

## 1. Předmět metody

Metoda popisuje stanovení bazální respirační aktivity mikroorganismů v půdě, tedy bez přidání jakéhokoliv substrátu. Po ovlhčení na 60 % WHC se půda inkubuje 24 h v 22 °C a poté se stanoví vyprodukovaný CO<sub>2</sub> na plynovém chromatografu.

Bazální respirace (BR) ukazuje respirační aktivitu mikroorganismů, která vyplývá z aktuálního stavu v půdě. Zejména závisí na aktuálním množství dostupného substrátu pro respiraci v půdě. Je také výsledkem fyziologického stavu mikroorganismů, jejich energetických nároků, působení stresových faktorů, inhibičních vlivů některých faktorů apod. Tento parametr pak lze brát jako jeden z indikátorů půdní kvality a sledovat jej při hodnocení stavu ekosystémů: při posouzení zemědělského managementu, rekultivací, při sledování vlivu polutantů na půdu atd.

Parametr BR může být použit jako endpoint v laboratorním testu toxicity látek pro půdní mikroorganismy. V obou případech je však nutné doplnit i další parametry mikrobiálního společenstva: minimálně potenciálně respirační aktivitu a mikrobiální biomasu. Navíc je velmi žádoucí doplnit výsledky BR údajem o množství dostupného substrátu v půdě, které lze vyjádřit například pomocí extracelulárního uhlíku (C<sub>ex</sub>) stanoveného v rámci FE metody (SoilECT-SOP-03).

## 2. Zdrojové normy a relevantní SOP

ISO 16072 (2002): Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 10381-6 (1993): Soil quality – Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

SoilECT-SOP-01: Stanovení sušiny a maximální vodní kapacity (WHC)

## 3. Materiál, pomůcky, chemikálie a přístroje

- Infuzní láhve (100-150 ml) s gumovými septy a kovovými uzávěry, vzduchotěsné
- Váhy s přesností na 0,1g a analytické váhy
- Termostat na 22 °C
- Injekční jehly a stříkačky či systém přepínacích ventilů s kapilárami ukončenými jehlami (12 pozic) v termostatu
- Plynový chromatograf s tepelně vodivostním detektorem s mobilní fází He a stacionární fází kapilární kolonou (Agilent GC 6850)
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)

## Pracovní postup – BR

### Příprava půdy

1. Po vzorkování/odběru se přirozeně vlhká půda skladuje v lednici při 4 °C.
2. Před zahájením testu je potřeba stanovit sušinu a WHC půdy (viz. SoilECT-SOP-01).
3. Minimálně 4 dny před zahájením testu by měla být půda dovlhčena na 40-60 % WHC a inkubována při 22 °C pro ustanovení rovnováhy mikrobiálních aktivit:
  - 3.1 Dostatečné množství půdy pro test dovlhčíme na 60 % WHC.
  - 3.2 Nádobu s půdou buď utěsníme (každý druhý, nejdéle třetí den nutno provětrat a také zajistit dostatečný objem vzduchu nad půdou) nebo zakryjeme alobalem s malými dírkami pro přístup vzduchu (kontrolujeme úbytek hmotnosti).
  - 3.3 Hmotnost půdy i s nádobou zvážíme a hmotnost zaznamenáme pro kontrolu a doplňování vlhkosti

### Založení a měření BR

4. Předinkubovanou půdu zvážíme a případný úbytek hmotnosti doplníme pomocí dH<sub>2</sub>O na 60 % WHC.
5. Do 100 nebo 150 ml infuzních lahví navážíme 3 × 10 g<sub>suš</sub> vlhké půdy (množství odpovídající 10 g sušiny ve třech opakováních).
6. Uzavřeme pryžovými zátkami a kovovými uzávěry. Dobře utěsníme.
7. Umístíme do termostatu nastaveného na 22 °C.
8. Přesně po 24 h od založení měříme obsah CO<sub>2</sub> v infuzních lahvích na plynovém chromatografu.

### Stanovení na plynovém chromatografu

9. Do infuzních lahví zavedeme injekční jehly v termostatu.
10. Dále postupujeme podle návodu na měření s přístrojem Agilent GC 6850 v programu Clarity (viz detailní návody pro práci s chromatografem a Clarity).
  - 10.1 Pro každé měření vytvoříme v adresáři nový projekt.
  - 10.2 Při měření ukládáme aktuální čas stanovení, podle kterého zpětně vypočítáme přesnou délku inkubace půdy.
  - 10.3 Stanovíme obsah CO<sub>2</sub> ve vzduchu v místnosti – nasání vzduchu přímo z termostatu (prázdná jehla)
  - 10.4 Několikrát změříme kalibrační plyn. Jako kalibrace slouží CO<sub>2</sub>/Argon směs s definovanou koncentrací.
  - 10.5 Data z Clarity vyexportujeme do Excelu.

### Výpočty

Výsledná bazální respirační rychlost je vypočítána z přírůstkem CO<sub>2</sub>-C v infuzní lahvi pomocí vzorce:

$$\text{BR } [\mu\text{g CO}_2\text{-C}\cdot\text{g}_{\text{suš}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}] = (\text{vz} - \text{in}) / 100 * \text{L} * 1,824 * 0,2729 * 1000 / \text{suš} / \text{čas}$$

kde:

- vz jsou objemová % CO<sub>2</sub> ve vzorku [%]
- in jsou průměrná objemová % CO<sub>2</sub> ve vzorku pro vzduch v místnosti [%]
- L je objem lahve [ml]
- suš je hmotnost testované sušiny ve vzorku [g]
- 1,824 je hustota CO<sub>2</sub> při 101,325 kPa a 22 °C [g/l]

0,2729 je hmotnostní zlomek C v CO<sub>2</sub>  
čas časový interval od uzavření lahví zátkami [h]

Výsledek vyjádříme jako průměr ze tří opakování ± SD.

Princip stanovení CO<sub>2</sub>:

- Plynová chromatografie (separační metoda) s tepelně vodivostním detektorem (detekční metoda)
- Plynová chromatografie:
  - o Nosný plyn: He
  - o Stacionární fáze: GC-GasPro (polysiloxan)
  - o CO<sub>2</sub> vychází z kolony poslední, jako nejpomalejší plyn
- Tepelně-vodivostní detektor
  - o Podstatnou částí TCD je tenké odporové vlákno umístěné uvnitř kovového bloku. Vlákno prochází konstantní elektrický proud, který je zahřívá na určitou teplotu. Jestliže detektorem vyhřátým na konstantní teplotu prochází čistý nosný plyn o stálém průtoku, je také teplota odporového vlákna konstantní. Obsahuje-li plyn eluovanou látku, která má jinou tepelnou vodivost, změní se teplota vlákna, a tím i jeho elektrický odpor.

