

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

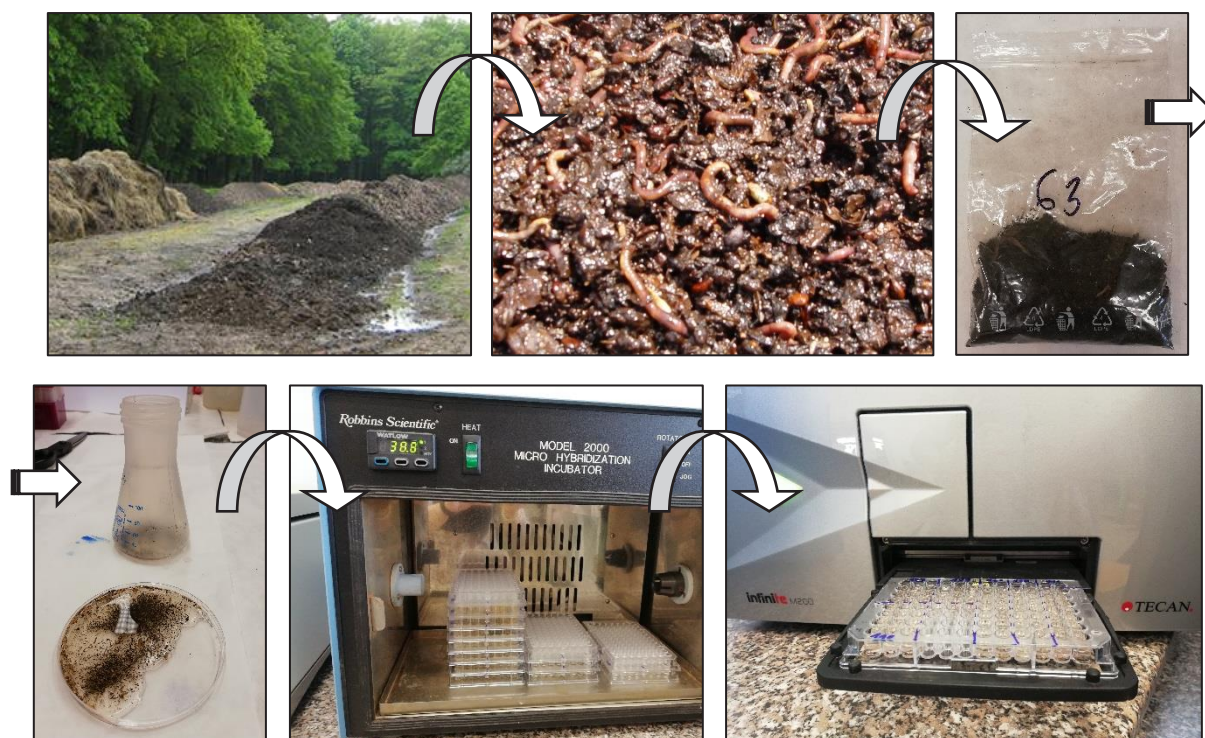
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Aleš Hanč a kol.



Praha 2018

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení

Certifikovaná metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR,
Odborem rostlinných komodit pod č. j. 37473/2018-MZE-17221

Aleš Hanč a kol.

Praha 2018

Certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení výzkumného projektu
NAZV č. QJ1530034

Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Dedikace: Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QJ1530034 „Legislativní podklady pro větší uplatnění kompostů, zejména vermikompostů, na zemědělskou půdu“.

Kolektiv autorů

Ing. Tereza Částková

Ing. Marie Bazalová

doc. Ing. Aleš Hanč, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení

Aleš Hanč a kol.

Vydání první, 2018

Vydavatelství: Česká zemědělská univerzita v Praze

Tisk Powerprint s.r.o., Brandejsovo nám. 1219/1, 165 00 Praha 6 – Suchdol, www.powerprint.cz

165 21 Praha 6 – Suchdol

© Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ ČZU v Praze

Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol

tel: +420 224 382 736

<http://www.af.czu.cz/>

ISBN 978-80-213-2865-5

Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení

Abstrakt

Certifikovaná metodika popisuje provozní vermikompostování v systému průběžného krmení žížal a na něj navazující analytické hodnocení vermikompostovaného materiálu a konečného produktu – vermikompostu. K vermikompostování byl vybrán biologicky rozložitelný komunální odpad, sladovnický kal, matolina a lihovarské výpalky s případnými přísadami dalších rostlinných zbytků. Vzorky byly odebrány po ročním a v případě lihovarských výpalků po dvouletém vermikompostování. Vedle běžně stanovovaných fyzikálních a chemických veličin jsou v metodice popsány i veličiny biologické. Důraz je kladen na výběr a stanovení enzymatické aktivity, což je parametr hodnotící zralost vermikompostu. V metodice jsou podrobně popsány pracovní postupy stanovení aktivit 12 enzymů. Pro pravidelný větší počet analýz se z ekonomického hlediska osvědčilo stanovení enzymatické aktivity pomocí multifunkčního modulárního readeru. Bylo zjištěno, že délka vermikompostování neovlivnila výrazně sušinu, hodnotu pH a měrnou vodivost, ale dotkla se počtu žížal, biomasy žížal a enzymatické aktivity.

Klíčová slova: Enzymatická aktivita; vermikompostování; průběžné krmení; fyzikálně-chemické a biologické parametry

Changes in enzymatic activity and methods of its determination during the process of vermicomposting in the system of continuous feeding

Abstract

The certified methodology describes operational vermicomposting in the system of continuous feeding of earthworms and the subsequent analytical evaluation of the vermicompost material and the final product - vermicompost. Biodegradable municipal waste, malting slurry, grape marc, and distillery residues with possible addition of other plant residues were used for vermicomposting. Samples were taken up after one year and, in the case of distillery residues, after two years of vermicomposting. In addition to the commonly used physical and chemical parameters, biological properties are described in the methodology. Emphasis is placed on the selection and determination of enzymatic activity, which is a parameter evaluating maturity of vermicompost. The methodology describes in detail the working procedures for determining the activities of 12 enzymes. For a regular large number of samples, the determination of enzymatic activity using a multifunctional modular reader has proved to be economically viable. It was found that the length of the vermicomposting did not significantly affect the dry matter, pH and electrical conductivity, but it affected the number of earthworms, earthworm biomass and enzymatic activities.

Key words: Enzymatic activity; vermicomposting; continuous feeding; physicochemical and biological parameters

Obsah

I. CÍL METODIKY.....	6
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	6
1. Úvod do problematiky.....	6
1.1 Vermikompostování a bioodpady	6
1.2 Enzymy.....	7
1.2.1 Hodnocené enzymy.....	7
2. Metodika	10
2.1 Vermikompostování v systému průběžného krmení	10
2.1.1 Popis jednotlivých vermikompostů	12
2.2 Stanovení enzymatické aktivity	16
2.2.1 Fluorescenční stanovení enzymatické aktivity.....	16
2.2.2 Spektrofotometrické stanovení enzymatické aktivity	23
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	29
IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	31
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	31
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	33
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	35
VIII. JMÉNA OPONENTŮ A NÁZVY JEJICH ORGANIZACÍ.....	37
IX. DEDIKACE.....	37

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat změny enzymatické aktivity vhodně vybraných enzymů podílejících se na abiotických dějích během procesu vermikompostování různých biologicky rozložitelných materiálů v systému průběžného krmení. Metodika obsahuje principy, postupy stanovení a hodnocení konkrétních dat z procesu provozního vermikompostování s návazností na posuzování stability a zralosti vermikompostu z různých biologicky rozložitelných materiálů.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod do problematiky

1.1 Vermikompostování a bioodpady

Biologicky rozložitelný odpad se v současnosti zpracovává zejména klasickými metodami biodegradace a to kompostováním a anaerobním rozkladem (Plíva et al., 2016). Méně rozšířeným způsobem zpracování bioodpadů je vermikompostování.

Vermikompostování je mezofilní aerobní fermentace, která probíhá za působení epigeických druhů žížal žijících ve svrchní vrstvě (Mc Lean a Parkinson, 1998). Jako potrava žížalám slouží organický materiál (nejlépe předfermentovaný) s poměrem C:N přibližně 25:1 – 30:1 (Edwards et al., 2011). Zpracují většinou jakýkoli organický materiál (Gaddie a Douglas, 1975), jako jsou čistírenské kaly, živočišné odpady, zbytky zemědělských plodin a zbytky z domácností, ze zahrad, některé průmyslové odpady, zejména odpady z pivovaru, lihovarnictví, ze zpracování cukrové třtiny apod. (Atiyeh et al., 2000; Sinha et al., 2010). Nevhodné materiály pro vermikompostování jsou například ty, které mají vysoký obsah solí. Nehodí se ani čerstvé listí či tráva (v silnějších vrstvách), ty při rozkladu uvolňují velké množství tepla. Nežádoucí je také maso, mléčné výrobky a citrusy (Sinha et al., 2008).

Předkládaná metodika se zabývá stanovením enzymatické aktivity ve vermikompostech z lihovarských výpalků, biologicky rozložitelného komunálního odpadu (BRKO), zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny či matoliny. Lihovarské výpalky jsou kašovitou hmotou, která zbývá ve vařáku destilačního přístroje po oddestilování alkoholu z ovocného kvasu (Obroučka et al., 2010). BRKO je odpad z domácností, úřadů a dalších institucí, včetně odděleně sbíraných složek těchto odpadů, jak je uvedeno ve vyhlášce ministerstva životního prostředí č. 93/2016 Sb. o Katalogu odpadů zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění zákona č. 320/2002 Sb. Kal ze sladoven vzniká při procesu namáčky ječmene a zbývá na dně nádrže. Matolina vzniká jako zbytek po rozdrcení,

a lisování vinných hroznů. Je nejdůležitějším vedlejším produktem vinařského průmyslu. Nejčastěji obsahuje z 60 % stonky, slupky a dužinu a ze 40 % semena (Flavel et al., 2005).

1.2 Enzymy

Enzymy jsou nejpočetnější skupinou biokatalyzátorů, specifických bílkovin vznikajících uvnitř živých buněk, které katalyzují průběh biologických reakcí. V roce 1961 Enzymová komise mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) zavedla systémové = racionální názvosloví a klasifikaci enzymů; podle mezinárodní nomenklatury bylo vytvořeno i české názvosloví enzymů. IUBMB zavedla rozdělení enzymů pomocí EC (Enzyme Commission) čísel do šesti tříd podle typu reakcí, které katalyzují:

EC 1 – oxidoreduktázy: katalyzují redoxní děje (dehydrogenázy, oxidázy, oxygenázy, hydroxylázy, cytochromy),

EC 2 – transferázy: přenášejí funkční skupiny (aminotransferázy, transglykosylázy, transmethylázy, hexokinázy),

EC 3 – hydrolázy: katalyzují hydrolytické štěpení (proteázy, lipázy, esterázy, glykosidázy),

EC 4 – lyázy: štěpí C-C a C-N vazby bez vstupu vody (aldolázy),

EC 5 – izomerázy: katalyzují isomerizační reakce (cis-trans isomerázy, epimerázy, mutázy, racemázy),

EC 6 – ligázy (synthetázy): spojují dvě molekuly kovalentní vazbou za spotřeby ATP.

Enzymy značíme čtyřmístnými číselnými kódy. Název enzymu se skládá ze zkratky „EC“ a čtyř čísel (Vodrážka, 1996). Například kyselá fosfatáza má systematické číslo 3.1.3.2. Název enzymu dle zkratky EC je tvořen: EC 3 – hydrolázy; EC 3.1 – působící na esterové vazby; EC 3.1.3 – fosfomonoesterhydrolázy; EC 3.1.3.2 – kyselá fosfatáza (Brenda, 2017).

1.2.1 Hodnocené enzymy

Na základě vyhodnocení vědeckých poznatků byly vybrány následující enzymy provázející metabolické děje při rozkladu organické hmoty. Vybrané enzymy spadají do tříd oxidoreduktáz a hydroláz.

Nitrát reduktáza (EC 1.7.1.1)

Enzym katalyzující redukci dusičnanového iontu na iont dusitanový. Nitrát reduktáza je tvořena především v rostlinách a skládá se z flavinoproteinu, molybdenového komplexu

a hemu. Aktivita nitrát reduktázy je velmi ovlivňována intenzitou slunečního světla, obsahem kyslíku a teplotou okolí. Při vyšší intenzitě světla, vyšším obsahu kyslíku a nižší teplotě je aktivita nitrát reduktázy vyšší (Hageman a Hucklesby, 1971).

Lakáza (EC 1.10.3.2)

Lakáza se řadí mezi ligninolytické enzymy, produkované houbami bílé hniloby (*Basidiomycota*). Podílí se na oxidativní degradaci ligninu. Působí na o- a p-quinoly, na aminofenoly a často také na fenylendiaminy. Lakáza má schopnost oxidace benzenových jader s jejich následným rozštěpením (Bamforth a Singleton, 2005).

Mn-peroxidáza (EC 1.11.1.13)

Mn-peroxidáza je enzym hub bílé hniloby (*Basidiomycota*) podílející se na oxidativní degradaci ligninu. Enzym oxiduje navázaný Mn^{2+} iont na Mn^{3+} za přítomnosti peroxidu vodíku. Mn^{3+} je uvolňován za přítomnosti chelátoru (většinou oxalátu a malátu), který jej stabilizuje. Komplexovaný iont Mn^{3+} se může dostávat difuzí do lignifikované buněčné stěny, kde oxiduje fenolické složky ligninu a další organické látky.

Lipáza (EC 3.1.1.3)

Lipázy hydrolyzují acylglyceroly, obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků ≥ 10 , na mastné kyseliny a glycerol (Horáková a Němec, 2003). Jelikož jsou lipázy aktivní i v prostředí s nízkým obsahem vody, nejsou problémy s rozpouštěním hydrofobních substrátů (Linek, 2002).

Kyselá fosfatáza (EC 3.1.3.2)

Kyselá fosfatáza spadá pod fosfomonoesterázy, které obecně katalyzují hydrolýzu monoesterů a anhydridů kyseliny fosforečné (Horáková a Němec, 2003), tím dochází k mineralizaci organického fosforu (Enowashu a kol., 2009). Kyselé fosfatázy jsou často přítomny v kořenových exudátech (látky vylučované kořeny rostlin), naopak alkalické fosfatázy jsou vylučovány půdními mikroorganismy (Šarapatka a Čáp, 2013).

Arylsulfatáza (EC 3.1.6.1)

V přírodě se vyskytují různé typy sulfatáz: arylsulfatázy, alkylsulfatázy, aj. Nejvíce prozkoumaná je arylsulfatáza, která vzniká převážně činností hub a bakterií, ačkoli rostliny a zvířata produkují tento enzym také. Sulfatázy jsou zapojeny do biochemické mineralizace organické síry (Tabatabai a Bremner, 1971). Arylsulfatáza katalyzuje hydrolýzu arylsulfátového aniontu přerušением vazby O-S. Předpokládá se, že arylsulfatáza přispívá k mineralizaci organické síry na $S-SO_4^{2-}$ (Tabatabai a Bremner, 1970).

Chitináza (EC 3.2.1.14)

Chitinázy jsou esenciální skupinou enzymů zodpovědných za degradaci chitinu. Hydrolyzují glukosidické vazby chitinu, při čemž se uvolňují menší organické sloučeniny, obsahující dusík. Chitin je jednou ze základních forem, ve kterých se dostává organický dusík do půdy. Dominantními producenty chitinázy jsou houby, bakterie, kvasinky, korýši a měkkýši. Chitin je hlavní složkou buněčné stěny hub. Aktivita chitinázy může být potlačována stejně jako u fosfatázy jejími produkty a to zejména glukózou a N – acetylglukosaminem (Gooday, 1994).

β-D-glukosidáza (EC 3.2.1.21)

Enzym celulóza katalyzuje hydrolýzu celulózy na D-glukózu, je tvořen nejméně třemi enzymy: endo-β-1,4-glukanáza (EC 3.2.1.4), exo-β-1,4-glukanáza (EC 3.2.1.91) a β-glukosidáza (EC 3.2.1.21), (Horáková a Němec, 2003). V praxi tvoří β-glukosidázy velmi heterogenní skupinu enzymů hydrolyzující glukózové oligosacharidy (Bočková a Kleňha, 1972). Nejčastěji jsou produkovány houbami, např. rodu *Actinomyces* či *Clostridium* (Horáková a Němec, 2003).

Cellobiohydroláza (EC 3.2.1.91)

Hydrolyzuje β – D- glukosidické vazby v cellulóze a cellotetraóze, uvolňuje cellobiózu nebo glukózu z cellulózového řetězce. Podílí se spolu s endoglukanázou a β – glukosidázou na dekompozici strukturních polymerů. Je produkována vřeckovýtrusnými houbami (*Ascomycota*) především druhem *Trichoderma reesei* (Mertz et al., 2007).

Ureáza (EC 3.5.1.5)

Ureáza je enzym produkováný bakteriemi (především druhem *Helicobacter pylori*), který katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak. Aktivita ureázy významně koreluje

s obsahem organického uhlíku a jejím působením dochází k alkalizaci okolního prostředí (Dick, 1984).

Leucin aminopeptidáza (EC 3.4.11.1)

Aminopeptidázy patří mezi exopeptidázy, jedná se o enzymy štěpící proteiny během trávení (Wickström et al., 2011). Leucin aminopeptidáza uvolňuje koncový N z aminokyselin, peptidů, amidů či arylamidů především z leucinu či prolinu.

Alanin aminopeptidáza (EC 3.4.11.2)

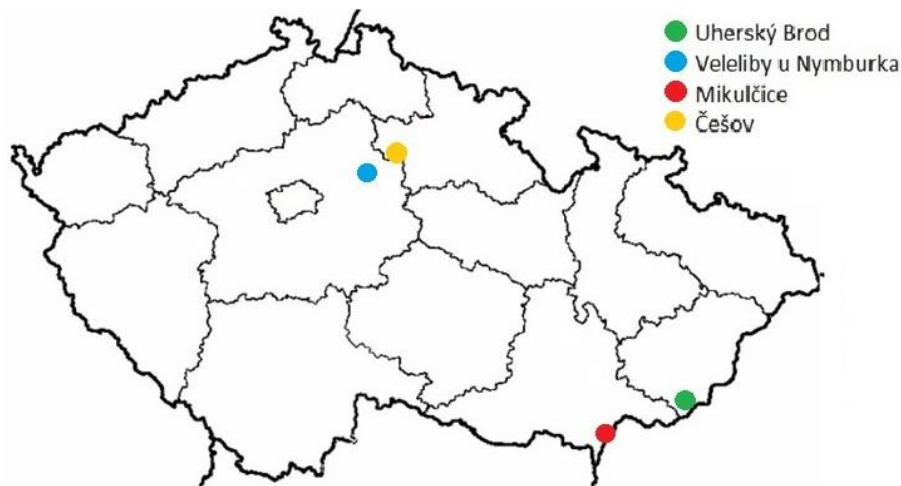
Aminopeptidázy patří mezi exopeptidázy, jedná se o enzymy štěpící proteiny během trávení (Wickström et al., 2011). Alanin aminopeptidáza uvolňuje koncový N z aminokyselin, peptidů, amidů či arylamidů, především z alaninu nebo prolinu.

2. Metodika

2.1 Vermikompostování v systému průběžného krmení

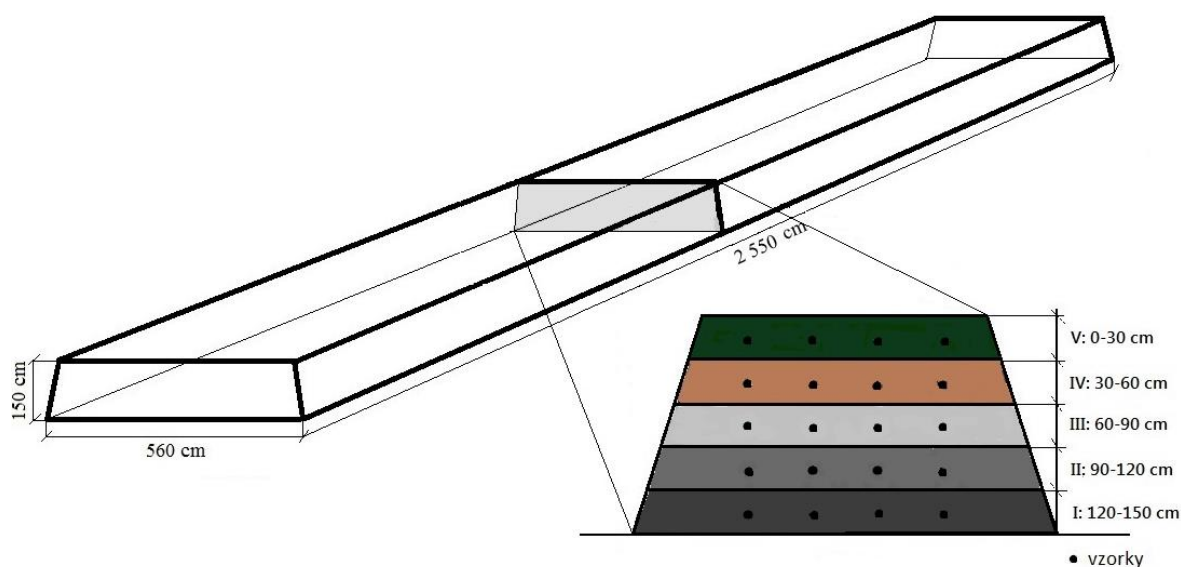
Při zakládání vermikompostu byla první umístěna vrstva bioodpadu, poté násada se žížalami (*Eisenia andrei*) a na ni opět vrstva bioodpadu. Každý měsíc byla přidávána nová vrstva bioodpadu o mocnosti 15-20 cm (Hanč a Plíva, 2013).

Vermikompostovací pokusy popisované v metodice probíhaly ve venkovních podmínkách v systému pásových nebo plošných hromad, v různých podnicích, podle toho, jaký odpad zde vznikal. Jednalo se o 4 lokality (Obr. 1), a to konkrétně Uherský Brod, kde byl využit odpad z domácností a zahrad (BRKO), Velelíby u Nymburka, kde se vermikompostoval zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny (cca 20 % objemových), dále Mikulčice, kde byl vermikompostován odpad po zpracování révy vinné (matolina), a nakonec Češov, kde se vermikompostoval odpad z výroby pálenky (lihovarské výpalky). Vermikompostování BRKO, zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny a matoliny probíhalo po dobu jednoho roku. Lihovarské výpalky byly spolu se slámou a senem vermikompostovány po dobu dvou let.



Obr. 1: Mapa znázorňující polohu jednotlivých lokalit

Po roce, u lihovarských výpalků po dvou letech, se z vermikompostů odebraly vzorky, vždy ve čtyřech opakováních z každé časové vrstvy. Roční vermikompostování bylo rozděleno na pět úseků, dvouleté na čtyři (Obr. 2). Odebíraly se přibližně jednokilogramové vzorky a to do perforovaných polyethylenových sáčků, přepravovány byly v termoboxech. V laboratoři byly vzorky zváženy, byly odděleny, spočítány a zváženy žížaly a každý vzorek byl rozdělen zhruba na tři části. První část byla určena ke stanovení sušiny, druhá se uložila do chladničky při 4°C pro následné stanovení pH/H₂O (1:5 w/v) a měrné vodivosti EC (1:5 w/v) za použití WTW pH 340 i a WTW cond 730 dle normy ČSN EN 15933. Třetí díl vermikompostu byl zmražen při -20°C v chladicím boxu a postupně lyofilizován pro stanovení enzymatické aktivity.



Obr. 2: Schéma odběru vzorků

2.1.1 Popis jednotlivých vermikompostů

Pásová hromada BRKO v lokalitě Uherský Brod byla založena v květnu 2015 o půdorysu 5,6 x 25,5 m. První vrstva byla proložena násadou se žížalami, další vrstvy vytvářel pouze BRKO. Obrázek 3 zobrazuje vermikompostování BRKO a následná úprava hotového vermikompostu hvězdicovým sítem pro úpravu vlhkých materiálů je zobrazena na Obr. 4 a 5.



Obr. 3: Vermikompostování biologicky rozložitelného komunálního odpadu v podobě pásových hromad



Obr. 4; 5: Hvězdicové síto a následná úprava hotového vermikompostu

Zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny se ve Velelibech u Nymburka vermikompostoval od května 2015 formou pásové hromady o rozměru 6 x 10 m (Obr. 6; 7). Kal ze sladovny byl aplikován ve směsi: cca 20 % objemových kal, štěpka, sláma, jablka, tráva a makovina, do nejspodnější první vrstvy byl přimísen substrát se žížalami (Tab. 1).



Obr. 6; 7: Kal ze sladovny (vlevo) a vermikompostovací pásová hromada s kalem ze sladovny, slámou, štěpkou, jablky, trávou a makovinou (vpravo)

Matolína z vinařství Habánské sklepy (Velké Bílovice) byla vermikompostována na půdorysu 2,5 x 50 m v lokalitě Mikulčice (Obr. 8; 9). Vermikompost byl založen v květnu 2015. Zakládající vrstva se odlišovala od následujících neboť se jednalo o násadu z koňského hnoje se žížalami (Tab. 1).



Obr. 8; 9: Detail vermikompostování matoliny (vlevo) a pásová hromada vermikompostu s matolinou (vpravo)

Lihovarské výpalky se slámou a senem se vermikompostovaly od dubna 2014 do května 2016 na ploše 6 x 8 m na rovném travnatém povrchu v lokalitě Češov (Obr. 10; 11).



Obr. 10; 11: Vermikompostovací hromada (vlevo) a odběr vzorků z pásové hromady vermikompostu z lihovarských výpalků, slámy a sena (vpravo)

Z průběhu vermikompostování byly sledovány vybrané parametry (Tab. 1). Během vermikompostování se doporučuje obsah vody cca 80 %; pH by mělo být neutrální až slabě alkalické; měrná vodivost by neměla být vysoká, neboť žížalům neprospívá vysoký obsah solí; počet a biomasa žížal by se měly pohybovat dle toho, zda je v dané vrstvě přítomna potrava pro žížaly (nerozložená organická hmota) či ne (Edwards et al., 2011).

Počet i biomasa žížal u všech vermikompostů klesaly s hloubkou vrstev, což značí správný průběh vermikompostování. Sušina byla u části vermikompostů v nejsvrchnější vrstvě nižší než u ostatních vrstev. U vermikompostu z BRKO byla vyšší než u vrstvy IV, u vermikompostu ze zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny byla vyšší ve vrstvě V než ve vrstvě I a u vermikompostu z matoliny byla dokonce v horní vrstvě sušina nejvyšší. To může být způsobeno zalitím či deštěm nedávno před odebráním vzorků. Kromě první vrstvy sušina u vermikompostu ze zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny a s matolinou napříč profilem klesala, což bylo způsobeno průsakem vody. Hodnoty pH se pohybovaly ve slabě alkalické oblasti u všech vermikompostů. U vermikompostu s lihovarskými výpalky nepřesáhly hodnoty pH 8, což bylo zapříčiněno velmi kyselým pH samotných lihovarských výpalků, které se pohybuje kolem hodnoty 4,5. Měrná vodivost (EC) se u jednotlivých vermikompostů značně lišila i v rámci vrstev, je zde také patrný značný statisticky významný rozdíl (Tab. 1).

Tab. 1: Vybrané parametry jednotlivých vermikompostů

Vermikompost	Vrstva	Stáří vrstev [měsíce]	Hloubka vrstev [cm]	Počet žížal [ks/kg]	Biomasa žížal [g/kg]	Sušina [%]	pH/H ₂ O	EC [μS/cm]
BRKO (Uherský Brod)	V	< 3	0 - 30	125 ± 81,92	14,94 ± 8,93	40,16 ± 2,19 a	8,70 ± 0,13 b	1824 ± 139,43 a
	IV	3 - 6	30 - 60	5,42 ± 7,86	0,70 ± 0,92	34,95 ± 1,64 c	8,75 ± 0,07 b	2041 ± 367,99 a
	III	6 - 9	60 - 90	2,50 ± 3,97	0,29 ± 0,42	46,57 ± 1,09 b	7,49 ± 0,11 a	3640 ± 318,01 b
	II	9 - 12	90 - 120	8,33 ± 13,54	0,82 ± 1,32	43,76 ± 0,69 b	8,11 ± 0,09 c	2076 ± 319,54 a
	I	> 12	120 - 150	0	0	40,44 ± 0,54 a	7,45 ± 0,10 a	2317 ± 197,88 a
Zemědělský bioodpad s kalen ze sladožny (Veleřiby u Nymburka)	V	< 3	0 - 20	67,08 ± 72,15	6,72 ± 2,38	42,30 ± 4,88 a	8,82 ± 0,15 b	1098 ± 120,18 a
	IV	3 - 6	20 - 40	4,17 ± 4,19	1,28 ± 0,53	46,13 ± 4,80 a	8,80 ± 0,10 b	1368 ± 132,60 ab
	III	6 - 9	40 - 60	0	0	45,00 ± 3,02 a	8,57 ± 0,10 bc	1131 ± 254,00 a
	II	9 - 12	60 - 80	0	0	43,51 ± 3,76 a	8,18 ± 0,08 a	1539 ± 256,72 b
	I	> 12	80 - 100	0	0	41,40 ± 2,34 a	8,28 ± 0,20 ac	1483 ± 88,33 ab
Matolína (Mikulčice)	V	< 3	0 - 20	208,54 ± 50,51	32,65 ± 7,53	41,06 ± 0,88 b	7,73 ± 0,15 b	812 ± 17,68 a
	IV	3 - 6	20 - 40	18,39 ± 9,23	3,22 ± 1,80	39,20 ± 0,85 ab	8,08 ± 0,13 a	805 ± 10,00 a
	III	6 - 9	40 - 60	0	0	38,07 ± 1,37 a	7,98 ± 0,10 ab	729 ± 31,98 ab
	II	9 - 12	60 - 80	0	0	35,32 ± 1,12 d	8,08 ± 0,10 a	643 ± 34,03 b
	I	> 12	80 - 100	0	0	26,68 ± 1,06 c	8,68 ± 0,10 c	1433 ± 131,75 c
Lihovarské výpalky (Čěšov)	IV	< 6	0 - 20	5,92 ± 1,91	2,54 ± 0,84	15,35 ± 2,42 b	7,41 ± 0,07 b	1162 ± 644,45 a
	III	6 - 12	20 - 40	5,80 ± 2,18	2,65 ± 1,01	25,78 ± 1,52 a	7,72 ± 0,04 c	976 ± 38,84 a
	II	12 - 18	40 - 60	1,57 ± 1,72	0,53 ± 0,73	25,80 ± 1,52 a	7,64 ± 0,10 c	683 ± 51,23 a
	I	> 24	60 - 80	1,37 ± 0,58	0,44 ± 0,23	28,32 ± 0,65 a	7,92 ± 0,09 a	760 ± 22,93 a

Legenda: EC – měrná vodivost. pH; EC w/v 1:5. Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka. Mezi vrstvami v rámci lokality označenými rozdílnými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly (ANOVA; Tukey's HSD test; $p \leq 0,05$; $n=4$)

2.2 Stanovení enzymatické aktivity

Metodické postupy pro jednotlivé enzymy se liší podle toho, zda byla pro měření enzymatické aktivity vybrána metoda fluorescenční či spektrofotometrická. Enzymy byly stanovovány ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd ČR v Praze na mikrotitračních destičkách s použitím kombinovaného přístroje Tecan Infinite® M200 a na České zemědělské univerzitě v Praze pomocí spektrometru UV/VIS Lambda 25.

2.2.1 Fluorescenční stanovení enzymatické aktivity

Pro stanovení enzymů se připravila suspenze zhomogenizováním $0,2 \pm 0,002$ g zlyofilizovaného vzorku vermikompostu a 20 ml octanového pufru s hodnotou pH 5 o koncentraci $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, po dobu přibližně 30 s pomocí přístroje Ultra-Turrax. Do příslušných jamek v mikrotitrační destičce bylo napipetováno 200 μl zhomogenizované suspenze a poté se přidal příslušný substrát (Tab. 2) dle tabulky 3 či tabulky 4. Mikrotitrační destičky se následně vložily na dobu 5 minut do inkubátoru, vyhřátého na teplotu 40°C , poté byla pomocí přístroje Tecan Infinite® M200 měřena fluorescence daného substrátu (Obr. 12; 13). Následně se opět destičky vložily na 2 h do inkubátoru a znovu se změřila fluorescence. Z rozdílu počáteční a konečné hodnoty se vypočítala enzymatická aktivita, běžně je udávána v mikromolech příslušného substrátu za hodinu a na jeden gram vzorku (Baldrian, 2009; Štursová a Baldrian, 2011).

Tab. 2: Substráty pro měření fluorescenčních enzymů

Stanovení	Substrát	Koncentrace [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]
Kalibrace MUF	MUF = methylumbelliferol	1,00
β -D-glukosidáza	MUFG = 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside	2,75
Kyselá fosfatáza	MUFP = 4-methylumbelliferyl-phosphate	2,75
Arylsulfatáza	MUFS = 4-methylumbelliferylsulphate potassium salt	2,50
Lipáza	MUFY = 4-methylumbelliferyl-caprylate	2,50
Chitináza	MUFN = 4-methylumbelliferyl-N-acetylglucosaminide	1,00
Cellobiohydroláza	MUFC = 4-methylumbelliferyl-N-cellobiopyranoside	2,50
Kalibrace AMC	AMC = 7-aminomethyl-4-coumarin	1,00
Alanin aminopeptidáza	AMCA = L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin	2,50
Leucin aminopeptidáza	AMCL = L-leucin-7-amido-4-methylcoumarin	2,50

Rozpouštědlo: dimethylsulfoxid (DMSO)

Tab. 3: Schéma zaplnění mikrotitrační desičky pro stanovení β -D-glukosidázy, kyselých fosfatázy, arylsulfatázy a lipázy

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO						
B	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO			10 μ l MUF 1:100	10 μ l MUF 1:100	10 μ l MUF 1:100	10 μ l MUF 1:100
C	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS			20 μ l MUF 1:100	20 μ l MUF 1:100	20 μ l MUF 1:100	20 μ l MUF 1:100
D	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY			50 μ l MUF 1:100	50 μ l MUF 1:100	50 μ l MUF 1:100	50 μ l MUF 1:100
E	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFG 20 μ l DMSO			20 μ l MUF 1:10	20 μ l MUF 1:10	20 μ l MUF 1:10	20 μ l MUF 1:10
F	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO	200 μ l suspenze 40 μ l MUFP 20 μ l DMSO			50 μ l MUF 1:10	50 μ l MUF 1:10	50 μ l MUF 1:10	50 μ l MUF 1:10
G	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS	200 μ l suspenze 40 μ l MUFS			10 μ l MUF 1	10 μ l MUF 1	10 μ l MUF 1	10 μ l MUF 1
H	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY	200 μ l suspenze 40 μ l MUFY			20 μ l MUF 1	20 μ l MUF 1	20 μ l MUF 1	20 μ l MUF 1

 vzorek 1

 vzorek 2

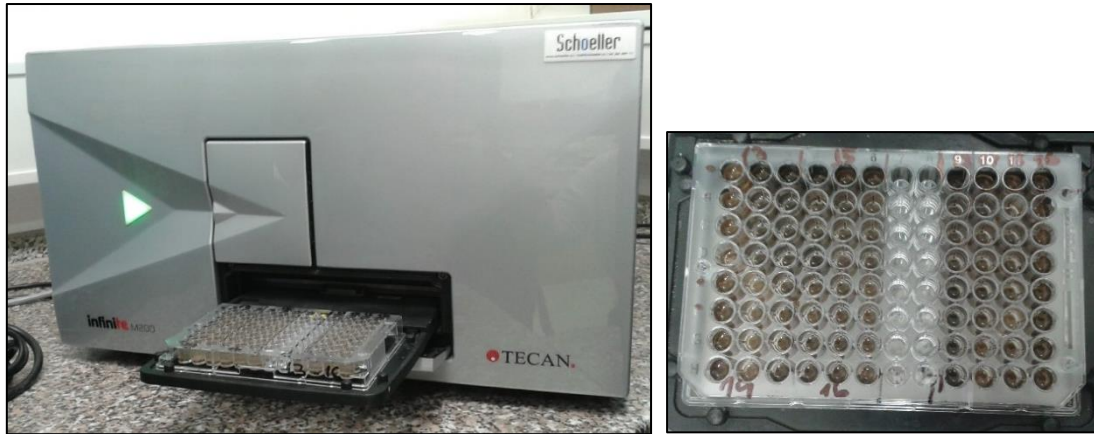
 vzorek 3

 vzorek 4

Tab. 4: Schéma zaplnění mikrotitrační destičky pro stanovení chitinázy, cellobiohydrolázy, alanin aminopeptidázy a leucin aminopeptidázy

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100
B	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100	2 µl AMC 1:100	10 µl MUF 1:100
C	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	5 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:100	5 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:100	5 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:100
D	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	10 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:100	10 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:100	10 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:100
E	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN	200 µl suspenze 40 µl MUFN				20 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:10	20 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:10	20 µl AMC 1:100	20 µl MUF 1:10
F	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC	200 µl suspenze 40 µl MUFC				50 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:10	50 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:10	50 µl AMC 1:100	50 µl MUF 1:10
G	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA	200 µl suspenze 40 µl AMCA				10 µl AMC 1:10	10 µl MUF 1	10 µl AMC 1:10	10 µl MUF 1	10 µl AMC 1:10	10 µl MUF 1
H	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL	200 µl suspenze 40 µl AMCL				20 µl AMC 1:10	20 µl MUF 1	20 µl AMC 1:10	20 µl MUF 1	20 µl AMC 1:10	20 µl MUF 1

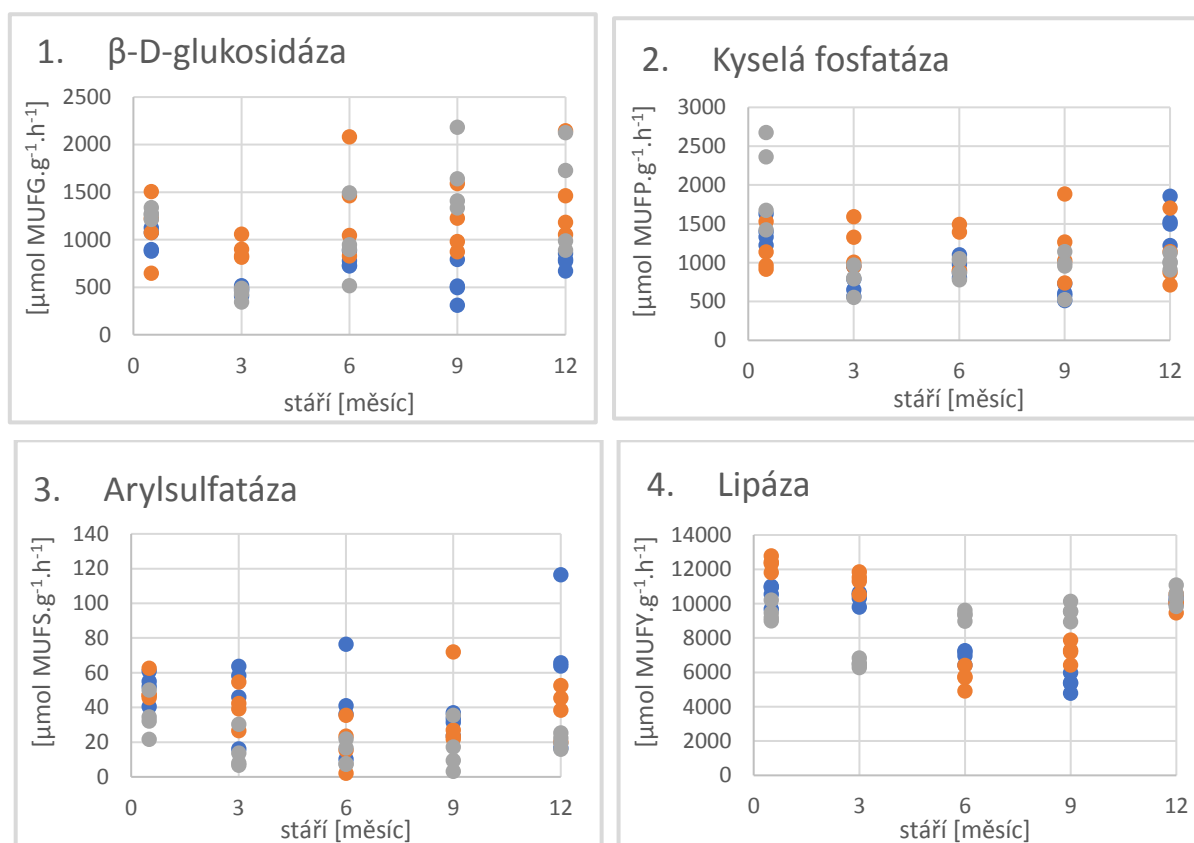
 vzorek 1  vzorek 2  vzorek 3



Obr. 12; 13: Měření na přístroji Tecan Infinite® M200 (vlevo) a napipetovaná mikrotitrační destička (vpravo)

Aktivity β -D-glukosidázy a lipázy vykazovaly u vermikompostů s BRKO a zemědělským bioodpadem s kalem ze sladovny napříč celým časovým profilem vermikompostů přibližně stejné změny, odrážející reakční podmínky ročního vermikompostování (Graf 1 a 4). U vermikompostu se zemědělským bioodpadem s kalem ze sladovny se aktivita kyselé fosfatázy během vermikompostování výrazně neměnila, ve vzorcích z BRKO byla nejvyšší aktivita kyselé fosfatázy naměřena ve vzorcích z vrstvy nejstarší. U vermikompostu s matolinou byl u kyselé fosfatázy nalezen velký rozdíl mezi nejmladší vrstvou a vrstvou starou 3 měsíce. S pokročilým stářím vrstev se hodnoty kyselé fosfatázy u vermikompostu s matolinou výrazně neodlišovaly (Graf 2). U aktivity arylsulfatázy je trend napříč profilem vermikompostů s BRKO a se zemědělským bioodpadem s kalem ze sladovny podobný, s tím rozdílem, že propad v aktivitě byl u vermikompostu s BRKO již u vrstvy II a u vermikompostu se zemědělským bioodpadem s kalem ze sladovny až ve vrstvě III (Graf 3). U aktivity lipázy stanovované ze vzorků vermikompostu s matolinou se hodnoty s rostoucím časem, po počátečním poklesu, vyrovnaly. Hodnoty enzymatické aktivity ve vermikompostu s matolinou mohl ovlivnit vysoký podíl nerozložených zrníček.

Graf 1-4: Enzymatická aktivita pro vermikomposty s BRKO, kalem ze sladovny a matolinou



Legenda: — BRKO; — sladovnický kal; — matolina

U vermikompostů z lihovarských výpalků byla naměřena nejvyšší aktivita β -D-glukosidázy, kyselé fosfatázy a lipázy v nejmladší vrstvě vermikompostu. Ve dva roky starých vrstvách je patrný výrazný pokles aktivity β -D-glukosidázy a kyselé fosfatázy téměř na třetinu, u lipázy na polovinu. U arylsulfatázy výsledky prokazatelně nepodložily, že by s postupujícím časem vermikompostování docházelo ke změnám (Tab. 5).

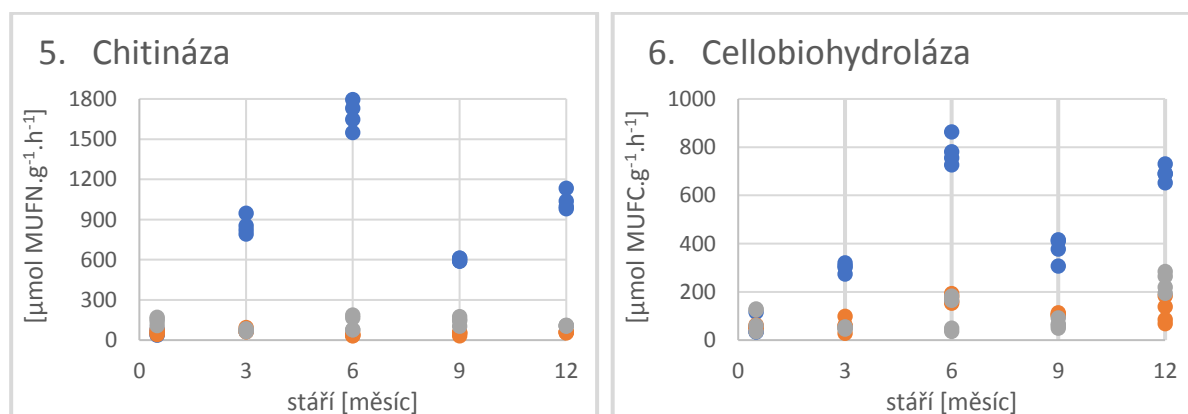
Tab. 5: Enzymatická aktivita pro vermikompost s lihovarskými výpalky

Vrstva	β -D-glukosidáza [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	Kyselá fosfatáza [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	Arylsulfatáza [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	Lipáza [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
IV	2053,3 \pm 101,5	2197,6 \pm 292,9	34,1 \pm 6,4	9117,6 \pm 600,2
III	1648,2 \pm 292,4	1325,5 \pm 112,4	30,0 \pm 8,4	8196,8 \pm 354,1
II	1467,8 \pm 269,5	1083,4 \pm 166,3	18,0 \pm 5,1	4223,3 \pm 388,6
I	712,3 \pm 172,4	779,9 \pm 116,9	39,3 \pm 15,0	4901,1 \pm 42,3

Jednotky jednotlivých enzymů jsou vždy v μmol substrátu (MUF) $\cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, viz grafy

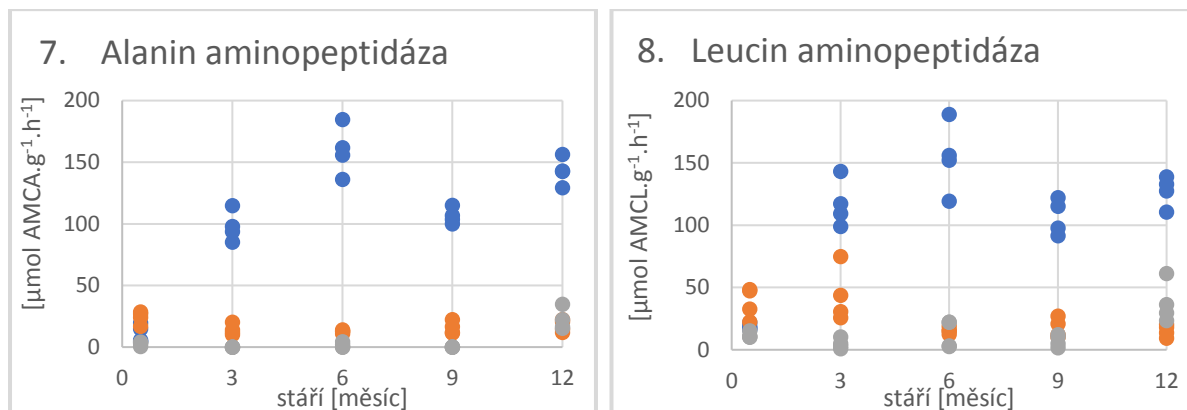
Ze získaných hodnot enzymatických aktivit chitinázy, cellobiohydrolázy a aminopeptidáz naměřených u sledovaných vermikompostů je zřejmé, že nejvyšších hodnot vykazoval vermikompost s BRKO, kde byly zjištěny několikanásobně vyšší hodnoty než u vermikompostů se sladovnickým kalem a s matolinou. V případě BRKO mohly být vysoké hodnoty zapříčiněny vysokou různorodostí materiálu, ve kterém se mohly velmi dobře rozvíjet i houbové mikroorganismy, produkující především chitinázu či cellobiohydrolázu. Jak je patrné z grafů pro jednotlivé enzymy (Graf 5-8), tak v případě vermikompostu z BRKO vykazovala výše enzymatické aktivity napříč celým časovým profilem vermikompostů ve všech případech obdobné změny, odraz podmínek pro štěpení glukosidických vazeb vstupního materiálu. Co se týče vermikompostu obsahujícího zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny, tak zde byly v případě chitinázy hodnoty velmi nízké, nejvyšší hodnota aktivity chitinázy ($73,1 \mu\text{mol MUFN}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) byla naměřena v čtvrté vrstvě (stáří 3 měsíce). Nejvyšší aktivita u vermikompostu se zemědělským bioodpadem a s kalem ze sladovny u cellobiohydrolázy byla naměřena ve třetí vrstvě ($171,9 \mu\text{mol MUFC}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Pro vermikompost s matolinou byly naměřeny u aminopeptidáz velice nízké hodnoty, u alanin aminopeptidázy byla v několika vrstvách aktivita dokonce nulová. Vyšší hodnoty pro vermikompost z matoliny byly naměřeny u aktivity cellobiohydrolázy, kde byla nejvyšší hodnota $240,8 \mu\text{mol MUFC}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. U vermikompostu z matoliny byla enzymatická aktivita ovlivněna velkým podílem nerozložených zrníček ze vstupního materiálu.

Graf 5-6: Enzymatická aktivita pro vermikomposty s BRKO, kalem ze sladovny a matolinou



Legenda: — BRKO; — sladovnický kal; — matolina

Graf 7-8: Enzymatická aktivita pro vermikomposty s BRKO, kalem ze sladovny a matolinou



Legenda: — BRKO; — sladovnický kal; — matolina

Nejvyšší hodnoty aktivity chitinázy, cellobiohydrolázy, alanin a leucin aminopeptidázy byly u vermikompostu s lihovarskými výpalky naměřeny v nejsvrchnější, tedy nejmladší vrstvě vermikompostu. Tato vrstva byla velmi biologicky aktivní, bylo v ní největší množství žížal. Aktivity chitinázy a cellobiohydrolázy se stářím vrstev poklesly, u aminopeptidáz tak znatelný pokles nenastal, ale u všech čtyřech enzymů se hodnoty enzymových aktivit z jednotlivých vzorků dané vrstvy výrazně přiblížily, z toho lze usuzovat na postupnou homogenizaci vermikompostu (Tab. 6).

Tab. 6: Enzymatická aktivita pro vermikompost s lihovarskými výpalky

Vrstva	Chitináza [μmol. g ⁻¹ . h ⁻¹]	Cellobiohydroláza [μmol. g ⁻¹ . h ⁻¹]	Alanin aminopeptidáza [μmol. g ⁻¹ . h ⁻¹]	Leucin aminopeptidáza [μmol. g ⁻¹ . h ⁻¹]
IV	3613,7 ± 574,7	1200,6 ± 264,3	258,2 ± 125,0	333,5 ± 155,2
III	3138,1 ± 330,1	1219,2 ± 233,6	171,6 ± 40,6	131,2 ± 5,7
II	2535,7 ± 166,4	1176,1 ± 60,5	218,1 ± 15,1	160,3 ± 11,7
I	1849,5 ± 41,3	885,8 ± 36,6	157,7 ± 18,6	154,7 ± 10,5

Jednotky jednotlivých enzymů jsou vždy v μmol substrátu (MUF/AMC) . g⁻¹ . h⁻¹, viz grafy.

2.2.2 Spektrofotometrické stanovení enzymatické aktivity

Lakáza a Mn-peroxidáza

Pro stanovení enzymů se připravila suspenze zhomogenizováním $0,2 \pm 0,002$ g zlyofilizovaného vzorku vermikompostu a 20 ml octanového pufru s hodnotou pH 5 o koncentraci $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, po dobu přibližně 30 s pomocí přístroje Ultra-Turrax.

Vzorky bylo nutné přefiltrovat a odsolit (kolonky PD-10) (Obr. 14; 15). Aktivitu lakázy (Tab. 7) i Mn-peroxidázy (Tab. 8 a 9) je nutné měřit ihned po aplikaci substrátu. Většina vzorků reaguje velmi rychle. Aktivita lakázy se měří spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm, aktivita Mn-peroxidázy při vlnové délce 590 nm. Oba enzymy se měří jako změna absorbance, po dobu 3 min každých 30 s (7 x 30 s) pro méně reaktivní vzorek a po dobu 12 min každé 2 min (7 x 2 min) pro více reaktivní vzorek pomocí přístroje Tecan Infinite[®] M200. V případě Mn-peroxidázy je spolu s ní měřena také peroxidáza a oxidáza pro výpočet celkové aktivity Mn-peroxidázy (Baldrian, 2009; Štursová a Baldrian, 2011).



Obr. 14; 15: Filtrace (vlevo) a následné odsolení vzorků (vpravo)

Tab. 7: Schéma zaplnění mikrotitrační destičky pro stanovení lakázy

	1	2	3	4
A	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS
B	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS
C	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS
D	50 µl suspenze 150 µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150µl Cp 50 µl ABTS	50 µl suspenze 150µl Cp 50 µl ABTS

vzorek 1
 vzorek 2
 vzorek 3
 vzorek 4

Cp: Citrátovo – fosfátový pufr pH 5

ABTS: 0,08 % 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

Tab. 8: Standardní roztoky pro Mn-peroxidázu (AMn), peroxidázu (AP) a oxidázu (AOx)

Chemikálie	AMn	AP	AOx
Sukcinát-laktátový pufr	5,25 ml	5,25 ml	5,25 ml
DMAB	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml
MBTH	0,35 ml	0,35 ml	0,35 ml
MnSO ₄	0,35 ml	/	/
Peroxid	0,35 ml	0,35 ml	/
EDTA	/	0,35 ml	0,35 ml
H ₂ O demineralizovaná	/	/	0,35 ml

Sukcinát-laktátový pufr ($c = 100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 4,5)

DMAB: para-Dimethylaminobenzaldehyd ($c = 25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; rozpouštědlo fosfátový pufr o koncentraci $c = 100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 6,5)

MBTH: 3-Methyl-2-benzothiazolinon hydrazon hydrochlorid ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)





MnSO₄: Síran manganatý ($c = 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Peroxid: 12,5 µl peroxidu 30% + 21,25 ml demineralizované vody

EDTA: Ethylendiamintetraoctová kyselina ($c = 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Tab. 9: Schéma zaplnění mikrotitrační desičky pro stanovení Mn-peroxidázy

	1	2	3	4	5	6
A	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
B	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
C	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
D	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
E	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
F	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
G	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx
H	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx	50 µl suspenze 200 µl substrátu AMn	50 µl suspenze 200 µl substrátu AP	50 µl suspenze 200 µl substrátu AOx

 vzorek 1
 vzorek 2
 vzorek 3
 vzorek 4

Analyzované vzorky z jednotlivých vrstev vermikompostů nevykazovaly přítomnost lakázy či Mn – peroxidázy. Dané enzymy jsou produkovány převážně ligninolytickými houbami. Ze stanovení je patrné, že tyto druhy hub v analyzovaných vermikompostech nebyly přítomny.

Ureáza a nitrát reduktáza

Pro stanovení ureázy byla modifikována metoda dle Kandeler a Gerber (1988), založená na stanovení amoniaku po inkubaci vzorků s močovinou. Stanovení nitrát reduktázy probíhalo dle Kandeler (1996) a je založeno na stanovení nitritu po inkubaci vermikompostu s nitrátem (účinek nitrit reduktázy se inhibuje přidávkem 2,4 – dinitrofenolu).

Pro přípravu extraktů se naváží $0,5 \pm 0,005$ g jemně rozdrčeného a přes 2 mm síto přesátého zlyofilizovaného vermikompostu a to vždy čtyři navážky, v případě ureázy do Erlemayerových baněk, pro nitrát reduktázu pak do plastových, mrazu odolných, uzavíratelných kyvet. Pro přípravu roztoků, není-li uvedeno jinak, se použijí chemikálie čistoty p.a. a demineralizovaná voda.

Navážka tří vzorků pro stanovení ureázy se smočí 4 ml demineralizované vody a přidá se 0,25 ml roztoku močoviny, do čtvrté (kontroly) se roztok močoviny nepřidává. Uzavřené baňky se vzorky se inkubují po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci se do kontrolního vzorku přidá 0,25 ml roztoku močoviny a do všech čtyřech baněk 5 ml roztoku KCl. Suspenze se ve znovu uzavřených baňkách 30 minut jemně kruživým pohybem promíchává a poté zfiltruje. Koncentrace a příprava roztoků v tab. 10.

K navážce čtyř vzorků pro stanovení nitrát reduktázy se přidá 4,5 ml demineralizované vody, 0,4 ml roztoku 2,4 – dinitrofenolu a 0,1 ml roztoku dusičnanu draselného. Obsah kyvet se po uzavření jemně promíchá, tři se umístí do inkubátoru (25 °C) a čtvrtá se dá zamrazit (-20 °C), všechny na dobu 24 hodin. Po inkubaci a roztátí kontroly se do všech vzorků přidá 10 ml roztoku KCl a po promíchání se suspenze zfiltruje (Obr. 16). Koncentrace a příprava roztoků v tab. 11.



Obr. 16: Filtrace vzorků pro následné stanovení nitrát reduktázy

Tab. 10: Roztoky pro stanovení ureázy

Chemikálie	Koncentrace
Močovina	0,08 mol . l ⁻¹
Hydroxid sodný	0,3 mol . l ⁻¹
Směsný roztok	17 g salicylanu sodného a 120 mg dihydrátu nitroprussidu sodného v objemu 100 ml
Chlorid draselný	1 mol . l ⁻¹
Směs roztoků v poměru 1 : 1 : 1 (stálá 12 hodin)	Směsný roztok : hydroxid sodný : H ₂ O
Dichlorisokyanurát sodný dihydrát	0,1 hmot.%
Chlorid amonný - <i>standardní roztok I</i>	1000 μg NH ₄ - N . ml ⁻¹
Chlorid amonný - <i>standardní roztoky II</i>	0; 1; 1,5; 2; 2,5 ml <i>standardního roztoku I</i> se naředí roztokem KCl do objemu 100 ml
Roztoky pro kalibrační křivku	0; 1; 1,5; 2,0; 2,5 μg NH ₄ - N . ml ⁻¹ 1 ml <i>standardních roztoků II</i> se naředí demineral. vodou do objemu 10 ml

Tab. 11: Roztoky pro stanovení nitrát reduktázy

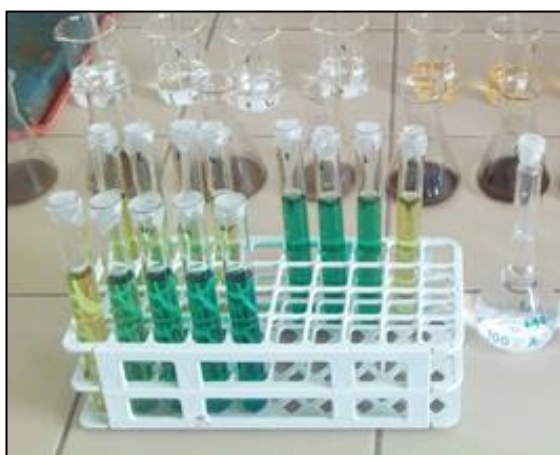
Chemikálie	Koncentrace
2,4 - Dinitrofenol	0,9 mmol . l ⁻¹
Dusičnan draselný	0,025 mol . l ⁻¹
Chlorid draselný	4 mol . l ⁻¹
Amonný pufr, pH 8,5	0,19 mol . l ⁻¹
Barevné činidlo	50 ml destilované vody, 20 ml konc. kyseliny fosforečné, 2 g sulfanilamidu, 0,1 g N-(1-naftyl)-ethylen diaminu dihydrochloridu, doplnit do 200 ml demineralizovanou vodou
Standardní roztok dusitanu sodného	1000 μg NO ₂ - N . ml ⁻¹
Roztoky pro kalibrační křivku (připravují se denně)	0; 0,2; 0,4; 0,8; 1 μg NO ₂ - N . ml ⁻¹ připraví se dávkováním 0; 2; 4; 8; 10 ml standardního roztoku dusitanu sodného, přidáním 50 ml roztoku KCl a doplněním do objemu 100 ml

Pro aktivitu ureázy se absorbance stanoví při vlnové délce 690 nm a minimálně 30 minutovém reakčním čase, proti roztoku KCl pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25. Aktivita ureázy se udává v μg hydrolyzovaného NH₄ - N . g⁻¹ suš. . 2 h⁻¹. Jestliže se stanovení neprovádí záhy po přípravě, lze filtrát uložit až na 24 hodin do chladničky při 4 – 6°C. Pro stanovení nitrát reduktázy se absorbance stanoví při vlnové délce 520 nm a minimálně 15 minutovém reakčním čase, proti prvnímu standardu, pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25. Aktivita nitrát reduktázy se udává v μg NO₂ - N . g⁻¹ suš. 24 h⁻¹. Ošetření filtrátů

pro spektrofotometrická stanovení uvádí tab. 12, s roztoky pro kalibrační křivky se pracuje stejně jako s filtráty (Obr. 17; 18).

Tab. 12: Úprava filtrátů pro spektrofotometrické stanovení

Enzym	Filtrát	Přídavek reagensů
Ureáza	1 ml	9 ml demineralizované vody 5 ml směsi roztoků 2 ml roztoku dichlorisokyanurátu sodného
Nitrát reduktáza	5 ml	3 ml amonného pufru 2 ml barevného činidla



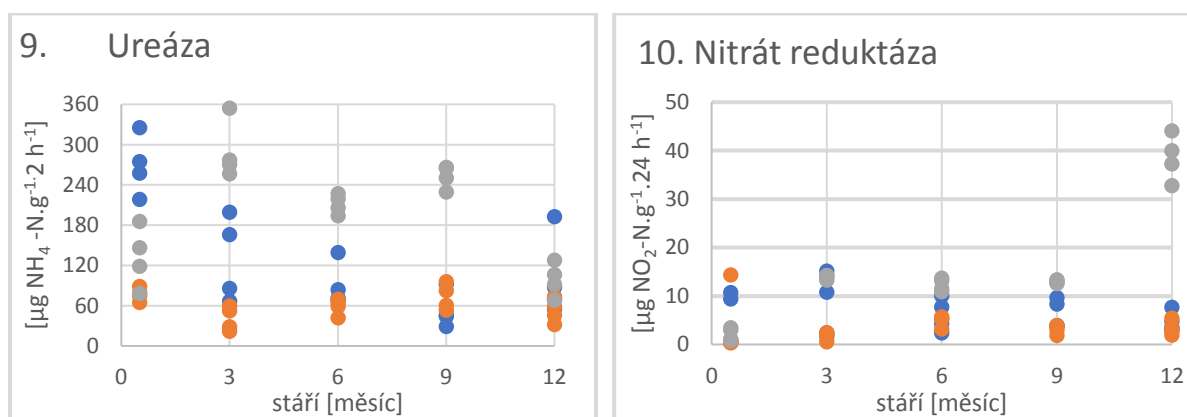
Obr. 17; 18: Upravené filtráty ureázy (vlevo) a nitrát reduktázy (vpravo) pro spektrofotometrické stanovení

V případě BRKO se vermikompostoval značně nesourodý materiál a přesto lze ze získaných hodnot odvodit, že s časem výrazně, téměř třikrát klesá hodnota značně stabilního enzymu ureázy (Graf 9). Nejnižší hodnoty ureázy byly naměřeny v nejspodnější vrstvě u vermikompostu z matoliny i lihovarských výpalků (Tab. 13), u těch se odrazila délka vermikompostování. U vermikompostu se zemědělským bioodpadem s kalem ze sladovny se hodnoty ureázy v jednotlivých časových vrstvách výrazně nelišily. Při hodnocení výsledků se musí brát v úvahu, že jich bylo dosaženo vermikompostováním biologicky rozložitelného materiálu, který byl v daném čase k dispozici, vliv měly klimatické podmínky, ale i lidský faktor. Přesto lze pokles aktivity ureázy považovat za dobrou kontrolu probíhajícího rozkladu.

Změřené hodnoty aktivity nitrát reduktázy ve vzorcích BRKO z lokality Uherský Brod, ve vzorcích zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny z lokality Veleliby u Nymburka i vermikompostu z matoliny z Mikulčic ukazují na podobnou přítomnost nitrát reduktázy v jednotlivých časových úsecích ročního vermikompostování (Graf 10), s nejnižšími

hodnotami v nejstarší vrstvě, z toho lze usuzovat, že i stanovení nitrát reduktázy může být vhodným ukazatelem rozkladného procesu, i když hodnoty nitrát reduktázy ve svrchní vrstvě výrazně ovlivňuje klima. Dvojnásobně vyšší hodnoty nitrát reduktázy v nejstarší vrstvě u vermikompostu z matoliny odráží způsob zakládky, zde byl přidán substrát z hnoje spolu se žížalami. Ve vermikompostu z lihovarských výpalků spolu se slámou a senem z lokality Češov lze mluvit o řádově nižší hodnotě nitrát reduktázy v nejstarší vrstvě (Tab. 13), ale zde se musí uvážit dvouletý cyklus a odlišnost 24 měsíců staré vermikompostové vrstvy, která byla vlhčí, měla téměř o jednotku nižší pH, nižší vodivost a byla “živá“, z pohledu přítomnosti žížal.

Graf 9-10: Aktivita ureázy a nitrát reduktázy pro vermikomposty s BRKO, kalem ze sladovny a matolinou



Legenda: — BRKO; — sladonický kal; — matolina

Tab. 13: Aktivita ureázy a nitrát reduktázy pro vermikompost s lihovarskými výpalky

Vrstva	Ureáza [$\mu\text{g NH}_4\text{-N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 2\text{ h}^{-1}$]	Nitrát reduktáza [$\mu\text{g NO}_2\text{-N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 24\text{ h}^{-1}$]
IV	101,8 ± 39,4	11,9 ± 10,1
III	187,1 ± 28,6	4,0 ± 3,9
II	118,8 ± 28,1	7,1 ± 7,6
I	65,7 ± 7,8	0,6 ± 0,2

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika popisuje provozní vermikompostování a na něj navazující analytické hodnocení získaného produktu – vermikompostu. Důraz je kladen na výběr a stanovení enzymatické aktivity, parametru, z něhož lze usuzovat zralost vermikompostu. Na základě získaných dat je pro orientaci uživatele do metodiky vložena tabulka 14. V tabulce jsou

uvedeny limitní hodnoty enzymatické aktivity, které by neměl zralý vermikompost z daného materiálu překročit. Podle charakteru vstupních surovin si pak uživatel může pro hodnocení vlastního vermikompostu vybrat určitou skupinu enzymů, analytickou metodu jejich stanovení a porovnat výsledky.

Modifikace analytických metod, jejich využití v provozní praxi a následné zhodnocení enzymatických aktivit vermikompostů z biologicky rozložitelných odpadů je v rámci území České republiky nové a původní.

Tab. 14: Limitní hodnoty enzymatické aktivity jednotlivých zralých vermikompostů

Enzym	1.	2.	3.	4.
β-D-glukosidáza [μmol MUFG.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 900	< 2 000	< 2 100	< 1 800
Kyselá fosfatáza [μmol MUFP.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 1 100	< 1 800	< 1 100	< 1 500
Arylsulfatáza [μmol MUFS.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 70	< 60	< 30	< 60
Lipáza [μmol MUFY.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 10 700	< 11 900	< 10 100	< 8 600
Chitináza [μmol MUFN.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 1 200	< 90	< 200	< 3 500
Cellobiohydroláza [μmol MUFC.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 900	< 200	< 200	< 1 500
Alanin aminopeptidáza [μmol AMCA.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 200	< 30	< 40	< 200
Leucin aminopeptidáza [μmol AMCL.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 200	< 70	< 40	< 200
Ureáza [μg NH ₄ -N.g ⁻¹ .2 h ⁻¹]	< 100	< 70	< 100	< 150
Nitrát reduktáza [μg NO ₂ -N.g ⁻¹ .24 h ⁻¹]	< 10	< 10	< 20	< 10

Legenda : 1. vermikomposty s BRKO; 2. vermikomposty se zemědělským bioodpadem a kalem ze sladovny; 3. vermikomposty s matolinou; 4. vermikomposty s lihovarskými výpalky

Lakáza a Mn-peroxidáza jsou ligninolytické enzymy. Aktivita výše zmíněných enzymů zde nebyla stanovena, z čehož se dá usuzovat, že námi zkoumané vermikomposty neobsahovaly ligninolytické houby. V případě vermikompostování vyplozeného substrátu ligninolytických hub by tyto enzymy mohly být přítomny. Není ovšem nutné jejich hladinu nijak omezovat.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

1. Metodika je určena zemědělcům a dalším zpracovatelům věnujícím se vermikompostování bioodpadů, podává jim přehled jaké vlastnosti sledovat a na rozsáhlém počtu stanovení ukazuje v jakých intervalech se jednotlivé veličiny po proběhlé době vermikompostování nacházejí.

2. Metodika je určena specializovaným zemědělským a environmentálním laboratořím, které se zabývají stanovením kvality organických hnojiv.

3. Metodika může být využita pro případnou tvorbu legislativy v oblasti vermikompostování.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zvolené metody byly oceněny podle aktuálních cen chemikálií, přístrojového vybavení a pracnosti. Kalkulace byla provedena v Kč na 1 vzorek při třech opakováních (Tab. 15) a zaplnění celé mikrotitrační destičky viz podkapitola 2.2.1 a při čtyřech opakováních (Tab. 16) a zaplnění celé mikrotitrační destičky viz podkapitola 2.2.2 na multifunkčním modulárním readeru Tecan Infinite® M200. Tabulka č. 17 zobrazuje cenovou analýzu při měření 1 vzorku ve čtyřech opakováních na UV/VIS spektrometru Lambda 25. Detailní kalkulace pro měření zaplněné mikrotitrační destičky při čtyřech vzorkách ve třech opakováních a čtyřech enzymech je znázorněna v tabulce 18, cenová kalkulace popisuje konkrétní zaplnění mikrotitrační destičky uvedené v tabulce 3.

Tab. 15: Cena analýz (Tecan Infinite® M200)

Enzym	Cena [Kč]
β-D-glukosidáza	15,29
Kyselá fosfatáza	14,53
Arylsulfatáza	14,68
Lipáza	15,07
Chitináza	22,34
Cellobiohydroláza	27,68
Alanin aminopeptidáza	36,99
Leucin aminopeptidáza	47,61

Tab. 16: Cena analýz (Tecan Infinite® M200)

Enzym	Cena [Kč]
Lakáza	9,68
Mn-peroxidáza	26,35

Tab. 17 : Cena analýz (UV/VIS spektrofotometr Lambda 25)

Enzym	Cena [Kč]
Ureáza	321,3
Nitrát reduktáza	356,3

Tab. 18: Příklad kalkulace nákladů pro měření zaplněné mikrotitrační destičky při čtyřech vzorcích ve třech opakováních a čtyřech enzýmech na přístroji Tecan Infinite® M200

Materiál, operace, práce	Cena za jednotkové množství	Spotřeba	Náklady [Kč] (na položku)
CH ₃ COOH	0,7	0,288 ml	0,2016
CH ₃ COONa	1	8,896 g	8,896
MUF	15,26	0,000104 g	0,00158704
MUFG	5 400	0,0004464 g	2,41056
MUFP	4 040	0,0003379 g	1,3651968
MUFS	6 200	0,0003533 g	2,190336
MUFY	10 410	0,0003629 g	3,777789
DMSO	1	1,168 ml	1,168
Špičky	0,2	28 ks	5,6
Microplate	22,1	1 ks	22,1
Inkubace	1,27	2 h	2,54
Měření	12,79	0,083 h	1,06
Práce	190	1 h	190

Celkem: 241,31,- Kč

Všechny výpočty hodnot v tab. 15 a 16 jsou provedeny při zaplnění celé mikrotitrační destičky, neboť se tím náklady značně sníží. Stejně tak je možné na jedné mikrotitrační destičce současně měřit více vzorků a více enzymů, tím se usnadňuje a zrychluje celý proces stanovení enzymatické aktivity u jednotlivých vzorků. Všechny ceny analýz jsou taktéž počítány pro tři až čtyři opakování na vzorek, z praktického hlediska a statistického vyhodnocení není vhodné stanovovat jednotlivé parametry bez opakování.

V případě inkubace je počítáno s životností laboratorního inkubátoru 5 let (cena přístroje: 56 000,- Kč (Šarapatka a Čáp, 2013)). V případě měření je počítáno s životností přístroje Tecan Infinite® M200 5 let (cena přístroje: 560 000,-Kč; doba měření: 5 min = 0,083 h) nebo s životností 5 let UV/VIS spektrometru Lambda 25 (cena přístroje: 220 000,-Kč).

Na základě výše zpracované kalkulace a při předpokladu pravidelného většího počtu analýz autoři doporučují vybavit pracoviště multifunkčním modulárním readerem.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Atiyeh, R.M., Subler, S., Edwards, C.A., Bachman, G., Metzger, J.D., Shuster, W. 2000. Effect of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia*, 44 (5), 579-590.
- Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environ*, 55 (9), 370–378.
- Bamforth, S.M., Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (7), 723-736.
- Bočková, J., Kleňha, J. 1972. *Celulázy – jejich biochemie a technologie*. Výzkumný ústav potravinářského průmyslu – středisko technických informací, Praha.
- Brenda, 2017. Enzyme database. The comprehensive Enzyme Information System, on-line dostupné z: <http://www.brenda-enzymes.info/>.
- ČSN EN 15933. 2013. Kaly, upravený bioodpad a půdy – Stanovení pH.
- Dick, W.A. 1984. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. *Soil Sci Soc Am J*, 48. 569–574.
- Edwards, C.A., Arancon N.Q., Sherman R. 2011. *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*. CRC Press. Boca Raton. 623 p. ISBN 978-1-4398-0987-7.
- Enowashu, E., Kandeler, E., Lamesdorf, N., Poll, C. 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition on a spruce forest soil. *Applied Soil Ecology*, 43 (1), 11-21.
- Flavel, T.C., Murphy, D.V., Lalor, B.M., Fillery, I.R.P. 2005. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (7), 1397-1400.
- Gaddie, R. E. (Sr.), Douglas D. E. 1975. *Earthworms for Ecology and Profit*. Scientific Earthworm Farming. Bookworm Publishing Company. California 180 p. ISBN: 0916302059.
- Gooday, G.W. 1994. Physiology and microbial degradation of chitin and chitosan. In: Ratledge C (Eds.), *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 279-312. ISBN: 978-94-011-1687-9.
- Hageman, R.H., Hucklesby, D.P. 1971. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*, 23, 491-503.

- Hanč, A., Plíva, P. 2013. Vermikompostování bioodpadů (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 35 s. ISBN 978-80-213-2422-0.
- Horáková, D., Němec, M. 2003. Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. Masarykova univerzita, Brno, 65 s.
- Kandeler, E. 1996. Nitrate reductase aktivity. *Methods in Soil Biology*, Springer, Berlin, Germany, 176-179.
- Kandeler, E., Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease aktivity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6 (1), 68-72.
- Linek, J. 2002. Využití lipáz k biokatalýze organických reakcí. *Bioprospect*, 12 (1-2), 8-12.
- Mc Lean, M. A., Parkinson, D. 1998. Impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on oribatid mite community diversity and microarthropod abundances in pine forest floor: a mesocosm study. *Applied Soil Ecology*. 7 (2). 125–136.
- Mertz, B., Hill, A.D., Mulakala, C., Reilly, P.J. 2007. Automated docking to explore subsite binding by glycoside hydrolase family 6 cellobiohydrolases and endoglucanases. *Biopolymers*, 87 (4), 249-260.
- Ministerstvo životního prostředí, 23. 3. 2016, Vyhláška č. 93/2016 Sb. o Katalogu odpadů, [citováno dne: 9.12.2017], Dostupné z: <http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/0BFE53E10EC910E2C12580A7004BBDA1/%24file/V%2093_2016.pdf>
- Plíva, P., Altmann, V., Hanč, A., Hejátková, K., Roy, A., Souček, J., Valentová, L. 2016. Kompostování a kompostárny. ProfiPress. Praha. 152 s. ISBN: 978-80-86726-74-8.
- Obroučka, K., Rusín, J., Chamrádová, K. 2010. Možnosti využití lihovarských výpalků k výrobě bioplynu. *Waste Forum*, 2010 (1), 58-67.
- Sinha, R. K., Nair, J., Bharambe, G., Patil, S., Bapat, P. 2008. Vermiculture revolution: a low-cost and sustainable technology for management of municipal and industrial organic wastes (solid and liquid) by earthworms with significantly low greenhouse gas emissions. In: Daven, J. I., Klein, R. N. (eds.). *Progress in waste management research*. Nova Science Publishers. New York. p. 159 - 227. ISBN: 978-1-60456-235-4.
- Sinha, R. K., Agarwal, S., Chauhan, K., Chandran, V., Soni, B. K. 2010. Vermiculture Technology: Reviving the dreams of Sir Charles Darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. *Technology and Investment*. 1. 155 – 172.
- Šarapatka, B., Čáp, L. 2013. Uplatněná certifikovaná metodika – Enzymy, jejich význam, funkce a metody stanovení aktivity v půdě. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, 34 s. ISBN: 978-80-224-3361-5.

- Štursová, M., Baldrian, P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil*, 338, 99-110.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1970. Factors Affecting Soil Arylsulfatase Activity. *Soil Science Society of America Journal*, 34 (3), 427-429.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1971. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biology & Biochemistry*, 3 (4), 317-323.
- Vodrážka, Z. 1996. *Biochemie*. 2. opravené vydání, Academia, Praha, 511 s. ISBN 80-200-0600-1.
- Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P., Gullbo, J. 2011. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Science*, 102 (3), 501-508.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Částková, T., Hanč, A. 2017. Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding, *Proceedings Sardinia 2017*, 1-11. ISBN: 978-88-6265-010-6.
- Částková, T., Hanč, A., Kraus, K. 2017. Obsah spalitelných látek, N, P, K ve vermikompostech. *Racionální použití hnojiv*, 30.11.2017, Praha. ČZU v Praze. 73-76. ISBN: 978-80-213-2793-1.
- García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., Tlustoš P. 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Management*, 62: 33-42.
- Hanč, A., Částková, T., Kužel, S., Cajthaml, T. 2017. Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system. *Waste Management & Research*, 11 (35), 1121-1128.
- Hanc, A., Dreslova, M. 2016. Effect of composting and vermicomposting on properties of particle size fractions. *Bioresource Technology*, 217: 186-189.
- Jindrová, B. 2017. Diplomová práce. Zpracování biologicky rozložitelných zbytků z potravinářského průmyslu. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 58s.
- Šmolík, J. 2017. Diplomová práce. Problematika nakládání s lihovarskými výpalky. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 55s.
- Šubrtová, Z. 2017. Diplomová práce. Vermikompostování matoliny v systému průběžného krmení. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 63s.

Taušnerová, H. 2015. Diploma Thesis. Evaluation of different types of vermicompost by the assessment of microbial enzymatic activities. Czech University of Life Sciences Prague, 80 p.

Záleská, H. 2017. Diplomová práce. Změny enzymatické aktivity během vermikompostování. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 75s.

VIII. JMÉNA OPONENTŮ A NÁZVY JEJICH ORGANIZACÍ

Posudek odborníka v daném oboru vypracovala:

RNDr. Vladimíra Bryndová – Laboratoř MORAVA s.r.o.

Posudek pracovníka příslušného odborného orgánu státní správy vypracovala:

Ing. Michaela Budňáková – Ministerstvo zemědělství ČR

IX. DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. NAZV QJ1530034 s názvem „Legislativní podklady pro větší uplatnění kompostů, zejména vermikompostů, na zemědělskou půdu“.

Název: **Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu
vermikompostování v systému průběžného krmení
Certifikovaná metodika**

Vydala: **Česká zemědělská univerzita v Praze**

Autoři: **Ing. Tereza Částková
Ing. Marie Bazalová
doc. Ing. Aleš Hanč, Ph.D.**

Oponenti: **RNDr. Vladimíra Bryndová
Ing. Michaela Budňáková**

Tisk: **Powerprint, Praha**

Náklad: **40 výtisků**

Počet stran: **37**

Rok vydání: **2018**

Vydání: **první**

Doporučená cena: **neprodejné**

ISBN: **978-80-213-2865-5**