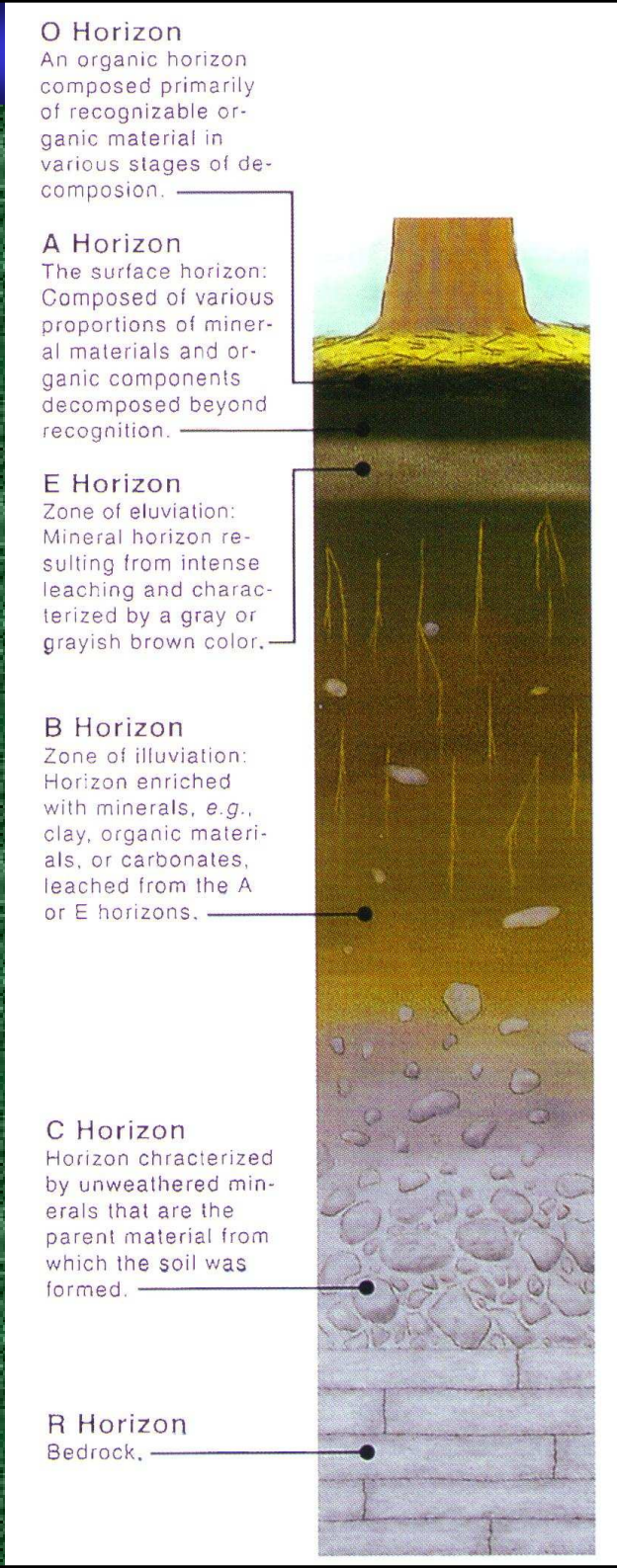
Půdní mikrobiální ekotoxikologie

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



Půdní mikrobiální ekotoxikologie

Location: High-altitude plateau in Arizona.

Vegetation: Pine forest.

Uses: Timber.

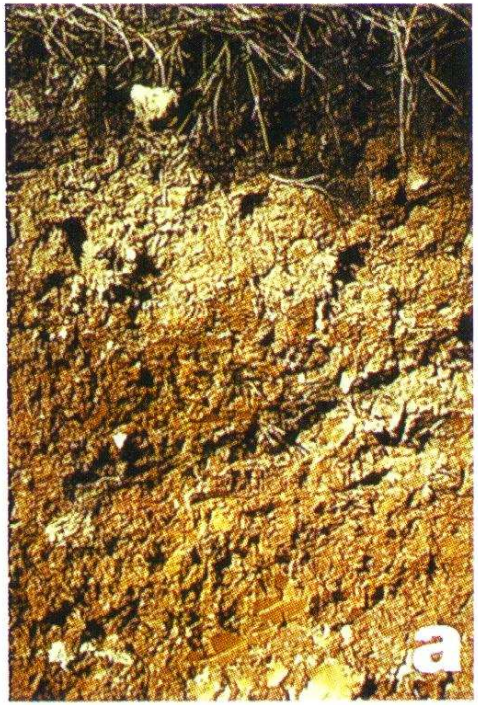
Horizon Notes

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.

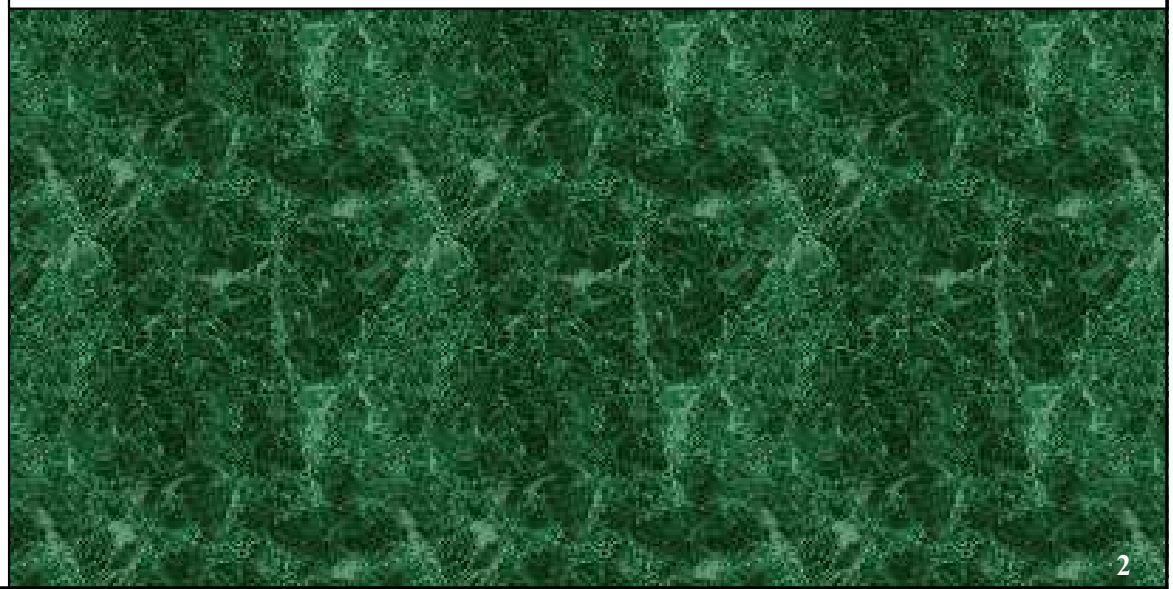
Vegetation: Creosote.

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.



Půdní mikrobiální ekotoxikologie

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 (lokalitě) stresována (ve srovnání s kontrolní nebo jinak srovnávanou lokalitou)?

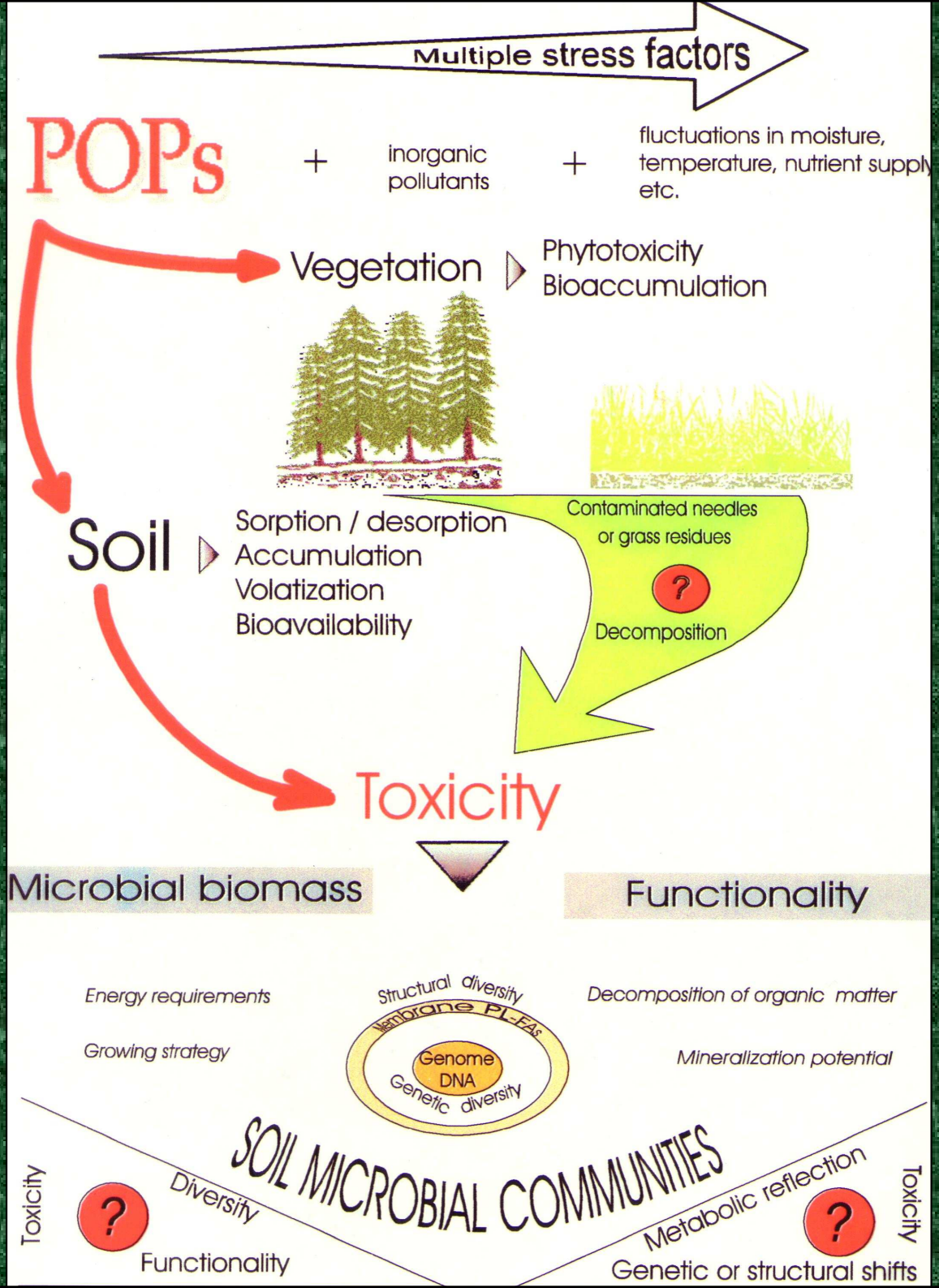
Půdní mikrobiální ekotoxikologie - ještě mnoho neznámého

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 %

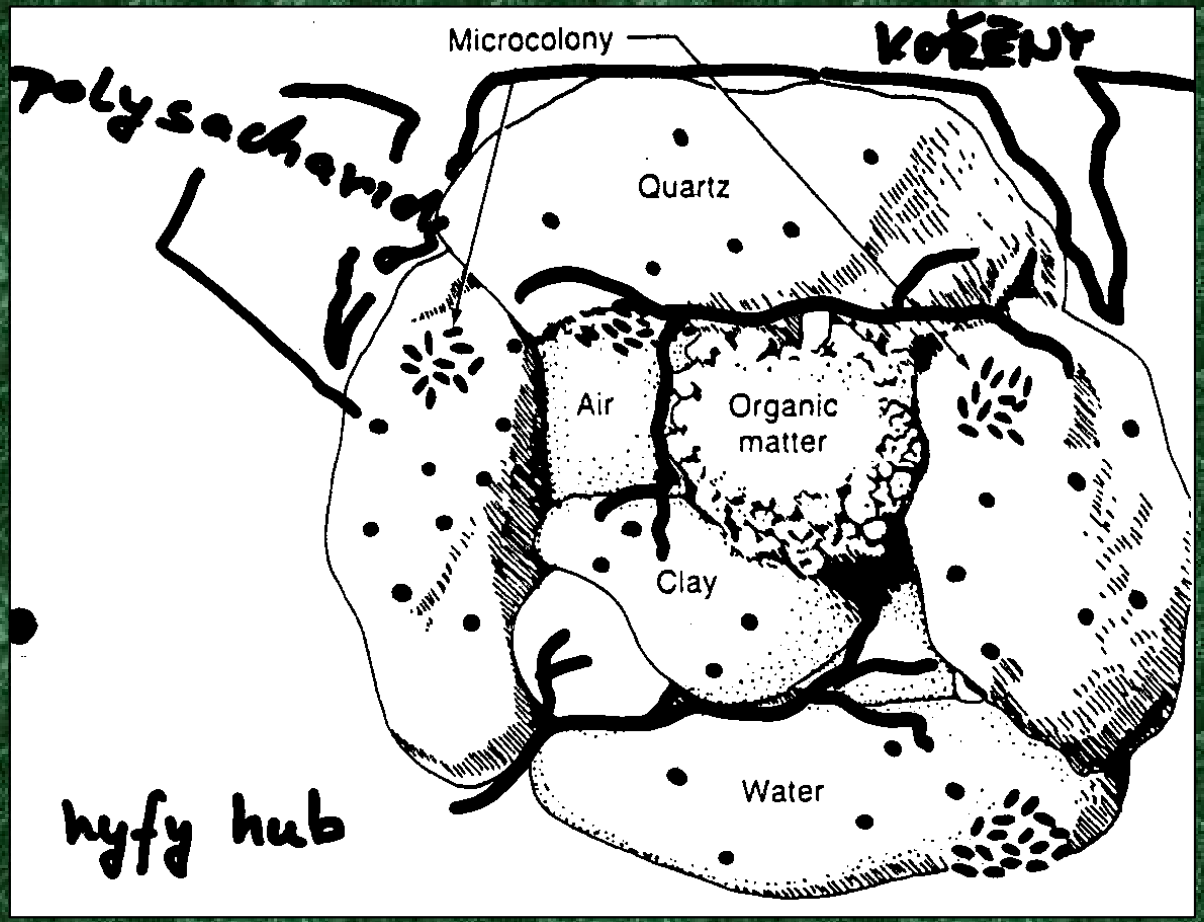
Effects on soil microorganisms < 5%


Multiple stress factors
POPs
+
inorganic pollutants
+
fluctuations in moisture, temperature, nutrient supply etc.
Vegetation
Phytotoxicity
Bioaccumulation
Soil
Sorption / desorption
Accumulation
Volatization
Bioavailability
Contaminated needles or grass residues
?
Decomposition
Toxicity
Microbial biomass
Functionality
Energy requirements
Growing strategy
Structural diversity
Membrane PL-FAs
Genome DNA
Genetic diversity
Decomposition of organic matter
Mineralization potential
SOIL MICROBIAL COMMUNITIES
Toxicity
?
Diversity
Functionality
Metabolic reflection
?
Toxicity
Genetic or structural shifts

Půda jako stanoviště mikroorganismů

Mikrobiální společenstvo půdy =

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



Půda jako stanoviště mikroorganismů

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.)

Půda jako stanoviště mikroorganismů

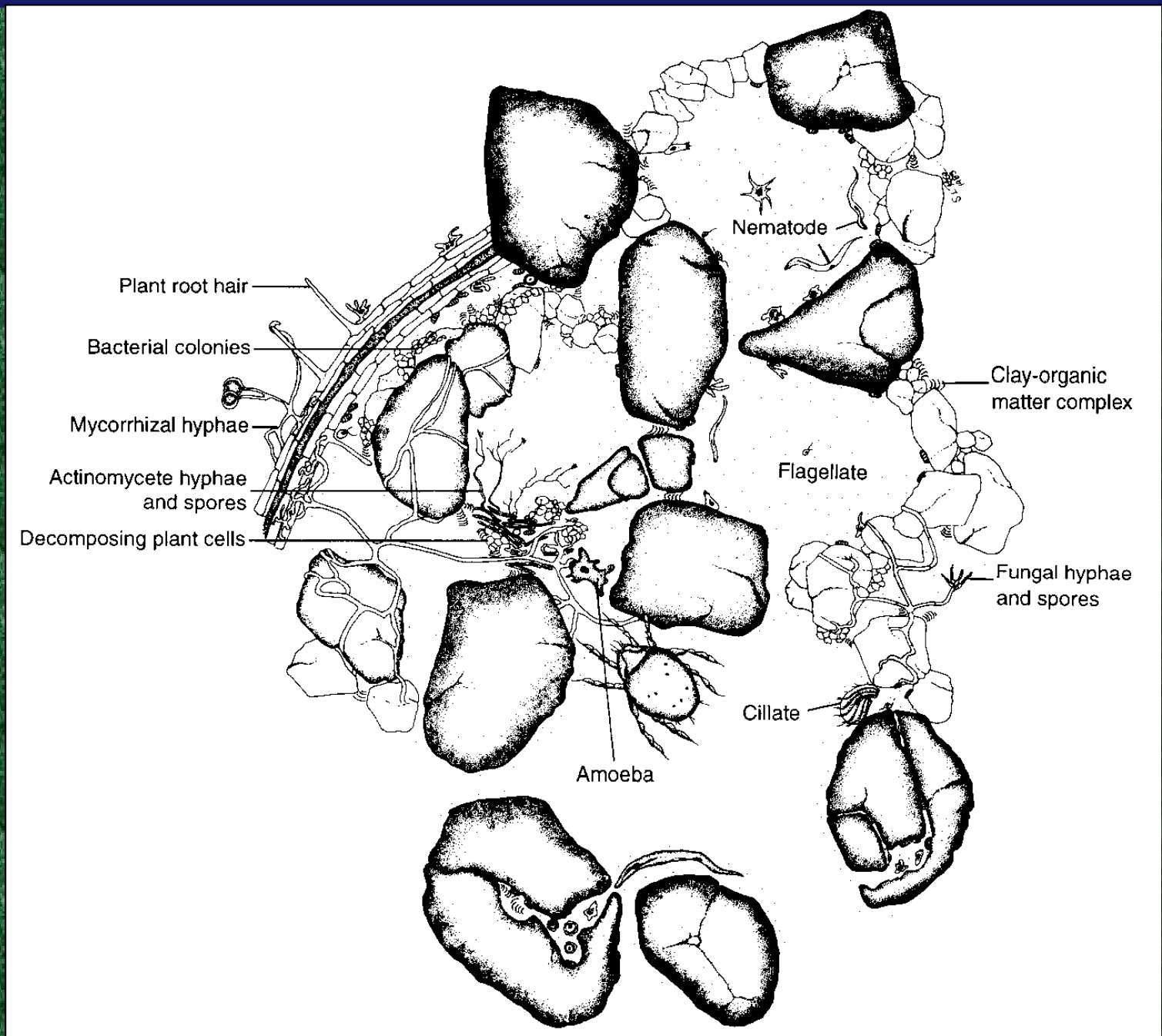
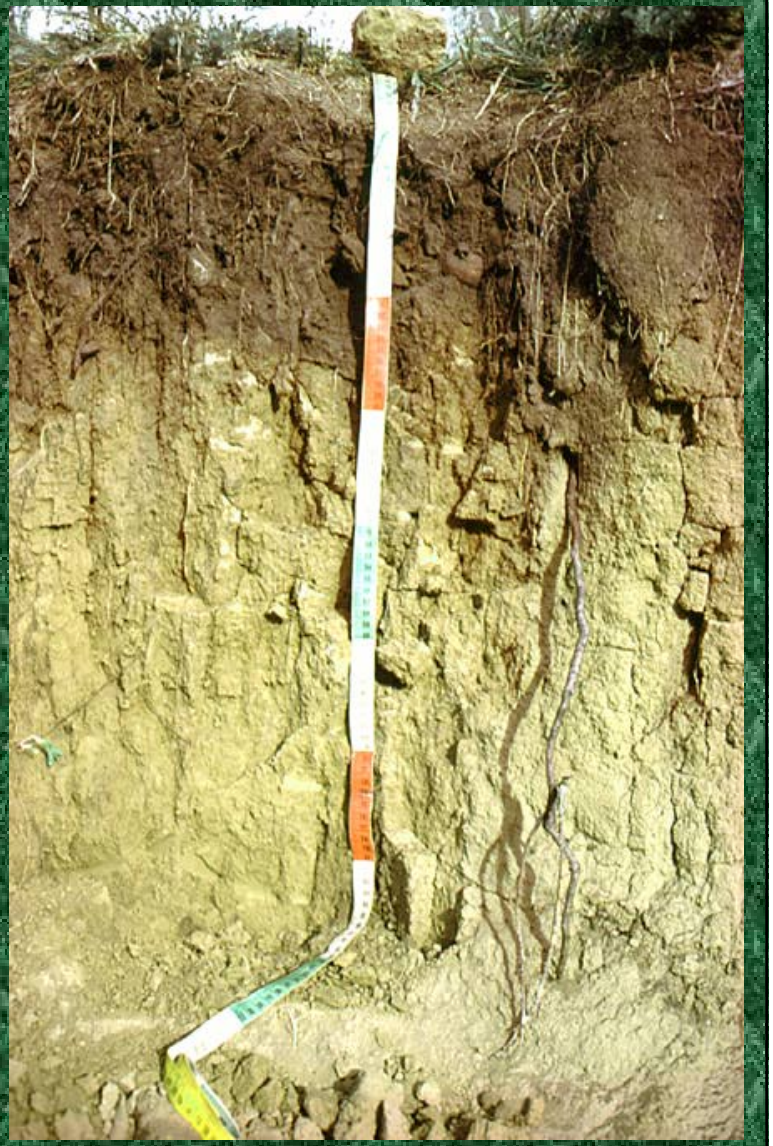


FIGURE 5.2 Diagrammatic representation of a plant root and associated biota approximately 1 cm^2 of a surface grassland horizon associated with a plant root. (Adapted from S. Rose and T. Elliott, personal communication.)

Půda jako stanoviště mikroorganismů

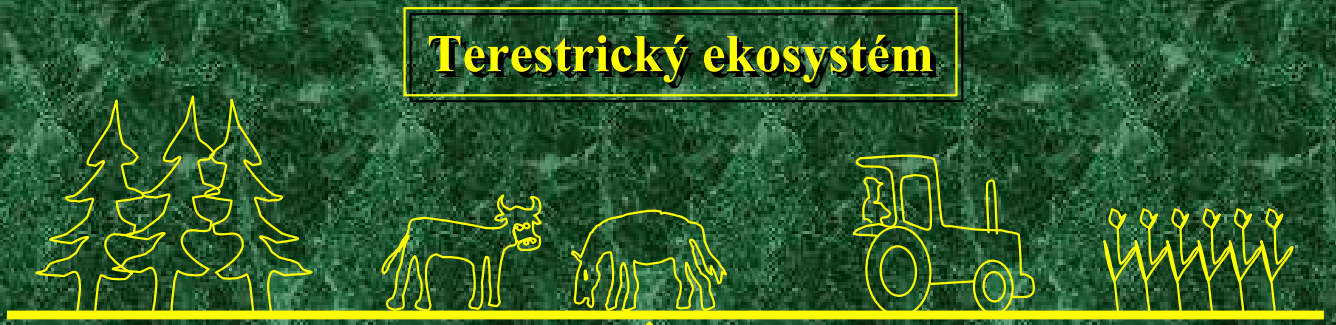
Význam mikroorganismů v půdě

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



Indikátory půdní kvality:

- Fyzikální
- Chemické
- Biologické

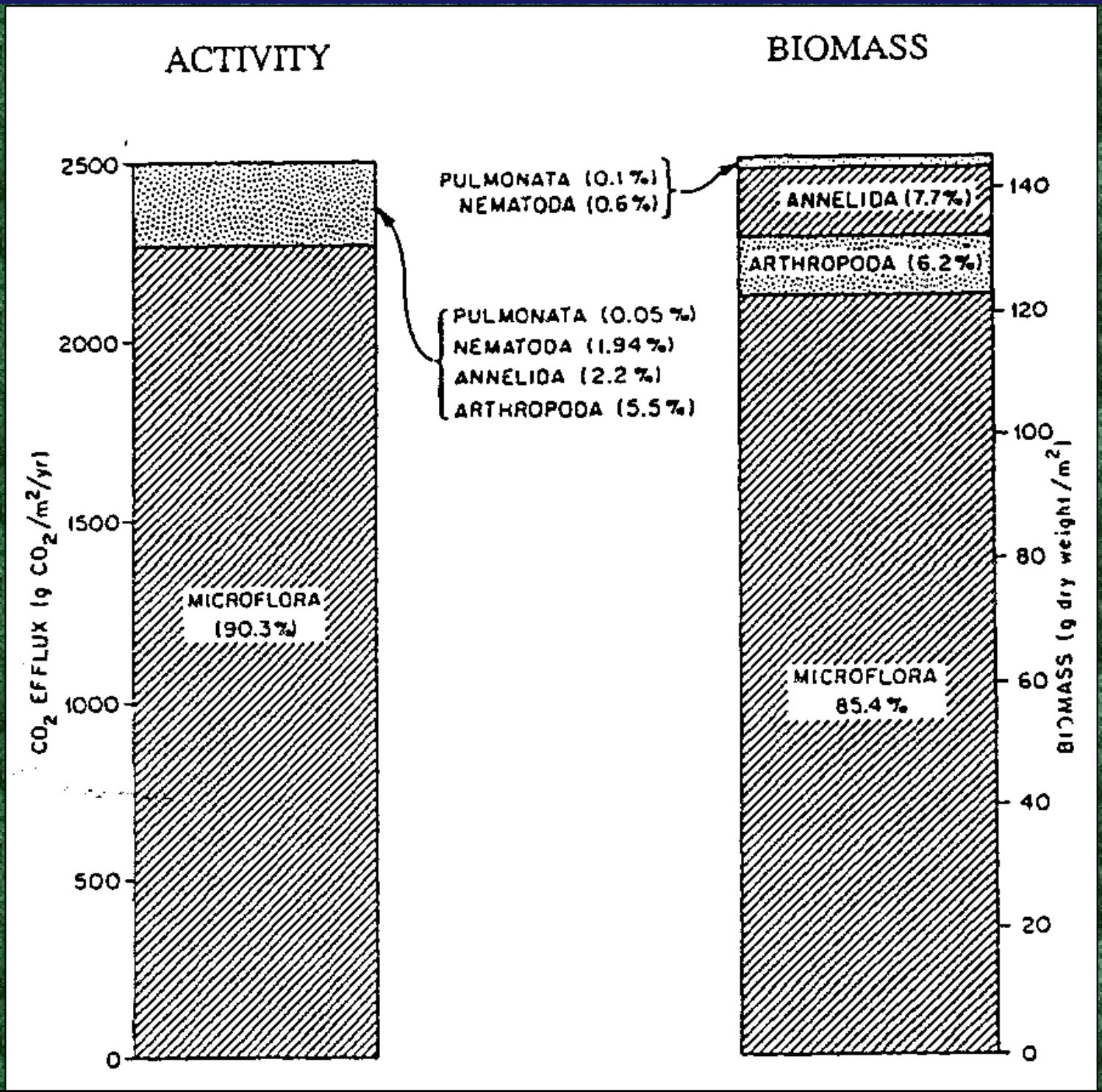


Společenstva půdních mikroorganismů

- Stabilita agregátů a půdní struktura
- Tvorba živin pro rostliny
- Degradace kontaminantů
- Produkce humusu
- Mineralizace reziduí
- Zdroj a propad organického materiálu

- ✓ Kvalita půdy
- ✓ Zdraví půdy
- ✓ Fungování půdy
- ✓ Úrodnost půdy

Půda jako stanoviště mikroorganismů



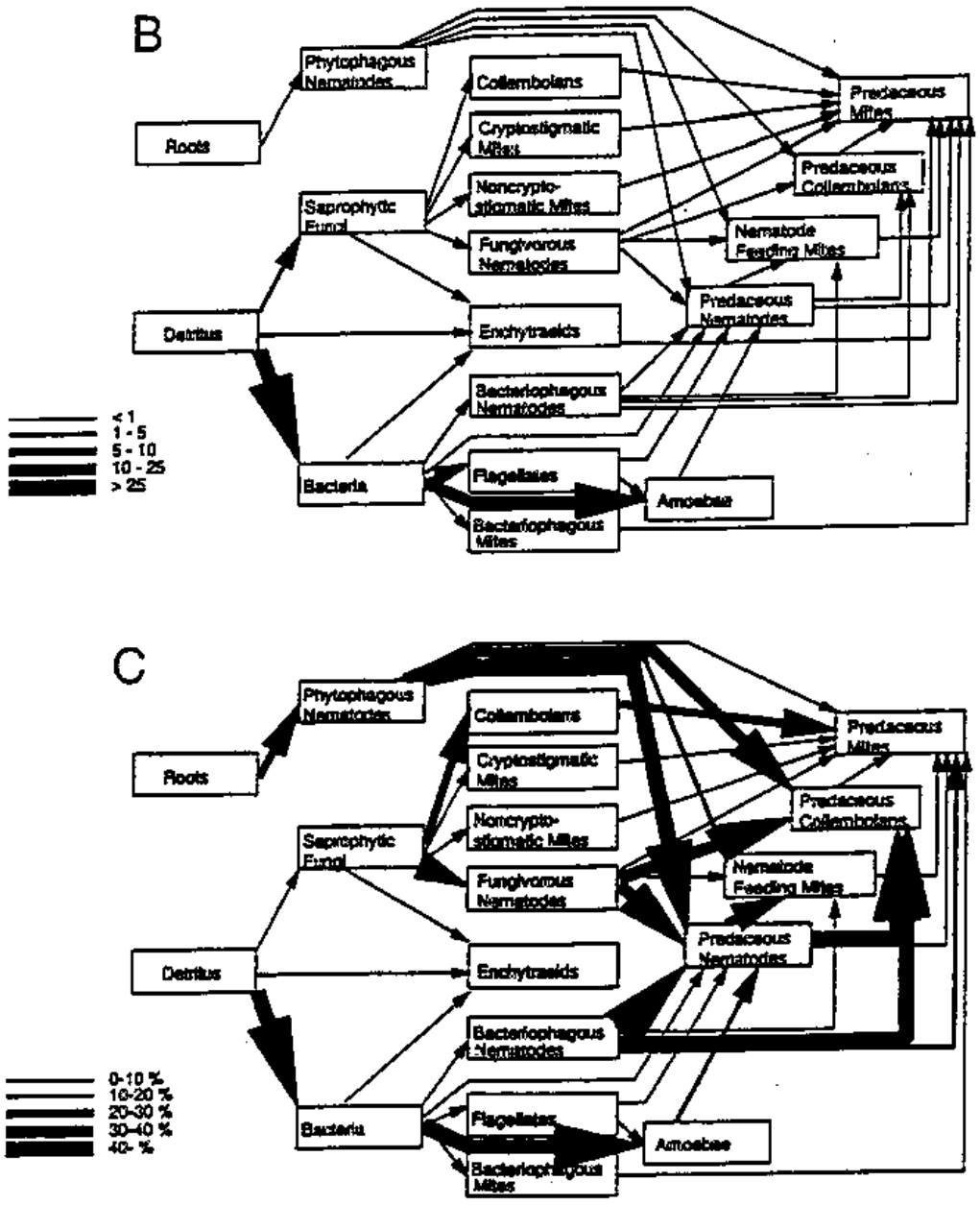
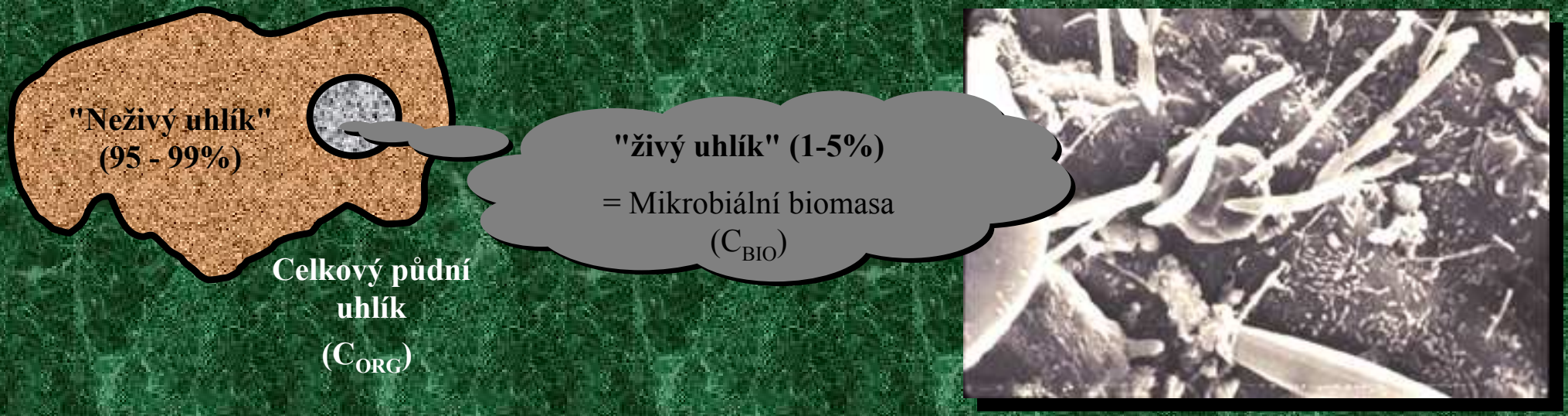


Diagram of a food web established for the fields of `de Lovinkhoeve', an experimental farm in the Netherlands' Northeast polder. A. Qualitative description of functional groups and their trophic interactions. B. Energy fluxes of the food web, in which the thickness of the arrows reflects their relative contribution to the energy cycle (in kg C ha^{-1} $year^{-1}$). 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.

Půda jako stanoviště mikroorganismů

- 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 immobilizace a dalších procesů
- v půdě se vyskytují volně, či ve složité a dynamické vazbě na površích a uvnitř agregátů a částic organominerálního komplexu



Půda jako stanoviště mikroorganismů

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.)

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

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

A

Experimental variant:	N	NF0	NF1	NF2	RF0	RF1	RF2
g C per m^2:	14.2	23.5	47.6	36.5	48.7	78.3	57.4

B[1]	Bacterial biomass		C in the ecosystem	
	g C per m^2	%	g C per m^2	%
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

[1]) mean of all experimental variants

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

		Spore-forming $10^7 . g^{-1}$	N fixators $10^3 . g^{-1}$	Oligotrophs $10^7 . g^{-1}$	Oligonitrophils $10^7 . g^{-1}$	Cellulolytic $10^6 . g^{-1}$
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

Půda jako stanoviště mikroorganismů

- 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 strádat nedostatkem substrátu

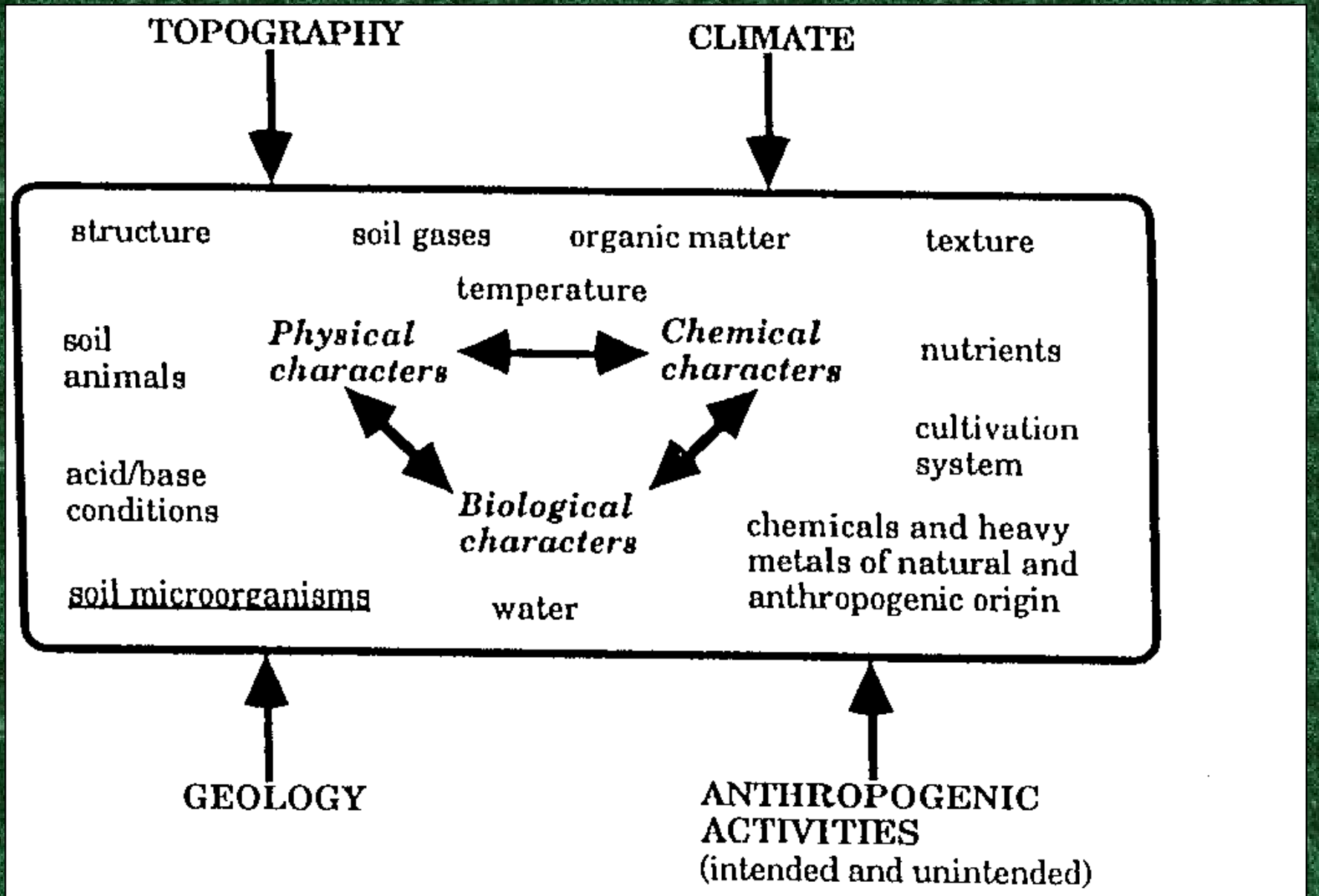
Půda jako stanoviště mikroorganismů

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_2: 0,1-20%; CO_2: 0,1-15%)
- sorpce/desorpce; půdní komplex; biodostupnost substrátů a kontaminantů
- mikroorganismy samy sorbují (G+ více než G-); jíl zvyšuje sorpci
- na površích částic se sorbují substráty i extracelulární enzymy (urychlení reakcí a zvýšení stability extracelulárních enzymů)
- vlastnosti působí buď přímo, či nepřímo
- vliv sezón

Půda jako stanoviště mikroorganismů

Mikroorganismy jsou v interakci s vlastnostmi půdy



The complex structure of soil as created by influence of geology, topography, and climate, as well as anthropogenic activities.

Půda jako stanoviště mikroorganismů

Význam půdních parametrů při hodnocení rizik pro půdní mikroflóru

Vliv kontaminace půdy na mikroflóru je v úzkém vztahu k biologicky dostupným formám těchto látek.

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 mohou ovlivnit i 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

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

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).

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

Příklad:

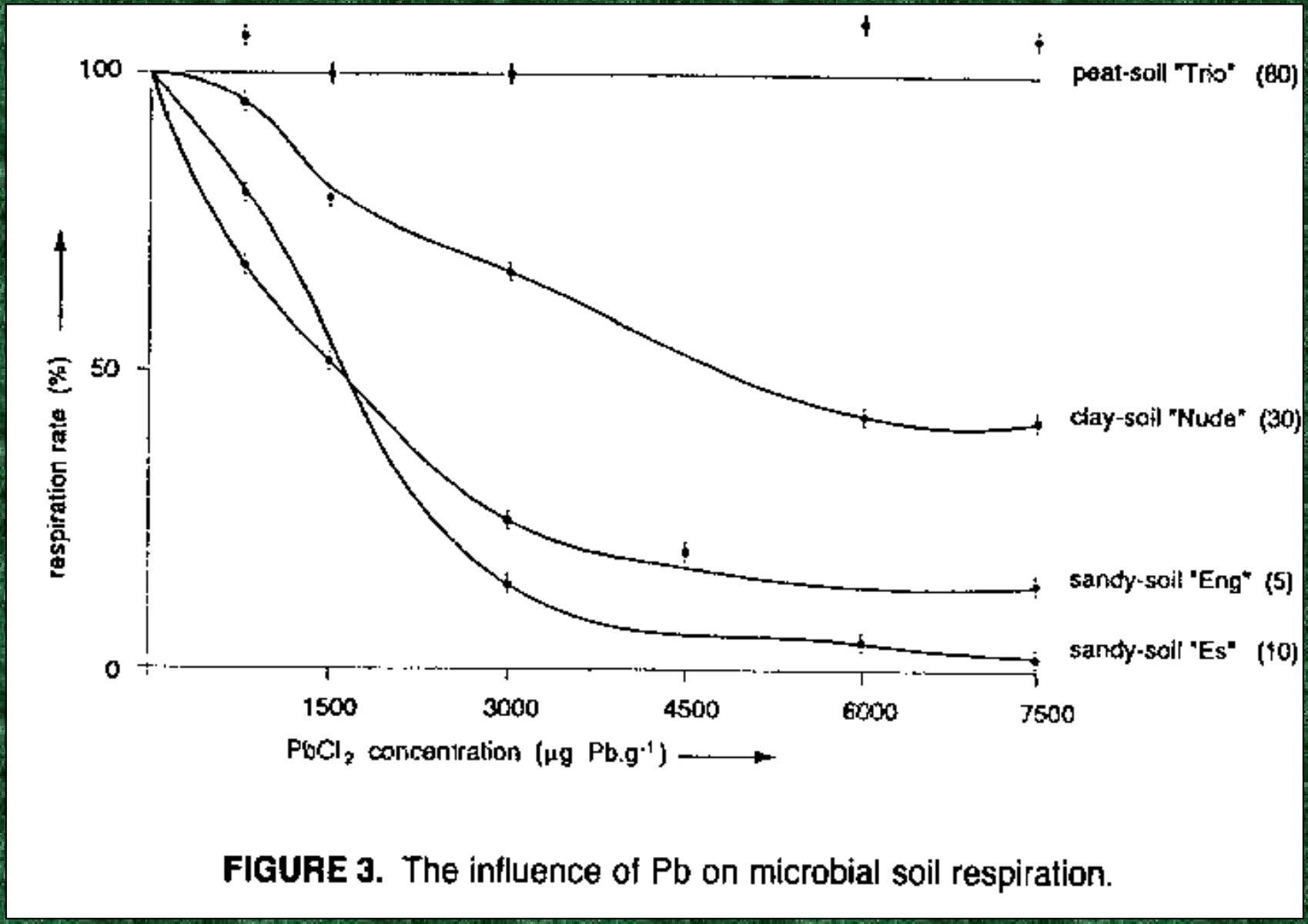


FIGURE 3. The influence of Pb on microbial soil respiration.

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

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 limitoána 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 matrici

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

Organická hmota v půdě

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

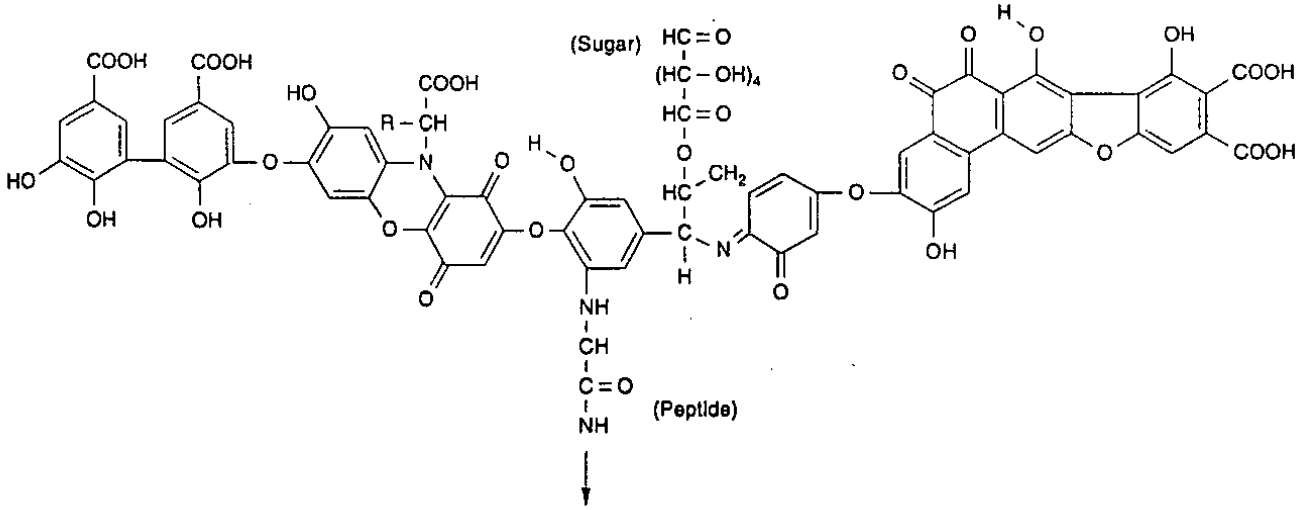


Figure 9.32
Proposed typical structure for humic acid. (Source: Stevenson 1976. *Bound and Conjugated Pesticide Residues*. Reprinted by permission, copyright American Chemical Society.)

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

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 površích částic

Měření půdní vlhkosti:

WHC (water holding capacity) plus stanovení sušiny

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

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

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

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 μm
- vysoký obsah jílů 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 jílů
- snižuje inhibiční účinek polutantů na mikroflóru
- ovlivňuje půdní strukturu
- chrání mikroorganismy před predátory

Vlastnosti půdy ve vztahu k půdním mikroorganismům

Agregáty

- mikroagregáty < 50 µm a makroagregáty > 50 µm

- 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

Biogeochemické cykly a půdní mikroorganismy

- cyklus uhlíku
- cyklus dusíku
- cyklus síry
- cyklus fosforu
- imobilizace/mineralizace = zvyšování/snižování biochemické složitosti systému

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)

Užití půdních mikrobiálních parametrů v ekotoxikologii:

- parametry mikrobiálního společenstva půdy získané těmito metodami můžeme určovat pro mikrobiální biomasu jako celek i pro její jednotlivé složky, např. významné fyziologické skupiny

- při sledování parametrů mikrobiální biomasy je vždy zapotřebí zjistit její aktuální stav (velikost, enzymatické vybavení, respirační rychlost) a teprve potom zkoumat její změny pod vlivem uměle vyvolaných stresových faktorů a jiných podnětů (zjištění funkceschopnosti a adaptability)

- v polních studiích je třeba parametry mikrobiální biomasy sledovat po delší časové údobí a pro komplexní studii mikrobiální ekotoxikologie je třeba řada testů zahrnujících metody molekulární, mikrobiologické i chemické

„Maitenance energy“

- část energie z oxidace, která není věnována biosyntéze
- snížení růstové rychlosti = zvýšení maintenance energy

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 mikrobiálního společenstva 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, zasolování apod.

- půdní mikrobiální ekotoxikologie může přispět k objektivnímu hodnocení rizik spojených s různými antropogenními zásahy

Jedno z možných schémat půdní mikrobiální ekotoxikologie

Biologický potenciál půd

- půdní kvalita
- monitoring stavu půd
- retrospektivní hodnocení rizik

Ekotoxikologické testy

- polní řízené pokusy
- polní observativní studie
- laboratorní testy

Ekotoxikologie půdních mikroorganismů

- na změnách mikrobiální biomasy v polních studiích *in situ* můžeme posuzovat vlivy i takových koncentrací polutantů, které jsou normálně považovány za chronické, relativně neškodné či pozaďové

- pomocí výzkumu krátkodobé reakce mikrobiálního společenstva půdy kontaminované v laboratoři je možné odhadnout akutní toxicitu látek

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, *Rhizobium* spp.
Activities	ATP-measurement, CO_2 production, heat production, O_2 consumption
	Ammonification, cellulose decomposition, denitrification, litter decomposition, nitrogen fixation (*Rhizobium*, heterotrophs, cyanobacteria), straw decomposition, sulfur oxidation
	Combination of activity and biomass data, giving specific activities
Interactions	Mycorrhiza (ecto, arbuscular), pathogens, physiological changes, *Rhizobium*, rhizosphere organisms (associate nitrogen-fixers, producers of growth stimulating or inhibiting substances)
	Soil aggregate stabilization (bacteria, fungi)

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

Methodology	*Ecological Relevance*	*Standar-dization*[b]	*Documented Sensitivity*	*Comments*
Litter bag	High[a]	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®) 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.

[a] High ecological relevance; however, a definite confounding factor associated with the litter bag technique is that the test introduces "clean" material.

[b] 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.

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

	Ecological and scientific rationales as quality indicators				Methodology	
Indicator	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[1]	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[2]	Intermediate–high	Poor–good

SIR, substrate-induced respiration; CFE, chloroform fumigation extraction; PAO, potential ammonium oxidation; PDA, potential denitrification activity.
[1] Quotient of basal respiration rate and SIR.
[2] Relatively new methodology; documentation is in many cases rapidly increasing.

Hodnocení ekologických rizik (EcoRA)

Ochrana ŽP

Biomonitoring kvality ekosystému

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

⊙ monitoring stavu půdních mikroorganismů

Půdní mikrobiologie

"Community level"

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

"Biomass level" přístup

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

"Population level"

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

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

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

- zachycují skutečnou reakci organismů v přírodních podmínkách

- kontaminaci půd z přírodního zdroje ovšem nelze plánovat, a tedy spočívají v popisu dané konkrétní situace (chemické a biologické rozbory), 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 rozborem a rozborem 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)

Ekotoxikologie půdních mikroorganismů

Užití půdních mikrobiálních parametrů v ekotoxikologii:

- díky vlastnostem mikroorganismů je téměř nemožné je sledovat přímo v terénu (*in situ*) - jen vyjímky (složitá interpretace)

- je tedy potřeba reprezentativní vzorek, se kterým je nakládáno jako se živým systémem, aby se biologické společenstvo příliš neovlivnilo (např. vysušení vzorků, zmrazení, v ledničce ...)

- i tak je vždy laboratorní vzorek něco jiného než „reálný svět“

- je tedy nutná určitá standardizace hlavních podmínek

- díky vlastnostem mikroorganismů je téměř nemožné je sledovat přímo v terénu (*in situ*) - jen vyjímky (složitá interpretace)

- je tedy potřeba reprezentativní vzorek, se kterým je nakládáno jako se živým systémem, aby se biologické společenstvo příliš neovlivnilo (např. vysušení vzorků, zmrazení, v ledničce ...)

- i tak je vždy laboratorní vzorek něco jiného než „reálný svět“

- je tedy nutná určitá standardizace hlavních podmínek

Existují i metody měřící přímo *in situ*:

- kromě již zmíněného měření respirace je to tzv. **"litterbag" metoda**

- umožňuje studium dekompozice organického materiálu přímo in situ

- sáčky z nulonu, polyesteru, polyvinylu atd. jeou naplněny opadankou a v časových intervalech jsou analyzovány úbytky váhy, změny ve složení organického materiálu apod.

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

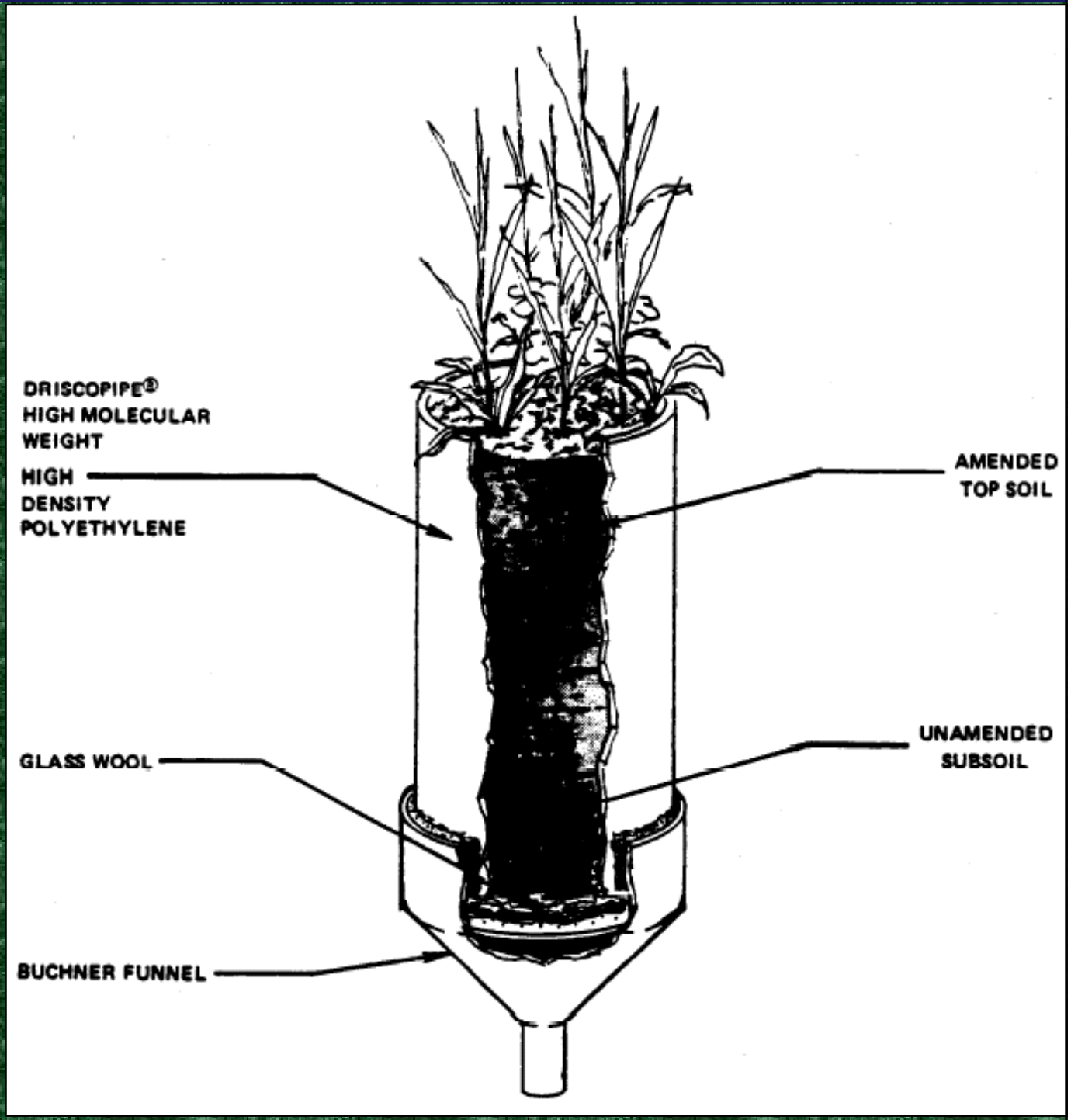
Plánovaný experiment v podmínkách mikrokosmu nebo mesokosmu:

- simulují dávkování polutantu z reálného zdroje na půdě nenarušené laboratorními manipulacemi s výhodou, že lze přesně volit koncentrace vstupů a typ kontaminantu

- v těchto řízených pokusech také nebývá problém s kontrolou

- tyto studie je možné řízeně plánovat i s použitím rostlin

- existují zejména směrnice pro testování pesticidů (US EPA)



Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

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 fluktuace zkoumaných parametrů a možnost řízených změn vnějších faktorů

- problémem je přenos a zpracování půdy v laboratoři (vzorek standardizován přesetím 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.

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

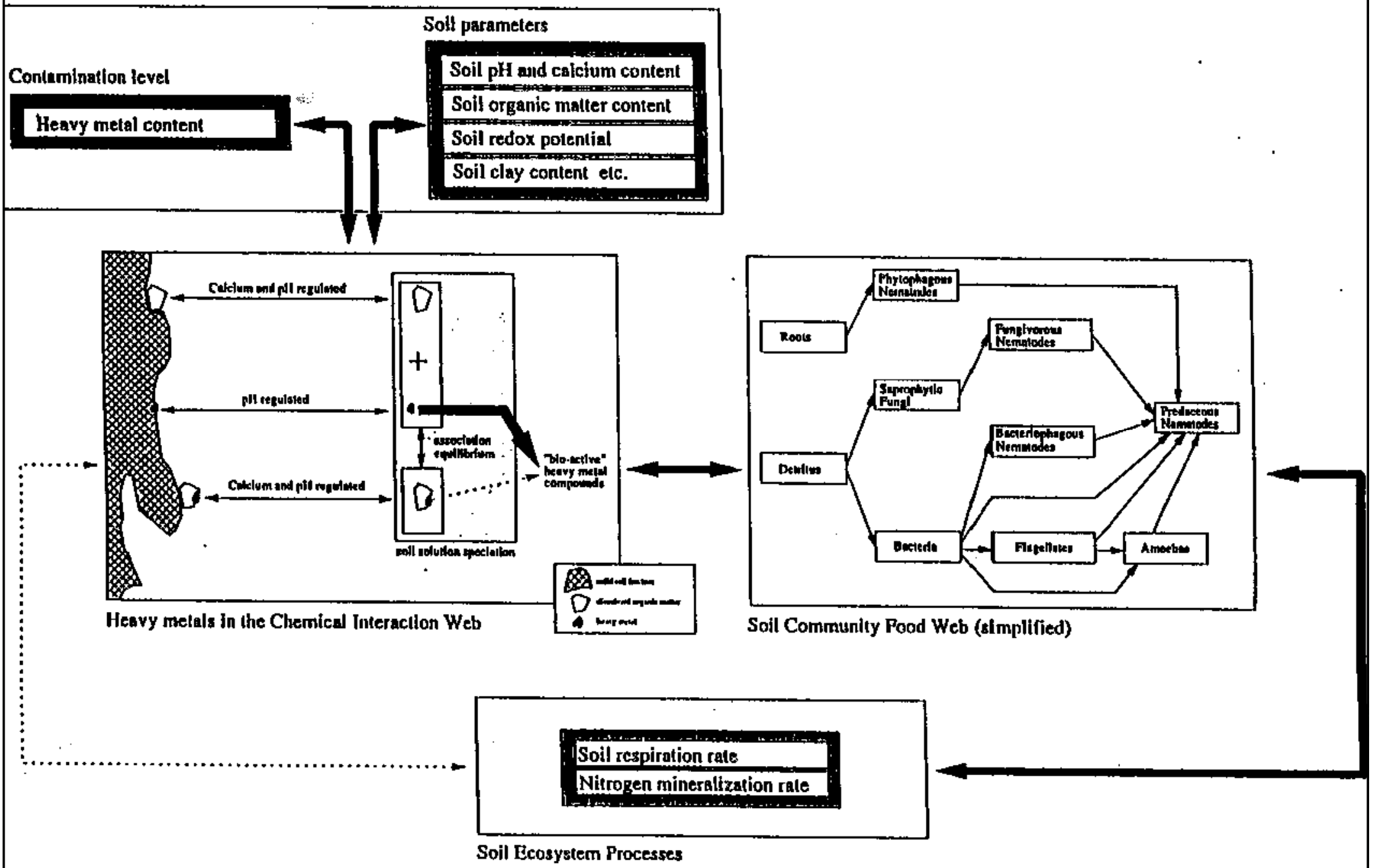
Při měření je nutné mít na vědomí:

- kromě projevených vlastností je celá řada skrytých (gynotypově podmíněné)
- neustále dochází k množení mikroorganismů
- některé jsou ve fázi spór
- procesy se zapojují do řetězců
- vliv kontaminace půdy na mikroflóru je v úzkém vztahu k biologicky dostupným formám těchto látek
- klíčovou otázkou je, která forma toxických látek je dostupná pro mikroflóru

Například:

Celkový obsah těžkých kovů v půdě je suma přirozeného obsahu a koncentrace kovů pocházejících z kontaminace. Přirozeně obsažené kovy jsou většinou sorbovány v matrici půdy, ale kovy pocházející z kontaminace jsou přítomny v podobě malých mikroskopických částeček. Mohou být sorbovány, chelatovány, vázány nebo přítomny v podobě solí a jejich chemické přeměny jsou mnohonásobně dynamičtější než u přirozeně obsažených těžkých kovů.

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie



Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

Při měření je nutné mít na vědomí:

- i v nekontaminované půdě mohou být mikroorganismy vystaveny vlivu stresových faktorů

- i "přirozené" stresové faktory obdobně jako kontaminace půdy jsou příčinou vyšší udržovací energie mikrobiálního společenstva

- tyto skutečnosti komplikují interpretaci ekotoxikologických studií *in situ*, proto pro odhad vlivu kontaminující látky je nezbytné znát i jistou historii zkoumané půdy

- samotné mikroorganismy mohou ovlivňovat chemické formy polutantů a jejich transformace (opětovná mobilizace sorbovaných forem látky)

- 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)

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

Při měření je nutné mít na vědomí:

1.Taxonomickou a genetickou variabilitu ovlivněných populací, která interaguje s kontaminací prostředí jako se selekčním faktorem.

2.Schopnost fyziologických adaptací u určitých částí společenstva, a tedy i možnost získání značné resistence vůči stresovému faktoru.

3.Celkovou historii zkoumaného mikrobiálního společenstva, které jinak reaguje na opakované působení stejného faktoru a jinak na zcela nový stresový podnět.

4.Vzhledem k celkovému propojení metabolických drah v potravních rětězcích je nutné posuzovat změny v aktivitě jednoho společenstva nebo populace ve vztahu k ostatním společenstvům a funkcím.

5. Narušení jedné komponenty může vyvolat i zvýšenou aktivitu jiné, jako kompenzační reakci ("stimulace" toxickou látkou).

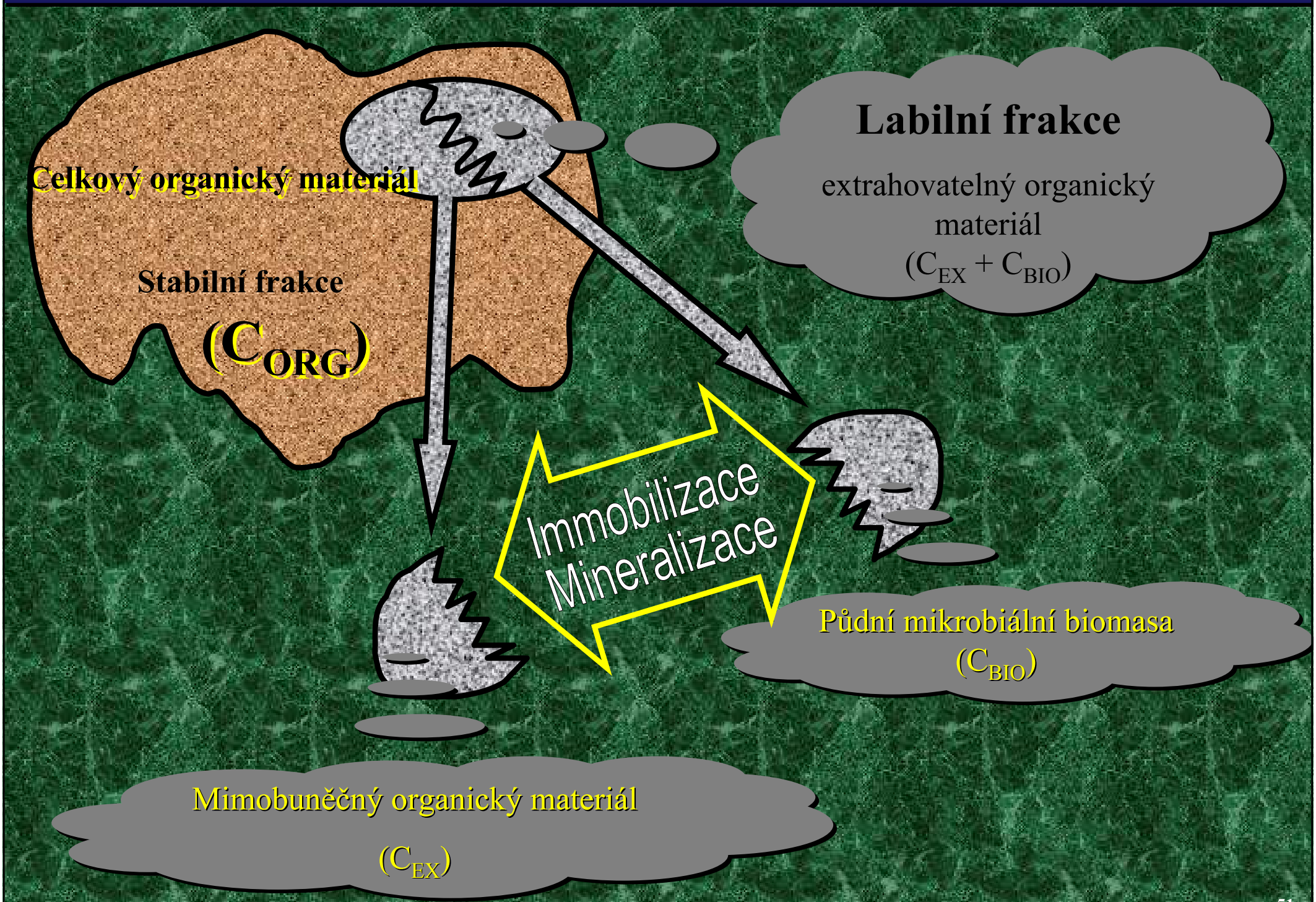
Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

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
- isolace 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)

Metodiky půdní mikrobiální ekotoxikologie

Koncepce mikrobiální biomasy



Mikrobiální biomasa půdy

Stanovení komponenty, která by měla:

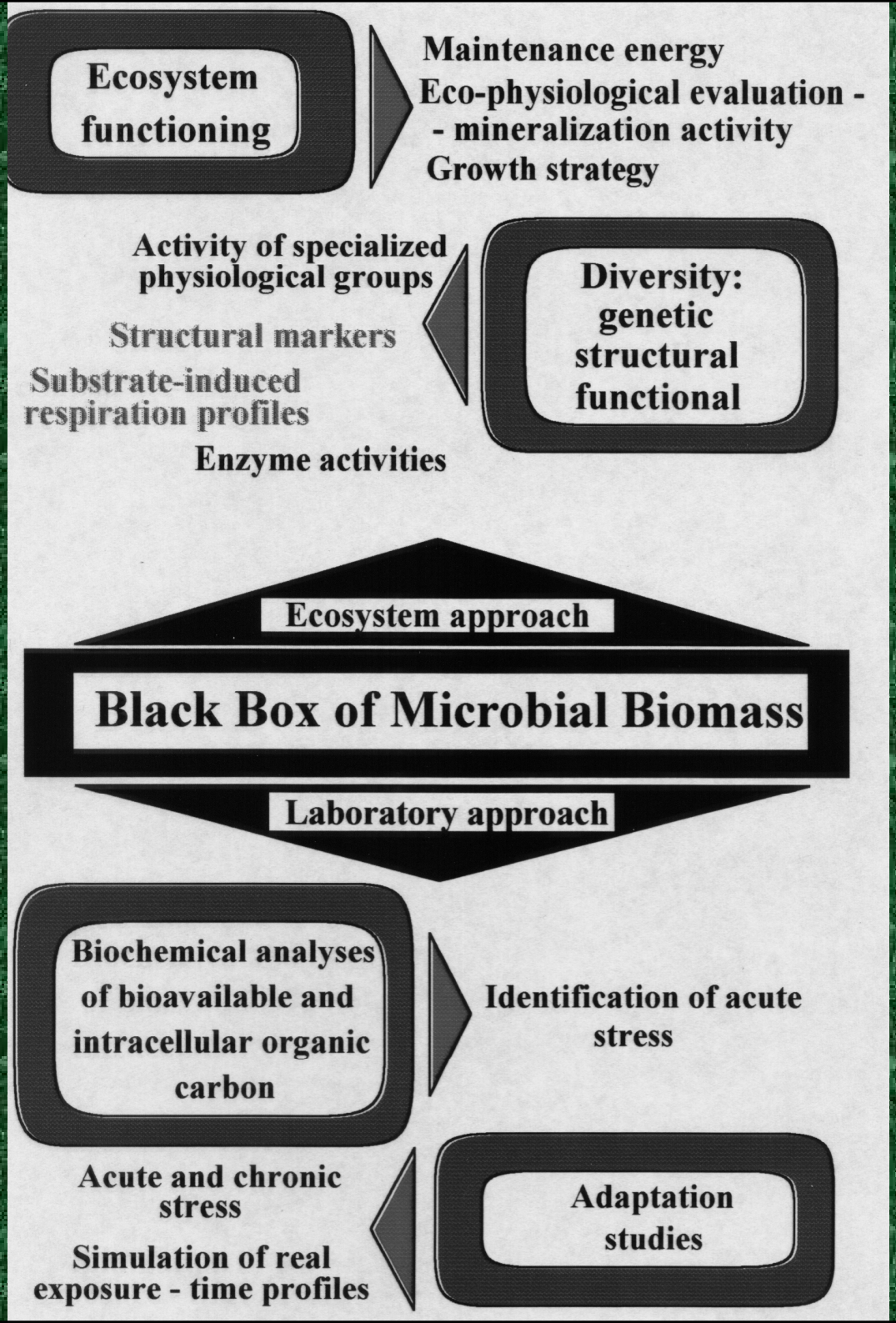
- být přítomna ve všech buňkách
- vyskytovat se ve všech buňkách v podobné koncentraci nezávisle na příslušnosti ke druhu, stadiu růstu
- rychle vymizet, pokud buňky umřou
- být kvantitativně extrahovatelná z půdy
- lehce měřitelná

Lze měřit pomocí:

- počítací techniky

- stanovením specifických komponent a prvků v mikrobiálních buňkách (uhlík, dusík, ATP, fosfolipidy, muramová kyselina, ergosterol atd.)

- měření metabolických procesů vycházejíce s korelace mezi nimi a mikrobiální biomasou (mineralizace glukozy, mineralizace dusíku)


Ecosystem functioning
Maintenance energy
Eco-physiological evaluation - - mineralization activity
Growth strategy
Activity of specialized physiological groups
Structural markers
Substrate-induced respiration profiles
Enzyme activities
Diversity: genetic structural functional
Ecosystem approach
Black Box of Microbial Biomass
Laboratory approach
Biochemical analyses of bioavailable and intracellular organic carbon
Identification of acute stress
Acute and chronic stress
Simulation of real exposure - time profiles
Adaptation studies

C v mikrobiální biomase / C_{org} v půdě
C / N pro mikrobiální biomasu

Velikost společenstva

Mikrobiální biomasa
(C_{bio}-metoda SIR)

Obsah N (P, S) v mikrobiální biomase

Mikrobiální biomasa
(C_{bio}-metoda FE)

Základní sada metod
Uhlík

Rozšířená sada metod
Uhlík

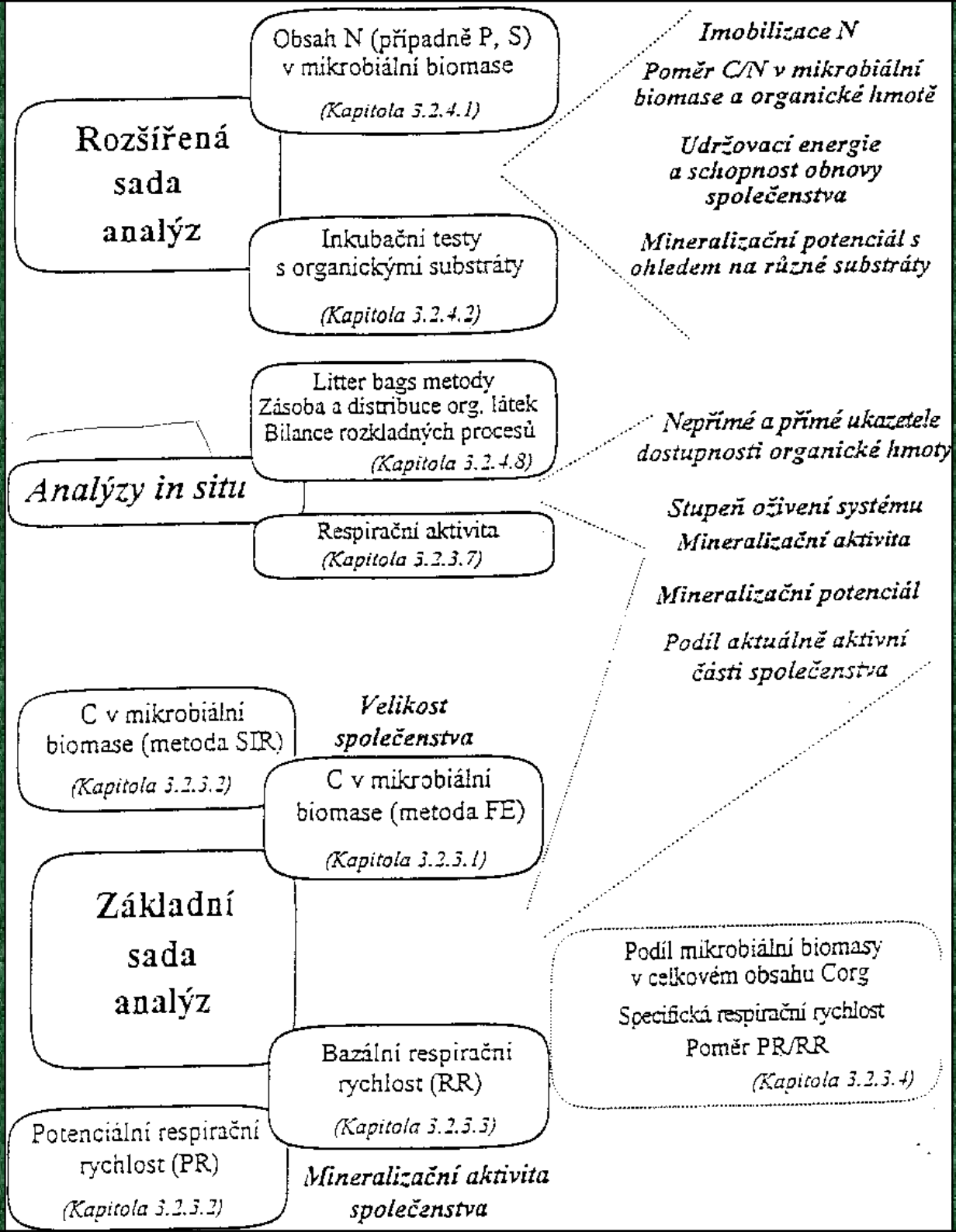
Bazální rychlost respirace (BR)

Potenciální rychlost respirace (PR)

Inkubační testy s org. substráty

Aktivita společenstva

Indexy (ekofyziologické koeficienty):
BR/C_{bio} (qCO_2) PR/BR qD


Rozšířená sada analýz
Obsah N (případně P, S) v mikrobiální biomase
(Kapitola 3.2.4.1)
Inkubační testy s organickými substráty
(Kapitola 3.2.4.2)
Imobilizace N
Poměr C/N v mikrobiální biomase a organické hmotě
Udržovací energie a schopnost obnovy společenstva
Mineralizační potenciál s ohledem na různé substráty
Analýzy in situ
Litter bags metody
Zásoba a distribuce org. látek
Bilance rozkladných procesů
(Kapitola 3.2.4.8)
Respirační aktivita
(Kapitola 3.2.3.7)
Nepřímé a přímé ukazetele dostupnosti organické hmoty
Stupeň oživení systému
Mineralizační aktivita
Mineralizační potenciál
Podíl aktuálně aktivní části společenstva
Základní sada analýz
C v mikrobiální biomase (metoda SIR)
(Kapitola 3.2.3.2)
C v mikrobiální biomase (metoda FE)
(Kapitola 3.2.3.1)
Velikost společenstva
Bazální respirační rychlost (RR)
(Kapitola 3.2.3.3)
Potenciální respirační rychlost (PR)
(Kapitola 3.2.3.2)
Mineralizační aktivita společenstva
Podíl mikrobiální biomasy v celkovém obsahu Corg
Specifická respirační rychlost
Poměr PR/RR
(Kapitola 3.2.3.4)

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 [$\mu g\ CO_2\text{-}C\ .\ den^{-1}\ .\ mg\ C_{bio}^{-1}$]
BR/C_{bio} ($q\ CO_2$)	Specifická bazální respirace [$\mu g\ CO_2\text{-}C\ .\ den^{-1}\ .\ mg\ C_{bio}^{-1}$]
PR/BR	Bezrozměrný poměr potenciální a bazální respirační aktivity
C_{bio}/C_{ox}	Relativní podíl mikrobiální biomasy v půdní organické hmotě

Obsah mikrobiální biomasy a respirační testy - reálná interpretace

C_{bio} / C_{ox}

↑ Syntéza nové biomasy
Rozvoj společenstva

↓ Pokles obsahu biomasy
Dlouhodobě velmi negativní jev

BR / C_{bio} **(qCO_2)**

Nárůst aktivity na jednotku biomasy

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

Pokles aktivity na jednotku biomasy

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

PR / BR

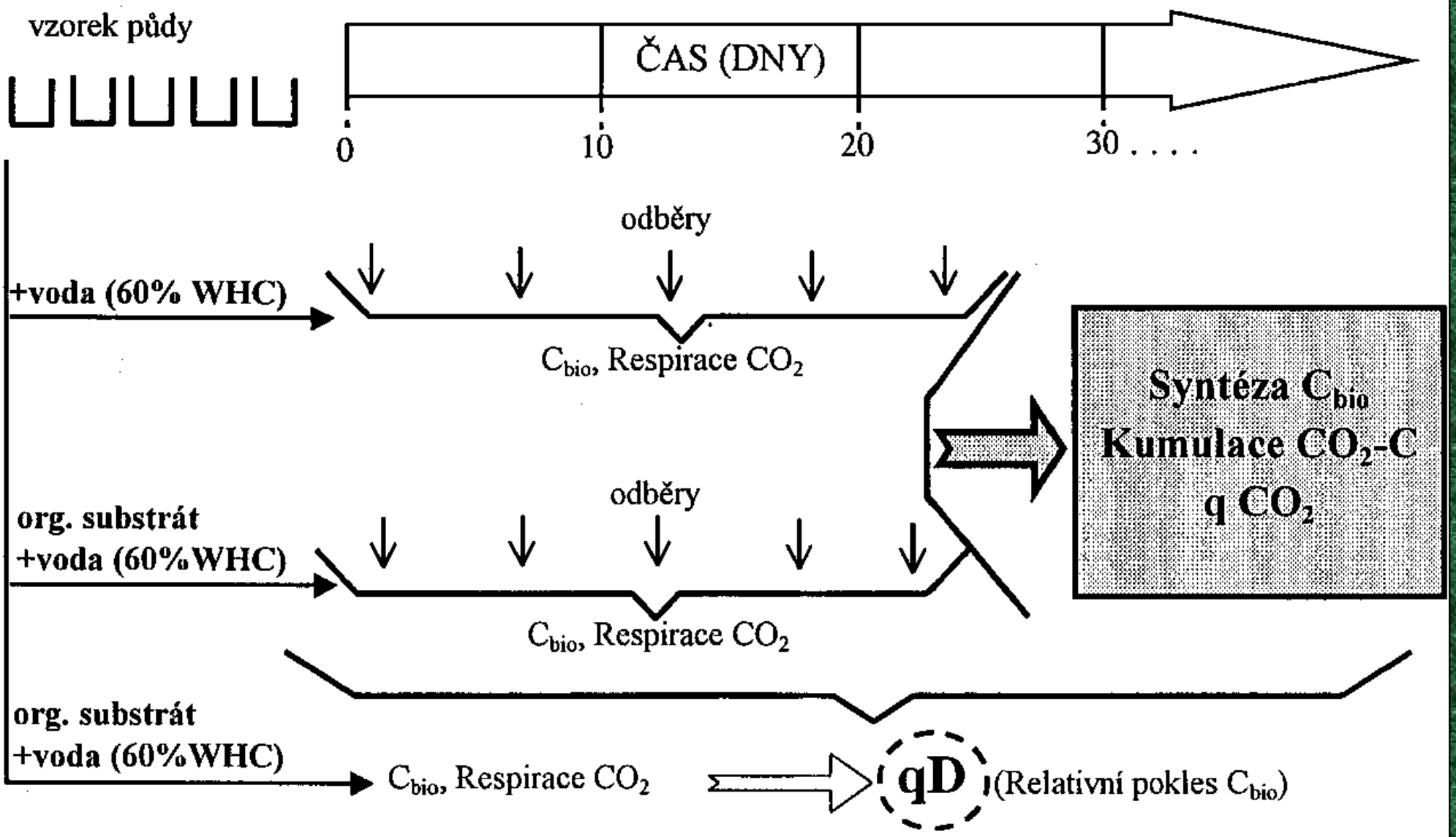
↓ Pokles reakce na lehce dostupný substrát

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

↑ Intenzivní reakce na lehce dostupný substrát

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

Laboratorní inkubace - vysoce doporučené rozšíření základní sady metod



Kinetika a rovnováha nitrifikace - návaznost na produkci NH_4^+ v půdě

Kinetika procesů

Potencální amonifikace *(arginin, pepton)*

Krátkodobé kinetické analýzy nitrifikace

Základní sada metod *Dusík*

Denitrifikace
Fixace N_2

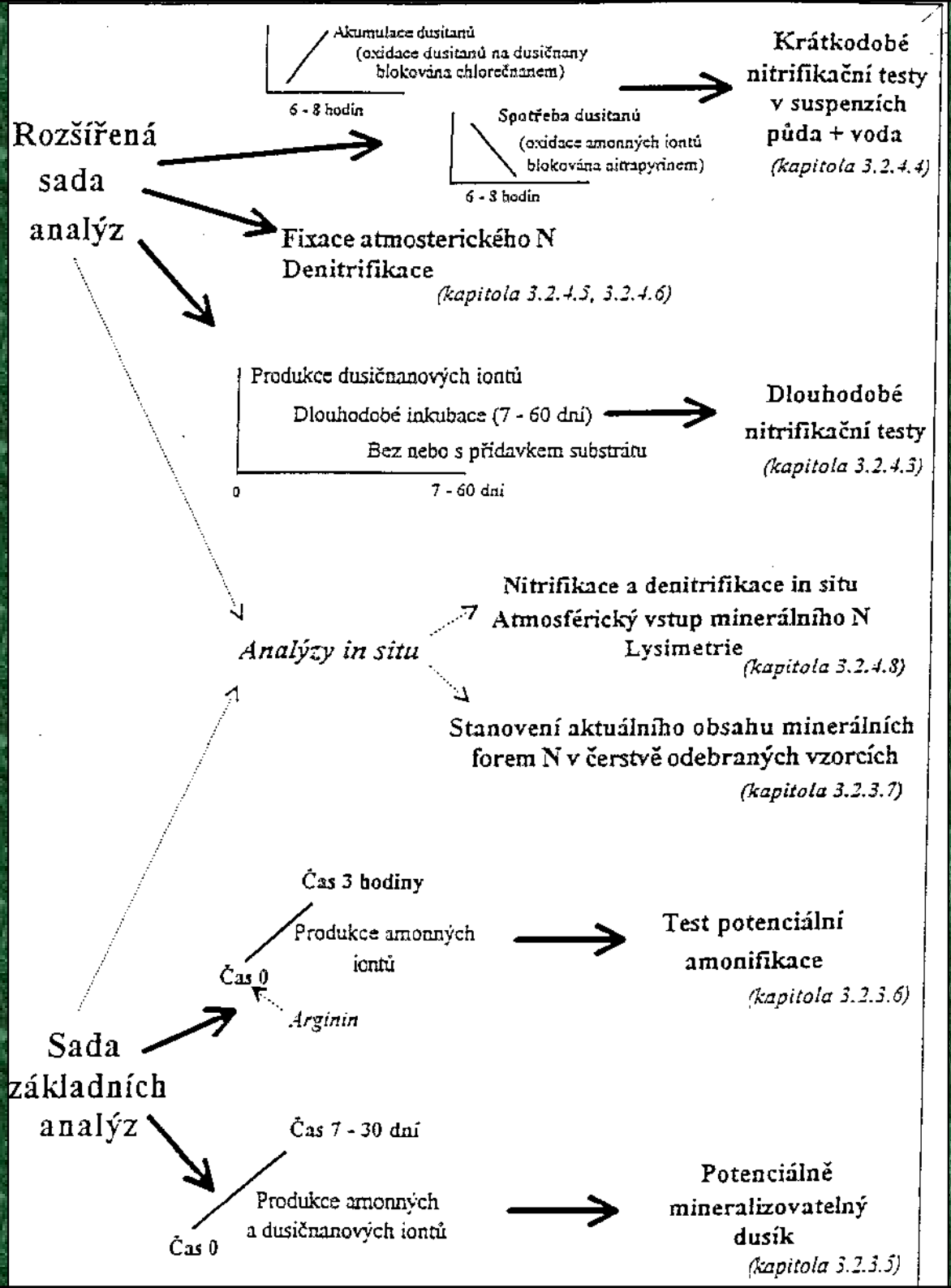
Rozšířená sada metod *Dusík*

Potenciálně mineralizovatelný N

Dlouhodobé inkubační testy (produkce NH_4^+, NO_3^-)

Mineralizace N

Dlouhodobá produkce NH_4^+, NO_3^- bez/s přídavkem substrátu [org. materiál, $(NH_4)_2SO_4$]


Akumulace dusitanů
(oxidace dusitanů na dusičnany
blokována chlorečnanem)
6 - 8 hodin
Krátkodobé
nitrifikační testy
v suspenzích
půda + voda
(kapitola 3.2.4.4)
Rozšířená
sada
analýz
Spotřeba dusitanů
(oxidace amonných iontů
blokována nitrapyrinem)
6 - 8 hodin
Fixace atmosterického N
Denitrifikace
(kapitola 3.2.4.5, 3.2.4.6)
Produkce dusičnanových iontů
Dlouhodobé inkubace (7 - 60 dní)
Bez nebo s přídavkem substrátu
0
7 - 60 dní
Dlouhodobé
nitrifikační testy
(kapitola 3.2.4.3)
Analýzy in situ
Nitrifikace a denitrifikace in situ
Atmosférický vstup minerálního N
Lysimetrie
(kapitola 3.2.4.8)
Stanovení aktuálního obsahu minerálních
forem N v čerstvě odebraných vzorcích
(kapitola 3.2.3.7)
Čas 3 hodiny
Produkce amonných
iontů
Čas 0
Arginin
Test potenciální
amonifikace
(kapitola 3.2.3.6)
Sada
základních
analýz
Čas 7 - 30 dní
Produkce amonných
a dusičnanových iontů
Čas 0
Potenciálně
mineralizovatelný
dusík
(kapitola 3.2.3.5)

Měření diverzity půdních mikrobiálních společenstev

- mladá záležitost v rámci půdní mikrobiologie (dáno metodologicky)

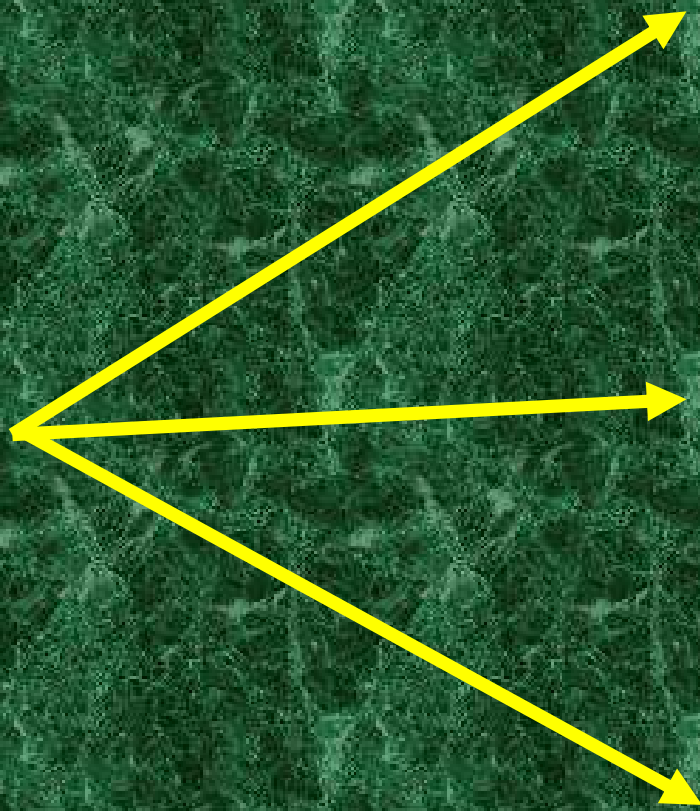
- dříve pouze izolační a kultivační techniky

- málo známo o vztahu mezi mikrobiální diverzitou a fungováním půdy, rostlinami, stabilitou ekosystému, stresory

- obecně platí, že vyšší diverzita stabilizuje funkční vlastnosti ekosystémů

- změny v diverzitě půdních mikrobiálních společenstev jsou tedy bioindikátorem změn půdní kvality

Měření diverzity půdních mikrobiálních společenstev



analýzy fosfolipidických mastných kyselin (PLFA) - strukturální

analýzy metabolické diverzity v systému BIOLOG® - funkční

taxonomická diverzita (fenotypická či genetická diverzita - DGGE, RFLP)

Současná mikrobiální ekotoxikologie a ekologie představuje rozvíjející se vědní obor s uceleným systémem verifikovaných základních metod. Při určitém zjednodušení lze v současném stavu oboru vymezit dvě základní myšlenkové i metodické linie:

(1) výzkum zaměřený na mikrobiální procesy v reálných ekosystémech nebo v celistvých vzorcích prostředí

(2) studie pracující s mikroorganismy izolovanými z prostředí, a následně zkoumanými z hlediska genetické, taxonomické nebo fyziologické diversity.

Půdní mikrobiální ekotoxikologie - současný stav výzkumu a koncepční otázky

Oba přístupy implikují nejrůznější typy řízených pokusů, či ekologických pozorování, avšak interpretační úroveň dosažených výsledků je značně rozdílná. Systémové sjednocení těchto postupů je hlavní prioritou současného vývoje a lze od něj očekávat přinejmenším částečné vysvětlení následujících koncepčních otázek:

- Do jaké míry jsou funkční změny v mikrobiálním společenstvu pod vlivem stresu vyvolány fyziologickou reakcí populací nebo strukturními změnami?

- Je studium rysů energetického metabolismu a růstové strategie na úrovni celkového společenstva efektivním markerem vlivu stresových faktorů? Jak tyto obecné informace souvisí se studiem specializovaných struktur nebo funkcí?

- Do jaké míry ukazatelé strukturní, genetické a funkční diversiy vzájemně korespondují?

- Jaký je vztah strukturních a funkčních parametrů společenstva k parametrům prostředí? Lze z parametrů prostředí usuzovat na reakci mikroflóry při specifikovaném typu kontaminace?

- Jsou analýzy diversity na úrovni DNA interpretovatelné ve srovnání s klasickými charakteristikami společenstva ? Je koncept tzv. "genomu společenstva - community genome" schopen efektivně diskriminovat společenstva ve stresovaných půdách?

- Lze nalézt ekologicky relevantní kombinaci substrátů, které smysluplně postihnou změny funkční diversity společenstva za daných podmínek? Do jaké míry je reakce společenstva na environmentální podnět determinována předchozí "zkušeností"?

Mikrobiální ekotoxikologie vodních ekosystémů

Opět specifika daná akvatickým prostředím

- hlavní rozdíl je, že v akvatických ekosystémech zastávají mikroorganismy také roli producentů (i tzv. heterotrofní producenti - microbial loop)

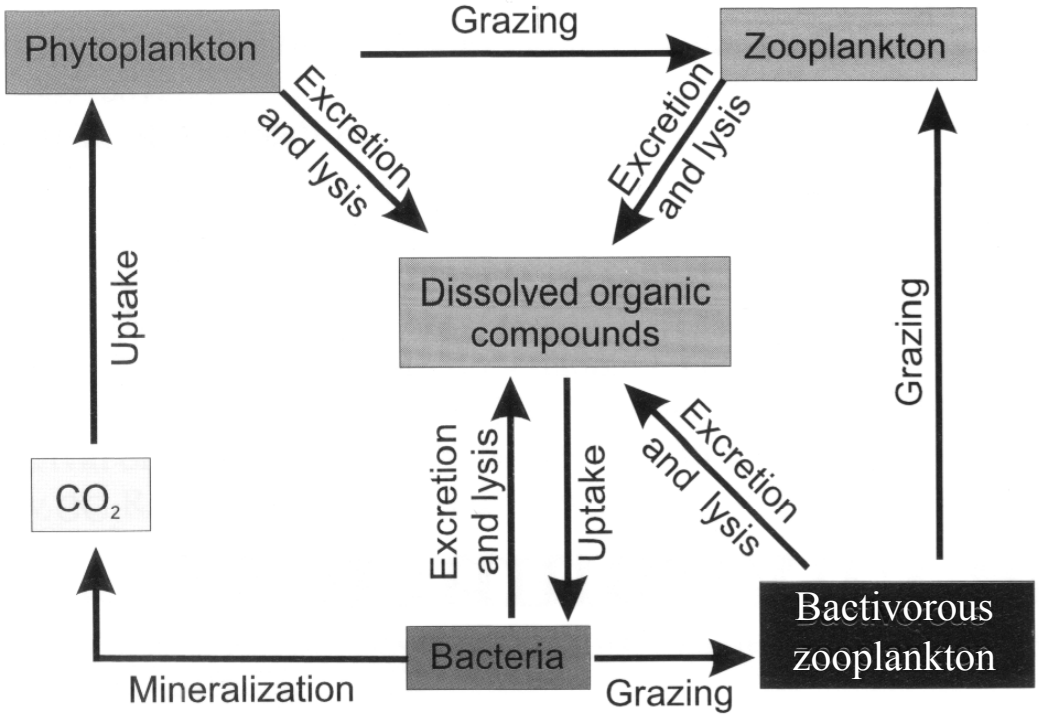


FIGURE 6.1 The microbial loop in the planktonic food web. The microbial loop represents a pathway in which the dissolved organic products are efficiently utilized. The role of bacterioplankton is to mineralize important nutrients contained within organic compounds and to convert a portion of the dissolved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

Mikrobiální ekotoxikologie vodních ekosystémů

Opět specifika daná akvatickým prostředím

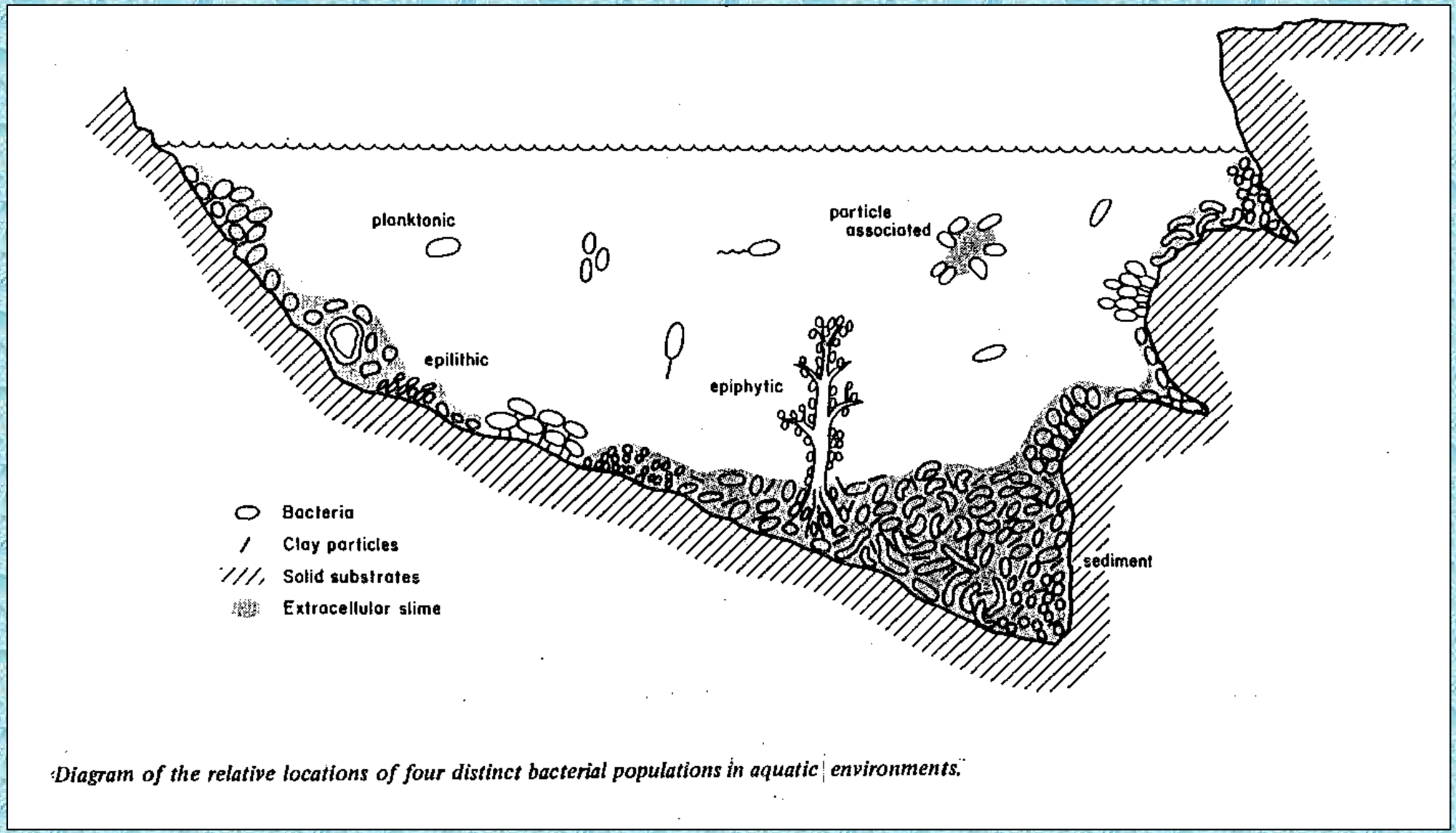


Diagram of the relative locations of four distinct bacterial populations in aquatic environments.

Mikrobiální ekotoxikologie vodních ekosystémů

Opět specifika daná akvatickým prostředím

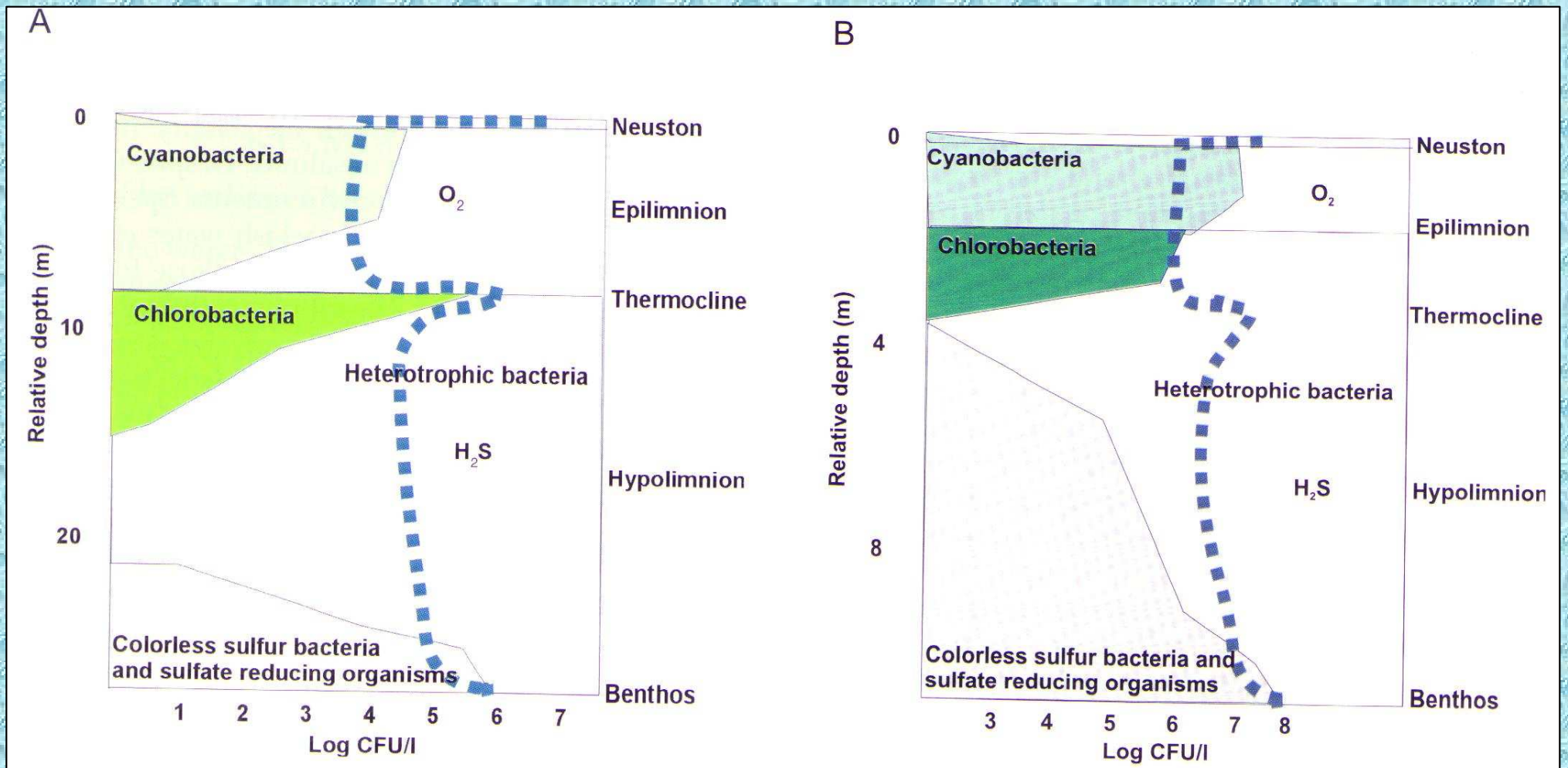


FIGURE 6.14 (A) Schematic representation of bacterial distribution in a typical oligotrophic lake. Notice especially the distribution and concentrations of the photosynthetic populations. Also note the lower concentration of heterotrophs in the upper zone, where cyanobacteria predominate. The large increase 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 ekotoxikologie vodních ekosystémů

Opět specifika daná akvatickým prostředím

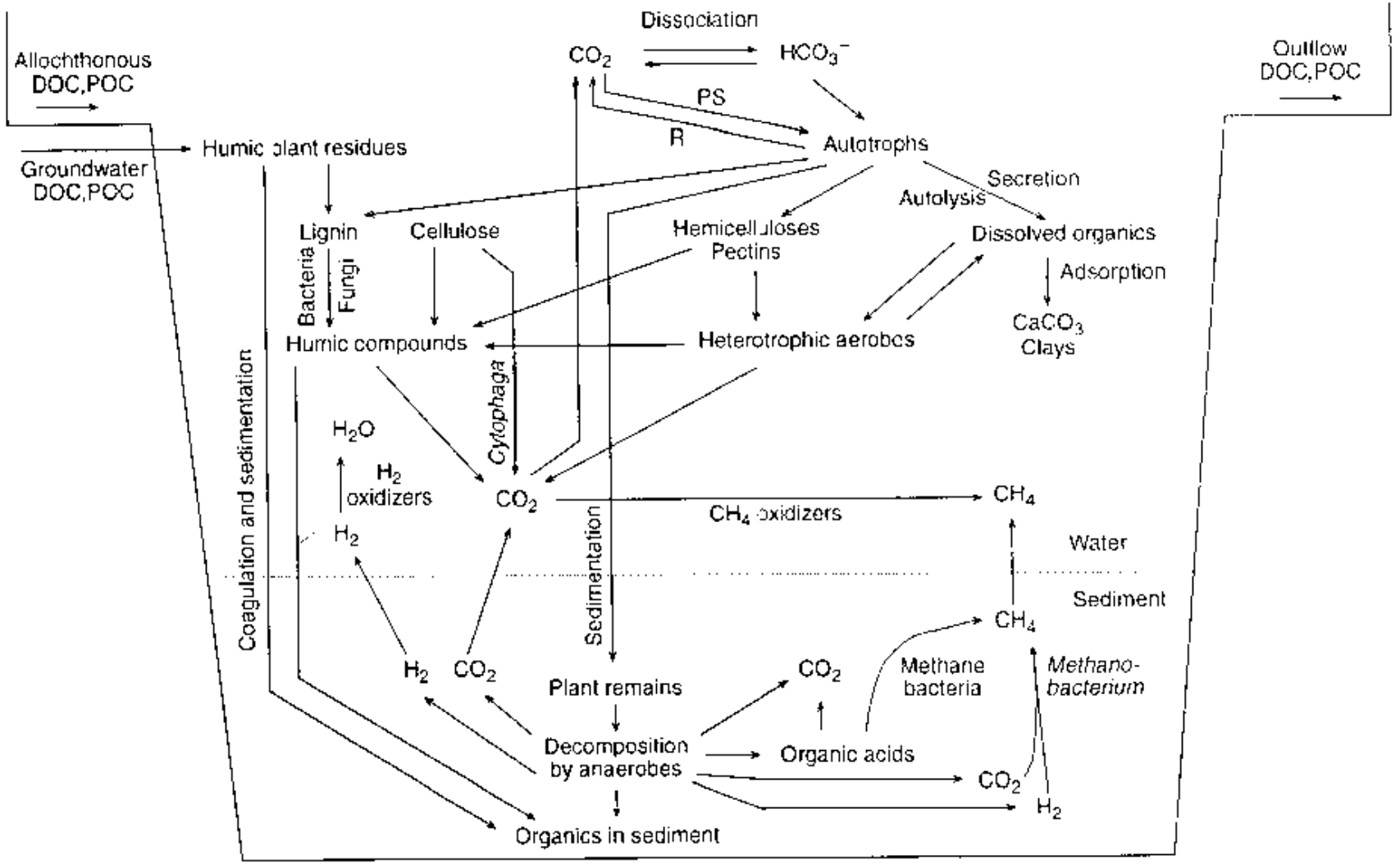


Figure 9.19
Carbon cycle of a typical freshwater lake. DOC = dissolved organic carbon; POC = particulate organic carbon; PS = photosynthesis; R = respiration. The figure illustrates the key role of microorganisms in carbon cycling of a lake habitat. (Source: Wetzel 1975. Based on Kuznetsov 1959. Reprinted by permission, copyright W. B. Saunders Co., Philadelphia.)

Mikrobiální ekotoxikologie vodních ekosystémů

Význam mikrobiálního biofilmu

BIOFILM = vrstva organického materiálu a mikroorganismů vzniklá na povrchu objektu

- využití při degradacích, čištění odpadních vod, v laboratorních studiích

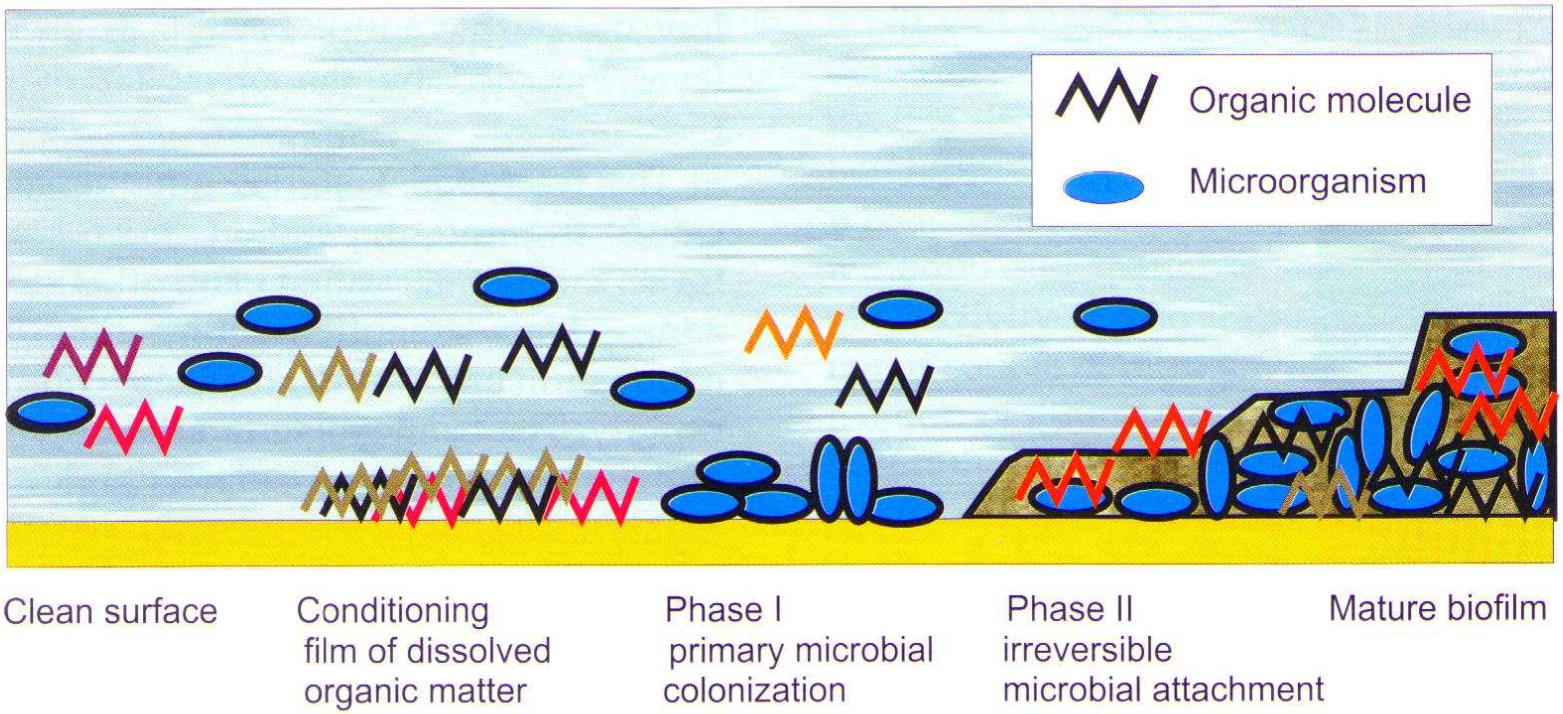


FIGURE 6.5 Representation of biofilm formation. Dissolved organic molecules of a hydrophobic nature accumulate at the solid surface–water interface and form a conditioning film. Bacteria approach the solid surface because of water flow and/or active motility. The initial adhesion (phase I) is controlled 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.)