



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ MIKROKALORIMETRIE PŘI STUDIU MIKROBIÁLNÍHO ŽIVOTA V PŮDĚ

THE USE OF MICROCALORIMETRY IN THE STUDY OF MICROBIAL LIFE IN SOIL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Karolína Drápalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2046/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Karolína Drápalová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití mikrokolorimetrie při studiu mikrobiálního života v půdě

Zadání diplomové práce:

- Zpracovat literární rešerši na téma využití mikrokolorimetrie při studiu mikrobiálního života v půdě, zaměřit se zejména na podmínky experimentů z hlediska vhodných živin nebo teploty měření.
- Dle poznatků z literatury navrhnout a realizovat vhodné mikrokolorimetrické experimenty.
- Získané výsledky vyhodnotit, diskutovat a vyvodit logické závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Karolína Drápalová
studentka

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním mikrobiální činnosti v půdě za pomoci mikrokolorimetrických metod. Základním cílem této práce bylo podrobně sledovat tepelné projevy metabolismu různých půdních mikroorganismů. Dále se práce zaměřila na komplexní vyhodnocení vlivu různých podmínek na jejich aktivitu. Experimenty byly prováděny za použití izotermické mikrokolorimetrie (TAM III) spolu s respirometrií (OxiTop IDS B6). Posuzovala se i reakce mikrobiálních komunit v půdě na skladování, změny teplot a přidání různých živin. Výsledky ukazují, že mikrokolorimetrie se dá dobře použít ke sledování změn aktivity mikrobů v půdě, přičemž počáteční tok energie souvisí s hydratací vzorků a další průběh signálu ukazuje na metabolickou aktivitu mikrobiálních společenství.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikrobiální aktivita, mikrokolorimetrie, půdní mikroorganismy, izotermická mikrokolorimetrie, respirometrie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the investigation of microbial activity in soil using microcalorimetric methods. The main objective of the work was to closely monitor the thermal manifestations of the metabolism of various soil microorganisms. Furthermore, the thesis provides a comprehensive evaluation of the influence of different conditions on their activity. Experiments were carried out using isothermal microcalorimetry (TAM III) together with respirometry (OxiTop IDS B6). The reaction of microbial communities in soil to storage, temperature changes and different nutrient additions was also assessed. The results show that microcalorimetry is suitable method to monitor changes in microbial activity in soil, with the initial energy flow related to sample hydration and the subsequent signal progression indicating the metabolic activity of microbial communities.

KEYWORDS

microbial activity, microcalorimetry, soil microorganisms, isothermal microcalorimetry, respirometry

CITACE

DRÁPALOVÁ, Karolína. Využití mikrokalorimetrie při studiu mikrobiálního života v půdě. Online, diplomová práce. Jitka KROUSKÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162233>. [cit. 2025-03-14].

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně. Že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům pouze se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto vyjádřila své upřímné poděkování své vedoucí práce, Ing. Jitce Krouské, Ph.D., za její trpělivost, ochotu a odborné vedení, stejně jako za čas, který mi věnovala během psaní této práce. Velmi si vážím také podpory své rodiny během celého studia, především mé babičky, která mě neustále motivovala a povzbuzovala.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Význam půdních mikroorganismů	10
3.1.1	Působení mikrobiálního společenstva v půdě	10
3.1.2	Zkoumání mikrobiálního života v půdě	11
3.1.3	Složitost mikrobiálního společenství	12
3.2	Kalorimetrie.....	12
3.2.1	Instrumentace TAM III	13
3.2.2	Izotermická titrační mikrokalorimetrie	16
3.2.3	Izotermická mikrokalorimetrie v uzavřených ampulích	16
3.3	Respirometrie	16
3.3.1	OxiTop IDS B6	17
3.4	Termogravimetrie (TGA)	18
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	19
4.1.1	Mikrokalorimetrie jako indikátor kontaminace půd.....	19
4.1.2	Využití alternativních zdrojů uhlíku	24
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
5.1	Použité chemikálie	26
5.1.1	Lignohumát	26
5.2	Použité přístroje a pomůcky	26
5.3	Příprava vzorků	27
5.3.1	Odběr vzorků půdy.....	27
5.3.2	Příprava zásobních roztoků se živinami.....	27
5.4	Příprava vzorků pro izotermickou mikrokalorimetrii (TAM III).....	28
5.4.2	Měření na mikrokalorimetru TAM III	29
5.5	Příprava vzorků pro izotermickou titrační mikrokalorimetrii (ITC).....	30
5.6	Respirometrické měření	33
5.7	Charakterizace půdy	34
5.7.1	TGA analýza	35
5.7.2	WHC – vodní zádržná kapacita půdy.....	35
5.7.4	Analýza chemických a biologických vlastností půdy	37
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	39
6.1	Charakterizace půdy	39

6.1.1	TGA analýza	39
6.1.2	Stanovení WHC – vodní zádržná kapacita půdy.....	40
6.1.3	Analýza chemických a biologických vlastností půdy	40
6.2	Mikrokalorimetrická měření na TAM III.....	42
6.2.1	Vliv skladování na mikrobiální aktivitu.....	43
6.2.2	Vliv teploty měření na mikrobiální aktivitu.....	47
6.2.3	Vliv sterilizace ampulí	50
6.2.4	Vliv zimního ročního období na mikrobiální aktivitu.....	51
6.2.5	Izotermická titrační mikrokalorimetrie (ITC)	52
6.2.6	Studium mikrobiální aktivity při využití různých zdrojů živin.....	55
6.4	Respirometrie	57
7	ZÁVĚR.....	59
7.1	Charakterizace půdy	59
7.2	Mikrokalorimetrická měření na TAM III.....	59
7.2.1	Vliv skladování na mikrobiální aktivitu.....	59
7.2.2	Vliv teploty na mikrobiální aktivitu	59
7.2.3	Vliv sterilizace ampulí	59
7.2.4	Izotermická titrační mikrokalorimetrie (ITC)	60
7.2.5	Studium mikrobiální aktivity při využití různých zdrojů živin.....	60
7.4	Respirometrie	61
7.5	Hodnocení metod studia mikrobiální aktivity	61
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	62
9	PŘÍLOHY.....	69
10	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	70
10.1	Seznam zkratk.....	70
10.2	Seznam symbolů.....	71

1 ÚVOD

Dnes již víme, že mikrobiální část půdy má zásadní význam pro půdní prostředí, konkrétně při rozkládání organických látek, koloběhu živin a také ve stabilizaci půdní struktury. Ovšem musíme myslet na to, že aktivita všech půdních mikroorganismů může být ovlivněna mnoha faktory. Mezi tyto faktory patří například dostupnost substrátů, teplota anebo vlhkost. Půdní mikrobiální složka zřetelně odráží celkové zdraví půdy a její velmi podrobné studium má ještě větší význam jak ve vědeckém výzkumu, tak i v nesmírně důležité oblasti enviromentální ochrany, zemědělství a půdní ekologii. Proto je pro nás zcela klíčové, abychom měli představu o těchto metabolických procesech.

Moderní postupy, jako např. izotermická mikrokalorimetrie a respirometrie, nám skutečně dovolují podrobně monitorovat mikrobiální činnost v reálném čase bez nutnosti zásahu do ekosystému. Obě zmíněné analytické metody poskytují podrobné informace o mikrobiálním metabolismu, nezávisle na složení zkoumaného vzorku půdy. Pomocí mikrokalorimetrie můžeme měřit veškerý tok tepla, který se týká metabolismu mikrobů. Ovšem pomocí respirometrie sledujeme produkci oxidu uhličitého.

Získané informace z mikrokalorimetrických měření jsou porovnávány s výstupy respirometrických měření za účelem interpretace dat a získání hlubšího porozumění problematiky, což pomáhá poskytnout důkladnější představu o procesech probíhajících ve měřených vzorcích půdy. Díky těmto výsledkům můžeme lépe porozumět metabolismu půdních mikroorganismů a jejich reakci na vnější faktory.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je sledovat mikrobiální aktivitu v půdních vzorcích pomocí izotermické mikrokolorimetrie a respirometrie. Dále hodnotí vliv různých experimentálních podmínek na metabolický stav mikrobiálních společenství v půdních vzorcích.

Tato práce si klade za cíl neustále prohlubovat znalosti a praktické zkušenosti s metodou izotermické mikrokolorimetrie při studiu půdních vzorků na Fakultě chemické VUT v Brně. Současně by měla poskytnout vysvětlení, jak za pomoci těchto metod můžeme přesně monitorovat mikrobiální aktivitu v půdě a jak interpretovat získaná data v kontextu mikrobiálního metabolismu.

Dále se práce zabývá pozorováním některých parametrů a faktorů ovlivňujících mikrobiální aktivitu (skladování půdy, vliv teploty a různých živin). Cílem této studie bude také porovnat mikrokolorimetrická měření s respirometrickými, aby bylo možné získat celistvější pohled na mikrobiální procesy v půdě. Snaha je lépe zachytit dynamiku mikrobiálního metabolismu a reakce na experimentální podmínky pomocí kombinace těchto metod.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Význam půdních mikroorganismů

Energie se neustále přeměňuje v systémech životního prostředí prostřednictvím metabolických aktivit živých organismů, ale o vztahu mezi nimi je známo jen málo. Život nad a pod zemí vyvinul komplexní a různorodá společenství a klíčovým problémem v ekologii je prozkoumat funkční význam složení půdních společenství. Navzdory ústřední roli půdních mikroorganismů v biogeochemických cyklech Země je význam mikrobiální diverzity ve fungování ekosystému stále diskutován. Biochemický cyklus nebo-li koloběh látek je termín, který se běžně používá ve vědách o Zemi pro cyklus určitého chemického prvku či molekuly, který probíhá v živém i neživém prostředí Země. Termín vyjadřuje fakt, že v procesu jsou zahrnuty biologické, geologické i chemické faktory. Díky tomuto koloběhu je daný prvek zpravidla recyklován. Regulace našeho klimatu a uhlíkového cyklu je důležitou funkcí ekosystému. Půdní organická hmota je největší zásobárnou uhlíku v suchozemských ekosystémech, a proto jsou půdy hlavními hráči v globálním uhlíkovém cyklu [2]. Organická hmota obsahuje energeticky bohaté vazby a je primárním zdrojem energie pro bohatá a různorodá půdní biologická společenství. Prostřednictvím metabolických aktivit využívají heterotrofní mikroorganismy [3] energii uloženou v organické hmotě a vyměňují si ji v biosféře a s atmosférou. Jedná se o mikroorganismy, které nejsou schopny samy vytvářet organické látky z anorganických látek a jsou proto ve své výživě závislé na existenci autotrofních organismů, což jsou organismy, které se vyznačují tím, že si dokáží přeměnou anorganických látek vytvořit energii, tedy potravu, pro svůj růst a vývoj [4].

Podle druhého zákona termodynamiky se energie v průběhu času rozptýlí ze systému a tento proces je nevratný. Z energetického hlediska lze půdní ekosystémy charakterizovat jako otevřené systémy nerovnovážné termodynamiky s rozkladem půdní organické hmoty na oxid uhličitý (CO_2) jako disipativní proces zvyšující entropii [5]. Mikrobiální metabolismus je rozdělen do dvou kategorií: katabolické reakce, které uvolňují energii, a anabolické reakce, které vyžadují energii. Právě příkladem katabolických reakcí v půdách je rozklad organického materiálu na menší sloučeniny, které uvolňují energii potřebnou pro anabolické biosyntetické reakce. Ovšem energie, která je nepotřebná, se rozptýlí jako teplo a zároveň se CO_2 uvolňuje z půdního systému do atmosféry.

3.1.1 Působení mikrobiálního společenstva v půdě

Mikroorganismy, jako jsou bakterie, houby, aktinomycety a další, jsou hlavními producenty půdních enzymů. Tyto mikroorganismy žijí v půdě a aktivně metabolizují organické látky, které se v ní nacházejí. Jako součást tohoto metabolického procesu produkují enzymy, které jim umožňují rozkládat složité organické sloučeniny na jednodušší formy, které mohou absorbovat jako zdroj energie a živin.

Ekologická důležitost půdních enzymů se od první zprávy o půdních enzymech před zhruba sto lety postupně rozšiřuje. Půdní enzymy jsou v současnosti ceněny pro svou klíčovou roli v mikrobiálních aktivitách, půdních procesech a reakci ekosystémů na způsob hospodaření

a globální změny životního prostředí [6]. Mikroorganismy syntetizují různé extracelulární enzymy, mezi nimiž jsou zvláště důležité hydrolytické enzymy. Hydrolytické enzymy katalyzují proces hydrolýzy a hrají zásadní roli v biodegradaci organické hmoty [7].

Aktivita půdních enzymů byly navrženy jako vhodné indikátory kvality a zdraví půdy, neboť rychle reagují na změny způsobené jak přírodními, tak antropogenními faktory, jako je znečištění, zemědělské hospodaření nebo urbanizace [8].

Půdní mikroorganismy jsou životně důležité pro zdraví agroekosystému, tedy ekosystému formovaného zemědělskou činností, který zahrnuje pěstované plodiny, půdu, mikrobiální společenstva a další biologické i abiotické složky (neživé faktory, jako jsou voda, minerály a chemické složení půdy). Mikroorganismy hrají klíčovou roli při rozkladu a integraci organických zbytků do půdy a prostřednictvím enzymatických procesů podporují chemické štěpení organických látek [9]. Mikrobiální vlastnosti půdy, jako je mikrobiální biomasa a populační aktivity, úzce souvisejí se zdravím půdy a slouží jako důležité ukazatele její kvality [10].

Na rozdíl od jiných druhů mají mikroorganismy schopnost rychle se fyziologicky adaptovat, což jim umožňuje přežít a zůstat aktivní tváří v tvář různým environmentálním stresům [11]. Na základě těchto vlastností by se při změně okolností mohly současně objevit rozdíly ve strukturách a funkčních procesech mikrobů, takže mikroby lze použít jako citlivý indikátor kvality půdního prostředí. Vzhledem ke složité dynamice půdních ekosystémů není pochopení mikrobiálního společenstva v půdním prostředí stále jednomyslně stanoveno a je nutné je zkoumat pomocí náročných technik.

3.1.2 Zkoumání mikrobiálního života v půdě

Izotermická mikrokolorimetrie poskytuje informace o tepelných tocích všech procesů s velmi vysokou přesností [12]. Tento přístup je obzvláště cenný pro studium zapojení mikroorganismů do dynamiky uhlíku v půdě, protože umožňuje kvantifikaci všech mikrobiálních metabolických procesů, tedy kombinovaného účinku katabolických a anabolických dějů, které nejen přispívají k produkci CO₂. Lze jej vnímat jako alternativní metodu ke standardnímu měření produkce CO₂, poskytující hlubší vhled do mikrobiální aktivity a koloběhu uhlíku v půdních ekosystémech.

Nedávno Harris a spol. [13] navrhl bezrozměrný index mikrobiální termodynamické účinnosti stanovený pomocí izotermické mikrokolorimetrie. Index je založen na poměru výdeje energie k energetickému vstupu. Malé hodnoty tohoto indexu ukazují, že mikrobiální energetika je účinná, tedy že biota má schopnost minimalizovat ztrátu energie ze systému při zachování metabolismu. Ačkoli je známo, že půdní organismy potřebují k řízení podzemních procesů energii i uhlík, málo se ví o tom, jak jsou energetické toky spojeny s uhlíkovým cyklem a zda existuje vztah mezi mikrobiální energií a složením mikrobiálního společenství v půdě.

Půdní organismy vyvinuly různé životní strategie k asimilaci uhlíku, kdy dochází k přeměně uhlíku z organické nebo anorganické formy do formy organismu vlastní, a pro udržení energie,

růstu a reprodukci. Půdní organismy se mohou rychle přizpůsobit změnám vnějších podmínek prostředí alternativními biochemickými cestami [14].

3.1.3 Složitost mikrobiálního společenství

Ačkoliv alochtonní r- versus zymogenní koncept K- selekce byl kritizován jako příliš zjednodušený pohled na procesy přirozeného výběru v ekologii, je stále v souladu s moderní interpretací typů společenství a fungování půdních mikroorganismů [15]. Organismy, které se vyskytují mimo lokality svého původního rozšíření nazýváme alochtonní. Mezi r- strategie řadíme organismy, které ve své životní strategii uplatňují vyšší důraz na rozmnožování a mobilitu potomstva, přičemž kvalita a konkurenceschopnost je odsunuta do pozadí. Naopak K- stratég představuje organismus, který ve svém životě uplatňuje strategii vyššího důrazu na kvalitu a konkurenceschopnost potomstva, přičemž jeho kvantita a mobilita je odsunuta do pozadí. Obecně platí, že alochtonní r- stratégové jsou uzpůsobeni k rychlému získávání zdrojů, když jsou hojné, a maximalizaci jejich tempa růstu. Tyto organismy obecně uvolňují větší část organického materiálu do atmosféry jako CO₂. Pro srovnání, zymogenní K- stratégové, kteří se vyskytují v závislosti na zvýšené koncentraci požadovaného substrátu, dokáží tedy přizpůsobovat svoji životní strategii podle okolních podmínek, si vyvinuli sadu extracelulárních materiálů, díky čemuž jsou dobře přizpůsobeni k přežití a konkurenci pokud mají omezené zdroje [16]. V ekosystémech, v nichž dominují K- stratégové, se předpokládá, že více organického materiálu je sekvestrováno, nebo-li ukládáno, v půdách prostřednictvím alokace uhlíku na údržbu mikrobiálních buněk a syntézu extracelulárních složek, jako jsou enzymy, polysacharidy, metabolity, proteiny atd. [17]. V důsledku toho je pravděpodobné, že různá půdní mikrobiální společenství budou vyžadovat různé biochemické cesty, které vedou k různým tokům uhlíku a energie skrze společenství a ekosystémy. Podle tohoto scénáře mohou existovat rozdíly mezi produkcí CO₂ a využitím energie mezi mikrobiálními komunitami s různým složením v krátkodobém horizontu a může to mít potenciálně dlouhodobé důsledky pro uhlíkový cyklus v půdě.

3.2 Kalorimetrie

Kalorimetrie je experimentální metoda sloužící k měření tepelné energie uvolněné nebo pohlcené při fyzikálních, chemických či biologických procesech. Pomocí kalorimetrie lze studovat různé děje, jako jsou fázové přechody, chemické reakce, interakce biomolekul nebo metabolické procesy [18].

Hlavním nástrojem kalorimetrických měření je kalorimetr, což je přístroj, který umožňuje zaznamenávat tepelné změny probíhající v uzavřeném systému. V našem případě využijeme jak izotermické titrační mikrokolorimetrie (ITC), tak izotermické mikrokolorimetrie v uzavřených ampulích. K měření obou metod bude použit mikrokolorimetr TAM III.

Mikrokolorimetrie se od běžné kalorimetrie liší vyšší citlivostí, kdy jsme díky ní schopni změřit i velmi malé tepelné toky, což nám umožňuje sledovat tak jemné procesy jako je právě metabolická aktivita půdních mikroorganismů, které by klasický kalorimetr nezachytil.

Mikrokalorimetrie umožňuje sledovat metabolickou aktivitu půdní mikrobioty měřením tepelného toku vznikajícího při biologických procesech, jako je rozklad organické hmoty nebo spotřeba živin. Mikroorganismy v půdě produkují teplo v důsledku svého metabolismu, a mikrokalorimetrické metody tak poskytují citlivý nástroj pro nepřetržité monitorování jejich aktivity. V kombinaci s respirometrií, která sleduje spotřebu kyslíku a produkci oxidu uhličitého, lze získat komplexnější obraz o mikrobiálním ekosystému v půdě a jeho dynamice [19].

3.2.1 Instrumentace TAM III

V praktické části této diplomové práce byl využit mikrokalorimetr od společnosti TA Instruments. Jedná se o poměrně univerzální kalorimetrický systém. Mikrokalorimetr TAM III (Thermal Activity Monitor) lze využít při experimentech jako jsou například izotermická titrační mikrokalorimetrie, studium tepelných změn při růstu mikroorganismů ve vzorku nebo studiu vlivu vlhkosti na chování vzorků. Může být použit pro hodnocení vlastností materiálů jako např. toxicita, stabilita nebo kompatibilita farmaceutických sloučenin, ale hlavně nám dobře poslouží pro sledování půdní mikrobiální aktivity, což je hlavním předmětem této práce [20].

Pomocí tohoto mikrokalorimetru můžeme:

- ⇒ stanovit rozpouštěcí teplo/entalpii,
- ⇒ stanovit entalpii micelizace při titračních experimentech,
- ⇒ sledování procesů stárnutí materiálů na základě detekce tepelné aktivity spojené s růstem mikroorganismů ve vzorcích,
- ⇒ analyzovat tepelnou stabilitu materiálů v čase a odezvu materiálů při změnách teploty,
- ⇒ experimenty s různou vlhkostí (perfuzní experimenty, sorpce vlhkosti atd.),
- ⇒ pro některé analýzy může být výhodou pracovat při zvýšené teplotě až do 150 °C.

Přístroj nám nabízí vysokou citlivost a flexibilitu při měření. Lze jej použít s nejcitlivějšími mikrokalorimetry a širokou škálou příslušenství pro přesné řízení experimentálních podmínek.



Obrázek 1: Modulární kalorimetr TAM III [20].

Základ mikrokalorimetru tvoří termostat, který je schopen rozpoznat velmi malé teplotní rozdíly, např. o $0,0001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento termostat může pracovat ve třech režimech, a to v izotermickém, krokově izotermickém nebo teplotně skenovacím režimu. Přístroj využívá jako tepelné médium olej. Teplotní rozsah, jak udává výrobce, činí od 15 do $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mikrokalorimetr disponuje až čtyřmi pozicemi pro vložení ampulí různého typu a objemu podle požadovaného měření. V našem případě máme v každé pozici jiný nástavec, což umožňuje využití přístroje pro širokou škálu odlišných experimentů. Mezi tyto nástavce patří např. nanokalorimetr, mikrokalorimetr, rozpouštěcí kalorimetr nebo, jak byl využit v praktické části, multikalorimetr se šesti minikalorimetry, který můžeme vidět na obrázku 2.



Obrázek 2: Multikalorimetr se šesti minikalorimetry [20].

Velkou výhodou tohoto mikrokalorimetru je, že je možné používat současně všechny kalorimetry, a to i pro různé typy experimentů zároveň. Jediné omezení v tomto případě je, že lze v přístroji nastavit termostat na jeden teplotní režim pro všechny používané experimenty.

Námi využívaný multikalorimetr (obrázek 2) obsahuje 6 minikalorimetrů pro ampule o objemu 4 ml. Do tohoto nástavce se zasunou držáky, na jejichž konci je háček, na kterém je zavěšena 4 ml měřící ampule se vzorkem, což je pěkně patrné na obrázku 2. Podle požadavků experimentů se měřilo při třech různých teplotách, a to při 15, 20 a 25 °C. Napěťový signál byl zaznamenáván počítačem a další nastavení výkonu odpovídalo údajům výrobce.

V našem případě se měřený vzorek vkládal do jednorázových skleněných ampulí o objemu 4 ml s lisovaným těsněním a hliníkovým víčkem. Do víčka se po jeho uzavření šroubuje kovové oko, jak můžete vidět na obrázku 3, to pak slouží pro zavěšení ampule na držák, který se následně zasunuje do mikrokalorimetru [20]. Před zahájením experimentu musí být ampule z vnější strany dokonale čistá a suchá.



Obrázek 3: Jednorázově uzavřené ampule ze skla [20].

Můžeme se setkat také s ampulemi z nerezové oceli nebo hastelloy (typ slitiny, odolný proti korozi). Používají se pro vzorky, které by buď mohly reagovat se sklem nebo mají být zkoumány při vysokých teplotách. Dále pak tam, kde existuje podezření, že se během experimentu bude uvolňovat plyn, který zvyšuje tlak v ampuli. Víčka ampulí jsou šroubovací [20].



Obrázek 4: Nerezové ampule [20].

3.2.2 Izotermická titrační mikrokalorimetrie

Jedna z metod, kterou nám TAM III umožňuje je izotermická titrační mikrokalorimetrie (ITC), což je metoda umožňující sledování tepelných změn během interakce mezi molekulami. Principem této techniky je postupná injekce titrantu do měřící cely obsahující vzorek, v našem případě vzorek půdy, přičemž se zaznamenává uvolněné nebo pohlcené teplo. ITC je široce využívána k charakterizaci (bio)molekulárních interakcí, včetně vazeb mezi malými molekulami, proteiny, protilátkami, nukleovými kyselinami a lipidy [21].

V našem experimentu jsme využili ITC k přesnému zaznamenání metabolické odezvy půdní mikrobioty. Ke vzorku půdy jsme přidali zásobní roztok, čímž jsme definovali počátek experimentu a umožnili sledování tepelné odezvy mikroorganismů v reálném čase. Tento přístup nám poskytl detailní informace o dynamice mikrobiální aktivity a metabolických změnách probíhajících ve vzorku.

3.2.3 Izotermická mikrokalorimetrie v uzavřených ampulích

Nejvíce využívanou metodikou v této práci byla izotermická mikrokalorimetrie v uzavřených ampulích měřená opět pomocí TAM III. Měřením tepelného výkonu, který je indikátorem metabolické aktivity půdních mikroorganismů, jsme získali přesnější pohled na život mikrobiálního společenství. Při těchto měřeních se využil nástavec multikalorimetr (obrázek 2).

3.3 Respirometrie

Respirometrie je analytická technika využívaná pro studium metabolické aktivity organismu, měřením respirace organismu (například spotřebou kyslíku, produkcí oxidu uhličitého). Tato metoda nám umožňuje kvantifikaci rychlostí biologických procesů v různých prostředích, což je klíčové pro hodnocení metabolických mikrobiálních procesů v půdě.

V případě půdních vzorků s komplexní mikrobiotou může respirometrie přinést znalosti o metabolismu, využití substrátů a dynamice komunit mikroorganismů. Změny ve spotřebě kyslíku nebo produkci CO₂ lze použít k měření aktivity mikrobiální komunity za různých podmínek [22].

Jednou z důležitých výhod respirometrie je, že v kontextu s kalorimetrií nám umožňuje získat velmi kompletní přehled o energetické bilanci a metabolické strategii mikrobiální komunity v analyzovaném vzorku. Tento přístup slouží jako most a umožňuje přímo porovnávat metabolickou aktivitu půdní mikrobioty. Kalorimetrie měří tok tepla, který je výsledkem mikrobiálních procesů, zatímco respirometrie poskytuje přímá data o intenzitě respirace mikroorganismů.

3.3.1 OxiTop IDS B6

Pro respirometrické experimenty byl použit přístroj OxiTop IDS B6, který umožňuje monitorování biochemické spotřeby kyslíku (BOD) v reálném čase. Tento systém pracuje na principu měření změn tlaku v uzavřeném prostoru, čímž poskytuje přesné údaje o mikrobiální aktivitě ve vzorcích. Díky své citlivosti a automatizovanému sběru dat je vhodný pro hodnocení biologického rozkladu organických látek v různých matricích, včetně půdních vzorků.

Přístroj funguje na principu sledování mikrobiálního metabolismu prostřednictvím spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého. Mikroorganismy využívají kyslík pro svůj metabolismus a při rozkladu uhlikatých látek uvolňují oxid uhličitý. V uzavřeném systému dochází k absorpci oxidu uhličitého hydroxidem sodným, což vede ke snížení tlaku. Tato změna tlaku je následně měřena a vyhodnocována jako indikátor mikrobiální aktivity ve vzorku [23].



Obrázek 5: Hlavice OxiTop IDS B6 [23].

V našem případě bylo k měření využito šest hlavic, které bylo nutné propojit s hlavním ovladačem (Multi 3620 IDS), viz obrázek 6. Tento ovladač slouží ke sběru a vyhodnocení dat,

umožňuje sledovat měřené parametry v reálném čase a poskytuje uživatelsky přívětivé rozhraní pro řízení experimentu.



Obrázek 6: Multi 3620 IDS [23].

3.4 Termogravimetrie (TGA)

Termogravimetrická analýza (TGA) je technika, která se používá pro určování změny hmotnosti a rychlosti změny vzorku v závislosti na teplotě, čase a okolní atmosféře. Takové metody se běžně používají pro stanovení tepelných vlastností materiálů, zejména pro hodnocení stability materiálu během ohřevu a oxidačních procesů, obsahu vlhkosti a obsahu těkavých látek [24].

TGA je tak užitečná v oblasti environmentální analýzy, protože může být použita pro stanovení vlhkosti půdy, jelikož poskytuje přesnou kvantifikaci obsahu vody ve vzorcích prostřednictvím úbytku hmotnosti jako funkce teploty během postupného ohřívání. Takový přístup generuje důvěryhodná data pro hodnocení kvality půdy a její kapacity pro zadržování vody.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Anke M. Herrmannová a spol. testovali hypotézu, že složení mikrobiálních společenstev v půdách a jejich fungování řídí energetické toky, protože půdní organismy vyvinuly různé biochemické dráhy a životní strategie. Obecným předpokladem je, že měření mikrobiální energetiky poskytují jemnější popis mikrobiálních procesů souvisejících s uhlíkovým cyklem než měření mikrobiální produkce CO₂ [25]. Pro měření mikrobiální produkce CO₂ využili kalorespirometrických měření, které měří jak produkci CO₂, tak spotřebu kyslíku, který organismus spotřebovává během metabolických procesů, zejména při oxidaci živin pro produkci energie (ATP) [26]. Kalorespirometrický poměr (poměr tepla k CO₂) byl použit k hodnocení metabolismu a metabolické účinnosti v půdních systémech, a zdá se, že tento poměr se liší mezi půdními systémy s různým využitím půdy.

Autoři odebírali vzorky z hloubky 0 až 7 cm a následně vzorky proseli síty o průměru 2 mm. Dále je nechaly zmrazit do jara. Poté byly půdy upraveny na 45 % jejich kapacity zadržování vody a předinkubovány po dobu dvou týdnů při 25 °C, aby se umožnilo odeznění jakýchkoliv poruch způsobených proséváním. Jako substráty byly vybrány následující: kyselina y- aminomáselná, d-glukóza, kyselina citrónová a kyselina a-ketoglutarová.

Pro každé ošetření půdy bylo 5 g půdy umístěno do 20ml skleněných reakčních nádob a každá nádoba byla uzavřena ampulí s přísadou sestávající ze dvou 1ml injekčních stříkaček. Každá ampule s přísadou obsahovala buď jeden ze sedmi výše uvedených substrátů nebo vodu jako kontrolu. Vzorky byly poté vloženy do izotermického mikrokolorimetru TAM Air (TA Instruments Sollentuna, Švédsko) s termostatem nastaveným na 25 °C. Kalorimetr byl poté utěsněn a vzorky byly ponechány při stabilních podmínkách po dobu 3 hodin. Po ekvilibraci byly písty dvou injekčních stříkaček pomalu stlačeny, aby se po kapkách přidaly substráty a kontrolní voda (60 µl na gram půdy) a tepelné toky byly stanoveny během 8 hodin po přidání substrátu.

4.1.1 Mikrokolorimetrie jako indikátor kontaminace půd

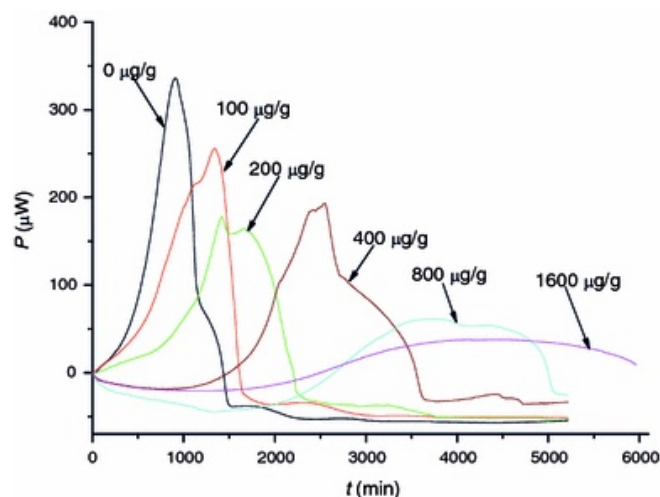
Pomocí vícekanálové mikrokolorimetrie TAM III v kombinaci s přímým počítáním mikroorganismů (bakterie, aktinomycety a houby) v laboratorních podmínkách se podařilo Yao a spol. [27] stanovit počet mikrobiálních populací, rezistenci a aktivitu vůči toxicitě kadmia (Cd) v půdě. Termokinetické parametry, které mohou reprezentovat půdní mikrobiální aktivitu, byly vypočteny z křivek power-time půdní mikrobiální aktivity získaných kalorimetrickým měřením. Yao a spol. výzkum naznačuje, že kalorimetrie je velmi citlivá, jednoduchá a užitečná technika pro *in vitro* zkoumání účinků toxických těžkých kovů na půdní mikrobiální aktivitu. Průmyslová odvětví významně přispívají k organickým zátěžím těžkých kovů (tj. kadmium, olovo, chrom, rtuť, arsen), těkavých fenolů, kyanidu, uhlovodíků, sulfidů, čpavku v půdě a vodních zádržích. Byly proto vyvinuty metody pro odhad ekonomických nákladů průmyslově i zemědělsky generovaného znečištění. Správný přístup k plánu monitorování by se však neměl soustředit pouze na hodnocení úrovní znečišťujících látek a nákladů na nápravu, ale také na schopnost mikrobů v půdních a vodních ekosystémech obnovit své funkce v prostředí.

Funkce půdních mikroorganismů jsou pro životní prostředí zásadní, protože hrají roli v koloběhu minerálních sloučenin, rozkladu organických látek, podpoře či potlačení růstu rostlin a dalších půdních biofyzikálních procesech [28]. Půdní mikroorganismy a jejich řízené procesy jsou tedy nezbytné pro dlouhodobou udržitelnost ekologických a zemědělských systémů.

Mnoho studií se v minulosti zaměřovalo na porovnání půdních mikrobiálních vlastností pomocí mikrokolorimetrie a dalších metod [29]. Bylo zjištěno, že izotermická mikrokolorimetrie je slibnou technikou pro monitorování mikrobiálních procesů, kdy se do půdy nebo vody přidává agrochemikálie. Tepelný účinek degradace glukózy poskytuje informace o mikrobiální aktivitě půdy [30]. Tato metoda je však omezena na druhy mikroorganismů, které metabolizují glukózu v půdě. Klasické stanovení mikrobiální aktivity v půdě přímo měří vývoj oxidu uhličitého (respirometrie), biomasu (množstvím mineralizovaného uhlíku nebo dusíku) nebo počítá růst mikroorganismů. Jde poměrně dobře simulovat reálné podmínky u měření s mikrokolorimetrií, která nepřetržitě kvantifikuje mikrobiální aktivitu v reálném čase, přičemž inkubační doba je stejná jako ve skutečných půdních podmínkách. Tento postup je rychlejší než měření samostatných skupin složek mikroorganismů a nevyžaduje opticky transparentní systémy [31]. Proto se mikrokolorimetrická metoda ukazuje jako velmi citlivá na změny v mikrobiální biomase, které nelze snadno detekovat některými konvenčními metodami [32].

Mikrokolorimetrie byla navržena pro měření kvantitativních indexů konstanty rychlosti růstu mikrobů, procesu vývoje tepla a výtěžku tepla v heterogenních komplexních půdních systémech [33]. Mikrokolorimetrická technika také umožňuje studium biologie na molekulární a buněčné úrovni [34].

Yao a spol. provedli tedy mikrokolorimetrické měření půdy o různé koncentraci kadmia, aby mohli pozorovat negativní vliv Cd na život mikroorganismů v půdě. Metabolismus mikroorganismů v půdě se v nepřítomnosti a přítomnosti různých množství kadmia lišil, jak se očekávalo, což můžeme vidět na obrázku 7. Na křivkách závislosti výkonu na čase pozorujeme, jak se se zvyšujícím zastoupením kadmia snižuje nejvyšší projev výkonu P_{max} .



Obrázek 7: Křivky závislosti výkonu na čase pro vzorek půdy s obsahem kadmia. Koncentrace Cd(II) byly (a) kontrolní; (b) 100; (c) 200; (d) 400; (e) 800; a (f) 1 600 $\mu\text{g CdCl}_2$ na ml. Ke kontrolnímu vzorku nebylo přidáno žádné Cd(II).

Když bylo Cd absorbováno do buněčné stěny a následně absorbováno buňkou, intracelulární Cd mohlo vyvolat toxický účinek na mikroorganismus různými cestami. Těžké kovy mohou snížit aktivitu enzymu interakcí s komplexem enzym-substrát, denaturací proteinu enzymu, interakcí s jeho aktivními místy nebo ovlivněním syntézy enzymů v mikrobiálních buňkách [35].

Autoři uvádějí, že když koncentrace Cd přesáhla $800 \mu\text{g ml}^{-1}$, křivky výkonu a času změnila tvar. Sada rozlišitelných profilů ukázala variace v mikrobiální aktivitě. To také objasňuje, že vysoké koncentrace Cd silně ovlivňují normální metabolismus mikroorganismů. Yao a spol. také vyhodnotili počet životaschopných mikroorganismů pomocí kultivace na sériově rozprostřených miskách s agarem a dalšími kultivačními médii. Následně se počítaly vytvořené kolonie, tedy jednotky tvořící kolonie (CFU). Zde autoři potvrdili jednoznačnou korelaci s klesajícím počtem životaschopných mikroorganismů ve vzorcích s Cd. Počet živých mikroorganismů v půdě (houby, bakterie...) tedy klesal s rostoucí koncentrací Cd. Když byla koncentrace Cd do $1\ 600 \mu\text{g ml}^{-1}$, mikroorganismy nemohly růst a vrchol výkonu a času byl pouze hladká čára. To ukazuje, že Cd může potlačit růst těchto mikroorganismů a křivky síly a času odpovídají počtu mikroorganismů v půdě.

Mikrokalorimetrie může být platným a rychlým nástrojem pro *in situ* hodnocení dynamiky růstu půdní mikrobiální populace, odolnosti a aktivity. Stručně řečeno, tato technika je slibná při analýze mechanismů a interakcí mezi toxickými látkami a půdními mikroorganismy.

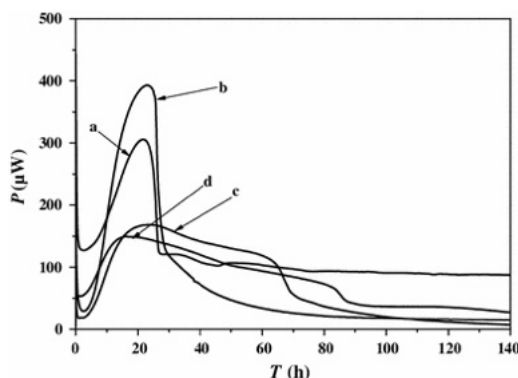
Mikrokalorimetr TAM byl využit také na sledování vlivu různých koncentrací ropy na mikrobiální život v půdě. She, Yao a spol. testovali tuto korelaci. Výsledky ukázaly, že ropa měla do určité míry účinky na půdní mikroorganismy. Půdní mikrobiální aktivita byla podporována koncentrací ropy nižší než $0,52\% \pm 0,24$, ale inhibována dalším zvýšením ropy [36]. Znečištění ropou má řadu negativních účinků na růst a vývoj jak rostlin tak i zvířat, ale také na lidské zdraví [37]. Většina výsledků ukazuje, že ropa ve vysokých koncentracích

inhibuje biologickou aktivitu. Rozklad ropných polutantů lze urychlit doplněním živin, které stimulují aktivitu přirozeně se vyskytujících mikroorganismů [38].

Mikrokalorimetr TAM III umožňuje analyzovat vliv různých polutantů na rychlost růstu půdních mikroorganismů a jejich produkci metabolického tepla [39]. She, Yao a spol. se zaměřili na kvantifikaci vlivu ropné kontaminace na mikrobiální aktivitu prostřednictvím detekce tepla uvolňovaného půdními mikroorganismy během kalorimetrické analýzy. Chtěli posoudit změnu mikrobiální aktivity a populace v kontaminované půdě a toleranci bioty k ropě.

Měření probíhala ve 4ml ampulích z nerezové oceli, které byly před použitím vyčištěny a sterilizovány v peci při 100 °C. Vzorky půdy o hmotnosti 1 g byly nasyceny 0,2 ml vodného roztoku obsahujícího glukózu a síran amonný ve stechiometrickém poměru 1:1 a následně umístěny do 4ml ampulí z nerezové oceli. V průběhu experimentu byla teplota nastavena na 28 °C.

Mikrobiální aktivity vzorků půdy byly zaznamenávány jako křivky závislosti výkonu na čase. Mikrobiální metabolismus v půdě odebrané z různých vrtů ropného pole je znázorněn na sérii křivek v obrázku 8. Autoři uvádějí, že křivky představují typický proces mikrobiální metabolické aktivity, tedy mají typický tvar růstové křivky, která má 4 části: lag fázi, exponenciální fázi, stacionární fázi a odumírající fázi. Každá křivka vykazovala jeden vrchol, přičemž maximální výkon se měnil v závislosti na délce inkubační doby a koncentraci ropy. Křivky výkonu a času ukazují, že tvary křivek metabolické aktivity se v různých půdách kontaminovaných ropou hodně změnily. Bylo zřetelně pozorováno, že při nízké koncentraci se vrcholy postupně zvyšují s rostoucími dávkami, zatímco při vysoké koncentraci naopak klesají.



Obrázek 8: Křivky výkonu a času pro vzorky půdy doplněné glukózou a síranem amonným. Rozdělení a, b, c, d podle místa odběru. Koncentrace ropy u vzorků půdy je následovná: a (3,46 %), b (0,52 %), c (0,06 %), d (0,02 %).

Tato studie odhalila, že mikrokalorimetrická metoda může být užitečným nástrojem pro hodnocení vlivu ropné kontaminace na půdní mikrobiotu.

Vědecká skupina vedená Hassanem, Chenem a spol. [40] využila mikrokalorimetr TAM III k odhadu enzymatických, mikrobiálních a chemických vlastností hnědozemě. Autoři se zaměřili na porovnání těchto půdních vlastností stanovených běžně používanými metodami

s výsledky získanými konvenčními postupy, které jsou široce uznávané a ověřené praxí. Následně své závěry potvrdili pomocí mikrokolorimetrie. Jejich výsledky naznačují, že kalorimetrické parametry P_{max} , t_{max} a k jsou vysoce citlivé a mohly by být použity jako ukazatele půdních enzymatických, mikrobiálních a chemických vlastností, zatímco Q je nepřímý indikátor.

Autoři porovnávají hnědozemě obohacené o rýžovou slámu, která představuje zemědělský odpad po celém světě, jehož se zbavujeme spalováním pod širým nebem, což následně způsobuje velké uvolňování skleníkových plynů [41]. Ovšem ukazuje se, že taková organická rezidua jsou schopna zlepšit enzymatickou aktivitu a diverzitu půdních mikrobiálních populací a zvýšit obsah organické hmoty. Ovšem vliv organické hmoty na mikrobiální a chemické vlastnosti půdy však bude záviset na množství, typu a velikosti přidaného organického rezidua [42]. Proto dopad vstupů organické hmoty pro tyto účely, ať už v kombinaci nebo samostatně, tvoří zajímavou oblast zkoumání pro posouzení udržitelnosti půdy a jejího biologického zdraví.

Hnědozemě jsou charakteristickým typem půd mírného pásma, běžně se vyskytujícími v lesních a zemědělských oblastech. Vznikají v důsledku intenzivního přesunu půdních částic a vyváženého složení jemných částic půdní hmoty. Obvykle mají vyváženou strukturu a dostatek živin, což je činí vhodnými pro zemědělské účely. Mají také dobrou propustnost vody. Ale mohou být náchylné na erozi, zejména pokud jsou vystaveny nadměrnému odlesňování nebo intenzivnímu zemědělství bez vhodných ochranných opatření. Intenzivní zemědělství může vést k vyčerpání živin v půdě, což vyžaduje pravidelné dodávky hnojiv. Přestože hnědozemě mají své výhody a nevýhody, správná péče a správa mohou pomoci maximalizovat jejich užitek a minimalizovat negativní dopady [43].

Jak již víme, během vývoje mikrobiální aktivity stimulované přítomností živin vzniká tepelný tok, který autoři monitorovali pomocí mikrokolorimetru TAM III. Studii doplnili hloubkovou analýzou nejdůležitějších půdních fyzikálních (teplota, vlhkost, textura a vodní kapacita), chemických (pH) a biologických vlastností (obsah organické hmoty, odhad počtu mikroorganismů) spolu se studiem prostředí, např. dešťové srážky, vlhkost atd. Velká výhoda mikrokolorimetrie je v tom, že je nezávislá na typech mikroorganismů či jejich formě evoluce a zároveň umožňuje nepřetržité sledování aktivity živého procesu *in situ* po dlouhou dobu, aniž by došlo k narušení systému.

Autoři provedli experiment následovně. Nejdříve odebrali vzorky hnědé půdy v hloubce 0 až 20 cm na polích v Číně v okolí dvou měst. Půda se následně prosela a přenesla do květináčů o kapacitě 1 kg. Půdu udržovali ve dvou hladinách vodní kapacity, a to 25 % a 200 % kapacity zadržování vody (WHC), pomocí deionizované vody. Půda byla během inkubace udržována na požadované kapacitě zadržování vody. WHC bylo odhadnuto volumetrickou metodou [44]. Teplota skleníku byla udržována na 25 °C. Vzorky půdy následně odebírali po 5, 10 a 15 týdnech, poté nechali vzorky prosít přes 2 mm síto a rozdělili vzorky na dvě frakce. První část byla sušena na vzduchu po dobu 1 týdne pro fyzikální a chemické analýzy, zatímco druhá část byla skladována při 4 °C, pro následně mikrobiální a biochemické vlastnosti.

Před mikrokalořimetrickým měřením byly vzorky půdy inkubovány při 25 °C po dobu 24 hodin a jejich vlhkost byla udržována na 35 % WHC, aby se maximalizovala mikrobiální aktivita. Všechna měření provedli ve 4ml ampulích z nerezové oceli při 25 °C. Ampule byly před experimentem sterilizovány proplachováním v 75 % ethanolu a sterilní deionizované vodě po dobu 10 minut a vysušeny v digestoři s laminárním prouděním. Následně se 1 g půdy umístil do sterilní ampule a okamžitě se přidalo 0,2 ml roztoku obsahujícího 1,5 mg glukózy a 1,5 mg síranu amonného. Ampule současně zavedli do mikrokalořimetru. Nejprve byly spuštěny do přehřívací polohy na 15 minut a poté do měřicí polohy. Jakmile byly základní linie stabilní, data a křivky byly monitorovány a zaznamenávány počítačem, dokud se signál opět nenavrátil na původní hodnotu. Každé měření trvalo přibližně 48 hodin. Konečná hodnota byla vypočtena porovnáním integrované plochy křivek výkonu a času, což odpovídá tepelnému účinku [45]. Z každého experimentu byly analyzovány křivky výkonu a času a z těchto analýz byly stanoveny charakteristické parametry, jako je konstanta rychlosti růstu (k) a celkový tepelný efekt (Q), které mohou popisovat biochemické reakce [46]. Celkový tepelný výkon Q byl získán integrací každé křivky. Hodnota výšky píku (P_{max}) a odpovídající čas (t_{max}) každé křivky byly získány pomocí softwarové sady TAM assistant [47].

4.1.2 Využití alternativních zdrojů uhlíku

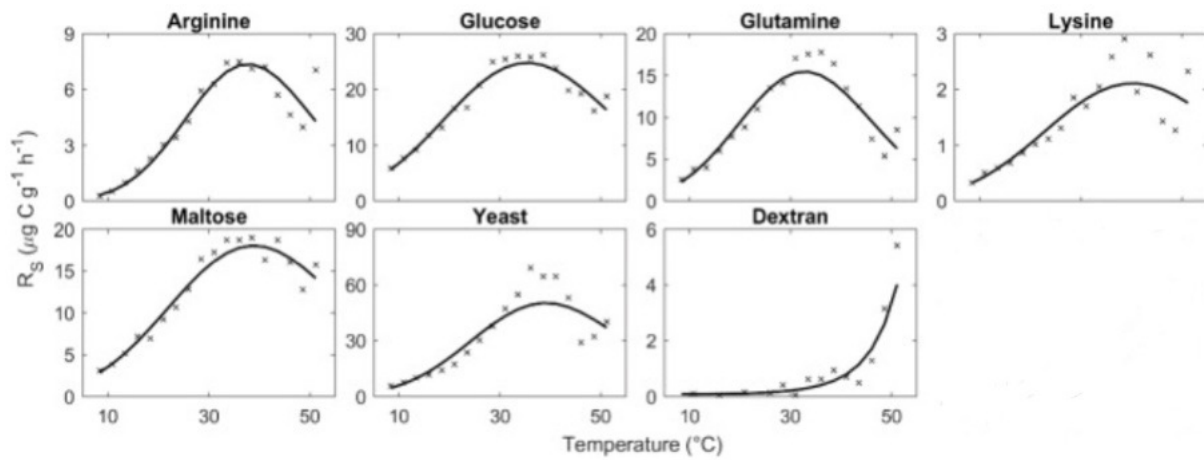
Byly provedeny také experimenty, které se mimo jiné zabývaly projevem půdní mikrobioty v závislosti na použitém zdroji uhlíku, jakožto využití živiny. Kristyn B. Numa a spol. [48] jako přidané substráty využili arginin, glukózu, glutamin, lysin a maltózu k reprezentaci teplotní odezvy rychlostních konstant (tj. rychlosti dýchání půdy), což způsobuje exponenciální zvýšení rychlosti dýchání s rostoucí teplotou [49].

Porozumění dynamice půdního uhlíku představuje klíčovou výzvu pro vývoj přesných a spolehlivých modelů jeho cyklování, od úrovně půdních agregátů až po globální modely zemského systému. Prostřednictvím heterotrofního dýchání mikroorganismy v půdě rozkládají různé organické sloučeniny, které lze funkčně rozdělit do dvou širokých teoretických poolů: labilní pool, který je snadno dostupný, rozpustný a snadno rozložitelný, a stabilní pool, který je fyzikálně chráněn před mikrobiálním rozkladem. Jedním z přístupů pro hodnocení teplotní odezvy různých uhlíkových poolů je přidání jednoduchých zdrojů uhlíku do půdy a stanovení jejich degradace odečtením dechových rychlostí naměřených z půdy, kde uhlík nebyl přidán.

Byly odebrány tři typy půdy z hloubky 10 cm pomocí kbelíkového vzorkovače z výzkumné farmy DairyNZ na Novém Zélandu. Po odebrání byly prosáté přes 2mm síto, zvlhčené na 60 % maximální kapacity zadržování vody (WHC) a uchovávány při pokojové teplotě v plastových sáčcích se zipem s vatou, aby byla zajištěna výměna plynů. Půda byla inkubována po dobu pěti hodin při 18 různých teplotách v rozmezí 8–52 °C. To umožnilo inkubaci celkem 56 vzorků. Před inkubací byly do zkumavek přidány různé uhlíkaté sloučeniny rozpuštěné ve vodě, aby vlhkost vzorků dosahovala 60 % WHC. Kontrolní vzorky byly zvlhčeny destilovanou vodou.

Jednoduché uhlíkaté sloučeniny byly podrobeny inkubaci: arginin, glukóza, glutamin, lysin a maltóza. Teplotní optima (T_{opt}) se pohybovala od 33 °C do 39 °C, zatímco teplotní inflexní

body (T_{inf}) byly mezi 19 °C a 25 °C. Lysin vykazoval výrazně nižší respirační aktivitu ve srovnání s ostatními sloučeninami, jak můžeme vidět na obrázku 9.



Obrázek 9: Vztah mezi průměrnou rychlostí dýchání (R_s) a teplotou pro arginin, glukózu, glutamin, lysin, maltózu, kvasničný extrakt, dextran. Všimněte si rozdílů v měřítku osy y.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie.

	Molekulová hmotnost [g/mol]	Výrobce	CAS
Glukóza	198,17	Lach-Ner, s.r.o.	5996-10-1
Síran amonný	132,14	Lachema	7783-20-2
Fruktóza	180,18	Lach-Ner, s.r.o.	57-48-7
Trehalóza	378,33	Sigma	6138-23-4
Lignohumát A extra	-	Amagro, s.r.o.	

5.1.1 Lignohumát

Jedná se o univerzální huminový přípravek obsahující huminové a fulminové kyseliny v optimálním poměru. Právě díky vysokému podílu nízkomolekulárních látek snadno proniká do rostlinných pletiv. Uplatnění najde nejen v zemědělství, ale i v zahradnictví, na sportovištích či v hobby pěstování [50].

Lignohumát díky svému organickému původu a poměrně komplexní struktuře může zároveň sloužit jako zdroj uhlíku pro půdní mikroflóru. Je však pro mikroorganismy hůře odbouratelný než jednoduché organické látky, což vede k jeho postupnému uvolňování a delšímu působení v půdě. Tím může ovlivnit mikrobiální metabolismus, například podpořit rozvoj mikrobiálních společenstev zaměřených na rozklad složitější organické hmoty.

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- mikrok calorimetr TAM III (TA Instruments, USA)
- předvážky S-4002 (Denver Instruments, USA)
- analytické váhy (Denver Instruments, USA)
- automatická pipeta BioHit m200 (20–200 µl)
- drobné laboratorní pomůcky (kádinky, ampule na měření, laboratorní lžička atd.)

- respirometr OxiTop IDS B6
- termogravimetrický analyzátor TGA 5500 (TA Instruments, USA)

5.3 Příprava vzorků

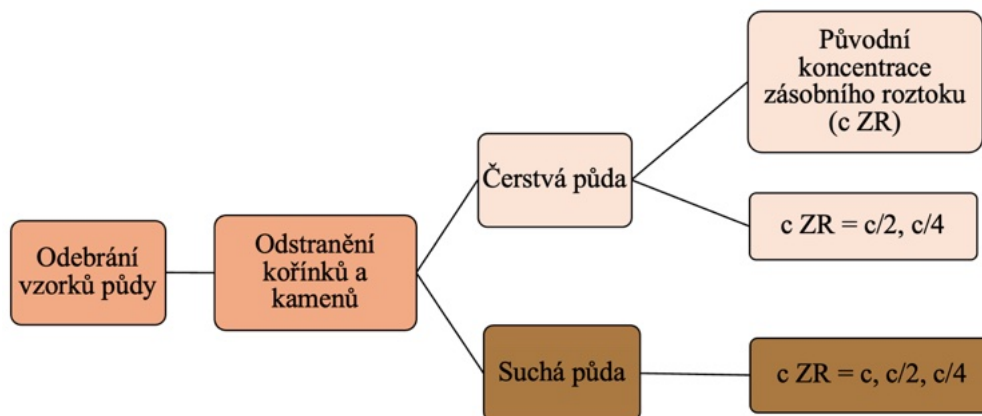
Následující kapitoly popisují postupy přípravy vzorků půdy a roztoků se živinami, které byly k půdním vzorkům přidávány za účelem podpoření metabolismu přítomných mikroorganismů. Navážení jednotlivých složek pro přípravu roztoků obsahujících živiny bylo prováděno na analytických vahách.

5.3.1 Odběr vzorků půdy

Vzorky půdy byly odebrány z pozemku poblíž Fakulty chemické VUT v Brně, vždy z hloubky 10 cm. Po odebrání byly kamínky a větší kořeny odstraněny. Měření byla prováděna od února 2024.

Odebrané vzorky byly následně rozděleny do dvou kategorií: čerstvé půdy a suché půdy. Čerstvé vzorky byly okamžitě měřeny po odběru půdy. Následně byla zbývající půda vysušena při laboratorní teplotě po dobu minimálně 7 dnů. Jednotlivé vzorky se lišily obsahem vlhkosti. Obsah vlhkosti u čerstvě odebrané půdy se pohyboval od 2 do 14 %.

Experimenty byly prováděny s oběma typy půdy – čerstvou i suchou. K navážené půdě v ampulích byl přidáván buď roztok živin (glukóza a síran amonný v různých koncentracích), nebo demineralizovaná voda či jiné živiny. Přehlednější schéma provedených experimentů je uvedeno na obrázku 10.



Obrázek 10: Schéma postupu práce (ZR = zásobní roztok, tj. roztok se živinami).

5.3.2 Příprava zásobních roztoků se živinami

Původní zásobní roztok byl připraven přidáním 7,5 mg glukózy (0,0416 M) a 7,5 mg síranu amonného (0,0568 M) do 10 ml demineralizované vody. Zásobní roztok (glukóza a síran amonný) byl pak přidán do vzorků půdy za účelem podpoření mikrobiální aktivity.

Glukóza a síran amonný byly vybrány jako substráty na základě jejich specifických vlastností podporujících mikrobiální metabolismus. Glukóza je dostupný zdroj organického uhlíku, z něhož mikroorganismy rychle získávají energii a přeměňují ji na biomasu. Síran amonný poskytuje anorganický dusík potřebný pro syntézu proteinů, nukleových kyselin a různých dalších buněčných složek. Tato kombinace poskytuje příznivé podmínky pro růst a metabolickou aktivitu mikroorganismů v půdním prostředí.

Koncentrace roztoků byla stanovena na základě množství glukózy ve vzorku. Příprava jednotlivých roztoků probíhala ředěním zásobního roztoku, přičemž c představuje původní koncentraci roztoku:

- 1) $c = 0,0416 \text{ M}$
- 2) $c/2 = 0,0208 \text{ M}$
- 3) $c/4 = 0,0104 \text{ M}$

Fruktóza, trehalóza a lignohumát sloužily jako alternativní zdroje živin místo již používané glukózy pro mikrokolorimetrická měření mikrobiálního metabolismu na TAM III. Fruktóza a trehalóza byly zředěny v roztoku, aby měly stejnou koncentraci jako původně použitá glukóza. Jejich příprava je podrobně popsána v tabulce 2. K tomu byla připravena suspenze lignohumátu s hmotnostním poměrem 1 g lignohumátu na 10 ml vody kvůli velmi širokému rozsahu molárních hmotností lignohumátu.

Tabulka 2: Navážky pro přípravu zásobních roztoků.

	Navážka [g]	Na objem [ml]
Fruktóza	0,0755	10
Trehalóza	0,1577	10

5.4 Příprava vzorků pro izotermickou mikrokolorimetrii (TAM III)

Ve všech experimentech bylo do ampulí (viz obrázek 3) naváženo stejné množství půdy, a to 1 g. Ke každému vzorku půdy bylo poté automatickou pipetou přidáno 200 μl roztoku s požadovanou koncentrací a obsahem živin. Kontrolní měření probíhalo pouze s půdou, ke které nebyla přidána žádná kapalina.

5.4.2 Měření na mikrokalorimetru TAM III

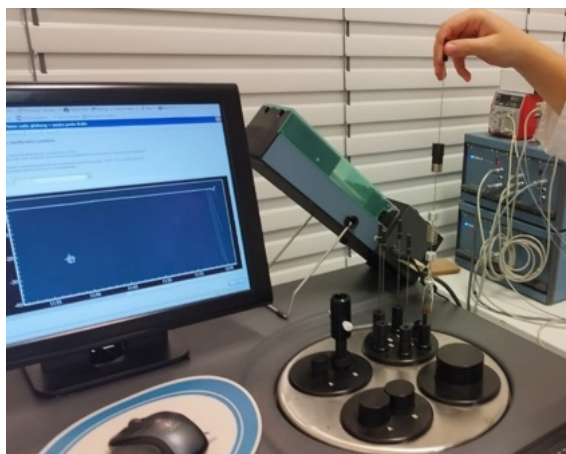
Experimenty byly prováděny při různých teplotách v závislosti na experimentu, ale standardně se měřilo při 25 °C. Vliv teploty na půdní mikroorganismy byl zkoumán při teplotách 15 a 20 °C.

Před zahájením měření musel být signál v mikrokalorimetru stabilizován. Poté byly měřicí ampule vloženy do mikrokalorimetru a zavěšeny na držák (zobrazený na obrázku 11), který byl součástí použitého měřicího nástavce (viz obrázek 2).



Obrázek 11: Držák na ampule.

Ampule se do mikrokalorimetru vkládají ve dvou fázích s časovým odstupem, aby signál zůstal co nejstabilnější během manipulace se vzorky. V první fázi byly ampule zasunuty pouze do poloviny délky držáku (viz obrázek 12). Po 15 minutách následoval druhý krok, kdy byla ampule zasunuta do měřicí pozice, tedy zasunuta do termostatu mikrokalorimetru. Poté byl dalších 40 minut finální signál ustálen. Po ustálení signálu následovalo vlastní měření.



Obrázek 12: Zasunutí držáku s ampulí do poloviční délky držáku.

5.5 Příprava vzorků pro izotermickou titrační mikrokolorimetrii (ITC)

Pomocí izotermické titrační mikrokolorimetrie (ITC) byly monitorovány interakce mezi půdním vzorkem a zásobními roztoky obsahujícími živiny. Tato metoda umožňuje stanovit termodynamické parametry těchto interakcí na základě změn tepelného toku při postupném přidávání zásobního roztoku k půdnímu vzorku.

Toto měření bylo provedeno tak, že se nechal injektovat přesně definovaný objem zásobního roztoku na počátku experimentu do ampule obsahující půdní vzorek.

Měření bylo provedeno při teplotách 20 a 25 °C pomocí mikrokolorimetru TAM III (TA Instruments), což umožnilo monitorování uvolněného tepla v reálném čase během experimentu. Měření bylo provedeno v ocelových ampulích o objemu 4 ml, které byly následně připevněny na nástavec mikrokolorimetru, jak je znázorněno na obrázku 13. Měřený vzorek, do kterého byl injektován zásobní roztok, byl v pozici A (viz obrázek 15), přičemž v pozici B byla reference, kde se v ampuli nacházela pouze půda samotná. Navážka vzorků půdy byla vždy 1 g.



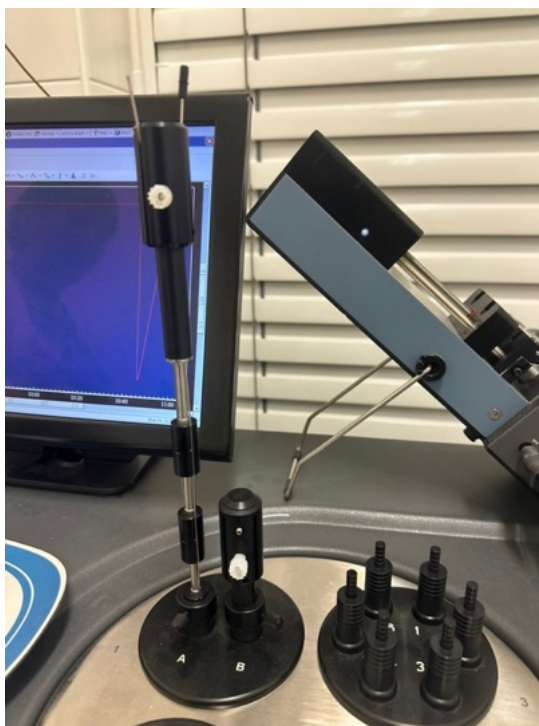
Obrázek 13: Nástavec na titrační měření na TAM III.



Obrázek 14: Ampule pro titrační měření na TAM III.

Postup samotného měření vypadal následovně:

1. Nejprve bylo nutné připravit nástavce pro izotermickou titrační mikrokolorimetrii (ITC). Bylo důležité určit správnou délku výstupu trubičky tak, aby vstupovala do ocelové ampule o objemu 4 ml ve správné výšce.
2. Do ocelových ampulí, včetně referenční, se navážil 1 g vzorku půdy. Bylo nutné zajistit, aby vzorek zůstal na dně ampule a nebránil jejímu správnému uzavření.
3. Ampule se vzorkem se upevnilly na nástavec (viz obrázek 13) a poté byly postupně zasunuty do mikrokolorimetru ve třech krocích, první pozici můžeme vidět na obrázku 15.



Obrázek 15: Zasunutí nástavce s ampulí obsahující vzorek půdy do první pozice; v pozici A ampule se vzorkem půdy; v pozici B reference.

4. Připravil se zásobní roztok obsahující živiny (glukóza $c = 0,0416$ M, síran amonný).
5. Stříkačka se naplnila zásobním roztokem, uzavřela se a následně byla umístěna do pumpy připojené k mikrokolorimetru (viz obrázek 16).



Obrázek 16: Pumpa připojená k mikrokolorimetru TAM III obsahující naplněnou stříkačku s roztokem se živinami.

6. Nejprve byl zásobní roztok propuštěn trubičkou, poté byla trubička zavedena k nástavci s půdním vzorkem.
7. V systému TAM III se nastavily podmínky experimentu. Před zahájením prvního měření se ještě provedla kalibrace systému.

Nastavení experimentu:

⇒ Teplota: 25 °C / 20°C

⇒ Dávkování:

- Celkové dávkování 200 μ l zásobního roztoku se živinami.
- Čas: dávkování zásobního roztoku se živinami hned ze začátku experimentu.
- Trvání experimentu: 20 h

5.6 Respirometrické měření

Respirometrické měření bylo prováděno pomocí přístroje OxiTop IDS B6. Pro zajištění správné komunikace hlavního ovladače Multi 3620 IDS s počítačem bylo nutné nainstalovat do Excelu doplněk Multi, díky kterému je možné přenést naměřená data do počítače.

V následujících krocích je popsán postup přípravy experimentu a průběh samotného měření.

1. Každá hlavice byla nakonfigurována (název, doba měření, jednotky, propojení s hlavním ovladačem).
2. Do měřicí nádoby bylo naváženo 20 g suché půdy.
3. Pod hlavici byly vloženy 2 pecky hydroxidu sodného (pro absorpci CO₂).
4. Ke každému ze šesti vzorků byl přidán odpovídající zásobní roztok (2 ml).
5. Hlavice byly připevněny na nádoby a spustilo se měření trvající 7 dní. Takto připravené nádoby s hlavicemi byly umístěny do termostatu a nechaly se temperovat při 20 °C, viz obrázek 17.
6. Po ukončení experimentu byla data stažena do počítače a vyhodnocena.



Obrázek 17: Hlavice OxiTop IDS B6 umístěny v termostatu.

5.7 Charakterizace půdy

Před provedením jednotlivých měření mikrobiální aktivity v půdě je nezbytné provést její základní charakterizaci. Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, jako je obsah vody, organických a anorganických složek, dusíkatých látek a mikrobiálního uhlíku. Například množství vody v půdě ovlivňuje dostupnost kyslíku, což má přímý dopad na mikrobiální aktivitu. Tyto vlivy mají zásadní dopad na metabolické procesy mikroorganismů, ať už se bavíme o projevu jejich metabolismu či růstu. Tyto faktory jsou klíčové pro pochopení procesů probíhajících v půdním prostředí a pro interpretaci výsledků mikrokolorimetrických měření mikrobiální aktivity [51].

V této kapitole budou postupně představeny jednotlivé metody charakterizace půdy, které byly použity v rámci této diplomové práce. Nejprve bylo analyzováno složení vzorku pomocí

termogravimetrické analýzy (TGA), která poskytla informace o obsahu vlhkosti a obsahu organických látek. Dále byla sledována dostupnost dusíku, konkrétně amoniakální a dusičnanové formy, jež jsou klíčové pro výživu mikroorganismů, neboť jsou pro ně dobře přístupné. Následovat bude stanovení mikrobiálního uhlíku (C_{mic}), což je důležitý ukazatel aktivity mikrobiálních společenstev, ale také obsahu živin v půdě.

Kromě těchto analýz bude hodnocena také vodní zádržná kapacita půdy (WHC – Water Holding Capacity), která ovlivňuje dostupnost vody pro mikroorganismy a tím i jejich metabolickou aktivitu. Tato charakterizace poskytne důležité informace pro interpretaci následných experimentů a umožní lepší pochopení procesů probíhajících v půdním prostředí.

5.7.1 TGA analýza

Měření bylo provedeno pomocí analyzátoru TGA 5500 (TA Instruments). Vzorek půdy odebraný u Fakulty chemické VUT v Brně byl podroben analýze v otevřené pánvičce za přístupu vzduchu v teplotním rozsahu 25 až 1000 °C.

Obsah vlhkosti, organického a anorganického podílu byl stanoven s využitím softwaru Universal V4.5A (TA Instruments).

5.7.2 WHC – vodní zádržná kapacita půdy

Vodní zádržná kapacita půdy (WHC) představuje maximální množství vody, které je půda schopna zaujmout. Tento parametr je zásadní, abychom pochopili schopnost půdy zadržovat vodu a následně ji poskytovat rostlinám a mikroorganismům. Vlhkost půdy hraje důležitou roli v regulaci mikrobiální aktivity. Dostupnost vody v půdě přímo ovlivňuje metabolické procesy mikroorganismů, jako např. rozklad organické hmoty a fixace dusíku. Například speciální struktury na povrchu půdy, které se vyskytují v suchomilných ekosystémech, mohou pomáhat zadržovat vodu a tím podporovat mikrobiální aktivitu. Tyto povrchové vrstvy přispívají ke zvýšení schopnosti půdy vázat vodu, čímž vytvářejí příznivější podmínky pro život mikroorganismů a zároveň chrání půdu před erozí [52].

Na WHC má přímý vliv fyzikální struktura půdy, hlavně zejména velikost a distribuce pórů. Dále pak má zásadní vliv organický obsah, který zvyšuje schopnost půdy vázat vodu. Vyšší WHC je běžná pro půdy s jemnou texturou (jíl), na rozdíl od písčitých půd, které mají nižší WHC kvůli větším pórům, které umožňují rychlý odtok vody.

Způsob stanovení WHC půdy, který jsme použili je zavedeným laboratorním postupem. Postup zahrnoval vysoušení suché půdy a postupné nasycení vodou až do optimálního nasycení půdního vzorku. Měření bylo provedeno v laboratoři a jednotlivé fáze experimentu byly provedeny následujícím způsobem:

1. Předem zvážený vzorek půdy byl sušen v sušárně po dobu 2 hodin při 105 °C.



Obrázek 18: Vzorek půdy po vysušení.

2. Poté se po kapkách přidávala destilovaná voda do vzorku a sledovala se absorpce vody do půdy. Po každém přidání se nechala půda krátce stabilizovat, aby voda měla možnost se rovnoměrně vsáknout.
3. Proces pokračoval, dokud se neobjevily první známky přebytečné vody na povrchu vzorku, což signalizovalo, že půda již nemůže absorbovat více vody.
4. Hmotnost nasyceného vzorku se zaznamenávala a porovnávala s původní suchou hmotností. Výpočet WHC se provedl podle následovného vzorce:

$$\text{WHC (\%)} = \frac{m_{\text{nasycené půdy}} - m_{\text{suché půdy}}}{m_{\text{suché půdy}}} \cdot 100$$



Obrázek 19: Vzorek půdy po přidávání demineralizované vody po naplnění kapacity.

Tato metoda poskytuje přibližnou hodnotu WHC, která umožňuje srovnávat různé půdní vzorky a hodnotit jejich schopnost zadržovat vodu.

5.7.4 Analýza chemických a biologických vlastností půdy

Měření charakterizace půdních vzorků byla provedena na Mendelově univerzitě v Brně, která je vybavená vhodnými zařízeními a zavedenými postupy pro měření mikrobiální aktivity v půdě. Použití moderních přístrojů a metodická podpora umožnily uskutečnit experimenty s vysokou přesností.

Vzorky půdy byly odebrány na pěti různých místech před Fakultou chemickou VUT v Brně, označených od A do E, aby se získaly vzorky z různých prostředí, která se mohou lišit ve složení a vlastnostech.

Součástí analýzy bylo hned několik parametrů. Ty zahrnují obsah dusíkatých sloučenin (amoniakální a dusičnanový dusík), obsah mikrobiálního uhlíku, sušiny a vodní kapacity. Tyto parametry jsou zásadní pro pochopení zdraví půdy a její schopnosti zadržovat vodu, což má přímý vliv na růst rostlin a aktivitu mikroorganismů.

Obsah dusíku v půdě, jak ve formě amoniakálního dusíku, tak dusičnanového dusíku, je důležitým ukazatelem živinového cyklu, protože dusík je jedním z hlavních prvků potřebných pro růst rostlin. Formy dusíku byly stanoveny podle postupu, který využili autoři Kučera A., Holík L. a spol. [53]. Obsah uhlíku, zejména mikrobiálního uhlíku, pak poskytuje informace o aktivitě mikroorganismů v půdě, které jsou nezbytné pro rozklad organické hmoty a recyklaci živin. Jeho obsah se stanovil pomocí metody, kterou využili autoři Zbírál J., Malý S. a spol. [54]. Dále byla měřena sušina, která je důležitá pro stanovení vlhkostních a nutričních podmínek v půdě, která byla stanovena také podle autorů Zbírál J., Malý S. a spol. [55].

Odběr vzorků půdy, které byly následně podrobeny podrobné analýze, byly sbírány do speciálních nádob určených pro tento účel tak, aby se zajistilo, že vzorky budou chráněny před kontaminací a různými vlivy okolního prostředí, které by mohly ovlivnit výsledky analýzy. Po odebrání se tedy vzorky pečlivě stlačily do těchto nádob a odstranil se přebytečný vzduch, čímž se získal kompaktní vzorek. Následně byly vzorky předány k laboratorní analýze na Mendelovu univerzitu, kde byly podrobeny dalšímu zpracování a následnému měření.

Následující fotografie ilustrují průběh plnění nádob vzorkem půdy při odběru.



Obrázek 20: Prázdňá nádoba na odběr vzorků půdy.



Obrázek 21: Speciální nádoba na odběr vzorků půdy.



Obrázek 22: Nádoba naplněna vzorkem půdy.



Obrázek 23: Nádoba na odběr vzorků uzavřená.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

V následujících kapitolách jsou shrnuty výsledky získané z měření prováděných v rámci této diplomové práce a je provedena diskuse k získaným výsledkům.

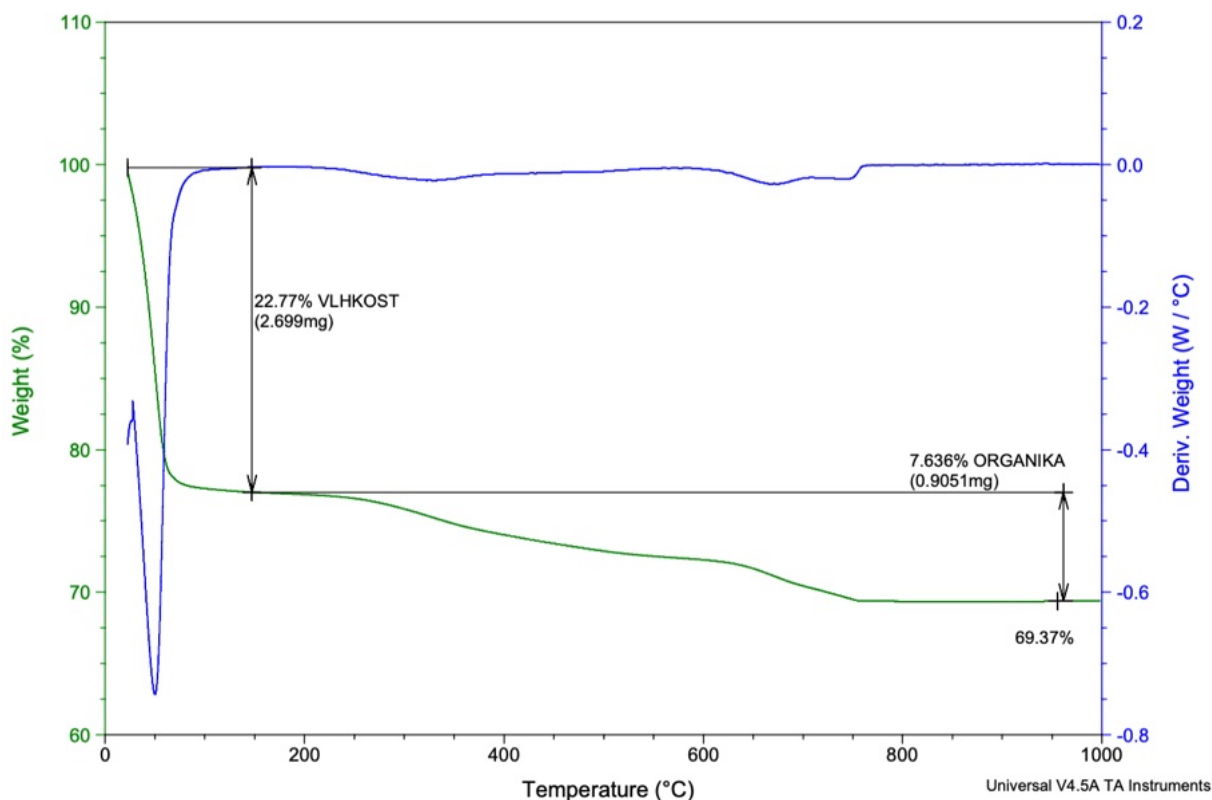
6.1 Charakterizace půdy

Byly provedeny analýzy pro zjištění charakteristik půd, u kterých se v rámci této práce měřil mikrobiální metabolismus. Ty si podrobně rozebereme níže.

6.1.1 TGA analýza

Z termogravimetrické analýzy vzorku půdy (navážka 11,853 mg) z okolí Fakulty chemické VUT v Brně, která probíhala 12. 3. 2024, můžeme vidět, že obsah vlhkosti byl stanoven na 27 %, což odpovídalo úbytku hmotnosti 2,699 mg.

Tento pokles hmotnosti nastal při teplotě do zhruba 150 °C, což odpovídá odpařování vody.



Obrázek 24: TGA analýza vzorku půdy.

Z dat na obrázku 24 vidíme, že organická složka ve vzorku činila 7,6 %, což odpovídalo další změně hmotnosti o 0,9 mg vzorku. Tato ztráta hmotnosti souvisí s termickým rozkladem organických materiálů, který je obecně pozorován v teplotním rozmezí od 200 °C až asi do 600 °C. Největší podíl ve vzorku (69,37 %) tvoří anorganická složka, která zůstala po odpaření vody a spálení organického materiálu. Při nejvyšších měřených teplotách (nad 600 °C) tento zbytek zůstává stabilní a obsahuje minerální složky.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v softwaru Universal V4.5A (TA Instruments). Celková hmotnost vzorku byla 11,853 mg.

6.1.2 Stanovení WHC – vodní zádržná kapacita půdy

Bylo provedeno stanovení vodní zádržné kapacity (WHC), která podle následujícího vztahu vyšla na 84,7 %.

$$\text{WHC (\%)} = \frac{m_{\text{nasyčené půdy}} - m_{\text{suché půdy}}}{m_{\text{suché půdy}}} \cdot 100 = \frac{29,01 - 15,71}{15,71} = 84,7 \%$$

To znamená, že půda má vysokou WHC (schopnost zadržování vody), což povede k lepší dostupnosti vody pro mikroorganismy a jejich metabolická aktivita bude tudíž podpořena. Tento faktor je poměrně důležitý pro interpretaci mikrokolorimetrických měření, neboť vlhkost půdy přímo ovlivňuje dynamiku mikrobiální odezvy.

6.1.3 Analýza chemických a biologických vlastností půdy

Naměřená data, která byla získána při analýze obsahu dusíku, uhlíku a sušiny, jsou zobrazená v následujících tabulkách. Tyto tabulky umožňují detailní přehled o vlastnostech půdy odebraných z 5ti míst v blízkosti pozemku Fakulty chemické VUT v Brně.

Tabulka 3: Obsah dusíku a uhlíku v měřených vzorcích.

Vzorky		Amoniakální dusík	Dusičnanový dusík	Mikrobiální uhlík
		μg /g suché půdy	μg N-NO ₃ /g suché půdy	C _{mic} (μg C/g sušiny)
A	1	2,06	0,52	687,81
A	2	2,17	0,70	614,98
A	3	2,55	0,62	612,28
B	1	2,02	0,70	545,67
B	2	1,75	0,70	553,81
B	3	1,75	0,68	559,24
C	1	1,54	0,63	446,02
C	2	1,54	0,51	416,99
C	3	20,74	0,63	374,76
D	1	2,44	0,46	479,48
D	2	1,90	0,44	492,95
D	3	1,68	0,48	501,03
E	1	1,69	0,52	441,76
E	2	1,58	0,52	457,45
E	3	1,79	0,56	470,52

Obsah amoniakálního dusíku (N-NH₄⁺) a dusičnanového dusíku (N-NO₃⁻) se liší podle místa odběru. Největší rozdíl vidíme u hodnoty amoniakálního dusíku na lokalitě C3 (20,74 μg/g), která je výrazně vyšší než ostatní měření. To může naznačovat lokální akumulaci amoniaku, například v důsledku mikrobiálních procesů nebo přísunu organické hmoty. Zároveň je však třeba zvážit možnost experimentální chyby či nehomogenity vzorku, které by mohly vést k této výrazné odchylce.

Mikrobiální uhlík v půdě (C_{mic}) odráží aktivitu a množství mikrobiální biomasy v půdě. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v lokalitě A, což naznačuje příznivější podmínky pro mikroorganismy, jako například vyšší obsah organické hmoty či lepší dostupnost živin. Nižší hodnoty na lokalitě B naznačují méně příznivé podmínky pro mikroorganismy. Naopak minimální hodnoty mikrobiálního uhlíku byly zjištěny na místě C, což ukazuje na nepříznivé podmínky pro mikrobiální aktivitu.

Tabulka 4: Obsah sušiny.

Vzorek	Sušina (%)
A	82,75
B	82,25
C	84,46
D	82,86
E	85,22

Na tabulce 4 můžeme vidět, že obsah sušiny se pohyboval mezi 82,25 % (B) a 85,22 % (E). Rozdíly mezi lokalitami mohou být způsobeny důsledkem odlišné půdní struktury, obsahu organické hmoty nebo mikrobiálního složení.

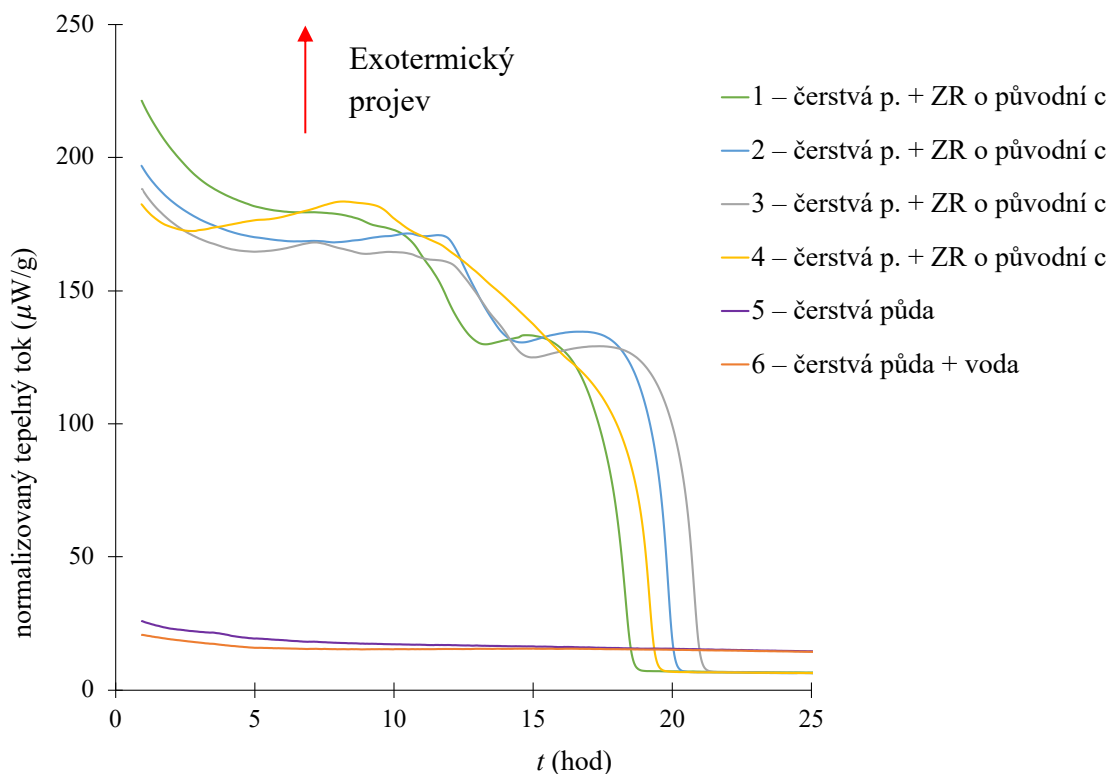
6.2 Mikrokalorimetrická měření na TAM III

Tato část navazuje na poznatky získané v mé bakalářské práci a rozšiřuje je o další experimentální přístupy a analýzy. Cílem je interpretovat získaná data v kontextu dosavadního výzkumu a zhodnotit jejich význam pro porozumění metabolických procesů v půdních vzorcích.

Získaná surová data z každého experimentu byla exportována do Excelu pro vytvoření grafu (enthalpogram), který zobrazuje závislost normalizovaného tepelného toku na čase měření. Normalizovaný tepelný tok byl vypočten z původních dat tepelného toku a vztažen na gram vzorku. Měření byla prováděna v multikalorimetru (obrázek 2) a vždy byla prováděna současně se šesti vzorkovými ampulemi. V této kapitole jsou pro přehlednost prezentována pouze vybraná data pro srovnání různých typů vzorků, přičemž zbývající naměřená data jsou uvedena v příloze.

Hlavním cílem této studie bylo měřit mikrobiální aktivitu, odrážející metabolické procesy, které se projeví změnou tepla, včetně respirace půdních mikroorganismů. Naměřené křivky představují exotermickou aktivitu mikrobů přítomných ve vzorcích půdy. Exotermický projev pozorujeme jako křivku, která se ohýbá do píku (obrázek 25).

V tomto ohledu mají křivky 1 až 4 klasický exotermický průběh a jsou významně odlišné než referenční vzorky skládající se z čisté půdy nebo půdy nasáklé pouze vodou (křivky 5 a 6). Navíc bylo pozorováno, že normalizovaná hodnota tepelného toku se časem snižuje, jak mikrobiální aktivita ustupuje.



Obrázek 25: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorky čerstvé půdy s přidávkou stejné koncentrace roztoků (ZR = zásobní roztok = roztok se živinami o původní koncentraci živin).

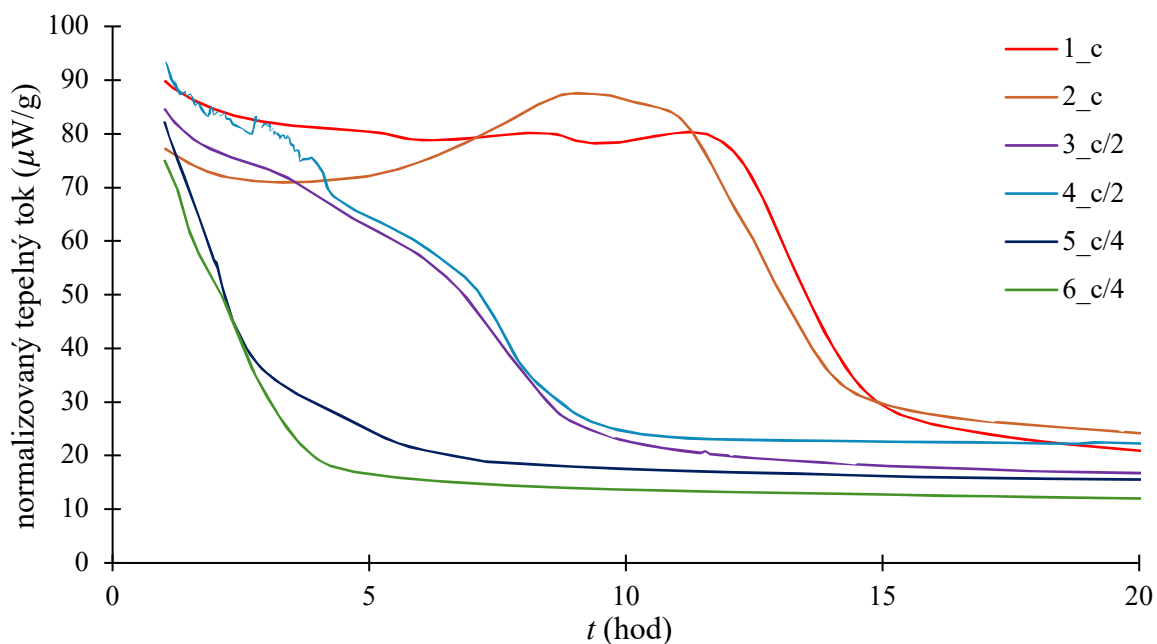
Složení půdy může být vždy mírně odlišné, ale metoda se ukázala jako vhodná pro detekci mikrobiální aktivity v půdě. Toto tvrzení je podpořeno našimi daty a srovnáními s vědeckou literaturou (např. Barros et al. [31]). I námi provedené opakované experimenty potvrdily přítomnost mikrobiální aktivity, což svědčí o spolehlivosti použité metody.

6.2.1 Vliv skladování na mikrobiální aktivitu

V literatuře se běžně setkáváme s tím, že vzorky půdy autoři uchovávali při 4 °C v lednici, a proto jsme chtěli ověřit, zda takové podmínky skutečně nemají dopad na mikrobiální aktivitu. Na tento postup skladování vzorků před měřením se odkazovali autoři jako například M. Isabel Barja a spol. [56], ale také N. Barros a S. Fejoo [57].

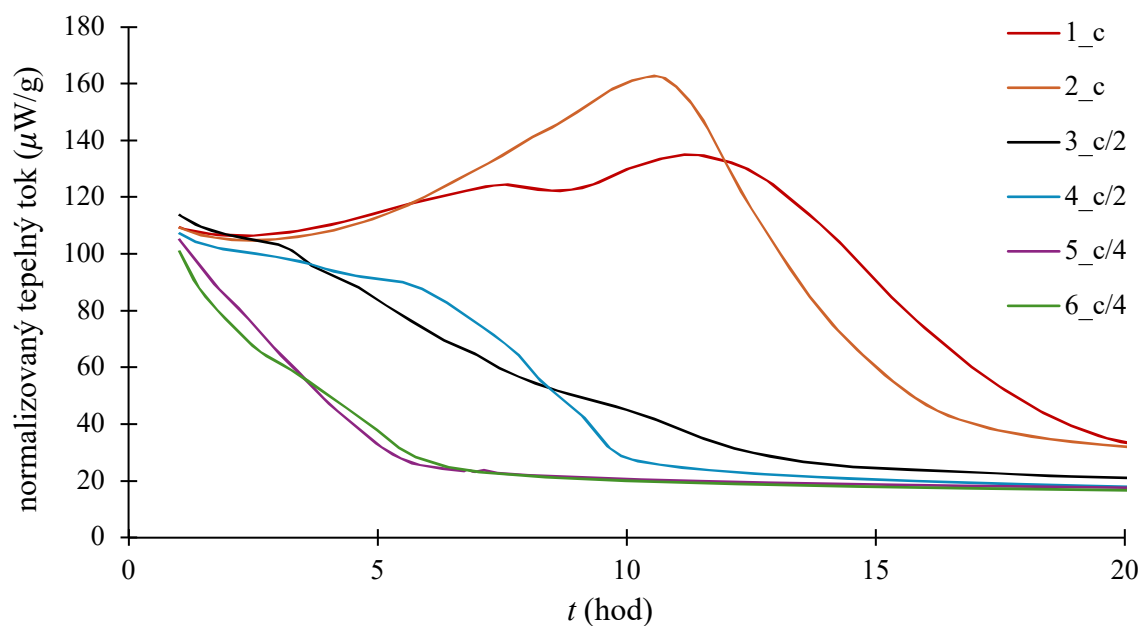
Provedly se tedy experimenty, kdy bylo naším cílem sledovat vliv doby skladování odebrané půdy na tvar naměřených křivek v enthalpogramu, jinými slovy na míru intenzity mikrobiální aktivity. První měření, které bylo provedeno s právě čerstvě odebranou půdou, můžeme vidět na obrázku 26. Byly použity tři různé koncentrace zásobního roztoku obsahujícího glukózu a síran amonný. Vyšší zastoupení živin vedlo k silnějšímu projevu, tedy vyššímu i širšímu píku v pozdější části měření, kdy sledujeme mikrobiální projev.

Naším hlavním zájmem bylo sledovat, jak se změní průběh naměřených křivek pro půdu, která byla uchována v lednici při teplotě 4 °C po dobu jednoho až tří měsíců. Měření se vzorky uchovávanými v lednici proběhlo tedy třikrát v měsíčních intervalech.

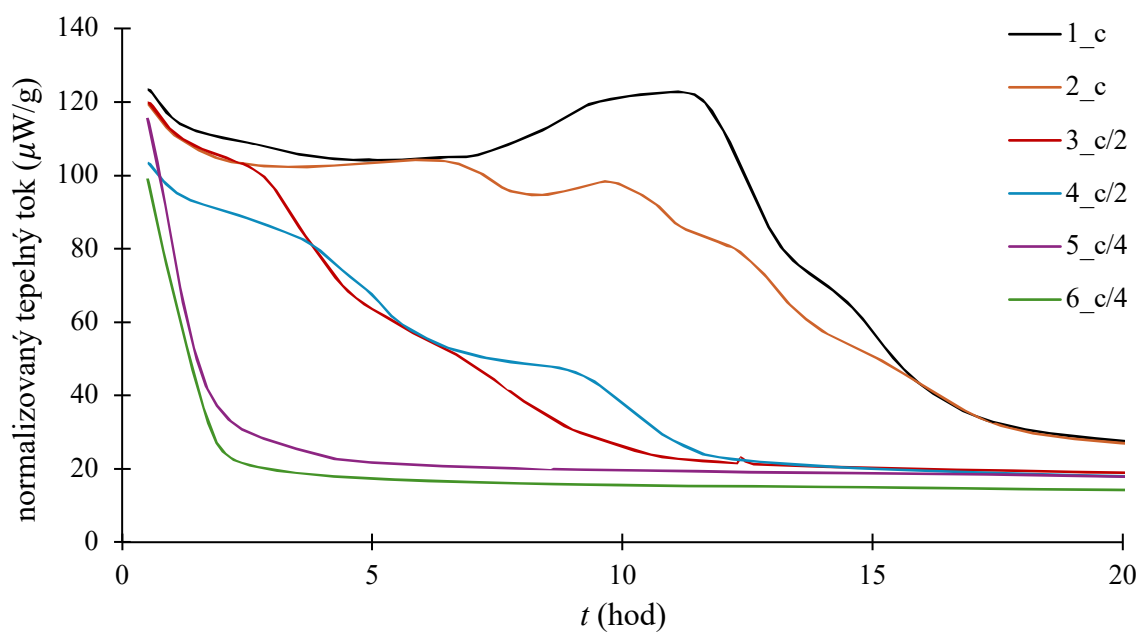


Obrázek 26: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorky čerstvé půdy s přidávkou zásobních roztoků o různých koncentracích.

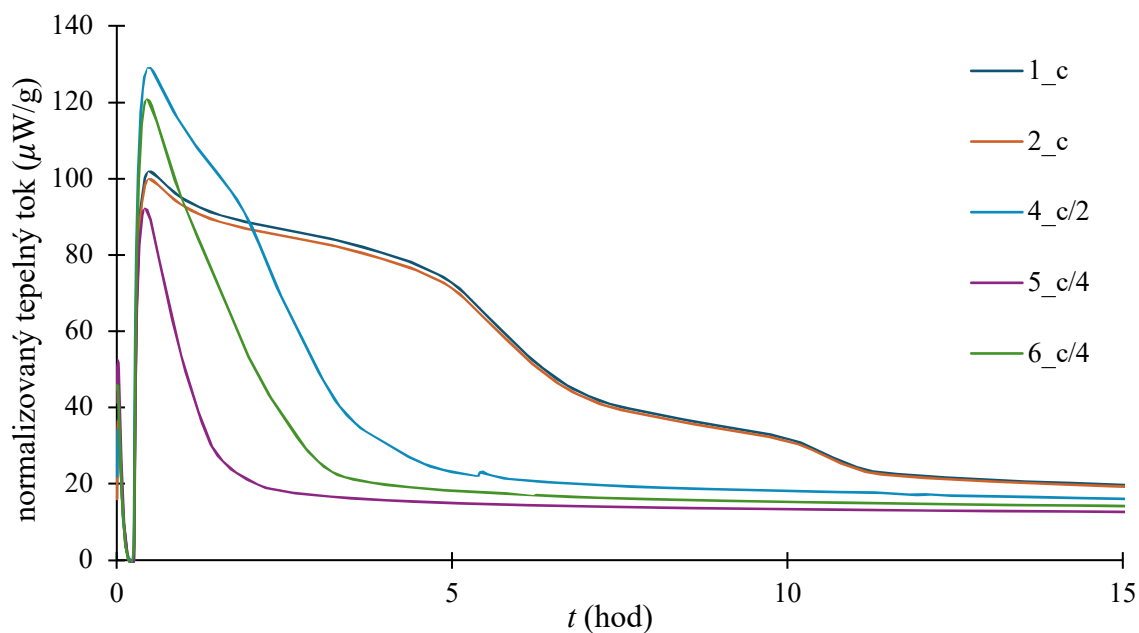
Níže uvedené grafy zobrazují data získaná v měsíčních intervalech, během nichž byla půda uchována při 4 °C v lednici. Každý měsíc bylo měření zopakováno, aby se zhodnotily případné změny v mikrobiální aktivitě vzorků půdy.



Obrázek 27: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorek půdy skladovaný při 4 °C v lednici po dobu 1 měsíce. Měřeno při 25 °C.



Obrázek 28: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorek půdy skladovaný při 4 °C v lednici po dobu 2 měsíců. Měřeno při 25 °C.



Obrázek 29: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorek půdy skladovaný při 4 °C v lednici po dobu 3 měsíců. Měřeno při 25 °C.

Ve všech třech grafech můžeme vidět, že naměřené křivky mají podobný tvar, kdy zpočátku dochází k poměrně prudkému nárůstu mikrobiální aktivity, na které navazuje postupné snižování signálu v průběhu času.

Počáteční nárůst signálu, případně jeho vyšší počáteční hodnoty, si spojujeme s projevem hydratace (začátek experimentu). Až následný průběh signálu s výskytem menšího píku odráží skutečnou mikrobiální aktivitu (cca 5. a 10. hodina).

Zaměříme-li se na rozdíly v měření, tak je vidět, že první graf, který vidíme na obrázku 27, ukazuje výraznější maxima aktivity u některých vzorků, což může znamenat, že v tomto měření byla mikrobiální aktivita vyšší. Ve druhém grafu na obrázku 28 se zdá, že aktivita některých vzorků je o něco nižší než v prvním. Na třetím grafu (obrázek 29) pozorujeme rychlejší pokles aktivity, což může naznačovat nižší metabolickou aktivitu mikroorganismů po delší době skladování vzorků. Zároveň na obrázku 29 zřetelně vidíme, že k aktivitě mikrobiální složky půdy došlo podstatně později než u předchozích měření, a tedy že naměřený signál nejprve klesl na nulu a až poté rostl (cca 1. hodina).

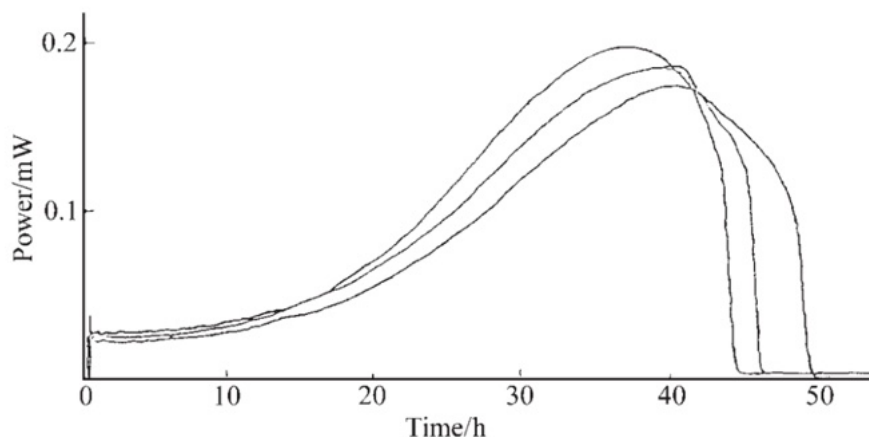
To naznačuje, že mikroorganismy byly ve fázi snížené metabolické aktivity či úplně klidovém režimu. Proto je také pochopitelné, že jejich probuzení a obnovení aktivity trvalo déle, což může být důsledkem delšího skladování vzorku. Celkově se mikrobiální aktivita v posledním měření projevila méně intenzivně, což potvrzuje trend poklesu aktivity s delší dobou skladování.

Z literatury, jak uvádějí M. Isabel Barja a spol. [56], ale také N. Barros a S. Fejoo [57], vyplývá, že skladování půdních vzorků při 4 °C je v dnešní době poměrně běžnou praxí, protože pomáhá uchovat mikrobiální společenstva poměrně stabilní. Nicméně námi naměřená data naznačují,

že aktivita mikroorganismů může s dobou skladování klesat, což znamená, že i při běžném skladování dochází ke změnám.

Pokud chceme tedy co nejpřesněji zachytit původní mikrobiální aktivitu v půdních vzorcích, je vhodné provést měření ihned po odběru vzorků půdy. Ukazuje se, že zpoždění jen několika měsíců může vést ke změně mikrobiální aktivity.

Když bychom chtěli porovnat naměřené výsledky například s autory N. Barros a spol. [57], tak jejich naměřená data po 3 měsících vypadala následovně.

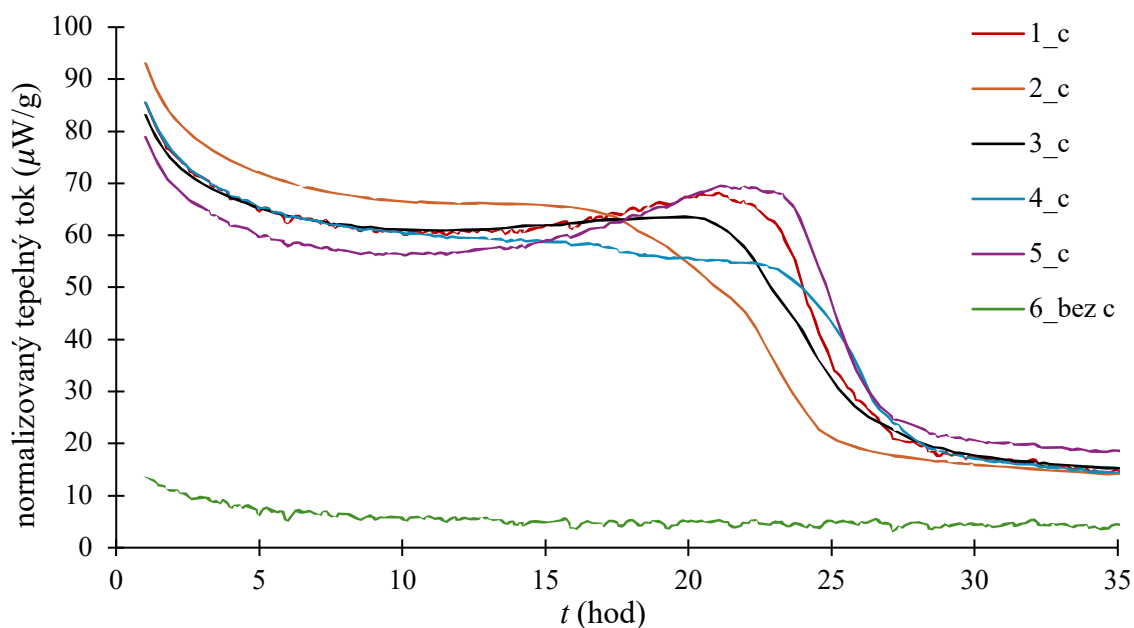


Obrázek 30: Křivky výkonu na čase zaznamenané u vzorků půdy obohacených živným roztokem obsahujícím glukózu jako zdroj uhlíku [57].

Autoři použili stejné zdroje živin v zásobním roztoku, tedy glukózu a síran amonný, avšak v mírně odlišných koncentracích. Na první pohled je patrné, že stejně jako v našem případě se i v jejich experimentu mikrobiální aktivita projevila výrazněji až později. Autoři zaznamenali nejvyšší mikrobiální aktivitu až kolem 40. hodiny, na rozdíl od nás, kdy byla zaznamenána podstatně dříve, a to cca kolem 10. hodiny.

6.2.2 Vliv teploty měření na mikrobiální aktivitu

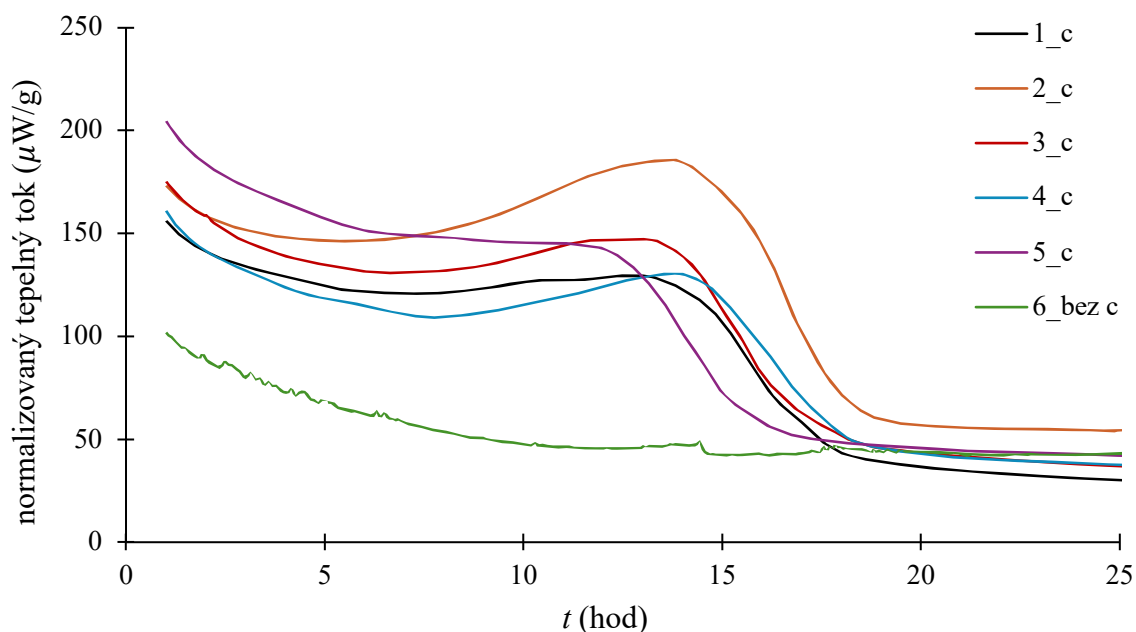
Jako další parametr, na který jsme se zaměřili, byl vliv teploty na mikrobiální aktivitu u čerstvě odebraných vzorků půdy. Před každým měřením bylo nutné vytemperovat ampule na teplotu měření. První měření bylo provedeno při 15 °C a jeho průběh byl následující:



Obrázek 31: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorek půdy měřený při 15 °C. Zásobní roztoky pro křivky 1 až 5 obsahovaly glukózu a síran amonný o $c = 0,0416 \text{ M}$. V 6. ampuli byla voda.

Nejdůležitější je poznatek, že k nejvyššímu projevu mikrobiální aktivity došlo až kolem 25. hodiny měření ve srovnání s měřením při 25 °C, které je vidět na obrázku 26. Je patrné, že se výrazně posunul projev mikrobiální aktivity.

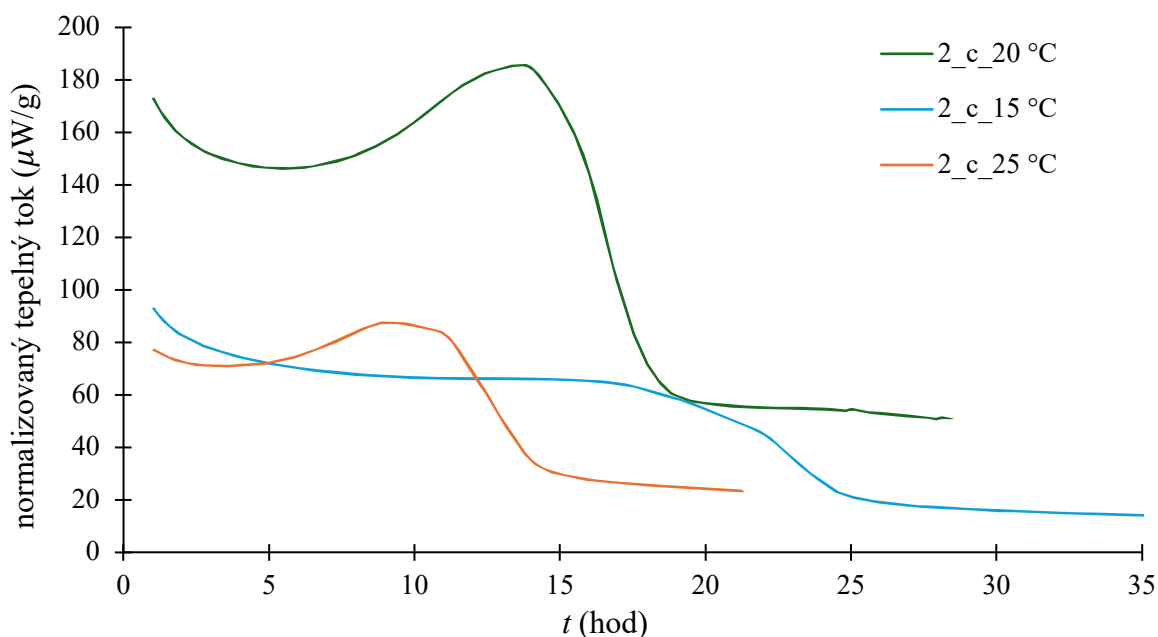
Následovalo měření při 20 °C (obrázek 32). U tohoto měření jsme pozorovali projev půdního společenství již kolem 15. hodiny, jak si můžete všimnout na grafu. Došlo tedy k výraznému časovému posunu v projevu mikrobioty v závislosti na teplotě měření.



Obrázek 32: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro vzorek půdy měřený při 20 °C.

Závislost mikrobiální aktivity na teplotě měření dává smysl, neboť víme, že vyšší teplota obecně urychluje metabolické procesy mikroorganismů.

Pro přehlednější porovnání můžeme na obrázku 33 vidět souhrnný graf, který zahrnuje křivky ampulí (konkrétně ampulí č. 2) ze všech měření, kde byl pozorován vliv teploty. Tady můžeme jasně vidět, že při 15 °C došlo k nejpomalejšímu projevu mikrobiální aktivity.

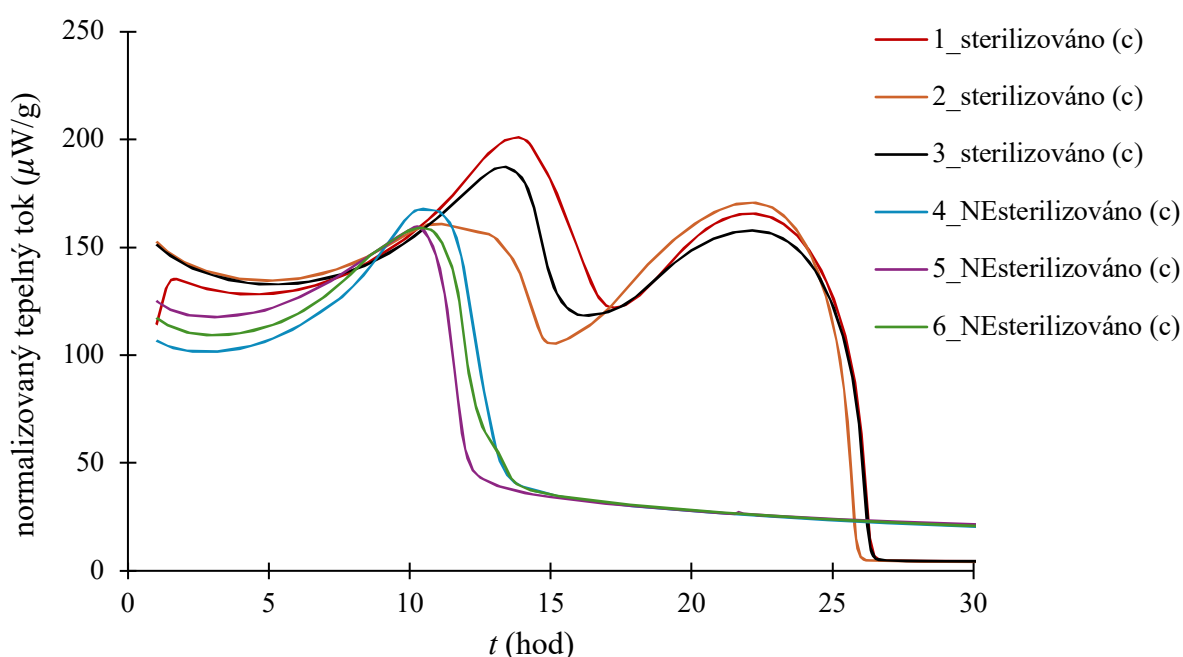


Obrázek 33: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro ampule č. 2 z měření vlivu teploty na mikrobiální aktivitu z obrázků 26 a 27.

6.2.3 Vliv sterilizace ampulí

Následujícím faktorem, který vzbudil naši zvědavost, byl vliv sterilizace ampulí na naše měření. V literatuře někdy autoři uváděli, že součástí přípravy na měření obdobné problematiky sterilizovali ampule, ovšem ne všichni. Konkrétně autoři W. Hassan a W. Chen [40] sterilizovali ampule pomocí 75% ethanolu, jenž má antimikrobiální účinky.

V prvním experimentu se nechaly ampule sterilizovat 75 % ethanolem, který se nechal po dobu jedné hodiny odpařit za laboratorních podmínek. Výsledek měření, který můžete vidět na obrázku 34, nás velmi překvapil, neboť místo toho, abychom pozorovali útlum mikrobiální aktivity, došlo k opaku. Mikrobiální aktivita se projevila výrazněji a o něco později než v experimentech, kde se ampule nesterilizovaly.



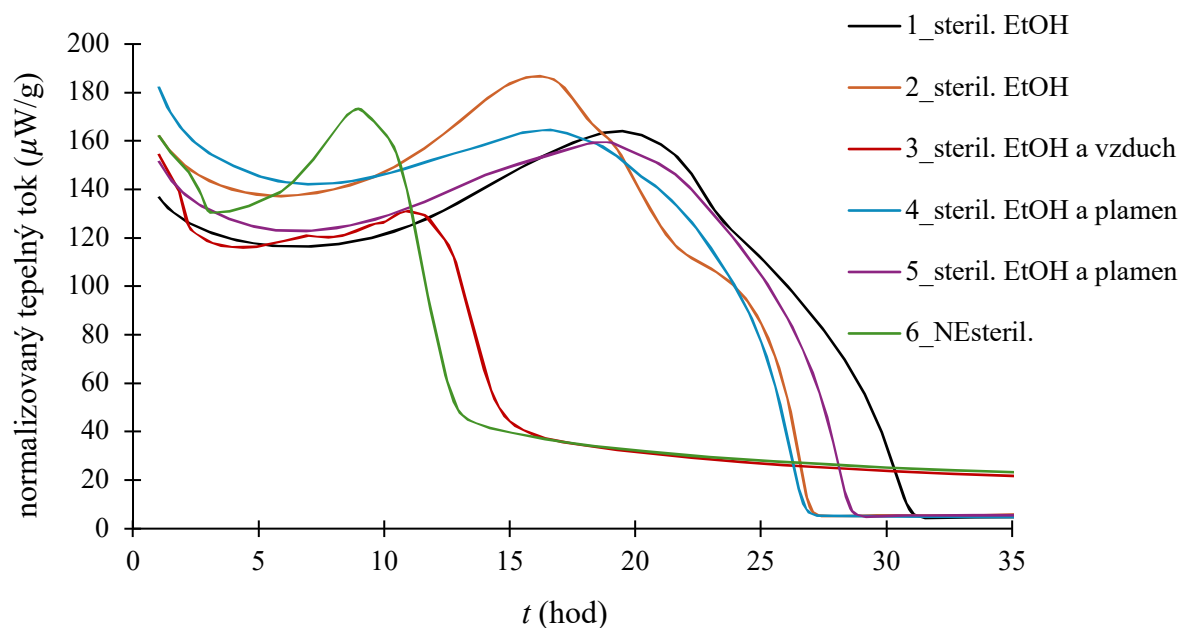
Obrázek 34: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase, sterilizace 1.

Toto měření bylo opakováno, neboť bylo třeba ověřit naměřené výsledky. U následujícího měření, které je na obrázku 35, vidíme, že došlo ke stejnému jevu jako u předchozího měření, a tedy k tomu, že došlo opět k posunutí aktivity v případech, kdy byly ampule sterilizovány.

První dvě ampule byly sterilizovány jen pomocí 75% ethanolu, kde opět pozorujeme silnější a delší projev mikrobiální aktivity ve srovnání s referencí, tedy ampulí č. 6, která nebyla sterilizována.

U třetí ampule se kromě ethanolu nechala ampule vysušit pomocí suchého vzduchu (z rozvodu v laboratoři). Tento krok zpětně hodnotíme spíše jako problematický, neboť došlo v tomto případě k silnému útlumu aktivity, což si myslíme, že bylo kontaminací ampule vzduchem. U ampulí č. 4 a 5 byla kromě sterilizace ethanolem a následného odpaření na vzduchu

provedena ještě dodatečná sterilizace nad plamenem kahanu, která ovšem měla nejspíš stejný efekt, jako sterilizace pouze pomocí ethanolu.



Obrázek 35: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase, sterilizace 2.

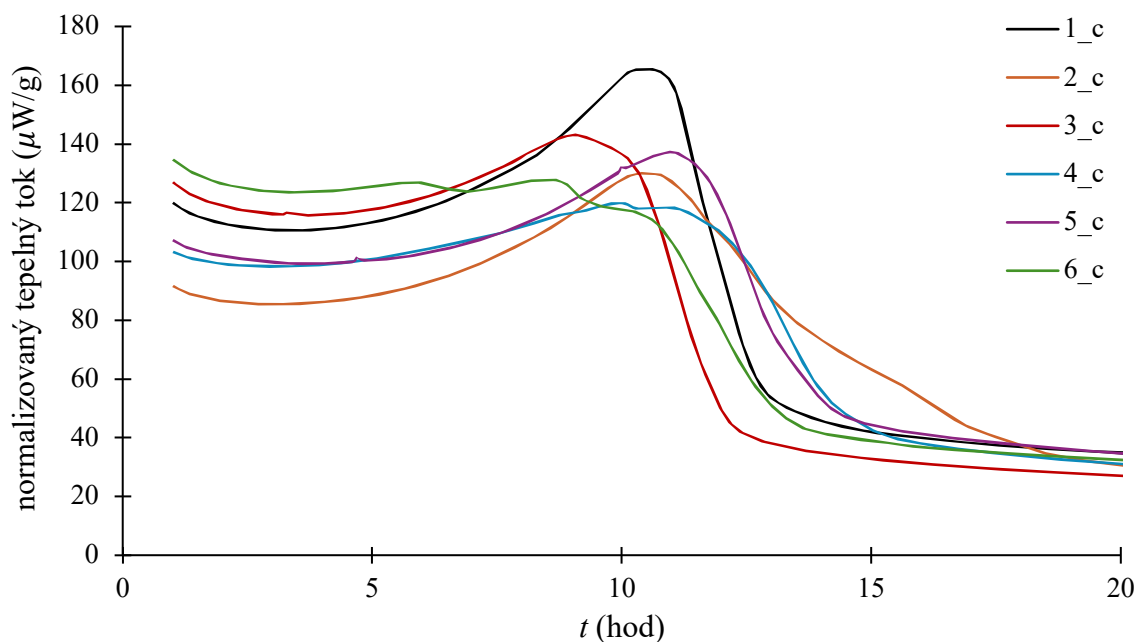
Sterilizace ampulí v případě použití 75% ethanolu nevedla ke snížení aktivity, ale naopak došlo k jejímu podpoření. Tento jev mohl být nejspíš způsoben tím, že pokud nějaký ethanol zůstal v ampuli i po odpaření, tak mohl potlačit nebo zcela eliminovat méně odolné přítomné mikrobiální druhy, čímž by vytvořil prostor pro růst těch mikroorganismů, které se s tímto stresem dokázaly lépe vypořádat. Takové mikroorganismy mohly tak mít k dispozici více živin a prostoru, což by mohlo vést k prudšímu nárůstu aktivity v pozdější fázi měření.

Jako další variantu bereme v úvahu, že by mohla být metabolická aktivita naopak podpořena stresem u některých druhů mikroorganismů. Takové mikroorganismy by tak reagovaly zvýšenou produkcí ochranných enzymů nebo jinými adaptivními mechanismy. Mohlo nejspíš také dojít k situaci, kdy by ethanol mohl ovlivnit dostupnost živin, neboť jeho přítomnost by mohla ovlivnit rozpustnost některých látek, což by vedlo například ke snadnější dostupnosti živin pro přeživší mikroorganismy.

Od sterilizace ampulí jsme ovšem nakonec úplně upustili, neboť ať už by se použila jakákoliv forma sterilizace, tak by se muselo sterilizovat i vše ostatní, kromě samotné půdy a to by bylo velmi komplikované.

6.2.4 Vliv zimního ročního období na mikrobiální aktivitu

Další měření bylo provedeno v zimním období, konkrétně 4. 2. 2025, kdy se venkovní teploty pohybovaly kolem $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cílem bylo zjistit, zda se projeví nějaké rozdíly při pozorování mikrobiální aktivity ve vzorcích půdy odebraných při takto nízké teplotě.



Obrázek 36: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase; odběr vzorku při venkovní teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Měřeno při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

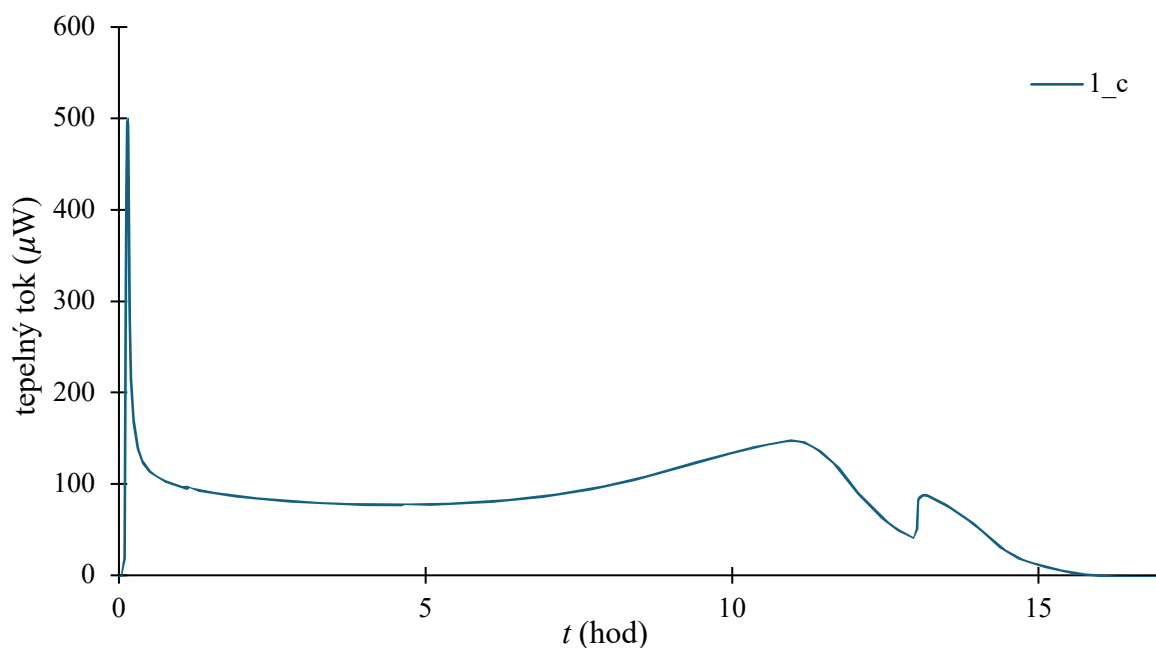
U tohoto měření pozorujeme, že všechny křivky vykazují obdobný průběh s dosažením exotermického píku kolem 10. hodiny. Očekávaný výsledek by byl spíše opožděný projev, neboť půda byla odebírána při nižších teplotách, kdy jsme si již u předchozích experimentech jasně potvrdili, že se snižující teplotou se posouvá pík projevu mikrobiální aktivity do pozdějších doby. Ovšem měření probíhalo při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a než samotné měření začalo, tak se půda už postupně zahřívala a mikrobiální společenství se adaptovala na vstřícnější podmínky, neboť při vyšších teplotách je jejich metabolismus rychlejší. Námi naměřené výsledky se nejspíš proto neliší od měření při vyšších venkovních teplotách.

6.2.5 Izotermická titrační mikrokolorimetrie (ITC)

Při experimentech v uzavřených ampulích nelze z principu experimentu zaznamenat signál hned od okamžiku, kdy je do ampule ke vzorku půdy přidán roztok se živinami. Ampule se musí po přidávku roztoku k půdě nejprve uzavřít a pak následuje poměrně dlouhá doba, kdy se postupně zasouvají do mikrokolorimetru až do finální měřicí polohy. Signál mikrokolorimetru je během této doby nestabilní díky mechanickému zasouvání ampulí, proto tento průběh není relevantní pro popis chování vzorku v ampuli.

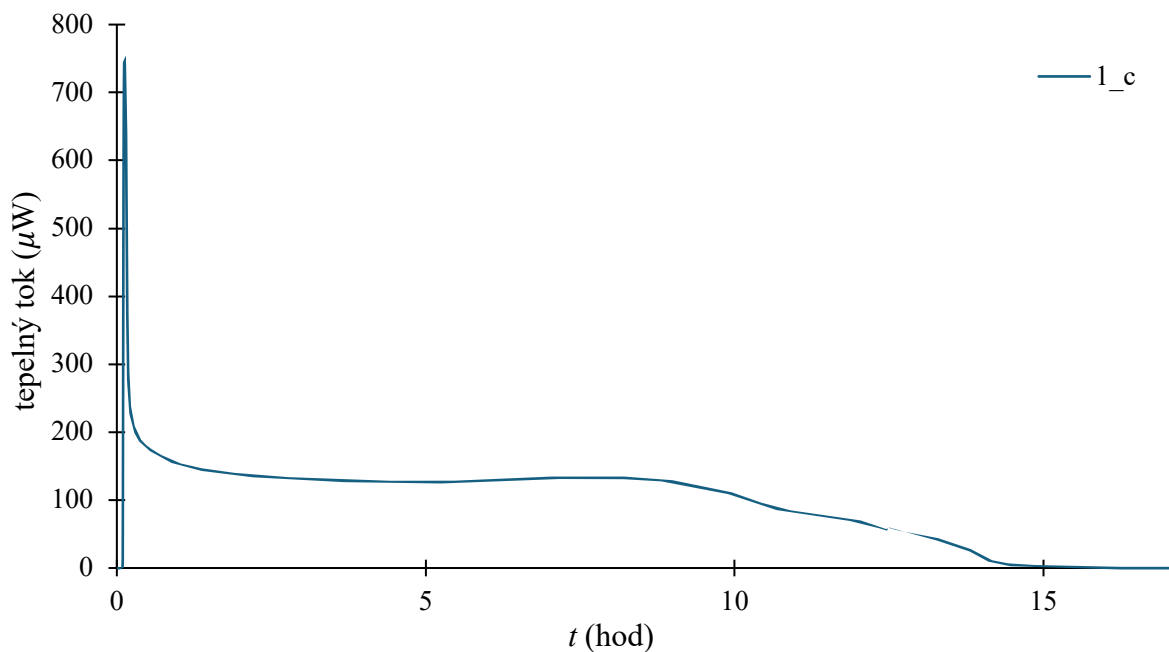
Počátek interakce vzorku půdy s živinami lze zaznamenat s využitím titrace. Během titračního experimentu je totiž roztok živin do měřicí ampule k půdě dávkován až v okamžiku ustáleného signálu, což umožňuje zaznamenat počátek experimentu, který je klíčový pro účely této práce.

Zásobní roztok byl použit o původní koncentraci (glukóza a síran amonný), abychom mohli dobře srovnávat získaná data s předešlými experimenty. Výstup z prvního experimentu, který trval 15 hodin, je znázorněn na obrázku 37.



Obrázek 37: Závislost tepelného toku na čase pro první ITC experiment. Měřeno při 25 °C.

Zásobní roztok o objemu 200 μl byl injektován hned po startu experimentu a tak můžeme krásně vidět, že ze začátku došlo k hodně výraznému nárůstu tepelného toku, který následně velmi prudce klesá. Usuzujeme, že tento prvotní pík bude projevem hydratace (kdy půda interaguje s vodou a dochází k exotermické reakci), neboť jeho prudký pokles nejde srovnávat s projevem mikrobiální aktivity, který jak vidíme u experimentů v uzavřených ampulích, se projevuje v určitém čase a v konkrétním tvaru píku. Třetí pík, který je patrný ve druhé polovině experimentu, není jednoznačně vysvětlen, a proto byl experiment zopakován pro potvrzení výsledků.

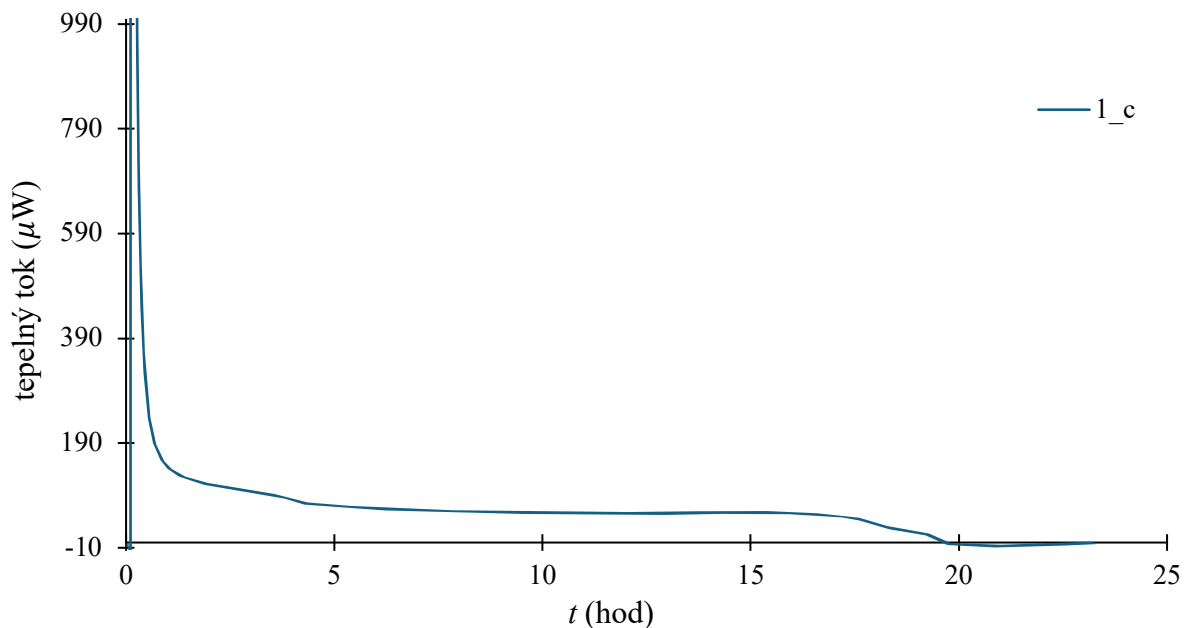


Obrázek 38: Závislost tepelného toku na čase pro druhý ITC experiment.

Na měření, které je vidět na obrázku 38, vidíme, že průběh experimentu je trendově shodný s předchozím měřením, i když pík mikrobiální aktivity je vidět o pár hodin dříve. Hlavní je, že zmizel třetí pík v čase zhruba 13 hodin, dá se tedy konstatovat, že se jednalo o chybu měření. Nejspíš v předchozím případě došlo k nerovnoměrnému protékání přidaného roztoku do půdy.

Když porovnáme měření ITC s měřeními předešlými (obrázek 36), tak je patrné, že k nejvyšší mikrobiální aktivitě došlo opět kolem 10. hodiny měření, přičemž počáteční projev hydratace nebyl v případě izotermické mikrokalorimetrie v uzavřených ampulích zaznamenán celý, a samotné měření začíná tím, že dochází ke klesání tepelného toku hned ze začátku měření, což jsme si potvrdili na základě experimentů na ITC. Skutečný mikrobiální projev tedy pozorujeme až v další části měření, kdy se zřetelně projeví mikrobiální metabolismus, který pochopitelně potřebuje více času, aby naběhl.

Pro potvrzení trendu byl proveden ITC experiment za nižší teploty, tedy 20 °C, který je vidět na obrázku 39.



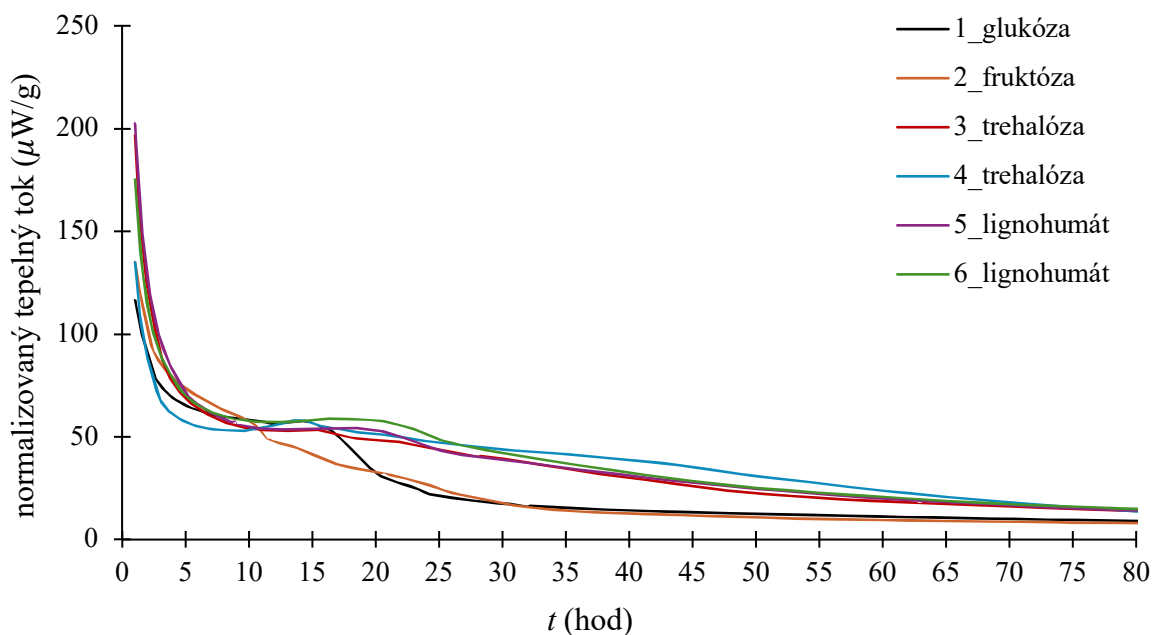
Obrázek 39: Závislost tepelného toku na čase pro další ITC experiment při 20 °C.

Na tomto měření vidíme, že snížením teploty došlo k výraznému posunutí mikrobiální odezvy, jak to již bylo pozorované na předešlých experimentech (obrázek 32). Mikrobiální projev se v tomto případě posunul až na cca 15. hodinu měření, což vidíme i na výsledcích předešlého experimentu, pravděpodobně se tak stalo v důsledku pomalejšího metabolismu při nižší teplotě.

6.2.6 Studium mikrobiální aktivity při využití různých zdrojů živin

Dále nás zajímalo, jaký bude mít vliv využití různých zdrojů živin pro podporu mikrobiálního metabolismu. Alternativní zásobní roztoky obsahovaly fruktózu, trehalózu a lignohumát. Zajímalo nás, jak se budou naměřená data lišit ve srovnání s původně použitou glukózou při zachování její koncentrace. Chtěli jsme zaznamenat, zda složitost struktury živin bude hrát roli při projevu mikrobiálního metabolismu. Fruktóza je monosacharid, tedy stejně jednoduchá struktura jako glukóza, naopak trehalóza je již disacharid a lignohumát je složitá komplexní organická látka.

Jak si můžeme všimnout, tak na obrázku 40 vidíme naměřené výsledky normalizovaného tepelného toku pro vybrané substráty.



Obrázek 40: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase pro alternativní zdroje živin (fruktóza, trehalóza, lignohumát). Měřeno při 20 °C.

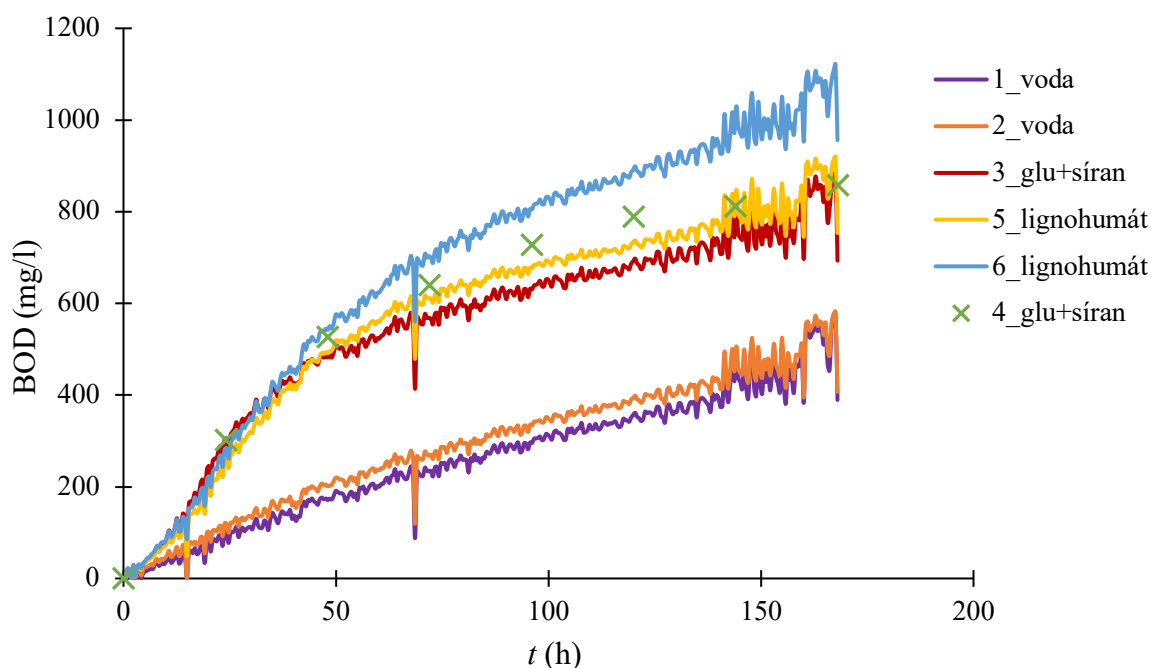
Z výsledků je patrné, že vybrané monosacharidy (glukóza, fruktóza) byly využity mikrobiálním společenstvem jako první, a to už přibližně kolem 14. hodiny, kdy docházelo k nejvyššímu využití substrátů, poté docházelo k pomalému klesání signálu. Tento průběh naznačuje, že jednoduché cukry byly velmi dobře dostupné a mikroby je mohly rychle spotřebovat jako primární zdroje energie.

Naopak u trehalózy, což je složitější cukr, pozorujeme mírné zpoždění nejvyššího projevu na rozdíl od předešlých monosacharidů. U křivky pro půdu s přidavkem trehalózy se dá říct, že i její průběh byl podstatně delší, neboť signál následně klesal velmi pozvolna. Z toho měření tedy vyvozujeme, že složitější disacharid bylo pro mikrobiální společenství větší problém zpracovat, neboť jej nespíš mikroby musely štěpit, aby se dostaly k lépe zpracovatelnému substrátu.

Nejpatrnější rozdíl v průběhu byl pozorován u vzorku lignohumátu, který je komplexní a obtížně rozložitelnou látkou. Po přidání lignohumátu vykazovala mikrobiální složka půdy nejvyšší aktivitu podstatně později, cca kolem 20. hodiny, ovšem co je asi i zajímavější, její aktivita trvala nejdéle, neboť následný signál klesal velmi pomalu. Vidíme, že tedy mikroby opět potřebovaly delší adaptační fázi, aby byly schopné přeměnit lignohumát na látku využitelnou pro svůj energetický metabolismus, zároveň je patrné, že lignohumát by mohl být vhodný jako dlouhodobý a stabilní zdroj organického uhlíku, který mikroorganismy postupně rozkládají a využívají po delší časové období.

6.4 Respirometrie

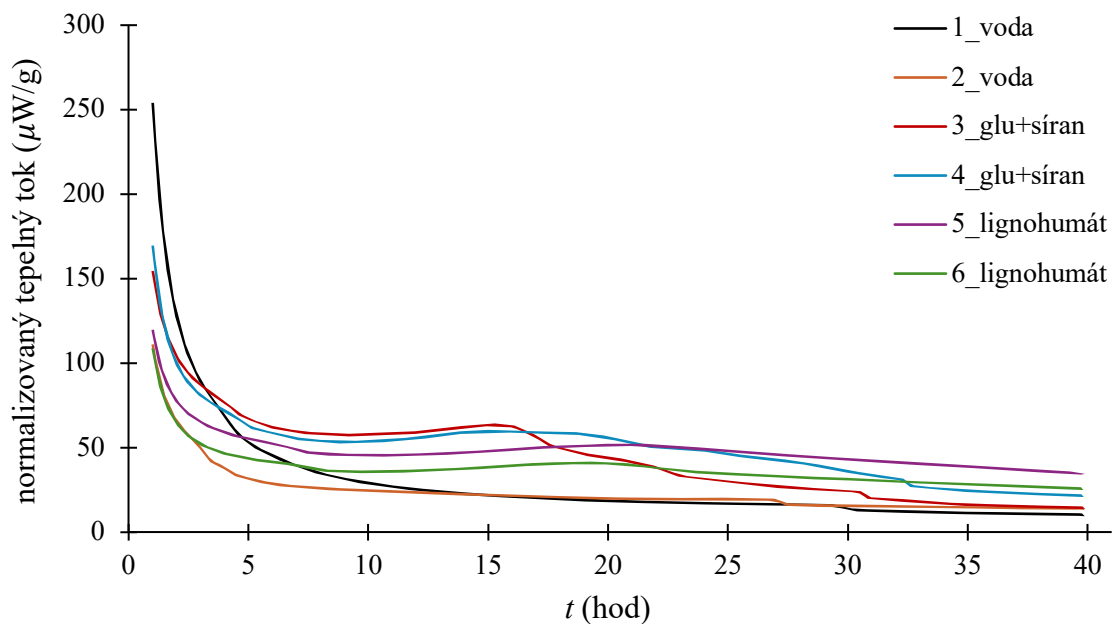
Jako další jsme provedli respirometrické měření, kdy jsme chtěli výsledek měření, který odráží přímý metabolismus mikroorganismů ve vzorku, neboť díky respirometrii měříme vývoj CO_2 , který můžeme porovnat s výstupem z izotermické mikrokalorimetrie v uzavřených ampulích na TAM III, kdy se měří obecně vývoj tepla. Přesněji řečeno jsme schopni pomocí respirometrie kvantifikovat biochemickou spotřebu kyslíku (BOD) v čase, která přímo odráží dýchání mikrobů ve vzorcích půdy. Výsledek měření vidíme na následujícím grafu.



Obrázek 41: Závislost BOD na čase pro respirometrické měření. Měřeno při 20 °C.

V případě měření č. 4 došlo k technickým problémům a nebyla stažena data z hlavy respirometru (kompletní časová závislost jako u ostatních vzorků). Výsledky pro hlavu č. 4 jsou zobrazeny jako 5 konkrétních hodnot uvedených v surovém záznamu na měřicím přístroji.

Z měření vyplývá, že ve vzorcích, do kterých byla přidána pouze voda, tedy křivky 1 a 2, došlo k minimálnímu projevu mikrobiální aktivity. Ve srovnání s měřením na TAM III, které je vidět na obrázku 42, které probíhalo současně s respirometrickým experimentem, vidíme, že ampule pouze s vodou také vykazovaly minimální aktivitu.



Obrázek 42: Závislost normalizovaného tepelného toku na čase. Srovnávací měření pro respirometrický experiment. Měřeno při 20 °C.

Dále si můžeme všimnout, že vzorky, které obsahovaly zásobní roztok s glukózou a síranem amonným, vykazovaly výrazně vyšší aktivitu než vzorky s vodou, avšak mírně nižší než vzorky s lignohumátem, u něž aktivita přetrvávala nejdéle a měla o něco pomalejší náběh než v případě glukózy a síranu amonného, který měl přesně opačný průběh, neboť nástup aktivity byl dřívější, ale také dříve ustupoval.

7 ZÁVĚR

7.1 Charakterizace půdy

Charakterizace půdních vzorků nám dala přehled o vlastnostech měřených vzorků půdy, které mají přímý vliv na mikrobiální aktivitu. Na základě termogravimetrické analýzy byla určena vlhkost půdních vzorků na 27 %, přičemž obsah organických látek činil 7,6 % a podíl anorganické složky byl 69,37 %. Dalším parametrem, který nás zajímal byla vodní zádržná kapacita, která byla stanovena pomocí laboratorního postupu, a její hodnota vyšla na 84,7 %. Vysoký podíl vody v půdních vzorcích je velmi příznivý pro mikrobiální aktivitu.

Následujícím hodnoceným parametrem byl obsah dusíku a mikrobiálního uhlíku, který se mezi jednotlivými místy odběru trochu lišil. Nicméně hodnota amoniakálního dusíku se pohybovala okolo 1,9 $\mu\text{g/g}$ a hodnota dusičnanového dusíku kolem hodnoty 0,6 $\mu\text{g/g}$. Za to hodnota mikrobiálního uhlíku byla kolem hodnot 510 $\mu\text{g/g}$. Nižší hodnoty obsahu dusíku v půdě naznačují omezenou mineralizaci půdních vzorků. Využití dusíku je v těchto vzorcích nižší, na rozdíl od vysokých hodnot mikrobiálního uhlíku, z nichž lze vyvodit přítomnost aktivní mikrobiální složky v odebraných vzorcích.

7.2 Mikrokolorimetrická měření na TAM III

Provedené experimenty měření vzorků půdy na mikrokolorimetru TAM III se ukázaly jako vhodná metoda pro detekci mikrobiální aktivity. Naměřené enthalpogramy jasně ukazovaly mikrobiální aktivitu, která se mírně lišila na základě sledovaných podmínek. Typický průběh mikrobiální aktivity nastal v pozdější fázi měření, kdy se projevila mírným nárůstem tepla a jeho následným pomalým klesáním.

7.2.1 Vliv skladování na mikrobiální aktivitu

Vzorek půdy byl skladován po dobu 3 měsíců v lednici při teplotě 4 °C. Každý měsíc bylo provedeno kontrolní měření, kdy se sledovaly případné změny v mikrobiální aktivitě. Ukázalo se, že po skladování půdního vzorku po dobu 3 měsíců došlo k oslabení projevu mikrobiálního společenství v půdě, ale také k jejímu pozdějšímu projevu.

7.2.2 Vliv teploty na mikrobiální aktivitu

Sledování vlivu teploty na mikrobiální aktivitu mělo velmi očekávaný výsledek, protože se ukázalo, že při vyšších teplotách došlo k výrazně rychlejšímu projevu mikrobiální aktivity, než jak tomu bylo v případě nižších teplot. Časové rozdíly v maximální hodnotě projevu byly i 10 hodin.

7.2.3 Vliv sterilizace ampulí

Dalším sledovaným parametrem bylo, jaký bude mít sterilizace ampulí vliv na měření mikrobiální aktivity na TAM III. Výsledky ovšem v tomto případě byly poměrně šokující, neboť když se ampule nechaly sterilizovat 75% ethanolem, tak místo toho aby došlo spíš

k útlumu projevu, tak naopak došlo k jeho zesílení a delšímu trvání. Mohlo nastat hned několik situací. Nejspíš pokud zůstalo nějaké stopové množství ethanolu v ampulích, tak to mohlo způsobit, že přeživší mikroorganismy byly vystaveny vyššímu stresu a došlo tak k podpoře metabolismu. Další diskutovanou variantou je, že došlo k eliminaci některých druhů a pro ty zbylé, tak zůstalo více živin, což taktéž mohlo umocnit jejich metabolismus.

Na základě výsledků jsme se rozhodli, že ampule sterilizovat nebudeme. Dalším problémem je i fakt, že sterilizovat by se musely všechny použité pomůcky i roztoky. Izotermická titrační mikrokolorimetrie (ITC)

7.2.4 Izotermická titrační mikrokolorimetrie (ITC)

Pomocí izotermické mikrokolorimetrie v uzavřených ampulích jsme nebyli schopni zachytit ihned začátek experimentu, a proto byla experimentální část obohacena o data získaná metodou ITC, kdy jsme byli schopni naměřit vývoj tepla ihned po přidání zásobního roztoku ke vzorku půdy.

Ukázalo se, že ve chvíli, kdy se přidal zásobní roztok do ampule se vzorkem půdy, tak došlo k velkému nárůstu tepla, tento jev si vysvětlujeme jako projev hydratace, kdy dojde k reakci mezi substrátem a vodou. Mikrobiální metabolismus se projeví až výrazně později, protože mikroby potřebují čas na zpracování. Následný projev, který se při 25 °C projevil nejčastěji kolem 10. hodiny, byl pozvolný a typický pro všechna měření. Zjistilo se tedy, že při experimentech pomocí izotermické mikrokolorimetrie v uzavřených ampulích pozorované píky odpovídají opravdu projevu mikroorganismů, kdy naměřený signál začíná při vysokých hodnotách a následně klesá. Před touto fází experimentu jsme při ITC pozorovali pík odpovídající hydrataci vzorku při prvním kontaktu po přidavku roztoku do ampule. Měření pomocí ITC nám tedy poskytlo důležitý pohled na sledovanou situaci.

7.2.5 Studium mikrobiální aktivity při využití různých zdrojů živin

Různé zdroje živin (glukóza, fruktóza, trehalóza a lignohumát) měly významný vliv na mikrobiální aktivitu, která svým způsobem odrážela složitost použitého substrátu, který byl použit pro podporu mikrobiální aktivity. U jednoduchých cukrů, jako byla glukóza a fruktóza, došlo k nárůstu tepla velmi brzo a průběh byl velmi krátký při srovnání s ostatními živinami. Tyto jednoduché cukry jsou pro mikroby dobře zpracovatelné, mohou být tedy rychlým zdrojem energie, naopak trehalóza, což je disacharid, vykazovala pozdější nárůst maximálního projevu, ale také pozvolnější útlum. Jedná se v tomto případě přece jen o složitější strukturu než v předchozím případě, mikroorganismy musí trehalózu nejprve zpracovat, aby ji mohly efektivně využít. Nejdelší, ale zároveň nejpomalejší byl projev u lignohumátu, což byla také nejsložitější látka, kterou jsme použili. Lignohumát byl zjevně nejvíce problematický na zpracování a následné využití, ovšem z dlouhodobého hlediska to byl dobrý zdroj pro podporu mikrobiálního společenstva.

7.4 Respirometrie

Zajímalo nás, jak přesně měření pomocí mikrokolorimetrie odráží mikrobiální metabolismus, proto jsme provedli respirometrické měření mikrobiální aktivity, které měří vývin CO₂, což přesně odráží projev metabolismu ve vzorcích půdy. V našem případě jsme tento experiment obohatili o různé zdroje živin, které byly přidány ke vzorkům půdy. Během následného srovnání s mikrokolorimetrickými výstupy se ukázalo, že získaná data spolu dobře korelují. Při přidavku lignohumátu mikrobiální společenství jak u respirometrie, tak v případě mikrokolorimetrie, vykazovalo nejvyšší i nejdelší aktivitu, naopak vzorky s vodou projevíly pouze minimální práci metabolismu.

7.5 Hodnocení metod studia mikrobiální aktivity

Ukázalo se, že izotermická mikrokolorimetrie je velmi citlivou metodou, která je vhodná pro měření mikrobiální aktivity ve vzorcích půdy. Měření pomocí izotermické mikrokolorimetrie v uzavřených ampulích ukázalo, jak vypadá typický projev mikrobiální aktivity, jak v našich měřeních, tak v literatuře. Pomocí ITC jsme se více zaměřili na to, co přesně pozorujeme na začátku našich experimentů. Mezi mikrokolorimetrickými a respirometrickými daty byl pozorován výrazný soulad, což nám umožnilo nahlížet na problematiku komplexněji.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Biogeochemické cykly*. Online. Biopedia. 2023. Dostupné z: <https://biopedia.sk/ekologia/biogeochemicke-cykly>. [cit. 2023-09-27].
- [2] HOUGHTON. Balancing the Global Carbon Budget. Online. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 2007, roč. 2007, č. 35, s. 313-347. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.earth.35.031306.140057>. [cit. 2023-09-27].
- [3] *Heterotrofní organismy*. Online. Envi Web. 2023. Dostupné z: <https://www.enviweb.cz/eslovník/643>. [cit. 2023-09-27].
- [4] *Autotrofní organismy*. Online. Radílek. 2023. Dostupné z: <https://www.radilek.cz/slovník-pojmu/autotrofni-organismy/>. [cit. 2023-09-27].
- [5] ADDISCOTT, T.M. Entropy, non-linearity and hierarchy in ecosystems. Online. 2010, roč. 1, č. 160, s. 57-63. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706109003802>. [cit. 2023-09-27].
- [6] FINZI, Adrien C. a SINSABAUGH, Robert L. Microbial Community Responses to Atmospheric Carbon Dioxide Enrichment in a Warm-Temperate Forest. Online. 2006, roč. 9, č. 1, s. 215-226. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10021-005-0078-6>. [cit. 2024-02-24].
- [7] SINSABAUGH, Robert L.; LAUBER, Christian L. a WEINTRAUB, Michael N. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. Online. *Ecology letters*. 2008, roč. 11, č. 11, s. 1252-1264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>. [cit. 2024-02-24].
- [8] TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; SEOANE, S. a GIL-SOTRES, F. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 2000, roč. 32, č. 13, s. 1867-1875. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00160-7). [cit. 2022-04-07].
- [9] BÜNEMANN, E. K. a SCHWENKE, G. D. Impact of agricultural inputs on soil organisms. Online. *Soil research*. 2006, roč. 44, č. 4, s. 379-406. Dostupné z: <https://doi.org/10.1071/SR05125>. [cit. 2024-02-24].
- [10] JUAN, LI a BING-QIANG, Thao. Effects of Long-Term Combined Application of Organic and Mineral Fertilizers on Microbial Biomass, Soil Enzyme Activities and Soil Fertility. Online. *Agricultural Sciences in China*. 2008, roč. 7, č. 3, s. 336-343. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60074-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60074-7). [cit. 2024-02-24].
- [11] SCHIMEL, Joshua; BALSER, Teri C. a WALLESTEIN, Matthew. MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR

- ECOSYSTEM FUNCTION. Online. *Ecology*. 2007, roč. 88, č. 6, s. 1386-1394. Dostupné z: <https://doi.org/10.1890/06-0219>. [cit. 2024-02-24].
- [12] BRAISSANT, Olivier; WIRZ, Dieter; GÖPFERT, Beat a DANIELS, Alma U. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. Online. 2010, roč. 303, č. 1, s. 1-8. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/303/1/1/559121>. [cit. 2023-09-27].
- [13] HARRIS, Jim A.; RITZ, Karl; COUCHENEY, Elsa; GRICE, Samuel M.; LERCH, Thomas Z. et al. The thermodynamic efficiency of soil microbial communities subject to long-term stress is lower than those under conventional input regimes. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 2012, roč. 47, č. 1, s. 149-157. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003807171100441X>. [cit. 2023-09-27].
- [14] DIJKSTRA, Paul; THOMAS, Scott C.; HEINRICH, Paul L.; KOCH, George W.; SCHWARTZS, Egbert et al. Effect of temperature on metabolic activity of intact microbial communities: Evidence for altered metabolic pathway activity but not for increased maintenance respiration and reduced carbon use efficiency. Online. 2011, roč. 43, č. 10, s. 2023-2031. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071711002112>. [cit. 2023-09-27].
- [15] REZNICK, David; BRYANT, Michael J. a BASHEY, Farrah. R- AND K- SELECTION REVISITED: THE ROLE OF POPULATION REGULATION IN LIFE-HISTORY EVOLUTION. Online. *Ecology*. 2002, roč. 83, č. 6, s. 1509-1520. Dostupné z: [https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[1509:RAKSRT\]2.0.CO;2](https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658(2002)083[1509:RAKSRT]2.0.CO;2). [cit. 2023-09-27].
- [16] BURNS, Richard G.; DEFOREST, Jared L.; MARXSEN, Jürgen; SINSABAUGH, Robert L. a STROMBERGER, Mary E. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. Online. S. 216-234. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071712004476>. [cit. 2023-09-27].
- [17] JASTROW, Julie; AMONETTE, James E. a BAILEY, Vanessa L. Mechanisms controlling soil carbon turnover and their potential application for enhancing carbon sequestration. Online. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10584-006-9178-3>. [cit. 2023-09-27].
- [18] PEKAŘ, Miloslav. *Přednášky z termodynamiky a elektrochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2014. ISBN 978-80-214-5079-0.
- [19] THENG, Shixue a HU, Junli. Soil microbial activity measured by microcalorimetry in response to long-term fertilization regimes and available phosphorous on heat

- evolution. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, roč. 41, č. 10, s. 2094-2099. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071709002636>. [cit. 2025-02-11].
- [20] *TA Instruments TAM III Isothermal Calorimeter*. Online. TA Instruments. 2016. Dostupné z: <https://researchpark.spbu.ru/en/equipment-thermo-eng/900-cattainstrumentstamiii-eng>. [cit. 2023-10-02].
- [21] *Izotermální titrační kalorimetrie: VP-ITC*. Online. CEITECH. Brno: CEITECH BIC, 2002. Dostupné z: <https://bic.ceitec.cz/cs/izotermalni-titracni-kalorimetrie-vp-itc/>. [cit. 2022-03-26].
- [22] ANTONIO, M. a CRISTINA, M. An insight into soil bioremediation through respirometry. Online. *Environment International*. 2005, roč. 31, č. 2, s. 179-183. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412004001631>. [cit. 2025-02-11].
- [23] *OxiTop®-IDS B 6 Measurement System for Soil Respiration - WTW*. Online. Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG. 2019. Dostupné z: <https://www.xylemanalytics.com/en/general-product/id-1577/oxitop®-ids-b-6-measurement-system-for-soil-respiration---wtw>. [cit. 2025-03-12].
- [24] *TA INSTRUMENTS*. Online. Thermogravimetric Analysis (TGA). Dostupné z: https://www.tainstruments.com/products/thermal-analysis/thermogravimetric-analysis/?gad_source=1&gbraid=0AAAAAD2DYz3IXv0t8wdn47IvNsXjthTem&gclid=Cj0KCCQjw4cS-BhDGARIsABg4_J1_shQ4j4d0MyIwKQIEdXDBtjGdZjn0hdkMEB_qbF5PZK5v_9LTFPQaAvM5EALw_wcB. [cit. 2025-03-12].
- [25] HERRMANNOVÁ, Anke M.; COUCHENEYOVÁ, Elsa a NUNAN, Naoise. Isothermal Microcalorimetry Provides New Insight into Terrestrial Carbon Cycling. Online. *Environmental Science And Technology*. 2014, roč. 48, č. 8, s. 4344-4352. Dostupné z: <https://pubs-acsc-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/es403941h#>. [cit. 2023-09-27].
- [26] WADSO, Lars a HANSEN, Lee D. Calorespirometry of terrestrial organisms and ecosystems. Online. *Methods*. 2015, roč. 76, č. 1, s. 11-19. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202314003508>. [cit. 2023-09-27].
- [27] YAO, Jun; XU, Chaoqian; WANG, Fei; TIAN, Lin a WANG, Yanxin. An in vitro microcalorimetric method for studying the toxic effect of cadmium on microbial activity of an agricultural soil. Online. 2007, roč. 16, č. 1, s. 503-509. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-007-0157-x>. [cit. 2023-10-01].
- [28] CRITTER, Silvana A. M.; FREITAS, Sueli S. a AIROLDI, Vlado. Microcalorimetric measurements of the metabolic activity by bacteria and fungi in

- some Brazilian soils amended with different organic matter. Online. *Thermochimica Acta*. 2004, roč. 417, č. 2, s. 275-281. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603103007287>. [cit. 2023-10-01].
- [29] RAUBUCH, M. a BEESE, F. Comparison of microbial properties measured by O₂ consumption and microcalorimetry as bioindicators in forest soils. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999, roč. 31, č. 7, s. 949-956. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071799000036>. [cit. 2023-10-01].
- [30] WADSO, Ignemar. Isothermal microcalorimetry near ambient temperature: An overview and discussion. Online. *Thermochimica Acta*. 1997, roč. 294, č. 1, s. 1-11. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004060319603136X>. [cit. 2023-10-01].
- [31] BARROS, Nieves; FEIJOO, Sergio; SIMONI, Jose A.; PRADO, Alexandre G. S.; BARBOZA, Fernando et al. Microcalorimetric study of some Amazonian soils. Online. *Thermochimica Acta*. 1999, roč. 328, č. 1-2, s. 99-103. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603198006297>. [cit. 2023-10-01].
- [32] VANDENHOVE, H.; CONINCK, K. De a COORVITS, K. Microcalorimetry as a tool to detect changes in soil microbial biomass. Online. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1991, roč. 30, č. 3-4, s. 201-206. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772249109357656>. [cit. 2023-10-01].
- [33] BARROS, Nieves a FEIJOO, Sergio. A combined mass and energy balance to provide bioindicators of soil microbiological quality. Online. *Biophysical Chemistry*. 2003, roč. 104, č. 3, s. 561-572. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462203000590>. [cit. 2023-10-01].
- [34] WADSO, Ingemar. Isothermal microcalorimetry in applied biology. Online. *Thermochimica Acta*. 2002, roč. 394, č. 1-2, s. 305-311. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603102002630>. [cit. 2023-10-01].
- [35] NANNIPIERI, P. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. Online. *Soil biota: management in sustainable farming systems*. Roč. 51, č. 1, s. 238-244. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19951907619>. [cit. 2023-10-02].
- [36] SHE, Wen Wen; YAO, Jun; WANG, Fei a CAI, Min Min. A Combination Method to Study the Effects of Petroleum on Soil Microbial Activity. Online. *Bulletin of*

Environmental Contamination and Toxicology. 2013, roč. 90, č. 1, s. 34-38. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-012-0893-3>. [cit. 2023-10-02].

- [37] KARAMALIDIS, A. K.; EVANGELOU, A. C.; KARABIKA, E. a KOUKKOU, A. I. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. Online. *Bioresource Technology*. 2010, roč. 101, č. 16, s. 6545-6552. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410005328>. [cit. 2023-10-02].
- [38] GUO, Huan; YAO, Jun; CAI, Minmin; QIAN, Yiguang a GUO, Yue. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. Online. *Chemosphere*. 2012, roč. 87, č. 11, s. 1273-1280. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512001002>. [cit. 2023-10-02].
- [39] ZHUANG, Rensheng; CHEN, Huilun; YAO, Jun a LI, Zhe. Impact of beta-cypermethrin on soil microbial community associated with its bioavailability: A combined study by isothermal microcalorimetry and enzyme assay techniques. Online. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, roč. 189, č. 1-2, s. 323-328. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389411002354>. [cit. 2023-10-02].
- [40] HASSAN, W. a CHEN, W. Estimation of enzymatic, microbial, and chemical properties in Brown soil by microcalorimetry. Online. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2014, roč. 116, č. 1, s. 969-988. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-013-3588-z>. [cit. 2025-01-31].
- [41] CAO, GuoLiang; ZHANG, XiaoYe; WANG, YaQiang a THENG, FangCheng. Estimation of emissions from field burning of crop straw in China. Online. *Springer link*. 2008, roč. 53, č. 5, s. 784-790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11434-008-0145-4>. [cit. 2024-02-24].
- [42] ALVARENGA, P.; GONCALVES, A. P.; FERNANDES, R. M. a VARENNES, A. de. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. Online. *Science Direct*. 2009, roč. 74, č. 10, s. 1292-1300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.063>. [cit. 2024-02-24].
- [43] *Lesní půda Zdroj*: <https://www.mezistromy.cz/ekosystem-lesa/lesni-puda>. Online. 2014. Dostupné z: <https://www.mezistromy.cz/ekosystem-lesa/lesni-puda>. [cit. 2024-02-24].
- [44] ELLIOTT, Edward T.; BURKE, Ingrid C.; MONZ, Christopher A. a FREY, Serita D. Terrestrial Carbon Pools: Preliminary Data from the Corn Belt and Great Plains Regions. In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. 12. 35. SSSA

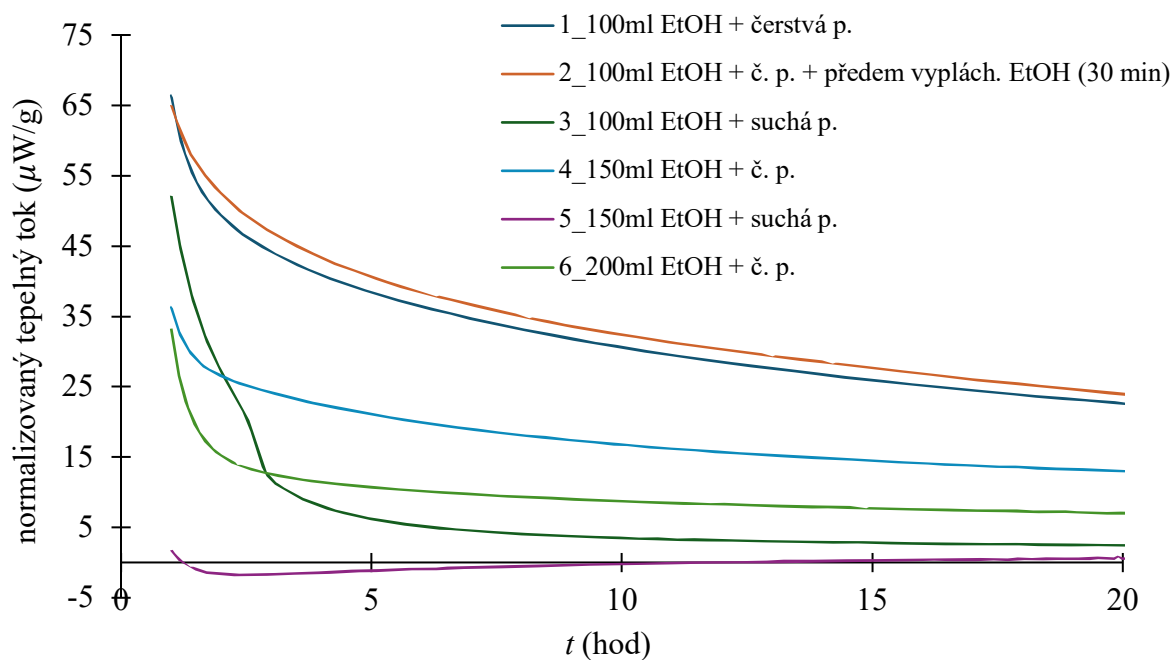
Special Publications, 1994, s. 235-242. ISBN 9780891188070. Dostupné také z:
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssaspecpub35.c12>.

- [45] CRITTER, Silvana A. M. a AIROLDI, Claudio. Application of Calorimetry to Microbial Biodegradation Studies of Agrochemicals in Oxisols. Online. *Journal of Environmental Quality*. 2001, roč. 30, č. 3, s. 954-959. Dostupné z:
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq2001.303954x>. [cit. 2024-02-24].
- [46] WANG, Fei; YAO, Jun; CHEN, Huilun a ZHOU, Yong. Microcalorimetric measurements of the microbial activities of single- and mixed-species with trivalent iron in soil. Online. 2009, roč. 72, č. 1, s. 128-135. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651308000158>. [cit. 2024-02-24].
- [47] BOLING, E. A.; BLANCHARD, G. C. a RUSSELL, W. J. Bacterial Identification by Microcalorimetry. Online. *Nature*. 1973, roč. 241, č. 1, s. 472-473. Dostupné z:
<https://www.nature.com/articles/241472a0>. [cit. 2024-02-24].
- [48] NUMA, Kristyn B.; ROBINSON, Jasmine M. a ARCUS, Vickery L. Separating the temperature response of soil respiration derived from soil organic matter and added labile carbon compounds. Online. *Geoderma*. 2021, roč. 2021, č. 400, s. 115-128. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115128>. [cit. 2024-10-08].
- [49] XXXI. On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. Online. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1896, roč. 251, č. 41, s. 237-276. Dostupné z:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14786449608620846>. [cit. 2024-10-08].
- [50] *AMAGRO s.r.o.* Online. Lignohumát. 2005. Dostupné z:
<https://amagro.com/vyroby/lignohumat-b/>. [cit. 2025-04-03].
- [51] *Kapitoly z pedologie a půdní biologie*. Online. ÚSTAV APLIKOVANÉ A LANDŠAFTNÍ EKOLOGIE, 2013. Dostupné z: https://uapmv.af.mendelu.cz/wcd/waf-uapmv/doc/kzp/kzp_prednasky.pdf. [cit. 2025-01-30].
- [52] YANG, S. a RUPP, A. Experimental Access to Cellulose Oxidation and the Dynamics of Microbial Carbon and Energy Use in Artificial Soil Under Varying Temperature, Water Content, and C/N ratio. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 2025, roč. 2025, č. 1, s. 109 -117. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071725000094>. [cit. 2025-01-30].
- [53] KUČERA, A.; HOLÍK, L.; MAROSZ, K.; MARTINÍK, A. a VAVŘÍČEK, D. Changes in forms of available nitrogen and respiration in soil of beech forest as a reaction to a deforestation resulting from wind storm. *Acta Universitatis Agriculturae*

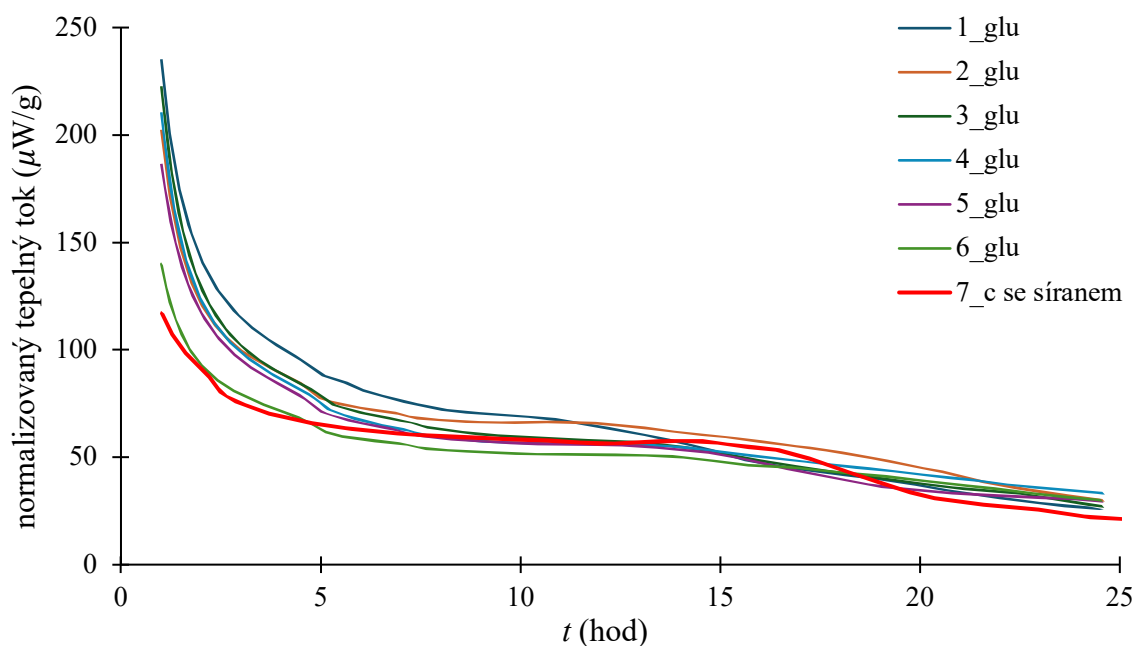
et Silviculturae Mendeliana Brunensis. 2013, roč. 61, č. 1, s. 107-113. ISSN 1211-8516.

- [54] ZBÍRAL, J.; MALÝ, S. a VÁŇA, M. Stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou. In: *Analýza půd III, Jednotné pracovní postupy*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2016, s. 87.
- [55] ZBÍRAL, J.; MALÝ, S. a VÁŇA, M. Stanovení vlhkosti gravimetricky. In: *Analýza půd I, Jednotné pracovní postupy*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2010, s. 27.
- [56] BARJA, M. Isabel a PROUPIN, Jorge. Microcalorimetric study of the effect of temperature on microbial activity in soils. Online. *Thermochemica Acta*. 1997, roč. 303, č. 2, s. 155-159. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(97\)00262-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(97)00262-1). [cit. 2025-01-31].
- [57] BARROS, N. a FEIJOO, S. Interpretation of the Metabolic Enthalpy Change, ΔH_{met} , Calculated for Microbial Growth Reactions in Soils. Online. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2000, roč. 63, č. 1, s. 577-588. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010162425574>. [cit. 2025-01-31].

9 PŘÍLOHY



Obrázek 43: Přidání 75% ethanolu ke vzorkům půdy a následné měření.



Obrázek 44: Měření s roztokem glukózy a síranu amonného a bez pouze s glukózou.

10 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

10.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CFU	jednotka tvořící kolonie
WHC	vodní zádržná kapacita
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
TGA	termogravimetrie
CO ₂	oxid uhličitý
C ₆ H ₁₂ O ₆	glukóza
(NH ₄) ₂ SO ₄	síran amonný
BOD	biochemická spotřeba kyslíku
TAM III	thermal activity monitor

10.2 Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
P_{max}	maximální výkon
t_{max}	čas (píku)
k	rychlostní konstanta
Q	teplo
g	gram
$g \cdot mol^{-1}$	gram na mol
$mol \cdot dm^{-3}$	mol na decimetr krychlový = M
$^{\circ}C$	stupeň Celsia
$\mu W \cdot g^{-1}$	mikrowatt na gram = normalizovaný tepelný tok
μl	mikrolitr
T_{opt}	teplotní optimum
T_{inf}	teplotní inflexní bod