

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOLOGIE

*Vliv dusíkaté zátěže mokřadních luk na obsah
volných aminokyselin v půdě*

Vypracoval: **Martin ŠEDA**

Vedoucí diplomové práce: **Prof. Ing. Hana Šantrůčková, CSc.**

České Budějovice, 2009

Šeda, M.: Vliv dusíkaté zátěže mokřadních luk na obsah volných aminokyselin v půdě. (Effect of nitrogen eutrofication of wetland soils on organic nitrogen content and quality, Master thesis, in Czech), České Budějovice 2009. 40 s. – Faculty of Education, The University of South Bohemia, Czech republic.

Anotace:

Tato práce sleduje vliv zvýšeného přísunu dusíku na obsah volných aminokyselin ve dvou typech odlišných půd – v minerální půdě v oblasti Hamr a v organické půdě v oblasti Záblatí v jižních Čechách. Experiment je uskutečněn přímo na lokalitách zamokřených luk, kde je vlivem přídatného hnojení simulován zvýšený vstup dusíku do půdy. Po dobu 2,5 roku byly sledovány hodnoty celkového dusíku a volných aminokyselin v půdě. Součástí práce je otestování ninhydrinové metody a metody HPLC na stanovování volných aminokyselin a také stanovení vhodného extrakčního činidla.

Annotation:

This study deals with an effect of fertilization on amount and quality of free amino acids in soil from wet meadows affected by nutrient loading. Free amino acids were analysed in the soil from the field experiment situated at wet meadows, where an increased nutrient input is simulated (fertilizer NPK). The experiment was established on two sites with different types of soil – Záblatí with organic soil and Hamr with mineral soil, both areas in the South Bohemia region. The soil was repeatedly sampled for more than two years and year. One part of this study is focused on testing of ninhydrine-method and HPLC-method for measuring free amino acids and efficiency of different extractants.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury. Pouze analýza vzorků metodou HPLC byla provedena ve spolupráci s firmou WATREX s.r.o., Praha.

V Českých Budějovicích dne 23. 04. 2009

.....

Děkuji své vedoucí diplomové práce, Prof. Ing. Haně Šantrůčkové, CSc., za cenné rady, připomínky, trpělivost a porozumění, s nímž mě při této práci vedla.

Dále děkuji všem pracovníkům Katedry biologie ekosystémů, kteří se podíleli na přípravě vhodných podmínek pro moji práci. Také bych rád poděkoval svému oponentovi za kritické zhodnocení mé diplomové práce.

Mé poděkování patří i všem ostatním, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce.

Tato práce byla uskutečněna za podpory grantového projektu GA ČR č. 526/06/0276
a
výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR: 6007665801.

OBSAH:

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ REŠERŠE	5
1.1 Úvod	5
1.2 Eutrofizace	6
1.3 Půda a její význam v ekosystému	7
1.3.1 Půda	7
1.3.2 Mokřadní ekosystémy	7
1.3.3 Dusík v půdách mokřadních ekosystémů	8
1.4 Měření volných aminokyselin v půdě	10
1.4.1 Extrakce volných aminokyselin z půdy	10
1.4.2 Ninhydrinová metoda – zdroje a historie	11
1.4.3 Metoda HPLC – zdroje a historie	13
1.5 Cíl práce a hypotézy	15
2. METODIKA	16
2.1 Sledované lokality	16
2.1.1 Lokality	16
2.1.2 Uspořádání pokusných ploch na lokalitách a aplikace hnojiva ...	18
2.2 Odběr a příprava půdních vzorků	19
2.3 Ninhydrinová metoda	20
2.3.1 Extrakce půd	20
2.3.2 Stanovení ninhydrin-reaktivního dusíku	20
2.4 Metoda HPLC	22
2.4.1 Extrakce půd	22
2.4.2 Vlastní analýza	22
2.4.3 Návratnost vnitřních standardů	24
3. VÝSLEDKY	25
3.1 Testování ninhydrinové metody	25
3.1.1 Vliv plynu na ninhydrinové činidlo	25
3.1.2 Stanovení citlivosti metody na různé N-sloučeniny	25
3.2 Testování metody HPLC	28
3.2.1 Stanovení vhodnosti extrakčních činidel	28
3.2.2 Zjištění návratnosti vnitřních standardů	28
3.3 Stanovení aminokyselin v půdě	29
3.3.1 Volná půda	29
3.3.2 Rhizosféra	32
4. DISKUSE	33
5. ZÁVĚR	36
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Úvod

Mokřady jsou jedním z nejvýznamnějších typů ekosystémů, které plní nezastupitelnou roli v globálním i regionálním měřítku. Fungují jako úložiště živin, jsou schopny zadržet velká množství vody a podílí se na celkové bilanci skleníkových plynů. Nezanedbatelný je i výskyt a přežívání některých druhů organismů, a to i ohrožených (Chytil a kol., 1999). V současné době dochází k ovlivňování mokřadních ekosystémů antropogenním znečištěním, bodovým i plošným, závažným i méně závažným. To vede ke změnám vegetačního krytu, změnám druhové diversity, ale především ke zvyšování produkce skleníkových plynů. Je proto nanejvýš důležité pochopit roli mokřadů na regionální i celosvětové úrovni, jakožto i porozumět detailně jevům, které se odehrávají uvnitř těchto ekosystémů. Dekompozice, cykly biogenních prvků, koloběhy některých látek, vliv eutrofizace či znečištění – to je jen několik příkladů z mnoha oblastí, které je třeba pečlivě probádat. Vždyť i malé změny mohou způsobit veliké důsledky...

V roce 2006 byl založen terénní experiment v CHKO Třeboňsko, který je zaměřen na sledování vlivu zvýšené živinové zátěže na primární produkci a složení vegetačního krytu. V návaznosti na to se zkoumají změny v dekompozici organické hmoty, v procesech transformace dusíku, ve složení půdních mikrobiálních společenstev a v uvolňování skleníkových plynů. Hlavní hypotézou projektu je, že zvýšená zátěž externím doplňováním dusíku a fosforu ve formě hnojiva urychlí transformaci organické hmoty a dusíku v půdě a následně ovlivní primární produkci porostu. Vliv živinové zátěže je větší v organických než v minerálních půdách. Předkládaná práce je dílčí součástí tohoto projektu a zaměřuje se na změny v obsahu volných aminokyselin vlivem živinové zátěže.

1.2 Eutrofizace

Eutrofizace je proces obohacování stojatých a tekoucích povrchových vod minerálními živinami, které zpětně vedou ke zvýšení biologické produkce a k mnohdy nežádanému zarůstání vodního biotopu. Rozlišujeme eutrofizaci přirozenou a indukovanou. Přirozená eutrofizace je výsledkem přirozeného vývoje a zrání nádrže, je pozvolná. Zatímco indukovaná eutrofizace je způsobena zejména přísunem biogenních prvků z výluhů hnojiv a odpadních vod (Říhová, Ambrožová, 2007). O eutrofizaci mluvíme i v případě zvýšeného přísunu živin do mokřadů a půd. To pak vede ke zvyšování rozkladu organické hmoty v půdě a uvolňování živin, především nitrátů, které odtékají do podzemních vod. Dalším důsledkem je zvýšené uvolňování CO₂ z půdy. V mokřadních ekosystémech jsou vedle CO₂ uvolňována i významná množství oxidů dusíku a methanu.

Zajímavý pokus byl proveden na mokřadech Hudsonského zálivu. Vytýčená část mokřadů zde posloužila jako přirozené prostředí experimentu. Do systému byly přidávány některé biogenní prvky (dusík, fosfor, uhlík) a sledovalo se jak budou organismy reagovat. Zde bylo prokázáno, že limitujícími prvky regulující míru primární produkce a rozklad rostlinného opadu jsou dusík a fosfor (Campbell, Reece, 2002).

Rychnovská (1993) zaznamenala výrazný nárůst rostlinné biomasy v lučních porostech, pokud byla lokalita hnojena, avšak také výrazné ztráty dusíku ze systému, způsobené denitrifikací a vyplavováním. Takový trend je zřejmý i u ekosystémů mokřadních, kde přidání živin paradoxně způsobuje vyšší ztráty dusíku ze systému (in: Mach, 2007).

Problém eutrofizace je v současnosti řešen alespoň částečně – použitím třetího stupně čištění odpadních vod, nejčastěji označované jako biologické odstraňování živin (dusíku a fosforu). V této nově implementované fázi se mikrobiologickou cestou transformují nitráty na plynný dusík a fosfor je zabudován do bakterií. K tomuto účelu slouží tzv. poly-P-bakterie (například rod *Acinetobacter*), které mohou koncentrovat až 10% fosforu v sušině. Jinou cestou odstraňování fosforu je převod jeho sloučenin na nerozpustné formy – Ca₃(PO₄)₂ – a to cestou chemickou (Kalač, Tříška, 1998).

1.3 Půda a její význam v ekosystému

1.3.1 Půda

Půda je směs zvětralé zemské kůry, živých organismů a jejich zvětralých produktů. Nejvýznamnější faktory ovlivňující fyzikální a chemické půdní procesy jsou teplota půdy, voda a vzduch v půdě. Půda se skládá z minerálních a organických částic, organismů (edafonu), půdního roztoku a vzduchu. 94% hmotnosti půdy tvoří minerální složky, na organické složky připadá zbylých 6%, z čehož většinu (5%) tvoří mrtvá organická hmota; živé kořeny a edafon tvoří jen 1% (Rajchard a kol., 2002). Jako edafon označujeme soubor všech živých organismů v půdě, zahrnuje rostliny, živočichy i mikroorganismy. Rhizosféra je oblast půdy obklopující kořeny rostlin, kde dochází k vzájemným interakcím mezi půdními mikroorganismy a kořeny vyšších rostlin (BOLTON a kol., 1993). V rhizosféře je obvykle zvýšené množství dostupných živin, což podporuje množství a aktivitu rhizosférní mikroflóry.

Kapalný podíl půdy obsahující ve vodě rozpuštěné sloučeniny, které vznikají při půdních procesech nebo výměnou s vodou a ovzduším, nazýváme půdním roztokem (Kalač, Tříška, 1998). Rostliny a osmotrofní organismy (bakterie, houby, prvoci) získávají potřebné živiny právě z půdního roztoku. Živiny, které se uvolňují do půdního roztoku, se do půdy dostávají několika způsoby. Například fosfor a vápník se primárně uvolňují z hornin, zatímco dusík je primárně fixován z atmosféry bakteriemi fixujícími vzdušný dusík a po jejich odumření je postupně mineralizován (Rajchard a kol., 2002). Nemalý podíl na změny v obsahu živin v půdě má i člověk. Jen díky hnojivům se do půdy dostává asi 80 milionů tun dusíku ročně (Kalač, Tříška, 1998).

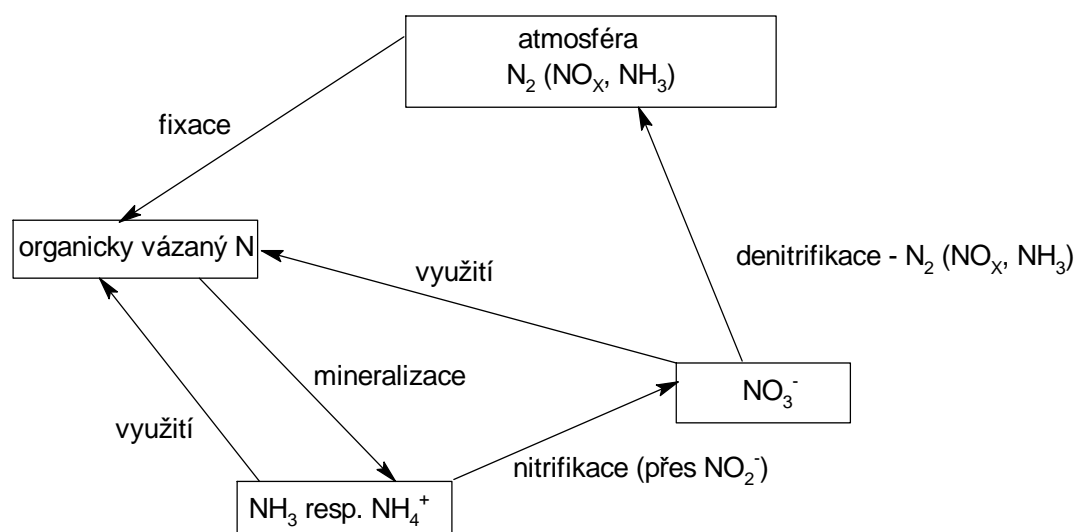
1.3.2 Mokřadní ekosystémy

Mokřady tvoří jakýsi přechod mezi terestrickým (suchozemským) a vodním prostředím. Z toho vyplývá i jejich relativní nestálost (Vymazal, 1995). Mokřady se zabývá Ramsarská úmluva z roku 1971, kde je mokřad definován jako území bažin, slatin, rašelinišť a území pokrytá vodou, přirozeně i uměle vytvořená, trvalá či dočasná, s vodou stojatou, tekoucí, sladkou, slanou či brakickou, včetně území s mořskou vodou, jejíž hloubka nepřesahuje při odlivu šest metrů (IUCN, 1971). Z této obsáhlé a složité definice lze vytušit, jak obtížně definovatelný a rozmanitý ekosystém tvoří mokřady.

1.3.3 Dusík v půdách mokřadních ekosystémů

Dusík je po uhlíku nejdůležitějším prvkem pro život (Rajchard a kol., 2002). Vyskytuje se jak v minerálních, tak v organických formách a tvoří různorodé sloučeniny. Bezesperu se největší zásoba dusíku nachází právě ve vzduchu, dusík tvoří celých 78% obj. vzduchu. Odtud vstupuje dusík do půdy jako produkt fixace bakteriemi, případně ve formě spadu a ve srážkách. Dusík se dostává do půdy i přirozeně z rozkladu biomasy, neboť jako významný biogenní prvek tvoří součást těl organismů. Nesmíme zapomenout ani na přísun antropogenní činností, zejména umělými i organickými hnojivy nebo průmyslovou činností.

V půdě probíhají tři základní procesy přeměny dusíku: Mineralizace, což je přeměna dusíku na minerální formy, imobilizace, během které je dusík zabudováván do biomasy, a oxidace a redukce, při kterých dochází k využívání minerálních forem dusíku v energetickém metabolismu. Tyto procesy probíhají v půdě kontinuálně a simultánně. Schéma pohybu dusíku mezi půdou, rostlinou a okolím je následující:



Obr. č. 1: Zjednodušené schéma cyklu dusíku (převzato z materiálů FŽP UJEP)

V půdě se kromě anorganických forem dusíku (nitráty, amonné ionty) objevují i formy vázané organicky, například některé složky humusu, peptidy, proteiny, amidy, aminosacharidy a volné aminokyseliny. Aminokyseliny jsou uvolňovány do půdy různými mechanismy: exkrecí z kořenů rostlin a mikroorganismů nebo rozpadem buněk,

které aminokyseliny obsahují. Pravděpodobně největším zdrojem však zůstává hydrolýza proteinů a peptidů extracelulárními enzymy (Lipson, Näsholm, 2001).

Murein v buněčných stěnách některých organismů rovněž obsahuje spektrum aminokyselin. Volné aminokyseliny jsou snadno rozložitelné, tudíž se v půdě příliš nehromadí a jejich koncentrace je poměrně nízká. Koncentrace volných aminokyselin se pohybují mezi 1 a 50 μM (Monreal, McGill, 1985). Jiní autoři (Anderson, Berggren, 2004) uvádí ve svých výsledcích hodnoty koncentrace volných aminokyselin v půdě max. 0,11mg N.dm⁻³. Raab a kol. (1999) uvádí, že nejhojnější aminokyselinou je glycin (alpské půdy), aspartát (subalpské půdy) a glutamát (stepní půdy). Celkové množství aminokyselin se podle jejich výsledků pohybovalo mezi 15 – 45 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$. Výsledky jiných autorů (Jones, Owen, Tartar, 2002) ukazují, že koncentrace volných aminokyselin byla relativně nezávislá na typu půdy a průměrně činila 16 – 30 μM .

Volné aminokyseliny v půdě jsou zužitkovány jako zdroj dusíku pro mikroorganismy, ale i pro kořeny rostlin (Formánek a kol., 2004). Významné jsou hlavně v půdách limitovaných dusíkem. Při zvýšené dusíkaté zátěži jsou nahrazeny minerálními formami dusíku.

1.4 Měření volných aminokyselin v půdě

1.4.1 Extrakce volných aminokyselin z půdy

Především je nutné zdůraznit, že extrakce aminokyselin je problematická. Dokládá to i článek Formánka a kol. (2004). Reaktivita jednotlivých aminokyselin závisí na jejich struktuře – především na náboji a na celkové rozpustnosti (Jones a kol., 1994). Ze širokého spektra aminokyselin je jich jen malá část rozpuštěná ve formě tzv. volných aminokyselin. Extrahovatelnost aminokyselin vždy závisí na použitém extrakčním činidle. Rozhodujícím faktorem je polarita rozpouštědla a rozpouštěné látky. Protože má každá aminokyselina jinou strukturu a tudíž jiný náboj a polaritu, je obtížné najít univerzální extrakční činidlo, schopné vyluhovat celé spektrum aminokyselin. Paul a Schmidt (1960) použili 0,5M roztok hydroxidu barnatého, kterým extrahovali arginin s účinností až 97,5%. Avšak pokud použili ethanol, klesla extrahovatelnost pod mez detekce. Již 2M KCl uvolňuje aminokyseliny z buněk osmotickým šokem a extrakce tímto činidlem má tudíž větší výtěžnost. Nevýhodou ale je, že výsledky kromě volných aminokyselin zahrnují i část aminokyselin obsažených v živých buňkách. Nejlepších výsledků bylo dosahováno použitím 0,5M octanu amonného (Formánek a kol., 2004). Rozpouštědla mohou dokonce způsobit hydrolyzu peptidických vazeb a vykazat tak ve výsledcích vyšší, ovšem nesprávné hodnoty. Tomuto je třeba předcházet a brát ohledy na reakce probíhající mezi extrakčním činidlem a extrahovanými látkami.

Přestože je spektrum aminokyselin široké, můžeme najít mnoho společných vlastností jednotlivých aminokyselin a podle nich charakterizovat některé skupiny. Například Campbell a Reece (2002) rozlišují aminokyseliny polární (např. serin, glutamin, cystein), nepolární (např. glycin, lysin, valin) a elektricky nabité (asparagová a glutamová kyselina). Jiné rozdělení je na základě acidity a bazicity. Struktura aminokyseliny obsahující více karboxylových skupin (-COOH) je kyselější, zatímco při obsahu více bazických skupin (-NH₂) je zásaditější. Tak můžeme aminokyseliny dělit na kyselé (např. aspartát, glutamát), zásadité (např. asparagin, glutamin) a přibližně neutrální (glycin, alanin, leucin a jiné).

Gafurova (2006) uvádí, že při analýze svrchního horizontu půdy byla skladba volných aminokyselin následující: 28% dvouhlíkatých*, 39% neutrálních, 8% cyklických, 15 – 23% bazických a necelé 1% sirných.

1.4.2 Ninhydrinová metoda – zdroje a historie

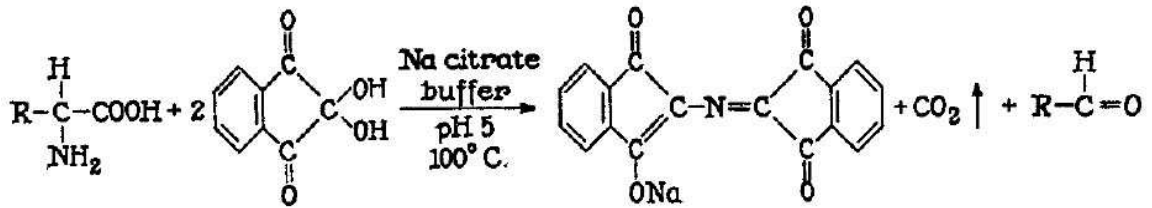
Ninhydrin dekarboxyluje a deaminuje sloučeniny obsahující α -aminoskupiny, reaguje např. s peptidy, s proteiny, s azanem. Reakce probíhá za tvorby barevné komplexní sloučeniny (volně upraveno a doplněno podle Joergensen, Brookes, 1990).

Ninhydrin se používá k analýze aminokyselin, zejména k postkolonové derivatizaci (po oddělení aminokyselin vhodnou metodou následuje reakce s ninhydrinem za vzniku barevných sloučenin), k přímé detekci aminokyselin v různých prostředích, avšak také jako činidlo pro důkaz otisků prstů při vyšetřování (více např. na stránkách <http://forensic-evidence.com>).

Jako první byla při různých podmínkách objevena reakce alaninu s ninhydrinem. Moore a Stein (1948) zjistili, že optimální pH pro reakci je okolo 5. Při pokojové teplotě byla reakce velmi pomalá a poskytovala pouze slabé zbarvení. Přítomnost alkoholu reakci podstatně urychlovala, rychlost se zvyšovala s rostoucí koncentrací alkoholu. Podobné výsledky byly pozorovány při použití organických rozpouštědel s vodou nemísitelných. Místo hydridantinu se též dříve užívala kyselina askorbová. Modifikovaná ninhydrinová metoda pro stanovení primárních aminokyselin používá následující činidla: ninhydrin v alkoholu, fenol, KCN a pyridin. Zbytky volných aminoskupin a amoniaku jsou eliminovány přidávkem Permutitu. Takto připravená činidla jsou stálá více než 1 měsíc při pokojové teplotě, pouze fenol má tendence absorbovat amoniak ze vzduchu a proto by měl být každý týden protřepán s Permutitem. Navíc je podezření, že lysin nereaguje kvantitativně (vše podle Troll, Cannan, 1952). To ovšem popírají výsledky Moore a Stein (1948), podle kterých špatně reagoval prolin, resp. hydroxyprolin. Stejní autoři také potvrdili, že ninhydrin nereaguje se všemi sloučeninami obsahující dusík, například s močovinou, kyselinou močovou nebo s adeninem.

Pozn: *) Vzhledem k více chybám v cizojazyčném překladu této práce se domnívám, že i zde je chyba. Uvedené „dicarbon“ bylo pravděpodobně zaměněno s „dicarbonxylic“, což by znamenalo „se dvěma karboxylovými skupinami (COOH) a tudíž kyselou aminokyselinu. Tento termín by lépe zapadal do kontextu výčtu jednotlivých skupin aminokyselin a navíc, jediná významná dvouhlíkatá aminokyselina je glycin.

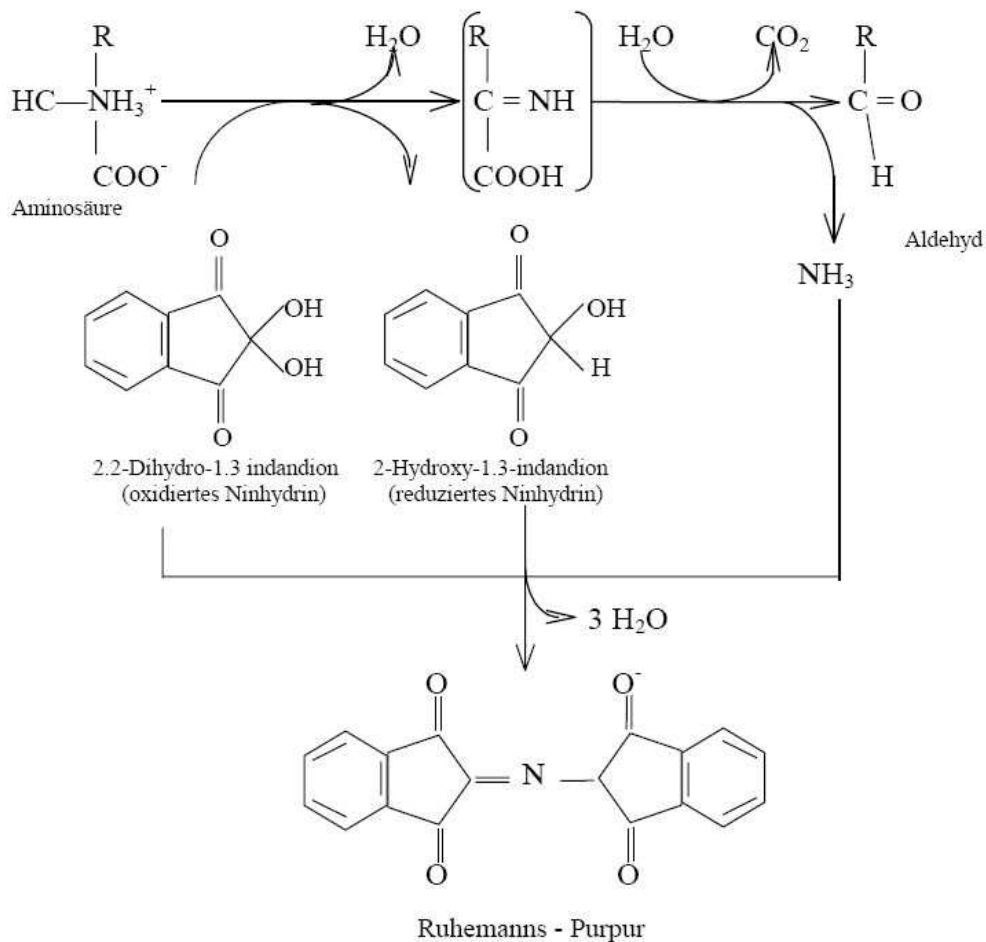
Ninhydrin reaguje s α -aminokyselinou za vzniku aldehydu, oxidu uhličitého a barevné sloučeniny (Moore, Stein, 1948).



Obr. č. 2: Schéma reakce ninhydrinu s aminokyselinou (podle Moore, Stein, 1948)

Podle Ruhemanna (1952) jde nejprve o oxidační deaminaci za tvorby amonného kationu a diketohydrindolu a teprve poté následuje kondenzace.

Maci (2001) uvádí reakci schematicky:



Obr. č. 3: Schéma reakce ninhydrinu s aminokyselinou (podle Maci, 2001)

Jako další složky ninhydrinového činidla se dnes užívají například hydridantin, DMSO (rozpuštědlo dimethylsulfoxid) a různé pufrací systémy. Hydridantin nebyl používán spolu s ninhydrinem vždy. Moore a Stein (1948) použili chlorid cínatý. V průběhu času se metoda modifikovala. Hydridantin je vlastně jakási redukována forma ninhydrinu reagující během reakce s amonnými ionty či s amoniakem. Při 100°C je přibližně po 15 minutách ukončena reakce s volnými aminoskupinami aminokyselin i bílkovin ; reakce s leucinem trvá maximálně 5 minut, zatímco reakce s amoniakem je plně dokončena až po 25 minutách. 2-methoxyethanol byl dříve hojně používaný v ninhydrinovém činidle, avšak bylo zjištěno, že má tendenci tvořit při reakcích peroxidy, proto se dnes používá DMSO (dimethylsulfoxid), který peroxidy netvoří (vše podle Maci, 2001). Sun a kol. (2005) uvádí, že při ninhydrinové metodě je možné užít NaOH-pufra namísto LiOH-pufra, který je drahý. Poskytnuté výsledky byly v jeho experimentech srovnatelné. Při ninhydrinové metodě je možné též vložit vzorky do 94°C teplé vody jen na deset minut namísto původně užívaných 30 minut, aniž by byly výsledky měření zkresleny. Toto je ovšem v rozporu s výsledky jiných autorů (Maci, 2001) a zdá se, že použití delší inkubace je spolehlivější.

Pro vyhodnocování výsledků ninhydrinové metody je nutné vytvářet kalibrační řady určené aminokyseliny a stanovit tak známé hodnoty absorbance při známých koncentracích roztoku aminokyseliny. K tomuto je vhodné použít např. leucin, který poskytuje přesné výsledky (Moore, Stein, 1948). Titíž autoři na základě svých výsledků také doporučují detekovat vzniklé zbarvení spektrofotometricky při vlnové délce 570nm, kde zjistili maximální absorbanci.

1.4.3 Metoda HPLC – zdroje a historie

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Aby docházelo k výše uvedené distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unáší složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fází. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází (zdroj: <http://www.hplc.cz>).

Zkratka HPLC znamená high-performance-liquid-chromatography, překládaná nejčastěji jako vysokoučinná kapalinová chromatografie. Zjednodušeně lze říci, že vzorek se nadávkuje spolu s vhodným rozpouštědlem pomocí dávkovacího ventilu do kolony. Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární (pevnou) fází, kterou prochází fáze mobilní (rozpouštědlo) společně se vzorkem. Při průchodu kolonou dochází k různým interakcím mezi stacionární a mobilní fází a vzorkem. Složky se navzájem sorbují, dochází ke konkurenci (soutěživosti). Hlavními parametry jsou polarita (či nepolárnost) molekul a pH. Po určitém čase celá směs projde kolonou, ovšem jednotlivé látky se v průběhu postupu kolonou oddělí na základě svých chemicko-fyzikálních vlastností. Jednotlivé vystupující látky se pak zjišťují a stanovují vhodným detektorem. Významnou roli při detekci hraje čas, během kterého látky prošly celou kolonou, a také rozdíly v rychlosti průchodu jednotlivých separovaných látek.

Vlastnímu chromatografickému procesu může předcházet předkolonová derivatizace, během níž se používají různá činidla. Pro stanovení aminokyselin jsou to zejména OPA (*o*-ftaldialdehyd), AQC (6-aminochinolylní-N-hydroxysukcinimidyl karbamát), ninhydrin, isokyanáty a isothiokyanáty. O derivatizaci postkolonové, která je řazena za chromatografii a která hojně využívá ninhydrin jako činidlo, pojednává již kapitola 1.4.2 této práce.

Metoda HPLC se používá i ke stanovení volných aminokyselin. Použil ji například J. Díaz a kol. (1996) na rozdělení aminokyselin v půdě, v hydrolyzované sojové bílkovině a v chitinu. Metoda poskytla dobré detekční limity, jakožto i opakovatelnost a reprodukovatelnost experimentu. Také mnohé laboratoře a ústavy dnes nabízejí detekci a analýzu volných aminokyselin ve vzorcích převážně metodou HPLC.

1.5 Cíl práce a hypotézy

Hypotéza:

Zvýšená zátěž externím doplňováním dusíku a fosforu ve formě hnojiva urychlí transformaci dusíku v půdě a následně ovlivní množství a složení volných aminokyselin v půdě. Vliv živinové zátěže bude větší v organických než v minerálních půdách.

Cíle práce:

- Otestovat stanovení citlivosti ninhydrinové metody na různé typy aminokyselin a sloučenin s volnou aminoskupinou.
- Porovnat extrahovatelnost aminokyselin z půdy a zvolit vhodné extrakční činidlo pro stanovení aminokyselin pomocí metody HPLC.
- Stanovit vliv živinové zátěže na obsah volných aminokyselin v půdě mokřých luk.
- Porovnat odpověď organických a minerálních půd na živinovou zátěž.
- Srovnat obsah aminokyselin v rhizosféře rostlin a ve volné půdě.

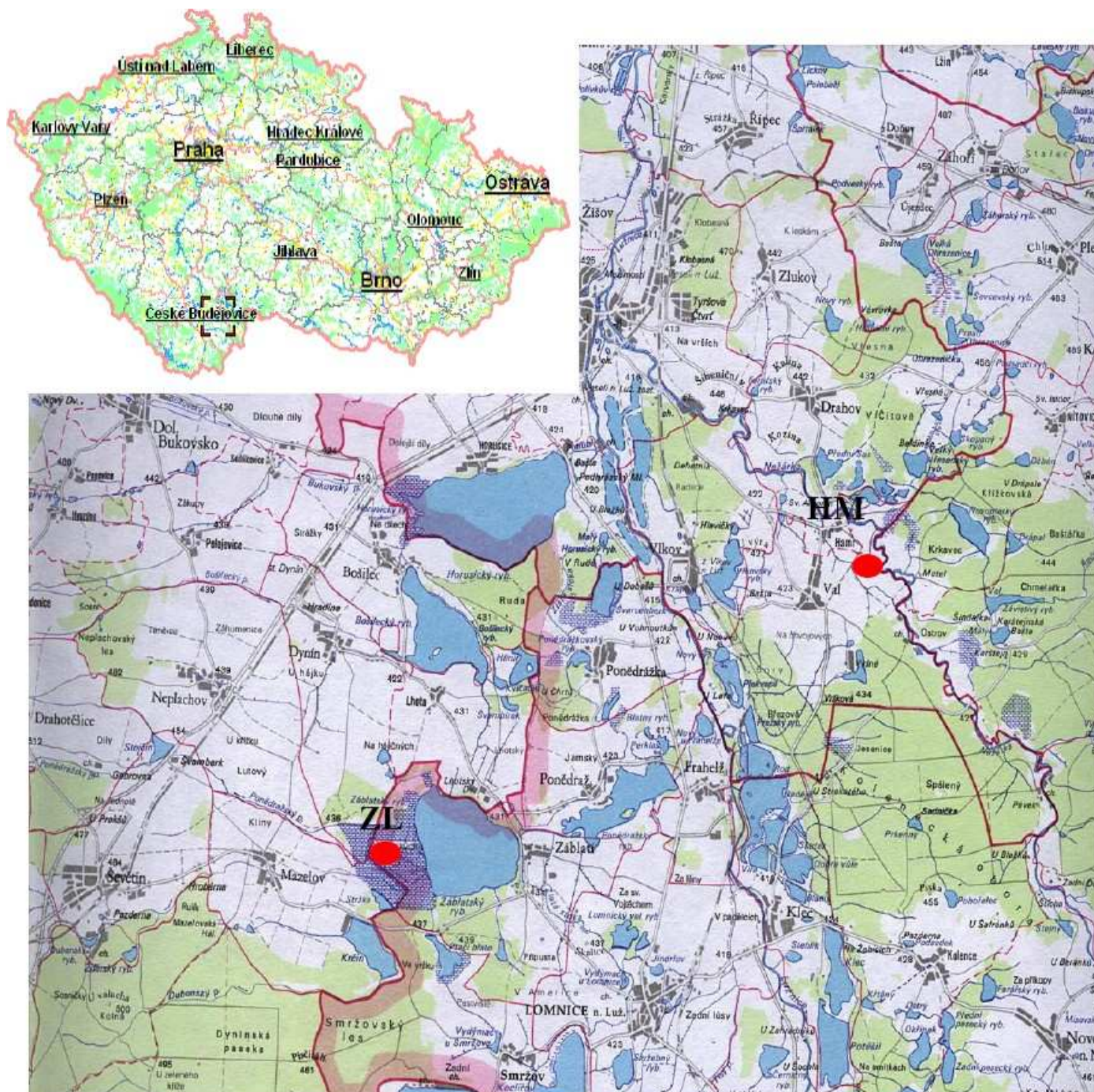
2. METODIKA

2.1 Sledované lokality

2.1.1 Lokality

Sledované lokality se nacházejí v CHKO Třeboňsko, v oblasti Třeboňské pánve.

Lokalizaci sledovaných míst znázorňuje následující mapa:



Obr. č. 4: Lokalizace sledovaných lokalit na území Třeboňska (upraveno dle Gerátové, 2007)

Zamokřené louky jsou po část roku zaplavovány vodou, proto je lze označit jako mokřady. V posledních 10-ti letech se lokality nehnojily a trvale udržovaly sečením.

Charakteristika půd na pokusných lokalitách je uvedena v následující tabulce (Tab. 1).

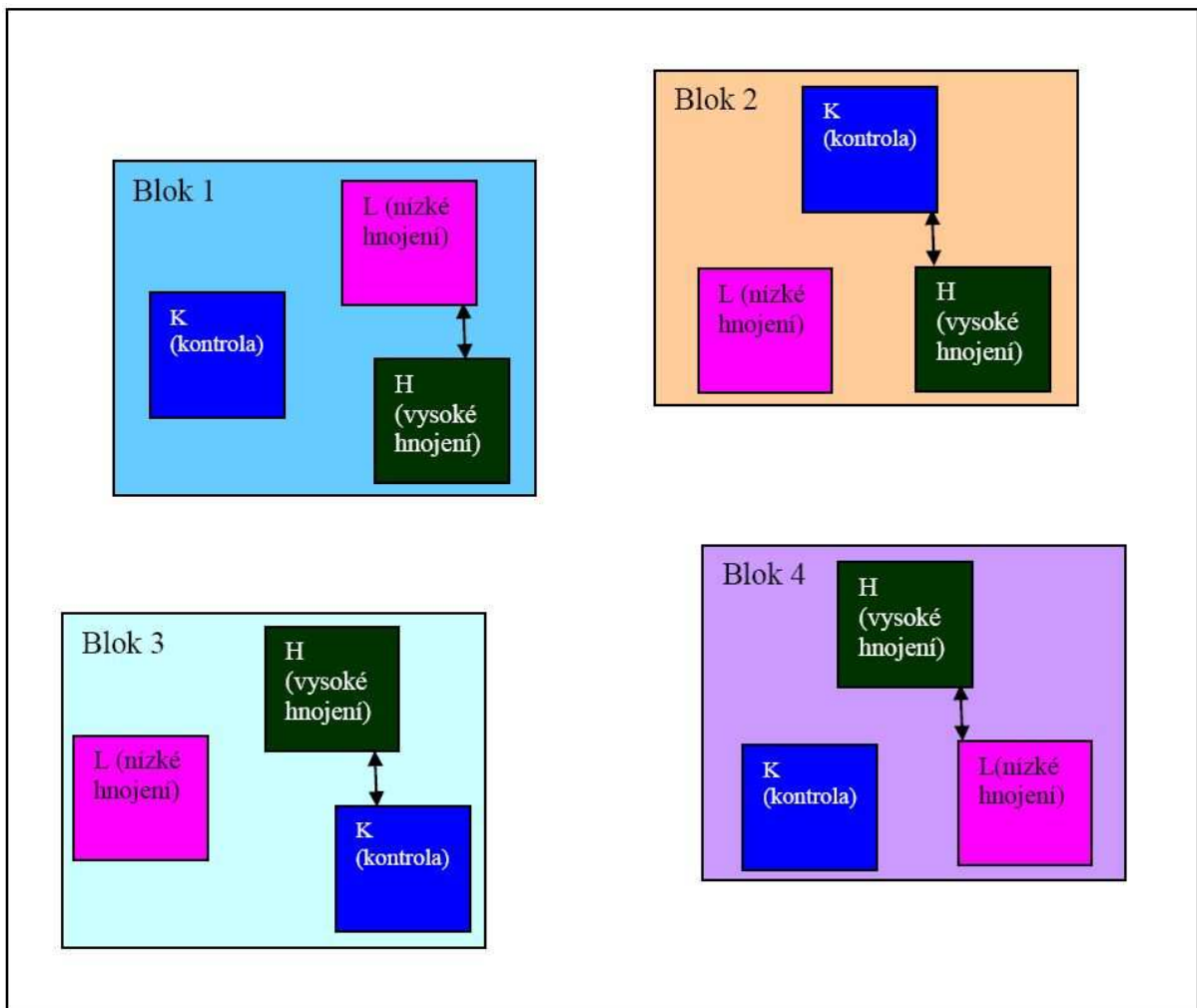
	Hamr	Záblatí
Objemová hmotnost (g.cm^{-3})	0.52 ± 0.04	0.21 ± 0.02
Podíl jílovitých částic (%)	12.5	22.5
Podíl pískovitých částic (%)	15.0	0.0
Celkový obsah C (%)	9.63 ± 1.65	22.33 ± 2.25
Celkový obsah N (%)	0.64 ± 0.10	1.18 ± 0.09
Celkový obsah P (%)	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Poměr C / N	15.0	18.9
pH _{H₂O}	4.9	5.1
pH _{KCl}	3.8	4.3
NO ₃ ⁻ (0.5M K ₂ SO ₄) (g.kg^{-1})	1.57 ± 0.63	2.28 ± 1.05
NH ₄ ⁺ (0.5M K ₂ SO ₄) (g.kg^{-1})	2.74 ± 0.79	2.72 ± 1.79
PO ₄ ³⁻ (oxalát) (g.kg^{-1})	0.60 ± 0.12	1.12 ± 0.12
K (g.kg^{-1})	12.16 ± 0.85	4.36 ± 0.29
Ca (g.kg^{-1})	0.63 ± 0.10	1.37 ± 0.35
Mg (g.kg^{-1})	2.23 ± 0.14	1.82 ± 0.09
Fe (g.kg^{-1})	25.83 ± 1.11	18.80 ± 0.93

Tab. 1: Některé parametry složení půdy na sledovaných lokalitách (upraveno dle Picka, 2008)

Makroklima Třeboňska se dá charakterizovat jako mírné, s průměrnou teplotou vzduchu 7,4°C (Jeník, 1983). Zamokřené louky se vyznačují poměrně vysokými hodnotami relativní vzdušné vlhkosti – srpnový průměr činí 82,2% (Kovářová, 2004). Oblast je též silně ovlivňována fluktuací hladiny podzemní vody díky nedalekému Záblatskému rybníku v okolí Záblatských luk a díky řece Nežárce v okolí Hamerských luk.

2.1.2 Uspořádání pokusných ploch na lokalitách a aplikace hnojiva

Ve dvou sledovaných lokalitách – Zábłatské louky a Hamerské louky – byly připraveny a vytýčeny 4 bloky, vzdálené od sebe 10-15m, trochu rozdílné ve struktuře půdy a v jejím složení. Tato čtyři opakování měla zajistit, že průměr naměřených hodnot bude vystihovat charakter celé pokusné plochy, přestože jsou mezi bloky rozdíly. V blocích byly dále vytýčeny vždy 3 čtverce o rozměrech 3,5 x 3,5m. První, které se vůbec nepřihnojují (označení K-kontrola) ; druhé, které se přihnojují mírně (označení L) ; a konečně třetí, jež se přihnojují výrazně (označení H). Přihnojování se uskutečňuje vždy dvakrát do roka a je aplikováno v dávce 60 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ pro variantu s nízkým hnojením (L), respektive 300 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ pro variantu s vysokým hnojením (H). Jako hnojivo se používá ve vodě rozpuštěná vícesložková směs NPK 15-15-15, tedy odpovídající 15% (hm.) dusíku ve formě N, 15% (hm.) fosforu ve formě P₂O₅ a 15% (hm.) draslíku ve formě K₂O. Uspořádání pokusných ploch na lokalitách přehledně znázorňuje následující schéma:



Obr. č. 5 Uspořádání pokusných ploch na lokalitách (převzato z Nitkulincová, 2008)

2.2 Odběr a příprava půdních vzorků

Vzorky byly odebírány vždy dvakrát do roka, přesná data odběrů jsou uvedena v Tabulce 2:

Datum odběru vzorků	Odebíraný substrát
2.8.2006	Volná půda
24.5.2007	Volná půda + rhizosféra
24.7.2007	Volná půda + rhizosféra
26.5.2008	Volná půda
15.10.2008	Volná půda

Tab. 2: Data odběru vzorků a odebírané substráty

V každém pokusném čtverci (schéma lokality viz 2.1.2) jsme provedli 10 vpichů půdní sondou a z každého pokusného čtverce jsme vytvořili jeden směsný vzorek. Tento jsme uložili do PE sáčku a ihned po odběru umístili do chladicího přenosného boxu. V laboratoři jsme vzorky umístili do chladicí místnosti při 4°C.

Druhý den jsme ze vzorků půdy separovali kořeny rostlin pro analýzu aminokyselin v rhizosférní půdě. Zbylou půdu jsme homogenizovali na 5mm sítech a extrahovali pro chemické analýzy. Pokud nemohla být extrakce provedena ihned, půda byla zamrazena, aby se zabránilo případné degradaci nasbíraného materiálu. Ta by mohla nastat vlivem zvýšené teploty a tedy i vlivem činnosti mikroorganismů.

Dále bylo nutné zjistit podíl sušiny ve vzorcích. To jsme provedli přesným navážením vzorků, jejich vysušením v sušárně při 105°C do konstantní hmotnosti a následným prostým výpočtem rozdílu hmotností.

2.3 Ninhydrinová metoda

2.3.1 Extrakce půd

Jednotlivé vzorky jsme zalili 2M chloridem draselným (poměr půda : KCl ; 1:4 ; hm./obj.) jako extrakčním činidlem. Za neustálého chlazení se směs 60 minut protřepávala a poté centrifugovala na chlazené centrifuze po dobu 10 minut při 8000 RPM. Směs jsme dále zfiltrovali za sníženého tlaku přes skleněný filtr (0,45 μ m). Tento extrakt byl v plastových zkumavkách zamražen.

2.3.2 Stanovení ninhydrin-reaktivního dusíku

Ninhydrinové činidlo

Toto se připravuje den před vlastním stanovováním a uchovává se při laboratorní teplotě, čímž se činidlo stabilizuje. Postup přípravy byl následující. 2g ninhydrinu a 0,3g hydridantinu jsem rozpustil ve 75ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Po přidání 25ml lithiumacetátového pufru (pH=5,2) jsem směs probublával 30 minut čistým dusíkem. Připravené činidlo je pak stálé po dobu 1-2 dnů. Dlouhodobé skladování činidla je možné jen ve tmavých prostorách a před následným použitím je nutné směs opět probublávat čistým dusíkem.

Součástí testování bylo i ověření možnosti použití i jiného inertního plynu pro odstranění kyslíku z ninhydrinového činidla – například helia. Pro vyloučení možných interakcí bylo jedno testování vzorků (odběr 24.05.2007) provedeno duplicitně – první varianta s ninhydrinovým činidlem probublávaným dusíkem a druhá varianta s heliem. Toto duální testování jsem uplatnil i při stanovování citlivosti ninhydrinové metody na různé dusíkaté sloučeniny.

Standardy

Jako standard se v této metodě užívá aminokyselina leucin připravovaná v zásobním roztoku o koncentraci 0,01M. Z tohoto roztoku jsem vytvořil kalibrační řadu napipetováním 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 a 8ml zásobního roztoku do 50ml odměrných baněk a doplněním destilovanou vodou. S kalibračními roztoky jsem zacházel stejně jako s extrahovanými vzorky. Kalibrační křivku jsem vypočítal pomocí lineární regrese (Microsoft Excel).

Vlastní analýza

Z půdního extraktu, ze slepého vzorku i z jednotlivých kalibračních roztoků jsem napipetoval 0,6ml do zkumavky. Poté jsem pomalu přidal 1,4ml pufru kyseliny citronové (pH=5,0) a 1,0ml ninhydrinového činidla. Po promíchání jsem zkumavky vložil na 25 minut do horké vodní lázně temperované na 94°C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu jsem přidal ethanolovou vodu (ethanol:voda v obj. poměru 1:1) o objemu 4,0ml a vzorek jsem promíchal. Nakonec jsem změřil absorbanci proti slepému vzorku (pouze čisté extrakční činidlo), při vlnové délce 570nm na spektrofotometru (Jenway, 6305, UV/Vis).

Při citlivosti metody na různé typy dusíkatých sloučenin jsem testoval následující sloučeniny: glukosamin, chlorid amonný, leucin a hydrazin.

2.4 Metoda HPLC

2.4.1 Extrakce půd

Dílčí úsek práce zahrnoval i testování různých extrakčních činidel a jejich vliv na extrahovatelnost aminokyselin. Seznam analýz s příslušnými extrakčními činidly, která byla použita, uvádí přehledná tabulka (Tab.3):

Termín odběru vzorků	Extrakční činidlo
podzim 2006	0,5M acetát amonný
podzim 2007	2M KCl
jaro 2008	H ₂ O a 0,1M HCl + 2% thiodiglykol
podzim 2008	0,1M HCl + 2% thiodiglykol

Tab. 3: Termíny odběru vzorků a použitá extrakční činidla

Jednotlivé vzorky jsem zalil příslušným extrakčním činidlem (poměr půda : extraktant ; 1:4 ; hm./obj.). Za neustálého chlazení se směs 60 minut protřepávala a poté centrifugovala na chlazené centrifuze po dobu 10 minut při 8000 RPM. Směs jsem dále zfiltraval za sníženého tlaku přes skleněný filtr (0,45 μ m). Tento extrakt byl v plastových zkumavkách zamražen. Následovala lyofilizace – tedy vysušení vzorků za snížené teploty a tlaku.

2.4.2 Vlastní analýza (upraveno podle fy. WATREX)

Navážky vzorků (0,2g) byly rozpuštěny v 10 ml ultračisté vody. Z toho vždy 40 μ l vzorku bylo smíšeno s 150 μ l borátového pufru (pH 8,4) a 20 μ l AQC činidla, vzorek byl třepán po dobu 20 minut a nastříknut do chromatografického systému s kolonou „WATREX 250x4mm C18 AQ 5 μ m“. Mobilní fázi tvořila směs 0,1M natriumacetátu a 60% ACN (acetonitril) ve vodném roztoku při hodinovém gradientu, kdy se postupně zvyšovala koncentrace druhé složky z počátečních 40% až na 100% obj. Výstupy byly detekovány fluorescenčním detektorem JASCO FP-920 při vlnové délce excitační 250nm a emisní 395nm.

Pro hodnocení zastoupení volných aminokyselin v půdě jsem jednotlivé aminokyseliny rozdělil do skupin na základě jejich acidity a bazicity (kyselosti či zásaditosti). Struktura aminokyseliny obsahující více karboxylových skupin (-COOH) je kyselější, zatímco při obsahu více bazických skupin (-NH₂) je zásaditější. Ostatní aminokyseliny jsou přibližně neutrální. Zvláštní skupinou jsou aminokyseliny, které vznikají v sekundárním metabolismu. Sledované aminokyseliny a sekundární metabolity jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

Aminokyselina	Zkratka	Typ
4-Hydroxyprolin	Hyp	Sek. metabolit
α -Aminoadipová kyselina	AAD	Sek. metabolit
α -Aminomáselná kyselina	AAB	Sek. metabolit
Alanin	Ala	Neutrální
Arginin	Arg	Zásaditá
Asparagin	Asn	Neutrální
Asparagová kyselina	Asp	Kyselá
beta-Alanin	Bala	Neutrální
beta-Aminoisomáselná kyselina	Baib	Sek. metabolit
Citrulin	Cit	Sek. metabolit
Cystathionin	Cysta	Sek. metabolit
Cysteová kyselina	Cya	Sek. metabolit
Cystin	Cys	Sek. metabolit
Fenylalanin	Phe	Neutrální
gamma-Aminomáselná kyselina	Gaba	Sek. metabolit
Glutamin	Gln	Neutrální
Glutamová kyselina	Glu	Kyselá
Glycin	Gly	Neutrální
Histidin	His	Zásaditá
Isoleucin	Ile	Neutrální
Leucin	Leu	Neutrální
Lysin	Lys	Zásaditá
Methionin	Met	Neutrální
Ornithin	Orn	Sek. metabolit
Prolin	Pro	Neutrální
Serin	Ser	Neutrální
Taurin	Tau	Sek. metabolit
Threonin	Thr	Neutrální
Tryptofan	Trp	Neutrální
Tyroxin	Tyr	Neutrální
Valin	Val	Neutrální

Tab. 4: Rozdělení sledovaných aminokyselin a sekundárních metabolitů

2.4.3 návratnost vnitřních standardů

Návratnost vnitřních standardů byla stanovena u vzorků odebraných na jaře 2008. Vzorky byly extrahovány směsí vodného roztoku 0,1M HCl s 2% příměsí thiodiglykolu. Přidanými vnitřními standardy byly aminokyseliny valin, lysin a glutamin, vždy v objemu 0,5 ml a koncentraci 0,8 mg.ml⁻¹.

3. VÝSLEDKY

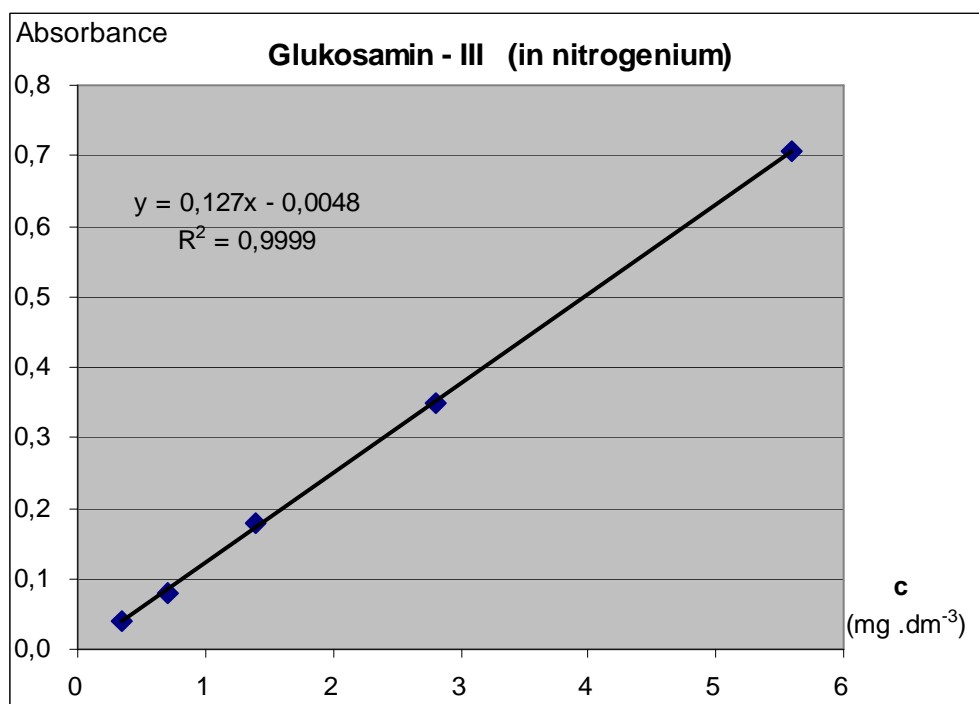
3.1 Testování ninhydrinové metody

3.1.1 Vliv plynu na ninhydrinové činidlo

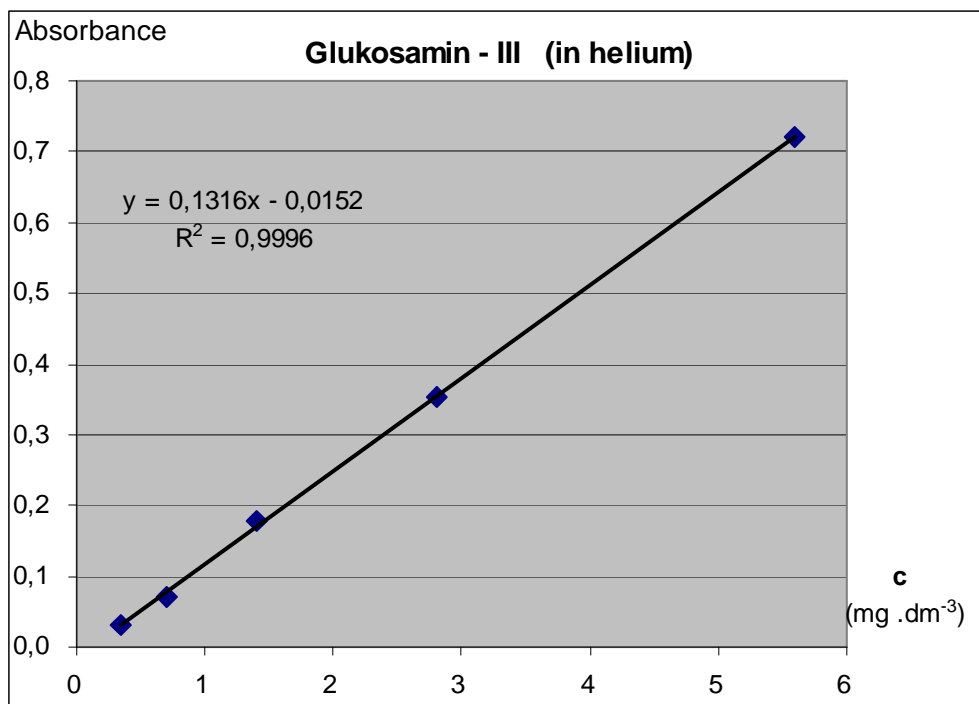
Výsledky testování s dusíkem i s heliem byly až na velice nepatrné přípustné odchylky totožné, což dokazuje, že oba plyny mohou být použity a chovají se vůči systému inertně. Dokazují to i měření prováděná při testování citlivosti metody na různé dusíkaté sloučeniny (obr. č. 6, 7, 8 a 9).

3.1.2 Stanovení citlivosti metody na různé N-sloučeniny

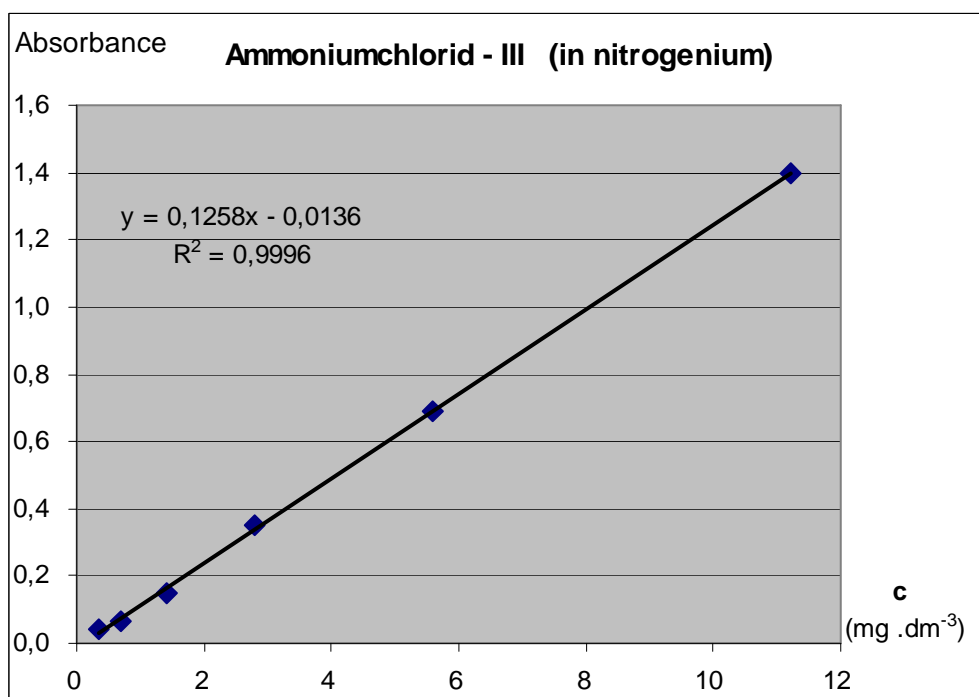
Výsledky glukosaminu i chloridu amonného byly srovnatelné s leucinem, jakožto standardní látkou pro kalibrační řadu (obr. č. 10). Hydrazin prakticky nereagoval. Stejně měření pak bylo ještě jednou pro potvrzení opakováno – s dosažením stejných výsledků. Pro přehlednost nejsou výsledky s hydrazinem v následujících grafech uváděny – hodnoty absorbance byly totiž při všech koncentracích téměř nulové.



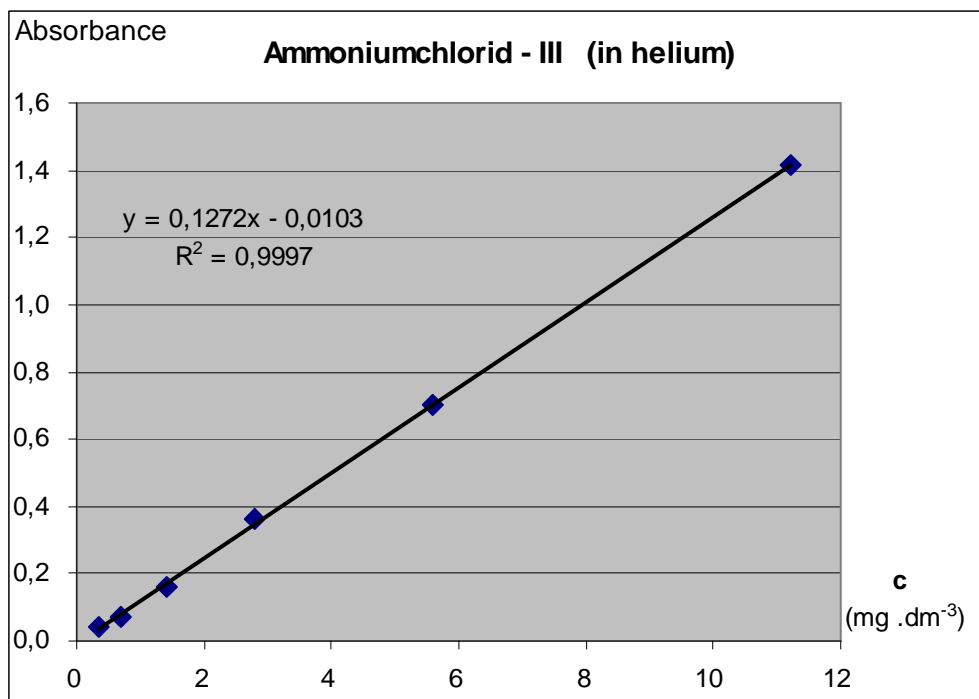
Obr. č. 6: Závislost naměřené absorbance na koncentraci glukosaminu (inertní plyn: dusík)



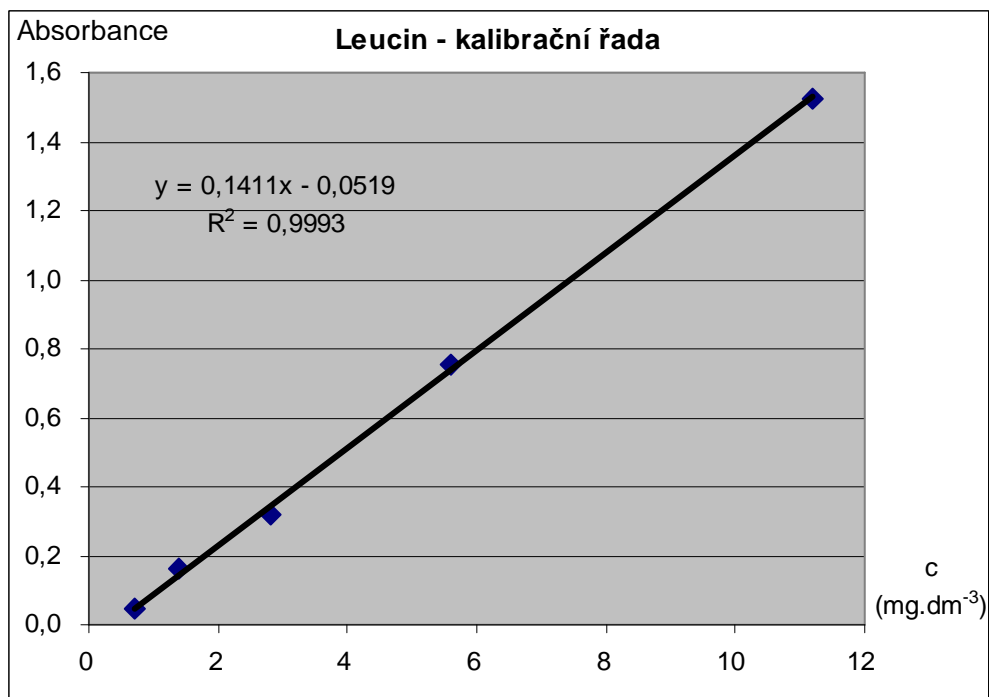
Obr. č. 7: Závislost naměřené absorbance na koncentraci glukosaminu (inertní plyn: helium)



Obr. č. 8: Závislost naměřené absorbance na koncentraci ammoniumchloridu (inertní plyn: dusík)



Obr. č. 9: Závislost naměřené absorbance na koncentraci ammoniumchloridu (inertní plyn: helium)



Obr. č. 10: Závislost naměřené absorbance na koncentraci leucinu (kalibrační řada)

3.2 Testování metody HPLC

3.2.1 Stanovení vhodnosti extrakčních činidel

Acetát amonný nebyl vhodným extrakčním činidlem. Přesnost stanovení rušily velké vrcholy nezreagovaného činidla AQC a přítomné NH_4^+ ionty. Množství přítomných aminokyselin ve vzorku muselo být pro kvantifikaci získáno odečtením slepého vzorku AQC a pufru, což způsobilo enormní nepřesnost stanovení.

Při analýze s chloridem draselným se též projevily potíže, neboť při manipulacích a úpravách vzorku byla na překážku právě vysoká koncentrace této soli, docházelo k zasolování apod.

Extrakce vodou poskytla jen nízkou extrahovatelnost, naprostá většina stanovovaných aminokyselin byla pod mezí detekce (koncentrace pod $0,50 \mu\text{g}$ na g půdy).

Nejlepší výsledky vykazovala směs vodného roztoku $0,1\text{M}$ HCl s 2% příměsí thiodiglykolu. Vzhledem k povaze stanovovaných látek i analytickému systému lze tento extraktant doporučit k dalšímu použití.

3.2.2 Zjištění návratnosti vnitřních standardů

Návratnost přidaného vnitřního standardu je nízká, pohybuje se mezi 7 a 25%. Návratnost aminokyselin se snižovala od valinu přes glutamin až po lysin (Tab. 5). Vyšší hodnoty návratnosti vnitřních standardů vykazují měření prováděná na půdě organické, avšak u lysinu je tato skutečnost opačná – jeho návratnost byla 2x vyšší v půdách minerálních.

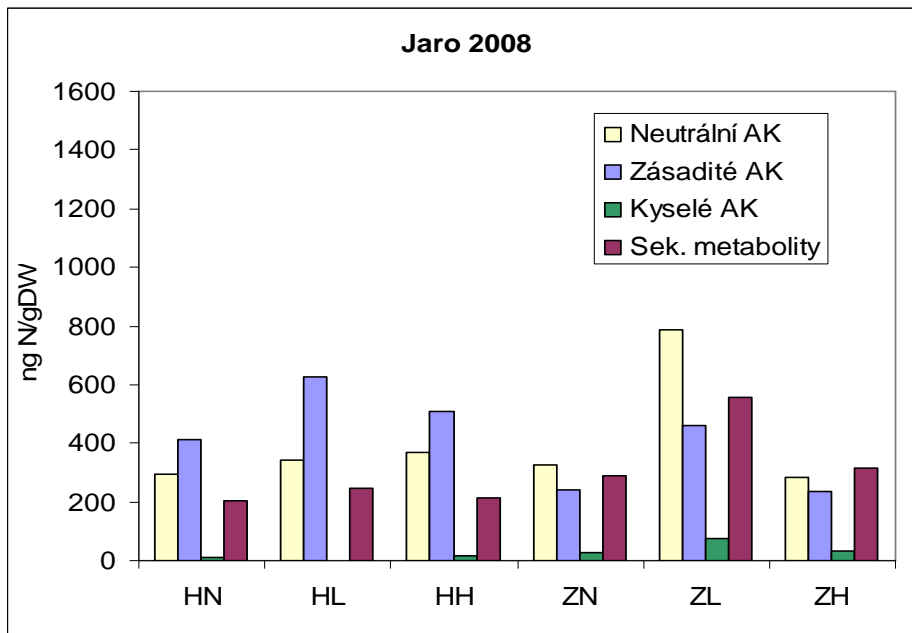
-	<u>Přídavek</u>	<u>Návratnost ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)</u>		<u>Návratnost (%)</u>	
		Hamr	Záblatí	Hamr	Záblatí
<u>Glutamin</u>	40	7.16	7.31	17.9	18.3
<u>Valin</u>	40	7.39	9.95	18.5	24.9
<u>Lysin</u>	40	5.69	2.98	14.2	7.5

Tab. 5: Návratnost vnitřních standardů

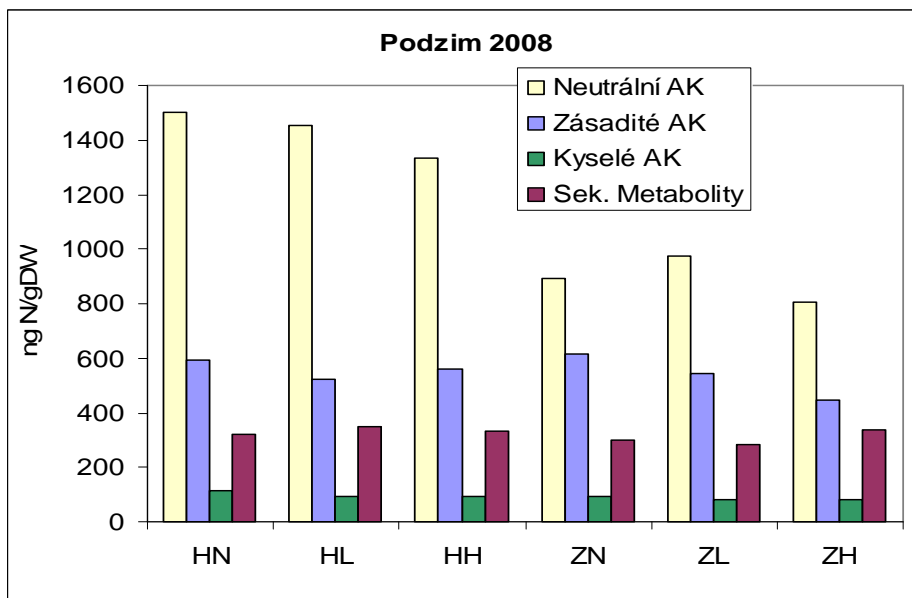
3.3 Stanovení aminokyselin v půdě

3.3.1 Volná půda

Na obou lokalitách převažovalo zastoupení neutrálních a bazických aminokyselin a sekundárních metabolitů (obr. č. 11 a 12). Zastoupení neutrálních aminokyselin se měnilo v závislosti na sezóně. Bylo výrazně vyšší na podzim než na jaře.

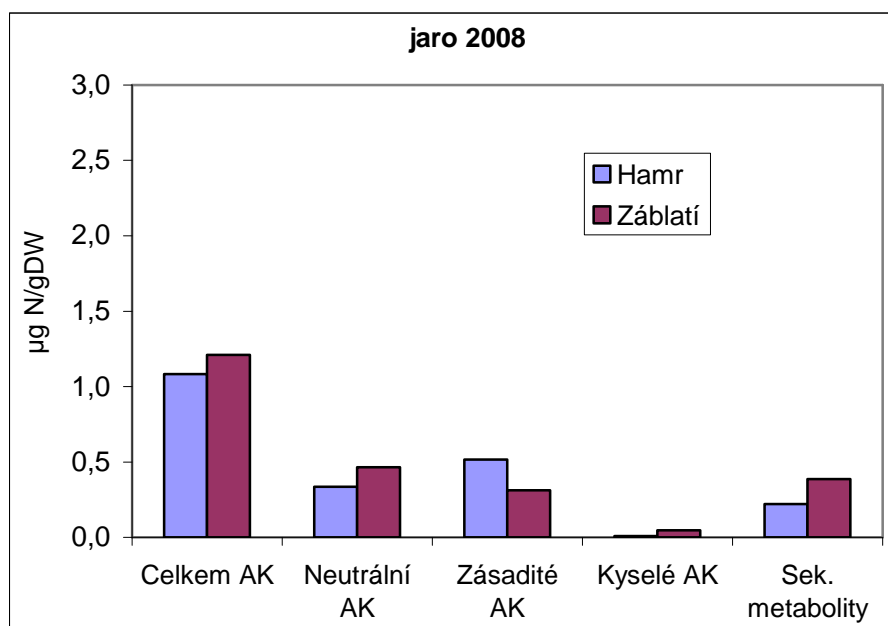


Obr. č. 11: Zastoupení jednotlivých skupin aminokyselin na pokusných plochách na jaře 2008. Lokality: H=Hamr, Z=Záblatí ; N=nehnojeno, L=nízká dávka hnojení, H=vysoká dávka hnojení.

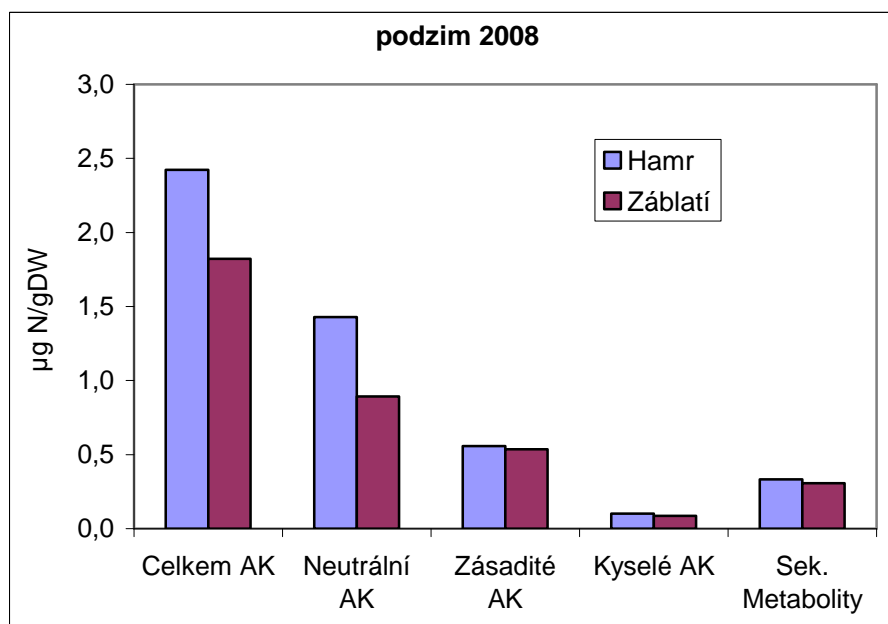


Obr. č. 12: Zastoupení jednotlivých skupin aminokyselin na pokusných plochách na podzim 2008. Lokality: H=Hamr, Z=Záblatí ; N=nehnojeno, L=nízká dávka hnojení, H=vysoká dávka hnojení.

Hnojení nemělo na zastoupení volných aminokyselin významný vliv a proto jsme použili průměrné hodnoty ze všech variant pro hodnocení vlivu půdy na zastoupení volných aminokyselin (obr. č. 13 a 14). Celkové množství volných aminokyselin v půdě obou lokalit bylo nízké, pohybovalo se řádově v jednotkách μg v 1 gramu půdy. Patrné je zvýšení obsahu neutrálních aminokyselin na podzim oproti jaru. Obsah kyselých aminokyselin je velice nízký.



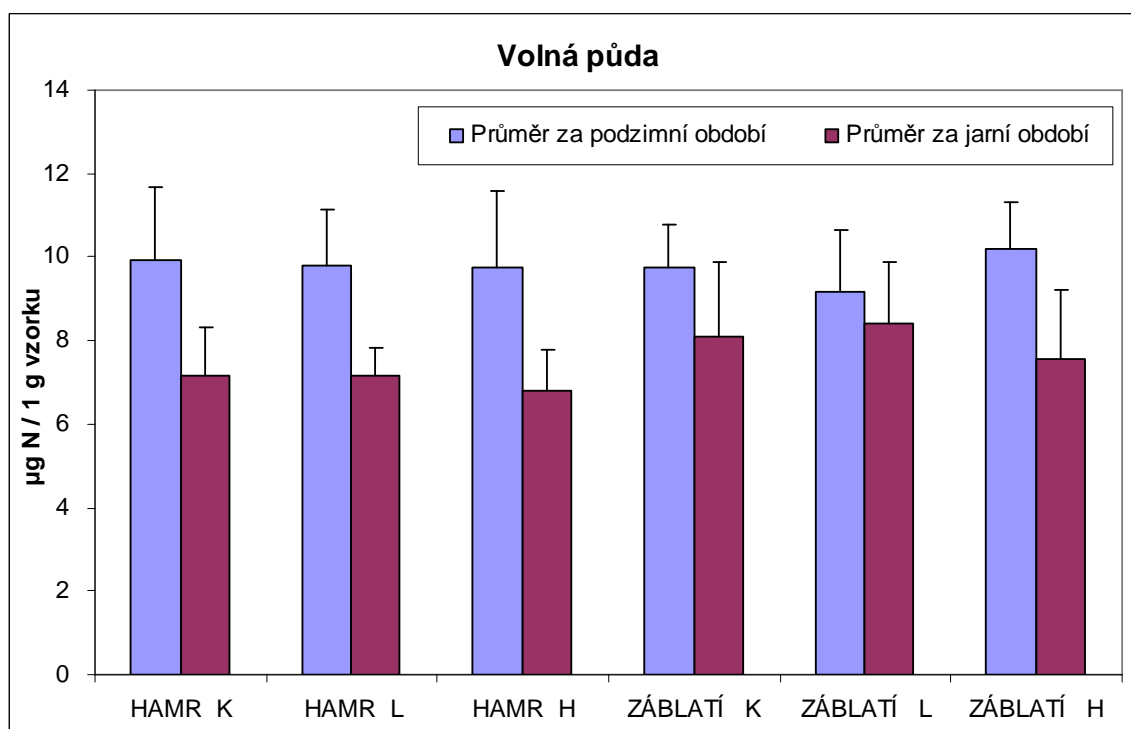
Obr. č. 13: Zastoupení jednotlivých skupin aminokyselin na sledovaných lokalitách na jaře 2008



Obr. č. 14: Zastoupení jednotlivých skupin aminokyselin na sledovaných lokalitách na podzim 2008

Následující graf zobrazuje průměrná množství ninhydrin-reaktivního dusíku na jednotlivých lokalitách vždy pro jarní a podzimní období (Obr. č. 15). Hodnoty pro podzimní období jsou takřka stejné, ani na jaře není vliv hnojení patrný. Významný rozdíl je však dobře patrný v tom smyslu, že celkové množství ninhydrin-reaktivního dusíku je prokazatelně vyšší na podzim než na jaře. Navíc v jarním období je viditelný rozdíl mezi lokalitou Hamerskou a Záblatskou – Záblatské lokality vykazují vyšší hodnoty ninhydrin-reaktivního dusíku.

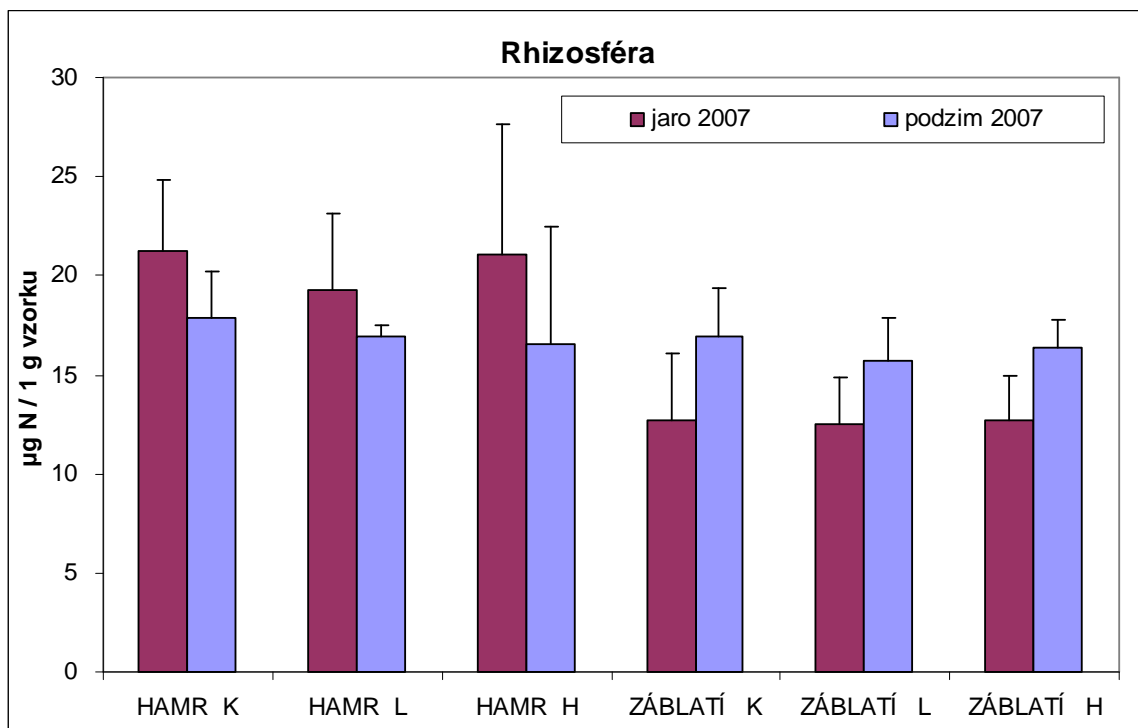
Oproti výsledkům z metody HPLC jsou naměřené hodnoty mnohem vyšší. To dokazuje, že ninhydrinovou metodou se nestanovují pouze aminokyseliny, ale i další ninhydrin-reaktivní sloučeniny (např. amoniak).



Obr. č. 15: Průměrný obsah dusíku ve volné půdě na pokusných plochách na jaře a na podzim. Průměrné hodnoty získané z měření v letech 2006–2008. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Legenda k lokalitám: K=nehnojeno, L=nízká dávka hnojení, H=vysoká dávka hnojení.

3.3.2 Rhizosféra

Složení aminokyselin pomocí HPLC nebylo v rhizosférní půdě prováděno z důvodu malého množství získané rhizosférní půdy. Proto uvádím pouze hodnoty získané metodou ninhydrinovou. Jak je patrné z následujícího grafu, rhizosféra je na obsah dusíku prokazatelně bohatší. Zatímco u volné půdy byly hodnoty vždy vyšší na podzim, v rhizosférní půdě je tomu tak jen na lokalitě Záblatí. Množství ninhydrin-reaktivního dusíku je v rhizosférické půdě na obou lokalitách na podzim srovnatelné, avšak na jaře zvýšené na minerálních půdách (Hamr) a snížené na půdách organických (Záblatí).



Obr. č. 16 Průměrný obsah dusíku v rhizosféře na pokusných plochách na jaře a na podzim 2007. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Legenda k lokalitám: K=nehnojeno, L=nízká dávka hnojení, H=vysoká dávka hnojení.

4. DISKUSE

4.1 Vhodnost extrakčního činidla

Mnoho současných laboratoří využívá a doporučuje acetát amonný jako extrakční činidlo (např. Formánek a kol., 2004). V našem případě se ale acetát amonný projevil jako nevhodné činidlo, protože přítomné amonné ionty a nezreagované činidlo rušily přesnost stanovení. Ani chlorid draselný nebyl nejvhodnější, neboť při použité vysoké koncentraci (2M) docházelo k zasolování vzorků a při použití nízké koncentrace tohoto činidla hrozilo riziko nízké extrahovatelnosti. Voda je pravděpodobně šetrným extrakčním činidlem, ovšem na rozdíl od autorů, kteří extrakci vodou propagují a mají s ní dobré zkušenosti (Formánek a kol., 2004), výsledky mé práce ukazují na nízkou extrakční schopnost.

Konečně poslední použitý roztok extraktantu vykazoval uspokojivé výsledky a bylo možné s ním jednoduše a bezproblémově pracovat. Vzhledem k povaze stanovovaných látek i analytickému systému lze právě užití směsi vodného roztoku 0,1M HCl s 2% příměsí thiodiglykolu doporučit. Někteří autoři ve svých dílech tuto směs používají běžně (Hernández-Sebastià a kol., 2005), avšak nezmiňují se o její extrakční schopnosti.

Návratnost přidaného vnitřního standardu je nízká, pohybuje se mezi 7 a 25%. Návratnost aminokyselin se snižovala od valinu, přes glutamin až po lysin. Nejvyšší návratnost valinu by bylo možno vysvětlit tím, že valin patří do skupiny neutrálních aminokyselin a jeho vazba na půdní částice je nejslabší. Naopak lysin, jehož extrahovatelnost byla nejnižší, patří do skupiny zásaditých aminokyselin a dá se tedy předpokládat vazba na půdní částice, které v našich podmínkách mají převážně záporný náboj.

4.2 Použití a vhodnost metod ke sledování

Metoda HPLC se běžně používá ke stanovení volných aminokyselin v půdě (např. Díaz a kol., 1996). Tato rozšířená metoda poskytuje dobré výsledky a se zařazením předkolumnové či postkolumnové derivatizace mohou být separovány a stanoveny nejrůznější volné aminokyseliny již při nízkých koncentracích (1 μ M).

Oproti tomu metoda ninhydrinová má mez stanovitelnosti výrazně vyšší, tudíž touto metodou volné aminokyseliny stanovit nejdou buďto vůbec, nebo značně nepřesně. Mnou stanovované celkové množství ninhydrin-reaktivního dusíku se pohybovalo okolo 6 – 21 μ g N v 1 g vzorku. Podstatnou nevýhodou ninhydrinové metody je i fakt, že stanovení v sobě zahrnuje veškeré ninhydrin-reaktivní sloučeniny, nejen volné aminokyseliny. Proto se zároveň stanoví například i amonné ionty, kterých bývá v půdě přítomno nezanedbatelné množství – takže touto metodou nelze spolehlivě zjistit, jaký je skutečný podíl volných aminokyselin. To také může vysvětlit rozdíl mezi celkovým množstvím aminokyselin stanovených metodou ninhydrinovou a metodou HPLC.

4.3 Stanovení vlivu dusíkaté zátěže na obsah volných aminokyselin v půdě

Sehtiya, Lussenhop a BassiriRad (2007) při svých studiích provedli experiment, při němž na dvou různých lokalitách prováděli záměrné dusíkaté hnojení. Zatímco první lokalita vykazovala zvýšení množství aminokyselin o 20% a změnu spektra nejčtenějších aminokyselin, na druhé lokalitě zůstala skladba aminokyselin téměř neměnná a celkové množství aminokyselin kleslo o 44%. Autoři věří, že půda na druhé lokalitě dosáhla stavu nasycení dusíkem a proto na umělou dusíkatou zátěž neodpovídala. V mém případě ani v jedné půdě nedošlo k významnému posunu v zastoupení volných aminokyselin vlivem hnojení. To je v souladu s tím, že na sledovaných lokalitách nebyl nalezen významný vliv hnojení ani na procesy transformace dusíku (Mach, 2007 ; Kaštovská, ústní sdělení). Neprokázala se původní hypotéza, že zvýšená zátěž externím doplňováním dusíku ve formě hnojiva urychlí transformaci dusíku v půdě. Jedním z možných vysvětlení je, že pokus probíhal příliš krátkou dobu k tomu, aby se mohl vliv hnojení projevit. Tento předpoklad je v souladu s výsledky z měření primární produkce porostu (Káplová, 2009), které ukazují, že k mírnému zvýšení primární produkce docházelo až v roce 2009.

Mé výsledky potvrzují, že rhizosféra patří mezi neaktivnější oblast půdy. Koncentrace dusíkatých sloučenin je zde výrazně vyšší než ve volné půdě, a to až dvojnásobně.

4.4 Množství volných aminokyselin na jednotlivých lokalitách, jejich spektrum a změny v čase

Mnou zjištěný celkový obsah volných aminokyselin v půdách sledovaných lokalit se pohyboval zhruba mezi 1 – 2,5 $\mu\text{g N}$ v 1 g vzorku. Tyto výsledky mohou být považovány za relevantní, neboť i jiní autoři vykazují podobné obsahy volných aminokyselin (Jones, Owen, Tartar, 2002). Jelikož někteří autoři uvádějí výsledky v jednotkách koncentračních objemových, převedl jsem i já své výsledky. Při průměrné objemové hmotnosti sledovaných půd 0,35 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ činí mnou zjištěný obsah volných aminokyselin v půdách zhruba 0,350 – 0,875 mg N v 1 dm^3 půdního vzorku.

Anderson, Berggren (2004) uvádí ve svých výsledcích hodnoty koncentrace volných aminokyselin v půdě 0,001 až 0,052 $\text{mg N}\cdot\text{dm}^{-3}$. Výsledky jiných autorů (Jones, Owen, Tartar, 2002) ukazují, že koncentrace volných aminokyselin byla relativně nezávislá na typu půdy a průměrně činila 16 – 30 μM , tedy po přepočtu asi 0,2 až 0,4 mg N v 1 dm^3 (při průměrné relativní molekulové hmotnosti aminokyselin 133,4).

Celkově lze k mým výsledkům říci, že množství volných aminokyselin je vyšší na podzim, což koreluje s tím, že i celkové množství dusíku je vyšší právě na podzim. Největší navýšení oproti jaru představují neutrální aminokyseliny. Na obou lokalitách (Hamr i Záblatí) zaujmají největší podíl aminokyseliny neutrální, zatímco kyselé aminokyseliny se zde téměř nevyskytují.

4.5 Porovnání odpovědi organických a minerálních půd na dusíkatou zátěž

Různé typy půd se se zvýšenou dusíkatou zátěží vyrovnávají různě. Vzhledem k tomu, že v našich pokusech se vliv živinové zátěže neprojevil, nemohli jsme hodnotit ani vliv půdního druhu a obsahu organické hmoty v půdě. Mnou předpokládaná hypotéza, že zvýšená zátěž externím doplňováním dusíku ve formě hnojiva urychlí transformaci dusíku v půdě, se nepotvrdila.

5. ZÁVĚR

Výsledek této diplomové práce lze shrnout v následujících bodech:

- Pro metodu HPLC je nejvhodnější použít jako extrakční činidlo směs 0,1M HCl a 2% thiodiglykolu. Činidla acetát amonný, voda i chlorid draselný mohou rušit detekci.
- Pro stanovení volných aminokyselin v půdách je vhodnější užít metodu HPLC. Ninhydrin je možno použít při derivatizaci, avšak samostatná detekce volných aminokyselin ninhydrinovou metodou není vhodná.
- Zvýšená živinová zátěž neměla významný vliv na obsah volných aminokyselin v půdách sledovaných lokalit a nemohl se proto projevit ani eventuelní vliv půdního druhu...
- Obsah ninhydrin-reaktivního dusíku, jakožto i volných aminokyselin je prokazatelně vyšší v rhizosféře než ve volné půdě.
- Obsah ninhydrin-reaktivního dusíku i volných aminokyselin ve volné půdě je proměnlivý v čase a je vyšší na podzim a nižší na jaře.
- Mezi vyskytujícími se volnými aminokyselinami v půdě dominují neutrální typy aminokyselin, jejich množství se však během roku významně mění a je vyšší na podzim než na jaře. Obsah kyselých aminokyselin je po celý rok velice nízký.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Andersson, P., Berggren, D.: Amino acids, total organic and inorganic nitrogen in forest floor soil solution at low and high nitrogen input. *Water, Air and Soil Pollution*, 2005, Vol. 162, s. 369 – 384.

Bolton, H. Jr., Frederickson, J. K., Elliot, L. F.: Microbial ecology of the rhizosphere. In: Elhottová, D.: Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rhizosferní mikroflóru mladých rostlin ozimé pšenice. BF JČU, České Budějovice, 1993.

Campbell, N. A., Reece, J. B.: *BIOLOGY*, 6th edition. Pearson education inc., 2002.

Chytil, J., Hakrová, P., Hudec, K., Husák, Š., Jandová, J., Pellantová, J.: Mokřady České republiky – přehled vodních a mokřadních lokalit ČR. Mikulov, Český Ramsarský výbor, 1999.

Díaz, J., Lliberia, J. L., Comellas, L., Broto-Puig, F.: Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by HPLC and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 1996, A 719, s. 171 – 179.

Formánek, P., Vranová, V., Marek, M.: Methods of soil's free amino acids extraction: a review. *Phytopedon Bratislava*, 2004/1, Vol. 3, s. 40 – 43.

Gafurova, L.: Free Amino Acids in Eroded Typical Serozem Soil of Uzbekistan. Uzbekistán, Tashkent State Univ. of Agriculture, 2006.

Hernández-Sebastià, C., Marsolais, F., Saravitz, C., Israel, D., Dewey, R. E., Huber, S. C.: Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56 (417), s. 1951 – 1963.

Jeník, J., Květ, J.: Studie zaplavovaných ekosystémů u Třeboně. Stud. Českosl. Akad. Věd, 93-96, 1983/4, Academia, Praha, s. 1 – 156.

Joergensen, R. G., Brookes, P. C.: Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5M K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, Vol. 22, Issue 8, s.1023 – 1027.

Jones, D. L., Edwards, A. C., Donachie, K., Darrah, P. R.: Role of proteinaceous amino acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 1993, 158, s.183 – 192.

Jones, D. L., Owen, A. G., Farrar, J. F.: Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, Vol. 34, Issue 12, s. 1893 –1902.

Kalač, P., Tříška, J.: *Chemie životního prostředí*. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 1998.

Káplová, M.: Comparing aboveground primary production in areas of low and high nutrient levels in Mokré Louky, Třeboň Basin Biosphere Reserve. [Bakalářská práce]. České Budějovice 2009. 48 s. – Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Kovářová, M.: *Projevy globálních změn v biosférické rezervaci Třeboňsko*. Třeboň, JČMF, 2004.

Lipson, D., Näsholm, T.: The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, 2001, 128, s. 305 – 316.

Mach, J.: *Přímý vliv eutrofizace na mikrobiální procesy v mokřadních půdách s důrazem na cyklus dusíku*. [Bakalářská diplomová práce]. České Budějovice 2007. 48 s. – Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Maci, A.: Der extrahierbare organische Stickstoff und Kohlenstoff in Böden und ihre bedeutung für die Stickstoffmineralisation. [Disertační práce]. Giessen 2001. 153 s. – Universität Giessen.

Monreal, C. M., McGill, W. B.: Centrifugal extraction and determination of free amino acids in soil solutions by TLC using tritiated 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Soil Biology and Biochemistry*, 1985, 17, s. 533 – 539.

Moore, S., Stein, W. H.: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1954, s. 907 – 913

Moore, S., Stein, W. H.: Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 1948, s. 367 – 388

Nitkulincová, A.: Vliv eutrofizace na emise skleníkových plynů z Mokřých luk. [Bakalářská diplomová práce]. České Budějovice 2008. 47 s. – Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Paul, E. A., Schmidt, E. L.: Extraction of free amino acids from soil. *Soil Science Society of America*, 1960, 24, s. 195 – 198.

Picek, T., Kaštovská, E., Edwards, K., Zemanová, K., Dušek, J.: Short term effects of experimental eutrophication on carbon and nitrogen cycling in two type of wet grassland. *Community Ecology*, 2008, 9, s. 1 – 8.

Raab, T. K., Lipson, D. A., Monson, R. K.: Soil amino acid utilization among species of the cyperaceae plant and soil processes. *Ecology*, 1999, Vol. 80, No. 7, s. 2408 – 2419.

Rajchard, J., Balounová, Z., Květ, J., Šantrůčková, H., Vysloužil, D.: *Ekologie III*. České Budějovice, KOPP, 2002.

Říhová Ambrožová, J.: *Eutrofizace*. Praha, VŠCHT Praha, 2007.

Sehtiya, H. L., Lussenhop, J. and BassiriRad, H.: Nitrogen loading affects free amino acid concentrations differently than inorganic N in temperate forest soils along a gradient of nitrogen deposition. Chicago, University of Illinois at Chicago, program COS 132-10, 2007.

Sun, S-W., Lin, Y-M. W., Chen, M-J.: Efficiency improvements on ninhydrine method for amino acid quantification. Taiwan, National Chiayi University, 2005.

Troll, W., Cannan, R. K.: A modified photometric ninhydrine method for the analysis of amino and imino acids. The Journal of Biological Chemistry, 1952, s. 803 – 811.

Vymazal, J.: Čištění odpadních vod v kořenových čistírnách. Třeboň, Envi s.r.o., 1995.

Internetové stránky a odkazy:

<http://www.hplc.cz>

<http://www.ceskachromatografickaskola.cz/>

<http://forensic-evidence.com>