

Hodnocení půd pomocí biochemických a molekulárně biologických metod

Bc. Jakub Klaban

Diplomová práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Jakub Klaban
Osobní číslo:	T19396
Studijní program:	N0712A030001 Environmentální inženýrství
Studijní obor:	Environmentální inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Hodnocení půd pomocí biochemických a molekulárně biologických metod

Zásady pro vypracování

1. Prostudovat literaturu k danému tématu.
2. Připravit zvolené varianty formulací.
3. Charakterizovat vzniklé formulace.
4. Výsledky přehledně sepsat do formy diplomové práce.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Web of Science, Scopus.
2. Kučerík, J., Svatoň, K., Malý, S., Brtnický, M., Doležalová-Weismannová, H., Demyan, M.S., Siewert, C., Tokarski, D.: Determination of soil properties using thermogravimetry under laboratory conditions, *European Journal of Soil Science*, 1–5 (2019).
3. Andersen, R., Grasset, L., Thofmann, M.N., Rochefort, L., Francez, A.-J.: Changes in microbial community structure and function following Sphagnum peatland restoration, *Soil Biology and Biochemistry*, 42(2), 291-301 (2010).
4. Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S.: Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877-887 (2005).

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 12. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Půda je jedním z nejdynamičtějších a nejdůležitějších systémů na Zemi. Půda obsahuje řadu různých druhů mikroorganismů, které jsou schopny tvorby intracelulárních a extracelulárních enzymů a ty mohou být považovány za půdní enzymy. Půdní enzymy hrají významnou roli při udržování půdní ekologie a zdraví půdy. Tyto enzymy rozkládají půdní organickou hmotu a měřením jejich aktivit je možné hodnotit funkčnost půd. Mezi nejvíce testované enzymové aktivity patří ureáza, esteráza, β -glukosidáza, α -glukosidáza, arylsulfatáza, a alkalické nebo kyselé fosfomonoesterázy, které zahrnují metabolismus uhlíku, dusíku, fosforu a síry. Enzymové aktivity byly stanoveny pomocí UV-VIS spektrofotometrie za použití chromogenních substrátů při vlnové délce odpovídající produktu vznikajícího danou enzymovou aktivitou, a to mikrozkuvkovou metodou, pracující se suspenzí půdy, a metodou podle ISO 20130, pracující s vodným extraktem půdy. Pro stanovení enzymových aktivit bylo použito 13 vzorků půdy dodaných kolegou z Mendelovy univerzity. Mezi výsledky obou metod byly nalezeny významné rozdíly. Zatímco metodiky pro α -glukosidázu, β -glukosidázu a alkalická fosfatázu navzájem spolu korelovaly, tak metodiky pro stanovení enzymové aktivity arylsulfatázy a kyselé fosfatázy měly rozdílné výsledky u obou metod. Rozdílné výsledky aktivit obou metod mohou vycházet z rozdílných postupů, kde u ISO metody se pracovalo s extraktem půdních enzymů a u mikrozkuvkové metody s půdní suspenzí.

Klíčová slova: Půdní enzymy, ISO 20130, zkuvková metoda, mikrodestička, β -glukosidáza, α -glukosidáza, arylsulfatáza, fosfatáza, ureáza, esteráza.

ABSTRACT

Soil is one of the most dynamic and important systems on Earth. Soil contains a several different types of microorganisms which are able to produce intracellular and extracellular enzymes, and these can be considered as soil enzymes. Soil enzymes play an important role in maintaining soil ecology and soil health. These enzymes decompose soil organic matter and by measuring their activities it is possible to evaluate the functionality of soils. The most tested enzyme activities include urease, esterase, β -glucosidase, α -glucosidase, arylsulfatase, and alkaline or acidic phosphomonoesterases, which include the metabolism of carbon, nitrogen, phosphorus and sulfur. Enzyme activities were determined by UV-VIS spectrophotometry using chromogenic substrates at wavelengths corresponding to the products formed by the enzyme activity, using a microtube method working with a soil suspension and a method according to ISO 20130 working with an aqueous soil extract. To determine soil enzyme activities, it was used 13 soil samples delivered by colleague from Mendel University. Significant differences were found between the results of both methods. While the method for α - glucosidase, β - glucosidase and alkaline phosphatase correlated with each other, and the method for determining the enzyme activity of arylsulfatase and acid phosphatase had different results for the two methods. The different results of the activities of both methods may be based on different procedures, where the ISO method worked with an extract of soil enzymes and the microtube method with a soil suspension.

Keywords: Soil enzymes, ISO 20130, tube method, microplate, β -glucosidase, α -glucosidase, arylsulfatase, phosphatase, urease, esterase.

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu prof. Mgr. Markovi Koutnému, Ph. D. za profesionální vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval během konzultací a pracích souvisejících s diplomovou prací. Rovněž bych rád poděkoval své rodině, přátelům a mým kolegům, kteří mě podpořili morálně či informativně a poskytli mi jak potřebné informace, tak i podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PŮDA	13
1.1 KVALITA PŮDY.....	13
1.1.1 Vlivy působící na kvalitu půdy.....	13
1.1.2 Vlastnosti půdy ovlivnitelné managementem.....	14
1.1.3 Esenciální služby poskytované půdou.....	14
1.2 INHERENTNÍ A DYNAMICKÉ VLASTNOSTI PŮDY.....	14
1.3 FUNKCE PŮDY.....	15
1.4 PŮDNÍ TYPY.....	15
2 ENZYMY	16
2.1 INTRACELULÁRNÍ ENZYMY.....	17
2.2 EXTRACELULÁRNÍ ENZYMY.....	17
2.3 PŮDNÍ ENZYMY.....	18
2.3.1 Amidohydrolázy.....	20
2.3.2 Fosfatázy.....	23
2.3.3 Arylsulfatázy.....	26
2.3.4 β -Glukosidáza.....	27
2.3.5 Esterázy.....	28
2.3.6 Invertáza.....	29
3 REALIZOVANÉ PRÁCE POJEDNÁVAJÍCÍ O STANOVENÍ PŮDNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY	30
3.1 METODA STANOVENÍ AKTIVITY ESTERÁZY.....	30
3.2 METODA STANOVENÍ B-GLUKOSIDÁZY.....	31
3.3 METODA STANOVENÍ AKTIVITY UREÁZY.....	31
3.4 METODA STANOVENÍ FOSFATÁZY.....	32
3.5 METODA PRO STANOVENÍ ARYLSULFATÁZY.....	33
3.6 KOMBINOVANÁ METODA PRO STANOVENÍ ČTYŘ ENZYMOVÝCH AKTIVIT.....	33
3.7 METODA STANOVENÍ INVERTÁZY.....	33
3.8 METODA STANOVENÍ AKTIVITY CELULÁZY.....	33
3.9 ISO 20130 KVALITA PŮDY — MĚŘENÍ VZORŮ ENZYMOVÝCH AKTIVIT V PŮDNÍCH VZORCÍCH POMOCÍ CHROMOGENNÍCH SUBSTRÁTŮ V MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH.....	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
4 OPTIMALIZACE A METODIKA	36
4.1 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ KŘIVKY <i>P</i> -NITROFENOLU.....	36
4.2 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ KŘIVKY AMONNÝCH IONTŮ.....	37

4.3	METODA STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PŮD V MIKROZKUMAVKÁCH.....	38
4.3.1	Kyselá fosfatáza	38
4.3.2	Alkalická fosfatáza.....	41
4.3.3	Esteráza	42
4.3.4	Arylsulfatáza	43
4.3.5	β -glukosidáza	44
4.3.6	α -glukosidáza	45
4.3.7	Ureáza	46
4.4	NORMOVANÁ METODA – ISO 20130	48
4.4.1	Kyselá fosfatáza ISO 20130.....	50
5	VÝSLEDKY	51
5.1	METODA HODNOCENÍ PŮD ENZYMOVÝMI AKTIVITAMI V MIKROZKUMAVKÁCH	51
5.1.1	Výsledné enzymové aktivity	51
5.2	METODA PODLE ISO 20130/2018	53
5.2.1	Výsledné enzymové aktivity – ISO 20130.....	53
5.3	VYHODNOCENÍ METODY V MIKROZKUMAVKÁCH A NORMOVANÉ METODY	55
5.3.1	Vyhodnocení všech enzymových aktivit a všech vzorků půd	55
5.3.2	Vyhodnocení enzymových aktivit α – glukosidázy pomocí obou metodik.....	57
5.3.3	Vyhodnocení enzymových aktivit β – glukosidázy pomocí obou metodik.....	58
5.3.4	Vyhodnocení enzymových aktivit kyselé fosfatázy pomocí obou metodik.....	59
5.3.5	Vyhodnocení enzymových aktivit alkalické fosfatázy pomocí obou metodik.....	61
5.3.6	Vyhodnocení enzymových aktivit arylsulfatázy pomocí obou metodik.....	62
5.3.7	Vyhodnocení enzymových aktivit esterázy pomocí obou metodik	63
5.3.8	Vyhodnocení enzymových aktivit ureázy pomocí obou metodik.....	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	76
	SEZNAM PŘÍLOH.....	77

ÚVOD

Podle Soil Science Society of America je půda směsí minerálů, mrtvých a živých organismů, vzduchu a vody. Tyto čtyři složky spolu reagují úžasným způsobem, díky čemuž je půda jedním z nejdynamičtějších a nejdůležitějších přírodních zdrojů naší planety. Půdu lidé využívají mnoha způsoby. Z tohoto důvodu má řadu definic. Inženýr může považovat půdu za materiál, na kterém je vybudována infrastruktura, zatímco diplomat může označovat „půdu“ jako území národa. Z pohledu vědce je půda: Povrchová minerální a / nebo organická vrstva Země, která prošla určitým stupněm fyzikálního, biologického a chemického zvětrávání. [1]

Půda hraje důležitou roli v životě každého z nás, a proto je velmi podstatná její kvalita. Intenzivním způsobem hospodaření a používáním nešetrných technologií nejen na zemědělských pozemcích dochází k významnému ovlivňování a změnám v obsahu organických látek akumulovaných v půdě i na jejím povrchu, toto vede ke snižování její kvality.

Kvalita půd se dá hodnotit mnoha způsoby, od fyzikálních, chemických až po biologické. Pro tuto práci byla zvolena biochemická metoda zaměřená na hodnocení kvality půdy. Metoda spočívá ve vyhodnocení několika typů enzymových aktivit v půdě na základě rozkladu substrátu. Substrát sestává ze dvou složek: z nichž jedna způsobuje zbarvení a druhá reaguje s enzymem. Na základě množství zreagovaného substrátu je získána odpovídající barevná sytost, pro niž je pomocí UV / VIS spektrofotometru při vhodné vlnové délce stanovena hodnota absorbance, díky které lze stanovit hodnotu enzymové aktivity. Z hodnot enzymových aktivit může být hodnocena půdní kvalita a také její zdraví, což popisuje tato práce. V této diplomové práci byla pro podrobné zhodnocení půd enzymovými aktivitami vybrána sada několika různých aktivit zahrnující cyklus uhlíku, dusíku, síry a fosforu. Tyto cykly jsou obsaženy ve vybraných enzymových aktivitách: α a β – glukosidázy, kyselé a alkalické fosfatázy, arylsulfatázy, esterázy a ureázy. Na základě výsledných hodnot enzymových aktivit byly půdy hodnoceny. Hodnocení probíhalo podle dvou metod, které byly vzájemně porovnány. První metodou, která byla optimalizována byla metoda prováděná v mikrozkuvkách a druhou metodou byla metoda podle normy ISO 20130/2018.

Cílem této práce bylo zjednodušit, částečně optimalizovat a následně také vyhodnotit metodu stanovení enzymových aktivit prováděnou v mikrozkuvkách a srovnat ji s hodnotami enzymových aktivit podle normované metody ISO 20130. Dalším cílem bylo

zaměřit se na snížení množství použitého materiálu a chemikálií. Optimalizace metody prováděné v mikroskopických spočívá ve vytvoření vhodných podmínek, při kterých bude možné hodnoty enzymových aktivit hodnotit společně. Hodnotami enzymových aktivit byla na závěr hodnocena půdní kvalita.

I. **TEORETICKÁ ČÁST**

1 PŮDA

Půda je minerální či organická vrstva na povrchu Země, která prošla biologickým, chemickým nebo fyzikálním zvětráváním. Je směsí minerálů, mrtvých a živých organismů, vzduchu a vody. Tyto jednotlivé prvky mezi sebou reagují úžasnými způsoby, díky kterým se půda stává jedním z nejdynamičtějších a nejdůležitějších přírodních zdrojů naší planety. Půdy jsou omezené přírodní zdroje. Jsou považovány za obnovitelné, protože se neustále formují. I když je to pravda, k jejich tvorbě dochází extrémně nízkou rychlostí. Ve skutečnosti může trvat tvorba jednoho centimetru půdy několik set let i více. Míra tvorby půdy se na celé planetě liší: nejpomalejší rychlost se vyskytuje v chladných a suchých oblastech (více než 1000 let) a nejrychlejší rychlost je v horkých a vlhkých oblastech (několik stovek let). [1], [2]

1.1 Kvalita půdy

Zachování kvality půdy je naprosto nezbytným bodem k dosažení trvale udržitelného a konkurenceschopného hospodářství. Půdní funkce plní nezastupitelnou roli a procesy, které v ní probíhají významně ovlivňují další složky ekosystému. Ze zemědělského hlediska je nejdůležitější funkcí půdy schopnost produkce, kterou lze obecně pojmenovat jak úrodnost půdy. Avšak kvalita půdy spíše souvisí s funkcí ekologickou a také bývá často definována jako půdní zdraví – schopnost půdy fungovat jako živý systém uvnitř ekosystému, uchovávat si svou produktivitu, podporující kvalitu vody a ovzduší a udržující zdraví rostlin, zvířat a lidí. [3]

1.1.1 Vlivy působící na kvalitu půdy

Lidskou aktivitou dochází k řadě zásadních negativních změn v půdě. Mezi nejvýznamnější negativní jevy můžeme zařadit: degradaci půdní struktury, ztrátu půdní organické hmoty, zhutňování půd, eroze půd, kontaminace půd cizorodými látkami, acidifikace a další. Do jisté míry je kvalita půd také ovlivňována způsobem hospodaření na půdě. Zásadní podíl na kvalitě půdy mají agrotechnické zásahy jako je hnojení, technologie pěstování plodin a osevní postupy. [3]

1.1.2 Vlastnosti půdy ovlivnitelné managementem

Hodnocení kvality půdy se zaměřuje na dynamický nebo na půdní management který ovlivňuje živiny, slanost a schopnost zadržovat vodu. Tyto vlastnosti jsou hodnoceny jako inherentní schopnosti konkrétní půdy. [4]

1.1.3 Esenciální služby poskytované půdou

Půda podporuje růst rostlin, recykluje organický materiál, půdy regulují a filtrují toky vody, podporují budovy a silnice a poskytují stanoviště pro rostliny a zvířata. V závislosti na využití půdy se mnoho z těchto funkcí vyskytuje současně. [2]

1.2 Inherentní a dynamické vlastnosti půdy

Kvalita půdy je kombinací inherentních a dynamických vlastností půdy. Kvalitní procesy probíhající v půdě jsou dynamické vlastnosti půdy a to, jak se mění ve vztahu k inherentním vlastnostem půdy. Inherentní nebo invariantní vlastnosti se s využitím půdy mění jen málo pokud vůbec. Tyto vlastnosti mohou zahrnovat strukturu půdy, hloubku podloží, typ jílu, sorpční kapacitu a drenážní třídu. Tyto vlastnosti jsou v půdě tvořeny po tisíciletí. Tvorba půdy závisí na pěti půdotvorných faktorech. [5]

- Klima (srážky a teplota)
- Topografie (tvar pozemku)
- Biota (půdní vegetace, organismy a mikroorganismy)
- Mateřský materiál (geologické a organické prekurzory půdy)
- Čas (čas, kdy je mateřský materiál vystaven půdotvorným procesům)

Dynamické vlastnosti půdy se mohou v průběhu měsíců a let měnit v reakci na změny využívání půdy. Dynamické vlastnosti zahrnují organickou hmotu, strukturu půdy, rychlost infiltrace, objemovou hmotnost a kapacitu zadržování vody a živin. Změny dynamických vlastností jsou závislé na postupech hospodaření s půdou a také na vlastnostech půdy. Například hladina organické hmoty v půdě závisí na postupech zpracování půdy a typech pěstování rostlin, ale celkové množství organické hmoty je omezeno strukturou půdy a podnebím. Některé vlastnosti, například objemovou hustotu lze považovat za inherentní vlastnosti pod 20-50 cm, ale v blízkosti povrchu se jedná o dynamickou vlastnost. [5]

1.3 Funkce půdy

Půda je nedílnou součástí pro provádění mnoha funkcí. Od poskytování čistého vzduchu, vody, bohaté úrody přes lesy, produkty pastvin až po rozmanitou divočinu a krásnou krajinu. To vše je zastoupeno pěti základními funkcemi. [6]

- Cyklus živin – Půda ukládá a řídí uvolňování a cyklus živin a dalších prvků. Během těchto biochemických procesů, analogicky k vodnímu cyklu, mohou být živiny transformovány do rostlinných forem, drženy v půdě nebo dokonce ztraceny vzduchem či vodou. [7]
- Vztah s vodou – Půda může regulovat tok, odtok a skladování vody a rozpuštěných látek zahrnujících dusík, fosfor, pesticidy a další sloučeniny rozpuštěné ve vodě. Při správné funkci půdy je voda rozdělována pro doplňování podzemních vod a pro využití rostlinami a půdními živočichy. [8]
- Biodiverzita a stanoviště – Půda podporuje růst rostlin, živočichů a půdních mikroorganismů, obvykle tím, že poskytuje různá fyzikální, chemická a biologická stanoviště. [9]
- Filtrační a tlumivá schopnost – Půda funguje jako filtr chránící kvalitu vody, vzduchu a dalších zdrojů. Toxické sloučeniny nebo přebytečné živiny mohou být degradovány nebo jiným způsobem zneprístupněny rostlinám a živočichům. [10]
- Fyzikální stabilita a podpora – Půda má schopnost udržovat svou porézní strukturu, aby umožňovala průchod vzduchu a vody, odolávala erozivním silám a poskytovala médium pro kořeny rostlin. Neodmyslitelnou funkcí půdy je schopnost podpory ukotvení lidských struktur a konzervace archeologických artefaktů. [11]

1.4 Půdní typy

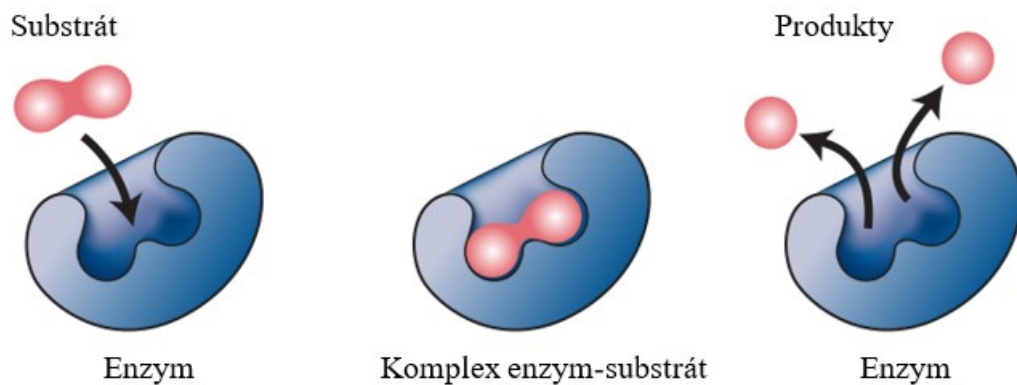
Půdní typ je základní kategorizační jednotkou taxonomického klasifikačního systému půd ČR. Všechny půdy, které sdílejí určitou sadu přesně definovaných vlastností, tvoří charakteristický typ půdy. Každá půda na světě patří k určitému typu půdy. [12]

2 ENZYMY

Život je složen z nesmírně velkého množství biochemických reakcí, z nichž téměř všechny jsou řízeny soubory biologických katalyzátorů, nazývané jako enzymy. I když jsou enzymy podřízeny stejným přírodním zákonům jako ostatní sloučeniny tak se odlišují od běžných chemických katalyzátorů v několika bodech. [13]

1. Vyšší reakční rychlost: Rychlosti u enzymově katalyzovaných reakcí jsou vyšší o 6 až 12 řádů oproti rychlosti odpovídající reakcí, které neobsahují katalyzátory a o několik řádů vyšší než reakce katalyzované chemicky.
2. Mírnější podmínky reakce: Enzymově katalyzované reakce bývají uskutečňovány za relativně mírných podmínek; teploty reakce dosahují do 100 °C, reakce probíhají za atmosférického tlaku a hodnoty pH se pohybují většinou v neutrální oblasti. Kdežto účinné chemické katalyzátory mnohdy vyžadují zvýšení teploty a tlaku a extrémní hodnoty pH.
3. Vyšší specifita a reakce: Na rozdíl od chemických katalyzátorů mají enzymy mnohem vyšší specifitu k substrátům, a to vede k tvorbě mnohem specifitějších produktů a výsledkem je že u enzymových reakcí málokdy vznikají vedlejší produkty.
4. Schopnost regulace: Koncentrace jiných sloučenin, než substrátu dokážou ovlivnit katalytické schopnosti mnoha enzymů. Mezi regulační mechanismy těchto procesů patří alosterická regulace, kovalentní modifikace enzymů a variabilita množství syntetizovaných enzymů.

Enzymy jsou jednoduché či složené proteiny, působící jako biokatalyzátory. Enzymy určují rychlost a povahu chemických reakcí a řídí většinu biochemických procesů v těle všech organismů. Molekuly, na které mohou enzymy působit, se nazývají substráty a enzym přeměňuje substráty na různé typy molekul známé jako produkty viz obrázek 1. Většina metabolických procesů v buňce potřebuje enzymovou katalýzu, aby k nim mohlo dojít dostatečně rychle a dokázaly udržet život. [14]



Obrázek 1: Mechanismus enzymové aktivity

Enzymy katalyzují více než 5000 typů biochemických reakcí. Mezi další biokatalyzátory můžeme zařadit katalytické molekuly RNA nazývané se ribozomy. Specifičnost enzymů pochází právě z jejich jedinečných trojrozměrných struktur. A podle místa působení je můžeme rozdělit na intracelulární a extracelulární enzymy. [15]

2.1 Intracelulární enzymy

Intracelulární enzymy představují většinu enzymů, zůstávají uvnitř v buňce, ve které vznikly, a v buňce vykonávají své specifické funkce. Jsou funkční buď v rozpuštěné formě anebo jsou vázané v různých biologických strukturách a většinou tvoří organizované funkční komplexy, multienzymové jednotky nebo multifunkční enzymy. Mnoho intracelulárních enzymů se vyskytuje pouze v určitých orgánech a mohou být lokalizovány pouze v některých jejich částech (organelách). Menší část intracelulárních enzymů naopak nemá specifickou lokalizaci a bývají ve většině částí buněk a prakticky v celém organismu. [16]

2.2 Extracelulární enzymy

Rozklad organických látek je složitý proces vyžadující kombinované působení více organismů. Z největší části se na rozkladu podílejí půdní mikroorganismy, které produkují a uvolňují nesčetné množství různých extracelulárních enzymů. Extracelulární enzymy pomáhají depolymerovat a mineralizovat složité organické sloučeniny na menší molekuly, které lze následně asimilovat. Hodnocení různých půdních extracelulárních enzymů se ukázalo jako účinný nástroj pro hodnocení funkčnosti půd v koloběhu živin a mikrobiálního oživení půd. [17]

Mezi hlavní zdroje extracelulárních enzymů v půdě můžeme zařadit půdní živočichy, kořeny rostlin a mikroorganismy. Enzymy se do půdního prostředí uvolňují buněčným metabolismem eukaryotických a prokaryotických buněk. V eukaryotických buňkách se na syntéze extracelulárních enzymů podílejí ribozomy a poté jsou enzymy transportovány přes endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát až na plazmatickou membránu, ze které jsou pomocí exocytózy vyloučeny ven z buňky. U prokaryotických buněk syntéza enzymů probíhá v ribozomech, ze kterých jsou transportovány na cytoplazmatickou membránu a sekrečními proteiny jsou vyloučeny z buňky ven. [16], [18]

2.3 Půdní enzymy

Půdní enzymy zvyšují rychlost reakce, při které se rozkládají organické sloučeniny a uvolňují se tak živiny. Složka zpracovávaná enzymem se nazývá substrát. Například glukosidáza (půdní enzym) štěpí glukózu z glykosidu (substrát). Enzymy jsou specifické pro substrát a mají svá aktivní místa, která se vážou na substrát a tvoří dočasný komplex viz obrázek 1. Enzymatická reakce uvolňuje produkt, kterým může být živina obsažená v substrátu. [19]

Půda je živý systém, ve kterém se uskutečňují všechny biochemické aktivity pomocí enzymatických procesů. Enzymy nahromaděné v půdě jsou přítomny v podobě volných enzymů, jako jsou exoenzymy uvolněné ze živých buněk, endoenzymy z rozpadajících se buněk a enzymy vázané na buněčné složky rozpadajících se buněk, v buněčných fragmentech a v životaschopných, ale nereprodukcujících se buňkách. Většina enzymů dostávajících se do půdy rozpadajícími se mikrobiálními tkáněmi, rostlinnými a živočišnými zbytky jsou pravděpodobně degradovány půdními proteázami a zbytek je začleněn do humusu. Půdu lze proto považovat za systém humusu a minerálů obsahujících jak imobilizované enzymy, tak uzavřené mikrobiální buňky. [20]

Enzymy stabilizované v půdní matici se hromadí nebo tvoří komplexy s organickou hmotou (humus), jílem a komplexy humus-jíl ale již nejsou spojeny s životaschopnými buňkami. Předpokládá se, že 40 až 60 % aktivity enzymu může pocházet ze stabilizovaných enzymů, takže aktivita nemusí nutně vysoce korelovat s mikrobiální biomasou nebo mikrobiálním dýcháním. Enzymová aktivita je tedy kumulativním účinkem dlouhodobé mikrobiální aktivity a aktivity životaschopné populace při odběru vzorků. Příkladem enzymu, který odráží aktivitu životaschopných buněk je dehydrogenáza, která se teoreticky může

vyskytovat pouze u životaschopných buněk, a ne ve stabilizovaných půdních komplexech. [19]

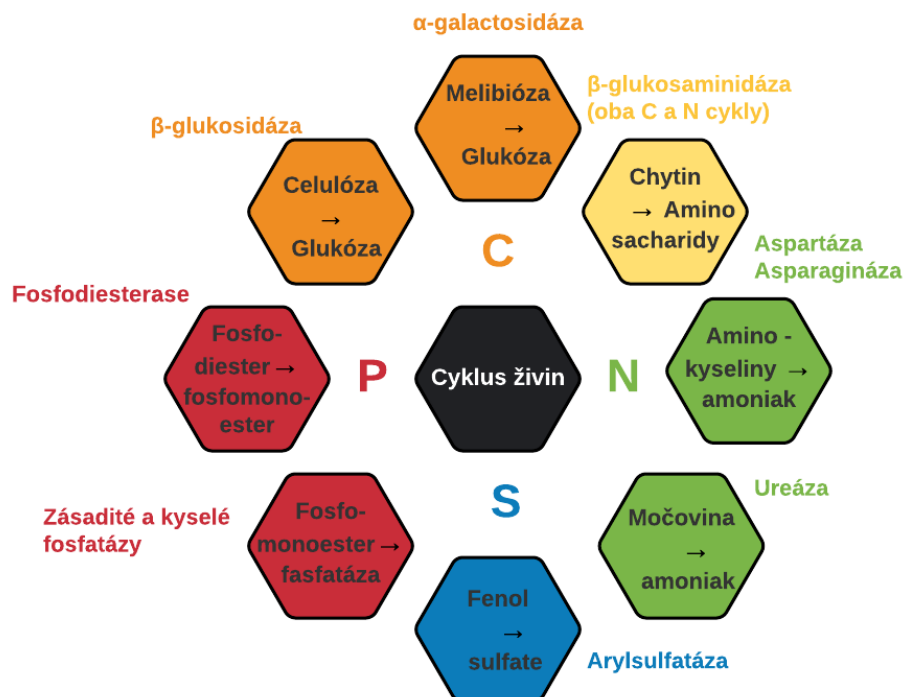
Význam půdních enzymů se nachází v jejich reakci na změnu hospodaření s půdou dlouho předtím, než jsou zjistitelné další změny indikátorů kvality půdy. Půdní enzymy hrají důležitou roli při rozkladu organických látek a koloběhu živin viz tabulka 1 a obrázek 2. Některé enzymy pouze usnadňují štěpení organické hmoty (hydroláza, glukosidáza), zatímco jiné se podílejí na mineralizaci živin (amidáza, ureáza, fosfatáza, sulfatáza). S výjimkou aktivit fosfatázy zatím nebylo prokázáno, že se aktivita enzymů přímo vztahuje k dostupnosti živin nebo produkci plodin. Vztah může být nepřímý, vzhledem k tomu, že mineralizace živin k formám dostupným pro rostliny je dosažena přispěním aktivity enzymu. [19], [21]

Tabulka 1: Úloha půdních enzymů [19]

Enzym	Substrát	Koncový produkt	Význam	Funkce v půdě
Beta glukosidáza	Sloučeniny uhlíku	Glukóza (cukr)	Energie pro mikroorganismy	Rozklad organické hmoty
Amidáza	Sloučeniny uhlíku a dusíku	NH ₄	NH ₄ pro rostliny	Koloběh živin
Ureáza	Dusík (močovina)	NH ₃ a CO ₂	NH ₄ pro rostliny	Koloběh živin
Fosfatáza	Fosfor	PO ₄	P pro rostliny	Koloběh živin
Sulfatáza	Síra	SO ₄	S pro rostliny	Koloběh živin

Absence nebo potlačení půdních enzymů předchází nebo omezuje procesy, které mohou ovlivnit výživu rostlin. Špatná aktivita enzymů (schopnost pesticidů degradovat enzymy) může vést k hromadění chemikálií, které mohou být škodlivé pro životní prostředí; určité chemikálie mohou dokonce inhibovat aktivitu půdních enzymů. [22]

Významnou roli při zvýšení enzymů v půdě hrají organické úpravy, střídání plodin a krycí plodiny. Pozitivní účinek pastviny je spojen se vstupem zvířecího hnoje a menším narušením půdy. Zemědělské metody, které mění pH půdy (vápnění), mohou do jisté míry změnit aktivitu enzymů. [22]



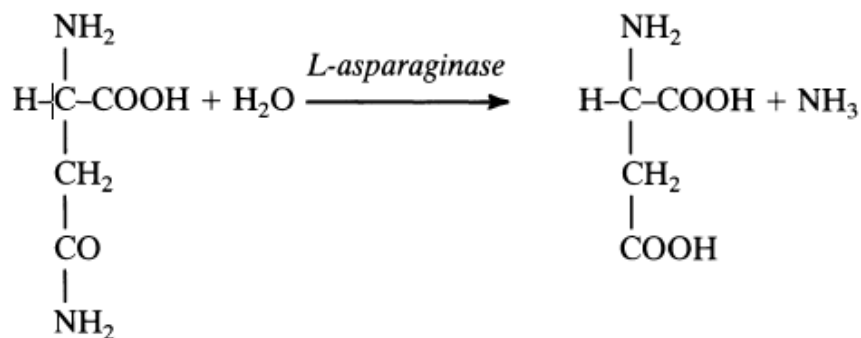
Obrázek 2: Enzymy katalyzující cyklus živin – půdní dynamika

2.3.1 Amidohydrolázy

V půdách se vyskytuje několik typů amidohydroláz. Všechny se účastní hydrolýzy přirozeného a přidaného organického N v půdě. Z nichž právě L-asparagináza, L-glutamináza, amidáza a ureáza jsou nejvýznamnější. [23]

Enzym L-asparagináza (L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1) hraje důležitou roli při mineralizaci N v půdách. Chemická podstata N v půdách je taková, že velká část (15-25 %) z celkového půdního N se často uvolňuje jako NH_4^+ kyselou hydrolýzou. Část uvolněného NH_4^+ pochází z hydrolýzy amidových (asparaginové a glutaminové) zbytků v půdní organické hmotě. Při kyselé hydrolýze huminových látek z celkového N bylo 7,3 až 12,6 % ve formě amidu. Procento NH_4^+ uvolněno během kyselé hydrolýzy je rovno nebo téměř rovno součtu kyseliny aspartové plus kyseliny glutamové odvozená od asparaginu a glutaminu. [23], [24]

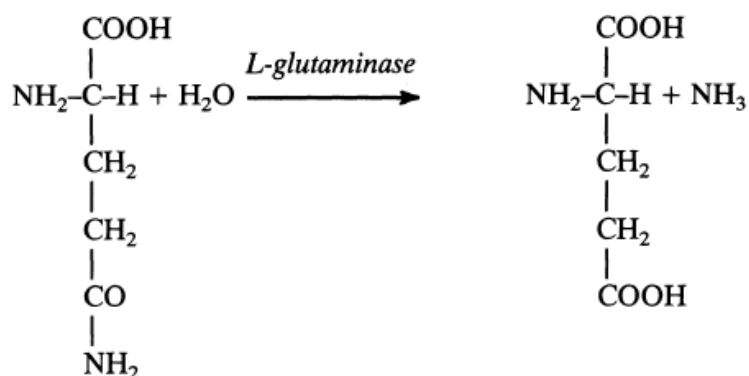
L-asparagináza katalyzuje hydrolýzu L-asparaginu za vzniku kyseliny L-asparaginové a NH_3 , jak je uvedeno na obrázku 3 [25]:



Obrázek 3: L-asparaginázová hydrolýza

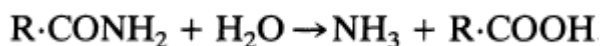
L-glutamináza patří mezi amidohydrolázy, které hrají důležitou roli při dodávání N rostlinám. Tato hydroláza je specifická tím, že působí na C-N vazby jiné než peptidové vazby v lineárních amidech. [26]

Reakce katalyzovaná pomocí L-glutaminázy (L-glutamine amidohydrolase, EC 3.5.1.2) zahrnuje hydrolýzu L-glutaminu za vzniku kyseliny L-glutamové a NH_3 , jak je znázorněno na obrázku 4 [26]:



Obrázek 4: L-glutaminázová hydrolýza

Amidáza (acylamide amidohydrolase, EC 3.5.1.4) je enzym, který katalyzuje hydrolýzu amidů na NH_3 a odpovídající karboxylové kyseliny viz obrázek 5 [27]:

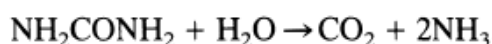


Obrázek 5: Amidázová hydrolýza

Amidáza působí na C-N vazby jiné než peptidové vazby v lineárních amidech. Je specifická pro alifatické a arylové amidy nemohou působit jako substráty. Tento enzym je široce

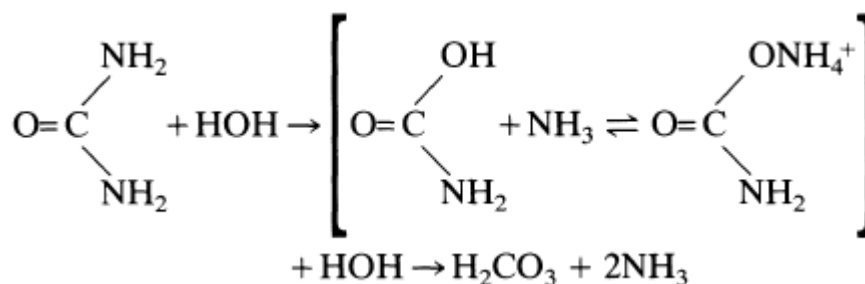
rozšířen a distribuováno v přírodě. Byl zjištěno u zvířat a mikroorganismů. Mezi mikroorganismy, u nichž je prokázáno, že mají amidázovou aktivitu, patří bakterie, kvasinky a houby. Substráty tohoto enzymu jsou zdrojem N pro rostliny. [28], [29]

Ureáza (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) je enzym, který katalyzuje hydrolyzu močoviny na CO_2 a NH_3 viz obrázek 6 [30]:



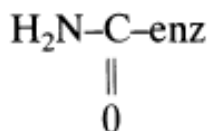
Obrázek 6: Ureázová hydrolyza

Působí na C-N vazby jiné než peptidové vazby lineárních amidů, a tak patří do skupiny enzymů, které zahrnují glutaminázu a amidázu. Jelikož jsou štěpeny dvě C-N vazby při hydrolyze močoviny ureázou, je zřejmé že stechiometrický vztah v rovnici je výsledkem komponentních reakcí. Karbamoyl je meziproduktem dvoustupňové reakce. Reakce se dá shrnout následovně viz obrázek 7 [30], [31]:



Obrázek 7: Dvoustupňová reakce [32]

Důkazy odvozené z kinetických údajů naznačují, že ureáza tvoří karbamoylový komplex znázorněn na obrázku 8:



Obrázek 8: Karbamoylový
komplex

jako jeden z ES (enzym – substrát) komplexů a voda je pravděpodobně akceptorem v reakci přenosu karbamoylu. Karbamát je tedy nutným substrátem pro druhý krok reakce. Vzhledem

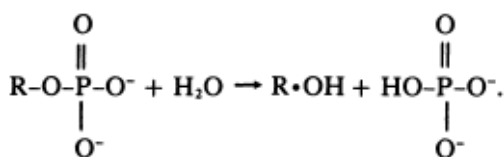
k tomu, že navrhovaný mechanismus je založen na kinetických studiích, je pro tento mechanismus stále zapotřebí přímých důkazů. [32]

Ureáza je v přírodě velmi široce distribuována. Byla detekována u mikroorganismů, rostlin a zvířat. [32]

2.3.2 Fosfatázy

Obecný název fosfatázy je používán k popisu široké škály skupiny enzymů, které katalyzují hydrolyzu jak esterů, tak anhydridů H_3PO_4 . Komise pro enzymy, Mezinárodní unie pro biochemii klasifikovala všechny tyto enzymy na pět hlavních skupin. Patří mezi ně fosforečné monoesterové hydrolázy (EC 3.1.3), diesterové hydrolázy fosforečné (EC 3.1.4), trihydrogenfosforečné hydrolázy (EC 3.1.5), působící enzymy anhydridy obsahující fosforyl (EC 3.6.1) a enzymy působící na P-N vazby (EC 3.9), jako je fosfoamidáza (EC 3.9.1.1). [33]

Fosfomonoesterázy, kyselá fosfatáza (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.2) a alkalické fosfatázy (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) jsou studovány velmi rozsáhle. Enzymy jsou klasifikovány jako kyselá a alkalická fosfatázy, protože ukazují své optimální aktivity v kyselém a alkalickém rozmezí. Z důvodu důležitosti těchto enzymů v mineralizaci půdního organického P a výživy rostlin se nashromáždila značná literatura na fosfomonoesterázách v půdě. Většina literatury, však souvisí s kyselou fosfatázou. V důsledku toho má tento enzym významné místo v půdní biochemii a enzymologii. Obecná rovnice reakce katalyzovaná kyselou a alkalickou fosfatázou jde znázornit rovnicí, která je popsána na obrázku 9: [34]



Obrázek 9: Fosfatázová hydrolyza

Jedna z nejzajímavějších vlastností kyselých a alkalických fosfatáz je jejich specifita. Ačkoli většina z dostupných informací těchto enzymů se týká kyselých fosfatáz v půdách, jsou tyto známy tím, že hydrolyzují různé fosfomonoestery. V půdě byly zdokumentovány hydrolyzy β -glycerofosfátu, fenyfosfátu, β -naftyl fosfátu a p-nitrofenyl fosfátu. [35]

Kyselá fosfatáza převládá v kyselých půdách a alkalická fosfatáza v alkalických půdách. Inverzní vztah mezi aktivitou fosfatázy a pH půdy to naznačuje rychlost syntézy a uvolňování tohoto enzymu půdními mikroorganismy a stabilita tohoto enzymu v souvislosti s pH půdy. Vzhledem k tomu, že vyšší rostliny postrádají aktivitu alkalické fosfatázy se zdá, že aktivita alkalické fosfatázy v půdě je pouze produkcí mikroorganismů. [36]

Hodnoty Michaelisovy konstanty K_m kyselé fosfatázy v půdě se pohybují od 1,3 do 4,5 mM; hodnoty alkalické fosfatázy se pohybují od 0,4 až 4,9 mM. Adsorpce fosfatáz na jílovitých minerálech významně mění kinetické parametry. Podobně jako ostatní kinetické studie půdních enzymů, hodnoty K_m získané pro fosfomonoesterázy jsou ovlivňovány třepáním směsi půdy a substrátu během inkubace; za normálních podmínek jsou hodnoty při třepání mezi půdami rovnoměrnější než při použití techniky statické inkubace. [37], [38]

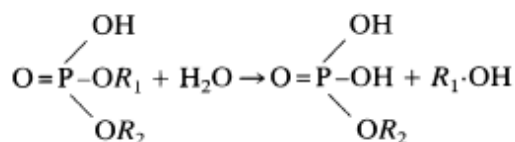
Studie prokázaly, že všechny těžké kovy a stopové prvky inhibují fosfomonoesterázy v půdě; stupeň inhibice souvisí s půdou a typem a koncentrací použitých stopových prvků. Kinetické studie naznačují, že ortofosfát je kompetitivní inhibitor kyselých a alkalických fosfatáz v půdě. [39]

Pro měření aktivity fosfomonoesterázy bylo navrženo několik metod. Základní rozdíl je v použití substrátu a následně v technice použité při měření produktu hydrolyzy substrátu fosfatázovými enzymy. [40]

Aktivitu půdní fosfatázy můžeme stanovit fenolem uvolněný inkubací půdy s fenylfosfátem a postupem, ve kterém je β – glycerofosfát hydrolyzován při inkubaci půdy s organickým fosfátem a je stanoven extrahovatelný celkový obsah a anorganického P po inkubaci. Tato metoda je zdlouhavá a časově náročná a má nízkou přesnost. Další metoda podle zahrnuje fluorimetrický test β – naftolu uvolněného inkubace půdy s β – naftyl fosfátem, ale tato metoda je komplikovaná kvůli sorpci β – naftolu složkami půdy a vyžaduje, aby kapacita každé půdy analyzované na sorpci β – naftolu byla stanovena a povolena pro výpočet výsledků. [40], [41], [42]

Z různých metod dostupných pro stanovení aktivity fosfatázy v půdě, je nejvíce rychlá a přesná metoda zahrnující kolorimetrické stanovení *p*-nitrofenolu uvolněného při inkubaci půdy s roztokem pufru obsahující substrát *p*-nitrofenylfosforečnanu sodného a toluenu. Postup slouží k extrakci *p*-nitrofenolu uvolněného aktivitou fosfatázy za vzniku stabilní barvy, používá se k vyhodnocení fenolu a poskytuje kvantitativní data *p*-nitrofenolu přidaného do půd. [41]

Z půdních fosfatáz je nejméně studována fosfodiesteráza (orthophosphoricdiester phosphohydrolase, EC 3.1.4.1). Fosfodiesteráza katalyzuje reakci znázorněnou na obrázku 10:



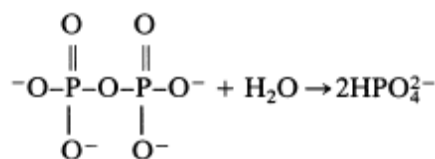
Obrázek 10: Fosfodiesterázová hydrolýza

kde R_1 a R_2 představují buď alkoholové nebo fenolové skupiny či nukleosidy. [43]

Aktivita fosfodiesterázy byla detekována v různých rostlinách, zvířatech a mikroorganismech. Tento enzym je známý svou schopností degradovat nukleovou kyselinu. [44]

Studie inhibice půdní fosfodiesterázy ukázaly, že 5mM ortofosfát, EDTA a citrát představují inhibitory tohoto enzymu. Podobně jako při inhibici aktivity fosfomonoesterázy je ortofosfát kompetitivní inhibitor fosfodiesterázy v půdách. Kinetické studie naznačují že zjevné hodnoty K_m tohoto enzymu v půdách se pohybují od 1,3 do 2,0mM, Q_{10} je 1,7 a průměrná aktivační energie je 37 kJ/mol. Na aktivitu fosfomonoesterázy a fosfodiesterázy má vliv mnoho faktorů v půdě. [44]

Anorganická pyrofosfatáza (pyrophosphate phosphohydrolase, EC 3.6.1.1) katalyzuje hydrolýzu pyrofosfátu na ortofosfát. Celková reakce je znázorněna na obrázku 11:



Obrázek 11: Hydrolýza pyrofosfátu

Podobně jako ostatní fosfatázy je anorganická pyrofosfatáza široce rozšířená v přírodě. Její přítomnost byla nalezena u bakterií, hmyzu, ve tkáních savců a rostliny. [45]

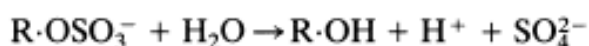
Aktivité tohoto enzymu v půdě byla věnována zvláštní pozornost, protože jeho substrát, pyrofosfát, se používá jako hnojivo. Dostupné informace naznačují že aktivita pyrofosfatázy v půdách je při optimálním pH pufru 8,0. Formaldehyd, fluoridy, oxalát, a uhličitan inhibují

aktivitu tohoto enzymu v půdě. Aktivita pyrofosfatázy v půdě je inhibována mnoha kovy a mezi kompetitivní inhibitory tohoto enzymu v půdě patří právě AsO_4^{3-} , BO_3^{2-} , MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} , VO^{2+} a WO_4^{2-} . Při nízkých koncentracích jsou však kovy považovány za aktivátory pyrofosfatázy v půdě. Kinetické studie s povrchovými půdami ukázaly, že hodnoty K_m pyrofosfatázy v půdách se pohybují od 20 do 51 mM a hodnoty aktivační energie se pohybují od 32 do 43 kJ/mol. [46]

Podobně jako u jiných enzymových aktivity v půdě, aktivita pyrofosfatázy se koncentruje na povrchu půdy a klesá s hloubkou, významně koreluje s organickým C v povrchových půdách a půdních profilech. Aktivita pyrofosfatázy také koreluje s procentem jílu a molárním podílem $\text{Mg}/(\text{Mg} + \text{Ca})$ ve vodních extraktech povrchových půd a významně, ale negativně koreluje s procentem CaCO_3 ekvivalentní v povrchových půdách. Na rozdíl od některých jiných půdních enzymů, sušení vlhkých půd na vzduchu snižuje pyrofosfatázovou aktivitu. [47]

2.3.3 Arylsulfatázy

V přírodě se vyskytuje několik typů sulfatáz. Byly klasifikovány podle typu organických sulfátových esterů, které hydrolyzují, rozeznáváme několik hlavních skupin sulfatáz: arylsulfatázy, alkylsulfatázy, steroidní sulfatázy, glukosulfatázy, chondrosulfatázy a myrosulfatázy. Arylsulfatáza (arylsulfate sulfohydrolase, EC 3.1.6.1) je enzym, který katalyzuje hydrolyzu arylsulfátového aniontu štěpením vazby O-S, reakce je znárodněna na obrázku 12:



Obrázek 12: Hydrolyza arylsulfátového aniontu

Reakce je nevratná a neexistuje žádný důkazy o tom, že by akceptor SO_4^{2-} mohl být jiný než voda a nebo že pro jeho katalytickou funkci je nutný nějaký kovový ion. Tento enzym byl poprvé objeven v roce 1911 u fialových hlemýžďů Derrien² a byl zjištěn i u rostlin, zvířat a mikroorganismů. Protože tento enzym byl první sulfatázou, která byla detekována přírodě, dostalo se mu více pozornosti než jiným skupinám sulfatáz. [48], [49]

Arylsulfatáza je částečně odpovědná pro cyklus S v půdě. Hlavní rolí tohoto enzymu je mineralizace S, 40 až 70 % (prům. 50 %) celkové S v povrchových půdách mírných oblastí je redukováno na H_2S pomocí HI a je převedeno na anorganický SO_4^{2-} . Tato zjištění

naznačují že tato frakce S v povrchových půdách je přítomna ve formě esteru sulfátu (organické sulfáty). Arylsulfatáza má důležitou roli v procesech, při nichž je půda s obsahem organické S mineralizována a následně je k dispozici pro růst rostlin. [50]

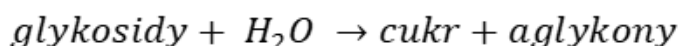
Postup, který byl použit pro stanovení aktivity arylsulfatázy v půdách, zahrnuje stanovení *p*-nitrofenolu uvolněného při inkubaci půdy s pufrovaným roztokem *p*-nitrofenylsulfátu a toluenem při 37 ° C po dobu 1 hodiny. Testy ukázaly, že aktivita arylsulfatázy v půdě je inaktivována při teplotách v rozmezí od 60 do 70 ° C. Hodnoty K_m se pohybují v rozmezí od 0,2 do 5,7mM. Stanovení je ovlivněno třepáním směsi půda-pufr-substrát během inkubace; obvykle K_m hodnoty jsou nižší a rovnoměrnější mezi půdami při inkubaci s třepáním než při použití statické techniky. [50]

Studie faktorů ovlivňujících aktivitu arylsulfatázy ukázaly, že aktivita tohoto enzymu klesá s hloubkou v půdních profilech, která je spojena s poklesem obsahu organické hmoty. Aktivita arylsulfatázy významně koreluje s obsahem organických látek. V povrchových půdách se výrazně liší v chemických a fyzikálních vlastnostech. Arylsulfatáza je v půdě inhibována i některými stopovými prvky, například prvky MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} , AsO_4^{3-} a PO_4^{3-} vykazují kompetitivní kinetiku. Při koncentraci do 25 $\mu\text{mol/g}$ půdy, běžné anionty zemin, jako NO_2^- , NO_3^- , Cl^- a SO_4^{2-} neinhibují tento enzym. [51]

Sušení vlhkých půd vede ke zvýšení arylsulfatázové aktivity. Možným vysvětlením tohoto nárůstu je to, že sušení vlhké půdy na vzduchu způsobí rozpad agregátů, čímž se zvýší dostupnost arylsulfatázy pro substrát. [50]

2.3.4 β -Glukosidáza

Enzymy působící na glykosylové sloučeniny (EC 3.2), včetně glykosidů hydrolázy (EC 3.2.1), patří mezi nejméně studované hydrolázy v půdě. Obecný název glykosidázy nebo glykosidové hydrolázy je používán k popisu skupiny enzymů, které katalyzují hydrolýzu různých glykosidů. Obecná rovnice reakce je znázorněna na obrázku 13:



Obrázek 13: Hydrolýza glykosidu

Obecně lze glykosid definovat jako směsný acetal vzniklý z výměny alkylové nebo arylové skupiny za vodíkový atom hemiacetal hydroxylové skupiny cyklické aldózy nebo ketózy. Aglykon je nekarbohydrátová část připojená k sacharidové části (glykosylový zbytek)

glykosidu. Aby se předešlo nejednoznačnosti, jako glykosidy se určují ty látky, které při kyselé hydrolyze uvolňují jeden nebo několik monosacharidů a aglykon. Enzymová komise Mezinárodní unie pro biochemii klasifikovala všechny tyto enzymy na 39 skupiny. Patří mezi ně enzymy jako je celulóza, amyláza a některé důležité glykosidázy, které katalyzují hydrolyzu disacharidů. Glykosidázy byly obvykle pojmenovány podle typu vazby, kterou hydrolyzují. Z glykosidáz je to α -glukosidáza (maltase, EC 3.2.1.20), která katalyzuje hydrolyzu α -D-glukopyranosidu a β -glukosidáza (celobiase, EC 3.2.1.21), která katalyzuje hydrolyzu β -D-glukopyranosidu, podílejí se na hydrolyze maltózy a celobiózy. Dalšími důležitými glykosidázami jsou α -galaktosidáza (melibiase, EC 3.2.1.22) a β -galaktosidáza (lactase, EC 3.2.1.23). Tyto enzymy katalyzují hydrolyzu melibiózy a laktózy. Aktivita β -glukosidázy ze všech čtyř glykosidáz v půdě nejvíce převládá. [52], [53]

Glukosidázy a galaktosidázy jsou v přírodě široce distribuovány a byly také detekovány v půdách. Díky široké distribuci β -glukosidázy v houbách, kvasinkách a rostlinách byla umožněna studie tohoto enzymu. β -Glukosidáza je v půdě dominantnější než α -glukosidáza a α a β -galaktosidázy. Produkty hydrolyzy β -glukosidázy jsou důležitými zdroji energie pro mikroorganismy v půdě. [54]

Enzym je inaktivován v půdě při 70 ° C a jeho aktivita koreluje s obsahem organického C v povrchových půdách a půdních profilech. Kinetické studie ukázaly, že hodnoty K_m tohoto enzymu pro *p*-nitrofenyl- β -D-glukosid v povrchových půdách se pohybují od 1,3 do 2,4mM a průměrná hodnota aktivační energie β -glukosidázy v půdách je 28 kJ/mol. [54]

2.3.5 Esterázy

Půdní esterázy jsou vylučovány širokou škálou mikroorganismů a podílejí se na degradaci olejů, pesticidů, biologicky odbouratelných plastů a vosků. Přestože esterázy hrají důležitou roli v oběhu materiálu a toku uhlíku v půdě, je zatím málo prozkoumán jejich vztah k půdnímu metabolismu. [55], [56], [57]

Aktivita esterázy v půdě se obecně určuje kolorimetricky s použitím esterů mastných kyselin spojených s *p*-nitrofenolem (*p*NP) jako substrátem. Žlutá barva, vzniká přidáním 2M tris(hydroxymethyl)aminomethanu a následně je změřena absorbance při 405 nm (A_{405}). [58], [59]

Vztah pro výpočet aktivity půdní esterázy:

$$A_{405} = (\bar{A}t_0 - \bar{B}t_0 - \bar{C}t_0) - (\bar{A}t_{30} - \bar{B}t_{30} - \bar{C}t_{30}) \quad (1)$$

kde \bar{A} je průměrná absorbance tří měření reakčního pufru; \bar{B} je reakční pufr bez půdy, jako slepý pokus (blank); a \bar{C} je reakční pufr, bez *p*NP derivátu pro kontrolu pozadí. Indexy t_0 a t_{30} označují dobu inkubace pro 0 min a 30 min. Odečtením \bar{B} z \bar{A} je kompenzován přírůstek odvozené absorbance z autohydrolyzy derivátu *p*NP. Odečtením \bar{C} z \bar{A} je kompenzován přírůstek absorbance z půdních eluátů. Skutečný přírůstek při absorbance 405 nm odvozen od uvolněného *p*NP je stanoven odečtením kompenzované absorbance v čase 0 min od 30 min. [59]

2.3.6 Invertáza

Enzym invertázy (beta-fruktofuranosidáza) je globulární protein, který hydrolyzuje sacharózu v živých organismech a uplatňuje se v koloběhu uhlíku. Invertáza široce distribuovaná v biosféře, zejména v pekařských kvasnicích a rostlinách. Invertáza (beta-D-fructofuranoside, EC 3.2.1.26) je enzym, který je schopen rozložit α -1,4 – glykosidovou vazbu mezi D–glukózou a D–fruktózou sacharózy, tak přenést zbytek α/β -D–fruktofuranosidu na akceptorový substrát. Invertáza proto působí jako hydrolyzující enzym, ale má také transferázovou aktivitu, zejména při vysoké koncentraci sacharózy. Tato vlastnost invertázy ji lokalizuje do třídy transferázy enzymu známého jako fruktosyltransferáza. Také další oligosacharidy, jako je ketóza, rafinóza a sacharóza, jsou hydrolyzovány invertázou. [60]

3 REALIZOVANÉ PRÁCE POJEDNÁVAJÍCÍ O STANOVENÍ PŮDNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

Tabulka 2: Přehled referencí zabývajících se enzymovými aktivitami

Stanovovaná enzymová aktivita	Pufr	pH pufru	Substrát	Metabolismus	Reference
Esteráza	Tris-maleinový	6	<i>p</i> -Nitrophenyl valerate/acetate	Cyklus uhlíku	Tsuboi et al., 2018
β -glukosidáza	MUB	6	<i>p</i> -Nitrophenyl- β -glucopyranoside	Cyklus uhlíku	Jackson, Tyler a Millar, 2013
α -glukosidáza	MUB	6	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glukopyran	Cyklus uhlíku	Eivazi a Tabatabai, 1988
α -galactosidáza	MUB	6	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	Cyklus uhlíku	Acosta-Martínez et al., 2000
β -glukosaminidáza	MUB	6	<i>p</i> -Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide	Cyklus uhlíku a dusíku	Acosta-Martínez et al., 2019
L-Aspartáza	Tris-HCl	5,1 – 7,9	L-Aspartate	Cyklus dusíku	Senwo a Tabatabai, 1999
Ureáza	Octanový sodný	5	Močovina	Cyklus dusíku	Cordero, Snell et al., 2019
Fosfomonoesteráza (kyselá a alkalická)	MUB	6–11	<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	Cyklus fosforu	Acosta-Martínez et al., 2019
Fosfodiesteráza	Octanový	8	Bis- <i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	Cyklus fosforu	Mori et al., 2020
Arylsulfatáza	Octanový	5,8	<i>p</i> -Nitrophenyl sulfate	Cyklus síry	Li, 2003

3.1 Metoda stanovení aktivity esterázy

Ve studii (Tsuboi et al., 2018) byla esterázová aktivita v půdě stanovena za použití *p*-nitrofenol-valerátu (*p*NP) jako substrátu. Do 96 jamkové destičky bylo naváženo 30 až 50 mg půdy bylo přidáno 0,1 ml toulenu a následně proběhla inkubace s esterovým substrátem (2 mmol · l⁻¹ *p*NP – valerát) v 0,6 ml Tris(hydroxymethyl)aminomethan-maleinovém pufru (0,5 mol · l⁻¹, pH 6,0) při teplotě 30 °C a po dobu 30 minut. Po inkubaci byl obsah odstředěn pomocí centrifugy (3000 x g, 5 minut). Následně bylo odebráno 75 μ l supernatantu, který byl smíchán s 20 μ l ledového ethanolu (-80 °C). Následně bylo přidáno 55 μ l 2 mol · l⁻¹ Tris a směs byla několik sekund míchána. Absorbance směsi byla měřena při 405 nm. Od

výsledné absorbance byla odečtena absorbance *p*NP-valerátu v pufru a absorbance každé směsi původního extraktu bez substrátu jako kontrolního vzorku a pozadí. [59]

3.2 Metoda stanovení β -glukosidázy

Stanovení aktivity β -glukosidázy bylo popsáno ve studii (Jackson, Tyler a Millar, 2013). Pro stanovení aktivity byl připraven 50mM octanový pufr o pH v rozmezí 5 – 5,5. Následně byl připraven roztok 1M NaOH a *p*NP- β -glucopyranosidový substrát v 50mM pufru. K 1 g půdy bylo přidáno 5 ml pufru a směs byla homogenizována pomocí vortexu. Poté proběhlo odstředění a bylo odpipetováno 150 μ l supernatantu na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Následně se přidalo 150 μ l substrátu do 3 vzorků, 150 μ l pufru do 3 slepých vzorkům pro kontrolu a pro kontrolu byl do prázdných jamek nepipetován substrát ke kontrole. Inkubace probíhala při 22 °C po dobu 1 h. Do nové 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo nepipetováno 10 μ l 1M NaOH a 190 μ l demineralizované H₂O. Po inkubaci byla 96 jamková mikrotitrační destička odstředěna a bylo přeneseno pomocí multikanálové pipety 100 μ l supernatantu na novou 96 jamkovou mikrotitrační destičku s NaOH a dH₂O a byla změřena absorbance při 410 nm. [61]

3.3 Metoda stanovení aktivity ureázy

Stanovení ureázové aktivity půdy bylo zkoumáno ve studii (Cordero, Snell a Bardgett, 2019), kde byly naváženy 4 g půdy, které následně byly suspendovány v 10 ml pufru octanu sodného (50mM, pH 5,0) v kónických baňkách k vytvoření suspenze. Půdní suspenze byla důkladně homogenizována mícháním, dokud nebyly viditelné agregáty rozpuštěny. Suspenze může být vložena do ultrazvukové lázně k uvolnění extracelulárních enzymů imobilizovaných na huminových koloidech. Ze suspenze bylo za stálého míchání odebráno 0,25 ml do 2 ml ml zkumavky. Vzorek byl rozdělen do 6 zkumavek: 4 zkumavky, které byly inkubovány s močovinou (analytické replikáty) a 2 pro kontrolu (kontrolní vzorky), k zohlednění počátečního obsahu amoniaku ve vzorku. K analytickým replikátům bylo přidáno 0,1 ml 80mM roztoku močoviny a ke kontrolním vzorkům bylo přidáno 0,1 ml pufru. Následně byly přidány čtyři kontroly substrátu, kde byla půdní suspenze nahrazena puftrem, pro zohlednění možného zbarvení roztoku močoviny nebo kontaminace amoniakem v činidlech. Zkumavka byla uzavřena a vzorky byly inkubovány při 18 °C po dobu 2 hodin za nepřetržitého třepání. Po inkubaci byl do každé jamky přidán 1 ml 2M KCl a zkumavky byly uzavřeny a třepány po dobu dalších 30 minut. Zkumavky byly následně centrifugovány (2900 x g, 5 min) a do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo odměřeno 75 μ l supernatantu

a následně smícháno se 75 μl vody. Koncentrace amoniaku je hodnocena Berthelotovou reakcí, která byla provedena dvěma různými činidly: oxidačním roztokem (1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sodné soli kyseliny dichlorisokyanurové) a barevným činidlem [směs 2: 1 (v: v) roztoku A a B, které by měly být smíchány těsně před použitím]. Roztok A: 0,15M NaOH. Roztok B: 170 mg ml^{-1} salicylát sodný a 1,278 mg ml^{-1} dihydrátu nitroprusidu sodného. Pro měření amoniaku bylo do každé jamky přidáno 75 μl barevného činidla a následně 30 μl oxidačního roztoku. Každá jamka byla promíchána pipetováním a zbarvení bylo hodnoceno po 30 minutách při absorbanci 650 nm. Aktivita ureázy ($\mu\text{g N} - \text{NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ suché půdy) byla vypočtena dle rovnice na obrázku 1:

$$\text{Aktivita} = \frac{\Delta\text{NH}_4^+ \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \cdot \text{objem v jamce (1,35 ml)}}{\text{Doba inkubace (2 h)} \cdot \text{g vlhké půdy v jamce (0,1 g)} \cdot (1 - \text{vlhkost})}$$

Obrázek 14: Vztah pro výpočet aktivity ureázy

ΔNH_4^+ představuje koncentraci amoniaku v inkubovaných jamkách, od kterých je odečtena koncentrace amoniaku v kontrolním vzorku a kontrolním substrátu. Tyto koncentrace byly vypočteny porovnáním se standardní křivkou amoniaku (0 – 3,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) připravenou stejným postupem (1: 0,35: 1,35; v: v: v; 2M KCl: acetátový pufr: voda). [62]

3.4 Metoda stanovení fosfatázy

Aktivity byly měřeny pro tři půdní fosfatázy: ACP (kyselá fosfatáza) (Enzyme Commission 3.1.3.2), ALP (alkalická fosfatáza) (EC 3.1.3.1) a fosfodiesteráza (EC 3.1.4.1; PDE). Enzymy byly testovány dvakrát vedle sebe pro každou půdu. Byl navážen 1 g půdy sušené v sušárně a inkubované po dobu 1 hodiny při 37 °C ve 4 ml modifikovaného univerzálního pufru (MUB) při pH 6,5 pro ACP a při pH 11,0 pro ALP a 4 ml 5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol) pufr při pH 8,0 pro PDE. Testy používaly finální koncentraci substrátu 25 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ na g půdy para-nitrofenyl fosfát (ACP a ALP) a bis-para-nitrofenylfosfát (PDE). Tato koncentrace substrátu, byla použita k zajištění toho, aby byly enzymové aktivity měřeny za podmínek nasycení substrátem (tj. v_{max}). Pro zlepšení přesnosti a citlivosti enzymových testů byly provedeny terminační podmínky k minimalizaci interference z rozpuštěné organické hmoty v půdách s vysokým organickým uhlíkem. Reakce byly zastaveny přidáním 4 ml 0,2 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH, ACP a ALP testech a 4 ml 0,1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris (pH 12,0) na PDE, poté je přidán ke všem vzorkům 1 ml 2 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CaCl_2 .

Vzorky byly centrifugovány (3000 x g) k odstranění sedimentu. Produkt *p*-nitrofenol (*p*NP) v čirém supernatantu byl kvantifikován kolorimetricky pomocí absorbance při 410 nm. Střední absorbance trojitých negativních kontrol byla odečtena od absorbance půdních testů, aby se zohlednila neenzymatická hydrolýza substrátu během inkubace. [63]

3.5 Metoda pro stanovení arylsulfatázy

Ve studii (Li, 2003) je popsán postup pro stanovení aktivity arylsulfatázy. Půdní vzorky byly inkubovány s 0,5M acetátovým pufrům pH 5,8 a *p*NP – sulfátem po dobu 1 h. Uvolnění *p*NP byl extrahován a určen kolorimetricky. Celková aktivita arylsulfatázy byla měřena pomocí absorbance při 410 nm. [64]

3.6 Kombinovaná metoda pro stanovení čtyř enzymových aktivit

Kombinovaná metoda pro stanovení čtyř enzymových aktivit byla popsána ve studii (Acosta-Martínez, Pérez-Guzmán a Johnson, 2019). Enzymové aktivity byly vybrány pro jejich roli v reakcích uvolňující biologicky dostupné živiny v cyklech C (β -glukosidáza), N a C (β -glukosaminidáza), P (kyselá fosfomonoesteráza) a S (arylsulfatáza). Jako inkubační pufr byly použity MUB (modifikovaný univerzální pufr) (pH 7) a acetátový pufr (pH 5,8). K 0,5 g půdy sušené na vzduchu byly přidány 2 ml příslušného pufru a 2 ml roztoku substrátu (0,5 ml každého substrátu připraveného ve stejném pufru použitým v testu) při optimálním pH a následně půda byla inkubována po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 0,5 ml 1M CaCl₂ a 2 ml a následně reakce byla ukončena přidáním 2 ml 0,1M THAM pH 12,0. Uvolněný produkt (*p*-nitrofenol) byl stanoven kolorimetricky při $\lambda = 400$ nm. Hodnoty aktivit získané z kontrolních vzorků byly odečteny od hodnoty vzorku. [65]

3.7 Metoda stanovení invertázy

Aktivita invertázy se stanoví za použití roztoku sacharózy jako substrátu, fosfátového pufru a dvou kapek toluenu. Inkubace probíhá po dobu 4 hodin při 37 °C. Suspenze se přefiltruje a k 0,25 ml filtrátu se přidá 2 ml indikátoru (kyselina 3,5–dinitrosalicylová) a směs se vaří 10 minut ve vodní lázni a poté ochladí. Intenzita zbarvení se stanovuje kolorimetricky při $\lambda = 508$ nm. [3], [66]

3.8 Metoda stanovení aktivity celulózy

Je naváženo 150 g mokré půdy do polyethylenových misek. Na půdu se vloží kotouček silonové tkaniny, zvážený kotouček filtračního papíru a opět kotouček tkaniny, který se

překryje 100 g půdy. Zakrytá miska se inkubuje při 28 °C po dobu 3 týdnů za průběžného zvlhčování. Výsledkem je stanovení váhového úbytku celulózy (filtračního papíru) po inkubaci v jednotlivých půdních vzorcích. [3]

3.9 ISO 20130 Kvalita půdy — Měření vzorů enzymových aktivit v půdních vzorcích pomocí chromogenních substrátů v mikrotitračních destičkách

Norma je zaměřena na měření několika hydrolázových aktivit (arylamidáza, arylsulfatáza, β -glukosidáza, α -glukosidáza, β -galaktosidáza, N-acetyl-glukosamidáza, kyselá, alkalická fosfatáza a ureáza) současně v půdních vzorcích pomocí kolorimetrických substrátů. Enzymové aktivity půd se liší v závislosti na chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech. Tato metoda nachází využití zejména k detekci škodlivých účinků na půdní enzymové aktivity, a to zejména deriváty toxických látek nebo jiné antropogenní látky v kontaminované půdě proti kontrolní půdě nebo k testování chemikálií. [67]

Metoda je založena na použití vzorku půdy, který je extrahován v demineralizované vodě a kolorimetrického substrátu. Extrakt se substrátem je inkubován specifickou dobu při teplotě 25–37 °C na několika mikrotitračních destičkách. Po inkubaci jsou reakce zastaveny, destička je odstředěna a supernatant je přenesen na novou destičku. Intenzita zbarvení je měřena absorbancí pomocí spektrofotometru UV/VIS pro 96 jamkové mikrotitrační destičky. [67]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 OPTIMALIZACE A METODIKA

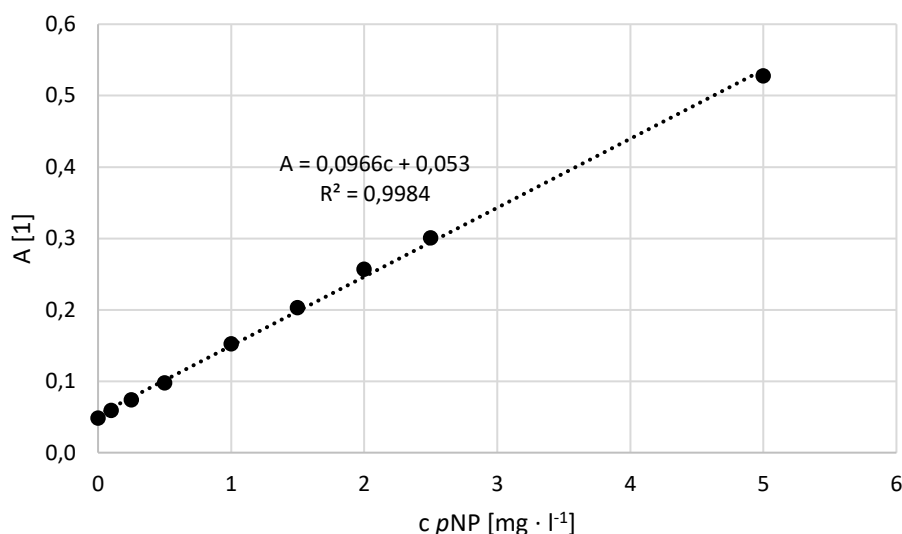
Pro zvolené enzymové aktivity byly vybrány vhodné podmínky na základě provedených experimentů, tak aby byla zajištěna opakovatelnost a reprodukovatelnost experimentů. V optimalizaci hrála důležitou roli teplota, doba inkubace, rozpustnost substrátu a jeho koncentrace, poměr vzorku půdy k inkubačnímu médiu, pH roztoku v 96 jamkové mikrotitrační destičce a vlnová délka, při které byla měřena absorbance v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Pro optimalizaci a vyzkoušení metodiky byla použita zkušební půda odebrána v obci Zahnašovice, která byla skladována ve tmě při laboratorní teplotě. Optimalizací se snažilo docílit podobných postupů u vzorků, tak aby bylo možno porovnávat výsledné enzymové aktivity mezi sebou a vyhodnotit údaje o vzorcích testovaných půd. Takto optimalizované postupy pro měření enzymových aktivity byly použity u 13 vzorků půd dodaných kolegou z Mendelovy univerzity. Vzorky půdy byly dodány v lyofilizovaném stavu a uchovány v mrazícím zařízení při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, před použitím byly vzorky přivezeny na laboratorní teplotu.

4.1 Příprava kalibrační křivky *p*-nitrofenolu

Zásobní roztok *p*NP byl připraven rozpuštěním 0,0101 g *p*NP ve 100 ml pufru TRIS pH 12. Ze zásobního roztoku byla připravena řada o koncentraci $c_{pNP} = 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5$ a $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku bylo odebráno 250 μl roztoku o dané koncentraci *p*NP. Absorbance byla měřena při vlnové délce 410 nm. Z výsledných hodnot absorbance ku koncentraci *p*NP vyšla rovnice přímky (viz obrázek 15), ze které byly vypočítány koncentrace enzymových aktivity používajících substrát s obsahem *p*NP pro obě metody.

Tabulka 3: Hodnoty absorbance a koncentrací *p*NP

$c_{pNP} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	0	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	5
A [1]	0,053	0,062	0,073	0,095	0,146	0,190	0,245	0,290	0,524
	0,048	0,053	0,075	0,096	0,147	0,205	0,247	0,297	0,549
	0,046	0,061	0,072	0,096	0,154	0,202	0,258	0,301	0,540
	0,047	0,063	0,071	0,099	0,151	0,201	0,226	0,299	0,513
	0,054	0,057	0,075	0,099	0,157	0,237	0,252	0,304	0,522
	0,050	0,063	0,080	0,099	0,152	0,202	0,251	0,300	0,526
	0,053	0,057	0,075	0,099	0,153	0,205	0,255	0,301	0,529
	0,048	0,058	0,072	0,096	0,151	0,202	0,257	0,303	0,528



Obrázek 15: Závislost koncentrace *p*-nitrofenolu na absorbanci

$$A = 0,0966c + 0,053$$

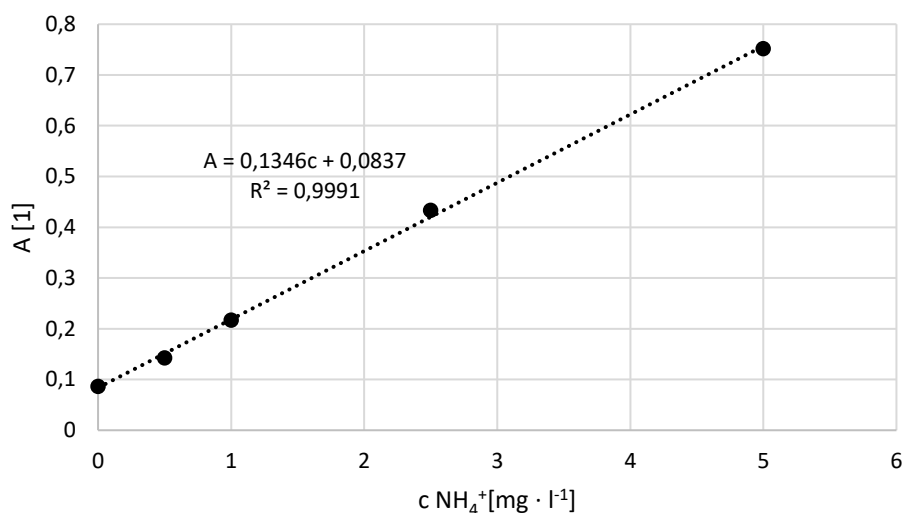
kde: A – absorbance [1] a c – koncentrace [mg (*p*NP) · l⁻¹].

4.2 Příprava kalibrační křivky amonných iontů

Zásobní roztok amonných iontů NH₄⁺ byl připraven rozpuštěním 0,0297g NH₄Cl ve 100 ml dH₂O. Ze zásobního roztoku byla připravena řada o koncentraci $c_{\text{NH}_4^+} = 0; 0,5; 1; 2,5$ a 5 mg · l⁻¹. Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku bylo odebráno 75 μl roztoku o dané koncentraci amonných iontů, ke kterému bylo přidáno 30 μl oxidačního činidla, 75 μl barevného činidla připraveného těsně před přidáním a 75 μl dH₂O. Absorbance byla měřena při vlnové délce 660 nm. Z výsledných hodnot absorbance ku koncentraci NH₄⁺ vyšla rovnice přímky (viz obrázek 16) pro enzymovou aktivitu ureázy, ze kterých byly počítány koncentrace NH₄⁺ ve vzorcích pro obě metody.

Tabulka 4: Hodnoty absorbancí a koncentrací amonných iontů

$c_{\text{NH}_4^+}$ [mg · l ⁻¹]	0	0,5	1	2,5	5
A (1)	0,095	0,141	0,215	0,442	0,808
	0,079	0,147	0,220	0,434	0,790
	0,084	0,140	0,216	0,423	0,657



Obrázek 16: Závislost koncentrace amonných iontů na absorbanci

$$A = 0,1346c + 0,0837$$

kde: A – absorbance [1] a c –koncentrace [$\text{mg} (\text{NH}_4^+) \cdot \text{l}^{-1}$].

4.3 Metoda stanovení enzymové aktivity půd v mikrozkušavkách

4.3.1 Kyselá fosfatáza

a) Postup

Pro přípravu modifikovaného univerzálního pufru (MUB) $\text{pH} = 6,5$ bylo naváženo 12,1 g TRIS, 11,6 g kyseliny maleinové, 14 g kyseliny citronové, 6,3 g kyseliny borité a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 0,025M roztok substrátu *p*-Nitrophenyl Phosphate (*p*NP) rozpuštěním 46,4 mg substrátu v 5 ml pufru. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 170 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkušavkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 713 μl MUB a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M

chloridu vápenatého a 0,5M hydroxidu sodného a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μ l supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Data

Tabulka 5: Hmotnost půdy pro stanovení aktivity kyselé fosfatázy

Vzorek	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	Průměr
m ₁ [g]	0,1720	0,1714	0,1718	0,1717	0,1712	0,1729	0,1718
m ₂ [g]	0,1700	0,1746	0,1729	0,1712	0,1767	0,1757	0,1735

Tabulka 6: Absorbance 1 p-nitrofenolu pro aktivitu kyselé fosfatázy

Ředění	A _{1.1} [1]			A _{1.2} [1]			A _{1.3} [1]		
1x				0,154	0,146	0,139	3,583	3,704	3,793
5x	2,412	2,809	2,692				0,927	1,004	0,966
25x	0,433	0,496	0,478				0,293	0,319	0,335

Tabulka 7: Absorbance 2 p-nitrofenolu pro aktivitu kyselé fosfatázy

Ředění	A _{2.1} [1]			A _{2.1} [1]			A _{2.3} [1]		
1x	3,906	3,811	3,879	0,179	0,182	0,195	0,087	0,089	0,092
5x	1,008	1,051	1,082						
25x	0,210	0,204	0,216						

c) Výpočet aktivity

Pro výpočet aktivity s obsahem substrátu buď *p*NP nebo NH₄⁺ byl použit vzorec:

$$a = \frac{\Delta pNP \cdot V}{t \cdot m \cdot S}; a = \frac{\Delta NH_4^+ \cdot V}{t \cdot m \cdot S}$$

kde: *a* – aktivita [mg *p*NP nebo NH₄⁺ (para nitro fenolu nebo amonných iontů) · g⁻¹ · min⁻¹]; ΔpNP – koncentrace *p*NP [mg · l⁻¹], vypočtena z rovnice přímky pro *p*NP; ΔNH_4^+ – koncentrace NH₄⁺ [mg · l⁻¹], vypočtena z rovnice přímky pro NH₄⁺ (pouze aktivita ureázy); *V* – objem roztoku ve zkumavce [l]; *t* – doba inkubace [h]; *m* – průměrná hmotnost půdy [g].

$$\Delta pNP = \frac{A - 0,053}{0,0966}$$

kde: *A* – absorbance na 96 jamkové mikrotitrační destičce [1].

$$A_{1.1} = \text{průměr absorbancí vzorku} \cdot \text{koefficient ředění} = \frac{0,433 + 0,496 + 0,478}{3} \cdot 25 \\ = 11,725 [1]$$

$$A_{1.2} = \text{průměr absorbancí slepého vzorku} \cdot \text{koefficient ředění} \\ = \frac{0,154 + 0,146 + 0,139}{3} \cdot 1 = 0,146 [1]$$

$$A_{1.3} = \text{průměr absorbancí slepého pokusu} \cdot \text{koefficient ředění} \\ = \frac{0,293 + 0,319 + 0,335}{3} \cdot 25 = 7,891 [1]$$

$$A = A_1 - A_2 - A_3 = 11,725 - 0,146 - 7,891 = 3,687 [1]$$

$$\Delta pNP_1 = \frac{A - 0,053}{0,0966} = \frac{3,687 - 0,053}{0,0966} = 37,62 \text{ mg/l}$$

$$a_1 = \frac{\Delta pNP \cdot V}{t \cdot m \cdot S} = \frac{37,62 \cdot 0,00134}{1 \cdot 0,1718 \cdot 0,9821} = 0,299 \frac{\text{mg (pNP)}}{\text{g} \cdot \text{h}}$$

$$A_{2.1} = \text{průměr absorbancí vzorku} \cdot \text{koefficient ředění} = \frac{0,210 + 0,204 + 0,216}{3} \cdot 25 \\ = 5,25 [1]$$

$$A_{2.2} = \text{průměr absorbancí slepého vzorku} \cdot \text{koefficient ředění} \\ = \frac{0,179 + 0,182 + 0,195}{3} \cdot 1 = 0,185 [1]$$

$$A_{2.2} = \text{průměr absorbancí slepého pokusu} \cdot \text{koefficient ředění} \\ = \frac{0,087 + 0,089 + 0,092}{3} \cdot 1 = 0,089 [1]$$

$$A = A_1 - A_2 - A_3 = 5,25 - 0,185 - 0,089 = 4,975[1]$$

$$\Delta pNP_1 = \frac{A - 0,053}{0,0966} = \frac{4,975 - 0,053}{0,0966} = 50,96 \text{ mg/l}$$

$$a_1 = \frac{\Delta pNP \cdot V}{t \cdot m \cdot S} = \frac{50,96 \cdot 0,00134}{1 \cdot 0,1735 \cdot 0,9821} = 0,401 \frac{\text{mg (pNP)}}{\text{g} \cdot \text{h}}$$

d) Výsledky

Výsledná enzymová aktivita kyselé fosfatázy byla stanovena na hodnotu $a = 0,299 - 0,401 \text{ mg pNP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve článku (Acosta-Martínez a Tabatabai, 2000) dosahovala aktivita kyselé fosfatázy při $\text{pH} = 6,5$ hodnot $a = 0,240 \text{ mg pNP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [68]

4.3.2 Alkalická fosfatáza

a) Postup

Pro přípravu modifikovaného univerzálního pufru (MUB) $\text{pH} = 11$ bylo naváženo 12,1 g TRIS, 11,6 g kyseliny maleinové, 14 g kyseliny citronové, 6,3 g kyseliny borité a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 0,025M roztok substrátu *p*-Nitrophenyl Phosphate (*p*NP) rozpuštěním 46,4 mg substrátu v 5 ml pufru. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 170 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 713 μl MUB a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M chloridu vápenatého a 0,5M hydroxidu sodného a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96

jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μl supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 8: Výsledky pro alkalickou fosfatázu

A [1]	$\Delta p\text{NP}$ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	a [$\text{mg} (p\text{NP}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
2,110	21,31	0,1700
2,882	29,29	0,2295

Výsledná enzymová aktivita alkalické fosfatázy prvního měření byla stanovena na hodnotu $a = 0,17 - 0,2295 \text{ mg } p\text{NP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a pro druhé měření vyšla $a = 0,230 \text{ mg } p\text{NP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve článku (Bowles et al., 2014) dosahovala aktivita kyselá fosfatázy při $\text{pH} = 11$ hodnot $a = 0,301 \text{ mg } p\text{NP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [69]

4.3.3 Esteráza

a) Postup

Pro přípravu 0,5 M TRIS – maleinového pufru $\text{pH} = 6$ bylo naváženo 6 g TRIS a 6 g kyseliny maleinové a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven roztok substrátu *p*-Nitrophenyl Acetate (*p*NP) rozpuštěním 63 mg substrátu v 10 ml methanolu z roztoku byl odebrán 1 ml, který byl převeden do 100 ml pufru, který se následně používal jako substrát. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 200 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 600 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 600 μl pufru a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 600 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 30 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M chloridu vápenatého a 0,1M roztoku TRIS $\text{pH} = 12$ a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96

jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μl supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 9: Výsledky pro esterázu

A [1]	$\Delta p\text{NP}$ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	a [$\text{mg} (p\text{NP}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
0,385	3,44	0,0435

Výsledná enzymová aktivita esterázy byla stanovena $a = 0,0435 \text{ mg } (p\text{NP}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve článku (Sakai et al., 2002) dosahovala aktivita esterázy hodnot $a = 0,03\text{--}0,8 \text{ mg } p\text{NP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [70]

4.3.4 Arylsulfatáza

a) Postup

Pro přípravu 0,5 M octanového pufru $\text{pH} = 5,8$ bylo naváženo 68 g trihydrátu octanu sodného v 500 ml demineralizované vody, k roztoku bylo přidáno 1,7 ml kyseliny octové. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 0,05M roztok substrátu Potassium 4-nitrophenyl sulfátu ($p\text{NP}$) rozpuštěním 128 mg substrátu v 10 ml pufru. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 140 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 570 μl pufru a 143 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 713 μl pufru a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 570 μl pufru a 143 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M chloridu vápenatého a 0,5M roztoku hydroxidu sodného a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μl supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 10: Výsledky pro arylsulfatázu

A [1]	ΔpNP [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	a [$\text{mg} (pNP) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
1,652	16,56	0,171

Výsledná aktivita arylsulfatázy byla stanovena na hodnotu $a = 0,171 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve studii (Li, 2003) dosahovala aktivita esterázy hodnot $a = 0,15 - 0,35 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [64]

4.3.5 β -glukosidáza

a) Postup

Pro přípravu modifikovaného univerzálního pufru (MUB) $\text{pH} = 6$ bylo naváženo 12,1 g TRIS, 11,6 g kyseliny maleinové, 14 g kyseliny citronové, 6,3 g kyseliny borité a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 0,05M roztok substrátu *p*-Nitrophenyl- β -D-glukoposidase (*p*NP) rozpuštěním 75,2 mg substrátu v 5 ml pufru. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 140 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 713 μl MUB a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M chloridu vápenatého a 0,5M hydroxidu sodného a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μl supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 11: Výsledky pro β -glukosidázu

A [1]	ΔpNP [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	a [$\text{mg} (pNP) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
1,73	17,36	0,179

Výsledná enzymová aktivita pro β -glukosidázu vyšla $0,179 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve studii (Jackson, Tyler a Millar, 2013) dosahovala aktivita esterázy hodnot $a = 0,0417 - 0,1948 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [61]

4.3.6 α -glukosidáza

a) Postup

Pro přípravu modifikovaného univerzálního pufru (MUB) $\text{pH} = 6$ bylo naváženo 12,1 g TRIS, 11,6 g kyseliny maleinové, 14 g kyseliny citronové, 6,3 g kyseliny borité a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 0,05 M roztok substrátu *p*-Nitrophenyl- α -D-glukopyran (*p*NP) rozpuštěním 75,2 mg substrátu v 5 ml pufru. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 140 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 713 μl MUB a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 570 μl MUB a 143 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byla opět provedena homogenizace a byly přidány roztoky 0,5M chloridu vápenatého a 0,5M hydroxidu sodného a opět byla provedena homogenizace. Poté byly zkumavky odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 250 μl supernatantu. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 12: Výsledky pro α -glukosidázu

A [1]	ΔpNP [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	a [$\text{mg} (pNP) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
0,305	2,61	0,0272

Výsledná enzymová aktivita pro α -glukosidázu vyšla $0,0272 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve studii (Eivazi a Tabatabai, 1988) dosahovala aktivita esterázy hodnot $a = 0,00278 - 0,02223 \text{ mg } pNP \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. [71]

4.3.7 Ureáza

a) Postup

Pro přípravu 50 mM octanového pufru pH = 5 bylo naváženo 2,762 g octnu sodného, 0,981 g kyseliny octové a následně rozpuštěno v 500 ml demineralizované vody. Úprava pH byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného a poté byl roztok pufru doplněn v 1000 ml odměrné baňce po rysku. Následně byl připraven 80mM roztok substrátu močoviny rozpuštěním 48 mg substrátu v 10 ml pufru a oxidační činidlo $c = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ dichlorisocyanurátu. Pro optimalizaci byla použita vysušená zkušební půda s obsahem sušiny 98,21 %, které bylo naváženo 100 mg. Půda byla navážena na analytických vahách v mikrozkuševkách. Do tří zkumavek, ve kterých byla navážena půda bylo přidáno 250 μl octanového pufru a 100 μl roztoku substrátu; jako slepé vzorky byly použity tři zkumavky s půdou, do kterých bylo přidáno 350 μl octanového pufru a do následujících tří zkumavek bez půdy bylo přidáno 250 μl octanového pufru a 100 μl roztoku substrátu. Takto připravené zkumavky, 3 zkumavky se vzorky a 6 zkumavek se slepými vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Homogenizace probíhala i během inkubace. Po inkubaci byl přidán 1 ml 2M roztoku KCl a zkumavky se nechalo 30 min homogenizovat následně zkumavky byly odstředěny pomocí centrifugy při 15000 rpm po dobu 10 minut. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo odebráno 75 μl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 30 μl oxidačního činidla, 75 μl barevného činidla připraveného těsně před přidáním a 75 μl dH₂O. Barevné činidlo bylo připraveno ze složky A a B. Složka A se připravila smícháním 60 mg NaOH s 10 ml dH₂O a složka B byla připravena smícháním 850 mg salicylátu sodného, 6,39 dihydrátu nitroprusidu sodného a 5

ml dH₂O. Následně byla změřena absorpance při vlnové délce 660 nm na spektrofotometru TEKAN.

b) Výsledky

Tabulka 13: Výsledky pro ureázu

A [1]	ΔNH_4^+ [mg · l ⁻¹]	a [mg (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ · h ⁻¹]
0,414	2,74	0,035

Výsledná aktivita ureázy vyšla 0,035 mg NH₄⁺ · g⁻¹ · h⁻¹. Ve studii (Cordero, Snell et al., 2019) dosahovala aktivita ureázy hodnot a 0,01 – 0,12 mg NH₄⁺ · g⁻¹ · h⁻¹. [62]

4.4 Normovaná metoda – ISO 20130

Byl připraven extrakční roztok, který byl přidán k naváženému množství vzorku půdy (viz tabulka 14) a byl homogenizován po dobu 10 minut na orbitální třepačce. Následně proběhlo odstředění při 10000 rpm pomocí centrifugy. Supernatant byl převeden na 96 jamkovou mikrotitrační destičku a byl přidán roztok substrátu a dH₂O, poté proběhla inkubace a byl přidán zastavovací roztok a byla změřena absorbance na nové 96 jamkové mikrotitrační destičce pomocí spektrofotometru na 96 jamkové mikrotitrační destičky (viz tabulka 15). [67]

Výpočet enzymové aktivity podle normy ISO 20130 byl proveden podle rovnice:

$$a = \frac{(C_s - C_b) \cdot D \cdot V_{SS}}{RT \cdot W_{ds}}$$

kde: a – enzymová aktivita v U · g⁻¹ suché půdy [μmol · g⁻¹ · min⁻¹], C_s – koncentrace produktu vzorku [μmol · ml⁻¹], C_b – koncentrace produktu blanku [μmol · ml⁻¹], D – ředění vzorku na 96 jamkové mikrotitrační destičce [1], V_{ss} – objem výluhu [ml], RT – doba inkubace [min], W_{ds} – hmotnost suchého vzorku [g]. [67]

Tabulka 14: Extrakční a zastavovací roztoky pro enzymové aktivity ISO 20130

Enzymová aktivita	α, β – glukosidáza Arylsulfatáza	Ureáza	Kyselá fosfatáza Esteráza	Alkalická fosfatáza
Extrakční roztok	dH ₂ O		50mM TRIS pH = 5,5	50mM TRIS pH = 11
Zastavovací roztok	100mM TRIS pH 12 0,5M CaCl ₂	Salicylát Kyanurát	100mM TRIS pH 12 0,5M CaCl ₂	

Tabulka 15: Údaje pro mikrotitrační destičku ISO 20130

	Arylsulfatáza	α , β – glukosidáza	Kyselá, alkalická fosfatáza	Esteráza	Ureáza
Supernatant	125 μ l				50 μ l
Substrát	25 μ l				40 μ l
dH ₂ O	0 μ l				40 μ l
Doba inkubace	4 H	1 H	30 min	2 H	3 H
Teplota	37 °C			30 °C	37 °C
Zastavení	100 μ l 100mM TRIS pH 12 25 μ l 0,5M CaCl ₂				40 μ l salicylát 40 μ l kyanurát
Inkubace					30 min třepání
Nová destička	200 μ l $\lambda = 405$ nm				200 μ l $\lambda = 660$ nm

4.4.1 Kyselá fosfatáza ISO 20130

a) Data

Tabulka 16: Absorbance pNP pro aktivitu kyselé fosfatázy – ISO 20130

Vzorek [1]	1	2	3
A [1]	0,138	0,139	0,139
	0,128	0,127	0,133
	0,170	0,171	0,169
	0,059	0,053	0,055

b) Výpočet aktivity

$$\begin{aligned}
 a_1 &= \frac{(C_s - C_b) \cdot D \cdot V_{SS}}{RT \cdot W_{ds}} = \frac{(0,00687 - 4,94 \cdot 10^{-5}) \cdot 0,625 \cdot 0,2}{30 \cdot 1,127} \\
 &= 2,522 \cdot 10^{-5} \text{ mmol (pNP)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \\
 &= 0,105 \text{ mg (pNP)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}
 \end{aligned}$$

c) Výsledky

Tabulka 17: Enzymová aktivita kyselé fosfatázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3
$C_s \text{ mmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	$6,87 \cdot 10^{-3}$	$6,90 \cdot 10^{-3}$	$7,00 \cdot 10^{-3}$
$C_b \text{ mmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	$4,94 \cdot 10^{-5}$	$4,96 \cdot 10^{-5}$	$5,03 \cdot 10^{-5}$
D	0,625		
$W_{ds} \text{ [g]}$	1,127	1,071	1,263
$V_{ss} \text{ [ml]}$	0,2		
RT [min]	30		
$a \text{ [mmol (pNP)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$	$2,522 \cdot 10^{-5}$	$2,531 \cdot 10^{-5}$	$2,291 \cdot 10^{-5}$
$a \text{ [mg (pNP)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	$1,05 \cdot 10^{-1}$	$1,06 \cdot 10^{-1}$	$9,56 \cdot 10^{-2}$

Dle stanovení ISO 20130 vyšla enzymová aktivita pro kyselou fosfatázu u zkušební půdy v rozmezí $a = 9,56 \cdot 10^{-2} - 1,06 \cdot 10^{-1} \text{ mg (pNP)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nižší aktivita, než u mikrozkuvkové metody může znamenat, že při stanovení enzymové aktivity pomocí normované metody může docházet k nižší extrakci enzymu do vodného prostředí.

5 VÝSLEDKY

Pro stanovení enzymových aktivit byly použity dvě metody. První metoda v mikrozkuvkách, která byla optimalizována v předchozí kapitole a druhá metoda podle normy ISO 20130/2018, u které je výsledek všech aktivit získán z extraktu jedné navážky půdy. Enzymovými aktivitami, konkrétně α a β glukosidázy, kyselá a alkalická fosfatázy, arylsulfatázy, esterázy a ureázy se hodnotilo celkem 13 půd dodaných z Mendelovy univerzity. Těchto 13 půd bylo nejprve testováno metodou v mikrozkuvkách a následně normovanou metodou ISO 20130. U metod byla provedena korelace a zjištěn Piersonův korelační koeficient pro hladinu významnosti $p > 0,05$. Obě metody byly nejprve vyzkoušeny a optimalizovány, což je popsáno v kapitole 4. OPTIMALIZACE A METODIKA.

5.1 Metoda hodnocení půd enzymovými aktivitami v mikrozkuvkách

Pro hodnocení enzymových aktivit v půdách pomocí metody v mikrozkuvkách byl použit stejný postup, který byl použit v kapitole 4. OPTIMALIZACE A METODIKA. Výsledky uvedené v následujících tabulkách byly získány zprůměrováním tří hodnot enzymových aktivit pro každý vzorek půdy.

5.1.1 Výsledné enzymové aktivity

Tabulka 18: Výsledné enzymové aktivity kyselá fosfatázy v mikrozkuvkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,540	0,504	0,449	0,302	0,732	0,359	0,482
σ [1]	0,029	0,014	0,010	0,016	0,036	0,012	0,039
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,299	0,443	0,400	0,433	0,465	0,299	
σ [1]	0,020	0,019	0,015	0,024	0,005	0,011	

Tabulka 19: Výsledné enzymové aktivity alkalická fosfatázy v mikrozkuvkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,715	0,079	0,078	0,051	0,939	0,146	0,063
σ [1]	0,100	0,008	0,007	0,006	0,077	0,007	0,089
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,449	0,536	0,495	0,096	0,128	0,085	
σ [1]	0,032	0,043	0,012	0,009	0,007	0,003	

Tabulka 20: Výsledné enzymové aktivity β – glukosidázy v mikrozkumavkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,163	0,076	0,067	0,092	0,159	0,069	0,134
σ [1]	0,006	0,002	0,006	0,003	0,008	0,006	0,005
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,121	0,143	0,117	0,055	0,059	0,065	
σ [1]	0,003	0,007	0,005	0,007	0,005	0,005	

Tabulka 21: Výsledné enzymové aktivity α – glukosidázy v mikrozkumavkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,046	0,026	0,022	0,015	0,042	0,025	0,033
σ [1]	0,004	0,005	0,003	0,002	0,004	0,005	0,002
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,029	0,037	0,029	0,018	0,017	0,018	
σ [1]	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	

Tabulka 22: Výsledné enzymové aktivity esterázy v mikrozkumavkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,035	0,020	0,024	0,013	0,028	0,019	0,025
σ [1]	0,004	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,028	0,037	0,025	0,014	0,011	0,018	
σ [1]	0,001	0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	

Tabulka 23: Výsledné enzymové aktivity arylsulfatázy v mikrozkumavkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,766	0,575	0,499	0,235	0,670	0,498	0,791
σ [1]	0,047	0,013	0,060	0,005	0,028	0,038	0,076
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,678	0,497	0,594	0,543	0,578	0,789	
σ [1]	0,042	0,036	0,008	0,043	0,035	0,034	

Tabulka 24: Výsledné enzymové aktivity ureázy v mikrozkumavkách

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mg (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,154	0,078	0,094	0,109	0,186	0,104	0,110
σ [1]	0,023	0,004	0,005	0,007	0,002	0,003	0,014
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mg (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ (půdy) · h ⁻¹]	0,082	0,090	0,102	0,120	0,067	0,041	
σ [1]	0,007	0,008	0,008	0,009	0,005	0,010	

5.2 Metoda podle ISO 20130/2018

Pro hodnocení enzymových aktivit půd pomocí metody ISO 20130 byl použit stejný postup a výpočet, který byl použit v kapitole 4. OPTIMALIZACE A METODIKA. Výsledky uvedené v následujících tabulkách byly získány zprůměrováním devíti hodnot enzymových aktivit pro každý vzorek půdy.

5.2.1 Výsledné enzymové aktivity – ISO 20130

Tabulka 25: Enzymová aktivita kyselých fosfatázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	1,75 · 10 ⁻⁵	2,17 · 10 ⁻⁵	2,37 · 10 ⁻⁵	2,21 · 10 ⁻⁵	2,96 · 10 ⁻⁵	2,68 · 10 ⁻⁵	2,73 · 10 ⁻⁵
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	1,46 · 10 ⁻¹	1,81 · 10 ⁻¹	1,98 · 10 ⁻¹	1,84 · 10 ⁻¹	2,47 · 10 ⁻¹	2,23 · 10 ⁻¹	2,28 · 10 ⁻¹
σ [1]	3,4 · 10 ⁻²	6,1 · 10 ⁻³	1,8 · 10 ⁻²	1,3 · 10 ⁻²	4,5 · 10 ⁻²	1,5 · 10 ⁻²	8,0 · 10 ⁻³
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	3,34 · 10 ⁻⁵	3,69 · 10 ⁻⁵	3,08 · 10 ⁻⁵	2,46 · 10 ⁻⁵	2,98 · 10 ⁻⁵	2,80 · 10 ⁻⁵	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	2,79 · 10 ⁻¹	3,09 · 10 ⁻¹	2,57 · 10 ⁻¹	2,05 · 10 ⁻¹	2,49 · 10 ⁻¹	2,34 · 10 ⁻¹	
σ [1]	5,6 · 10 ⁻²	3,9 · 10 ⁻²	1,4 · 10 ⁻²	1,8 · 10 ⁻²	4,7 · 10 ⁻²	4,7 · 10 ⁻³	

Tabulka 26: Enzymová aktivita alkalické fosfatázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	3,34 · 10 ⁻⁵	2,48 · 10 ⁻⁵	1,97 · 10 ⁻⁵	1,21 · 10 ⁻⁵	9,67 · 10 ⁻⁵	2,15 · 10 ⁻⁵	3,41 · 10 ⁻⁵
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	2,79 · 10 ⁻¹	2,07 · 10 ⁻¹	1,64 · 10 ⁻¹	1,01 · 10 ⁻¹	8,07 · 10 ⁻¹	1,79 · 10 ⁻¹	2,85 · 10 ⁻¹
σ [1]	5,4 · 10 ⁻²	3,2 · 10 ⁻²	3,6 · 10 ⁻²	3,6 · 10 ⁻²	1,7 · 10 ⁻²	2,1 · 10 ⁻²	3,8 · 10 ⁻²
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	4,04 · 10 ⁻⁵	4,52 · 10 ⁻⁵	6,09 · 10 ⁻⁵	1,91 · 10 ⁻⁵	2,87 · 10 ⁻⁵	3,24 · 10 ⁻⁵	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	3,38 · 10 ⁻¹	3,77 · 10 ⁻¹	5,09 · 10 ⁻¹	1,60 · 10 ⁻¹	2,39 · 10 ⁻¹	2,71 · 10 ⁻¹	
σ [1]	5,1 · 10 ⁻²	6,8 · 10 ⁻²	1,2 · 10 ⁻²	2,7 · 10 ⁻²	1,2 · 10 ⁻²	2,7 · 10 ⁻²	

Tabulka 27: Enzymová aktivita β – glukosidázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	2,14 · 10 ⁻⁵	1,99 · 10 ⁻⁵	1,98 · 10 ⁻⁵	1,93 · 10 ⁻⁵	3,09 · 10 ⁻⁵	2,15 · 10 ⁻⁵	2,55 · 10 ⁻⁵
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	1,79 · 10 ⁻¹	1,67 · 10 ⁻¹	1,65 · 10 ⁻¹	1,61 · 10 ⁻¹	2,58 · 10 ⁻¹	1,80 · 10 ⁻¹	2,13 · 10 ⁻¹
σ [1]	7,5 · 10 ⁻²	1,1 · 10 ⁻²	1,3 · 10 ⁻²	1,0 · 10 ⁻²	6,8 · 10 ⁻²	1,6 · 10 ⁻²	4,4 · 10 ⁻²
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	2,34 · 10 ⁻⁵	2,42 · 10 ⁻⁵	2,68 · 10 ⁻⁵	1,82 · 10 ⁻⁵	1,93 · 10 ⁻⁵	1,99 · 10 ⁻⁵	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	1,95 · 10 ⁻¹	2,02 · 10 ⁻¹	2,23 · 10 ⁻¹	1,52 · 10 ⁻¹	1,61 · 10 ⁻¹	1,66 · 10 ⁻¹	
σ [1]	6,7 · 10 ⁻²	1,0 · 10 ⁻²	3,3 · 10 ⁻²	9,0 · 10 ⁻²	1,2 · 10 ⁻²	3,8 · 10 ⁻²	

Tabulka 28: Enzymová aktivita α – glukosidázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	6,87·10 ⁻⁶	3,15·10 ⁻⁶	3,04·10 ⁻⁶	2,93·10 ⁻⁶	1,07·10 ⁻⁶	6,27·10 ⁻⁶	7,59·10 ⁻⁶
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	5,73·10 ⁻²	2,63·10 ⁻²	2,54·10 ⁻²	2,45·10 ⁻²	8,93·10 ⁻²	5,24·10 ⁻²	6,33·10 ⁻²
σ [1]	3,4·10 ⁻³	9,9·10 ⁻³	7,2·10 ⁻³	1,2·10 ⁻³	1,8·10 ⁻³	1,2·10 ⁻³	8,0·10 ⁻³
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	6,75·10 ⁻⁶	6,04·10 ⁻⁶	9,28·10 ⁻⁶	3,36·10 ⁻⁶	3,46·10 ⁻⁶	3,58·10 ⁻⁶	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	5,64·10 ⁻²	5,04·10 ⁻²	7,74·10 ⁻²	2,80·10 ⁻²	2,89·10 ⁻²	2,99·10 ⁻²	
σ [1]	2,3·10 ⁻³	5,3·10 ⁻³	9,4·10 ⁻³	1,7·10 ⁻³	6,2·10 ⁻³	1,3·10 ⁻³	

Tabulka 29: Enzymová aktivita esterázy – ISO 20130

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	4,29·10 ⁻⁶	2,29·10 ⁻⁶	2,80·10 ⁻⁶	2,29·10 ⁻⁶	2,50·10 ⁻⁶	2,25·10 ⁻⁶	3,17·10 ⁻⁶
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	3,58·10 ⁻²	1,91·10 ⁻²	2,33·10 ⁻²	1,91·10 ⁻²	2,08·10 ⁻²	1,88·10 ⁻²	2,65·10 ⁻²
σ [1]	6,5·10 ⁻³	9,2·10 ⁻⁴	8,4·10 ⁻³	3,7·10 ⁻³	2,2·10 ⁻³	2,2·10 ⁻³	4,3·10 ⁻³
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	2,81·10 ⁻⁶	3,87·10 ⁻⁶	3,99·10 ⁻⁶	2,49·10 ⁻⁶	2,26·10 ⁻⁶	4,16·10 ⁻⁶	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	2,35·10 ⁻²	3,23·10 ⁻²	3,33·10 ⁻²	2,07·10 ⁻²	1,89·10 ⁻²	3,47·10 ⁻²	
σ [1]	2,5·10 ⁻³	3,3·10 ⁻³	2,9·10 ⁻³	1,4·10 ⁻³	7,0·10 ⁻³	7,3·10 ⁻³	

Tabulka 30: Enzymová aktivita arylsulfátázy – ISO 20130

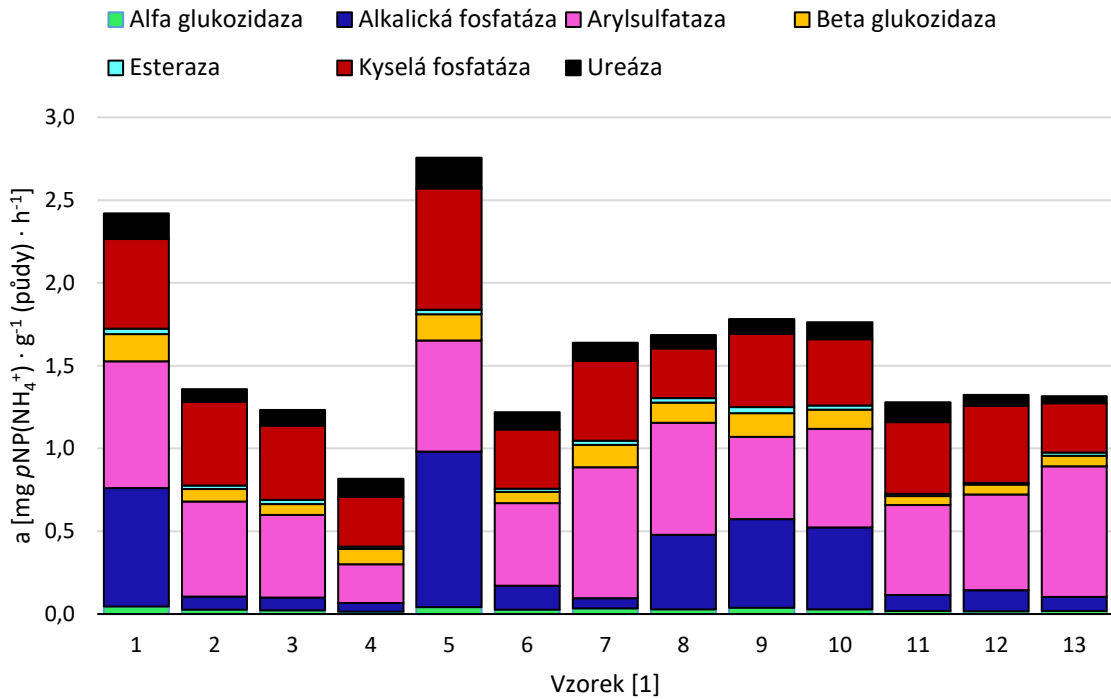
Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	6,04·10 ⁻⁶	3,35·10 ⁻⁶	1,82·10 ⁻⁶	7,97·10 ⁻⁷	1,69·10 ⁻⁵	5,09·10 ⁻⁶	5,30·10 ⁻⁶
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	5,04·10 ⁻²	2,80·10 ⁻²	1,52·10 ⁻²	6,70·10 ⁻³	1,41·10 ⁻¹	4,25·10 ⁻²	4,43·10 ⁻²
σ [1]	2,1·10 ⁻³	2,1·10 ⁻³	2,4·10 ⁻³	5,4·10 ⁻⁴	9,9·10 ⁻³	3,0·10 ⁻³	5,0·10 ⁻³
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (pNP) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	4,03·10 ⁻⁶	3,28·10 ⁻⁶	5,66·10 ⁻⁶	6,95·10 ⁻⁷	4,52·10 ⁻⁷	1,11·10 ⁻⁶	
a [mg (pNP) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	3,36·10 ⁻²	2,74·10 ⁻²	4,72·10 ⁻²	5,80·10 ⁻³	3,80·10 ⁻³	9,30·10 ⁻³	
σ [1]	1,7·10 ⁻³	2,5·10 ⁻³	7,3·10 ⁻³	8,0·10 ⁻⁴	2,9·10 ⁻³	2,2·10 ⁻⁴	

Tabulka 31: Enzymová aktivita ureázy – ISO 20130

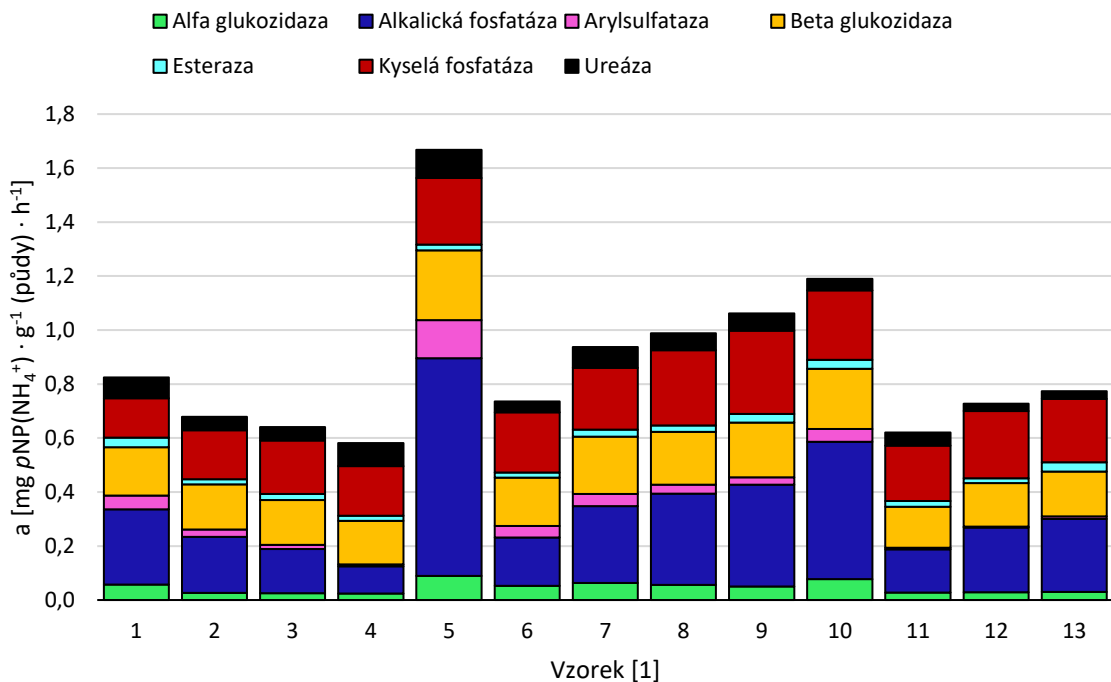
Vzorek	1	2	3	4	5	6	7
a [mmol (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	9,30·10 ⁻⁶	5,93·10 ⁻⁶	5,88·10 ⁻⁶	1,02·10 ⁻⁶	1,25·10 ⁻⁶	4,83·10 ⁻⁶	9,32·10 ⁻⁶
a [mg (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	7,76·10 ⁻²	4,95·10 ⁻²	4,91·10 ⁻²	8,49·10 ⁻²	1,04·10 ⁻¹	4,03·10 ⁻²	7,78·10 ⁻²
σ [1]	2,2·10 ⁻³	4,9·10 ⁻³	5,4·10 ⁻³	2,1·10 ⁻³	2,7·10 ⁻³	1,3·10 ⁻³	2,6·10 ⁻³
Vzorek	8	9	10	11	12	13	
a [mmol (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ · min ⁻¹]	7,56·10 ⁻⁶	7,58·10 ⁻⁶	5,18·10 ⁻⁶	5,89·10 ⁻⁶	3,25·10 ⁻⁶	3,38·10 ⁻⁶	
a [mg (NH ₄ ⁺) · g ⁻¹ · h ⁻¹]	6,31·10 ⁻²	6,33·10 ⁻²	4,32·10 ⁻²	4,92·10 ⁻²	2,71·10 ⁻²	2,82·10 ⁻²	
σ [1]	4,6·10 ⁻³	1,1·10 ⁻³	3,0·10 ⁻³	2,8·10 ⁻³	1,1·10 ⁻³	1,1·10 ⁻³	

5.3 Vyhodnocení metody v mikrozkuvkách a normované metody

5.3.1 Vyhodnocení všech enzymových aktivit a všech vzorků půd

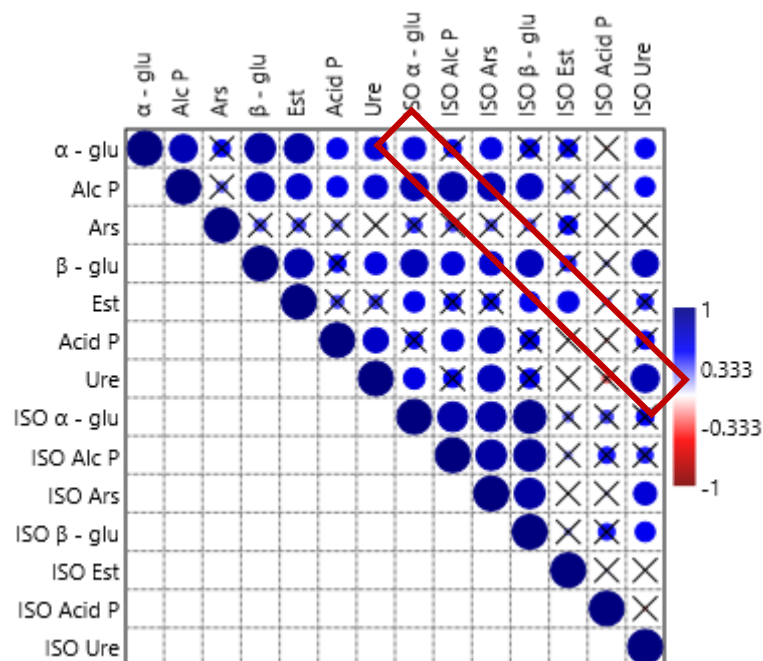


Obrázek 17: Výsledné enzymové aktivity pro metodu v mikrozkuvkách



Obrázek 18: Výsledné enzymové aktivity pro metodu podle ISO 20130/2018

Na obrázcích 17 a 18 jsou srovnány všechny stanovení enzymových aktivit pro dodané vzorky půd. Je patrná základní podobnost v půdách, kdy půda číslo 5 se jeví jako půda, ze které bylo extrahováno nejvíce enzymů, z tohoto pohledu se tahle půda jeví jako neaktivnější. Na opačné straně je půda číslo 4, ze které bylo extrahováno nejméně enzymů a jeví se jako nejméně oživená půda ze všech hodnocených půd. Zajímavostí je, že pro normovanou metodu vyšly výrazně nižší aktivity pro arylsulfatázu a kyselou fosfatázu. Nižší aktivity těchto dvou enzymů mohou souviset s nižší extrakcí enzymů do vodného prostředí používaného v normované metodě.



Obrázek 19: Výsledná korelace aktivit (Pearsonův korelační koeficient)

(X – aktivity spolu nekorelují významně ($p > 0,05$), velikost kolečka

= vzájemná korelace) zahrnutí metody v mikrozkušavkách i ISO 20130

Obrázek 19, vycházející z hodnot v tabulce 32 znázorňuje vzájemnou korelaci mezi jednotlivými aktivitami, metodou v mikrozkušavkách a metodou podle normy ISO 20130. Nejvyšší korelace s ostatními enzymovými aktivitami dosahuje alkalická fosfatáza metodou ve zkumavkách, naopak s enzymovou aktivitou kyselé fosfatázy stanovenou normovanou metodou a arylsulfatázy stanovenou metodou ve zkumavkách nekoreluje dokonce žádná jiná enzymová aktivita.

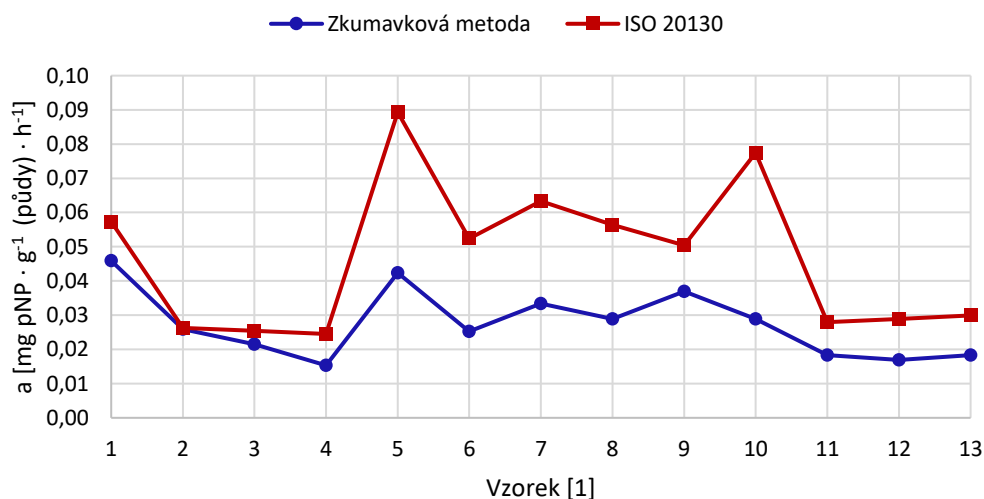
Arylsulfatáza stanovená normovanou metodou koreluje s 5 enzymovými aktivitami na rozdíl od arylsulfatázy stanovenou metodou v mikrozkušavkách a v případě kyselé fosfatázy je tomu naopak.

Diagonála zvýrazněná červeně znázorňuje korelaci mezi mikrozkušavkovou a normovanou metodou pro jednotlivé enzymové aktivity.

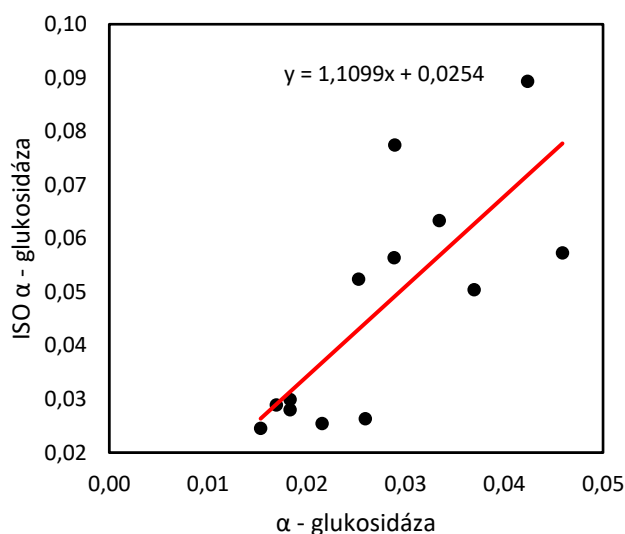
Tabulka 32: Piersonův korelační koeficient ($p > 0,05$) mezi jednotlivými enzymovými aktivitami

	α - glu	Alc P	Ars	β - glu	Est	Acid P	Ure	ISO α - glu	ISO Alc P	ISO Ars	ISO β - glu	ISO Est	ISO Acid P	ISO Ure
α - glu		$1,19 \cdot 10^{-3}$	$9,37 \cdot 10^{-2}$	$1,26 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{-4}$	$3,43 \cdot 10^{-2}$	$1,61 \cdot 10^{-2}$	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$8,64 \cdot 10^{-2}$	$2,44 \cdot 10^{-2}$	$6,06 \cdot 10^{-2}$	$7,24 \cdot 10^{-2}$	$7,24 \cdot 10^{-1}$	$4,64 \cdot 10^{-2}$
Alc P			$3,17 \cdot 10^{-1}$	$5,84 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-3}$	$3,42 \cdot 10^{-2}$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	$1,44 \cdot 10^{-3}$	$4,61 \cdot 10^{-4}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	$3,96 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^{-1}$	$4,11 \cdot 10^{-1}$	$4,86 \cdot 10^{-2}$
Ars				$2,43 \cdot 10^{-1}$	$2,11 \cdot 10^{-1}$	$3,34 \cdot 10^{-1}$	$9,09 \cdot 10^{-1}$	$1,48 \cdot 10^{-1}$	$2,05 \cdot 10^{-1}$	$2,80 \cdot 10^{-1}$	$2,60 \cdot 10^{-1}$	$6,77 \cdot 10^{-2}$	$8,15 \cdot 10^{-1}$	$9,36 \cdot 10^{-1}$
β - glu					$3,99 \cdot 10^{-4}$	$9,07 \cdot 10^{-2}$	$2,17 \cdot 10^{-2}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$	$1,55 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$	$2,82 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-1}$	$5,68 \cdot 10^{-1}$	$2,68 \cdot 10^{-3}$
Est						$2,21 \cdot 10^{-1}$	$1,97 \cdot 10^{-1}$	$3,28 \cdot 10^{-2}$	$9,18 \cdot 10^{-2}$	$9,82 \cdot 10^{-2}$	$4,12 \cdot 10^{-2}$	$2,92 \cdot 10^{-2}$	$4,35 \cdot 10^{-1}$	$1,22 \cdot 10^{-1}$
Acid P							$5,96 \cdot 10^{-3}$	$9,48 \cdot 10^{-2}$	$2,22 \cdot 10^{-2}$	$3,48 \cdot 10^{-3}$	$5,52 \cdot 10^{-2}$	$8,39 \cdot 10^{-1}$	$6,84 \cdot 10^{-1}$	$7,18 \cdot 10^{-2}$
Ure								$2,68 \cdot 10^{-2}$	$6,94 \cdot 10^{-2}$	$2,40 \cdot 10^{-3}$	$5,30 \cdot 10^{-2}$	$8,26 \cdot 10^{-1}$	$3,85 \cdot 10^{-1}$	$1,11 \cdot 10^{-3}$
ISO α - glu									$2,23 \cdot 10^{-4}$	$2,36 \cdot 10^{-4}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	$3,52 \cdot 10^{-1}$	$2,21 \cdot 10^{-1}$	$8,30 \cdot 10^{-2}$
ISO Alc P										$1,08 \cdot 10^{-4}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$4,76 \cdot 10^{-1}$	$1,12 \cdot 10^{-1}$	$1,27 \cdot 10^{-1}$
ISO Ars											$9,96 \cdot 10^{-5}$	$9,73 \cdot 10^{-1}$	$6,78 \cdot 10^{-1}$	$1,56 \cdot 10^{-2}$
ISO β - glu												$5,29 \cdot 10^{-1}$	$1,07 \cdot 10^{-1}$	$4,67 \cdot 10^{-2}$
ISO Est													$7,49 \cdot 10^{-1}$	$8,37 \cdot 10^{-1}$
ISO Acid P														$6,64 \cdot 10^{-1}$
ISO Ure														

5.3.2 Vyhodnocení enzymových aktivit α - glukosidázy pomocí obou metodik



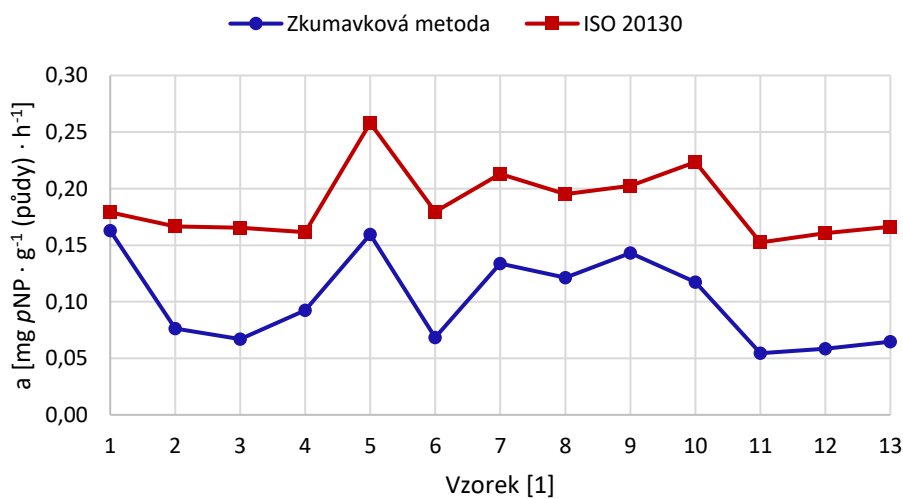
Obrázek 20: Porovnání metod enzymových aktivit pro α - glukosidázu



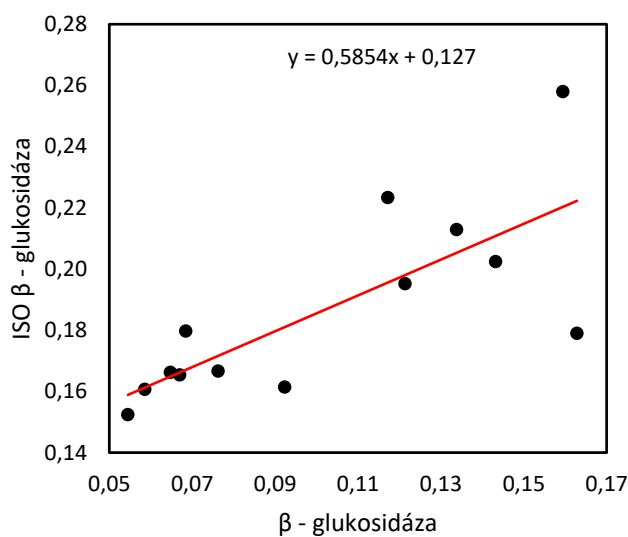
Obrázek 21: Porovnání metodik u aktivity α – glukosidázy

Podle obrázku 20 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity α – glukosidázy mezi sebou korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,651. ISO metoda dosahuje výrazně vyšších hodnot než metoda v mikrozkušavkách. Což může být způsobeno lepší extrakcí enzymu do vodného prostředí použitého v ISO metodě. Na obrázku 21 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.3 Vyhodnocení enzymových aktivit β – glukosidázy pomocí obou metodik



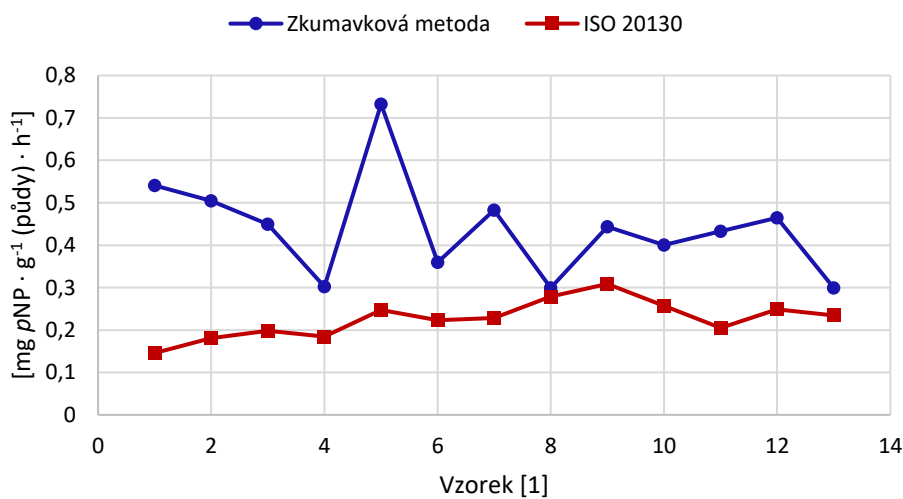
Obrázek 22: Porovnání metod enzymových aktivit pro β – glukosidázu



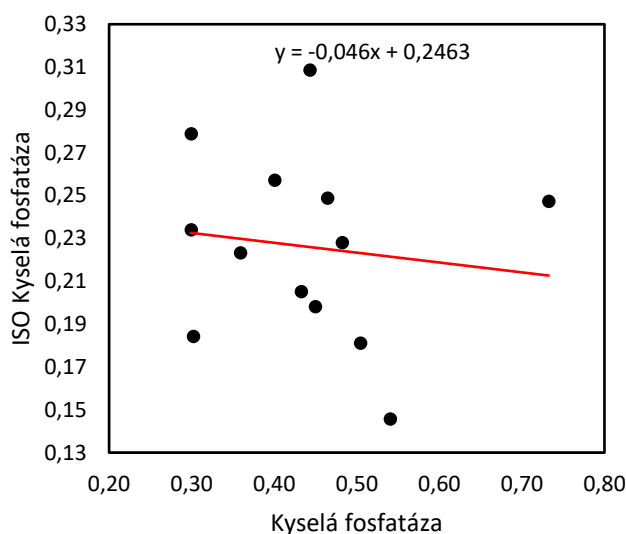
Obrázek 23: Porovnání metodik u aktivity β – glukosidázy

Podle obrázku 22 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity β – glukosidázy spolu korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,755. Zároveň je zřejmé že u ISO metody dosahují enzymové aktivity vyšších hodnot než u metody ve zkumavkách. Což může být způsobeno lepší extrakcí enzymu do vodného prostředí použitého v ISO metodě. Na obrázku 23 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.4 Vyhodnocení enzymových aktivit kyselé fosfatázy pomocí obou metodik



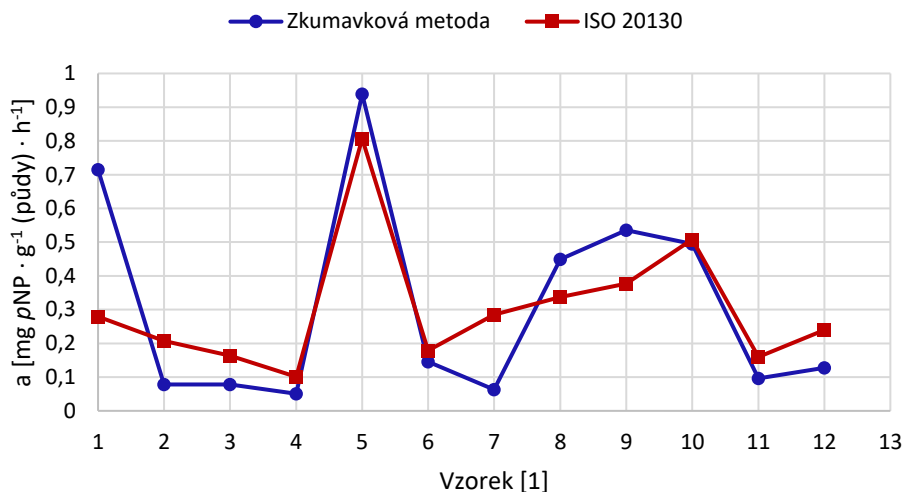
Obrázek 24: Porovnání metod enzymových aktivit pro kyselou fosfatázu



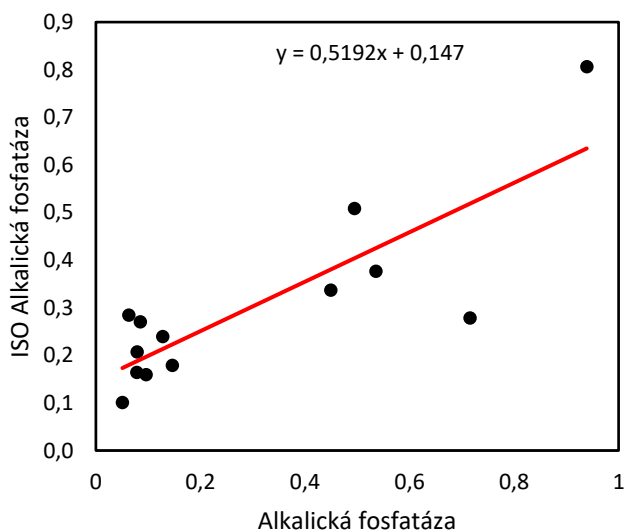
Obrázek 25: Porovnání metodik u aktivity kyselé fosfatázy

Podle obrázku 24 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity kyselé fosfatázy spolu nekorelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty $-0,125$. Nízká korelace může být způsobena rozdílným postupem v metodách. Vyšší enzymová aktivita se dá pozorovat u metody v mikrozkuvkách. Mikrozkuvková metoda může dosahovat lepší extrakce enzymu v průběhu experimentu. V případě kyselé fosfatázy zde může hrát určitou roli extrakce enzymů do vodného prostředí, jelikož u ISO metody probíhala extrakce po dobu 10 minut a u zkumavkové metody probíhala extrakce po celou dobu experimentu tedy 1 hodinu. Doba extrakce u kyselé fosfatázy může hrát významnou roli při stanovení této enzymové aktivity. Na obrázku 25 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.5 Vyhodnocení enzymových aktivit alkalické fosfatázy pomocí obou metodik



Obrázek 26: Porovnání metod enzymových aktivit pro alkalickou fosfatázu

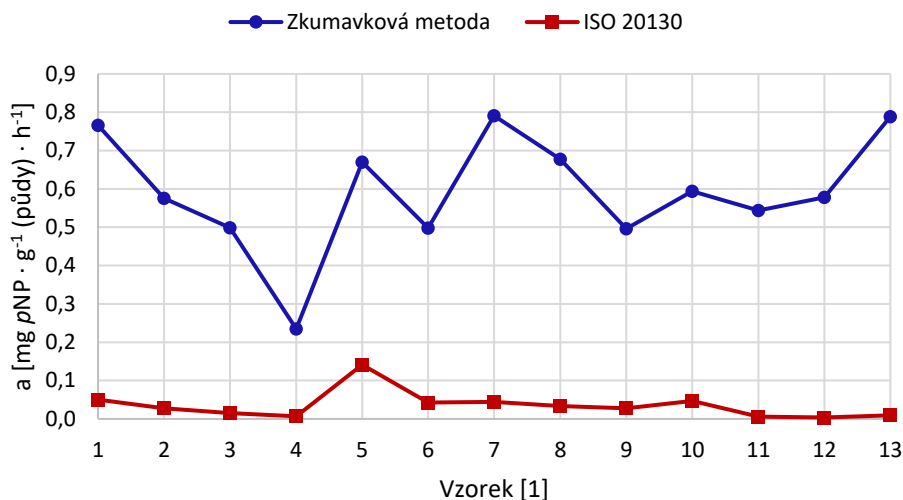


Obrázek 27: Porovnání metodik u aktivity alkalické fosfatázy

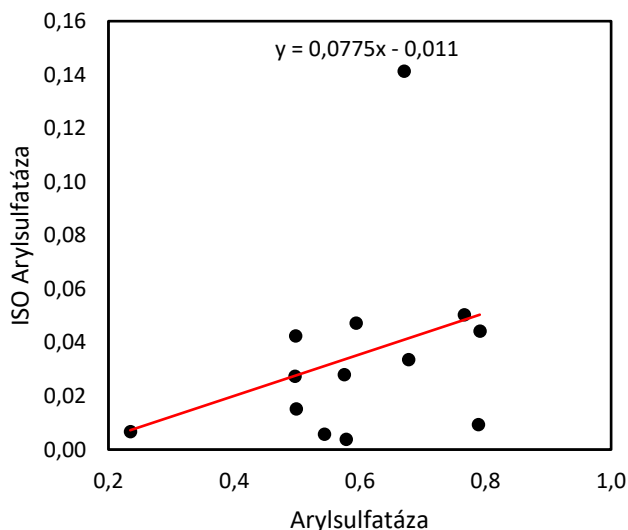
Podle obrázku 26 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity alkalické fosfatázy spolu vysoce korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,829. Obě metodiky dosahují pro různé půdní vzorky podobných hodnot. Podle těchto výsledků se dá usuzovat, že obě metodiky jsou pro stanovení alkalické fosfatázy jsou optimální. Extrakce enzymů pro alkalickou fosfatázu probíhala u obou metod ve vysoce zásaditém prostředí, které mohlo mít zásadní vliv na dobu

extrakce enzymů. Na obrázku 27 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.6 Vyhodnocení enzymových aktivit arylsulfatázy pomocí obou metodik



Obrázek 28: Porovnání metod enzymových aktivit pro arylsulfatázu

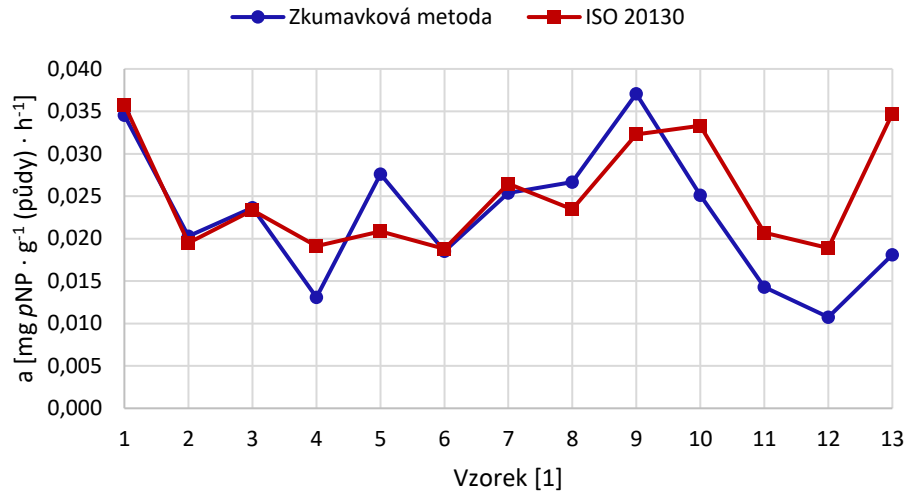


Obrázek 29: Porovnání metodik u aktivity arylsulfatázy

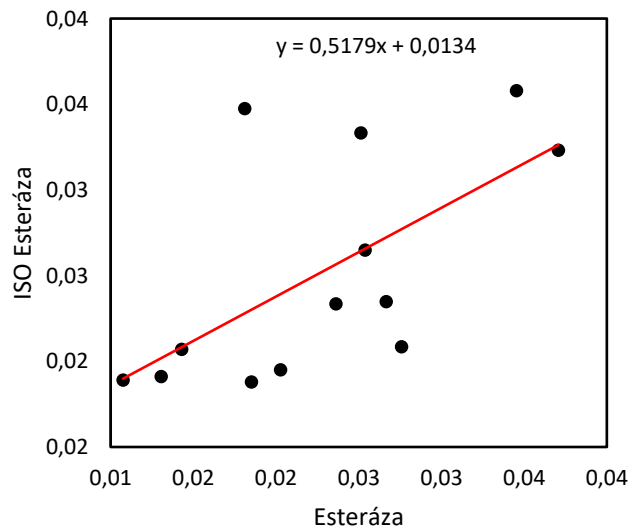
Podle obrázku 28 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity arylsulfatázy spolu velmi nízkce korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,324. Nízká korelace metod může být způsobena při extrakci arylsulfatázy do vodného prostředí, jelikož u metody ISO 20130 nebyl použit tlumivý roztok

o vhodném pH, ale jen demineralizovaná voda. Na obrázku 29 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.7 Vyhodnocení enzymových aktivit esterázy pomocí obou metodik



Obrázek 30: Porovnání metod enzymových aktivit pro esterázu

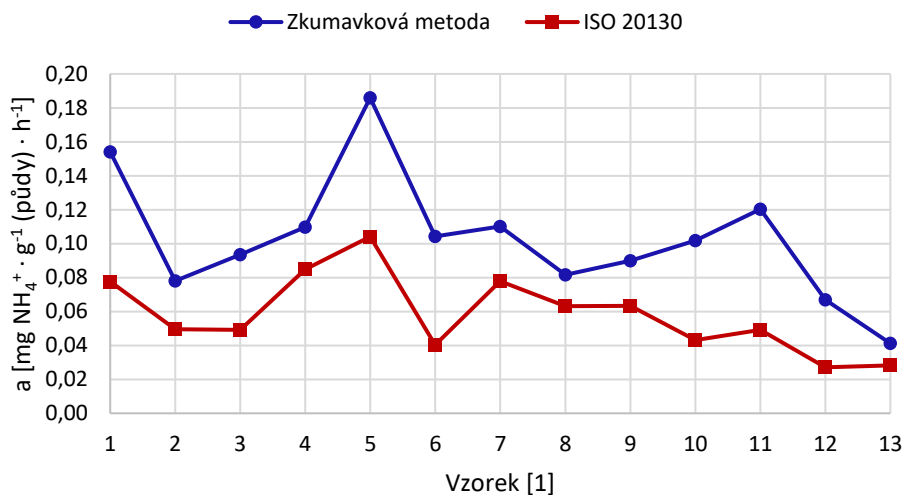


Obrázek 31: Porovnání metodik u aktivity esterázy

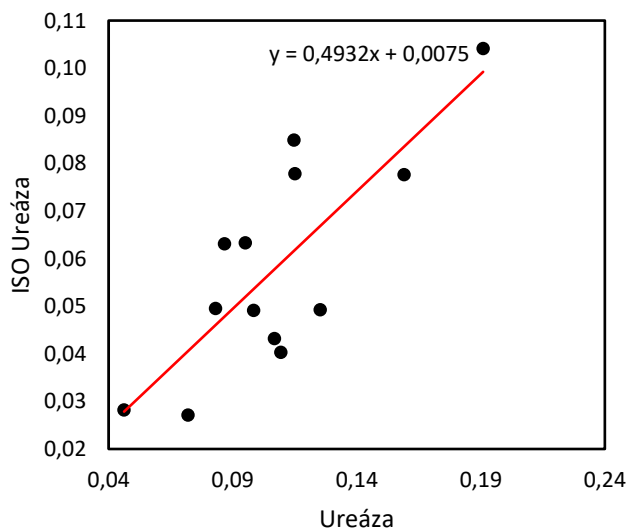
Podle obrázku 30 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity esterázy spolu korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Pearsonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,603. Hodnoty enzymových aktivit esterázy pro jednotlivé vzorky půdy dosahují podobných hodnot u obou metodik, a tak se dá usuzovat, že obě metody pro stanovení

aktivity esterázy jsou optimální. Na obrázku 31 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

5.3.8 Vyhodnocení enzymových aktivit ureázy pomocí obou metodik



Obrázek 32: Porovnání metod enzymových aktivit pro ureázu



Obrázek 33: Porovnání metodik u aktivity ureázy

Podle obrázku 32 se dá usuzovat, že metody pro stanovení enzymové aktivity ureázy spolu vysoce korelují na hladině významnosti $p > 0,05$. Piersonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,797. Hodnoty enzymových aktivit u obou metodik jsou navzájem podobné, avšak u metody ve zkumavkách dosahují hodnoty aktivit vyšších hodnot než u metody podle ISO

normy. Vyšší hodnoty u metody ve zkumavkách mohou být způsobeny lepší extrakcí enzymů do vodného prostředí a déle extrakce. Vzhledem k podobnosti hodnot enzymových aktivit se dá domnívat, že obě metodiky pro stanovení enzymové aktivity ureázy mohou být optimální. Na obrázku 33 je znázorněna závislost enzymové aktivity pro jednotlivé vzorky.

Tabulka 33: Korelační koeficienty metodiky jednotlivých enzymových aktivit

Enzymová aktivita	α – glukosidáza	Alkalická fosfatáza	Arylsulfatáza	β – glukosidáza	Esteráza	Kyselá fosfatáza	Ureáza
Korelační koeficient	0,651	0,829	0,324	0,755	0,603	-0,125	0,797

Závislost jednotlivých enzymových aktivit mezi sebou je shrnuta v tabulce 33, kde jsou vypočteny jednotlivé korelační koeficienty pro obě metodiky každého vzorku. Z výsledků je patrné, že nejvyššího korelačního koeficientu dosahuje alkalická fosfatáza a nejnižšího kyselá fosfatáza. Vysoké hodnoty korelace u alkalické fosfatázy mohou mít souvislost s extrakcí do zásaditého prostředí. Nízká korelační závislost u kyselých fosfatáz může být způsobena krátkou dobou extrakce enzymů do vodného prostředí nebo tím, že hodnoty u kyselých fosfatáz představují z části intracelulární enzymy. Extrakce u ISO metody probíhala pouze po dobu 10 minut. Při metodě prováděné v mikrozkuvkách byly enzymy extrahovány po celou dobu, tedy 1 hodinu, a tak se mohly na celkové enzymové aktivitě podílet i enzymy intracelulární. K podobným výsledkům mohlo dojít i u arylsulfatázy, kdy je poměrně nízká korelační závislost, a tak se můžeme domnívat, že doba extrakce v případě arylsulfatázy nemusela být dostačující v případě ISO metody, nebo že v případě arylsulfatázy ve zkumavkové metodě hrály významnou roli intracelulární enzymy anebo bylo použito v případě ISO metody nevhodné extrakční prostředí.

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na důležitost a unikátnost půd pro život na planetě Zemi a také na popis půdních enzymových aktivit měřených v části praktické. Enzymová aktivita půd je právě jedním z významných ukazatelů půdního zdraví a kvality. Hodnoty těchto aktivit vypovídají o mikroorganismech, rostlinách a živočiších, vyskytujících se na půdním povrchu i v profilu. Všechny tyto organismy se podílejí na produkci intracelulárních a extracelulárních enzymů, které můžeme popsat jako půdní enzymy.

Prvním krokem experimentu byla optimalizace stanovení enzymových aktivit v mikrozkuvkách. Stanovení enzymové aktivity bylo optimalizováno pro: α – glukosidázu, β – glukosidázu, kyselou fosfatázu, alkalickou fosfatázu, esterázu, arylsulfatázu a ureázu. Výsledné aktivity zjištěné při optimalizaci byly porovnány s aktivitami v publikovaných pracích.

Bylo hodnoceno 13 různých náhodně zvolených vzorků půdy. Hodnocení probíhalo mikrozkuvkovou a normovanou metodou ISO 2013/2018.

Optimalizací mikrozkuvkové metody se podařilo docílit možné úspory práce a chemikálií.

Metodou ISO 20130 pro stanovení enzymových aktivit půdy bylo hodnoceno 13 typů půd. Možnou nevýhodou této metody je nutnost extrakce enzymů z půdy do vodného prostředí. Výhodou metody je rychlost stanovení a nízká spotřeba materiálu.

Mezi výsledky mikrozkuvkové a normované metody u jednotlivých enzymových aktivit byly stanoveny korelační koeficienty. Korelační koeficient pro aktivity α – glukosidázy činí 0,651 z čehož plyne, že obě provedené metodiky spolu částečně korelují, podobných hodnot korelačních koeficientů dosahují i aktivity esterázy 0,603 a β – glukosidázy 0,755 a ureázy 0,797. Korelační koeficient pro aktivity alkalické fosfatázy činí 0,829 což může znamenat, že obě metodiky spolu korelují. V případě arylsulfatázy korelační koeficient činí 0,324 a tato poměrně nízká hodnota poukazuje na nepříliš dobrou korelaci mezi metodikami, a to platí i v případě kyselé fosfatázy, kde korelační koeficient dosahuje záporné hodnoty -0,125, z toho lze usuzovat že metodiky spolu nekorelují.

Při celkovém zhodnocení kvality půd mikrozkuvkovou a normovanou metodou je patrné, že nejvyšších hodnot enzymových aktivit dosahovala půda číslo 5 a nejnižších hodnot půda

číslo 4. Dle výsledků hodnot enzymových aktivit se dá domnívat, že půda 5 je podle tohoto hodnocení neaktivnější a půda 4 je nejméně aktivní. U půdy 4 je patrná poměrně vysoká hodnota enzymové aktivity ureázy oproti ostatním hodnotám enzymových aktivit.

Na závěr lze konstatovat, že normovaná metoda tím, že zkoumá enzymové aktivity po extrakci do vody, nebo pufru o vhodném pH a nepracuje přímo se suspenzí půdy může mít alespoň pro některé aktivity výrazná omezení a je třeba to mít při její aplikaci na paměti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ASA-CSSA-SSSA [online]. Madison: Soil Science Society of America, 2021 [cit. 2021-05-03]. Dostupné z: <https://www.soils.org/about-soils/>
- [2] RETALLACK, Gregory J. Soil, Soil Processes, and Paleosols. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier, 2020. ISBN 9780124095489. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.12537-0
- [3] MIKANOVÁ, Olga, Tomáš ŠIMON a Dana CERHANOVÁ. *Hodnocení kvality půdy biologickými metodami: metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. ISBN 978-80-7427-044-4.
- [4] WILLIAMS, Hanna, Tino COLOMBI a Thomas KELLER. The influence of soil management on soil health: An on-farm study in southern Sweden. *Geoderma*. 2020, **360**. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/j.geoderma.2019.114010
- [5] PAZ, Carlota a Teresa RODRÍGUEZ. Factors of Soil Formation. *Encyclopedia of Soil Science*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, , 229-230. Encyclopedia of Earth Sciences Series. ISBN 978-1-4020-3994-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-3995-9_207
- [6] DROBNIK, Thomas, Lucie GREINER, Armin KELLER a Adrienne GRÊT-REGAMEY. Soil quality indicators – From soil functions to ecosystem services. *Ecological Indicators*. 2018, **94**, 151-169. ISSN 1470160X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2018.06.052
- [7] HAYNES, R.J. a P.H. WILLIAMS. Nutrient Cycling and Soil Fertility in the Grazed Pasture Ecosystem. *Advances in Agronomy Volume 49*. 2008. New Zealand Institute for Crop and Food Research, Canterbury Agriculture and Science Centre, Christchurch, New Zealand: Elsevier, 1993, s. 119-199. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007493. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(08)60794-4
- [8] REICH, Peter a Thomas HINCKLEY. Water Relations: Soil Fertility, and Plant Nutrient Composition of a Pygmy Oak Ecosystem. *Ecology*. 1980, **61**(2), 400-416. ISSN 00129658. Dostupné z: doi:10.2307/1935197
- [9] WOLTERS, Volkmar. Biodiversity of soil animals and its function. *European Journal of Soil Biology*. 2001, **37**(4), 221-227. ISSN 11645563. Dostupné z: doi:10.1016/S1164-5563(01)01088-3
- [10] BLUM, Winfried E. H. Functions of Soil for Society and the Environment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2005, **4**(3), 75-79. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-005-2236-x
- [11] MENON, Manoj, Tinashe MAWODZA, Arash RABBANI et al. Pore system characteristics of soil aggregates and their relevance to aggregate stability. *Geoderma*. 2020, **366**. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/j.geoderma.2020.114259
- [12] BLUM, Winfried, Peter SCHAD a Stephen NORTCLIFF. *Essentials of soil science: soil formation, functions, use and classification (world reference base, WRB)*. 1. Stuttgart: Borntraeger, 2018. ISBN 978-3-443-01090-4.
- [13] VOET, Donald a Judith VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [14] BERG, Jeremy, Lubert STRYER a John TYMOCZKO. *Biochemistry: chapters 1-34*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002. ISBN 07-167-3051-0.

- [15] PLACZEK, Sandra, Ida SCHOMBURG, Antje CHANG, Lisa JESKE, Marcus ULBRICH, Jana TILLACK a Dietmar SCHOMBURG. BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Research*. 2017, **45**(1), 380-388. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw952
- [16] BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*. 1982, **14**(5), 423-427. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(82)90099-2
- [17] SINSABAUGH, Robert a Jennifer FOLLSTAD SHAH. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2012, **43**(1), 313-343. ISSN 1543-592X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414
- [18] JOHNSON-ROLLINGS, Ashley, Helena WRIGHT, Grazia MASCIANDARO et al. Exploring the functional soil-microbe interface and exoenzymes through soil metaexoproteomics. *The ISME Journal*. 2014, **8**(10), 2148-2150. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2014.130
- [19] BANDICK, Anna a Richard DICK. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 31. 1999, , s. 1471-1479. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(99)00051-6
- [20] KISS, S., M. DRĂGAN-BULARDA a D. RĂDULESCU. *Biological Significance of Enzymes Accumulated in Soil*. Elsevier, 1975, , 25-87. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007271. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(08)70007-5
- [21] DICK, Richard, Donald BREAKWELL a Ronald TURCO. Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators. *Methods for Assessing Soil Quality*. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 1997, s. 247-271. SSSA Special Publications. ISBN 9780891189442. Dostupné z: doi:10.2136/sssaspecpub49.c15
- [22] KARACA, Ayten, Sema CETIN, Oguz TURGAY a Ridvan KIZILKAYA. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. *Soil Enzymology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, s. 119-148. Soil Biology. ISBN 978-3-642-14224-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-14225-3_7
- [23] SOWDEN, F. J. THE FORMS OF NITROGEN IN THE ORGANIC MATTER OF DIFFERENT HORIZONS OF SOIL PROFILES. *Canadian Journal of Soil Science*. 1958, **38**(2), 149-156. ISSN 0008-4271. Dostupné z: doi:10.4141/cjss58-023
- [24] NELSON, D.W. a J.M. BREMNER. Gaseous products of nitrite decomposition in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1970, **2**(3), 203-8. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(70)90008-8
- [25] FRANKENBERGER, W. T. a M. A. TABATABAI. L-Asparaginase activity of soils. *Biology and Fertility of Soils*. 1991, **11**(1), 6-12. ISSN 0178-2762. Dostupné z: doi:10.1007/BF00335826
- [26] FRANKENBERGER, W.T. a M.A. TABATABAI. L-glutaminase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1991, **23**(9), 869-874. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(91)90099-6
- [27] CLARKE, Patricia H. The Aliphatic Amidases of *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in Microbial Physiology Volume 4*. Elsevier, 1969, , 179-222. Advances in Microbial Physiology. ISBN 9780120277049. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2911(08)60442-7

- [28] KELLY, M. a P. H. CLARKE. An Inducible Amidase Produced by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*. 1962, **27**(2), 305-316. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-27-2-305
- [29] FRANKENBERGER, W.T. a M.A. TABATABAI. Characteristics of an amidase isolated from a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*. 1985, **17**(3), 303-308. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(85)90065-3
- [30] GORIN, George. On the mechanism of urease action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1959, **34**, 268-270. ISSN 00063002. Dostupné z: doi:10.1016/0006-3002(59)90265-3
- [31] BLAKELEY, Robert L., John A. HINDS, Hugo E. KUNZE, Edwin C. WEBB a Burt ZERNER. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry*. 1969, **8**(5), 1991-2000. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00833a032
- [32] REITHEL, F.J. 1 Ureases. *Hydrolysis*. Elsevier, 1971, , 1-21. The Enzymes. ISBN 9780121227043. Dostupné z: doi:10.1016/S1874-6047(08)60361-3
- [33] GARG, Shipra a G.S. BAHL. Phosphorus availability to maize as influenced by organic manures and fertilizer P associated phosphatase activity in soils. *Bioresource Technology*. 2008, **99**(13), 5773-5777. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.10.063
- [34] SPEIR, T.W., D.J. ROSS a Valerie A. ORCHARD. Spatial variability of biochemical properties in a taxonomically-uniform soil under grazed pasture. *Soil Biology and Biochemistry*. 1984, **16**(2), 153-160. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(84)90106-8
- [35] EIVAZI, F. a M.A. TABATABAI. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1977, **9**(3), 167-172. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(77)90070-0
- [36] EIVAZI, F. a M.A. TABATABAI. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1977, **9**(3), 167-172. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(77)90070-0
- [37] BRAMS, W.H. a A.D. MCLAREN. Phosphatase reactions in columns of soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 1974, **6**(3), 183-189. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(74)90025-X
- [38] DICK, W. A. a M. A. TABATABAI. KINETICS AND ACTIVITIES OF PHOSPHATASE-CLAY COMPLEXES¹. *Soil Science*. 1987, **143**(1), 5-15. ISSN 0038-075X. Dostupné z: doi:10.1097/00010694-198701000-00002
- [39] JUMA, N. G. a M. A. TABATABAI. Phosphatase activity in corn and soybean roots: Conditions for assay and effects of metals. *Plant and Soil*. 1988, **107**(1), 39-47. ISSN 0032-079X. Dostupné z: doi:10.1007/BF02371542
- [40] HO, Iwan a Kolluru V.B.R. TILAK. A simple method for assessing acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1988, **91**(2), 346-347. ISSN 00071536. Dostupné z: doi:10.1016/S0007-1536(88)80227-4
- [41] TABATABAI, M.A. a J.M. BREMNER. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1969, **1**(4), 301-307. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(69)90012-1
- [42] MARTÍNEZ, J. R. Ramírez. Organic phosphorus mineralization and phosphatase activity in soils. *Folia Microbiologica*. 1968, **13**(2), 161-174. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/BF02868220

- [43] PRIVAT DE GARILHE, Michel. *Enzymes in nucleic acid research*. 1. Paris: Hermann, 1967. ISBN 1199120901.
- [44] BROWMAN, M. G. a M. A. TABATABAI. Phosphodiesterase Activity of Soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1978, **42**(2), 284-290. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1978.03615995004200020016x
- [45] HOSSNER, L. R. a D. P. PHILLIPS. Pyrophosphate Hydrolysis in Flooded Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 1971, **35**(3), 379-383. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1971.03615995003500030018x
- [46] MALCOLM, R.E. Assessment of phosphatase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1983, **15**(4), 403-408. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(83)90003-2
- [47] ALI TABATABAI, M a Warren DICK. Enzymes in Soil. *Enzymes in the Environment*. CRC Press, 2002. Books in Soils, Plants, and the Environment. ISBN 978-0-8247-0614-2. Dostupné z: doi:10.1201/9780203904039.ch21
- [48] HOFFMANN-OSTENHOF, Otto. Schwefelsäureester-Hydrolasen. *Enzyme*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1966, , 1103-1123. ISBN 978-3-662-37578-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-38358-2_26
- [49] NICHOLLS, R.G. a A.B. ROY. *2 Arylsulfatases*. Elsevier, 1971, , 21-41. The Enzymes. ISBN 9780121227050. Dostupné z: doi:10.1016/S1874-6047(08)60085-2
- [50] TABATABAI, M. A. a J. M. BREMNER. Arylsulfatase Activity of Soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1970, **34**(2), 225-229. ISSN 03615995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x
- [51] STROBL, W., M. TRAUNMÜLLER a E. KANDELER. Enzymes Involved in Sulfur Metabolism. *Methods in Soil Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, , 228-234. ISBN 978-3-642-64633-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-60966-4_14
- [52] GRÜNEWALD, H. Comprehensive Biochemistry. Herausgeg. v.M. Florkin und E. H. Stotz. Band 13: Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1964. 1. Aufl., XII, 164 S., Einzelpreis DM 22.80. *Angewandte Chemie*. 1965, **77**(7), 357-357. ISSN 00448249. Dostupné z: doi:10.1002/ange.19650770733
- [53] EIVAZI, F. a M.A. TABATABAI. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1990, **22**(7), 891-897. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(90)90126-K
- [54] SKUJINŠ, J. a R. G. BURNS. Extracellular Enzymes in Soil. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. 2008, **4**(4), 383-421. ISSN 0045-6454. Dostupné z: doi:10.3109/10408417609102304
- [55] MARGESIN, Rosa, Astrid ZIMMERBAUER a Franz SCHINNER. Soil lipase activity - A useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques*. 1999, **13**(12), 859-863. ISSN 0951208X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008928308695
- [56] GODA, Sayed, Iman ELSAYED, Taha KHODAIR, Walaa EL-SAYED a Mervat MOHAMED. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. *Biodegradation*. 2010, **21**(6), 903-913. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-010-9350-3

- [57] CHEN, Sheng, Lingqia SU, Jian CHEN a Jing WU. Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. 2013, **31**(8), 1754-1767. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.09.005
- [58] YAMAMOTO-TAMURA, Kimiko, Syuntaro HIRADATE, Takashi WATANABE, Motoo KOITABASHI, Yuka SAMESHIMA-YAMASHITA, Tohru YARIMIZU a Hiroko KITAMOTO. Contribution of soil esterase to biodegradation of aliphatic polyester agricultural mulch film in cultivated soils. *AMB Express*. 2015, **5**(1), 10. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-014-0088-x
- [59] TSUBOI, Shun, Takumi TANAKA, Kimiko YAMAMOTO-TAMURA a Hiroko KITAMOTO. High-throughput method for the evaluation of esterase activity in soils. *Journal of Microbiological Methods*. 2018, **146**, 22-24. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2018.01.009
- [60] MANOOCHEHRI, Hamed, Nashmin HOSSEINI, Massoud SAIDIJAM, Mohammad TAHERI, Hamideh REZAEI a Fatemeh NOURI. A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020, **25**. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2020.101599
- [61] JACKSON, Colin R., Heather L. TYLER a Justin J. MILLAR. Determination of Microbial Extracellular Enzyme Activity in Waters, Soils, and Sediments using High Throughput Microplate Assays. *Journal of Visualized Experiments*. 2013, (80). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/50399
- [62] CORDERO, Irene, Helen SNELL a Richard BARDGETT. High throughput method for measuring urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2019, **134**, 72-77. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2019.03.014
- [63] GU, Chunhao, Stewart WILSON a Andrew MARGENOT. Lithological and bioclimatic impacts on soil phosphatase activities in California temperate forests. *Soil Biology and Biochemistry*. 2020, **141**. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2019.107633
- [64] LI, Xiangzhen a Pariente SARAH. Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect. *Soil Biology and Biochemistry*. 2003, **35**(7), 925-934. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(03)00143-3
- [65] ACOSTA-MARTÍNEZ, Verónica, Lumarie PÉREZ-GUZMÁN a Jane JOHNSON. Simultaneous determination of β -glucosidase, β -glucosaminidase, acid phosphomonoesterase, and arylsulfatase activities in a soil sample for a biogeochemical cycling index. *Applied Soil Ecology*. 2019, **142**, 72-80. ISSN 09291393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2019.05.001
- [66] GU, Y., P. WANG a C.H. KONG. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. *European Journal of Soil Biology*. 2009, **45**(5-6), 436-441. ISSN 11645563. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejsobi.2009.06.003
- [67] ISO 20130. *Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates*. 2018.
- [68] ACOSTA-MARTÍNEZ, V. a M. A. TABATABAI. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2000, **31**(1), 85-91. ISSN 0178-2762. Dostupné z: doi:10.1007/s003740050628
- [69] BOWLES, Timothy M., Veronica ACOSTA-MARTÍNEZ, Francisco CALDERÓN a Louise E. JACKSON. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed

- agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*. 2014, **68**, 252-262. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2013.10.004
- [70] SAKAI, Yasuo, Mari ISOKAWA, Takashi MASUDA, Hisashi YOSHIOKA, Masahito HAYATSU a Koichi HAYANO. Usefulness of Soil p-Nitrophenyl Acetate Esterase Activity as a Tool to Monitor Biodegradation of Polybutylene Succinate (PBS) in Cultivated Soil. *Polymer Journal*. 2002, **34**(10), 767-774. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1295/polymj.34.767
- [71] EIVAZI, F. a M.A. TABATABAI. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1988, **20**(5), 601-606. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(88)90141-1
- [72] LLOYD, A. B. a M. Jane SHEAFFE. Urease activity in soils. *Plant and Soil*. 1973, **39**(1), 71-80. ISSN 0032-079X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00018046

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance
a	aktivity
ACP	kyselá fosfatáza
ALP	alkalická fosfatáza
c	koncentrace
C _b	koncentrace produktu ISO 20130
C _s	koncentrace produktu vzorku ISO 20130
D	ředění vzorku na 96 jamkové mikrotitrační destičce ISO 20130
m	hmotnost
MUB	modifikovaný univerzální pufr
pNP	para – nitrofenol
RT	doba inkubace ISO 20130
S	sušina
SP	slepý pokus
SV	slepý vzorek
t	doba inkubace
V	objem
V _{ss}	objem výluhu ISO 20130
W _{ds}	hmotnost suchého vzorku ISO 20130
λ	vlnová délka
σ	směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Mechanismus enzymové aktivity</i>	17
<i>Obrázek 2: Enzymy katalyzující cyklus živin – půdní dynamika</i>	20
<i>Obrázek 3: L-asparginázová hydrolýza</i>	21
<i>Obrázek 4: L-glutaminázová hydrolýza</i>	21
<i>Obrázek 5: Amidázová hydrolýza</i>	21
<i>Obrázek 6: Ureázová hydrolýza</i>	22
<i>Obrázek 7: Dvoustupňová reakce [32]</i>	22
<i>Obrázek 8: Karbamoylový</i>	22
<i>Obrázek 9: Fosfatázová hydrolýza</i>	23
<i>Obrázek 10: Fosfodiesterázová hydrolýza</i>	25
<i>Obrázek 11: Hydrolýza pyrofosfátu</i>	25
<i>Obrázek 12: Hydrolýza arylsulfátového aniontu</i>	26
<i>Obrázek 13: Hydrolýza glykosidu</i>	27
<i>Obrázek 14: Vztah pro výpočet aktivity ureázy</i>	32
<i>Obrázek 15: Závislost koncentrace p-nitrofenolu na absorbanci</i>	37
<i>Obrázek 16: Závislost koncentrace amonných iontů na absorbanci</i>	38
<i>Obrázek 17: Výsledné enzymové aktivity pro metodu v mikrozkušavkách</i>	55
<i>Obrázek 18: Výsledné enzymové aktivity pro metodu podle ISO 20130/2018</i>	55
<i>Obrázek 19: Výsledná korelace aktivit (Piersonův korelační koeficient)</i>	56
<i>Obrázek 20: Porovnání metod enzymových aktivit pro α – glukosidázu</i>	57
<i>Obrázek 21: Porovnání metodik u aktivity α – glukosidázy</i>	58
<i>Obrázek 22: Porovnání metod enzymových aktivit pro β – glukosidázu</i>	58
<i>Obrázek 23: Porovnání metodik u aktivity β – glukosidázy</i>	59
<i>Obrázek 24: Porovnání metod enzymových aktivit pro kyselou fosfatázu</i>	59
<i>Obrázek 25: Porovnání metodik u aktivity kyselé fosfatázy</i>	60
<i>Obrázek 26: Porovnání metod enzymových aktivit pro alkalickou fosfatázu</i>	61
<i>Obrázek 27: Porovnání metodik u aktivity alkalické fosfatázy</i>	61
<i>Obrázek 28: Porovnání metod enzymových aktivit pro arylsulfatázu</i>	62
<i>Obrázek 29: Porovnání metodik u aktivity arylsulfatázy</i>	62
<i>Obrázek 30: Porovnání metod enzymových aktivit pro esterázu</i>	63
<i>Obrázek 31: Porovnání metodik u aktivity esterázy</i>	63
<i>Obrázek 32: Porovnání metod enzymových aktivit pro ureázu</i>	64
<i>Obrázek 33: Porovnání metodik u aktivity ureázy</i>	64

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Úloha půdních enzymů [19]</i>	19
<i>Tabulka 2: Přehled referencí zabývajících se enzymovými aktivitami</i>	30
<i>Tabulka 3: Hodnoty absorbance a koncentrací pNP</i>	36
<i>Tabulka 4: Hodnoty absorbancí a koncentrací amonných iontů</i>	37
<i>Tabulka 5: Hmotnost půdy pro stanovení aktivity kyselé fosfatázy</i>	39
<i>Tabulka 6: Absorbance 1 p-nitrofenolu pro aktivitu kyselé fosfatázy</i>	39
<i>Tabulka 7: Absorbance 2 p-nitrofenolu pro aktivitu kyselé fosfatázy</i>	39
<i>Tabulka 8: Výsledky pro alkalickou fosfatázu</i>	42
<i>Tabulka 9: Výsledky pro esterázu</i>	43
<i>Tabulka 10: Výsledky pro arylsulfatázu</i>	44
<i>Tabulka 11: Výsledky pro β-glukosidázu</i>	45
<i>Tabulka 12: Výsledky pro α-glukosidázu</i>	46
<i>Tabulka 13: Výsledky pro ureázu</i>	47
<i>Tabulka 14: Extrakční a zastavovací roztoky pro enzymové aktivity ISO 20130</i>	48
<i>Tabulka 15: Údaje pro mikrotitrační destičku ISO 20130</i>	49
<i>Tabulka 16: Absorbance pNP pro</i>	50
<i>Tabulka 17: Enzymová aktivita kyselé fosfatázy – ISO 20130</i>	50
<i>Tabulka 18: Výsledné enzymové aktivity kyselé fosfatázy v mikrozkušavkách</i>	51
<i>Tabulka 19: Výsledné enzymové aktivity alkalické fosfatázy v mikrozkušavkách</i>	51
<i>Tabulka 20: Výsledné enzymové aktivity β – glukosidázy v mikrozkušavkách</i>	52
<i>Tabulka 21: Výsledné enzymové aktivity α – glukosidázy v mikrozkušavkách</i>	52
<i>Tabulka 22: Výsledné enzymové aktivity esterázy v mikrozkušavkách</i>	52
<i>Tabulka 23: Výsledné enzymové aktivity arylsulfatázy v mikrozkušavkách</i>	52
<i>Tabulka 24: Výsledné enzymové aktivity ureázy v mikrozkušavkách</i>	52
<i>Tabulka 25: Enzymová aktivita kyselé fosfatázy – ISO 20130</i>	53
<i>Tabulka 26: Enzymová aktivita alkalické fosfatázy – ISO 20130</i>	53
<i>Tabulka 27: Enzymová aktivita β – glukosidázy – ISO 20130</i>	53
<i>Tabulka 28: Enzymová aktivita α – glukosidázy – ISO 20130</i>	54
<i>Tabulka 29: Enzymová aktivita esterázy – ISO 20130</i>	54
<i>Tabulka 30: Enzymová aktivita arylsulfatázy – ISO 20130</i>	54
<i>Tabulka 31: Enzymová aktivita ureázy – ISO 20130</i>	54
<i>Tabulka 32: Piersonův korelační koeficient ($p > 0,05$) mezi jednotlivými enzymovými aktivitami</i>	57
<i>Tabulka 33: Korelační koeficienty metodiky jednotlivých enzymových aktivit</i>	65

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Základní data pro stanovení enzymové aktivity metodou v mikrokumavkách

Příloha P II: Základní data pro stanovení enzymové aktivity metodou v mikrokumavkách

Příloha P III: Základní data pro stanovení enzymové aktivity metodou podle normy ISO 20130/2018

Příloha P IV: Základní data pro stanovení enzymové aktivity metodou podle normy ISO 20130/2018

PŘÍLOHA P I: ZÁKLADNÍ DATA PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY METODOU V MIKROZKUMAVKÁCH

	Vzorek [l]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		α - glukosidáza (zkumavková metoda)												
A [1]	0,841	0,607	0,479	0,513	0,731	0,630	0,721	0,623	0,708	0,733	0,502	0,485	0,620	
	0,833	0,711	0,555	0,487	0,780	0,525	0,766	0,650	0,689	0,754	0,557	0,553	0,684	
	0,796	0,644	0,524	0,489	0,792	0,615	0,744	0,626	0,703	0,763	0,567	0,537	0,687	
A5X [1]	0,223	0,163	0,137	0,155	0,189	0,160	0,190	0,179	0,189	0,198	0,148	0,150	0,174	
	0,212	0,190	0,148	0,144	0,196	0,146	0,186	0,181	0,175	0,192	0,147	0,153	0,178	
ASV [1]	0,199	0,172	0,141	0,146	0,186	0,156	0,177	0,173	0,171	0,186	0,146	0,143	0,170	
	0,215	0,286	0,214	0,287	0,179	0,230	0,278	0,241	0,170	0,332	0,273	0,285	0,409	
	0,225	0,296	0,219	0,270	0,197	0,239	0,301	0,242	0,187	0,334	0,291	0,296	0,413	
ASP [1]	0,210	0,301	0,222	0,271	0,194	0,238	0,288	0,241	0,176	0,356	0,301	0,288	0,405	
	0,084													
	0,073													
mVZ (mg)	0,081													
	206,9	203,7	200,9	202,4	204,7	200,0	192,8	201,3	204,8	199,4	194,2	203,2	204,7	
	196,7	202,3	207,6	203,1	192,3	201,2	201,6	194,8	207,1	208,0	204,0	204,2	203,1	
mSP (mg)	200,4	206,6	197,0	203,1	204,2	207,6	203,5	197,7	206,0	203,9	204,6	198,1	202,4	
	201,5	206,2	202,5	202,7	207,7	199,7	200,5	195,8	208,4	201,3	195,0	203,7	208,3	
	209,5	210,1	195,1	201,9	202,5	207,3	196,6	193,8	206,4	200,7	206,1	199,2	205,0	
β - glukosidáza (zkumavková metoda)	205,7	206,6	204,7	204,5	199,4	195,9	205,0	205,0	197,4	199,2	205,0	206,1	202,2	
	2,168	1,238	1,025	1,285	2,086	0,954	1,861	1,569	1,842	1,748	0,988	0,881	1,103	
	2,095	1,228	0,914	1,328	2,044	0,924	1,893	1,627	1,790	1,669	1,066	0,873	1,144	
A [1]	2,243	1,247	0,982	1,401	2,053	0,951	1,797	1,706	1,876	1,668	0,977	0,960	1,088	
	0,518	0,295	0,267	0,328	0,499	0,273	0,450	0,403	0,461	0,438	0,232	0,243	0,284	
	0,495	0,285	0,237	0,320	0,503	0,249	0,449	0,401	0,429	0,400	0,247	0,224	0,282	
A5X [1]	0,517	0,281	0,244	0,327	0,473	0,247	0,443	0,412	0,457	0,395	0,216	0,243	0,267	
	0,206	0,274	0,210	0,279	0,180	0,224	0,277	0,240	0,165	0,348	0,268	0,253	0,373	
	0,224	0,285	0,208	0,252	0,185	0,235	0,269	0,248	0,170	0,355	0,299	0,271	0,379	
ASV [1]	0,212	0,259	0,244	0,250	0,184	0,238	0,284	0,243	0,164	0,359	0,289	0,267	0,397	
	0,068	0,273	0,221	0,260	0,183	0,232	0,277	0,244	0,166	0,354	0,285	0,264	0,383	
	0,063													
ASP [1]	0,056													
	202,8	207,0	204,4	198,8	198,3	199,3	201,5	207,3	208,3	209,4	206,8	202,4	201,3	
	206,0	202,7	195,2	199,6	195,7	195,3	199,4	199,1	203,3	202,9	201,1	202,3	204,5	
mVZ (mg)	207,7	193,2	196,8	205,7	200,4	202,7	207,5	203,9	199,5	195,1	199,4	196,9	203,3	
	194,4	203,5	199,5	202,7	202,1	206,4	205,9	193,8	201,0	199,3	208,6	202,5	201,1	
	202,3	203,8	208,7	195,1	193,4	200,6	202,0	208,4	204,5	193,2	207,5	203,2	209,9	
mSP (mg)	194,7	205,8	199,0	196,4	209,7	203,5	205,0	204,8	197,7	198,4	208,2	208,4	197,8	
	3,605	1,341	1,183	0,786	3,572	1,752	1,935	2,861	3,506	3,510	1,637	1,798	1,436	
	3,737	1,280	1,181	0,847	3,697	1,962	2,163	2,910	3,694	3,565	1,685	2,005	1,545	
A [1]	3,546	1,121	1,105	0,904	3,654	1,980	2,201	2,971	3,458	3,457	1,353	2,000	1,601	
	1,273	0,325	0,315	0,217	1,687	0,471	0,498	0,810	0,967	0,932	0,378	0,432	0,357	
	1,293	0,326	0,300	0,226	1,729	0,477	0,533	0,762	1,033	0,894	0,384	0,464	0,369	
A5X [1]	1,122	0,288	0,282	0,240	1,413	0,494	0,546	0,785	0,829	0,857	0,345	0,466	0,369	
	0,463	0,122	0,125	0,090	0,554	0,180	0,182	0,277	0,305	0,293	0,139	0,142	0,121	
	0,405	0,121	0,112	0,096	0,520	0,165	0,183	0,241	0,324	0,300	0,142	0,159	0,136	
A25X [1]	0,363	0,117	0,113	0,099	0,487	0,185	0,189	0,271	0,291	0,279	0,122	0,156	0,131	
	0,228	0,318	0,285	0,304	0,215	0,247	0,307	0,245	0,185	0,378	0,382	0,379	0,482	
	0,227	0,365	0,268	0,301	0,191	0,271	0,313	0,276	0,189	0,391	0,381	0,374	0,535	
ASV [1]	0,243	0,336	0,312	0,298	0,212	0,27	0,319	0,266	0,204	0,371	0,419	0,389	0,49	
	0,108													
	0,094													
ASP [1]	0,088													
	201,6	202,1	205,5	199,8	192,6	208,5	202,2	206,4	206,9	206,2	198,9	202,0	202,7	
	210,0	204,9	194,1	201,6	202,8	202,5	199,4	198,6	193,6	205,0	204,0	203,2	205,5	
mVZ (mg)	205,2	199,6	198,4	197,3	196,4	203,4	2046,0	198,4	201,0	197,0	198,9	205,2	207,1	
	206,2	195,7	197,8	195,4	197,1	202,8	199,5	204,4	204,6	208,4	200,8	194,3	197,8	
	203,9	208,0	205,3	197,1	204,1	197,8	208,2	204,1	199,9	195,1	199,9	204,7	203,7	
mSP (mg)	195,9	201,2	199,6	209,8	200,5	192,3	195,6	203,5	204,7	194,5	197,7	195,0	206,7	

PŘÍLOHA P II: ZÁKLADNÍ DATA PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY METODOU V MIKROZKUMAVKÁCH

Kyselá fosfátáza (zkumavková metoda)	Vzorek [l]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	A [1]	3,728	3,795	3,682	3,366	3,662	3,641	3,572	3,473	3,209	3,558	3,478	3,465	3,613	
		3,615	3,562	3,608	3,459	3,698	3,601	3,751	3,685	3,544	3,847	3,742	3,603	3,703	
		3,531	3,569	3,501	3,532	3,611	3,527	3,648	3,619	3,244	3,718	3,566	3,612	3,707	
	A5X [1]	1,349	1,43	1,325	0,878	1,94	1,052	1,322	1,071	0,906	1,214	1,152	1,259	1,267	
		1,441	1,324	1,201	0,874	1,983	1,041	1,285	1,059	0,958	1,206	1,108	1,188	1,239	
		1,438	1,422	1,283	0,872	1,902	1,058	1,175	1,113	0,801	1,262	1,129	1,168	1,239	
	A25X [1]	0,426	0,417	0,369	0,265	0,567	0,307	0,403	0,309	0,253	0,371	0,345	0,375	0,399	
		0,42	0,395	0,372	0,263	0,549	0,306	0,397	0,302	0,285	0,364	0,32	0,361	0,383	
		0,438	0,405	0,363	0,281	0,544	0,311	0,374	0,33	0,257	0,373	0,344	0,35	0,375	
	ASV [1]	0,2	0,287	0,202	0,255	0,201	0,225	0,272	0,249	0,192	0,348	0,276	0,272	0,388	
		0,212	0,296	0,217	0,256	0,2	0,227	0,296	0,261	0,185	0,379	0,285	0,307	0,404	
		0,213	0,289	0,227	0,361	0,201	0,269	0,282	0,297	0,171	0,36	0,295	0,335	0,401	
	ASP [1]	0,099													
		0,095													
		0,093													
	mVZ (mg)	198,3	198,3	208,4	195,5	196,0	206,3	194,0	195,7	201,3	205,2	200,5	208,7	201,9	
		202,2	193,2	202,3	202,5	194,9	196,7	196,5	204,0	208,0	200,4	202,8	201,8	199,7	
		192,1	201,0	202,7	203,8	205,6	199,1	205,4	206,4	195,9	195,9	201,3	195,2	193,8	
	mSP (mg)	201,5	198,1	193,7	203,3	197,8	203,0	206,4	196,6	202,5	204,4	199,1	207,1	208,6	
		201,5	200,2	196,2	203,6	205,5	199,2	195,5	198,3	209,5	198,5	201,0	197,7	208,6	
		207,5	208,3	205,0	196,3	192,0	207,4	204,7	204,5	196,2	203,9	199,3	206,1	196,1	
	Esteráza (zkumavková metoda)	A [1]	0,598	0,374	0,418	0,266	0,456	0,325	0,477	0,468	0,610	0,437	0,294	0,230	0,351
			0,519	0,344	0,407	0,290	0,457	0,357	0,436	0,458	0,577	0,467	0,325	0,272	0,366
			0,578	0,434	0,418	0,308	0,470	0,344	0,421	0,461	0,604	0,462	0,329	0,259	0,366
		ASV [1]	0,093	0,108	0,087	0,101	0,085	0,099	0,099	0,088	0,099	0,119	0,116	0,099	0,119
			0,105	0,099	0,088	0,107	0,091	0,098	0,106	0,086	0,103	0,126	0,122	0,112	0,118
			0,092	0,118	0,093	0,110	0,082	0,097	0,097	0,09	0,105	0,12	0,116	0,108	0,108
ASP [1]		0,041													
		0,040													
		0,042													
mVZ (mg)		204,3	203,8	198,7	199,8	198,6	194,1	205,4	209,1	203,3	194,3	195,5	194,6	204,8	
		202,1	196,1	205,5	206,9	199,2	196,3	198,4	208,5	201,1	194,6	204,5	204,5	200,1	
		194,4	203,3	204,3	208,6	203,5	196,6	196,0	203,3	204,5	202,7	208,4	206,3	195,7	
mSP (mg)		195,4	202,8	200,3	201,7	201,5	204,9	199,0	208,8	205,5	202,8	197,6	202,5	193,5	
		198,1	202,5	193,7	204,4	197,8	198,7	199,7	194,9	2043,0	206,2	196,3	196,3	206,1	
		206,4	206,1	205,8	205,6	196,1	201,5	204,1	208,2	202,1	199,8	200,5	205,3	193,1	
Arylsulfátáza (zkumavková metoda)		A [1]	3,588	3,551	3,573	3,006	3,703	3,595	3,705	3,629	3,417	3,696	3,621	3,626	3,638
			3,847	3,518	3,509	2,909	3,765	3,588	3,847	3,692	3,536	3,692	3,742	3,692	3,729
			3,764	3,58	3,675	2,983	3,846	3,607	3,777	3,768	3,655	3,88	3,731	3,897	3,739
	A5X [1]	1,574	1,166	1,085	0,715	1,482	1,062	1,713	1,371	1,043	1,283	1,242	1,41	1,884	
		1,541	1,083	0,956	0,669	1,265	1,033	1,7	1,325	1,024	1,302	1,146	1,441	1,804	
		1,587	1,233	0,974	0,69	1,47	0,96	1,659	1,317	0,999	1,356	1,154	1,478	1,737	
	A25X [1]	0,434	0,324	0,313	0,191	0,401	0,28	0,476	0,368	0,293	0,324	0,312	0,336	0,453	
		0,44	0,317	0,275	0,206	0,361	0,294	0,452	0,389	0,29	0,336	0,326	0,327	0,459	
		0,395	0,316	0,255	0,198	0,364	0,257	0,4	0,36	0,256	0,349	0,285	0,306	0,409	
	ASV [1]	0,096	0,089	0,089	0,100	0,096	0,097	0,101	0,084	0,106	0,139	0,106	0,108	0,141	
		0,097	0,110	0,094	0,107	0,098	0,096	0,105	0,087	0,115	0,122	0,122	0,105	0,125	
		0,097	0,100	0,095	0,108	0,102	0,109	0,098	0,088	0,108	0,12	0,114	0,108	0,122	
	ASP [1]	0,089													
		0,078													
		0,081													
	mVZ (mg)	211,0	193,9	199,4	204,6	206,4	201,9	203,3	200,2	194,8	194,7	206,2	195,6	204,8	
		196,3	192,8	201,8	197,9	192,9	192,7	208,0	192,2	203,5	198,1	197,1	207,5	201,5	
		198,8	197,7	205,6	201,0	202,1	194,7	207,2	199,5	195,3	209,3	200,2	200,3	193,6	
mSP (mg)	197,7	199,5	193,8	200,9	198,3	205,8	199,6	204,6	197,5	201,2	208,0	201,7	206,4		
	198,1	209,5	205,5	200,7	200,8	195,0	194,2	194,6	207,9	202,8	200,2	195,7	199,5		
	193,8	198,3	201,4	208,3	208,5	199,7	200,4	196,5	204,2	208,3	201,3	199,5	200,5		
Ureáza (zkumavková metoda)	A [1]	0,440	0,367	0,356	0,392	0,620	0,361	0,468	0,342	0,362	0,388	0,402	0,341	0,331	
		0,508	0,358	0,358	0,394	0,625	0,361	0,469	0,343	0,363	0,368	0,402	0,342	0,337	
		0,495	0,353	0,357	0,391	0,634	0,360	0,421	0,342	0,362	0,381	0,406	0,348	0,334	
	ASV [1]	0,104	0,101	0,104	0,113	0,119	0,100	0,122	0,110	0,119	0,104	0,124	0,116	0,119	
		0,108	0,103	0,106	0,114	0,121	0,102	0,127	0,101	0,112	0,118	0,114	0,118	0,120	
		0,106	0,107	0,111	0,114	0,116	0,099	0,136	0,109	0,112	0,118	0,122	0,120	0,144	
	ASP [1]	0,091													
		0,091													
		0,094													
	mVZ (mg)	201,6	202,4	201,9	193,5	198,8	201,5	208,2	207,2	204,2	202,9	209,7	203,1	196,1	
		193,6	198,9	198,9	198,0	200,6	199,5	200,0	194,3	193,5	199,3	196,7	193,2	204,5	
		200,1	199,1	207,2	208,6	202,0	206,3	196,4	207,9	209,9	205,7	196,9	206,0	206,3	
	mSP (mg)	205,8	203,1	201,3	197,7	207,2	204,7	205,1	208,3	200,4	206,4	204,3	199,0	205,4	
		200,6	203,7	201,5	198,4	208,3	198,2	198,7	197,7	196,7	209,0	199,2	199,4	194,6	
		207,5	209,0	205,5	205,5	194,2	193,6	203,6	201,3	209,7	201,1	198,7	203,0	198,6	

PŘÍLOHA P III: ZÁKLADNÍ DATA PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY METODOU PODLE NORMY ISO 20130/2018

	Vzorek [l]	1			2			3			4			5			6			7		
		α - glukosidáza (ISO 20130)		0.133	0.140	0.145	0.097	0.108	0.109	0.101	0.110	0.101	0.098	0.121	0.102	0.248	0.253	0.270	0.155	0.173	0.179	0.139
AVZ [1]		0.131	0.145	0.144	0.099	0.102	0.109	0.103	0.112	0.102	0.102	0.116	0.104	0.257	0.249	0.273	0.148	0.162	0.183	0.139	0.148	0.141
		0.133	0.142	0.145	0.099	0.114	0.115	0.108	0.111	0.102	0.104	0.117	0.106	0.253	0.255	0.273	0.152	0.172	0.166	0.134	0.147	0.158
ASV [1]		0.090	0.095	0.100	0.071	0.096	0.089	0.078	0.096	0.083	0.093	0.091	0.082	0.193	0.189	0.186	0.115	0.135	0.124	0.093	0.097	0.096
m [g]		1.0092	1.0044	1.0049	1.0088	1.0024	1.0109	1.0129	1.0136	1.0117	1.0065	1.0034	1.0035	1.0037	1.0014	1.0064	1.0205	1.0034	1.0149	1.0078	1.0086	1.0055
Vzorek [l]		8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]		0.139	0.144	0.151	0.137	0.134	0.131	0.180	0.195	0.188	0.140	0.091	0.087	0.097	0.101	0.101	0.098	0.096	0.106			
		0.134	0.133	0.141	0.133	0.130	0.124	0.178	0.194	0.190	0.106	0.101	0.096	0.107	0.104	0.101	0.100	0.095	0.116			
		0.131	0.138	0.146	0.134	0.134	0.128	0.186	0.184	0.207	0.106	0.097	0.096	0.095	0.107	0.095	0.100	0.098	0.118			
ASV [1]		0.091	0.096	0.100	0.093	0.098	0.086	0.124	0.122	0.140	0.080	0.082	0.079	0.072	0.086	0.077	0.077	0.072	0.090			
m [g]		1.0082	1.0176	1.0189	1.0057	1.0072	1.0034	1.0023	1.0111	1.0096	1.0127	1.0016	1.0083	1.0114	1.0084	1.0120	1.0108	1.0122	1.0081			
Vzorek [l]		1			2			3			4			5			6			7		
AVZ [1]		0.234	0.234	0.231	0.212	0.226	0.214	0.217	0.223	0.208	0.214	0.215	0.236	0.302	0.354	0.312	0.258	0.275	0.274	0.261	0.264	0.276
		0.227	0.231	0.232	0.203	0.206	0.211	0.217	0.210	0.174	0.218	0.224	0.212	0.313	0.311	0.310	0.289	0.265	0.289	0.274	0.258	0.259
		0.224	0.230	0.249	0.207	0.214	0.220	0.212	0.208	0.205	0.216	0.223	0.213	0.314	0.351	0.358	0.254	0.228	0.268	0.246	0.269	0.268
ASV [1]		0.091	0.096	0.091	0.070	0.085	0.094	0.075	0.085	0.076	0.098	0.094	0.087	0.114	0.133	0.124	0.120	0.131	0.128	0.098	0.095	0.100
m [g]		1.0092	1.0044	1.0049	1.0088	1.0024	1.0109	1.0129	1.0136	1.0117	1.0065	1.0034	1.0035	1.0037	1.0014	1.0064	1.0205	1.0034	1.0149	1.0078	1.0086	1.0055
Vzorek [l]		8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]		0.244	0.257	0.263	0.279	0.258	0.248	0.420	0.273	0.316	0.227	0.202	0.203	0.209	0.219	0.229	0.226	0.222	0.224			
		0.240	0.258	0.265	0.256	0.249	0.251	0.290	0.285	0.312	0.224	0.198	0.204	0.207	0.210	0.215	0.225	0.220	0.238			
		0.242	0.255	0.260	0.262	0.252	0.249	0.302	0.290	0.308	0.205	0.202	0.201	0.197	0.216	0.231	0.226	0.215	0.230			
ASV [1]		0.095	0.098	0.111	0.099	0.097	0.098	0.136	0.130	0.143	0.107	0.080	0.078	0.076	0.100	0.092	0.099	0.088	0.099			
m [g]		1.0082	1.0176	1.0189	1.0057	1.0072	1.0034	1.0023	1.0111	1.0096	1.0127	1.0016	1.0083	1.0114	1.0084	1.0120	1.0108	1.0122	1.0081			
Vzorek [l]		1			2			3			4			5			6			7		
AVZ [1]		0.500	0.545	0.564	0.485	0.462	0.457	0.506	0.504	0.569	0.742	0.712	0.684	0.670	0.699	0.746	0.522	0.510	0.542	0.479	0.511	0.558
		0.471	0.526	0.534	0.465	0.455	0.451	0.486	0.497	0.567	0.672	0.679	0.683	0.722	0.717	0.807	0.448	0.422	0.471	0.470	0.489	0.525
		0.481	0.528	0.548	0.453	0.446	0.456	0.492	0.494	0.559	0.718	0.691	0.692	0.713	0.690	0.792	0.516	0.512	0.501	0.468	0.510	0.520
ASV [1]		0.400	0.411	0.429	0.395	0.360	0.380	0.439	0.442	0.484	0.654	0.661	0.657	0.396	0.387	0.456	0.422	0.421	0.429	0.366	0.405	0.407
m [g]		1.0050	1.0041	1.0122	1.0105	1.0010	1.0050	1.0059	1.0192	1.0193	1.0325	1.0023	1.0185	1.0017	1.0092	1.0243	1.0060	1.0042	1.0142	1.0040	1.0037	1.0082
Vzorek [l]		8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]		0.506	0.539	0.493	0.390	0.444	0.424	0.762	0.694	0.859	0.704	0.669	0.705	1.010	0.919	0.849	0.893	0.871	0.827			
		0.501	0.514	0.511	0.371	0.432	0.410	0.752	0.669	0.868	0.735	0.664	0.692	0.838	0.880	0.868	0.877	0.881	0.891			
		0.476	0.498	0.502	0.372	0.434	0.407	0.747	0.680	0.830	0.697	0.655	0.720	0.834	0.895	0.876	0.909	0.835	0.872			
ASV [1]		0.363	0.364	0.391	0.231	0.288	0.269	0.589	0.501	0.604	0.639	0.602	0.653	0.754	0.848	0.774	0.793	0.745	0.765			
m [g]		1.0155	1.0159	1.0000	1.0142	1.0000	1.0065	1.0057	1.0104	1.0018	1.0018	1.0079	1.0100	1.0068	1.0154	1.0088	1.0108	1.0049	1.0021			
Vzorek [l]		1			2			3			4			5			6			7		
AVZ [1]		0.103	0.105	0.125	0.129	0.146	0.144	0.128	0.119	0.130	0.127	0.135	0.123	0.166	0.156	0.181	0.145	0.145	0.158	0.145	0.148	0.152
		0.117	0.104	0.127	0.128	0.139	0.138	0.133	0.128	0.138	0.134	0.127	0.122	0.157	0.160	0.196	0.144	0.154	0.153	0.162	0.147	0.151
		0.111	0.105	0.132	0.126	0.143	0.146	0.136	0.134	0.135	0.129	0.128	0.122	0.153	0.156	0.183	0.138	0.138	0.155	0.136	0.164	0.147
ASV [1]		0.053	0.060	0.058	0.056	0.075	0.071	0.050	0.058	0.053	0.063	0.053	0.051	0.066	0.075	0.071	0.056	0.063	0.063	0.060	0.060	0.063
m [g]		1.0050	1.0415	1.0088	1.0070	1.0070	1.0037	1.0018	1.0027	1.0358	1.0139	1.0080	1.0036	1.0139	1.0203	1.0086	1.0082	1.0203	1.0012	1.0143	1.0148	1.0095
Vzorek [l]		8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]		0.165	0.160	0.167	0.200	0.191	0.184	0.176	0.179	0.181	0.148	0.147	0.150	0.160	0.169	0.171	0.155	0.171	0.151			
		0.159	0.162	0.296	0.252	0.190	0.184	0.180	0.177	0.181	0.153	0.144	0.159	0.160	0.159	0.158	0.156	0.151	0.158			
		0.153	0.171	0.168	0.179	0.184	0.187	0.157	0.186	0.171	0.141	0.148	0.150	0.149	0.162	0.173	0.159	0.151	0.153			
ASV [1]		0.063	0.066	0.075	0.073	0.077	0.073	0.076	0.074	0.077	0.075	0.065	0.066	0.057	0.068	0.070	0.068	0.065	0.062			
m [g]		1.0176	1.0233	1.0191	1.0047	1.0145	1.0053	1.0101	1.0191	1.0134	1.0056	1.0178	1.0125	1.0122	1.0075	1.0181	1.0038	1.0101	1.0088			

PŘÍLOHA P IV: ZÁKLADNÍ DATA PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY METODOU PODLE NORMY ISO 20130/2018

Esteráza (ISO 20130)	Vzorek [l	1			2			3			4			5			6			7		
	AVZ [1]	0,121	0,124	0,123	0,080	0,081	0,082	0,103	0,108	0,096	0,091	0,089	0,088	0,116	0,118	0,117	0,109	0,101	0,101	0,106	0,102	0,108
	m [g]	1,0050	1,0415	1,0088	1,0070	1,0070	1,0037	1,0018	1,0027	1,0358	1,0139	1,0080	1,0036	1,0139	1,0203	1,0086	1,0082	1,0203	1,0012	1,0143	1,0148	1,0095
	Vzorek [l	8			9			10			11			12			13					
	AVZ [1]	0,104	0,109	0,107	0,124	0,122	0,128	0,113	0,119	0,115	0,099	0,099	0,092	0,097	0,090	0,079	0,118	0,119	0,119			
	m [g]	1,0176	1,0233	1,0191	1,0047	1,0145	1,0053	1,0101	1,0191	1,0134	1,0056	1,0178	1,0125	1,0122	1,0075	1,0181	1,0038	1,0101	1,0088			
	Vzorek [l	1			2			3			4			5			6			7		
	AVZ [1]	0,251	0,272	0,256	0,152	0,146	0,157	0,126	0,131	0,120	0,105	0,110	0,114	0,610	0,653	0,611	0,250	0,280	0,268	0,230	0,266	0,267
	m [g]	1,0092	1,0044	1,0049	1,0088	1,0024	1,0109	1,0129	1,0136	1,0117	1,0065	1,0034	1,0035	1,0037	1,0014	1,0064	1,0205	1,0034	1,0149	1,0078	1,0086	1,0055
	Vzorek [l	8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]	0,218	0,230	0,256	0,275	0,240	0,245	0,280	0,290	0,322	0,202	0,121	0,113	0,106	0,106	0,120	0,115	0,124	0,140				
m [g]	1,0082	1,0176	1,0189	1,0057	1,0072	1,0034	1,0023	1,0111	1,0096	1,0127	1,0016	1,0083	1,0114	1,0084	1,0120	1,0108	1,0122	1,0081				
Arylsulfatáza (ISO 20130)	Vzorek [l	1			2			3			4			5			6			7		
	AVZ [1]	0,416	0,374	0,363	0,316	0,285	0,311	0,287	0,329	0,323	0,327	0,364	0,401	0,421	0,412	0,414	0,255	0,236	0,241	0,469	0,415	0,338
	m [g]	1,0092	1,0044	1,0049	1,0088	1,0024	1,0109	1,0129	1,0136	1,0117	1,0065	1,0034	1,0035	1,0037	1,0014	1,0064	1,0205	1,0034	1,0149	1,0078	1,0086	1,0055
	Vzorek [l	8			9			10			11			12			13					
	AVZ [1]	0,370	0,341	0,325	0,374	0,341	0,346	0,356	0,380	0,479	0,330	0,226	0,221	0,175	0,158	0,211	0,209	0,196	0,180			
	m [g]	1,0082	1,0176	1,0189	1,0057	1,0072	1,0034	1,0023	1,0111	1,0096	1,0127	1,0016	1,0083	1,0114	1,0084	1,0120	1,0108	1,0122	1,0081			
	Vzorek [l	1			2			3			4			5			6			7		
	AVZ [1]	0,404	0,295	0,263	0,239	0,237	0,237	0,237	0,241	0,258	0,258	0,289	0,369	0,273	0,310	0,421	0,249	0,251	0,267	0,351	0,280	0,251
	m [g]	1,0092	1,0044	1,0049	1,0088	1,0024	1,0109	1,0129	1,0136	1,0117	1,0065	1,0034	1,0035	1,0037	1,0014	1,0064	1,0205	1,0034	1,0149	1,0078	1,0086	1,0055
	Vzorek [l	8			9			10			11			12			13					
AVZ [1]	0,206	0,196	0,229	0,263	0,238	0,229	0,235	0,275	0,409	0,342	0,217	0,196	0,172	0,192	0,214	0,210	0,211	0,205				
m [g]	1,0082	1,0176	1,0189	1,0057	1,0072	1,0034	1,0023	1,0111	1,0096	1,0127	1,0016	1,0083	1,0114	1,0084	1,0120	1,0108	1,0122	1,0081				