

Standardní operační procedura

SoilECT-SOP-05

MĚŘENÍ SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE (SIR)

Autor: prof. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D., RNDr. Jitka Černošáková, Ph.D.

Upravil: Mgr. Marek Šudoma, Ph.D.

Brno, 26.03.2021

Verze upravená pro cvičení:

Účinky stresorů v ekosystémech_ terestrická část

Klára Šmídová 19.5.2022

1. Předmět metody

Metoda popisuje stanovení respirační aktivity mikroorganismů v půdě po přidání lehce využitelného substrátu - tzv. substrátem indukované (neboli potencionální) respirace. Konkrétně se po přidavku saturujícího množství glukózy sleduje krátkodobá (6 h) odpověď respirace jako produkce CO₂ na plynovém chromatografu.

Výhodou tohoto parametru oproti bazální respiraci je to, že ukazuje maximální možnou, substrátem nelimitovanou respirační aktivitu mikroorganismů. Ta je 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. Tento parametr 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 bazální respirační aktivitu a mikrobiální biomasu.

Původně byla metoda vyvinuta na stanovení mikrobiální biomasy, a to na základě empirické korelace mezi SIR a biomasou zjištěnou jinými metodami. V tomto případě je však údaj o mikrobiální biomase poplatný jejímu fyziologickému stavu, její kvalitě. Pro odhad biomasy jako kvantitativního parametru je však vhodnější fumigačně-extrakční metoda (viz. SoilECT-SOP-03), která je nezávislá na fyziologickém stavu společenstva.

2. Zdrojové normy a relevantní SOP

ISO 14240-1 (1997): Soil quality – Determination of soil microbial biomass. Part 1: Substrate-induced respiration method. 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.

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

3. Materiál, pomůcky, chemikálie a přístroje

- Infuzní láhve 100-150 ml s víčky, 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)
- D-glukóza
- Deionizovaná voda (dH₂O)

Pracovní postup – SIR

Příprava půdy

1. Po vzorkování/odběru se přirozeně vlhká půda skladuje v lednici při 4 °C.
2. Před testem je potřeba stanovit sušinu a WHC půdy (viz. SoilECT-SOP-01).
3. Před vlastním měřením by měla být půda předinkubována při 22 °C a dovlhčena na 40-60% WHC pro ustanovení rovnováhy mikrobiálních aktivit.
 - 3.1 Do 100 nebo 150 ml infuzních lahví Navážíme 3 × 10 g přirozeně vlhké půdy.
 - 3.2 Doplníme WHC alespoň na 40% destilovanou vodou.
 - 3.3 Uzavřeme pryžovými zátkami.
 - 3.4 Umístíme do termostatu do 22 °C a inkubujeme nejméně 4 dny. Každý druhý, nejdéle třetí den pořádně provětráme.

Založení a měření SIR

4. Po předinkubaci vyvětráme vzorky.
5. WHC doplníme na 60 % roztokem glukózy, o takové koncentraci, aby ovlhčením bylo na 1 g suché půdy přidáno 5 mg glukózy. Při ovlhčování roztok rovnoměrně rozkapeme po povrchu půdy.
6. Uzavřeme pryžovými zátkami a kovovými vršky. Zaznamenáme přesný čas uzavření infuzních lahví.
7. Lahve umístíme do termostatu nastaveného na 22 °C.
8. Přesně po 2, 4 a 6 hod od založení měříme obsah CO₂ v infuzních lahvích na plynovém chromatografu. Časová perioda a množství odběrových bodů se může upravovat podle potřeby.

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 CO₂ ve vzduchu v místnosti – nasání vzduchu přímo z termostatu (prázdná jehla)
 - 10.4 Několikrát změříme kalibrační plyn. Jako kalibrace slouží CO₂/Argon směs s definovanou koncentrací.
 - 10.5 Data z Clarity vyexportujeme do Excelu.

Poznámka: Pro měření SIR můžeme použít automatickou sekvenci. Doba jedné analýzy na GC 6850 trvá přibližně 8 min, pro stanovení 12 vzorků trvá měření cca 1,5 hod. Proto měříme respiraci v intervalech 2, 4 a 6 hod, přesný čas prodlevy (podle počtu vzorků) nastavíme do sekvence měření (viz detailní návody pro práci s chromatografem a Clarity). Je potřeba počítat s tím, že 12. pozice v inkubátoru je pro kontrolu vzduchu v místnosti.

Výpočty

Výpočet kumulativního obsahu CO₂-C

Obsah CO₂-C v infuzní lahvi vypočítáme ze vzorce:

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

kde:

- vz jsou objemová % CO₂ ve vzorku (%)
- in jsou průměrná objemová % CO₂ ve vzorku pro vzduch v místnosti (%)
- L je objem lahve (ml)
- suš je hmotnost testované sušiny ve vzorku [g]
- 1,824 je hustota CO₂ při 101,325 kPa a 22°C (g/l)
- 0,2729 je hmotnostní zlomek C v CO₂

Výpočet potenciální respirační rychlosti (SIR)

Provedeme lineární regresi závislosti kumulativního obsahu CO₂-C na čase:

- a) v programu Excel – pomocí funkce Slope, výsledek určíme jako průměr ze 3 opakování.
- b) v programu STATISTICA® for Windows, modul Multiple regression, k odvození parametru B, což je "slope" regresní přímky a současně i SIR v $\mu\text{g CO}_2\text{-C.g}_{\text{suš}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Pokud je "intercept" statisticky nevýznamný, provedeme regresi s nastavením "intercept" roven nule. "Standard error of B" je SD pro SIR.