	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31042.1– Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

STANOVENÍ BAZÁLNÍ A SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE METODOU GC

1 Účel a rozsah

Postup se používá pro stanovení bazální respirace (BR) a substrátem indukované respirace (SIR) mikroorganismů ve vzorcích minerálních i organických půd. Postup není vhodný pro karbonátové půdy.

2 Princip

Půdní vzorek se aerobně inkubuje v uzavřené lahvi s přidavkem (SIR) nebo bez přidavku (BR) substrátu. Respirací organismů se v lahvi uvolňuje CO₂, který se v čase stanovuje metodou plynové chromatografie.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Glukosa bezvodá, C₆H₁₂O₆.
- 2 Síran amonný, (NH₄)₂SO₄.
- 3 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄.
- 4 Substrát.

Příprava: Substrát se připraví důkladným smícháním a rozemnutím 8,42 g glukosy (1), 1,37 g síranu amonného (2) a 0,21 g dihydrogen fosforečnanu draselného (3).

- 4 Helium, He, vysoce čistý plyn v tlakové lahvi (čistota 6.0, tj. 99,9999 % He).
- 5 Kalibrační směs s CO₂ o koncentraci přibližně 0,1 obj. % v N₂ v tlakové lahvi.
- 6 Kalibrační směs s CO₂ o koncentraci přibližně 3 obj. % v N₂ v tlakové lahvi.
- 7 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Termostat s teplotou udržovanou na 22 °C.
- 2 Erlenmeyerovy baňky, 100 ml.
- 3 Inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) s otvorem, 100 ml.
- 4 Černé pryžové zátky k inkubačním lahvím.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31042.1– Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

- 5 Chromatografické plynotěsné stříkačky s teflonovým těsněním a vyměnitelnou jehlou pro manuální nástřik vzorku, 1 ml, jehly mají boční vývod (tzv. „side hole“ ukončení).
- 6 Plynový chromatograf s tepelně vodivostním detektorem (TCD), manuálním nástřikem vzorku a kapilární kolonou HP-PLOT Q.

5 Postup

Obsah vody ve vzorku


Půdy mají mít vlhkost, která odpovídá (40 – 60) % maximální vodní kapacity (WHC). Vzorky se dovlhčují na 60 % WHC v případě stanovení BR a na 40 % WHC v případě stanovení SIR. Rozdíly v obsahu vody pro BR a SIR jsou způsobeny skutečností, že promíchání substrátu s půdou ovlhčenou na 60 % WHC vede ke slepení půdních částic, což znemožňuje účinnou výměnu plynů mezi vzorkem a okolím. Je-li obsah vody ve vzorku velmi nízký, může být ovlhčení na 60 % WHC problematické. V tomto případě se při stanovení BR zvolí dovlhčení na nižší hodnotu. Vždy se ale půdy v rámci jednoho experimentu odvlhčují na obsah vody odpovídající stejné hodnotě WHC a tato hodnota se uvede do výsledkového protokolu.

Preinkubace

Půdy se preinkubují v termostatu 4 dny při 22 °C. Na preinkubaci se do 100ml Erlenmeyerovy baňky naváží takové množství čerstvé půdy, které odpovídá obsahu sušiny uvedenému v tabulce 1. Pokud je obsah vody ve vzorku nižší než 60 % WHC (v případě BR) resp. 40 % WHC (v případě SIR), vzorek se na danou hodnotu dovlhčí a baňky se uzavřou parafilmem. Navažuje se ve 3 opakováních.

Měření

Parametry stanovení BR a SIR v půdách fermentačního, humusového a minerálního horizontu shrnuje tabulka 1. Po skončení preinkubace se půda naváží do inkubačních lahví. V případě SIR se před samotným vzorkem do inkubačních lahví naváží substrát a teprve poté vzorek a půda se se substrátem důkladně promíchá. Inkubační lahve se uzavřou černými gumovými zátkami a šroubovými uzávěry s otvorem. Ihned poté se lahve se vzorky umístí do termostatu s nastavenou teplotou 22 °C a zahájí se inkubace. Po 2,5 h a 5 h inkubace (v případě SIR) resp. po 4 h a 24 h inkubace (v případě BR) se plynotěsnou stříkačkou s jehlou odebere 500 µl vzorku vnitřní atmosféry lahví. Vzorky se okamžitě analyzují na obsah CO₂ pomocí plynového chromatografu s tepelně vodivostním detektorem (TCD). Plynový chromatograf je předem zkalibrován pomocí kalibračních směsí s CO₂ o koncentraci přibližně 0,1 obj. % v N₂ a 3 obj. % v N₂. Při analýze se jako nosný plyn používá helium. Po ukončení inkubace se lahve otevřou a doplněním vodou se vázkově stanoví objem plynné fáze.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31042.1– Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

Tabulka 1. Základní parametry pro stanovení bazální respirace (BR) a substrátem indukované respirace (SIR) metodou plynové chromatografie. Uvedené hodnoty navážek jsou rovny obsahu sušiny v naváženém čerstvém vzorku.

Parametr	BR	SIR
Preinkubace ($g_{\text{sušina}}$), FH	4,0	4,0
Preinkubace ($g_{\text{sušina}}$), HH	6,75	6,75
Preinkubace ($g_{\text{sušina}}$), MH	13,5	13,5
Inkubace ($g_{\text{sušina}}$), FH	3,5	3,5
Inkubace ($g_{\text{sušina}}$), HH	6,25	6,25
Inkubace ($g_{\text{sušina}}$), MH	12,5	12,5
Obsah vody (% WHC)	60,0	40,0
Substrát (g), FH	–	viz pozn. 1
Substrát (g), HH	–	viz pozn. 1
Substrát (g), MH	–	0,125
Čas odběru plyných vzorků od počátku inkubace (h)	4 a 24	2,5 a 5


FH – fermentační horizont,

HH – humusový horizont,

MH – minerální horizont

Poznámky

- V případě stanovení SIR v organických horizontech lesních půd je třeba množství přidaného substrátu zjistit experimentálně. Přídavek substrátu při měření SIR se podle ISO 16702 řídí obsahem půdní organické hmoty (SOM). Pokud je obsah SOM nižší než 5 %, přidává se 1 g substrátu na 100 g sušiny, což odpovídá navážkám 0,035 g substrátu pro fermentační horizont a 0,063 g substrátu pro humusový horizont. V ostatních případech potom 0,2 g substrátu na 1 g SOM. V praxi se SIR stanovuje při pěti koncentracích od fixní navážky vztahované na sušinu po navážku vycházející z obsahu SOM. Pro hodnocení se bere maximální dosažená hodnota SIR. Množství SOM se stanoví výpočtem z C_{ox} (oxidovatelný uhlík), pro přepočet se používá koeficient 1,72.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31042.1– Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

- 2 *Postup je třeba důsledně dodržovat a dbát na odebírání plynných vzorků z inkubačních lahví v přesných časech. Časy odběru se zapisují a při mírné odchylce je nutné přepočítat výsledky.*
- 3 *Po odběru plynných vzorků vnitřní atmosféry inkubačních lahví se plynotěsné stříkačky zapíchnou do vhodné pryžové zátky, aby se mezi analýzami zabránilo úniku vzorku ze stříkačky.*

6 Výpočet

Rychlost bazální (BR) nebo substrátem indukované respirace (SIR) se vypočítá podle vztahů

$$C_{\Delta} = C_b - C_a$$

$$G = C_{\Delta} \times V_g \times 10$$

$$L = \frac{\alpha \times G \times V_l}{V_g}$$

$$\text{BR nebo SIR} = \frac{(G + L) \times 12}{W_d \times 22,4 \times t}$$

C_a změřená koncentrace CO_2 po 2,5 h (v případě SIR) nebo po 4 h (v případě BR) inkubace (obj. %),

C_b změřená koncentrace CO_2 po 5 h (v případě SIR) nebo po 24 h (v případě BR) inkubace (obj. %),

C_{Δ} rozdíl v koncentraci CO_2 mezi jednotlivými měřeními (obj. %),

V_g objem plynné fáze (vnitřní atmosféry) inkubační lahve (ml),

G produkce CO_2 do plynné fáze mezi jednotlivými měřeními ($\mu\text{l CO}_2$),

W_d navážka ekvivalentu suché půdy (g),

V_l objem kapalně fáze = objem vody v půdě (ml),


α Bunsenův absorpční koeficient pro CO_2 a danou teplotu (= 0,889 pro 22 °C),

L produkce CO_2 do kapalně fáze mezi jednotlivými měřeními ($\mu\text{l CO}_2$),

t doba mezi jednotlivými měřeními, t.j. 2,5 h v případě SIR a 20 h v případě BR,

BR nebo SIR

bazální respirace nebo substrátem indukovaná respirace vyjádřená jako produkce C- CO_2 do plynné i kapalně fáze na 1 g suché půdy za 1 h ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31042.1– Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

7 Literatura

- 1 ISO 14240-1 Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method, 1997.
- 2 ISO 16072 Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, 2001.