

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra geografie



Michaela PEŠKOVÁ

**AKTIVITA PŮDNÍCH ENZYMŮ VE SPOLEČENSTVECH
TRVALÝCH TRAVNÍCH POROSTŮ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. Dr. Ing. Bořivoj Šarapatka, CSc.

Olomouc 2008

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci řešila samostatně s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne 5. května 2008

.....

Děkuji panu Prof. Dr. Ing. Bořivoji Šarapatkovi, CSc. za vedení bakalářské práce a cenné rady, které mi při zpracovávání práce poskytl. Děkuji také panu Ing. Ladislavu Čápovi za spolupráci při přípravě vzorků pro stanovení aktivity půdních enzymů, za pomoc při laboratorním měření i statistickém vyhodnocování získaných výsledků.



Vysoká škola: Univerzita Palackého

Fakulta: Přírodovědecká

Katedra: Geografie

Školní rok: 2006/07

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student

Michaela Pešková

obor Geografie

Název práce:

Aktivita půdních enzymů ve společenstvech trvalých travních porostů

Soil enzymes activity in the associations of perennial grasses

Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce je zjistit aktivitu půdních enzymů ve společenstvech trvalých travních porostů, a to v přesných maloparcelových pokusech, statisticky zpracovat výsledky a převést do grafických výstupů.

Struktura práce:

1. Literární rešerše
2. Studium metodik
3. Odběr a zpracování vzorků
4. Statistické vyhodnocení, tvorba grafického výstupu
5. Diskuze a závěr
6. Shrnutí (v angličtině)

Bakalářské práce bude zpracována v těchto kontrolovaných etapách:

1. Literární rešerše (do listopadu r. 2007)
2. Analýza dat (do ledna 2008)
3. Zpracování práce – do doby jejího odevzdání

Rozsah grafických prací: grafické zpracování - schéma pokusu

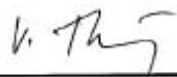
Rozsah průvodní zprávy: cca 30 stran

Seznam odborné literatury: podle pokynů vedoucího práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. Dr. Ing. Bořivoj Šarapatka, CSc.

Datum zadání bakalářské práce: 20. 6. 2007

Termín odevzdání bakalářské práce: r. 2008



vedoucí katedry



vedoucí bakalářské práce

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíle.....	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Půda	9
3.2 Půdní enzymy	9
3.2.1 Názvosloví enzymů.....	10
3.2.2 Původ enzymů.....	11
3.2.3 Význam enzymů v půdě.....	11
3.2.4 Aktivita půdních enzymů.....	12
3.2.4.1 Aktivita fosfatázy.....	13
3.2.4.2 Aktivita proteázy.....	13
3.2.4.3 Aktivita dehydrogenázy.....	13
3.2.4.4 Aktivita nitrát reduktázy	13
3.2.4.5 Aktivita ureázy.....	13
3.2.4.6 Aktivita celulózy.....	14
4 Základní charakteristika zájmového území	15
4.1 Vymezení zájmového území.....	15
4.2 Fyzickogeografická charakteristika	16
4.2.1 Geologické poměry.....	16
4.2.2 Geomorfologické poměry	16
4.2.3 Hydrologické poměry	18
4.2.4 Klimatické poměry	19
4.2.5 Pedologické poměry	19
4.2.6 Biogeografické poměry.....	20
5 Studium metodik.....	22
5.1 Aktivita kyselých a alkalických fosfatáz	22
5.2 Aktivita proteázy.....	23
5.3 Aktivita dehydrogenázy.....	24
5.4 Aktivita nitrát reduktázy	25
5.5 Aktivita ureázy.....	26
5.6 Aktivita celulózy.....	27
6 Odběr a zpracování vzorků	28
6.1 Úprava vzorků půd pro analýzu.....	28
6.1.1 Úprava půdních vzorků pro fyzikálně – chemické rozbory.....	28
6.1.2 Úprava čerstvých půdních vzorků	29
6.2 Odběr vzorků	29
7 Výsledky	31
8 Diskuze	33
8 Závěr	35
9 Summary.....	36
Seznam literatury	37

1 Úvod

Kvalita životního prostředí je dána kvalitou vody, vzduchu a půdy, tedy základními přírodními zdroji, které se vzájemně ovlivňují. V posledních letech je však význam půdy pro člověka a biosféru všeobecně podceňován, protože lidská společnost je na půdě existenčně závislá.

Půda je základem všech terestrických ekosystémů, včetně agroekosystémů. Vytváří životní prostor pro suchozemské organismy jak rostlinné, tak živočišné.

Je prostředím pro koloběh prvků, výměnu tepelné energie, infiltraci, akumulaci a retenci vody. Pro člověka představuje půda výrobní prostředek, který má určitý produkční potenciál a je zdrojem neobnovitelných surovin (Novák 2001).

Intenzivní způsob hospodaření na zemědělských pozemcích ovlivňuje změny v obsahu a kvalitě organických látek akumulovaných v půdě i na jejím povrchu. Snížený obsah a zhoršená kvalita půdní organické hmoty se projevují poruchami sorpčního komplexu, snížením vododržnosti a celkové půdní úrodnosti (Šuškevič, Procházková 2000).

Půdní enzymy tvoří důležitou součást půdního prostředí. Podílejí se na řízení a koordinaci organizovaného a vysoce integrovaného souboru chemických reakcí a s nimi spojených energetických změn, které zajišťují přísun energie a stavebního materiálu z okolí a jejich využití organismy (Vodrážka, 1992).

2 Cíle

Cílem bakalářské práce je zjistit aktivitu půdních enzymů ve společenstvech trvalých travních porostů v přesných maloparcelových pokusech. Pozornost je soustředěna na lokalitu u Rožnova pod Radhoštěm, přesněji město Zubří.

Získané výsledky je nutné statisticky zpracovat a převést do grafických výstupů. Tato bakalářská práce zahrnuje literární rešerše o enzymech, studium metodik a statistické vyhodnocení výsledků.

3 Literární rešerše

3.1 Půda

Půda je definována jako samostatný, přírodně historický útvar, který vzniká v důsledku komplexního působení vnějších činitelů na mateční horninu v určitém čase. Je formována působením půdotvorných činitelů a postupně se mění vlivem přírodních změn nebo antropogenních zásahů. Půdu je třeba chápat komplexně jako složku přírodního prostředí, která spolu s atmosférou, hydrosférou a biocenózou tvoří funkční ekologický systém (Jandák, Prax, Pokorný 2001).

3.2 Půdní enzymy

Enzymy tvoří nejpočetnější a nejvýznamnější skupinu biokatalyzátorů. Enzymy tedy můžeme definovat jako specifické bílkoviny vznikající v živých buňkách, které katalyzují průběh biologických reakcí snížením aktivační energie, a to jak uvnitř organismů (in vivo), tak i mimo ně (in vitro) (Kotal 1989).

Tyto reakce mají na rozdíl od běžných chemických reakcí vyšší specifiku k substrátu, probíhají při nižších teplotách, v jejich průběhu většinou nevznikají vedlejší produkty a jsou velmi citlivě regulovány. Působením katalyzátorů dochází v průběhu reakce ke snížení aktivační energie a tím ke zkrácení času potřebného k dosažení chemické rovnováhy (Šarapatka 2005).

Biochemické reakce, které probíhají v půdě jsou závislé na přítomnosti jednotlivých skupin enzymů, jež jsou ovlivňovány mnoha faktory. Mezi nejvíce studované skupiny patří oxidoreduktázy, transferázy a hydrolázy, které se uplatňují při přeměně organické hmoty a při zpřístupňování anorganických živin pro rostliny, avšak největší pozornost je věnována dehydrogenázám.

Na dekompozici organických sloučenin se podílejí některé skupiny enzymů jako například hydrolázy a transferázy, které mají význam při tvorbě půdní organické hmoty a ovlivňují koloběh prvků v přírodě. V koloběhu uhlíku se uplatňují enzymy amyláza, celulóza, xylóza, glukosidáza a invertáza. Koloběh dusíku ovlivňují proteáza, amidáza, ureáza a deamináza. Na koloběhu fosforu se podílí enzym fosfatáza a na koloběhu síry enzym arylsulfatáza.

3. 2. 1 Názvosloví enzymů

Enzymy jsou makromolekulární látky bílkovinné povahy, které se podle chemického složení dělí na jednosložkové nebo dvousložkové enzymy. Jednosložkové enzymy se skládají pouze z bílkoviny, která je nositelem substrátové specifiky. Dvousložkové enzymy jsou tvořeny bílkovinnou částí (apoenzym) a účinnou nebílkovinnou složkou (kofaktor). Apoenzym společně s nebílkovinnou složkou tvoří celek označovaný jako holoenzym. Bílkovinná část enzymu odpovídá za substrátovou specifiku, která určuje, jaká látka se v průběhu reakce bude měnit. Specifiku do značné míry ovlivňuje kofaktor, který určuje, jaký typ reakce proběhne. Kofaktory mají charakter prothetické skupiny nebo koenzymu, nejčastěji se jedná o deriváty vitamínů.

Součástí každého enzymu je tzv. aktivní vazebné místo, kde dochází k navázání určitého substrátu. Substrát se na enzym váže pomocí slabých molekulových sil, jakými jsou Waalsovy síly, vodíkové můstky a elektrostatické síly. Některé enzymy (např. alkalická fosfatáza) mohou přeměňovat celou skupinu látek, která má společné rysy (typ chemické vazby). Jiné enzymy jsou vysoce specifické (např. ureasa) a nepůsobí ani na velmi podobnou molekulu substrátu.

Názvy enzymů obecně vznikají připojením koncovky *-asa* k názvu substrátu, jehož přeměnu katalyzují. Podle druhu chemických vazeb, které enzymy vytvářejí nebo štěpí, rozlišujeme šest základních tříd:

1. oxidoreduktasy – katalyzují oxidačně – redukční děje
2. transferasy – katalyzují přenos skupin atomů nebo i větších částí molekul
3. hydrolasy – katalyzují hydrolytické štěpení substrátů
4. lyasy – katalyzují eliminační reakce, při nichž se tvoří dvojná vazba nebo v opačném směru adice na dvojnou vazbu
5. isomerasy – katalyzují přeskupení uvnitř molekul
6. ligasy – vytvářejí vazby za současného štěpení ATP

Enzymy jsou označovány čtyřmístnými kódy (např. celulosa – EC 3.2.1.4.). Úvodní písmena EC znamenají Enzyme Commission, první číslice řadí enzym do jedné z výše jmenovaných tříd, druhá číslice definuje skupinu chemické vazby, na kterou enzym působí, třetí označuje podskupinu a poslední pořadové číslo enzymu v podskupině (Šarapatka 2005).

3. 2. 2 Původ enzymů

Hlavním zdrojem půdních enzymů jsou rostliny, živočichové a především mikroorganismy. Vysoký podíl jejich biomasy, značná metabolická aktivita i krátký životní cyklus zajišťují většinu enzymové aktivity v půdě (Speir, Ross 1978).

Významný vliv na půdní biologickou aktivitu mají také rostliny, které ovlivňují zastoupení mikrobiální biomasy díky změnám v obsahu půdní organické hmoty. Prostřednictvím kořenových exudátů dochází v rhizosféře k nepřetržitému uvolňování extracelulárních a endocelulárních enzymů (Raynaud et al. 2006), které společně se zvýšenou mikrobiální aktivitou příznivě působí na enzymovou aktivitu půdy (Lavelle, Spain 2001). Dalším zdrojem půdních enzymů mohou být živočišné exkrementy, které se do půdního prostředí dostávají činností edafonu (Šarapatka 2005).

Doba odběru vzorků a podmínky předchozí přípravy půdy a uskladnění půdy před výzkumem mohou značně ovlivnit relativní rozsahy, ve kterých enzymy různého původu mohou přispívat k aktivitě přítomných půdních enzymů (Burns ed., 1978).

3. 2. 3 Význam enzymů v půdě

Biochemické reakce probíhající v půdě jsou katalyzovány celulárními nebo extracelulárními enzymy. První skupina celulárních enzymů se podrobněji dělí na endoenzymy a ektoenzymy. K syntéze a aktivitě endoenzymů dochází uvnitř buněk, kde mohou být využity například k transportu živin nebo mohou signalizovat určitou koncentraci různých látek přítomných v prostředí. Ektoenzymy se nacházejí na vnějších stěnách buněk, kde se účastní hydrolyzy makromolekul přímým kontaktem mezi buňkou a substrátem.

Extracelulární enzymy neboli exoenzymy představují skupinu enzymů, které již byly živými buňkami aktivně vyloučeny do vnějšího prostředí a jejich syntéza je i nadále kontrolována nebo byly uvolněny lyzí buněk bez kontroly organismů, které je vyprodukovaly. Extracelulární enzymy se v půdním prostředí nacházejí ve volné podobě nebo jsou vázány na ligandy organického, anorganického nebo smíšeného původu. Za ligandy považujeme především jílové minerály nebo humusové látky, které působí jako stabilizátor. Navázané enzymy se tak stávají odolnější vůči změnám prostředí a degradaci proteázami. Absorpce extracelulárních enzymů závisí na vlastnostech ligandy, charakteristikách enzymů a podmínkách prostředí (Speir, Ross 1978).

Půda je schopna absorbovat a stabilizovat pouze určité množství enzymů, nadbytek podléhá rychlé degradaci. Aplikací organických látek (statková hnojiva a komposty), které jsou postupně přeměňovány na stabilní celulózní látky, se zvyšuje schopnost půdy

navázat větší podíl extracelulárních enzymů. Přísun bakteriálních kultur a enzymů do půdy je však omezený, po určité době se i po přidavku energeticky bohatého substrátu populace mikroorganismů i aktivita půdních enzymů ustálí a dále nenarůstá.

V půdě se vyskytují dvě skupiny enzymů, enzymy přirozené a navozené. Přirozené enzymy jsou v půdním prostředí neustále přítomny, jejich aktivita závisí na koncentraci substrátu a podmínkách prostředí. Navozené enzymy se objevují až po dodání substrátu, jejich syntéza je ovlivňována produkčními organismy (Šarapatka 2005).

3. 2. 4 Aktivita půdních enzymů

Aktivita enzymů vyjadřuje míru působení enzymů a je definována jako rychlost katalyzované reakce. Jednotkou aktivity je 1 katal, který udává takové množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu. Aktivitu půdních enzymů ovlivňuje řada biotických i celulózních faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou teplota, vlhkost, půdní reakce, kvantita a kvalita organické hmoty, obsah živin, edafon, vegetace, přítomnost aktivátorů a inhibitorů.

Zvyšováním teploty se obdobně jako u chemických reakcí zvyšuje rychlost reakce enzymatické. Optimální teplota pro většinu enzymů je udávána v rozmezí 25 – 45°C (Kotal, 1989). Při vysokých teplotách dochází k degradaci enzymů, a tedy ztrátě jejich aktivity. Při velmi nízkých teplotách se zvyšuje viskozita prostředí, čímž se zhoršuje difuze substrátu k enzymu a produktu enzymu.

Vliv pH je pro enzymatickou aktivitu zvláště důležitý. Většina enzymů rozvíjí své katalytické působení v určité oblasti pH. Nejpříznivější koncentrace H^+ se nazývá pH optimum. U většiny enzymů toto optimum spadá do neutrální nebo slabě kyselé oblasti (Karlson, 1965).

Jako efekty obecně označujeme látky, které ovlivňují aktivitu enzymů. Pokud aktivitu enzymů zvyšují, mluvíme o pozitivních efektech nebo též aktivátorech. Aktivátory jsou látky, které zvyšují katalytický účinek enzymů vznikem komplexu enzym – substrát. Pokud aktivitu snižují, nazývají se negativní efekty či inhibitory.

Podle pevnosti vazby mezi enzymem a inhibitorem rozlišujeme dvě hlavní skupiny, reversibilní a ireversibilní inhibitory. Reversibilní inhibitory vytvářejí s enzymem volnější komplex, aktivitu enzymu lze obnovit odstraněním inhibitoru, například dialýzou. Druhou

skupinu inhibitorů tvoří ireversibilní inhibitory, které vytvářejí s enzymem velmi pevný komplex enzym – inhibitor a tím nevratně blokuje enzymovou aktivitu (Šarapatka 2005).

3. 2. 4. 1 Aktivita fosfatázy

Určitá část fosforu v půdním prostředí je v organických sloučeninách a při jeho zpřístupňování hrají nezastupitelnou roli půdní fosfatázy. Pro stanovení jejich aktivit používáme upravenou metodiku dle Tabatabai a Bremmer a využitím p-nitrofenylfosfátu jako substrátu. Stanovení vzniklého p-nitrofenolu je po inkubaci prováděno spektrofotometricky.

3. 2. 4. 2 Aktivita proteázy

Proteiny, které se dostávají do půdy jsou rozkládány mnoha bakteriemi a houbami. Aktivní roli během degradace zaujímají extracelulární proteázy. Pro stanovení aktivity používáme metodiku podle Ladd a Butler s využitím kaseinu jako substrátu. Aromatické kyseliny po reakci s fenolovým činidlem tvoří v alkalickém prostředí modré komplexy, které jsou stanovovány spektrofotometricky.

3. 2. 4. 3 Aktivita dehydrogenázy

Dehydrogenázy patří mezi oxidoreduktázy a v půdě se účastní oxidačních procesů organických složek. Aktivita dehydrogenázy v půdě je výsledkem řady dehydrogenáz, které jsou důležitými složkami enzymatických systémů mikroorganismů. Její studium může být bráno jako ukazatel mikrobiálního metabolismu v půdách. V našem sledování používáme metodu dle Ross s využitím trifenyltetrazolium chloridu jako substrátu a vzniklý trifenyl formazan je po extrakci měřen spektrofotometricky.

3. 2. 4. 4 Aktivita nitrát reduktázy

Údajů o aktivitě tohoto enzymu v půdním prostředí je zatím nedostatek, i když je důležitá v prvním kroku redukce dusičnanů na dusitany v procesech denitrifikace. S využitím metodiky dle Abdelmagid a Tabatabai jsou vzorky inkubovány s využitím KNO_3 jako substrátu a vzniklý nitrit je determinován spektrofotometricky.

3. 2. 4. 5 Aktivita ureázy

Enzym ureáza je součástí většiny živočichů, rostlin a mikroorganismů. V půdním prostředí se podílí na hydrolýze močoviny na NH_3 a CO_2 a zpřístupňuje tak dusík

pro rostliny. Jedná se o velmi stabilní půdní enzym, který je využíván při hodnocení úrodnosti půdy (Frankenberger, Tabatabai 1991). Aktivita enzymu ureáza může být ovlivněna koncentrací substrátu, teplotou, pH a hospodařením na půdě (Šarapatka 2005).

3. 2. 4. 6 Aktivita celulózy

Celulóza je jednou z nejdůležitějších rostlinných složek a studium mikrobiální degradace stojí v popředí při výzkumu osudu organické hmoty v půdě. Jednou z možných metod studia, kterou popsali Schiner a von Mersi s využitím CM – celulózy jako substrátu, je o inkubaci půdního vzorku. Determinace vytvořeného ferric hexacyanoferrate bude prováděna spektrofotometricky.

Tab. 1 Enzymy v půdě katalyzují následující reakce (Stevenson 1986)

Enzym	Katalyzovaná reakce
Fosfatasa	fosfátester + H ₂ O → ROH + PO ₄ ³⁻
Dehydrogenasa	XH ₂ + akceptor → X + akceptor H ₂
Proteasa	proteiny → peptidy a aminokyseliny
Ureasa	NH ₂ CONH ₂ + H ₂ O → 2NH ₃ + CO ₂
Celulasa	hydrolyza β1,4 – glykosidických vazeb

Aktivita půdních enzymů je kromě teploty a vlhkosti půdy, půdní reakce, kvantitativního a kvalitativního zastoupení organické hmoty, obsahu živin, půdní biomasy, vegetačního krytu a přítomnosti aktivátorů a inhibitorů významně ovlivněna také zpracováním půdy a hnojením (Angers et al. 1993; Diaz-Ravina et al. 2005; Melero et al. 2006). Různá hnojiva aktivují, či inhibují různé enzymy odlišným způsobem. Použitím některých hnojiv dochází ke zvýšení počtu půdních mikroorganismů a v závislosti na nich se zvyšuje i enzymatická aktivita.

Simonyan (in: Rejšek, 1988), ale i jiní autoři zjistili, že eroze způsobuje snížení enzymatické aktivity v důsledku ztrát mikrobiálních společenstev s povrchovou vrstvou půd.

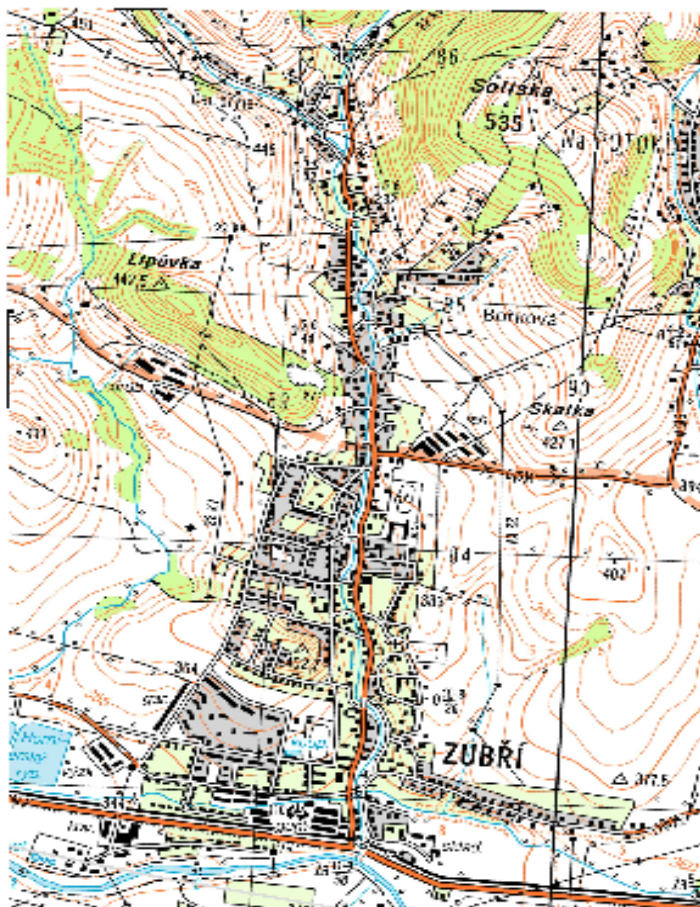
Ramírez – Martínek (1966) sledoval aktivitu enzymů a zjistil, že nejvyšší hodnoty aktivity byly měřeny v dubnu a květnu. Jiné studie udávají zvyšování aktivity během jara, s maximem v letních měsících Ascón (in: Rejšek, 1988).

4 Základní charakteristika zájmového území

4. 1 Vymezení zájmového území

Město Zubří se nachází v podhůří západní části Moravskoslezských Beskyd. Leží 4 km západně od Rožnova pod Radhoštěm. Severní část města leží v Chráněné krajinné oblasti Beskydy. Zájmové území spadá pod Zlínský kraj a dále pod okres Vsetín, který se nachází na východním okraji České republiky. Zubří se nachází v rozmezí nadmořských výšek 378 m n.m. u Bečvy a 860 m n.m. dosahuje na Kameničce. Zaujímá 28,4 km² katastrální plochy a prochází jím důležité silniční a železniční spojení. Silnice I. třídy č. 18 jež spojuje Českou republiku se Slovenskem (Valašské Meziříčí – Rožnov pod Radhoštěm – – státní hranice – Žilina) a železnice spojující Valašské Meziříčí s Rožnovem pod Radhoštěm po trati č. 281. Za zmínku stojí i autobusová doprava a přímé spojení do Prahy, Brna, Olomouce, Zlína a řady dalších měst.

Obr. 1: Mapa lokality



Zdroj: upraveno podle www.geoportal.cenia.cz

4. 2 Fyzickogeografická charakteristika

4. 2. 1 Geologické poměry

Na geologické stavbě zájmového území se podílí především předčtvrtohorní regionálně geologická jednotka flyšové pásmo Západních Karpat. Geologicky jsou Západní Karpaty součástí rozsáhlé soustavy mladých pásemných pohoří, vznikajících ve třetihorách působením několika fází alpinského vrásnění. Protože od ukončení těchto pohybů neuplynula z geologického hlediska dlouhá doba, jeví se jako soustava mohutných hřbetů, oddělených hlubokými údolními nebo kotlinami. Termínem flyš se označuje soubor usazených hornin, charakteristický rytmickým střídáním pískovců, prachovců, jílovců, slínovců, vzácně i vápenců a slepenců. Jednotlivé litologické typy sedimentů tvoří vrstvy se snižující se zrnitostí do nadloží. V rámci jedné vrstvy lze pozorovat zákonitou posloupnost uspořádání klastických částí (drobných úlomků hornin a minerálů) – zvrstvení. Naspodu je zvrstvení gradační nebo homogenní, nad ním je zvrstvení vodorovně a šikmo laminované. Výše je opět vodorovně laminované zvrstvení, ale velikost částic je menší (Pavelka a kol., 2001).

Podle geologické mapy České republiky na lokalitě Zubří a jejího blízkého okolí nalezneme deluviální, převážně písčitohlinité sedimenty; flyš a subflyš s převahou tmavošedých a hnědošedých vápnitých jílovců, ve spodní části s polohami pískovců; eluvium hradišťských vrstev; deluviofluviální písčitohlinité sedimenty s proměnlivou příměsí horninových úlomků; fluviální, převážně písčitohlinité sedimenty vyššího nivního stupně a fluviální, převážně šterkovité sedimenty nižšího nivního stupně.

4. 2. 2 Geomorfologické poměry

Podle regionálního geomorfologického členění reliéfu patří území okresu Vsetín k provincii Západní Karpaty a k subprovincii Vnější Západní Karpaty (Pavelka, 2001). Zájmové území, město Zubří patří do soustavy Západních Beskyd, ve kterých se nachází sníženina Rožnovské brázdy ležící mezi Vsetínskými vrchy a Moravskoslezskými Beskydami.

Schéma geomorfologického členění:

Západní Karpaty

Vnější Západní Karpaty

Západní Beskydy

Rožnovská Brázda

Vigantinská pahorkatina

Zašovská pahorkatina

Vnější Západní Karpaty – geomorfologická soustava v rámci Západních Karpat na východní Moravě a ve Slezsku; plocha 7 185, 96 km²; soustava mladých vrásnozlomových flyšových pohoří vyvrásněných v průběhu alpínského vrásnění ve třetihorách (Demek a kol., 2006).

Západní Beskydy – geomorfologická podsoustava v rámci Vnějších Západních Karpat; složeny z flyšových hornin s ojedinělým brandlem jurských vápenců, ve středních částech jsou zachovány neogenní zarovnané povrchy, okraje hluboce rozřezány údolními vodními toků; na vrcholech stopy odsedání svahů vlivem hlubinného ploužení, sesuvy na svazích, kryogenní tvary – izolované skály, kryoplanační terasy (Demek a kol., 2006).

Rožnovská brázda – podčepek v jižní části Západních Beskyd; plocha 115,29 km²; sníženina ve složitě zvrásněných souvrstvích jílovců, slepenců a pískovců převážně istebňanského a godulského souvrství, méně krosněnského a menilitového souvrství slezské jednotky; erozně denudační povrch se stopami mladotřetihorního zarovnání, četnými slepencovými a pískovcovými tvrdoši, periglaciálními mrazovými sruby a strukturními terasami (Demek a kol., 2006).

Vigantinská pahorkatina – okrsek ve východní části Rožnovské brázdy; členitá pahorkatina; složitě zvrásněné souvrství jílovců, slepenců a pískovců převážně istebňanského a godulského souvrství, méně krosněnského a menilitového souvrství slezské jednotka před denudačním čelem magurského příkrovu; erozně denudační reliéf s tvrdoši, sečnými plošinami, náznaky mrazových srubů a strukturních teras, rozsáhlé sesuvy (Demek a kol., 2006).

Zašovská pahorkatina – okrsek v západní části Rožnovské brázdy; členitá pahorkatina; složitě zvrásněné flyšové komplexy pískovců, slepenců a jílovců převážně istebňanského a godulského souvrství slezské jednotky, v jižní části pahorkatiny pískovce krosněnského souvrství slezské jednotky, vápnité jílovce křivských vrstev zlínského souvrství a pískovcovo–slepencové vrstvy křivského pásma račanské jednotky magurského flyše, erozně denudační

georeliéf s tvrdoši a zbytky zarovnaných povrchů, málo výrazné mrazové sruby a strukturní terasy (Demek a kol., 2006).

4. 2. 3 Hydrologické poměry

Území náleží k úmoří Černého moře a k povodí řeky Moravy. Severní hranice okresu Vsetín, ve kterém se zájmová oblast nachází je současně hlavním evropským rozvodím mezi Černým a Baltským mořem. Rozvodnice probíhá Podbeskydskou pahorkatinou a vystupuje na hřbet Radhoštské hornatiny (Mackovčín, 2002).

Hlavním vodním tokem zájmového území je řeka Bečva, která vzniká soutokem Vsetínské a Rožnovské Bečvy u Valašského Meziříčí ve výšce 288 m n. m. Bečva ústí zleva do Moravy u Troubek ve výšce 195m n. m. Plocha povodí je 1625,7 km², délka toku 119,6 km a průměrný průtok u ústí 17,5 m³·s⁻¹. Nejprve teče napříč Podbeskydskou pahorkatinou, u Hranic na Moravě přitéká do snížení Moravské brány, kterou protéká až po Přerov. Závěrečný úsek jejího toku před ústím do Moravy se nachází na území Hornomoravského úvalu. Hydrologické stanice nacházející se na zájmovém území: Teplice nad Bečvou, Dluhonice, Přerov – most a Rokytnice. Bečva patří mezi vodohospodářsky významný tok, který je vodácky využíván v délce 61 km. Čistota vody po Přerov II. tř., od Přerova po ústí IV. tř. (Kříž et al.,1984) .

Na zájmové území bakalářské práce zasahuje i jeden z přítoků Bečvy, a to Rožnovská Bečva. Rožnovská Bečva pramení na severních svazích Vysoké ve výšce 910 m n. m., spojuje se s Vsetínskou Bečvou u Valašského Meziříčí v 288 m n. m. Plocha povodí Rožnovské Bečvy je 254,3 km², délka toku 37,6 km a průměrný průtok u ústí je 3,91m³ ·s⁻¹. Hydrologické stanice, které se zde nacházejí: Horní Bečva, Prostřední Bečva, Rožnov pod Radhoštěm, Střítež, Krásno a Dolní Bečva. Tok se nachází ve vodohospodářsky důležité oblasti Beskyd, vodácky je využíván úsek 26 km od ústí a čistota vody II. tř. (Kříž et al.,1984).

Z přehradních nádrží má větší význam Bystřička Bystřička (37 ha) vybudovaná v letech 1907 – 1912. Na Rožnovské Bečvě leží nádrž Horní Bečva (15 ha). Okres Vsetín je celkově chudý na podzemní vody, neboť málo propustné horniny karpatského flyše mají nepříznivé podmínky pro výskyt a oběh podzemních vod (Pavelka, 2001). Vyskytuje se zde také řada pramenů minerálních vod s malou vydatností např. Mikulůvka, Podolí, Valašská Polanka, Rožnov pod Radhoštěm a další.

4. 2. 4 Klimatické poměry

Zájmová oblast bakalářské práce náleží do klimatické oblasti MT 2.

Charakteristika vybrané klimatické oblasti:

MT 2 – krátké léto, mírné až mírně chladné, mírně vlhké, přechodné období krátké s mírným jarem a mírným podzimem, zima je normálně dlouhá s mírnými teplotami, suchá s normálně chladnou sněhovou pokrývkou (Quitt, 1971).

Tab.2 Klimatické charakteristiky (upraveno podle: E. Quitt 1975)

Oblast	MT2
Počet letních dnů	20 - 30
Počet dnů s průměrnou teplotou 10°C a více	140 - 160
Počet mrazových dnů	110 - 130
Počet ledových dnů	40 - 50
Průměrná teplota v lednu v °C	-4 - 3
Průměrná teplota v červenci v °C	16 - 17
Průměrný počet dnů se srážkami 1mm a více	120 - 130
Srážkový úhrn ve vegetačním období v mm	400 - 500
Srážkový úhrn v zimním období v mm	250 - 300
Počet dnů se sněhovou pokrývkou	80 - 100
Počet dnů jasných	40 - 50
Počet dnů zamračených	150 - 160

4. 2. 5 Pedologické poměry

Půdy sledované oblasti jsou tvořeny především hnědými půdami, které jsou vůbec nejrozšířenějším typem půd v ČR, vyskytující se nejčastěji v členitém reliéfu pahorkatin a hornatin. Jako matečný substrát se uplatňují téměř všechny horniny (žuly, ruly, svory, fylity, čediče, břidlice a mnoho dalších). Hnědé půdy jsou nejvíce rozšířeny mezi 450 až 800m n. m. a jsou vázány většinou na členitý reliéf: svahy, vrcholy, hřbety apod. (Tomášek, 1995).

Půdy této skupiny jsou typické přítomností kambického B horizontu v půdním profilu. K hlavním procesům při jejich tvorbě patří hnědnutí. Při procesu hnědnutí dochází ke zbarvení horizontu hydrolýzou uvolněnými amorfními oxidy a hydroxidy železa, goethitem nebo železem bohatými komplexy (chaláty). K hnědnutí dále přistupují procesy tvorby a přeměn jílu. Ve slabě kyselých půdách dochází například k transformaci: slídy – illit-

– vermikulit – smektit. Vývoj kambizemí je doprovázen v závislosti na klimatu vyluhováním a acidifikací (Šarapatka, 1996).

Podle morfogenetického klasifikačního systému rámci půdního typu kambizemí typická rozeznáváme na lokalitě Zubří varietu kyselou. Pro hnědou půdu kyselou je charakteristický nízký obsah humusu, nápadný pokles půdní reakce a poněkud nízké nasycení sorpčního komplexu.

4. 2. 6 Biogeografické poměry

Biogeograficky se zájmové území nachází mezi Moravskoslezskými Beskydami a Hostýnskovsetínskou hornatinou. Většina oblasti však tvoří přechodnou, nereprezentativní zónu mezi Hostýnským a Beskydským bioregionem, kde hranice mezi oběma bioregiony je velmi nevýrazná.

Po floristické stránce se jedná o velmi bohaté území. Významné lokality se nacházejí až na šetrněji obhospodařovaných loukách pastvinách vyšších poloh. Cenné jsou zde zvláště výskyty některých druhů orchidejí, častý je zejména vstavač mužský a prstnatec májový, vzácněji najdeme vemeník dvoulistý, srstnatec Fuchsův a bradáček vejčitý. Ze zavlečených invazních rostlin se ve Starém Zubří vyskytuje nevídaný druh křídlatka sachalinská. Ze vzácnějších hub zde nalezneme kozák kapucínek, kozák bílý, šiškovec černý a květnatec Archerův. V Zubří se nachází větší počet významných stromů. Nejpozoruhodnější je památný tis červený, který svojí tloušťkou spadá mezi nejmohutnější.

Ze savců se zde vyskytují například srnec, jelen, prase divoké, kuna lesní, kuna skalní, jezevčík, liška, jezevec a na rybnících ondatra. Při migraci se zde dvakrát objevil los. Z drobných savců byli zjištěni rejsek obecný, rejsek černý, rejsek vodní, hrabošík podzemní, myšice temnopásá, plšík lískový a pravidelně se vyskytující netopýři, například netopýr dlouhouchý, netopýr brvitý, netopýr večerní a mnoho dalších.

Z ptáků bylo zjištěno 149 druhů, z toho 104 je hnízdících. Ze vzácnějších druhů se vyskytují například čáp černý, jeřábek lesní, žluna šedá, krkavec velký, bramborníček černohlavý, konipas luční, bekasina otavní, skorec vodní a jiní. V průběhu roku zde můžeme pozorovat racka chechtavého, potápku roháče i lysku černou. Z plazů se vyskytují užovka obojková, ještěrka obecná i zmije obecná. Z obojživelníků se kromě běžného skokana hnědého vyskytuje rosnička zelená a vzácněji lze spatřit čolky, kuňku žlutobřichou i mloka skvrnitého. Z rybí fauny bylo zjištěno mnoho druhů, z nichž nejhojnějšími jsou hrouzek

obecný, pstruh obecný, střevle potoční a někdy i ouklejka pruhovaná. Ze vzácnějších motýlů lze pravidelněji spatřit batolce duhového a otakárka fenyklového.

Na vymezeném území se nachází PP Zubří. Je to zvláště chráněné území, jelikož se zde nachází již výše zmiňovaný památný strom a také bohaté naleziště šafránu Heuffelova.

Obr. 2: Orthofotomapa zájmového území



Zdroj: upraveno podle www.geoportal.cenia.cz

5 Studium metodik

5. 1 Aktivita kysel \acute{e} a alkalick \acute{e} fosfat \acute{a} zy

Aktivita kysel \acute{e} a alkalick \acute{e} fosfat \acute{a} zy byla stanovena pomocí upraven \acute{e} metodiky podle Tabatabaie a Bremnera. Jako substr \acute{a} t byl využit p-nitrofenylfosf \acute{a} t a vznikl \acute{y} p-nitrofenol byl po inkubaci stanoven pomocí spektrofotometru. Aktivita fosfat \acute{a} z byla vyj \acute{a} dřena v jednotk \acute{a} ch μ mol PNP/kg dm/1hod.

Postup:

Do p \acute{e} ti Erlenmeyerov \acute{y} ch ban \acute{e} k se nav \acute{a} ží 1g \acute{c} erstv \acute{e} vlhk \acute{e} zeminy. Pouze do t \acute{r} í ban \acute{e} k (vzorky) se p \acute{r} id \acute{a} 1 ml požadovan \acute{e} ho roztoku substr \acute{a} tu a 4 ml odpov $\acute{ı}$ daj $\acute{ı}$ cího tlum $\acute{ı}$ c $\acute{ı}$ ho roztoku (odlišn \acute{e} pro kyselou a pro zásaditou fosfat \acute{a} zu). Do zb \acute{y} vaj $\acute{ı}$ c $\acute{ı}$ ch dvou ban \acute{e} k (kontroly) se pipetuj $\acute{ı}$ pouze 4 ml pracovního tlum $\acute{ı}$ c $\acute{ı}$ ho roztoku. Ba \acute{n} ky se kr \acute{a} tce protřepou, uzav \acute{r} ou a inkubuj $\acute{ı}$ se p \acute{r} i teplot \acute{e} 37 $^{\circ}$ C po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci se do vzork \acute{u} i do kontrol p \acute{r} id \acute{a} 1 ml roztoku chloridu draseln \acute{e} ho a 4 ml roztoku hydroxidu sodn \acute{e} ho (0,5M). Do kontrol se nav $\acute{ı}$ c pipetuje 1 ml roztoku substr \acute{a} tu, kter \acute{y} byl do vzork \acute{u} dod \acute{a} n p \acute{r} ed inkubaci. Do vzork \acute{u} i do kontrol se p \acute{r} id \acute{a} 90 ml destilovan \acute{e} vody. Ba \acute{n} ky se kr \acute{a} tce protřepou a jejich obsah se filtruje do k \acute{a} dinek. M \acute{e} ř $\acute{ı}$ se extinkce žlut \acute{e} zbarven \acute{y} ch kalibra \acute{c} n $\acute{ı}$ ch standard \acute{u} , vzork \acute{u} a kontrol na spektrofotometru proti blank \acute{c} inidlu p \acute{r} i vlnov \acute{e} d \acute{e} lce 400 nm.

V \acute{y} po \acute{c} et v \acute{y} sledk \acute{u} :
$$\frac{(S - C) \cdot 10 \cdot 100}{\% \text{ dm}}$$

Jednotky: μ mol PNP/kg dm/1hod

kde: S..... st \acute{r} edn $\acute{ı}$ hodnota vzork \acute{u} (μ g PNP)

C..... st \acute{r} edn $\acute{ı}$ hodnota kontrol (μ g PNP)

10..... faktor řed \acute{e} n $\acute{ı}$ extraktu

100 \cdot % $^{-1}$ dm faktor pro sušinu p \acute{u} dy

5. 2 Aktivita proteázy

Pro stanovení aktivity proteázy byla použita metodika podle Ladda a Butlera s využitím kaseinu jako substrátu. Aromatické kyseliny po reakci s fenolovým činidlem tvoří v alkalickém prostředí modré komplexy, které stanovíme pomocí spektrofotometru. Aktivita byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$.

Postup:

Nejprve se naváží 1g přirozeně vlhké zeminy do čtyř 25 ml Erlenmeyerových baněk. Do dvou připravených baněk (vzorky) se pipetuje 5 ml roztoku substrátu a 5 ml Tris pufru, do zbylých baněk (kontroly) se přidá pouze 5 ml Tris pufru. Baňky se krátce protřepou, uzavřou se gumovou zátkou a na rotační třepačce se inkubují po dobu 2 hodin při teplotě 50° C.

Po inkubaci se do baněk s kontrolami pipetuje 5 ml roztoku substrátu. Baňky se krátce protřepou, do obou kontrol i obou vzorků se přidá 5 ml TCA roztoku. Obsah baněk se znovu protřepe, vzorky i kontroly se následně filtrují.

Pro fotometrickou analýzu se do testovacích zkumavek pipetuje 5 ml filtrátu a 7,5 ml alkalického činidla, obsah se dobře promíchá a přidá se 5 ml Folin-Ciocalteu's fenolového činidla a obsah se znovu důkladně promíchá.

Pokud se v průběhu jedné hodiny vytvoří sraženina, je ji třeba přefiltrovat nebo odstranit v průběhu odstředování v centrifuze. Kalibrační standardy se přefiltrují a dále se opakuje stejný postup, který byl popsán při přípravě filtrátů vzorků a kontrol. V následujících 90 minutách se kalibrační standardy nechají stát při pokojové teplotě, postupně dojde ke změně jejich zbarvení. Během této doby se měří kalibrační standardy, vzorky i kontroly spektrofotometricky při vlnové délce 700 nm proti blanku.

$$\text{Výpočet výsledků: } \frac{(S - C) \cdot 100}{\% \text{ dm}}$$

Jednotky: $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$

kde: S..... střední hodnota vzorků ($\mu\text{g tyr}$)

C..... střední hodnota kontrol ($\mu\text{g tyr}$)

$100 \cdot \%^{-1}$ dm faktor pro sušinu půdy

5.3 Aktivita dehydrogenázy

Během měření byla použita metodika dle Rosse s využitím trifenyltetrazolium chloridu jako substrátu a vzniklý trifenyl formazan byl po extrakci měřen spektrofotometricky. Aktivita dehydrogenázy byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod.}$

Postup:

Do čtyř testovacích zkumavek se naváží 5g čerstvě vlhké zeminy. Do tří z nich se přidá 5 ml roztoku substrátu (vzorky), do čtvrté zkumavky se pipetuje 5 ml Tris pufru (kontrola). Obsah zkumavek se promíchá, uzavře gumovými zátkami a inkubuje se při 25° C po dobu 16 hodin. Do vzorků i kontroly se přidá 25 ml acetonu, obsah se zamíchá a nechá se třepat v temnu na třepačce po dobu 2 hodin.

Vzorky se následně v polotmavé místnosti filtrují. Získané filtráty a kalibrační standardy se měří fotometricky při vlnové délce 546 nm během 1 hodiny.

$$\text{Výpočet výsledků: } \frac{(S - C) \cdot 100}{5 \cdot \% \text{ dm}}$$

Jednotky: $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod.}$

kde: S..... střední hodnota vzorků ($\mu\text{mol formazanu}$)

C..... kontrola ($\mu\text{mol formazanu}$)

$100 \cdot \%^{-1} \text{ dm} \dots \dots$ faktor pro sušinu půdy

V laboratorních podmínkách byl proces stanovení aktivity dehydrogenázy částečně modifikován. Do testovacích zkumavek se naváží 5g čerstvě vlhké zeminy, ke kterým se přidá 1 ml destilované vody a 5 ml Tris roztoku. Obsah se nechá probublat dusíkem po dobu 2 minut. Zkumavky se uzavřou gumovými uzávěry a nechají se v termostatu při 25° C po dobu 16 hodin.

Poté se do zkumavek přidá 50 ml methanolu a obsah se nechá 2 hodiny třepat na třepačce. Následuje odstředování na centrifuze při 3000 ot/min po dobu 10 minut. Absorbance se měří na spektrofotometru při vlnové délce 485 nm.

5. 4 Aktivita nitrát reduktázy

S využitím metodiky dle Abdelmagid a Tabatabai jsou vzorky inkubovány pomocí KNO_3 jako substrátu a vzniklý nitrit je determinován spektrofotometricky. Aktivita nitrát reduktázy byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g}/\text{N dm}^2$ hod.

Postup:

Do tří zkumavek se naváží 5g přirozeně vlhké zeminy a pipetují se 4 ml 2,4 DNP roztoku, 1 ml roztoku substrátu a 5 ml destilované vody. Zkumavky se krátce protřepou a uzavřou se šroubovacími uzávěry.

Dvě zkumavky (vzorky) se inkubují po dobu 24 h při teplotě 25°C a jedna zkumavka (kontrola) se inkubuje po stejnou dobu při teplotě -20°C . Po inkubaci se kontrola musí nechat roztát. Do obou vzorků i do kontroly se přidá 10 ml roztoku KCl, obsah zkumavek se krátce protřepe a ihned se filtruje.

Pro fotometrickou analýzu se do testovacích zkumavek odpipetuje 5 ml filtrátu, 3 ml pufru chloridu amonného a 2 ml barevného reagentu. Obsah zkumavek se dobře promíchá a nechá se stát při pokojové teplotě po dobu 15 minut.

Vzorky i kontroly se měří při vlnové délce 520 nm proti blanku.

$$\text{Výpočet výsledků: } \frac{(S - C) \cdot 20 \cdot 100}{5 \cdot 5 \cdot \% \text{ dm}}$$

Jednotky: $\mu\text{g}/\text{N dm}^2$ hod.

kde: S..... hodnota vzorků ($\mu\text{g N}$)
C..... kontrola ($\mu\text{g N}$)
20..... objem extraktu (ml)
5..... alikvótní část filtrátu (ml)
5..... počáteční hmotnost půdy (g)
 $100 \cdot \%^{-1}\text{dm}$ faktor pro sušinu půdy

5. 5 Aktivita ureázy

Podle metodiky Tabatabaie a Bremnera byly půdní vzorky inkubovány s roztokem močoviny jako substrátem a uvolňovaný amoniak byl stanoven volumetricky. Aktivita ureázy byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g N/g dm/2hod}$.

Postup:

Do tří 50 ml volumetrických lahví se odváží 5 g přirozeně vlhké zeminy, přidá se 9 ml Tris pufru a lahve se promíchají. Poté se přidá 1 ml substrátového roztoku a obsah lahví se znovu důkladně promíchá. Obdobným způsobem se připraví kontrolní vzorky, které však budou bez přídavku substrátového roztoku. Lahve se dobře utěsní a vzorky s kontrolou se následně inkubují při 37° C po dobu 2 hodin.

Po inkubaci se do všech lahví přidá 35 ml roztoku KCl, pouze do kontroly se pipetuje 1 ml substrátového roztoku. Lahve se umístí na rotační třepačku a jejich obsah se důkladně promíchá. Pak se upraví objem vzorků i kontroly na požadovaných 50 ml destilovanou vodou. Lahve se znovu uzavřou, několikrát se obrátí dnem vzhůru, aby se promíchaly, a suspenze se přefiltruje.

Do destilační lahve destilační aparatury se odpipetuje 20 ml filtrátu a přidá se přibližně 0,2g MgO. Destiluje se NH_4^+ - N do 10 ml roztoku indikační kyseliny borité po dobu 3,3 minuty po změně indikátoru z fialového zbarvení na zelené. Množství NH_4^+ - N se stanoví titrací zředěnou kyselinou sírovou v destilátu.

$$\text{Výpočet výsledků: } \frac{\text{ml} \cdot 0,07 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot 100}{20 \cdot 5 \cdot \% \text{ dm}}$$

Jednotky: $\mu\text{g N/g dm/2hod}$

kde: ml..... spotřeba 2,5 mM H_2SO_4 (ml)
0,07..... úpravný faktor (1ml 2,5 mM H_2SO_4 odpovídá 0,07 mg N)
50..... objem extraktu
1000..... úpravný faktor (1 mg N = 1000 $\mu\text{g N}$)
20..... dělitel filtrátu (ml)
5..... počáteční hmotnost půdy (g)
 $100 \cdot \%^{-1} \text{dm}$ faktor pro sušinu půdy

5.6 Aktivita celulázy

Jednou z možných metod studia je přístup, který popsali Schiner a von Mersi s využitím CM – celulózy jako substrátu. Determinace vytvořeného ferric hexaxyanoferrate byla prováděna spektrofotometricky. Aktivita celulózy byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g GE/g dm}/24\text{hod}$.

Postup:

Do tří 100 ml Erlenmeyerových baněk se nejprve naváží 10 g přirozeně vlhké zeminy. Do dvou baněk (vzorků) se přidá 15 ml roztoku substrátu a 15 ml tlumivého roztoku (acetátový pufr), do zbývající baňky (kontroly) se pipetuje pouze 15 ml tlumivého roztoku. Baňky se krátce protřepou, utěsní se gumovými koncovkami a následně se inkubují 24 hodin při teplotě 50°C .

Po inkubaci se pipetuje 15 ml roztoku substrátu do kontroly a obsah baňky se krátce promíchá. Ihned poté se všechny vzorky společně s kontrolou filtrují. Objem 0,5 ml filtrátu se zředí v testovacích zkumavkách destilovanou vodou na požadovaných 20 ml.

Pro spektrofotometrickou analýzu se do testovacích zkumavek pipetuje 1 ml zředěného filtrátu, 1 ml činidla A a 1 ml činidla B. Připravené zkumavky se utěsní, dobře promíchají a následně inkubují po dobu 15 min ve varné vodní lázni.

Po zchlazení ve vodní lázni při pokojové teplotě po dobu 5 minut se přidá 5 ml činidla C. Obsah zkumavek se znovu dobře zamíchá a nechá se stát v klidu při pokojové teplotě po dobu 60 minut, sleduje se průběh zbarvení. Během následujících 30 minut se vzorky měří na spektrofotometru při vlnové délce 690 nm proti blank činidlu.

$$\text{Výpočet výsledků: } \frac{(S - C) \cdot 30 \cdot 40 \cdot 100}{100 \cdot \% \text{ dm}}$$

Jednotky: $\mu\text{g GE/g dm}/24\text{hod}$

kde: S..... střední hodnota vzorků ($\mu\text{g GE}$)

C..... kontrola ($\mu\text{g GE}$)

30..... hodnota inkubované směsi (ml)

40..... faktor zředění filtrátu

10..... počáteční hmotnost půdy (g)

$100 \cdot \%^{-1}\text{dm}$ faktor pro sušinu půdy

6 Odběr a zpracování vzorků

6. 1 Úprava vzorků půd pro analýzu

Odebraný vzorek musí být reprezentativní, homogenní a nekontaminovaný nebo jinak nezměněný. Úprava půdních vzorků se zpravidla skládá z pěti operací: vysoušení, mělnění, prosévání a mletí. Způsob vlastní úpravy závisí na požadovaných analýzách, na velikosti daného vzorku, na navázce pro jednotlivá stanovení a dalších vlivech.

Vzorky je třeba po odběru uchovávat ve vhodných obalech, ve kterých nedojde ke kontaminaci vzorku. Při transportu je třeba chránit je před zvýšenou teplotou a přímým slunečním světlem a zajistit urychlené zahájení dalších kroků analýzy (zpravidla sušení). Uchování vlhkých půdních vzorků v plastových obalech by nemělo překročit 48 hodin a teplota by neměla být nižší než 10° C.

Pro sušení vzorků je vhodné používat teploty maximálně do 40° C. Při vyšších teplotách může docházet ke změnám v extrahovatelnosti některých analytů (velmi významné opět pro tzv. slabá extrakční činidla). Sušením při vyšších teplotách může dojít např. ke zvýšení extrahovatelného obsahu síry, fosforu a amonné formy dusíku.

Pro přípravu analytického vzorku z dodaného upraveného vzorku je možné použít ruční kvartaci, příhradové nebo rotační děliče. Mletí celého vzorku se provádí jen výjimečně. Vzorky se upravují na 2 mm prosev mělněním a teprve takto upravený vzorek je v případě nutnosti upraven mletím na jemnější prosev (Zbiral, 2002).

6. 1. 1 Úprava půdních vzorků pro fyzikálně – chemické rozbory

Pro analýzy v systému Agrochemického zkoušení zemědělských půd (AZZP) se používají vzorky vysušené na vzduchu. Odebraný půdní vzorek se vysuší rozložený do tenké vrstvy na suchém a větraném místě. Je třeba zajistit, aby vzorek nemohl být při sušení kontaminován. Nesmí se sušit na slunci nebo pomocí umělého zdroje tepla. Norma ČSN ISO 11464 uvádí kromě vysušení na vzduchu i možnost sušení v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu při teplotě $40 \pm 2^\circ \text{C}$ nebo vymrazováním ve vymrazovací sušárně.

Jemnozemi I: z vysušeného půdního vzorku se odstraní větší částice skeletu, rostlinné a živočišné zbytky a vzorek se potom opatrně rozmělní v půdní prosevačce nebo ručně tak, aby nebyly rozmělněny částice skeletu. Částice skeletu větší než 2 mm se oddělí prosátím sítem o velikosti otvorů 2 mm.

Jemnozemi II: z jemnozemi I se oddělí průměrný vzorek o hmotnosti asi 5 g. Z tohoto podílu vzorku se pečlivě vyberou zbytky rostlinného a živočišného původu. Vzorek se potom rozetře na achátové misce tak, aby prošel beze zbytku sítím o jmenovité délce strany oka 0,25 mm.

Upravené vzorky je možné skladovat v papírových sáčcích nebo uzavřených polyetylenových lahvích s širokým hrdlem na suchém a dobře větratelném místě mimo dosah slunečního záření po dobu 5 i více let (Zbíral, 2002).

6. 1. 2 Úprava čerstvých půdních vzorků

Odebraný půdní vzorek se zpracovává ihned po dodání do laboratoře. Není-li to možné, skladuje se vzorek při teplotě nižší než -18°C . Při dodání zmrazeného vzorku je třeba maximálně omezit dobu rozmrazování soustavným rozrušováním vzorku a jeho zpracováním za teploty pod 4°C . Vzorek se rozprostře na vhodné misce, odstraní se hrubší části skeletu, zbytky rostlinného a živočišného původu a další zjevné příměsi. Případné agregáty se rozruší nastrouháním a vzorek se potom přeseje přes síto o jmenovité délce strany oka 5 mm (Zbíral, 2002).

6. 2 Odběr vzorků

V roce 2007 byly v rámci projektu NPV II. na lokalitách Zubří 1 a Zubří 2 provedeny odběry půdních vzorků. Podle metodiky jsme na lokalitě Zubří 1 odebírali vzorky z parcel ÚHOR A, B 10 A, RS 20 A, RS 40 B, ÚHOR B, B10 B, RS20 B, RS 40 B. Na lokalitě Zubří 2 byly odebírány vzorky z parcel ÚHOR A, L A, R1 A, R2 A, ÚHOR B, L B, R1 B, R2 B.

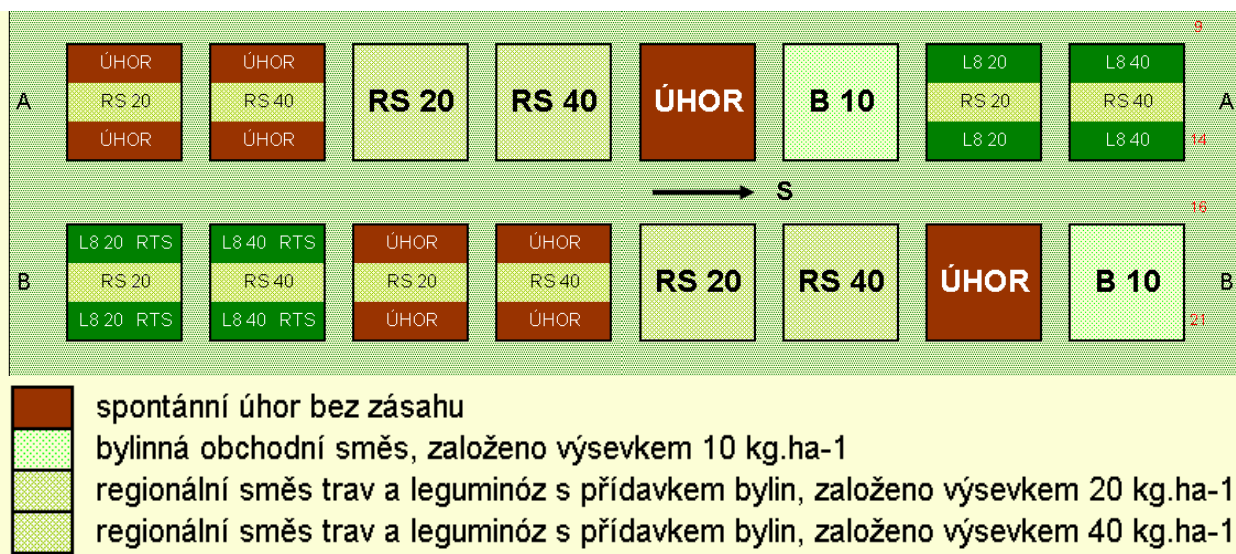
Obr. 3: Parcely na lokalitě Zubří



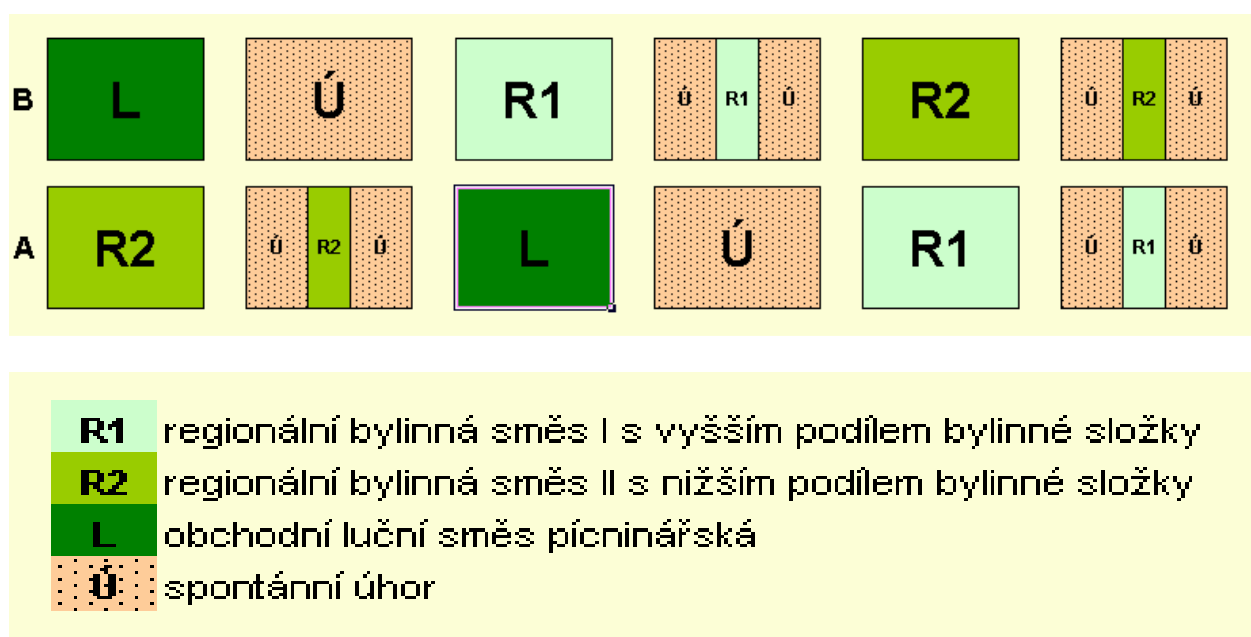
Zdroj: foto L. Čáp

Schéma lokalit

Zubří 1



Zubří 2



7 Výsledky

V odebraných vzorcích z lokalit Zubří 1 a Zubří 2 byla stanovena aktivita půdních enzymů (celulázy, ureázy, proteázy, nitrát reduktázy, dehydrogenáz a fosfatáz).

Výsledky (průměrné hodnoty) aktivity půdních enzymů byly po analýzách podrobeny prvnímu statistickému zhodnocení (viz níže).

Tab. 3: Hodnoty průměrných výsledků u jednotlivých enzymů

Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	µg GE/g dm/24hod
Zubří, průměry 2007 aktivita celulázy	1 Ú s	1	194,73
	1 B 10s	2	164,75
	1 RS 20s	3	176,20
	1 RS 40s	4	250,99
	2 Ús	5	159,52
	2 Ls	6	155,48
	2 R1s	7	176,10
	2 R2s	8	216,33

Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	mg N/g dm/2hod
Zubří, průměry 2007 aktivita nitrát reduktázy	1 Ú s	1	2,1992
	1 B 10s	2	2,9740
	1 RS 20s	3	2,9494
	1 RS 40s	4	2,5929
	2 Ús	5	1,9082
	2 Ls	6	2,5330
	2 R1s	7	1,7084
	2 R2s	8	2,2259

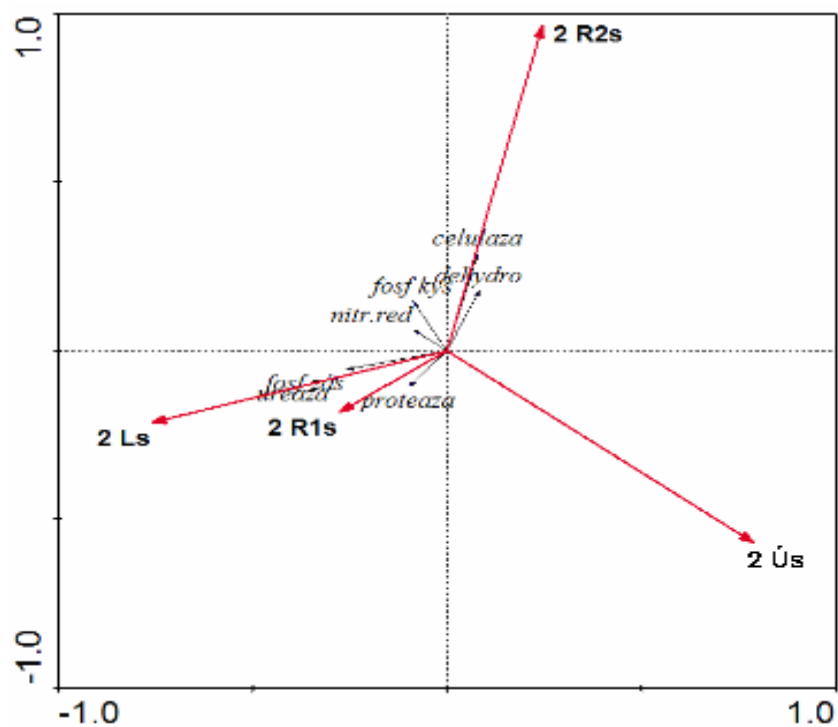
Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	µg N / g dm / 2 h
Zubří, průměry 2007 aktivita ureázy	1 Ú s	1	160,79
	1 B 10s	2	191,90
	1 RS 20s	3	168,95
	1 RS 40s	4	204,51
	2 Ús	5	160,12
	2 Ls	6	259,15
	2 R1s	7	189,69
	2 R2s	8	167,64

Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	µmol formazanu /kg dm/1hod
Zubří, průměry 2007 aktivita dehydrogenáz	1 Ú s	1	5,3825
	1 B 10s	2	3,3469
	1 RS 20s	3	6,1722
	1 RS 40s	4	4,8870
	2 Ús	5	4,3927
	2 Ls	6	3,9072
	2 R1s	7	5,2364
	2 R2s	8	7,1577

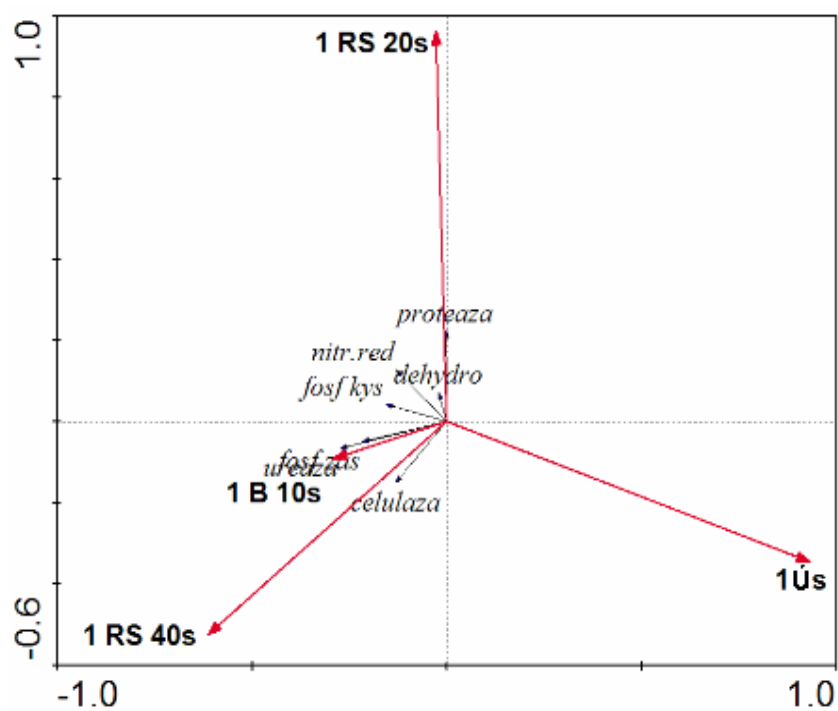
Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	µg tyr/g dm/2hod
Zubří, průměry 2007 aktivita proteázy	1 Ú s	1	129,43
	1 B 10s	2	134,97
	1 RS 20s	3	147,34
	1 RS 40s	4	102,33
	2 Ús	5	111,59
	2 Ls	6	150,68
	2 R1s	7	145,41
	2 R2s	8	126,05

Lokalita datum	parcela	číslo vzorku	kyselá µmol PNP/kg dm/1hod	zásaditá µmol PNP/kg dm/1hod
Zubří, průměry 2007 aktivita fosfatáz	1 Ú s	1	3847,05	2780,82
	1 B 10s	2	4344,92	3292,42
	1 RS 20s	3	4531,73	3257,62
	1 RS 40s	4	4476,79	3418,79
	2 Ús	5	3601,94	3011,59
	2 Ls	6	3501,21	3155,05
	2 R1s	7	3941,68	3313,48
	2 R2s	8	3886,74	2818,36

Výstupy statistického zhodnocení



Graf 1: Výstup statistického zhodnocení na lokalitě Zubří 1



Graf 2: Výstup statistického zhodnocení na lokalitě Zubří 2

8 Diskuze

Na lokalitě Zubří 1 byla aktivita celulózy nejvyšší na parcele RS 40s, a to 250,99 $\mu\text{g GE/g dm/24hod}$. RS 40s je regionální směs trav a leguminóz s přidavkem bylin a byla založena výsevem $40\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Nejnižší hodnota celulózy byla naměřena na parcele B 10s, a to 164,75 $\mu\text{g GE/g dm/24hod}$. Varianta porostu B 10s je bylinná obchodní směs, která byla založena výsevem $10\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Aktivita enzymu nitrát reduktázy byla opět nejvyšší na parcele B 10s, a to 2,9740 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ a nejnižší byla tentokrát na parcele Ús a činila 2,1992 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$. Parcela Ús je spontánní úhor bez zásahu. Jeho celkový vzhled během vegetace vykazoval známky zapleveleného pole se značným podílem prázdných míst. Navíc zápoj porostu byl tvořen hlavně plevelnými rostlinami, na jaře se jednalo především o agresivní rozvoj druhů z čeledi hvězdčovitých (rmen a heřmánek). Podíl trav zůstává během vegetace přibližně stejný, jeteloviny, zvláště jetel plazivý a luční, se rozšířily hlavně na podzim.

Enzym ureáza dosahoval nejnižší hodnoty na spontánním úhoru bez zásahu 160,79 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ a nejvyšší hodnota činila 204,51 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ na regionální směsi trav a leguminóz s přidavkem bylin, založena výsevem $40\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Aktivita enzymu dehydrogenázy byla nejvyšší na RS 20s, což je regionální směs trav a leguminóz s přidavkem bylin založena výsevem $20\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, a to 6,1722 $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod}$. Nejnižší aktivitu dehydrogenáza vykazovala na bylinné obchodní směsi B 10s, která byla založena výsevem $10\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Hodnota činila 3,3469 $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod}$.

Proteáza měla nejnižší i nejvyšší aktivitu na parcele RS s rozdílem založeného výsevu v $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Nejvyšší naměřená hodnota proteázy byla 147,34 $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$ a nejnižší činila o několik desítek méně, přesně 102,33 $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$.

U aktivity kyselé fosfatázy byla nejnižší hodnota 3847,05 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$ a u zásadité fosfatázy opět nejnižší hodnota naměřena 2780,82 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$. Obě tyto hodnoty se vyskytly na stejné parcele, a to u spontánního úhoru bez zásahu. Nejvyšší hodnoty kyselé fosfatázy byla naměřena na RS 20s a to 4531,73 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$ a na parcele RS 40s byla naměřena nejvyšší hodnota zásadité fosfatázy, přesněji 3418,79 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$.

Na lokalitě Zubří 2 se aktivita celulózy nejméně projevovala na parcele Ls, což je obchodní luční směs pícninářská a naměřená hodnota činila 155,48 $\mu\text{g GE/g dm/24hod}$. Za to na parcele R2 s měla nejvyšší hodnotu, která byla 216,33 $\mu\text{g GE/g dm/24hod}$. R2 je regionální bylinná směs II s nižším podílem bylinné složky, pro kterou je charakteristický vyšší podíl

trav na úkor bylin. Ve výsevu nedosahovala ve srovnání s regionální směsí I takové druhové pestrosti ani zápoje porostu. Ale jsou zde vytvořeny předpoklady pro vývoj druhově pestrého porostu v příštích letech.

Aktivita enzymu nitrát reduktázy byla nejvyšší na parcele Ls, a to 2,5330 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ a nejnižší byla tentokrát na parcele R1s a činila 1,7084 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$. Parcela R1s je regionální směs, druhově velmi pestrý porost květnatého vzhledu, vyrovnaného druhového zastoupení a vyhovujícím poměrem agrobotanických skupin trav, jetelů a bylin. Zápoj porostu je na jaře slabší, ale na podzim je porost téměř plně zapojen. Je to celkově velmi dobrá varianta pro zakládání druhově pestrých lučních porostů a nereprodukčním využitím.

Enzym ureáza dosahoval nejnižší hodnoty na spontánním úhoru bez zásahu, a to 160,12 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ a nejvyšší hodnota činila 259,15 $\mu\text{g N/g dm/2hod}$ na obchodní luční směsi pícninářské. Jedná se o druhově chudý luční porost s výraznou převahou trav, nejvyšší a nejvýnosnější z hodnocených variant, vhodný především k pícninářskému využití vyprodukované hmoty. Luční směs byla na jaře slabě zaplevelena, zápoj porostu byl dobrý především na podzim.

Aktivita enzymu dehydrogenázy byla nejvyšší na R2s, což je regionální směs trav, a to 7,1577 $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod}$. Nejnižší aktivitu dehydrogenáza vykazovala na obchodní luční směsi pícninářské L s. Hodnota činila 3,9072 $\mu\text{mol formazanu/kg dm/1hod}$.

Proteáza měla nejnižší aktivitu na parcele Ús. Nejvyšší naměřená hodnota proteázy byla 150,68 $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$ na parcele, kde se vyskytuje luční směs. A nejnižší činila o několik desítek méně, přesně 111,59 $\mu\text{g tyr/g dm/2hod}$.

U aktivity kyselé fosfatázy byla nejnižší hodnota 3501,21 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$ a u zásadité fosfatázy nejnižší hodnota, jež byla naměřena, činila 2818,36 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$. Nejnižší hodnota u kyselé fosfatázy se vyskytla na parcele obsahující luční směs a zásadité fosfatázy to bylo na regionální bylinné směsi II s nižším podílem bylinné složky. Nejvyšší hodnoty kyselé fosfatázy i zásadité fosfatázy byly naměřeny na R1s a to 3041,68 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$ a u zásadité přesněji 331348 $\mu\text{g mol PNP/kg dm/1hod}$.

8 Závěr

Základem práce byl laboratorní výzkum s cílem zjistit aktivitu půdních enzymů ve společenstvech trvalých travních porostů, a to v přesných maloparcelových pokusech na lokalitě Zubří a následně statisticky zpracovat výsledky. V odběrech vzorků z vybraných variant se bude pokračovat i v dalších letech, jelikož tento projekt MŠMT 2B06101 Optimalizace zemědělské a říční krajiny v České republice s důrazem na rozvoj biodiverzity probíhá až do roku 2011, kdy na jeho konci bude provedeno statistické zhodnocení všech získaných výsledků, a to nejen týkajících se aktivity enzymů, ale i problematiky edafonu.

Za uplynulých 50 let se velmi změnil ráz krajiny i zemědělství. Mezníkem byla kolektivizace v 50. letech 20. století spojená a rozoráváním mezí a scelováním pozemků. Následná intenzifikace zemědělské výroby byla spojována i s melioračními opatřeními. V krajině bylo likvidováno značné množství ekologických stabilizačních prvků. Důsledkem je nízká ekologická stabilita krajiny, narušené odtokové poměry i snížení biologické diverzity.

Na základě již výše zmiňovaných faktů si myslím, že v současné době bychom měli klást důraz na zvýšení biodiverzity a funkčnosti travních ekosystémů jako důležitého stabilizačního faktoru v zemědělské krajině a životním prostředí.

9 Summary

The thesis deals with the laboratory research with the aim to determine soil enzymes activity in the associations of perennial grasses, namely in given experiments on small localities of Zubří followed by the results worked out in a statistical way.

The process of collecting chosen samples will go on even in future as the MŠMT 2B06101 Optimalization of Agricultural and River Landscape in the Czech Republic with Focus on Biodiversity Advacement project is planned to have been finished by the year 2011, when at its end the statistical evaluation of all gained results, not only those concerning the enzyme activity but also the ones concerning the endafone problematics will be carried out.

Both agriculture and Czech country areas have changed a lot in the last fifty years. The starting point of those dramatic changes happened in the fifties of the twentieth century when we could see an enormous collectivisation process, i. e. ploughing field boundaries, joining thus narrow fields together and the intensification of the agriculture production along with melioration arrangements.

A great numer of ecological stabilization elements have been destroyed which results in a low ecological landscape stabilization, broken outflow conditions as well as the lowering of the biological diversity.

On the basis of all the above mentioned facts I think that at present we should emphasize the increase of biodiversity and the functions of grass ecosystems as an important stabilization factor of both a rural area and environment.

Seznam literatury

- Angers, D. A., Bissonnette, N., Legre, A., Samson, N., (1993): Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in soil under barely production. *Canadian Journal of Soil Science*, 73:1, 39 – 50 s.
- Burns, R. G. (1978): *Soil enzymes*. Academia Press, London, 379 s.
- Culek, M., et al. (1995): Biogeografické členění České republiky. Enigma, Praha, 347 s.
- Demek, J. et al. (2006): *Zeměpisný lexikon ČR – Hory a nížiny*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Brno, 582 s.
- Diaz-Ravina, M., Bueno, J., Gonzales-Prieto, SJ., Carballas, T. (2005): Cultivation effects on biochemical properties, C storage and N-15 natural abundance in the 0-5 cm layer of an acidit soil from temprate humid zone. *Soil & Tillage Research* 84 (2): 216 – 221 s.
- Frankenberger, W. T. Jr., Tabatabai, M. A. (1991): L-glutaminase aktivity of soils. *Soil Biol Biochem* 23: 869 – 874 s. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandele, E., Margesin, R. (1995): *Methods in Soil Biology*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 3-540-59055-2-418.
- Jandák, J., Prax, A., Pokorný, E. (2001): *Půdoznalství*. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 142 s.
- Karlson, P., (1965): *Základy biochemie*. Academia, Praha, 441 s.
- Kotal, V., (1989): *Enzymy v zemědělství*. SZN, Praha, 99 s.
- Kříž, H. et al. (1984): *Zeměpisný lexikon ČSR – Vodní toky a nádrže*. Academia, Praha.
- Lavelle, P., Spain, A. V. (2001): *Soil ecology*. Kluwer Academic Publisher: 369 – 376 s.
- Mackovčín, P. et al. (2002): *Zlínsko*. Agentura ochrany přírody, Praha, 374 s.
- Macháč, R., Šrámek, P., Frydrych, J., Smočková, M., Chovančíková, E., Mikulová, M., Nedomanský, J., (2007): Optimalizace zemědělské a říční krajiny v ČR s důrazem na rozvoj biodiverzity. *Periodická zpráva za rok 2007*, 23 s.
- Melero, S., Porras, JCR., Herencia, JF., Madejon, E. (2006): Chemical and biochemical properties in a silty loam under conventional and organic management. *Soil & Tillage Research* 90 (1-2): 162-170 s.
- Novák, P. (2001): Produkční a mimoprodukční funkce a její ochrana. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy Praha, *Úroda* 1/2001, 6 -7 s.
- Pavelka, J., Trezner, J., et al. (2001): *Příroda Valašska*. Český svaz ochránců přírody, Vsetín, 568 s.
- Quitt, E., (1971): *Klimatické oblasti Československa*. Geografický ústav ČSAV, Brno, 75 s.

- Raynaud, X., Lata, J.C., Leadley, P.W. (2006): Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant microbial interactions. *Plant and soil* 287 (1-2): 95 – 116 s.
- Rejšek, K., (1988): Fosfatázy v lesních půdách. VŠZ, Brno.
- Speir, T.W., Ross, D. J. (1978): Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns, R. G. (ed.) *Soil enzymes*. Academic Press London: 197 – 250 s.
- Stevenson, F. J. (1986): Cycles of soil (carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients). John Wiley and Sons, New York: 231 – 284 s.
- Šarapatka, B. (1996): *Pedologie*. Vydavatelství UP, Olomouc, 235 s.
- Šarapatka, B., Bubeníková, I. (2005): Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšující supresivitu půdy. Průběžná zpráva za rok 2004, 21s .
- Šuškevič, M., Procházková, B., (2000): Konvenční technologie zpracování půdy k obilninám. *Úroda* 2, 28-29 s.
- Tomášek, M., (1995): *Atlas půd České republiky*. Vydavatelství českého geologického ústavu, Praha, 36 s.
- Vodrážka, Z., (1992): *Biochemie I*. Praha, Academia, 120 s.
- Zbiral, J., (2002): *Analýza půd I. Jednotné pracovní postupy*. ÚKZÚZ, Brno, 197 s.

MAPOVÉ PODKLADY

- Culek, M.: *Biogeografické regiony ČR 1: 500 000*, ČÚZK, Praha, 1993.
- Geologická mapa ČR, list 25 – 23 Rožnov pod Radhoštěm, 1: 50 000*, ČgÚ, Praha, 1991.
- Orthofotomapa, zdroj - upraveno podle: www.geoportal.cenia.cz*
- Quitt, E.: *Klimatické oblasti ČSR*, Geografický ústav ČSAV, Brno, 1975.
- Tomášek, M.: *Půdní mapa ČR 1: 1 000 000*, ČgÚ, Praha, 1995.
- Vojenská mapa ČR, 1: 25 000, zdroj – upraveno podle: www.geoportal.cenia.cz*