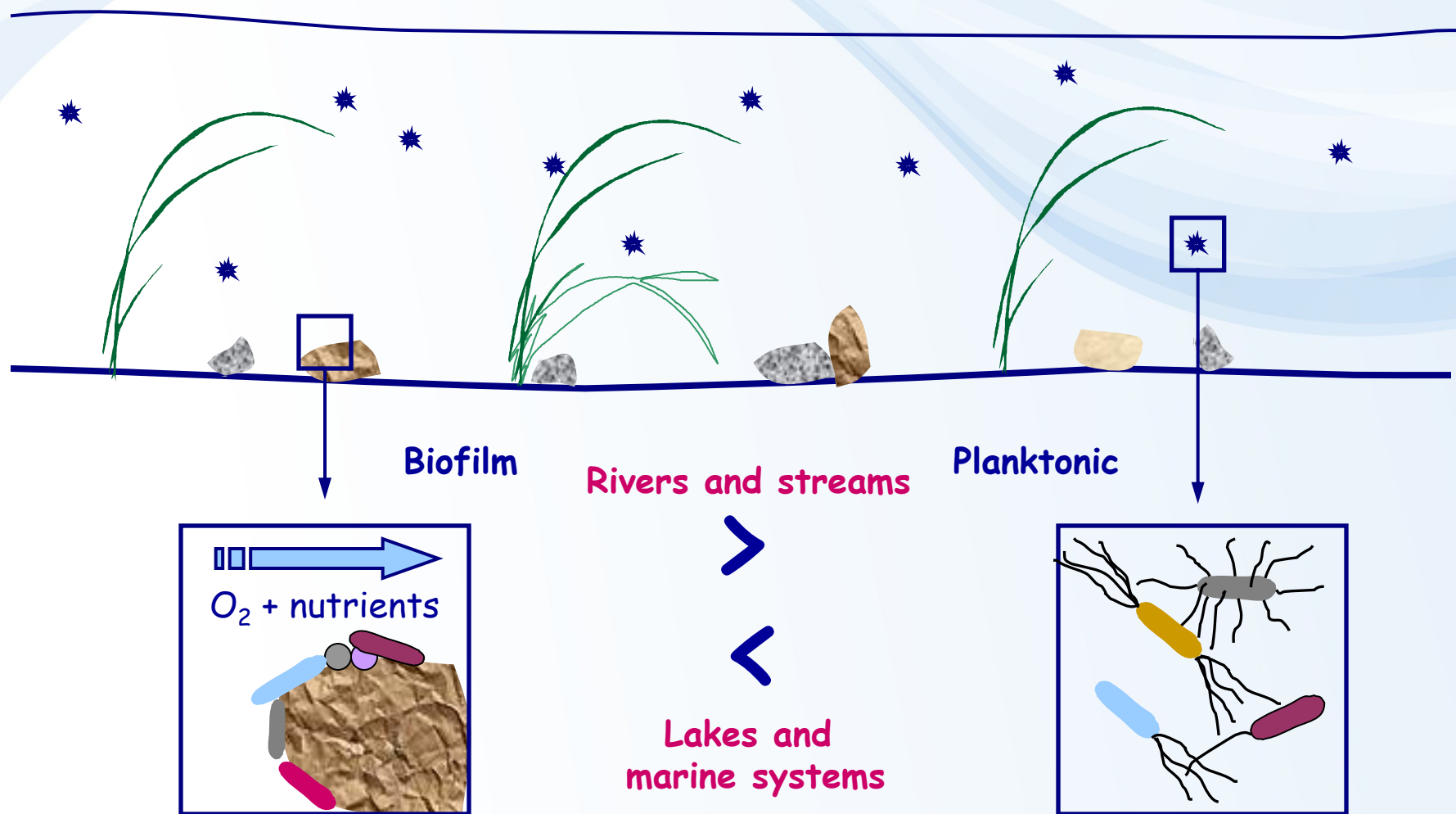
# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

## Čtyři hlavní typy mikrobiálních populací ve vodních ekosystémech



# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

Zastoupení jednotlivých typů společenstev se liší mezi typy vodních ekosystémů

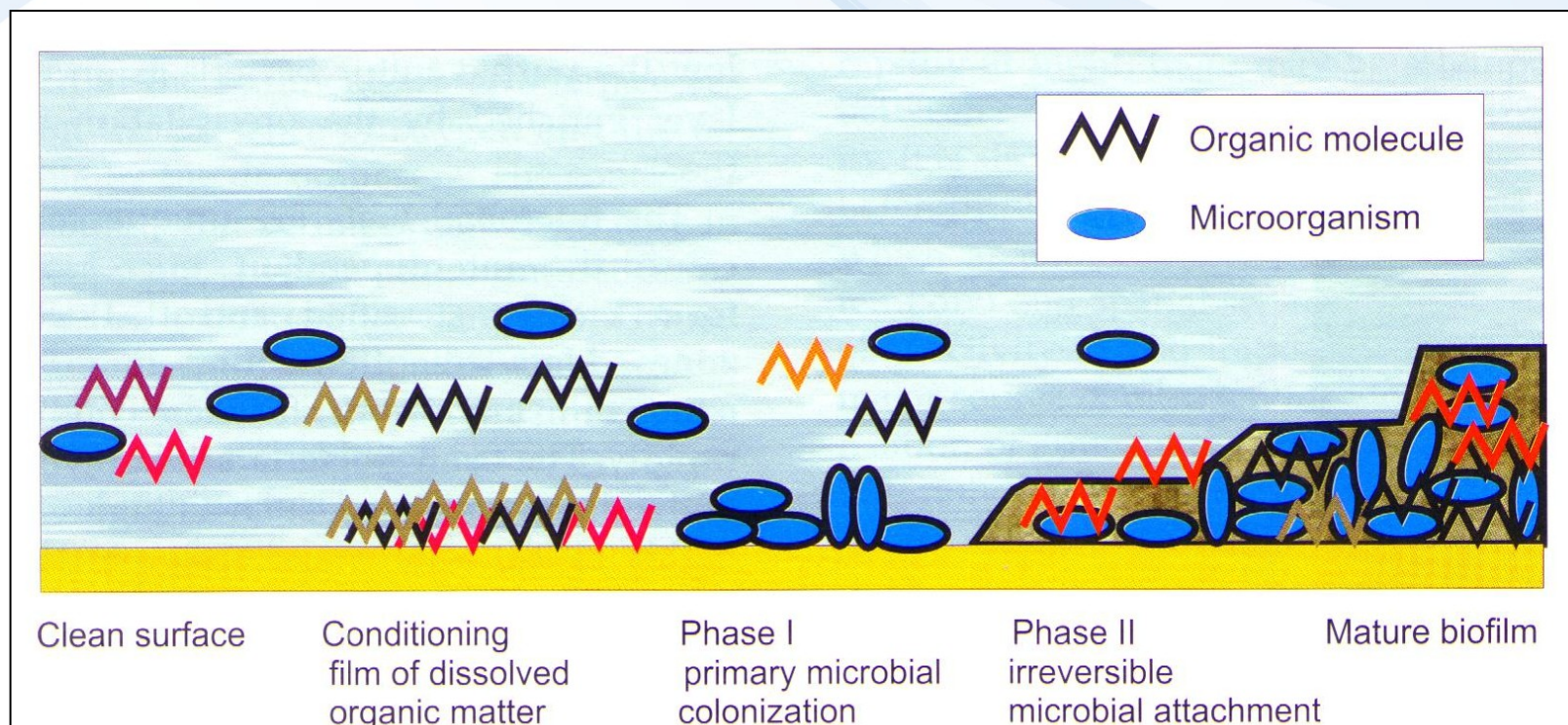




# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

**BIOFILM** = vrstva organického materiálu a mikroorganismů vzniklá na povrchu objektu

Význam při degradacích, čištění odpadních vod, v laboratorních studiích



**FIGURE 6.5** Representation of biofilm formation. Dissolved organic molecules of a hydrophobic nature accumulate at the solid surface–water interface and form a conditioning film. Bacteria approach the solid surface because of water flow and/or active motility. The initial adhesion (phase I) is controlled by various attractive or repulsive physicochemical forces leading to passive, reversible attachment to the surface. An irreversible attachment is a biological, time-dependent process related to the proliferation of bacterial exopolymers forming a chemical bridge to the solid surface (phase II). By a combination of colonization and bacterial growth, the mature biofilm is formed. It is characterized by cell clusters surrounded by water-filled voids. (Adapted from Marshall, 1992, and Marshall, 1997.)



## Microbial loop u planktonu

**Fytoplankton – fotoautotrofové – primární producenti**

dissolved organic matter

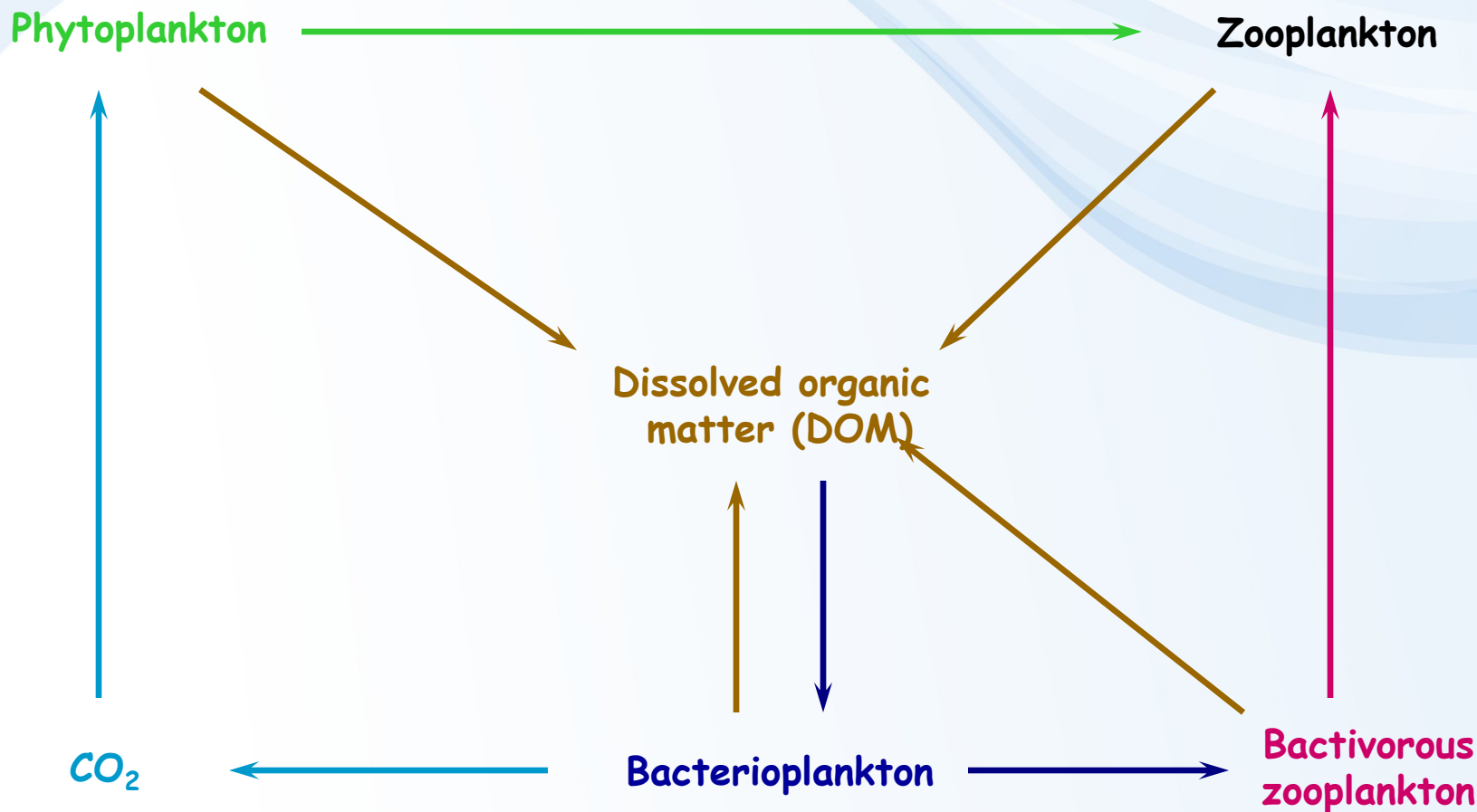
particulate organic matter

**Bakterioplankton – heterotrofní bakterie – sekundární „heterotrofní“  
producenti**

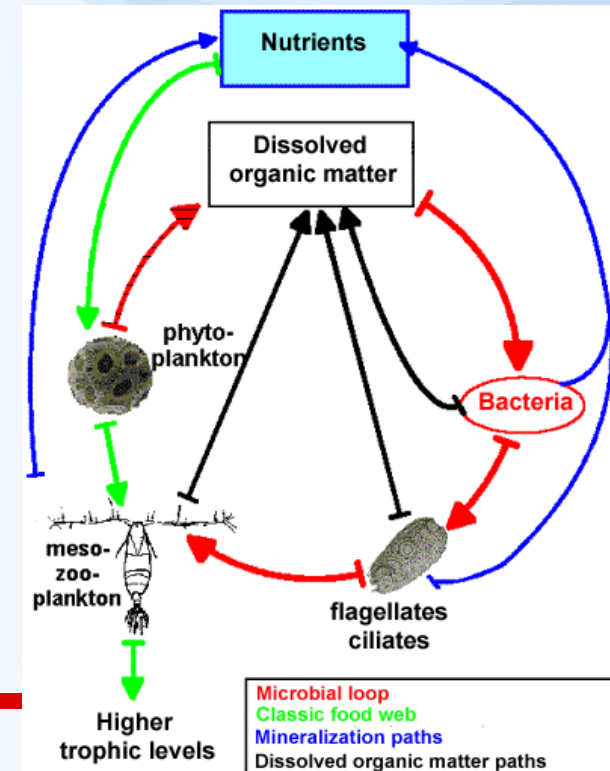
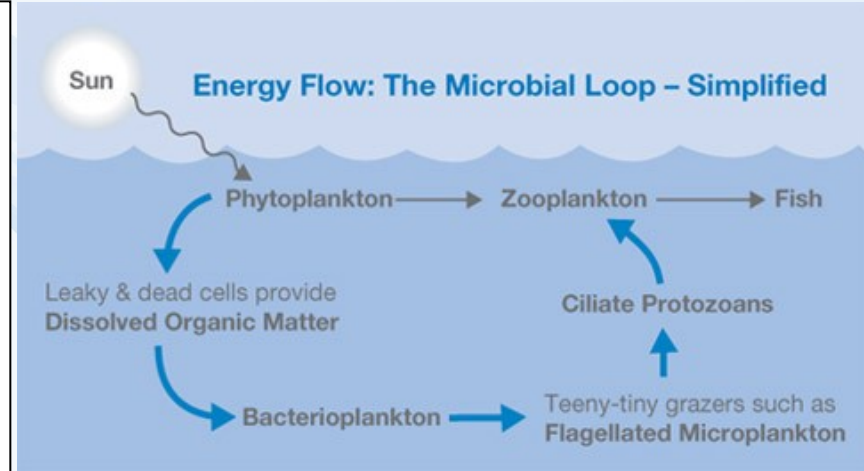
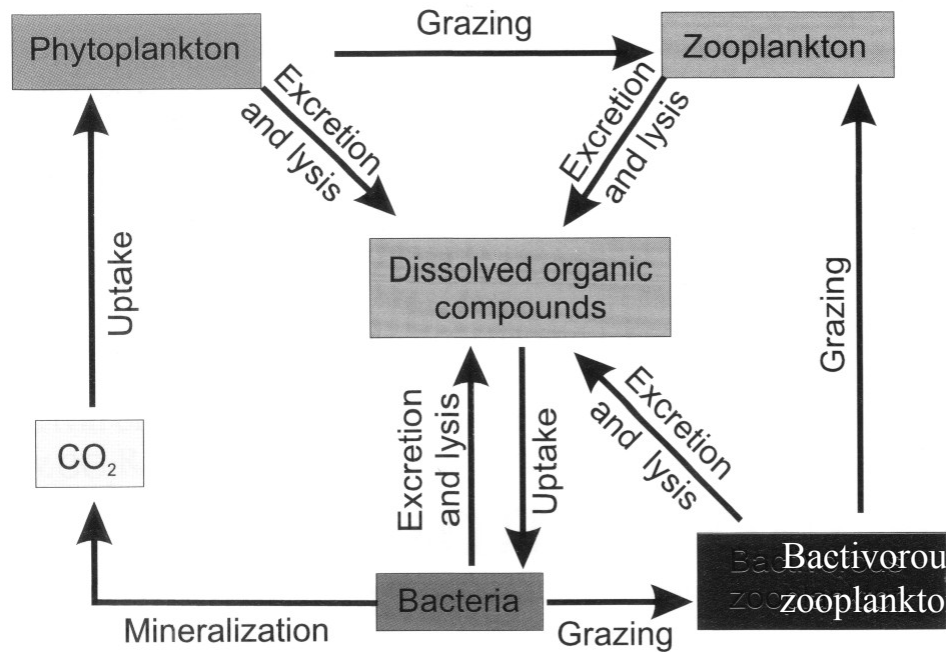
**Zooplankton – protozoa**

# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

## Microbial Loop



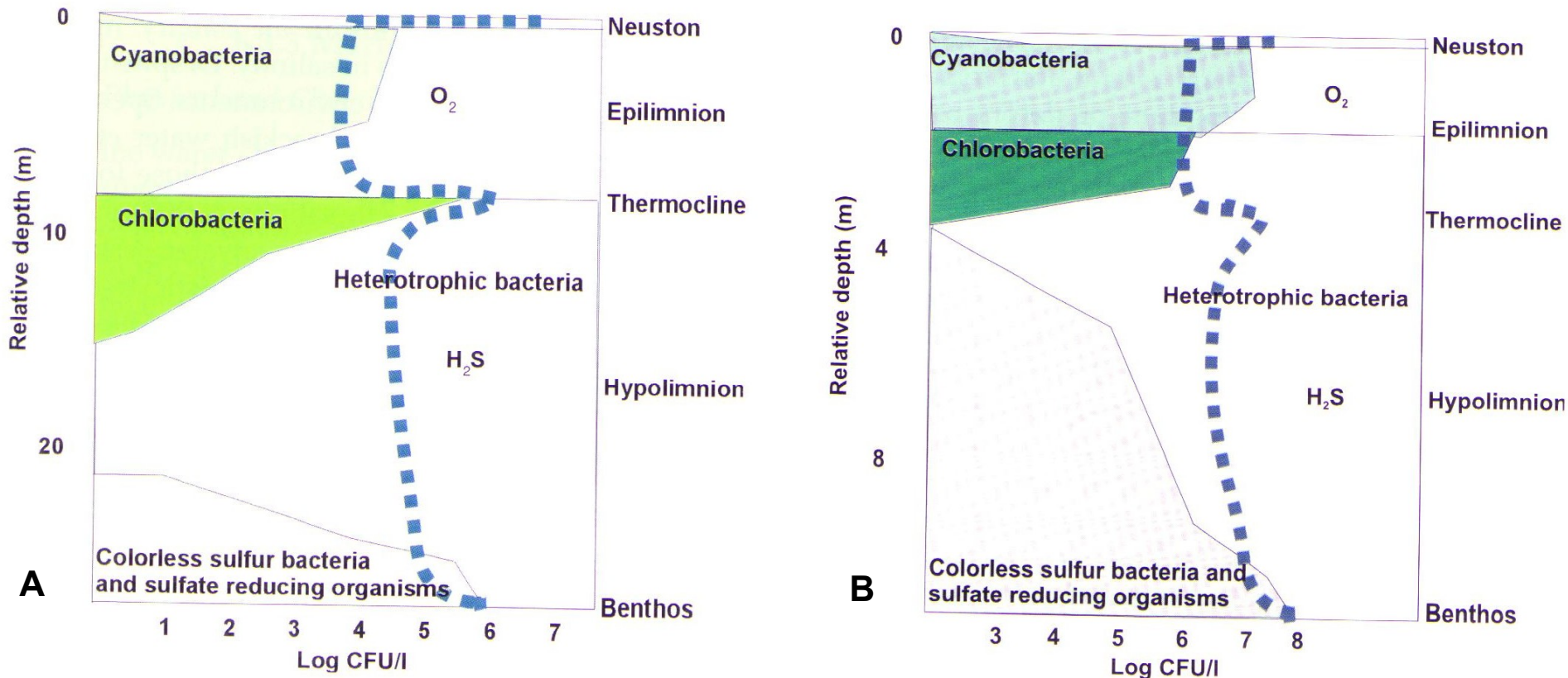
# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů



**FIGURE 6.1** The microbial loop in the planktonic food web. The microbial loop represents a pathway in which the dissolved organic products are efficiently utilized. The role of bacterioplankton is to mineralize important nutrients contained within organic compounds and to convert a portion of the dissolved carbon into biomass. Grazing by bacterivorous protozoans provides a link to higher trophic levels. (Modified from Fuhrman, 1992.)

# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

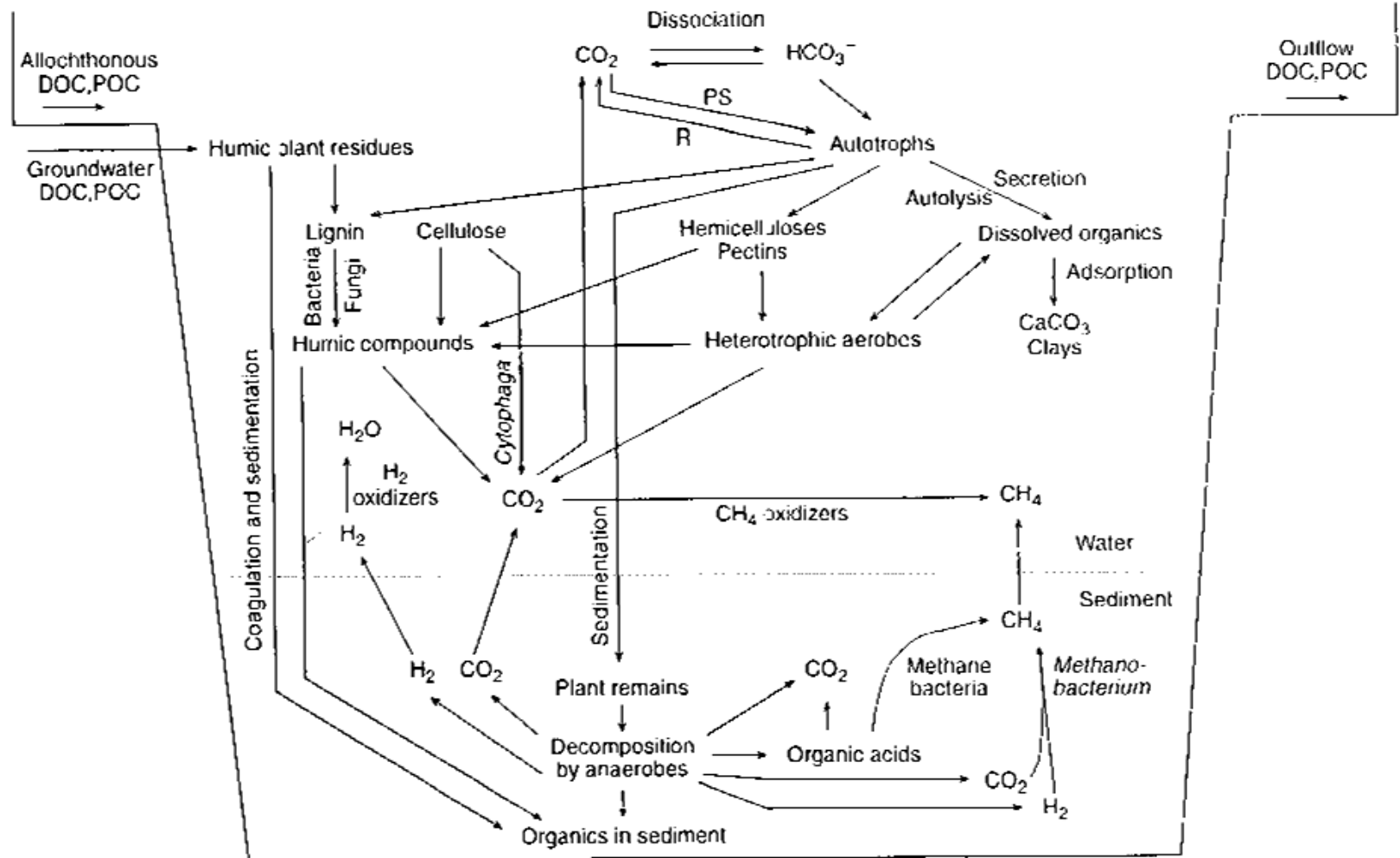
Je také výrazná distribuce vertikální



**FIGURE 6.14** (A) Schematic representation of bacterial distribution in a typical oligotrophic lake. Notice especially the distribution and concentrations of the photosynthetic populations. Also note the lower concentration of heterotrophs in the upper zone, where cyanobacteria predominate. The large increase in the heterotrophic population between the epilimnion and the hypolimnion is related to the presence of a zone where organic matter accumulates. This area is known as a thermocline and is a zone where the sunlight-warmed surface water (less dense) and the deeper colder water (more dense) meet, forming a density gradient where organic matter accumulates. (B) Schematic representation of a typical eutrophic lake. The figure shows the same groups of organisms as in (A) indicating the localization and relative concentrations throughout the water column. Notice that both the photosynthetic and the heterotrophic populations are considerably higher in a eutrophic lake. (Adapted from Rheinheimer, 1985.)



# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů



**Figure 9.19**

Carbon cycle of a typical freshwater lake. DOC = dissolved organic carbon; POC = particulate organic carbon; PS = photosynthesis; R = respiration. The figure illustrates the key role of microorganisms in carbon cycling of a lake habitat. (Source: Wetzel 1975. Based on Kuznetsov 1959. Reprinted by permission, copyright W. B. Saunders Co., Philadelphia.)



# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů



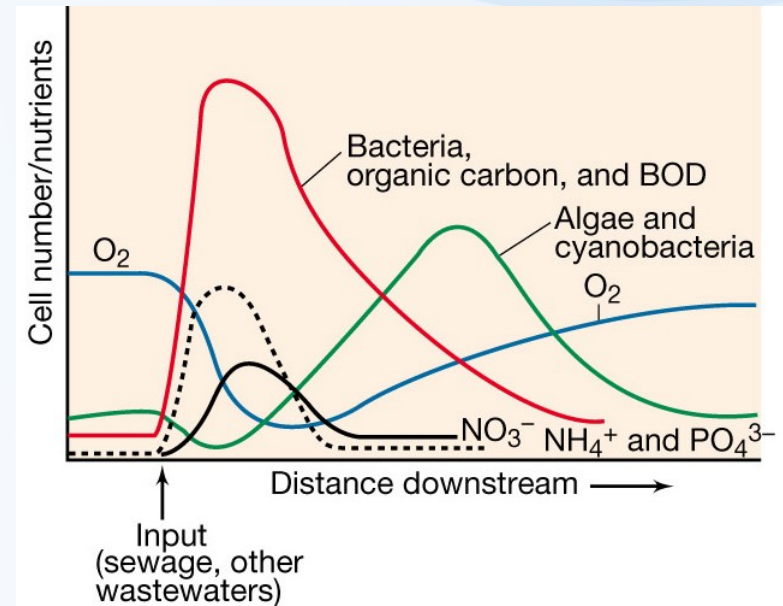
Effect of input of sewage or other organic-rich wastewaters into aquatic systems

In a river, an increase in heterotrophic bacterial numbers and a decrease in  $O_2$  levels occur immediately upon a spike of organic matter.

If  $NH_4^+$  is present in the input, for example from sewage, is oxidized to by nitrifying bacteria - note how the rise in  $NH_4^+$  is followed shortly by the rise in  $NO_3^-$ , as the two-stage process of nitrification proceeds.

The rise in numbers of algae and cyanobacteria is primarily a response to inorganic nutrients, especially  $PO_4^{3-}$ .

Oxygen levels return to their pre-input levels once most of the oxidizable organic and inorganic compounds are depleted.





## Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs

Stéphane Pesce<sup>a,b,1</sup>, Céline Fajon<sup>a,\*</sup>, Corinne Bardot<sup>a</sup>, Frédérique Bonnemoy<sup>a</sup>,  
Christophe Portelli<sup>a</sup>, Jacques Bohatier<sup>a</sup>

### Abstract

To determine the effects of anthropic activities on river planktonic microbial populations, monthly water samples were collected for 11 months from two sampling sites characterized by differing nutrient and pesticide levels. The difference in trophic level between the two stations was particularly pronounced from May to November. Total pesticide concentrations were notably higher at the downstream station from April to October with a clear predominance of herbicide residues, especially the glyphosate metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA). From spring, algal biomass and density were favored by the high orthophosphate concentrations recorded at the downstream location. However, isolated drops in algal biomass were recorded at this sampling station, suggesting an adverse effect of herbicides on algal communities. No major difference was observed in bacterial heterotrophic production, density, or activity (CTC reduction) between the two sampling stations. No major variation was detected using the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method, but shifts in bacterial community composition were recorded by PCR–TTGE analysis at the downstream station following high nutrient and pesticide inputs. However, outside the main anthropic pollution period, the water's chemical properties and planktonic microbial communities were very similar at the two sampling sites, suggesting a high recovery potential for this lotic system.





## Chlorophyll a levels and algal cell counts

- Samples (50–250 ml, triplicates) for chlorophyll a (chl-a) assay were **filtered** on glass fiber filters (2 mm) and frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Chl-a was extracted for 24 h with 90% acetone and measured by spectrophotometry. For qualitative and quantitative analysis of phytoplankton, samples were fixed with Lugol's iodine solution (2%, final concentration) and **cells were enumerated with an inverted microscope** using sedimentation chambers. Algal cells were identified to genus level.

## Production, abundance and physiological activity of heterotrophic bacteria

- Production of heterotrophic bacteria was immediately estimated using **tritiated thymidine incorporation**. Bacterial density was determined using **epifluorescence microscopy**. Samples (2 ml) were fixed with formaldehyde (2%, final concentration) and analyzed by **DAPI staining**.
- **Bacterial physiological activity** was assessed using 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (**CTC**).

## Fluorescent in situ hybridization (FISH) with group-specific rRNA oligonucleotides

- The relative abundance of four major phylogenetic groups was analyzed by **FISH** with oligonucleotide probes. Specific probes were used to detect bacteria of the  $\alpha$ - (ALF1b),  $\beta$ - (BET42a), and  $\gamma$ - (GAM42a) subdivisions of Proteobacteria and of the Cytophaga-Flavobacterium cluster (CF319a).

## PCR amplification and temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE)

- Samples (80 ml) were **centrifuged** ( $15,000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for 45 min. The resulting pellet was resuspended in 545  $\mu\text{l}$  TE buffer (pH 8) and conserved at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the extraction. **Genomic DNA was extracted**.
- The V6–V8 regions of **16S rRNA** gene were amplified by **PCR** using primers GC-968f and 1401r. **Electrophoresis** was performed. Gel was stained using a Gel Star nucleic acid gel stain bath (BMA) and digitized using a Versa Doc™ Imaging System (Bio-RAD). **Electrophoresis for TGGE** was run for 17 h at 68 V at a temperature increasing from 66 to  $69.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a ramp rate of  $0.2\text{ }^{\circ}\text{C h}^{-1}$ .





# Mikrobiální společenstva vodních ekosystémů

Aquatic Toxicology 86 (2008) 352–360

