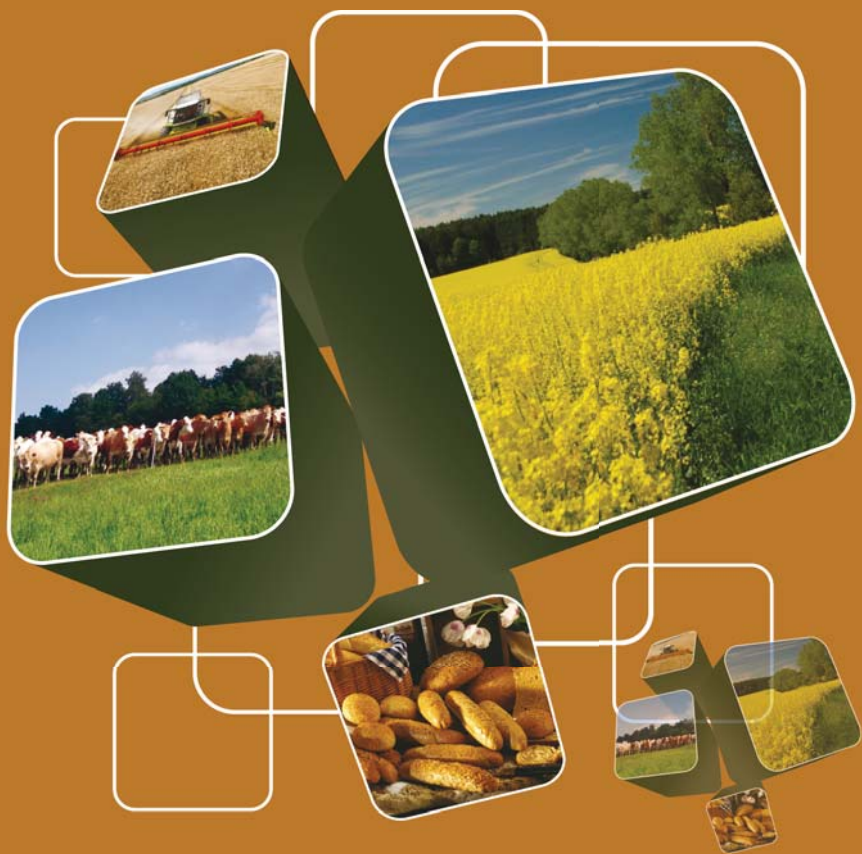




Faculty
of Agronomy

Mendel²
Net⁰¹²



Mendel
University
in Brno



Proceedings of
International Ph.D. Students Conference
November 21st and 22nd, 2012
Brno, Czech Republic

MENDEL UNIVERSITY IN BRNO

Faculty of Agronomy

Mendel 2
Net 0 1
2

Proceedings of International Ph.D. Students Conference

2012, November 21st and 22nd

BRNO

The Conference MendelNet 2012 was realized thanks to:

the support of The Partner Network of Technology Transfer Focusing on Agriculture, Food Processing and Bioenergy No. **CZ.1.07/2.4.00/31.0026** project that is co-financed from the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic,

the special fund for the specific university research according to the Act about the support of the research, the experimental development and innovation granted by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic

and

the support of the Research Plan No. **MSM6215648905** "Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change" funded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Sources of cover illustrations:

www.wallpaper.cz

www.agromachinery.cz

ISBN: 978-80-7375-836-3

Editors:

Ing. Petr Škarpa, Ph.D., Assoc. Prof. Ing. Pavel Ryant, Ph.D., Assoc. Prof. Ing. Radim Cerkal, Ph.D., Ing. Ondřej Polák, Ing. Jaromír Kovárník, Ing. Ivo Vyskočil; Mendel University in Brno, Czech Republic.

Committee Members:**Section Plant Production**

Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc. (Chairman)
Assoc. Prof. Stanislav Hejduk, Ph.D.
Ing. Tamara Dryšlová, Ph.D.
Ing. Vladimír Smutný, Ph.D.
Ing. Gabriela Růžičková, Ph.D.

Section Animal Production

Prof. Ing. Gustav Chládek, CSc. (Chairman)
Assoc. Prof. Ing. Radek Filipčík, Ph.D.
Ing. Petr Mareš, Ph.D.
Ing. Aleš Pavlík, Ph.D.
Assoc. Prof. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D.

Section Agroecology

Prof. Ing. František Toman, CSc. (Chairman)
Ing. Petr Hlavinka, Ph.D.
Ing. Jiří Jandák, CSc.
Mgr. Ing. Magdalena Vaverková, Ph.D.
Ing. Václav Ždímal, Ph.D.

Section Rural Development

Assoc. Prof. RNDr. Antonín Vaishar, CSc. (Chairman)
Ing. Hana Středová, Ph.D.
Assoc. Prof. Dr. Ing. Milada Šťastná
Mgr. Ing. Hana Vavrouchová, Ph.D.
RNDr. Jana Zapletalová, CSc.

Section Food Technology

Assoc. Prof. Ing. Jan Pospíchal, CSc. (Chairman)
Ing. Miroslav Jůzl, Ph.D.
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.
Assoc. Prof. Dr. Ing. Luděk Hřivna
Assoc. Prof. Ing. Šárka Nedomová, Ph.D.

Section Plant Biology

Mgr. Vilém Reinöhl, CSc. (Chairman)
Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.
Ing. RNDr. Marek Klemš, Ph.D.
Kiran S. Nagavalli, Ph.D.

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Section Animal Biology

Prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D. (Chairman)

Ing. Martin Hošek, Ph.D.

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Ing. Petr Sláma, Ph.D.

Assoc. Prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Section Techniques and Technology

Assoc. Prof. Ing. Josef Filípek, CSc. (Chairman)

Ing. Martin Fajman, Ph.D.

Ing. Josef Los, Ph.D.

Ing. Jiří Pospíšil, CSc.

Ing. Jiří Votava, Ph.D.

Section Applied Chemistry and Biochemistry

Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D. (Chairman)

Assoc. Prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.

Ing. David Hynek, Ph.D.

Mgr. Markéta Ryvolová, Ph.D.

Mgr. Tomáš Vaculovič, Ph.D.

PREFACE

It is a tradition that the **MendelNet Conference** for undergraduate and postgraduate students is hosted by **Faculty of Agronomy** in the end of the year. From the first year, in 1996, it has reflected the faculty's life and events. Probably the most important change of the conference image is its gradual increase of the number of sections, connected with the implementation of new courses. Recently, increased number of the participants is welcomed, from our University, from partner universities in the Czech Republic and from abroad, respectively.

The mission and the aims of the Conference continue. It provides students with the opportunity to present their contributions in face of their colleagues and scientific commissions. Students acquire experience with active presentation and defence of results obtained from research on diploma and doctoral thesis. The discussions among participants and students are very valuable because it is the best training procedure for proper thesis defence in front of the commission. The **MendelNet 2012 Conference** is an ideal form for scientific survey acquirement in a given specialization.

Prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.

Dean of FA MENDELU

Contents

SECTION PLANT PRODUCTION

STIMULATION OF SORGHUM SEED TO INCREASE ITS VITALITY ADAMČÍK J., PULKRÁBEK J.	16
USE OF ORGANOMINERAL FERTILIZERS OMIFOS-A AND OMIFOS-S+ IN NUTRITION WINTER WHEAT DOLEŽAL S., RYANT P.	21
EFFECT OF FERTILIZATION WITH UREA AND UREA WITH INHIBITOR OF UREASE ON YIELD AND CONTENT OF NITRATE IN POTATO TUBERS IN YEAR 2010 DRÁPAL K., ELZNER P., JANEČKA L., JŮZL M.	33
THE EFFECT OF SLOW-RELEASE FERTILIZERS ON THE CONTENT OF NITROGEN AND PHOSPHORUS IN ABOVEGROUND PHYTOMASS OF STRAWBERRIES HANKOVÁ H., SLAMKA P.	39
EVALUATION OF CURRENT WEED INFESTATION ON LAND OF MAIZE IN SELECTED FARM CHOVANCOVÁ S., WINKLER J.	45
CHANGE OF WEED SPECTRUM IN SELECTED VINEYARDS JAKABOVÁ, L., WINKLER, J.	55
WEED INFESTATION OF <i>PAPAVER SOMNIFERUM</i> IN FIELD CONDITIONS JONÁŠOVÁ K., WINKLER J.	70
WATER REGIME OF MAIZE (<i>ZEA MAYS</i> L.) IN DIFFERENT MOISTURE CONDITIONS KLIMEŠOVÁ J., STŘEDA T., KUČERA J., HAJZLER M.	78
THE IMPACT OF APPLICATION OF PIG MANURE FERMENTED WITH LARVAE OF HOUSEFLY ON YIELD PARAMETERS OF SUGAR BEET KMEŤOVÁ M., KOVÁČIK P., JANČICH M.	88
CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF GENETIC RESOURCES OF MILK THISTLE [<i>SILYBUM MARIANUM</i> (L.) GAERTN.] KOLÁČKOVÁ P., RŮŽIČKOVÁ G.	95
<i>THIOBACILLUS</i> BACTERIA IN CEREALS PROTECTION KOVÁRNÍK J., BEZDĚKOVÁ K., ŠAFRÁNKOVÁ I., RYANT P., CERKAL R.	104
EVALUATION HETEROGENEITY OF SELECTED WEEDS SPECIES KUBAŠÁKOVÁ M., SMUTNÝ V., LUKAS V., WINKLER J.	111
THE INFLUENCE OF THE SPECIES AND VARIETY ON THE ECONOMIC CHARACTERISTICS OF LAWN TURF IN THE VINEYARD KVASNOVSKÝ M., KNOT P.	119
THE EFFECT OF CUTTING FREQUENCY AND FERTILIZATION ON SPECIES DIVERSITY, GRASSLAND QUALITY AND PRODUCTION NÁWRATH A., SKLÁDANKA J., HRABĚ F.	126

SPRING BARLEY WEED INFESTATION IN VARIOUS CROP ROTATION CYCLES NEISCHL A., WINKLER J., ZELENÁ V.	133
COMPARISON OF NON-DIRECT METHODS FOR ESTIMATION OF NITROGEN STATUS AND CANOPY STRUCTURE IN SPRING BARLEY NOVOTNÁ K., KLEM K.	142
CALIBRATION OF THE SELECTED CROP GROWTH MODELS FOR SPRING BARLEY POHANKOVÁ E., TRNKA M., HLAVINKA P., TAKÁČ J., KERSEBAUM CH., ORSÁG M., FISCHER M., POKORNÝ E., ŽALUD Z.	149
DEVELOPMENT OF PHENOTYPING METHODS FOR DROUGHT TOLERANCE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. BASED ON SPECTRAL REFLECTANCE AND THERMAL IMAGING RAJSNEROVÁ P., KLEM K.	162
THE TREATMENT EFFECT WITH ALGINURE ON APPLE TREE INFECTION BY <i>VENTURIA INAEQUALIS</i> RYCHLÁ K., KATRŇÁK M., PSOTA V.	168
DEPENDENCE OF OCCURRENCE ONION BEETLE (<i>LILIOCERIS MERDIGERA</i> L., 1758) ON TEMPERATURE SAPÁKOVÁ E., ŠEPROVÁ H., HRIVNA L.	178
DIFFERENCES IN WEED INFESTATION OF WINTER WHEAT AFTER PERCROP <i>MEDICAGO SATIVA</i> AND <i>TRIFOLIUM PRETENSE</i> SPAČILÍKOVÁ A., WINKLER J.	184
SULPHUR AND ITS EFFECT ON GRAIN YIELD AND QUALITY OF MALTING BARLEY SYROVÁ H., RYANT P.	192
IMPACT OF VARIABLE APPLICATION OF PHOSPHORUS AND POTASSIUM ON THEIR SOIL RESERVES DURING THE YEARS ŠIRŮČEK P., KRĚN J.	207
EFFECT OF NITROGEN AND MAGNESIUM TREATMENTS ON THE PRODUCTION OF INDIAN TOBACCO (<i>LOBELIA INFLATA</i> L.) VOJNICH V.J., MÁTHÉ Á., SZŐKE É., CSAPÓ Z.	216

SECTION ANIMAL PRODUCTION

THE ANALYSE OF HAFLINGER BREEDING AN ITS CROSSBREEDS IN THE CZECH REPUBLIC BIHUNCOVÁ I., KOSTŮKOVÁ M., ČERNOHORSKÁ H., PÍŠOVÁ M., KRÁLOVÁ B., ORAVCOVÁ I., SOBOTKOVÁ E.	229
CHECK HEREDITY OF EXTERIOR AND MECHANICS OF MOVEMENT OF THE CZECH WARM-BLOOD BASED ON RESULTS OF COLTS IN REARING FACILITIES FOR TESTING YOUNG HORSES ČERNOHORSKÁ H., JISKROVÁ I., SOBOTKOVÁ E., PÍŠOVÁ M., KOSTŮKOVÁ M., BIHUNCOVÁ I., ORAVCOVÁ I.	238

THE EFFECT OF GRADED LEVEL EXTRUDED FULL-FAT SOYBEAN IN DIETS FOR BROILER ON APPARENT ILEAL AMINO ACIDS DIGESTIBILITY FOLTÝN M., RADA V., LICHOVNÍKOVÁ M.	248
COMPARISON OF TOTAL PROTEIN IN SERUM OF COWS IN TERMS OF AGE AND PERIOD OF GESTATION FRÖHDEOVÁ M., MLEJNOVÁ V., LUKEŠOVÁ K., DOLEŽAL P.	254
EVALUATION OF NUTRIENT REQUIREMENTS AND NUTRIENT INTAKE IN SPORT HORSES JAKUBCOVÁ Z., MAREŠ P.	260
RELATIONSHIP BETWEEN TEMPERATURE IN STABLE, MILK COMPOSITION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF HOLSTEIN DAIRY COWS JAVOROVÁ J., FALTA D., VELECKÁ M., ANDRÝSEK J., VEČEŘA M., CHLÁDEK G.	267
INFLUENCE OF DOWNHILL BUILD ON PELVIS ANGLE IN DONKEYS KOSTŮKOVÁ M., JISKROVÁ I., ČERNOHORSKÁ H., BIHUNCOVÁ I., ORAVCOVÁ I.	274
EVALUATION OF THE CONTENT OF BASIC MILK COMPONENTS OF BROWN SHORT-HAIRED GOAT DURING THE LACTATION PERIOD KRÁLÍČKOVÁ Š., KUČHTÍK J.	279
EVALUATION OF LINEAR DESCRIPTION OF HORSES REGISTERED IN THE STUD BOOK CZECH WARMBLOOD KRÁLOVÁ B., JISKROVÁ I., BIHUNCOVÁ I., KOSTŮKOVÁ M., SOBOTKOVÁ E.	286
EFFECT OF FEEDING MYCOTOXIN-CONTAMINATED GRAINS FOR HEALTH, GROWTH AND PRODUCTION PROPERTIES OF LABORATORY RATS KROBOT R., LUKEŠOVÁ K., MLEJNKOVÁ V., ZEMAN L.	288
EFFECT OF ADDITION OF SOIL ON MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF ALFALFA SILAGE (<i>MEDICAGO SATIVA</i>) MLEJNKOVÁ V., FRÖHDEOVÁ M., LUKEŠOVÁ K., ALBA MEJÍA J.E., KALHOTKA L., DOLEŽAL P.	294
EVALUATION OF COMPOUND DOSE OF HORSES MRÁZKOVÁ E., MAREŠ P.	302
EVALUATION OF CHOSEN FACTORS AFFECTING THE TIME SPENT OF FEEDING AT HOLSTEIN DAIRY COWS MUSILOVÁ A., FALTA D.	310
THE EFFECT OF REPOPULATION OF SOWS ON SELECTED REPRODUCTIVE PARAMETERES NEVRKLA P., ČECHOVÁ M., HADAŠ Z.	317
COMPARISON CHOICES BREEDINGS OF HUCUL HORSES ORAVCOVÁ I., JISKROVÁ I., KOSTŮKOVÁ M., ČERNOHORSKÁ H., BIHUNCOVÁ I.	323
EVALUATION OF THE WELSH PONY AND COB BREED ON THE CHAMPIONSHIP OF THE CZECH REPUBLIC PÍŠOVÁ M., JISKROVÁ I.	332

APPARENT ILEAL AMINO ACIDS DIGESTIBILITY OF RAW FULL-FAT SOYBEAN IN BROILER DIETS	
RADA V., FOLTÝN M., LICHOVNÍKOVÁ M., ŠAFAŘÍK I., LOHNISKÝ A.	339
THE USING OF CLAY MINERALS IN POULTRY	
ŠKARKOVÁ M., HAVLÍČEK Z.	346
EFFECTS OF MECHANICAL IMPACTS ON HATCHABILITY OF BROILER BREEDERS	
TORMA T., KOVÁCSNÉ K.G.	359
DIFFERENCE IN OCCUPATION OF CUBICLE ROW OF DAIRY COWS CZECH FLECKVIEH-SIMMENTAL BEFOR THE START AND AFTER MORNING MILKING	
VEČEŘA M., FALTA D., VELECKÁ M., JAVOROVÁ J., ANDRÝSEK J., STUDENÝ S., CHLÁDEK G.	368
THE RELATIONSHIP BETWEEN THE TEMPERATURE IN THE STABLE, COMPOSITION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK IN CZECH FLECKVIEH BREED	
VELECKÁ M., FALTA D., JAVOROVÁ J., VEČEŘA M., ANDRÝSEK J., STUDENÝ S., CHLÁDEK G.	373
COMPARISON OF SEMEN TRAITS OF CROSSBRED BOARS AND HYBRIDS RAISED AT INSEMINATION STATION	
ZEJER P., MILEWSKA W.	380

SECTION AGROECOLOGY

CONTENT OF RADIOCAESIUM IN FOREST BLACKBERRY AND RASPBERRY FRUITS	
ČERVINKOVÁ A., PÖSCHL M.	386
LEACHING OF MINERAL NITROGEN FROM ARABLE LAND IN RELATION TO THE PREVIOUS TYPE OF SOIL FERTILIZATION	
ELBL J., KINTL A., ZÁHORA J.	392
MONITORING OF A POTENTIAL POLUTION SOURCES OF THE RIVER SVRATKA	
GRMELA J., KOPP R.	401
THE FLUCTUATION OF PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS IN HYPERTROPHY FISHPONDS DURING THE DAY AND NIGHT	
HADAŠOVÁ L., KOPP R.	412
VORACIOUS LARVAE AND BIOLOGICALLY DEGRADABLE WASTE	
KALOVÁ M., BORKOVCOVÁ M.	418
EFFECT OF CARBON STIMULATED MICROBIAL ACTIVITY ON PLANT GROWTH AND LOSS OF NITROGEN FROM THE SOIL	
KINTL A., PLOŠEK L., HYNŠT J., TŮMA I., ZÁHORA J.	422

EVALUATION OF ARANEOCENOSIS OF VINEYARD TERRACES IN INTENSIVELY EXPLOITED LANDSCAPE OF SOUTH MORAVIA (CZECH REPUBLIC)	
KOŠULIČ O., HULA V.	431
SPECTRAL ANALYSIS OF DEFLAMETRIC RECORDS OCCASIONED DURING THE PERIODS OF THE EROSIVELY DANGEROUS WINDS	
KRMELOVÁ P., TOMAN F., STŘEDOVÁ H.	440
ASSESSING THE SUSTAINABILITY OF FARMING ON ARABLE LAND AND ITS USE IN THE EDUCATION	
MARADA P., VALTÝNIOVÁ S., VERNER. F.	449
LIMESTONE QUARRIES AS A REFUGIUM FOR ENDANGERED SPECIES OF INVERTEBRATE – PRELIMINARY RESULTS	
NOVÁKOVÁ L.	456
DIVERSITY AND ABUNDANCE OF SMALL MAMMALS OF AGRICULTURAL LANDSCAPE	
NYTRA L.	467
POSSIBILITIES OF DIGESTATE UTILIZATION FROM BIOGAS PLANT IN ŽDĀR NAD SÁZAVOU	
PETRÁKOVÁ V., KOTOVICOVÁ J.	471
CHARAKTERISTICS OF SELECTED TYPES OF COMPOSTS AND THEIR IMPACT ON SOIL	
PLOŠEK L., ELBL J., ZÁHORA J., GRODA B.	481
APPLICABILITY OF BOWEN RATIO ENERGY BALANCE METHOD IN FETCH LIMITED CONDITIONS	
POZŇÍKOVÁ G., TRNKA M., FISCHER M., ORSÁG M., ŽALUD Z.	493
SOIL PHYSICAL PROPERTIES OF MULCHED AND MOWED GRASS-CLOVER TURFS	
RAUS J., KNOT P.	504
THE DYNAMICS OF TEMPERATURE IN BIRDBOXES	
SLAVÍKOVÁ Z., ŽALUD Z., BARTOŠOVÁ L., FISCHER M., TRNKA M.	510
SOIL INFILTRATION CAPACITY IN DIFFERENT MANAGED GRASSLANDS	
SOCHOREC M., HEJDUK S.	522
DEVELOPMENT OF COMMUNITY COMPOSTING OPTIONS IN ŠTERNBERK	
STONAWSKÁ K., VAISHAR A., KOTOVICOVÁ J.	528
ESTIMATION OF ABOVE GROUND WOODY BIOMASS OF SRC HYBRID POPLAR CLONE J-105 IN DIFFERENT FERTILIZER TREATMENTS IN CZECH-MORAVIAN HIGHLAND	
TRIPATHI A.M., TRNKA M., FISCHER M., ORSÁG M., FAJMAN M., MAREK M.V., ŽALUD Z.	534
THE EVOLUTION OF NATURE-LIKE VEGETATION IN ŘÍČKA CANYON BETWEEN ŠLAPANICE AND BEDŘICHOVICE DURING LAST 140 YEARS	
TRUNDA P., ŠTYKAR J.	542

EVALUATION OF POSSIBLE SOURCES OF SURFACE WATER POLLUTION ON CHOSEN STREAMS IN JIZERA MOUNTAINS	
ZÁKOUTSKÁ K., OPPELTOVÁ P.	554
INDUSTRIAL WASTE LANDFILLS AND METHODS THEIR RECLAMATION	
ŽMUDA K., WIŚNIEWSKA-KIELIAN B.	563

SECTION RURAL DEVELOPMENT

CONCENTRATION OF BOTANICALLY INTERESTING PIECES OF KNOWLEDGE IN LOCALITIES OF VYSOKOMÝTSKO –MICROREGION	
DOSKOČILOVÁ V., WAGNEROVÁ Z.	572
THE INFLUENCE OF WIND TURBINES ON THE MORTALITY OF BIRDS - PRELIMINARY RESULTS	
FRÝŽELKOVÁ L., BORKOVCOVÁ M.	593
ACTIVITIES OF TRADITIONAL AND WILD PROJECT ON FACULTY OF AGRONOMY OF MENDEL UNIVERSITY IN BRNO	
GEŽOVÁ V., RŮŽIČKOVÁ G., ŽITŇÁKOVÁ J.	596
TOURISM POTENTIAL AND THE WAY TO ACHIEVE SUCCESS ALONG THE DANUBE REGION BASED ON THE DATOURWAY PROJECT	
TALABOS I.	605
ANALYSIS OF PUBLIC PLACES IN RURAL SETTLEMENT	
JANČOVIČOVÁ M., TITKOVÁ D., ŠTĚPANKOVÁ R.	614
THE EVALUATION OF LAND USE CHANGES IN LAND SURROUNDING WATERCOURSES AS ONE OF THE KEY ELEMENTS FOR ASSESSING THE ECOLOGICAL STABILITY IN RURAL AREAS	
KRIVOSUDSKÝ R.	631
DIPLOMA PROJECT TO THE COMPLETION OF SELECTED URBAN AREAS - THE SELECTED EXAMPLE: KRÁLOVOPOLSKÁ STROJÍRNA BRNO	
LORKOVÁ H., DAMEC J.	640
RURAL DEVELOPMENT FROM THE PERSPECTIVE OF LOCAL ACTORS (CASE STUDY OF BREZNO REGION)	
MÁLIKOVÁ L., SPIŠIAK P.	653
THE CURRENT STATE OF SUBURBANIZATION IN BRNO HINTERLAND	
PÁKOZDIOVÁ M., KŘENOVSKÁ I., ŽITŇÁKOVÁ J.	662
ASSESSING TOURISM DEVELOPMENT IN THE TATRA REGION AND THE VISITORS' PERSPECTIVE	
STREBEROVÁN E., BAUS P.	672
THE OPPORTUNITIES OF BUILDING OF ECO-COMMUNITIES IN RURAL AREAS	
ŠKVARKOVÁ J., HALAŠOVÁ M.	684

THE CUMULATIVE EFFECTS OF ASSESSED DEVELOPMENT PROJECTS ON THE MALACKY LANDSCAPE	
VYSKUPOVÁ M.	703
TRADITIONAL COLLECTION OF WILD PLANTS AS SUPPORT FOR WEAK REGIONS	
ŽITŇÁKOVÁ J. ¹ , VAISHAR A. ¹ , GEŽOVÁ V.	714

SECTION FOOD TECHNOLOGY

BASIC NUTRITION PROFILE OF WAXMOTH LARVAE (<i>GALLERIA MELLONELLA</i>)	
BEDNÁŘOVÁ M., BORKOVCOVÁ M., FIŠER V.	722
CORELLATION BETWEEN INCIDENCE OF <i>FUSARIUM</i> SPECIES AND MYCOTOXINS OCCURRENCE IN DIFFERENT CLIMATIC REGIONS OF SLOVAKIA	
BÍLIKOVÁ J., HUDEC K., TÓTHOVÁ M.	728
THE MONITORING OF DIBUTYL PHTHALATE AND DI-2-ETHYLHEXYL PHTHALATE IN MORAVIAN AGRICULTURAL SOILS	
DAŇKOVÁ R., JAROŠOVÁ A., POLÁKOVÁ Š.	736
MICROFLORA OF SELECTED SPICE MIXTURES WITHOUT ADDED SALT	
DOSTÁLOVÁ L., KALHOTKA L.	748
THE QUALITY OF SANITATION IN THE PRODUCTION OF CHILLED READY MEALS	
DVOŘÁK L., ŠULCEROVÁ H.	758
EVALUATION OF PROTEIN COMPLEX QUALITY ON SELECTED VARIETIES OF WHEAT	
HOMOLA L.	770
THE EFFECT OF PROBIOTICS CULTURES ON <i>ESCHERICHIA COLI</i> AND <i>CLOSTRIDIUM</i> COUNTS IN INTESTINAL TRACT OF PIGLETS	
KOLÁŘOVÁ M., SLÁDKOVÁ P., ZORNÍKOVÁ G.	778
THE YIELD AND GRAIN QUALITY OF WINTER WHEAT AFTER APPLICATION OF NITROGEN AND SULPHUR	
KOTKOVÁ B., HRIVNA L.	788
DYNAMICS OF SUGAR BEET GROW CHANGE AND QUALITY AFTER EXTRA-ROOT NUTRITION	
PECHKOVÁ J., HRIVNA L.	799
THE DYNAMIC OF MICROBIAL DEVELOPMENT IN THERAPEUTIC AGENT MADE OF ALOE	
PŘICHYSTALOVÁ J., KALHOTKA L., PELLIZZONI M., RŮŽIČKOVÁ G.	809
EFFECT OF PALM OIL AND SALMON OIL ON FATTY ACIDS COMPOSITION IN THE TISSUES OF RATS	
ROZÍKOVÁ V., ZORNÍKOVÁ G., GREGOR T., KOMPRDA T., KROBOT R.	820

DETERMINATION OF SMEAR-RIPENED CHEESE TEXTURAL PROPERTIES BY OBJECTIVE METHODS IN DIFFERENT STORAGE CONDITIONS STRNKOVÁ J., NEDOMOVÁ Š., CWIKOVÁ O.	827
INFLUENCE OF THE TECHNOLOGY OF CULTIVATION ON THE QUALITY OF POTATO TUBERS VARIETIES OF RED ANNA AND KARIN SÝKORA V., STRNKOVÁ J., NEDOMOVÁ Š., JÜZL M.	834
PLANT PRODUCTS TREATMENT WITH ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS ŠMÍD J., KLOUČEK J., PULKRÁBEK J.	843

SECTION PLANT BIOLOGY

AXILLARY BUD OUTGROWTH AFTER DECAPITATION IN PEA CAN BE BASED ON THE CANALIZATION OF AUXIN MEDVEDOVÁ Z., BALLA J., PROCHÁZKA S.	852
DETERMINATION OF CANDIDATE SEQUENCES CHALCONE ISOMERASE AND DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE IN WHEAT ONDROUŠKOVÁ J., VYHNÁNEK T., MUSILOVÁ M. TROJAN V., HAVEL L.	859
STOMATAL CONDUCTANCE OF SHORT ROTATION COPPICE BASED ON SAP FLOW MEASUREMENTS AND ITS RESPONSE TO CHOSEN METEOROLOGICAL VARIABLES ORSÁG M., TRNKA M., FISCHER M., KUČERA J., ŽALUD Z.	865
THE USE OF PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS FOR EVALUATION OF DROUGHT STRESS RESPONSE OF WINTER WHEAT DURING PLANT WILTING RYŠKOVÁ T., TRUHLÁŘOVÁ E., KLIMEŠOVÁ J., SMUTNÁ P.	874
NATURAL VARIATION IN THE CYTOKININ METABOLIC NETWORK IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> SAMSONOVÁ Z., KUKLOVÁ A., MAZURA P., ROTKOVÁ G., NOVÁK O., BRZOBOHATÝ B., KIRAN N.S.	881
RESPONSE OF <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> TO HEAT STRESS SKALÁK J., ČERNÝ M., JEDELSKÝ P., VAŇKOVÁ R., BRZOBOHATÝ B.	887
COMPARISON OF ¹⁴C₂,4-D AND ¹⁴C₁FLT UPTAKE BY TOBACCO CELL SUSPENSION BY-2 ŠTĚPÁN Z.	893
EXPRESSION OF SELECTED COR/LEA GENES IN WINTER WHEAT PLANTS DURING WILTING TRUHLÁŘOVÁ E., SMUTNÁ, P., HOLKOVÁ L.	901
THE EFFECT OF SIMULATED EUTROFICATION ON THE GROWTH AND MYCORRHIZAL SYMBIOSIS OF <i>SERAPIAS LINGUA</i> VESELÁ B., BALÁŽ M.	910

ANALYSIS OF VARIABILITY AND GENERATIVE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF THE GENUS <i>PRUNUS</i> L. IN THE BIOCORRIDORS ON THE TERRITORY OF WESTERN SLOVAKIA ŽGANČÍKOVÁ I., VEREŠ T., BARANEC T.	919
---	-----

SECTION ANIMAL BIOLOGY

EFFECT OF COLOURFUL DRINKERS AND GENDER OF PARROTS LORICULUS GALGULUS TO INTAKE OF HONEY WATER ANDRÝSEK J., CHLÁDEK G., JAVOROVÁ J., VELECKÁ M., VEČEŘA M., FALTA D.	928
REVEALING THE ROLE OF ZINC(II) IN PROSTATE CANCER PATHOGENESIS GUMULEC J., SZTALMACHOVÁ M., RAUDENSKÁ M., MASARIK M., KIZEK R. ²	934
QUANTIFIED ANALYSIS OF CORTICAL GRANULE DISTRIBUTION OF PORCINE OOCYTES BEFORE MATURATION HANULÁKOVÁ Š., MILAKOVIČ I., JEŠETA M., HANZALOVÁ K., KNITLOVÁ D., BLAHOVÁ E., MÁCHAL L.	942
PROFILE COMPARISON OF ZINC-PROTEINS IN CANCER AND CONTROL PROSTATIC CELLS EXPOSED A ZN(II) JÍLKOVÁ E., KRÍŽKOVÁ S., MASARIK M., KENŠOVÁ R., ADAM V., KIZEK R.	949
OCCURENCE OF FISH MIGRATION IN THE FISHPASS AT BULHARY ON THE DYJE RIVER KLÍMA O., SPURNÝ P., LUSK S., VÍTEK T.	957
THE IMPACT OF NONYLPHENOL (NP) ON THE SPERMATOZOA MOTILITY <i>IN VITRO</i> LUKÁČOVÁ J., KŇAŽICKÁ Z., TVRDÁ E., LUKÁČ N., MASSÁNYI P.	966
IDENTIFICATION OF THE LIPID DROPLETS OF IMMATURE PORCINE OOCYTES DURING THE DIFFERENT STAGE OF FOLLICULOGENESIS MILAKOVIČ I., HANULÁKOVÁ Š., JEŠETA M., KNITLOVÁ D., HANZALOVÁ K., HORSKÝ R., MÁCHAL L.	973
EFFECT OF CHRONIC APPLICATION OF QUERCETIN AND ACUTE DOSE OF T-2 TOXIN ON HAEMATOLOGICAL PARAMETERS OF RABBITS PETRUŠKA P., CAPCAROVÁ M.	981
FEEDING EFFECT ON THE STERLET <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> SWIM BLADDER GIGANTISM RYBNIKÁR J., MAREŠ J.	989
THE EFFECT OF FRUCTOSE ON TURKEY SPERMATOZOA MOTILITY <i>IN VITRO</i> SLANINA T., MIŠKEJE M., PETROVIČOVÁ I., MASSÁNYI P.	995
FACTORS INFLUENCING CANINE SOCIAL INTERACTIONS ŠEDIVÁ M., ŘEZÁČ P.	1002

THE FOOD PREFERENCES OF ASIAN LADY BEETLE <i>HARMONIA AXYRIDIS</i> ŠENKERÍKOVÁ P., NEDVĚD O.	1008
FEMTOGRAM ELECTROCHEMICAL SENSING OF PRION PROTEINS USING QUANTUM DOTS ŠOBRVÁ P., ZÍTKA O., RYVOLOVÁ M., JANŮ L., ADAM V., KIZEK R.	1016
EFFECT OF GLUTATHIONE ON SELECTED MOTION PARAMETERS OF RAM COOLING-STORED SPERMATOZOA ŠPALEKOVÁ E., MAKAREVICH A.V.	1022
RISK ELEMENTS IN BOTTOM SEDIMENTS AND FISH FROM THE SMALL WATER RESERVOIR TÓTH J., TÓTH T., LAZOR P., SLÁVIK M.	1030
STIMULATING AND PROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL ON BOVINE SPERMATOZOA TVRDÁ E., KŇAŽICKÁ Z., LUKÁČOVÁ L., LUKÁČ N.	1036

SECTION TECHNIQUES AND TECHNOLOGY

INOVATIVE FILTRATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION WATER USING NANOTEXTILE DOŠEK M., LEV J., ČERNÝ M., KALHOTKA L.	1048
INFLUENCE OF CHANGES IN MUNICIPAL WASTE COLLECTION SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF RECOVERABLE AND NON-RECOVERABLE COMPONENTS HLAVENKA T.	1055
THE EFFECT OF THE LOAD OF TRACTOR ENGINE ON IT'S FUEL CONSUMPTION KATRENČÍK J., BAUER F.	1065
PERMEABILITY FLUIDS OF NANOTEXTILES KOLÁČEK S., ČERNÝ M.	1074
QUANTI-QUALITATIVE ANALYSIS OF ANAEROBIC FERMENTATION OF FOOD WASTE KOUTNÝ T., VÍTĚZ T., SZABÓ T.	1085
DRIVER'S INFLUENCE ON KINEMATICS OF ARTICULATED BUS KRUMPHOLC T., BARTOŇ S.	1091
CONTROLS OPERATIONS OF THE VAKUUM PUMP OF THE MILKING MACHINE BY FREQUENCY CONVERTER KUDÉLKA J., FRYČ J., KUKLA R., KONRÁD Z., ŠEVČÍK J.	1101
THE PREDICTION PHYSICAL AND MECHANICAL BEHAVIOR OF FLOWING LIQUID IN THE TECHNICAL ELEMENT KUMBÁR V., BARTOŇ S., KRÍVÁNEK I.	1108

ACOUSTIC EMISSION DURING TENSILE TESTING OF ALUMINIUM ALLOY SPECIMENS

LUKŮVKA R., FILÍPEK J., VARNER D. 1118

INFLUENCE OF THE ENVIRONMENTAL LEGISLATION ON THE VALUE OF THE ENTERPRISE TECHNICAL EQUIPMENT

PASEKA P., MAREČEK J. 1130

REDUCTION OF NO_x EMISSIONS USING THE SELECTIVE CATALYTIC REDUCTION SYSTEM

SKŘIVÁNEK A., POLCAR A., SEDLÁK P. 1136

INFLUENCE OF TRACTOR AND SEEDING MACHINE WEIGHT AND TIRE PRESSURE ON SOIL CHARACTERISTICS

SVOBODA M., ČERVINKA J. 1144

MONITORING OF HONEY BEE (*APIS MELLIFERA*) COLONY BEHAVIOR USING ACOUSTIC EMISSION METHOD

TLAČBABA J., ČERNÝ M., VARNER D. 1150

SECTION APPLIED CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

EFFECT OF ZINC(II) IONS ON THE EXPRESSION OF PRO- AND ANTI-APOPTOTIC FACTORS IN HIGH-GRADE PROSTATE CARCINOMA CELLS

BALVAN J., HOLUBOVÁ M., GUMULEC J., SZTALMACHOVÁ M., RAUDENSKÁ M., ADAM V., KIZEK R., MASAŘÍK M. 1158

ASSAY OF NATURAL ANTIOXIDANTS POTENCY USING PIPETING ROBOT AND SPEKTROPHOTOMETRY

DOBEŠ J., SOCHOR J., RUTTKAY-NEDECKÝ B., ADAM V., KIZEK R., KLEJDUŠ B. 1166

AUTOMATED ZINC PROTEINS EXTRACTION FROM PROSTATIC CANCER CELLS USING MAGNETIC PARTICLES

DOSTÁLOVÁ S., JÍLKOVÁ E., KRÍŽKOVÁ S., MASAŘÍK M., ŠMERKOVÁ K., HYNEK D., RUTTKAY-NEDECKÝ B., KREJČOVÁ L., ADAM V., KIZEK R. 1174

2D MAPPING OF OTOLITHS BY LA-ICP-MS

GRULICHOVÁ E., KANICKÝ V., HOLÁ M., VACULOVÍČ T., KALVODA J., BRZOBOHATÝ R. 1183

SYNTHETIC PEPTIDE MEDIATED IMMUNOCONJUGATION OF QUANTUM DOTS

JANŮ L., STANISAVLJEVIĆ M., RYVOLOVÁ M., HUBÁLEK J., ADAM V., KIZEK R. 1190

OPTIMIZATION OF METHODS SUITABLE FOR ASSESSMENT OF VOLATILES IN BEER

KLEINOVÁ J., KLEJDUŠ B. 1200

PREPARING, ISOLATION AND PARTICAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT PROTEINS OF β -GLUKOSIDASE ZM-P60.1

KLIMEŠ P., MAZURA P., FILIPI T., BRZOBOHATÝ B. 1210

DEVELOPMENT OF METHODIC OF TOTAL GLUTATHIONE AMOUNT DETERMINATION	
KOMÍNKOVÁ M., ZÍTKA O., MERLOS RODRIGO M.A. ³ , ZEHNÁLEK J., HAVEL L., ADAM V., KIZEK R.	1218
ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANTS IN SERUM SAMPLES	
KRAČMAROVÁ A., SOCHOR J., ADAM V., KIZEK R., POHANKA M.	1225
ELECTROCHEMICAL DETECTION OF QUANTUM DOTS USED AS A TOOL FOR LABELLING INFLUENZA DERIVED OLIGONUCLEOTIDE	
KREJČOVÁ L., HYNEK D., KOPEL P., ADAM V., HUBÁLEK J., KIZEK R.	1233
STUDY COVALENT INTERACTIONS FRAGMENT A DNA WITH CISPLATIN	
NEJDL L., SOCHOR J., JÍLKOVÁ E., ŠMERKOVÁ K., RYVOLOVÁ M., ADAM V., KIZEK R.	1244
ISOLATION AND DETERMINATION OF LACTOFERRINE FROM HUMAN SALIVA USING PARAMAGNETIC PARTICLES	
SKALIČKOVÁ S., ZÍTKA O., KRÍŽKOVÁ S., VLKOVÁ M., KIZEK R.	1250
INVESTIGATION OF INTERACTION OF PLATINUM-BASED CYTOSTATIC DRUGS WITH DNA BY SANGER SEQUENCING	
ŠMERKOVÁ K., RYVOLOVÁ M., KREJČOVÁ L., ADAM V., KIZEK R.	1258
STUDY OF COMPLEXES OF ANIMAL METAL-BINDING PROTEIN WITH PLATINUM CYTOSTATICS	
ŠOBROVÁ P., ZÍTKA O., KOMÍNKOVÁ M., SKALIČKOVÁ S., ŠKUTKOVÁ Š., ADAM V., KIZEK R.	1265
X-RAY MICROTOMOGRAPHY AS A TECHNIQUE FOR MINERALOGICAL ANALYSIS OF URINARY CALCULI	
ŠTĚPÁNKOVÁ K., NOVOTNÝ K., KAISER J., PROCHÁZKOVÁ K., KANICKÝ V., MANCINI L.	1272
DESIGN, CREATING AND SCREENING OF MUTANT LIBRARY OF CORN ENZYME B-GLUCOSIDASE ZM-P60.1	
TUREK D., MAZURA P., BRZOBOHATÝ B.	1279
STUDY OF CORROSION OF STRUCTURAL MATERIALS FOR A NUCLEAR REACTOR IV GENERATION BY MEANS OF LA-ICP-MS	
WARCHILOVÁ T., VACULOVÍČ T., MATAL O., ŠIMO T., MIKUŠKA P., KANICKÝ V.	1291

Section – Plant Production

STIMULATION OF SORGHUM SEED TO INCREASE ITS VITALITY

STIMULACE OSIVA ČIROKU PRO ZVÝŠENÍ JEHO VITALITY

Adamčík J., Pulkrábek J.

Department of Crop Production, Faculty of Agrobiologi, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, Czech Republic

Email: adamcik@af.czu.cz

ABSTRACT

The aim of our study was to verify the effects of the application of auxin plant germination increased sorghum sugar in colder conditions. In the years 2011 and 2012 were observed in laboratory conditions stimulated germination of seeds of sorghum sugar according to the different temperatures at the time of germination. To increase the vitality of seeds, the seed was stimulated by auxin plant M-Sunagreen and Lexin. The attempt was used by the company sorghum seed variety Saatbaulinz Goliath - Biomaas 133 and variety Zerberus made by KWS. The seed was stained with Thiram. Net volume of product per 100 g of seeds was at Lexin 0.0096 ml and M Sunagreenu 0.015 ml. The total volume of solution of water used per 100 g of seeds was uniform, and 1 ml. Germination tests were established according to the methodology ISTA. Germination test carried out on the folded filter paper in plastic dishes at 40% saturation of the substrate with water. Heat stress was stimulated by klimaboxu SANYO - versatile environmental test chamber (model MLR-350H), at temperatures of 12, 15, 18 and 21 ° C in the dark for 14 days. Individual variants always conducted in four replications. Germinated seeds (with roots greater than 3 mm) were counted at 24 hour intervals. Germination was determined (KL), germination energy (EK) and the mean germination (MTG). The results were processed using analysis of variance statistical program package SAS 1.9 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Detailed assessments of the differences between means were performed using HSD (Tukey test). The obtained results show that the most active biologically active agent (for faster and more even germination) is Lexin. This product is the most promoted seed germination and seedling and germination at lower temperatures and has a significant impact on increasing the vitality of seeds of sorghum sugar. In less favorable conditions of temperature (12 ° C) to expedite the administration of Lexin germination of sorghum seeds by a full five days.

Key words: sorghum, germination, temperature, stimulation of seed, vitality,

Acknowledgments: SGS 20122006 FAPPZ 2011-2012.

ÚVOD

Klíčivost je ovlivněna především vnitřní kvalitou osiva (vitalitou) a podmínkami prostředí. Mezi základní podmínky prostředí patří teplota a množství přijatelné vody. V podmínkách České republiky je limitujícím faktorem pro pěstování čiroku cukrového zejména nízká teplota v době klíčení a vzházení, která velmi negativně ovlivňuje počáteční růst. Teplota je primární ekologický regulátor klíčení semen (Alvarado a Bradford, 2002). Je obecně známo, že negativní vlivy stresových faktorů během vegetace lze částečně eliminovat aplikací biologicky aktivních látek na bázi huminových kyselin a fulvokyselin, nebo jejich směsi s auxiny (Štranc et al., 2008). Biologicky aktivní látky lze aplikovat v různých fázích růstu rostlin. Lze je však použít i k aplikaci na povrch semen „moření osiva“. Jedná se o speciální úpravu osiva. Speciální úpravy osiva jsou nadstandardní předseťové úpravy a jejich smyslem je zvýšit výkonnost běžně užívaných komerčních osiv (Pazdera, 2002). Úpravy osiv mají zlepšit semenářské parametry osiva s důrazem na dosažení rychlejšího a vyrovnanějšího klíčení a vzházení, při současném rozšíření podmínek prostředí, ve kterých semena mohou klíčit (Copeland a McDonald, 1995). Fytohormony se podílejí na dormanci semen a na řízení klíčení a prvních fázích růstu klíčících rostlin (Houba et al., 2002). Pozitivní výsledky aplikaci auxinů na semena byly zaznamenány i při klíčení kořenové zeleniny (Procházka et al., 1998). Přípravek Lexin je kapalný koncentrát vysokomolekulárních huminových kyselin, nízkomolekulárních fulvokyselin a auxinů. Stimuluje jak dlouhý růst buněk, tak i jejich dělení. Podporuje rovněž jejich diferenciaci a tvorbu cévních svazků. Příznivě ovlivňuje i propustnost buněčných membrán. Tím, že podporuje příjem a využití rostlinných živin celkově pozitivně působí na látkový metabolismus, stimuluje nejen dlouhý růst rostlin, ale i jejich regeneraci, rhizogenezi apod. (Hradecká et al. 2006, Štranc et al., 2006). Přípravek M-Sunagreen je proauxinový přípravek, který přispívá k rychlejšímu a vyrovnanějšímu klíčení a vzházení, zvyšuje a zrychluje tvorbu kořínků v raných vývojových fázích a zvyšuje toleranci k nepříznivým podmínkám v tomto období (Petrásek, 2011). Počáteční růst čiroku cukrového je velmi pomalý a proto je důležité, aby bylo zajištěno rychlé, rovnoměrné klíčení a vzházení i v méně teplotně příznivých podmínkách. Lobato et al., (2008) a Brar et al., (1992) uvádí, že optimální teplota pro klíčení čiroku cukrového se nachází v intervalu 20 až 30 °C.

MATERIÁL A METODIKA

V letech 2011 a 2012 byla v laboratorních podmínkách sledována klíčivost semen čiroku cukrového v závislosti na rozdílných teplotách. K pokusu bylo použito osivo čiroku od firmy Saatbaulinz odrůda Goliath – Biomaas 133 a odrůda Zerberus od firmy KWS. Dodané osivo bylo mořeno přípravkem Thiram. Na povrch semen byly při pokusu aplikovány biologicky aktivní přípravky M-Sunagreen a Lexin. Aplikace roztoku byla provedena rozprašovačem na povrch

semen, která byla následně promíšena a přípravek na nich zaschl za teploty 20°C. Objem čistého přípravku na 100 g semen byl u Lexinu 0,0096 ml a u M-Sunagreenu 0,015 ml. Celkový objem roztoku s vodou použitého na 100 g semen byl jednotný, a to 1 ml.

Testy klíčivosti byly založeny dle metodiky ISTA. Zkouška klíčivosti probíhala na skládaném filtračním papíru v plastových miskách při 40 % nasycení substrátu vodou. Teplotní stres byl stimulován pomocí klimaboxu SANYO – versatile environmental test chamber (model MLR-350H), při teplotách 12, 15, 18 a 21 °C, bez přístupu světla po dobu 14 dní. Jednotlivé varianty probíhaly vždy ve čtyřech opakováních. Vyklíčená semena (s kořínky větší než 3 mm) byly počítány v intervalu 24 hodin. Stanovena byla klíčivost (KL), energie klíčení (EK) a střední doba klíčivosti (MTG). Výsledky byly zpracovány pomocí analýzy rozptylu balíku statistických programů SAS 9.1. (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Podrobnější vyhodnocení rozdílů mezi průměry bylo provedeno metodou HSD (Tukeyho test).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Dvouleté výsledky laboratorní zkoušky klíčivosti shrnuté v tabulce č.1. ukazují, pozitivní vliv aplikace auxinových přípravků na semenářské parametry (EK, KL, MGT). Nejlepší semenářské parametry, byly v průměru zjištěny u stimulace osiva čiroku cukrového, pomocí auxinového přípravku Lexin. Stimulace osiva pomocí přípravku Lexin (GZL) měla v průměru obou ročníků, obou sledovaných odrůd a všech testovaných teplot nejvyšší klíčivost 94,9 % a nejkratší střední dobu klíčení (3,7). Naopak neošetřená kontrola (GZ0) měla v průměru obou ročníků, obou sledovaných odrůd a všech testovaných teplot nejvyšší klíčivost 91,3 % a nejdélší střední dobu klíčení (4,4). Stimulace osiva pomocí přípravku M-sunagreen (GZS) nevyšla u parametrů energie klíčení (EK) a celkové klíčivosti (KL) statisticky průkazně, ale měla statisticky průkazně pozitivní vliv na střední dobu klíčení (MTG).

Stimulace osiva pomocí auxinových přípravků M-sunagreen a Lexin se v našem pokuse ukázala jako vhodné opatření pro zvýšení vitality osiva čiroku cukrového při pěstování v chladnějším prostředí. S klesající teplotou při klíčení se zvyšovaly rozdíly mezi jednotlivými variantami. Zatím co při teplotě klíčení 21°C byly rozdíly v rychlosti dosažení hranice 85 % klíčivosti mezi upraveným osivem (Lexin) a neošetřenou kontrolou jeden den, při teplotě klíčení 12°C tento rozdíl činil plných pět dnů. Hranice 85 % klíčivosti nutná pro certifikaci osiva a jeho uvedení do oběhu dle vyhlášky 369/2009 Sb., Tuto hodnotu překonaly ve výsledné klíčivosti všechny testované vzorky při všech sledovaných teplotách. Výsledky našich pokusů se shodují se závěry Arteca (1996) a Procházký et al., (1998), kteří uvádějí, že auxiny pozitivně působí na tvorbu rostlinných pletiv.

Tab. č. 1 *Semenářské parametry v průměru obou ročníků, obou odrůd, jednotlivých úprav a všech testovaných teplot.*

Úprava	EK 2 (%)	EK 3 (%)	EK 5 (%)	KL (%)	MTG (dny)
Lexin	32 a	49,8 a	76,5 a	94,8 a	3,7 a
M-sunagreen	27,3 b	46,9 b	67,5 b	92 b	4,1 b
Bez úpravy	27,1 b	44,9 c	67,1 b	91,3 b	4,4 c
HSD	1,6	1,7	1,5	1,1	0,01

$\alpha=0,05$

ZÁVĚR

Z literatury je znám fakt, že snižující se teplota má značný vliv na prodloužení doby klíčení u semen rostlin. V našem pokusu se ukázalo, že aplikací auxinových přípravků se dá tento přirozený jev u semen čiroku cukrového částečně omezit a zrychlit klíčení pomocí aplikace auxinových přípravků na povrch semen. Dosažené výsledky mohou přispět k rozšíření pěstitelských ploch čiroku cukrového v podmínkách České republiky.

Poděkování

Výsledky byly získány za podpory CIGA 20122006 a SGS FAPPZ 2011-2012.

LITERATURA

ALVARADO V., BRADFORD K.J., (2002): A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 25, 1061-1969.

ARTECA N. R., (1996): *Plant growth substances, principles and applications*, Chapman&Hall, New Your, 332 s.

BRAR G.S., STEINERJ.L., UNGER P.W., PRIHAS S.S., (1992): Modeling sorghum seedling establishment from soil wetness temperature of drying seed zones. *Agronomy Journal*, 84, p. 905-910.

HRADECKÁ, D., BEČKA, D., ŠTRANC, P. (2006): Aplikace přípravku Lexin v řepce, *Agromanuál*, 1, č. 6, s. 60-61.

LOBATO A.K.S., OLIVIERA NETO C.F.COSTA R.C.L., SANTOS FILHO B.G., SILVA F.K.S., CRUZ F.J.R., ABOUD A.C.S., LAUGHINGHOUSE H.D., (2008): Germination os Sorghum Under the Influence sof Water Restriction and Temperature . *Agricultural Jurnal*, 3, 220-224.

MCDONALD, M.B., 1995: *Principles of Seed Science and Technologi. Seed Enhancements*. Chapman and Hall, New YorkEsechie, H.A., 1994: Interaction of salinity and temperature on the germination of sorghum, *Journal of Agronomy and Crop Science-zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau*, p. 194-199.

PAZDERA, J., 2002: Speciální úpravy osiv In Houba, M., Hosnedl, V., Osivo a sadba. Ing. Martin Sedláček, Praha, s. 124-130.

PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. et. al., (1998): Fyziologie rostlin, Academia, Praha: 483 s.

ŠTRANC P., ŠTRANC J., ŠTRANC D., POKORNÝ J., KOHOUT, L., (2008): Výsledky pokusů s vybranými stimulanty v chmelařství, Moderní trendy v zemědělství, Agromanuál, 4, č. 6, s. 50-53.

ŠTRANC P., HRADECKÁ, D., ŠTRANC J., BEČKA, D., ERHARTOVÁ D., ŠTRANC D., KOHOUT, L., (2006): Možnost agrobiologické regulace stresu u sóji, In: Vliv abiotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006, FAPPZ ČZU v Praze, s. 287- 290.

USE OF ORGANOMINERAL FERTILIZERS OMIFOS-A AND OMIFOS-S+ IN NUTRITION WINTER WHEAT

VYUŽITÍ ORGANOMINERÁLNÍCH HNOJIV OMIFOS-A A OMIFOS-S+ VE VÝŽIVĚ PŠENICE OZIMÉ

Doležal S., Ryant P.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xdolez22@node.mendelu.cz; dol.stanislav@seznam.cz

ABSTRACT

In agricultural years 2008/2009 and 2009/2010, a field experiment with winter wheat was implemented on small plot field in Žabčice (49°1'19"N 16°36'55"E). In this diploma thesis, influence of organomineral fertilizers based on met and bone meal Omifos-A and Omifos-S+ on crop nutritional status (measured by N-tester), yield, grain quality and amount of mineral nitrogen in soil were studied. The experiment was based on comparison of Omifos with mineral fertilizers. It included following variants of fertilization: (1) un-fertilized control, (2) Omifos-A (10–30–0 + 5.5 Ca) compared to (3) Amofos (11–49–0) and (4) Omifos-S+ (4–6–0 + 20Ca + 7S) compared to (5) Gypsum (17.9Ca + 14S). In the latter variant, urea was applied to supply nitrogen. Fertilizers were applied in autumn with sowing, whereas variants (2), (3) and (6), (7) were also applied in spring time to compare autumn and spring fertilizing. The studied fertilizers reached higher levels of nutritional status, yield, volume weight, N-substances content and sedimentation value by Zeleny test than the unfertilized variant. Increases of values were statistically significant. Also amount of total mineral nitrogen in the soil in DC 31 and after harvest was significantly higher after application of fertilizers in comparison to the unfertilized variant. As emerged from the results of this experiment, organomineral fertilizers of Omifos series are completely comparable with mineral fertilizers. Differences between compared pairs of fertilizers and spring and autumn fertilizer application were non-significant.

Key words: Omifos, winter wheat, fertilization, yield, grain quality, mineral nitrogen

ÚVOD

Současná situace ve využití hnojiv v České republice je velmi špatná. Z aplikovaných asi 100 kg hnojiv (v čistých živinách) na 1 ha zemědělské půdy, tvořila v hospodářském roce 2009/2010 celých 80 % dusíkatá hnojiva. V předěšlých letech byla situace obdobná (Ritschelová a kol., 2011). Díky takovému zastoupení dusíku dochází k trvalému nedohnojení půdy zejména draslíkem a fosforem, které již v půdě chybí. V posledních dvaceti letech došlo také k dramatickému poklesu stavu hospodářských zvířat. V současnosti dosahuje hodnoty 0,37 DJ na ha zemědělské půdy, zatím co v roce 1990 dosahoval hodnoty 0,81 DJ na ha zemědělské půdy (Ritschelová a kol., 2011). Nižší množství zvířat znamená logicky i nižší produkci statkových hnojiv. Přitom se snížily i pěstební plochy pícnin pěstovaných na orné půdě. To má vliv na množství kvalitní organické hmoty dodávané do půdy v podobě statkových hnojiv a posklizňových zbytků z pícních porostů. Tyto faktory a události vedou ke snížení úrodnosti půdy. To vše odporuje filozofii Trvale udržitelného hospodaření, které má být hlavním cílem zemědělské politiky EU.

V roce 2007 začala firma FOSFA, a. s. vyrábět organominerální hnojiva na bázi masokostní moučky. Jedná se o hnojiva obsahující dusík, fosfor, vápník a síru. Jejich složení a forma obsaženého dusíku (pomalu uvolnitelný) je přímo předurčují k základnímu hnojení takřka všech plodin. A jelikož v Evropské unii stále platí zákaz zkrmování masokostní moučky hospodářským zvířatům, jeví se způsob jejího využití k výrobě hnojiv jako perspektivní. Objevily se sice pokusy o opětovné povolení ke krmení alespoň křížovým způsobem, ale ani v roce 2007, ani v roce 2010 nebyla žádná změna přijata a tudíž trvá tato situace dodnes.

Tato organominerální hnojiva by tak mohla částečně nahradit klasická minerální hnojiva a přitom působit částečně jako organické hnojivo. Bude tedy nejspíš záležet jen na cenové politice výrobců takovýchto hnojiv a vývoji v situaci s masokostní moučkou.

MATERIÁL A METODIKA

Jako pokusný materiál byla použita zkoušená organominerální hnojiva řady Omifos (Omifos-A a Omifos-S+) od firmy FOSFA, a. s., a klasická minerální hnojiva (Amofos, Sádovec a Močovina). V pokusu byla použita odrůda pšenice ozimé Cubus od společnosti KWS.

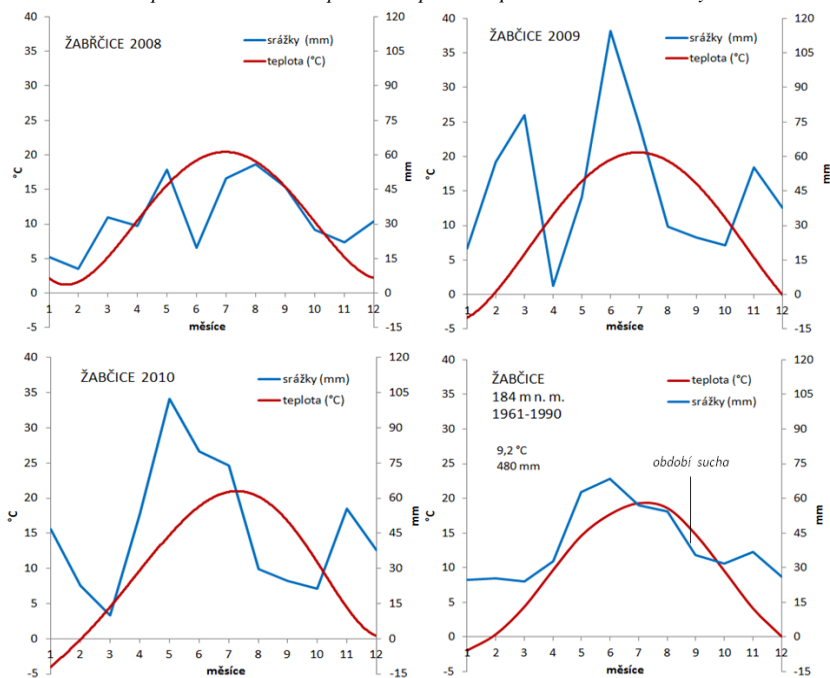
Maloparcelkový pokus byl realizován v hospodářském roce 2008/2009 a 2009/2010 na polní pokusné stanici ŠZP Žabčice s označením „Obora“ metodou znáhodněných půdních bloků. Předplodinou byla ozimá pšenice. Příprava půdy před setím byla prováděna tradičním způsobem. Setí pšenice v prvním roce sledování proběhlo 6. 10. 2008 a ve druhém roce bylo provedeno 8. 10. 2009. Výsev byl proveden maloparcelkovým secím strojem Wintersteiger.

Výsledky agrochemického rozboru půdy před založením pokusu uvádí tab. 1 a průběh teplot a srážek pak obr. 1. Výměnná půdní reakce byla v prvním i druhém ročníku hodnocena jako neutrální. Obsah přístupného fosforu a draslíku byl v obou ročnících na úrovni dobrý, obsah vápníku vysoký, hořčíku pak velmi vysoký a obsah vodorozpustné síry byl nízký.

Tab. 1 Agrochemické vlastnosti půdy před založením pokusu (5. 10. 2008 a 7. 10. 2009)

Ročník	pH/CaCl ₂	Obsah přístupných živin (mg.kg ⁻¹)				
		P	K	Ca	Mg	S
2009	6,75	107	236	4694	432	7,5
2010	7,16	109	245	4343	733	6,8

Obr. 1 Průběh teplot a srážek v době provádění pokusu v porovnání s dlouhodobým normálem



Varianty pokusu byly postaveny tak, aby se mohla posoudit možná náhrada Amofosu hnojivem Omifos-A a Sádrovce sírným hnojivem Omifos-S+. Dusík obsažený v Omifosu-S+ z masokostní moučky byl doplněn u srovnávací varianty Močovinou.

Pokus zahrnoval následující ošetření a zásahy:

- základní hnojení u variant s podzimní aplikací (6. 10. 2008 resp. 8. 10. 2009),
- regenerační hnojení Močovinou v dávce 60 kg N na ha u variant s podzimní aplikací hnojiv (17. 3. 2009, resp. 18. 3. 2010); zároveň byly nahojeny další varianty, kde byla zkoušená hnojiva aplikována až na jaře,
- produkční hnojení na počátku sloupkování (DC 31), bylo aplikováno na všechny varianty 50 kg N na ha v močovíně (16. 4. 2009, resp. 19. 4. 2010),
- změření porostů N-testerem ve fázi metání (DC 57) pro zjištění výživného stavu jednotlivých variant (26. 5. 2009, resp. 6. 6. 2010)
- sklizeň pokusů v plné zralosti (17. 7. 2009, resp. 22. 7. 2010)
- v roce 2010 byly také odebrány ve dvou termínech (19. 4. - DC 31 a 22. 7. - po sklizni pokusů) vzorky půdy pro stanovení obsahu minerálního dusíku v půdě
- během vegetace byly porosty standardně ošetřovány herbicidy, fungicidy i insekticidy.

Tab. 2 Schéma celého pokusu a podzimní aplikace hnojiv

Termín aplikace	var. č.	Schéma	Základní hnojení – podzim			
			Hnojivo	N	P ₂ O ₅	S
Podzim	1	nehnojeno	–	–	–	–
	2	OMIFOS-A	200	20	60	–
	3	AMOFOS	200	22	98	–
	4	OMIFOS-S+	400	18	26	29,5
	5	SÁDROVEC + Močovina	400 + 39	0 + 18	0+0	56 + 0
Jaro	6	OMIFOS-A	–	–	–	–
	7	AMOFOS	–	–	–	–
	8	OMIFOS-S +	–	–	–	–
	9	SÁDROVEC + Močovina	–	–	–	–

Tab. 3 Schéma jarní aplikace hnojiv a regeneračního přihnojení

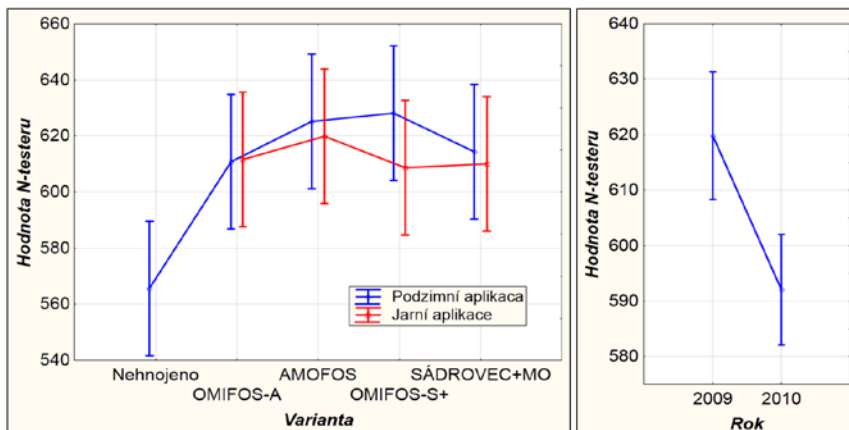
Termín aplikace	var. č.	Schéma	Regenerační hnojení – jaro			
			Hnojivo	N	P ₂ O ₅	S
Podzim	1	nehnojeno	–	–	–	–
	2	OMIFOS-A	0 + 130	60	0	–
	3	AMOFOS	0 + 130	60	0	–
	4	OMIFOS-S+	0 + 130	60	0	0
	5	SÁDROVEC + Močovina	0 + 130	60	0	0
Jaro	6	OMIFOS-A	200 + 87	20 + 40	60	–
	7	AMOFOS	200 + 87	22 + 40	98	–
	8	OMIFOS-S +	400 + 87	18 + 40	26	29,5
	9	SÁDROVEC + Močovina	400 + 39 + 87 (MO)	0 + 18 + 40	0 + 0 + 0	56 + 0 + 0

Hodnoty N-testeru, výnos, technologické parametry zrna a obsah minerálního dusíku v půdě byly hodnoceny vícefaktorovou analýzou rozptylu s využitím softwaru STATISTICA verze 10 a následné testování bylo provedeno Tuckeyho testem významnosti rozdílů.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování VÝŽIVNÉHO STAVU porostu pomocí N-testeru nebyly prokázány rozdíly mezi dvojicemi zkoušených hnojiv ani mezi jarní a podzimní aplikací hnojiv. Projevil se pouze vliv hnojení v porovnání s nehnojenou kontrolou a vliv ročníku. Všechny hnojené varianty tedy dosáhly průkazně vyšších hodnot N-testeru jak nehnojená kontrola.

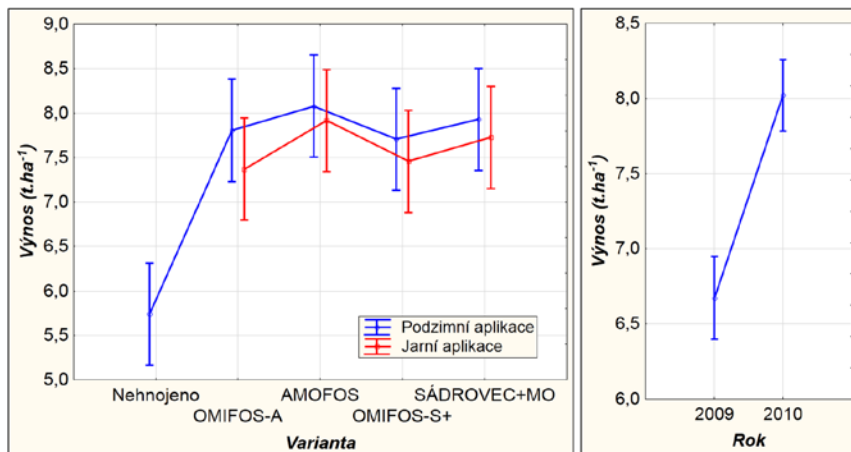
Obr. 2 Hodnoty N-testeru porostu pšenice ozimé ve fázi metání hodnocené podle termínu aplikace, jednotlivých variant hnojení a ročníku



VÝNOS ZRNA pšenice byl v obou ročnících pozitivně ovlivněn hnojením. Rozdíl ve výnosu mezi oběma ročníky činil 20 % ($1,35 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$), což bylo způsobeno především odlišným průběhem počasí v obou ročnících, jak je patrné z obr. 1. Všechny hnojené varianty dosáhly průkazně vyššího výnosu než nehnojená kontrola. Tento výsledek již naznačovaly hodnoty N-testeru (viz obr. 2). Nejvyšší průměrný výnos ($8,11 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) byl dosažen po aplikaci Amofosu, což je o 39 % více než na nehnojené kontrole ($5,82 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$). Rozdíl mezi Omifosem-A a Amofosem činil 7 % ($0,43 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) ve prospěch Amofosu, ale rozdíl nebyl statisticky průkazný, proto se dá vliv obou hnojiv posoudit jako srovnatelný. Ke stejnému výsledku došla i Smatanová (2008) v pokusu se silážní kukuřicí, kdy Amofos dosáhl nejvyššího výnosu, ale rozdíl mezi ním a Omifosem-A nebyl průkazný. Také Kubík (2008) a Svoboda (2011) uvádí průkazné zvýšení výnosu hlíz brambor oproti nehnojené kontrole po aplikaci Omifosu-A a Amofosu s tím, že opět rozdíl mezi těmito dvěma hnojivy byly malé a neprůkazné. Svoboda (2011) v pokusu s jarním ječmenem také potvrdil srovnatelnost Omifosu-A a Amofosu s tím, že mírně vyššího výnosu zrna ječmene (statisticky neprůkazného) bylo dosaženo po aplikaci Omifosu-A oproti Amofosu. Po aplikaci Omifosu-S+ a Sádrovce s Močovinou nebyly zjištěny průkazné rozdíly. V tomto případě činila diference výnosu zrna 4 % ($0,25 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) opět ve prospěch minerálního hnojiva (Sádrovce s Močovinou).

Při hodnocení termínu aplikace nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi podzimní a jarní aplikací hnojiv. Rozdíl mezi podzimní a jarní aplikací činil 2 % ve prospěch podzimních aplikací. Také z grafu na obr. 3 jsou vidět mírně vyšší výnosy po podzimní aplikaci zkoušených hnojiv. Rozdíl je sice neprůkazný, ale i tak to hovoří ve prospěch podzimní aplikace těchto hnojiv.

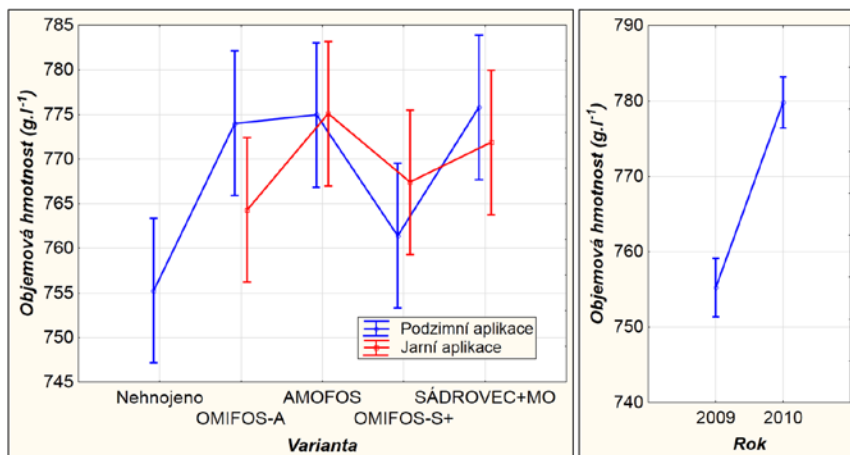
Obr. 3 Výnos zrna pšenice ozimě hodnocený podle termínu aplikace, variant hnojení a ročníku



Hodnoty **OBJEMOVÉ HMOTNOSTI** se za oba ročníky pohybovaly od 733 do 804 g.l⁻¹. Nejnižší hodnota byla naměřena na nehnojené variantě, naopak nejvyšší hodnota pak po aplikaci Sádrovce s Močovinou. Rozdílnost průměrných hodnot v relativním srovnání se pohybovala v rozmezí dvou procent. Z hnojených variant jen varianta Omifos S+ nedosáhla statisticky průkazných rozdílů od kontroly. Při hodnocení variant při každém termínu aplikace zvlášť (obr. 4) už ani Omifos-A aplikovaný na jaře nedosáhl průkazného rozdílu oproti kontrole, avšak stále zůstává statisticky srovnatelný s Amofosem, i když propad objemové hmotnosti činil skoro 10 g.l⁻¹. Stejně tak rozdíl, hodnocený souhrnně za oba ročníky a oba termíny hnojení, mezi Omifosem-S+ a Sádrovcem s Močovinou je neprůkazný. Jak je vidět na obr. 4 mezi podzimní aplikací Omifosu-S+ a Sádrovce s Močovinou je výrazný rozdíl, ale neprůkazný, kdy se u Sádrovce s Močovinou jeví jako lepší jeho aplikace na podzim, kdežto u Omifosu-S+ vychází lépe jarní aplikace hnojiva.

Při srovnání hodnot objemové hmotnosti s požadavky pro kvalitativní zařazení dosáhly všechny hnojené varianty „B“ kvality (požadavek 760–779 g.l⁻¹), i když některé hodnoty se nacházely u samé hranice „A“ kvality – Amofos (777 g.l⁻¹) a Sádrovec s Močovinou (775 g.l⁻¹). Pouze nehnojená varianta spadla do „C“ kvality (požadavek 740–759 g.l⁻¹), i když opět jen minimálním rozdílem 2 g.l⁻¹.

Obr. 4 Objemová hmotnost zrna pšenice ozimé hodnocená souhrnně podle termínu aplikace, variant hnojení a ročníku



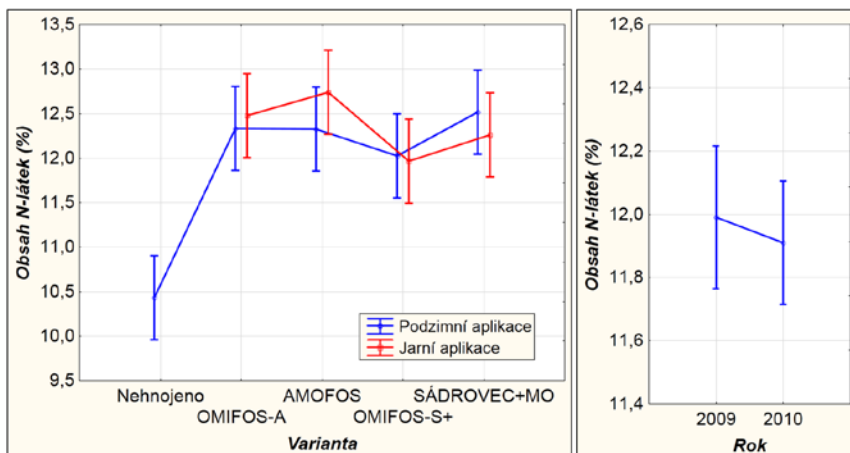
OBSAH N-LÁTEK se u hnojených variant pohyboval od 11,4–13,3 %, což je signifikantně více než na nehnojené variantě, u které obsah N-látek kolísal v intervalu 9,8–11,9 %. Průměr kontroly pak činil jen 10,4 % N-látek. V relativním srovnání se rozdíl mezi nehnojenou variantou a hnojenými variantami pohyboval od 15–20 % ve prospěch hnojených variant. Nejvyšší obsah N-látek v zru - 12,5 % byl zjištěn po aplikaci Amofosu. Na variantách Omifos-A a Sádrovec + Močovina

MENDELNET 2012

byl zjištěn shodný obsah 12,4 % N-látek, což bylo jen o 1 rel. % méně než po hnojení Amofosem. Také Svoboda (2011) uvádí signifikantní zvýšení obsahu dusíku v zrna ječmene po hnojení Amofosem a Omifosem-A oproti nehnojené variantě. Uvedeným autorem byl také zjištěn vyšší obsah dusíku po aplikaci Amofosu oproti Omifosu-A, ale rozdíl nebyl průkazný. Odlišný výsledek uvádí Smatanová (2008), která v pokusu se silážní kukuřiči zjistila o 45,1 % vyšší obsah N-látek v sušině kukuřice u varianty hnojené Omifosem-A než u varianty hnojené Amofosem, což může být dáno pozvolnějším uvolňováním dusíku z Omifosu-A a delší vegetační dobou kukuřice. Kubík (2008) zjistil srovnatelný obsah dusíku v hlízách brambor po aplikaci Amofosu a Omifosu-A.

Při posouzení obsahu N-látek v rámci kvalitativního zařazení do skupiny se do „B“ kvality (požadavek 12,5–12,9 %) dostalo akorát zrna vyprodukované po hnojení Amofosem. Ostatní hnojené varianty spadly do „C“ kvality (požadavek 11,5–12,4 %), i když Omifosu-A a Sádrovec s Močovinou se nacházely na samé hranici s obsahem 12,4 % N-látek. Pokud se na situaci podíváme podrobněji pod vlivem termínu aplikace hnojiv u jednotlivých variant, jak je zřejmé z obr. 5, dojdeme k závěru, že do „B“ kvality se dostal sice Amofos, ale jen při jarní aplikaci (12,7 % N-látek). Zároveň dosáhl však kvality „B“ i Sádrovec s Močovinou (12,5 % N-látek), tentokrát po podzimní aplikaci hnojiva.

Obr. 5 Obsah N-látek zrna pšenice ozimé hodnocený podle termínu aplikace, variant hnojení a ročníku



Pro stanovení kvality zrna není rozhodující jen množství obsažených bílkovin, které bylo stanoveno jako obsah N-látek, ale i jejich kvalita. Ta byla v pokusu zjištěna stanovením **SEDIMENTAČNÍ HODNOTY**, která popisuje bobtnavost pšeničných bílkovin. Opět se projevil průkazný vliv hnojených variant oproti nehnojené kontrole. Hnojené varianty dosáhly o 69–100 % (32,1–37,9 ml) vyšších hodnot sedimentační hodnoty, tedy všechny hnojené varianty splnily normu

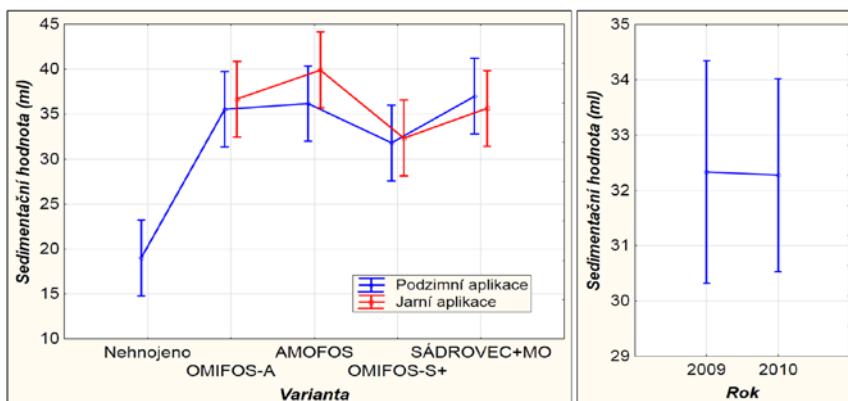
MENDELNET 2012

30 ml pro pekařskou jakost potravinářské pšenice. Nehojená varianta dosáhla v průměru jen 19 ml. Nejvyšší nárůst oproti kontrole byl zaznamenán po aplikaci Amofosu (+ 100 %), jehož sedimentační hodnota se pohybovala v rozmezí 31–47 ml (průměr 37,9 ml). Omifos-A dosáhl o 10 % nižší hodnoty, ale po statistické stránce je stále srovnatelný s Amofosem. Druhé nejvyšší hodnoty dosáhla varianta Sádrovec + Močovina s průměrnou sedimentační hodnotou 36,4 ml (+ 91 % oproti kontrole). Omifos-S+ měl sice nejnižší sedimentační hodnotu z hnojených variant - 32,1 ml (+ 69 % oproti kontrole), ale i přesto byl jeho vliv při souhrnném hodnocení srovnatelný se Sádrovcem s Močovinou i ostatními hnojenými variantami.

Zhao a kol. (1997) uvádějí, že hnojní sírou zvyšuje sedimentační hodnotu a tím objem pečiva, což se však v případě sirného Omifosu-S+ a Sádrovce s Močovinou nepotvrdilo. Také Ryant a Hrůza (2010) zjišťovali v podmínkách jižní Moravy (Žabčice a Břežany) vliv hnojiva Magnisul (obsah síry 11 %) na výnos a kvalitu zrna pšenice, přičemž zjistili zvýšení sedimentační hodnoty po aplikaci Magnisulu oproti Ledku amonnému s dolomitem – v tomto případě se tedy projevily pozitivní vliv síry na tento kvalitativní parametr, což se v pokusu s Omifosy nepotvrdilo. Pokud se na jednotlivé varianty podíváme pod vlivem termínu aplikace – viz obr. 1, zjistíme, že se vyskytl menší rozdíl mezi Omifosem-S+ a Sádrovcem s Močovinou, kdy na variantě se Sádrovcem s Močovinou bylo dosaženo vyšší sedimentační hodnoty než na variantě s Omifos-S+. U varianty Amofos si můžeme všimnout, že bylo dosaženo vyšší hodnoty při jeho jarní aplikaci. Rozdíly mezi podzimní a jarní aplikací jsou však statisticky neprůkazné.

Opět můžeme pozorovat podobný trend jako u obsahu N-látek, kdy sirné varianty (Omifos-S+ a Sádrovec + Močovina) dosahují vyšších hodnot při podzimní aplikaci hnojiv a naopak fosforečné varianty (Omifos-A a Amofos) při jarní aplikaci těchto hnojiv.

Obr. 6 Sedimentační hodnota zrna pšenice hodnocená podle termínu aplikace hnojiv, variant hnojení a ročníku

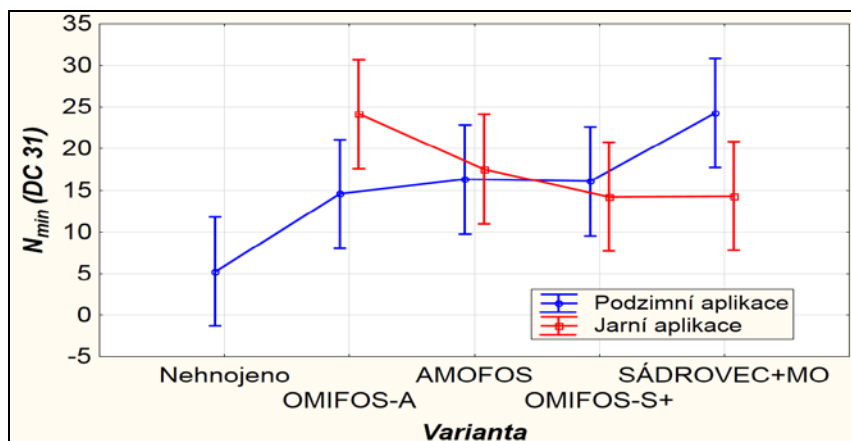


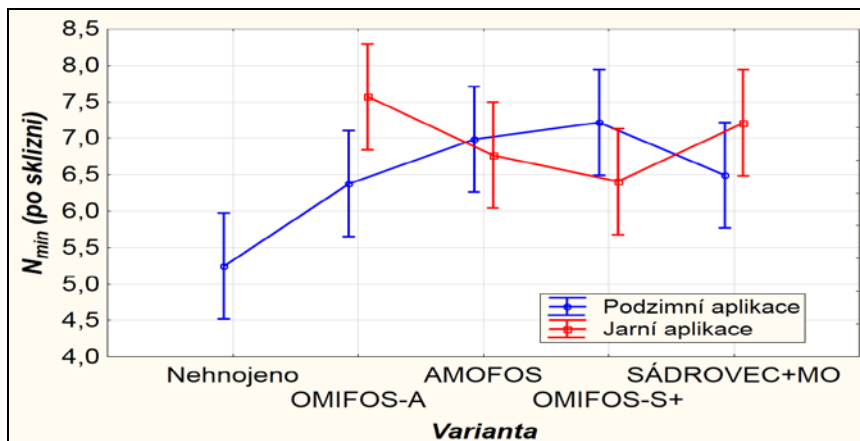
Absolutní hodnoty a také rozdíly v OBSAHU N_{\min} v PŮDĚ jsou po sklizni výrazně nižší než za vegetace v průběhu sloupkování. To je způsobené především odběrem dusíku pšenicí a případnými ztrátami dusíku z půdy. Přehledně porovnání obsahů jednotlivých forem dusíku a celkového minerálního dusíku zachycuje tab. 4. Z této tabulky je patrné, že obsah minerálního dusíku v půdě je u kontroly v podstatě konstantní a naopak po aplikaci hnojiv se výrazně mění jeho obsah v půdě v průběhu vegetace. Všechny hnojené varianty tedy dosáhly průkazného zvýšení obsahu N_{\min} v půdě, přičemž mezi sledovanými dvojicemi hnojiv nebyly zaznamenány průkazné rozdíly v obsahu N_{\min} . Zajímavé je také to, že v termínu odběru vzorků po sklizni obsah amonného ani nitrátového dusíku nevykazuje průkazný rozdíl oproti kontrole, ale při jejich součtu jako N_{\min} je již rozdíl průkazný. Hnojené varianty, které na počátku sloupkování obsahovaly nejvyšší množství N_{\min} v půdě, pak naopak po sklizni obsahovaly nejnižší množství N_{\min} . Zároveň nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi sledovanými dvojicemi při podzimní a jarní aplikaci hnojiv, jak je vidět z obr. 7 a obr. 8.

Tab. 4 Porovnání obsahů jednotlivých forem minerálního dusíku (mg.kg^{-1}) u obou termínů odběru vzorků (DC 31 i po sklizni pokusu)

Varianta	Odběr DC 31			Odběr po sklizni pokusu		
	$N\text{-NH}_4^+$	$N\text{-NO}_3^-$	N_{\min}	$N\text{-NH}_4^+$	$N\text{-NO}_3^-$	N_{\min}
Nehnojeno	1,7 ^a	3,6 ^a	5,2 ^a	1,9 ^a	3,6 ^a	5,5 ^a
OMIFOS-A	8,9 ^b	10,5 ^{bc}	19,4 ^b	2,6 ^a	4,1 ^a	6,8 ^b
AMOFOS	8,8 ^b	8,1 ^b	16,9 ^b	2,4 ^a	4,5 ^a	7,0 ^b
OMIFOS-S+	4,8 ^{ab}	10,3 ^{bc}	15,2 ^b	2,6 ^a	4,4 ^a	7,0 ^b
SÁDROVEC	7,5 ^{ab}	11,8 ^c	19,3 ^b	2,4 ^a	4,3 ^a	6,7 ^b

Obr. 7 Obsah N_{\min} po jarní a podzimní aplikaci hnojiv při odběru v DC 31 (19. 4. 2010)



Obr. 8 Obsah N_{min} po jarní a podzimní aplikaci hnojiv při odběru po sklizni pokusu (22. 7. 2010)

ZÁVĚR

Cílem pokusu bylo porovnat vliv hnojení organominerálními hnojivy Omifos-A a Omifos-S+ s klasickými minerálními hnojivy s podobným zastoupením živin, tedy Amofosem a Sádrovcem. Z dvoutýdňových výsledků maloparcelkového pokusu je zřejmé, že Omifos-A i Omifos-S+ jsou ve všech sledovaných veličinách (výživný stav, výtěžek, objemová hmotnost, obsah N-látek, sedimentační hodnota a obsah minerálního dusíku v půdě) srovnatelné s klasickými minerálními hnojivy a lze je doporučit pro využití v praxi. Pro Omifosy hovoří i fakt, že díky organické složce je jejich působení zpomaleno, což je přímo určuje k základnímu hnojení. To potvrzují i výsledky vlivu termínu aplikace hnojiv, kdy nebyly prokázány rozdíly mezi podzimním a jarním hnojením. Je nutné si však uvědomit, že jarní aplikací Omifosů byla snížena regenerační dávka dusíku v minerálním hnojivu.

Při dávce 20 kg dusíku na ha (200 kg Omifosu-A) totiž dodáme do půdy potřebné množství fosforu na výtěžek 5 t.ha⁻¹ zrna pšenice. Dodávat Omifosy vyšší dávky dusíku by znamenalo přehnojovat fosforem. V případě potřeby dodat ozimé pšenici dusík již na podzim lze tedy doporučit právě podzimní aplikaci. Pokud bychom naopak chtěli ušetřit na regenerační dávce dusíku, dá se Omifos aplikovat i na jaře, ale zde musíme počítat s dohnojením na požadovanou regenerační dávku dusíku. Dodat totiž takovéto množství dusíku v Omifosu by bylo nežádoucí z hlediska formy dusíku a obsahu fosforu v Omifosu obsaženém.

V případě hnojení jařin by pak byla ideální aplikace Omifosů na jaře před setím.

LITERATURA

KUBÍK, L. (2008): *Ověření účinnosti organominerálních hnojiv na bramborách*, Bulletin Sekce úřední kontroly XVI(2): 11–22.

RITSCHELOVÁ, I. a kol. (2011): *Statistická ročenka České republiky 2011*, ČSU Praha, 13. Část Zemědělství, czso.cz [on-line], 2011-11-23 [cit. 2012-01-05]. Dostupné na: http://www.apic-ak.cz/data_ak/11/k/Stat/StatRocenska2011.pdf

RYANT, P., HRŮZA, M. (2010): *Vliv aplikace hnojiva Magnisul na výnos a kvalitu pšenice ozimé*, Agrochemia: Agrochemistry, 16(3): 3–7.

SMATANOVÁ, M. (2008): *Ověřování účinnosti organominerálních hnojiv Omifos-A*, Bulletin Sekce úřední kontroly XVI(2): 4–10.

SVOBODA, J. (2011): *Ověřování účinnosti organických a organominerálních hnojiv na bázi masokostních mouček ve výživě polních plodin*, Disertační práce, Mendelova univerzita v Brně, 144 s.

ZHAO, F. J., MCGRATH, S. P., SALMON, S. E., SHEWRY, P. R., QUAYLE, R., WITHERS, P. J. A., EVANS, E. J., MONAGHAN, J. M. (1997): *Optimising sulphur inputs for breeding quality of wheat*, Aspect of Applied Biology, 50: 199-205.

EFFECT OF FERTILIZATION WITH UREA AND UREA WITH INHIBITOR OF UREASE ON YIELD AND CONTENT OF NITRATE IN POTATO TUBERS IN YEAR 2010

VLIV HNOJENÍ MOČOVINOU A MOČOVINOU S INHIBITOREM UREÁZY NA VÝNOS A OBSAH DUSIČNANŮ V HLÍZÁCH BRAMBOR V ROCE 2010

Drápal K., Elzner P., Janečka L., Jůzl M.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: karel.drupal@seznam.cz

ABSTRACT

Field experiment was carried out on two locations – Žabčice (lowland) and Valečov (highland) in year 2010. In experiment were used two nitrogen fertilizers - classical Urea and urea with inhibitor of urease (UreaStabil®) and two varieties of potatoes with different length of vegetation - early Karin and semi-early Red Anna. At both locations were based six variants of fertilization in four repetitions. Variants were 100% Urea, 80% Urea, 60% Urea, 100% UreaStabil®, 80% UreaStabil® and 60% UreaStabil®, when 100% of each fertilizer was 90 kg ha⁻¹ decreased according to content of N_{min} in soil before planting. The obtained results can be stated that from variants of fertilization it was achieved the highest average yield by variant 100% of urea (44.7 t.ha⁻¹). This variant was statistically significant higher (P<0.05) against all other variants. From locations a higher average yield of potatoes was achieved at the location Valečov (44.7 t.ha⁻¹). From varieties it was achieved of higher average yield by variety Red Anna (41.7 t.ha⁻¹). Differences between locations and varieties were statistically significant (P<0.05). As far as the monitoring of nitrate content in potatoes tubers which represent health risk for consumers is concerned we found that effect variants of fertilization on the content of nitrate was not statistically significant (P>0.05). From locations the lowest average content of nitrate was achieved at the location Žabčice (159.6 mg.kg⁻¹ fresh mass). From varieties it was achieved the smallest average content of nitrates by variety Red Anna (141.9 mg.kg⁻¹ fresh mass). The differences in the content of nitrate between locations and varieties were statistically significant (P<0.05).

Key words: potatoes, urea, UreaStabil®, nitrate, yield

Acknowledgments: This study was supported by Research plan No. MSM 6215648905 called “Biological and technological aspects of the sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change” which is financed by the Ministry of Education, and Research project NAZV No. QI101A184 called: Potato Growing Technology – New Friendly Approaches to the Environment.

ÚVOD

Dusík jakožto základní makrobiogenní živina je nezbytná pro tvorbu biomasy a to nejen u brambor, ale i u ostatních rostlin (Vaněk, 2002). Je si třeba uvědomit, že vhodná dávka dusíkatého hnojení pozitivně ovlivňuje výnos, ale i kvalitu bramborových hlíz. Narůstající dávka dusíku zvyšuje výnos hlíz, ale od dávky 50 – 60 kg.ha⁻¹ začíná klesat jeho účinnost. Doporučená dávka dusíku se pohybuje v rozmezí 60 – 120 kg.ha⁻¹ s ohledem na množství aplikovaného hnoje (Diviš a kol., 2005). Vysoké dávky dusíku také snižují škrobnatost na úkor tvorby nitrátů, které jsou nežádoucí (Westermann et al., 1994). Z tohoto pohledu je zřejmé, že nevhodné dávky dusíku snižují nejen kvantitativní, ale i zejména kvalitativní parametry bramborových hlíz (Roinila et al., 2003).

Dusíkaté hnojivo UreaStabil je močovina obohacená o inhibitor ureázy NBPT (N-(n-butyl)-thiophosporic triamid). Jedná se o nové hnojivo, které bylo zaregistrováno v České republice v roce 2006. Jeho hlavní předností ve srovnání s běžně používanými minerálními dusíkatými hnojivy je vysoký obsah dusíku (46 %), velmi dobrá rozpustnost (již po 5 mm srážek oproti LAV, kdy je zapotřebí 10 mm srážek), kdy dochází k transportu nepolární molekuly močoviny ke kořenům rostlin (Mráz, 2007). Při transportu půdním profilem dochází k oddělení inhibitoru ureázy od močoviny, která je buď přijímána kořeny rostlin nebo se rozkládá na uhlíčitán amonný a rostlinou je pak přijímána ve formě amonného iontu a po zvýšení teploty půdy ve formě nitrátového. Ve srovnání s klasickou močovinou jsou působením inhibitoru ureázy eliminovány ztráty dusíku únikem amoniaku do ovzduší (volatilizace) a vytvořeny lepší předpoklady pro transport nehydrolyzované močoviny ke kořenům rostlin (Růžek, 2006).

Dusíkaté hnojivo UREA^{stabil} je vhodné pro většinu plodin a aplikací, zejména pro regenerační přihnojení ozimů, produkční a kvalitativní hnojení obilovin, základní hnojení a přihnojení jařin, ale také pro při hnojení plodin pod patu (neinhibuje klíčící a vzházející rostliny). Nedoporučuje se jeho použití na velmi slabé a poškozené porosty, vhodné je naopak na stanovištích s častými přísušky (Mráz, 2007).

Nová hnojiva na bázi močoviny s inhibitorem ureázy jsou základním předpokladem pro uplatnění nových technologických postupů ve výživě rostlin, jejichž cílem je zvýšit efektivnost hnojení dusíkem a zároveň však omezit znečišťování vod i ovzduší.

MATERIÁL A METODIKA

Přesné polní pokusy byly založeny na dvou lokalitách – Žabčice (49°1'22.783"N 16°37'4.409"E) a Valečov (49°38'36.839"N 15°29'48.422"E). Výsadba byla provedena ve sponu 750x250mm ve dnech 8.4.2010 (Žabčice) a 28.4.2010 (Valečov). Na obou stanovištích bylo ve čtyřech opakování založeno šest variant hnojení N - 100 % močoviny (U), 80 % močoviny, 60 % močoviny, 100 % UreaStabil (US), 80 % UreaStabil a 60 % UreaStabil, kdy 100 % odpovídalo 90 kg N.ha⁻¹ po odečtení obsahu N_{min} v půdě a kontrolní varianta bez hnojení minerálním dusíkem. Hnojení příslušnými dávkami hnojiv bylo provedeno v den výsadby a hnojivo bylo ihned zapracováno do půdního profilu.

Sledovány byly dvě odrůdy s rozdílnou délkou vegetační doby – raná odrůda Karin a poloraná odrůda Red Anna.

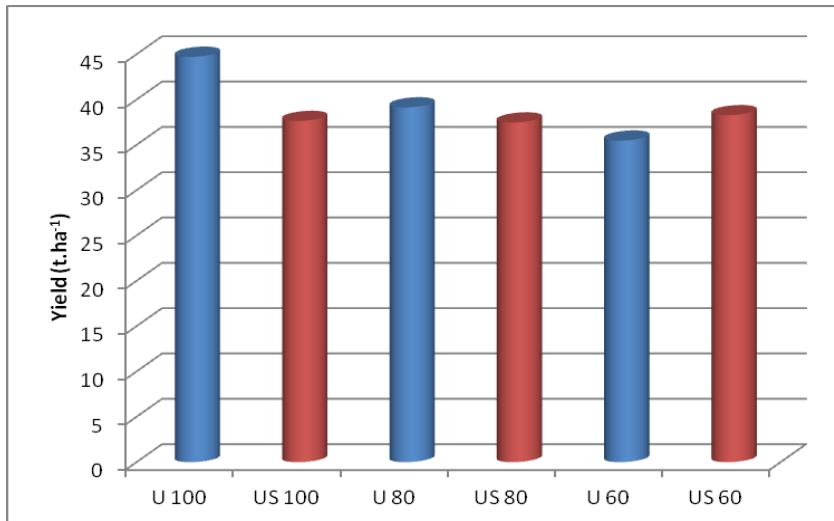
Vzorky pro výnosové a kvalitativní rozborů byly odebrány ve dnech 12.7.2010 (Žabčice) a 6.8.2010 (Valečov). Z každé parcely bylo ručně odkopáno na poli deset trsů, u nichž byl přímo na pokusné stanici proveden rozbor výnosotvorných ukazatelů. Dále byl laboratorně stanoven obsah dusičnanů iontově selektivní elektrodou. (Elektroda podle Petra a Šenkýře (1979) se skládá z kapalných membrán a z elektrodového tělesa. Kapalnou membránu tvoří roztok 2.10-4 M dusičnanu ethylvioleti nebo 10-4 M dusičnanu pyroninu Y v nitrobenzenu nebo jiném nitrovaném aromatickém uhlovodíku). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA 8.0 CZ metodou analýzy variance a následně post – hoc testem – Tukey HSD test.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Z grafu č. 1 je patrné, že pokud hnojíme klasickou močovinou, tak se zvyšujícími se dávkami dusíku roste i výnos. Toto potvrzuje i Diviš a kol. (2005) – narůstající dávka dusíku zvyšuje výnos hlíz. Avšak u močoviny s inhibítorem ureázy tento trend zaznamenaný nebyl. Pokud se zaměříme na varianty hnojení, tak nejlepšího výnosu dosáhla varianta 100 % močoviny, u které byl výnos 44.7 t.ha⁻¹. Tato varianta byla statisticky průkazně vyšší vůči všem ostatním variantám ($P < 0.05$). Naopak nejnižšího výnosu bylo dosaženo u varianty 60 % močoviny a to 35.5 t.ha⁻¹, avšak tato varianta nebyla statisticky průkazně odlišná od všech ostatních variant (mimo 100 % U). Neprůkaznost v ostatních variantách mohlo mít na svědomí počasí. Pokusný ročník 2010 byl z hlediska počasí velmi atypický a to z hlediska úhrnu srážek, kdy na lokalitě Žabčice činil úhrn srážek za vegetační období 478 mm, což je o 128 % více oproti klimatickému normálu a na lokalitě Valečov činil úhrn srážek za vegetační období 695 mm, což je o 144 % více oproti klimatickému normálu.

Z lokalit vyššího výnosu bylo dosaženo na lokalitě Valečov (vysočina) a to 44.7 t.ha⁻¹ oproti Žabčicím (nížina), kde bylo dosaženo výnosu 32.9 t.ha⁻¹. Tento rozdíl ve výnosu mezi lokalitami byl statisticky průkazný ($P < 0.05$). Z odrůd vyššího výnosu dosáhla poloraná odrůda Red Anna (41.7 t.ha⁻¹) oproti odrůdě rané Karin, která dosáhla výnosu jen 35.9 t.ha⁻¹. Rovněž tento rozdíl ve výnosu mezi odrůdami byl statisticky průkazný ($P < 0.05$).

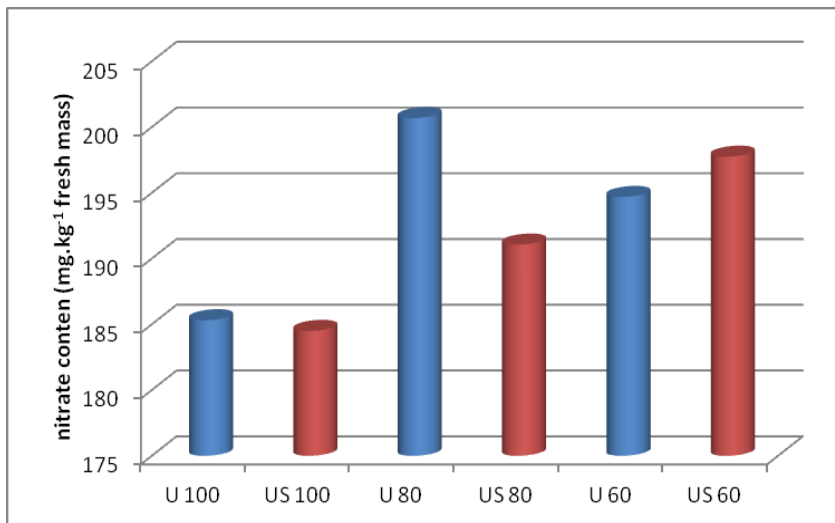
Graf 1: Výnos hlíz – porovnání variant hnojení a odrůd



Z grafu č. 2 je patrné, že nejnižšího obsahu dusičnanů bylo dosaženo u varianty US 100 % a to 184.5 mg.kg⁻¹ fresh mass. Naopak nejvyššího obsahu dusičnanů bylo dosaženo u varianty 80 % klasické močoviny (200.7 mg.kg⁻¹ fresh mass). Mezi variantami hnojení se neprojevila statistická průkaznost ($P>0.05$). [Shahbazi](#) (2009) tvrdí ve své práci, že se zvyšující se dávkou dusíkatých hnojiv se zvyšuje obsah dusičnanů v hlízách, což jsme nepotvrdili (Graf č. 2). Důvodem nepotvrzení tohoto faktu může být, že v našem pokusu jsme zvolili relativně nízké dávky čistého dusíku a tento efekt se neprojevil. Další příčinou může být již zmiňované počasí, které s největší pravděpodobností ovlivnilo náš pokus.

Z lokalit nižšího obsahu dusičnanů bylo dosaženo na lokalitě Žabčice (159.6 mg.kg⁻¹ fresh mass) oproti Valečově, kde bylo dosaženo 225.1 mg.kg⁻¹ fresh mass). Tento rozdíl byl statisticky průkazný ($P<0.05$). Gislason (1984) ve své práci uvádí, že nejvyšší koncentrace dusičnanů v hlízách byla zjištěna v chladnějších oblastech, což se potvrdilo i v našem pokusu, kde Valečov reprezentuje chladnou oblast. Z odrůd nižšího obsahu dusičnanů bylo dosaženo u odrůdy Red Anna (141.9 mg.kg⁻¹ fresh mass oproti odrůdě Karin, kde bylo naměřeno 242.7 mg.kg⁻¹ fresh mass). Ke stejnému závěru dospěl i [Shahbazi](#) (2009), který zjistil, že u odrůd s vysokým výnosem byl nižší obsah dusičnanů. Rozdíl mezi odrůdami v obsahu dusičnanů byl statisticky průkazný ($P<0.05$).

Graf 2: Obsah nitrátů v hlízách



ZÁVĚR

Výnos hlíz byl statisticky průkazně ovlivněn jak variantou hnojení, tak i odrůdou a lokalitou. Z variant hnojení, byla statisticky průkazná pouze varianta 100 % močoviny vůči všem ostatním. Na obsah dusičnanů v hlízách bramboru měla statisticky průkazný vliv lokalita a odrůda u variant hnojení se statistická závislost neukázala protože rozdíly mezi jednotlivými variantami byly minimální.

Vzhledem k tomu, že se jedná pouze výsledky z jednoletých polních pokusů, nelze zatím vyzovovat objektivní závěry. Zejména, když byl pokusný ročník 2010 ovlivněn nadměrným množstvím srážek v průběhu vegetace. Proto tedy bude nezbytné víceleté opakování pokusů, tak aby bylo možno stanovit, zda je z pohledu výnosu a obsahu dusičnanů v bramborových hlízách vhodnější hnojit klasickou močovinou nebo močovinou s inhibitorem ureázy.

LITERATURA

- Diviš J., Švajner J., Bárta J. (2005): Vliv dusíku na výnos průmyslových brambor v roce 2004. *Sborník vědeckých a odborných prací z konference „Hospodaření v méně příznivých oblastech“*, 2. června 2005, Lukavec u Pacova, s. 40.
- Gislason J., Dahle H. K., Baerug R., Roer L., Ronsen K. (1984): Nitrate in potatoes. 1. The effect of fertilization and storage on the nitrate content in 5 genotypes grown in widely separated localities. *Potato Research*, vol. 27, no. 3, p. 331 – 337.
- Mráz J. (2007): Urea Stabil – Efektivní zdroj dusíku pro polní plodiny. *Sborník z konference „Prosperující olejiny“*, 12. – 14.12.2007, s. 121 – 122.
- Roinila P., Vaisanen J., Granstedt A., Kunttu S. (2003): Effect of different organic fertilization practises and mineral fertilization on potato quality. *Biological Agriculture & Horticulture*, vol. 21, no. 2, p. 165 – 194.
- Růžek P., Pišánová J., Kusá H. (2006): Nové dusíkaté hnojivo Urea^{stabil} a jeho uplatnění ve výživě rostlin. *Sborník příspěvků z konference „Nové trendy v používání dusíkatých hnojiv“*, 25. – 26.10. MZLU Brno a VÚRV Praha – Ruzyně, s. 40 – 42.
- Shahbazi K., Tobeh A., Ebadi A., Dehdar B., Mahrooz A., Jamaati-e-Somarin S., Shiri-e-Janagrad M. (2009): Nitrogen Use Efficiency and Nitrate Accumulation in Tubers as Affected by Four Fertilization Levels in Three Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Asian Journal of Biological Sciences*, vol. 2, no. 4, p. 95 – 104.
- Šenkýř J., Petr, J. (1979): Dusičnanová iontově selektivní elektroda. *Chemické listy*, vol. 73, p. 1097
- Vaněk V. et al. (2002): Výživa a hnojení polních a zahradních plodin. 3. Vydání, Praha, s. 91 – 93.
- Westermann D. T., James D. W., Tindall T. A., Hurst R. L. (1994): Nitrogen and potassium fertilization on potatoes – sugars and starch. *American Potato Journal*, vol. 71, no. 7, p. 433 – 453.

THE EFFECT OF SLOW-RELEASE FERTILIZERS ON THE CONTENT OF NITROGEN AND PHOSPHORUS IN ABOVEGROUND PHYTOMASS OF STRAWBERRIES

ÚČINOK POMALY PÔSOBIACICH HNOJÍV NA OBSAH DUSÍKA A
FOSFORU V NADZEMENJ FYTOMASE JAHŔD

Hanková H., Slamka P.

Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: henrieta.hankova@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the article was determined the effect slowly acting fertilizers and classic quickly soluble fertilizer on the content of nitrogen and phosphorus in aboveground biomass of strawberries. The pot experiment was established in a vegetation cage at the Department of Agrochemistry and Plant Nutrition at Faculty of Agrobiolgy and Food Resources of Slovak Agricultural University in spring 2011. There were examined four treatments of fertilization with the same dose of nitrogen (1.65 g per pot): 1st variant not fertilized, 2nd variant fertilized with quickly soluble fertilizer, 3rd and 4th variant fertilized with slowly acting fertilizer. Into experimental pots the mixture of soil and sand was applied in ratio (5:1). The highest cumulative weight of aboveground biomass was achieved in treatment where quickly soluble fertilizer Duslofert Extra was used for fertilization. The content of nitrogen and phosphorus was higher in aboveground biomass strawberries in treatment with slowly acting fertilizer Duslocote with micronutrients in comparison with treatment where quickly soluble fertilizer Duslofert Extra was used. From fertilized treatments was found out the lowest content of N and P in aboveground biomass in treatment with slowly acting fertilizer - urea-formaldehyde condensate.

Key words: nitrogen, phosphorus, strawberries, fertilizers, aboveground biomass

Acknowledgments: This work has been supported by the project VEGA no. 1/0811/10 „The dynamics determination of the dissolution and releasing of nutrients from fertilizer“

ÚVOD

Pomaly pôsobiace hnojivá sú vyrábané za účelom postupného uvoľňovania živín a pokiaľ je to možné svojím zložením a pomerom živín vyhovujú základným požiadavkám rastlín. Mnoho pomaly pôsobiacich hnojív bolo vyvinutých v posledných desaťročiach (WU – LIU – LIANG, 2008). Pojmy pomaly pôsobiace hnojivá (SRF – slow release fertilizer) a kontrolované pôsobiace hnojivá (CRF – controlled release fertilizer) sa často používajú ako synonymá, ale technicky sa rozlišujú rôznymi materiálmi hnojiva (JAIN, 2007). Kontrolované pôsobiace hnojivá – CRF sú všeobecne produkty obaľované polymérom alebo sírou prípadne ich kombináciou (MALVEDA et al. 2008). Polymérom obaľované hnojivá (PCF – polymer-coated fertilizer) predstavujú najtechnickejšiu triedu medzi CRF hnojivami. Tieto hnojivá poskytujú pomalšie a postupnejšie uvoľňovanie živín s intenzitou uvoľňovania od 3 mesiacov až približne do 2 rokov. PCF hnojivá môžu byť zmiešané tak, by poskytovali rovnováhu všetkých makro- a mikroživín (JACOBS, 2005; SARTAIN, 2010). Dusík rastliny potrebujú na tvorbu asimilačných orgánov – listov a fytomasy. Je základným biogénnym prvkom, ktorý najintenzívnejšie zasahuje do životných procesov rastlín. Fosfor je potrebný pre rast koreňov, kvetov a semien. V rastlinách má výrazné postavenie v prenose energie, a zvýšené nároky na jeho obsah majú kvetové a plodové rastliny (HABÁN, 2007). Jahody patria medzi najskôr dozrievajúce druhy ovocia, a sú jednou z najúrodnejších ovocnín. Sú obľúbeným ovocím pre vynikajúcu chuť a arómu, ale taktiež obsahujú aj veľa dôležitých látok, ktoré sú nepostrádateľné pre ľudské zdravie (PEVNÁ, 1989). Aplikácia hnojív vychádza zo skutočnosti, že jahody sú viacročné rastliny a zostávajú na stanovišti 2 – 3 roky. Keďže pľtka zakoreňuje a majú slabšiu schopnosť osvojovať si živiny, spôsob zabezpečovania výživy a hnojenia rozdeľujeme na hnojenie pred výsadbou a hnojenie po výsadbe (LOŽEK et al. 2000; VANĚK, 2007).

MATERIÁL A METODIKA

Nádobový pokus s jahodou obyčajnou (*Fragaria vesca L.*) bol založený na jar v roku 2011 (31. 3. 2011) vo vegetačnej kletke KAVR FAPZ SPU v Nitre. Priemerná ročná teplota výskumnej oblasti v roku 2011 bola počas vegetácie 16,6°C s priemerným ročným úhrnom zrážok 68,2 mm. Pôda do pokusných nádob bola privezená zo stanovišťa Dolná Malanta, okres Nitra. Pôdny profil v tejto oblasti je tvorený hnedozemou. Do pokusných nádob o objeme 12 litrov bola použitá preosiata pôda zmiešaná s pieskom v pomere 5:1. Agrochemické charakteristiky pôdy a jej zmesi s pieskom sú uvedené v tabuľke 1. Použitá zmes pôdy a piesku sa vyznačovala nízkou až strednou zásobou minerálneho dusíka a veľmi nízkym obsahom fosforu. Obsah draslíka bol vyhovujúci, horčíka vysoký, vápnika a síry veľmi nízky. Pôda bola kyslá s nízkym obsahom humusu.

Tab. 1 Agrochemická charakteristika pôdy a zmesi nádobového pokusu v roku 2011

Vzorka	Obsah makroživín (mg.kg ⁻¹ pôdy)						pH _{KCl}	% humusu
	N _{an}	P	K	S	Ca	Mg		
pôda	12,40	51,25	245,00	2,50	755,00	377,50	5,11	2,21
zmes	10,10	32,50	150,00	0,00	485,00	265,00	5,28	1,19

V pokuse bola použitá odroda jahody obyčajnej „Darselect“, ktorá sa vyznačuje extra veľkými plodmi, výbornou chuťou a odolnosťou voči plesni sivej a hubovým chorobám koreňov. Jahody boli hnojené hnojivami: Duslofert Extra - rýchlo rozpustné granulované hnojivo, Duslocote s mikroživinami – pomaly rozpustné granulované hnojivo a močovino-formaldehydový kondenzát – pomaly rozpustné hnojivo vo forme peliet. V pokuse boli sledované 4 varianty hnojenia s rovnakou dávkou dusíka (1,65 g) na nádobu:

1. **variant (K)** – kontrolný variant nehnojený
2. **variant (DE)** – hnojený hnojivom Duslofert Extra 14-10-20(+7S) v dávke 11,79 g hnojiva/nádoba
3. **variant (DCm)** – hnojený hnojivom Duslocote s mikroživinami 13-9-18(+6S) + (B, Cu, Mn, Mo, Zn) v dávke 12,69 g hnojiva/nádoba
4. **variant (MF)** – hnojený močovino-formaldehydovým kondenzátom 13-10-14(+8,6S) v dávke 12,69 g hnojiva/nádoba

Každý variant obsahoval 7 nádob, z ktorých sa v približne mesačných intervaloch postupne odoberali vzorky pôdy, koreňov a nadzemnej fytomasy, a to v nasledovných termínoch: 9.5. 2011, 3.6. 2011, 4.7. 2011, 1.8. 2011, 5.9. 2011 a 4.10. 2011.

Odber rastlinného materiálu bol uskutočnený jednoduchým vybratím celej rastliny z pôdy spolu s koreňovým systémom. Po vymytí koreňov bola rastlina rozdelená na nadzemnú a koreňovú časť a ich hmotnosť zistená vážením. Nadzemná fytomasa bola vysušená pri teplote 105 °C na konštantnú hmotnosť a zhomogenizovaná. Po ukončení odberov sme stanovili kumulatívnu hmotnosť čerstvej nadzemnej fytomasy, a to sčítaním jednotlivých hmotností zo všetkých odberov. V sušine nadzemnej fytomasy bol Kjeldahlovou metódou stanovený obsah celkového dusíka N_t a obsah fosforu bol stanovený po mineralizácii mokrou cestou kolorimetricky ako fosfomolybdénová modrá.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci hodnotenia obsahu vybraných živín v nadzemnej fytomase jahôd bola vypočítaná kumulatívna hmotnosť nadzemnej fytomasy (tab. 2), ktorá bola najvyššia na variante hnojenom

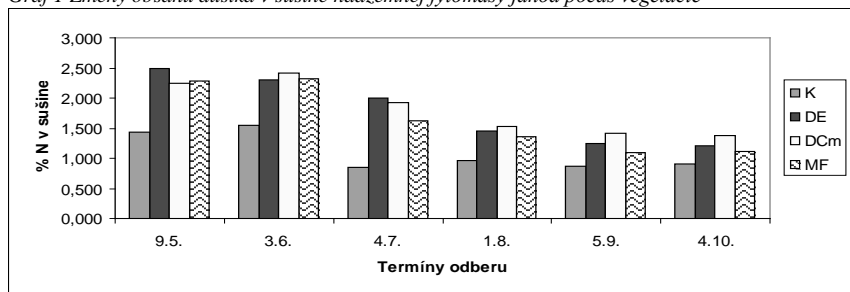
rýchlo rozpustným hnojivom DE (1453 g/variant). Na variantoch s pomaly pôsobiacimi hnojivami boli dosiahnuté nižšie hodnoty kumulatívnej hmotnosti nadzemnej fytomasy v porovnaní s DE variantom. Pokles predstavoval 9% (DCm) a 4% (MF). 4

Tab.2 Kumulatívna hmotnosť nadzemnej fytomasy jahôd (g/variant)

Variant	Hmotnosť (g)	Relatívne ku K (%)	Relatívne k DE (%)
K	612,34	100	42
DE	1453,45	237	100
DCm	1325,11	216	91
MF	1402,33	229	96

Zmeny obsahu dusíka v sušine nadzemnej fytomasy jahôd počas vegetačnej doby znázorňuje graf 1. Z neho vyplýva, že saturácia nadzemných pletív jahôd bola na nehnojenom variante najnižšia, kde sa koncentrácia N v sušine pohybovala v intervale 0,9-1,5%, ale prevažne na úrovni 0,9%. Na všetkých hnojených variantoch bola koncentrácia dusíka v sušine vyššia a kolísala v intervale 1,1-2,5%, priemerne okolo 1,7% N v sušine. Na variante hnojenom pomaly pôsobiacim hnojivom Dcm bola najvyššia koncentrácia N v sušine nadzemnej hmoty v druhej polovici vegetačnej doby. Na všetkých hnojených variantoch dochádzalo v dôsledku rastu rastlín k zriedovaciemu efektu, ktorý spôsobil pokles obsahu dusíka v sušine nadzemnej hmoty v priebehu vegetačnej doby jahôd.

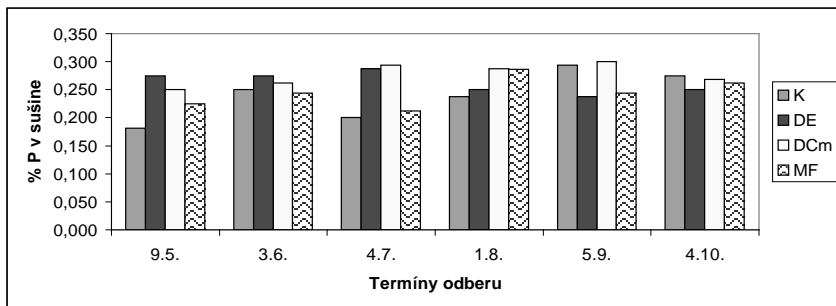
Graf 1 Zmeny obsahu dusíka v sušine nadzemnej fytomasy jahôd počas vegetácie



Pri fosfore (graf 2) boli najstabilnejšie hodnoty jeho obsahu v sušine nadzemnej fytomasy zistené na variante hnojenom DCm dosahujúce v 2. polovici vegetácie. Hodnoty sa pohybovali na úrovni 0,27-0,30%. Rýchlo rozpustné hnojivo Duslofert Extra zvyšovalo obsah fosforu skôr v 1. polovici vegetácie (0,27-0,29) a v 2. polovici vegetácie došlo k jeho zníženiu na tomto variante na úroveň 0,24-0,25%. Relatívne nižšie obsahy fosforu v sušine nadzemnej fytomasy počas vegetácie boli namerané na variante hnojenom močovino-formaldehydovým kondenzátom. V prípade fosforu na

rozdiel od dusíka nebol jeho obsah v sušine nadzemnej fytomasy ovplyvnený zriedčovacím efektom. Obsah fosforu v sušine bol počas celej doby vegetácie vyrovnannejší a dochádzalo k jeho pozvoľnému zvyšovaniu v porovnaní s obsahom dusíka v sušine.

Graf 2 Zmeny obsahu fosforu v sušine nadzemnej fytomasy jahôd počas vegetácie



Priemerný obsah v nadzemnej sušine rastlín oboch skúmaných živín je znázornený v tabuľke 3. Z nej vidno, že hnojenie výrazne zvyšovalo obsah dusíka v sušine približne o 50 – 65 % oproti nehnojenej kontrole. Najvyšší obsah dusíka bol stanovený na variante, kde bolo použité hnojivo Duslocote s mikroživinami (1,815%), čo v porovnaní s variantom hnojeným rýchlorozpuštným hnojivom DE predstavuje zvýšenie o 3,29 %. Najnižší obsah sme zaznamenali pri močovino-formaldehydovom kondenzáte. Rovnako ako pri dusíku aj pri fosfore bol najvyšší priemerný obsah P v sušine nadzemnej fytomasy jahôd zistený na variante, ktorý bol hnojený hnojivom DCm. V porovnaní s kontrolným variantom to predstavuje 15,42 % zvýšenie a v porovnaní s DE variantom 5,84 % zvýšenie. No a opäť najnižší obsah fosforu rovnako ako pri dusíku bol nameraný na variante s močovino-formaldehydovým kondenzátom (0,246 %), čo v porovnaní s kontrolným variantom je len 2,5 % zvýšenie.

Tab.3 Obsah dusíka a fosforu v sušine nadzemnej fytomasy jahôd (priemer termínov odberu)

Variant	Obsah v sušine (%)		Relatívne ku K (%)	
	Dusík	Fosfor	Dusík	Fosfor
K	1,094	0,24	100	100
DE	1,779	0,263	162,61	109,58
DCm	1,815	0,277	165,90	115,42
MF	1,631	0,246	149,09	102,50

ZÁVĚR

Z dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že aplikácia skúmaných hnojív zvyšovala tvorbu nadzemnej fytomasy jahôd, ako aj obsah dusíka a fosforu v sušine v porovnaní s kontrolným nehnojeným variantom. Najviac nadzemnej fytomasy sa počas vegetácie vytvorilo na variante kde bolo použité klasické rýchlo rozpustné hnojivo Duslofert Extra-DE (1453,45 g). Na variantoch s

aplikáciou pomaly pôsobiacich hnojív sa vytváralo menej nadzemnej fytomasy, a to o 9 % na variante s hnojivom Duslocote s obsah mikroživín-DCm a o 4 % na variante s močovino-formaldehydovým kondenzátom-MF. Najväčší vplyv na obsah dusíka v sušine nadzemnej fytomasy v rámci hnojených variantov jahôd bol zaznamenaný na variante s obalovaným hnojivom Duslocote s mikroživinami (1,815%). Najnižší obsah bol zistený na variante s aplikáciou močovino-formaldehydového kondenzátu (1,631%). Rozdiel medzi pomaly pôsobiacimi hnojivami(DCm a MF) predstavuje 16,81 %. Rovnaká situácia bola aj pri fosfore kde sa na variante s hnojivom DCm zisťoval najvyšší obsah fosforu (0,277%) a na MF variante najnižší obsah (0,246%) v sušine nadzemnej fytomasy jahôd. Aplikácia rýchlo rozpustného hnojiva DE zabezpečila v porovnaní s MF variantom vyšší obsah dusíka (o 13,52%) aj fosforu (o 7,08%) v sušine nadzemnej fytomasy, ale pri porovnaní s variantom DCm bol obsah dusíka i fosforu nižší (o 3,29% N a o 5,84% P). Spomedzi testovaných hnojív najlepšie výsledky skúmaných parametrov dosiahlo obalované pomaly pôsobiace hnojivo Duslocote s mikroživinami.

LITERATURA

HABÁN, M. 2007. Miniatlaz liečivých rastlín 72. Ružovité (Rosacea). In *Liečivé rastliny*, roč. 44, 2007, č. 5, s. 4. ISSN 0323-2646.

JACOBS F.D. 2005. Variation in Nutrient Release of Polymer-Coated Fertilizers [online]. 2005, [cit. 2011-08-25]. Dostupné na internete: <http://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_p035/rmrs_p035_113_118.pdf>

JAIN, K. S. et al. 2007. Controlled Release Fertilizers: Trends and Technologies. In *Pharmaceutical Reviews* [online]. 2007, vol. 5, no. 1 [cit. 2010-10-15]. Dostupné na internete: <<http://www.pharmainfo.net/reviews/controlled-release-fertilizers-trends-and-technologies>>. ISSN 1918-5561

LOŽEK, O. et al. 2000. *Hnojenie záhradných plodín*. Nitra : SPU, 2000. 114 s. ISBN 80-7137-735-X

MALVEDA, M. et. Al. 2008. *Controlled and slow release fertilizers* [online]. 2010, [cit. 2010-10-23]. Dostupné na internete: <<http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/535.8000/>>

PEVNÁ, V. et al. 1989. *Záhradníctvo : zeleninárstvo, ovocinárstvo, vinohradníctvo*. 3. preprac. a dopln. vyd. Bratislava : Príroda, 1989. 622 s. ISBN 80-07-00039-9.

SARTAIN, B. J. 2010. *Food for turf: Slow-release nitrogen* [online]. 2010, [cit. 2010-10-23]. Dostupné na internete: <http://www.grounds-mag.com/mag/grounds_maintenance_food_turf_slowrelease/>

VANĚK, V. et al. 2007. *Výživa polních a záhradných plodín*. Praha : Profi Press, 2007. 176 s. ISBN 976-80-86726-25-0

WU, L. – LIU, M. – LIANG, R. 2008. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention. In *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, no. 3, p. 547-554. ISSN 1381-5148.

EVALUATION OF CURRENT WEED INFESTATION ON LAND OF MAIZE IN SELECTED FARM

VYHODNOCENÍ AKTUÁLNÍHO ZAPLEVELENÍ KUKUŘICE SETÉ NA POZEMKU VYBRANÉHO ZEMĚDĚLSKÉHO PODNIKU

Chovancová S., Winkler J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: chovancova.svetlana@seznam.cz

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate current weed infestation on land of maize. Evaluation was carried out counting methods in the year 2010. RDA method was used for evaluation of obtained results. *Galium aparine* and *Echinochloa crus-gali* were the most often weed species in maize. While *Galium aparine* significantly harmed in other field crop that year as well. In assessing of harmfulness based on crop equivalents were seen as the most damaging species *Echinochloa crus-gali* and *Triticum aestivum*.

Key words: maize, weeds, harmfulness

Acknowledgments: The results in paper are output of project of Internal Grant Agency, AF MENDELU, No. TP 9/2012 “Innovation of crop management practices in areas threatened by drought”.

ÚVOD

Ochrana kulturních rostlin proti plevelům se stále řadí k nejdůležitějším pěstitelským úkonům zemědělské výroby. Dodnes jsou plevele nejvážnějším škodlivým činitelem výrazně snižujícím kvalitu i kvantitu plodin na zemědělských plochách (Hron, Kohout, 1988).

Škodlivost plevelných rostlin, jak uvádí Dvořák a Smutný (2003), se od ostatních škodlivých organismů liší. Na rozdíl od chorob a živočišných škůdců, které plodiny přímo napadají a mají devastující účinky, plevelné rostliny, s výjimkou poloparazitických a parazitických druhů, kulturu přímo nepoškozují. Stávají se škodlivými zhoršováním životního prostředí plodin, odčerpáváním vegetačních faktorů, popřípadě ovlivněním půdních podmínek. Z těchto důvodů agrotechnika a způsob pěstování plodin výrazně ovlivňují reakci plevelu.

Mikulka a Kneifelová (2005) uvádějí, že přezimující plevelné druhy (*Galium aparine*, *Matricaria inodora*, *Viola arvensis* atd.) převládají v osevních postupech s vysokým zastoupením ozimů, a k přemnožení pozdních jarních plevelů (*Echinochloa crus-gali*, *Chenopodium*, *Stellaria* atd.) dochází po určité době na pozemcích s častým pěstováním cukrové řepy, kukuřice, zeleniny a brambor.

Podle Váňové a Klema (1997) je stanovení prahu škodlivosti plevelů ztěžováno řadou faktorů. Snahou je, najít způsob stanovení hodnot tak, aby bylo možné posoudit ekonomickou návratnost použitých plevelohubných opatření.

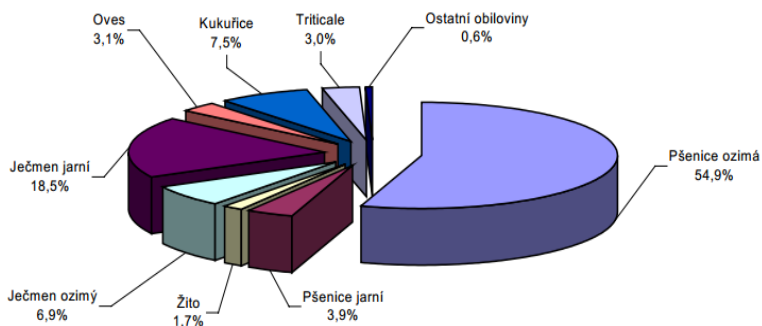
Nemalé problémy způsobují i zaplevelující rostliny, které za přítomnosti mohou mít jen nepatrný význam, nebo být naopak velmi škodlivé. Vyskytují se za předpokladu nekvalitní likvidace předplodiny a ztrátami ze sklizně. Podobné potíže mohou zapříčinit i některé léčivé rostliny, produkující semena se značnou dormancí. V posledních letech je to např. *Silybum marianum*, uvádí Kostelanský (1997).

Důsledkem ekonomické situace a zvyšující se poptávky po lukrativních zemědělských komoditách se setkáváme s tím, že ani obecné zásady sestavování osevních postupů na orné půdě nejsou u většiny zemědělských pěstitelů zachovávány. Příčinou je snižující se druhové spektrum pěstovaných plodin ve prospěch tržních, jakými jsou kupř. obilniny, řepka ozimá, slunečnice. Ustupuje pěstování víceletých pícnin a neméně významný je i pokles pěstebních ploch luskovin a brambor (Mikulka, Kneifelová, 2005).

Jak uvádějí Vach a Javůrek (2008), jedním z nejvýznamnějších faktorů úspěšného hospodaření, je účelná skladba plodin zemědělského podniku, která přispívá k efektivnímu využití potenciálu stanoviště a agrotechnických opatření. Nutno říci, že ani volba výkonných odrůd a intenzivního

hnojení nezajistí předpokládané výnosy a dobrý ekonomický výsledek podniku, při nevhodně zvolené struktuře pěstovaných plodin. Současné podstatné změny ve způsobu hospodaření, a to odklonem od chovu hospodářských zvířat a specializací na pěstování lukrativních tržních plodin (struktura osevu obilovin, Obr. 1), vedou k zanedbávání ekologických hledisek, a tím k ohrožení biologické vyváženosti zastoupení plodin na orné půdě.

Obr. 1 Struktura osevu obilovin v roce 2011 (ČSÚ, 2011)



S mírou rozvoje zemědělství narůstá i význam chemické metody ochrany rostlin. To však neznamená, že zbylé postupy by být používány neměly. Nejlepšího ekonomického i produkčního efektu, a relativně nízkého ohrožení životního prostředí je dosaženo kombinací všech metod ochrany rostlin (Klepacki, 1997).

Podle Juráška (1997) celý proces ochrany rostlin, včetně agrotechnických prvků prošel značným vývojem. Původní monotónnost se stále více rozvíjí v závislosti na přírodních a ekonomických podmínkách. Nicméně i tyto nové cesty mohou přicházet do konfliktu se současnými metodami pěstování plodin. Proto se každá z dalších změn musí starostlivě zvážit a komplexně řešit.

Dle Vacha a Javůrka (2008), pro dosahování dobrých výsledků v zemědělské oblasti podnikání, je nutné respektovat skutečnost, že pěstování polních plodin je především biologickým procesem. S tím spojené přizpůsobení hospodaření ekologickým hlediskům, což přispívá nejen k vyšší ekonomické efektivnosti zemědělských podniků, ale i ochraně životního prostředí a stabilitě agroekosystému.

MATERIÁL A METODIKA

Zemědělský podnik, ve kterém jsem získala údaje pro vyhodnocení výsledků z polních plodin, se nachází v obci Skalice. Tato vesnice se nachází v blízkosti města Znojma v kraji Jihomoravském. Ze severu je obtékána řekou Rokytná, z jihu pak říčkou Jevišovka. Celé pěstební území je situováno v nížinách Dyjskosvrateckého úvalu. Nadmořská výška daného okolí je 230 m n. m. Průměrná roční teplota zde dosahuje 8,5°C a roční úhm srážek je 470 mm.

Soukromý statek Bazal, Skalice byl založen roku 1992 a od té doby prošel velkým pozemkovým i technologickým vývojem. Od počátku podnikatelské činnosti se zabýval rostlinnou i živočišnou výrobou. V roce 2000 od živočišné výroby upustil a věnuje se pouze pěstování kulturních rostlin. Na nyníšších 305 ha obdělávané půdy se pěstuje převážně pšenice, řepka a kukuřice.

Zaplevelení ve vybrané polní plodině, kukuřici seté, bylo vyhodnoceno početní metodou. Při každém sledování byly sečteny jedinci každého druhu plevelu. Sledování počtu plevelných rostlin bylo provedeno na 1 m² a mělo 12 opakování. Jednotlivá opakování byla rovnoměrně rozmístěna na vybraném pozemku, v typickém místě porostu, tak aby reprezentovala míru zaplevelení. Pozorování bylo provedeno v roce 2010.

České a latinské názvy jednotlivých druhů plevelů byly použity podle Kubáta (Kubát, 2002).

U každého nalezeného druhu plevelu byl stanoven plodinový ekvivalent (pq) podle Váňové a Klema (1997). U druhů, které neměly tento ekvivalent určen, byl odhadnut na základě podobnosti s příbuznými druhy nebo podle skupiny škodlivosti. Přehled plodinových ekvivalentů jednotlivých druhů uvádí Tab. 1.

Tab. 1 Přehled plodinových ekvivalentů jednotlivých druhů plevelů (Váňová, Klem, 1997)

Druh plevelu	pq	Druh plevelu	pq	Druh plevelu	pq
<i>Achillea millefolium</i>	0.4*	<i>Echinochloa crus-galli</i>	1.32*	<i>Polygonum aviculare</i>	0.45*
<i>Alopecurus myosuroides</i>	0.46*	<i>Elytrigia repens</i>	2*	<i>Silybum marianum</i>	1*
<i>Apera spica-venti</i>	0.46	<i>Erodium cicutarium</i>	0.2*	<i>Sinapis arvensis</i>	0.75*
<i>Atriplex patula</i>	0.75*	<i>Euphorbia helioscopia</i>	0.2*	<i>Thlaspi arvense</i>	0.13*
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0.13	<i>Fallopia convolvulus</i>	0.75*	<i>Tripleurospermum inodorum</i>	0.75
<i>Cardaria draba</i>	1	<i>Galium aparine</i>	0.77	<i>Triticum aestivum</i>	1*
<i>Carduus acanthoides</i>	1*	<i>Lamium amplexicaule</i>	0.2	<i>Veronica hederifolia</i>	0.24
<i>Cirsium arvense</i>	2	<i>Lamium purpureum</i>	0.2	<i>Veronica persica</i>	0.24
<i>Consolida orientalis</i>	0.75*	<i>Papaver rhoeas</i>	1.1	<i>Viola arvensis</i>	0.13

*odhadnutý plodinový ekvivalent (pq)

U každého místa stanovení plevelů byly vypočteny plevelné jednotky. Jejich pomocí můžeme charakterizovat a kvantifikovat škodlivost plevelů. Výpočet byl proveden dle vzorce:

$$PJ = \Sigma \text{všech druhů} (pq \cdot ks)$$

PJ – počet plevelných jednotek na plochu

pq – plodinový ekvivalent

ks – počet kusů určitého druhu ($ks \cdot m^{-2}$)

Pokles výnosu ozimé pšenice v závislosti na jedné plevelné jednotce se pohybuje v rozmezí 10 – 90 $kg \cdot ha^{-1}$, k dalším výpočtům byla použita hodnota 50 $kg \cdot ha^{-1}$. Výnos byl přepočten na obilninu jednotky (OJ), aby bylo možné porovnat i jiné plodiny.

Ke zjištění vlivu plodiny a ročníku byly výsledky zaplevelení zpracovány mnohorozměrnými analýzami ekologických dat. Výběr optimální analýzy se řídil délkou gradientu (*Lengths of Gradient*), zjištěného segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*). Dále byla použita kanonická korespondenční analýza CCA (*Canonical Correspondence Analysis*). Při testování průkaznosti pomocí testu Monte-Carlo bylo propočítáno 499 permutací. Data byla zpracována pomocí počítačového programu Canoco 4.0. (Ter Braak, 1998).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vyhodnocení zaplevelení bylo provedeno v kukuřici seté (*Zea mays*), která byla pěstována na ploše 11ha, odrůdy NK SYMBIA H. Počty plevelů v pěstované plodině jsou aktuální k roku 2010 a zaznamenány v Tab. 2 a Tab. 3

Tab. 2 Počet plevelů v opakováních 1-6, kukuřice setá 2010

Latinský název	Český název	Opakování ($ks \cdot m^{-2}$)					
		1	2	3	4	5	6
<i>Echinochloa crus-gali</i>	Ježatka kuří noha	1				1	
<i>Fallopia convolvulus</i>	Opletka obecná			1			1
<i>Triticum aestivum</i>	Pšenice setá		1	1	2		
<i>Galium aparine</i>	Švível přítula	2	3	1		1	
Celkový počet plevelů		3	4	3	2	2	1

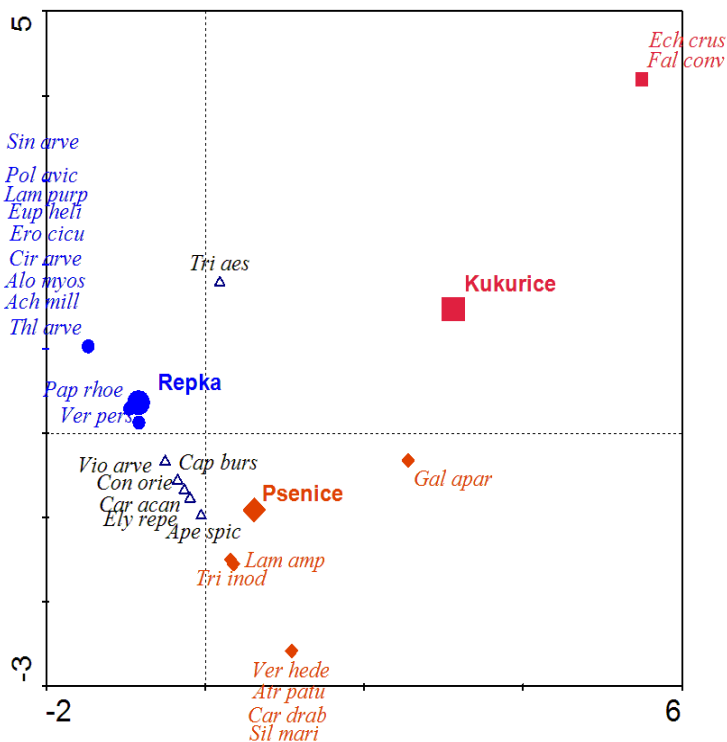
Tab. 3 Počet plevelů v opakovaných 7-12, kukuřice setá 2010

Latinský název	Český název	Opakování (ks.m ⁻²)					
		7	8	9	10	11	12
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Ježatka kuří noha	1		1	1	1	
<i>Fallopia convolvulus</i>	Opletka obecná		1			1	
<i>Triticum aestivum</i>	Pšenice setá					1	
<i>Galium aparine</i>	Svízel přítula	1		2	3	1	2
Celkový počet plevelů		2	1	3	4	4	2

Společně s kukuřicí setou, statistickému zpracování výsledků zaplevelení v rámci pozorování, podléhaly i pozemky s jinými kulturními rostlinami, jako pšenice ozimá a řepka ozimá. Nejprve byla vypočtena délka gradientu (*Lengths of Gradient*) pomocí analýzy DCA, která činila 8,243. Na základě tohoto výpočtu byla k dalšímu zpracování zvolena kanonická korespondenční analýza CCA. Analýza CCA vymezuje prostorové uspořádání jednotlivých druhů plevelů a variant faktorů, a to na základě dat, která byla o frekvenci výskytu plevelných druhů zjištěna. Toto je následně graficky vyjádřeno pomocí ordinačního diagramu. Druhy plevelů a plodiny jsou zobrazeny body odlišného tvaru a barvy.

Výsledky analýzy CCA, která hodnotila vliv plodiny na výskyt plevelů je signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,002$, pro všechny kanonické osy. Na základě analýzy CCA (Obr. 2) je možné nalezené druhy plevelů rozdělit do 4 skupin. První skupina plevelů se vyskytovala především v ozimé pšenici a jsou to druhy: *Atriplex patula*, *Cardaria draba*, *Galium aparine*, *Lamium amplexicaule*, *Silybum marianum*, *Tripleurospermum inodorum*, *Veronica hederifolia*. Druhá skupina vyskytující se v řepce ozimé: *Achillea millefolium*, *Alopecurus myosuroides*, *Cirsium arvense*, *Erodium cicutarium*, *Euphorbia helioscopia*, *Lamium purpureum*, *Papaver rhoeas*, *Polygonum aviculare*, *Sinapis arvensis*, *Thlaspi arvense*, *Veronica persica*. Zástupci třetí skupiny, vyskytující se pouze v kukuřici seté *Echinochloa crus-galli* a *Fallopia convolvulus*. Čtvrtou skupinu tvoří plevelné druhy, které se vyskytovaly v řepce a pšenici, nikoli v kukuřici; *Apera spica-venti*, *Capsella bursa-pastoris*, *Carduus acanthoides*, *Consolida orientalis*, *Elytrigia repens* a *Viola arvensis*.

Obr. 2 Ordinační diagram vyjadřující zastoupení jednotlivých plevelů v porostech vybraných plodin



Vysvětlivky k ordinačnímu diagramu: **Psenice** – ozimá pšenice (*Triticum aestivum*), **Repka** – ozimá řepka (*Brassica napus*), **Kukurice** – kukuřice setá (*Zea mays*)

Zkratky vybraných druhů: *Achillea millefolium* – Ach mill, *Alopecurus myosuroides* – Alo myos, *Apera spica-venti* – Ape spic, *Atriplex patula* – Atr patu, *Capsella bursa-pastoris* – Cap burs, *Cardaria draba* – Car drab, *Carduus acanthoides* – Car acan, *Cirsium arvense* – Cir arve, *Consolida orientalis* – Con orie, *Echinochloa crus-gali* – Ech crus, *Elytrigia repens* – Ely repe, *Erodium cicutarium* – Ero cicu, *Euphorbia helioscopia* – Eup heli, *Fallopia convolvulus* – Fal onv, *Galium aparine* – Gal apar, *Lamium amplexicaule* – Lam ampl, *Lamium purpureum* – Lam purp, *Papaver rhoeas* – Pap rhoe, *Polygonum aviculare* – Pol avic, *Silybum marianum* – Sil mari, *Sinapsis arvensis* – Sin arve, *Thlaspi arvense* – Thl arve, *Tripleurospermum inodorum* – Tri inod, *Triticum aestivum* – Tri aes, *Veronica hederifolia* – Ver hede, *Veronica persica* – Ver pers, *Viola arvensis* – Vio arve.

Na pozemku kukuřice seté byli zjištěni zástupci plevelů *Echinochloa crus-gali*, *Fallopia convolvulus*, *Galium aparine* a výdrol *Triticum aestivum*. Nejčastěji vyskytujícím se druhem byl *Galium aparine*. Míra zaplevelení kukuřice byla nejnižší ze sledovaných plodin a činila 2,58 ks.m⁻². K velmi často se vyskytujícím druhům patřil *Galium aparine*, který zapleveloval všechny plodiny, výrazněji pak obiloviny. Tento druh řadí Dvořák (1998) k velmi nebezpečným druhům plevelů. Winkler et al. (2011) uvádí, že s vyšším podílem obilnin ve struktuře plodin stoupá podíl obtížně regulovatelných druhů, jako je právě *Galium aparine*. To může být jednou z příčin intenzivního zastoupení tohoto druhu, protože sledovaný podnik je silně zaměřen na pěstování obilnin.

Na základě metodiky Váňové a Klema (1997) byly stanoveny plodinové ekvivalenty u každého nalezeného druhu, jejichž pomocí můžeme charakterizovat a kvantifikovat škodlivost plevelů. Z Tab. 1 vybíráme 3 druhy s nejvyšším plodinovým ekvivalentem *Cirsium arvense*, *Elytrigia repens*, *Echinochloa crus-gali*. Stanovení škodlivosti zaplevelení bylo provedeno pomocí plevelných jednotek. Průměrný počet plevelných jednotek byl u kukuřice seté 2,3 PJ.m⁻². Výpočet ztráty výnosu plodiny vlivem škodlivosti plevelů byl vynásobený reálnou výkupní cenou plodiny, a tím jsme získali hodnotu ztráty v Kč. Od této částky byl odečten reálný náklad spojený s aplikací herbicidů. Zjištěný rozdíl nám vyjádřil ekonomickou efektivitu herbicidního ošetření proti plevelům. Pokud vycházely hodnoty rozdílu kladné, znamená to, že náklady na aplikaci herbicidů byly menší, než potenciální ztráta způsobená plevele. V takovém případě považujeme aplikaci za efektivní. Ovšem, pokud byla ztráta způsobená plevele nižší než náklady na aplikaci herbicidů, můžeme hovořit o neefektivním zásahu. Ve sledované obilnině v roce 2010, kukuřici seté, bylo dosaženo z hlediska průměrných hodnot nejnižší efektivnosti užití herbicidů s průměrem hodnot -671,22 Kč. Všechny rozdíly nabyly záporných hodnot s maximem -1094,50 Kč (viz.Tab.4).

Tab. 4 Plevelné jednotky a ekonomické odvození potenciální škodlivosti plevelů v kukuřici seté, rok 2010

Opakování (Kukuřice 2010)	Plevelné jednotky (PJ.m ⁻²)	Ztráta na výnosu (kg.ha ⁻¹)	Ztráta OJ (t.ha ⁻¹)	Cena (Kč.r ⁻¹)	Ztráta (Kč.ha ⁻¹)	Náklad na herbicidy (Kč.ha ⁻¹)	Rozdíl (Kč.ha ⁻¹)
1	2.86	143.00	0.14	5280.00	755.04	1292.50	-537.46
2	3.31	165.50	0.17	5280.00	873.84	1292.50	-418.66
3	2.52	126.00	0.13	5280.00	665.28	1292.50	-627.22
4	2.00	100.00	0.10	5280.00	528.00	1292.50	-764.50
5	2.09	104.50	0.10	5280.00	551.76	1292.50	-740.74
6	0.75	37.50	0.04	5280.00	198.00	1292.50	-1094.50
7	2.09	104.50	0.10	5280.00	551.76	1292.50	-740.74
8	0.75	37.50	0.04	5280.00	198.00	1292.50	-1094.50
9	2.86	143.00	0.14	5280.00	755.04	1292.50	-537.46
10	3.63	181.50	0.18	5280.00	958.32	1292.50	-334.18
11	3.84	192.00	0.19	5280.00	1013.76	1292.50	-278.74
12	1.54	77.00	0.08	5280.00	406.56	1292.50	-885.94
Průměr	2.35	117.67	0.24	5280.00	621.28	1292.50	-671.22

Je nutné si uvědomit, že získané výsledky ekonomické efektivity a kalkulace škodlivosti udávají pouze vzorové výpočty, založené na určitých předpokladech. Avšak i tyto považujeme za velmi cenné a přínosné, zejména v případě plošné aplikace herbicidů, která nereaguje na aktuální stav zaplevelení pozemku, a tím se stává neefektivní a ohrožující životní prostředí.

ZÁVĚR

Na sledovaném pozemku kukuřice seté se vyskytovaly plevelné druhy *Echinochloa crus-gali*, *Fallopia convolvulus*, *Galium aparine*, *Triticum aestivum*. Vysokých hodnot plodninových ekvivalentů dosahují druhy *Galium aparine* a *Echinochloa crus-gali*.

Ty byly stanoveny na základě metodiky Váňové a Klema (1997). Jejich pomocí můžeme charakterizovat a kvantifikovat škodlivost plevelů. Plodninové ekvivalenty jsou odvozovány z poklesu výnosu ozimé pšenice v závislosti na jedné plevelné jednotce, což může vést k nepřesnostem ve výsledcích pokud je použijeme v jiné plodině.

Je zřejmé, že např. druh *Echinochloa crus-gali*, bude mít jinou míru škodlivosti v kukuřici a jinou právě v ozimé pšenici. Stanovení plodninových ekvivalentů pro každou plodinu, by vedlo k přesnějšimu, konkrétnějšimu vyjádření hospodářské škodlivosti plevelů.

Získané výsledky, kalkulace škodlivosti a ekonomické efektivity jsou pouze modelovými výpočty, založené na určitých předpokladech, ovšem i tyto výsledky ukazují cenné souvislosti. Je zřejmé, že škodlivost a míra zaplevelení je velmi heterogenní a z tohoto důvodu plošná aplikace herbicidů nemůže být na celém pozemku efektivně využita. Vlastní aplikace herbicidů by měla reflektovat intenzitu zaplevelení, tím by se mohly ušetřit náklady na regulaci plevelů a dosáhnout i omezení užívání herbicidů, což by bylo přínosem i pro životní prostředí.

LITERATURA

ČSÚ, 2011: *Situační výhledová zpráva Obiloviny 2011*. MZe ČR, Praha, 90 s., [cit. 2010-4-10].

Dostupné na:

http://eagri.cz/public/web/file/140964/OBLOVINY_12_2011__k_umisteni_na_web.pdf

DVOŘÁK J., 1998: *Praktikum z herbologie*. MZLU, Brno, 88 s., ISBN 80-7157-344-2

DVOŘÁK J., SMUTNÝ V., 2003: *Herbologie – Integrovaná ochrana proti polním plevelům*, 1.vyd. Skriptum MZLU, Brno, 186 s., ISBN 80-7157-732-4

HRON F., KOHOUT V., 1988, b: *Polní plevele – speciální část*, 1.vyd. Skriptum VŠZ, Praha, 146s.

JURÁŠEK P., 1997: *Svetové poľnohospodárstvo*, 1.diel. AT Publishing, Bratislava, 262 s., ISBN 80-967812-0-0

KLEPACKI B., 1997: *Wybranie pojecia z zakresu organizacji gospodarstw, produkcji i pracy w rolnictwie*, wydanie II. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 157 s., ISBN 83-00-03060-3

KOSTELANSKÝ F., 1997: *Obečná produkce rostlinná*. MZLU, Brno, 212 s., ISBN 80-7157-245-4

KUBÁT K., 2002: *Klíč ke květeně České republiky*. Academia, Praha, 928 s., ISBN 80-200-0836-5

MIKULKA J., KNEIFELOVÁ M. et al., 2005: *Plevelné rostliny*. Profi press, s.r.o, Praha, 155 s., ISBN 80-86726-02-9

TER BRAAK C., J., F., 1998: CANOCO – A FORTRAN program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [canonical] correspondence analysis (version 4.0.). Report LWA-88-02 *Agricultural Mathematics Group*. Wageningen.

VACH M., JAVŮREK M., 2008: *Rostlinná produkce s ohledem na agroekologická hlediska, Metodika pro praxi*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 22 s., ISBN 978-80-87011-584

VÁŇOVÁ M., KLEM K., 1997: *Regulace výskytu plevelů v obilninách soustavou opatření navržených podle prahů škodlivost a intenzity výroby*. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., 141 s.

WINKLER J., NEISCHL A., ZELENÁ V., HLEDÍK P., 2011: *Porovnání zaplevelení ozimé pšenice a jarního ječmene pěstovaných v rozdílných osevních postupech*. Vědecká příloha časopisu Úroda 12, Brno, s. 303 – 306, ISSN 0139-6013

CHANGE OF WEED SPECTRUM IN SELCTED VINEYARDS

ZMENA DRUHOVÉHO ZLOŽENIA BURÍN VO VYBRANÝCH VINOHRADOCH

Jakabová L., Winkler J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xjakabo1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this labor was to determinate weed species which are occurred in vineyards in Žabčice and evaluate differences in weed infestation in various locations. Monitoring was progressing in years 2008 and 2011. Three vineyards was assessed, when 10 phytocoenological reléves were carried out. Purchased data were analysed with canonical correspondence analyses (CCA). In vineyard were identified 71 weed species. The most often occurred weed species between rows (grass-covered variant), were: *Lolium perenne*, *Arrhenatherum elatius*, *Calamagrostis epigejos*, *Carduus acanthoides* and *Potentilla anserina*. In part close to the trunk of the tree, were: *Arrhenatherum elatius*, *Calamagrostis epigejos*, *Digitaria sanguinalis*, *Lolium perenne* and *Carduus acanthoides*. The most frequent weeds in variant with soil cultivation space between rows were: *Arrhenatherum elatius*, *Carduus acanthoides*, *Lolium perenne*, *Echinochloa crus-galli*, *Conyza canadensis*, *Stellaria media*, *Chenopodium album*, *Amaranthus* sp., *Tripleurospermum inodorum*, *Bromus sterilis* and *Digitaria sanguinalis*.

Key words: phytocoenological relevés, weed spectrum, vineyards

Acknowledgments: The results in paper are output of project of Internal Grant Agency, AF MENDELU, No. TP 9/2012 "Innovation of crop management practices in areas threatened by drought".

ÚVOD

V roku 2008 a 2009 sa uskutočnil monitoring biologickej rozmanitosti burín vo viniciach južnej Moravy. Sledovali sa rozdiely medzi konvenčným, integrovaným a ekologickým spôsobom pestovania. Výsledky jasne preukázali, že vo viniciach s integrovaným a ekologickým spôsobom pestovania prevládajú pôvodné druhy rastlín, zatiaľ čo v konvenčne vedených viniciach sú častejšie jednoroké nepôvodné druhy (Lososová, 2011).

Regulácia burín je jedným zo základných agrotechnických úkonov, ktoré sa každoročne opakujú. Existuje niekoľko spôsobov regulácie, najobecnejšie je delenie na priame a nepriame metódy. Medzi priame metódy sa radí napríklad termické, biologické a hlavne chemické ošetrovanie. Efektívnosť zásahu sa priamo odvíja od priebehu počasia a vlhkosti pôdy. K nie menej dôležitým patria nepriame metódy, tzn. striedanie plodín alebo spracovanie pôdy (Mikulka, 1999).

Spoločenstvá burín sa vyznačujú plasticitou a prispôbovosťou k meniacim sa podmienkam. V minulosti po zavedení nových technológií pestovania kultúrnych rastlín dochádzalo k zmenám druhového spektra burín. Druhy, ktoré sa nedokázali prispôbiť novým podmienkam, postupne zmizli a prispôsobivé druhy rýchlo zaplnili uvoľnený priestor. Poslednou výraznou zmenou je rezistencia voči herbicídum (Mikulka, Chodová, 1996).

Rezistencia buriny je absolútna tolerancia voči takej dávke herbicídu, ktorá príslušný druh buriny likviduje. Tolerancia buriny je na rozdiel od rezistencie prirodzená a normálna variabilita citlivosti voči herbicídum, ktorá je danému druhu buriny vlastná (Dvořák, Smutný, 2003).

Vysoký podiel rezistencie voči herbicídum bol zistený napríklad u čeľadí Poaceae, Asteraceae a Amaranthaceae (Naylor, 2010).

Najlepšou stratégiou je rezistencii predísť. Medzi hlavné antirezistentné stratégie patrí pravidelná kontrola, identifikácia odolných druhov, reagovanie na zmeny v zložení populácií a obmedzovanie výskytu druhov, u ktorých je možný vznik rezistencie. Vhodné je tiež striedať herbicidy s rôznymi mechanizmami účinku a tank-mixy s viacerými účinnými látkami (Štěpánek, 2005).

Rezistentné populácie sú morfológicky identické s citlivými populáciami, ale fyziologicky sa líšia. V súčasnej dobe je rezistencia proti herbicídum veľmi významným celosvetovým problémom (Mikulka, Chodová, 1996).

MATERIÁL A METODIKA

Školský poľnohospodársky podnik Žabčice leží v Dyjsko-svratkovskom úvale. Pozemky tvoria štvorhonové štrky, čiastočne sa vyskytujú aluviálne naplaveniny. Pôdy majú neutrálnu až slabokyslú reakciu a trpia nedostatkom humusu. Nachádzajú sa tu rôzne pôdne druhy, od piesčitých pôd, ktoré prevažujú, po pôdy ílovité. Z pôdnych typov sa najčastejšie vyskytujú černozeme, mierne podzolované drnové pôdy a nivné glejové pôdy. Pozemky sú prevažne rovinaté s nadmorskou výškou 185 m. n. m. Žabčice ležia v juhomoravskej suchej oblasti, do ktorej zasahuje zrážkový tieň. Zrážky sú vo vegetačnom období rozložené nerovnomerne. Celkové suchu ešte zvyšujú výsušné vetry. Podrobnejšie zrážkové a teplotné pomery sú uvedené v Tab. 1. Celková rozloha plodných vinogradov je asi 170 ha. Pozemok spadá do najsevernejšej časti Veľkopavlovickej vinogradníckej oblasti. Celkovo sa pestuje asi 25 odrôd, vrátane niektorých zaujímavých krížencov. Z bielych odrôd sa najčastejšie pestuje Rulandské šedé, Müller-Thurgau, Sauvignon, Tramín, Pálava a Veltlínske zelené. Pestuje sa tiež modrá odroda Svätovavrinecké (Anonym, 2006).

Tab. 1: Prehľad zrážkových a teplotných pomerov v Žabčiciach

Mesiac	Dlhodobé priemery		Hodnoty v roku 2008		Hodnoty v roku 2011	
	Zrážky (mm)	Teploty (°C)	Zrážky (mm)	Teploty (°C)	Zrážky (mm)	Teploty (°C)
Január	27,5	-2,4	15,7	1,8	21,4	-0,4
Február	25,5	-0,2	10,4	2,6	4,6	-0,9
Marec	27,2	3,8	32,9	4,81	39,3	5,4
Apríl	37,8	9,1	29,3	10,1	33,2	12,4
Máj	73,3	14,2	53,5	15,4	46,2	15,3
Jún	78,4	17,1	19,6	19,8	42,9	19,4
Júl	76,4	18,6	49,9	20,4	79,8	19,2
August	68,8	18,0	55,9	20,0	42,4	20,5
September	44,5	14,3	46,1	14,3	31,1	17,1
Október	40,0	9,1	27,3	9,8	22,6	9,3
November	40,4	3,7	22,1	6,5	1,6	2,5
December	30,3	-0,4	31,1	1,8	14,6	2,24

Zdroj: ČHMÚ

Hodnotenie prebiehalo v rokoch 2008 a 2011 v troch vinogradoch s rôznou charakteristikou. Vinograd 1 je produkčný vinograd, v ktorom sa v agrotechnických termínoch robia zelené práce. Vinograd 2 je tiež v produkčnom veku, ale zelené práce sa tu nerobia. Vinograd 3 je neprodukčný

a výsadba prestarnutá. Vo vybraných vinohradoch sú rovnaké alebo veľmi podobné pôdne, teplotné a zrážkové pomery. V každom z troch vinogradov bolo spravených 10 fytoecologických snímok.

Každá snímka pokrývala 3 rôzne stanoviská: zatrávené medzirádie (ZM), kultivované medzirádie (KM) a príkmenný pás (PP). Každé stanovisko malo plochu 15 m², na ktorej bola odhadnutá pokryvnosť jednotlivými druhmi v percentách.

Prvé hodnotenie prebehlo v termíne od 16.7. do 19.7.2008, druhé od 17.7.2011 do 19.7.2011.

Dáta nazbierané vo vinohradoch v Žabčiciach za oba roky boli spracované mnohoročnou analýzou ekologických dát. Výber optimálnej analýzy sa riadil dĺžkou gradientu, ktorá sa zisťovala segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*). Následne bola použitá kanonická korešpondenčná analýza CCA (*Canonical Correspondence Analysis*).

Pri testovaní vecnosti pomocou testu Monte-Carlo bolo prepočítaných 499 permutácií. Dáta boli spracované pomocou počítačového programu Canoco 4.0. (Ter Braak, 1998).

Latinské názvy identifikovaných druhov boli použité podľa Kubáta (2002).

VÝSLEDKY A DISKUZIA

Vo výsledkoch sa kvôli prehľadnosti pracuje iba s druhmi, ktoré majú najvyššiu priemernú pokryvnosť. Za spodnú hranicu bola zvolená 5% priemerná pokryvnosť druhom vo vinohrade. Zmena vo vývoji priemernej pokryvnosti sa uvádza od 3 %. Červenou farbou je zvýraznený nárast, zelenou farbou pokles priemernej pokryvnosti medzi jednotlivými pozorovaniami. Kvôli prehľadnosti sú vyjadrenia k zmenám priemerných pokryvností v jednotlivých oddieloch vinogradov. Pri opakovanom výskyte rastlinného druhu vo viacerých vinohradoch sa jeho charakteristika už neopakuje. *Lolium perenne* bol zámerne vysiaty do zatrávených medziradií. Keďže však nie je známe zloženie pôvodnej trávnikovej zmesi, považuje sa kvôli zachovaniu objektivity za druh buriny.

Vinohrad 1

Druhy, ktoré v roku 2008 a 2011 mali v tomto vinohrade najvyššiu priemernú pokryvnosť, sú zhrnuté v Tab. 2. Zmeny v priemernej pokryvnosti medzi jednotlivými pozorovaniami sú v Tab. 3.

Tab. 2: Druhy s najvyššou priemernou pokrývnosťou vo vinohrade 1

Rok	Druh	Priemerná pokrývnosť [%]
2008	<i>Lolium perenne</i>	22
	<i>Setaria pumila</i>	10
	<i>Amaranthus sp.</i>	7
2011	<i>Lolium perenne</i>	26
	<i>Digitaria sanguinalis</i>	15
	<i>Stellaria media</i>	8
	<i>Arrhenatherum elatius</i>	5
	<i>Amaranthus sp.</i>	5

Tab. 3: Rozdiel v priemernej pokrývknosti medzi rokom 2008 a 2011 vo vinohrade 1

Druh	Priemerná pokrývnosť druhu		Rozdiel v priemernej	
	[%] v rokoch		pokrývknosti [%]	
	2008	2011	Nárast	Pokles
<i>Digitaria sanguinalis</i>	3	15	+12	
<i>Stellaria media</i>	0	8	+8	
<i>Arrhenatherum elatius</i>	1	5	+4	
<i>Lolium perenne</i>	22	26	+4	
<i>Echinochloa crus-galli</i>	0	3	+3	
<i>Elytrigia repens</i>	0	3	+3	
<i>Setaria pumila</i>	10	3		-7
<i>Bromus sp.</i>	3	0		-3

V roku 2008 bolo vo vinohrade 1 identifikovaných 42 druhov burín, v roku 2011 to bolo až 57 druhov.

Digitaria sanguinalis má pri silnejšom výskyte vysokú konkurenčnú schopnosť. Ako uvádzajú Mikulka a Kneifelová (2005), je to svetlomilná rastlina. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) dodávajú, že jedna rastlina je schopná vyprodukovať až niekoľko stoviek obiliek. Jej význam stúpa aj v Žabčiciach, za 3 roky jej priemerná pokrývnosť vo vinohrade narástla o 3 %.

Stellaria media je jednoročná, dobre prezimujúca bylina s plazivými, často koreniacimi stonkami. Kohout (1997) uvádza, že tvorí súvislé plochy. Na jednej rastline dozrieva aj niekoľko tisíc semien. Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) uvádzajú, že životnosť semien je až desať rokov. Jej význam vo vinohrade bude zrejme stúpať, za 3 roky sa jej priemerná pokrývnosť zvýšila o 8 %.

Arrhenatherum elatius je vysoká trvalá tráva, ktorá sa množí hlavne generatívne. Dnes sa vyskytuje skoro v celej Európe, v Austrálii aj na Novom Zélande (Pyšek, 2001). V Žabčiciach jej plocha každoročne stúpa, čo má negatívny dopad hlavne na druhové spektrum zatrávených medziradií. Za posledné tri roky jej priemerná pokrývnosť stúpla o 4 %.

Lolium perenne je súčasťou trávnikových zmesí. Tento druh bol v bližšie neurčenej zmesi zámerné vysiaty do zatrávených medziradií. Česká zemědělská univerzita v Prahe uvádza, že sa používa predovšetkým v intenzívne zatážovaných trávnikoch, pretože má vysokú konkurenčnú schopnosť. Neznáša však prísušky a holomrazy. Server Engo, s. r. o. uvádza, že je najrýchlejšie zakladajúcim trávny druhom, hoci má nižšiu schopnosť regenerácie. Za posledné 3 roky sa jeho priemerná pokrývnosť zvýšila o 4 %.

Echinochloa crus-galli je podľa autorov Pikulu, Obrdžálkovej a Zapletalá (1997) údajne náš pôvodný jednoročný druh. Mikulka a Kneifelová (2003) však uvádzajú, že tento druh pochádza z Ázie. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) ju považujú za tretiu najvýznamnejšiu burinu sveta. Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) dodávajú, že jediná oblasť, kde zatiaľ nespôsobuje problémy, je Afrika. Je teplomilná a rozmnožuje sa výhradne generatívne. Jedna rastlina je schopná vyprodukovať až niekoľko desiatok tisíc obiliek. Podľa niektorých autorov dokáže vzísť z hĺbky až 16 cm. Množstvo semien v pôdnej zásobe sa zrejme zvyšuje spolu s plochou, ktorú vo vinohrade zaberá. Za posledné tri roky sa jej priemerná pokrývnosť zvýšila o 3 %.

Elytrigia repens je úporná trvalá burina, ktorá pretrváva na stanovisku aj za nepriaznivých podmienok. Rozmnožuje sa hlavne vegetatívne, oddenkami. Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) udávajú, že hoci dáva prednosť vlhkejším pôdam, dobre sa uplatňuje aj na suchých stanoviskách, čo zodpovedá výskytu v Žabčiciach. Nevyhovujú jej iba extrémne suché kamenité pôdy s výrazne nízkym pH. Ročný prírastok jedného oddenku môže dosiahnuť až 100 cm. V spojení s regeneračnou schopnosťou a opakovanou kultiváciou, dokáže vyvinúť veľmi silný konkurenčný tlak. Napriek tomu, že zatienenie a správna agrotechnika by mali kriticky znížiť jej výskyt, jej priemerná pokrývnosť vo vinohrade stúpla za posledné tri roky o 3 %.

Setaria pumila je jednoročný, vzrastovo nižší druh. Ako uvádza Mikulka (1999), jeho výskyt je skôr lokálny a jeho význam stúpa iba pri premnožení. Jeho schopnosť konkurencie je ale značná. V pôdnej zásobe pretrvávajú semená až niekoľko rokov. Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) uvádzajú, že jedna rastlina je schopná vyprodukovať až 1 000 obiliek. V budúcnosti by sa mohol stať problematickým druhom, zatiaľ však jeho priemerná pokrývnosť klesla o 7 %.

Bromus sp. je skupina rastlín rodu *Bromus*, u ktorých je v skoršej fáze vývoja ťažké identifikovať, o aký druh sa jedná. Pri pozorovaní v roku 2011 boli rastlinky už dobre diferencované, preto sa priemerná pokrývnosť tejto skupiny znížila o 3 %.

Vinohrad 2

Druhy, ktoré v roku 2008 a 2011 mali najvyššiu priemernú pokrývnosť, sú zhrnuté v Tab. 4. Rozdiely v priemernej pokrývosti medzi rokom 2008 a 2011 sú v Tab. 5.

Tab. 4: Druhy s najvyššou priemernou pokrývnosťou vo vinohrade 2

Rok	Druh	Priemerná pokrývnosť [%]
2008	<i>Lolium perenne</i>	27
	<i>Bromus</i> sp.	26
	<i>Arrhenatherum elatius</i>	8
	<i>Potentilla anserina</i>	6
	<i>Tripleurospermum inodorum</i>	6
2011	<i>Arrhenatherum elatius</i>	33
	<i>Lolium perenne</i>	20
	<i>Carduus acanthoides</i>	12
	<i>Melica transsilvanica</i>	9
	<i>Bromus sterilis</i>	8
	<i>Potentilla anserina</i>	8
	<i>Medicago lupulina</i>	6
	<i>Conyza canadensis</i>	5
	<i>Calamagrostis epigejos</i>	5

Tab. 5: Rozdiel v priemernej pokrývosti medzi rokom 2008 a 2011 vo vinohrade 2

Druh	Priemerná pokrývnosť druhu		Rozdiel v priemernej pokrývosti [%]	
	[%] v rokoch		Nárast	Pokles
	2008	2011		
<i>Arrhenatherum elatius</i>	8	33	+25	
<i>Bromus sterilis</i>	0	8	+8	
<i>Carduus acanthoides</i>	4	12	+8	
<i>Melica transsilvanica</i>	3	9	+6	
<i>Medicago lupulina</i>	1	6	+5	
<i>Conyza canadensis</i>	1	5	+4	
<i>Calamagrostis epigejos</i>	2	5	+3	
<i>Bromus</i> sp.	26	0		-26
<i>Lolium perenne</i>	27	20		-7
<i>Convolvulus arvensis</i>	4	0		-4
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	6	2		-4
<i>Filago arvensis</i>	4	1		-3

V roku 2008 bolo vo vinohrade 2 identifikovaných 40 druhov burín, v roku 2011 stúpol počet na 53 druhov.

Priemerná pokrývnosť druhu *Arrhenatherum elatius* sa zvýšila za tri roky o 25 %.

Bromus sterilis je jednoročná, svetlo zelená tráva. Mikulka a Kneifelová (2003) uvádzajú, že na jednom trse dozreje až 800 obiliek. Navyše dlhé osiny umožňujú zachytenie v srsti zvierat. Semená najlepšie klíčia z povrchu pôdy. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) uvádzajú, že hoci bol tento druh v minulosti bezvýznamný, dnes, nielen vďaka minimalistickému spracovaniu pôdy, jeho význam stúpa. Vo vinohrade stúpila jeho priemerná pokrývnosť o 8 %.

Carduus acanthoides je dvojročná až trvalá medonosná rastlina. Rozmnožuje sa hlavne generatívne, nažky sa šíria na veľké vzdialenosti. Rozmnožuje sa aj regenerujúcimi koreňmi (Kohout, 1997). Na suchom stanovisku, akým vinohrady v Žabčiciach sú, sa ľahko stáva agresívnym druhom. Nakoľko je však medonosným druhom, mohol by prispieť k rozvoju biodiverzity hmyzu. Za tri roky sa jeho priemerná pokrývnosť zvýšila o 8 %.

Melica transsilvanica je až 90 cm vysoká, dekoratívna tráva. V ČR sa vyskytuje roztrúsené v teplých slnečných oblastiach. Červený zoznam ju radí medzi vzácnejšie druhy, ktoré vyžadujú pozornosť (Fišer, 2007). Napriek tomu by mohla byť viniču svojou veľkosťou a nárokmi na vlahu veľkým konkurentom. Za posledné tri roky jej priemerná pokrývnosť stúpla o 6 %.

Medicago lupulina je jednoročná až vytrvalá, poliehavá až plazivá bylina. Je to európsky druh, ktorý preferuje slnečné stanovisko. Rastie na celom území ČR, od nížiny až do stredného podhoria (Krása, 2007). Radí sa medzi zdroje potravy hmyzu. Jej priemerná pokrývnosť stúpla o 5 %.

Conyza canadensis je vysoká, jednoročná bylina. Vďaka obrovskej produkcii semien, ktoré sa veľmi dobre šíria vetrom, sa k nám dostala až zo Severnej Ameriky (Kohout, 1997). Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) udávajú, že rozmnožovací potenciál rastie s výškou rastliny, pričom môže vytvoriť až 250 000 semien. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) dodávajú, že pri premožení sa môže na jednom metri štvorcovom vyskytnúť až 1 000 jedincov. Ohniskové porasty sú veľkým spotrebiteľom vody. Za tri roky sa priemerná pokrývnosť zvýšila o 4 %.

Calamagrostis epigejos je bylina nezávislá na pH pôdy, pretože koreňmi dokáže regulovať reakciu prostredia. Produkuje veľké množstvo biomasy, ktorá sa veľmi pomaly rozkladá (Pyšek, 2001). Hustý systém oddenkov oberá pôdu o už tak nedostatočnú vlahu a živiny. Tento druh bude v budúcnosti zrejme naberať na význame, pretože jeho priemerná pokrývnosť stúpla o 3 %.

Priemerná pokrývnosť druhu *Bromus* sp.za tri roky klesla o 26 %, u *Lolium perenne* bok pokles v priemernej pokrývosti 7 %.

Convolvulus arvensis je trvalá burina, s veľkou konkurenčnou schopnosťou. Jursík, Holec, Hamouz a Soukup (2011) ju radia medzi 20 najúpornejších burín sveta. Úspešne sa množí nielen vegetatívne (roznášanie výbežkov mechanizáciou), ale aj generatívne (semená si zachovávajú klíčivosť dlhú dobu). Zrejme agrotechnické zásahy a použitie herbicídov znížilo priemernú pokrývnosť tohto druhu o 3 %.

Tripleurospermum inodorum je podľa Mikulky a Kneifelovej (2005) významnou, konkurenčne veľmi silnou burinou. Nie je náročná na stanovisko, jedna rastlina dokáže vyprodukovať až 100 000 nažiek. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) vyjadrujú názor, že minimalistické spracovanie pôdy podporuje jeho šírenie. Jeho priemerná pokrývnosť klesla o 4 %.

Filago arvensis je jednoročná bylina, ktorá sa kedysi v ČR vyskytovala hojne, dnes už len zriedkavo (Mižík, 2008). Červený zoznam ju zaraďuje do ohrozených druhov (Grulich, 2012). Preferuje vysychavé pôdy s nedostatkom živín. V Žabčiciach sa už skoro nevyskytuje, za tri roky jej priemerná pokrývnosť klesla o 3 %.

Vinohrad3

Druhy, ktoré v roku 2008 a 2011 mali najvyššiu priemernú pokrývnosť, sú zhrnuté v Tab. 6. Najväčšie zmeny v priemernej pokrývosti sú zobrazené v Tab. 7.

Tab. 6: Druhy s najvyššou priemernou pokryvnosťou vo vinohrade 3

Rok	Druh	Priemerná pokryvnosť [%]
2008	<i>Bromus</i> sp.	18
	<i>Lolium perenne</i>	17
	<i>Calamagrostis epigejos</i>	9
	<i>Amaranthus</i> sp.	6
	<i>Convolvulus arvensis</i>	5
	<i>Conyza canadensis</i>	5
2011	<i>Calamagrostis epigejos</i>	18
	<i>Lolium perenne</i>	17
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	11
	<i>Setaria pumila</i>	7
	<i>Carduus acanthoides</i>	7
	<i>Digitaria sanguinalis</i>	6
	<i>Conyza canadensis</i>	6
	<i>Bromus</i> sp.	6
	<i>Chenopodium album</i>	5
<i>Potentilla anserina</i>	5	

Tab. 7: Rozdiel v priemernej pokrývosti medzi rokom 2008 a 2011 vo vinohrade 3

Druh	Priemerná pokrývnosť druhu		Rozdiel v priemernej pokrývosti [%]	
	[%] v rokoch		Nárast	Pokles
	2008	2011		
<i>Calamagrostis epigejos</i>	9	18	+9	
<i>Echinochloa crus-galli</i>	4	11	+7	
<i>Carduus acanthoides</i>	3	7	+4	
<i>Chenopodium album</i>	1	5	+4	
<i>Digitaria sanguinalis</i>	3	6	+3	
<i>Setaria pumila</i>	4	7	+3	
<i>Bromus tectorum</i>	0	3	+3	
<i>Bromus sp.</i>	18	6		-12
<i>Amaranthus sp.</i>	6	2		-4
<i>Convolvulus arvensis</i>	5	2		-3

V roku 2008 bolo vo vinohrade 3 identifikovaných 35 druhov burín, v roku 2011 stúpil počet na 45 druhov.

Priemerná pokrývnosť u druhu *Calamagrostis epigejos* stúpila za tri roky o 9 %, u druhu *Echinochloa crus-galli* stúpila o 7 % a u *Carduus acanthoides* priemerná pokrývnosť stúpila o 4 %.

Chenopodium album je náš pôvodný, jednoročný druh. Považuje sa za veľmi nebezpečnú burinu. Jedna rastlina je schopná vyprodukovať až 200 000 semien (Píkula, Obdržáľková, Zapletal, 1997). Mikulka (1999) uvádza, že je častým hostiteľom chorôb a škodcov viniča. Preukázané boli aj rezistentné biotopy. Kazda, Mikulka a Prokinová (2010) dodávajú, že v ČR je jedným z najrozšírejších burinných druhov. Žabčice mu vyhovujú, pretože rastie aj na veľmi suchých a výsušných stanovištiach. Za posledné tri roky jeho priemerná pokrývnosť stúpila o 4 %.

Priemerná pokrývnosť druhov *Digitaria sanguinalis* a *Setaria pumila* stúpila o 3%.

Bromus tectorum je jednoročný trávnatý druh, ktorý sa na území ČR vyskytuje roztrúsene až hojne. Má iba nízku konkurenčnú schopnosť (Möllerová, 2009). V tomto vinohrade sa vyskytuje iba ojedinele, jeho priemerná pokrývnosť stúpila o 3 %.

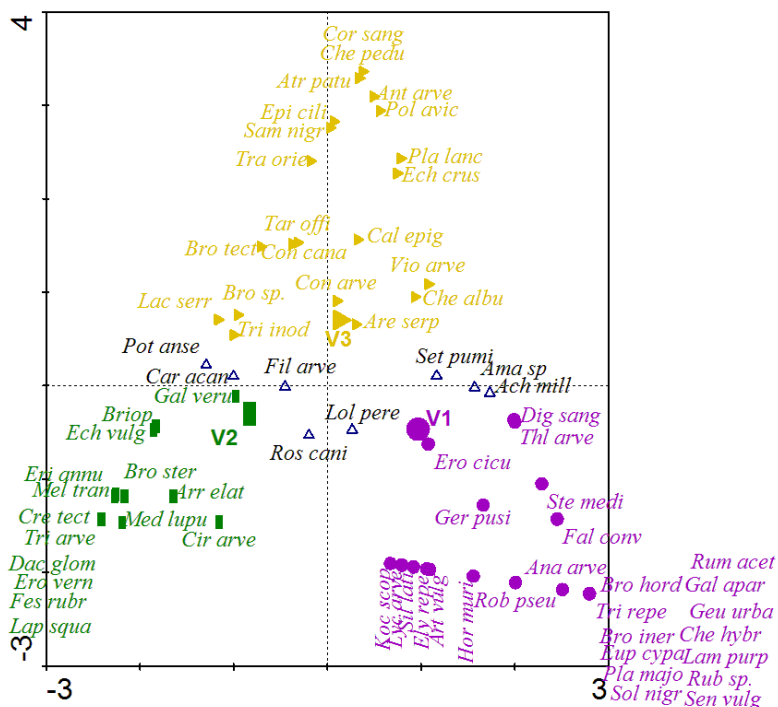
Priemerná pokrývnosť skupiny *Bromus sp.* klesla za tri roky o 12 %.

Amaranthus sp. je jednoročná, stredne vysoká bylina. Vyznačuje sa mohutným rastom a mimoriadne veľkou tvorbou semien, ktoré kľčia hlavne z povrchových vrstiev pôdy. V pôde prežívajú až 10 rokov (Kohout, 1997). Jej priemerná pokryvnosť klesla o 4 %.

Priemerná pokryvnosť u druhu *Convolvulus arvensis* klesla o 3 %.

Výber optimálnej analýzy vhodnej pre ďalšie spracovanie sa riadil dĺžkou gradientu. Segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*) bola zistená dĺžka gradientu 4,676, preto bola pre ďalšie spracovanie dát zvolená kanonická korešpondenčná analýza CCA (*Canonical Correspondence Analysis*). Na základe výskytu burín v jednotlivých vinohradoch vymedzuje analýza CCA priestorové usporiadanie jednotlivých burinných druhov, ktoré je vyjadrené ordinačným diagramom na Obr. 1. Rastlinné druhy a faktory vinohradov, ktoré ich výskyt ovplyvňujú, sú označené rôznymi farbami. Čím je rastlinný druh bližšie k znaku faktoru, tým výraznejšie ho daný faktor ovplyvňuje.

Obr. 1: Ordinačný diagram vyjadrujúci vplyv vinohradu na výskyt rastlinných druhov



Vysvetlivky: Ach mill (*Achillea millefolium*), Ama sp (*Amaranthus* sp.), Ana arve (*Anagallis arvensis*), Ant arve (*Anthemis arvensis*), Are serp (*Arenaria serpyllifolia*), Arr elat (*Arrhenatherum elatius*), Art vulg (*Artemisia vulgaris*), Atr patu (*Atriplex patula*), Briop (*Briopsida*), Bro hord (*Bromus hordeaceus*), Bro iner (*Bromus inermis*), Bro sp. (*Bromus* sp.), Bro ster (*Bromus sterilis*), Bro tect (*Bromus tectorum*), Cal epig (*Calamagrostis epigejos*), Car acan (*Carduus acanthoides*), Cir arve (*Cirsium arvense*), Con arve (*Convolvulus arvensis*), Con cana (*Conyza canadensis*), Cor sang (*Cornus sanguinea*), Cre tect (*Crepis tectorum*), Dac glom (*Dactylis glomerata*), Dig sang (*Digitaria sanguinalis*), Ech crus (*Echinochloa crus-galli*), Ech vulg (*Echium vulgare*), Ely repe (*Elytrigia repens*), Epi cili (*Epilobium ciliatum*), Eri annu (*Erigeron annuus*), Ero cicu (*Erodium cicutarium*), Ero vern (*Erophila verna*), Eup cypa (*Euphorbia cyparissias*), Fal conv (*Fallopia convolvulus*), Fes rubr (*Festuca rubra*), Fil arve (*Filago arvensis*), Gal apar (*Galium aparine*), Gal veru (*Galium verum*), Ger pusi (*Geranium pusillum*), Geu urba (*Geum urbanum*), Hor muri (*Hordeum murinum*), Che albu (*Chenopodium album*), Che hybr (*Chenopodium hybridum*), Che pedu (*Chenopodium pedunculare*), Koc scop (*Kochia scoparia*), Lac serr (*Lactuca serriola*), Lam purp (*Lamium purpureum*), Lap squa (*Lappula squarrosa*), Lol pere (*Lolium perenne*), Lyc arve (*Lycopsis arvensis*), Med lupu (*Medicago lupulina*), Mel tran (*Melica transsilvanica*), Pla lanc (*Plantago lanceolata*), Pla majo (*Plantago major*), Pol avic (*Polygonum aviculare*), Pot anse (*Potentilla anserina*), Rob pseu (*Robinia pseudacacia*), Ros cani (*Rosa canina*), Rub sp. (*Rubus* sp.), Rum acet (*Rumex acetosella*), Sam nigr (*Sambucus nigra*), Sen vulg (*Senecio vulgaris*), Set pumi (*Setaria pumila*), Sil lati (*Silene latifolia*), Sol nigr (*Solanum nigrum*), Ste medi (*Stellaria media*), Tar offi (*Taraxacum officinale*), Thl arve (*Thlaspi arvense*), Tra orie (*Tragopogon orientalis*), Tri arve (*Trifolium arvense*), Tri inod (*Tripleurospermum inodorum*), Tri repe (*Trifolium repens*), Vio arve (*Viola arvensis*).

ZÁVER

V roku 2008 bolo vo vinohradoch v Žabčiciach spolu identifikovaných 67 rastlinných druhov. V roku 2011 to bolo 71 druhov.

Vo vinohrade 1 mali najvyššiu priemernú pokryvnosť druhy *Lolium perenne*, *Digitaria sanguinalis*, *Setaria pumila*, *Amaranthus* sp. a *Stellaria media*. K najväčšiemu nárastu priemernej pokryvnosti došlo u druhu *Digitaria sanguinalis*, k najväčšiemu poklesu u druhu *Setaria pumila*.

Vo vinohrade 2 mali najvyššiu priemernú pokryvnosť druhy *Lolium perenne*, *Arrhenatherum elatius*, *Bromus* sp., *Carduus acanthoides* a *Melica transsilvanica*. K najväčšiemu nárastu priemernej pokryvnosti došlo u druhu *Arrhenatherum elatius*, k najväčšiemu poklesu priemernej pokryvnosti došlo u skupiny *Bromus* sp. a druhu *Lolium perenne*.

Vo vinohrade 3 mali najvyššiu priemernú pokryvnosť druhy *Lolium perenne*, *Calamagrostis epigejos*, *Bromus* sp., *Echinochloa crus-galli* a *Conyza canadensis*. K najväčšiemu nárastu priemernej pokryvnosti došlo u druhu *Calamagrostis epigejos*, k najväčšiemu poklesu priemernej pokryvnosti došlo u skupiny *Bromus* sp. a druhu *Amaranthus* sp.

U druhov *Arrhenatherum elatius*, *Bromus sterilis*, *Carduus acanthoides*, *Galium verum*, *Chenopodium album* a *Taraxacum officinale* došlo vo všetkých troch vinohradoch medzi pozorovaním v roku 2008 a 2011 k **nárastu priemernej pokryvnosti**.

U druhov *Amaranthus* sp., *Bromus* sp., *Convolvulus arvensis* a *Filago arvensis* došlo vo všetkých troch vinohradoch medzi pozorovaním v roku 2008 a 2011 k **poklesu priemernej pokryvnosti**.

V budúcnosti budú mať pravdepodobne hlavný význam druhy, ktoré dokážu vyvinúť silný konkurenčný tlak, tzn. produkujú veľké množstvo semien (*Conyza canadensis*), ktoré si zachovávajú klíčivosť po dlhú dobu (*Amaranthus* sp.), regenerujú z vegetatívnych častí (*Convolvulus arvensis*), ktoré roznáša mechanizácia po pozemku, preferujú alebo tolerujú nízky podiel zrážok (*Carduus acanthoides*) a v neposlednej rade majú zníženú citlivosť voči povoleným herbicídny prípravkom (*Tripleurospermum inodorum*). Problematické budú zrejme aj druhy, ktoré sú odolné voči mechanickej kultivácii (*Robinia pseudacacia*).

LITERATÚRA

ANONYM, 2003: *Jílek vytrvalý (Lolium perenne L.)*. [cit. 2012-10-07]. Dostupné na WWW: http://www.agrokrom.cz/texty/metodiky/Picninarstvi/picniny/picniny_skripta_jilek_vytrvaly.pdf

ANONYM, 2006: *Lokalizace a přírodně-výrobní podmínky podniku*. [cit. 2012-10-07].

Dostupné na WWW: www.szp.mendelu.cz/cz/poloha

ANONYM, 2007: *Mätonoh trváci (Lolium perenne)*. [cit. 2012-10-07].

Dostupné z WWW: www.engo.sk/matonoh-trvaci-lolium-perenne-3.html

ČESKÝ HYDROMETEOROLOGICKÝ ÚSTAV

DVOŘÁK, J., SMUTNÝ, V. *Herbologie: Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita, 2003. 186 s. ISBN 978-80-7157-732-4.

FIŠER, R., 2007: *Melica transsilvanica Schur. - strdivka sedmihradská/ mednička sedmihradská*. [cit. 2012-10-07]. Dostupné na WWW: <http://botany.cz/cs/melica-transsilvanica/>

GRULICH, V., 2012: *Červený seznam cévnatých rostlin České republiky (nejnovější verze, stav v roce 2012)*. [cit. 2012-10-07]. Dostupné na WWW: <http://botany.cz/cs/cervený-seznam/>

JURSÍK, M., HOLEC, J., HAMOUZ, P., SOUKUP, J. *Plevelé - Biologie a regulace*. Vyd. 1. České Budějovice: Kurent, 2011. 232 s. ISBN 978-80-87111-27-7.

KAZDA, J., MIKULKA, J., PROKINOVÁ, E. *Encyklopedie ochrany rostlin*. Vyd. 1. Praha: Profi Press, 2010. 399 s. ISBN 978-80-86726-34-2.

KOHOUT, V. *Plevelé polí a zahrad*. Vyd. 1. Praha: Agrospoj, 1997.

KRÁSA, P., 2007: *Medicago lupulina L. - tolice dětelová/ lucerna d'atelinová*. [cit. 2012-10-07]. Dostupné na WWW: <http://botany.cz/cs/medicago-lupulina/>

KUBÁT, K. (eds), 2002: *Klíč ke květeně České republiky*. Vyd. 1. Academia, Praha: 927 s., ISBN 80-200-0836-5.

LOSOSOVÁ, Z., 2011: *Monitoring biologické rozmanitosti vinic na jižní Moravě*. [cit. 2012-10-07]. Dostupné z WWW: http://www.zahradaweb.cz/Monitoring-biologicke-rozmanitosti-vinic-na-jizni-Morave__s529x54714.html.

MIKULKA, J. et al. *Plevelné rostliny polí, luk a zahrad*. Vyd. 1. Praha: Farmář - Zemědělské listy, 1999. 160 s. ISBN 80-902413-2-8.

MIKULKA, J., CHODOVÁ, D. *Hubení plevelů odolných vůči herbicidům*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání MZe, 1996. 35 s. ISBN 81-7105-136-5.

MIKULKA, J., KNEIFOVÁ, M. *Významné a nově se šířící plevely*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2003. 59 s. ISBN 80-7271-142-3.

MIKULKA, J., KNEIFELOVÁ, M. *Plevelné rostliny*. Vyd. 2. Praha: Profi Press, s.r.o., 2005. 148s. ISBN 80-86726-02-9.

MIŽÍK, P., 2008: *Filago arvensis L. - bělolist rolní/ bielolist roľný*. [cit. 2012-10-07].

Dostupné na WWW: <http://botany.cz/cs/filago-arvensis/>

MÖLLEROVÁ, J., 2009: *Bromus tectorum L. - sveřep střešní/ stoklas strechový*. [cit. 2012-10-07].

Dostupné z WWW: <http://botany.cz/cs/bromus-tectorum/>

NAYLOR, R. E. L. *Weed management handbook*. Edition 9. UK: Blackwell publishing, 2002. 423 s. ISBN 978-0-632-05732-0.

PIKULA, J., OBDRŽÁLKOVÁ, D., ZAPLETAL, M. *Atlas vybraných druhů plevelů v ČR*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1997. ISBN 80-86153-20-7.

PYŠEK, P., TICHÝ, L. *Rostlinné invaze*. Vyd. 1. Brno: Rezekvítek, 2001. 40 s. ISBN 80-902954-4-4.

ŠTĚPÁNEK, P., 2005: *Strategie minimalizující rezistenci plevelů k herbicidům*. [cit. 2012-10-07].

Dostupné z WWW:

<http://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevely/strategie-minimalizujici-rezistenci-plevelu-k-herbicidum.html>

TER BRAAK, C. J. F. 1998: CANOCO – A FORTRAN program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [canonical] correspondence analysis (version 4.0.). Report LWA-88-02 *Agricultural Mathematics Group*. Wageningen.

WEED INFESTATION OF PAPAVER SOMNIFERUM IN FIELD CONDITIONS

ZAPLEVELENÍ MÁKU SETÉHO V PROVOZNÍCH PODMÍNKÁCH

Jonášová K., Winkler J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xjonaso2@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the current weed infestation of poppy (*Papaver somniferum*) in the field conditions. The evaluation was conducted on the fields of the company PODYJÍ, a.s. in Horní Břečkov. Two fields were assessed during two years, in 2011, field „U včelína“, acreage of 100.96 hectares, in 2012 in the field of „Za hřbitovem“, 34.4 hectares. Weed assessment was done in three terms, in growth stages of poppy – in emergence, in flowering and before harvest. Intensity of weed infestation was carried out in chosen fields using counting method on area of 1 m². The differences of the weed infestations at the various sites were determined. Gained data were processed by „Multivariate Analysis of Ecological Data“ and redundancy analysis was used for data analyses. The poppy stand in 2011 was mainly affected by these weed species: *Anagalis arvensis*, *Atriplex patula*, *Atriplex sagittata*, *Capsella bursa-pastoris*, *Fallopia convolvulus*, *Chenopodium album*, *Polygonum aviculare*, *Tripleurospermum inodorum* and others. The poppy in 2012 was mainly affected by: *Anagalis arvensis*, *Echinochloa crus-galli*, *Fumaria officinalis*, *Polygonum aviculare*, *Viola arvensis* and others.

Key words: weeds, poppy

Acknowledgments: The results in paper are output of project of Internal Grant Agency, AF MENDELU, No. TP 9/2012 „Innovation of crop management practices in areas threatened by drought“.

ÚVOD

Mák (*Papaver somniferum* L.) je velmi stará kulturní rostlina, od pradávna pěstovaná na celém euroasijském kontinentě (Fábry, 1975). Dle Vašáka et al. (2010) pochází doložené nálezy máku již z neolitu, mladší doby kamenné, hlavně z oblasti předhůří Alp. V Evropě se mák jako zahradní a okrasná plodina pěstuje od středověku, jako polní plodina s odplevením herbicidy se na našem území pěstuje od sedmdesátých let 20. století.

Úspěšná a šetrná regulace plevelů v máku je vedle založení porostů základem intenzivního pěstování máku. Nedostatky nebo chyby v jednom z těchto článků mají zásadní dopad na výši sklízně a především také na kvalitu produkce. Je to dáno dvěma fakty. Mák má velmi pomalý počáteční růst, z toho také vyplývající nízkou konkurenční schopnost a výsledkem jsou významné výnosové ztráty již při relativně nízké úrovni zaplevelení. Druhý zásadní dopad zaplevelení porostů souvisí s velmi podobnými vlastnostmi semen máku a některých plevelných druhů. V tomto případě se semena ze sklizené produkce obtížně čistí a snižuje se jakost i cena (Vašák et al., 2010).

Dle Krejčíře (1966) a Dvořáka a Smutného (2003) se člověk setkává od nepaměti s rostlinami, které svojí přítomností a životními projevy ztěžují práci a snižují výkonnost pěstovaných druhů. Plevelé mohou škodit přímo i nepřímo. Přímá škodlivost spočívá zejména v potlačování růstu pěstovaných plodin tím, že je plevelé připravují o životní prostor a zastíňují, odnímají z půdy přednostně vláhu a živiny, často v několikanásobně větším množství než kulturní rostliny. Do nepřímé škodlivosti lze zařadit ztěžování zemědělské práce, podporu rozšiřování chorob, škůdců i fakt, že řada plevelných druhů produkuje alergeny.

Nejnebezpečnější plevelné druhy jsou nejlépe vybaveny konkurenčními schopnostmi (Dvořák, Smutný, 2003). Mikulka, Chodová et al. (1999) dodávají, že plevelé patří k nejvýznamnějším škodlivým činitelům v České republice.

MATERIÁL A METODIKA

Vyhodnocení stavu zaplevelení v porostu máku setého probíhalo v letech 2011 a 2012. Hodnocení bylo provedeno na pozemcích společnosti PODYJÍ, a.s. Tento podnik sídlí v obci Horní Břečkov (okres Znojmo, Jihomoravský kraj, Česká republika). Dlouhodobý průměrný roční úhm srážek činí 470,5 mm, průměrná roční teplota vzduchu je 8,5 °C.

Vyhodnocení zaplevelení se provádělo pomocí početní metody. Na 1 m² se spočítaly kusy rostlin máku setého a rostlin plevelů, rozmístění těchto hodnocených ploch po pozemku bylo rovnoměrné.

Hodnocení probíhalo ve třech termínech. První hodnocení bylo uskutečněno po vzejití máku setého, druhé v době květu a třetí před sklízní máku.

V roce 2011 probíhalo hodnocení zaplevelení na pozemku „U včelína“. Leží v katastrálním území Horní Břečkov, v nadmořské výšce 418,64 m, jeho výměra je 100,96 ha. Zasetá byla odrůda Major dne 25.3.2011. Na této lokalitě bylo zvoleno 50 míst pro hodnocení zaplevelení, jelikož jedno měření odpovídá dvěma hektarům výměry.

V roce 2012 hodnocení probíhalo na pozemku „Za hřbitovem“. Leží v katastrálním území Vracovice, v nadmořské výšce 434,4 m, jeho výměra je 34,4 ha. Zasetá byla odrůda Major dne 28.3.2012. Bylo zvoleno 17 hodnotících míst, jedno měření odpovídalo i zde dvěma hektarům výměry.

České a latinské názvy jednotlivých druhů plevelů byly použity podle Kubáta (Kubát, 2002).

Získané údaje byly zpracovány mnohorozměrnou analýzou ekologických dat. Výběr optimální analýzy se řídil délkou gradientu (*Lengths of Gradient*), zjištěného segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*). Pro další zpracování byla použita redundanční analýza (redundancy analysis, RDA), která je založena na modelu lineární odpovědi (*Linear Response*). Při testování průkaznosti pomocí testu Monte-Carlo bylo propočítáno 499 permutací. Data byla zpracována pomocí počítačového programu Canoco 4.0. (Ter Braak, 1998).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tab. 1 udává průměrné počty nalezených rostlinných druhů na jedno hodnotící místo v roce 2011, v roce 2012 Tab. 2, vždy ve všech třech termínech hodnocení zaplevelení.

Tab. 1 Průměrné počty rostlinných druhů v roce 2011 ve třech termínech hodnocení

Nalezené rostlinné druhy	Sledovaný rok a termín hodnocení 2011		
	1. termín	2. termín	3. termín
<i>Papaver somniferum</i>	52,22	61,62	63,12
<i>Anagallis arvensis</i>	0,00	0,28	0,50
<i>Atriplex patula</i>	0,00	0,02	0,12
<i>Atriplex sagittata</i>	0,00	0,16	0,34
<i>Avena fatua</i>	0,00	0,10	0,20
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0,02	0,06	0,00
<i>Cirsium arvense</i>	1,56	0,22	0,18
<i>Echinochloa crus-galli</i>	0,00	0,24	0,68
<i>Elytrogia repens</i>	1,56	0,42	0,32
<i>Euphorbia helioscopia</i>	0,00	0,02	0,00
<i>Fallopia convolvulus</i>	19,14	0,58	1,16
<i>Fumaria officinalis</i>	0,36	0,18	0,16
<i>Galium aparine</i>	0,00	0,12	0,00
<i>Chenopodium album</i>	0,86	0,36	0,04
<i>Papaver rhoeas</i>	0,00	0,48	0,48
<i>Plantago major</i>	0,02	0,00	0,00
<i>Polygonum aviculare</i>	0,50	0,90	1,44
<i>Sinapis alba</i>	0,80	0,46	0,00
<i>Sonchus arvensis</i>	0,00	0,18	0,22
<i>Thlaspi arvense</i>	1,34	0,00	0,00
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	0,06	0,38	1,50
<i>Triticum aestivum</i>	0,04	0,00	0,04
<i>Veronica hederifolia</i>	0,00	0,02	0,00
<i>Viola arvensis</i>	0,00	0,22	0,66

Tab. 2 Průměrné počty rostlinných druhů v roce 2012 ve třech termínech hodnocení

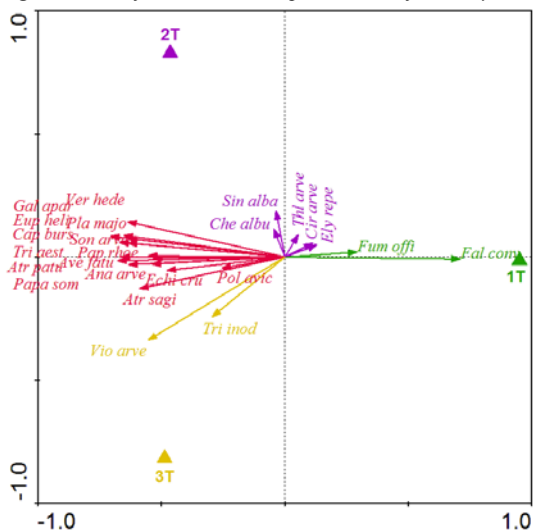
Nalezené rostlinné druhy	Sledovaný rok a termín hodnocení		
	1. termín	2. termín	3. termín
<i>Papaver somniferum</i>	46,71	50,82	57,88
<i>Anagallis arvensis</i>	0,00	0,94	0,88
<i>Atriplex patula</i>	0,00	0,18	0,18
<i>Atriplex sagittata</i>	0,00	0,00	0,53
<i>Avena fatua</i>	0,00	0,00	0,06
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Cirsium arvense</i>	0,71	1,00	0,12
<i>Echinochloa crus-galli</i>	0,00	0,65	0,65
<i>Elytrigia repens</i>	0,59	0,71	0,24
<i>Euphorbia helioscopia</i>	0,00	0,18	0,00
<i>Fallopia convolvulus</i>	2,94	1,59	0,47
<i>Fumaria officinalis</i>	9,47	1,12	0,53
<i>Galium aparine</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Chenopodium album</i>	0,18	0,24	0,12
<i>Papaver rhoeas</i>	0,00	0,24	0,29
<i>Plantago major</i>	0,00	0,35	0,18
<i>Polygonum aviculare</i>	0,47	1,94	1,71
<i>Sinapis alba</i>	0,41	0,47	0,12
<i>Sonchus arvensis</i>	0,00	0,24	0,00
<i>Thlaspi arvense</i>	0,00	0,41	0,12
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	1,06	0,71	0,00
<i>Triticum aestivum</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Veronica hederifolia</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Viola arvensis</i>	0,00	0,00	1,00

Výsledky vyhodnocení zaplevelení byly zpracovány analýzou DCA. Délka gradientu u získaných dat byla 1,496, z tohoto důvodu byla vybrána pro následující zpracování dat redundanční analýza (RDA).

Na základě frekvence výskytu a počtu plevelů v jednotlivých sledováních, bylo analýzou RDA vytvořeno prostorové uspořádání nalezených druhů plevelů a termínů pozorování. Toto zpracování bylo graficky zobrazeno pomocí ordinačních diagramů. Druhy rostlin jsou zde zobrazeny pomocí vektorů (šipky), které mají odlišnou barvu a směr. Jednotlivé termíny pozorování jsou zobrazeny jako body různého tvaru a barvy. V případě, že vektor příslušného druhu směřuje k bodu varianty, je jeho výskyt více vázán k tomuto stanovišti.

Výsledky zaplevelení v jednotlivých termínech pozorování jsou podle analýzy RDA signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,002$ pro všechny kanonické osy a vysvětlují 36,7 % celkové variability v datech. Výsledky jsou tedy statisticky vysoce průkazné. Podle ordinačního diagramu (Obr. 1) lze druhy plevelů rozdělit do čtyř skupin.

Obr. 1 Ordinační diagram zobrazující vztah termínů pozorování a jednotlivých druhů plevelů



Vysvětlivky zkratk použitých v ordinačním diagramu:

1T = 1. termín hodnocení, **2T** = 2. termín hodnocení, **3T** = 3. termín hodnocení

Fal conv = *Fallopia convolvulus*, **Fum offi** = *Fumaria officinalis*

Cir arve = *Cirsium arvense*, **Ely repe** = *Elytrigia repens*, **Che albu** = *Chenopodium album*, **Sin alba** = *Sinapis alba*, **Thl arve** = *Thlaspi arvense*

Ana arve = *Anagallis arvensis*, **Atr patu** = *Atriplex patula*, **Atr sagi** = *Atriplex sagittata*, **Ave fatu** = *Avena fatua*, **Cap burs** = *Capsella bursa-pastoris*, **Echi cru** = *Echinochloa crus-galli*, **Eup heli** = *Euphorbia helioscopia*, **Gal apar** = *Galium aparine*, **Pap rhoe** = *Papaver rhoeas*, **Pap som** = *Papaver somniferum*, **Pla majo** = *Plantago major*, **Pol avic** = *Polygonum aviculare*, **Son arv** = *Sonchus arvensis*, **Tri aest** = *Triticum aestivum*, **Ver hede** = *Veronica hederifolia*

Tri inod = *Tripleurospermum inodorum*, **Vio arve** = *Viola arvensis*

První skupina plevelů se vyskytovala zejména v prvním termínu hodnocení, tedy po vzejití máku setého. Řadíme sem *Fumaria officinalis* a *Fallopia convolvulus*, jsou označeny zelenou barvou.

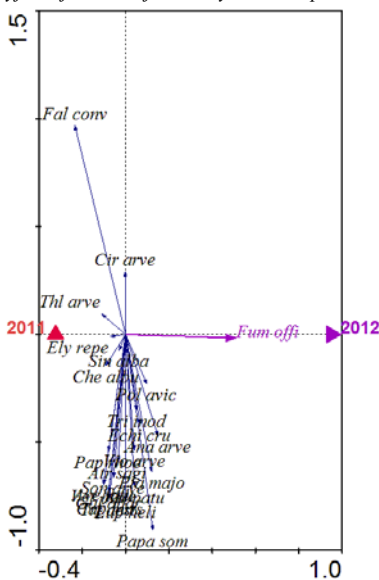
Do druhé skupiny se dají zařadit plevele, vyskytující se častěji ve druhém termínu hodnocení, jsou označeny fialovou barvou písma a patří sem *Elytrigia repens*, *Cirsium arvense*, *Thlaspi arvense*, *Sinapis alba*, *Chenopodium album*.

Třetí skupina plevelů, označená barvou červenou, je více ovlivněna jinými faktory než je termín hodnocení zaplevelení. Jsou to druhy: *Veronica hederifolia*, *Galium aparine*, *Plantago major*, *Euphorbia helioscopia*, *Capsella bursa-pastoris*, *Sonchus arvensis*, *Papaver rhoeas*, *Triticum aestivum*, *Avena fatua*, *Atriplex patula*, *Anagallis arvensis*, *Echinochloa crus-galli*, *Polygonum aviculare*.

Čtvrtá skupina plevelů se vyskytovala zejména v posledním termínu hodnocení, tedy před sklizní máku setého, druhy jsou označeny žlutě a jsou to: *Tripleurospermum inodorum* a *Viola arvensis*.

Výsledky zaplevelení v jednotlivých letech pozorování jsou podle analýzy RDA signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,002$ pro všechny kanonické osy a vysvětlují 6,2 % celkové variability v datech. Výsledky jsou tedy statisticky vysoce průkazné. Podle ordinačního diagramu (Obr. 2) lze říci, že kromě *Fumaria officinalis* jsou ostatní zjištěné druhy plevelů více ovlivněny jinými faktory než ročníkem hodnocení. Dle ordinačního diagramu lze proto *Fumaria officinalis* považovat za druh, který byl ovlivněn ročníkem – tedy rokem 2012.

Obr. 2 Ordinační diagram vyjadřující vztah jednotlivých druhů plevelů a ročníku hodnocení



Vysvětlivky zkratk použitých v ordinačním diagramu:

2011 = rok hodnocení 2011, **2012** = rok hodnocení 2012

Fum offi = *Fumaria officinalis*

Ana arve = *Anagallis arvensis*, **Atr patu** = *Atriplex patula*, **Atr sagi** = *Atriplex sagittata*, **Ave fatu** = *Avena fatua*, **Cap burs** = *Capsella bursa-pastoris*, **Cir arve** = *Cirsium arvense*, **Echi cru** = *Echinochloa crus-galli*, **Ely repe** = *Elytrigia repens*, **Eup heli** = *Euphorbia helioscopia*, **Fal conv** = *Fallopia convolvulus*, **Gal apar** = *Galium aparine*, **Che albu** = *Chenopodium album*, **Pap rhoe** = *Papaver rhoeas*, **Pap som** = *Papaver somniferum*, **Pla majo** = *Plantago major*, **Pol avic** = *Polygonum aviculare*, **Sin alba** = *Sinapis alba*, **Son arv** = *Sonchus arvensis*, **Thl arve** = *Thlaspi arvense*, **Tri inod** = *Tripleurospermum inodorum*, **Tri aest** = *Triticum aestivum*, **Ver hede** = *Veronica hederifolia*, **Vio arve** = *Viola arvensis*

Zjištěné množství plevelů bylo následně přepočítáno na průměrné počty jedinců na jedno hodnocené místo. Průměrné počty těchto jedinců jsou uvedeny v Tab. 1 pro rok 2011 a v Tab. 2 pro rok 2012.

V obou sledovaných ročnících se vyskytovala opletka obecná. Kazda et al. (2010) uvádějí, že tento druh patří mezi významné plevele v časně setých jařinách. Dvořák (1998) dodává, že opletka obecná má vysokou konkurenční schopnost vůči pěstovaným plodinám.

Na obou sledovaných lokalitách se dále vyskytovaly plevele vytrvalé jako pcháč oset a pýr plazivý. Jak uvádějí Kneifelová a Mikulka (2003), zřejmě se zde vyskytuje ohniskový výskyt pcháče osetu. Je možné, že výsledky jeho výskytu byly ovlivněny výběrem hodnotících míst. Jursík et al. (2011) uvádějí, že se v knihách pro hospodářské školy z dvacátých let minulého století můžeme dočíst: „Pýr plazivý jest pravou metlou zemědělství, každá půda jest proň vhodná!“. Pýr plazivý proto patří podle těchto autorů mezi velmi nebezpečné plevele s vysokou konkurenční schopností a společně s pcháčem osetem zaujímá přední postavení mezi našimi vytrvalými plevele.

Byl zaznamenán i vyšší výskyt zemědělnímu lékařského zejména v prvním termínu hodnocení v roce 2012. To potvrzují Jursík et al. (2011), kteří uvádějí, že růst a vývoj zemědělnímu lékařského je velmi rychlý, a proto se v porostech plodin uplatňuje především na počátku vegetace. Později je většinou plodin přerůstán a utlačován.

Ve větším množství se na těchto místech objevovali ve všech termínech i truskavec ptačí a heřmánkovec nevonný. Kazda et al. (2010) potvrzují, že heřmánkovec nevonný postupně a nepřetržitě vzhází během celého roku.

ZÁVĚR

V porostu máku setého bylo na hodnocených pozemcích nalezeno celkem 24 rostlinných druhů.

V roce 2011 se vyskytovali na pozemku ve větším množství tyto druhy: *Anagallis arvensis*, *Atriplex patula*, *Atriplex sagittata*, *Capsella bursa-pastoris*, *Fallopia convolvulus*, *Chenopodium album*, *Polygonum aviculare*, *Tripleurospermum inodorum* a další.

V roce 2012 byly zjištěny tyto druhy: *Anagallis arvensis*, *Echinochloa crus-galli*, *Fumaria officinalis*, *Polygonum aviculare*, *Viola arvensis* a další.

Je zřejmé, že spektrum druhů plevelů se neustále mění a vyvíjí. Používáním herbicidů dochází k potlačování citlivých druhů a na uvolněné místo se rozšiřují druhy odolné. Pomocí této selekce se mění nejen spektrum druhů. Z tohoto důvodu se zjišťování aktuálního zaplevelení, jeho následné vyhodnocení a vhodná volba plevelohubného zásahu jeví jako nevyhnutelná agronomická povinnost.

LITERATURA

- DVOŘÁK J., 1998: *Praktikum z herbologie*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 88 s.
- DVOŘÁK J., SMUTNÝ V., 2003: *Herbologie: integrovaná ochrana proti polním plevelům*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 184 s.
- FÁBRY A., 1975: *Řepka, hořčice, mák a slunečnice*. 1. vyd. Praha: SZN, 358 s.
- JURSÍK J., HOLEC J., HAMOUZ P., SOUKUP J., 2011: *Plevelé – biologie a regulace*. 1. vyd. České Budějovice: Kurent. 232 s.
- KAZDA J., MIKULKA J., PROKINOVÁ E., 2010: *Encyklopedie ochrany rostlin*. 1. vyd. Praha: Profi Press. 400 s.
- KNEIFELOVÁ M., MIKULKA J., 2003: *Významné a nově se šířící plevelé*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací 4/2003. 59 s.
- KREJČÍŘ J., 1966: Poznámky k přednáškám, s. 5-124. In KREJČÍŘ J., DVOŘÁK J., *Základní agrotechnika (3. část – plevelé)*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 206 s.
- KUBÁT K., 2002: *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia. 927 s.
- MIKULKA J., CHODOVÁ D., KOHOUT V., MARTINKOVÁ Z., SOUKUP J., UHLÍK J., 1999: *Plevelné rostliny polí, luk a zahrad*. Farmář – Zemědělské listy. Praha. 160 s.
- TER BRAAK C. J. F.: CANOCO – A FORTRAN, 1998: program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [canonical] correspondence analysis (version 4.0.). Report LWA-88-02 Agricultural Mathematics Group. Wageningen, 1998.
- VAŠÁK J., 2010: *Mák*. 1. vyd. Praha: Powerprint. 336 s.

WATER REGIME OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) IN DIFFERENT MOISTURE CONDITIONS

VODNÍ PROVOZ KUKUŘICE V RŮZNÝCH VLÁHOVÝCH PODMÍNKÁCH

Klimesová J.¹, Středa T.¹, Kučera J.², Hajzler M.¹

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Environmental Measuring Systems, Turistická 5, 621 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jana.klimesova@mendelu.cz

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) water regime was monitored in the pot experiment in four variants of irrigation. The aim of the study was to identify the influence of air temperature, drought and intensity of solar radiation on the plant water regime. Potential evapotranspiration calculated according to Penman-Monteith transpiration equation was compared with actual plant transpiration in individual variants. Transpiration rate (sapflow) was measured by stem heat balance (SHB) method. Statistical significant correlation was found between the sapflow and global radiation or sapflow and air temperature respectively. Statistical significant difference between transpiration of plant growing under different irrigation variants was also confirmed.

Key words: sapflow, maize, water stress, transpiration

Acknowledgments: This research was supported by projects of the Faculty of Agronomy Mendel University in Brno: TP 10/2012.

ÚVOD

V případě nástupu nepříznivých podmínek (nedostatek vody, vysoké teploty, zasolení, chlad) je rostlina schopna regulovat hospodaření s vodou resp. transpiraci pomocí obranných mechanismů (uzavírání průduchů a zpomalení toku vody xylémem) a adaptovat se na danou situaci. Pokud je změna podmínek razantní nebo trvá příliš dlouho, jsou rostliny stresovány. V současnosti se jeví nedostupnost půdní vody resp. půdní sucho a vysoké teploty vzduchu jako aktuální problém provázející měnící se klima, protože abiotický stres je u zdravých rostlin hlavní příčinou snížení produkce.

Cílem práce bylo identifikovat nástup vodního stresu u kukuřice seté (*Zea mays*, L.) při různých úrovních zásobení vodou a kvantifikovat vliv měřených faktorů (teplota a vlhkost vzduchu, půdní vodní potenciál, vlhkost půdy, globální solární radiace) na výkon transpirace pomocí měření toku xylémové šťávy (sapflow).

MATERIÁLY A METODIKA

Nádobový pokus byl založen v přírodních podmínkách s omezením přístupu srážek. Ve čtyřech variantách byl na základě pedologického rozboru půdy udržován rozdílný závlahový režim na úrovni objemové vlhkosti půdy 23 % - silný stres; 25 % - středně silný stres; 30 % - mírný stres a 35 % - kontrola (plná vodní kapacita – 39 %, bod vadnutí – 21 %). Do každé nádoby o objemu 269 dm³ bylo vyseto 6 rostlin kukuřice seté (linie 2087 - šlechtitelský materiál CEZEA Čejč). U rostlin byly sledovány fenologické údaje a v pozdější fázi pokusu změny v habitu jedinců následkem působení stresu.

Transpirace byla monitorována pomocí kontinuálního měření toku xylémové šťávy (sapflow). Měřicí systém EMS 62 (EMS Brno, CZ) využívá metody „stem heat balance“ (SHB) (KUČERA *et al.*, 1977). SHB je nedestruktivní, citlivá metoda, založená na fyzikálních vlastnostech vody. Měřicí systém je složen z páru termočlánků, které jsou instalovány v určité vzdálenosti od sebe na stonku rostliny. V místě upevnění termočlánků je stonka po celém obvodu izolována válcovým těsněním, které zároveň plní funkci topného tělesa a změna teplot je snímána vnitřním čidlem. Celá sada je obalena radiačním krytem (obr. 1). Elektronický systém umožňuje udržovat proměnlivým výkonem (P) konstantní rozdíl teplot (dT) (přičemž P je pak přímo úměrný intenzitě proudu). Hodnoty transpiračního toku (Q) jsou udávány v jednotkách [kg.h⁻¹]. Měřeny byly vždy dvě rostliny z každé varianty od fáze BBCH 50 –metání lat až do fáze BBCH 89 – plná zralost.

Paralelně byly monitorovány (agro)meteorologické prvky: relativní vlhkost vzduchu [%] a teplota [°C] vzduchu v desetiminutovém chodu čidly HOBO RH Temp (Onset Computer Corporation) s přesností měření ± 0,7 °C a rozlišením ± 0,4 °C, objemová vlhkost půdy [%] automatickými elektromagnetickými čidly VIRRIB (AMET Velké Bílovice) s přesností měření ± 1 % ve čtvrt hodinovém kroku a teplota [°C] půdy odporovými snímači Pt100 ve čtvrt hodinovém kroku.

Globální solární radiace [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] byla měřena čidly LI-COR (LI-COR USA) v patnáctiminutovém kroku. Půdní vodní potenciál [-bar] byl detekován sádrovým bločkem s napojením na datalogger MicroLog SP (EMS Brno) v desetiminutovém kroku.

Pokusná data byla zpracována v programu MINI32 (EMS Brno) a statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Byla provedena korelační analýza, analýza variance a následné testování Tukeyovým LSD testem.

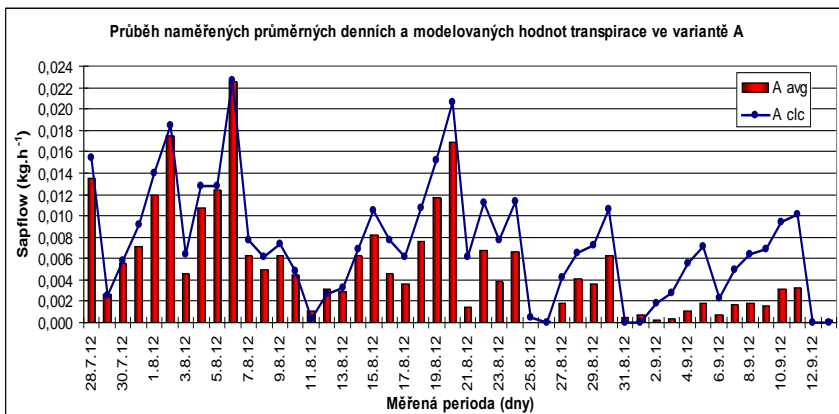
Obr. 1: Měření sapflow kukuřice čidly EMS 62



VÝSLEDKY A DISKUZE

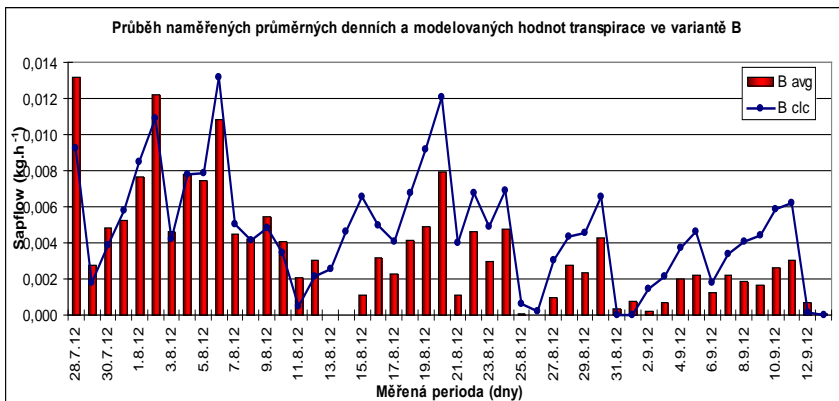
Ve variantě A (optimálně zavlažovaná varianta), je přirozený pokles intenzity transpirace viditelný až během zářijových dní, kdy dochází ke zrání, stárnutí rostlin a zvyšování sušiny (Obr. 2). Ve variantě B (lehký, dočasný stres) se projevil lehký stres až v polovině vegetace (Obr. 3). Průběh transpirace má obdobnou tendenci jako v případě varianty A, ale absolutní dosahované průměrné denní hodnoty transpirace jsou zřetelně nižší. Ačkoliv 30 % objemové vlhkosti půdy zdaleka nedosahuje bodu vadnutí na úrovni 20 %, vodní potenciál půdy klesal do silně záporných hodnot a rostliny trpěly suchem (měřeno pomocí sádrového bločku – EMS Brno).

Obr. 2: Průběh naměřených průměrných denních a modelovaných hodnot transpirace ve variantě A (kontrola – vlhkost půdy 35 % obj.)

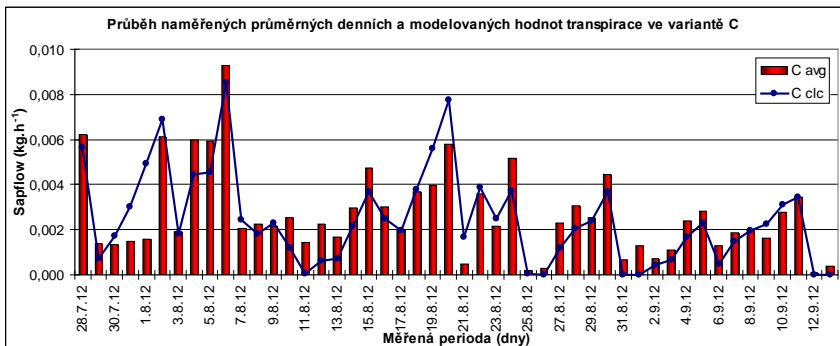


vysvětlivky: měřené hodnoty - avg
modelované hodnoty - clc

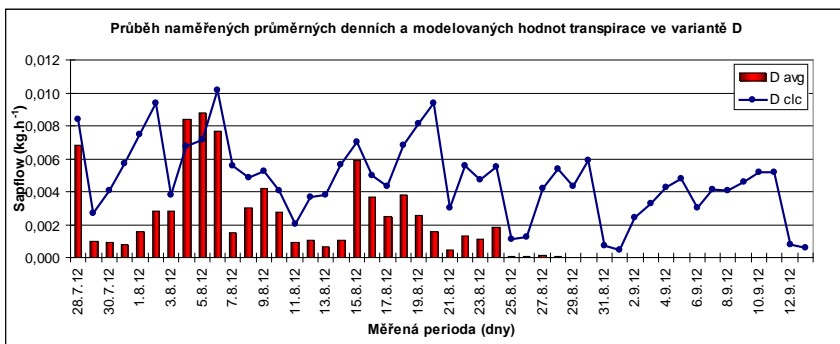
Obr. 3: Průběh naměřených průměrných denních a modelovaných hodnot transpirace ve variantě B (mírný stres - vlhkost půdy 30 % obj.)



Obr. 4: Průběh naměřených průměrných denních a modelovaných hodnot transpirace ve variantě C (střední stres – vlhkost půdy 25 % obj.)



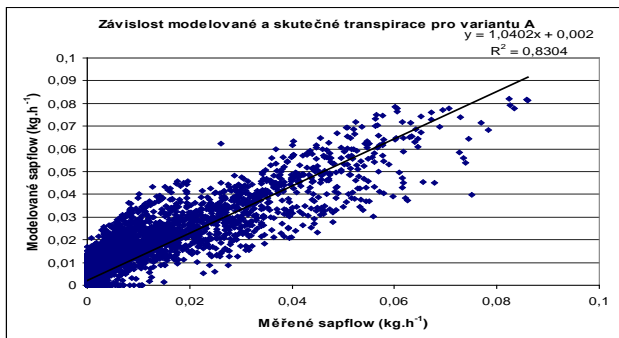
Obr. 5: Průběh naměřených průměrných denních a modelovaných hodnot transpirace ve variantě D (těžký stres – vlhkost půdy 23 % obj.)



Ve variantě C (Obr. 4) se projevil stálý vodní stres. Konstantní vlhkost na úrovni 25 % VVK?? v nádobách byla udržována už před instalací čidel pro monitoring sapflow. Rostliny tak byly stresovány po celou dobu vegetace a pravděpodobně se zde uplatnily některé obranné mechanismy. Absolutní hodnoty transpirace jsou nižší než ve variantě B ale nedochází k výraznějším výkyvům. Transpirace rostlin z nádoby D (Obr. 5; permanentní těžký stres suchem) svědčí o vodním stresu již v průběhu fáze kvetení. Změny byly pozorovány i na habitu rostlin, kdy docházelo k předčasnému usychání starších listů a stáčení mladých listů. Ačkoliv byly hodnoty transpirace zpočátku srovnatelné s variantou C, rostliny následkem stresu začaly odumírat už v průběhu měsíce srpna.

Průměrné denní hodnoty sapflow rostlin z každé varianty byly porovnány s hodnotami modelovaného sapflow. Modelová transpirace byla vypočtena na základě parametrizované rovnice vycházející z rovnice Penman-Monteith pro výpočet potenciální evapotranspirace a měřených meteorologických prvků (software MINI32). Parametrizace byla provedena z dat z období kvetení rostlin (BBCH 60). Závislost modelované a skutečné transpirace ve variantě A zobrazuje Obr. 6.

Obr. 6 regresní přímka lineární závislosti modelované a skutečné transpirace



Měřená perioda během doby vegetace kukuřice byla rozdělena do třech období dle projevu změn v transpiraci (vypočtená versus měřená) a fenologické fázi rostlin (27.7.–6.8.; 7.8.–24.8.; 25.8.–14.9.). Závislost transpirace na faktorech prostředí (globální radiace, teplota vzduchu, sytostní doplněk, objemová vlhkost půdy) byla hodnocena pro každé období zvlášť, aby byla těsněji postihnuta variabilita sledovaných prvků. Z Tab 1. lze pozorovat nejtěsnější závislost transpirace na teplotě vzduchu a radiaci u všech variant v období 1. V průběhu vegetace se závislost snižuje nejvíce u stresovaných variant, avšak v období 3 dochází k zvýšení závislosti na radiaci i teplotě. Průkaznou závislost radiace a sapflow rovněž uvádí OGUNTUNDE (2005). Závislost sapflow na uvedených meteorologických prvcích klesá se zvyšujícím se vodním stresem dle variant. Lze se domnívat, že se na variabilitě hodnot transpirace pak více podílí vodní deficit. Neprůkazné hodnoty korelačního koeficientu pro variantu D jsou způsobeny ukončením vegetace rostlin během období 3.

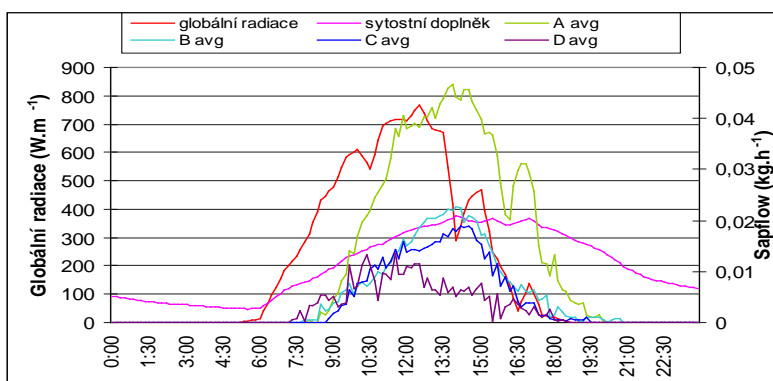
Tab.1. Tabulka korelačních koeficientů závislosti sapflow na teplotě a radiaci

Varianta	A		B		C		D	
	teplota	radiace	teplota	radiace	teplota	radiace	teplota	radiace
období 1	0,934**	0,877**	0,862**	0,886**	0,902**	0,730*	0,698*	0,497
období 2	0,627**	0,745**	0,537*	0,575*	0,516*	0,676**	0,030	0,536*
období 3	0,665**	0,624**	0,674**	0,754**	0,681**	0,805**	0,022	0,086

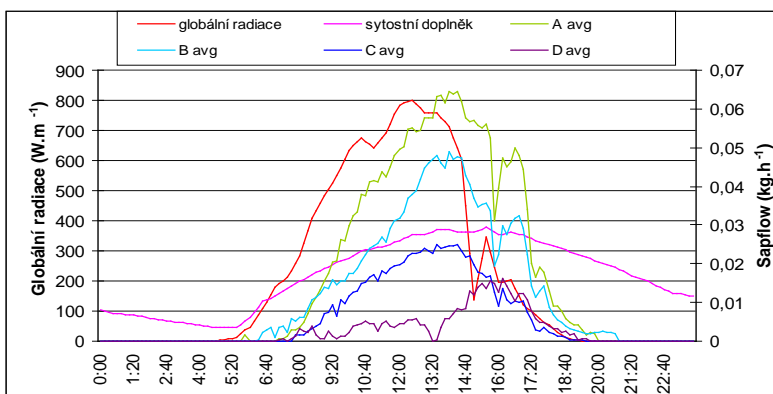
V ranních hodinách podporuje zvětšující se množství dopadajícího záření na listy transpiraci, zároveň však dochází ke zvyšování sytostního doplnku (vapor pressure deficit) VPD a rostlina se musí bránit nadměrnému výparu uzavíráním průduchů. Opožděná reakce toku xylémové šťávy na zvyšování radiace je způsobena nutností vypařit určité množství zásoby vody v listech pro dosažení rozdílu tlaků mezi atmosférou a listem a tedy vytvoření sacího potenciálu listů.

Denní chod průměrných hodnot transpirace dle variant, průběh globální radiace a sytostního doplnku dokumentuje obr. 7 a obr. 8. Lze pozorovat zřetelné rozdíly mezi variantami pokusu. Srovnatelné hodnoty transpiračního toku kukuřice pozorovali i GAVLOSKI *et al.* (1992).

Obr. 7: Denní průběh hodnot globální radiace, sytostního doplnku (VPD) a transpirace dle variant (2.8.2012)

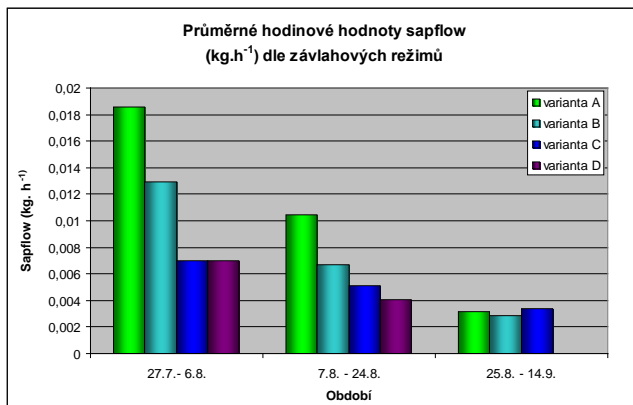


Obr. 8: Denní průběh hodnot globální radiace, sytostního doplnku (VPD) a transpirace dle variant (19.8.2012)



Průměrné denní hodnoty transpirace v jednotlivých variantách vykazovaly napříč variantami vysoce průkazný rozdíl ($P=0,01$). Pouze v počátku vegetace nebyl průkazný rozdíl mezi variantou A a B, což můžeme vysvětlovat podobnými vlhkostními podmínkami v období bez stresu suchem. Ve 3. období byl rozdíl mezi variantou B, C a D neprůkazný. To může být způsobeno stresem suchem a pokročilou fenologickou fází rostlin. Rozdíly mezi variantami ilustruje Obr. 9.

Obr. 9: Průměrné hodinové hodnoty transpiračního toku pro vláhové varianty ve třech obdobích.

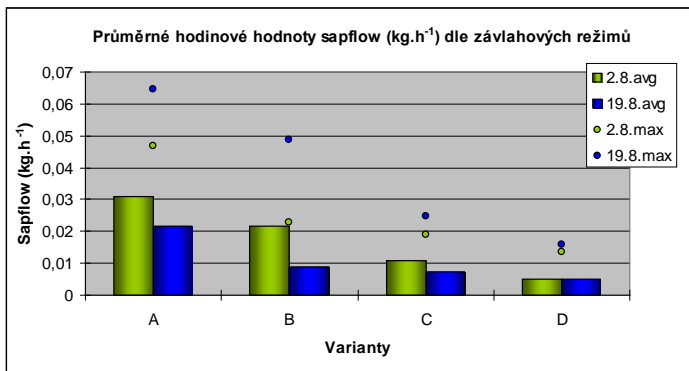


Průměrné hodnoty sapflow lze srovnávat buď mezi obdobími (intenzita transpirace vlivem růstové fáze rostliny...), anebo v rámci jednoho období mezi variantami, kdy byly podmínky vnějšího prostředí pro všechny varianty shodné.

Pokud výkon transpirace v kontrolní variantě A při objemové vlhkosti půdy 35 % (75 % využitelné vodní kapacity = VVK) označíme jako 100 %, tak při poklesu vlhkosti o 5 % objemových (varianta B = 50 % VVK) dosahují rostliny průměrně už jen 70 % výkonu rostlin ve variantě A. Vlhkost 25 % (25 % VVK) resp. 23 % objemových (15 % VVK) (v nádobě C resp. D) regulovala průtok cca o 62 %. V 2. období od 7.8 do 24.8. nastal pokles v absolutním množství transpirované vody za hodinu, ale poměr mezi variantami se nezúžil. Pouze rostliny z varianty C vykazovaly o necelých 50 % nižší průtok ve srovnání s variantou A. Vyrovnanější průběh transpirace v nádobě C znázorňuje obr. 4. Ve třetím období byla transpirace ve třech variantách téměř stejná (neprůkazné rozdíly). Variantu D nelze hodnotit.

Protože se jedná o nádobový pokus, bude mít objemová vlhkost půdy pravděpodobně větší podíl na ovlivnění transpirace než-li v polních podmínkách, protože kořenový systém je prostorově omezen velikostí nádoby.

Obr. 10: Průměrné hodinové hodnoty sapflow dle závlahových režimů



V rámci období 1 a období 2 byly vybrány dny (2.8 a 19.8.), kdy se průměrné hodnoty globální radiace (398,6 a 378,2 W.m⁻²), sytostního doplňku (2214,4 a 2039,1 Pa) a teploty (28,2 a 26,9 °C) výrazně nelišily (rozdíl 5 – 8 %) – Obr. 10. Rozdíly v sapflow jsou tedy pravděpodobně způsobeny stresem suchem, délkou jeho trvání a také stářím rostlin. Vliv zrání a senescence na průběh transpirace potvrzují PIVEC *et al.* (2009) v pokusech s řepkou v polních podmínkách a JARA *et al.* (1998) v pokusech s kukuřicí. Dne 19. 8. byl zaznamenán pokles průměrných hodinových sum transpirace ve variantě A o 30 %, ve variantě B o 59 %, v C o 32 %. Varianta D naopak transpirovala o 1 % více ve srovnání se stavem dne 2.9.2012. Absolutní hodnoty sapflow v jednotlivých nádobách jsou určitým dílem ovlivněny průduchovou vodivostí a metabolismem rostliny. Závažnost vodního stresu může měnit efektivitu využití vody rostlinou (WILKINSON, 2004) a rychlost životního cyklu (CHAVES *et OLIVEIRA*, 2004). Tyto domněnky lze ověřit podrobnějším rozбором jednotlivých pokusných rostlin. Zároveň lze míru stresu indikovat pomocí „molekulárních metod“.

ZÁVĚR

Měření transpiračního toku (sapflow) je jedním ze způsobů jak kvantifikovat využití/tok vody rostlinami v závislosti na faktorech prostředí. Metoda stem heat balance (SHB) byla zvolena jako přesná, citlivá metoda pro detekci sapflow u kukuřice s cílem zjistit míru ovlivnění transpirace vybranými meteorologickými prvky. Zároveň byl pozorován stres suchem a jeho vliv na průběh transpirace. Na základě rovnice pro výpočet potenciální evapotranspirace Penman-Monteith byla vypočtena potenciální transpirace pro 4 varianty závlahového režimu. Byly nalezeny vysoce průkazné hodnoty korelačního koeficientu pro sapflow a výkon globální radiace resp. sapflow a teplotu vzduchu. Současně byly potvrzeny statisticky vysoce průkazné rozdíly hodnot sapflow mezi všemi variantami. Přestože je transpirace silně ovlivněna výkonem radiace, teplotou vzduchu a sytostním doplňkem, projevil se vliv vodního deficitu. V závěru vegetace byla transpirace ovlivněna stárnutím rostlin. Můžeme předpokládat další důsledky stresu suchem na rostlinný

metabolismus a jeho projevy na růstu nadzemní části rostlin i kořenového systému. Pro přesnější identifikaci stresových projevů je nutné vyhodnotit biometrické charakteristiky pokusných rostlin a identifikovat nástup stresu i na molekulární úrovni.

LITERATURA

GAVLOSKI, J. E., WHITFIELD, G. H., ELLIS, C. R.: Effect of restricted watering on sap flow and growth in corn (*Zea mays* L.), *Canadian Journal of Plant Science*. 1992, vol. 72, p. 361-368

CHAVES, M. M., OLIVEIRA, M. M.: Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture, *Journal of Experimental Botany*, 2004, vol 55, p. 2365-2384

JARA, J., STODOLE, C.O., KJELGAARD, J.: Measurement of evapotranspiration and its components in a corn (*Zea mays* L.) field, *Agricultural and Forest Meteorology*. 1998, vol 92, p. 131-145

KUČERA, J., ČERMÁK, J., PENKA, M.: Improved thermal method of continual recording the transpiration flow rate dynamics. *Biologia Plantarum*. 1977, vol. 19, p. 413-420

OGUNTUNDE, P. G.: Whole-plant water use and canopy conductance of cassava under limited available soil water and varying evaporative demand, *Plant and Soil*. 2005, vol. 278, p. 371-383

PIVEC, J., BRANT, V., BEČKA, D.: The influence of weather conditions on the sap flow of *Brassica napus* L. during the fructification and maturation stages, *Ekológia*. 2009, vol. 28, p. 43-51

WILKINSON, S.: Water use efficiency and chemical signalling, In: Bacon M, ed. Water use efficiency in plant biology. Oxford: Blackwell Publishing. 2004, p. 75-112

JARA, J., STODOLE, C.O., KJELGAARD, J.: Measurement of evapotranspiration and its components in a corn (*Zea mays* L.) field, *Agricultural and Forest Meteorology*. 1998, vol 92, p. 131-145

THE IMPACT OF APPLICATION OF PIG MANURE FERMENTED WITH LARVAE OF HOUSEFLY ON YIELD PARAMETERS OF SUGAR BEET

VPLYV APLIKÁCIE PRASACIEHO HNOJA FERMENTOVANÉHO LARVAMI MUCHY DOMÁCEJ NA ÚRODOVÉ PARAMETRE REPY CUKROVEJ

Kmet'ová M., Kováčik P., Jančíh M.

Department of agrochemistry and plant nutrition, Faculty of agrobiology and food resources, Slovak university of agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: kmetova.maria0307@gmail.com

ABSTRACT

The pot experiment was established in vegetation cage of Department of agrochemistry and plant nutrition in the area of Slovak university of agriculture in Nitra (48° 18' N, 18° 06' E). Into 30 kg plastic containers was weighed 23.5 kg brown soil (Haplic Luvisol) which was taken from the top, 0.3 m, humic horizon of soil (locality Dolná Malanta).

Experiment had four treatments. Variant 1 was verificatory, unmanured variant. In variant 2, fermented pig manure was applied on soil in dose 4 t.ha⁻¹ in autumn. In variants 3 and 4 fermented pig manure was also applied, but in double dose, in comparison with variant 2 (8 t.ha⁻¹). In variant 3 a half of the amount of manure (4 t.ha⁻¹) was applied in autumn and a second half (4 t.ha⁻¹) in the spring, a month before sowing sugar beet. In variant 4 a full dose of manure (8 t.ha⁻¹) was applied once, in autumn.

The results obtained suggest, that with graded up dose of manure was also graded up yield of sugar beet, while one-off autumn application of manure, in dose 8 t.ha⁻¹, had the most significant impact on yield compared with divided doses on autumn and spring application. The highest content of sugar was detected in variant with the lowest application rate of manure and the lowest content of sugar was in variant, where yield was the highest. The application of manure didn't increase contents of α - amino nitrogen in sugar beet.

Key words: sugar beet, pig manure, fermentation, soil, root yield

Acknowledgments: VEGA no. 1/0591/13

ÚVOD

Hospodárske hnojivá (najmä maštalný hnoj, komposty, zelené hnojenie), ako pilier ekologickej výživy rastlín, sú zdrojom organických látok (celulóza, hemicelulóza, lignín, cukry, bielkoviny, aminokyseliny), z ktorých sa formuje pôdny humus. Každoročne nahrádzajú asi 40 % zmineralizovaných organických látok v pôde (Lacko - Bartošová, 2005).

Sú obnoviteľným zdrojom organických látok a živín v pôde. Priaznivo ovplyvňujú chemické, fyzikálne a biologické parametre pôdy. Zvyšujú úrodnosť pôdy, pomáhajú detoxikovať zvyšky pesticídov, dočasne znepriístupňujú niektoré ťažké kovy, kompenzujú jednostranné pôsobenie priemyselných hnojív a zvyšujú ich účinnosť, prispievajú k biologickej diverzite pôdy. Preto, ak sa má používaním konvenčných technológií pestovania rastlín dlhodobo udržať vysoká pôdna úrodnosť, musí sa rátať s vyššími vstupmi organických hnojív ako pri používaní pôdochranných technológií (Růžek, 2000).

Na Slovensku sa v porovnaní s okolitými štátmi venuje menšia pozornosť výskumu vplyvu spôsobov uskladnenia (fermentácie) hnoja na jeho kvalitu. V snahe prispieť k riešeniu tohto problému a problému skrátenia doby skladovania, t.j. fermentácie maštalného hnoja, ktorý trvá minimálne 6 mesiacov ak podstielku tvoria piliny, sa v predkladanom pokuse testoval vplyv prasacieho hnoja vyrobeného na pilinovej podstielke fermentovaného 7 dní larvami muchy domácej, na tvorbu fytomasy repy cukrovej

MATERIÁL A METODIKA

Nádobový pokus bol založený v októbri 2009 vo vegetačnej kletke Katedry agrochémie a výživy rastlín v areáli SPU v Nitre (48° 18' S, 18° 06' V). Do 30 kg nádob z umelej hmoty s priemerom 0,35 m bolo navážených 23,5 kg hnedozeme kultizemnej (Haplic Luvisol) odobratej z vrchného, 0,3 m humusového horizontu pôdy (lokalita Dolná Malanta). Agrochemické parametre použitej pôdy sú uvedené v tabuľke 1. Testovaný materiál bol suchý prasací hnoj fermentovaný 7 dní larvami muchy domácej. Vyrobený bol tak, že čerstvý hnoj vyhrnutý spod dojčiacich prasíc podstielaných smrekovými pilinami sa vo fermentačných halách rovnomerne uložil na police. Do neho sa vložili vajíčka muchy domácej, ktoré sa získali chovom múch. Vyliahnuté larvy spracovávali hnoj sedem dní, po ktorých sa následne zakuklili. Tesne pred kuklením sa mierne zvýšila teplota vo fermentačných halách, čím došlo k zakukleniu na povrchu hnoja. To umožnilo veľkú časť kukiel pozberať. Zber kukiel nebol z aspektu hnojenia rastlín nutný, avšak výrobu hnoja zefektívňoval. Týmto spôsobom vyrobený hnoj mal 30 – 40 % vlhkosť. Následne sa dosušil a pomlel. Konečný produkt svojím zafarbením, veľkosťou jednotlivých častí a obsahom vody pripomínal čierny čaj, bol sypký, hnedastej farby. Základné chemické zloženie a obsahy živín fermentovaného hnoja sú uvedené v tabuľke 1.

Pokus mal štyri varianty pri päťnásobnom opakovaní. Variant 1 bol kontrolný, nehnojený variant. Vo variante 2 bol do pôdy na jeseň zapravený fermentovaný prasací hnoj v dávke 4 t.ha⁻¹. Vo variantoch 3 a 4 bol aplikovaný taktiež fermentovaný hnoj, avšak v dvojnásobnej dávke v porovnaní s variantom 2 (8 t.ha⁻¹). Vo variante 3 sa polovičné množstvo hnoja (4 t.ha⁻¹) aplikovalo na jeseň a druhá polovica (4 t.ha⁻¹) sa aplikovala na jar, mesiac pred sejbou repy. Vo variante 4 bola celá dávka hnoja (8 t.ha⁻¹) aplikovaná jednorazovo na jeseň. Dávkou 8 t.ha⁻¹ sa aplikovalo cca 170 kg. ha⁻¹ N, čo je z hľadiska nitrátovej direktívy maximálna možná dávka dusíka do pôdy vo forme maštalného hnoja. Dávka 4 t.ha⁻¹ predstavuje polovičnú hodnotu maximálneho množstva N aplikovaného vo forme hospodárskych hnojiv určeného nitrátovou direktívou. Varianty pokusu sú uvedené v tabuľke 2.

Tab.1 Agrochemická charakteristika pôdy a hnoja

Materiál	N _{an}	P	K	Ca	Mg	S	N _t	C:N	C _{ox}	Org. lát.	pH
	mg.kg ⁻¹									%	KCl
Pôda	14,8	66,25	430	1010	360	17,5	1358	9,9:1	1,34	4,61	5,66
Ferm. hnoj	1030	4908	1630 3	5839	451	6628	19686	20,3:1	40,04	81,99	7,53

Ferm. hnoj – fermentovaný hnoj

Tab. 2 Varianty pokusu

Variant		Aplikačné dávky testovaného materiálu		
		Hnoj		Obdobie aplikácie
č.	Označenie	t.ha ⁻¹	g/nádoba	
1	0	-	-	-
2	FH ₁	4	111	Jeseň
3	FH ₁ + FH ₁	4 + 4	111 + 111	Jeseň + jar
4	FH ₂	8	222	Jeseň

FH – fermentovaný hnoj

Dávky fermentovaného hnoja boli prepočítané z hektárových aplikačných dávok na nádoby. V zmysle zásad výživárskych pokusov boli tieto dávky zvýšené päťnásobne. Pri dávke 4 t.ha⁻¹ fermentovaného hnoja dávku predstavovalo 22,2 g, čo pri päťnásobnom zvýšení bolo 111 g. Vo variantoch s dávkou 8 t.ha⁻¹ fermentovaného hnoja dávku predstavovalo 44,4 g, čo pri päťnásobnom zvýšení bolo 222g.

Sejba repy cukrovej odrody Antek sa vykonala v I. dekáde apríla 2010. Vysialo sa šesť semien na nádobu. Hĺbka sejby bola 0,02 m a po vysiatí semien sa povrch pôdy rovnomerne zasypal 0,5 kg kremičitého piesku. Počas celého obdobia vegetácie bol pokus pravidelne kontrolovaný, sledoval sa celkový zdravotný stav porastu a koncom júna sa nezávisle na počte vzídených rastlín nechali v nádobe len tri jedince, ktoré ostali do konca vegetácie.

Po zbere repy cukrovej sa zistila hmotnosť vážením, cukrnatosť buliev sa stanovila polarimetricky, obsah α – amino dusíka v mmol.100 g⁻¹ repnej kaše spektrofotometricky, ktoré sa stanovili na automatickej linke VENEMA (Selekt Bučany, a.s.).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Aplikácia fermentovaného hnoja štatisticky vysoko preukazne ovplyvnila tvorbu úrody buliev repy cukrovej. Obsah α – amino dusíka ovplyvnila preukazne a cukrnatosť nepreukazne (tab. 3).

Tab. 3 Vplyv zdrojov premenlivosti na vybrané kvalitatívne parametre

Zdroj premenlivosti	n	Úroda	Cukrnatosť	α – amino N
		F-vypočítané		
Variant	3	270,846⁺⁺	2,460	4,521⁺
Opakovanie	3	2,060	0,655	0,890
Nekotr. fakt.	9			
Celkom	15			

Potvrdil sa vzťah medzi dávkou hnoja a výškou úrody. Základná aplikačná dávka hnoja (var. 2) zvýšila úrodu o 148,5 % a dvojnásobná dávka (var. 4) až o 320,8 %, pričom sa zistilo, že z pohľadu výšky úrody buliev repy je vhodnejšie, ak sa hnoj aplikuje jednorazovo na jeseň ako v rozdelených dávkach (tab. 4). Rozdiel v úrode medzi variantom 3 a 4, t.j. rozdiel v úrode v závislosti od toho či sa hnoj aplikoval v dostatočnom časovom predstihu pred sejbou repy, alebo sa aplikoval aj na jar, poukazuje na skutočnosť, že organické hnojivá, ktoré sú v súčasnosti predávané v suchom stave, a to či už v práškovej alebo granulovanej forme, je vhodnejšie aplikovať na jeseň, t.j. s dostatočným časovým predstihom pred sejbou, či výsadbou plodín. Zistené zdôvodňuje nechotu farmárov rešpektovať odporúčania ekologov deliť aplikačné dávky hospodárskych hnojív z dôvodu ochrany podzemných vôd pred znečistením dusičnanmi. Pozitívny vplyv organických hnojív na výšku úrody repy cukrovej popisujú aj Haas et al. (2002).

Tab. 4 Vplyv variantov pokusu na úrodové parametre repy cukrovej

Variant		Úroda		Cukornatosť		α – amino N	
č.	označenie	g/nádoba	rel. %	%	rel. %	mmol.100 g ⁻¹ repy	rel. %
1	0	192,43 a	100,00	18,86 a	100,00	3,59 b	
2	FH ₁	285,68 b	148,46	19,73 a	104,61	3,43 a	
3	FH ₁ + FH ₁	422,97 c	219,80	19,58 a	103,82	3,43 a	
4	FH ₂	617,26 d	320,77	18,63 a	98,78	3,47 a	
HD _{0,05}		35,8915		1,1118		6,1139	
HD _{0,01}		51,5597		1,5972		0,1637	

Hodnoty cukornatosti dosiahnuté v bulvách dopestovaných na všetkých variantoch varírovali v rozpätí od 18,63 % (var.4) do 19,73 (var. 2) a korešpondovali s poznatkami Beringera et al. (1986), ktorí pri pestovaní riep (nádobový pokus) zaznamenali cukornatosť v rozpätí 15 % – 17,7 %. S rastom aplikačných dávok hnojív s obsahom dusíka zvyčajne dochádza k zníženiu cukornatosti v bulvách riep (Fecenko a Ložek, 2000). V našom pokuse vplyv hnoja na cukornatosť nebola významná. Napriek tomu sa zistilo, že ak sa hnoj aplikoval v malej dávke na jeseň, na úrovni cca 85 kg.ha⁻¹ N, potom vplyv na cukornatosť bol mierne pozitívny (var. 2 a 3). Jednorazová maximálne prípustná dávka hnoja na úrovni 170 kg.ha⁻¹ N aplikovaná na jeseň takmer vôbec neovplyvnila obsah cukornatosti i keď sa pozorovala tendencia znížiť obsah cukru v bulvách.

Uvedené poukazuje na fakt, že i maximálne povolené dávky hnoja nemusia negatívne ovplyvniť kvalitu pestovaných rastlín, pričom tieto dávky, ak sú racionálne zdôvodnené, výrazne zvyšujú úrodu pestovaných rastlín.

Kvalita repy cukrovej sa v Európe a prirodzene, že aj na Slovensku posudzuje aj podľa obsahu α – amino dusíka (Mahn a Hoffman, 2001). Táto forma dusíka v repe cukrovej sa považuje za škodlivý dusík (Hoffman a Märlander, 2005).

Obsah α – amino dusíka sa v prezentovanom pokuse pohyboval v rozsahu od 3,43 (var. 2 a 3) do 3,59 (var. 1) mmol.100 g⁻¹ repy. Macák et al. (2007) zaznamenali vo variantoch s aplikovaným maštalným hnojom, samostatne a spolu s NPK hnojivami, vyššie hodnoty α – amino dusíka (4,26 – 7,98 mmol.100 g⁻¹) a podobne aj Hanáčková et al. (2008) pri aplikácii samotného hnoja zaznamenali vyššie hodnoty α – amino dusíka (4,27 – 7,68). V našom pokuse štatisticky preukazne najvyšší obsah α – amino dusíka bol zaznamenaný v kontrolnom, nehnojenom, variante (tab. 3). Pozoruhodné je zistenie, že použitý suchý prasací hnoj vyrobený na pilinovej podstielke, sedem dní fermentovaný larvami muchy domácej, mal pozitívny vplyv na obsah α – amino dusíka. Znižoval ho. Zistené potvrdzuje naše predchádzajúce zistenie, že i maximálne povolené dávky hnoja nemusia negatívne ovplyvniť kvalitu pestovaných rastlín, naopak, môžu ju zlepšiť.

ZÁVER

Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo, že aplikácia fermentovaného prasacieho hnoja larvami muchy domácej štatisticky vysoko preukazne zvyšovala úrodu buliev repy cukrovej. So stupňovanou dávkou hnoja sa zvyšovala úroda buliev repy, pričom jednorazová jesenná aplikácia hnoja mala na úrodu výraznejší vplyv ako rozdelenie dávky na jesennú a jarnú aplikáciu. Výsledky poukazujú na skutočnosť, že pri aplikácií organických hnojív, ktoré sú v súčasnosti predávané v suchom stave, a to či už v práškovej alebo granulovanej forme, je vhodnejšia ich aplikácia na jeseň, t.j. s dostatočným časovým predstihom pred sejbou, či výsadbou plodín.

Použitie fermentovaného prasacieho hnoja pri pestovaní repy cukrovej v našom pokuse, neprekázalo významný vplyv na zvýšenie cukrnatosti. Napriek tomu sa zistilo, že ak bol hnoj aplikovaný v malej dávke na jeseň, vplyv na cukrnatosť bol mierne pozitívny. Jednorazová maximálne prípustná dávka hnoja aplikovaná na jeseň takmer vôbec neovplyvnila obsah cukrnatosti buliev repy cukrovej.

Fermentovaný hnoj nezávisle na dávke a termíne aplikácie nezvyšoval resp. znižoval obsah škodlivého α – amino dusíka v buľvách riep. Štatisticky preukazne najvyšší obsah α – amino dusíka bol zaznamenaný v kontrolnom, nehnojenom, variante. Pozoruhodné je zistenie, že použitý suchý prasací hnoj vyrobený na pilinovej podstielke, sedem dní fermentovaný larvami muchy domácej, mal pozitívny vplyv na obsah α – amino dusíka. Znižoval ho.

Zistené výsledky potvrdzujú, že i maximálne povolené dávky hnoja nemusia negatívne ovplyvniť kvalitu pestovaných rastlín, naopak, môžu ju zlepšiť.

Príspevok vznikol za finančnej podpory grantového projektu VEGA č. 1/0591/13.

LITERATÚRA

BERINGER, H. – KOCH, K. – LINDHAUER, M. G. 1986. Sucrose accumulation and osmotic potentials in sugar beet at increasing levels of potassium nutrition. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 37, issue 3, p. 211 – 218. 1986 ISSN 1097-0010

FECENKO, J. – LOŽEK, O. 2000. Výživa a hnojenie poľných plodín, SPU v Nitre a Duslo a.s. Šála, 2000, 452 s. ISBN 80-7137-777-5

HAAS, G. – BERD, M. – KÖPKE, U. 2002. Nitrate leaching: comparing conventional, integrated and organic agricultural production systems. In *Agricultural Effects on Ground and Surface Waters: Research at the Edge of Science and Society*, IAHS, Wageningen, 2002.

HANÁČKOVÁ, E. – ŽÁK, Š. – MACÁK, M. 2008. Vplyv úrody buliev a cukrnatosti repy cukrovej na teoretickú produkciu etanolu a energie pri rôznom hnojení. In *Listy cukrovárnícké a řepářské*, roč. 126, č. 12, 2008, s. 340 – 343 ISSN 1210-3306

HOFFMAN, C. - MÄRLÄNDER, B. 2005. Composition of harmful nitrogen in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) – amino acid, betaine, nitrate – as affected by genotype and environment. In *European Journal of Agronomy*, vol. 22, p. 255 – 265, 2005. ISSN 1161-0301

IVANIČ, J. – HAVELKA, B. – KNOP, K. 1984. Výživa a hnojenie plodín, 2. vyd. Bratislava: Príroda, 1984. 482 s. 64-045-84

LACKO-BARTOŠOVÁ, H. et al. 2005. Udržateľné a ekologické poľnohospodárstvo, SPU Nitra, 2005, s. 555, ISBN 80-8069-556-3

MACÁK, M. – KOVÁČ, K. – ŽÁK, Š. 2007. The effect of nitrogen input on polarised sugar production and qualitative parameters of sugar beet. In *Journal of Central European Agriculture*, vol. 8, no. 1, p. 63 – 72, 2007. ISSN 1332-9049

MAHN, K. – HOFFMAN, C. – MÄRLÄNDER, B. 2002. Distribution of quality components in different morphological sections of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In *European Journal of Agronomy*, vol. 17, p. 29 – 39, 2002. ISSN 1161-0301

MAHN, K. – HOFFMAN, C. 2001. Berechnungsansätze zur Schätzung des Melasseszuckeranfalls von qualitativ heterogenen Zuckerruben. *Zuckerind* 126, ISSN 120-128, 2001

RŮŽEK, P. 2000. Využití orebných a bezorebných technologií zpracování půdy při pěstování rostlin, 1. vyd. Praha: VÚRV, 2000. ISBN 80-238-5334-1

CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF GENETIC RESOURCES OF MILK THISTLE [*SILYBUM MARIANUM* (L.) GAERTN.]

POPIS A HODNOCENÍ GENOVÝCH ZDROJŮ OSTROPESTŘECE MARIÁNSKÉHO [*SILYBUM MARIANUM* (L.) GAERTN.]

Kolářková P., Růžičková G.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: pavla.kolackova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of the work was to evaluate the characters according to the minimal set of descriptors, which will be developed. Genetic resources are evaluated by the classifiers, numeric dials, for descriptive part. These numeric dials create the rules for the evaluation of the phenotypic traits. Four genetic resources of Milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) were evaluated on one site in South Moravian region (Znojemsko) in chosen characters: 'Beograd', 'De Prahova', 'BG' and 'Silyb'. This work summarizes the methodology and compares the variability of the chosen characters. Additional aim was to obtain viable seeds for the experiments in next year.

Key words: *Silybum marianum*, genetic resources, minimal set descriptors

Acknowledgments: This work was realized thanks to the Crop Research Institute, v.v.i., Department of Gene Bank, workplace Olomouc.

ÚVOD

Ostropěstěc mariánský (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) je jednoletá, výjimečně i dvouletá, léčivá rostlina patřící do rozsáhlé čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*). Původně pochází z oblasti Středozevního moře, často zplaňuje po celé Evropě i v horských oblastech. Plodina není náročná na prostředí, vhodné jsou ŘVO (Moudrý 2011).

Podle Situační a výhledové zprávy z roku 2010 se pěstební plochy ostropěstěce neustále zvyšují. V roce 2001 byl ostropěstěc pěstován na 1 500 ha s výnosem 0,62 t / ha a podle posledního šetření z roku 2009 byla tato plodina pěstována na 3 500 ha s udávaným výnosem 0,68 t / ha.

Význam pěstování spočívá hlavně v jeho farmaceutickém využití. Slouží k prevenci a léčení jater, žlučníku a trávicího ústrojí. Drogou jsou plody (*Cardui mariae fructus*), které obsahují účinné látky ze skupiny flavonoidů, tzv. silymarinový komplex (silybin, silydianin, silychristin, taxifolin), dále obsahuje histamin, hořčiny, sacharidy, oleje (kyselinu linolovou, linolenovou). Další možné uplatnění je v kosmetickém průmyslu a v krmivářství, kde se využívá olej jako vedlejší produkt lisování semen (Růžičková a kol. 2011, Habán a kol. 2009).

Pro podrobný popis genetických zdrojů jsou vytvářeny tzv. klasifikátory, číselníky pro část popisnou, které určují pravidla pro hodnocení projevů popisných znaků. Klasifikátory jsou rodově nebo druhově specifické (Dotlačil a kol. 2009). Schvalování deskriptorů v ČR probíhá dále uvedeným způsobem. U druhů rostlin, pro které nejsou mezinárodní klasifikátory, které se běžně používají pro hodnocení je vypracováním minimálních sad popisných deskriptorů pověřen kurátor příslušné kolekce rostlin ve spolupráci se správcem databáze EVIGEZ (Faberová 2011). Připravené materiály se jednou ročně předkládají ke schválení Radě genetických zdrojů ČR (Dušková 2011).

MATERIÁL A METODIKA

V rámci hodnocení byly sledovány čtyři genové zdroje ostropěstěce mariánského (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.): Bělehrad (krajová odrůda, zdroj Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Bělehrad, Srbsko), De Prahova (odrůda, Rumunsko, zdroj Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Rakousko), BG (krajová odrůda, zdroj Institute of Plant Genetic Resources, K. Malkovo, Bulharsko), Silyb (registrovaná odrůda, IREL, s.r.o., ČR).

Pokusná lokalita se nachází v katastrálním území obce Citonice, v okrese Znojmo v Jihomoravském kraji. Oblast je situována v nadmořské výšce 360 m. n. m. Klimatický region je charakterizován jako teplý, mírně suchý. Sklon terénu je s převahou rovinný. Půda je hluboká až středně hluboká, především bez skeletu (Koláčková 2011).

Od každého genotypu bylo vyseto přímo na pozemek 20 rostlin, ve sponu $0,50 \times 0,25$ m. Termín setí byl 14. 04. 2012, u genotypu De Praha 21. 04. 2012 z důvodu zpožděné dodávky osiva. Porost byl sledován každý týden. Rostliny byly během vegetace každodenně zalévány, dále byla provedena okopávka (3 x za vegetaci). Ošetření proti škůdcům bylo zaměřeno proti napadení mšicemi (PIRIMOR 2 x 25 g, v dávce 1,5 g / 2 – 3 l vody, aplikováno 2 x na napadené rostliny) a proti plzáku španělskému (VANISH SLUG PELLETS, 1,5 – 3 g, aplikováno po 7 dnech po celou dobu vegetace).

Deskriptor pro ostropestřec v rámci ČR nebyl zatím publikován. Neexistuje ani deskriptor v rámci UPOV. V tomto příspěvku uvádím pouze vybrané morfologické znaky. Hodnocení znaků na rostlinách probíhalo vizuálně podle navrhovaných znaků na deskriptor.

Vybrané hodnotící znaky:

- 1) Vybrané morfologické znaky: rostlina (habitus, výška, šířka rostliny, intenzita větvení), list (délka, šířka, tvar, stupeň mramorování), květenství (délka květní lodyhy, šířka úboru, počet úboru, barva květu), semeno – nažka (délka nažek, šířka nažek).
- 2) Biologické znaky: sledování porostu a vegetační doby.
- 3) Hospodářské znaky: výnos semen na jednu rostlinu.
- 4) Biochemické znaky (neuvádíme).

Biochemické znaky budou hodnoceny vybranými referenčními metodami po kompletním popisu nažek. Paralelně byly v roce 2012 na pracovišti Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i., Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin v Olomouci rozmnoženy další genetické zdroje ostropestřce. V roce 2013 bude vyseto 15 genetických zdrojů na dvou lokalitách a budou hodnoceny již schváleným deskriptorem pro hodnocení genetických zdrojů v České republice.

Následující fotografie demonstrují způsob hodnocení znaků na ostropestřci. Sklizeň probíhala ručně (pomocí zahradních nůžek) podle genotypů a jednotlivých rostlin. Nejdříve byly sklizeny terminální úborů do papírových sáčků. Následně byla opět zvlášť semena ručně vydrcena z úborů.

Obrázek 1 *Ostropěstřec mariánský* (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) - měření délky listu



Foto: Koláčková 2012

Obrázek 2 *Ostropěstřec mariánský* (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) - měření šířky listu



Foto: Koláčková 2012



Foto: Koláčková 2012



Foto: Koláčková 2012

Obrázek 5 *Ostropěstřec mariánský* (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) - hodnocení barvy květu podle RHS



Foto: Koláčková 2012

Obrázek 6 *Ostropěstřec mariánský* (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) - měření šířky semen



Foto: Koláčková 2012

VÝSLEDKY A DISKUZE

Porost ostropestřce mariánského byl již ve fázi vzejití silně nevyrovnaný. Semena nestejněměrně klíčila a muselo být provedeno dosažení sazenic ze sadbovače. Tyto problémy se týkaly všech genotypů kromě genotypu De Prahova.

Průběh povětrnostních podmínek rovněž ovlivnil růst a vývoj rostlin. Teplé, vlhké počasí způsobilo rozvoj houbových chorob (padlí a *Septoria silybi*). Kořeny rostlin byly předány k provedení diagnostiky. Porost z velké míry poničil přívalový déšť s krupobitím (6. 8. 2012). Růst a vývoj rostlin ovlivnil negativně i atak škůdců (mšic a plzáka španělského).

Jako příklad výsledků měření uvádíme tabulku hodnotících znaků s průměrnými hodnotami znaků.

Ostropestřec mariánský (Silybum marianum [L.] Gaertn.) – průměrné hodnoty hodnocených znaků

Průměrné hodnoty	Hodnotící znaky																	
	rostlina				list				květenství			semena - nažka			porost a délka vegetační doby			
Genové zdroje	habitus	výška rostl. (cm)	šířka rostl. (cm)	intenzita větvení (dle stupnice)	délka (cm)	šířka (cm)	tvár (dle stupnice)	stupeň mramor. (dle stupnice)	délka květní lodyhy (cm)	úbor - šířka (cm)	úbor - počet	květ. - barva květu (RHS)	délka (mm)	šířka (mm)	výnos semen g/na jednu rost.	dny od výsevu po zač. tv. květ. lod.	dny od výsevu po zač. květ. terminal. ú.	dny od výsevu po zralost terminal. ú.
Bělehrad	vzpřímený	97,84	55,97	3,84	35,63	13,82	7	5	59,71	7,18	9	77A purple group	7,04	3,08	7,38	82	97	132
De Prahová	vzpřímený	71,1	39,45	3	26,03	9,43	5	5	20,46	5,28	2	77A purple group	6,82	2,92	1,11	77	94	133
BG	vzpřímený	77,3	41,75	3,3	24,03	9,13	7	5	46,67	7,05	5	77A purple group	6,26	2,62	1,37	84	99	134
Silyb	vzpřímený	71,94	48,44	4	28,00	12,59	7	5	51,93	6,97	10	77A purple group	6,63	2,84	1,82	75	89	124

ZÁVĚR

V pokusu jsem se zaměřila na hodnocení čtyř odlišných genotypů ostropestřece mariánského [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], které jsem hodnotila podle návrhu na připravovaný deskriptor. Ostropestřec byl pěstován v lokalitě jižní Moravy jeden pěstitelský rok.

Z výsledků vyplývají tyto skutečnosti:

- 1) Hlavním cílem v dalších letech bude zjistit variabilitu genetických zdrojů v jednotlivých znacích, morfologických, biologických a biochemických. Biochemické znaky jsou spojeny s kvalitou plodů využívaných pro farmaceutické a kosmetické zpracování. Perspektivní genetické zdroje budou využity ve šlechtění.
- 2) Obecně byly porosty od fáze vzházení silně nevyrovnané, a tím byly některé rostliny zpožděné ve vývoji. Mezi faktory působící na hodnocené znaky lze zařadit např. průběh povětrnostních podmínek, napadení patogeny a škůdci.
- 3) Většina semen z jednotlivých genotypů jeví špatnou kvalitu, i přesto budou stanoveny biochemické zkoušky a bude vybráno dozrálé osivo do dalšího pokusného roku.

LITERATURA

HABÁN, M., OTEPKA, P., KOBIDA, L., HABÁNOVÁ, M., (2009): Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic marcoregion. *Horticultural Sciences*, 36 (2): 25 – 30.

KOLÁČKOVÁ, P., (2011): Kvalitativní parametry zdravých a napadených rostlin ze skupiny LAKR. Diplomová práce, Mendelova univerzita, Brno.

MOUDRÝ J., (2011): Alternativní plodiny. 1 vyd., Praha: Profi Press, 142 s. ISBN 978-80-86726-40-3.

RŮŽIČKOVÁ, G., FOJTOVÁ, J., SOUČKOVÁ, M., (2011): The yield and quality of milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] seed oil from the perspective of environment and genotype - a pilot study. *Acta fytotechnica et zootechnica*. sv. 14, č. 1, s. 9-12. ISSN 1335-258X.

Internetové zdroje:

BRANŽOVSKÝ, I., PŘIBYLOVÁ, Z., BUCHTOVÁ, I., Z: Situační a výhledová zpráva léčivé, aromatické a kořeninové rostliny, Ministerstvo zemědělství, 12/10. Dostupné on – line [cit. 2012 – 10 - 03]:

<http://eagri.cz/public/web/file/114053/SVZ_2010_LAKR.pdf>

DOTLAČIL, L., FABEROVÁ, I., HOLUBEC, V., STEHNO, Z., Z: Rámcová metodika Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro – biodiverzity. Rada genetických zdrojů – Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha – Ruzyně 2009. Dostupné on – line [cit. 2012 – 10 - 03]:

<http://genbank.vurv.cz/genetic/nar_prog/Dokumenty/Methodika_2009.pdf>

Ústní sdělení:

DUŠKOVÁ 2011

FABEROVÁ 2011

THIOBACILLUS BACTERIA IN CEREALS PROTECTION

BAKTERIE THIOBACILLUS V OCHRANĚ OBILNIN

Kovárník J.¹, Bezděková K.¹, Šafránková I.¹, Ryant P.², Malachová A.¹, Cerkal R.¹

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jaromir.kovarnik@mendelu.cz, radim.cerkal@mendelu.cz

ABSTRACT

The laboratory experiment evaluated the effectiveness of the Aqua Almus[®] biopreparation containing bacteria of *Thiobacillus* sp. on the elimination of the natural microflora (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Rhizopus*) on the grains of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and spring barley (*Hordeum vulgare* L.). The increasing concentration of the preparation (1, 2, and 4%) applied on the grains resulted in the decline in ratios of contaminated/non-contaminated grains compared to control samples treated by water solutions by 20, 10, and 42% in wheat, respectively, and by 28, 34, and 40% in barley, respectively. Mainly the saprophytic microflora (*Cladosporium*, *Epicoccum* and *Nigrospora*) was eliminated; the occurrence of pathogens with mycelium that penetrates the inner grain tissues (*Drechslera*, *Fusarium*) was not reduced. This fact is possibly the result of the short duration of the exposition of grains to the active substance of the preparation (especially in case of the hulled barley) and the chosen method of application (spraying/soaking). In upcoming research, effectiveness of the preparation will be tested on grains artificially infected by isolates of pathogens and vitality of germinating plants under modified environmental conditions will be studied.

Key words: biopesticides, pathogens, antagonism, seed treatment, barley, wheat, grain, Aqua Almus[®]

Acknowledgment: The paper was supported by the QI111B044 project titled "Comprehensive strategy for decreasing a negative impact of *Fusarium* spp. toxicogenic fungi infection in cereals and their derived products" that was financed by the National Agency for Agricultural Research and the European Social Fund project called "The excellence of Ph.D. studies at AF MENDELU for the following scientific European career" No. CZ.1.07/2.3.00/20.0005.

INTRODUCTION

Plant nutrition and protection is currently being promoted by chemical inputs – fertilizers and pesticides. In the Czech Republic, plant nutrition is mainly covered by mineral fertilizers. It is estimated that on average 94 kg/ha of macronutrients (NPK) were applied over the last eleven years whereas the application of organic fertilizers was far lower, ranging between 50–60 kg/ha (Budňáková *et al.* 2011). Similarly, when comparing the use of conventional pesticides to the average application of biological preparations in the last two years, treatment with conventional pesticides (1–1.8 kg or l/ha) prevailed over the biological one (0.1 kg/ha) more than ten times. According to the Czech Ministry of Agriculture, the Czech Republic belongs to the countries with a very low pesticide usage; however, this is more a result of the economic situation in the agricultural sector rather than usage of bioactive substances instead of chemical preparations.

Although conventional fertilizers and pesticides allow, in most cases, sufficient nutrition and protection of plants, a long-term usage of these agrochemicals may result in undesirable contamination of soil as well as plants by chemical residues. Therefore the preparations based on biological agents are becoming of high interest not only for the sector of ecological agriculture but also for other sectors (Bailey *et al.* 2010). This fact was also confirmed by the data provided by the State Phytosanitary Administration. Altogether 38,240 ha of crops were treated by biological substances (microbial and macrobial) in the Czech Republic in 2011, which is almost by 12,000 ha more than in the previous year (increase by 46%). The country that is currently considered as a leader in the use of biological preparations among the EU countries is Holland. Worldwide, the market with biopreparations reached approx. 2% (750 mil. USD; Bt alone 375–450 mil., neem based products 20–30 mil., all other biopesticides as microbials, pheromones, plant extracts etc. about 300–350 mil.) of the whole market with agrochemicals (35–37 bil. USD; Mehta 2012).

The purpose of biopesticide application is to eliminate the occurrence of certain pests or pathogens by means of natural antagonism among microorganisms. As fungicide plant protection, preparations based on e. g. *Pythium oligandrum*, *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. are used. Riungu *et al.* (2008) proved the antagonistic effect of *Epicoccum* sp., *Bacillus* sp., *Alternaria* sp. and *Trichoderma* sp. on *Fusarium graminearum*. The effect is based on the reduction of the growth of the pathogen's colonies on wheat plants by 49–64%. Wheat variants inoculated by *Alternaria* sp. showed decrease of deoxynivalenol in the grains by 91%. The presence of *Bacillus* sp., *Epicoccum nigrum* and *Aspergillus niger* on the wheat leaves reduced the germination capacity of Blotch of Wheat's (*Septoria tritici*) spores by 30–88% and spores of *Drechslera tritici-repentis* by 40–96%. The antagonistic effects of many other microorganisms are currently being evaluated.

The aim of this study was to verify the effectiveness of biological preparation containing *Thiobacillus* bacteria in terms of inhibition of pathogen infection in chemically untreated grains of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and spring barley (*Hordeum vulgare* L.).

MATERIAL A METHODS

Biological material and experimental conditions

Chemically untreated winter wheat (Mulan variety) and spring barley (Prestige variety) grains were used in the laboratory experiment. Ten grains from each species were placed on moist filtration paper into Petri's dishes in five replications. The seed was treated by liquid bacterial preparation Aqua Almus® (content of bacteria *Thiobacillus thiooxidans* and *T. ferrooxidans* 1.2 mil./ml of solution, pH 2.2) of escalating concentration of 1, 2 and 4%. Detection of microorganisms was carried out by microscopic means after five days of cultivation (20–23 °C, light regimen 12/12 hrs).

RESULTS

A microflora of winter wheat grains was represented by several genera (Tab. 1), namely *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* (Fig. 1a), and *Nigrospora*. Concerning the pathogen genera occurred in spring barley grains (Tab. 2), *Alternaria* (Fig. 1b), *Cladosporium* (Fig. 1c), *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Nigrospora* (Fig. 1d), and *Rhizopus* were identified. In case of both crop species, the effectiveness of the Aqua Almus® preparation was proved by decrease of the number of pathogens occurring on the surface of naturally infected grains. However, the antagonistic effects of *Thiobacillus* of the Aqua Almus® seemed to be significant only for saprophytic genera (*Cladosporium*, *Epicoccum*, and *Nigrospora*) which were eliminated. The extent of antagonism among *Thiobacillus* and saprophytic genera was dependent on the concentration of the Aqua Almus®. The increasing concentration of the preparation (1, 2, and 4%) applied on the grains resulted in the decline in ratios of contaminated/non-contaminated grains compared to control samples treated by water solutions by 20, 10, and 42% in wheat, respectively, and by 28, 34, and 40% in barley, respectively. On the other hand, the Aqua Almus® concentration of 1 and 2% led to the increase of the number of saprophytic species of *Alternaria* genus (*A. tenuissima*, *A. alternata*) found on wheat grains. Their presence has no negative impact on germinating plants. Saprophytic representatives may colonize the cereal grains and create a competitive environment for other cereal grain pathogens and consequently inhibit their development. The spores and mycelium of saprophytic *Alternaria* spp. may occur on the grain surface as well as inside grains and their presence is signaled by e. g. blackish colouring of the outer layers of the grains.

The occurrence of pathogens with mycelium penetrating into the inner grain tissues (*Drechslera*, *Fusarium*) was not eliminated by the Aqua Almus®. These pathogens were identified on the grains even after treatment by concentrations higher than the recommended one (0.15%). No effects on these pathogens could be caused by the short exposition time of the grains to the active substance or

by way of application (spraying instead of soaking). In particular, in case of barley, the used method of application is a key factor because the most pathogens occur between the lemma and the outer layers of the grain. Therefore, the active substances (*Thiobacillus* bacteria) could not effectively penetrate through the outer layers, and thus compete with present pathogens.

Fig. 1 Pathogens of Alternaria, Cladosporium, Fusarium, and Nigrospora sp. on cereal grains of wheat and barley

a) Fusarium sp.



b) Alternaria sp.



c) Cladosporium sp.



d) Nigrospora sp.



Photos by Šafránková

Tab. 1 Spectrum of pathogens on winter wheat after cultivation of grains treated by the Aqua Almus® preparation (containing *Thiobacillus thiooxidans* and *T. ferrooxidans*)

Concentration	Pathogens	% of grains with pathogens occurrence
Control	<i>Alternaria</i>	20
	<i>Alternaria+Cladosporium</i>	2
	<i>Alternaria+Epicoccum</i>	2
	<i>Bipolaris</i>	4
	<i>Cladosporium</i>	10
	<i>Epicoccum</i>	8
	<i>Fusarium</i>	4
	Without microflora occurrence	50
1%	<i>Alternaria</i>	20
	<i>Alternaria+Epicoccum</i>	4
	<i>Cladosporium</i>	6
	Without microflora occurrence	70
2%	<i>Alternaria</i>	30
	<i>Alternaria+Cladosporium</i>	4
	<i>Bipolaris</i>	4
	<i>Nigrospora</i>	2
	Without microflora occurrence	60
4%	<i>Alternaria</i>	8
	Without microflora occurrence	92

Tab. 2 Spectrum of pathogens on spring barley after cultivation of grains treated by the Aqua Almus[®] preparation (containing *Thiobacillus thiooxidans* and *T. ferrooxidans*)

Concentration	Pathogens	% of grains with pathogens occurrence
Control	<i>Alternaria</i>	22
	<i>Alternaria</i> + <i>Cladosporium</i>	2
	<i>Cladosporium</i>	10
	<i>Drechslera graminea</i>	10
	<i>Epicoccum</i>	2
	<i>Nigrospora</i>	2
	Without microflora occurrence	52
1%	<i>Alternaria</i>	2
	<i>Cladosporium</i>	6
	<i>Drechslera graminea</i>	8
	<i>Drechslera graminea</i> + <i>Fusarium</i>	2
	<i>Rhizopus</i>	2
	Without microflora occurrence	80
2%	<i>Drechslera graminea</i>	14
	Without microflora occurrence	86
4%	<i>Alternaria</i>	2
	<i>Cladosporium</i>	2
	<i>Drechslera graminea</i>	4
	Without microflora occurrence	92

SUMMARY

Biological preparations have a significant potential in plant protection. The current research is focused on the targeted sampling and proprietary isolation and cultivation of plant associated microbes (rhizosphere, endosphere, phyllosphere) from diverse biotopes and environments around the world. Usage of *Thiobacillus* bacteria seems purposeful and promising in view of the other proved positive characteristics, such as an effective intake of nutrients by plants (transformation into a more acceptable form takes place), regeneration of damaged tissues and increase of plant resistance to low temperatures. In further stages of the research, other ways of Aqua Almus[®]

application (soaking, duration of exposition) will be tested. Testing of the preparation's effectiveness on the cereal grains artificially infected by isolates of pathogens and the vitality of the germinating plants under modified environmental conditions will be studied.

REFERENCES

Bailey K.L., Boyetchko S.M., Längle T. (2010): Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, 52(3): 221–229.

Budňáková M., Hlušek J., Balík J. (2011): Current Situation in Agriculture in the Czech Republic. In: Škarpa P. (Ed.): *Proceedings of the International Conference – Soil, Plant and Food Interactions*. Brno, Mendel University in Brno, 56–65. ISBN 978-80-7375-534-8.

Faostat [on-line]. Food and Agriculture Organization of the United Nations [cit. 9. 11. 2012]. Available: <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en#anchor>.

Mehta K.K. (2012): Baseco – A Microbial Biocontrol for Grapevine Mealybugs [on-line]. 7th Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM) in Lucerne, Switzerland 22th–24th October, 2012. [cit. 14. 11. 2012]. Available: http://www.abim.ch/fileadmin/documents-abim/Presentations_2012/ABIM_2012_5_Mehta_Ketan.pdf.

Riungu G.M., Muthomi J.W., Narla R.D., Wagacha J.M., Gathumbi J.K. (2008): Management of *Fusarium* Head Blight of Wheat and Deoxynivalenol Accumulation Using Antagonistic Microorganisms. *Plant Pathology Journal*, 7(1): 13–19.

EVALUATION HETEROGENEITY OF SELECTED WEEDS SPECIES

VYHODNOCENÍ HETEROGENITY VÝSKYTU VYBRANÝCH DRUHŮ PLEVELŮ

Kubašáková M., Smutný V., Lukas V., Winkler J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkubasak@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Field trial in winter wheat was established for evaluation of heterogeneity of weed infestation. Whole area has 32000 m² (320 x 100 m) and was split to 480 application cells with area of 50 m² (5 x 10 m). Together 22 weed species were found in observed field. Weed species found were: *Veronica hederifolia*, *Stellaria media*, *Lamium amplexicaule*, *Polygonum aviculare*, *Viola arvensis*, *Holosteum umbellatum*, *Chenopodium album*, *Lamium purpureum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Consolida regalis*, *Veronica triphyllos*, *Geranium pusillum*, *Papaver rhoeas*, *Apera spica-venti*, *Taraxacum officinale*, *Descurainia sophia*, *Tripleurospermum inodorum*, *Fallopia convolvulus*, *Myosotis arvensis*, *Conyza canadensis*, *Galium aparine*.

Key words: weeds, heterogeneity of weed infestation, *Veronica hederifolia*,

Acknowledgments: This research was supported by project NAZV QI111A184 „ Optimization methods of weed control system in precision farming “.

ÚVOD

Dnes je běžnou zemědělskou praxí, že při nestejném výskytu plevelů se na celý pozemek aplikuje dávka herbicidu, která je schopna udržet pod prahem škodlivosti plevelu i v místech s nejvyšším výskytem.

Plevelé jsou ztrátovým činitelem produkce pěstovaných plodin. V historii se sestavovaly různé systémy regulace plevelných rostlin, jejichž důsledkem mělo být jejich úplné vyhubení. Plevelé vyhubit nejde, a proto tato řešení způsobila snížení druhové pestrosti plevelů a rezistence některých druhů vůči herbicidům. Nejmenšího spektra plevelných druhů bylo dosaženo v 80. letech minulého století důsledkem intenzivní výroby a používání velkého množství chemických přípravků. Současně dochází k opětovnému zvýšení počtu druhů a cílem zemědělců je snížení celkové zaplevelenosti zemědělské půdy (Mikulka, Kneifelová, 2005).

Jak uvádí Dvořák a Smutný (2003), plevelné rostliny se podílí na snižování úrodnosti půdy a jsou pro výskyt vybaveny konkurenčními schopnostmi oproti jiným rostlinám. Jejich mohutný kořenový systém je prioritou pro jejich přežití. Čerpají lépe z půdy vodu a živiny než pěstované plodiny, odolávají snadněji suchým podmínkám a produkují značné množství reprodukce schopných jedinců. Přispívá k tomu např. brzké klíčení, rychlý počáteční vývoj, sorpční schopnost kořenového systému a aktivita fotosyntézy. Všechny druhy plevelů, ať více či méně rozšířené jsou na zemědělské půdě značnou překážkou pro optimální produkci.

Chemickými principy regulace plevelných rostlin se rozumí využívání herbicidů. Herbicid je chemická látka jejíž fytotoxickým účinkem jsou ničeny nebo omezovány nežádoucí vegetace rostlin (Kostelanský et al., 1997).

Fytotoxický účinek způsobují tzv. účinné látky, která je součástí složité chemické sloučeniny. Účinná látka způsobuje deformaci rostlinných pletiv nebo poruchu důležitých biochemických pochodů. Herbicidní účinek chemického přípravku označuje účinnost přípravku na plevelné rostliny a fyto toxicitou jsou označována poškození pěstovaných plodin (Dvořák a Smutný, 2003).

Účinek herbicidů neovlivňuje jen výběr účinné látky, ale i další faktory. Rozhodující vliv má termín aplikace, vegetační stádium, kombinace látek, dávka postřikové jichy, aplikační technika, atd. (Jursík et al., 2011).

Lokálně specifická regulace zaplevelení založená na principu precizního zemědělství předpokládá, že v místech s nulovým nebo podprahovým výskytem plevelů bude aplikace přípravku vynechána a na ošetřovaných částech bude dávka přizpůsobena stupni zaplevelení (Sökefeld et al., 2000, Gerhards et al., 2000).

Gerhards et al. (2002) dosáhl použitím lokálně specifické aplikace herbicidu na pěti pozemcích v ozimém ječmeni v průměru 60 % úspory herbicidu proti dvouděložným plevelům a 92 % úspory proti jednoděložným plevelům. V kukuřici dosahovalo ušetřené množství 11 % pro dvouděložné a 81 % pro jednoděložné druhy. V cukrovce bylo lokálně specifické ošetření uplatněno jen na dvou pozemcích, kde činila úspora 42 % pro dvouděložné resp. 36 % pro jednoděložné.

Cílem práce bylo vyhodnocení heterogenity zaplevelení v založeném polním pokusu s porostem ozimé pšenice.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusný pozemek se nachází v katastrálním území obce Žabčice, které patří do geomorfologické oblasti Dyjsko–svratecký úval. Obec Žabčice se nachází v kukuřičné výrobní oblasti (KVO) ječného subtypu, a to v nadmořské výšce 184 metrů nad mořem v rovinatém terénu. Žabčice leží ve vzdálenosti necelých 25 km jižně od města Brna v okrese Brno - venkov. Katastrálním územím protéká říčka Šatava a spadá do povodí řeky Svatky.

Oblast Žabčic patří do kukuřičné výrobní oblasti (KVO) a do velmi teplého a suchého klimatického regionu. Podle sledování klimatu za posledních třicet let je průměrná roční teplota 9,2°C, úhrnem srážek náleží lokalita k sušším oblastem. V třicetiletém průměru činí roční úhm srážek 483,3 mm.

K vyhodnocení heterogenity zaplevelení byl založen polní pokus v porostu ozimé pšenice. Celá plocha pokusného pozemku má velikost 32000 m² (320 x 100 m) a byla rozdělena do aplikačních buněk o velikosti 50 m² (5 x 10 m). Celkovým počtem byl 480 buněk. Tyto aplikační buňky představují nejmenší samostatně ošetřovanou plochu a zároveň plochu, ve které byl samostatně sledován výskyt plevelů.

Plevely byly hodnoceny na 0,25 m² ve čtyřech opakování v každé buňce. Vždy byly určeny všechny druhy vyskytujících se plevelů a sečteny jedinci každého druhu. Po vyhodnocení zaplevelení byly údaje zpracovány a byly stanoveny prahy škodlivosti pro významné druhy plevelů a skupiny ostatních druhů plevelů. Na základě těchto údajů byly vytvořeny aplikační mapy pro ošetření vybraných buněk, ke byl překročen práh škodlivosti

Aplikační buňky byly rozmístěny do 48 pásů po 10 buňkách. Byly zvoleny 4 varianty prahu škodlivosti, podle kterých bylo rozhodováno o následné aplikaci herbicidů. Každá varianta má 12 pásů. První varianta je kontrolní se standardním celoplošným ošetřením, druhá je s nízkými prahy škodlivosti, třetí je se středními prahy škodlivosti a čtvrtá varianta je s vysokými prahy škodlivosti. V Tab. 1 jsou uvedeny prahy škodlivosti pro nalezené druhy plevelů nebo skupiny druhů plevelů.

Tab. 1 Prahy škodlivosti pro nalezené druhy plevelů

Úroveň prahu škodlivosti	Rozhodující počet rostlin na 1 m ²			
	<i>Veronica hederifolia</i>	<i>Viola arvensis</i>	Skupina přezimujících	Ostatní plevelé
Nízký	10	5	5	5
Střední	20	10	10	10
Vysoký	30	20	20	20

VÝSLEDKY A DISKUZE

Na sledovaném pozemku bylo nalezeno celkem 22 druhů plevelů. Nejčastěji zastoupeným druhem byl *Veronica hederifolia* a dalším druhem podle, kterého bude rozhodováno o budoucí aplikaci byla *Viola arvensis*.

V Tab. 1 jsou uvedeny sumy jedinců nalezených druhů ze všech buněk. V Tab. 2 je uveden počet buněk ve kterých byl zaznamenán počet jedinců v určitém rozmezí.

Tab. 1 Sumy jedinců nalezených druhů plevelů z celého pokusu

Druhy	Suma jedinců (ks)
<i>Veronica hederifolia</i>	12925
<i>Stellaria media</i>	4583
<i>Lamium amplexicaule</i>	4326
<i>Polygonum aviculare</i>	978
<i>Viola arvensis</i>	919
<i>Holosteum umbellatum</i>	773
<i>Chenopodium album</i>	520
<i>Lamium purpureum</i>	410
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	269
<i>Thlaspi arvense</i>	173
<i>Consolida regalis</i>	155
<i>Veronica triphyllos</i>	107
<i>Geranium pusillum</i>	43
<i>Papaver rhoeas</i>	41
<i>Apera spica-venti</i>	24
<i>Taraxacum officinale</i>	21
<i>Descurainia sophia</i>	17
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	14
<i>Fallopia convolvulus</i>	8
<i>Myosotis arvensis</i>	2
<i>Conyza canadensis</i>	1
<i>Galium aparine</i>	1

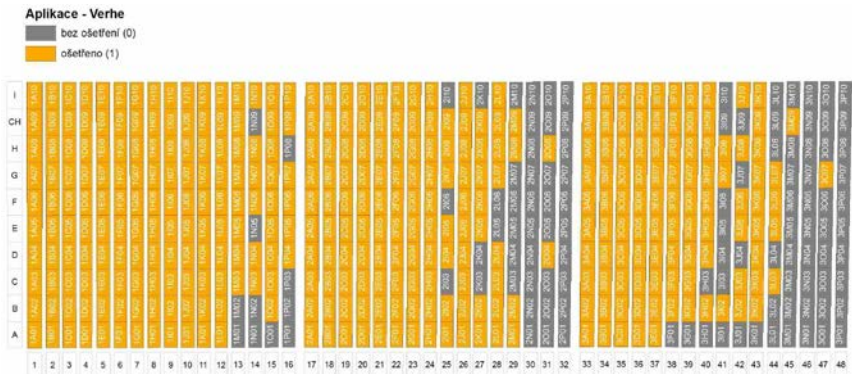
Tab. 2 Počty buněk s nalezeným počtem plevelů v uvedené rozmezí

Druhy plevelů	Rozmezí jedinců plevelů (počet buněk ve kterých byly nalezeny)			
	0 – 5 jedinců	5 – 10 jedinců	10 – 15 jedinců	15 a víc jedinců
<i>Veronica hederifolia</i>	5	23	34	301
<i>Stellaria media</i>	50	2		
<i>Lamium amplexicaule</i>	75	166	82	
<i>Polygonum aviculare</i>	122	121		
<i>Viola arvensis</i>	111	22		
<i>Holosteum umbellatum</i>	270	54		
<i>Chenopodium album</i>	264	32		
<i>Lamium purpureum</i>	242	15		
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	127	1		
<i>Thlaspi arvense</i>	99	1		
<i>Consolida regalis</i>	209	48		
<i>Veronica triphyllos</i>	178	3		
<i>Geranium pusillum</i>	17			
<i>Papaver rhoeas</i>	2			
<i>Apera spica-venti</i>	15			
<i>Taraxacum officinale</i>	30	1		
<i>Descurainia sophia</i>	35			
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	19			
<i>Fallopia convolvulus</i>	12			
<i>Myosotis arvensis</i>	7			
<i>Conyza canadensis</i>	1			
<i>Galium aparine</i>	1			

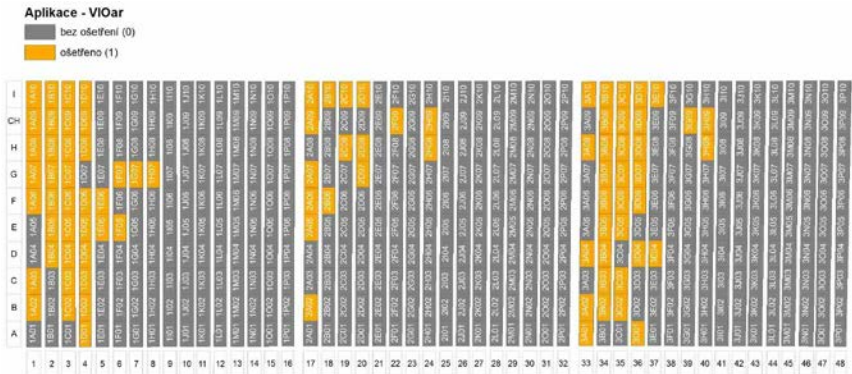
MENDELNET 2012

Obr. 1 zobrazuje aplikační mapu pro ošetření buněk, kde byl překročen práh škodlivosti pro nejčastější druh *Veronica hederifolia*. Na Obr. 2 je znázorněna aplikační mapa pro ošetření herbicidy proti druhu *Viola arvensis*.

Obr. 1 Výsledná aplikační mapa znázorňující ošetřené buňky s vysokým výskytem druhu Veronica hederifolia



Obr. 2 Výsledná aplikační mapa znázorňující ošetřené buňky s vysokým výskytem druhu Viola arvensis



ZÁVĚR

Ze získaných údajů vyplývá, že intenzita zaplevelení je na sledovaném pozemku poměrně vysoká. Vyhodnocení zaplevelení naznačuje i druhé spektrum plevelů, kde dominují dvouděložné plevele.

Dále je zřejmé, že heterogenita zaplevelení je poměrně vysoká a velmi odlišná mezi nalezenými druhy. Vysoké a relativně stejnoměrné zastoupení bylo zjištěno u druhů *Veronica hederifolia*. Pro regulaci tohoto druhů by byla vhodná plošná aplikace.

Naopak výskyt druhu *Viola arvensis* byl poměrně nerovnoměrný a soustředění do několika míst. U tohoto druhu by byla vhodnější cílená aplikace herbicidů.

LITERATURA

Dvořák, J., Smutný, V. (2003): Herbologie: integrovaná ochrana proti polním plevelům. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 184 s. ISBN 80-7157-732-4

Gerhards R., Sökefeld M., Nabout A., Therburg R. D., Kühbauch W. (2002): Online weed control using digital image analysis. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh. XVIII, 421-427

Gerhards R., Sökefeld M., Timmermann C., Krohmann P., Kühbauch W. (2000): Precision Weed Control – more than just saving herbicides. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh. XVII, 179-186

Jursík, M., Soukup, J., Holec J., ANDR, J. (2011): Vnější faktory ovlivňující účinnost herbicidů. Listy cukrovarnické a řepašské, roč. 2011, č. 11, s. 348-350.

Mikulka, J., Kneifelová M. (2005): Plevelné rostliny. 2., kompletně přeprac. vyd. Praha: Profi Press, 148 s. ISBN 80-86726-02-9.

Sökefeld M., Gerhards R., Kühbauch W. (2000): Teilschlagspezifische Unkrautkontrolle - von der Unkrauterfassung bis zur Herbizidapplikation. – Z. Pfl.Krankh. Pfl.Schutz, Sonderh. XVII, 227-233.

THE INFLUENCE OF THE SPECIES AND VARIETY ON THE ECONOMIC CHARACTERISTICS OF LAWN TURF IN THE VINEYARD

VLIV DRUHU A ODRŮDY NA HOSPODÁŘSKÉ CHARAKTERISTIKY
TRÁVNÍKOVÉHO DRNU VE VINICI

Kvasnovský M., Knot P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: michal.kvasnovsky@gmail.com

ABSTRACT

Grassing has the importance in protecting the soil against erosion and for maintenance of soil fertility. The increase of soil bearing capacity at high moisture content is also of importance. The aim of this thesis is to evaluate the grass sod structure, root mass and aboveground phytomass in interrows of vineyard. The trial was conducted from 2009 to 2012 and the species *Festuca rubra*, *Festuca ovina* and *Poa pratensis* evaluated.

On the basis of the results the most suitable species was *Festuca rubra commutata*. Total weight of phytomass in year 2011 amounted to 1909 g.m⁻² at a ratio of 78% of root phytomass and 22% aboveground phytomass.

Total weight of phytomass in year 2012 amounted to 1558 g.m⁻² at a ratio of 70% of root phytomass and 30% aboveground phytomass.

Suitable sod structure increases its resistance to weeds. Smaller amounts of aboveground phytomass reduce unproductive evaporation. Large quantities of underground phytomass ensures an even distribution of organic matter in the soil.

Key words: grassing, vineyard, root, *Festuca*, *Poa*

Acknowledgments: This study was supported by the Research plan No. MSM6215648905 “Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change“, which is financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

ÚVOD

Způsob obdělávání půdy má zajistit ochranu půdní úrodnosti, omezení aplikace herbicidů, průmyslových hnojiv a dalších agrochemikálií (Litschmann, 2006). Péči o půdu ve vinicích ovlivňuje mnoho faktorů, např. kvalita půdy, svažitost terénu, množství srážek, spon, použitá mechanizace a další. Na doporučení odborníků je černý úhor stále častěji nahrazován zatravněním meziřadí. Zelené pásy mají funkci především půdu chránit, zlepšit její kvalitu, snížit potřebu chemické ochrany a usnadnit práci ve vinici (Kol. Seed service, 2010). Ozelenění ve vinici napomáhá omezit zaplevelování bez nutnosti kultivovat půdu. Za nevhodných podmínek lze provádět potřebné ošetření révy vinné a nelze opomenout úsporu nákladů (Hrabě et al. 2009). V porovnání s černým úhorem umožňuje zatravněné meziřadí úsporu až 2500 Kč/ha. Umožňuje vyšší pojezdové rychlosti a tím zvýšení výkonnosti mechanizace, operace jsou prováděny kvalitněji a účinněji je využita mechanizace. Při přepočtení všech variabilních a fixních nákladů lze sledovat úsporu při využití na větších plochách v kombinaci s vhodným traktorem (Burg, Zemánek, 2010).

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl prováděn ve vinici v lokalitě katastru obce Moravská Nová Ves v kukuřičné výrobní oblasti v nadmořské výšce 199 m. Terén je zde rovinatý až mírně skloněný, půda těžká, hluboká a bezskeletovitá. Dlouhodobý normál ročního úhrnu srážek je 542 mm a průměrná teplota 8,3°C. Při srovnání jednotlivých ročníků s dlouhodobými normály byl v roce 2010 úhm srážek vyšší o 374,5 mm a v roce 2011 bylo srážek oproti normálu o 36 mm méně.

Pokusné parcely byly vysety v meziřadí na podzim 2009, výsevek 50 kg/ha. Založený porost byl udržován mulčováním na výšku porostu max. 10 cm. Příkmený pás je ošetřován výkyvnou sekcí. Byly použity druhy *Festuca rubra trichophylla* (odrůdy Barpearl a Viktorka), *Festuca rubra commutata* (Barborka a Bardiva), *Festuca ovina* (Hardtop a Jana) a *Poa pretensis* (Harmonie a Miracle).

Pro hodnocení hmotnosti a struktury drnu byly odebrány vzorky plochou půdní sondýrkou (2×8×15 cm). Byla odebrána nadzemní reziduální fytomasa a z půdního monolitu vyplavena zemina. Odběr kořenů vždy na jaře 2011 a 2012.

K testu signifikance byla použita analýza variance (Statistika, verze a následný Tukeyův test ($p \leq 0,05$)).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Hmotnost nadzemní a kořenové fytomasy odrůd v roce 2011

Hmotnost celkové suché fytomasy drnu (nadzemní + kořenová) se pohybovala na jaře roku 2011 v rozmezí od 1421,92 g.m⁻² u F.r.t. Barpearl do 2109,63 g.m⁻² u F.r.t. Viktorka.

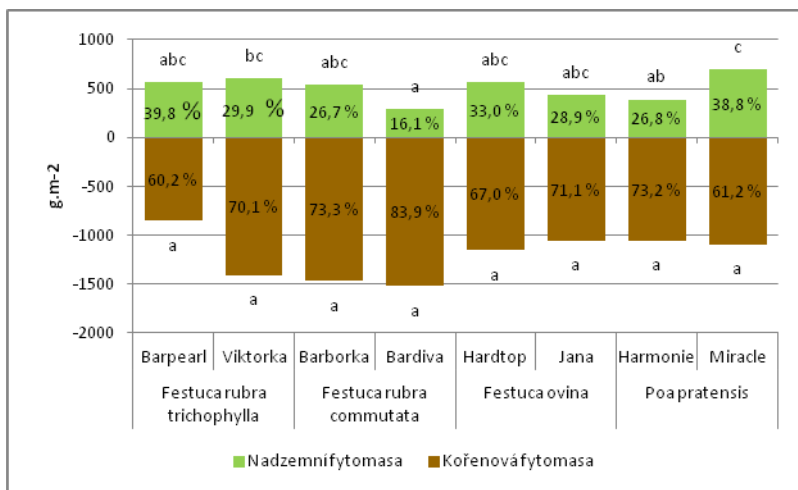
Nejnižší množství nadzemní fytomasy bylo zaznamenáno u F.r.c. Bardiva 292,56 g.m⁻² a statisticky průkazně nejvyšší hmotnost nadzemní fytomasy byla u P.p. Miracle (695,23 g.m⁻²). U ostatních odrůd byly rovněž zjištěny rozdíly v hmotnosti nadzemní fytomasy, ale nebyly statisticky průkazné.

Největší hmotnost kořenové fytomasy dosáhla F.r.c. Bardiva 1522,58 g.m⁻² a nejméně F.r.t. Barpearl 855,67 g.m⁻². I přes poměrně velké hmotnostní rozdíly nebyl zaznamenán průkazný rozdíl v hmotnosti kořenové fytomasy

Na celkové hmotnosti drnu se více podílela kořenová část drnu (graf 1). Její podíl na hmotnosti drnu kolísal od 62,2 % u F.r.t. Barpearl po 83,9 % u F.r.c. Bardiva. Naproti tomu hmotnost nadzemní fytomasy tvořila pouze 16,1%-39,8% podíl hmotnosti drnu.

Podobných hodnot dosáhl Knot (2008) u *Festuca rubra* a u *Poa pratensis*.

Graf 1 Vliv odrůdy na hmotnost a strukturu travního drnu v roce 2011



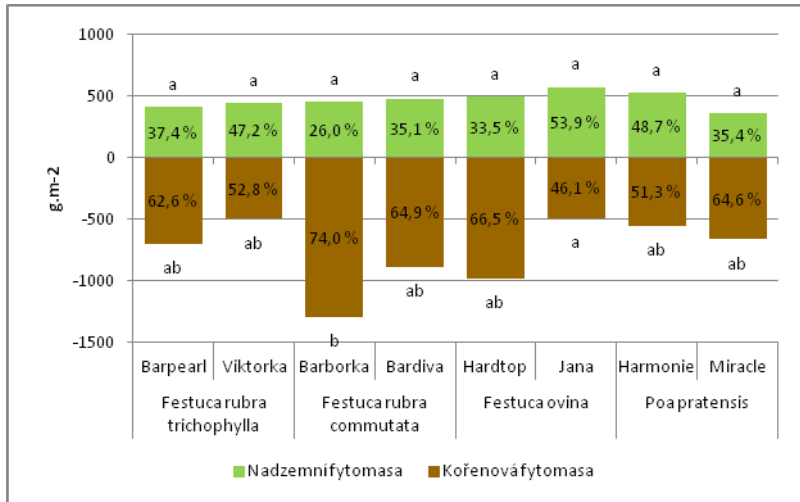
Hmotnost nadzemní a kořenové fytomasy odrůd v roce 2012

Hmotnost celkové suché fytomasy drnu se pohybovala na jaře 2012 v rozmezí od 943,75 g.m⁻² u F.r.t. Viktorka do 1745,83 g.m⁻² u F.r.c. Barborka.

Nejnižší množství nadzemní fytomasy bylo zaznamenáno u P.p. Miracle 362,5 g.m⁻². Hmotnost nadzemní fytomasy u ní byla nižší než u F.o. Jana 575 g.m⁻². I přes poměrně velké hmotnostní rozdíly nebyl zaznamenán průkazný rozdíl v hmotnosti nadzemní fytomasy.

Největší množství kořenové fytomasy dosáhla F.r.c. Barborka 1291,67 g.m⁻². Hmotnost kořenové fytomasy u ní byla průkazně vyšší než u F.o. Jana 491,67 g.m⁻². U ostatních odrůd nebyly rozdíly v hmotnosti kořenové fytomasy statisticky průkazné.

Graf 2 Vliv odrůdy na hmotnost a strukturu travního drnu v roce 2012



Na celkové hmotnosti drnu se převážně více podílela kořenová část drnu (graf 2). Její podíl na hmotnosti drnu kolísal od 46,1 % u F.o. Jana po 84,0 % u F.r.c. Naproti tomu hmotnost nadzemní fytomasy tvořila pouze 26,0% - 53,9% podíl hmotnosti drnu.

Hmotnost nadzemní a kořenové fytomasy u zkoumaných druhů v roce 2011

Hmotnost celkové suché fytomasy drnu se pohybovala roku 2011 v rozmezí od 1609,09 g.m⁻² u *Festuca ovina* a do 1909,52 g.m⁻² u *Festuca rubra commutata*.

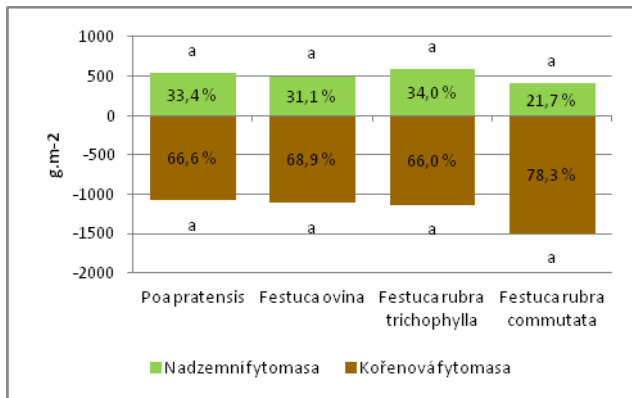
Nejnižší množství nadzemní fytomasy bylo zaznamenáno u *Festuca rubra commutata* 413,68 g.m⁻². Hmotnost nadzemní fytomasy u ní byla nižší než u *Festuca rubra trichophylla* 585,13 g.m⁻².

Největší hmotnost kořenové fytomasy dosáhl druh *Festuca rubra commutata* 1495,84 g.m⁻² a nejnižší byla zjištěna u *Festuca ovina* 1108,91 g.m⁻².

I přes poměrně velké rozdíly v hmotnosti nadzemní i podzemní fytomasy nebyly statisticky průkazné.

Podobných výsledků dosáhl také Knot (2008) zjistil množství kořenové fytomasy u *Festuca rubra trichophylla* 987,46 g.m⁻², *Poa pratensis* 1058,41 g.m⁻² a *Festuca rubra commutata* 1108,31 g.m⁻², což jsou hodnoty podobné údajům, které jsme zjistili. Rovněž poměr k nadzemní fytomasy ke kořenové je podobných hodnot.

Graf 3 Vliv druhu na hmotnost a strukturu drnu v roce 2011



Hmotnost nadzemní a kořenové fytomasy u zkoumaných druhů v roce 2012

Hmotnost celkové suché fytomasy drnu se pohybovala na jaře roku 2012 v rozmezí od 1029,17 g.m⁻² u *Festuca rubra trichophylla* do 1558,33 g.m⁻² u *Festuca rubra commutata*.

Nejnižší množství nadzemní fytomasy bylo zaznamenáno u *Festuca rubra trichophylla* 431,25 g.m⁻². Hmotnost nadzemní fytomasy u ní byla nižší než u *Festuca rubra commutata* 467,71 g.m⁻².

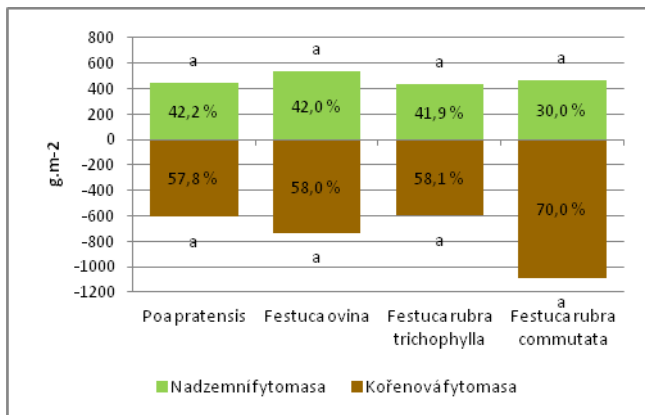
Největší hmotnost kořenové fytomasy dosáhl druh *Festuca rubra commutata* 1090,63 g.m⁻² a nejnižší byla zjištěna u *Festuca rubra trichophylla* 597,92 g.m⁻².

Nejlépe hodnocený druh *Festuca rubra commutata* měl největší poměr kořenové fytomasy k nadzemní.

Mezi druhy byly zjištěny poměrně velké rozdíly v hmotnosti nadzemní i podzemní fytomasy, ale nebyly statisticky průkazné (graf 4).

Hojná (2010) u mulčovaného porostu *Festuca rubra* zjistila množství kořenové fytomasy 974,91 g.m⁻² do hloubky 200 mm. K podobným hodnotám dospěla také Vrzalová (2011), kdy průměrná hmotnost kořenové fytomasy do hloubky 200 mm činila 1048,3 g.m⁻² (průměr ze čtyř let). Fiala (1997) u 3krát sečených lučních společenstev uvádí množství kořenové fytomasy do 5 cm hloubky v rozpětí od 988 do 2210 g.m⁻¹ a od 5 do 10 cm hloubky 213 – 543 g.m⁻¹.

Graf 4 Vliv druhu na hmotnost a strukturu drnu v roce 2012



ZÁVĚR

Výsledky týkající se hodnocení struktury drnu v letech 2011 a 2012, tj. poměru a hmotnosti reziduální nadzemní hmoty a kořenové fytomasy, prokazují z hlediska druhu jako nevhodnější *Festuca rubra commutata*. U uvedeného druhu je nejvýhodnější jak poměr mezi nadzemní a kořenovou fytomasou (cca 30 % a 70 %) tak i absolutní hmotnost kořenové fytomasy (rok 2011 – 1495 g.m⁻², rok 2012 – 1090 g.m⁻²).

Vhodná struktura drnu zvýší jeho odolnost proti zaplevelení. Menší množství nadzemní fytomasy snižuje neproduktivní výpar. Větší množství podzemní fytomasy zajistí rovnoměrné rozložení organické hmoty v půdě.

Na základě výsledků a daných cílů práce lze doporučit jako základ pro zatravnění vinic jako vhodnou obě odrůdy *Festuca rubra commutata* (z hlediska tvorby kořenové fytomasy).

POUŽITÁ LITERATURA

BURG, P., ZEMÁNEK, P. 2010. Hodnocení provozních nákladů u mechanizačních prostředků pro údržbu zatravněných meziřadí ve vinicích, In: Odras vědy a výkumu ve vinogradnické praxi, sborník, Lednice: Mendelova univerzita, s. 45 – 51. ISBN: 978-80-7375-400-6

FIALA, K. 1997. Underground plant biomass og grassland communities in releation to mowing intensity, Acta scientiarum naturalium academiae scientiarum bohemicae Brno, Vol. 36, Issue 6, pp. 54, ISSN 0032-8758

HOJNÁ, M. 2010. Vliv mulčování trávniku na kvalitu travního drnu kostřavy červené. Diplomová práce. Brno: MENDELU Brno, 97 s.

HRABĚ, F. et al. 2009. Travníky pro zahradu, krajinu a sport. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Ing. Petr Baštan, 335 s. 1. ISBN 978-80-87091-07-4.

KNOT, P. 2008. Vliv extenzivní a intenzivní exploatace na strukturu trávnickového drnu, Disertační práce, MZLU v Brně, 130 s.

KOLEKTIV SEED SERVICE s. r. o. 2010. Zatravnění sadů a vinic, In: Vinař – sadař, 1/2010. Olomouc: Petr Baštan, ISSN 1804-3054.

LITSCHMANN, T. 2006, Způsob obdělání meziřadí v závlahových a bezzávlahových podmínkách, Online zpravodaj časopisu Zahradnictví [cit. 7. 1. 2012] Dostupné na: <
http://www.zahradaweb.cz/Zpusob-obdelani-meziradi-v-zavlahovych-a-bezzavlahovych-podminkach__s513x43968.html>

VRZALOVÁ, J. 2011, Vliv intenzity ošetřování trávnickového drnu na jeho hmotnost a strukturu, Disertační práce, Brno: MENDELU Brno, 130 s.

THE EFFECT OF CUTTING FREQUENCY AND FERTILIZATION ON SPECIES DIVERSITY, GRASSLAND QUALITY AND PRODUCTION

VLIV INTENZITY VYUŽÍVÁNÍ A HNOJENÍ NA DRUHOVOU DIVERZITU, KVALITU A VÝNOSY TRAVNÍHO POROSTU

Nawrath A., Skládanka J., Hrabě F.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xnawrath@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of study was to explore the influence of fertilization and cutting frequency on production, species diversity and grassland quality. The monitored grass stands are situated in the Bohemian-Moravian Highlands at the altitude 650 m a. s. l. Vegetation was assessed by the level of fertilization (unfertilized, PK fertilized, fertilized N 90 + PK and fertilized N 180 + PK) and by the intensity of use (double-cut, triple-cut) since year 2007 till 2011. There was monitored the index of diversity, grassland quality and yield of the forage. Three cut grass stands exhibited a higher diversity than two-cut grass stands did. The three-cut grass stands showed the highest species diversity after the application of PK. The lowest species diversity showed the two-cut grass after the application of N 180 + PK. The grassland quality increased with the level of fertilization. The yield of forage increased with the level of fertilization, too.

Key words: Grassland, fertilization, cutting frequency

Acknowledgments: This paper was prepared with the support of TP IGA FA MENDELU 3/2012 Effectivity in Base Material Utilization and Environment Preservation Through Animal Feed Production and Nutrition Systems.

ÚVOD

Trvalé travní porosty jsou po lesích nejrozšířenějším pokryvem planety. V ČR zaujímají téměř 1 milion ha a svou výměrou tedy tvoří významnou část zemědělského půdního fondu. Travní porosty jsou situovány převážně v horských a podhorských oblastech, kde dříve sloužily především k pastvě. Mimo tradiční funkci, produkci píce, se v současnosti pozornost obrací, zejména vlivem poklesu stavu skotu, k funkcím mimoprodukčním. Tyto funkce jsou ovlivněny především druhovou skladbou travních porostů, množstvím a dynamikou nárůstu biomasy a její kvalitou a půdními podmínkami pod travními porosty (KLIMEŠ et al., 2007).

V současné době lze pozorovat v mnoha částech střední Evropy dva rozdílné extrémy, kdy dochází k významnému poklesu druhově bohatých travních porostů, způsobené buď intenzifikací nebo naopak neobhospodařováním (SCHMIEDE et al., 2012). Promyšlenými pratotechnickými zásahy však lze ovlivňovat druhové složení tak, aby při ekonomicky výhodných vstupech zůstala zachována jak druhová pestrost, tak kvalita píce (GAISLER et al., 1998). Multifunkční harmonická krajina tvořená travními porosty může poskytovat nejen ekonomický prospěch, ale také ekologické a sociální funkce (KAMPMANN et al., 2011).

Cílem práce bylo porovnat změny druhové diverzity, produkce a kvality travního porostu v letech 2009–2011, vznikající v důsledku různé dotace živin a intenzity využívání.

MATERIÁL A METODIKA

Charakteristika stanoviště:

Pokusná plocha se nachází v katastru obce Kameničky, náležícího pod CHKO Žďárské vrchy. Výzkum zde byl zahájen v roce 1992. Předkládané výsledky zahrnují roky 2009–2011. Stanoviště je orientováno jihozápadním směrem, na svahu se sklonem 3°. Průměrná roční teplota (1951–2000) je 5,8 °C a průměrný roční srážkový úhrn činí 758,4 mm. Půdním typem je pseudoglej luviský, kyselý na deluviu ruly. Půda je hlinitopísčité až hlinitá.

Uspořádání pokusu:

Pokus je uspořádaný metodou dělených dílců ve 4 opakováních. Každá parcela má plochu 15 m² (1,5 × 10 m). Sledovány byly dva faktory. Prvním sledovaným faktorem bylo hnojení se stupni nehnojeno, hnojeno PK, hnojeno 90N+PK a hnojeno 180N+PK. Druhým sledovaným faktorem byla intenzita využití se stupni dvousečné využití a třísečné využití.

Ošetřování pokusné plochy:

Dusík byl dodán formou ledku amonného s vápencem (LAV 27 %) v celkové dávce 90 kg.ha⁻¹ N, resp. 180 kg.ha⁻¹ N. Dávka dusíku byla při třísečném využívání aplikována ve třech termínech

(1/3 na jaře, 1/3 po 1. seči a 1/3 po 2. seči). Při dvousečném využívání byla dávka aplikována ve dvou termínech (2/3 na jaře a 1/3 po 1. seči). Draselná a fosforečná hnojiva byla aplikována na jaře. Fosfor byl dodáván ve formě hyperkornu (26 %) v dávce 30 kg.ha⁻¹ P a draslík formou draselné soli (60 %) v dávce 60 kg.ha⁻¹ K. Sklizeň probíhala u třísečných porostů ve třech termínech (začátkem června, začátkem srpna a začátkem října) a u dvousečných ve dvou (polovina června a začátek září). Na sklizeň byl použit žací stroj MF – 70 se žací lištou o záběru 1,2 m. Sklízňová plocha byla 12 m², výška strniště 0,07 m.

Hodnocené charakteristiky:

Mezi hodnocené charakteristiky byly zahrnuty výnosy suché hmoty v jednotlivých sečích, podíl jednotlivých druhů ve sklizené píce, Hillův index diverzity (N₂) a kvalita porostu stanovená dle krmné hodnoty jednotlivých druhů (E_{GQ}). Pro stanovení podílu jednotlivých druhů ve sklizené píce byl ze stabilně vytyčených ploch (0,5 m²) odebrán vzorek nadzemní části píce. Odebraný vzorek nadzemní hmoty byl rozdělen na jednotlivé druhy a usušen při 60 °C. Poté byla vážením stanovena jejich hmotnost v suchém stavu a podíl jednotlivých druhů byl vyjádřen v procentech z celkové hmotnosti suché píce. Hillův index diverzity (HILL, 1973) byl vypočítán podle vzorce:

$$N_2 = \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}$$
, kde N₂ je index diverzity a x_i podíl i-tého druhu v porostu

Kvalita travního porostu (NOVÁK, 2004) byla vypočítána podle vzorce:

$$E_{GQ} = \frac{\sum (D \cdot FV)}{8}$$
,

kde E_{GQ} je ocenění travního porostu, D podíl druhu ve sklizené píce v % a FV je krmná hodnota píce daného druhu. Každému rostlinnému druhu náleží na 13-ti bodové stupnici (od -4 do 8) vlastní krmná hodnota. Druhům vysoce hodnotným přísluší hodnota 8 a vysoce jedovatým -4.

Pro hodnocení byl použit statistický program Statistica 6.0 CZ. Vliv hnojení na výnosy suché píce byl hodnocen vícefaktorovou analýzou variance (ANOVA) a Tukeyovým testem.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejnižší Hillův index diverzity vykazovaly porosty dvousečně využívané, dotované nejvyšším množstvím živin (N180 + PK). Index diverzity zde byl 3,5 = nízká úroveň diverzity. Naopak u porostů třísečných přihnojovaných PK byl index diverzity nejvyšší a to 9,4 = střední úroveň diverzity. Celkově vykazovaly porosty třísečné vyšší indexy diverzity než porosty dvousečné. Obecným trendem u dvousečných porostů bylo snižování druhové pestrosti spolu se zvyšujícími dávkami hnojiv. Ke stejnému zjištění došli také VOZÁR a JANČOVIČ (2004) a Rychnovská et al. (1994), kteří uvádějí intenzivní hnojení, zejména dusíkem, jako hlavní faktor snižování druhové diverzity. Třísečné porosty však při PK hnojení dosáhly zvýšení druhové diverzity, neboť zde došlo k podpoře kvikvovité složky a bylin, u kterých jinak dochází v důsledku nadměrného hnojení k ústupu z porostu vlivem dominance vzrůstných druhů trav. Dominance vzrůstných trav zde však byla potlačena intenzivním využíváním (3 seče). Postupný nárůst počtu druhů při vyšší frekvenci využití byl prokázán také RYSHEREM et al. (1995). K omezení dominance u vzrůstných trav však

nedošlo u porostů dvousečně využívaných, kde vlivem extenzivnějšího využívání nebyla jejich konkurence dostatečně oslabena a vlivem zastínění došlo k ústupu konkurenčně slabších jetelovin a bylin. Na to, že je zastoupení leguminóz a bylin do značné míry ovlivněno dominancí trav poukazují také OSTRČILOVÁ et al. (2010). Také HRABĚ (2009) uvádí dostatek osvětlení jako významný faktor pro podporu vikvovité složky v porostu. Rovněž MRKVIČKA et al. (2002) a GAISLER et al. (1998) uvádějí zvýšení pokryvnosti leguminóz a snížení zastoupení vzrůstných druhů trav na nehněných porostech oproti porostům hnojeným dusíkatými hnojivy.

Kvalita travního porostu úzce souvisela s druhovou diverzitou, měla však opačný trend. Na rozdíl od biodiverzity kvalita travního porostu se zvyšujícími dávkami hnojiv rostla a to až do úrovně N90 + PK. Zvýšení kvality travního porostu souvisí s nárůstem dominance vzrůstných druhů trav s vysokou výživovou hodnotou, schopných využít vysoké dávky hnojiv. Že se na vyšší kvalitě travního porostu podílejí zejména kulturní druhy trav uvádí také SKLÁDANKA et al. (2008). Tomuto tvrzení nasvědčuje také fakt, že dvousečné porosty měly oproti třísečným vyšší kvalitu porostu, při stejné dotaci živin. Kvalitu u dvousečných porostů zvýšil právě výskyt kulturních druhů trav (*Alopecurus pratensis*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis*). K závěru, že ke zvýšení podílu trav dochází vlivem nižší frekvence sečení a vyšší úrovně hnojení, zejména dusíkem, došli také ODSTRČILOVÁ et al. (2010), ŠTÝBNAROVÁ et al. (2010) a CHALUPOVÁ et al. (2010). Při intenzivnějším využívání (tři seče) dochází k oslabení konkurenceschopnosti vzrůstných druhů trav s vysokou výživovou hodnotou, v důsledku čehož je podpořen rozvoj bylin, jejichž výživová hodnota je však nižší. Při nejvyšší dotaci živin však došlo k mírnému poklesu kvality porostu. Nadměrnými dávkami hnojiv totiž došlo ke zvýšení výskytu nežádoucí flóry (*Geranium pratense*, *Rumex acetosella*) s nízkou kvalitou biomasy, čímž se snížila i celková krmná hodnota travního porostu. Rovněž BUCHGRABER et al. (1995) uvádí, že nadměrnou dotací živin v kombinaci s opožděnou sklizní dochází k šíření nežádoucích druhů.

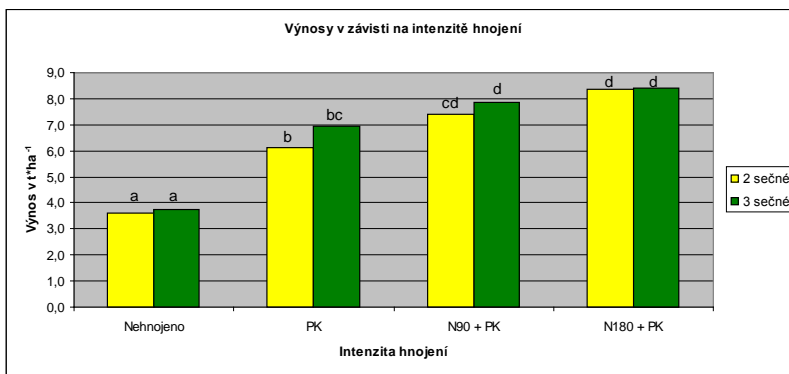
Tab. 1 Index diverzity, kvalita porostu a výnosy za roky 2009-2011.

Průměry za roky 2009-2011						
Faktor	Index diverzity		Kvalita porostu		Výnosy	
	Dvousečný	Třísečný	Dvousečný	Třísečný	Dvousečný	Třísečný
Nehnojeno	7,7	9,1	37,9	21,0	3,6	3,7
PK	6,3	9,4	48,4	49,1	6,1	6,9
N90 + PK	3,6	5,8	70,6	61,8	7,4	7,9
N180 + PK	3,5	6,3	70,1	52,3	8,4	8,4

U výnosů lze pozorovat, že se zvyšující dotací živin rostly. U třísečných porostů bylo dosahováno vyšších výnosů, než u porostů dvousečných. Nejvyšší nárůst produkce u obou variant byl zaznamenán při hnojení PK, a to o 2 t*ha⁻¹ u dvousečného využívání, respektive o 2,5 t*ha⁻¹ při třísečném využívání. Mezi variantou nehnojenou a hnojenou PK u obou intenzit využívání byl také prokázán statisticky významný rozdíl (p=0,05). Tento nárůst pravděpodobně způsobilo navýšení podílu jetelovin v travním porostu, které jsou schopny fixovat vzdušný dusík nejen pro svou

potřebu, ale také pro ostatní rostliny ve společenstvu. Pozitivní vliv PK hnojení na zvýšení podílu jetelovin v porostu prokázali také MRKVIČKA a VESELÁ (2002). Při hnojení dusíkem v obou dávkách (N90 a N180) byl již nárůst mírnější v porovnání s PK hnojením, a to v rozmezí $0,9\text{--}1\text{ t*ha}^{-1}$, nicméně mezi variantou hnojenou PK a variantou hnojení N90 + PK byl prokázán statisticky významný rozdíl ($p=0,05$).

Obr. 1 Graf výnosů v závislosti na intenzitě hnojení. Rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl ($p=0,05$).



ZÁVĚR

Nejvyšší druhovou diverzitu ($H_2 = 9,7 =$ střední úroveň diverzity) vykazovaly porosty třísečné přihnojované PK. Naproti tomu nejnižší index diverzity ($3,5 =$ nízká úroveň) byl zjištěn u dvousečné využívaných porostů dotovaných nejvyššími dávkami hnojiv (N 180 + PK). Obecně také platilo, že třísečné porosty byly druhově bohatší než porosty dvousečné, u kterých s přibývajícím dávkami hnojiv index diverzity klesal.

Opačný trend oproti indexu diverzity však vykazovala kvalita travního porostu, která s přibývajícím dávkami hnojiv rostla a to až do dávky N 90 + PK. Při dávkách N 180 + PK kvalita porostu mírně klesla, kvůli výskytu nežádoucích bylin v porostu. U dvousečné varianty byla kvalita travního porostu vyšší než u třísečné, díky výskytu kulturních trav.

Výnosy rostly spolu s přibývajícím dávkou hnojiv. Nejvyššího nárůstu produkce bylo dosaženo u třísečné varianty přihnojované PK, zde byl také prokázán statisticky významný rozdíl ($p=0,05$). Tato varianta rovněž vykazovala nejvyšší biodiverzitu.

LITERATURA

- Buchgraber, K., Sobotik, M., 1995: Einfluss der Grünlandwirtschaft auf die Artenvielfalt in verschiedenen Pflanzengesellschaften. Bericht Experttagung Landwirtschaft und Naturschutz, BAL, Gumpenstein, s. 9-23.
- Gaisler, J., Fiala, J., Spoustová, B., 1998: The Changes of Botanical Composition Yield in Dependence on the Type of Grassland and Fertilization. *Rostlinná výroba*, roč. 44, s. 39-44.
- Hill, M.O., 1973: Reciprocal Averaging: An Eigenvector Method of Ordination. *Journal of Ecology*, roč. 63, s. 597-613.
- Chalupová, P., Kašparová, J., Šrámek, P., Kohoutek, A., Odstrčilová, V., 2010: Vliv frekvence sečení a úrovně hnojení na botanické složení trvalého travního porostu v oblasti rožnovských Beskyd na stanovišti Zubří v průměru roků 2003-2009 In *Kvalita píce z travních porostů a chov skotu v měnících se ekonomických podmínkách*, Kunín, s. 119-129.
- Kampmann, D., Lüscher, A., Konold, W., Herzog, F., 2011: Agri-Environment Scheme Protects Diversity of Mountain Grassland Species. *Land Use Policy*, roč. 29, s. 569-576.
- Klimeš, F., Kobes, M., Suchý, K.: 2007. Možnosti harmonizace produkčních a mimoprodukčních funkcí trvalých travních porostů. In: Multifunkční obhospodařování a využívání trvalých travních porostů v LFA. Sborník příspěvků z mezinárodní vědecké konference. Rapotín, s. 74-79.
- Mrkvíčka, J., Veselá, M., 2002: Influence of Fertilization Rates on Species Composition, Duality and Yields of the Meadow Fodder. In: *Rostlinná výroba*, roč. 48, s. 494-498.
- Novák, J., 2004: Evaluation of Grassland Quality. *Ecologia*, roč. 23, s. 127-143.
- Odstrčilová, V., Kohoutek, A., Komárek, P., Nerušil, P., 2010: Vliv frekvence sečení a úrovně hnojení na botanické složení trvalého travního porostu na fluvizemě glejové na Malé Haně v průměru roků 2003-2009 In *Kvalita píce z travních porostů a chov skotu v měnících se ekonomických podmínkách*, Kunín, s. 107-118
- Rychnovská, M., Blažková, D., et. Hrabě, F., 1994: Conservation and development of floristically diverse grassland in Central Europe. In: *Grassland and Society. Proceedings of 15th General Meeting of EGF*, Wageningen, s. 266-277.
- Rysher, P., Langenauer, R., Gigon, A., 1995: Species Richness and Vegetation Structure in a Limestone Grassland after 15 years Management with Six Biomass Removal Regimes. *Folia Geobot. Phytotax*, s. 157-167.
- Schmiede, R., Otte, A., Donath, T.W., 2012: Enhancing Plant Biodiversity in Species-Poor Grassland through Plant Material Transfer-the Impact of Seed Distance. *Applied Vegetation Science*, roč. 15, s. 290-298.
- Skládanka, J., Hrabě, F., Heger, P., 2008: Vliv intenzity hnojení a využití na druhovou diverzitu a kvalitu travního porostu. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae brunensis*, Brno, číslo 2, s. 131-138.

MENDELNET 2012

Štýbnarová, M., Svozilová, M., Odstrčilová, V., Kohoutek, A., 2010: Produkce sušiny hospodářského výnosu a botanického složení při rozdílném obhospodařování travních porostů v podhůří Hrubého Jeseníku In Kvalita píče z travních porostů a chov skotu v měnících se ekonomických podmínkách, Kunín, s. 130-138.

Vozár, L., Jančovič, J., 2004: Diverzita antropogénne ovplyvnenej asociácie *Lolio-Cynosuretum Typicum* In: Produkčné, ekologické a krajínovorné funkcie trávnych ekosystémov a krmných plôin. Nitra, s. 136-143.

SPRING BARLEY WEED INFESTATION IN VARIOUS CROP ROTATION CYCLES

Neischl A.¹, Winkler J.², Zelená V.¹

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: alexandr.neischl@gmail.com

ABSTRACT

The goal of the thesis is to evaluate weed infestation of spring barley at various crop rotation cycles, in year 2010 and 2011. The trial site is located at Mendel University trial station Žabčice. The first trial plot represents cropping cycle based on cycle with seven crops (*Medicago sativa* – first year, *Medicago sativa* – second year, winter wheat, silage corn, winter wheat, sugar beet, spring barley,

The second trial plot represents cropping cycle based on five crops (corn, spring barley, *Carthamus tinctorius*, winter wheat, winter wheat).

The 39 weed varieties have been found at the trial plots. The results shows, the higher is cereals density in cropping cycles, the higher is the weed infestation of *Galium aparine*.

Key words: the weeds, spring barley, *Galium aparine*

Acknowledgments: The results in paper are output of project of Internal Grant Agency, FA MENDELU No. TP 9/2012 “Innovation of crop management practices in areas threatened by drought”.

ÚVOD

Dvořák a Smutný (2003) uvádějí, že pěstovaná plodina má největší vliv na strukturu a intenzitu zaplevelení a často potlačí vliv ostatních podmínek. Plodina velmi výrazně ovlivňuje druhové spektrum plevelů a četnost jedinců jednotlivých druhů. Hustota porostu, rychlost vývoje, habitus plodiny a způsob pěstování působí na vzházení, růst a vývoj jednotlivých druhů plevelů.

Změny ve struktuře pěstovaných plodin jsou dány nepříznivou hospodářskou situací zemědělských podniků, ve které se nacházejí od roku 1990 a dále také možnostmi na trhu zemědělských komodit. V důsledku toho došlo ke snížení plochy jednoletých a víceletých píceňin související s poklesem stavu skotu, dále se snížila plocha okopanin (cukrovka, brambory) a luskovin. U obilovin došlo k poklesu u žita, ovsa a částečně i ozimého ječmene. Nárůstu ploch došlo u triticales a olejnin, především řepky a mák a stejně jako kukuřice na zrno. V současné době je hlavní ziskovou plodinou v ČR především sladovnický ječmen, pšenice obecná, řepka a mák. Obecně platí, že tyto změny vedly ke snížení podílu zúrodňujících předplodiny ve struktuře pěstovaných plodin a ke snížení homeostázy agrosystémů (Křen, Valtýniová, 2008).

Velmi důležité preventivní opatření, které značně snižuje problémy se zaplevelením je podle Jursíka et al. (2011) vhodně sestavený osevní postup. Jestliže jsou na pozemku střídány plodiny dle obecných zásad, platných pro sestavování osevních postupů, jedná-li se zároveň o osevní postupy vyvážené, s pestrým zastoupením jednotlivých plodin, nemělo by v pleveleňm společenstvu dojít k přemnožení škodlivých druhů.

Neexistuje pěstovaná kultura, ve které by se mimo pěstovanou plodinu nevyskytovaly i jiné konkurenční rostliny, které se během svého života přizpůsobily způsobu hospodaření a životnímu cyklu plodiny. Značná část plevelných druhů se přizpůsobila do takové míry, že jsou schopny růst téměř ve všech pěstovaných plodinách. Bývají to většinou houževnaté plevele, mezi které patří např. pcháč rolní, svlačec rolní, mléč rolní, přeslička aj. Naopak jiné plevelné druhy dávají přednost spíše určitému způsobu obdělávání a určitým plodinám, ve kterých jsou schopny konkurovat. Plevele se přizpůsobují kulturním plodinám nejen svým vzrůstem, barvou, velikostí a tvarem semen, ale také celkovým způsobem života (Deyl, 1964).

Obilniny jsou podle dle Lekeše (1985) považovány za obecně zhoršující plodiny. Nejenže negativně ovlivňují půdní úrodnost, snižují diverzitu půdní mikroflóry, zhoršují fyzikální a chemické vlastnosti půdy, ale umožňují zároveň i rozvoj plevelů, zvláště pak v horších podmínkách, na chudších půdách a v prodlých porostech.

Obilniny svou biologií a technologií pěstování umožňují růst, rozmnožování i rozšiřování plevelů. Hodnotíme je jako plodiny zaplevelující půdu i následně pěstované plodiny. K tomu přispívá skutečnost, že ve struktuře obilnin převládá pěstování druhů s malou konkurenční schopností vůči plevelům a výrazně poklesl podíl ozimého žita a ovsa, jež byly plodiny s vyšší konkurenční schopností vůči plevelům. Rovněž šlechtění krátkostébelných odrůd pšenice a ječmene umožňuje intenzivnější růst a vývin plevelů (Čača, 1990).

Rozvoj plevelů je umožněn především tím, že šikmo postavené listy a přímá, nevětvená stěbla umožňují větší přístup světla i do nižších pater porostu. Na rozvoji plevelů v obilninách se rovněž podílí charakter agrotechniky, v níž se během vegetace nevykonávají žádné další agrotechnické zásahy (Hron, Vodák, 1959).

Vlivem ekologických podmínek stanoviště v průběhu vegetační doby se mění druhové spektrum plevelů, které lze rozdělit podle převažujících plevelných druhů na jarní, letní a strniskový aspekt. Jarní aspekt je typický značnými výkyvy mezi denní a noční teplotou a nízkým, nezapojeným porostem pěstované kultury, který umožňuje plný přísun světla k plevelům. V jařinách jsou v jarním aspektu zastoupeny především klíčící rostliny jednoletých časně jarních plevelů (hořčice rolní, ředkev ohnice, konopice rolní, oves hluchý aj.), naproti tomu u ozimých obilnin se vyskytují plevele s krátkou vegetační dobou, tzv. efemérní druhy (Dvořák, 1987).

Z efemérních plevelů se u nás nejčastěji uplatňuje osívka jarní, rozrazil trojlistý a břečťanolistý (Dvořák, Smutný, 2003).

Kromě efemérních druhů se mohou v jarním aspektu ozimých obilnin objevit i druhy, které nekvetou, ale jsou ve fázi klíčících rostlin nebo v přízemní růžici. Jedná se především o hluchavku nachovou, hluchavku objímavou, ptačinec žabinec, vesnovka obecnou, pcháč oset a svlačec rolní. V letním aspektu postupně dochází ke světelným, teplotním a vláhovým změnám na stanovišti a současně dochází ke změně druhového spektra plevelů (Hron, Vodák, 1959).

V letním aspektu jarních obilnin se objevují především časně jarní plevele, které vzešly současně s obilninou (konopice rolní, ředkev ohnice, hořčice rolní a oves hluchý). Kromě těchto druhů se mohou objevit i plevele víceleté (vesnovka obecná, pcháč oset, svlačec rolní a mléč rolní). V ozimých obilninách je letní aspekt tvořen převážně jednoletými, přezimujícími druhy, které vzešly již na podzim a ve fázi pravých lístků přezimují spolu s ozimem. Typickými plevele v ozimech jsou hefmánkovec přímořský, rmen rolní, vlčí mák, chundelka metlice aj. Stejně jak u jarních obilnin i u ozimů se mohou uplatnit vytrvalé plevele (Hron, Vodák, 1959).

Strniskový aspekt je charakterizován obdobím po sklizni obilnin, kdy se opět mění světelné a vodní poměry stanoviště. Odstraněním porostního krytu jsou plevele vystaveny plnému slunečnímu

záření, urychlují tak vývoj a brzy vytvářejí zralá semena. Ve strniskovém aspektu bývají zastoupeny např. tyto druhy plevelů: rmen rolní, heřmánkovec přímořský, rdesno ptačí, rozrazil, mák vlčí, mléč rolní, pcháček oset aj., (Dvořák, 1987).

MATERIÁL A METODIKA

Pozemek na kterém probíhal polní pokus se nachází v katastrálním území obce Žabčice. Toto území patří do geomorfologické oblasti Dyjsko–svratecký úval. Katastrální obec Žabčice se nachází v kukuřičné výrobní oblasti ječného subtypu a leží v nadmořské výšce 185 metrů nad mořem v rovinném terénu. Žabčice jsou vzdáleny cca 25 km jižně od města Brna a spadají do okresu Brno - venkov. Tímto územím protéká říčka Šatava, která náleží do povodí řeky Svratky.

Oblast Žabčic spadá do výrobní oblasti kukuřičné a velmi teplého, suchého klimatického regionu. Sledováním podnebí za posledních třicet let ukazuje že průměrná roční teplota je 9,3 °C, úhrnem srážek náleží lokalita k sušším oblastem. Třicetiletý průměr ročního úhrnu srážek činí 483,3 mm. Teplotní a srážkové údaje byly získány z meteorologické stanice v pokusné stanici v Žabčicích. Dlouhodobé průměry teplot a úhrnů srážek za jednotlivé měsíce jsou zobrazeny v Tab. 1.

Tab. 1 Dlouhodobé průměry teplot a úhrnů srážek za jednotlivé měsíce (1961 až 1990)

Měsíc	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
Srážky (mm)	25	25	24	33	63	69	57	54	36	32	37	26
Teploty (°C)	- 2,0	0,2	4,3	9,6	14,6	17,7	19,3	18,6	14,7	9,5	4,1	0,0

Území Žabčic a jeho okolí leží v Dyjsko-svrateckém úvalu, který je z velké části tvořen neogenním sedimenty. Pozemky statku se nacházejí na geologickém útvaru, který je tvořen čtvrtohorními šterky, a z s části aluviálními naplaveninami. Druhý kvartérní pokryv je tvořen sprašemi.

Pozemek je situován v nivní oblasti řeky Svratky a řadí se k vývojově mladým lužním glejovým půdám. Jsou to půdy vzniklé na holocenních, vápenitých nivních usazeninách. Intenzivní glejový proces do hloubky silně narůstající je následkem půdního profilu, který je zde pod stálým vlivem spodní vody. V hloubce 180 cm pod povrchem se nachází hladina podzemní vody. Proto během suchého období půda vysychá a tvoří se trhliny. Mocnost hlinité až jílovitohlinité ornice je 35 cm, zrnitostně těžší, šedohnědý přechodný horizont je hluboký 45 cm. Hloubka glejového horizontu je 90 cm. Zesílení oglejení nastává v dalším glejovém horizontu do hloubky 130 cm. Ten má prismatickou strukturu jílového charakteru. Pod hloubkou 130 cm je půdotvorný substrát s glejovým procesem, nemá strukturu a převládají v něm redukční procesy. Z toho lze usoudit, že spodina nemá dobrou vodopropustnost a je těžká. V ní se však drží zásoba půdní vláhly, která se pomocí kapilárního zdvihu dostane až do povrchových vrstev. Orniční horizont půdy má střední

obsah humusu 2,28 % a pH 6,9 značí neutrální půdní reakci. Sorpční vlastnosti půdy jsou dobré, sorpční komplex je nasycený a zásoba snadno přístupných živin je dobrá.

První polní pokus byl založen v roce 2010 a představuje plochu 2,3 ha (100 m x 225 m). Jednotlivé parcely mají velikost 1000 m² (100 x 10 m). V polním pokusu byl použit sedmihonný osevní postup.

1. vojtěška setá (*Medicago sativa*) – první užitkový rok
2. vojtěška setá – druhý užitkový rok
3. ozimá pšenice (*Triticum aestivum*)
4. kukuřice na siláž (*Zea mays*)
5. ozimá pšenice
6. cukrovka (*Beta vulgaris*)
7. **jarní ječmen (*Hordeum vulgare*)**

Druhý polní pokus byl založen v roce 2004 a měl by být „modelovým příkladem“ hospodaření bez živočišné výroby v sušších klimatických podmínkách. Velikost jednotlivých parcel je 21 x 19,5 m. V polním pokusu je použit pětihonný osevní postup. Sled plodin je následující:

1. Kukuřice na zrno (*Zea mays*)
2. **Ječmen jarní (*Hordeum vulgare*)**
3. Světlíce barvířská (*Carthamus tinctorius*)
4. Ozimá pšenice (*Triticum aestivum*)
5. Ozimá pšenice (*Triticum aestivum*)

Zaplevelení porostu jarního ječmene bylo vyhodnoceno v období mezi 2. 5. – 5. 5. 2010 a 2. 5. – 4. 5. 2011 vždy před aplikací herbicidů.

Byla použita početní metoda, počty plevelů byly zjišťovány 25 na 1 m², u každé varianty zpracování půdy a střídání plodin ve 24 opakováních. České a latinské názvy jednotlivých druhů plevelů byly použity podle Kubáta (Kubát, 2002).

Ke zjištění vlivu sledovaných faktorů na jednotlivé druhy plevelů, které se vyskytovaly v polním pokusu, byly použity mnohorozměrné analýzy ekologických dat. Výběr optimální analýzy se řídil délkou gradientu (*Lengths of Gradient*), zjištěného segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*). Dále byla použita kanonickou korespondenční analýzou CCA (*Canonical Correspondence Analysis*). Při testování průkaznosti pomocí testu Monte-Carlo

bylo propočítáno 499 permutací. Data byla zpra-cována pomocí počítačového programu Canoco 4.0. (Ter Braak, 1998).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V našem prvním pokusu v 7 – honném osevním postupu bylo v porostu jarního ječmene nalezeno 31 druhů plevelů, Ve druhém pokusu v 5 – honném osevním postupu se vyskytovalo 30 druhů plevelů.

Průměrný počet jedinců jednotlivých druhů plevelů jsou uvedeny v Tab. 2.

Analýzou DCA byla vypočtena délka gradientu, která činila 4,662. Na základě tohoto výpočtu byla k dalšímu zpracování zvolena a kanonická korespondenční analýza CCA. Analýza CCA vymezuje prostorové uspořádání jednotlivých druhů plevelů a variant faktorů (osevních postupů), a to na základě dat, která byla o frekvenci výskytu plevelných druhů zjištěna. Toto je následně graficky vyjádřeno pomocí ordinačního diagramu. Druhy plevelů a varianty osevních postupů jsou zobrazeny body odlišného tvaru a barvy.

Výsledky analýzy CCA, která hodnotila vliv osevních postupů na výskyt plevelů jsou signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,002$, pro všechny kanonické osy. Na základě analýzy CCA (Obr. 1) je možné nalezené druhy plevelů rozdělit do 3 skupin.

První skupina se vyskytovala v prostu jarního ječmene především na variantě 7-honného osevního postupu: *Arctium tomentosum*, *Artemisia vulgaris*, *Beta vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Carduus acanthoides*, *Convolvulus arvensis*, *Geranium pusillum*, *Lactuca serriola*, *Lamium amplexicaule*, *Persicaria lapathifolia*, *Plantago major*, *Polygonum aviculare*, *Sinapis arvensis*, *Sonchus oleraceus*, *Stellaria media*, *Taraxacum officinale*, *Tripleurospermum inodorum*, *Veronica persica* a *Veronica polita*.

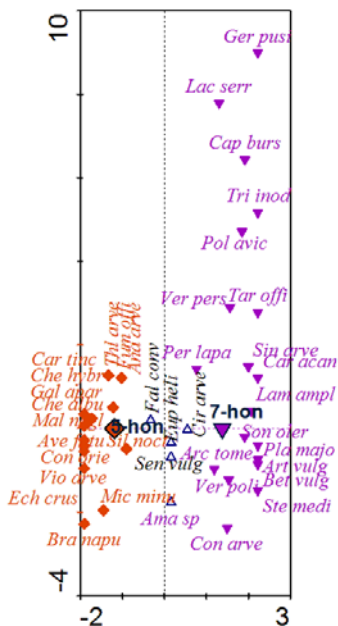
Druhá skupina se vyskytovala na variantě, kde byl ječmen pěstován v rámci 5-honného osevního postupu a jsou to druhy: *Anagallis arvensis*, *Avena fatua*, *Brassica napus subsp. napus*, *Carthamus tinctorius*, *Consolida orientalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Fumaria officinalis*, *Galium aparine*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Malva neglecta*, *Microrrhinum minus*, *Silene noctiflora*, *Thlaspi arvense* a *Viola arvensis*.

Třetí skupina plevelů byla ovlivněna faktory, které tato analýza nezahrnuje a jsou to plevele jako: *Amaranthus*, *Cirsium arvense*, *Euphorbia helioscopia*, *Fallopia convolvulus* a *Senecio vulgaris*.

Tab. 2 Průměrný počet plevelů zaznamenaný v odlišných osevních postupech a letech

Druhy plevelů	Osevní postupy a roky			
	7 -hon		5 -hon	
	2010	2011	2010	2011
<i>Veronica polita</i>	12,28	0,22	1,13	0,27
<i>Galium aparine</i>	0,03	0,43	1,34	4,38
<i>Chenopodium album</i>	0,07	0,08	0,54	3,20
<i>Thlaspi arvense</i>	0,07	0,54	0,09	2,02
<i>Silene noctiflora</i>	0,38	0,36	1,05	0,24
<i>Plantago major</i>	1,60	0,14	0,00	0,00
<i>Veronica persica</i>	0,54	0,99	0,02	0,15
<i>Convolvulus arvensis</i>	1,50	0,00	0,18	0,00
<i>Chenopodium hybridum</i>	0,00	0,00	0,00	1,24
<i>Cirsium arvense</i>	0,35	0,53	0,21	0,13
<i>Lamium amplexicaule</i>	0,81	0,31	0,02	0,01
<i>Sonchus oleraceus</i>	0,75	0,26	0,01	0,04
<i>Sinapis arvensis</i>	0,42	0,56	0,01	0,02
<i>Fallopia convolvulus</i>	0,08	0,35	0,13	0,27
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0,10	0,60	0,03	0,00
<i>Stellaria media</i>	0,49	0,00	0,00	0,00
<i>Taraxacum officinale</i>	0,24	0,24	0,00	0,00
<i>Amaranthus</i>	0,19	0,00	0,11	0,00
<i>Persicaria lapathifolia</i>	0,04	0,11	0,03	0,02
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	0,06	0,11	0,00	0,00
<i>Polygonum aviculare</i>	0,01	0,13	0,01	0,00
<i>Anagallis arvensis</i>	0,01	0,03	0,01	0,08
<i>Lactuca serriola</i>	0,00	0,10	0,00	0,02
<i>Microrrhinum minus</i>	0,00	0,01	0,04	0,02
<i>Artemisia vulgaris</i>	0,06	0,00	0,00	0,00
<i>Beta vulgaris</i>	0,06	0,00	0,00	0,00
<i>Consolida orientalis</i>	0,00	0,00	0,02	0,03
<i>Fumaria officinalis</i>	0,00	0,01	0,03	0,01
<i>Arctium tomentosum</i>	0,04	0,00	0,00	0,01
<i>Carthamus tinctorius</i>	0,00	0,00	0,00	0,05
<i>Euphorbia helioscopia</i>	0,03	0,00	0,00	0,02
<i>Carduus acanthoides</i>	0,01	0,01	0,00	0,00
<i>Geranium pusillum</i>	0,00	0,03	0,00	0,00
<i>Senecio vulgaris</i>	0,01	0,00	0,00	0,01
<i>Avena fatua</i>	0,00	0,00	0,00	0,01
<i>Brassica napus subsp. napus</i>	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>Echinochloa crus-galli</i>	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>Malva neglecta</i>	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>Viola arvensis</i>	0,00	0,00	0,01	0,00
Počet druhů	3,92	2,97	2,66	3,55
Počet jedinců	20,21	6,14	5,02	12,23

Obr. 1 Ordinační diagram vyjadřující vliv osevních postupů na jednotlivé druhy plevelů



Vysvětlivky k ordinačnímu diagramu (Obr. 1), varianty osevních postupů: ◆**5-hon** – 5-honný osevní postup, ▼**7-hon**.

Zkratky druhů: *Ama sp* – *Amaranthus*, *Ana arve* – *Anagallis arvensis*, *Arc tome* – *Arctium tomentosum*, *Art vulg* – *Artemisia vulgaris*, *Ave fatu* – *Avena fatua*, *Bet vulg* – *Beta vulgaris*, *Bra napu* – *Brassica napus subsp. napus*, *Cap burs* – *Capsella bursa-pastoris*, *Car acan* – *Carduus acanthoides*, *Car tinc* – *Carthamus tinctorius*, *Cir arve* – *Cirsium arvense*, *Con orie* – *Consolida orientalis*, *Con arve* – *Convolvulus arvensis*, *Ech crus* – *Echinochloa crus-galli*, *Eup heli* – *Euphorbia helioscopia*, *Fal conv* – *Fallopia convolvulus*, *Fum offi* – *Fumaria officinalis*, *Gal apar* – *Galium aparine*, *Ger pusi* – *Geranium pusillum*, *Che albu* – *Chenopodium album*, *Che hybr* – *Chenopodium hybridum*, *Lac serr* – *Lactuca serriola*, *Lam ampl* – *Lamium amplexicaule*, *Mal negl* – *Malva neglecta*, *Mic minu* – *Microrrhinum minus*, *Per lapa* – *Persicaria lapathifolia*, *Pla majo* – *Plantago major*, *Pol avic* – *Polygonum aviculare*, *Sen vulg* – *Senecio vulgaris*, *Sil nocti* – *Silene noctiflora*, *Sin arve* – *Sinapis arvensis*, *Son olera* – *Sonchus oleraceus*, *Ste medi* – *Stellaria media*, *Tar offi* – *Taraxacum officinale*, *Thl arve* – *Thlaspi arvense*, *Tri inod* – *Tripleurospermum inodorum*, *Ver pers* – *Veronica persica*, *Ver poli* – *Veronica polita*, *Vio arve* – *Viola arvensis*.

ZÁVĚR

Celkem bylo nalezeno na obou pokusech v průběhu dvouletého sledování 39 druhů plevelů.

V porostu ječmene jarního pěstovaného v 7-honném osevním postupu se z plevelů nejčastěji vyskytovaly druhy: *Veronica polita*, *Plantago major*, *Veronica persica*, *Convolvulus arvensis*, *Lamium amplexicaule*, *Sonchus oleraceus*, *Sinapis arvensis* a *Cirsium arvense*.

Zaplevelení v porostu ječmene jarního pěstovaného v 5-honném osevním postupu dominovaly druhy: *Galium aparine*, *Chenopodium album*, *Thlaspi arvense*, *Veronica polita*, *Silene noctiflora*, *Chenopodium hybridum*, *Fallopia convolvulus* a *Cirsium arvense*.

Výrazný vliv na intenzitu zaplevelení i druhovou pestrost měl ročník. Mezi výsledky z obou let sledování byl významný rozdíl ve složení plevelů i v početnosti jednotlivých druhů.

Výsledky potvrzují naše starší zjištění, že při vyšší koncentraci obilnin v osevním postupu stoupá výskyt druhu *Galium aparine*.

LITERATURA

DEYL, M. (1964): *Plevelé polí a zahrad*. 2. vyd. Praha: Československá akademie věd, 1964, 392 s. ISBN 21-070-64.DVOŘÁK, J. (1987): *Zemědělské soustavy: Vybrané kapitoly - polní plevelé*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, 1987, 58 s.

DVOŘÁK J., SMUTNÝ, V., 2003: *Herbologie – Integrovaná ochrana proti plevelům*. Skriptum MZLU v Brně, ISBN 80-7157-732-4, 186 s.

HRON, F., VODÁK A. (1959): *Polní plevelé a boj proti nim*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1959, 381 s.

JURSÍK, J., HOLEC, J., HAMOUZ, P., SOUKUP, J. (2011): *Plevelé, biologie a regulace*. 1. vyd. České Budějovice: Kurent, 2011, 232 s. ISBN: 978-80-87111-27-7ČAČA, Z., et al. (1990): *Ochrana polních a zahradních plodin*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990, 368 s. ISBN 80-209-0171.

KŘEN J., VALTÝNIOVÁ S., 2008, *Czech Agriculture in the period of transformation*, *Acta Agrophysica*, 101-116 s., ISSN 1234-4125.

LEKEŠ, J., et al., (1986): *Ječmen*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1985, 296 s.

TER BRAAK, C., J., F.: CANOCO – A FORTRAN program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [canonical] correspondence analysis (version 4.0.). Report LWA-88-02 *Agricultural Mathematics Group*. Wageningen, 1998.

COMPARISON OF NON-DIRECT METHODS FOR ESTIMATION OF NITROGEN STATUS AND CANOPY STRUCTURE IN SPRING BARLEY

SROVNÁNÍ NEPŘÍMÝCH METOD PRO VYHODNOCENÍ VÝŽIVNÉHO STAVU A STRUKTURY POROSTU JEČEMENE JARŇÍHO

Novotná K.^{1,2}, Klem K.^{1,2}

¹Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe – Global Change Research Centre AS CR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xnovotn3@mendelu.cz

ABSTRACT

The main objective of this study was to compare numerous vegetation indices derived from reflectance measurements in range 350 – 2500 nm (using the instrument FieldSpec 3 equipped with fiber optics) with *in-vivo* measured flavonols and chlorophyll content and derived Nitrogen Balance Index (NBI) (using the instrument Dualex). The sensitivity of individual parameters to genotypic variability and canopy structure was tested in two spring barley varieties ('Barke' and 'Bonus') and three sowing densities (1, 3 and 5 million germinable seeds). Furthermore, the effect of UV and PAR radiation on flavonols content was studied within independent experiment to ensure robustness of the selected parameters for the diagnosis of nutritional status and structure of vegetation. The results show that content of flavonols provides more uniform outcome with less influence of sowing density, but with a certain effect of leaf age. In addition, within the variety 'Bonus' significant effect of lowest sowing density was found. It is also evident that at higher doses of nitrogen the effect on flavonol content is saturating.

Key words: spectral reflectance, vegetation indices, nitrogen, flavonols, UV radiation, PAR radiation

Acknowledgments: This work was supported by the European Commission (project CzechGlobe - contract CZ.1.05/1.1.00/02.0073) and by the project National Agency for Agriculture Research No. QII11A133.

INTRODUCTION

Spatial variation in soil conditions and temporal changes in weather, results in high spatio-temporal variability in nutrient availability and canopy structure with significant impact on crop productivity. In order to be able timely estimate this heterogeneity and prevent negative impact on crop productivity and canopy structure there is increasing demand for reliable method, which will enable to detect already small changes in crop physiology on relatively large areas. One of the most promising approaches in remote sensing is based mainly on spectral reflectance measurements. Vegetation indices that combine reflectance from few spectral bands have been developed for pigment retrieval and subsequently for nitrogen status estimation (Gitelson et al., 1996). Specific absorption coefficients of leaf pigments are high for blue and red wavelengths and the depth of light penetration into the leaf is very low (Merzlyak and Gitelson, 1995). As a result, even low amounts of foliar pigments are sufficient to saturate absorption. The widely applied Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), due to its early saturation (Buschmann and Nagel, 1993), was found to be insufficiently sensitive to changes of medium and high chlorophyll/nitrogen content. For this reason, increased attention was later paid to the development of new vegetation and chlorophyll indices and new non-direct diagnostic methods for estimation of nitrogen nutrition status that would provide higher accuracy and reliable detection also at higher levels of nitrogen nutrition. One of the most promising approaches seems to be the detection of leaf polyphenolic compounds (flavonols) based on measurements of UV-screening of chlorophyll fluorescence (Cerovic et al. 2005). The main objective of this study was to compare numerous vegetation indices derived from reflectance measurements in range 350 – 2500 nm with *in-vivo* measured flavonols content and derived Nitrogen Balance Index (NBI). The sensitivity of individual parameters to genotypic variability and canopy structure was tested in two barley varieties and three sowing densities. Furthermore, the effect of UV and PAR radiation on flavonols content was studied within independent experiment to ensure robustness of the selected parameters for the diagnosis of nutritional status and structure of vegetation.

MATERIALS AND METHODS

Within the first experiment the pre-germinated seeds of two barley varieties ('Barke' and 'Bonus') were sown in pots filled with a mixture of siliceous sand (0 – 2 mm fraction) and a light peat substrate that contains no fertilizers and pH is adjusted to 5.5 – 6.5 (Base substrate, Klasmann-Deilmann, D). The sowing density was adjusted to 1, 3 and 5 million of germinable seeds (MGS). After 9 days since seeding (11 – 12 BBCH) were the pots fertilized with nitrogen (CaNO₃ dissolved in water) to achieve final nitrogen doses of 0, 5 and 100 kg N.ha⁻¹ respectively.

Within the second experiment two barley varieties ('Barke' and 'Bonus') were sown in one density 3 MGS and the nitrogen fertilization was carried out in two doses 0 and 200 kg N.ha⁻¹. At the growth stage BBCH 12 were the pots placed under two contrast radiation treatments. UV0 PAR50 represents the treatment with excluded UV radiation using UV filter (Lee Filters) and reduced PAR using shading net with approximately 50% transmittance of PAR. UV100 PAR100 treatment represents ambient UV and PAR conditions. Barley plants were cultivated under these treatments for 8 days.

Measurement of spectral reflectance in the range 350 – 2500 nm was done at BBCH 13 on the canopy level using the instrument FieldSpec 3 (ASD inc.) equipped with fiber optics. Spectral on plate was used as a reference before each measurement. Measurements of chlorophyll content and flavonols were carried out with the instrument Dualex (Force A) on the first and second leaf around 13 BBCH (within second experiment BBCH 12-13). Vegetation and chlorophyll indices were calculated as simple ratios or normalized indices based on commonly used formulas. Nitrogen Balance Index (NBI) was calculated as a ratio between chlorophyll and flavonols content. Data were analysed using statistical software Statistica 7.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of transmittance based measurement of chlorophyll content (Dualex) show relatively small changes with nitrogen dose with high variation of measured data. This method of measurement of chlorophyll content using transmittance is now considered as a standard among non-direct methods for detection of nitrogen nutrition status (e.g. SPAD or N-tester). Although this type of measurement is carried out at the leaf level, it is interesting that the results show a relatively conclusive effect of sowing density on these values. This is probably due to the competition of plants for nitrogen and light. Therefore with increasing density the chlorophyll content decreases. It is therefore evident that the canopy structure must be also taken into account during detection of nitrogen status. Similarly, there is also apparent effect of variety on the chlorophyll content. This shows the necessity of varietal calibration of this method.

Response of flavonols content on nitrogen dose shows generally opposite trend compare to chlorophyll content. At the higher dose of nitrogen the flavonols content decreases. Likewise, the sowing density affects the content of flavonols in the opposite direction than chlorophyll content. Generally, the content of flavonols provides more uniform results with less influence of sowing density, but with a certain effect of leaf age. In addition, within the variety 'Bonus' significant effect of lowest sowing density was found. It is also evident that at higher doses of nitrogen the effect on flavonol content is saturating.

Using the flavonol content for more accurate diagnosis of nitrogen nutrition in the form of NBI brings reduced variability and thus more accurate detection. Differences between sowing densities, however, remain almost unchanged and therefore the calculated nitrogen dose should be adjusted according to canopy structure.

If we compare NBI with the vegetation indices that provide the highest response, such as NDVI or NRERI, it is apparent that these indices are characterized by relatively high variability of the measured data, early saturation already at middle nitrogen dose, but surprisingly also by little response to sowing density. We can therefore assume that the combination of spectral reflectance measurement with UV-screening of chlorophyll fluorescence (flavonols content) may contribute to the more accurate results of diagnostic methods for nitrogen nutrition.

Based on the results of the second experiment, however, it is necessary to state that the amount of accumulated flavonols is also dependent on the radiation conditions and in particular on the amount of UV radiation. This can result in temporal variability of the content of flavonols, due to the change of the incident radiation. These measurements therefore require the development of appropriate methods of calibration or relative comparison that would limit the effect of different radiation conditions.

Fig. 1 Effect of nitrogen dose, sowing density and leaf age on chlorophyll content in two barley varieties. The chlorophyll content was determined non-destructively on the basis of transmittance measurements (Dualix, Force A, F). Means (points) and 95% confidence intervals (error bars) are presented ($n \geq 4$).

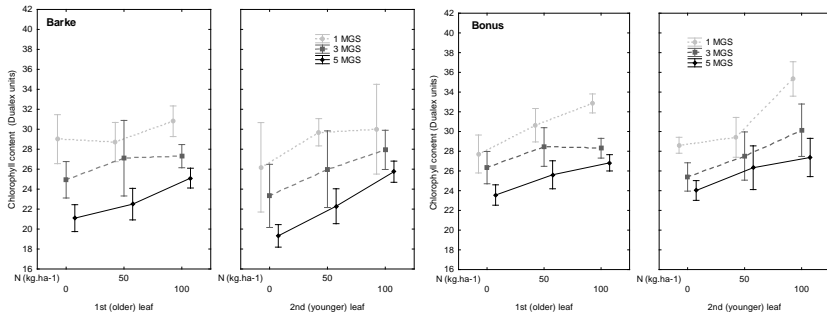


Fig. 2 Effect of nitrogen dose, sowing density and leaf age on flavonols content in two barley varieties. The flavonols content was determined non-destructively on the basis of measurement of UV-screening of chlorophyll fluorescence (Dualex, Force A, F). Means (points) and 95% confidence intervals (error bars) are presented ($n \geq 4$).

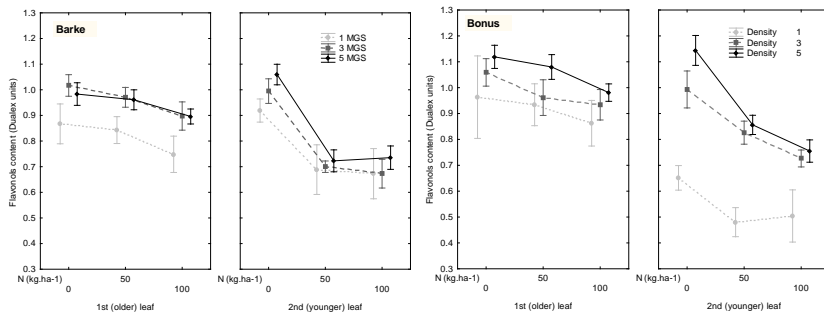


Fig. 3 Effect of nitrogen dose, sowing density and leaf age on Nitrogen Balance Index (NBI) in two barley varieties. The NBI was calculated as a ratio of chlorophyll and flavonols content both determined non-destructively with instrument Dualex. Means (points) and 95% confidence intervals (error bars) are presented ($n \geq 4$).

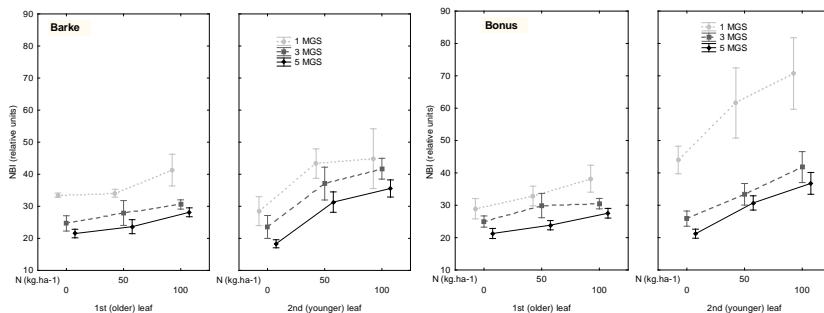


Fig. 4: Effect of nitrogen dose and sowing density on selected vegetation indices (NDVI and NRERI) in two barley varieties. The spectral reflectance measurements were made on the canopy level using spectroradiometer FieldSpec 3. Means (points) and 95% confidence intervals (error bars) are presented (n=4).

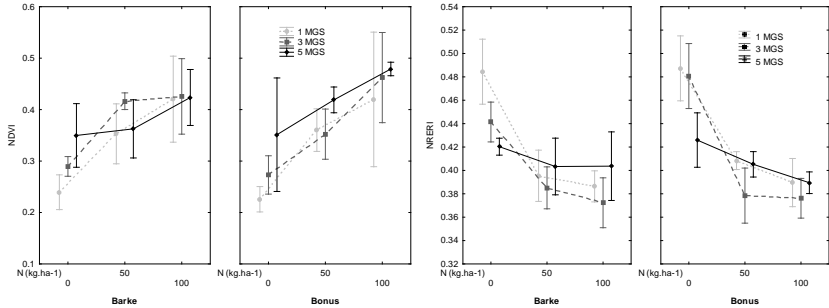
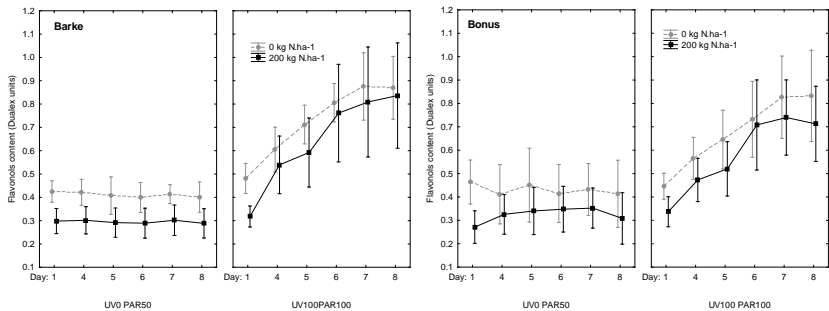


Fig. 5: Changes in flavonols content during short-term exposition to two levels of UV and PAR radiation treatments (UV0 PAR50 represents UV exclusion and reduction of PAR to 50%; UV100 PAR100 represents ambient UV and PAR conditions) in response to nitrogen dose. Means from two leaves (1st and 2nd leaf) are shown separately for individual barley varieties. The flavonols content was determined non-destructively on the basis of measurement of UV-screening of chlorophyll fluorescence (Dualox, Force A, F). Means (points) and 95% confidence intervals (error bars) are presented (n≥4)



CONCLUSIONS

The chlorophyll content shows relatively small changes with nitrogen dose and with high variation of measured data. Interestingly, the data show a relatively conclusive effect of sowing density on chlorophyll content. Response of flavonols content on nitrogen dose shows generally opposite trend compare to chlorophyll content. Generally, the content of flavonols provides more uniform results with less influence of sowing density, but with a certain effect of leaf age. Using the flavonol content for more accurate diagnosis of nitrogen nutrition in the form of Nitrogen Balance Index (NBI) brings reduced variability and thus more accurate detection. However, the amount of accumulated flavonols is also dependent on the radiation conditions and in particular on the amount of UV radiation. The vegetation indices that provide the highest response to nitrogen dose (e.g. NDVI or NRERI) are characterized by relatively high variability of the measured data, early saturation already at middle nitrogen dose, but surprisingly also by little response to sowing density. We can assume that the combination of spectral reflectance measurement with UV-screening of chlorophyll fluorescence (flavonols content) may contribute to the more accurate results of diagnostic methods for nitrogen nutrition.

REFERENCES

- BUSCHMANN C., NAGEL E., 1993: In vivo spectroscopy and internal optics of leaves as basis for remote sensing of vegetation. *International Journal of Remote Sensing*. 14 (4): 711 – 722.
- CARTELAT A., CEROVIC Z.G., GOULAS Y., MEYER S., LELARGE C., PRIOUL J.-L., BARBOTTIN A., JEUFFROY M.-H., GATE P., AGATI G., MOYA I., 2005: Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*. 91 (1): 35 – 49.
- GITELSON A. A., MERZLYAK M. N., 1995: Why and what for the leaves are yellow in autumn? On the interpretation of optical spectra of senescing leaves (*Acer platanoides* L.). *Journal of Plant Physiology*. 145 (3): 315 – 320.
- GITELSON A. A., MERZLYAK M. N., LICHTENTHALER H. K., 1996: Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *Journal of Plant Physiology*. 148 (3 – 4): 501 – 508.

CALIBRATION OF THE SELECTED CROP GROWTH MODELS FOR SPRING BARLEY

KALIBRACE VYBRANÝCH RŮSTOVÝCH MODELŮ PRO JEČMEN JARNÍ

Pohanková E.¹, Trnka M.^{1, 2}, Hlavinka P.^{1, 2}, Takáč J.³, Kersebaum Ch.⁴, Orság M.^{1, 2}, Fischer M.^{1, 2}, Pokorný E.⁵, Žalud Z.^{1, 2}

¹Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe, Centre for Global Climate Change Impact Studies, AS CR, v. v. i. Brno, Czech Republic

³Soil Science and Conservation Research Institute, Gagarinova 10, 827 13 Bratislava, Slovak Republic

⁴Institute of Landscape Systems Analysis, Eberswalder Straße 84, 153 74 Müncheberg, Germany

⁵Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Eva.Pohankova@seznam.cz

ABSTRACT

The climate change is one of the most discussed global problems. One option how to estimate the effects of expected future climate conditions on plant production is the use of the crop growth models. Our aim was the calibration of two models (Daisy and Hermes) based on observed and measured data that were collected for spring barley (represented by cultivars Tolar and Blaník) at experimental site Bystřice nad Pernštejnem during 2011 and 2012. The onset of flowering was underestimated by an average of 1.1 and 1.6 days and maturity by 5.8 and 9.0 days using Daisy and Hermes respectively. On average Daisy systematically underestimated yields by 0.3 t·ha⁻¹ and Hermes overestimated yields by 1.24 t·ha⁻¹. We expect further improvement of these models estimates using the available result from the following years.

Key words: spring barley, field experiment, crops growth model

Acknowledgments: This work was supported by projects funded by National Agency for Agricultural Research Q191C054 Soil Climate Atlas; „Partnerství v oblasti výzkumu klimatu a adaptačních strategií, reg. č. CZ.1.07/2.4.00/31.0056“; KONTAKT project no. LH11010 and project of Internal Grant Agency, AF MENDELU No.TP 9/2012 „Innovation of crop management practices in areas threatened by drought“.

ÚVOD

Ječmen jarní je po ozimé pšenici v České republice druhou nejrozšířenější pěstovanou plodinou. Tomu odpovídá i jeho ekonomický význam. Ze sedmdesáti procent je používán jako krmivo, kolem třiceti procent celkové sklizně ječmene jarního se uplatňuje při výrobě sladu. Jen velmi malé množství je určeno k přímé produkci potravin.

V roce 2011 byl pěstován na výměře 268 tis. ha s průměrným hektarovým výnosem $5,11 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$. V roce 2012 se plocha pěstovaného ječmene zvýšila na 284 tis. ha. Odhad průměrného výnosu je o $0,62 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ nižší, tedy $4,49 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Mze, Stav sklizně obilovin a řepky - operativní zpráva k 28.8.2012).

Aby výnosy v budoucích letech nebyly ztrátové, bude nutné stále důkladněji vybírat vhodné pěstební lokality, odrůdy a další adaptační opatření, jako např. optimalizovat termín setí, technologii zpracování půdy či zefektivnit režim hnojení apod.

Kvůli zvýšené koncentraci skleníkových plynů včetně oxidu uhličitého v atmosféře a jeho vlivu na výměnu látek mezi rostlinou a prostředím a klimatické podmínky samotné, oblastí, kde se určitý druh plodin pěstuje nyní, pravděpodobně již nebudou v budoucnu k tomuto účelu vhodné (Žalud et al., 2008). Jednou z možností, jak předvídat, do jaké míry postihnou dopady změny klimatu výnosy zemědělských plodin v různých půdně-klimatických podmínkách, je využít růstové modely.

V tomto příspěvku byla hlavním cílem kalibrace dvou růstových modelů, Daisy a Hermes, na základě námi pozorovaných a naměřených dat u ječmene jarního na experimentálních stanovištích v Bystřici nad Pernštejnem v letech 2011 a 2012.

MATERIÁL A METODIKA

Růstové modely

V dnešní době je dostupná celá řada růstových modelů (např. APES, CROPSYST, DAISY, DSSAT, FASSET, HERMES, STICS, WOFOST), které z hlediska biologických a technologických aspektů udržitelnosti slouží jako nástroj pro plánování řízených ekosystémů (Challinor et al., 2009; Porter and Semenov, 2005). Snaží se přiblížit důsledky změny prostředí (vč. změny teploty, srážek a nárůstu koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře), na výměnu látek mezi rostlinou a prostředím.

Pro jejich kalibraci je zapotřebí vhodná databáze. Ta se skládá z informací o srážkách; teplotě vzduchu; vlhkosti vzduchu; denních sumách globální radiace; rychlosti větru; z informací o technologii pěstování (např. setí, zavlažování, hnojení) půdních vlastnostech (např. zrnitostní složení, hydrolimity, objemová hmotnost, obsah živin); jednotlivých fenologických fází

MENDELNET 2012

(např. kvetení, fyziologické zralosti, sklizni); listové ploše (LAI), množství nadzemní biomasy a dosažené vodní bilanci. Hlavním principem aplikace růstových modelů je zapracovat výsledky měřených biotických dějů s jejich provázaností na abiotické podmínky do základních algoritmů. Jednotlivé modely se současně liší architekturou, komplexností, samotnými algoritmy a jejich parametrizací (Palosuo et al., 2011).

Růstové modely Daisy a Hermes na základě informací o způsobu hospodaření s půdou a údajích o počasí simulují růst plodiny, vodní režim, tepelný režim půdy, bilanci organické hmoty a dynamiku dusíku.

Růstový model Daisy

Daisy je dánský agroekologický simulační model (Hansen et al. 1990).

Samotný model má hierarchickou strukturu a forma vstupních dat je do jisté míry flexibilní. Model k zahájení simulace vyžaduje:

1. Meteorologické údaje, které slouží k výpočtu evapotranspirace. Aplikován byl výpočet referenční evapotranspirace ET_0 dle Penmana-Monteitha (FAO) (Allen et al., 1998), který vyžaduje údaje o průměrné denní teplotě vzduchu ($^{\circ}C$), globálním záření ($MJ \cdot m^{-2}$), denních srážkách (mm), rychlosti větru ($m \cdot s^{-1}$), tlaku par nebo relativní vlhkosti vzduchu (%). Pokud chybí údaje o rychlosti větru a vlhkosti vzduchu model provede výpočet evapotranspirace ET_0 výstupem empirického vztahu Masinga.
2. Údaje o půdě, kde vstupují do modelu informace o zrnitostním složení půdy, objemové hmotnosti půdy, obsahu humusu, poměru C:N, hydraulické vodivosti půdy a parametrech retenční čáry.
3. Údaje o plodinách, kde mezi simulované procesy růstu rostliny patří fotosyntéza, respirace, rozdělení asimilátů, odumírání listů a kořenů, struktura porostu a stresové faktory. Fotosyntéza je počítána z indexu listové plochy (LAI), globálního záření, teploty vzduchu, vodního a dusíkového stresu. Model rozlišuje listy, stébla, zásobní orgány a kořeny rostliny. Rychlost vývoje rostliny je simulována na základě informací o teplotě a délce dne (Takač, Šiška, 2011).
4. Agrotechnické údaje, nazývané jako management, kde jsou pro Daisy definovány informace o hospodaření s půdou. Data, která tato část modelu rozlišuje, by se dala rozdělit na dvě části
 - a) přímá (orba, setí, sklizeň)
 - b) podmíněná (termín a množství hnojení, případně závlahy)

Model Daisy simuluje vodní bilanci povrchu i půdy. Pohyb vody v půdě je stanoven pomocí numerického řešení Richardsovy rovnice.

Daisy ke vkládání vstupních dat používá textový editor TextPad.

Růstový model Hermes

Hermes je německý agroekosystémový model. Z počátku byl vyvinut pro simulaci dynamiky dusíku v rostlinách a půdě (Kersebaum, 2011). V současné době komplexně simuluje celkový vývoj plodiny v daných podmínkách na základě specifických vstupních dat, mezi která patří:

1. Meteorologická data - průměrná denní teplota ($^{\circ}\text{C}$), relativní vlhkost (%), globální radiace ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{den}$), denní srážky (mm) a rychlost větru ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) - která modelu slouží pro výpočet evapotranspirace. Hermes počítá evapotranspiraci na základě dvou vzorců. V rámci předkládané studie byl použit výpočet dle Penman-Monteithe, který bere v úvahu výše uvedené proměnné. Alternativou je tzv. Haudeho vzorec, přičemž se jedná o standardní metodu Německé meteorologické služby.
2. Údaje o půdních vlastnostech, tj o obsahu organického uhlíku pro výpočet mineralizačního potenciálu půdy, o poměru C:N pro odhad obsahu organického dusíku v půdě, o objemové hmotnosti a půdní textuře pro určení maximální efektivní dosažitelné kořenové hloubky plodiny, o kamenitosti půdy, která vstupuje v úvahu při výpočtu půdní vlhkosti a hydrolimitech – bodu vadnutí a polní kapacitě – důležitých pro výpočet vodní bilance na základě tzv. kapacitní metody.
3. Údaje o agrotechnických opatřeních (termínech orby, hnojení, setí, závlah, sklizni).
4. Údaje o modelované plodině, kdy se do růstového modelu zadá základní charakteristika ječmene jarního. Nastavení odrůdy Tolar a Blaník v rámci modelu Hermes bylo vytvořeno rekalibrací odrůdy Orbit, která byla definována pro podmínky v České republice autorem modelu a aplikována v publikaci Rötter et al. (2012). Rekalibrace spočívala zejména v modifikaci délky fenologických fází.

Růstový model Hermes je schopen pracovat i s omezeným rozsahem vstupních dat. Všechny údaje, určené pro simulaci, musí být k dispozici ve speciálně definovaném formátu. Ke vkládání vstupních dat slouží jednoduchý textový editor.

Popis polního experimentu

Růstové modely byly kalibrovány na základě pozorovaných a naměřených dat z pokusného stanoviště v Bystřici nad Pernštejnem z let 2011 a 2012.

Experimentální lokalita se nachází v kraji Vysočina přibližně 60 km severo-severo-západně od Brna. Území s nadmořskou výškou 530 m n n náleží do bramborářsko-obilnářské výrobní oblasti. Podmínky pro intenzivní rostlinnou výrobu jsou zde ztíženy vyšší skeletovitostí a svažitostí půd jakož i nižším obsahem humusu a celkově horší kvalitou půdy a rizikem pozdním mrazů.

Design pokusu byl v obou letech totožný. Pokus s osmi variantami (označenými 1-8) byl založen na standardizovaných pokusných parcelách každé o velikosti $12,5 \text{ m}^2$ ve třech opakováních. Jednotlivé varianty se lišily:

1. odrůdou (odrůda Tolar, varianty 1,2,3,4 x odrůda Blaník, varianty 5,6,7,8)

2. termínem setí (varianty 1,2,5,6 s normální agrotechnickým termínem setí x varianty 3,4,7,8 s o 14 dní zpožděným agrotechnickým termínem setí)
3. dávkou hnojení (varianty 1,3,5,7 s běžnou úrovní hnojení x varianty 2,4,6,8 s o 1/3 zvýšenou dávkou hnojení)

Tab. 1. Rozdělení variant polního pokusu

varianty	odrůda	setí 2011	dávka č.N		
			(kg·ha ⁻¹) 2011	(kg·ha ⁻¹) 2012	
1	Tolar	12.04.	60	18.04.	70
2	Tolar	12.04.	69 + 20	18.04.	81+20
3	Tolar	27.04.	60	03.05.	70
4	Tolar	27.04.	69 + 20	03.05.	81+20
5	Blaník	12.04.	60	18.04.	70
6	Blaník	12.04.	69 + 20	18.04.	81+20
7	Blaník	27.04.	60	03.05.	70
8	Blaník	27.04.	69 + 20	03.05.	81+20

Tolar

Polopozdní sladovnická odrůda preferovaná některými sladovny. Je doporučena výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna je ve všech oblastech nízký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, středně až méně odolné proti poléhání. Zrno je středně velké, podíl předního zrna je nízký (VÚPS, 2009).

Blaník

Polopozdní sladovnická odrůda. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna je v neošetřené variantě v kukuřičné oblasti a v ošetřené variantě v bramborářské oblasti vysoký, v ošetřené variantě v kukuřičné oblasti je velmi vysoký, v řepařské a obilnářské oblasti a v neošetřené variantě v bramborářské oblasti je středně vysoký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, středně až méně odolné proti poléhání. Zrno je velké, podíl předního zrna je vysoký (VÚPS, 2009).

U variant 1,2,3 byly parcely zdvojené. Jedna byla odběrová, druhá sklizňová. Ve sklizňových parcelách byla do hloubky 30 cm umístěna dvě čidla TDR na měření obsahu půdní vláhy a v týdenním kroku zde byla měřena listová plocha pomocí přístroje SunScan (výrobce Delta-T Devices, Velká Británie).

Z odběrových parcel byly v průběhu vegetační sezóny prováděny odběry nadzemní biomasy a půdy a to minimálně 6x za sezónu. Jedna sada odběrů byla vždy provedena v době krátce po vzházení ječmene, jedna na počátku kvetení ječmene a jedna v době fyziologické zralosti ječmene.

U nadzemní biomasy byl vždy stanoven obsah sušiny na 1 m² a obsah dusíkatých látek v rostlině.

První půdní odběr proběhl ještě před setím, a to do hloubky 30 cm. Sloužil ke stanovení obsahu minerálního dusíku (NO₃ a NH₄) v jednotlivých vrstvách půdy. Díky tomu nám byly známi iniciační podmínky na pokusných parcelách. Ostatní půdní odběry se dělaly vždy následně po odběru nadzemní biomasy a po sklizni do hloubky 30 cm. Odebrané vzorky byly gravimetricky zpracovány a výsledky budou použity ke kalibraci čidel TDR umístěných ve sklizňových parcelách.

Podrobně se zde sledoval nástup a průběh fenologických fází (vzházení, odnožování, sloupkování, metání, kvetení, žlutá zralost, sklizeň), zdravotní stav porostu, hlavní výnosotvorné parametry, tj hustota porostu před sklizní, počet vzešlých rostlin na m², počet produktivních odnoží na m², sušina, hmotnost tisíce zrn, počet zrn v klase, jejich vlhkost a výnos.

V polních pokusech byla každý rok nainstalována meteorologická stanice.

Podle naměřených a pozorovaných údajů z polních pokusů z let 2011 a 2012 byly kalibrovány růstové modely Daisy a Hermes.

Ke statistickému vyhodnocení vztahu mezi naměřenými a modelovanými veličinami byly použity následující parametry (Davies & McKay 1989)

1. MBE, jako ukazatel průměrné systematické chyby
2. RMSE, jako střední kvadratická chyba, která popisuje průměrnou absolutní odchylku mezi pozorovanými a modelovanými hodnotami

$$MBE = \frac{\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)}{n} \quad (1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i)^2}{n}} \quad (2)$$

kde S_i odpovídá odhadované hodnotě dané veličiny,
O_i odpovídá pozorované hodnotě dané veličiny,
n je počet dvojic pozorovaných a odhadovaných hodnot

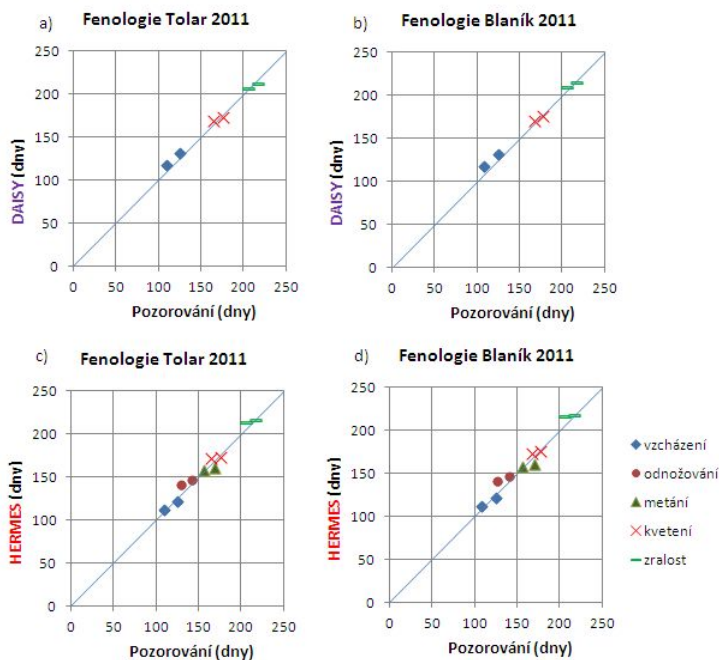
VÝSLEDKY A DISKUZE

Kalibrace růstových modelů Daisy a Hermes na základě naměřených a pozorovaných dat z polního pokusu s ječmenem jarním v Bystřici nad Pernštejnem probíhala v několika fázích. Prvním krokem

bylo co nejvíce přiblížit termíny modelovaných fenologických fází fenofázím pozorovaným. Pokus je zastoupen dvěma odrůdami. Kalibrace se dělala pro každou odrůdu zvlášť. U růstového modelu Daisy kalibrace fenofází probíhala postupným upravováním přednastavených parametrů vývojových stádií plodiny pro vegetativní a reprodukční fázi vývoje. V modelu Hermes byly postupně modifikovány teplotní sumy odpovídající jednotlivým fenologickým fázím.

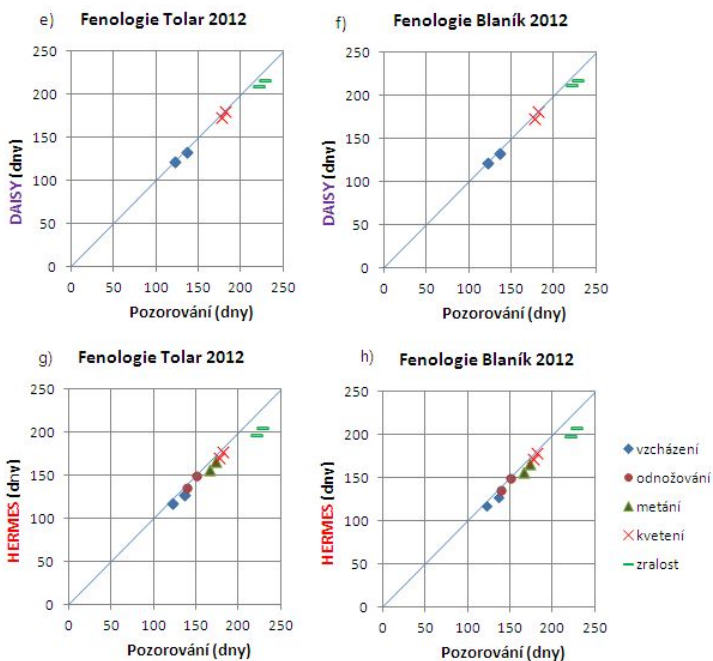
Graficky jsou výsledky kalibrace zachyceny pomocí obrázků 1 a 2. Dosažené hodnoty indikátorů MBE a RMSE jsou pak uvedeny v tabulce 2 a 3.

Obr. 1: Srovnání pozorovaného a modelovaného nástupu fenologických fází v roce 2011 pro odrůdy Tolar (a, c) a Blaník (b, d) pomocí modelů Daisy (a, b) a Hermes (c, d). V rámci obou modelů je odhadován termín vzházení, kvetení a zralosti. U modelu Hermes jsou mezi výstupy i odhadované termíny pro odnožování a metání. Jednotlivé termíny jsou definovány pomocí pořadového čísla daného dne od začátku roku



Obr. 2: Srovnání pozorovaného a modelovaného nástupu fenologických fází v roce 2012 pro odrůdy Tolar (a, c) a Blaník (b, d) pomocí modelů Daisy (a, b) a Hermes (c, d). V rámci obou modelů je odhadován termín vzházení, kvetení a zralosti. U modelu Hermes jsou mezi výstupy

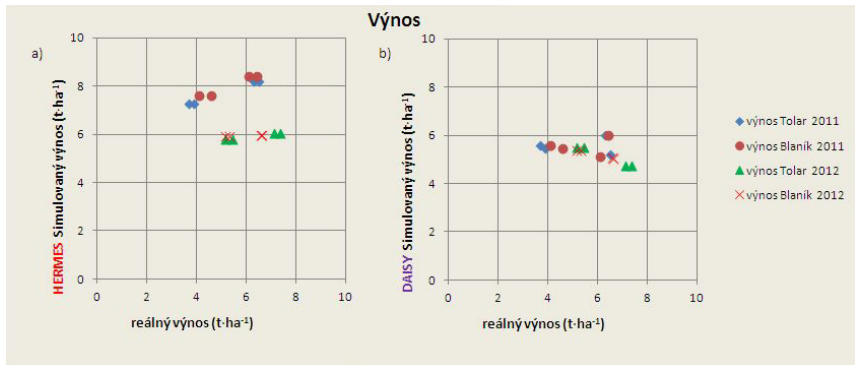
i odhadované termíny pro odnožování a metání. Jednotlivé termíny jsou definovány pomocí pořadového čísla daného dne od začátku roku.



Dalším ukazatel kalibrace růstových modelů je porovnání simulovaných a reálných výnosů u jednotlivých variant pokusu. Hermes nedokázal z hlediska výnosů rozlišit mezi nižší a vyšší úrovní hnojení.

Graficky jsou modelované a simulované výnosy zachyceny pomocí obrázku 3. Dosažené hodnoty indikátorů MBE a RMSE jsou pak uvedeny v tabulce 2 a 3.

Obr. 3: Srovnání pozorovaných a odhadovaných výnosů ječmene jarního (odrůdy Tolar a Blaník) pomocí modelu Hermes a Daisy v roce 2011 a 2012.



Model Daisy výnos v průměru za oba simulované roky systematicky mírně podhodnotil. Hermes v roce 2011 výnos systematicky nadhodnocoval, což by se částečně dalo vysvětlit polehnutím porostu v době trvání pokusu, které mohlo vést k nižšímu reálnému výnosu (tento fakt model nedokáže do svých odhadů zahrnout). V roce 2012 Hermes téměř nedokázal rozlišit mezi dříve a později setými variantami, což vyústilo v podhodnocení výnosů v prvním a mírnému nadhodnocení v druhém případě. Model Hermes v roce 2012 předpokládal, že později seté varianty profitovaly díky lepšímu rozložení srážek vzhledem k růstovým fázím. Díky tomu se v těchto variantách vytvořilo i více LAI (což potvrzují i měřené hodnoty). To se následně pozitivně projevilo u modelovaných výnosů, které se téměř dorovnaly odhadovaným hodnotám dříve setých variant. V případě pozorovaných výnosů se možnost delšího růstu u dříve setých variant (viz. pozorované termíny setí, vzházení a zralosti) pozitivně projevila na výnosech mnohem významněji, než tomu bylo u modelu.

Tab. 2. Vyhodnocení kalibrace dle statistického parametru MBE (Mean Bias Error)

2011	Daisy MBE			Hermes MBE		
	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)
Tolar 1-4	1,0	-1,5	0,47	2,5	3,5	2,63
Blaník 5-8	0,5	1,0	0,24	2,0	6,0	2,66
2011 Ø MBE	0,8	-0,3	0,40	2,3	4,8	2,66
2012	Daisy MBE			Hermes MBE		
	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)
Tolar 1-4	-3,5	-12,5	-1,16	-6,5	-23,5	-0,37
Blaník 5-6	-2,5	-10,0	-0,72	-4,5	-22,0	0,01
2012 Ø MBE	-3,0	-11,3	-0,90	-5,5	-22,8	-0,18
2011 a 2012 Ø MBE	-1,1	-5,8	-0,30	-1,6	-9,0	1,24

Růstový model Daisy simuloval kvetení v průměru o 1,1 dne dříve, než bylo pozorováno, zralost předběhl o 5,8 dní a celkový výnos o 0,3 t·ha⁻¹ podhodnotil. Hermes fenofázi kvetení předběhl o 1,6 dne, zralost o celých 9 dní. Výnos naopak o 1,24 t·ha⁻¹ nadhodnotil.

Tab. 3. Vyhodnocení kalibrace dle statistického parametru RMSE (Root Mean Square Error)

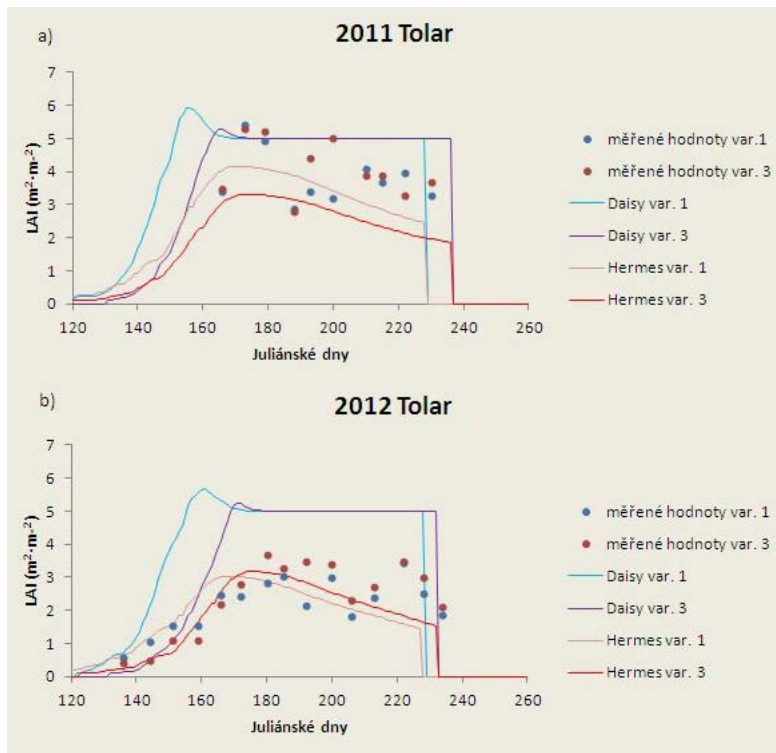
2011	Daisy RMSE			Hermes RMSE		
	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)
Tolar 1-4	10,0	8,5	1,97	26,5	32,5	7,62
Blaník 5-8	6,5	10,0	1,02	20,0	61,0	7,62
2011 Ø RMSE	2,9	3,0	1,20	4,8	6,8	2,76
2012	Daisy RMSE			Hermes RMSE		
	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)	Kvetení (dny)	Zralost (dny)	Výnos (t·ha ⁻¹)
Tolar 1-4	14,5	156,5	3,19	44,5	552,5	0,84
Blaník 5-8	8,5	101	1,23	22,5	485,0	0,45
2012 Ø RMSE	3,4	11,3	1,50	5,8	22,8	2,03
2011 a 2012 Ø RMSE	3,1	8,3	1,40	5,3	16,8	2,03

Podle statistického parametru RMSE, průměrná tzv. absolutní chyba růstového modelu Daisy byla o velikosti 3,1 dne při kvetení, 8,3 dní při zralosti a 1,4 t·ha⁻¹ u výnosu. Průměrná chyba růstového modelu Hermes byla u kvetení 5,3 dní, zralosti 16,8 dní a u výnosu 2,03 t·ha⁻¹.

Kalibrační výsledky fenologie ječmene jarního vykazují určité rozpory s pozorováním i ve studii Rötter et al (2012), která porovnávala více růstových modelů (APESACE, CROPSYST, DAISY, DSSAT-CERES, FASSET, HERMES, MONICA, STICS a WOFOST) s růstem a vývojem ječmene jarního a do které byly zahrnuty výsledky z pozorování v rámci experimentů prováděných v několika evropských zemích. Kvetení se zde v průměru neshodovalo s realitou o ± 11 dní, zralost o ± 12 dní. Ani výnos zde žádný z modelů nesimuloval zcela uspokojivě. Daisy výnos systematicky podhodnocovala, Hermes prokázal lepší výsledky. I přesto tyto dva modely patřily mezi trojici nejlepších, co se odhadu výnosu týče.

Model Daisy byl kalibrován i na Slovensku. Zde se v jednotlivých simulacích rozdílly mezi simulovanými a reálnými úrody u ječmene jarního pohybovaly v rozmezí 0,1 t·ha⁻¹ do 2,2 t·ha⁻¹ (Takač, Šiška, 2011).

Obr. 4: Srovnání hodnot zaznamenaných přístrojem SunScan, odhadovaného vývoje listové plochy modelem Hermes a plochy rostlin (vč. stonků, klasů) modelem Daisy u varianty s normálním agrotechnickým termínem setí (varianta č. 1) a s o 14 dní zpožděným agrotechnickým termínem setí (varianta č. 3) v pokusných letech 2011 a 2012.



Růstové modely v obou letech relativně uspokojivě odhadly dynamiku vývoje listové plochy u variant 1 a 3 s rozdílným termínem setí.

V roce 2011 ve vegetační době porost ječmene díky nepříznivým podmínkám polehl. Naměřená data listové plochy jsou proto zatížena značnou chybou.

Z grafu na Obr.4 b) můžeme vyčíst, že v roce 2012 růstový model Daisy vývoj listové plochy nadhodnotil. Růstový model Hermes, na rozdíl od Daisy a SunScanem naměřených dat, bere v potaz jen samotnou listovou plochu bez zbývající plochy rostliny reprezentované stonky či klasy. Tímto způsobem by se dal částečně vysvětlit fakt, že simulované hodnoty LAI Hermesu jsou nižší než u Daisy.

ZÁVĚR

Při kalibraci vybraných růstových modelů (Daisy a Hermes) pro ječmen jarní v klimatických podmínkách Českomoravské vrchoviny bylo dosaženo uspokojivých výsledků v oblasti fenologického vývoje. V případě odhadovaných výnosů oba modely nedokáží uspokojivě vysvětlit variabilitu pozorovaných výnosů. Modely obecně uváděly oproti pozorování o něco menší rozdíly ve výnosech mezi variantami s dřívějším a pozdějším termínem setí v jednotlivých letech. Ve většině případů uváděly velmi malé rozdíly u různě hnojených variant. Na druhou stranu zde byly malé rozdíly i v případě reálně pozorovaných výnosů a různého hnojení, přičemž v některých případech byl dokonce u variant a vyšší dávkou hnojení pozorován mírně nižší výnos.

Polní experiment se dvěma odrůdami ječmene jarního bude pokračovat i v příštím roce a bude doplněn o pokusy v růstových komorách, které umožní získání dat z podmínek s vyšší než současnou koncentrací CO₂ a modifikovaným teplotním a srážkovým režimem. Na základě získaných výsledků v sezónách 2011 a 2012 je pro sezónu 2013 také připravena modifikace pokusných variant (nahrazení varianty se zvýšenou dávkou N, variantou bez hnojení a změna nahrazení pozdního výsevu extrémně časným výsevem). Na základě nově získaných výsledků proběhne finální recalibrace růstových modelů.

Získané zkušenosti při aplikaci uvedených dvou modelů a dosažené výsledky jsou dobrým výchozím bodem k jejich dalšímu používání k různým účelům (např. hledání optimálních způsobů hospodaření v současných podmínkách či odhadu možných dopadů budoucích klimatických podmínek).

LITERATURA

Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M. 1998. *Crop Evapotranspiration. Guidelines for Computing Crop Water Requirements*. FAO Irrigation and Drainage Paper 56. Rome: FAO. 326, ISBN 92-5-104219-5.

Davies, J.A. & McKay, D.C. 1988. *Evaluation of selected models for estimating solar radiation on horizontal surfaces*. Solar Energy 43, 153-168.

Hansen, S., Jensen, H. E., Nie Isen, N. E., Svendsen, H. 1990. *DAISY – A Soil Plant System Model. Danish Simulation Model for Transformation and Transport of Energy and Matter in the Soil-Plant-Atmosphere System*. Copenhagen: National Agency for Environmental Protection 272, ISBN 87-503-8790-1.

Challinor, A.J., Ewert, F., Arnold, S., Simelton, E., Fraser, E. 2009. *Crops and climate change: progress, trends, and challenges in simulating impacts and informing adaptation*. J. Exp. Bot. 60, ISBN 2775-2789.

Kersebaum, K.C. 2011. *Special Features of the HERMES Model and Additional Procedures for Parameterization, Calibration, Validation, and Applications: Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Institute for Landscape Systems Analysis, Muencheberg.3*, WI 53711-5801.

Palosuo, T., Kersebaum, K. C., Angulo, C., Hlavinka, P., Moriondo, M., Olesen, J. E., Patil, R. H., et al. 2011. *Simulation of winter wheat yield and its variability in different climates of Europe: A comparison of eight crop growth models*. European Journal of Agronomy 35, 103-114.

Porter, J.R., Semenov, M.A. 2005. *Crop responses to climatic variation*. Philos. T. Roy.Soc. B 360, 2021–2035.

Rötter, R., Palosuo, T., Kersebaum, K.C., Angulo, C., Bindi, M., Ewert, F., Ferrise, R., Hlavinka, P., Moriondo, M., Nendel, C., Olesen, J.E., Patil, R.H., Ruger, F., Takač, J., Trnka, M. 2012. *Simulation of spring barley yield in different climatic zones of Northern and Central Europe: A comparison of nine crop models*. Field Crops Research 133, 23-36. ISSN 0378-4290.

Takáč, J., Šiška, B. 2011. *Calibration and Validation of DAISY model In Conditions of the Slovak Republic*. Vedecké práce Výskumného ústavu pôdoznanectva a ochrany pôdy, 161-172, 216.

Svaz pěstitelů sladovnického ječmeně Čech, Moravy a Slezka, 2009. *Ječmenářská ročenka*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 38-42, 262.

Žalud, Z. 2008, *Folia Mendelovy Zemědělské a Lesnické Univerzity v Brně – Svazek 1, Mendelova Zemědělská a Lesnická Univerzita Brno, Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu - metodiky stanovení indikátorů ekosystémových služeb*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 176s., IBSN 978-80-7375-221-7

DEVELOPMENT OF PHENOTYPING METHODS FOR DROUGHT TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BASED ON SPECTRAL REFLECTANCE AND THERMAL IMAGING

VÝVOJ METOD FENOTYPIZACE TOLERANCE K SUCHU U *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH ZALOŽENÝCH NA SPEKTRÁLNÍ ODRAZIVOSTI A TERMÁLNÍM ZOBRAZOVÁNÍ

Rajsnerová P.^{1,2}, Klem K.^{1,2}

¹Department of Forest Ecology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe – Global Change Research Centre AS CR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

E-mail: rajsnerova.p@czechglobe.cz

ABSTRACT

The main objective of our study was to develop new phenotyping methods for early detection of tolerance to drought stress. The six *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. natural accessions were used as a model for development of phenotyping methods based on spectral reflectance and thermal imaging. Plants were grown in pots under artificial light and controlled temperature conditions. The drought stress was induced at the leaf rosette growth stage for 14 days. We tested the various vegetation and chlorophyll indices derived from spectral reflectance measurements and thermal imaging method for the assessment of leaf temperature differences between dry and wet treatments. It was found that both approaches are able to detect responses to drought stress. However, it is clear that the responses of individual parameters on the effect of drought stress have different meaning. For this reason it will be necessary to carry out additional measurements in which the response of individual spectral reflectance and leaf temperature parameters will be correlated to direct indicators of plant response to drought stress such as leaf water potential and stomatal conductance.

Key words: phenotyping, drought stress, *Arabidopsis thaliana*, spectral reflectance, thermal imaging, vegetation indices

Acknowledgments: This work was supported by the European Commission (project CzechGlobe - contract CZ.1.05/1.1.00/02.0073).

ÚVOD

Zvýšená frekvence a intenzita abiotických i biotických stresových podmínek v rostlinné produkci, související s nárůstem časové a prostorové variability klimatických podmínek, vyžaduje rychlou reakci v sektoru šlechtění, jejímž cílem by měly být nové genotypy vykazující zvýšenou odolnost vůči očekávaným změnám prostředí a výskytu škodlivých organismů. Tyto požadavky staví šlechtitele před velmi komplexní úkol tvorby genotypů, u kterých bude skloubena odolnost vůči abiotickým a biotickým stresům a vysoká efektivita využití zdrojů (především živin a vody) s požadavky na kvalitu a produktivitu. Dosažení tohoto cíle není v současnosti možné bez zavedení nových metodických přístupů a technologií, které zajišťují zásadní zrychlení selekce genotypů ať již v oblasti vývoje nástrojů molekulární genetiky pro podporu šlechtění jako je například „MAS - marker-assisted breeding“ (Collard a Mackill, 2008) nebo vývoje technologií pro high-throughput vyhodnocení fenotypu. V případě komplexních znaků (založených větším počtem genů) je nezbytná kvantitativní analýza strukturálních a funkčních vlastností rostlin (fenotypizace rostlin) která se nyní stává nejslabším článkem šlechtitelského procesu (Whitepaper of the European Plant Science Organisation on Plant Phenotyping, 2010). Podstatou fenotypizace rostlin je sběr a vyhodnocení velkého množství informací o růstových, fyziologických a biochemických parametrech rostlin, které jsou měřeny a vyhodnocovány pomocí nedestruktivních metod, včetně metod nepřímých, nejčastěji založených na optických signálech, jako je spektrální reflektance (Montes et al. 2007), fluorescence chlorofylu (Jansen et al. 2009) či termální zobrazování (Munns et al. 2010). Zásadním úkolem fenotypizace je transformace těchto dat do podoby využitelné ve šlechtění, tedy do formy kvantitativní či kvalitativní informace o komplexních znacích jako je např. výnos, kvalita produkce, odolnost k abiotickému stresu či odolnost k chorobám.

Cílem této práce bylo vyvinout rychlou a neinvazivní metodu diagnostiky tolerance k suchu, která by umožňovala selekci genotypů na tento znak na základě vyhodnocení fenotypové odezvy (fenotypizaci). Modelové experimenty byly prováděny s genotypy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. přirozeného původu u kterých byl uměle indukován stres sucha a následně prováděna pravidelná měření spektrální odrazivosti v rozsahu 350-2500 nm a teploty listů pomocí termální kamery.

MATERIÁL A METODY

Experiment se šesti genotypy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byl prováděn v laboratorních podmínkách při umělém osvětlení LED panelu a řízené teplotě. Rostliny byly kultivovány v nádobách s rašelinovým substrátem do fáze vytvoření listové růžice. Do této fáze bylo rovnoměrné zásobení vodou zajištěno kapilárním vztláním. Následně byl u tří opakování od každého genotypu indukován stres sucha a u tří opakování bylo udržováno stejné zásobení vodou každodenním doplněním na stejnou hmotnost.

V pravidelných časových intervalech od indukce sucha byla prováděna měření spektrální odrazivosti listů v rozsahu 350-2500 nm přístrojem FieldSpec3 s optickým vláknem a teploty listů pomocí termální kamery s vysokým rozlišením Flir řady SC. Tato měření byla doplněna o stanovení světlem saturované rychlosti asimilace a stomatální vodivosti s využitím otevřeného gazometrického systému LiCor 6400. Data byla statisticky zpracována pomocí software SigmaPlot 11.

VÝSLEDKY A DISKUSE

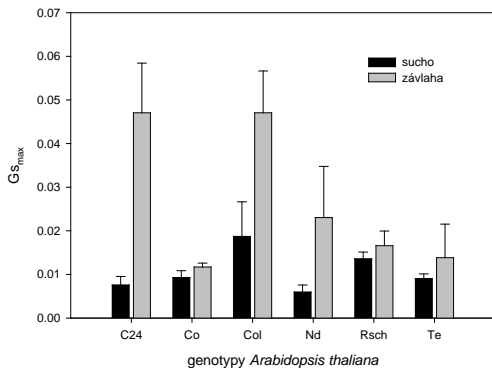
Výsledky měření prováděných v pravidelných intervalech od začátku indukce sucha umožnily vyhodnotit dynamiku změn jednotlivých parametrů a možnosti jejich využití pro včasnou detekci odezvy genotypů na stres sucha. Zásadní rozdíly mezi jednotlivými metodami měření, parametry i genotypy jsou ovšem patrné z výsledků, které byly získány v závěru experimentu, tedy 14 dní po začátku indukce sucha. Rozdílná odezva jednotlivých genotypů na stres sucha je velmi dobře patrná na parametru světlem saturované stomatální vodivosti $G_{s_{max}}$ (obr. 1). Tyto údaje ukazují významné rozdíly mezi suchou a zavlažovanou variantou u genotypů C24 a Col, zatímco u genotypů Co, Rsch a Te se stomatální vodivost liší jen nepatrně.

Mezi nepřímými metodami pro odhad stomatální vodivosti a tím také odezvy na stres sucha se jako nejvhodnější ukazuje měření teploty listů pomocí termální kamery. Teplota listů se mění s otevřeností průduchů a rychlostí transpirace, přičemž zavírání průduchů vede ke zvyšování teploty (obr. 2). Rozdíly v teplotě listů mezi suchou a zavlažovanou variantou jsou patrné z obr. 3. Je zřejmé, že teplota listů se vlivem sucha zvyšuje u všech genotypů, ovšem např. u genotypu Te jsou rozdíly jen malé v porovnání např. s genotypem Col.

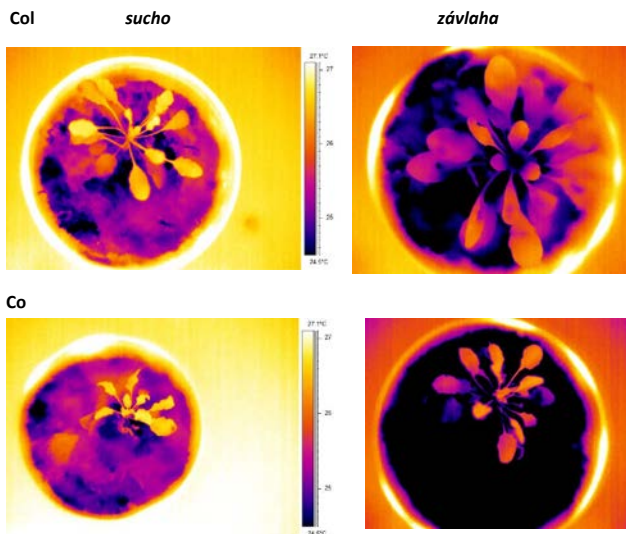
Pro vyhodnocení vlivu sucha na spektrální odrazivost byly použity tzv. vegetační a chlorofylové indexy, které jsou založeny obvykle na jednoduchých nebo normalizovaných poměrech odrazivosti ve dvou až čtyřech vlnových délkách. V rámci celé řady indexů byly nejzajímavější výsledky dosaženy u indexu $NDVI_{2340}$ který využívá absorpčního pásma pro vodu a pak u tzv. Water Index (WI) který již byl dříve využíván pro diagnostiku stresu sucha. Tyto indexy budou mít pravděpodobně odlišnou interpretaci, protože vykazují rozdílnou odezvu jednotlivých genotypů. Zatímco například u indexu $NDVI_{2340}$ byly nejvyšší kontrasty mezi suchou variantou a závlahou zaznamenány u genotypu C24 a nejnižší u genotypu Te v případě WI byly nejvyšší rozdíly zjištěny

u genotypu Te. Je ovšem patrné, že odezva na stres sucha je poměrně konzistentní napříč všemi genotypy pro oba indexy.

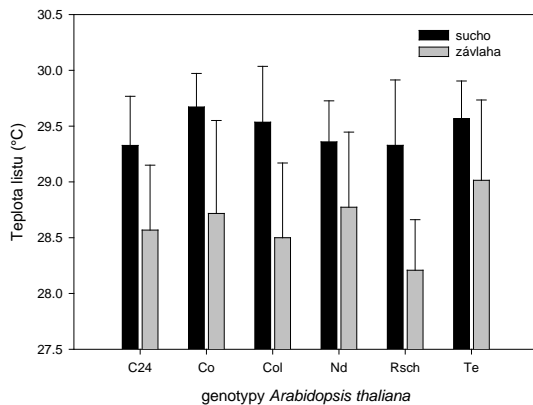
Obr. 1 Vliv stresu sucha na hodnoty světlem saturované stomátální vodivosti u jednotlivých genotypů Arabidopsis thaliana. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí otevřeného gasometrického systému LiCor 6400. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) (n≥3).



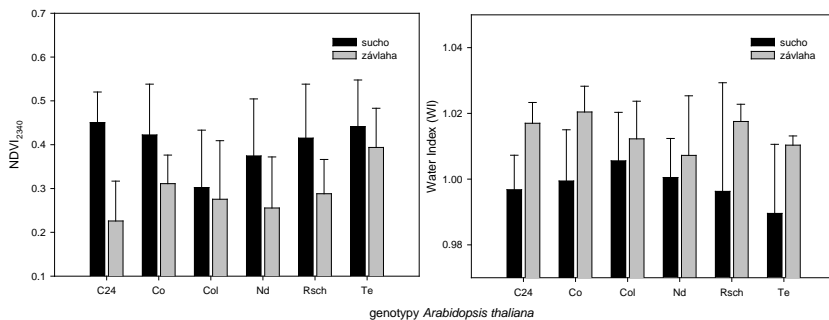
Obr. 2 Příklady rozdílné teploty listů u suché a zavlažované varianty u dvou genotypů Arabidopsis thaliana. Snímky byly pořízeny termální kamerou Flir řady SC. Světlé barvy (oranžová až bílá) reprezentují vyšší teplotu listu zatímco tmavé barvy (modrá až černá) představují nižší teplotu listu.



Obr. 3 Vliv stresu sucha na teplotu listů u jednotlivých genotypů *Arabidopsis thaliana*. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí termální kamery Flir řady SC. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) ($n \geq 3$).



Obr. 3 Vliv stresu sucha na vybrané vegetační indexy NDVI₁₃₄₀ a Water Index (WI) u jednotlivých genotypů *Arabidopsis thaliana*. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí spektorradiometru FieldSpec 3. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) ($n \geq 3$).



ZÁVĚRY

V rámci experimentu bylo potvrzeno, že metodiky založené na spektrální odrazivosti a termálním zobrazování jsou využitelné pro včasnou diagnostiku stresu sucha.

Vybrané vegetační indexy NDVI₂₃₄₀ a WI, jakož i teplotní difference mezi suchou a zavlažovanou variantou jsou schopné odlišit rozdíly v reakci jednotlivých genotypů.

Pro spolehlivou interpretaci jednotlivých parametrů budou ovšem nezbytné doplňující experimenty, které umožní korelovat data s přímými parametry charakterizujícími odezvu na stres sucha jako je vodní potenciál listu, či stomatální vodivost.

LITERATURA

Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 557 -572.

Montes, J.M., Melchinger, A.E., Reif, J.C. (2007) Novel throughput phenotyping platforms in plant genetic studies. *Trends in Plant Science*, 12, 433-436.

Munns, R., James, R.A., Sirault, X.R.R., Furbank, R.T., Jones, H.G. (2010) New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3499-3507

Jansen M, Gilmer F, Biskup B, Nagel KA, Rascher U, Fischbach A, Briem S, Dreissen G, Tittmann S, Braun S, De Jaeger I, Metzlaß M, Schurr U, Schar H, Walter A (2009) Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Functional Plant Biology*, 36, 902–914.

THE TREATMENT EFFECT WITH ALGINURE ON APPLE TREE INFECTION BY *VENTURIA INAEQUALIS*

VLIV OŠETŘENÍ PŘÍPRAVKEM ALGINURE NA NAPADENÍ JABLONÍ PATOGENEM *VENTURIA INAEQUALIS*

Rychlá K.¹, Katrňák M.¹, Psota V.²

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²BIOCONT LABORATORY, spol. s. r. o., Šmahova 66, 627 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xrychla1@mendelu.cz, xkatrnak@mendelu.cz, psota@biocont.cz

ABSTRACT

During the year 2012 we tested the efficacy of different variant based on PRI (plant resistance improver) product Alginure (algae extract 24%, plant aminoacids 7%, phosphates 20%; producer TilcoBiochemie GmbH) against *Venturia inaequalis* on apples. Our survey was designed as a small plot trial in commercial apple orchard in Brno (South Morava, Czech Republic). The chosen apple variety was Golden Delicious. Alginure was applied according to variant 3, 4 and 5 times in following dosages 3, 4, 5 l/ha during the main *V. inaequalis* infection pressure. Following treatments after Alginure were done by product based on sulphur and potassium hydrogen carbonate. There were totally 8 treatments since April 14 until June 6. First evaluation was done on June 1 on leaves. Second was carried out on August 14 on leaves and fruits. The most effective variants were 5 applications of Alginure in dosages 4 and 5 l/ha. During the second evaluation variant Alginure 4 l/ha reached 68.1% efficacy on leaves and 94.7% efficacy on fruits. Similarly variant Alginure 5 l/ha reached 91.2% efficacy on leaves and 89.5% on fruits. The difference between these two variants was not significant.

Key words: *Venturia inaequalis*, apple, applescab, Alginure, Golden Delicious

Acknowledgments: This study was supported by National Agency for Agriculture Research No. QJ1210209. Authors would like to thank to fruitgrowing company Ovocnářské Družstvo Brno – sady Starý Lískovec.

ÚVOD

Strupovitost jabloní způsobená patogenem *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. je ekonomicky nejzávažnější onemocnění jabloní po celém světě. Ztráty způsobené touto chorobou mohou být 70% i více z celkové hodnoty ovoce (STEVÍČ et al., 2010). Symptomy na listech se projevují v podobě hnědozelených, později šedočerných sazovitých skvrn. Na plodech vznikají různě velké šedočerné skvrny, které mohou korkovatět a pokožka může v místě napadení i praskat (KLOUTVOROVÁ, 2011). Při časném jarním napadení vzniká riziko opadu květů nebo malých plůdků. U později napadených plodů dochází k deformacím, ovoce je nevzhledné a hůře se skladuje (HLUCHÝ, 2008).

Houba přezimuje v opadaném listí v podobě pohlavních plodnic – pseudoperithecií, které obsahují vřečka s askospory. Ta v době rašení jabloní dozrávají. Po dešti nabobtnaná vřečka praskají a spory jsou roznášeny po okolí. Na vlhkých listech pak klíčí a způsobují primární infekce. Po uplynutí inkubační doby se na listech a plodech tvoří šedočerné skvrny obsahující konidiofory s konidii, které jsou za deště splavovány na další rostlinná pletiva a představují tak zdroj sekundární infekce. Celý průběh infekce je ovlivňován dobou ovhčení povrchu listu a teplotou během ovhčení (KLOUTVOROVÁ, 2011). Infekce nastává v teplotním rozmezí od 0,5 do 30 °C a za optimum se považuje teplota 17 – 24 °C (ACKERMANN, 2008). Předpokladem vzniku infekce je také ovhčení. Nutná doba ovhčení je závislá na teplotě. Při nízkých teplotách do 5 °C to je i více jak 48 hodin, naopak za optimálních teplot postačí pouze 9 hodin (MILLS, LAPLANTE, 1951).

Při silném infekčním tlakupatogena je nutná v podmínkách České republiky aplikace 15 i více postřiků fungicidy, takové množství představuje riziko obsahu reziduí pesticidů ve sklizeném ovoci (FALTA, VÁVRA, 2010). Existují také reálná rizika selekce populací patogena rezistentních k dané účinné látce (KLOUTVOROVÁ, 2011). Řešení mohou být přípravky zvyšující obranyschopnost rostliny (PRI – plant resistance improvers), které mají oproti běžným fungicidům jiný mechanismus účinku. Jelikož nepůsobí přímo proti patogenu, je třeba je aplikovat v dostatečném předstihu před vznikem infekce. V rostlině pak dochází k aktivaci obranných mechanismů a tvorbě obranných látek. Navíc jsou šetrné k životnímu prostředí a oproti použití chemických přípravků bylo dokonce zjištěno zvýšení nutriční hodnoty plodů (FALTA, VÁVRA, 2010).

V našem pokusu jsme sledovali účinky přípravku typu PRI – Alginure na strupovitost jabloní. Alginure je složen z extraktů z mořských řas a rostlin obsahující látky, které slouží jako spouštěče obranných reakcí, díky nimž je rostlina schopná se rychle a účinně bránit. Přípravek dále obsahuje fosfáty a fosfonáty, které transportují aktivátory do rostlinných buněk (BAGAR, 2011).

Cílem pokusu bylo zjistit působení přípravku Alginure na strupovitost jableň v různých dávkách a při různém počtu ošetření.

MATERIÁL A METODIKA

Experiment probíhal formou maloparcelkového pokusu v sadech ovocnářského družstva ve Starém Lískovci v Brně (49°9'29.504"N, 16°33'49.405"E). Ošetření byla prováděna motorovým zádovým postřikovačem. Pro účely pokusu byly vyčleněny stromy odrůdy Golden Delicious, která je silně náchylná k patogenu *Venturia inaequalis*. Pokus měl celkem 9 variant včetně neošetřené kontroly. Každá varianta měla 4 opakování po 4 stromech (tab. 2). Pouze 9. varianta (označena CH) nebyla přímou součástí maloparcelkového pokusu, ale šlo o přiléhající část sadu (odrůda Golden Delicious), která byla ošetřována v běžném provozu standardními fungicidy dle směrnic integrované produkce. Použitá dávka vody byla 500 l/ha, což odpovídá 12,1 l na jednu variantu. Přípravky byly míchány s vodou přímo na stanovišti za pomoci digitální váhy a odměrného válce. Aplikaci a manipulaci s postřikovačem vždy prováděla jedna osoba, aby byla zajištěna rovnoměrnost postřiku v celé délce pokusu. Ve stejném řádku byl umístěn registrátor teploty vlhkosti vzduchu a ovlhčení listu HOBO od firmy AMET, Velké Bílovice.

Tab. 1 Data aplikací s fenologickými fázemi BBCH

Datum ošetření	BBCH
13.4. 2012	55
20.4. 2012	57
30.4. 2012	65
7.5. 2012	71
14.5. 2012	72
24.5. 2012	73-74
1.6. 2012	74
6.6. 2012	74

Ošetření bylo provedeno celkem 8krát (tab. 1). Dle doporučení dodavatele byly dávky Alginure 3-5 l/ha. Použité přípravky v jednotlivých aplikacích včetně dávek jsou uvedeny v tabulce 2. Účinné látky jednotlivých přípravků jsou v tabulce 3.

Tab. 2 Použité přípravky včetně dávek u jednotlivých variant.

Varianta	Použité přípravky
1	1.-5. ošetření Alginure 4 l/ha + Kocide 2000 175 g/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
2	1.-5. ošetření Alginure 5 l/ha + Kocide 2000 175 g/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
3	1.-2. ošetření Alginure 5 l/ha + Kocide 2000 175 g/ha; 3. ošetření Sulikol K; 4. ošetření Alginure 5 l/ha; 5. ošetření Sulikol K 4 kg/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
4	Neošetřená kontrola
5	1.-5. ošetření Sulikol K 6 kg/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
6	1.-5. ošetření Alginure 3 l/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
7	1.-5. ošetření Alginure 5 l/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
8	1-5.ošetření Alginure 4 l/ha; 6. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 3 kg/ha; 7. ošetření Sulikol K 4 kg/ha + Vitisan 4 kg/ha; 8. ošetření Kumulus K 4 kg/ha + Vitisan 5 kg/ha
CH	Flowbrix; Dithane NEO-TEC; Kumulus WG; ThiramGranuflo; Sillit 400 SC; Domark 10 EC; Mythos 30 SC; Merpan 80 WG; Delan 700 WDG; Talent

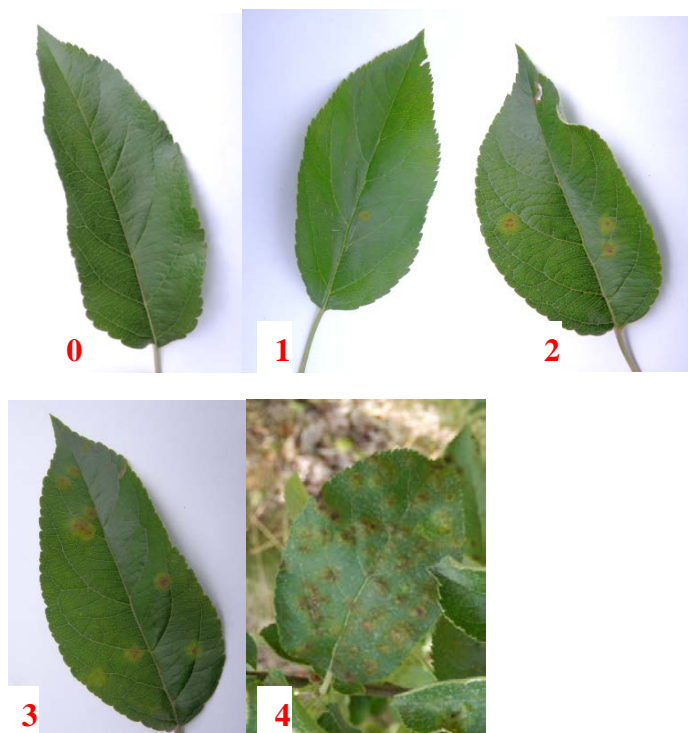
Tab. 3 Účinné složky použitých přípravků

Název přípravku	Účinná složka	Výrobce
Alginure	24 % extraktu z mořskýchchřás, 7 % rostlinnýchaminokyselín a 20 % fosfonátů	TilcoBiochemie GmbH
Kocide 2000	hydroxidmědnatý 53.8 %	DuPont International
Sulikol K	síra 50 %	NeraAgro
Vitisan	hydrogenuhlíčan draselný 1000 g/kg	Biofa AG
Kumulus WG	síra 80 %	BASF SE

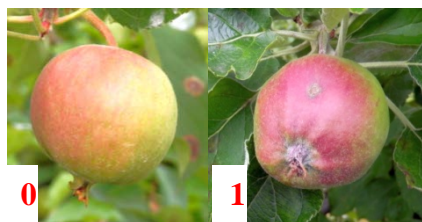
MENDELNET 2012

Ve dnech 1. 6. 2012 (BBCH 74) a 14. 8. 2012 (BBCH 77) bylo provedeno hodnocení intenzity napadení patogenem *Venturia inaequalis* na testovaných variantách. Hodnoceno bylo 50 náhodně vybraných listů a 50 plodů v rámci každého opakování. Listy byly rozděleny podle pětibodové stupnice (obr. 1), plody podle dvoubodové (obr 2). Plody byly vyhodnoceny pouze 14. 8., protože dne 1. 6. nebyl pozorován výskyt symptomů na plodech.

Obr. 1 Stupně napadení listů. 0: bez napadení; 1: 1-2 malé skvrny; 2: 3-4 malé skvrny nebo 1 velká skvrna; 3: 5 a více malých nebo 2 velké skvrny; 4: napadeno více jak 4 cm² listové plochy



Obr. 2 Stupně napadení plodů. 0: čisté bez symptomů, 1: s výskytem skvrn

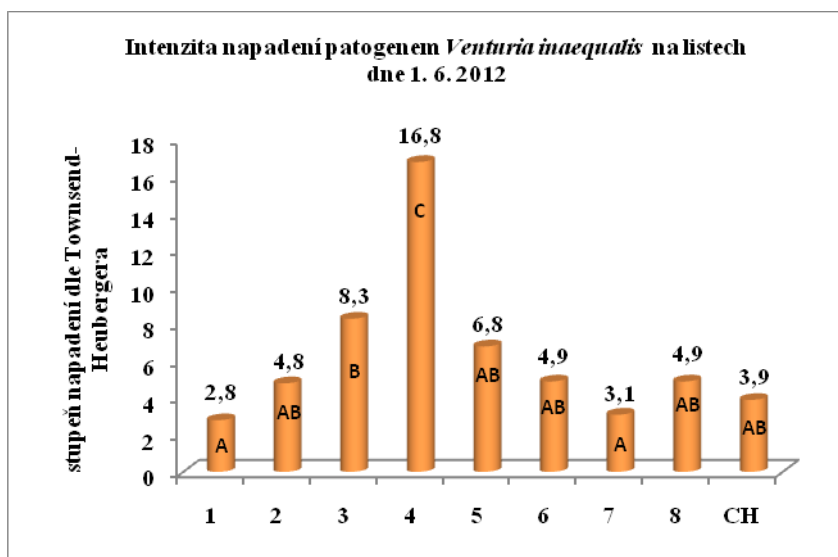


Ze získaných dat byl pro napadení na listech stanoven stupeň napadení dle Townsend-Heubergerova vzorce (TOWNSEND, HEUBERGER, 1943). Na plodech bylo napadení vyjádřeno v %. Účinnost variant byla stanovena dle Abbottova vzorce (ABBOTT, 1925). Pro statistické vyhodnocení byla zvolena analýza variance a Tukeyův test. Byla také zhodnocena ekonomická stránka použitých postřiků, dle aktuálních cen distributorů přípravků na ochranu rostlin pro rok 2012.

VÝSLEDKY A DISKUZE

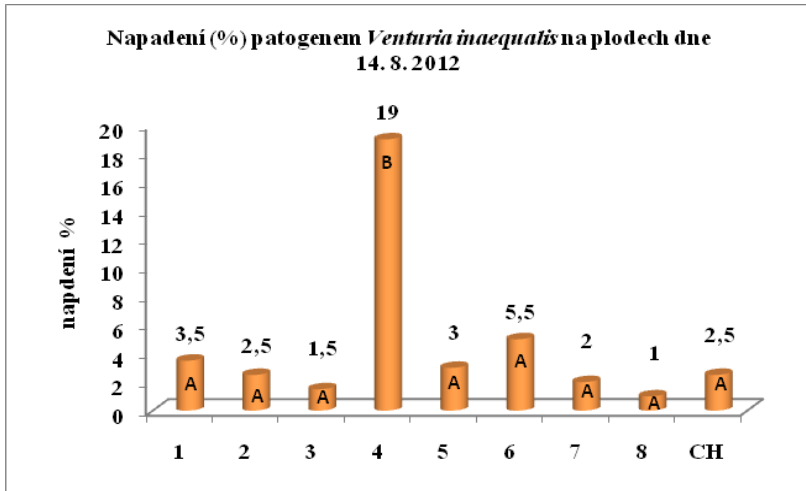
V rámci hodnocení provedeného dne 1. 6. 2012 jsme na listech zaznamenali nejvyšší napadení na kontrolní variantě. Všechny ošetřované varianty se od neošetřené kontroly statisticky prokazatelně lišily (obr. 3.). Byly rovněž zjištěny rozdíly mezi některými variantami. Varianta 3 byla významně více napadena ve srovnání s variantami 1 a 7.

Obr. 3. Zjištěná intenzita napadení listů patogenem *Venturia inaequalis* dne 1. 6. 2012. ANOVA ($F_{15,13}$; $p_{0,0000001}$).

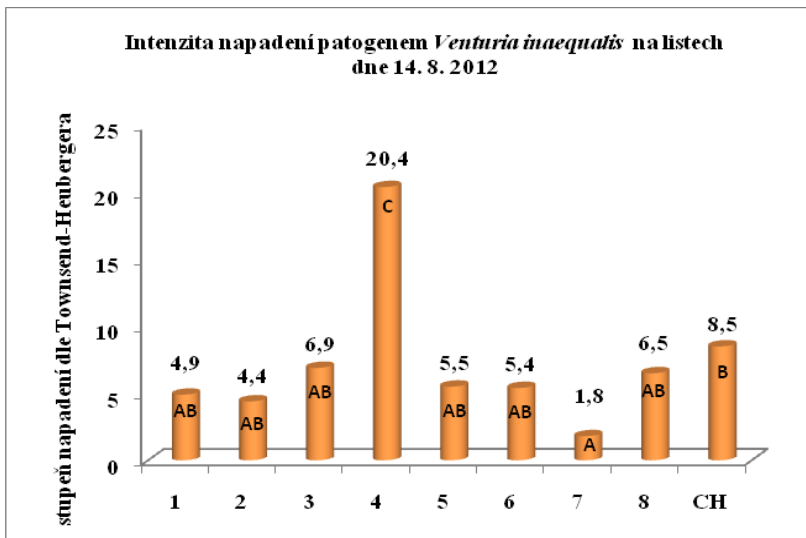


V průběhu druhého hodnocení dne 14. 8. byl na listech (obr. 4) zjištěn podobný výsledek jako při prvním hodnocení. Pouze u většiny variant došlo k mírnému nárůstu intenzity napadení. Významné rozdíly byly zjištěny mezi variantami 7 a CH. Napadení na plodech (obr. 5) dosáhlo na neošetřované kontrole 19 %. Naproti tomu na všech ošetřovaných variantách bylo toto napadení významně nižší a pohybovalo se v rozmezí od 1 do 5,5 %.

Obr. 4. Zjištěná intenzita napadení listů patogenem *Venturia inaequalis* dne 14. 8. 2012. ANOVA ($F 8,90$; $p 0,0000001$).



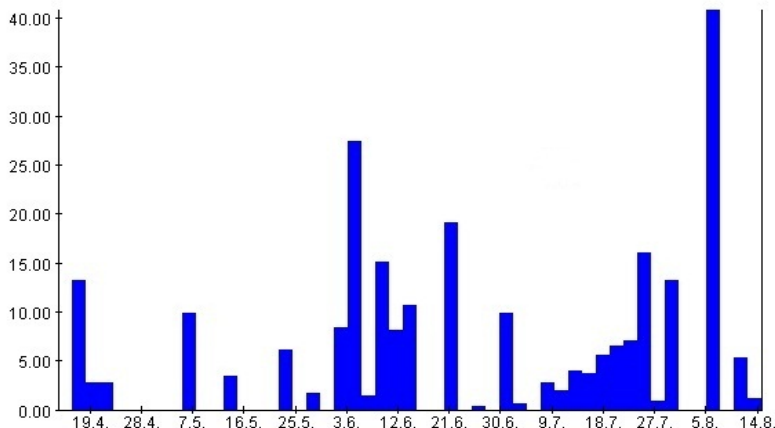
Obr. 5. Zjištěná intenzita napadení plodů patogenem *Venturia inaequalis* dne 14. 8. 2012. ANOVA ($F 8,90$; $p 0,000007$).



Vzhledem k tomu, že primární infekce askosporami trvala na zvolené lokalitě od 6.4. do 16.5. (BLÁHA, osobní sdělení) byla pro potlačení vzniku infekce rozhodující především první 4 ošetření. Ostatní ošetření pak spíše minimalizovala riziko vzniku sekundární infekce v době dešťových srážek, kterých bylo v kritickém období méně než v jiných letech (obr. 6).

Obr. 6. Přehled dešťových srážek na testované lokalitě v období od 13. 4. do 14. 8. (zdroj: www.amet.cz).

Brno-St. Lískovec: srážky



Pro úplnost byly spočítány finanční náklady jednotlivých variant přepočteny na 1 hektar. V ceně nejsou zakalkulovány náklady na aplikaci (tab. 4). Na variantě číslo 8, bylo dosaženo stejné účinnosti (rozdíl nejsou stat. významné) jako na standardně ošetřované varinatě (CH) při prakticky stejných nákladech (rozdíl 268 Kč).

Tab 4. Účinnost (%) a náklady na ošetření (CZK/ha) na jednotlivých variantách.

varianta	1. června		14. srpna		cena varianty Kč/ha		
	listy		listy	plody			
1	83,3	A	76,0	AB	81,6	A	8111,-
2	71,4	AB	78,4	AB	86,8	A	9576,-
3	50,6	B	66,2	AB	92,1	A	7438,-
4		C		C		B	0,-
5	59,5	AB	73,0	AB	84,2	A	5166,-
6	70,8	AB	73,7	AB	73,7	A	6591,-
7	81,6	A	91,2	A	89,5	A	9510,-
8	70,8	AB	68,1	AB	94,7	A	8044,-
CH	76,8	AB	58,3	B	86,8	A	8312,-

Podobných výsledků bylo dosaženo již v roce 2010 na lokalitě Nosislav, kdy byl přípravek Alginure ověřován v rámci maloparcelkového pokusu na odrůdě Idared. Avšak v průběhu celého pokusu byl aplikován pouze přípravek Alginure v dávkách 3 a 5 l/ha. Výsledky ukázaly statisticky významný rozdíl mezi neošetřenou kontrolou a aplikací Alginure. Mezi dávkami 3 l/ha a 5 l/ha se však statistický rozdíl neukázal (PSOTA, 2011).

Podle BAGARA (2011) je nejvyššího účinku dosaženo při použití 5 aplikací v raných fázích sezóny. Další aplikace sice přinesly zvýšení účinnosti, ale byly tak ekonomicky nevýhodné. U vyšší dávky (5 l/ha) byla pozorována významně vyšší účinnost. To se ukázalo i v našem pokusu, kdy 5 aplikací bylo účinnější než 3 aplikace, v rámci 1. hodnocení byl tento rozdíl statisticky významný. Stejně tak se potvrdil i vliv dávky.

BAGAR (2012) také uvádí, že kromě vysokého účinku na strupovitost jabloní má Alginure velký význam v ochraně proti plísni révy vinné v ekologickém pěstování. Další využití je také v ochraně proti skládkovým chorobám ovoce, moniliniové spále nebo hnědnutí listů meruňky.

ZÁVĚR

V rámci tohoto výzkumu bylo prokázáno, že přípravek typu PRI Alginure vykazuje velmi dobrou účinnost proti původci strupovitosti jabloně. Vliv přidání přípravku na bázi mědi do tank-mixu se neprojevil zvýšením účinnosti oproti variantám se samostatnou aplikací přípravku Alginure. Vezme-li v úvahu ekonomiku, bude pak v praxi ideální aplikovat Alginure 5 × v dávce 4 l/ha v době nejvyššího infekčního tlaku a poté pokračovat přípravky na bázi koloidní síry v kombinaci s hydrogenuhličitanem draselným (VitiSan). Tato technologie dosahovala v tomto výzkumu srovnatelné účinnosti jako standardní syntetické fungicidy při stejných nákladech.

V současnosti se přípravek Alginure již začíná v podmínkách České republiky využívat ve strategii ošetření proti patogenu *Venturia inaequalis* v rámci integrované produkce. Naše výsledky nabízejí možnost využít tento přípravek také v rámci ekologického pěstování jabloní, kdy tato strategie bude postavená na přípravku Alginure, spolu s koloidní sírou a hydrogenuhličitanem draselným. Vzhledem k tomu, že každá vegetační sezóna je jiná z hlediska infekčního tlaku bude vhodné i nadále tento přípravek testovat již přímo v provozu, ale i formou maloparcelkových pokusů. Tím může dojít k další optimalizaci snížení počtu aplikací, případně k upřesnění celkového doporučení vzhledem k průběhu počasí.

LITERATURA

- ABOTT W. S., 1925: A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 256-267.
- ACKERMANN P., 2008: Jádroviny – choroby, s. 33-53. In. HLUCHÝ M., ACKERMANN P., ZACHARDA M., LAŠTŮVKA Z., BAGAR M., JETMAROVÁ E., VANEK G., SZÓKE L. & PLÍŠEK B., *Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci*. BIOCONT LABORATORY, Brno. 498 s.
- BAGAR M., 2011: Nové prostředky v systému ochrany ovoce před houbovými chorobami. *Zahradnictví*, č. 4, 18 - 19.
- BAGAR M., 2012: Prostředky pro ekologické pěstování ovoce. *Rostlinolékař*, č. 4, 36-37.
- BLÁHA K., 2012: osobní sdělení (e-mail), 2.10. 1012.
- FALTA V. a VÁVRA R., 2010: Testování přípravků k ochraně proti strupovitosti jabloní pro integrovanou a ekologickou produkci. *Zahradnictví* č. 11, 10-11.
- HLUCHÝ M., c2008: *Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci*. Brno: BiocontLaboratory, 498 s. ISBN 978-809-0187-474.
- KLOUTVOROVÁ J., 2011: *Integrovaná ochrana jádrovín*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 92 s. ISBN 978-80-87030-20-2.
- MILLS L. D. & LAPLANTE A. A., 1951: Diseases and insects in the orchard. *Cornell Extension Bulletin*, 711: 1-5.
- PSOTA V., 2011: *Ochrana proti vybraným patogenům a škůdcům v ekologickém pěstování jabloní*. *Disertační práce*. Brno, Mendelova univerzita v Brně. 139 s.
- STEVIĆ M., VUKŠA P. a ELEZOVIĆ I., 2010: Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Žemdirbystė: biomedicinos mokslų sritys agronomijos krypties : mokslo darbai / Lietuvos Žemdirbystės institutas [ir] Lietuvos Žemės ūki universitetas = Agriculture : research works of biomedical sciences, agronomy / Lithuanian Institute of Agriculture [and] Lithuanian University of Agriculture = Zemledėlie : nauchnye trudy / Litovskii institut zemledėlii [i] Litovskii sel'skokhoziaistvennyi universitet*. č. 4, s. 65. ISSN 1392-3196.
- TOWNSEND G. R., HEUBERGER J. W., 1943: Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant disease reporter*, 27(17): 340-343.

DEPENDENCE OF OCCURRENCE ONION BEETLE (*LILIOCERIS MERDIGERA* L., 1758) ON TEMPERATURE

ZÁVISLOST VÝSKYTU CHŘESTOVNÍČKA CIBULOVÉHO (*LILIOCERIS MERDIGERA* L., 1758) NA TEPLOTĚ

Sapáková E.¹, Šefrová H.¹, Hřivna L.²

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xsapako0@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The objective of this study was to find out dependence of occurrence onion beetle (*Lilioceris merdigera* L., 1758) on temperature in five study plots in different altitudes: Nedakonice (178 m), Olomouc (241 m), Dolní Němčí (256 m), Suchá Loz (304 m) a Vápenky (484 m) during growing season 2012. The relationship between the density of adults onion beetle and temperature was expressed by linear regression method.

The occurrence of onion beetle was observed in winter varieties (Dukát and Blanin). High density of adults was detected at 18.8 to 29.5 °C in the 6.1-4.7, the highest density on the variety Dukát in Vápenky (484 m) with a total of 36 adults/1m² at 26.5 °C 1.6 and 24.6. The highest number of adults onion beetle has been found in the study plot Sucha Loz (872 adults) per season.

Key words: onion beetle, temperature, garlic

Acknowledgments: This study was supported by the Research plan No. MSM6215648905 and IP 7/2012 IGA.

ÚVOD

Studiem vlivu teploty na různé aspekty biologie hmyzu se zabývala celá řada autorů, značná pozornost byla věnována také různým druhům mandelinkovitých (Chrysomelidae). Nejvíce autorů analyzovalo teplotní závislosti a preference u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), u nás např. Blatný et al. (1950), Skuhravý et al. (1968) a Kocmánková et al. (2008). Z chřestovniců je největší pozornost věnována chřestovnicu liliovému (*Lilioceris lili*), který byl zavlečen z Evropy do Ameriky (Cox, 2001; Salisbury et al., 2012). Biologii samotného chřestovníčka cibulového studovali Haye & Kenis (2004) a Müller & Rosenberger (2006). V předloženém příspěvku jsou shrnuty výsledky studia vlivu teploty na početnost chřestovníčka cibulového (*Lilioceris merdiger*).

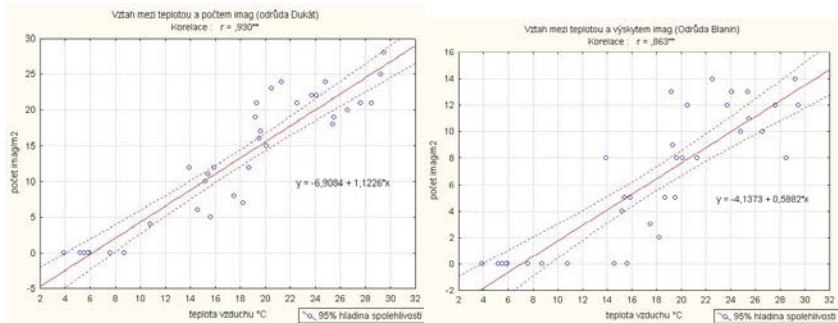
MATERIÁL A METODIKA

Výskyt chřestovníčka cibulového byl sledován ve vegetační sezóně 2012 v oblasti střední a jihovýchodní Moravy v porostu česneku kuchyňského *Allium sativum* L. Studijní plochy se nacházely v obilnářské oblasti v různé nadmořské výšce: Nedakonice (178 m, roční průměrná teplota vzduchu 8,5 °C, roční úhrn srážek 550 mm, rovina), Olomouc (241 m, 8,5 °C, 583 mm, rovina), Dolní Němčí (256 m, 8,1 °C, 752 mm, nízká pahorkatina), Suchá Loz (304 m, 7,6 °C, 650 mm, pahorkatina) a Vápenky (484 m, 6,1 °C, 750 mm, vyšší pahorkatina). Na studijních plochách byly vysazeny pouze ozimé odrůdy česneku Dukát a Blanin. Výskyt chřestovníčka cibulového byl hodnocen od začátku března 2× týdně. Početnost imag byla zjišťována na rostlinách česneku na 1 m² na deseti náhodně zvolených místech na každé studijní ploše. Pro měření teploty vzduchu na povrchu půdy byl použit přístroj Datalogger (GAR 195). Vztah mezi hustotou imag chřestovníčka cibulového a teplotou byl vyjádřen metodou lineární regrese (Obr. 1–5). Teplota při prvním a maximálním výskytu chřestovníčka cibulového na jednotlivých studijních plochách je v tabulce 1.

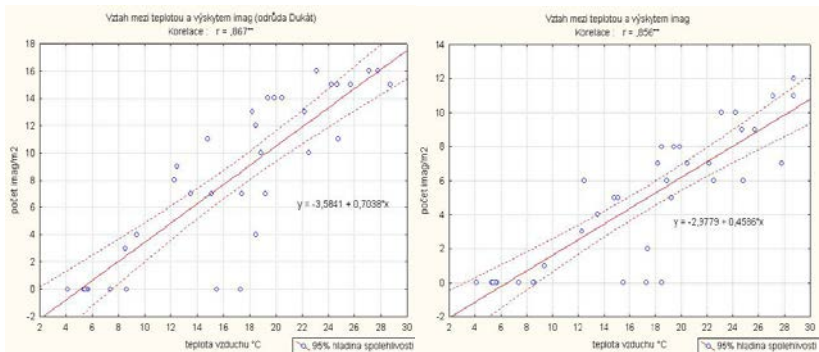
VÝSLEDKY A DISKUZE

V průběhu vegetační sezóny 2012 byl chřestovnic cibulový zjištěn na všech pěti studijních plochách na porostu česneku kuchyňského (Tab. 1). První výskyt imag chřestovníčka cibulového byl pozorován při teplotě 14,9–17,4 °C v období 16.3–27.4., poprvé 16.3. na studijní ploše s nejnižší nadmořskou výškou v Nedakonících (178 m) v počtu pět dospělců na 1 m² na odrůdě Dukát (obr. 1). Nejvyšší hustota imag byla zjištěna při teplotě 18,8–29,5 °C v období 1.6.–4.7., nejvyšší hustota na odrůdě Dukát na Vápenkách (484 m) s celkovým počtem 36 dospělců/1m² při teplotě 26,5 °C 1.6. a 24.6. (obr. 5). Vztah mezi početností dospělců chřestovníčka cibulového a teplotou vzduchu na povrchu půdy je znázorněn na obrázcích 1–5. Nejvyšší počet imag chřestovníčka cibulového za sezónu byl zjištěn na studijní ploše Suchá Loz (872 imag). Odrůda Dukát byla více napadena než odrůda Blanin. Na rostlinách odrůdy Dukát byl zjištěn maximální počet 36 imag na 1 m², na rostlinách odrůdy Blanin 24 imag na 1 m².

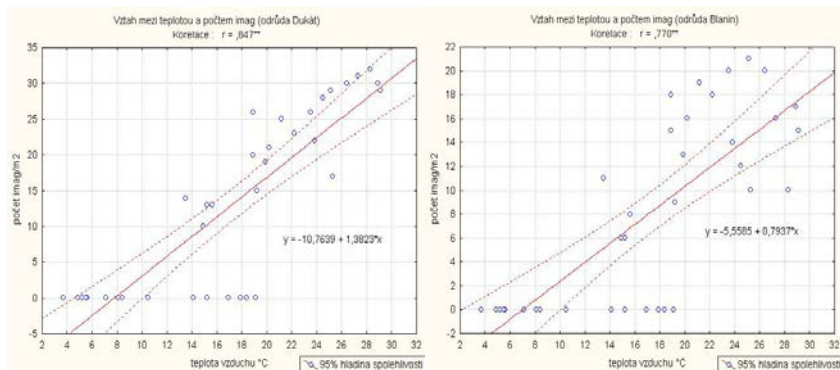
Obr. 1: Vztah mezi teplotou a počtem imag chřestovnička cibulového na odrůdě Dukát a Blanın na studijní ploše v Nedakonicích



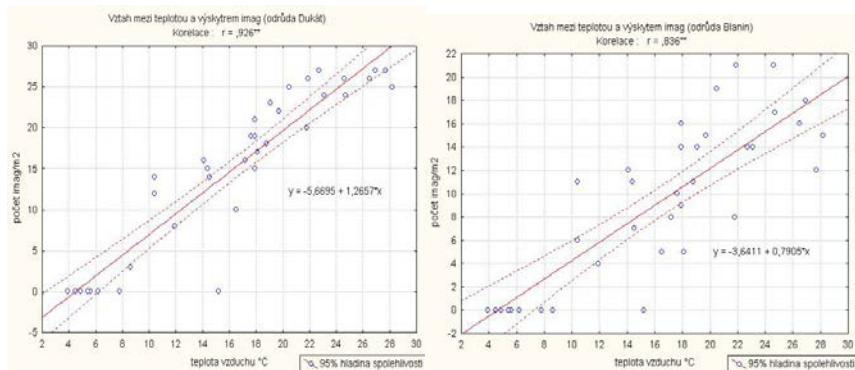
Obr. 2: Vztah mezi teplotou a počtem imag chřestovnička cibulového na odrůdě Dukát a Blanın na studijní ploše v Olomouci



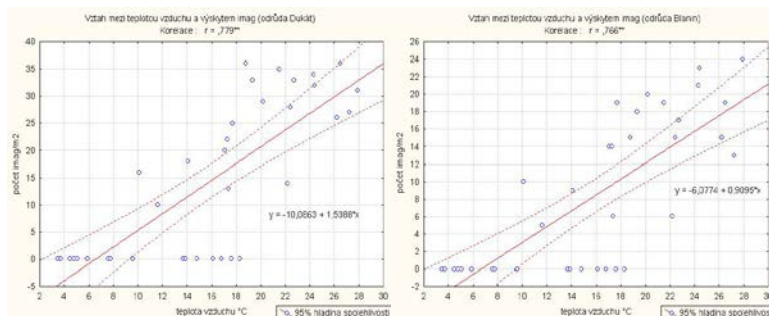
Obr. 3: Vztah mezi teplotou a počtem imag chřestovnička cibulového na odrůdě Dukát a Blanin na studijní ploše v Dolním Němčí



Obr. 4: Vztah mezi teplotou a počtem imag chřestovnička cibulového na odrůdě Dukát a Blanin na studijní ploše v Suché Lozi



Obr. 5: Vztah mezi teplotou a počtem imag chřestovnička cibulového na odrůdě Dukát a Blantin na studijní ploše ve Vápenkách



Tab. 1: Výskyt chřestovnička cibulového na jednotlivých studijních plochách

Studijní plocha	První výskyt imag		Maximální hustota imag		Počet imag za sezónu Dukát/Blantin
	teplota °C	datum	teplota °C	datum	
Nedakonice	15,6	16.3.	29,5	4.7.	463/224
Olomouc	18,5	23.3.	27,1	24.6.	301/173
Dolní Němčí	14,9	22.4.	28,3	17.6.	473/294
Suchá Loz	16,5	18.3.	27,7	4.7.	539/333
Vápenky	17,4	27.4.	18,8	1.6	518/302
			26,5	24.6	

ZÁVĚR

Při sledování výskytu škůdců česneku kuchyňského ve vegetačním období 2012 na střední a jihovýchodní Moravě byla zjištěna nejvyšší početnost chřestovnička cibulového v rozmezí teplot 20–27 °C v průběhu června a července (obr. 1–5). První výskyt imag byl pozorován při teplotě 15,6 °C (16.3.) na studijní ploše s nejnižší nadmořskou výškou v Nedakonících (178 m) v počtu 5 dospělců na 1 m² na odrůdě Dukát. Nejvyšší intenzita výskytu chřestovnička byla zjištěna na odrůdě Dukát na Vápenkách (484 m) s celkovým počtem 36 dospělců/1m² 1.6. (18,8 °C) a 24.6. (26,5 °C). Nejvyšší počet imag chřestovnička cibulového za sezónu byl zjištěn na studijní ploše Suchá Loz (872 imag). Odrůda Dukát byla více napadena než odrůda Blantin.

LITERATURA

Blattný C., Slabý V. & Neubauer Š., 1950: Základy boje proti mandelince bramborové. Ochrana rostlin, 23(2): 136-158.

Cox M. L., 2001: The status of the Lily beetle, *Lilioceris lili* (Scopoli, 1763) in Britain (Chrysomelidae: Criocerinae). The Coleopterist, 10: 5-20.

Haye & Kenis M., 2004: Biology of *Lilioceris* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) and their parasitoids in Europe. Biological Control, 29: 399-408.

Kocmánková E., Trnka M., Semerádová D., Žalud Z., Dubrovský M., Možný M., Juroch J. & Šefrová H., 2008: Změna potenciálního rozšíření mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*, Say 1824) v ČR během první poloviny 21. století. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 56(2): 87-94.

Müller C. & Rosenberger C., 2006: Different oviposition behaviour in Chrysomelid beetles: Characterisation of the interface between oviposition secretion and the plant surface. Arthropod Structure and Development, 35: 197-205.

Salisbury A., Cook S. M., Powell W. & Hardie J., 2012: Odour-mediated orientation behaviour of the lily beetle *Lilioceris lili*. Physiological Entomology, 37: 97-102.

Skuhravý V., Novák K. & Růžička Z., 1968: Die Populationsdynamik des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in zwei klimatisch unterschiedlichen Gebieten Böhmens. Zeitschrift für angewandte Entomologie, 62(4): 365-385.

DIFFERENCES IN WEED INFESTATION OF WINTER WHEAT AFTER PRECROP *MEDICAGO SATIVA* AND *TRIFOLIUM PRETENSE*

ROZDÍLY V ZAPLEVELNÍ OZIMÉ PŠENICE PO PŘEDPLODINĚ
VOJTĚŠCE SETÉ A JETELU LUČNÍM

Spačilíková A., Winkler J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xspacili@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study is to compare weed spectrum in winter wheat after different precrops. In the first experiment there is used Norfolk crop rotation (*Trifolium pretense*, winter wheat, maize, spring barely). In the second experiment is used a seven-year-crop rotation (*Medicago sativa* – first year, *Medicago sativa* – second year, winter wheat, maize, winter wheat, sugar beat, spring barely). The highest weed infestation was after precrop *Trifolium pretense*. The most common weed species were *Lamium amplexicaule*, *Capsella bursa-pastoris*, *Stellaria media* and *Fallopia convolvulus*.

Key words: weeds, winter wheat, *Trifolium pretense*, *Medicago sativa*

Acknowledgments: The results in paper are output of project of Internal Grant Agency, FA MENDELU No. TP 9/2012 “Innovation of crop management practices in areas threatened by drought”.

ÚVOD

Historie zemědělských systémů je současně historií osevních postupů, způsobů zpracování půdy, regulace zaplevelení polí a jiných oborů zemědělských činností. Vývoj zemědělských systémů je dlouhodobý, nepřetržitý proces formovaný lidskou společností. V počátcích zemědělské produkce byla půda využívána bez ohledu na její úrodnost, jež se rychle snižovala. Teprve později se v zemědělských systémech zavedly určité zásady, které měly zabezpečovat úrodnost půdy (Chloupek, Procházková, Hrudová, 2009).

Petříčková a Málek (2000) uvádějí, že při sestavování osevních postupů je třeba uvést do souladu biologická a pěstitelská hlediska s organizačními a ekonomickými hledisky. Při střídání plodin je snaha o maximální využití mezíporostního období mezi dvěma hlavními plodinami zařazením různých typů meziplodin, s dodržáním agrotechnických termínů optimální doby výsevu nebo výsadby plodin. Dobře zvolený osevní postup je vlastně beznákladové opatření v rostlinné produkci, zvyšující výnosy jednotlivých plodin a udržující úrodnost půdy.

Současná rostlinná výroba v České republice je charakteristická úzkou skladbou plodin. Struktura pěstování je ovlivněna jak vhodností půdně-klimatických podmínek pro pěstování jednotlivých druhů polních plodin, tak stále více podmínkami trhu. Od roku 1990 se struktura pěstovaných plodin poměrně výrazně změnila. V důsledku velkého snížení stavu skotu (od roku 1990 o více než 60 %) došlo k výraznému snížení ploch víceletých a jednoletých píceňin. V roce 1990 byly víceleté pícniny pěstovány na 14,3 % orné půdy a v roce 2009 jen na 7,16 %. U jednoletých pícnin byl zaznamenán pokles z 18,9 % na 8,03 % (Procházková et al., 2011).

Ze statistických údajů o vývoji ploch pěstovaných plodin ve sledovaném období je patrný pokles ploch luskovin (na 1,15 %) a brambor (na 1,14 %). Také plochy cukrovky se oproti devadesátým rokům snížily. V roce 2009 byla cukrovka pěstována na 2,08 % orné půdy. Naopak byl zaznamenán výrazný nárůst ploch olejnin, zejména ozimé řepky. V roce 1990 byly olejninu pěstovány na 4 % orné půdy, v roce 2009 na 19,3 %. Obilniny zaujímají v průměru ČR více než polovinu orné půdy (Český statistický úřad, 2012).

Ozimá pšenice je nejpěstovanější obilninou ve všech výrobních oblastech. Dobře roste na středních až těžkých půdách s dostatkem pohotových živin a vody. Ze všech obilnin je nejnáročnější na dostatek dusíku v půdě a nejcitlivěji reaguje na předplodinu vyšším výnosem. Sama o sobě vzhledem k delší vegetační době a většímu množství posklizňových zbytků je z obilnin nejlepší předplodinou (Krejčíř, 1990).

Nejvhodnější předplodinou ozimé pšenice je bezesporu vojtěška, a to díky množství a kvalitě posklizňových zbytků, které po sobě zanechává. Obdobně pozitivní účinek mají luskoviny a luskoobilní směsky. Středně vhodnými předplodinami jsou olejninny a okopaniny pokud k ní bylo hnojeno organicky. Nejméně vhodnými předplodinami jsou obilniny, jelikož zhoršují půdní vlastnosti, zvyšují riziko většího zaplevelení specifickými plevely obilnin a vyššího stupně napadení houbovými chorobami a škůdci (Zimolka et al., 2005).

Podle Deyla (1964) se v boji proti plevelům velmi dobře uplatňují pícniny, a to především tím, že za příznivých podmínek vytvářejí vzrůstné, hustě zapojené porosty a časným, opakovaným kosením jsou schopny potlačovat jednoleté i vytrvalé plevele. Ale i přesto se určité druhy plevelů přizpůsobily životnímu cyklu pícnin. K charakteristickým plevelům patří především dvouleté a vytrvalé druhy, které se zpravidla v jiných plodinách nevyskytují a řadíme sem např. šťovík menší, knotovku bílou, lnici květel, jitrocel kopinatý, popenec břechtanolistý, smetanku lékařskou, ječmen myší, sveřep měkký aj.

Cílem práce porovnat druhové spektrum zaplevelení ozimé pšenice po odlišných předplodinách stejné pěstitelské skupiny a to jeteli lučním a vojtěšce seté.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusný pozemek se nachází v katastrálním území obce Žabčice. Tato oblast je součástí geomorfologické oblasti Dyjsko–svratecký úval. Žabčice leží jižně od Brna v nadmořské výšce 184 metrů nad mořem. Terén je rovinatého charakteru. Katastrální území obce Žabčice protíná říčka Šatlava, která spadá do povodí řeky Svratky. Z výrobního pohledu se jedná o kukuřičnou oblast ječného subtypu. Oblast lze považovat za velmi teplou a suchou. Průměrná roční teplota pro daný klimatický region je 9,2°C a průměrný roční úhrn srážek 483,3 mm. Dlouhodobé údaje o průměrných teplotách a srážkách jsou uvedeny v Tab 1. Tyto údaje byli převzaty z meteorologické stanice pokusné stanice Mendlovy univerzity v Žabčicích. Severozápadní větry v tomto klimatickém regionu způsobují převahu výparu nad srážkami a způsobují častý vodní deficit ovlivňující vývoj rostlin v jarních a letních měsících, kdy jsou pěstované plodiny nutné využívat pro růst a vývoj jen půdní vláhu.

Stanoviště se nachází v nivní oblasti řeky Svratky a proto půdy se řadí do glejového typu. Orniční vrstva je hlinitá až jílovitohlinitá se stálým vlivem spodní vody. Mocnost ornice dosahuje hloubky 35cm. Glejový horizont způsobuje sníženou propustnost vody, který umožňuje udržení půdní vláhy a vlivem kapilárních sil čerpaní rostlinami ve vyšší vrstvě půdy. Kyselost půd je neutrální, pH 6,9 a obsah je humusu 2,28 %. Nasycenost sorpčního komplexu je dobrá a přístupnost živin pro rostliny také.

Tab. 1 - Dlouhodobé průměry teplot a úhrnů srážek za jednotlivé měsíce (1961 až 1990)

Měsíc	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
Srážky (mm)	25	25	24	33	63	69	57	54	36	32	37	26
Teploty (°C)	- 2,0	0,2	4,3	9,6	14,6	17,7	19,3	18,6	14,7	9,5	4,1	0,0

Střídání plodin v **prvním pokusu** je podle norfolkského osevním postupu a byl založen v roce 1970 a částečně upraven v 2002. Velikost jedné parcely je 5,3 m x 7,0 m. Sled plodin je následující:

- jetel luční
- ozimá pšenice
- kukuřice na zrno
- jarní ječmen

Druhý polní pokus byl založen v roce **2004** a měl by být „modelovým příkladem“ hospodaření s živočišnou výrobou v suchších klimatických podmínkách. Velikost jednotlivých parcel je 10 x 20 m. V polním pokusu je použit **sedmi honný** osevní postup. Sled plodin je následující:

- vojtěška setá – první užitkový rok
- vojtěška setá – druhý užitkový rok
- **ozimá pšenice**
- kukuřice setá (silážní)
- ozimá pšenice
- cukrovka
- jarní ječmen

Zaplevelení porostu ozimé pšenice bylo vyhodnoceno v období mezi 13.4. – 14. 4. 2012 před aplikací herbicidů. Byla použita početní metoda, počty plevelů byly zjišťovány na 1 m², u každé varianty zpracování půdy a střídání plodin ve 24 opakováních. České a latinské názvy jednotlivých druhů plevelů byly použity podle Kubáta (Kubát, 2002).

Získané údaje byly zpracovány mnohorozměrnou analýzou ekologických dat. Výběr optimální analýzy se řídil délkou gradientu (*Lengths of Gradient*), zjištěného segmentovou analýzou DCA (*Detrended Correspondence Analysis*). Pro další zpracování byla použita redundanční analýza (redundancy analysis, RDA), která je založena na modelu lineární odpovědi (*Linear Response*). Při testování průkaznosti pomocí testu Monte-Carlo bylo propočítáno 499 permutací. Data byla

zpracována pomocí počítačového programu Canoco 4.0. (Ter Braak, 1998). Pomocí těchto analýz byl zjišťován odlišný vliv zpracování půdy na plevelné druhy.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo nalezeno v ozimé pšenici 21 druhů plevelů, po předplodině jeteli lučním to bylo 20 druhů a po předplodině vojtěšce seté to bylo 14 druhů. Tab. 2 uvádí průměrné počty jedinců plevelů nalezených v ozimé pšenici po dvou různých předplodinách.

Tab. 2 Průměrný počet plevelů v ozimé pšenici po dvou předplodinách

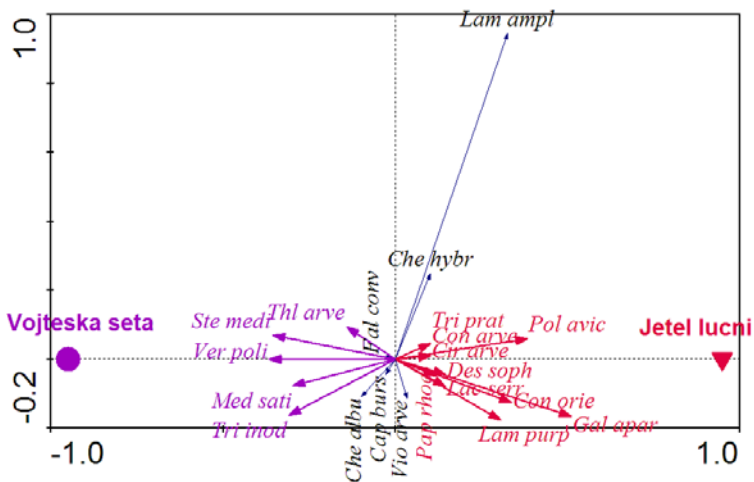
Druhy plevelů	Předplodina (ks plevelů.m ⁻²)	
	Jetel luční	Vojtěška setá
<i>Lamium amplexicaule</i>	3,81	2,04
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	1,00	1,08
<i>Stellaria media</i>	0,21	1,08
<i>Fallopia convolvulus</i>	0,58	0,65
<i>Galium aparine</i>	1,04	0,02
<i>Veronica polita</i>	0,04	0,58
<i>Polygonum aviculare</i>	0,56	0,02
<i>Lamium purpureum</i>	0,35	0,06
<i>Chenopodium album</i>	0,15	0,25
<i>Medicago sativa</i>		0,31
<i>Consolida orientalis</i>	0,29	
<i>Thlaspi arvense</i>	0,08	0,19
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	0,00	0,21
<i>Viola arvensis</i>	0,08	0,06
<i>Papaver rhoeas</i>	0,08	0,02
<i>Descurainia sophia</i>	0,04	
<i>Lactuca serriola</i>	0,04	
<i>Cirsium arvense</i>	0,02	
<i>Convolvulus arvensis</i>	0,02	
<i>Chenopodium hybridum</i>	0,02	
<i>Trifolium pratensis</i>	0,02	
Počet druhů	4,02	3,10
Počet jedinců	8,46	6,58

Výsledky vyhodnocení zaplevelení v různých polních plodinách byly zpracovány analýzou DCA. Délka gradientu u dat získaných byla 3,118 z tohoto důvodu byla vybrána pro následující zpracování dat redundanční analýza (RDA).

Na základě frekvence výskytu a početnosti plevelů v jednotlivých variantách, bylo analýzou RDA vytvořeno prostorové uspořádání jednotlivých plevelných druhů a variant předplodiny. Toto zpracování bylo graficky zobrazené pomocí ordinačních diagramů. Druhy plevelů jsou zobrazeny vektory (šipky), které mají odlišnou směr a barvu. Varianty předplodiny jsou zobrazeny body

různého tvaru a barvy. V případě, že vektor příslušného druhu plevele směřuje k bodu varianty, je jeho výskyt více vázán k této variantě.

Obr. 1. Ordinační diagram vyjadřující prostorové upořádání nalezených druhů plevelů v ozimé pšenici po dvou předplodinách



Vysvětlivky zkratk použitých v ordinačním diagramu:

předplodiny - ● Vojteska seta – vojtěška setá; ▼ Jetel luční – jetel luční.

Cap burs – *Capsella bursa-pastoris*, *Cir arve* – *Cirsium arvense*, *Con orie* – *Consolida orientalis*, *Con arve* – *Convolvulus arvensis*, *Des soph* – *Descurainia sophia*, *Fal conv* – *Fallopia convolvulus*, *Gal apar* – *Galium aparine*, *Che albu* – *Chenopodium album*, *Che hybr* – *Chenopodium hybridum*, *Lac seri* – *Lactuca serriola*, *Lam ampl* – *Lamium amplexicaule*, *Lam purp* – *Lamium purpureum*, *Med sati* – *Medicago sativa*, *Pap rhoe* – *Papaver rhoeas*, *Pol avic* – *Polygonum aviculare*, *Ste medi* – *Stellaria media*, *Thl arve* – *Thlaspi arvense*, *Tri prat* – *Trifolium pratensis*, *Tri inod* – *Tripleurospermum inodorum*, *Ver poli* – *Veronica polita*, *Vio arve* – *Viola arvensis*.

Vyhodnocení vlivu předplodiny na plevele analýzou RDA byly signifikantní na hladině významnosti byla $\alpha = 0,002$ a jsou statisticky vysoce průkazné. Zobrazení výsledků je na Obr. 1. Z tohoto ordinačního diagramu je patrné, že druhy plevelů, které se častěji vyskytovali v porostu ozimé pšenice po předplodině jeteli lučním jsou: *Cirsium arvense*, *Consolida orientalis*, *Convolvulus arvensis*, *Descurainia sophia*, *Galium aparine*, *Lactuca serriola*, *Lamium purpureum*, *Polygonum aviculare* a *Trifolium pratensis*.

V porostu ozimé pšenice po předplodině vojtěšce seté se častěji vyskytovali: *Medicago sativa*, *Stellaria media*, *Thlaspi arvense*, *Tripleurospermum inodorum* a *Veronica polita*.

Ostatní druhy byly více ovlivněny faktory, které nejsou v této analýze zachyceny.

Podle Dvořáka a Smutného (2003) mohou jednotlivé druhy plevelů způsobovat ztráty na produkci jen v plodinách, které jim umožňují snadný růst a reprodukci. Např. víceleté pícniny umožňují rozvoj víceletých plevelů jako jsou pampelišky, šťovíky atd.

Víceleté druhy byly v našem pokusu nalezeny jen ohniskovitě, můžeme tedy usuzovat, že porosty jetele ani ve vojtěšce neumožnili těmto druhům masivní rozvoj.

Podobné zjištění Klema a Váňové (1997) hluchavky a rozrazilky zaplevelují nejvíce porosty ozimé pšenice po předplodině vojtěšce seté.

Stejně výsledky jsme zaznamenali i v našich pozorováních u druhu *Veronica polita*. Druh *Lamium amplexicaule* se pravděpodobně chová stejně v obou sledovaných plodinách a podobně zapleveluje i následnou ozimou pšenici.

I přes příbuznost obou předplodin byly nalezeny rozdíly v zaplevelení následné plodiny. Můžeme tedy předpokládat i těchto jednoletých výsledků, že předplodina má významný vliv na zaplevelení následné plodiny.

ZÁVĚR

Vyšší zaplevelení i vyšší druhová pestrost v ozimé pšenici byly zaznamenány po předplodině jeteli lučním. Nejčastěji nalezený druh *Lamium amplexicaule* dle analýzy RDA byl ovlivněn jinými faktory než druhem předplodiny.

V druhové skladně po obou příbuzných předplodinách byly nalezeny rozdíly. Po jeteli se častěji nacházely druhy *Galium aparine* a *Polygonum aviculare*, po předplodině vojtěšce seté to byly druhy: *Stellaria media* a *Veronica polita*.

LITERATURA

Český statistický úřad (2012): Česká republika od roku 1898 v číslech. Český statistický úřad [online]., © 2012, 3.4.2012 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/cr_od_roku_1989#09

Deyl, M. (1964): *PLEVELE POLÍ A ZAHRAD*. 2. vyd. Praha: Československá akademie věd, 1964, 392 s. ISBN 21-070-64.

Chloupek, O., Procházková, B., Hřudová, E., (2005): *PĚSTOVÁNÍ A KVALITA ROSTLIN*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2005. ISBN 978-80-7157-897-0.

Krejčíř, J., (1990): *OBECNÁ PRODUKCE ROSTLINNÁ: oševní postupy*. Brno: MZLU, 1990, 189 s.

Kubát, K., (2002): Klíč ke květeně České republiky. Praha: Academia., 928 s. ISBN 80-200-0836-5.

Procházková, B., et al., (2010): *VÝZNAM A MOŽNOSTI OPTIMALIZACE STRUKTURY A STRŽDÁNÍ PLODIN V SYSTÉMECH HOSPODÁŘENÍ NA PŮDĚ*. Brno: MZLU, 2011. ISBN 978-80-7375-525-6.

Ter Braak, C., J., F. (1998): CANOCO – A FORTRAN program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [canonical] correspondence analysis (version 4.0.). Report LWA-88-02 *Agricultural Mathematics Group*. Wageningen.

Zimolka, J., et al., (2005): *Pšenice: pěstování, hodnocení a využití zrna*. 1.vydání. Praha: Profi Press, 2005, 184 s. ISBN 80-86726-09-6.

SULPHUR AND ITS EFFECT ON GRAIN YIELD AND QUALITY OF MALTING BARLEY

SÍRA A JEJÍ VLIV NA VÝNOS A KVALITU SLADOVNICKÉHO JEČMENE

Syrová H., Ryant P.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xsyrova@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the effect of foliar applications of sulphur to grain yield, N substances content and the content of dimethylsulfid (DMS) and its precursors (PDMS) in the grain of malting barley. The observation was realized by form of small plot field experiment with six varieties of malting barley. Three varieties for Czech beer production (Aksamit, Bojos, Radegast) and three varieties for export (Jersey, Prestige, Sebastian). Sulphur was applied as foliar elementary micronized sulphur with bentonit in the DC 31 and DC 57. Effect of sulphur on grain yield, N substances and sulphur content of the grain in the front grain (above 2.5 mm) did not show statistically significant. The content of dimethylsulfid (DMS) and its precursor (PDMS) was not increased by sulphur applications. Higher content of PDMS was determined in the varieties for Czech beer production. Export varieties reached lower values. No variety exceeded the limit set for the production of malt.

Key words: malting barley, sulphur, DMS, PDMS, grain yield

Acknowledgments: Grant No. 1G58038 Innovation of Growing Technologies of Malting Barley for Development of Diagnostic Methods to Evaluation Stand Structure, Health and Nutritional Status and No. 1M0570 Research Center for the Study of Substances Contained in the Barley and Hops.

ÚVOD

Správná výživa sírou pozitivně ovlivňuje nejen výši výnosu, ale i kvalitu celkové produkce zrna sladovnického ječmene. Síra je významným esenciálním makroelementem s důležitou rolí v rostlinném metabolismu. Nedostatek vede ke snížení výnosu a nepříznivě ovlivňuje i technologickou kvalitu zrna sladovnického ječmene. Donedávna zajišťovala dostatečný přísun síry aplikace mnoha běžných hnojiv a emise z atmosféry. Podle posledních údajů ČHMÚ z roku 2010 činí depozice síry na území České republiky přibližně 6,6 kg S/ha. Na některých územích, jako jsou například Krušné hory s část Šumavy jsou depozice vyšší než je daný průměr. Naopak zhruba na jedné čtvrtině území jsou depozice síry po 5 kg/ha. Do této skupiny patří i Jihomoravský kraj. Ječmen jarní potřebuje na produkci tuny zrna 4,2 kg síry pro dosažení požadovaného výnosu a kvality (Richter et al., 2006). Sladovnický ječmen bývá často pěstován na lehkých půdách. Ty bývají na deficit síry náchylnější než půdy střední a těžké (Kohoutek et al., 1995). Důležitým faktem je, že aplikace síry může snížit obsah dusíkatých látek v zrně. Děje se tak díky zředovacímu efektu jako důsledku zvýšení výnosu zrna. Dle některých autorů může přihnojením sírou v pozdější fázi vývoje rostliny dojít ke zvýšení obsahu síry v předním zrně, což se odráží na výsledné kvalitě zrna sladovnického ječmene. Ta vychází z celého komplexu vlastností zrna, jako je obsah sacharidů a bílkovin, struktura endospermu, aktivita hydrolytických enzymů během sladování a skladba buněčné stěny. V případě nedostatečné sirmé výživy může dojít k redukci velikosti zrna a s tím spojené snížení energie klíčení vyprodukovaného zrna (McGrath et al., 2002). Dochází také ke změnám ve složení bílkovin v zrně ječmene (Schewry et al., 2001). Sníží se obsah na síru bohatých B a D hordeinu a zvyšuje se obsah na síru chudých C hordeinů. B a D hordeiny jsou hlavními složkami gelové bílkovinné frakce, které jsou během klíčení degradovány a slouží jako substrát pro syntézu bílkovin rostoucího embrya (Schewry et al., 2011). Síra ovlivňuje i kvalitativní parametry vyráběného piva, ovlivňuje například diastatickou mohutnost, aktivitu alfa-amylázy, friabilitu a obsah beta-glukanů v mladině. Za určitých podmínek mohou vznikat sloučeniny, které nepříznivě ovlivňují senzorickou kvalitu piva. Patří k nim např. dimethylsulfid (DMS) a jeho prekurzory (PDMS). Dimethylsulfid je v pivu produkován ze svých prekurzorů S-methylmethioninu (SMM) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Během sušení sladu je produktem rozkladu SMM. Podle Zhaa et al. (2006) aplikace síry ke sladovnickému ječmeni průkazně zvyšuje koncentraci SMM v sušeném sladu. Optimální koncentrace DMS i PDMS ve sladu nejsou zcela přesně dané. Na jejich stabilitu a následnou syntézu dalších látek má vliv pH, teplota a doba vaření mladiny i další přidané suroviny. Mimo sladu může být zdrojem také chmel nebo pivovarské kvasnice. Přesné koncentrace se stanovují až ve finálním výrobku. Kosař a Procházka (2000)

udávají že, při překročení koncentrace 50 µg/l dochází ke zhoršení sensorických vlastností piva, k ovlivnění chuti a pěnivosti. Naopak Basařová a kol. (2010) udává jako sensoricky nepříznivou hodnotu 100 µg/l. Při této koncentraci pivo získává dokazatelně mladinovou až zeleninovou příchut'. U světlý sladů se obsah DMS pohybuje v rozmezí 2 -15 mg/kg a u tmavých sladů 1 – 3 mg/kg DMS. Vyšší koncentrace DMS je žádoucí a je charakteristická pro výrobu piva typu ležák (Hřivna, Gregor, 2010). Cílem práce je zhodnocení vlivu síry, přidané foliárně během vegetace na výnos a sladovnickou kvalitu. Hlavním ukazatele kvality je pak obsah dusíkatých látek v zrna a obsah prekurzorů dimethylsulfidu (PDMS) a dimethylsulfidu (DMS) ve sladu.

MATERIÁL A METODIKA

Problematika sirmé výživy u sladovnického ječmene byla řešena formou maloparcelkového polního pokusu na polní pokusné stanici Obora Školního zemědělského podniku v Žabčicích v roce 2011. Lokalita spadá do kukuričného výrobní oblasti. Dlouhodobý průměr srážek a teplot a aktuální stav na této lokalitě v roce 2011 udává obrázek 1. Agrochemické vlastnosti půdy před založením pokusu udává tabulka 1. Obsah přístupného P, K, Ca a Mg je stanoven ve výluhu Mehlich III. Obsah vodorozpustné síry potom ve vodném výluhu v poměru 1:5. Výměnná půdní reakce na pokusné stanici byla neutrální. Obsah přístupného fosforu a draslíku je dobrý, obsah vápníku vysoký, hořčiku velmi vysoký a obsah vodorozpustné síry je nízký.

Tab. 1 Agrochemické zkoušení půd před založením (středně těžká půda)

pH/CaCl ₂	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	N _{min} (mg/kg)	S vodoroz. (mg/kg)
7,08	113	211	4396	394	7,94	3,67

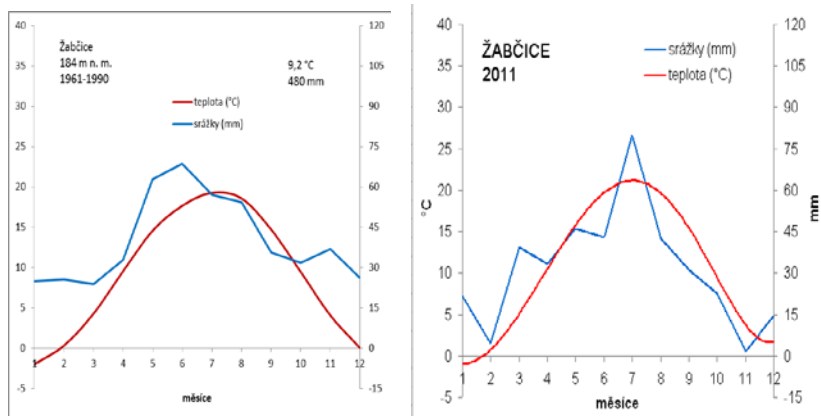
Pokus byl založen se šesti odrůdami sladovnického ječmene. Použity byly odrůdy pro výrobu Českého piva - Aksamit, Bojos a Radegast a odrůdy exportní – Jersey, Prestige a Sebastian. Vysety byly vždy ve třech opakováních, bezzbytkovým maloparcelkovým secím strojem Wintersteiger s výsevkem 4 MKS. Před setím byla provedena jednotná aplikace dusíkem v dávce 30 kg/ha v LAV. Síra byla aplikována foliárně ve formě suspenze mikronizované elementární síry s bentonitem (80 %). Do pokusu byly zařazeny následující varianty hnojení: 1. Sírrou nehnojená kontrola, 2. Síra aplikovaná v DOLOSUL 80 WG v DC 31, 3. Síra aplikovaná v DOLOSUL 80 WG v DC 57. Termíny jednotlivých zásahů pokusu udává tabulka 2. Předplodinou byla jarní pšenice. Po sklizni byl stanoven výnos zrna, přepočten na 14% sušinu, obsah dusíkatých látek, obsah síry v přepadu zrna na síť 2,5 mm, obsah dimethylsulfidu (DMS) a jeho prekurzorů

(PDMS). Výsledná data byla zpracována vícefaktorovou analýzou variance s využitím softwaru STATISTICA version 10.0 a následným testováním pomocí Tuckeyova testu významnosti rozdílů.

Tab. 2 Agrotechnické zásahy v pokusu

datum	operace
24.3.2010	výsev
29.3.2010	hnojení LAD
30.4.2010	aplikace herbicidu LINTUR
9.5.2010	aplikace S v DOLOSDULU
20.5.2010	aplikace herbicidu PUMA EXTRA
24.5.2010	aplikace fungicidu ARCHER TOP
8.6.2010	aplikace S v DOLOSDULU
19.7.2010	sklizeň

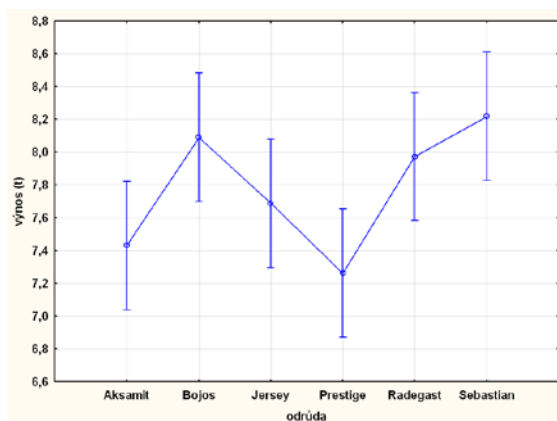
obr. 1 Průběh teplot a srážek na pokusné lokalitě (dlouhodobý normál a rok 2011)



VÝSLEDKY A DISKUZE

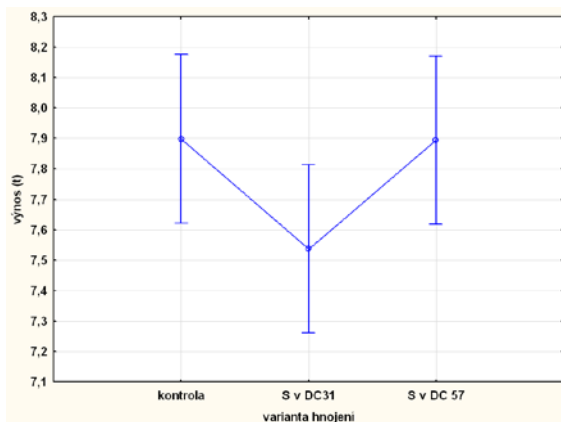
Výnos zrna ječmene jarního se v roce 2011 pohyboval v rozmezí 7,0 – 8,2 t/ha. Hnojení sírou v DC 31 i v DC 57 výsledný výnos zrna statisticky významně neovlivnilo. Graf 1 uvádí průkazné rozdíly mezi jednotlivými odrůdami. Statisticky průkazný byl rozdíl mezi odrůdami Sebastian a Prestige. Mezi ostatními odrůdami nebyl rozdíl statisticky průkazný. Nejvyššího výnosu dosáhla odrůda Sebastian (8,2 t/ha), nejnižšího pak Prestige (7,3 t/ha). Výnos je v kombinaci s optimální agrotechnikou a výživou odrůdová vlastnost. Za rozdíly mezi jednotlivými odrůdami může velikost kořenového systému, která je řízena geneticky (Chloupek, Dostál, 2006).

Graf 1. Vliv odrůdy na výnos zrna



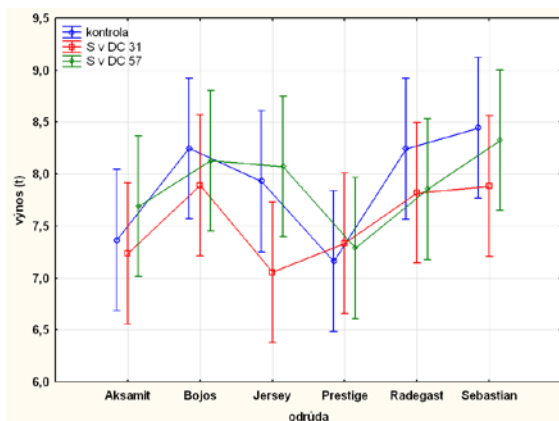
Jak vyplývá z grafu 2, výnos zrna byl po přihnojení sírou v DC 31 nejnižší. Shodné závěry uvádí i Hřivna a Gregor (2010) a Babiánek a Ryant (2009). Důvodem mohou být srážky, které přišly bezprostředně po aplikaci síry (30 mm cca 4 h po aplikaci), což nebyl dostačující čas pro její optimální využití. Jak nasvědčují výsledky z předešlých let, aplikace síry v DC 31 může být pro rostlinu stresující. Sladovnický ječmen pak reaguje snížením výnosu. Aplikace v DC 57 už snížení výnosu nezpůsobuje. Rozdíly mezi dosaženými výnosy jsou však statisticky nevýznamné.

Graf 2. Vliv aplikace síry na výnos zrna



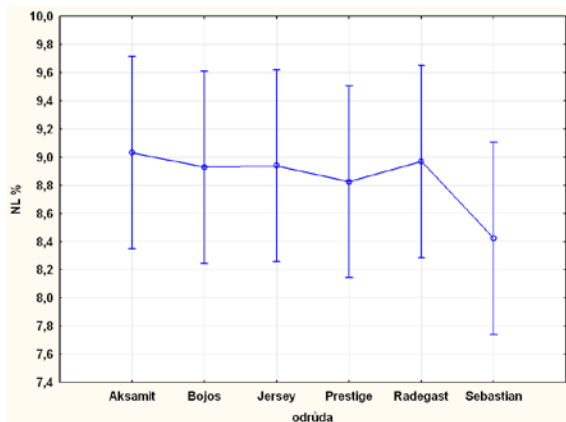
Interakce mezi sledovanými faktory, tedy mezi výnosem, odrůdou a variantou hnojení sírou ukazuje graf 3.

Graf 3 Vliv odrůdy a aplikace síry na výnos zrna



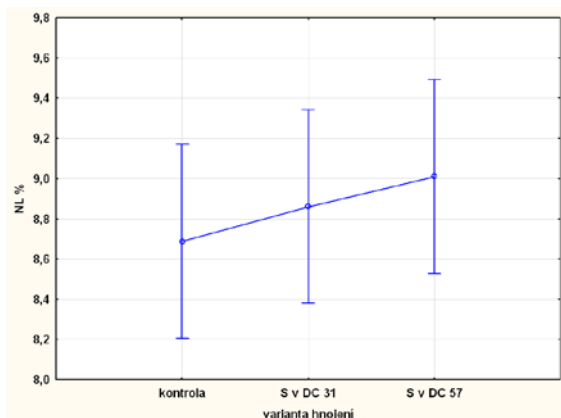
Nejvyšší obsah dusíkatých látek byl u odrůdy Aksamit (9,1%), nejnižší u odrůdy Sebastian (8,4%). Rozdíly mezi odrůdami však nebyly statisticky průkazné (graf 4).

graf 4 Vliv odrůdy na obsah dusíkatých látek



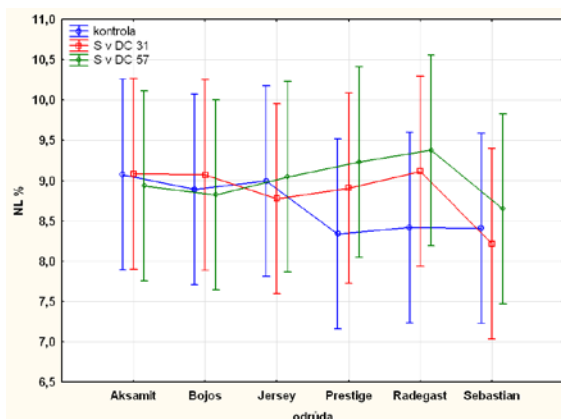
Podle ČSN 46 11 00 – 5 je požadován obsah dusíkatých látek v zrně v rozmezí 10,5 – 11,5 %. Hladina obsahu dusíkatých látek se váže i na ostatní sledované znaky sladu. U všech sledovaných odrůd byl obsah dusíkatých látek velmi nízký. Ani nejvyšší dosažená hodnota 9,1% u odrůdy Aksamit nedosahuje dolní hranice pro sladovnickou využitelnost. Mohlo se tak stát díky vyšším výnosům, kdy díky zředřovacímu efektu byl dusík využit na tvorbu zrna a obsah dusíkatých látek se tak propadl až pod hranici sladovnické využitelnosti, což je podle Vaňka (2007) stále častější jev. Pokles dusíkatých látek v zrně pod 9 % udává také Kosař (2000). Taková zrna ječmene jsou, z důvodu technologických problémů, sladovnický nevyužitelná.

Graf 5 Vliv aplikace síry na obsah dusíkatých látek



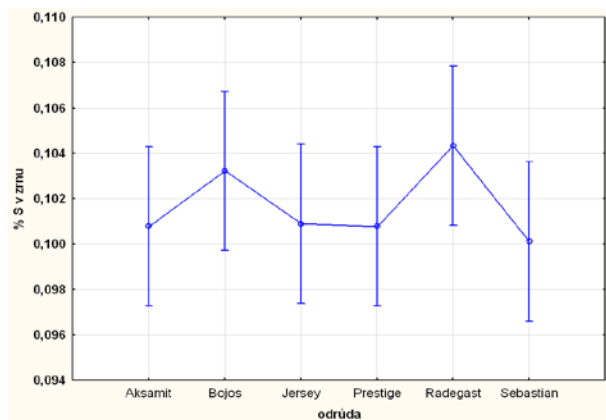
Graf 6 znázorňuje interakce všech sledovaných faktorů. Vyplyvá z něj, že nevyšší obsah dusíkatých látek měla odrůda Radegast po aplikaci síry v DC 57.

graf 6 Vliv odrůdy a aplikace síry na obsah dusíkatých látek



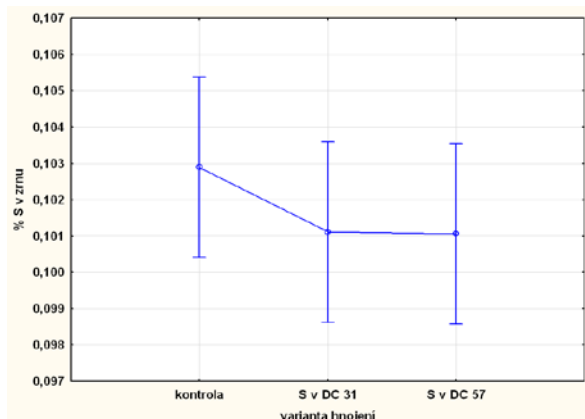
I když obsah síry v přeřadu zrna na síť (>2,5 mm) není přímo odpovědný za nepříznivé chutě a vůně piva, za určitých podmínek mohou vznikat sensoricky aktivní látky, které znehodnotí konečný produkt. Proto je obsah síry tolik diskutovaným tématem z hlediska sladovnické kvality. Obsah síry v zrně ječmene závisí na odrůdě, ale také na klimatických podmínkách a zvolené technologii pěstování. U sladu pak závisí obsah celkové síry na zvolené technologii sladování (Kosař, 2000). Obsah síry patří k jednému z charakteristických znaků rozdělující odrůdy sladovnického ječmene na exportní a odrůdy Českého piva (graf 7). Mezi odrůdy exportní patří Jersey, Prestige a Sebastian, u kterých je nižší obsah síry v předním zrně přínosem. Naopak je tomu u odrůd pro výrobu Českého piva, kam patří Aksamit, Bojos a Prestige. U těchto odrůd je vyšší obsah síry žádoucí, protože je při určité koncentraci považován za aromatickou složku ležáků (Mikulíková 2010, Kosař a Procházka 2000).

Graf 7 Vliv odrůdy na procentuální obsah síry v přeřadu zrna na síť (2,5 mm)

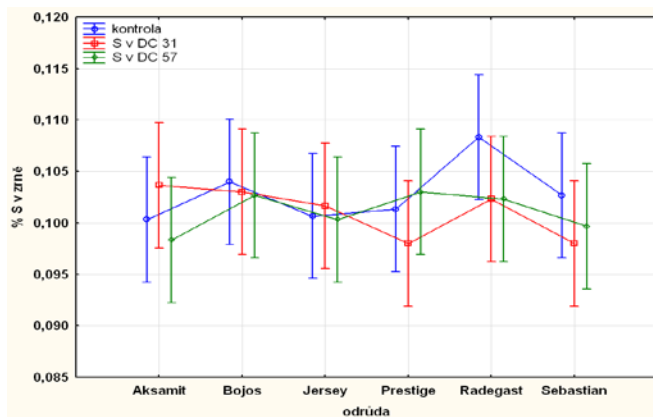


Obsah síry v zrně se nezvýšil ani v jedné variantě hnojení sírou. Jak potvrzuje Hřivna (2010) a Zhao et al.,(2006) nedochází po aplikaci síry ani v pozdějším termínu aplikace síry (DC 57) k jejímu zvýšení a tím k narušení sladovnické kvality (graf 8). Síra v zrně se tedy nekumuluje.

Graf 8 Vliv aplikace síry na procentuální obsah síry v přepadu zrna na síť (2,5 mm)



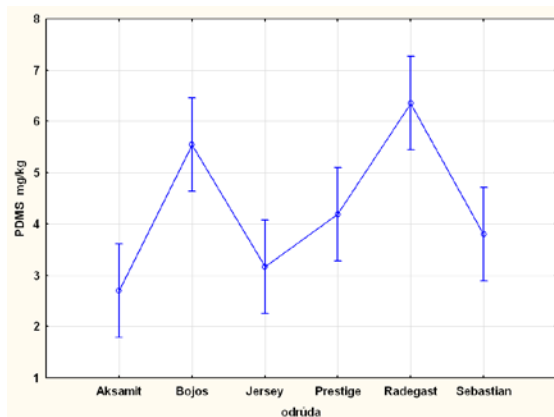
Graf 9 Vliv odrůdy a aplikace síry na procentuální obsah síry v přepadu zrna na síť (2,5 mm)



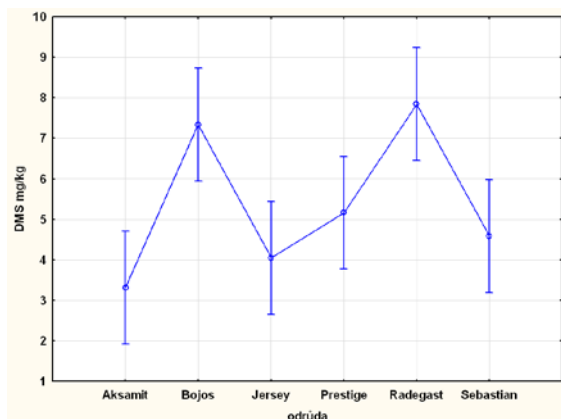
Na dimethylsulfidy (DMS) a jeho prekurzory (PDMS) je jako na sírné sloučeniny upřena pozornost z hlediska narušení kvality piva nežádoucími vůněmi a chutěmi. Jejich obsah je velmi variabilní, pohybuje se v rozmezí jednotek až stovek. Síra obsažená v zrně sladovnického ječmene není jejich jediným zdrojem. Záleží na použité technologii a surovinách, typu piva a použitém slad. I proto není na obsah prekurzorů dimethylsulfidu (PDMS) a dimethylsulfidů (DMS) v pivu mezi odborníky jednotný názor. Například Mikulíková (2010) udává rozsahu 35–40 $\mu\text{g/l}$, Kosař a Procházková (2000) udávají jako limitující obsah 50 $\mu\text{g/l}$. Basařová (2010) uvádí jako limitující

koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$. V případě sladu je situace podobná. Basařová (2010) udává maximální koncentraci 6 mg/l . Hřivna a Gregor (2010) pak rozdělují přípustné koncentrace podle typu sladu, u světlého sladu 2 – 15 mg/l a u tmavého 1 – 3 mg/l . Graf 10 a 11 udává obsah PDMS a DMS, kdy nevyšší obsah PDMS a tím i DMS by zjištěn byl u odrůdy Radegast a Bojos. Obě to jsou odrůdy pro výrobu Českého piva.

Graf 10 Vliv odrůdy na obsah PDMS ve sladu



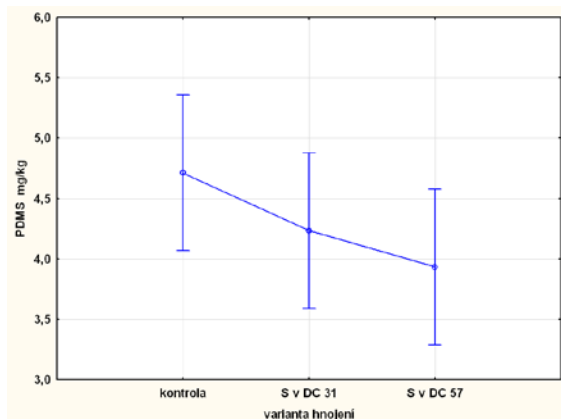
Graf 11 Vliv odrůdy na obsah DMS ve sladu



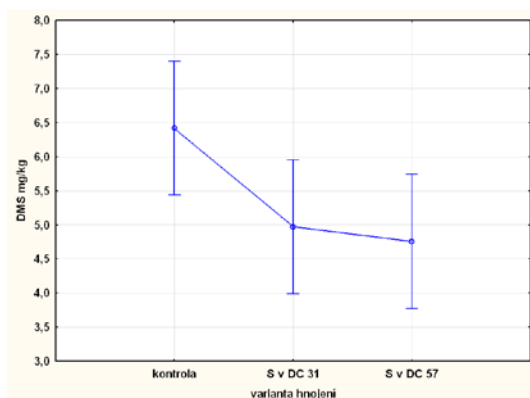
Limitující koncentrace PDMS i DMS jsou zjišťovány až v konečném produktu, proto jsou koncentrace ve sladu pouze orientační. Jejich obsah se může měnit i během vaření piva. Může dojít ke snížení, ale i ke zvýšení obsahu. Jejich zdrojem mohou být i pivovarské kvasnice, chmel nebo použitá technologie a kontaminace z okolí. Z našich prozatímních výsledků nevyplývá, že po přihnojení sírou nedojde ke zvýšení obsahu PDMS a tím i DMS. Je tomu naopak. Obsah obou

klesal s přidáním síry jak v DC 31 tak i v DC 57 a splňují limit pro tmavý slad (graf 12,13). Srovnání celkového vlivu hnojení sírou a vlivu odrůdy uvádí graf 14 a 15.

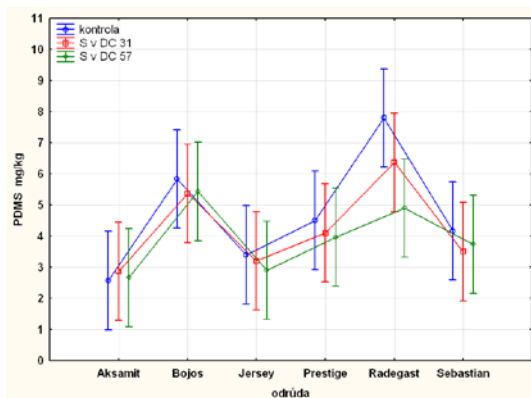
Graf 12 Vliv aplikace síry na obsah PDMS ve sladu



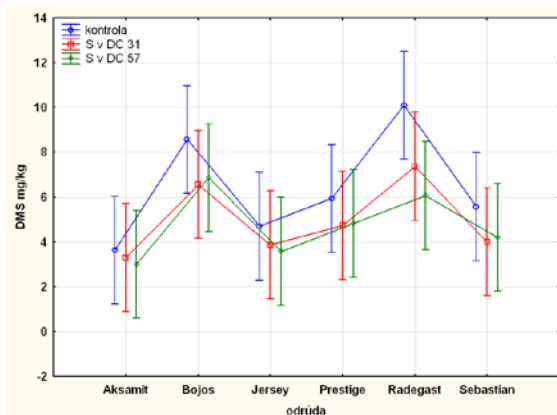
Graf 13 Vliv aplikace síry na obsah DMS ve sladu



Graf 14 Vliv odrůdy a aplikace síry na obsah PDMS ve sladu



Graf 15 Vliv odrůdy a aplikace síry na obsah DMS ve sladu



ZÁVĚR

Na celkový výnos zrna nemělo přihnojení sírou statisticky průkazný vliv.

Obsah dusíkatých látek nebyl statisticky průkazně ovlivněn odrůdou ani variantou přihnojení sírou. Obsah dusíkatých látek byl celkově nízký a nevyhovoval optimálnímu rozpětí obsahu dusíkatých látek pro sladovnické využití.

Aplikace síry neovlivnila průkazně obsah síry v zrně. Nedocházelo tedy k akumulaci síry v zrně a tím ke zhoršení sladovnické kvality.

Na obsah DMS a PDMS nemělo přihnojení sírou statisticky průkazný vliv a nedocházelo ke zvyšování jejich obsahu. Potvrdila se odrůdová variabilita mezi odrůdami Českého piva a exportními odrůdami. Odrůdy Českého piva dosahují větší koncentrace DMS a PDMS oproti exportním, což je u nich žádoucí vzhledem ke specifikám konečného produktu.

LITERATURA

Chloupek O., Dostál V. (2006): Sladová kvalita a tolerance linií ječmene ke stresu ovlivněná velikostí kořenového systému. In: Sborník příspěvků konference „Mendelnet 2006“, MZLU v Brně str. 25.

Babiánek P., Ryant P., Vavrušková P. (2009): Výnos a kvalita sladovnického ječmene po aplikaci různých forem síry. In: Sborník z konference „Sladovnický ječmen – regulace tvorby výnosu a kvality“. Sborník konference „Sladovnický ječmen – regulace tvorby výnosu a kvality“ str. 58 -59.

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010): Pivovarnictví, teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha, 904 s.

Hřivna L., Gregor T. (2010): Role síry při tvorbě a výnosu zrna ječmene jarního, parametrů jakosti sladu a PDMS: Kvasný průmysl, 56(2): 69 – 73

Hřivna L., (2010): Habilitation Thesis MENDELU, Brno, 197 s.

Kosař K., Procházka S. (2000): Technologie výroby sladu a piva, VÚPS, Praha, 398 s.

McGrath S. P., Zhao F., Blake-Klaff M. M. A. (2002): Sulphur in Soil. Process, Behaviour and Measurement. Proceeding 499. York. International Fertilizer Society, 26.

Mikulíková R. (2010): Studium vybraných typů sirných látek v pivu a pivovarských surovinách. Disertační práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno, 111 s.

Shewry, P. R., Tatham, A. S., Halford, N. G. (2001): Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation*, 34(1): 105-111

Zhao F., J., Fortuna S., Barbosa V., L., McGrath S., P., Stobart R. Bilsborrowe P. E., Booth E. J., Brown A., Robson P. (2006): Effects of sulphur on yield and malt quality of barley. *Journal of Cereal Science*, 43(3): 369 - 377

Grzebisz W., Przygocka-Cyna K. (2007): Spring malt barely response to elemental sulphur - the prognostic value of N and S concentrations in malt barley leaves. *Plant, Soil and Environment*, 53(9): 388 - 394.

IMPACT OF VARIABLE APPLICATION OF PHOSPHORUS AND POTASSIUM ON THEIR SOIL RESERVES DURING THE YEARS

VLIV VARIABILNÍ APLIKACE FOSFORU A DRASLÍKU NA PŮDNÍ ZÁSOBOENOST V PRŮBĚHU LET

Širůček P., Křen J.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: psirucek@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluation of variable application by phosphorus and potassium fertilizers in the conditions of farm during the years. The goal of the research was attempted to prove variable application fertilizers enable to achieve balanced soil phosphorus and potassium levels by reduction undesirable categories of soil supply. The methods were based on soil sampling in previous years, which took place in three periods during the six years. Currently the methods were based on survey spatial representation of soil supply categories by phosphorus and potassium in the soil with help calculation spatial interpolation. In the results there were compared categories of soil supply with their representation in three soil sampling periods during the six years and with their position in area. In last soil sampling period variable application by phosphorus fertilizers was achieved significant reduction in representation of undesirable soil supply categories in comparison with other soil sampling periods. Conversely by variable rate by potassium fertilizers in last soil sampling period was achieved increase in representation of undesirable soil supply categories by potassium in comparison with other soil sampling periods. It follows, that in last soil sampling period was evident over-fertilization by potassium in the soil.

Key words: variable application fertilizers, soil supply, phosphorus, potassium, spatial interpolation

ÚVOD

Precizní zemědělství v posledních dvou desetiletích zaznamenalo v našich podmínkách značný rozmach. Ten však nebyl takové velikosti, aby se dokázal alespoň částečně naplnit jeho celkový potenciál v přínosu pro širší zemědělskou praxi. Do jisté míry tomu brání především konzervativní přístup některých zemědělců, nechť učít se novým postupům a také rozdílná ekonomická situace jednotlivých zemědělských podniků. Cílem precizního zemědělství je poskytnout taková data, která by následně měla sloužit jako informace pro co nejobektivnější závěry ve formě pěstitelských opatření tak, aby došlo k požadovanému ekonomickému efektu. Na precizní zemědělství nelze nahlížet jen jako na systém, který by měl stoprocentně garantovat úsporu nákladů při pěstování rostlin, jak na něj bývá často v zemědělské praxi poukazováno. Pomocí lokálně cíleného hospodaření na půdě se proto snažíme dosáhnout optimalizace jednotlivých agrotechnických opatření při pěstování polních plodin. Principem takového hospodaření na půdě je co nejoptimálnější přísun vhodných a pro rostliny důležitých živin na správném místě, ve správném čase a v odpovídajícím množství.

MATERIÁL A METODIKA

Vyhodnocení variabilní aplikace fosforečných a draselných hnojiv bylo realizováno v jednom ze středisek zemědělské společnosti Rostěnice a. s., které má sídlo v obci Otnice nedaleko Brna. Středisko hospodaří na celkové výměře 1637,49 ha v katastrálním území čtyř obcí – Otnice, Bošovice, Milešovice a Lovčičky.

Tab. č. 1: Popis zkoumané lokality

Zařazení pozemků	
Zemědělská výrobní oblast:	Kukuřičná
Celkový počet půdních bloků:	44
Celková výměra půdních bloků:	1637,49 ha
Průměrná velikost půdních bloků:	37,22 ha
Nadmořská výška (m):	214 - 354
Průměrná svažitost pozemků:	
Klimatické podmínky	
Klimatický region:	VT, T1
Úhrn srážek během vegetace (mm):	285
Průměrná roční teplota:	8,6 °C
Pedologické zařazení	
Půdní typ:	Černozem, hnědozem - substrát spraš
Půdní druh:	Lehká, střední, těžká
Způsob hospodaření	
Zpracování půdy:	Bezorebné, minimalizační
Hlavní pěstované plodiny:	Pšenice ozimá, sladovnický ječmen, kukuřice na zrno, řepka olejka

Vzorkování půdy bylo provedeno společností MJM Litovel a. s. v letech 2006, 2008 a 2011 s celkovým množstvím 547 vzorků, což odpovídá umístění jednoho vzorku na plochu přibližně tří hektarů. Průměrná vzdálenost jednotlivých vzorků se pohybovala na hranici 173,0 m. Rozmístění vzorků na ploše bylo provedeno na základě dálkového průzkumu země pomocí leteckého snímkování půdy s následným zjištěním její prostorové půdní variability. Laboratorní analýzy vzorků na zjištění obsahu přístupného fosforu a draslíku s využitím extrakčního činidla Mehlich III byly rovněž prováděny společností MJM Litovel a. s. Výsledky vzorkování půdy byly zpracovány v geografickém informačním systému ArcMap od společnosti ESRI v učebnách Mendelovy univerzity v Brně. Jako mapový podklad pro další zpracování byly staženy mapy půdních bloků z veřejného registru půdy LPIS.

Vstupní data obsahu fosforu a draslíku z analýz vzorků byla zpracována prostorovými interpolacemi v programu ArcMap. Pro hodnocení obsahu draslíku bylo nutné vyhodnotit i půdní druh. Výběr vhodných prostorových interpolací, popřípadě jejich modifikací, byl umožněn na základě metody cross-validation s porovnáním ukazatele RMSE. Prostorová interpolace, respektive typ variogramu, byl vybrán s ohledem na nejnižší hodnotu ukazatele RMSE. Velikost 1 pixelu výsledného rasteru byla stanovena jako 5 x 5 metrů.

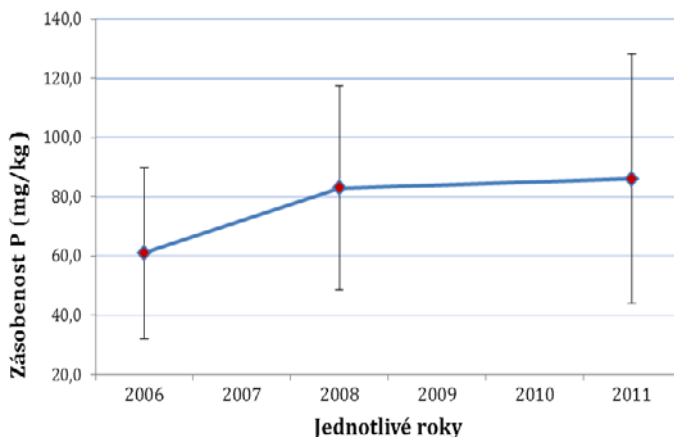
MendelNet 2012

Vyhodnocení zpracovaných dat bylo provedeno s cílem zjištění plošného zastoupení v jednotlivých kategoriích zásobenosti podle hodnocení obsahu přístupného fosforu a draslíku metodou Mehlich III (ÚKZÚZ, 2011). Výpočet plošného zastoupení zásobenosti byl proveden pomocí výběru pixelů patřících do určité kategorie zásobenosti s vynásobením jejich množství v dané kategorii.

VÝSLEDKY A DISKUZE

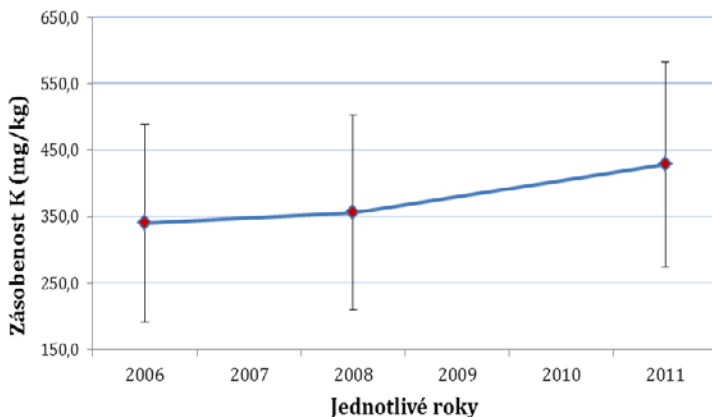
Průměrná zásobenost u obou živin v průběhu let stoukala. Jak znázorňuje graf č. 1, u fosforu byl tento vzestup nejvýraznější v letech 2006 až 2008. Po roce 2008 se však růst zásobenosti výrazně zbrzdil, to se odráží i ve zvýšené hodnotě variačního koeficientu u fosforu v roce 2011. Pomocí variačního koeficientu můžeme charakterizovat celkovou vyrovnanost (homogenitu) zásobenosti na vzorkované ploše. V roce 2011 se tato hodnota u fosforu dostala nad úroveň roku 2006. To znamená, že zásobenost fosforu byla v daném roce méně vyrovnaná, než tomu bylo po prvním vzorkování v roce 2006. Tento jev mohl být způsoben zvýšeným odběrem přístupného fosforu z půdy díky nadprůměrným výnosům v roce 2010 až 2011 ve zkoumané lokalitě. Opačná situace nastala u draslíku (graf č. 2). Zde na rozdíl od fosforu je patrný pozvolný růst průměrné zásobenosti v letech 2006 až 2008. Od roku 2008 do roku 2011 je tento růst ještě více výrazný. Z pohledu vyrovnané zásobenosti je zřetelný postupný pokles vyrovnanosti v letech 2006 až 2008 a o něco výraznější pak v letech 2008 až 2011. Tento zdánlivý růst průměrné zásobenosti a vyrovnanosti se však projevil enormním nárůstem ploch s kategoriemi vysoké a velmi vysoké zásobenosti.

Graf č. 1: Vývoj průměrné zásobenosti půdy fosforem v půdě v letech 2006, 2008 a 2011, vyplyvajících z výsledků vzorkování půdy



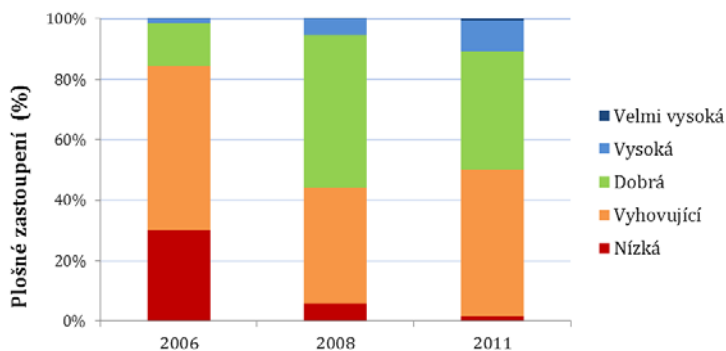
MendelNet 2012

Graf č. 2: Vývoj průměrné zásobenosti půdy draslíkem v půdě v letech 2006, 2008 a 2011, vyplývajících z výsledků vzorkování půdy



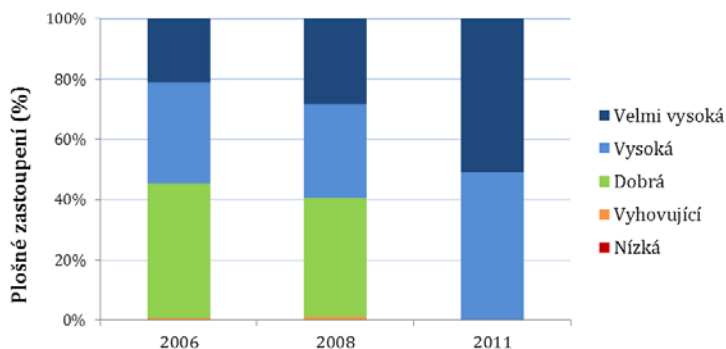
Z grafu č. 3 je zřejmé, že více jak polovinu plochy zaujímal v roce 2006 kategorie vyhovující zásobenosti. Dalších 30 % plochy odpovídalo nízké kategorii zásobenosti a pouze na 14 % byla zjištěna dobrá úroveň zásobenosti. Vysoká zásobenost zaujímal v tomto období pouze nevýznamnou část obhospodařované plochy. V roce 2008 byl na pozemcích střediska Otnice proveden druhý cyklus vzorkování půdy. Oproti výsledkům z roku 2006 je zde patrný výrazný nárůst plochy zastupující kategorii dobré zásobenosti. V tomto případě se jedná o více než polovinu celkové výměry. Dále je zřejmý znatelný úbytek plochy nacházející se v kategoriích nízké a vyhovující zásobenosti. Zároveň je nutné zmínit i mírný nárůst, v řádech jednotek procent, u kategorie vysoké zásobenosti. Poslední vzorkování půdy bylo v této oblasti provedeno v roce 2011. Oproti výsledkům vzorkování z roku 2008 je zde patrný nárůst kategorie vyhovující zásobenosti blíží se k úrovni z roku 2006. Toto zvýšení proběhlo na úkor dobré zásobenosti, kde došlo v tomto případě k úbytku ploch přibližně o 10 %. V řádu jednotek procent se dále snížila plocha odpovídající kategorii nízké zásobenosti. Naopak k nárůstu ploch došlo u kategorie vysoké zásobenosti. Negativní trend poklesu kategorie dobré zásobenosti do kategorie vyhovující zásobenosti na některých pozemcích mohl být zapříčiněn zvýšeným odběrem živin porosty plodin v letech 2010 a 2011 v souvislosti s vysocí nadprůměrnými výnosy v dané lokalitě.

Graf č. 3 Hodnocení zásobenosti půdy fosforem v letech 2006, 2008 a 2011, vyjádřeno v procentech plochy



Jak vyplývá z grafu č. 4, nejvyššího plošného zastoupení v roce 2006 u draslíku dosahovala kategorie dobrá zásobenosti, následovala kategorie vysoké zásobenosti a nemalým podílem byla zastoupena i kategorie velmi vysoké zásobenosti. Takřka nulové nebo jen velmi malé zastoupení bylo patrné u nízké a vyhovující kategorie zásobenosti. Rok 2008 byl v zásobenosti draslíku ve znamení mírného poklesu dobré a vysoké kategorie zásobenosti se současným nárůstem plošného zastoupení kategorie velmi vysoké zásobenosti. Kategorie nízké a vyhovující zásobenosti sehrávaly, podobně jako v roce 2006, nevýznamnou roli. V roce 2011 došlo k rapidnímu úbytku kategorie dobré zásobenosti na úkor kategorií vysoké a velmi vysoké zásobenosti. Výsledkem toho je výrazné přehojení draslíkem na celkové ploše, která byla pokryta vzorkováním.

Graf č. 4 Hodnocení zásobenosti půdy draslíkem v letech 2006, 2008 a 2011, vyjádřeno v procentech plochy



ZÁVĚR

Výsledky vzorkování půdy a jejich vzájemné porovnání v letech 2006, 2008, 2011 u fosforu nasvědčují zvýšení průměrné zásobenosti přístupného fosforu v půdách a zároveň nárůstu výměry půdy nacházející se v kategorii dobré zásobenosti. Tento posun lze hodnotit jako pozitivní efekt variabilní aplikace na pozemcích, které jsou obhospodařovány střediskem Otnice. Jako mírně negativní efekt může být zohledněno snížení celkové nevyrovnanosti pozemků na konci roku 2011. To mohlo být způsobeno nadprůměrnými výnosy v letech 2010 a 2011, respektive vyšším odběrem fosforu rostlinami v těchto letech. V tomto případě tedy lze konstatovat, že variabilní aplikací hnojiv došlo ke znatelnému snížení podílu nežádoucích kategorií zásobenosti a ke znatelnému zvýšení žádoucích kategorií i přes mírný nárůst nevyrovnanosti zásobenosti půdy fosforem.

Z hlediska vývoje půdní zásobenosti draslíkem zjištěného na základě vzorkování půdy v letech 2006, 2008 a 2011 je patrný nárůst průměrné zásobenosti draslíku v půdách a snížení její celkové nevyrovnanosti. Tento posun má však jednoznačně negativní efekt z pohledu na snížení podílu nežádoucích kategorií půdní zásobenosti a na zvýšení její vyrovnanosti, neboť došlo k enormnímu nárůstu výměry, která se nacházela v kategorii vysoké a velmi vysoké zásobenosti. Naopak celkový podíl výměry nacházející se v cílové kategorii dobré zásobenosti je poznamenán rapidním úbytkem ploch. Výsledkem tohoto jevu je výrazné přehnojení draslíkem na celé výměře střediska. Nutno podotknout, že k nárůstu vysoké a velmi vysoké zásobenosti došlo i na pozemcích, které draslíkem nebyly do této doby vůbec hnojeny více než osm let. To mohlo být zapříčiněno nejruznějšími přírodními procesy. Lze ale konstatovat, že i přes snížení nevyrovnanosti v zásobě draslíkem nedošlo variabilní aplikací ke snížení podílu nežádoucích kategorií zásobenosti.

LITERATURA

Internetové zdroje:

Balík, J., Štípek, K., Černý, J., 2006: Výživa rostlin a hnojení v systému precizního zemědělství Precizní zemědělství. www.phytosanitary.org [online]. [cit. 2012-02-07]. Dostupné z: http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF_08_2005.pdf

Klír, J., Kunzová, E., Čermák, P., 2008: Rámcová metodika výživy rostlin a hnojení 2. vyd. www.vurv.cz [online]. [cit. 2012-02-04]. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-61-4.pdf>

ÚKZÚZ, 2005: Pracovní postupy pro agrochemické zkoušení zemědělských půd v České republice v období 2005 až 2010. www.ukzuz.cz [online]. [cit. 2012-02-15]. Dostupné z: http://www.ukzuz.cz/Uploads/1057-7-pracovniPostupy_AZZP.pdf.aspx

ÚKZÚZ, 2010: Porovnání vývoje agrochemických vlastností půd za období 1999 – 2003 a 2005 – 2009. www.ukzuz.cz [online]. [cit. 2012-03-04].

Dostupné z: <http://www.ukzuz.cz/Folders/Uploads/159604-7-Porovnavaci+zprava+AZZP+99-03+a+05-09pdf.aspx>

MendelNet 2012

ÚKZÚZ, 2010: Výsledky agrochemického zkoušení zemědělských půd za období 2004 – 2009. www.ukzuz.cz [online]. [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: <http://www.ukzuz.cz/Folders/Uploads/159600-7-Hodnotici+zprava+AZZP+2004-2009pdf.aspx>

Ryant, P., Richter, R., Hlušek, J., Fryšáková, E., 2003: Multimediální učební texty z výživy rostlin. www.af.mendelu.cz [online]. [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/index.htm

Ryant, P., Richter, R., Poulík, Z., Hřivna, L., 2004: Multimediální učební texty z výživy a hnojení polních plodin. www.af.mendelu.cz [online]. [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/hnojeni_plodin/index.htm

Kunzová, E., 2010: Výživa rostlin a hnojení draslíkem (metodika pro praxi). www.vurv.cz [online]. [cit. 2012-03-01]. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-066-6.pdf>

Kunzová, E., 2009: Výživa rostlin a hnojení fosforem (metodika pro praxi). www.vurv.cz [online]. [cit. 2012-03-01]. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-015-4.pdf>

Kraus, J., 2007: Geostatistika jako prostorové modelování jevů, 490 – 552 s. <http://panda.hyperlink.cz>. [online]. [cit. 2012-02-28]. Dostupné z: <http://panda.hyperlink.cz/cestapdf/pdf07c6/kraus.pdf>

Langhammer, J., 2009: Hlavní metody interpolace. www.natur.cuni.cz/fakulta [online]. [cit. 2012-02-28]. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~langhamr/lectures/vtfg2/prednasky/surfer_1/interpolace/interpolace.html

Lukas, V. a kol., 2011: Tvorba aplikačních map pro základní hnojení plodin v precizním zemědělství (metodika pro praxi). www.af.mendelu.cz [online]. [cit. 2012-03-4]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_217_multitext/metodiky_pro_praxi/4_hnojeni.pdf

Main, Ch., 2004: A Guide to Predicting Spatial Distribution of Weed Emergence Using Geographic Information Systems (GIS). www.plantmanagementnetwork.org [online]. [cit. 2012-03-8]. Dostupné z: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/ats/guide/2004/gis/>

Disertační a habilitační práce:

Lukas, V., 2009: Metody hodnocení variability půdních podmínek jako podklad pro diferencované provádění pěstebních zásahů. Disertační práce (nepubl.), Ústav agrosystémů a bioklimatologie, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 170 s.

Borůvka, L., 2001: Variabilita půdních vlastností a jejich hodnocení. Habilitační práce (nepubl.), Katedra pedologie a geologie, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 151 s.

Hrůza, M., 2008: Technicko-ekonomické hodnocení variabilního a uniformního hnojení v podmínkách precizního zemědělství. Doktorská disertační práce (nepubl.), Ústav techniky a automobilové dopravy, Mendelova lesnická a zemědělská univerzita v Brně, Brno, 150 s.

Knihy:

MendelNet 2012

Brodský, L., 2004: Využití geostatistických metod pro mapování prostorové variability agrochemických vlastností půd. Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra agrochemie a výživy rostlin, Praha, 120 s, ISBN 8021311002.

Vaněk, V. a kol., 2002: Výživa a hnojení polních a zahradních plodin. Třetí, doplněné vydání. Praha: Zemědělec, 132 s, ISBN 80-902413-7-9.

Zimolka, J. a kol., 2005: Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. Praha: Profi Press, 180 s, ISBN 80-86726-09-6.

Články ve sborníku:

Lukas, V., 2007: Vliv rozdílné hustoty vzorkování půdy aplikaci základních hnojiv v precizním zemědělství. In. Mezinárodní konference „Výživa rostlin a její perspektivy“, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 155-158 s. ISBN 978-80-7375-068-8.

Lukas, V., Křen, J., 2005: Tvorba aplikačních map základního hnojení z výsledků agrochemických analýz půdních vzorků. In MendelNet 2005, Mendelova univerzita v Brně, Brno.

EFFECT OF NITROGEN AND MAGNESIUM TREATMENTS ON THE PRODUCTION OF INDIAN TOBACCO (*LOBELIA INFLATA* L.)

Vojnich V.J.¹, Máthé Á.¹, Szőke É.², Csapó Z.¹

¹Department of Botany, Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of West Hungary, Vár 2, 9200 Mosonmagyaróvár, Hungary

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, Üllői út 26, 1085 Budapest, Hungary

E-mail: vojnichv@mtk.nyme.hu

ABSTRACT

The aim of this project was to examine the effect of magnesium and nitrogen fertilisation on the biomass and on the alkaloid production of *Lobelia inflata* in Hungary. Indian tobacco (*Lobelia inflata* L.) is a native North American species domesticated at the University of West Hungary, Department of Botany in 2010 and 2011. The establishment of plants, propagated by *in vitro* and *in vivo* methods, was studied. Both the *in vitro* experiments and the examination of active substances were carried out at the University Semmelweis, Department of Pharmacognosy in Budapest. When propagated by seed *L. inflata* needs several months to reach the transplant stage required for planting into the open-field. The *in vitro* propagation method, as an alternative for large-scale production, was examined. Our observations indicated that plants propagated and acclimatised *in vitro* have the same characteristics as those grown from seeds.

Key words: lobeline, alkaloid, biomass production, fertilizer

Acknowledgments: This work was supported by Semmelweis University, Department of Pharmacognosy in Budapest. Thanks for the laboratory research worker Lenke Tóth. The support of GVOP 3.1.1.-2004-05-0309/3.0 is gratefully acknowledged.

INTRODUCTION

Indian tobacco (*Lobelia inflata* L., Lobeliaceae) is a native North American species that seems to be a useful medicinal plant that can be introduced in Hungary. It is mainly an annual plant (Kelly, 1992), but biennial populations can be found, too.

The herb contains more than 20 piperidine skeleton alkaloids (Kursinszki et al., 2008). Its main alkaloid is lobeline, used in cases of gas- and narcotic poisoning for its stimulating effect on the respiratory system (Dwoskin and Crooks, 2002). It is also used in anti-smoking preparations (Szóke and Máthé, 2007). Recently, significant amounts of polyacetylene compounds have been isolated from above ground organs of the plant (lobetyol, lobetolin and lobetyolin) (Bálványos 2002, Felpin and Lebreton 2004).

The aim of this project was to examine the effect of magnesium and nitrogen fertilisation on the biomass and on the alkaloid production as well as on the total alkaloid content in *L. inflata* in Hungary.

MATERIAL AND METHODS

The open field trials were carried out in 2010 and 2011 at the University of West-Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences. N- and Mg- were applied in the form of ground fertilizers. The nutrients were applied in the following methods and quantities in 2010: untreated (control), 50 kg/ha N-, 100 kg/ha Nitrogen and 50 kg/ha Magnesium fertilizer. The nutrients were applied in the following methods and quantities in 2011: untreated (control), 50 kg/ha N-, 100 kg/ha Nitrogen ground fertilizers, 50 kg/ha Mg- and 100 kg/ha Magnesium ground fertilizers. Soil analytical values: pH 7.12; humus 3.08 m/m%; Mg 310 mg/kg; NO₂-NO₃-N 20.1 mg/kg, K₂O 518 mg/kg, P₂O₅ 358 mg/kg. An extended soil analysis was carried out according to standard methods of UIS Ungarn laboratory (Hungary, Mosonmagyaróvár).

Plants were sown in glasshouse of January in 2010 and 2011. Seedlings were transplanted to multi-cellular transplant raising trays, between end of April and early of May.

Mg (2%) - and N (34%) fertilizers were spread onto the soil surface, one day prior to transplanting (15. June, 2010) with 27 plants per plot. Transplanting in 2011 two days (26-27. May) with 40 plants per plot. The experimental design was a randomized blocks with 4 repetitions. Mechanical weed control was applied.

Plant height (cm) was measured in 2010 four times (8. July, 17 July, 24 July, 1. August) and in 2011 three times (22. July, 29. July, 7. August). In each treatment 7 plants (2010) and 8 plants (2011) were measured. The first harvest took place on 5th of August 2010, respectively on 9-10th of August 2011, when the biomass was recorded. Following harvest, the plants were dried in a shaded and well-ventilated glasshouse. The dry weight determination was 30th of August 2010 and

1st September of 2011. The flowering phenophase was observed in the period July between Septembers (Vojnich et al., 2011). The total alkaloid content was determined by a spectrophotometric method elaborated by Mahmoud and El-Masry (1980) and modified by Krajewska (1986). The statistical analysis was accomplished with SPSS v19 software.

RESULTS AND DISCUSSION

References in the literature on the mineral nutrition of *L. inflata* are scarce, although it is one of the basic factors for the successful production of this species. With the goal of introducing *L. inflata* into cultivation in Hungary, our experiments were aimed at clarifying the basic nutrient requirements.

It could be established that in the form of ground fertilization, both nitrogen and magnesium had a favourable effect on the formation of biomass. Table 1 and Table 2 summarize the effect of fertilizers on plant growth (in 2010). As expected and shown by the analysis of variance, as well as Tukey test, the growth parameters show significantly different values for plant height. Figure 1 illustrates the dry biomass values recorded (in 2010) for above ground plant parts, at the flowering phenophase that was highest in the 50 kg/ha N-treatment followed by the 50 kg/ha Mg-, 100 kg/ha N-treatments. The lowest values were recorded for the control.

Total alkaloid content (in 2010) of above ground plant parts (Figure 2) is 490 mg/100 g (50 kg/ha Mg-treatment), this value is 8.9% higher than the control. The 50 kg/ha N-treatment value is 8.4% higher than the control. The value of the 100 kg/ha N ground fertilizer is 13.7% lower than the control. Similar results were obtained by Szőke et al. (1994) and Takács-Hájos et al. (2007), in experiments where the root formation of *in vitro* organized cultures was studied.

Tab.1. Influence of N- and Mg-fertilization on the growth (height in cm) of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) in the course of the vegetation period, in 2010

Treatments		Height of the plants (cm)			
		8 July	17 July	24 July	1 August
Control	Mean	6.6	11.0	19.3	30.6
	<i>N</i>	7	7	7	7
	<i>Std. Deviation</i>	3.59	6.56	9.52	7.89
	<i>Minimum</i>	3.0	3.0	4.0	16.0
	<i>Maximum</i>	13.0	21.0	31.0	39.0
50 kg/ha N	Mean	14.0	22.4	32.4	40.3
	<i>N</i>	7	7	7	7
	<i>Std. Deviation</i>	7.95	10.84	12.60	11.75
	<i>Minimum</i>	3.0	4.0	7.0	15.0
	<i>Maximum</i>	28.0	38.0	44.0	49.0
100 kg/ha N	Mean	3.4	4.6	6.4	16.0
	<i>N</i>	7	7	7	7
	<i>Std. Deviation</i>	0.53	0.97	1.81	5.94
	<i>Minimum</i>	3.0	3.0	5.0	5.0
	<i>Maximum</i>	4.0	6.0	10.0	25.0
50 kg/ha Mg	Mean	3.6	4.7	9.0	23.1
	<i>N</i>	7	7	7	7
	<i>Std. Deviation</i>	0.47	0.75	2.94	6.44
	<i>Minimum</i>	3.0	4.0	5.0	10.0
	<i>Maximum</i>	4.0	6.0	12.0	28.0

*Tab.2. Tukey HSD test of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) measured four times in 2010 in relation to four fertilising treatments (Parameter: plant height)*

Date of mesasuremens	Treatments (A)	Treatments (B)	Mean Difference (A-B)	Std. Error	Sig. level
8 July	Control	50 kg/ha N	-7.4286	2.3421	0.020 *
		100 kg/ha N	3.1429	2.3421	0.546 n.s.
		50 kg/ha Mg	2.9286	2.3421	0.602 n.s.
17 July	Control	50 kg/ha N	-11.4286	3.4032	0.013 *
		100 kg/ha N	6.4286	3.4032	0.259 n.s.
		50 kg/ha Mg	6.2857	3.4032	0.277 n.s.
24 July	Control	50 kg/ha N	-13.1429	4.3217	0.027 *
		100 kg/ha N	12.8571	4.3217	0.031 *
		50 kg/ha Mg	10.2857	4.3217	0.108 n.s.
1 August	Control	50 kg/ha N	-9.7143	4.4508	0.157 n.s.
		100 kg/ha N	14.5714	4.4508	0.016 *
		50 kg/ha Mg	7.4286	4.4508	0.361 n.s.

**The mean difference is significant at the 0.1 level.*

n.s. = not significant

Fig.1. Dry biomass production (g/plant) of above ground plant parts of Indian tobacco (*Lobelia inflata*), at the flowering phenophase in 2010

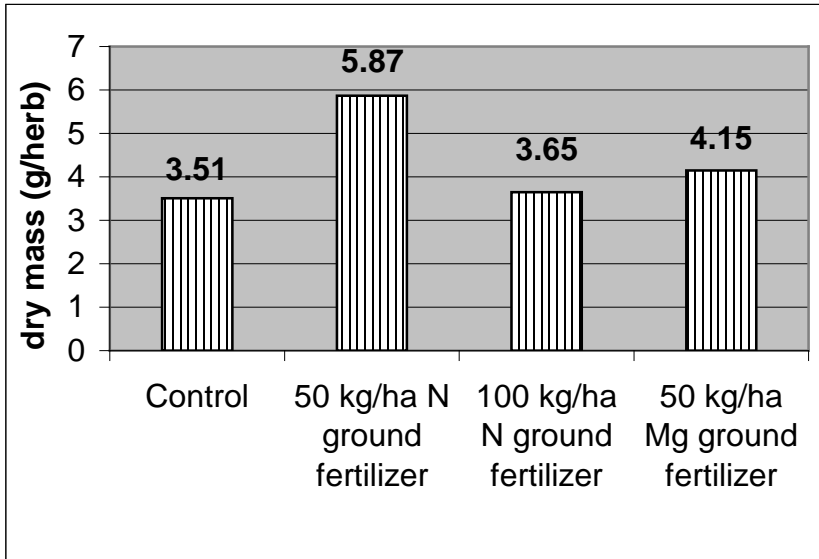
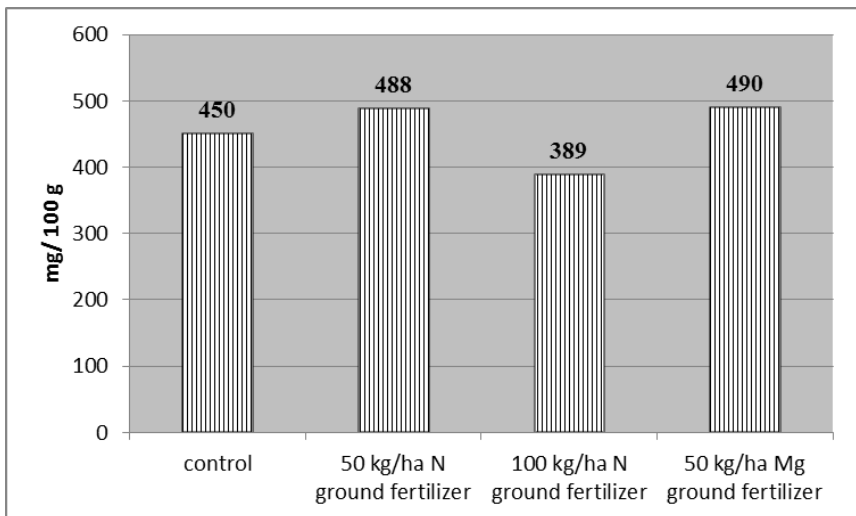


Fig.2. Total alkaloid content (mg/100g) of above ground plant parts of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) in 2010



Tables 3 and Table 4 summarize the effect of fertilizers on plant growth, in 2011. As expected and shown by the analysis of variance, as well as Tukey test, the growth parameters show significantly different values for plant height. Figure 3 illustrates the dry biomass values recorded (in 2011) for above ground plant parts, at the flowering phenophase that was highest in the 100 kg/ha N-treatment followed by the 50 kg/ha Mg-, 100 kg/ha Mg-treatments and control. The lowest values were recorded for the 50 kg/ha N-treatment.

Total alkaloid content (in 2011) of above ground plant parts (Figure 4) is 439 mg/100 g (100 kg/ha N-treatment), this value is 6.4% higher than the control. In the 50 kg/ha Mg-treatment, its value is 5.6% higher than the control. The application of 100 kg/ha Mg ground fertilizer resulted 5.7% higher total alkaloid content than the unfertilized control. The value for the 50 kg/ha N-treatment is 2.2% lower than the control.

Tab.3. Influence of N- and Mg-fertilization on the growth (height in cm) of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) in the course of the vegetation period, in 2011

Treatments		Height of the plants (cm)		
		22 July	29 July	7 August
Control	Mean	25.0	33.75	40.25
	<i>N</i>	8	8	8
	<i>Std. Deviation</i>	6.44	6.52	5.7
	<i>Minimum</i>	13.0	20.0	27.0
	<i>Maximum</i>	32.0	41.0	45.0
50 kg/ha N	Mean	30.38	38.63	47.75
	<i>N</i>	8	8	8
	<i>Std. Deviation</i>	12.59	11.02	7.5
	<i>Minimum</i>	14.0	23.0	36.0
	<i>Maximum</i>	50.0	56.0	60.0
100 kg/ha N	Mean	29.25	37.88	45.38
	<i>N</i>	8	8	8
	<i>Std. Deviation</i>	6.36	6.33	5.15
	<i>Minimum</i>	19.0	28.0	37.0
	<i>Maximum</i>	39.0	47.0	54.0
50 kg/ha Mg	Mean	30.75	38.38	43.0
	<i>N</i>	8	8	8
	<i>Std. Deviation</i>	6.16	6.05	6.97
	<i>Minimum</i>	22.0	29.0	33.0
	<i>Maximum</i>	39.0	47.0	54.0
100 kg/ha Mg	Mean	26.25	36.5	45.13
	<i>N</i>	8	8	8
	<i>Std. Deviation</i>	8.68	7.54	5.84
	<i>Minimum</i>	14.0	25.0	36.0
	<i>Maximum</i>	41.0	50.0	56.0

Tab.4. Tukey HSD test of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) measured three times in 2011 in relation to four fertilising treatments (Parameter: plant height)

Date of mesasuremens	Treatments (A)	Treatments (B)	Mean difference (A-B)	Std. Error	Sig. level
22 July	Control	50 N	-5.375	4.20576	0.706 n.s.
		100 N	-4.250	4.20576	0.849 n.s.
		50 Mg	-5.750	4.20576	0.652 n.s.
		100 Mg	-1.250	4.20576	0.998 n.s.
29 July	Control	50 N	-4.875	3.85646	0.714 n.s.
		100 N	-4.125	3.85646	0.821 n.s.
		50 Mg	-4.625	3.85646	0.752 n.s.
		100 Mg	-2.750	3.85646	0.952 n.s.
7 August	Control	50 N	-7.500	3.14614	0.144 n.s.
		100 N	-5.125	3.14614	0.490 n.s.
		50 Mg	-2.750	3.14614	0.904 n.s.
		100 Mg	-4.875	3.14614	0.538 n.s.

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

n.s. = not significant

Fig.3. Dry biomass production (g/plant) of above ground plant parts of Indian tobacco (*Lobelia inflata*), at the flowering phenophase in 2011

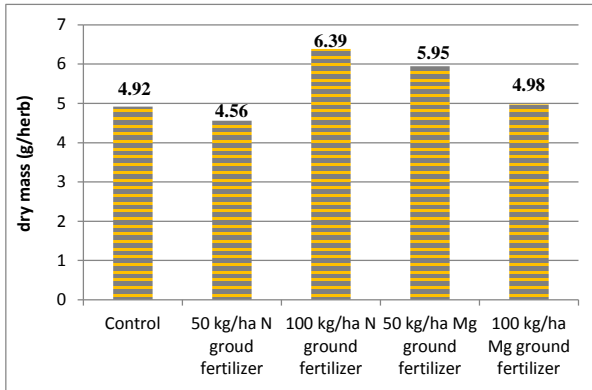
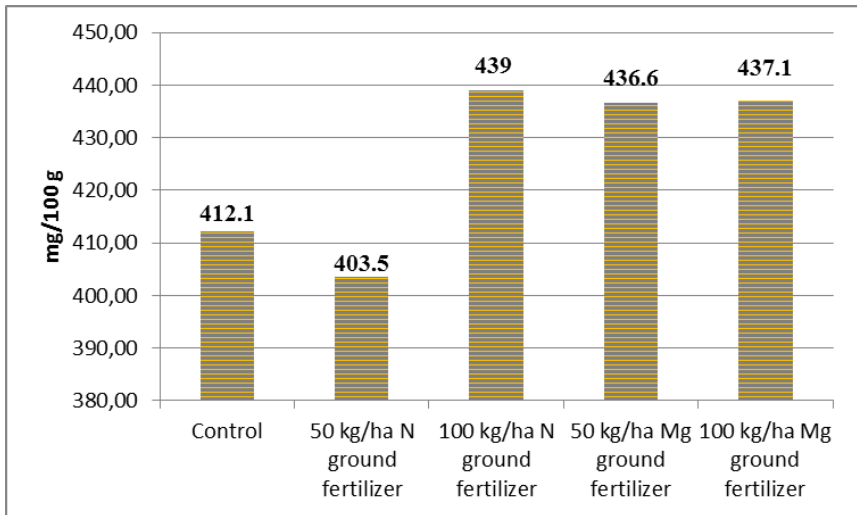


Fig.4. Total alkaloid content (mg/100g) of above ground plant parts of Indian tobacco (*Lobelia inflata*) in 2011



CONCLUSIONS

In the field trials of *L. inflata* we have established the favourable effect of fertilization. As a result, in 2010, N- and Mg-fertilization increased plant growth (height in cm) by 40.3 and 16.0 cm, respectively (50 kg/ha N-fertilization 40.3 cm). The average height of plants in the 50 kg/ha Mg-treatment is 23.1 cm. The average above ground dry biomass production (g/plant) is 5.87 g/plant (50 kg/ha N ground fertilizer treatment). The 50 kg/ha Mg ground fertilizer value is 4.15 g/plant. The lobeline content (mg/100g) of above ground plant parts is 490 mg/100g (50 kg/ha Mg-treatment), while in the 50 kg/ha N-treatment is 488 mg/100g.

The results in 2011 indicate that N- and Mg-fertilization increased growth (height in cm) by 47.75-40.25 cm (50 kg/ha N-fertilization 47.75 cm). The value of the 100 kg/ha Mg-treatment is 45.13 cm. The dry biomass production (g/plant) of above ground plant parts is 6.39 g/plant (100 kg/ha N-treatment). The 50 kg/ha Mg ground fertilizer value is 5.95 g/plant. The lobeline content (mg/100g) of above ground plant parts is 439 mg/100g (100 kg/ha N-treatment). The value of the 100 kg/ha Mg-treatment is 437.1 mg/100g.

Based on our results, it seems possible to make the right choice of Mg- and N-fertilization with a favourable effect on both biomass and alkaloid production of *Lobelia inflata*.

REFERENCES

- Bálványos I. (2002): Studies on the growth and secondary metabolite production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. PhD thesis, Budapest.
- Dwoskin L. P., Crooks P. A. (2002): A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse. *Biochemical Pharmacology*, 63: 89-98.
- Felpin F.-X., Lebreton J. (2004): History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. *Tetrahedron*, 60(2004):10127-10153.
- Kelly C.A. (1992): Reproductive phenology in *Lobelia inflata* L. (Lobeliaceae) and their environmental control. *American Journal of Botany*, 79(10):1126-1133.
- Krajewska A. (1986): The effect of new type of growth regulators on the *Lobelia inflata* L. tissue cultures in Hungarian. PhD thesis, Budapest.
- Kursinszki L., Ludányi K., Szőke É. (2008): LC-DAD and LC-MS-MS analysis of piperidine alkaloids of *Lobelia inflata* L. (in vitro and in vivo). *Chromatographia*, 68:27-33.
- Mahmoud Z. F., El-Masry S. (1980): Colorimetric determination of lobeline and total alkaloids in *Lobelia* and its preparations. *Scie. Pharm.*, 48:365-369.
- Szőke É., Kiss A. S., Kursinszki L., Petri G. (1994): Inhibition of aluminium toxicity by magnesium and citric acid in tobacco tissue culture. *Magnesium Research*, 5:83-87.
- Szőke É., Máthé Á. (2007): GVOP 3.1.1.-2004-05-0309/3.0 report of research. NKTH, Budapest.

MENDELNET 2012

Takács-Hájos M., Szabó L., Rácz I-né., Máthé Á., Szőke É. (2007): The effect of Mg-leaf fertilization on quality parameters of some horticultural species. *Cereal Research Communications*, 35(2): 1181-1184.

Vojnich V. J., Máthé Á., Gaál R., Tüű Sz. (2011): Botanical and chemical variability of Indian tobacco (*Lobelia inflata* L.). *Acta Agronomica Óváriensis*, 53(2): 37-48.

Section – Animal Production

THE ANALYSE OF HAFLINGER BREEDING AN ITS CROSSBREEDS IN THE CZECH REPUBLIC

ANALÝZA CHOVU HAFLINGA A JEHO KŘÍŽENCŮ V ČR

Bihuncová I., Kostůková M., Černohorská H., Pišová M., Králová B., Oravcová I., Sobotková E.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: iveta-lorietta@centrum.cz

ABSTRACT

The main aim of our work was to separate the Haflinger breed from an overall database of all horses without breed classification. Another goal was to determine breeds are mostly coupled with Haflinger horses and what type of horses is produced by such coupling. There is a total of unclassified 22 260 horses (as per Ustředni Evidence Koni – UEK database). A total of 864 individuals were evaluated. We managed to separate the parenting individuals by breed, a total count of interbreeding, and evaluation of Haflinger – type horses count growth. The largest group of horses is descendants of a stallion without breed classification – 514. The second largest group contains descendants of Haflinger mare – 273, and the third place is occupied by descendants of Haflinger-type mare – 184. There are also offspring of crossbreeding Haflingers with various other breeds; 58.9% of those Haflinger type, 0.4% cold blooded type, 6.7% pony type, 5.7% warm blooded type, 0.5% Hucul horse type and 27.5% of unmarked horses. These results show that the total count of Haflinger type horses is rising every year. Also, there are cases of unclassified horses being transferred to Haflinger studbook; this is only allowable if such horse fulfills the studbook order criteria. Also such horse must be a thoroughbred offspring of Haflinger horses.

Key words: The haflinger, breed, breeding, crossbreed

Acknowledgments: This project was made with support of Internal Grant Agency of The Faculty of Agronomy Mendel University, IGA TP O1/2012

ÚVOD

S chovem haflinga se začalo v jižním Tyrolsku (Dušek, 2007; Kapitzke, 2008). Menší tyrolské klisny byly kříženy s arabskými polokrevnými hřebci rodu El-Bedavi a Dahoman, kdy příbuzenskou plemenitbou a úpravou životních podmínek za důsledného výběru bylo ucelené stádo a tak dalo vznik novému plemeni (Bílek, 1955).

Největší vliv na vznik plemene měl hřebec El Bedavi, který byl dovezen z Arábie v 19. století rakouskou hipologickou společností. Čtyři z krevních linií tohoto plemene se odvozují od synů, vnuků a pravníků polokrevníka El Bedavi XXII, který pocházel z Rakousko-uherského hřebčína v Radovci. Pátá linie je po 40 Willym pravnik, potomek po 249 Folie, syn El Bedavi XXII (Edwards, 1998; Kapitzke, 2008).

Hafling je velice všestranný kůň, využívaný pro agroturistiku. Je vhodný jak pro děti, tak pro dospělé. Využití nalézá i v zemědělství, ale během posledních let je chov zaměřen spíše ke sportovním účelům. Toto plemeno je středně velké, ušlechtilé, harmonické s korektním fundamentem, s velmi dobrým charakterem a přiměřeným temperamentem a s dobrou mechanikou pohybu. Plemenná kniha haflinga je uzavřená a není povolené používat v plemenitbě jiná plemena (Hermens, 1999; Dušek, 2007; Kapitzke, 2008).

Čistokrevná plemenitba je připarování klisen a plemeníků stejného plemene. Cílem je homogenizovat plemeno a dosáhnout dědičného ustálení a požadovat, aby rodiče požadované vlastnosti předávali svému potomstvu. Čistokrevná plemenitba je používána u plemen koní s uzavřenou plemennou knihou. Meziplemenné křížení je páření dvou jedinců rozdílných plemen (Misař a Jiskrová, 2008).

Od roku 1995 početní stavy koní každým rokem stále stoupají v tomto roce bylo evidováno 18.039 kusů. O 17 let později, tedy k 31.7.2012 již Ústřední evidence koní ve Slatiňanech eviduje 77.362 koní. Nejpočetnější plemeno koní v ČR je český teplokrevník. Druhou nejpočetnější skupinou zauímají koně bez plemenné příslušnosti se 22.260 jedinci. V typu haflinga je to 864 koní. Chovatelé nerespektují řady plemenných knih, jejich přístup je nedbalý a následně se stává, že i koně s oboustranným původem se zbytečně zařazují do skupiny koní bez plemenné příslušnosti.

MATERIÁL A METODIKA

Ústřední evidence koní ve Slatiňanech nám zprostředkovala databázi evidovaných koní, kteří nepatří do žádné plemenné knihy. Tato skupina koní je běžně označována jako koně bez plemenné příslušnosti a mezi inspektory chovu koní, pracující v Equiservis konzultent s.r.o. je označována

číslem „99“. Koně bez plemenné příslušnosti patří jednoznačně do druhé nejpočetnější skupiny evidovaných koní se 22.260 jedinci.

V práci jsme se zaměřili na konkrétnější typ, kterým jsou koně bez plemenné příslušnosti v typu haflinga. Z celkové databáze jsme získali 864 koní tohoto typu. Zpracovávali jsme počty připuštění konkrétních plemen, sledovali jsme nárůst dané skupiny k určitému období, vznik potomků a zařazení do typu. V lednu 2012 Ústřední evidence koní zaznamenala 580 klisen zařazených v plemenné knize haflinga, 35 plemenných hřebců a 972 valachů, mladých koní, starších klisen a hřebců nezapsaných v plemenné knize.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Šlechtitelský program haflinga vyžaduje čistokrevnou plemenitbu. Mohou se připuštět pouze licentovaní hřebci na klisny zapsané v plemenné knize. Plemené knihy se člení na: plemenná kniha hřebců, hlavní plemenná kniha klisen, plemenná kniha klisen a pomocná plemenná kniha klisen. Klisny v pomocné plemenné knize budou využívány v chovu do konce přechodného období do 31.12.2016.

Použití jiných plemen není povoleno. Plemenná kniha je uzavřená. U plemenných koní se hodnotí plemenný typ a pohlavní výraz, exteriér a zdravotní stav. Hodnocení koní se provádí před zápisem do PK, hodnocení se provádí na svodech a chovatelských výstavách jak uvádí svaz chovatelů haflinga.

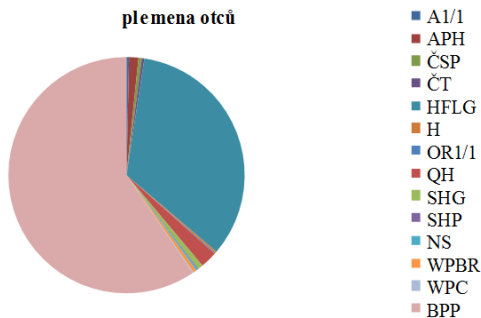
Plemena otců

V tabulce 1 jsou uvedeni hřebci příslušného plemene, kteří zplodili potomka v typu haflinga, potomci nejsou zapsáni v PK. Největší počet hřebců je ve skupině koní bez plemenné příslušnosti, to jsou hřebci, kteří nejsou oprávněni připouštět žádné klisny, jsou bez licence. Druhou nejpočetnější skupinou jsou hřebci plemene hafling. Třetím plemenem je quarter horse s 20 potomky a dale appaloosa s 11 potomky. Westernová plemena v posledních letech stoupají na oblibě pro jejich charakter a westernový styl ježdění. Ostatní plemena mají počet připuštění nižší. Je potřeba položit si otázku. Proč počet koní bez plemenné příslušnosti tolik narůstají? Je to již 28,5% celkové populace chovaných koní v ČR. Kříženci různých plemen nejsou uplatnitelní dale v chovu. V ČR konzumace koňského masa je velice nízká 0,4kg na obyvatele. Tak jaké uplatnění mají? Stejně jako stoupá každým rokem počet koní, tak stoupá zájem o rekreační ježdění. Člověk touží po návratu do přírody, po klidu a tichu. Agroturistické stáje tak nabývají uplatnění. Kříženci koní jsou podstatně levnější než-li koně s původem. Proto velká skupina rekreačních jezdců si vybere právě tyto koně. Křížením plemen přesto dopředu nebudeme vědět jaké vlastnosti budou u potomka převládat.

Tab. 1 Zastoupení plemenných hřebců figurujících u nepřívodových potomků

Plemeno hřebce	Počet ks
A1/1	3
APH	11
ČSP	4
ČT	3
HFLG	292
H	2
OR1/1	1
QH	20
SHG	6
SHP	1
NS	2
WPBR	4
WPC	1
BPP	514

Graf 1. Přehled plemenných hřebců vyskytujících se u potomstva BPP



Plemena matek

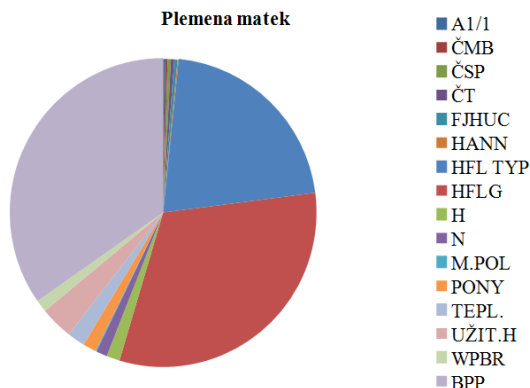
Koně BPP pochází nejvíce z matek ze skupiny samotné BPP celkem se 300 jedinci. Dále neméně početnou skupinou jsou plemenné klisny haflinga s 273 jedinci. Třetí významnou skupinou jsou matky pouze v typu haflinga s 184 potomky. Méně početné skupiny matek jsou jak uvádí tab. 2 dříve uznávané plemeno užitkový hucul, teplokrevný typ klisen, typ pony, hucul a WPBR. Investice do hříbat je ze strany matek obrovská, březost klisen trvá 333dní, dále období laktace je zpravidla 6 měsíců. Na tento problém s chovem koní bez plemenné příslušnosti se musíme dívat z chovatelské stránky jako neekonomický a ztrátový přínos pro chov koní v ČR. Na Slovensku je situace obdobná, ve chvíli kdy chovatelé v sousední zemi ztratili příspěvky na hříbata

čistokrevného chovu, tak chov na Slovensku má též na druhém místě v populace koní právě „křížence“.

Tab. 2 Plemena matek figurující u nepůvodových potomků

Plemeno matek	Počet ks
A1/1	2
ČMB	2
ČSP	3
ČT	3
FJHUC	3
HANN	1
HFL TYP	184
HFLG	273
H	12
N	10
M.POL	1
PONY	12
TEPL.	16
UŽIT.H	30
WPBR	11
BPP	300

Graf 2. Přehled chovných klisen vyskytujících se u potomstva BPP



V tabulce 3 je přehled nejčastějšího páření plemen, nejvíce potomků vzniklo pářením hřebců BPP a klisen BPP 274 potomků, dále páření těchto hřebců s klisnami plemene hafling dalo 163 jedinců, plemenní hřebci s klisnami v typu haflinga dali 94 potomků, a plemenní hřebci s chovnými klisnami zplodili 77 jedinců. Dále mezi nejpočetnější páření je v rámci hřebců BPP a klisen v typu haflinga s 64 potomky. Lze si položit dvě otázky: Chtějí chovatelé experimentovat nebo je poptávka po bez původových koní tak velká díky jejich nízké pořizovací ceně? Nebo chovatelé z nedbalosti připouští své klisny hřebci bez licence?

Tab. 3 Přehled páření plemen a počet vzniklých potomků

MENDELNET 2012

Plemeno otce	Ks	Plemeno/typ matky	Ks
A1/1	3	Hfl typ	2
		HFLG	1
APH	11	Hfl. typ	7
		HFLH	4
ČSP	4	Hfl. typ	1
		HFLG	3
HFLG	281	BPP	16
		A1/1	2
		ČMB	2
		ČSP	3
		ČT	3
		FJHUC	3
		HANN	1
		Hfl. TYP	94
		HFLG	77
		HUC	10
		ChD.TYP	8
		MPOL	1
		N	2
		PONY	11
		TEPL.TYP	14
		UŽIT.H	24
		WPBR	10
ČT	3	HAFL.TYP	1
		HFLG	2
H	2	HFL.TYP	1
		HFLG	1
N	1	HFLG	1
OR1/1	1	HFL.TYP	1
QH	20	HFL.TYP	9
		HFLG	11
SHAG	6	HFLG	6
SHP	1	HFLG	1
NS	1	HFL.TYP	1
WPBR	4	HFL.TYP	1
		HFLG	3
WPC	1	HFL.TYP	1
BPP	511	BPP	274
		HFL.TYP	64
		HFLG	163
		H	1
		TEPL.TYP	2
		UŽIT.H	6
		WPBR	1

V tabulce 4 je znázorněno procentuální zastoupení pohlaví, nejvíce je klisen 54%, valachů 26% a 20% populace je hřebců.

Tab. 4 Počet koní daného pohlaví

Hřebci	172
Klisy	467
Valaši	225

V tab. 5 se nachází vyhodnocení typu potomků vzniklém křížením hafliga s jinými plemeny I koňmi BPP. Nejpočetnější skupinou jsou koně v typu hafliga s 58,9% a koně bez označení 27,5% u kterých neznáme typ.

Tab. 5 typy koní vzniklé zkřížením hafliga

Bez označení	27,5%
Hfl.typ	58,9%
Chld.	0,4%
Pony	6,7%
Tepl	5,7%
Užit h	0,5%

Ročně přibývá počet připuštěných klisen, ale stejně tak počet narozených hříbat v typu hafliga, tato hříbata jsou zapsána jako koně BPP. Poslední sloupec v tabulce znázorňuje počet hříbat s oboustranným původem rodičů, ale nejsou zapsáni z určitých důvodů. Tato skupina také ročně přibývá.

Tab. 6 Přehled počtu připuštěných a narozených hříbat HF i hříbat BPP v typu hafliga

Rok	Počet připuštěných klisen	Počet narozených hříbat	Počet narozených hříbat v typu hfl	Počet narozených hříbat BPP s rodiči HF
2007	254	140	11	3
2008	250	140	23	9
2009	265	156	23	11
2010	271	129	32	17

Tabulka 6 ukazuje v posledních letech střídavý nárůst koní v typu hafliga, pro letošní rok 2012 lze usoudit nárůst hříbat v typu hafliga přes 60 jedinců. Data v tab.6 jsou poskytnuty ze statistiky na internetových stránkách svazu chovatelů hafliga.

Tab. 7 Počet narozených koní BPP křížených haflingem

Rok narození	Počet koní
1982 – 1990	8
1991 – 1995	46
1996 – 2000	146
2001	45
2002	72
2003	63
2004	68
2005	70
2006	67
2007	43
2008	61
2009	48
2010	66
2011	49

ZÁVĚR

Koně bez plemenné příslušnosti v typu haflinga ročně narůstají a ubývají tříleté a čtyřleté klisny zapsané do plemenné knihy. Klisny, které nebudou zapsány do plemenné knihy budou plodit opět koně bez plemenné příslušnosti v typu haflinga. Chov haflingů v České republice se dle našeho názoru na jedné straně velice zkvalitňuje, chov haflinga již směřuje ke sportovnímu využití. Na druhé straně však přibývá počet koní BPP v typu haflinga, což je nežádoucí.

Seznam použitých zkratk

A1/1 – anglický plnokrevník

APH – appaloosa

BPP – koně bez plemenné příslušnosti

ČSMB – českomoravský belgik

ČSP – český sportovní pony

ČT - český teplokrevník

HF, HFLG – hafling

H - hucul

Half. typ – kůň v typu haflinga

HANN – hanoverský kůň

M. Pol. – malopolský kůň

FJHUC – fjord s huculem (dříve plemeno)

OR 1/1 – arabský plnokrevník

SHP – Shetland pony

Tepl. Teplokrevník

Užit. H – užitkový hucul

NS – norik slezký

N – norik

QH – quarter horse

WPBR – welsh part-bred

WPC – welsh pony cob

LITERATURA

Bílek, F., 1955: *Plemena domácího koně*, s.11 - 211. In: Bílek, F., Ambrož, L., Blažek, K., Hartman, K., Keil, H., Král, E., Koubek, E., Lerche, F., Michal, V., Munk, Z., Müller, V., Pernička, J., Píša, A., Procházka, V., Příbyl, E., Richter, L., Řecka, J., Sejkova, J., Steinitz, J., *Speciální zootechnika*. 2. díl, chov koní. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 849 s.

Dušek, J. Misař, D., Müller, Z., Navrátil, N., Rajman, J., Tlušťhoř, V., a Žlumov, P., (2007): *Chov koní*. 2. vydání. Brázda, Praha, 404 s. ISBN 80-209-0352-6.

Edwards, E. H., (1998): *Obrázková encyklopedie koní*. 2. vydání. Cesty, Praha, 400 s. ISBN 80-7181-192-0.

Hermesen, J., (1999): *Encyklopedie koní*. Rebo Productions, Čestlice, 312 s. ISBN 80-85815-86-9.

Kapitzke, G. (2008): *Kůň od A do Z*. Brázda, Praha, 411 s. ISBN 978-80-209-0363-1.

Misař, D. a Jiskrová, I., (2008): *Chov a šlechtění koní*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 170 s. ISBN 978-80-7157-510-8.

Internetové zdroje

Svaz chovatelů haflinga. Databáze online [cit 2012-09-09] dostupné na <http://www.haflingove.cz/chov/statistiky.html>

CHECK HEREDITY OF EXTERIOR AND MECHANICS OF MOVEMENT OF THE CZECH WARM-BLOOD BASED ON RESULTS OF COLTS IN REARING FACILITIES FOR TESTING YOUNG HORSES

KONTROLA DĚDIČNOSTI EXTERIÉRU A MECHANIKY POHYBU NA ZÁKLADĚ HODNOCENÍ HŘEBEČKŮ ČESKÉHO TEPLOKREVNÍKA V TESTAČNÍCH ODCHOVNÁCH

Černohorská H., Jiskrová I., Sobotková E., Pišová M., Kost'uková M., Bihuncová I., Oravcová I.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xcernoh1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The objective of the study was to analyse stallion's influence on the evaluation of exterior and mechanics of movement of colts in rearing facilities for testing young horses (RFT). Groundwork data were obtained from the database of the Czech Warm-Blood Horse Breeders Association which contains data on the regular grading of the colts in the RFT facilities. Data from the year 2001 to 2011 from 7 RFT facilities for colts of the Czech warm-blood were entered in the basic database. Statistical processing of the database using the GLM method revealed that the sire had a statistically significant effect on the evaluation of exterior and mechanics of movement of colts. By multiple comparisons of the individual effects using the Tukey-B method we discovered statistically significant differences in evaluation of exterior and mechanics of movement of colts by the respective sire. Colts of the stallion Sahib Kubišta have statistically significant better mechanics of movement than colts of the stallions Ballast, Cartouche, Catango Z, Eibisch II, Federweisser, Fors-Gedos, Lancelot, Landino, Lantaan, Le Patron, Manillon Rouge, Oscar, Radegast. Colts of the stallions Fors-Gedos and Radegast have statistically significant better evaluation of exterior than colts of the stallions Veneur du Luc and Sahib Kubišta.

Key words: Czech warm-blood, horses, rearing facilities for testing young horses, exterior, mechanics of movement

Acknowledgments: This study was funded by the project of the Internal grant agency TP 1/2012 Faculty of Agronomy Mendel University in Brno.

ÚVOD

Ve státech Evropy, které mají tradici a dlouholeté úspěchy v chovu teplokrevných koní jsou běžné různé formy testování mladých koní. Jedním z cílů tohoto testování je získat data pro vyhodnocení genetické úrovně populace, dále kontroly dědičnosti a stanovení plemenné hodnoty jejich rodičů (zejména hřebců využitých ve větším měřítku v plemenitbě) a v neposlední řadě výběr talentovaných jedinců pro sport (BRUNS et al., 2001). Plemenná hodnota jedince a genetická úroveň populace v závislosti na čase představuje genetický pokrok populace (PŘIBYL, 2008). Plemenná hodnota (PH) je relativní číslo, které se vztahuje k populaci, ve které byla odhadnutá. Odhad PH vychází z testování a kontroly výkonnosti (JISKROVÁ, 2009). Na základě selekce je dosahováno genetického pokroku, důsledkem kterého se plemeno vyvíjí a zvyšuje se jeho průměrná genetická úroveň. Autor KOENEN et al. (2004) uvádí, že výsledky hodnocení mladých koní (hodnocení v testačních odchovných, výsledky kritéria mladých koní, základní zkoušky výkonnosti klisen a hřebců) jsou ve vysoké korelaci (0,7 až 0,9) s pozdějšími výsledky koní na závodech.

Nejrozšířenějším plemenem v České republice je český teplokrevník. Tvoří 28 % z celkového počtu koní chovaných v České republice (MISAŘ, 2011). Současný trend využití koní českého teplokrevníka v jezdeckém sportu přináší zvýšené nároky na kvalitu produkovaných koní. Zákon č. 154/2000 Sb. O šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (plemenářský zákon) ve znění pozdějších předpisů a jeho změny, vyplývající ze zákona č. 130/2006 Sb. je právním základem pro plemenitbu koní v České republice. Svaz chovatelů českého teplokrevníka vede plemenitbu tak, aby produkoval vynikající jedince se skokovým, případně drezurními předpoklady. Nosným pilířem genetického pokroku ve výkonnosti českého teplokrevníka jsou genetické informace a fenotypové projevy výkonnosti potomstva po hřebcích, kteří jsou zařazeni v chovu českého teplokrevníka (ZURAVCOVÁ, 2009). Selektce se provádí na základě výsledků hodnocení jedince a jeho potomstva (ŠAROVSKÁ, 2010). Hřebečci a hřebci jsou selektováni: při registraci hříbat, při výběru do testační odchovny, při bonitacích v testačních odchovných, při základních zkouškách výkonnosti, při 100 denním testu, při udělování výběru do plemenitby, na základě informací o potomstvu. Pro správnou selekci je důležité mimo jiného i znalost koeficientu dědivosti (heritability) vlastností jako jsou exteriér, mechanika pohybu, skokové schopnosti, které determinují hodnotu zvířat (ZURAVCOVÁ, 2009). Dušek (2007) uvádí, že střední dědivost má mechanika pohybu (h^2 v rozmezí 0,5 až 0,6), exteriér má nižší dědivost (h^2 okolo 0,30).

Vybrání hřebečci českého teplokrevníka jsou testováni od odstavu do absolvování základních zkoušek výkonnosti hřebců v testačních odchovných. Provoz v testačních odchovných se řídí provozním řádem schváleným svazem chovatelů českého teplokrevníka. Testační odchovny slouží

k několika účelům: jedním z nejdůležitějších účelů je poskytnout kompletní data hodnocených hřebečků a na základě výsledků hodnocení hřebečků kontrolu dědičnosti jejich rodičů, dalším účelem je výběr talentovaných jedinců s předpoklady pro využití v jezdeckém sportu (Ročenka SCHČT, 2010).

Cílem práce bylo posoudit na základě výsledků z testačních odchoven českého teplokrevníka vliv otce na hodnocení exteriéru a mechaniky pohybu jeho potomstva. Dále statistickou metodou vyhodnotit, zda jsou průkazné rozdíly v hodnocení potomstva po jednotlivých otcích.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo Podkladová databáze byla vytvořena na základě výsledků testace hřebečků v testačních odchovnách ve spolupráci s Ústřední evidencí koní ve Slatiňanech. Do databáze byly zahrnuty data z těchto testačních odchoven: Horní Město, Luka – Týn, ZH Tlumačov, ŠCHK Měnik Kubišta, ZH Písek, Hřebčín Suchá, Železnice. Vlastní hodnocení hřebečků provádí tříletná hodnotitelská komise složená ze zástupce chovatelské sekce předsednictva Svazu chovatelů českého teplokrevníka, konzulenta příslušné oblasti a jednoho člena Rady plemenné knihy.

Podkladová data zahrnují výsledky z pravidelných jarních a podzimních třídění hřebečků v testačních odchovnách v letech 2001 až 2011. Zpracovány a hodnoceny byly pouze výsledky koní, kteří absolvovali celou testaci. Z databáze byla vyřazena data hřebečků, která nebyla kompletní (z důvodu úhynu hřebečka v průběhu testace nebo vyřazení hřebečka z testace rozhodnutím hodnotitelské komise).

U každého z testovaných hřebečků je v databázi uvedeno jméno, rok narození, identifikační číslo, životní číslo, jméno otce, jméno matky, jméno otce matky, majitel hřebečka, testační odchovna a tělesné míry (obvod holeně, obvod hrudníku, kohoutková výška hůlková, kohoutková výška pásková) a známky za exteriér, mechaniku pohybu a růstový standard. Exteriér a mechanika pohybu se hodnotí známkami 1-5, růstový standard známkou -2 až +2. Tělesné míry jsou uváděny v centimetrech. Jednotlivá měření hřebečků probíhala ve věku 6, 12, 18, 24, 30, 36 měsíců a dále jsou rozlišena indexy 1 až 6.

Bylo provedeno základní statistické zpracování souboru, byla stanovena směrodatná odchylka a průměrné hodnoty sledovaných charakteristik: exteriéru a mechaniky pohybu. Dále byla provedena analýza rozptylu metodou GLM a následné testování pro faktory testační odchovna, rok konání třídění hřebečků v testační odchovně a otec podle modelové rovnice:

$y_{ijkl} = \mu + p_i + s_j + y_k + e_{ijkl}$, kde:

μ □ = obecná střední hodnota

s_i = efekt i-té odchovny ($i = 1, \dots, 7$)

y_j = efekt k-tého roku konání ($j = 1, \dots, 11$)

p_k = efekt j-tého otce ($k = 1, \dots, 37$)

e_{ijkl} = reziduum

U statisticky průkazných výsledků bylo provedeno mnohonásobné porovnání jednotlivých efektů metodou Tukey – B, přičemž jsme se zaměřili na porovnání otců hřebečků. Efekt testační odchovny a roku konání jsme do modelové rovnice zařadili, aby byl vyloučen jejich vliv. Pro zpracování databáze a statistické vyhodnocení byly použity programy Excel a Unistat, verze 5,1.

VÝSLEDKY A DISKUZE

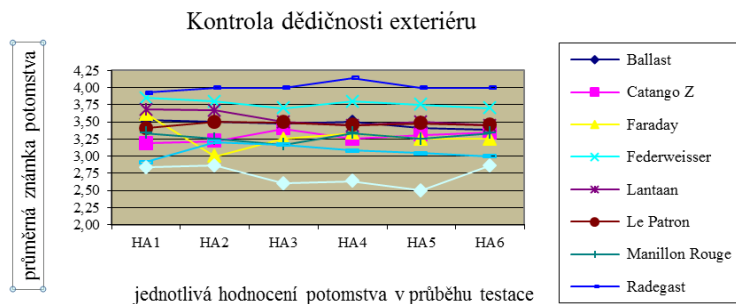
Podkladová databáze obsahovala údaje od roku 2001 do roku 2011 z celkem sedmi testačních odchoven: TO Albertovec, TO Železnice, TO Tlumačov, TO Kubišta, TO Horní město, TO Luka – Týn, TO Suchá. Do podkladové databáze byli zařazeni pouze hřebečci s kompletními daty. Podkladová databáze obsahovala údaje z jednotlivých třídění 215 hřebečků po 37 různých hřebečích, celkem tedy 9 030 údajů. Na základě podkladové databáze byli vyhodnoceni hřebečci, kteří měli v podkladové databázi 3 a více hřebečků s kompletními údaji. V tabulce č. 1 jsou uvedeny počty vyhodnocených hřebečků po jednotlivých otcích. Nejvyšší počet hřebečků s kompletními údaji je po hřebečích Ballast, Catango Z a Rock'n Roll.

Tab.1 Početní zastoupení hřebečků po jednotlivých hřebečích zařazených do databáze

jméno hřebece	počet potomků	jméno hřebece	počet potomků
Ballast	18	Landino	5
Carismo	4	Lantaan	9
Cartouche	3	Le Patron	11
Catango Z	16	Lordano	4
Dantes	5	Manillon Rouge	6
Eibisch II	4	Oscar	4
Faraday	6	Radegast	7
Federweisser	10	Rock'n Roll	12
Fors-Gedos	5	Sahib Kubišta	11
Lancelot	3	Veneur du Luc	3

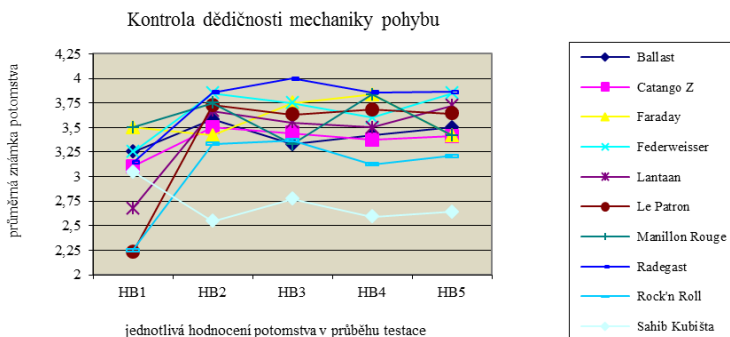
Graf č. 1 zachycuje hodnocení exteriéru hřebečků po jednotlivých otcích v průběhu celé testace. Znázorněno je potomstvo po deseti hřebečích s nejvyšším počtem hodnocených potomků. Z grafu je patrné, že potomstvo po hřebeči Sahib Kubišta je hodnoceno nejnižší známkou za exteriér – v průběhu testace v rozmezí 2,5 až 2,8. Oproti tomu potomstvo po hřebečích Ballast a Federweisser je hodnoceno nadprůměrnou známkou za exteriér – v průběhu testace v rozmezí 3,75 až 4,15. Zajímavý průběh vývoje exteriéru je zaznamenán u potomstva po hřebeči Faraday, kdy je potomstvo na začátku testace hodnoceno průměrnou známkou 3,6, ale v dalších obdobích dochází ke zhoršení exteriéru a potomstvo je hodnoceno průměrnou známkou 3,0. Obecně lze konstatovat, že u potomstva po ostatních hřebečích je vývoj exteriéru plynulý a nedochází k větším výkyvům v hodnocení.

Graf. 1 – Kontrola dědičnosti exteriéru



Graf č. 2 znázorňuje zachycuje hodnocení mechaniky pohybu hřebečků po jednotlivých otčích v průběhu celé testace. Znázorněno je potomstvo po deseti hřebečích s nejvyšším počtem hodnocených potomků. Z grafu je patrné, že potomstvo po hřebeči Sahib Kubišta je na začátku testace hodnoceno průměrnou známkou 3,15 za mechaniku pohybu, ale v průběhu testace se hodnocení mechaniky pohybu výrazně horší a potomstvo je hodnoceno v rozmezí 2,5 až 2,75. Oproti tomu potomstvo po hřebeči Ballast je na začátku testace hodnoceno stejně jako potomstvo po hřebeči Sahib Kubišta – známka 3,15, ale v průběhu testace se hodnocení mechaniky pohybu výrazně lepší s průměrnými známkami 3,8 až 4,0. Hodnocení mechaniky pohybu u hřebečků v testaci se s rostoucím věkem zlepšuje, pouze u potomstva po hřebeči Sahib Kubišta se hodnocení se zvyšujícím se věkem zhoršuje.

Graf. 2 – Kontrola dědičnosti mechaniky pohybu



Statistickým zpracováním databáze byl zjišťován vliv otce na hodnocení exteriéru (průběžné hodnocení HA1 až HA5) a mechaniky pohybu (průběžné hodnocení HB1 až HB5) potomstva. Analýza metodou GLM zjistila statisticky průkazný vliv otce na exteriér (u průběžného hodnocení HA1, HA2, HA4) a mechaniku pohybu (průběžné hodnocení HB1, HB2, HB4) u potomstva. Mnohonásobným porovnáváním jednotlivých efektů metodou Tukey-B byly zjišťovány statisticky průkazné rozdíly v hodnocení exteriéru a mechaniky pohybu potomstva po jednotlivých hřebcích.

V tabulkách číslo 2, 3, 4 jsou uvedeny výsledky analýzy metodou GLM, kde byl zjišťován statisticky průkazný vliv efektu otce na exteriér hřebečků. Z tabulky je patrné, že potomstvo po hřebci Sahib Kubišta je s průkazně horším exteriérem než potomstvo po hřebci Fors-Gedos, Radegast a Federweisser a Ballast. Potomstvo po hřebci Radegast je s průkazně lepším exteriérem než potomstvo po hřebci Veneur du Luc, Sahib Kubišta, Carismo, Dantes a Rock'n Roll. Hřebce Sahib Kubišta lze podle statistického zpracování dat označit za zhoršovatele exteriéru, protože jeho potomstvo je s průkazně horším exteriérem než potomstvo po ostatních hřebcích. Hřebce Radegast lze podle statistického zpracování označit za zlepšovatele exteriéru, protože jeho potomstvo je s průkazně lepším exteriérem než potomstvo po ostatních hřebcích.

Tab. 2 - Vliv efektu otce na exteriér ve sledovaných obdobích – první třídění

HA1		hřelec	průměr*
hřelec	průměr*	Sahib Kubišta	2,84
Fors-Gedos	4,20	*	

Tab. 3 - Vliv efektu otce na exteriér ve sledovaných obdobích – druhé třídění

HA2		hřelec	průměr*	hřelec	průměr*
hřelec	průměr*	Veneur du Luc	2,33	Sahib Kubišta	2,86
Fors-Gedos	4,20	*			
Radegast	4,00	*		*	

Tab. 4 - Vliv efektu otce na exteriér ve sledovaných obdobích – čtvrté třídění

HA4		hřelec	průměr*	hřelec	průměr*	hřelec	průměr*
hřelec	průměr*	Radegast	4,14	Federweisser	3,80	Ballast	3,50
Sahib Kubišta	2,64	*		*		*	
Carismo	2,75	*					
Dantes	2,80	*					
Rock'n Roll	3,08	*					

V tabulkách číslo 5, 6, 7 jsou uvedeny výsledky analýzy metodou GLM, kde byl zjišťován statisticky průkazný vliv efektu otce na hodnocení mechaniky pohybu hřebečků. Z tabulky je patrné, že potomstvo po hřebcích Ballast a Faraday má prokazatelně lepší mechaniku pohybu než

potomstvo po hřebcích Dantes a Federweisser. Potomstvo po hřebci Sahib Kubišta má průkazně horší mechaniku pohybu než potomstvo po hřebcích Catango Z, Ballast, Lantaan, Le Patron, Manillon Rouge, Federweisser, Radegast, Fors-Gedos, Ebisch II, Lancelot, Landino, Oscar, Cartouche, Le Patron, Fors-Gedos, Lordano, Faraday a Oscar. Hřebce Sahib Kubišta lze tedy podle výsledků statistického zpracování databáze označit za zhoršovatele mechaniky pohybu, protože jeho potomstvo je s průkazně horší mechanikou pohybu než potomstvo po ostatních hřebcích. Ze statistického zpracování nevypívá žádný hřelec – zlepšovatel, který by dával průkazně lepší potomstvo s mechanikou pohybu než ostatní hřebci.

Tab. 5 - Vliv efektu otce na mechaniku pohybu ve sledovaných obdobích – první třídění

HB1		hřelec	průměr*	hřelec	průměr*
hřelec	průměr*	Dantes	2,23	Federweisser	2,25
Faraday	3,50	*		*	
Ballast	3,25	*		*	

Tab. 6 - Vliv efektu otce na mechaniku pohybu ve sledovaných obdobích – druhé třídění

HB2		hřelec	průměr*
hřelec	průměr*	Sahib Kubišta	2,55
Catango Z	3,50	*	
Ballast	3,58	*	
Lantaan	3,67	*	
Le Patron	3,73	*	
Manillon Rouge	3,75	*	
Federweisser	3,85	*	
Radegast	3,86	*	
Fors-Gedos	3,90	*	
Eibisch II	4,00	*	
Lancelot	4,00	*	
Landino	4,00	*	
Oscar	4,00	*	
Cartouche	4,17	*	

Tab. 7 - Vliv efektu otce na mechaniku pohybu ve sledovaných obdobích – čtvrté třídění

HB4		hřebec	průměr*
hřebec	průměr*	Sahib Kubišta	2,59
Catango Z	3,38	*	
Ballast	3,42	*	
Lantaan	3,50	*	
Federweisser	3,60	*	
Le Patron	3,68	*	
Fors-Gedos	3,70	*	
Eibisch II	3,75	*	
Lordano	3,75	*	
Faraday	3,83	*	
Manillon Rouge	3,83	*	
Radegast	3,86	*	
Oscar	4,13	*	

Ze statistického zpracování dat vyplývá, že potomstvo po Sahib Kubišta je prokazatelně hůře hodnoceno jak v exteriéru, tak v mechanice pohybu než ostatní hřebci. Širší použití tohoto hřebce v plemenitbě českého teplokrevníka je tedy nevhodné. Potomstvo po hřebci Dantes má horší exteriér než potomstvo po hřebci Radegast a zároveň horší mechaniku pohybu než potomstvo po hřebcích Faraday a Ballast. Široké využití tohoto hřebce v plemenitbě českého teplokrevníka je taktéž nevhodné. Potomstvo po hřebci Radegast je s průkazně lepším exteriérem než potomstvo po ostatních hřebcích – tento hřebec by mohl být využíván při konsolidaci exteriéru českého teplokrevníka především na klisny s průměrným popřípadě horším exteriérem.

ZÁVĚR

Podkladová databáze obsahovala údaje od roku 2001 do roku 2011 z celkem sedmi testačních odchoven: TO Albertovec, TO Železnice, TO Tlumačov, TO Kubišta, TO Horní město, TO Luka – Týn, TO Suchá. Analýzou metodou GLM byl zjištěn statisticky průkazný vliv otce na hodnocení exteriéru a mechaniky pohybu potomstva. Mnohonásobným porovnáním jednotlivých efektů metodou Tukey-B byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly v hodnotách exteriéru a mechaniky pohybu hřebečků po jednotlivých otcích.

Ze statistického zpracování dat vyplývá, že potomstvo po Sahib Kubišta je prokazatelně hůře hodnoceno jak v exteriéru, tak v mechanice pohybu než ostatní hřebci. Širší použití tohoto hřebce v plemenitbě českého teplokrevníka je tedy nevhodné. Potomstvo po hřebci Dantes má horší exteriér než potomstvo po hřebci Radegast a zároveň horší mechaniku pohybu než potomstvo po

hřebcích Faraday a Ballast. Širší využití tohoto hřebce v plemenitbě českého teplokrevníka je taktéž nevhodné. Potomstvo po hřebci Radegast je s průkazně lepším exteriérem než potomstvo po ostatních hřebcích – tento hřebec by mohl být využíván při konsolidaci exteriéru českého teplokrevníka především na klisny s průměrným popřípadě podprůměrným exteriérem.

Dynamika vývoje exteriéru a mechaniky pohybu hřebečků po jednotlivých hřebcích je rozdílná. U potomstva po většině hřebců dochází ke zlepšení mechaniky pohybu s věkem, pouze u potomstva po hřebci Sahib Kubišta dochází s věkem ke zhoršení hodnocení mechaniky pohybu. U hodnocení exteriéru potomstva po jednotlivých hřebcích nebyla zaznamenána vzestupná tendence s věkem.

LITERATURA

Bruns E. et al. (2001): Interstallion—a cross-country evaluation of testing methods and data availability/suitability. 52nd Ann. Meet. EAAP, Budapest, Hungary.

Dušek J. (eds.) (2007): Chov koní. Ed. Brázda, Praha, CZ. ISBN 80-209-0352-6

Dušek J. (1981): Koefficienty dědivosti exteriéru a výkonnosti koní. Pages 1-86 in Stud. inform., Živoč. Výr., No.3. UVTIZ, Praha, CZ.

Jiskrová I. (2009): Možnosti využití odhadu plemenné hodnoty metodou BLUP Animal model ve šlechtění českého teplokrevníka. Pages 149 – 151 in Acta fytotechnica et zootechnica. Mimoriadne číslo, No. 12.

Jiskrová I., Misař D. (1997): Effect of selected factors on sports performance on the Czech Warmblood horse. Pages 417 – 425 in Czech J. Animal Science, Vol. 42, No. 9.

Klement J. (1966): Růst a výkonnost A1/1 koní. Pages 78-91 in Věd. práce VSCHK Slatiňany, CZ.

Koenen E.P.C. et al. (2004): An overview of breeding objectives for warmblood sport horses. Livest. Prod. Sci., 88 (2004), pp. 77–84.

Maršálek M. (2000): Hodnocení teplokrevných hřebců podle výkonnosti jejich potomstva. Pages 91-98 In Collection of Scientific Papers, Series for Animal Sciences. Agronomická fakulta v Českých Budějovicích, CZ.

Maršálek M., Zedníková J. (2001): Možnosti hodnocení teplokrevných hřebců podle výkonnosti jejich potomstva. Pages 14 – 14 in Koně. Vol. 5, No. 1. CZ.

Misař D. (2011): Vývoj chovu koní v Čechách, na Moravě a na Slovensku. Ed. Brázda, s.r.o., 296 p ISBN 978-80-209-0383-9

Příbyl J. (2008): Šlechtění v globalizujícím světě. Pages 12 – 14 in Aktuální problémy chovu a šlechtění koní v ČR, Brno, CZ. ISBN 978-80-7375-241-5

Řád plemenné knihy českého teplokrevníka, Ročenka SCHČT. Svaz chovatelů českého teplokrevníka, Písek. CZ.

Šarovská L. (2010): Zhodnocení zkušebního systému u mladých koní sportovních plemen v ČR. Doktorská disertační práce. Mendelova univerzita v Brně. Brno, CZ.

Zuravcová B. (2009): Odhad plemenných hodnot parkúrových koní metodou Blup-animal model . Doktorská disertační práce. Mendelova univerzita v Brně. Brno, CZ.

THE EFFECT OF GRADED LEVEL EXTRUDED FULL-FAT SOYBEAN IN DIETS FOR BROILER ON APPARENT ILEAL AMINO ACIDS DIGESTIBILITY

VLIV VZRŮSTAJÍCÍ HLADINY EXTRUDOVANÉ PLNOTUČNÉ SÓJE V KRMNÉ SMĚSI PRO KUŘATA NA ZDÁNLIVOU ILEÁLNÍ STAVITELNOST AMINOKYSELIN

Foltyn M., Rada V., Lichovníková M.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: marian.foltyn@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the influence of different content of extruded full-fat soybean (EFFSB) in the diets for broilers on apparent ileal amino acids digestibility (AIAAD). In the experiment total 260 ROSS 308 female chickens were used. Five dietary treatments were used; Control group (without EFFSB) and groups containing 4%, 8%, 12% and 16% of EFFSB. The experiment lasted from 10th to 38th day of age. The addition of EFFSB to the diets for broilers decreased body weight and worsened feed efficiency ratio. AIAAD was lower when diet contained more than 4% of full-fat soybean. The AIAAD was higher in E16 in comparison with E8 and E12 due to higher weight of pancreas and higher trypsin activity.

Key words: trypsin inhibitors, broiler

Acknowledgments: We thank for financial support IGA TP 1/2012 AF MENDELU

INTRODUCTION

Soybeans and soybeans products are the most important sources of protein and energy in livestock feeds for many animals. Soybeans have a good amino acids profile, with high content of lysine, tryptophan, isoleucine, valine and threonine (Larbier and Leclercq, 1994). In addition soybeans contain from 18 to 22% of oil with good quality mainly with high content of linoleic acids (Waldroup, 1982). Soybeans are used mainly as a source of oil for human consumption but thanks breeding there are more resistant varieties, which can be grown in colder climatic conditions and the area of soybeans grows. In general, full-fat soybeans may be not only good sources of protein but also of energy and it can replace soybean meal in swine and poultry diets with similar anticipated performance. However raw soybeans contain a number of antinutritional factors.

The most problematic are Bowman-Birker or Kunitz trypsin inhibitors (TI) and lectin. Other antinutritional factors are antivitamin, saponins, tanins, non starch oligosaccharides and polysaccharides and phytate (Dourado et al., 2011). These antinutrition factors depress the food intake, growth performance and digestibility of nutrients (Liener, 1994; Perilla et al., 1997; Palacios et al., 2004; Valencia et al., 2009). The growth depression, observed when TIs are ingested, may be a combined effect of endogenous loss of essential amino acids and decreased intestinal proteolysis (Clarke and Wiseman, 2007). The TI and urease activity (UA) are correlated to body weight and feed conversion ratio (Ruiz et al., 2004). The level of 4 mg/g TI activity is assumed to have a minimum adverse effect in birds although the basis for such recommendation is questionable (Clarke and Wiseman, 2007). One of the ways how to eliminate the antinutritional factors and improve nutritional value of raw soybeans is heating treatment (Qin et al., 1996; Machado et al., 2008). Extrusion as a form of heating treatment inactivates TI and denatures it as native proteins (Perilla et al., 1997).

MATERIAL AND METHODS

Birds Management and Diets

In total of 260 female chickens ROSS 308 were housed in two-floor cage technology. Each chicken had wing mark. Housing was provided according to technology guide for ROSS 308. Chickens were fed by commercial diet from 1 to 10 days of age. Ten day of age all chickens were weighed and divided into 5 groups with the same average weight. Broilers were fed by diets with different contents of soybean meal (SBM), EFFSB and soybean oil. Thirteen chickens were kept in each cage and 4 cages were used for each treatment. Chickens in the group 1 were fed by control diet (C – without EFFSB) and groups E4, E8, E12 and E16 were fed by diets with 4, 8, 12 and 16% of EFFSB respectively. Composition of diets is shown in Table 1. The content of TI in the soybean meal and EFFSB was expressed as amount of trypsin inhibited by one gram of the sample (SBM or

EFFSB) and the amount was 6.7 mg and 8.4 mg respectively. The diets were formulated to have similar energy (12 MJ AMEn/kg) and protein (21.5% CP) contents. Feed and water were available ad libitum. All birds were weighed individually from the start to the end of the experiment in regular one week period. Feed consumed per each cage was recorded; the dead chickens were weighed to calculate feed efficiency.

Table 1. Composition of the experimental diets (%)

Ingredient	Control diets	Experimental diets			
		E4	E8	E12	E16
Wheat	39.08	39.08	39.08	39.08	39.08
Corn	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Soybean meal	27.30	24.02	20.74	17.46	14.18
Extruded full fat soybean	0.00	4.00	8.00	12.00	16.00
Soybean oil	4.50	3.78	3.06	2.34	1.62

Complex of minerals and vitamins

4.12 4.12 4.12 4.12 4.12

* One kilogram of premix contained : Vit. A: 250 000 m.j. , Vit. D3: 40 000 m.j. ; Vit. E (alfa tokoferol): 700 mg; Vit. K3: 30 mg; Vit. B1: 30 mg; Vit. B2: 60 mg; Vit. B6: 25 mg; Vit. B12: 0,2 mg; Niacinamid: 210 mg; Cholin chloride: 6 200 mg; DL-methionin: 20 g; L-lysine: 14 g; Ca: 200 g; P: 48 g; Na: 15 g; Fe: 880 mg; Cu: 100 mg; Zn: 740 mg; Mn: 1 240 mg; Co: 4,5 mg; I: 5 mg; Se: 1,4 mg

Amino Acids and Fat Digestibility

This experiment was conducted to determine the ileal amino acids digestibility of diets with improving content of EFFSB. At 38 d, birds were killed by decapitation and dissected in order to obtain the digesta content of ileum (section between Meckel's diverticulum and the 4 cm from ileocecal junction). Digesta collected from each bird was stored at -30 °C (one sample – five chickens). Samples were lyophilized, ground and analyzed for amino acids, dry matter and insoluble ash in 4 mol.l-1 HCl, which was used as indicator. The samples of the feed and ileal digesta were treated by oxidative acid hydrolysis HCl (c= 6 mol.l-1). The chromatographic analysis of the hydrolysate samples was performed in the analyser AAA 400 (f. Ingos, Prague) using Na-citrate buffers and ninhydrin detection to find the amounts of certain amino acids. The content of fat in the diets and excreta was determined according to Soxhlet. Apparent ileal amino acids digestibility (fat digestibility) was calculated with the following formula:

$$AIAAD = 100 - (100 \times Id \times AAdc / Idc \times AAd) (\%)$$

Apparent ileal amino acid digestibility (AIAAD), content of indicator in the diet (Id), content of amino acid in the digesta (AAdc), content of indicator in the digesta (Idc), content of amino acid in the diet (AAd).

Data obtained from these experiments were analyzed using the single factor analysis of variation. Apparent ileal amino acid and fat digestibility the Kruskal-Wallis analysis was used using the software package Unistat 5.1 (UNISTAT Ltd, ENGLAND).

RESULTS AND DISCUSSION

Coefficients of apparent ileal amino acids digestibility are shown in Table 2. The effect of feeding EFFSB on AIAAD for each amino acid was expressed by polynomial function (Figure 1): $y = ax^2 + bx + c$, where a, b, c are parameters of the polynomial function, x is level of EFFSB and y is coefficient of digestibility.

Table 2. Coefficients of apparent ileal amino acid digestibility

	C	E4	E8	E12	E16
Lysine	0.803 ^b	0.813 ^a	0.748 ^b	0.750 ^b	0.740 ^b
Methionine	0.841 ^a	0.878 ^a	0.858 ^a	0.859 ^a	0.866 ^a
Threonine	0.696 ^{a,c}	0.718 ^a	0.519 ^b	0.532 ^b	0.598 ^{b,c}
Isoleucine	0.734 ^a	0.721 ^a	0.517 ^b	0.554 ^b	0.603 ^b
Leucine	0.758 ^a	0.751 ^a	0.583 ^b	0.614 ^b	0.660 ^b
Fenylalanine	0.760 ^a	0.757 ^a	0.664 ^b	0.663 ^b	0.699 ^{a,b}
Histidine	0.717 ^a	0.661 ^{a,c}	0.483 ^b	0.493 ^b	0.604 ^{b,c}
Arginine	0.826 ^a	0.794 ^{a,c}	0.661 ^b	0.705 ^b	0.753 ^{b,c}
Fat digestibility	0.873 ^a	0.873 ^a	0.855 ^{ab}	0.799 ^b	0.823 ^{ab}

Different superscripts (a, b) indicate statistical significant difference between groups (P<0.05)

The AIAAD decreased with increasing level of EFFSB in the diets. Only in methionine there was not significant effect of EFFSB on AIAAD. There were significantly (P<0.05) lower AIAAD in groups E8 and E12 in comparison with C and E4 for Thr, Ile, Leu, Phe, His, Arg and Lys and also weight of these chickens was negatively affected by EFFSB. For all amino acids except methionine the AIAAD was no significantly higher in E16 in comparison with E12 (E8). The fat digestibility slightly decreased with increased level of EFFSB.)

Clarke and Wiseman (2007) noted wide variability between coefficients of digestibility for individual amino acids depending of the samples (e.g. lysine from 0.75 to 0.88 for SBM and from 0.77 to 0.84 for FFSB) but they did not find correlation with TI levels, indicating other factors also affect amino acid digestibility of FFSB and SBM. This hypothesis indicates also Batal and Parsons (2003). In their study AA digestibility values of the Williams 82 soybeans, Kunitz-free soybeans, and lectin-free soybeans diets were much lower than those for the SBM diet. Positive effect of extrusion on amino acid digestibility observed Ruitz et al. (2004). As temperature increased during

wet-extrusion, the digestible amino acid coefficients increased, indicating the gradual destruction of TI and other antinutritional factors that may affect amino acid absorption. Amino acid digestibility coefficients for lecithin free soybean tended to be consistently higher than for conventional soybean but the differences were not significant (Michele et al., 1999).

CONCLUSION

The present study has shown that the addition of EFFSB to the diet for broilers to 12% had not significant negative effect on the growth but the feed conversion ratio was slightly impaired, when more than 4% of EFFSB was used.

REFERENCES

- Batal, A. B., Parsons, C. M. (2003): Utilization of Different Soy Products as Affected by Age in Chicks, *Poultry Science*, Volume 82: 454–462
- Clarke, E., Wiseman, J. (2007): Effects of extrusion conditions on trypsin inhibitor activity of full fat soybeans and subsequent effects on their nutritional value for young broilers. *British Poultry Science*, 48: 703-712
- Larbier, M., Leclercq, B. (1994): *Nutrition and Feeding of Poultry*. Nottingham University Press, 300 p.
- Liener, I. E. (1994): Implications of antinutritional components in soybean foods. *Food Science and Nutrition*, 34: 31-67
- Machado, F. P. P., Queiroz, J. H., Oliveira, M. G. A., Piovesan, N. D., Peluzio, M. C. G., Costa, N. M. B., Moreira, M. A. (2008): Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chemistry*, 107: 649–655
- Michele, W. D., Parson, C. M., Hymowitz, T. (1999): Nutritional Evaluation of Lectin-Free Soybeans for Poultry. *Poultry Science*, 78: 91–95
- Dourado, L. R. B., Pascoal, L. A. F., Sakomura, N. K., Costa, F. G. P., Biagiotti, D. (2011): Soybeans (*Glycine max*) and Soybean Products in Poultry and Swine Nutrition. p. 175 – 190. In Krezhova, D., *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. Hardcover, 2011, p. 536, ISBN 978-953-307-533-4
- Valencia, D.G., Serrano, M.R., Lazaro, R., Jiménez-Moreno, E., Mateos, G. G. (2009): Influence of micronization (fine grinding) of soya bean meal and full-fat soya bean on the ileal digestibility of amino acids for broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 238-248
- Palacios, M. F., Easter, R. A., Soltwedel, K. T., Parsons, C. M., Douglas, M. W., Hymowitz, T., Pettigrew, J. E. (2004): Effect of soybean variety and processing on growth performance of young chicks and pigs. *Journal of Animal Science*, 82: 1108–1114
- Perilla, N.S., Cruz, M.P., De Belalcazar, F., Diaz, G. J. (1997): Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybeans for broiler chickens. *British Poultry Science*, 38: 412-416

Qin, G., ter Elst, E. R., Bosch, M. W., van der Poe, A.F.B. (1996): Thermal processing of whole soya beans: Studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. *Animal Feed Science Technology*, 57: 313-324

Ruiz, N., de Belalcázar, F., Díaz, G. J.(2004): Quality Control Parameters for Commercial Full-Fat Soybeans Processed by Two Different Methods and Fed to Broilers. *J. Appl. Poult. Res.*, 13: 443–450

Waldroup, P. W. (1982): Whole Soybeans for Poultry Feeds. *World's Poultry Science Journal*, 38: 28 – 35.

COMPARISON OF TOTAL PROTEIN IN SERUM OF COWS IN TERMS OF AGE AND PERIOD OF GESTATION

POROVNÁNÍ CELKOVÉHO PROTEINU V SÉRU KRAV Z HLEDISKA
VĚKU A OBDOBÍ GRAVIDITY

Fröhdeová M., Mlejnová V., Lukešová K., Doležal P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: MartinaFrohdeova@seznam.cz

ABSTRACT

The present work was processed on the farm located in the Pardubice region. By tracking was involved 14 cows of Czech Pied cattle. Was evaluated in serum total protein in terms of age and time of blood collection. To obtain cows blood collection was performed from v coccygea.

In an experiment with 14 dairy cows of Czech red-spotted cattle we observed in serum total protein before and after birth. At the first sampling conducted an average of 23 days before parturition in heifers were the mean values of serum total protein $70.01 \pm 5.12 \text{ g.l}^{-1}$ and cows $74.95 \pm 4.14 \text{ g.l}^{-1}$. At the second sampling performed after delivery were heifers value of $72.01 \pm 4.14 \text{ g.l}^{-1}$ and cows $74.78 \pm 3.19 \text{ g.l}^{-1}$. The results were statistically analyzed using Microsoft Excel and Statistica.

Key words: Red-spotted cattle, total protein, blood serum, calves

Acknowledgments: This project was supported by IGA MENDELU BRNO No: IP 20/2012

ÚVOD

Během peripartálního období jsou dojnice vnímavé ke zvýšení výskytu a závažnosti onemocnění, což je následek kolísání imunitních mechanismů. Zdravotní poruchy vyskytující se v tomto období mají velký dopad na produkční výkonnost dojnic v nastupující laktaci (Kováč a kolektiv, 2012). Je zřejmé, že limitujícím faktorem produkce a reprodukce se stane zdraví chovaných vysokoužitkových dojnic, zejména v jejich peripartálním období (Skřivánek a kolektiv, 2002). Tato práce byla zpracována pro zmapování vývoje hladiny celkového proteinu jako ukazatele zdravotního stavu v peripartálním období.

Mnohé aspekty vrozené a získané imunity skotu jsou horší než optimální během různých období laktačního cyklu, zejména okolo porodu. Zvláště se zřetelem na tři týdny před porodem bylo zjištěno, že jde o období, kdy obranné mechanismy jsou výrazně ovlivněny. Dojnice jsou vnímavější na metabolické a infekční choroby po dobu trvání tohoto období (Kováč a kolektiv, 2012).

MATERIÁL A METODIKA

Předkládaná práce byla zpracována v zemědělském podniku v Pardubickém kraji. Do sledování byly zařazeny dvě věkové skupiny plemenic českého strakatého skotu. Skupiny plemenic dostávaly totožnou krmnou dávku. Každá skupina byla sestavena ze 7 kusů příslušné věkové kategorie.

U plemenic byla krev odebírána průměrně 23 dní pře porodem a druhý den po porodu. Pro získání krve plemenic byl odběr proveden z *v. coccygea*. Krev byla převezena do laboratoře, kde bylo provedeno separování krevního séra na laboratorní odstředivce. V laboratoři byly fotometricky stanoveny hodnoty celkového proteinu pomocí biuretoví reakce. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel a Statistica.

Byly vypočteny statistické údaje:

- aritmetický průměr \bar{x}
- směrodatná odchylka S_x
- střední chyba průměru SE
- variační koeficient V_x .

VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení celkového proteinu může být jedním z důležitých ukazatelů zdraví. Hladina celkových proteinů v séru může naznačovat abnormality (Bárta, 2008).

Základní statistické ukazatele hodnotící hodnoty celkového proteinu u prvního a druhého odběru jsou uvedeny v Tab.1.

Tab.1: Statistické ukazatele u prvního odběru 23 dní před porodem a druhého odběru druhý den po porodu

	Jalovice		Krávy	
	-23	+2	-23	+2
počet	7	7	7	7
průměr	70,01	72,01	74,95	74,78
směrodatná odchylka	5,12	4,14	4,14	3,19
střední chyby průměru	5,53	4,47	4,47	3,44
variační koeficient	37,56	23,83	22,93	13,61

Hodnoty celkového proteinu se u jalovic průměrně pohybují kolem $70,01 \pm 5,12 \text{ g.l}^{-1}$ u prvního odběru a hodnoty druhého odběru kolem $72,01 \pm 4,14 \text{ g.l}^{-1}$. Oproti tomu průměrné hodnoty celkového proteinu u krav byly $74,95 \pm 4,14 \text{ g.l}^{-1}$ u prvního odběru a u druhého $74,78 \pm 3,19 \text{ g.l}^{-1}$. Ucelený přehled hodnot celkového proteinu jsou uvedeny v Tab.2.

Tab.2: Hodnoty celkového proteinu v g.l^{-1} u odběru 1. (-23) a odběru 2. (+2)

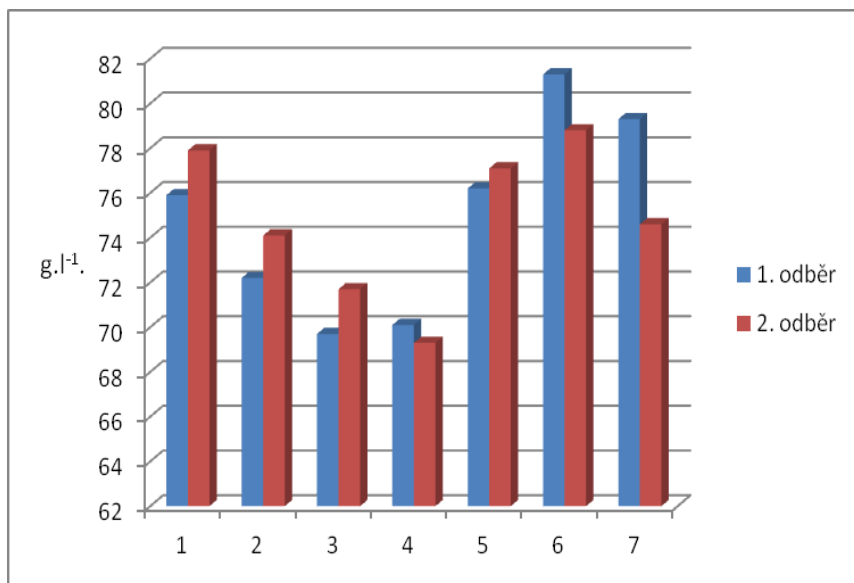
Jalovice		Krávy	
-23	+2	-23	+2
g.l^{-1}	g.l^{-1}	g.l^{-1}	g.l^{-1}
78,8	77,5	75,9	77,9
60,4	64,8	72,2	74,1
71,3	74,9	69,7	71,7
72,1	75,1	70,1	69,3
70,9	70,9	76,2	77,1
67,4	73,1	81,3	78,8
69,1	67,8	79,3	74,6

Hodnoty uváděné různými autory pro celkový protein u dospělých zvířat se někdy značně liší, proto je nutné, aby každá referenční laboratoř stanovila minimální a maximální hodnoty pro zdravá zvířata při použití standardních postupů v dané laboratoři (Bárta, 2008). V některých pracích se uvádí rozmezí 60 – 74 g.l⁻¹ (Bárta, 2008) v dalších 65 – 85 g.l⁻¹ (Dvořák, 2005). Práce (Radostits, 2007) udává užší rozmezí 60 – 70 g.l⁻¹. Naopak širší rozmezí udává práce (Bouda a Jagoš, 1979) a to 74 ± 9 g.l⁻¹.

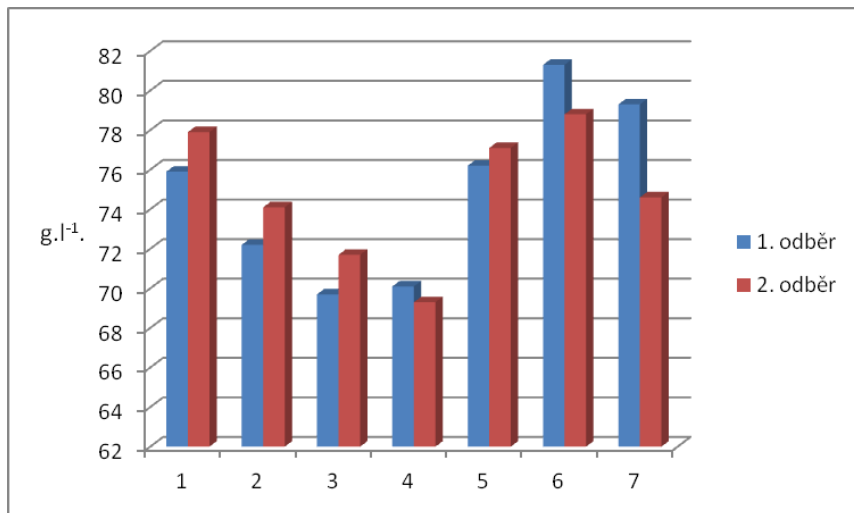
Ke zvýšení hodnot celkového proteinu dochází u zvířat zejména při dehydrataci organismu a chronických zánětlivých procesech (Dvořák, 2005). Dále také může být hladina CB zvýšena parazitárními nebo smíšenými infekcemi, myelomem a autoimunitními chorobami (Bárta, 2008).

Při snížení hladiny CB se může jednat o dlouhodobé hladovění (Dvořák, 2005) nebo jaterní onemocnění, ztrátu bílkovin způsobenou glomerulonefritidou, IgG deficiencí a poruchy trávení a absorpce potravy (Bárta, 2008).

Obr. 1 Jalovice odběr 1.(-23) a odběr 2.(+2)



Obr. 2 Krávy odběr 1.(-23) a odběr 2.(+2)



ZÁVĚR

V experimentu bylo potvrzeno, že v dospělosti by se hodnota celkového proteinu měla pohybovat okolo 75 g.l⁻¹. U jalovic byl v průběhu experimentu zaznamenán průměrný nárůst o 2 g.l⁻¹. U krav na vyšších laktacích nebyl zaznamenán žádný pohyb. Hodnoty celkového proteinu jsou u krav vyšší, avšak není průkazný rozdíl mezi jalovicemi a dojnícemi na vyšších laktacích. Celková bílkovina v séru matky je důležitá z hlediska přenosu frakce gamaglobulinů, kde se nacházejí převážně imunoglobuliny. Ty se tvoří při sekundární imunitní odpovědi.

LITERATURA

Bárta O., Codner E. C., Pickett J. P., Shell L. G. (2008): Veterinární klinická imunologie. CERM, ISBN 978-80-7204-553-2, 322s.

Bouda J., Jagoš P. (1979): Proteins and enzyme activities in the blood of cows in late pregnancy and in their foetuses. Acta Veterinaria, 48: 15-18.

Dvořák R. et al. (2005): Výživa skotu z hlediska produkční a preventivní medicíny, Klinika chorob přežvýkavců FVL VFU Brno, 80-86542-08-4, 117s.

Kováč G., Petrovič V., Tóthová C., Zaleha P., Vargová M. (2012): Metabolické a imunologické problémy vo vztahu k telesnej hmotnosti. Veterinářství, 62(5): 317-320.

Radostits O. M. et al. (2007): Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. Saunders Elsevier, 2456s.

Skřivánek M., Šlosárková S., Fleischer P., Dvořák P. (2002): Peripartální období – klíč k plnohodnotné produkci dojnic. Veterinářství 52 : 175-180.

EVALUATION NUTRIENT REQUIREMENTS AND NUTRIENT INTAKE IN SPORT HORSES

POROVNÁNÍ POTŘEBY A PŘÍJMU ŽIVIN U SPORTOVNÍCH KONÍ

Jakubcová Z., Mareš P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xjakubco@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the diet of selected horses of different breed, age and workload in the National Tlumačov stables. The evaluation of the nutrition level was carried out during February and March. 11 horses were selected for individual monitoring. It was estimated weight and condition of these horses and then the horses were divided into categories based on workload. The nutrient requirements and the calculation of feed rations were carried out.

The assessment shows that the established method of feeding largely meets the needs of sport horse stallions upcoming for sport season and mating. The monitored horses were in adequate condition for the mentioned purposes. The base diet consisted of high-quality hay and silage of wilted fodder, which quality was not very suitable for horse feeding. Based on the results of nutrient requirements comparison was found out that most of the monitored horses received more DE and CP (crude protein) than their daily requirement was.

Key words: horses, feeding rations, nutrients, nutrient requirements.

ÚVOD

Výživa byla v dějinách chovu koní vždy jedním z klíčových faktorů ovlivňujících zdraví, sportovní výkony a reprodukci. Způsob výživy je určen výživným stavem koně, jeho kondicí a sportovním nebo produkčním zaměřením. Výživa patří mezi nejdůležitější prvky, kterými je jedinec spojen s vnějším prostředím. Příjem vody a krmiva je nezbytný stejně jako dýchání nebo pohyb. Krmivo vstupuje do vnitřního prostředí a dostává se do buněk, takže má zásadní vliv na složení organismu, jeho funkci, na vývoj a výkon jedince. Výživa má jako dodavatel potřebných látek a živin rozhodující význam pro udržení aktivního zdraví a schopnosti maximálního výkonu. (Tluchoř, 1999)

Kůň je neuvěřitelný sportovec, který vyniká v různých typech závodů, jako jsou dostihy, rodeo nebo vytrvalostní dostihy. Ať už koně startují na nejvyšších úrovních nebo jsou využíváni pouze pro rekreační ježdění, musí být krmeni odpovídajícím způsobem k zajištění optimální kondice pro požadovaný výkon. (Warren, 2009a)

MATERIÁL A METODIKA

Krmné dávky byly hodnoceny v Zemském hřebčinci Tlumačov. Hodnocení úrovně výživy bylo provedeno na základě znalosti plemene, věku, pohlaví, pracovního zatížení, denního režimu a denního příjmu krmiva. Krmné dávky byly posuzovány v období únor – březen ve stáji pro mladé koně, kteří byli v základním výcviku a ve stáji pro sportovní koně a hřebce, kteří byli připravováni na sportovní resp. připouštěcí sezonu.

Byly odebrány vzorky jednotlivých krmiv a krmných směsí, jejichž analýza byla provedena v laboratořích Ústavu výživy zvířat a pícninářství Mendelovy univerzity v Brně. Analýza travní siláže ze zavadlé píce byla provedena v laboratoři S.O.S. Skalice nad Svitavou. U sena a travní siláže ze zavadlé píce bylo provedeno smyslové hodnocení. Odběry vzorků a analýzy krmiv a krmných směsí byly provedeny podle nařízení komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.

Ke sledování bylo vybráno 11 koní různého plemene, věku a pracovního zatížení. U těchto koní byla odhadnuta hmotnost a bylo provedeno hodnocení výživného stavu pomocí devítistupňové stupnice BCS (body condition score). Podle zjištěného stupně zátěže a popisu práce byli koně rozděleni do kategorií.

Mladí koně byli ustájeni vazným způsobem, sportovní koně byli ustájeni v boxech o průměrné velikosti 3,5×3m. Všechny boxy i stání byly vybaveny automatickými napáječkami a koně měli adlibitní přístup k minerálnímu lizu. Podestýlku tvořila ovesná sláma, s výjimkou koní 6 a 11, kteří měli piliny.

Koně se pohybovali denně v kolotoči (30-40 minut) a denně pracovali pod jezdcem. U koní, kteří byli připravováni na závodní sezonu, byla zařazena dvakrát týdně skoková práce.

MENDELNET 2012

Krmné dávky tvořilo seno, travní siláž ze zavadlé píce a jadrné krmivo. Jako jadrné krmivo se využívá oves, mačkaný ječmen a 3 druhy granulovaných krmných směsí. Všichni koně jsou krmeni dvakrát denně objemným krmivem a třikrát denně jadrným krmivem. SE (stravitelná energie) v krmivech byla vypočítána pomocí koeficientů stravitelnosti, které byly převzaty z Katalogu krmiv (Zeman et al., 1995).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Krmné dávky jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1: Krmné dávky a celkový příjem sušiny skupiny lehce pracujících koní v kilogramech na den

Kůň	Seno	Travní siláž ze zavadlé píce	Oves	Ječmen	Celkový příjem sušiny
1	5,5	0,7	0,9	0,8	7,8
2	5,6	1,2	0,9	0,8	8,6
3	4,6	0,9	0,9	0,8	7,2
4	4,3	0,8	0,9	0,8	6,8
5	4,8	1,0	0,9	0,8	7,5

Tabulka 2: Krmné dávky a celkový příjem sušiny skupiny lehce pracujících koní v kilogramech na den

Kůň	Seno	Travní siláž ze zavadlé píce	Doplňková směs č.1	Oves	Doplňková směs č. 2	Doplňková směs č. 3	Celkový příjem sušiny
6	5,5	1,8	2,9	0	0	0	10,2
7	5,9	1,7	0	0,9	0	2,7	12,2
8	3,7	0,9	0	0,9	1,2	3,7	9,2
9	7,7	1,3	0	0,9	1,2	2,5	13,6
10	6,7	2,7	0	0,9	0	2,5	12,8
11	6,5	1,7	0	0,9	1,2	0	10,3

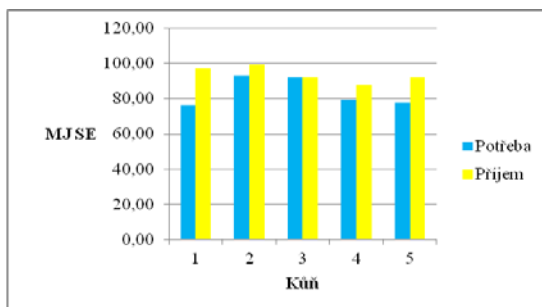
Přidělené známky BCS byly 5 a 6. Průměrná hmotnost koní dosahovala $493,5 \pm 34,2$ kg. Harper (2004b) uvádí, že koně s lehkou zátěží mohou mít BCS 5,5 – 7,5. Koně se středně těžkou a těžkou zátěží BCS 5 – 5,5. Burwash, Warren (2009) doporučují u hřebců, kteří jsou v připouštěcí sezóně hodně aktivní, zvýšení BCS v období před připouštěním na 6 – 7, aby v období připouštění nebyli příliš hubení.

Jakost sena byla na základě smyslového hodnocení stanovena jako velmi dobrá, kvalita travní siláže ze zavadlé píce jako zdařilá – nezdařilá. Podle laboratorní analýzy byla výsledná kvalita travní siláže ze zavadlé píce hodnocena jako méně zdařilá. U travní siláže ze zavadlé píce byl obsah sušiny 28,16 %. Podle Wilkinsona (2005) a Cuddeforda (2012) by travní siláže ze zavadlé píce pro koně měly mít sušinu 50 – 70 %. Röcken (2012) uvádí obsah sušiny 40 – 60 % sušiny. Obsah sušiny 28,16 % je nižší, než obsah sušiny, který doporučují zmínění autoři. Siláže s nízkým obsahem sušiny jsou po otevření méně stabilní, především pokud se ihned nespotřebují a snadno potom dochází k sekundární fermentaci. Stanovené pH 4,61 je nižší než rozmezí pro sportovní koně 4,8 – 5,8, které udává Wilkinson (2005). Cuddeford (2012) však udává rozmezí pH 4 – 6, což travní siláž předkládaná sledovaným koním splňuje.

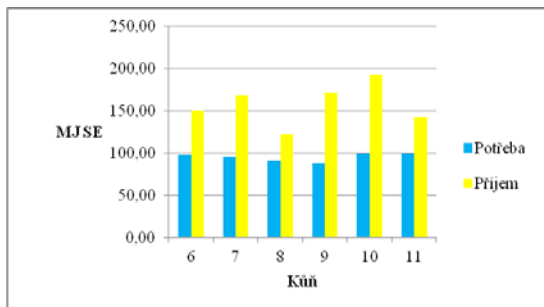
Výskyt etanolu, značí přítomnost kvasinek a horší aerobní stabilitu této travní siláže ze zavadlé píce. Na horší kvalitu poukazuje výskyt kyseliny másečné, který byl patrný již při smyslovém hodnocení. Vyšší obsah popele naznačuje znečištění zeminou.

Průměrný příjem SE (stravitelné energie) lehce pracujících koní byl $93,9 \pm 4,2$ MJ, průměrný příjem koní se střední zátěží byl $158,3 \pm 22,8$ MJ. Při průměrné hmotnosti skupiny lehce pracujících koní $500,8 \pm 43,9$ kg, byla jejich průměrná potřeba podle NRC (2007) $83,8 \pm 7,3$ MJ. Při průměrné hmotnosti skupiny středně pracujících koní $487,5 \pm 21,6$ kg byla jejich průměrná potřeba podle NRC (2007) $95,2 \text{ MJ} \pm 4,2$. Příjem SE je vyšší, než potřeba, kterou doporučují NRC (2007).

Graf 1: Porovnání denní potřeby a příjmu SE u skupiny koní v lehké práci

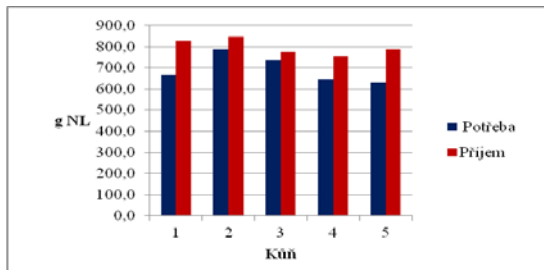


Graf 2: Porovnání denní potřeby a příjmu SE u skupiny koní ve střední práci

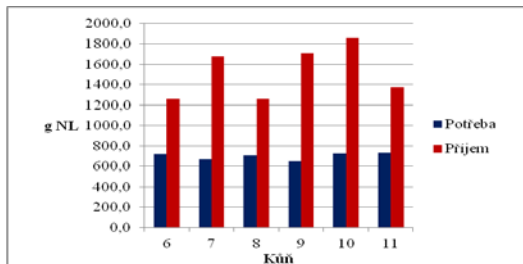


Průměrný příjem NL skupiny lehce pracujících koní byl $797,1 \pm 33,2$ g, průměrný příjem skupiny středně pracujících koní 1524 ± 235 g. Průměrná potřeba NL je pro skupinu lehce pracujících koní podle NRC (2007) 693 ± 60 g, pro skupinu středně pracujících koní $700 \pm 31,8$ g. Freeman (2008) uvádí denní potřebu $680,4$ g NL pro koně v lehké práci a $771,1$ g pro koně ve střední práci. Příjem NL je vyšší než denní potřeba, kterou uvádí NRC (2011) a Freeman (2008). NRC 1989 uvádí, že pracující koně nepotřebují přísávek NL. NRC 2007 již uvádí přísávek NL pro pracující koně.

Graf 3: Porovnání denní potřeby a příjmu NL u skupiny koní v lehké práci



Graf 4: Porovnání denní potřeby a příjmu NL u skupiny koní ve střední práci



ZÁVĚR

Sledování koně byli v odpovídající kondici pro uvedené účely. Základem krmné dávky bylo kvalitní seno a siláž ze zavadlé píce, jejíž kvalita nebyla příliš vhodná ke krmení koní. Na základě výsledků porovnání potřeby a příjmu živin bylo zjištěno, že skupina středně pracujících koní přijímala více SE a NL, než byla jejich denní potřeba.

LITERATURA

BURWASH, L., WARREN, L. Body Condition Scoring Your Horse. *Agri - Facts* [online]. 2010, 1-3 [cit. 2012-04-07]. Dostupné

z:[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/\\$FILE/body-condition-scoring-horses.pdf](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/$FILE/body-condition-scoring-horses.pdf)

CUDDEFORD, D. *Haylage for Performance Horses* [online]. 2012 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: <http://www.dow.com/silage/tools/experts/haylage.htm>

FREEMAN, W. F. Nutritional concerns for exercising horses. [online]. 2008, [cit. 2012-04-07]. Dostupné z:

<http://osufacts.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2066/ANSI-3970web.pdf>

HARPER, F. Feeding the Equine Athlete, Part II. *Horse Express* [online]. 2004, č. 4 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z:

<http://animalscience.ag.utk.edu/Horse/pdf/HorseExpress/HorseExpressFall2004.pdf>

KACEROVSKÝ, O. *Zkoušení a posuzování krmiv: celost. vysokošk. učebnice pro vys. školy zeměd.* 1. vyd. Praha: SZN, 1990, 213 s. Živočišná výroba. ISBN 80-209-0098-5.

NAŘIZENÍ KOMISE (ES) č. 152/2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv. Úřední věstník Evropské unie, L 54/1. Dostupný z: <http://www.ukzuz.cz/Articles/46-2-Legislativa+.aspx>

Nutrient requirements of horses. 5th rev. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989, 100 s. Nutrient requirements of domestic animals (Unnumbered). ISBN 03-090-3989-4

Nutrient requirements of horses. 6th rev. ed. Washington, D.C.: National Academies Press, c2007, 341 s. Animal nutrition series (Washington, D.C.). ISBN 03-096-6096-3.

RÖCKEN, M. *Using green fodder silage for feeding horses*. In:Dow [online]. Veterinary clinic Starnberg, 2012 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.dow.com/silage/tools/experts/green.htm>

TLUČHOŘ, V. In: DUŠEK, J. *Chov koní*. 1. vyd. Praha: Brázda, 2001, 350 s. ISBN 80-209-0282-1.

WARREN, L. K. Feeding Working and Performance Horses. *Agri - Facts* [online]. 2009a [cit. 2012-04-07]. Dostupné z:

[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/\\$FILE/feeding-working-and-performance-horses.pdf](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/$FILE/feeding-working-and-performance-horses.pdf)

WILKINSON, J. M. *Silage*. Lincoln: Chalcombe Publications, 2005. ISBN 09-486-1750-0.

ZEMAN, L. et al. *Katalog krmiv: (tabulky výživné hodnoty krmiv)*. 1. vyd. Pohořelice: VÚVZ, 1995. 465 s. ISBN 80-901598-3-4

ZEMAN, L. et al. *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro koně*. 3. vyd. Brno: MZLU, 2005. 341 s. ISBN 80-715-7855-X.

ZEMAN, L. et al. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Profi Press, c2006, 360 s. ISBN 80-867-2617-7.

RELATIONSHIP BETWEEN TEMPERATURE IN STABLE, MILK COMPOSITION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF HOLSTEIN DAIRY COWS

VZTAH MEZI TEPLOTOU VE STÁJI, SLOŽENÍM A TECHNOLOGICKÝMI VLASTNOSTMI MLÉKA U HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU

Javorová J., Falta D., Velecká M., Andryšek J., Večeřa M., Chládek G.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Javorova.J@seznam.cz

ABSTRACT

Altogether 87 bulk milk samples obtained in identical herds of Holstein cows within 87 weeks were divided into six groups depending on average diurnal pattern of air temperatures in stable (less than 5.0 °C; 5.1 to 10.0 °C; 10.1 to 15.0 °C; 15.1 to 20.0 °C; 20.1 to 25.0 °C; above 25.1 °C). The average values of milk parameters under study ($n = 87$) were as follows: fat content 3.98 g.100g⁻¹, protein content 3.32 g.100g⁻¹, casein content 2.61 g.100g⁻¹, lactose content 4.82 g.100g⁻¹, solids non-fat content 8.74 g.100g⁻¹, specific density 1.0308 kg.l⁻¹, titratable acidity 6.91 °SH, pH acidity 6.74, rennet coagulation time 201 sec, curd quality class 1.71; average diurnal temperature was 13.27 °C. Based on the results can be stated that with the increasing average diurnal air temperature, contents of fat, protein, casein and solids-non-fat significantly decreased ($p < 0.01$). On the other hand, relationship between temperature in stable and lactose, specific density, rennet coagulation time, curd quality, titratable and pH acidity was not statistically significant ($p > 0.01$).

Key words: milk composition, technological properties, stable temperature, Holstein.

Acknowledgments: This research was supported by the research programme MSM 6215648905 and by grant project IGA TP 1/2012 AF MENDELU.

ÚVOD

Složení mléka a jeho technologické vlastnosti závisí na řadě faktorů. Souvisí s individualitou dojnice, plemenem, výživou, dědičným založením, laktací a dalšími (DOLEŽAL et al., 2000). Neméně důležitým faktorem jsou klimatické podmínky (KUBEKOVÁ, 2004 cit. RICHARDT, 2004). Skot je více adaptován na teploty nižší než vyšší. Pásmo tepelné pohody skotu se obecně pohybuje od 10 do 16 °C (CHLÁDEK, 2004). V případě tepelného stresu dochází ke snížení příjmu krmiva, což vede ke snížení užitkovosti (KUDRNA et al., 2004). Právě teplota nad 24 °C způsobuje pokles příjmu krmiva. Naopak delší den v letních měsících příjem krmiva zvyšuje (MUDŘÍK et al., 2006). Nejefektivnější způsob, jak snižování užitkovosti v teplých měsících zamezit, je předcházení úpravou technologie ustájení nebo výživářskými zásahy (KOUKAL, KOSTKAN, 2011). Omezit vliv tepelného stresu je možné také genetickou selekcí (WEST, 2003). Sledovaným plemenem bylo v tomto výzkumu plemeno holštýnské. Vyznačuje se vysokou mléčnou užitkovostí, jeho šlechtění se stává celosvětovou záležitostí (BOUŠKA et al., 2006).

Existuje velká sezónní variabilita v koncentraci hlavních složek mléka. Se změnami teploty během roku dochází k největším změnám v obsahu tuku a bílkovin, koncentrace laktózy je během roku stálejší (DOLEŽAL, ABRAMSON, 2009; HECK et al., 2009). Fyzikální a chemické vlastnosti mléka vychází z jeho složení a struktury (WALSTRA et al., 2006). Z hlediska chovatele patří k důležitým parametrům množství obsahových látek, zejména tuku a bílkovin. Z hlediska zpracovatele můžeme zařadit jako technologické vlastnosti, například titrační kyselost, syřitelnost (CHLÁDEK, 2004). Syřitelnost představuje jednu z nejvýznamnějších technologických vlastností (ČEJNA, 2008). Za žádoucí se považuje syřitelnost asi 161 sekund (ČEJNA, 2006). Výroba sýřeniny je proces, ve kterém je mléčný tuk a kasein koncentrován desetinasobně, zatímco syrovátkové bílkoviny, laktóza a rozpustné soli přejdou do syrovátky (FOX, McSWEENEY, 1998). Pro výrobu sýrů je nejvhodnější mléko s odpovídajícím poměrem tuku ke kaseinu (BUCEK, 2009).

Tato práce si stanovila za úkol analyzovat vztah mezi teplotou ve stáji, složením a technologickými vlastnostmi mléka dojnic holštýnského plemena. Konkrétně jsme sledovali změny v obsahu tuku, bílkovin, kaseinu, laktózy, tukuprosté sušiny, hustoty, titrační a aktivní kyselosti, syřitelnosti a kvality sýřeniny v závislosti na průměrné denní teplotě ve stáji.

MATERIÁL A METODIKA

Byly analyzovány bazénové vzorky mléka dojnic holštýnského plemene chovaných ve Školním zemědělském podniku v Žabčicích, které byly krmeny směsnou krmnou dávkou *ad libitum*. Vzorky byly odebírány v průběhu 87 týdnů (3.6.2010–1.2.2012) v pravidelných intervalech jedenkrát týdně a představovaly směs ranního a večerního nádoje. Dojení probíhalo 2krát denně – ve 4 a 16 hodin

(krávy na 2. a vyšší laktaci s nádojem vyšším než 25 kg mléka za den byly dojeny 3krát denně). Dojnice se nacházely v různém stádiu laktace. V kontrolní dny byly zaznamenány průměrné teploty vzduchu ve stáji. Analýza vzorků byla prováděna v laboratoři Ústavu chovu a šlechtění zvířat Mendelovy univerzity. **Obsahové složky mléka, tukuprostá sušina a hustota** byly měřeny na přístroji Julie C5 Automatic (Scope Electric) pracující na principu termoanalýzy. **Aktivní kyselost** byla měřena pH-metrem CyberScan 510. **Titrační kyselost** byla zjištěna dle metodiky Soxhlet-Henkela titrací vzorku hydroxidem sodným. **Syřitelnost** byla měřena pomocí nefelo-turbidického snímače koagulace mléka dle metodiky PŘIBYLY a ČEJNY (2006). **Kvalita syřeniny** byla zjišťována po inkubaci zasyřeného mléka dle GAJDŮŠKA (1997) a zařazena do tříd jakosti 1–5. Čím nižší číslo, tím vyšší jakost. **Teplota vzduchu** představovala aritmetický průměr teplot v kontrolní dny, zjišťovaných každých 15 minut s použitím 3 čidel s dataloggerem HOBO (Onset Computer) v kohoutkové výšce.

Dle zjištěné teploty byly vzorky rozděleny do 6 intervalů: méně než 5,0 °C; 5,1 až 10,0 °C; 10,1 až 15,0 °C; 15,1 až 20,0 °C; 20,1 až 25,0 °C; nad 25,1 °C. Pro vyhodnocení byl použit program MS Office Excel 2003 a Unistat 5.1.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vztah mezi teplotou ve stáji, složením a technologickými vlastnostmi mléka je uveden v Tab. I. Z tabulky vyplývá, že počet vzorků hodnocených v rozmezí stanovených teplotních intervalů se pohyboval od 6 případů (nad 25,1 °C) po 20 případů (20,1 až 25,0 °C). Je zřejmé, že se vzrůstajícím rozmezím intervalů průměrných denních teplot stoupala také průměrná denní teplota ve stáji z 1,33 až 26,88 °C. Statisticky vysoce průkazně ($p < 0,01$) nejnižší průměrný obsah bílkovin $3,22 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ byl zjištěn v teplotním intervalu nad 25,1 °C, nejnižší průměrný obsah kaseinu byl zjištěn $2,51 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, a to v intervalu 20,1 až 25,0 °C. Problém s redukcí bílkovin v souvislosti s rostoucí teplotou prostředí uvádějí DREVJANY et al. (2004) a DOLEŽAL, ABRAMSON (2009) za další důvod považují nedostatek živin v krmné dávce. Statisticky vysoce průkazně nejvyšší průměrné hodnoty obou parametrů byly zjištěny v intervalu méně než 5,0 °C a 5,1 až 10,0 °C. Tato hodnota činila u obsahu bílkovin $3,42 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, u obsahu kaseinu $2,70 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Podobných výsledků dosáhli také CHLÁDEK et al. (2011) a POLÁK et al. (2011), kteří dospěli k závěru, že se v podzimních a zimních měsících obsah bílkovin zvyšuje. Podobný trend v souvislosti se změnou teploty byl zjištěn u obsahu tuku. Statisticky vysoce průkazně nejnižší průměrný obsah tuku $3,76 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, byl zjištěn v teplotním intervalu 20,1 až 25,0 °C a nad 25,1 °C. S poklesem obsahu tuku při zvyšujících se teplotách souhlasí RUSEK (2006). Statisticky vysoce průkazně nejvyšší průměrný obsah tohoto parametru byl zjištěn $4,16 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v intervalu 5,1 až 10,0 °C. DREVJANY et al. (2004) doplňuje, že tyto rozdíly v tučnosti mléka během teplotních změn v průběhu roku jsou výsledkem změny v příjmu krmiva během horkého a studeného počasí. Dojnice jsou ochotnější přijímat hrubou píci s vyšším obsahem vlákniny během chladného počasí. To pak příznivě ovlivňuje syntézu kyseliny octové v bacheru, stejně jako syntézu mléčného tuku v mléčné žláze. GAJDŮŠEK (2003) uvádí, že obsah bílkovin kolísá méně než obsah tuku, což se shoduje s výsledkem tohoto výzkumu, kdy rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou u bílkovin činil

0,2 g.100g⁻¹, u tuku 0,37 g.100g⁻¹. V případě tukuprosté sušiny, byla statisticky vysoce průkazně nejnižší průměrná hodnota 8,58 g.100g⁻¹ zjištěna v intervalu nad 25,1 °C. POLÁK et al. (2011) souhlasí a dodávají, že v teplejším období roku se obsah tukuprosté sušiny snižuje. Naopak statisticky vysoce průkazně nejvyšší průměrná hodnota byla zjištěna v intervalu méně než 5,0 °C a 5,1 až 10,0°C, a to 8,83 g.100g⁻¹. FOX, McSWEENEY (1998) uvádí, že celková sušina kolísá vlivem obsahu jednotlivých složek. Toto zjištění koresponduje s výsledky našeho výzkumu.

Rozdíly v obsahu laktózy (maximálně 0,07 g.100g⁻¹) v rámci sledovaných intervalů průměrných denních teplot nebylo průkazné ($p > 0,01$). CHLÁDEK et al. (2011) i POLÁK et al. (2011) ve svém výzkumu zjistili, že obsah laktózy byl nejnižší na podzim, naopak HECK et al. (2009) zjistili, že obsah laktózy je v průběhu roku poměrně konstantní a uvádí rozdíly v obsahu laktózy maximálně 0,09 g.100g⁻¹. Rozdíly v aktivní kyselosti (maximálně 0,19) a titrační kyselosti (maximálně 0,21 °SH) v rámci sledovaných intervalů průměrných denních teplot nebyly průkazné. Naopak FRELICH et al. (2001) uvádí, že na jaře dochází ke zvyšování pH a poklesu titrační kyselosti. Dle výsledků výzkumu CHLÁDKA et al. (2011), byly hodnoty pH nejvyšší v zimním období a vliv změny teploty během roku na titrační kyselost nebyl průkazný. Rozdíly v hustotě mléka (maximálně 0,0005 kg.l⁻¹) v rámci sledovaných intervalů průměrných denních teplot také nebyly průkazné. Dle výsledků výzkumu uvádí CHLÁDEK et al. (2011), že v létě byla hustota mléka vyšší, než na podzim a v zimě. Hodnota kolísá dle zastoupení obsahových složek. Rozdíly v syřitelnosti (maximálně 16 sec.) v rámci sledovaných intervalů průměrných denních teplot nebyly průkazné. Statisticky průkazný vliv sledovaného období na syřitelnost mléka zjistil ČEJNA (2008). Dospěl k názoru, že nejhorší syřitelnost byla dosažena v zimním období. CHLÁDEK et al. (2011) uvádějí, že znatelně kratší doba syření v jejich výzkumu byla zaznamenána v létě. Rozdíly v třídě kvality syřeniny (maximálně 0,3) v rámci sledovaných intervalů průměrných denních teplot nebylo průkazné. FALTA et al. (2010) zjistil horší kvalitu syřeniny ve dnech, kdy průměrná teplota ve stáji překračovala 21 °C.

Tab. 1 Vztah mezi teplotou ve stáji, složením a technologickými vlastnostmi mléka

PARAMETR	JEDNOTKA	\bar{x}	INTERVALY ROZDĚLENÉ PODLE PRŮMĚRNÝCH DENNÍCH TEPLOT VE STÁJI					
			méně než 5,0 °C	5,1 až 10,0 °C	10,1 až 15,0 °C	15,1 až 20,0 °C	20,1 až 25,0 °C	nad 25,1 °C
Počet vzorků	n	87	18	16	12	15	20	6
Průměrná denní teplota ve stáji	°C	13,27	1,33 ^a	7,04 ^b	12,56 ^c	17,82 ^d	21,91 ^e	26,88 ^f
Syřitelnost	sec.	201	206 ^a	210 ^a	204 ^a	194 ^a	196 ^a	196 ^a
Titrační kyselost	°SH	6,91	6,84 ^a	6,88 ^a	7,05 ^a	6,93 ^a	6,89 ^a	6,94 ^a
Aktivní kyselost	pH	6,74	6,79 ^a	6,80 ^a	6,73 ^a	6,67 ^a	6,74 ^a	6,61 ^a
Tuk	g.100g ⁻¹	3,98	4,13 ^b	4,16 ^b	4,13 ^b	3,89 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a
Bílkoviny	g.100g ⁻¹	3,32	3,42 ^c	3,42 ^c	3,33 ^b	3,27 ^a	3,23 ^a	3,22 ^a
Laktóza	g.100g ⁻¹	4,82	4,81 ^a	4,81 ^a	4,85 ^a	4,85 ^a	4,82 ^a	4,78 ^a
Tukuprostá sušina	g.100g ⁻¹	8,74	8,83 ^d	8,83 ^d	8,78 ^{cd}	8,71 ^{bc}	8,64 ^{ab}	8,58 ^a
Kvalita syřeniny	třída	1,71	1,69 ^a	1,78 ^a	1,50 ^a	1,80 ^a	1,75 ^a	1,67 ^a
Hustota	kg.l ⁻¹	1,0308	1,0298 ^a	1,0298 ^a	1,0301 ^a	1,0300 ^a	1,0297 ^a	1,0296 ^a
Kasein	g.100g ⁻¹	2,61	2,70 ^c	2,70 ^c	2,62 ^c	2,55 ^b	2,51 ^a	2,53 ^a

^{a-f} Hodnoty označené ve stejném řádku odlišnými písmeny se liší vysoce průkazně ($P < 0,01$)

ZÁVĚR

Na základě analýzy bazénových vzorků mléka dojníc holštýnského plemene bylo zjištěno, že se vzrůstající průměrnou denní teplotou ve stáji vysoce průkazně klesal obsah bílkovin, kaseinu, tuku a tukuprosté sušiny. Dále byla zjištěna statisticky neprůkazná tendence k poklesu času potřebného k zasýření mléka a hodnoty aktivní kyselosti. Rovněž obsah laktózy, hustoty, kvality syřeniny a titrační kyselosti nebyly teplotou ve stáji ovlivněny průkazně.

LITERATURA

- Bouška, J. et al. (2006): Chov dojeného skotu. 1. vyd. Profi Press Praha, 186 s. ISBN 80-86726-10-9.
- Bucek, P. (2009): Genetické parametry koagulace mléka a jejich vztah k produkčním ukazatelům, Náš chov. Profi Press s. r. o., Praha, č. 1, s. 29–30. ISSN 0027–8068.
- Čejna, V. (2006): Vliv laktace krav na vybrané technologické vlastnosti mléka. Dizertační práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně, MZLU, Brno, 81 s.
- Čejna, V. (2008): Zkušenosti z mlékárny se syřitelností mléka ve vazbě dodavatele mléka, s. 7–16. In Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků: sborník příspěvků = Agricultural production practice and food biotechnological manipulations for support of positive health impacts of milk and milk products: proceedings of contributions, 8.10.2008, Rapotín. 1. vyd. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín, 91 s. ISBN 978-80-87144-03-9.
- Doležal, O. et al. (2000): Mléko, dojení, dojírny. 1. vyd. Agropoj Praha, 241 s.
- Doležal, O., Abramson, S. (2009): Výživa a krmení při eliminaci tepelného stresu (1.), Náš chov. Profi Press s. r. o., Praha, č. 8, s. 26–28. ISSN 0027-8068.
- Drevjany, Kozel, Padrůnek (2004): Holštýnský svět. 1. vyd. Zea Sedmihorky, s. r. o. ve spolupráci se Zemědělským týdníkem, 344 s.
- Falta, D., Skýpala, M., Polák, O., Chládek, G. (2010): Vliv teploty a vlhkosti ve stáji na složení a technologické vlastnosti bazénových vzorků mléka v letním období. In: Farnářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VII. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 69–72. ISBN 978-80-7375-402-0.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (1998): Dairy chemistry and biochemistry. 1st ed. Blackie Academic & Professional, London ; New York, 478 s. ISBN 0-412-72000-0.
- Frelich, J. et al. (2001): Chov skotu. 1. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 211 s. ISBN 80–7040-512–0.
- Gajdůšek, S. (1997): Mlékařství II: (cvičení). 1. vyd. MZLU Brno, 84 s. ISBN 80-7157-278-0.
- Gajdůšek, S. (2003): Laktologie. 1. vyd. MZLU Brno, 84 s. ISBN 80-7157-657-3.
- Heck, J. M. L. et al. (2009): Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. Journal of Dairy science, Vol. 92, no. 10, p. 4745–4755. ISSN 0022-0302.
- Chládek, G. (2004): Vliv chovatelského prostředí na kvalitu mléka, s. 11–13. In KUCHTÍK, J. Farnářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, s. 40. ISBN 80-7157-771-5.
- Chládek, G., Čejna, V., Falta, D., Máchal, L. (2011): Effect of season and herd on rennet coagulation time and other parameters of milk technological quality in Holstein dairy cows., Acta

universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis. Sv. 59, č. 5, s. 113–118. ISSN 1211-8516.

Koukal, P., Kostkan, J. (2011): Jak zmírnit působení tepelného stresu na dojnice? Náš chov. Profí Press s. r. o., Praha, č. 6, s. 14. ISSN 0027-8068.

Kubeková, K. (2004): Obsah mléčných složek jako kritérium výživy a zdraví, (dle přednášky dr. Richardta), Náš chov. Profí Press s. r. o., Praha, č. 11, s. P26–P28. ISSN 0027-8068.

Kudrna, V. et al. (2004): Tepelný stres a výživa, Farmář. Profí Press s.r.o., Praha, č. 8, s. 44–46. ISSN 1210-9789.

Mudřík, Z., Doležal, P., Koukal, P. (2006): Základy moderní výživy skotu: vědecká monografie zpracovaná v rámci řešení VZ MSM 6046030901. 1. vyd. Česká zemědělská univerzita v Praze, 276 s. ISBN 80-213-1559-8.

Polák, O., Falta, D., Hanuš, O., Chládek, G. (2011): Effect of barn airspace temperature on composition and technological parameters of bulk milk produced by dairy cows of Czech Fleckvieh and Holstein breeds. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LIX, No. 6, pp. 271–280.

Přibyla, L., Čejna, V. (2006): Porovnání vizuální a nefelo – turbidimetrické metody pro měření syřitelnosti mléka, s. 110–111. In Den mléka 2006. ČZU Praha, 172 s. ISBN 80-213-1498-2.

Rusek, A. (2006): Problémy s mléčnými složkami u dojnic – obsah tuku, Náš chov. Profí Press s. r. o., Praha, č. 5, s. 40–41. ISSN 0027-8068.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006): Dairy science and technology. 2nd ed. Boca Raton : CRC/Taylor & Francis, New York, 2006, 782 s. ISBN 0-8247-2763-0.

West, J. W. (2003): Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. Journal of Dairy science, Vol. 86, no. 6, p. 2131–2144. ISSN 0022-0302.

INFLUENCE OF DOWNHILL BUILD ON PELVIS ANGLE IN DONKEYS

VLIV PŘESTAVĚNOSTI NA ZAÚHLENÍ PÁNVE

Košťuková M., Jiskrová I., Černožorská H., Bihuncová I., Oravcová I.

Department of animal breeding, Faculty of Agriculture, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: markostuko@centrum.cz

ABSTRACT

In this work, we were particularly focusing on morphology differences between donkeys and horses; our aim was to determine any eventual influence of pelvic angle on body build (uphill x downhill) in donkeys. There already are a few known differences between horses and donkeys; such as donkeys are taller in sacral region and the weight is carried a bit more by front limbs. To verify our hypothesis, the following body measurements had to be taken; WH (Withers Height), SH (Sacral Height), PA (Pelvic angle, measured from hip point to rating point, relative to floor). Our results were able to show a few differences between Czech and African population of donkeys. Czech donkeys are in average higher at withers and mostly downhill-built (average difference between WH and SH is 2.1 cm for stallions and 3 cm for mares). Both of these measurements are also more variable in Czech donkeys, which is most probably a consequence of uncontrolled import. The pelvic angle was showing values 12° – 17° for stallions and 14° - 22° for mares. This occurs in all equiidae; for mares, it is easier to give birth with slightly higher value of pelvic angle. In the end, we were not able to prove the influence of pelvic angle on body build (uphill x downhill), but we were able to prove WH dependency on SH using Pearson's correlation.

Key words: donkey, pelvic angle, downhill built,

Acknowledgments: This project was realized with a financial support of IGA TP 1/2012 AF MENDELU v Brně

ÚVOD

Oslí se po celou dobu svého vývoje přizpůsobovali drsným podmínkám pouště (Rossel *et al.* 2007). Jejich fyziologická a morfologická stavba se po celou dobu měnila tak, aby prosperovali v nehostinném prostředí. Domestikace osla domácího se datuje na 6000 let př. n. l., jejich domestikace je úzce spjata s rozvojem starověké civilizace a dodnes v chudších světových regionech nahrazují motorové dopravní prostředky (Kefena *et al.* 2011).

Oslí a koně se od sebe morfologicky odlišují, přestože patří do společné čeledi *equidů*. Nevýraznější morfologickou odlišností od koní jsou dlouhé uši, nicméně i jejich tělesná stavba je od koní rozdílná. Zád' a pánevní končetiny mají jiný tvar než u oslů a proto oslí vypadají více hubení. Oslí, i přestože mají velice podobou stavbu těla jako koně, vykazují vyšší výšku v kříži než koně a jejich váha je přenášena více na hrudní končetiny (Folch, Jordana, 1997).

Zajímá nás, jestli má vliv úhel pánve na přestavěnost a její morfologickou stavbu těla oslů.

MATERIÁL A METODIKA

V ústřední evidenci koní je v současné době zaregistrováno 475 oslů. Pro účely naší práce bylo změřeno 65 zvířat; z toho 20 hřebců a 45 klisen. Minimální věková hranice vybraných a měřených zvířat byla tři roky, neboť ve třech letech jsou teplokrevní koně chovatelsky dospělí a jsou zařazováni do plemenitby. Z toho usuzujeme, že je vhodné zařadit do našeho vzorku osly starší tři let i přesto, že je pro osly věková hranice zařazování do plemenitby posunuta na 5 let. Databázi postupně rozšiřujeme o další chovatele, kteří jsou ochotni nechat svá zvířata změřit.

Měření oslů

Zvíře se k měření předvede na rovnou plochu tak, aby mělo možnost vizuální komunikace s ostatními zvířaty a nebylo tak vystavováno zbytečnému stresu. Je vhodné seznámit osla s měřicími pomůckami, mohlo by dojít k úrazu osla i měřiče, pokud by zvíře mělo pocit ohrožení těmito pomůckami.

Osel musí být postaven tak, aby stál na všech čtyřech končetinách, které se při pohledu z boku kryjí. Měření se několikrát opakuje, aby došlo k ověření zjištěné hodnoty a omezení chyby. Při měření výškových hodnot - kohoutková výška hůlková (KVH), výška v kříži (VvK) - musí být měrná hůl neustále v kolmé poloze k povrchu. Jakýkoli odklon od vertikály zkresluje naměřené výsledky, které by poté pro pozdější výzkum byly nepoužitelné. Měření prováděla tatáž osoba, aby nedocházelo k chybě v měření. Úhel pánevní k podložce jsme měřili úhloměrem.

Zaměřili jsme se na:

- KVH – kohoutková výška hůlková
- VvK – výška v kříži
- Úhel pánve k podložce – měřeno od kyčelního hrbolu k sedacímu hrbolu

Metody statistického zpracování

Sesbíraná data jsme shromažďovali v programu Microsoft Excel 2007, ve kterém jsme provedli výpočet základních statistických údajů (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum).

Vliv pohlaví na vybrané tělesné míry jsme testovali pomocí obecného lineárního modelu (GLM). Ke zpracování jsme využili program Unistat ver. 5.1. Dále jsme využili Pearsonova korelačního testu na zjištění vlivu úhlu pánve na přestávěnost.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tab. 1: Zjištěné hodnoty pro dané parametry v cm.

	KVH		VvK		ÚP		IP	
	hřebci	klišny	hřebci	klišny	hřebci	klišny	hřebci	klišny
průměr	109,90	105,12	112,33	108,22	14,20	17,98	102,22	103,00
min	91,00	91,00	95,50	94,00	12,00	14,00	100,00	100,00
max	123,00	121,00	126,00	126,00	17,00	22,00	105,50	106,57
směrodatná odchylka	8,74	7,47	8,89	7,15	1,47	2,44	1,63	1,71

Porovnáme – li poznatky Kefena *et al.* (2004), který mapoval situaci afrických oslů a sledoval diversitu mezi jednotlivými populacemi, zjišťujeme, že osli v ČR vykazují vyšší hodnoty KVH oproti populacím africkým. Tento fakt je pravděpodobně způsoben dovozem zvířat z různých zemí k nám, a jejich KVH pravděpodobně ovlivňuje různý původ a jejich adaptace na dané podmínky prostředí. Výškově nejpodobnější jsou osli z ČR oslům nazývaným Sinar, kteří pocházejí ze severozápadních nížin podél Etiopské a Súdánské hranice. Jejich KVH dosahuje průměrných hodnot 110 cm pro hřebce a 108 cm pro samice. Další 4 testované populace vykazovaly nižší průměrné hodnoty kohoutkové výšky hůlkové, než naše populace, přičemž hodnoty směrodatné odchylky dosahovaly nižších hodnot. Z toho vyplývá, že populace v ČR má větší diversitu. Jelikož v ČR osli nejsou původním druhem a jejich chov byl doposud nahodilý, tato variabilita je předpokladatelná. Aktuální populace oslů v ČR vykazuje vyšší fenotypové rozdíly, ať se jedná o celkovou stavbu těla, případně zbarvení. Příčinu těchto rozdílů lze hledat v různých domestikacích

linií v populaci (Beja-Pereira *et al.*, 2004). Taktéž Kefena *et al.* (2004) upozorňuje na význam ekologie, životního prostředí a biofyzikálních zdrojů na celkové tělesné parametry.

Výška v kříži taktéž vykazuje vysokou variabilitu oproti populaci oslů v Etiopii, katalánii. Jak je z tabulky 1. vidět, osli na území ČR mají výrazně vyšší hodnoty VvK než KVH. Folch, Jordana (1997) ve své práci uvádí hodnotu pro VvK oproti KVH o 0,8 cm vyšší pro samce a pro klisny je tato hodnota vyšší již o 3,3 cm, pro porovnání uvádím hodnoty etiopských oslů z práce Kefeny *et al.* (2004), které průměrně nabývaly hodnot o 2 – 3 cm vyšší oproti KVH pro hřebce i klisny. V České republice osli dosahují Vvk průměrně kolem 112 cm pro hřebce s průměrnou KVH kolem 109,9 cm a pro klisny 108 cm s KVH 105 cm.

Úhel pánevní jsme měřili od kyčelního hrbolu k sedacímu hrbolu při porovnání k podložce. Samci a samice vykazovali rozdílné hodnoty zaúhlení pánve.

Tab. 2 Vliv pohlaví na úhel pánevní

Skupina	Příp.	Průměr	Hřebci	Klisny
Klisny	45	14,20		*
Hřebci	20	17,98	*	

V tabulce č. 2 můžeme sledovat prokázání statisticky průkazného rozdílu pro úhel pánevní mezi hřebci a klisnami. Průměrné hodnoty se u samců pohybovaly v rozmezí 12° – 17° a u samic 14° – 22°. Klisny mají vyšší sklon pánve, ten umožňuje snadnější porod a průchod mláďete porodními cestami. I pro ostatní koňovité je tento jev typický. Porovnat úhel pánevní s ostatními equidy nelze, neboť v populaci vykazují rozdílné stupně zaúhlení dle plemene. Celková stavba těla se u různých plemen liší, dle historických i současných požadavků na pracovní zaměření např. Zechner *et al.* (2001), uvádí průměrné hodnoty úhlu pánevního pro klisny lipického koně ze 7 hřebčínů v rozmezí 16° – 10,9°, kdy každý hřebčín má tyto hodnoty rozdílné. Oproti tomu Pinto *et al.* (2008), ve své práci uvádí hodnoty úhlu pánevního pro klisny plemene Mangalarga Marchadorské koně v rozmezí 22° – 26°.

Tabulka č. 3. Vliv pohlaví na index přestavěnosti

Skupina	Příp.	Průměr	Hřebci	Klisny
Klisny	45	103,00		*
Hřebci	20	102,22	*	

Index přestavěnosti (viz. tab. č. 1, tab. č. 3) vykazuje vyšší hodnoty přestavěnosti pro klisny. Podobné hodnoty vychází i pro populace zahraničních oslů, kdy samice mají vyšší hodnotu indexu přestavěnosti. U tohoto indexu se nám podařilo prokázat statisticky významný rozdíl. Proto zde existuje předpoklad, který naznačuje určitou pravděpodobnost, že by úhel pánevní mohl ovlivňovat

přestavěnou; klisny vykazují vyšší hodnoty přestavěnosti, než hřebci mají i vyšší hodnoty úhlu pánevního.

Pearsonova korelace

Pearsonově korelací jsme podrobili 4 proměnné z této studie, jedná se o index přestavěnosti a úhel pánevní a dále KVH a VvK. Pearsonova korelace pro vliv přestavěnosti a úhlu pánevního dosahovala hodnoty 0,1348, což znamená, že vztah mezi dvěma proměnnými je zanedbatelný. Podrobením ostatních hodnot Pearsonově korelací jsme zjistili závislost výšky v kohoutku na výšce v kříži, tyto dvě hodnoty mají mezi sebou těsný kladný vztah o hodnotě 0,9770. Taktéž Folch E., Jordana J. (1997) prokázali vztah mezi VvK a KVH vyšší než 0,9. KVH a VvK ke vztahu k úhlu pánevnímu jsme však neprokázali.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit vliv přestavěnosti u oslů na úhel pánevní. Podrobením těchto hodnot Pearsonovou korelací jsme tuto teorii nepotvrdili, ale podařilo se nám prokázat závislost kvh na vvk. U vztahů vvk a kvh vůči úhlu pánevnímu jsme opět neprokázali žádný významný vztah. Dále jsme soubor testovali na vliv pohlaví a u úhlu pánve se nám podařilo prokázat statisticky významný rozdíl mezi záuhlením pánve u hřebců a u klisen. Z výsledků zjišťujeme, že přestavěnost u oslů je typickým jevem, který ovlivňuje záuhlení celých pánevních končetin, nikoli pouze úhel pánevní.

LITERATURA

Rossel, S., Marshall, F., Peters, J., Pilgram, T., Adams, M.D., O'Connor, D., 2008. Domestication of the donkey: timing, processes and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3715–3720.

Beja-Pereira, A., England, P.R., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A.O., Abdalla, M.A., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P., Luikart, G., 2004. African origin of domestic donkey. *Science* 304, 1781.

Folch, P., Jordana, J., 1997. Characterization, reference ranges and the influence of gender on morphological parameters of the endangered

Catalonian donkey breed. *Journal of Equine Veterinary Science* 17 (2), 102–111.

Zechner, P., Zohman, F., Sölkner, J., Bodo, I., Habe, F., Martir, E., Brem, G., 2001. Morphological description of the Lipizzan horse population. *Livest. Prod. Sci.* 69, 163–177

Pinto L. F. B., de Almeida F. Q., Quirino C. R., de Azevedo P. C. N., Cabral G. C., Santos E. M., Corassa A., 2008. Evaluation of the sexual dimorphism in Mangalarga Marchador horses using discriminant analysis. *Livestock Science* 119, 161–166.

Kefena E., Beja-Pereira A., Han J.L., Haile A., Mohammed Y.K., Dessie T., 2011. Eco-geographical structuring and morphological diversities in Ethiopian donkey populations, *Livestock Science* 141, 232–241.

EVALUATION OF THE CONTENT OF BASIC MILK COMPONENTS OF BROWN SHORT-HAIRED GOAT DURING THE LACTATION PERIOD

ZHODNOCENÍ OBSAHU ZÁKLADNÍCH SLOŽEK V MLÉČE KOZ PLEMENE HNĚDÁ KRÁTKOSRSTÁ V PRŮBĚHU LAKTAČNÍHO OBDOBÍ

Králíčková Š., Kuchtík J.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkralic0@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Effect of stage of lactation on daily milk yield and basic milk composition (total solids, fat, total protein, casein and lactose) were evaluated using 32 goats of Brown short-haired breed which were reared on an organic farm in Olešenka. Goats were on the 1st, 2nd and 3rd lactation; 15 of them gave birth to singles and 17 to twins. Kidding occurred from January to March. During the experiment all goats were reared on permanent pasture, in one flock and under the identical conditions. Milk samplings were carried out from April to October on the average 50th, 85th, 120th, 155th, 190th, 225th and 260th day of lactation. The stage of lactation had a significant effect on all monitored parameters. The milk fat was the most variable component of the milk. On the other hand the lactose content was during the lactation very well-balanced.

Key words: goat milk, stage of lactation, composition, correlations

Acknowledgments: Sledování bylo realizováno s podporou projektu IGA TP 1/2012.

ÚVOD

Chov koz je v České republice obecně řazen mezi minoritní produkce v rámci živočišné výroby, nicméně posledních deset let je možno považovat za období opětovného rozvoje, přičemž rozvoj toho chovu byl registrován zejména v rámci ekologické produkce. V současné době je u nás chováno přes 23 000 koz (Bucek *et al.*, 2011), přičemž nejvíce rozšířenými plemeny jsou Bílá krátkosrstá a Hnědá krátkosrstá koza.

Kozí mléko je svým složením velmi podobné mléku kravskému, což umožňuje jeho poměrně široké využití pro následné zpracování. Na druhou stranu je kozí mléko často využíváno jako alternativa za již zmiňované mléko kravské, a to zejména díky své nízké alergenitě a snadné vstřebatelnosti (Mowlem, 2005). V dnešní době je spotřeba kozího mléka nízká, pouze 0,1 litr na osobu a rok, ovšem jak uvádí Hanuš *et al.* (2008) díky jeho zdravotním benefitům bude nadále stoupat i hodnota kozího mléka v lidské výživě, což by se mohlo odrazit na navýšení spotřeby.

Chemické složení kozího mléka je ovlivněno celou řadou faktorů, mezi ty velmi významné pak řadíme zejména vliv plemene, výživy a fáze laktace. Cílem našeho sledování se proto stalo zhodnocení změn složení kozího mléka v průběhu laktačního období a to tedy z pohledu vlivu fáze laktace.

MATERIÁL A METODIKA

Studie se uskutečnila na ekologické farmě Olešenka na Vysočině. Do pokusu bylo zapojeno 32 koz plemene Hnědá krátkosrstá, přičemž kozy byly na první (15 ks), druhé (10 ks) a třetí (7 ks) laktaci. Odstav kůzlat probíhal v období od konce ledna do konce března 2012, následně se začalo s dojením 2x denně pomocí strojního dojícího zařízení. Po celou dobu pokusu sestávala krmná dávka z pastvy na trvalých travních porostech (*ad libitum*), sena (*ad libitum*), minerálního lizu (*ad libitum*), 0,5 kg/kus/den mačkaného ovsa a během dojení bylo podáváno 0,5 kg/kus/den směsi pro kozy dojící (VK DRCMAN). V průběhu experimentu byly kozy chovány v jednom stádě a za shodných podmínek.

Individuální vzorky mléka byly získávány každý měsíc v období od dubna do září 2012 z ranního dojení. Získaná data byla následně, pomocí lineární interpolace, přepočítána na průměrný 50., 85., 120., 155., 190., 225 a 260. den laktace. Denní nádoj byl měřen s přesností 0,01 l. Vzorky mléka byly ihned po nadojení zchlazeny na teplotu 5-8 °C a převezeny do rozborových laboratorů na MENDELU v Brně, kde byly následně hodnoceny pomocí standardních laboratorních metod na obsahy sušiny v % (gravimetricky dle ČSN ISO 6731, 1998), tuku v % (Gerberovou metodou dle ČSN ISO 2446, 2001), bílkovin a kaseinu v % (na přístroji PRO-MILK dle ČSN 570530, 1974) a laktosu v % (polarimetricky dle ČSN 570530, 1974).

Data byla vyhodnocena s pomocí matematicko-statistického balíku STATISTICA 9.0, přičemž byl zohledněn vliv systematického efektu fáze laktace (7 tříd). Pro stanovení průkazných rozdílů byl použit Tukeyův HSD test a dále byly spočítány a vyhodnoceny Pearsonovy korelace.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky hodnocení obsahů jednotlivých složek kozího mléka v průběhu laktace jsou uvedeny v tabulce č. 1. Tabulka č. 2 uvádí přehled Pearsonových korelací mezi jednotlivými složkami kozího mléka.

Na základě statistického vyhodnocení bylo zjištěno, že fáze laktace měla průkazný ($P \leq 0,01$) vliv na denní nádoj a na obsahy tuku, bílkovin a kaseinu, dále tento faktor průkazně ($P \leq 0,05$) ovlivňoval také obsahy sušiny a laktosu v kozím mléce. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky studií, jež provedli Zeng *et al.* (1997), Kuchťík a Sedláčková (2003) a Mestawet *et al.* (2012). Z tabulky č. 1 je patrné, že dojivost (D) klesala od počátku až do konce laktace. Stejný sestupný trend zaznamenali také Zeng a Escobar (1995), Kuchťík a Sedláčková (2003), Strzałkowska *et al.* (2010). Na druhou stranu, Vacca *et al.* (2010) a Mestawet *et al.* (2012), uvádějí ve svých studiích nejvyšší D uprostřed laktace, přičemž nižší hodnoty D byly zaznamenány na počátku a na konci laktace. Dle našeho názoru je postupné snižování D spojeno se zhoršující se kvalitou pastvy.

U koz je, díky jejich sezónní laktaci, obvyklé, že obsahy sušiny (S), bílkovin (B) a tuku (T) jsou vysoké na počátku laktace, klesají se stoupající dojivostí a naopak, když se začne dojivost snižovat od 2. poloviny laktace, obsahy S, B a T začínou opět narůstat (Fekadu *et al.*, 2005). Také Strzałkowska *et al.* (2010) a Mestawet *et al.* (2012) uvádějí ve svých studiích, že obsahy S, B a kaseinu (K) jsou průkazně vyšší na počátku a na konci laktace oproti středu laktčního období. Naproti tomu, výsledky naší studie ukazují, že mezi 50. a 190. dnem laktace byly obsahy S, B a K relativně vyrovnané, nicméně na konci laktace výrazněji vzrostly, což je dle našeho mínění zapříčiněno snižující se dojivostí. Stejný trend zaznamenali Kuchťík a Sedláčková (2003), nicméně např. Aganga *et al.* (2002) uvádí u obsahů S a B trend postupného snižování již od počátku laktace. V rámci naší studie byl nejvíce proměnlivou složkou mléka tuk, ovšem od 190. dne laktace byl zaznamenán rostoucí trend jeho hodnot. Kuchťík a Sedláčková (2003) zaznamenali podobný trend, kdy mezi 35. a 163. dnem laktace byl obsah T relativně stabilní a od 163. dne následovalo postupné zvyšování jeho obsahu. Naprosto odlišný trend zaznamenali Strzałkowska *et al.* (2010) a Mestawet *et al.* (2012), když v rámci jejich studie byly nejvyšší obsahy T zjištěny uprostřed laktace. Obsah laktosu (L) byl relativně nejstálejší složkou mléka, s výjimkou 50. a 225. dne laktace. Podobně vyrovnaný trend hodnot, vyjma 100. dne laktace, zaznamenali také Zeng a Escobar (1995) a Kuchťík a Sedláčková (2003). Na druhou stranu, Vacca *et al.* (2010) zaznamenali vzrůstající trend obsahu L od počátku do konce laktace, naopak Mestawet *et al.* (2012) uvádějí ve své studii vyvyšší obsah L na počátku laktace.

Jak ukazují výsledky uvedené v tabulce 2, co se týká korelačních vztahů mezi dojivostí a jednotlivými složkami mléka, v případě naší studie byly zjištěny samé negativní a vysoce průkazné korelace. Také Kuchťík a Sedláčková (2003), Zumbo *et al.* (2004) a Vacca *et al.* (2010)

MENDELNET 2012

uvádějí v případě D vs. S, T, B (popř. K) snižování obsahu těchto složek mléka se stoupající D. Naopak v případě korelace D vs. L zaznamenali tito autoři, ve srovnání s výsledky naší studie, zvyšování obsahu L s narůstající D. Dále byly zjištěny pozitivní a průkazné korelace mezi obsahem S a obsahy T a B (popř. K), což je v souladu s výsledky studie Zenga a Escobara (1995) a Kuchtíka a Sedláčkové (2003). Navíc autoři Zeng a Escobar (1995) uvádí také vysoce průkaznou a pozitivní korelaci v případě korelace obsah S vs. obsah L, což se v rámci naší studii, shodně s Kuchtíkem a Sedláčkovou (2003), nepotvrdilo. Stejně jako ve studiích Zenga a Escobara (1995), Kuchtíka a Sedláčkové (2003) a Vacky *et al.* (2010) jsme zaznamenali, že obsahy B (popř. K) průkazně rostly se zvyšujícím se obsahem T. Co se týče korelací obsah L vs. ostatní složky, zde nebyly zjištěny žádné průkazné vztahy, shodně s výsledky Kuchtíka a Sedláčkové (2003). Naproti tomu, ve studii jež uskutečnili Vacca *et al.* (2010) bylo zjištěno, že obsah L průkazně klesal s rostoucími obsahy T a B a ve studii Zenga a Escobara (1995) se obsah L naopak průkazně zvyšoval spolu s rostoucími obsahy T a B.

Tab. 1 L.S.M a S.E.M. hodnoty dojivosti a obsahu základních složek v mléce dojných koz v průběhu laktace

Ø DEN LAKTACE	DOJIVOST (l/den)		SUŠINA (%)		TUK (%)	
	L.S.M.	S.E.M.	L.S.M.	S.E.M.	L.S.M.	S.E.M.
	**		*		**	
50.	2,81 ^A	0,195	11,39 ^a	0,205	3,21 ^{ABC}	0,137
85.	2,56 ^{AB}	0,211	10,76 ^b	0,129	2,85 ^{AC}	0,107
120	2,56 ^{AB}	0,129	10,61 ^b	0,108	2,75 ^A	0,105
155.	2,18 ^B	0,103	11,10 ^{ab}	0,152	3,36 ^{BE}	0,145
190.	1,76 ^C	0,107	11,38 ^a	0,126	3,34 ^{CE}	0,116
225.	1,50 ^C	0,104	12,21 ^c	0,251	3,96 ^D	0,168
260.	1,29 ^C	0,103	13,20 ^d	0,215	4,46 ^D	0,154
Ø DEN LAKTACE	BÍLKOVINY (%)		KASEIN (%)		LAKTOSA (%)	
	L.S.M.	S.E.M.	L.S.M.	S.E.M.	L.S.M.	S.E.M.
	**		**		*	
50.	2,82 ^A	0,051	2,09 ^A	0,036	4,22 ^a	0,086
85.	2,69 ^A	0,029	2,03 ^A	0,020	4,51 ^{bd}	0,045
120	2,82 ^A	0,035	2,07 ^A	0,023	4,36 ^c	0,016
155.	2,79 ^A	0,032	2,05 ^A	0,021	4,38 ^{ce}	0,020
190.	2,85 ^A	0,036	2,11 ^A	0,027	4,46 ^{bc}	0,034
225.	3,02 ^B	0,091	2,22 ^B	0,055	4,60 ^d	0,032
260.	3,56 ^C	0,070	2,54 ^C	0,045	4,53 ^{bde}	0,040

Mezi hodnotami v řádcích s rozdílnými písmeny (A, B, C, D) je statisticky vysoce průkazný ($P \leq 0,01$) rozdíl, ** $P \leq 0,01$; Mezi hodnotami v řádcích s rozdílnými písmeny (a, b, c, d, e) je statisticky průkazný ($P \leq 0,05$) rozdíl, * $P \leq 0,05$; NS = nesignifikantní

Tab. 2 Vzájemné korelace mezi dojivostí a jednotlivými složkami mléka dojných koz.

	SUŠINA	TUK	BÍLKOVINY	KASEIN	LAKTOSA
DOJIVOST	-0,26**	-0,25**	-0,28**	-0,24**	-0,26**
SUŠINA		0,94**	0,76**	0,74**	0,10 ^{NS}
TUK			0,57**	0,56**	0,11 ^{NS}
BÍLKOVINY				0,95**	-0,01 ^{NS}
KASEIN					-0,01 ^{NS}

** = $P \leq 0,01$ a NS=neprůkazné

ZÁVĚR

V rámci naší studie bylo zjištěno, že sledovaný systematický efekt fáze laktace průkazně ovlivňoval jak množství nadojeného mléka, tak i všechny základní obsahové složky mléka, tedy sušinu, tuk, bílkoviny, kasein i laktosu. Nejvíce variabilní složkou mléka byl tuk, naproti tomu obsah laktosy byl poměrně stabilní v průběhu celé laktace. Dále byl potvrzen, pomocí Pearsonových korelací, klesající trend všech sledovaných komponent kozího mléka spolu se zvyšující se denní dojivostí.

LITERATURA

- Aganga A. A., Amarteifio J. O., Nkile N. (2002): Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 533–543.
- Bucek P. *et al.* (2011): Ročenka chovu ovcí a koz za rok 2010. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. a Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR, Praha. ISBN 978-904131-7-7.
- Czech Technical Standard ISO No. 2446 (2010): Milk – Determination of fat content (Routine method). Czech Standards Institute, Prague, 16 pp.
- Czech Technical Standard ISO No. 6731 (1998): Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). Czech Standards Institute, Prague, 8 pp.
- Czech Technical Standard No. 570530 (1974): Methods for testing of milk and milk products. Czech Standards Institute, Prague, 108 pp.
- Fekadu B., Soryal K., Zeng S., Hekken D.V., Bah B., Villaquiran M. (2005): Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. *Small Ruminant Research*, 59: 55–63.

- Hanuš O., Genčurová V., Vyletělová M., Landová H., Kopecký J., Jedelská R. (2008): The effect of goat udder health on composition and properties of raw milk. *Folia Veterinaria*, 52, (3–4): 149–154.
- Kuchtlík J. a Sedláčková H. (2003): Composition and properties of milk in White Short-haired goats on the third lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 48: 540–550.
- Mestawet T.A., Girma A., Ådnøy T., Devold T.G., Narvhus J.A., Vegarud G.E. (2012): Milk production, composition and variation at different lactation stages of four goat breeds in Etiopia. *Small Ruminant Research*. 105: 176–181.
- Mowlem A. (2005): Marketing goat dairy produce in the UK. *Small Ruminant Research*, 60: 207–213.
- Strzałkowska N., Jóźwik A., Bagnicka E., Krzyżewski J., Horbańczuk K., Pyzel B., Słoniewska D., Horbańczuk J.O. (2010): The concentration of free fatty acids in goat milk as related to the stage of lactation, age and somatic cell count. *Animal Science Papers and Reports*, 28 (4): 389–395.
- Vacca G.M., Dettori M.L., Carcangiu V., Rocchigiani A.M., Pazzola M. (2010): Relationships between milk characteristic and somatic cell score in milk from primiparous browsing goats. *Animal Science Journal*, 81: 594–599.
- Zeng S.S a Escobar E.N. (1995): Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Ruminant Research*, 17: 269–274.
- Zeng S.S, Escobar E.N., Popham T. (1997): Daily variations in somatic cell count, composition and production of Alpine goat milk. *Small Ruminant Research*, 26: 253–260.
- Zumbo A., Chiofalo B., Liotta L., Rundo Sotera A., Chiofalo V. (2004): Quantitative and qualitative milk characteristics of Nebrodi goats. *South African Journal of Animal Science*, 34 (1): 210–212.

EVALUATION OF LINEAR DESCRIPTION OF HORSES REGISTERED IN THE STUD BOOK CZECH WARBLOOD

VYHODNOCENÍ LINEÁRNÍHO POPISU U KONÍ ZAPSANÝCH DO PLEMENNÉ KNIHY ČESKÉHO TEPLOKREVNÍKA

Králová B., Jiskrová I., Bihuncová I., Kostůková M., Sobotková E.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Bara.Kralova@seznam.cz

ABSTRACT

The objective of the grading-up of the Czech warm-blooded horse is a noble, correct and light to ride horse, which due to its temperament, character, ample and elastic movements and good health is adequate for all types of riding sports within the framework of the FEI disciplines, specially in the jumping disciplines and for free-time activities.

The objective of my dissertation work is the evaluation of the exterior of the horse of the race Czech warm-blooded based on the linear description. Further the evaluation of individual exterior traits, which fathers pass on to their offspring and the set-up of a hereditary coefficient for the specific body type traits. These traits are evaluated in such a way as to improve, after excluding the shortcomings in the body structure, movement mechanics, display of performance and with the exclusion of genetic defects and diseases, the quality and health of the bred horses. Stallion horses with at least 7 descendants were used for the evaluation and determination of the values, as well as mares which underwent a linear description of traits at the age of 3 years. Data from the year 1996 are used for this evaluation, which comprises a total of around 10300 mares and more than 500 000 records related to the linear description. When evaluating the exterior of the horses we cannot rule out other external factors which may influence the evaluation and performance of the horses at the moment of the assessment. Just as the personality of the evaluator is also not always the same.

The evaluation, description of body traits and linear description are carried out when the characteristics are registered in the breeding books, at shows, at exhibitions, or at performance tests, in some cases on the basis of an application submitted by the horse breeder. The linear description is registered by the evaluator in the description letter. The evaluated traits are: height at withers, chest girth, shin girth, type, full-bloodedness, neck length, neck tethering, topline length, loin length, loin form, length of the back, inclination of the back, shoulder blade, forefeet, forehoof, posture of the hind limbs, hindfeet, hind hoof, body width, form of the back, step spaciousness, trot spaciousness. The single traits are evaluated on a number scale with scores from 1 to 9. Score 5 is the mean, score 1 means very short, score 9, for example, means very long.

Key words: horse, linear description, evaluation, Czech warmblood

ÚVOD

Cílem šlechtění českého teplokrevníka je ušlechtilý, korektní a lehce jezditelný kůň, který na základě svého temperamentu, charakteru, prostorné a elastické mechaniky pohybu a pevného zdraví, je vhodný pro všechny druhy výkonnostního jezdeckého sportu v rámci disciplin FEI, především na skokové disciplíny a pro volnočasové aktivity.

MATERIÁL A METODIKA

Cílem mé disertační práce je zhodnocení exteriéru koně plemene Český teplokrevník na základě lineárního popisu. Dále pak vyhodnocení jednotlivých exteriérových znaků, které hřebci - otcové předávají potomstvu a stanovení hodnoty koeficientu dědivosti u jednotlivých tělesných tvarů. Uvedené znaky se hodnotí tak, aby se vyloučením nedostatků ve stavbě těla, mechanice pohybu, v projevech výkonnosti a vyloučením dědičně podmíněných genetických vad a chorob zlepšovala kvalita a zdraví chovaných koní. Pro vyhodnocení a stanovení hodnoty jsou použiti hřebci, kteří mají nejméně 7 potomků - klisen, které byly ohodnoceny lineárním popisem ve věku 3 let. K vyhodnocení jsou použita data od roku 1996 a jedná se přibližně o 10 300 klisen a více než 500 000 záznamů týkajících se lineárního popisu. Ve vyhodnocení exteriéru však nelze vyloučit vnější faktory mající vliv na hodnocení a předvedení koně při vlastním hodnocení a posuzování. Rovněž osoba hodnotitele není vždy identická.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Hodnocení, popis stavby těla a lineární popis se provádí při zápisu do plemenných knih, na svodech, chovatelských výstavách, při zkouškách výkonnosti, případně na základě individuální žádosti u chovatele. Lineární popis je zaznamenáván hodnotitelem do popisového listu. Sledované znaky jsou: Výška v kohoutku hůlková, výška v kohoutku pásková, obvod hrudi, obvod holeně, typ, rámec, ušlechtilost, délka krku, nasazení krku, délka kohoutku, délka hřbetu, tvar hřbetu, délka beder, tvar beder, délka zádě, sklon zádě, lopatka, přední spěnka, přední kopyto, postoj zadních končetin, zadní spěnka, zadní kopyto, šířka těla, tvar zádě, prostornost kroku, prostornost klusu. Jednotlivé znaky jsou ohodnoceny v rozmezí bodové stupnice 1 – 9, kdy hodnota 5 znamená průměr, hodnota 1 – například velice krátký, hodnota 9 například velice dlouhý.

ZÁVĚR

Vzhledem k pozdnímu zaslání dat z ústřední evidence chovu koní ve Slatiňanech, stále probíhá intenzivní vyhodnocování získaných údajů, kterých je k vyhodnocení před 500 000.

LITERATURA

- Dušek, J. (1992): Chov koní v Československu, 1. vydání, Brázda, 176 s., ISBN: 80-209-0168-X
Dušek, J. a kol.(2007): Chov koní, 2. vydání, Brázda, Praha, 432 s., ISBN: 80-209-0352-6

EFFECT OF FEEDING MYCOTOXIN-CONTAMINATED GRAINS FOR HEALTH, GROWTH AND PRODUCTION PROPERTIES OF LABORATORY RATS

VLIV ZKRMOVÁNÍ MYKOTOXINY KONTAMINOVANÝCH OBILOVIN NA ZDRAVOTNÍ, RŮSTOVÉ A UŽITKOVÉ VLASTNOSTI LABORATORNÍCH POTKANŮ

Krobot R., Lukešová K., Mlejnková V., Zeman L.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno Czech Republic

E-mail: xkrobot@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this project was to test the effects of low levels of mycotoxins and naturally moldy feed in the experimental compound feed. The focus of observation was monitoring the health of experimental animals and their production indicators. The ration balancer mycotoxins were included as verification of nutritional method of protection during this feeding contaminated food. Feed mixtures were contaminated with mycotoxins Vomitotoxin (DON) concentration in TM 0 - 58µg/kg and TM 100 - 581µg /kg. As absorbent was used Mykosorb (Alltech) on content of 3kg per ton of feed . During this experiment, the experiment was monitored by consumption of feed and increases weight of rats. Additions balancer groups were compared against groups without absorbent. Best group was TM 100 + A – 242.41g followed by a group of TM 100 – 241.54g.

Key words: Laboratory rats, Vomitotoxin (DON), adsorbent

Acknowledgments: This project was supported by IGA AF MENDELU BRNO No: IP 8/2012.

ÚVOD

Ověření vlivu nízkých hladin přirozeně vzniklých mykotoxinů je předpokladem pro sestavení kvalitní a plnohodnotné krmné dávky, kterou jsme schopni zabezpečit dobrý zdravotní stav chovaných zvířat a následně tak produkci bezpečných potravin. Dalším důvodem, a ne zcela zanedbatelným, je možné snížení nákladů v zemědělských podnicích v případě, že se nízké hladiny mykotoxinů projeví negativně. Ověření není možné provést na hospodářských zvířatech přímo, protože finální produkt (maso, vejce, mléko) by musel být likvidován speciálními postupy.

Plísňe (mikroskopické vláknité houby, mikromycety) jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné organismy, které vytvářejí vláknité povlaky na povrchu různých substrátů nebo jimi prorůstají. Rozmnožují se rozrůstáním hyf (vláken) nebo sporami. Mykotoxiny jsou metabolity některých plísňí rostoucích na rostlinách, krmivech a potravinách se specifickými biologickými účinky na vyšší organismy. K jejich produkci dochází za určitých podmínek, daných druhem plísně, substrátem, vlhkostí a teplotou prostředí. Metabolity plísňí pronikají do substrátu, tím kontaminují potravní řetězec a stávají se významným zdrojem alimentárních intoxikací zvířat a člověka, skupinově nazývaných mykotoxikózy. Případy hromadných mykotoxikóz jsou známy již od středověku, kdy opakovaně došlo v Evropě k zamoření obilovin paličkovců nachovou (*Claviceps purpurea*) a kontaminaci mouky jejími alkaloidy. Je známo, že v 17. století způsobovaly toxiny obsažené v žitném

chlebu halucinace. K dalšímu výskytu hromadných mykotoxikóz, a to u hospodářských zvířat, došlo před II. světovou válkou na Ukrajině při zkrmování plesnivé slámy a sena kontaminovaného pravděpodobně mykotoxiny plísně *Stachybotrys atra*, které způsobily rozsáhlé úhyny koní a skotu. Masivní výskyt mykotoxikózy byl zaznamenán ve Velké Británii v roce 1960, kdy uhynulo více než 100 000 krůřat následkem zkrmování plesnivého podzemnicového šrotu, který obsahoval toxické produkty plísně *Aspergillus flavus*, zvané aflatoxiny.

Evropská unie zavedla rozsáhlé předpisy o aflatoxinu, ochratoxinu A, deoxynivalenolu a fumonisinů pro potraviny a krmiva. Dnes i přes obrovské investice do výzkumu, prevence a kontroly mykotoxinů v potravinách a krmivech zůstává i nadále potravinářský průmysl náchylný k problému znečištění (KRSKA, BERTHILLER 2010).

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl proveden v experimentálním zařízení Ústavu výživy zvířat a pícninářství AF MENDELU v Brně (v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb).

V laboratoři byly sledovány mikroklimatické podmínky, které jsou limitovány především teplotou, jež byla měřena „DATALOGEREM S 3120“ a byla udržována v rozmezí $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dále byla stejným přístrojem monitorována stálá vlhkost vzduchu a udržována na hladině 60 % klimatizační jednotkou. Fotoperioda byla řízena uměle dle schématu 12hod. den a 12hod. noc o max. intenzitě 200 lx a konečně z podmínek chemických se sledoval obsah CO_2 ve stájovém vzduchu – max. 0,25 %, NH_3 max. 0,0025 %.

Jako experimentální model pro tento pokus byli použiti rostoucí samci laboratorního potkana outbreedního kmene *Wistar Han*. Zvířata byla do pokusu zařazena ve věku 28 dní a skupiny byly sestaveny tak, aby bylo vše v souladu s normou požadující maximální rozdíly ve hmotnosti mezi pokusnými skupinami 5g (KACEROVSKÝ, 1990).

Pokusné sledování trvalo 28 dní a bylo rozděleno do 4 týdnů. Potkani byli ustájeni v plastových klecích po 4 skupinách a pro přehledné sledování byli barevně označeni. V každé skupině bylo ustájeno 8 samců.

Krmné směsi byly sestaveny z přirozeně zaplesnivělé pšenice, jež byla do diet přidávána v zastoupení 0% a 100%. Před vlastním mícháním pokusných diet byla u pšenice provedena analýza na stanovení hladiny mykotoxinů deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu a T-2 toxinu. Poté byla kompletně sestavena pokusné krmné směsi a byly odebrány vzorky krmiv a provedeny rozborů na obsah základních organických živin (NL, vlákniny, tuku, BNLV a popela). Analýzy a chemická stanovení budou provedena podle zásad, které uvádí (KACEROVSKÝ, 1990) a podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., která stanovuje požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchování vzorků podléhající zkáze.

V průběhu pokusu byly individuálně sledovány tyto ukazatele: čistý příjem pokusných krmných směsí, zdravotní stav zvířat, hmotnostní přírůstky, příjem a konverze krmiva. Zvířata byla 1x týdně přestýlána. Zbytky nesežraných krmiv a výkaly byla skupinově odebírána, vážena a sušena. Z nich byly stanoveny: čistý příjem pokusných krmných směsí a výkaly pro stanovení koeficientů stravitelnosti organických živin (v % - sušiny, NL, vlákniny, BNLV, tuku a popela).

V průběhu pokusu byla individuálně sledována z pohledu výživy a dietetiky tyto ukazatele: čistý příjem pokusných krmných směsí, zdravotní stav zvířat, hmotnostní přírůstky, příjem a konverze krmiva.

Zvířata budou 1x týdně přestýlána. Zbytky nesežraných krmiv a výkaly byla skupinově odebírána, vážena a sušena. Z nich budou stanoveny: čistý příjem pokusných krmných směsí a výkaly pro stanovení obsahu mykotoxinů.

VÝSLEDKY A DISKUZE

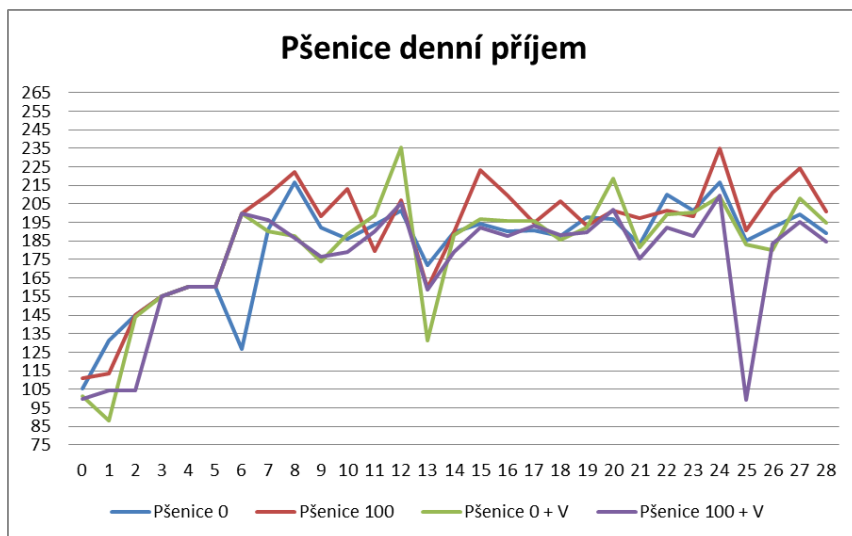
Do sledování byli použiti laboratorní potkani *Wistar: Han*. V množství 8 ks na skupinu a celkovém množství 32 ks pro 4 skupiny z toho 2 skupiny bez absorbentu a 2 skupiny s absorbentem v dávce 3kg/t krmné směsi (Mykosorb). Krmné směsi byly sestavovány dle normy potřeby živin pro potkany. Výsledné směsi byly namíchaný z pšenice o obsahu DON 58 a 581 $\mu\text{g}/\text{kg}$ z toho dále byly namíchaný směsi o celkovém obsahu mykotoxinů viz. Tab. 1.

Tab. 1 Množství mykotoxinů v kg krmné směsi

Krmivo	Vomitoxin (DON)	$\mu\text{g}/\text{kg}$
TM 0	58	$\mu\text{g}/\text{kg}$
TM 100	581	$\mu\text{g}/\text{kg}$

Zvířata byla krmena 1x denně množstvím v rozpětí od 114g/sk/den do 250g/sk/den. Příjem krmiva byl u skupin vcelku vyrovnaný v 13. Den pokusu byl zaznamenán u všech skupin znatelný propad v množství přijatého krmiva, jasnou příčinu se nepodařilo zjistit. Dále 25. den pokusu byl zaznamenán snížený příjem krmiva u 4. pokusné skupiny. Viz. Graf č. 1.

Graf. 1 Množství přijaté krmné směsi

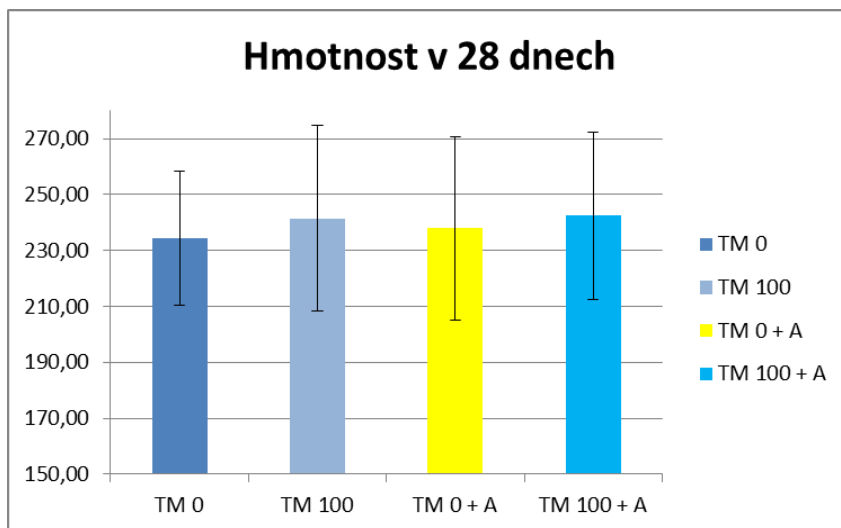


V tabulce č. 2 a 3 máme znázorněné hmotnosti jednotlivých jedinců v průběhu 5-ti vážení. V pátém týdnu vážení byla průměrná hmotnost ve skupině TM 0 – 234,43g, skupina TM 100 – 241, 54g, skupina TM 0 + A 237,94 a skupina TM 100 + A 242,41g. Na konci pokusu dosahovala nejvyššího průměrného přírůstku skupina TM 100 + A.

Tab. 2 Hmotnosti během týdenního vážení

Skupina	Počáteční hmotnost (g)	živá hmotnost v průběhu experimentu (g)				Průměrný přírůstek /28 dní (g)
		1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	
TM 0	78,65	142,34	202,94	259,69	313,08	234,43
TM 100	78,34	144,23	207,38	266,48	319,88	241,54
TM 0 + A	79,19	145,40	207,79	265,36	317,13	237,94
TM 100 + A	78,40	147,68	213,29	267,73	320,81	242,41

Tab.3 Hmotnosti skupin v 28 dnech



ZÁVĚR

Statisticky průkazný rozdíl nebyl potvrzen u žádných hmotnostních přírůstků krmených směsí TM 0 a TM 0+A. Ani u skupin krmených TM 100 a TM 100 + A nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl v hmotnostních přírůstcích. Dále nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami krmenými směsí obsahující mykotoxiny a směsmi obohacenými o adsorbent. Nejlépe dopadla skupina krmena směsí TM 100 + A s hodnotou 242,41g, dále TM 100 s hodnotou 241,54g. Pro další zkoumání by bylo třeba zopakovat pokus zda-li je rozdíl ve vyšší průměrné hmotnosti ovlivněn adsorbentem. Nebo nízká hladina mykotoxinů může ovlivnit výši přírůstků.

EFFECT OF ADDITION OF SOIL ON MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF ALFALFA SILAGE (*MEDICAGO SATIVA*)

VLIV PŘÍDAVKU PŮDY NA MIKROBIOLOGICKÉ UKAZETELE SILÁŽÍ VOJTĚŠKY SETÉ

Mlejnková V., Fröhdeová M., Lukešová K., Alba Mejía J.E., Kalhotka L., Doležal P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: veronika.mlejnкова@mendelu.cz

ABSTRACT

The present work deals with the influence of the addition of soil microbiological analysis of experimental silages of alfalfa (*Medicago sativa*, var. *Palava*). In the manufacture of experimental silages were contaminated deliberately with soil alfalfa in amounts of 0, 20 and 40 g/kg dry matter. Subsequently, the model of silage has made in different varieties and always in three repetitions. The experimental containers were removed and analyzed pooled sample.

The microbiological analyzes were observed number of colonies of clostridia, lactic acid bacteria, total plate count, amount of bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, moulds and yeasts. After statistical evaluation, it was found that the addition of soil between the versions (K, K20, K40) has not been shown statistically ($P < 0.05$) at any of the studied microorganism.

Key words: soil, microorganism, yeasts, moulds, Lactic Acid Bacteria (LAB), clostridia

Acknowledgments: The study was supported by an internal grant project (IGA) No. IP 2/2012 "The risk incidence of clostridia in silage."

ÚVOD

Vojtěška setá je významnou bílkovinnou píceinou. Vyznačuje se nejen vysokými výnosy sušiny, ale i vyšším obsahem dusíkatých látek, vitamínů, vápníku, hořčiku a beta – karotenů v porovnání s ostatními zemědělskými píceinami. Je jedním z hlavních i nejlevnějších zdrojů rostlinných bílkovin v krmných dávkách všech býložravců (DOLEŽAL, 2012). Využívá se pro zkrmování, konzervaci silážováním nebo pro výrobu sena (PADRŮNĚK, 2004). Vojtěška setá se řadí z hlediska výživy zvířat mezi objemná statková krmiva šťavnatého charakteru. Patří do skupin jetelovin, které jsou hlavním zdrojem rostlinných bílkovin s vysokou biologickou hodnotou a stimulačním mlékotvorným účinkem (ZEMAN a kol., 2006).

Kvalitní siláže vznikají konzervací čerstvé nebo zavadlé píce především mléčným kvašením nebo konzervací píce pomocí silážních aditiv. Jsou mírně nakyslá či kyselá šťavnatá krmiva, které se vyznačují příjemnou aromatickou vůní po původní surovině, ze které byla vyrobena (LOUČKA, 1998). Zdravotní nezávadnost siláží můžeme hodnotit pomocí smyslového posouzení a kvality fermentačního procesu. Fermentaci siláží ovlivňují různé druhy mikroorganismů, u kterých je možno stimulovat nebo brzdit jejich aktivitu.

Mikroflóru v silážích můžeme z mikrobiologického hlediska rozdělit na žádoucí (prospěšnou) a nežádoucí. Do nežádoucí mikroflóry řadíme mikroorganismy, které se podílejí na kažení siláže za aerobních podmínek, což jsou kvasinky, plísně a listerie. Nebo za anaerobních podmínek - klostridie a enterobakterie. Mezi žádoucí mikroorganismy řadíme bakterie mléčného kvašení (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

MATERIÁL A METODIKA

V modelovém experimentu se použila vojtěška setá (*Medicago sativa*, var. *Palava*). Byla získána z první seče z pokusných parcel a krátce zavadnuta na sušinu 33 %. Byl založen modelový pokus, kde sledovaným faktorem byl přírůstek půdy, a to v dávkách 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. Dávky přidávané půdy byly navrženy s ohledem na předpokládaný obsah popelovin v původní hmotě (okolo 8 %/kg sušiny) a na záměr, aby obsah popelovin v kontaminovaných silážích přesahoval 10 %, což je v praxi považováno za hraniční hodnotu obsahu popelovin.

V pokusu byly použity celkem tři varianty siláží vždy ve třech opakováních. Jednalo se o kontrolní variantu bez přírůstku půdy (K) – vzorky č. 1 až 3. Kontrolu s přírůstkem půdy v množství 20 g/kg sušiny původní hmoty (K20) – vzorky č. 4 – č. 6 a kontrolu s přírůstkem půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty (K40) – vzorky č. 7 – č. 9.

Takto připravená hmota o hmotnosti 6 kg byla udusána do speciálních silážních nádob, jejichž konstrukční řešení umožňuje hermetické uzavření a stálé zatížení silážované hmoty. Modelové

siláže byly po dobu 8 týdnů uskladněny v laboratoři o průměrné laboratorní teplotě 24 – 26 °C. Po otevření silážních nádob byl z každé varianty odebrán reprezentativní vzorek na mikrobiologickou analýzu.

Pro stanovení sulfidredukcujících klostridií (*Clostridium perfringens*) byl použit TSN agar a inkubace probíhala při 46 °C po dobu 24 h. Pro počet bakterií mléčného kvašení (BMK) byl použit MRS agar (Biokar Diagnostics, France), inkubace probíhala při 30 °C 72 h. Pro celkový počet mikroorganismů (CPM) bylo použito jako kultivačního média PCA agar, inkubace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin. U bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byl použit VRBG agar, inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 h. Pro stanovení kvasinek a plísní byl použit Chloramphenicol glucose agar, inkubace probíhala 120 h při 25 °C. Po inkubaci byly z Petriho misek odečteny narostlé kolonie a výsledky analýz byly vyjádřeny v CFU na gram siláže.

Výsledky byly statisticky zpracovány metodou analýzy variace a rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány Scheffeho testem v programu Statistica 10. Byly sledovány rozdíly mezi všemi variantami bez přídavku i s přídavkem půdy. Pokud jsou v tabulce uvedeny shodné indexy, pak nebyl po vyhodnocení výsledků statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Jsou-li indexy odlišné, byl prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Data jsou v textu prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (dále jen sm.od.).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentu bylo zjistit pomocí mikrobiologické analýzy vliv přídavku půdy na výskyt klostridií v pokusných silážích. Do pokusu byly zahrnuty kromě klostridií i bakterie mléčného kvašení, celkový počet mikroorganismů, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, plísně a kvasinky.

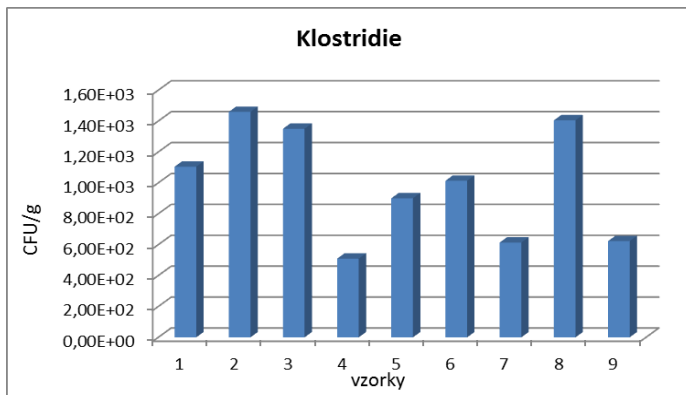
Přídavek půdy neměl vliv na zvýšení počtu klostridií v silážích. Mezi jednotlivými variantami (K, K20 a K40) nebyl statistický průkazný rozdíl ($P < 0,05$) (tab. 1).

Tab. 1: Klostridie

varianta	průměr \pm sm.od.	indexy
K	1,30E+03 \pm 1,48E+02	a
K20	8,08E+02 \pm 2,16E+02	a
K40	8,80E+02 \pm 3,71E+02	a

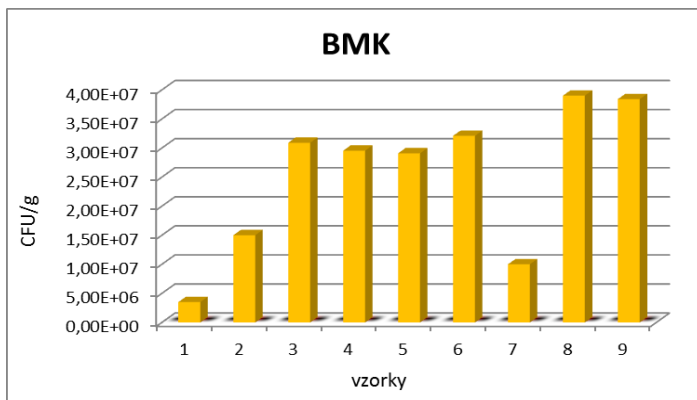
V grafu 1 jsou uvedeny počty kolonií klostridií, které dosahovaly maximální koncentrace do $1,5 * 10^3$ CFU/g. Dle ZEMANA a kol. (2006) je kvalita siláže velmi dobrá, pokud počty spor klostridií v 1 g siláže jsou do 5000.

Graf 1: Klostrídie



DOLEŽAL a kol. (2006) uvádí, že bakteriím mléčného kvašení v silážní hmotě konkurují kvasinky. Nejvyšší počty kolonií bakterií mléčného kvašení byly řádově 10^7 CFU/g (graf 2). U BMK obecně platí, že čím vyšší obsah těchto bakterií, tím je usnadněn proces primární fermentace.

Graf 2: Bakterie mléčného kvašení

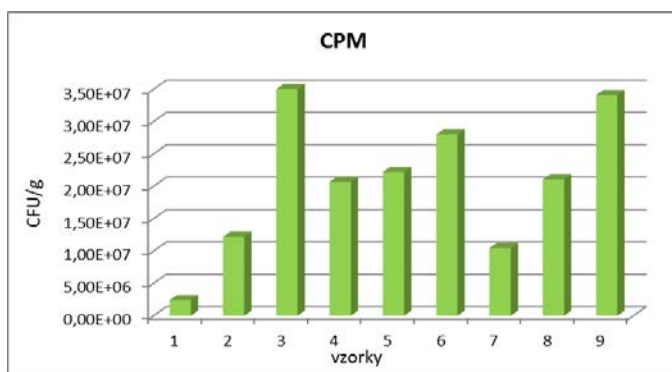


U bakterií mléčného kvašení nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantami K, K20 a K40 (tab. 2).

Tab. 2: *BMK*

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,65E+07 ± 1,12E+07	a
K20	3,02E+07 ± 1,32E+06	a
K40	2,91E+07 ± 1,35E+07	a

Celkový počet mikroorganismů se řádově pohyboval do 10^8 CFU/g u neošetřené varianty (K), s přidavkem půdy 20 a 40g/kg sušiny hmoty (graf 3). Tato skupina mikroorganismů byla stanovována pro zjištění celkové úrovně mikrobiálního osídlení siláží.

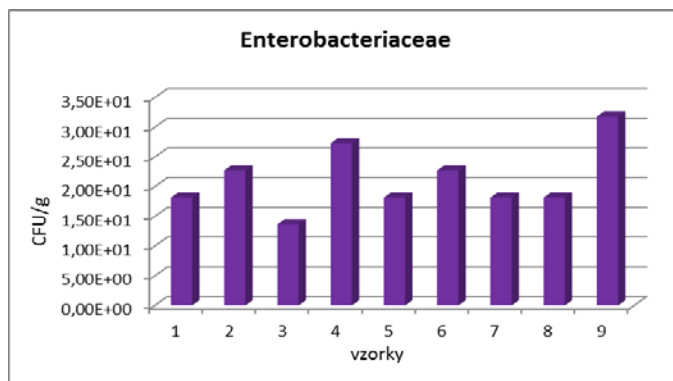
Graf 3: *Celkový počet mikroorganismů*

U celkového počtu mikroorganismů nebyl statisticky průkazný rozdíl po přidavku půdy (tab. 3).

Tab. 3: *CPM*

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,67E+07 ± 1,38E+07	a
K20	2,36E+07 ± 3,16E+06	a
K40	2,19E+07 ± 9,67E+06	a

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* se ve vzorcích vyskytovaly jen v nepatrném množství (graf 4). Tyto bakterie indikují fekální znečištění siláží.

Graf 4: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

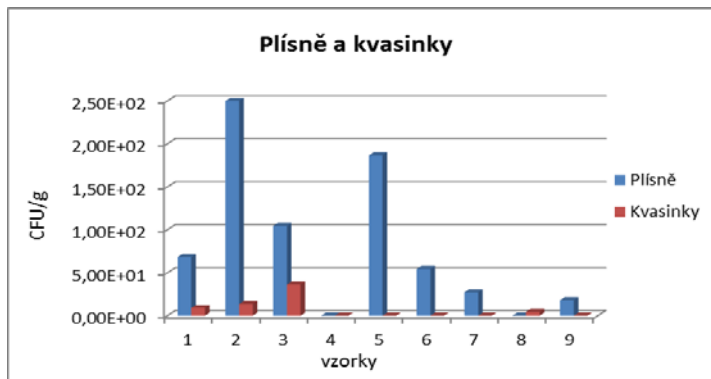
U bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebyl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi jednotlivými variantami (tab. 4).

Tab. 4: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,82E+01 ± 3,71E+00	a
K20	2,27E+01 ± 3,71E+00	a
K40	1,82E+01 ± 0,00E+00	a

Zdravotním i nutričním problémem v silážích jsou plísně, které patří mezi nežádoucí mikroorganismy. Signalizují nízkou hygienu a špatné skladovací podmínky. V současné době zatím nejsou zavedeny limity na přípustné množství plísní a kvasinek. Dle ZEMANA a kol. (2006) se všeobecně považuje za ještě vyhovující koncentrace plísní do 10^5 CFU/g, ale zpravidla jsou krmiva považována za zkažená a nezkrmitelná, pokud je koncentrace plísní vyšší než 10^6 či 10^7 CFU/g. Toto potvrzuje rovněž MUDŘÍK a kol. (2006). Vzorky pokusných siláží nebyly viditelně zaplísněné. Maximální počet plísní byl řádově do 10^3 CFU/g (graf 5). Uvedená hodnota vyhovuje hygienické kvalitě pokusných siláží. Kvasinky jsou považovány za hlavní příčinu aerobní nestability siláží. K zahřívání siláží dochází při činnosti kvasinek a zvýšení jejich koncentrace nad 10^7 či 10^8 CFU/g. Limity počtu kvasinek by měly dle ZEMANA a kol. (2006) dosahovat maximální koncentrace do 10^4 CFU/g. Maximální hodnoty kvasinek (graf 5) dosahovaly řádově do 10^1 CFU/g.

Graf 5: Plísňe a kvasinky



U kvasinek se zvyšujícím se množstvím přidané půdy se počet kvasinek snižoval (tab. 5), ale nebyl mezi jednotlivými variantami prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). U plísňí také nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl (tab. 5).

Tab. 5: Plísňe a kvasinky

mikroorganismus	varianta	průměr ± sm.od.	indexy
plísňe	K	1,42E+02 ± 8,07E+01	a
	K20	8,03E+01 ± 7,82E+01	a
	K40	1,36E+01 ± 1,36E+01	a
kvasinky	K	1,97E+01 ± 1,19E+01	a
	K20	0,00E+00 ± 0,00E+00	a
	K40	1,52E+00 ± 2,14E+00	a

ZÁVĚR

U kvasinek se zvyšujícím se množstvím půdy klesaly jejich počty, ale nebyl statisticky průkazný rozdíl. Bylo potvrzeno, že vliv přídatků půdy v množství 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty nebyl mezi jednotlivými variantami (K, K20, K40) u žádného mikroorganismu statisticky prokázán ($P < 0,05$).

LITERATURA

Doležal, P. a kol. (2012): Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat. Mendelova univerzita v Brně, Vydavatelství Baštan: 183.

Doležal, P. (2006): Konzervace, skladován a úpravy objemných krmiv (Přednášky), 1. vyd., MZLU, Brno, 247 s.

Driehuis, F., Elferink SJWH. (2000): Wet. Quart 22, 212 - 217 s.

Loučka, R. (1998): Charakteristika kukuřice jako krmiva. Kukuřice. Kněževes: VP AGRO, s. 110 - 114.

Mudřík, Z., a kol. (2006): Základy moderní výživy skotu, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 270 s.

Padrůněk, S., Drevjani, L., Kozel, V. (2004): Holštýnský svět, 1. vyd., UNIPRESS Turnov: 168 - 179.

Zeman, L. a kol. (2006): výživa a krmení hospodářských zvířat, 1. Vyd., Profi Press s.r.o.: 104 - 105.

EVALUATION OF COMPOUND DOSE OF HORSES

HODNOCENÍ KRMNÝCH DÁVEK KONÍ

Mrázková E., Mareš P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: emrazkova@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate feed rations horses. Rations were evaluated in higher animals from the perspective of feed and food business specialists. Experimental observation was made in the riding stable in Rajnochovice. Rated ration consisted of meadow hay, green forage, oats and mineral lick. The observed group of horses consisted of 15 mares. The mares were evaluated ration for each individual separately. We consider feed and took samples for laboratory determination of nutrients. In addition, we conducted horses weighing and evaluating their fitness for better control of the level of nutrition. Of intake of nutrients were compared with the standard. Based on the results of comparison of nutrient needs, and it was found that mares receive appropriate amount of the SE. SNL once some mares take more than their daily requirement. For these horses, but did not experience any unusual behavior. SNL is an increased amount of horses nowadays almost normal and NL without increasing the food. According to the 1989 NRC does not need to increase NL to work, but according to NRC 2007, NL increase the work is needed. Opinions are therefore variously different. In my opinion, there is an increased need to work on NL logic to the renewal and growth of muscle tissue.

Key words: horses, horse nutrition, nutrient

ÚVOD

Pro život koní je jedním z nejdůležitějších faktorů výživa. Problematika výživy a krmení koní je na rozdíl od ostatních druhů hospodářských zvířat složitější, protože užitkovost koně není objektivně měřitelná. Navíc úroveň krmení je dána jeho individualitou. Výživa ovlivňuje jejich zdraví, sportovní výkony, reprodukci a růst. Nejde jen o materiální substrát – tedy krmivo, ale i o vlastní technologii krmení tj. způsob jeho dávkování a čas podávání, množství a jakost krmiva včetně jeho vlivu na organismus.

Technika a způsob výživy je určován výživným stavem koně, kondicí a produkčním či sportovním zaměřením. Vždy záleží na celkovém zdravotním stavu koně, který může být fyziologický nebo patologický. Dále záleží na stavu tělesných rezerv, celkovém složení těla, způsobu a průběhu látkové přeměny, odolnosti a výkonnosti koně.

Při sestavování krmných dávek je třeba si uvědomit, v jakých klimatických podmínkách se zvíře nachází, dále se musíme zamyslet nad jeho zdravotním stavem, výkonností a reprodukční aktivitou.

MATERIÁL A METODIKA

Kontrolní sledování bylo prováděno v jezdecké stáji Rajnochovice, která se zabývá chovem koní plemene hafling, apaloosa a paint horse. Je to soukromá stáj, kde je ustájeno 36 koní různého plemene, pohlaví a věku.

Hodnocení úrovně výživy bylo stanoveno na základě znalosti plemene, pohlaví, věku, pracovního zatížení, denního režimu, techniky krmení a kvality jednotlivých krmiv. Krmné dávky byly posuzovány během několikaměsíčního pozorování a odběru individuálních krmných dávek v období června až srpna.

Nejprve byly odebrány vzorky krmiva podle nařízení komise 152/2009. Pro zajištění objektivity byly vzorky objemných krmiv odebírány z již nadávkované krmné dávky. Přímou na místě jsme provedli smyslové hodnocení sena podle Doležala, 2006. U krmiva jadrného byly kontrolní partii zásobníky s krmivem určené pro meziskladování ve stáji o celkovém objemu cca 250 kg. Vzorky byly převezeny do laboratoře v Brně, kde byl stanoven obsah sušiny, popela, dusíkatých látek, tuku, vlákniny, NDF a ADF. Tyto hodnoty byly stanoveny podle postupů uvedených Kacerovským, 1990.

Pro pozorování jsme vybrali 15 klisen různého věku, zátěže a reprodukčního cyklu. Všechny tyto klisny jsme zvážili pro přesné zjištění hmotnosti. Dále bylo provedeno bodové hodnocení kondice podle šestistupňového schématu dle Wright, 1998. Bodování tělesné kondice zahrnovalo prohmatání a vizuální posouzení stupně tučnosti různých oblastí těla koně, jako je oblast žeber, krku, kohoutku, ramen a kořene ocasu.

Krmnou dávkou tvořilo, luční seno, pastva a celý oves. Jednotlivé dávky sena a ovesa byly zváženy digitální vahou a množství přijaté pastvy bylo zjištěno kvalifikovaným odhadem.

K výpočtu potřeby jednotlivých živin bylo použito norem NRC, 2007 a opravdová spotřeba byla vypočítána na základě výsledků z pozorování.

Vlastní hodnocení

Všechny klisny byly ustájeny individuálně v boxech o velikosti 4x4 m, kde podestýlku tvořily dřevěné piliny. Napájení bylo společné pro všechny koně z venkovního napajedla. Pět těchto klisen již bylo po ohřebení a čtyři byly březí. Všechny klisny byly ve střední pracovní zátěži pod sedlem, kde byly využívány k rekreačnímu ježdění denně na 3 hodiny v kroku a klusu.

Denní krmný režim těchto klisen byl následující. 2x denně jsou krmeny objemným krmivem a to senem, které je předkládáno na zem, ráno v 7 hodin a večer ve 20 hodin. Oves dostávají 2x denně vždy po nakrmení senem tedy asi po hodině. Tyto klisny mají možnost pastvy 8 hodin denně. Tento denní režim koní byl po celou dobu pozorování stejný.

Smyslové posouzení sena bylo prováděno podle Doležala, 2006 a hodnotila se vůně, barva, struktura a znečištění. Podle součtu přidělených bodů jsme seno zařadili do určité jakostní třídy.

Potřeba dusíkatých látek a stravitelné energie pro koně byla vypočtena na základě vzorce, který uvádí NRC, 2007.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování jsme zjistili, že všechny klisny podléhají stejnému dennímu režimu. Podle Lawrence, 1998 stejně důležitou roli hraje správná volba krmiv, doba krmení, množství krmiva, ale i předkládání krmiv ve správném pořadí. Bylo zjištěno, že krmení sena před koncentrovanými krmivy má pozitivní vliv na stabilitu střevní mikroflóry. Navíc ve stresu hodně koní přijímá krmivo rychle a nedostatečně žvýká. Speciálně u koní, kteří přijímají velké množství koncentrovaných krmiv, to může mít za následek vznik žaludečních vředů. Proto u pozorovaných klisen ranní krmení v 7 hodin objemným krmivem (senem) je hodnoceno jako vhodné pořadí předkládání krmiv, kdy po 1 hodině následuje krmení ovsem. Během dne klisny pracují 3 hodiny pod sedlem vždy po 1,5 hodině dopoledne i odpoledne. Zbytek volného času během dne (což je 8 hodin) jsou klisny na pastvě, kde mají i neustálý přístup k vodě z napajedla. Ve 20 hodin večer jsou klisny zaváděny zpět do boxů, kdy opět dostávají seno a oves ve stejné posloupnosti jako ráno. Jednotlivé dávky krmiv jsou uvedeny v tabulce č. 2. V každém boxu má klisna k dispozici minerální liz, ale nevhodou je, že v boxu nemají napáječky, takže během noci nemají přístup k vodě. V tomto případě bych doporučila ve stáji doplnit automatické napáječky. Technika krmení odpovídá fyziologickým potřebám předmětných kategorií klisen. Díky této technice chovu jsou klisny pod každodenním ošetrovatelským dohledem. Využití pastvin hodnotím velmi pozitivně. Klisny mají každodenní pohyb na čerstvém vzduchu, což má velmi pozitivní vliv na jejich zdraví a kondici. Kondice

MENDELNET 2012

jednotlivých klisen se pohybuje v rozmezí 2,5 – 3,5. Většina klisen má ohodnocení 3 BSC což je optimální kondice. Klisna číslo 1. a 5. mají hodnotu BSC 2,5, což může být způsobeno tím, že jsou tyto klisny v laktaci. Naopak klisna číslo 4. byla již před laktací mírně obézní a po porodu pomalu začíná ubývat na váze. Číslo 11. a 14. jsou klisny, které jsou dobře krmitelné, a proto mají vyšší ohodnocení BSC.

Tab. 1 Seznam klisen se základními údaji

číslo	jméno klisny	hmotnost/kg	plemeno	věk/roky	kondice	stav
1	CINDA	437	hafling	16	2,5	březí-3měs.+laktace
2	BONA	466	hafling	15	3	březí-3měs.+laktace
3	CILLI	431	hafling	12	3	březí-3,5měs+laktace
4	CRAZY	446	hafling	7	3,5	laktace
5	LYSI	528	apaloosa	11	2,5	laktace
6	DORA	456	hafling	18	3	0
7	CHELSEA	420	hafling	3	3	0
8	DORYS	434	hafling	6	3	0
9	DAYSI	429	hafling	11	3	0
10	CIMBRLI	435	shagia arab x hafling	8	3	0
11	LILI	523	apaloosa	7	3,5	0
12	AMÁLKA	498	apaloosa	4	3	0
13	LAKY	557	paint horse	8	3,5	březí-3měs.
14	ANGEL	458	QHxhafling	5	3	0
15	GERNEA	497	QHxhafling	5	3	0

Tab. 2 Spotřeba krmiva během dne

číslo	jméno klisny	sušina sena kg/den	sušina pastvy kg/ den	sušina ovsa kg/den	celkem	celkem sušiny	% přijatého krmiva z živ.hmot.těla
1	CINDA	5,44	2,17	4,18	21,87	11,79	2,7
2	BONA	7,03	2,36	3,52	23,91	12,92	2,8
3	CILLI	6,82	1,97	3,52	21,67	12,31	2,9
4	CRAZY	6,59	2,36	3,52	23,41	12,47	2,8
5	LYSI	7,25	2,36	4,40	25,15	14,01	2,7
6	DORA	6,62	2,36	0,88	20,45	9,87	2,2
7	CHELSEA	7,45	1,97	0,88	19,38	10,30	2,5
8	DORYS	7,28	1,97	0,88	19,19	10,13	2,3
9	DAYSI	7,39	1,97	0,88	19,31	10,24	2,4
10	CIMBRLI	6,97	1,97	0,88	18,84	9,82	2,3
11	LILI	7,46	2,36	0,88	21,39	10,70	2,0
12	AMÁLKA	7,78	1,97	0,88	19,75	10,63	2,1
13	LAKY	8,39	2,36	0,88	22,44	11,64	2,1
14	ANGEL	7,76	1,97	0,88	19,73	10,61	2,3
15	GERNEA	7,17	2,36	0,88	21,07	10,42	2,1

V tabulce číslo 2 jsou uvedeny spotřeby jednotlivých krmiv za 1 krmený den. V posledním sloupci je uvedeno % přijatého krmiva ze živé hmotnosti těla klisny, které se pohybuje od 2,0 do 2,9 %. Podle MEYERA, 2003, by se spotřeba krmiva měla pohybovat mezi 1,5 – 3,5 % ze živé hmotnosti koně. Tím je tedy zřejmé, že klisny dostávají správné množství sušiny krmiva.

Výsledky smyslového hodnocení sena

Jakostní znaky sena	body
Vůně: Aromatická – senná, výrazná	5
Barva: olivově zelená, málo změněná	5
Struktura: bohaté olistění, na pohmat měkké a jemné seno	7
Znečištění: téměř žádné (velmi malá prašnost)	3
Celkem bodů	20

Podle získaných bodů jsme seno zařadili do jakostní třídy jedna – velmi dobrá.

Výsledky analýzy živinového složení krmiv je v tabulce č. 3. Nižší obsah NL a VL v seně nám poukazuje na dobrou kvalitu sena.

Tab. 3 Nutriční hodnoty krmiv

	obsah E	SUŠINA	NL	SNL	VL
seno	7,86	889	87,1	47,8	287,2
pastva	1,86	197	30,3	19,8	45,8
oves	11,41	880	113,4	89,6	111,7

Tab. 4 Porovnání potřeby a spotřeby SNL a SEK

číslo	jméno klisny	NRC potřeba SEK/MJ	NRC potřeba SNL/ g	příjem SEK/MJ	příjem SNL/g
1	CINDA	131,8	892,2	129,4	935,9
2	BONA	139,1	934,0	135,7	974,1
3	CILLI	130,2	890,3	130,1	923,0
4	CRAZY	134,1	871,2	131,8	950,2
5	LYSI	154,7	981,4	150,4	1075,2
6	DORA	86,5	374,3	93,7	683,3
7	CHELSEA	81,3	357,9	97,3	688,2
8	DORYS	83,3	364,3	95,8	679,1
9	DAYSİ	82,6	394,7	96,7	684,8
10	CIMBRLI	83,5	364,8	93,0	662,4
11	LILI	95,8	404,0	101,1	728,2
12	AMÁLKA	92,4	429,8	100,2	705,9
13	LAKY	100,5	418,7	109,3	778,4
14	ANGEL	86,7	375,2	100,0	704,9
15	GERNEA	92,2	392,6	98,6	712,9

Z tabulky číslo 4 je zřejmé, že klisny přijímají téměř stejné množství SE jako je dáno normou NRC, 2007. U klisny číslo 1. – 5. mají pouze mírně zvýšené dávky SNL a klisny číslo 6. - 15. mají dvojnásobné množství SNL. Zvýšené množství SNL je u koní v dnešní době téměř běžné i bez navýšování NL v krmivu. Podle NRC 1989 není potřeba navýšení NL na práci, ale podle NRC 2007 již navýšení NL na práci potřeba je. Názory se tedy různě liší. Dle mého názoru je zvýšená potřeba NL na práci logická z důvodu obnovy a růstu svalové tkáně.

U sledovaných klisen byl příjem dusíkatých látek vyšší oproti požadavkům. Vyšší obsah dusíkatých látek koně snázejí dobře, není však důvod předkládat další bílkovinná krmiva. Zatímco množství přijímané energie dokážeme poměrně dobře ve výživě koní regulovat, u dusíkatých látek to není tak lehké, neboť i seno sklizené v pozdějších vegetačních stádiích často obsahuje cca 8 g SNL/kg, při adlibitním příjmu sena, který je tou správnou volbou, dochází přirozeně k vyššímu příjmu SNL. Při extrémně vysokých dávkách SNL (dodatek bílkovinných krmiv aniž by byly potřeba) je zbytečně zatěžována činnost jater, vyšší přítomnost amoniaku v organismu (negativní účinky na nervový systém) a také vzniká nutnost dusíkaté látky vyloučit močí, což zvyšuje potřebu vody - to může prohlubovat dehydrataci u kojících klisen a pracujících koní.

ZÁVĚR

Během hodnocení techniky krmení bylo zjištěno, že zavedená praxe koresponduje s požadavky zvířat. Sledované klisny byly v optimální kondici. Všechny byly ustájeny individuálně v boxech, díky čemuž byl možný individuální přístup při ošetřování a krmení. Podávaná krmiva byla dobré kvality, základem krmné dávky bylo kvalitní seno, zelená píce a oves. U klisen byl maximálně využíván pobyt mimo stáj.

Na základě výsledků porovnání potřeby a příjmu živin bylo zjištěno, že klisny přijímají vhodné množství SE. SNL některé klisny přijímaly jedenkrát více, než byla jejich denní potřeba. U těchto koní však nebylo pozorováno žádné nestandardní chování. Zvýšené množství SNL je u koní v dnešní době téměř běžné i bez navyšování NL v krmivu. Podle NRC 1989 není potřeba navýšení NL na práci, ale podle NRC 2007 již navýšení NL na práci potřeba je. Názory se tedy různě liší. Dle mého názoru je zvýšená potřeba NL na práci logická z důvodu obnovy a růstu svalové tkáně.

LITERATURA

DOLEŽAL, Petr a Ladislav ZEMAN. OBJEMNÁ KRMIVA A HLAVNÍ ZÁSADY PRO ZLEPŠENÍ JEJICH KVALITY. *Krmivářství*. Praha: Profi Press s.r.o., 2011, roč. 2011, č. 1. ISSN 1212-9992 MK ČR E 7525.

DRAPEROVÁ, Judith. *Kůň a péče o něj*. 1. vyd. Praha: Svojtka a Vašut, 1997. ISBN 80-7180-277-8.

FREEMAN, W. F. Feeding Management of the Equine. [online]. 2009b, [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://osufacts.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2051/ANSI-3973web.pdf>

FREEMAN, D. W., REDFEARN, D. D. *Forage for Horses*. [online]. 2009, [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2077/ANSI-3980web.pdf>

FREEMAN, W. F. Nutrients needs of horses. [online]. 2009a, [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2067/F-3997web.pdf>

LAWRENCE, Laurine. *Evaluating hay for horses: Myths and realities* (1998) Laurie Lawrence, Professor, Department of Animal Sciences, University of Kentucky, Lexington, KY 40546

MEYER, Helmut a Manfred COENEN. *Krmení koní: současné trendy ve výživě*. Vyd. 1. Překlad Bohumila Chocholová, Tomáš Kapic. Praha: Ikar, 2003, 254 s. ISBN 80-249-0264-8.

MOHELSKÝ, Martin. Výživa kojících klisen a hříbat do období odstavu. *Krmivářství*. Praha: Profi Press s.r.o., 2011, roč. 2011, č. 1. ISSN 1212-9992 MK ČR E 7525.

MOHELSKÝ, Martin. Co nás často mýlí ve výživě koní. *Krmivářství*. Praha: Profi Press s.r.o., 2011, roč. 2011, č. 6. ISSN 1212-9992 MK ČR E 7525.

Nutrient requirements of horses. 6. vyd. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007. 341 s. ISBN 978-0-309-10212-4.

ZEMAN, Ladislav. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Profi Press, c2006, 360 s. ISBN 80-867-2617-7.

ZEMAN, Ladislav. *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro koně: celost. vysokošk. učebnice pro vys. školy zeměd.* 3. vyd. Brno: MZLU, 2005, 213 s. Živočišná výroba. ISBN 80-715-7855-X.

EVALUATION OF CHOSEN FACTORS AFFECTING THE TIME SPENT OF FEEDING AT HOLSTEIN DAIRY COWS

ANALÝZA VYBRANÝCH VLIVŮ PŮSOBICÍCH NA DOBU STRÁVENOU KRMENÍM DOJNIC HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU

Musilová A., Falta D.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xmusilov@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this paper was to evaluate chosen factors affecting feeding behaviour, especially feeding time at high-production cows.

The experiment was done by monitoring a group of Holstein cows (avg. 80 cows) by on-line IP cameras with recording possibility. A number of chosen factors: delivery of fresh feed, milking, removing manure, push feed, human presence and milk yield were analysed to proof its influence on feeding time.

It was found that the above mentioned factors had influence on feeding time. Especially it was factors as return from milking parlour, delivery of fresh feed and removing manure. It seems that there is no relation between feed intake and individual milk yield production.

Key words: feeding, behaviour, feed intake, dairy cows, Holstein

Acknowledgments: This project was supported by IGA TP 1/2012 FA MENDELU.

ÚVOD

K dosažení vysoké mléčné užitkovosti a k jejímu udržení je hlavní podmínkou genetický potenciál, výživa a zdravotní stav dojnic. Z pozice chovatele je nejdůležitějším faktorem výživa, kterou společně s technikou krmení může řídit sám (BOUŠKA et al., 2006). Faktory, které mění skupinové i individuální potravní chování dojnic a příjem sušiny mají potenciální obrovský dopad na produkci, welfare, zdraví a ekonomiku podniku (BOTHERAS, 2007). Při správném managementu krmení lze dosáhnout snížení nákladů spojených s výživou na produkci jednoho litru mléka, kdy tyto výdaje mohou pokrývat třetinu až polovinu z celkových nákladů (BOUŠKA et al., 2006).

Existuje řada vlivů, kterými může být dojnice ovlivněna, když se snaží dostat ke krmivu a také příjem krmiva může být těmito vlivy omezen (GRANT, ALBRIGHT, 2011). Dostupnost krmiva, může být pro dojnice důležitější, než samotné množství poskytnutých živin (ALBRIGHT, 1993). Z nutričních faktorů je nezbytný pečlivý výběr krmných komponent dávky tak, aby byly chutné a kvalitní a přilákaly tak dojnice ke krmnému stolu. Jedním z nejdůležitějších faktorů, který mléčnou produkci ovlivňuje, je příjem sušiny (KUDRNA et al., 1998). Je potřeba se zaměřit i na frekvenci zakládání čerstvého krmiva a přihmování.

Příjem sušiny je také ovlivněn potravním chováním. To je modulováno prostředím, managementem, sociálními interakcemi mezi dojnicemi a zdravím. Na potravní chování má vliv i produkční systém, ve kterém je dojnice chována (TUCKER, 2009). V rámci prostředí zastupuje velkou úlohu teplota a vlhkost ve stáji. Příjem krmiva se snižuje u dojnic v tepelném stresu (CHASE, 2006). Podle hustoty, složení a velikosti skupiny se odráží sociální vlivy na příjem krmiva. Krávy musí mít možnost dojít ke krmivu bezpečně a musí mít dostatek prostoru pro klidný příjem krmiva (HULSEN, 2011).

U dojnic je důležitá její kondice, pořadí laktace a stupeň laktace. Zejména v první fázi laktace je vysoký příjem krmiva důležitý k udržení vysoké produkce mléka a dobrého zdravotního stavu. Laktující dojnice žerou o něco rychleji než dojnice stojící na suchu a březí. (ALBRIGHT, 1993).

Cílem práce bylo zjistit, zda vybrané faktory, užitkovost dojnic a teplota ve stáji ovlivňují četnost a dobu strávenou krmením vysokoprodukčních dojnic pomocí experimentálního pozorování.

MATERIÁL A METODIKA

Při pozorování byl použit kamerový záznam ze dvou IP kamer (s možností on-line sledování a záznamu) umístěných přímo ve velkokapacitním kravíně ŠZP Žabčice. Předmětem pozorování byla skupina dojnic holštýnského skotu s nádojem vyšším než 25 litrů mléka za den a minimálně na 2.

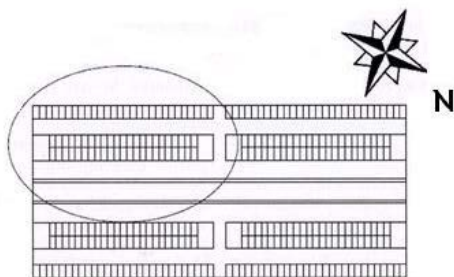
laktaci. Ustájení bylo ve formě volné boxové technologie. Krmení TMR bylo k dispozici ad libitum. Dojení probíhalo třikrát denně. Napájecí žlaby byly umístěny na každém konci ustájení.

Sledování probíhalo po dobu tří dnů ve čtyřech obdobích. Během dne snímaly kamery snímky po pěti minutách. Rozdílná délka denní doby pozorování byla způsobena z důvodu zkracujícího se denního světla a následně špatné viditelnosti na kamerových snímcích.

Tab. č. 1 – Charakteristika jednotlivých období sledování

	roční období	měsíc	průměrná teplota (°C)	denní doba pozorování	počet dojnic ve skupině (ks)
první období	léto	červenec	21,7	od 5h do 21h	80
druhé období	léto	srpen	28,27	od 5h do 20h	81
třetí období	podzim	říjen	19,09	od 5h do 19h	76
čtvrté období	podzim	listopad	3,78	od 5h do 19h	82

Obr. č. 1 Schéma ustájení sledované skupiny dojnic (WALTEROVÁ et al., 2009)



Pozorování bylo rozděleno na dva experimenty, kdy cílem prvního experimentu bylo sledovat vliv vybraných faktorů (zakládání krmiva, dojení, přihrnování, odkluzu chlévské mrvy, pohybu osob a značkování dojnic) na procentuální změny v počtu dojnic u krmného stolu během dne. Během pozorování byl z pořízených snímků sledován počet dojnic s hlavou nad krmným stolem. Byl zaznamenán také čas vybraných faktorů.

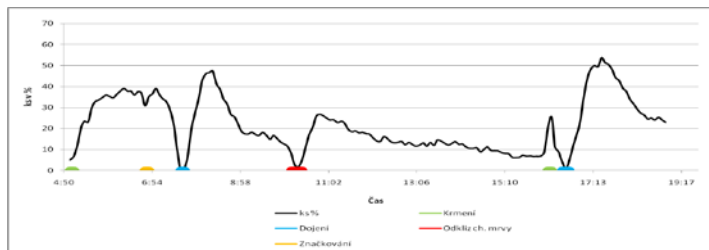
V druhém experimentu byla sledována závislost mezi aktuální průměrnou denní produkcí mléka a dobou strávenou krmním. Tento experiment byl prováděn v rámci prvního a druhého letního období, kdy na základě denního nádoje byly vybrány dvě skupiny dojnic (viz. Tab. č. 2 a Tab. č. 3). Pomocí snímků z IP kamer byl hodnocen čas strávený krmním u jednotlivých dojnic.

Výsledky byly zpracovány pomocí běžných matematicko – statistických metod v programu MS Excell a Statistica 10.0.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Během prvního experimentu bylo zaznamenáno, že zakládání čerstvého krmiva, příchod z dojírny, odkliz chlévské mrvy, přihrnování a pohyb osob v krmné chodbě pozitivně stimulují zájem dojníc o krmivo a tím byla prodloužena doba strávená krmením. Na druhé straně pohyb osob přímo ve skupině snižuje počet krav u krmného stolu. Důležitým faktorem je i možnost přístupu ke krmivu po návratu z dojírny, kdy mají dojnice velkou potřebu příjmu krmiva a neměly by z důvodu prevence mastitid ihned ulehnout. DREVJANY et al. (2004), také poznamenali, že dojnice velmi ochotně přijímají krmivo bezprostředně po dojení, a proto je nutné, aby čerstvé krmivo bylo připraveno ve žlabu před návratem zvířat do stáje. Velmi příznivá na příjem krmiva je i větší frekvence přihrnování, zejména v odpoledních hodinách. Pravidelné přísunutí krmiva k dojnicím sice zvýší zájem dojníc o krmivo, ale častější zakládání čerstvého krmiva se nevyrovná (DREVJANY et al., 2004). Neustálá dostupnost krmiva a rozdělení jeho příjmu během celého dne přispívá k zachování stabilní mikrobiální populace bacheru, která je důležitá k redukci rizika subakutní bacherové acidózy (NOCEK, BRAUND, 1985). Dodání čerstvého krmiva je tedy možnost, jak četnost podávání krmiva může významně přispět k rozdělení příjmu krmiva během dne s potenciálním důsledkem na stabilitu bacherové mikroflóry (DEVRIES et al., 2005). U všech sledování měly změny v počtu dojníc zabývajících se krmením velmi podobný průběh. Vrchol příjmu krmiva byl pozorován v ranních hodinách po založení čerstvého krmiva, po ranním dojení, po odpoledním zakládání krmiva a po odpoledním dojení (viz. **Graf č. 1**). DEVRIES et al. (2003) ve svém sledování došli také k závěrům, že dramatický nárůst počtu dojníc u krmiva lze pozorovat bezprostředně po zakládání čerstvého krmiva a po návratu z dojírny. O něco menší, ale výrazný nárůst počtu dojníc u krmného stolu byl po odklizu chlévské mrvy. Postupně klesající zájem o krmivo byl zaznamenán od poledních hodin do odpoledního krmení nebo dojení. Během této doby dojnice přicházely ke krmnému stolu pouze po přihnutí krmiva a při pohybu osob v krmné chodbě. Přizpůsobení krmného režimu přirozeným krmným návykům vede k maximalizaci příjmu krmiva (DREVJANY et al., 2004).

Graf č. 1 – Průměrný počet dojnic zabývajících se krmením pozorovaných od 5. hodiny ranní do 19. hodiny večerní za celé pozorování v %



V rámci druhého experimentu bylo zjištěno, že u dojnic v první skupině s nádojem větší než 38 kg mléka/den byl průměrný čas strávený krmením 214 minut (za dobu pozorování), z toho minimální naměřená doba strávená krmením byla 167 min a maximální doba 308 minut. Dojnice s nižším nádojem (pod 38 kg mléka/den) trávily krmením průměrně 187 minut, zjištěná minimální doba byla 167 minut a maximální doba 232 minut (viz. Tab. č. 2). Při sledování druhé skupiny bylo u skupiny dojnic s nádojem pod 30 kg mléka za den pozorováno průměrně 167 minut strávených krmením. Minimální doba strávená krmením byla 123 minut a maximální doba 228 minut. U druhé skupiny dojnic s nižším nádojem mléka byl tento průměr 146 minut, minimální doba byla 128 minut a maximální doba strávená krmením 175 minut (viz. Tab. č. 3).

Tab. č. 2 – Vliv výše aktuálního denního nádoje na dobu strávenou krmením v prvním letním období (v minutách/den)

skupina	\bar{x}	min.	max.	Sx	Vx (%)	P
I > 38 kg mléka	214	167	308	49,09	22,94	P > 0,05
II < 38 kg mléka	187	167	232	26,17	13,99	

Tab. č. 3 – Vliv výše aktuálního denního nádoje na dobu strávenou krmením v druhém letním období (v minutách/den)

skupina	\bar{x}	min.	max.	Sx	Vx (%)	P
I > 30 kg mléka	167	123	228	34,94	20,92	P > 0,05
II < 30 kg mléka	146	128	175	17,54	12,01	

V tomto sledování nebyla prokázána žádná statisticky průkazná závislost ($P > 0,05$) mezi dobou strávenou kmením a nádojem. AZIZI et al. (2009) ve své práci publikovali výsledky, které prokazují, že nádoj neměl významný vliv na frekvenci kmení a dobu strávenou kmením. Ale také poznamenal, že starší dojnice zkrmily větší množství sušiny (o 4,21 kg) a jejich příjem byl rychlejší (o 30 g sušiny za minutu více) než u dojnic na první laktaci. Koefficient korelace mezi dobou strávenou kmením a příjmem sušiny byl vyšší u skupin s vyšší dojivostí než u skupin s menší dojivostí a u dojnic na první laktaci. V další studii ALBRIGHT (1993) poznamenal, že dojnice s vyšší produkcí měly větší příjem sušiny podle zvyšujícího se množství krmné dávky, přičemž snížily dobu strávenou kmením a přežvykáváním na jednotku příjmu.

ZÁVĚR

Výsledky prvního experimentu prokázaly, že vybrané faktory (zakládání čerstvého krmiva, příchod z dojírny, odklíz chlěvské mrvy, přihmování a pohyb osob v krmné chodbě) pozitivně ovlivnily příjem krmiva vysokoprodukčních dojnic, kromě pohybu osob přímo ve skupině krav, který počet dojnic u krmného stolu snižoval. Při hodnocení druhého experimentu nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$) mezi nádojem a dobou strávenou kmením.

Z výsledků je patrné, že celkový příjem krmiva, dobu strávenou kmením a potravní chování dojnic ovlivňuje mnoho vlivů, které je potřeba sledovat a přizpůsobit jim management krmení. Při optimalizaci všech faktorů působících na výživu a techniku krmení můžeme udržet vysokou produkci, zdraví a dobrou ekonomickou situaci.

LITERATURA

ALBRIGHT, J. L.; Feeding Behavior of Dairy Cattle. Journal of Dairy Science [online]. 1993 [cit. 01.03.2012], č. 76, 485 - 498. Dostupné z: <http://www.zayand.com/AttachFiles/NUTRITION.pdf>

AZIZI, O., KAUFMANN, O., HASSELMANN, L.; Relationship between feeding behaviour and feed intake of dairy cows depending on their parity and milk yield. Livestock Science [online]. 2009 [cit. 14.02.2012], č. 122, 156 - 161.

BOTHERAS, A.; The Feeding Behavior of Dairy Cows: Considerations to Improve Cow Welfare and Productivity. Tri-State Dairy Conference [online]. 2007 [cit. 16.10.2011], s. 14. Dostupné z: <http://tristatedairy.osu.edu/Proceedings%202007/Botheras.pdf>

BOUŠKA, J., DOLEŽAL, O., JÍLEK, F., KUDRNA, V., KVAPILÍK, J., et al.; Chov dojeného skotu. Praha: Profi Press, 2006. ISBN 80-86726-16-9

CHASE, L. E.; Climate Change Impacts on Dairy Cattle. Climate Change and Agriculture: Promoting Practical and Profitable Responses [online]. 2006 [cit. 01.03.2012], s. 7. Dostupné z: <http://www.climateandfarming.org/pdfs/FactSheets/III.3Cattle.pdf>

DEVRIES, T. J., KEYSERLINGK, M. A. G., BEAUCHEMIN, K. A.; Short Communication: Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science [online]. 2003 [cit.

25.01.2012], č. 56, 4079 - 4082. Dostupné z:

http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022_03020374020X.pdf

DEVRIES, T. J., M. A. G. KEYSERLINGK a K. A. BEAUCHEMIN. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* [online]. 2005 [cit.

25.01.2012], č. 88, 3553 - 3562. Dostupné

z:<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS002203020573040X.pdf>

DREVJANY, L., KOZEL, V., PADRŮNĚK., S.; Holštýnský svět. 1. vyd. ZEA Sedmihorky, 2004. 345 s.

GRANT, R. J., ALBRIGHT, J. L.; Effect of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* [online]. 2001 [cit. 12.02.2012], č. 84, 156 - 163. Dostupné z: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS002203020170210X.pdf>

HULSEN, J., Cows signals: Praktický průvodce pro chovatele dojníc. Praha: ProfiPress, 2011. 98 s. ISBN 978-80-86726-44-1

KUDRNA, V., ČERMÁK, B., DOLEŤAL, O., FRYDRYCH, Z., HERRMANN, H., et al.; Produkce krmiv a výtiva skotu. Praha: Agrospoj, 1998

NOCEK, J. E., BRAUND, D. G.; Effect of feeding frequency on diurnal dry matter and water consumption, liquid dilution rate, and milk yield in first lactation. *Journal of Dairy Science* [online]. 1985 [cit. 01.03.2012], č. 68, 2238 - 2247. Dostupné z:

<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030285810961.pdf>

TUCKER, C. B.; Behaviour of Cattle. www.cabi.org [online]. 2009 [cit. 02.02.2012]. Dostupné z:

WALTEROVÁ, L., ŠAROVSKÁ, L., FALTA, D., a CHLÁDEK, G., Vztah mezi vybranými klimatickými prvky uvnitř a vně stáje dojníc v průběhu roku. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 2009, č. 4, 125 – 132

THE EFFECT OF REPOPULATION OF SOWS ON SELECTED REPRODUCTIVE PARAMETERES

VLIV REPOPULACE PRASNIC NA VYBRANÉ REPRODUKČNÍ UKAZATELE

Nevrkla P., Čechová M., Hadaš Z.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: NevrklaPavel@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the differences in performance in selected reproductive parameteres in sows before repopulation and after repopulation in a selected utilitarian breed. The monitored population formed 160 sows. The population before repopulation formed 80 sows from 1st to 5th litter. The repopulated (newly brought) population formed 80 gilts at the 1st litter. The collected values show the total number of delivered piglets of 12.21 ± 2.63 . After the repopulation a higher total number of delivered piglets was recorded (15.96 ± 2.20). The number of piglets born alive was 11.25 ± 2.43 before repopulation and 14.63 ± 2.09 after repopulation. The number of still-born piglets was 0.96 ± 0.99 before repopulation against 1.30 ± 1.36 after repopulation and the number of weaned piglets was 9.69 ± 1.75 against 13.44 ± 1.79 . The statistical analysis proved highly significant differences ($P < 0.001$) in the total number of piglets, the number of born alive piglets and the number of weaned piglets. The numbers of still-born piglets showed no significant difference. The experiment proved a positive effect of repopulation on the reproductive performance of sows.

Key words: repopulation, reproduction, sow, piglet

Acknowledgments: This study was supported by the project of MENDELU internal grant agency, Faculty of Agriculture No TP 1/2012 and the NAZV Project No. QI 111A166 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

ÚVOD

Vliv na rentabilní produkci prasat má zejména plodnost prasnic. V rámci optimalizace chovu prasat je důležité zaměřit pozornost na počet živě narozených a odchovaných selat na prasnici. Tyto počty byly vždy pokládány za důležitý ukazatel úspěšnosti chovu. Neustále se poukazuje na to, že právě počet odchovaných selat na prasnici je příčinou problémů v našich chovech a také, že je zásadní rozdíl mezi našimi a úspěšnými zahraničními chovy (Rozkot, 2012). Optimální zajištění reprodukce je vedle různých endogenních a exogenních faktorů ovlivněno zdravotním stavem, který se následně promítá i do odchovu a výkrmu prasat, čímž je ovlivněna celá rentabilita chovu (Lambert et al., 2012). Špatná zdravotní situace v chovech může být řešena systémem radikálního ozdravení metodou repopulace. Tímto způsobem jsou stáda ozdravena od různých agens a zejména od nemoci reprodukčního a respiračního syndromu (PRRS), která negativně ovlivňuje jak plodnost, tak životaschopnost selat. Výskyt PRRS v České republice je dnes v mnoha chovech prasat endemický (Pulkrábek et al., 2005). Trvalý výskyt PRRS představuje pro chovatele především velký ekonomický problém, který se kumuluje přímými ztrátami při krátkodobém akutním vzplanutí onemocnění, ale také v důsledku déle trvajících nízké užitkovosti. Úspěšnost ozdravení a eliminace PRRS je do značné míry ovlivněna systémem a organizací provozů a možnostmi chovatelů realizovat podmínky vnější i vnitřní ochrany jednotlivých farem před zavlečením infekce. Je možné předpokládat, že u vysoko produkčních zvířat prostých většiny infekčních nemocí dojde k ekonomické výhodnosti z hlediska lepší užitkovosti prasnic i zvýšení užitkovosti dalších kategorií prasat (Roehe and Kalm, 2000).

MATERIÁL A METODIKA

Cílem sledování bylo vyhodnotit rozdíly v užitkovosti ve vybraných reprodukčních ukazatelích u stáda prasnic před ozdravením a po provedení repopulace u vybraného chovu.

Sledování se uskutečnilo v užitkovém chovu prasnic, přičemž do pokusu bylo zahrnuto 160 prasnic. Před repopulací bylo hodnoceno 80 prasnic od 1. do 5. vrhu. Repopulovaný (nově naskladněný) soubor tvořilo 80 prasniček na 1. vrhu. Zvířata z obou skupin byla stejné hybridní kombinace. Prasničky byly naskladněny do asanované stáje. V kategorii zapouštěných prasnic byly obě skupiny prasnic ustájeny individuálně po dobu 1 měsíce a následně byly březí prasnice převedeny do skupinových kotečů po 6 - 8 kusech do doby průměrně 5-ti dnů před porodem. V kategorii vysokobřeží, rodící a kojící byly prasnice ustájeny v individuálních porodních kotečích s celoroštovou podlahou. U výše zmiňovaných kategorií bylo prováděno automatické zakládání krmiva. Výměna vzduchu, jak v sekci porodny, tak u prasnic zapouštěných a březích byla řešena také automatickým způsobem. Optimální mikroklima pro selata bylo zajištěno pomocí výhřevných desek. Od 7. dne po narození byla selata příkrmována. Selata byla odstavována v průměrném věku

28 dnů. U obou skupin prasnic (před a po repopulaci) byla sledována fenotypová úroveň vybraných ukazatelů reprodukce:

- počet všech narozených selat,
- počet živě narozených selat,
- počet mrtvě narozených selat,
- počet odstavených selat.

Získané reprodukční údaje ozdraveného stáda byly porovnány s údaji získaných od prasnic před repopulací. Byly vyhodnoceny základní statistické charakteristiky pro hodnocené ukazatele a to průměr, směrodatná odchylka a průkaznost mezi skupinami prasnic, kde *** značí $P < 0,001$, ** značí $P < 0,01$, * značí $P < 0,05$ a – značí $P > 0,05$. Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem STATISTICA verze 9.0. a Microsoft Excel 2010. Data byla vyhodnocena za použití t-testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V tabulce 1 jsou znázorněny počty všech narozených selat na vrh. Před repopulací bylo všech narozených selat $12,21 \pm 2,63$. Po provedení repopulace byl zaznamenán vyšší počet všech narozených selat ($15,96 \pm 2,20$). Po statistickém zhodnocení byl prokázán mezi skupinami prasnic v počtu všech narozených selat velmi vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$).

Arango et al. (2006) uvádí ve své práci, která se zabývala optimalizací chovu selat, 11,8 všech narozených selat na jeden vrh, což je hodnota nižší, než byla dosažena u obou skupin prasnic. Vyšší hodnoty prokázali Vanderhaeghe et al. (2011), kteří při hodnocení porodů prasnic uvádí u hybridních prasnic 13,8 všech narozených selat. Výsledky v počtu všech narozených selat uvedené v tabulce 1 lze považovat před repopulací za srovnatelné s běžnými užitkovými chovy. Po provedení repopulace jsou výsledky v hodnoceném ukazateli výborné.

Tab. 1 Základní statistické charakteristiky počtu všech narozených selat na vrh

Ukazatel	n vrhů	\bar{x}	S_x	X_{\min}	X_{\max}	Průkaznost
Před repopulací (ks)	80	12,21	2,63	4	19	***
Po repopulaci (ks)	80	15,96	2,20	11	20	
Celkem	160	-	-	-	-	-

*** ($P < 0,001$)

V tabulce 2 jsou zaznamenány počty živě narozených selat ve vrhu. Před repopulací bylo živě narozených selat $11,25 \pm 2,43$. Po provedení repopulace bylo zaznamenán vyšší počet živě

narozených selat $14,63 \pm 2,09$. Po statistickém zhodnocení byl prokázán mezi skupinami prasnic v počtu živě narozených selat velmi vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$).

Počet živě narozených selat lze dle Rozkota (2012) považovat za důležitý aspekt reprodukce. Kilbride et al. (2012) uvádí při běžném zdravotním stavu prasnic 11 živě narozených selat na vrh, této hodnoty bylo dosaženo u prasnic před repopulací. Počet živě narozených selat (14,63) u skupiny prasnic po provedení repopulace vypovídá o dobrém zdravotním statusu prasnic.

Tab. 2 Základní statistické charakteristiky počtu živě narozených selat na vrh

Ukazatel	n vrhů	\bar{x}	S_x	X_{\min}	X_{\max}	Průkaznost
Před repopulací (ks)	80	11,25	2,43	4	18	***
Po repopulací (ks)	80	14,63	2,09	11	19	
Celkem	160	-	-	-	-	-

*** ($P < 0,001$)

Údaje v tabulce 3 znázorňují počty mrtvě narozených selat na vrh. Před repopulací bylo mrtvě narozených selat $0,96 \pm 0,99$ ve vrhu. Po provedení repopulace byl zaznamenán nepatrně vyšší počet mrtvě narozených selat ($1,30 \pm 1,36$). Po statistickém zhodnocení nebyl prokázán mezi skupinami prasnic statisticky signifikantní rozdíl u mrtvě narozených selat.

Nielsen et al. (2002) u zdravotně problémových prasnic zaznamenali 2 až 6 mrtvě narozených selat na vrh. Nicméně o mrtvě narozených selatech rozhoduje velmi významně velikost a pořadí vrhu (Borges et al., 2005; Canario et al., 2006; Lucia et al., 2002). Výsledky v tabulce 3 vykazují mírně zvýšený počet mrtvě narozených selat po provedení repopulace. Tento fakt je způsoben tím, že prasnice byly na 1. vrhu a měly vysokou četnost všech narozených selat.

Tab. 3 Základní statistické charakteristiky počtu mrtvě narozených selat na vrh

Ukazatel	n vrhů	\bar{x}	S_x	X_{\min}	X_{\max}	Průkaznost
Před repopulací (ks)	80	0,96	0,99	0	4	NS
Po repopulací (ks)	80	1,30	1,36	0	5	
Celkem	160	-	-	-	-	-

NS ($P > 0,05$)

V tabulce 4 jsou zaznamenány počty odchovaných selat ve vrhu. Před repopulací bylo odchováno $9,69 \pm 1,75$ selat. Po provedení repopulace byl zaznamenán zvýšený počet odchovaných selat

(13,44 ± 1,79). Po statistickém zhodnocení byl prokázán mezi skupinami prasnic v počtu odchovaných selat velmi vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$).

Počet odchovaných selat na prasnici je považován za nejdůležitější ekonomický efekt v chovu prasnic (Arango et al., 2006). Mauch et Bilkei (2004) uvádějí při hodnocení zdravotního stavu prasnic ve vztahu k reprodukci u nemocných zvířat 9,21 ± 1,02 odchovaných selat, což odpovídá údajům u hodnoceného souboru před repopulací, a u zdravých prasnic 10,11 ± 0,37 odchovaných selat, což je hodnota nižší o více jak 3 selata prokázaných v pokusu po repopulaci. Výsledky v počtu odchovaných selat zjištěné po repopulaci lze považovat za vynikající od prasnic na 1. vrhu a svědčící o přínosu repopulace.

Tab. 4 Základní statistické charakteristiky počtu odchovaných selat na vrh

Ukazatel	n vrhů	\bar{x}	S_x	X_{\min}	X_{\max}	Průkaznost
Před repopulací	80	9,68	1,75	4	12	***
Po repopulaci	80	13,44	1,79	10	18	
Celkem	160	-	-	-	-	-

*** ($P < 0,001$)

ZÁVĚR

V pokusu byl prokázán pozitivní vliv repopulace na reprodukční užitkovost prasnic. Po provedení radikálního ozdravení chovu jsou zvýšeny významné ukazatele reprodukce, které rozhodují o ekonomice chovu prasat. Hodnoty zjištěné v pokusu po repopulaci, především počet živě narozených selat (14,63) a odchovaných selat (13,44) na vrh lze hodnotit jako velmi konkurenceschopné a srovnatelné se špičkovými zahraničními chovy. Metodu repopulace je možné považovat za jednu z cest ke zlepšení zdravotní situace a reprodukční užitkovosti v českém chovu prasat.

LITERATURA

ARANGO, J., MISZTAL, I., TSURUTA, S., CULBERTSON, M., HOLL, J. W., HERRING, W., 2006: Genetic study of individual preweaning mortality and birth weight in Large White piglets using threshold-linear models. *Livestock Science*, 101, 208–218.

BORGES, V.F., BERNARDI, M.L., BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., 2005: Risk factors for stillbirth and foetal mummification in four Brazilian swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 70, 165–176.

CANARIO, L., CANTONI, E., LE BIHAN, E., CARITEZ, J.C., BILLON, Y., BIDANEL, J.P., FOULLEY, J.L., 2006: Between-breed variability of stillbirth and its relationship with sow and piglet characteristics. *Journal Animal Science*, 84, 3185–3196.

KILBRIDE, A. L., MENDEL, M., STATHAM, P., HELD, S., HARRIS, M., COOPERA, S., GREENA, L. E., 2012: A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112 commercial pig farms in England. *Preventive Veterinary Medicine*, 104, 271–291.

LAMBERT, M. Č., POLJAK, Z., ARSENAULT, J., D'ALLAIRE, S., 2012: Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: Biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. *Preventive Veterinary Medicine*, 104, 74–83.

LUCIA, T., CORRÊA, M.N., DESCHAMPS, J.C., BIANCHI, I., DONIN, M., MACHADO, A.,

MEINCKE, W., MATHEUS, J.E.M., 2002: Risk factors for stillbirths in two swine farms in the south of Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 53, 285–292.

MAUCH, C., BILKEI, G., 2004: The influence of prepartal bacteriuria on the reproductive performance of the sow. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 111, 166–169.

NIELSENA, J., BØTNERA, A., BILLE-HANSEN, V., OLEKSIEWICZA, M. B., STORGAARD, T., 2002: Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Veterinary Microbiology*, 84, 1–13.

PULKRÁBEK, J. (ed.), 2005: *Chov prasat*. Praha: Profi Press, 160 .

ROEHE, R., KALM, E., 2000: Estimation of genetic and environmental risk factors associated with pre-weaning mortality in piglets using generalized linear mixed models. *Animal Science*, 70, 227–240.

ROZKOT M., 2012: Chov prasat – perspektivy a další možnosti. In: *Aktuální problémy chovu prasat (sborník příspěvků 21. 2. 2012, kolektiv autorů)*, VÚŽV Praha Uhřetěves, 54–55.

VANDERHAEGHE, C., DEWULF, J., JOURQUIN, J., DE KRUIF, A., MAES, D., 2011: Incidence and Prevention of Early Parturition in Sows. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 428–433.

COMPARASION CHOICES BREEDINGS OF HUCUL HORSES

POROVNANIE VYBRANÝCH CHOVOV HUCULSKÉHO KOŇA

Oravcová I., Jiskrová I., Kostůuková M., Černoorská H., Bihuncová I.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xoravco1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to compared various breedings of hucul horses in Slovakia and Czech Republic in terms of exterior, breeding conditions and climatic conditions in which horses live and find out relative relation between these factors. I measured 14 body dimensions (withers high rod, withers high tape, high in saddle, high in hips, high in tailhead, high in breastbone, diagonal length of the body, length of the head, heart girth, circumference of the shank, width of the chest behind the blade-bone, front width of the pelvis, length of the pelvis, depth of the chest) in every breeding. The resultings of measures were analysed statistically and compared with each other. From 14 body dimensions 11 were highly signifianted and 1 was significanted. Breeders from Jeseniky and Janova Hora have the largest horses at average breeders from SR Hucul club and Zmrzlık have the smallest horses at average.

Key words: hucul horse, body dimensions, climatic conditions, place of measuring

Acknowledgments: This study was supported by grant project IGA TP 1/2012 FA MENDELU.

ÚVOD

Huculský kôň patrí medzi primitívne plemená koní, ktoré v dnešnom svete nemajú šancu konkurovať veľkochovom, ktoré požadujú od všetkých zvierat vysokú výkonnosť.

Hucule však boli chované našimi predkami pre iné vlastnosti, ktoré si v tej dobe tak cenili, a to konštitučná tvrdosť, istý krok aj v náročnom teréne, dobrá kŕmitel'nosť a nenáročnosť. Tieto vlastnosti si dokázali zachovať dodnes aj napriek niekoľkoročným snahám chovateľov o jeho „zlepšenie“ krížením s ťažšími a fjorskými koňmi (snahy o zmohtnutenie) alebo arabskými plnokrvníkmi (snahy o zušľachtenie). Vďaka týmto tendenciám hrozilo huculom dokonca vyhynutie. Našťastie sa tak nestalo a už v roku 1979 bol tento malý koník zapísaný do chráneného genofondu FAO. Neskôr sa toto plemeno zaradilo medzi genetické zdroje nielen Slovenskej a Českej republiky, ale aj Maďarska, Poľska, Nemecka, Rakúska a Ukrajiny (ŠPKPH, 2006). Genofond týchto koní patrí medzi vzácne zdroje genetickej diverzity. Pre udržanie vysokej kvality chovného materiálu je preto nevyhnutné jeho neustále monitorovanie, vyhodnocovanie a porovnávanie v rámci všetkých krajín, kde pôsobí ako genetický zdroj, aby sa predišlo jeho výrazným odchýlkam od plemenného štandardu.

Hucul patrí medzi menšie horské plemená s veľmi dobre vyjadreným typom, s typickými chodmi v kroku a pri prekonávaní horských prekážok. Zovňajšok je väčšinou korektný, je dlhšieho telesného rámca na kratších, kostnatých nohách s tvrdou kopytnou rohovinou (ŠPKPH, 2006). Hlava hucula býva zväčša suchá a mohutnejšia, stredne dlhá so širokou mozgovou základňou a robustnejšími žuchvami. Krk má hucul svalnatý, silný, stredne nasadený, občas klenutý. Charakteristický je menej výrazný kohútik a priestorný, hlboký a široký hrudník. Chrbát je pevný, rovný, s dobre viazanými a krátkymi bedrami, zadok býva krátky, široký a mierne sklonený, chvost nízko nasadený. Postoj vpredú pravidelný, vzadu občas šabl'ovitý a zblížený v stehnách (napomáha k lepšiemu pohybu v horských terénoch). Vďaka svojej telesnej stavbe sa hodí na prácu v horskom teréne ako kôň pre ťah, nosenie nákladov ako aj jazdeckto (ŠPHK, 2009).

Huculský kôň sa najčastejšie vyskytuje vo farbách hnedák, plavák, vraník, menej ryšiak a strakoš (HUČKO, 1996). Atavistické znaky sa vyskytujú veľmi často a sú to: výrazný úhorí pás, ktorý začína tam, kde končí hriva a končí pri koreni chvosta, zebrované predkolenia a predlaktia a občas sa stretne aj s oslím krížom. U niektorých jedincov je badateľná aj tzv. svetlá ružica v oblasti koreňa chvosta, čo je znakom divoko žijúcich koní. Albinotické odznaky sú nežiaduce (DURUTTYA, 1975). Pri správnom a vhodnom zaobchádzaní je toto plemeno učenlivé, vytrvalé, pracovité a vysoko výkonné pri práci najmä v teréne, kde sa pohybuje isto a obratne (ŠPHK, 2009).

Vo svojej práci som sa zamerala na 5 významných chovov v Českej a Slovenskej republike a to Národný žrebčín Topoľčianky, Slovenský hucul klub v Lome nad Rimavicou, Farma Hucul v Janovej hore, Hucul klub v Prahe a chov Dagmar a Zdeňka Svobodových v Jindřichove. V každom chove som zmerala 14 telesných mier a výsledky som štatisticky spracovala. Cieľom práce je porovnať jednotlivé vybrané chovy huculských koní medzi sebou vzhľadom na miesto merania, zistiť prípadné odchýlky od plemenného štandardu a analyzovať ich možné príčiny.

MATERIÁL A METODIKA

Podkladovým materiálom pre spracovanie práce sú výsledky vlastných terénnych meraní v chovoch huculských koní na Slovensku a v Českej republike. Zmeraných bolo celkovo 115 huculských koní. V Národnom žrebčine Topoľčianky bolo zmeraných 22 chovných huculských kobýl a 5 huculských žrebčov. V súkromnej sfére boli zmerané kone týchto chovateľov :

- M. Gonda – Lom nad Rimavicou (SR Hucul klub) v počte 17 huculských kobýl a 1 huculský žrebec
- I. a M. Karbusičtí - Vítkovice v Krkonošoch (Janova Hora) v počte 22 huculských kobýl, 10 huculských valachov a 4 huculské žrebce
- D. a Z. Svobodovi – Jindřichov (Jeseníky) v počte 4 huculské kobylly
- Hucul Club v Prahe (Zmrzlík) v počte 20 huculských kobýl, 6 huculských valachov a 4 huculské žrebce

Bolo meraných 14 telesných rozmerov, z toho 6 výškových rozmerov, 3 dĺžkové rozmery, 2 šírkové rozmery, 2 obvodové rozmery a 1 hĺbkový rozmer. Ako pomôcka na meranie koní bola použitá palicová miera (trojdielna štvorhranná rozkladacia tyč z kovu, na ktorej je vyrytá stupnica v cm, s dvomi kolmo nasadenými ramenami pričom jedno z ramien je posuvné) a pásková miera pre kone (vosková páska s vyznačenou stupnicou).

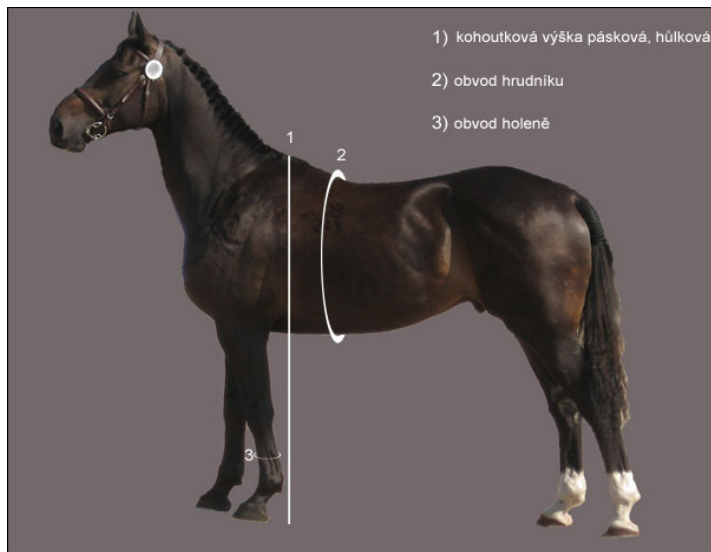
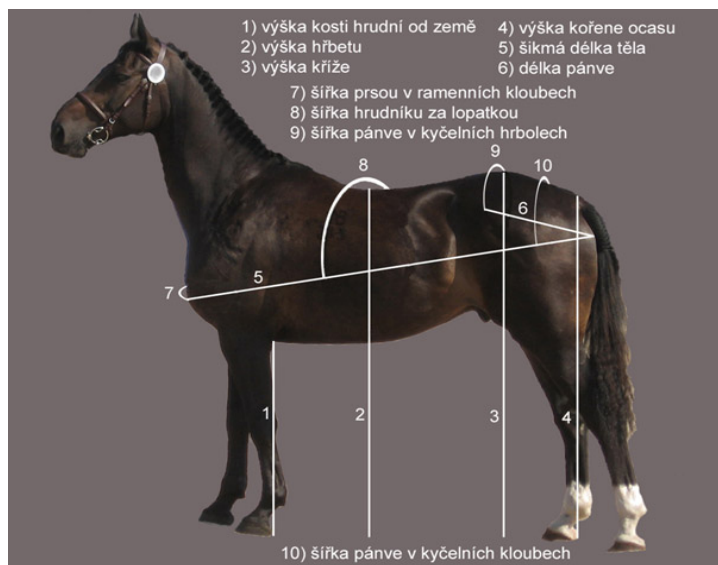
Všetky zvieratá som merala v rozpätí mesiacov november – december roku 2011 tými istými pomôckami a sama (výsledky by preto nemali byť zaťažené chybou) za asistencie dvoch pomocníkov. Jeden držal kone a druhý zapisoval namerané hodnoty. Meranie každého rozmeru prebiehalo trikrát, do práce som zaradila výslednú priemernú hodnotu z nameraných 3 rozmerov.

Merané kone stáli podľa možností na vodorovnej pevnej ploche, pričom všetky 4 končatiny zaťažovali rovnomerne. Pri pohľade z boku sa hrudné aj panvové pravé končatiny prekrývali s ľavými. Pri všetkých meraniach bola zohľadnená aj výška podkovy a jej hodnota bola odčítaná od

nameraných hodnôt. Pre získanie správnosti a čo najpresnejších dát boli použité iba tie namerané hodnoty, u ktorých nedošlo k narušeniu procesu merania.

Podľa DUŠKA (1999) telesné miery definujeme nasledovne:

1. Kohútikova výška palicová (KVH) – kolmá vzdialenosť najvyššieho bodu kohútika od zeme
2. Kohútikova výška pásková (KVP) – vzdialenosť vonkajšej pätky ľavej prednej končatiny k najvyššiemu bodu kohútika
3. Výška v sedle (VS) – kolmá vzdialenosť najhlbšieho miesta chrbta od zeme
4. Výška v krížoch (VK) – kolmá vzdialenosť najvyššieho bodu na chrbte (krížová kosť) od zeme
5. Výška koreňa chvosta (VKCH) – kolmá vzdialenosť od zeme k nasadeniu chvosta
6. Výška hrudnej kosti (VHK) – kolmá vzdialenosť hrudnej kosti od zeme
7. Šikmá dĺžka tela (ŠDT) – vzdialenosť od ramenného kĺbu k výčnelkom sedacieho hrboľu
8. Dĺžka hlavy (DH) – vzdialenosť od stredy temenného hrebeňa po stred línie spojujúcej horný okraj nozdier
9. Obvod hrudníka (OHR) – merané za lopatkou a kohútikom v mieste najmenšieho obvodu
10. Obvod holene (Ohol) – meraný v najslabšom mieste holene na ľavej prednej končatine, tzn. na prechode hornej tretiny holene v druhú tretinu
11. Šírka hrudi za lopatkou (ŠHZL) – meraná tesne za lopatkami
12. Predná šírka panvy (PŠP) – meraná v najvzdialenejších bodoch bedrových kĺbov
13. Dĺžka panvy (DP) – vzdialenosť od bedrového kĺbu po sedací kĺb
14. Hĺbka hrudníka (HH) – zisťovaná dopočítaním KVH – VHK

Obr. 1: Základné telesné miery koňa (<http://www.agropress.cz/zakladni-miry-koni.php>)Obr. 2: Hlavné telesné miery koňa (<http://www.agropress.cz/zakladni-miry-koni.php>)

Údaje do databázy boli zhromažďované v programe MICROSOFT EXCEL 2000.

Priemerné hodnoty nameraných telesných rozmerov boli porovnané s plemenným štandardom uvedeným v Štatúte plemennej knihe huculského koňa.

Pomocou databázy boli zisťované vzťahy medzi nameranými telesnými rozmermi a miestom merania. Údaje o telesnej stavbe boli štatisticky spracované pomocou štatistického programu UNISTAT verzia 5.1. :

- metódou GLM (lineárny model s pevnými efektmi)
- súhrnnými číselnými charakteristikami stredných hodnôt a mier variácií (boli hodnotené tieto stredné hodnoty a miery variácie: rozptyl a variačný koeficient)

Modelová rovnica lineárneho modelu s pevnými efektmi (GLM):

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_{ijklm}$$

Kde:

y_{ijklm} = pozorovanie telesnej miery alebo indexu

μ = celkový priemer

a_i = pevný efekt veku koňa ($i = 3, 4 \dots 20$)

b_j = pevný efekt pohlavia koňa ($j = 1, 2, 3$)

c_k = pevný efekt línie ($k = 1, 2, 3, 4, 5$)

d_l = pevný efekt miesta merania ($l = 1, 2, 3, 4, 5$)

e_{ijklm} = náhodná reziduálna chyba

V prípade štatisticky preukázateľného vplyvu sledovaného efektu sme pomocou metódy mnohonásobného porovnávania (metóda podľa Tukey – B) stanovili rozdiely medzi miestami merania.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po štatistickom spracovaní údajov pomocou programu Unistat 5.1 boli zistené štatisticky preukazné aj vysoko preukazné rozdiely. Pre utvorenie základného prehľadu uvádzam tabuľku č. 1, ktorá zobrazuje miery vychádzajúce u daného efektu štatisticky preukazné.

Tab. č. 1: Súhrmné výsledky štatistickej analýzy

Miery/Efekt	Miesto merania
KVH	
KVP	**
VS	
VK	*
VKCH	**
VHK	**
ŠDT	**
DH	**
OHR	**
Ohol	**
ŠHZL	**
PŠP	**
DP	**
HH	**

* označuje štatisticky preukazný vplyv

** označujú štatisticky vysoko preukazný vplyv

Porovnanie podľa faktoru miesta merania:

Najviac štatisticky preukazných rozdielov medzi mierami bolo zistených pri efekte miesta merania. Zo 14 meraných telesných rozmerov vyšlo 11 štatisticky vysoko preukazných (KVP, VKCH, VHK, ŠDT, DH, OHR, Ohol, ŠHZL, PŠP, DP, HH) a 1 štatisticky preukazná (VK). Štatisticky nepreukazné vyšli pri efekte miesta merania len KVH a VS. Priemerne najväčšie kone majú chovatelia z Jeseníkov a Janovej Hory, najmenšie zas SR Hucul klub a Zmrzlík.

Jeseníky spolu s Janovou Horou sú chovy, v ktorých kone žijú v najvyšších nadmorských výškach (z chovov ktoré som merala) a po celý rok vo výbehoch. Janova Hora existuje už niekoľko desiatok

rokov, takže vplyv geomorfologických a klimatických pomerov sa na koňoch už mohol odraziť, naproti tomu Jeseníky sú oproti Janovej Hore pomerne nový chov. Jeseníky majú však kone dovezené z Lucziny v Rumunsku, kde sú podmienky ešte drsnejšie. SR Hucul klub patrí tiež medzi

novšie chovy s koňmi nakúpenými z Maďarska, Poľska, Slovenska aj Českej republiky. Aj keď tento chov má drsnejšie podmienky a vysokú nadmorskú výšku, kone si zatiaľ uchovávajú svoj nízky vzrast. Zmrzlík spolu s Topoľčiankami majú najmenej vhodné podmienky pre chov huculských koní. Topoľčianky však dosahujú vyššie rozmery ako Zmrzlík, čo je pravdepodobne spôsobené vyššou úrovňou selekcie a šľachtenia spolu s vyššími kŕmnyimi dávkami.

Rozptyl a variačný koeficient meraných chovov:

Pre hodnoty rozptylu platí, že čím sú väčšie, tým je väčší variačný koeficient a tým menej je stádo vyrovnané. Porovnaním hodnôt rozptylu v základných telesných mierach (KVH, OHR, OHol) sa javia Jeseníky ako najvyrovnanejšie stádo. Tieto hodnoty sú však skreslené kvôli nízkemu počtu zmeraných koní. Najvyrovnanejšie stádo majú Topoľčianky, ktoré dosahujú vo všetkých základných mierach najnižšie hodnoty rozptylu a variačného koeficientu. Tento fakt je spôsobený pravdepodobne najvyššou úrovňou šľachtenia a najprísnejšou selekciou spomedzi všetkých meraných chovov. Druhé najvyrovnanejšie stádo má Janova Hora v mierach KVH a OHR. V obvode holene však dosahuje najvyššie číslo spomedzi všetkých meraných chovov, takže je najmenej vyrovnané. Najmenej vyrovnané stádo má SR Hucul klub, v KVH a OHR dosahujú najvyššie hodnoty a v OHol druhú najvyššiu. Tento chov má spomedzi všetkých chovov (okrem Jeseníkov) najkratšiu dobu pôsobenia a kone nakúpené z rôznych krajín (Maďarsko, Poľsko...), preto je pochopiteľné, že chov je pomerne nevyrovnaný. Stredné hodnoty v rozptyle vo všetkých mierach dosahuje Zmrzlík.

Tab. č. 2: *Hodnoty rozptylu základných telesných mier meraných chovov huculských koní*

Miery/Chovy	Janova Hora	Jeseníky	Topoľčianky	Zmrzlík	SR Hucul klub
KVH	14,17	0,67	5,58	15,75	20,53
OHR	47,25	12,90	32,96	77,58	93,89
OHol	0,84	0,23	0,31	0,50	0,78

ZÁVER

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv faktoru miesta merania na telesnú stavbu huculských koní vo vybraných chovoch v Českej a Slovenskej republike. Podkladová databáza je zložená celkom zo

115 koní (85 kobýl, 16 valachov a 14 žrebčov) zmeraných v jednotlivých chovoch počas vlastných terénnych meraní. Údaje boli zhromažďované v programe Microsoft Excel 2000 a štatisticky spracované pomocou štatistického programu Unistat verzia 5.1. Hodnotili sa vplyvy efektu miesta merania na zmerané telesné miery. Údaje boli štatisticky vyhodnotené pomocou obecného lineárneho modelu (GLM) a pokiaľ sa prejavil u niektorého efektu štatisticky preukázateľný vplyv, otestovali sme daný telesný rozmer následným mnohonásobným porovnávaním podľa Tukeya.

Pri efekte miesta merania bolo zistených veľa štatisticky preukazných rozdielov. Zo 14 meraných telesných rozmerov vyšlo 11 štatisticky vysoko preukazných a 1 štatisticky preukazný. Kone chovateľov z Janovej Hory a Jeseníkov dosahovali v priemere najvyššie rozmery, kone chovateľov zo SR Hucul klubu a Zmrzlíka zas najnižšie. Najvyrovnanejšie stádo majú Topoľčianky a najmenej vyrovnané stádo SR Hucul klub.

Z uvedených výsledkov možno konštatovať, že medzi populáciami huculských koní z meraných chovov sa vyskytujú určité rozdiely, ale jednoznačný rozdiel je najmä medzi miestami merania. Pre zvýšenie úrovne a zlepšenie chovu by som odporučila hlavne vyššiu úroveň selekcie a šľachtenia a taktiež zmenu podmienok chovu huculských koní tak, aby vyhovovali ich požiadavkám a nemenil sa vplyvom nevhodných podmienok ich drahocenný exteriér. Tiež by som odporučila zjednotiť v rámci HIFu plemenný štandard huculského koňa (aby bol rovnaký pre všetky krajiny chovajúce toto plemeno) a dohodnúť sa na smerovaní šľachtenia. Hucul je kôň odolný tvrdým podmienkam, nenáročný, skromný na kŕmenie, s dobrým zdravotným stavom a pokojným temperamentom a my by sme mali robiť všetko preto, aby takýto ostal zachovaný aj pre budúce generácie.

LITERATÚRA

Duruttya M., (1975): Správa z celoštátnej vedeckej konferencie o huculských koňoch usporiadanej Zväzom pre ochranu prírody a krajiny v Prahe, Muráň - Revúca 1975, s. 11.

Dušek J. et al., 1999: *Chov koní*. Brázda, Praha, 350 s.

Hučko V., 1996: Chov huculského koňa na Slovensku, publikované v zborníku konferencie "Perspektíva chovu koní v Českej republike", MZLU v Brne

Štatút plemennej knihy plemena hucul (ŠPKPH) (2006). Dostupné na <http://sk.nztopolciany.sk/index.php/sk/hucul.html>

Šlechtitelský program huculského koně (ŠPHK) (2009). Dostupné na <http://www.hucul-achhk.cz/>

EVALUATION OF THE WELSH PONY AND COB BREED ON THE CHAMPIONSHIP OF THE CZECH REPUBLIC

VYHODNOCENÍ PLEMENE VELŠSKÝ PONY A KOB NA MISTROVSTVÍ
REPUBLIKY PONY

Píšová M., Jiskrová I.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: marketa.pisova@centrum.cz

ABSTRACT

The aim of our study is evaluation of the welsh pony breed on the Championship of the Czech Republic. We use datas from the Czech riding association and the Czech breed association. We evaluated the Championship of the Czech Republic in dressage and showjumping between years 2010 to 2012. We use data from the Czech riding association and the Czech breed association. We evaluated the Championship of the Czech Republic in dressage and between years 2010 to 2012. The number of the Welsh Part bred is lower during years 2010 to 2012. The number of Pony Breed is lower among years 2010 to 2011. We evaluated the Breed and the Welsh Pony and Cob among. We have statistically result for the Pony Breed. The Pony Breed is statistically succesfull to the Welsh Pony Breed in every years 2010 to 2012.

Key words: The Welsh Pony and Cob, The Pony breed, performance, The Championship of the Czech Republic, dressage

ÚVOD

Velšský pony je jedno z neznámější a nevýznamnějších plemen pony na světě. Postupem šlechtění se z malého zavalitého ponyho, který obýval rozsáhlé pláně Walesu, stal v současnosti vytrvalý, energický sportovní pony nejen pro děti. Plemeno velšský pony se rozděluje do několika sekcí přičemž nejpočetnější sekce ve světě je A, tedy velšský horský pony. Během staletí se exteriér velšských pony měnil, především ve 20. století vlivem stále většího tlaku na produkci jezdeckých pony z původních kočárových.

V České republice se tyto ponyové začali chovat od 70. let minulého století a jejich obliba stále roste. To nejen díky výborným jezdeckým schopnostem, ale i kvůli jejich dobrému charakteru, nenáročnosti a mnohdy jsou využíváni i jako společníci. Toto plemeno stále častěji ovlivňuje i chov ostatních plemen ponyů, v České republice pak především českého sportovního ponyho.

V zahraničí, především ve Velké Británii, odkud tento pony pochází je dlouhodobá tradice soutěží pro pony. A to i pro nejmenší děti. Při hodnocení v soutěžích zaměřených na plemeno velšský pony a kob je důležitá mechanika pohybu, aktivní krok a korektní klus. Ale také charakter a jezditelnost (PARKER-JONES, 2011). Chovatelé se tak zaměřují nejen na mechaniku pohybu, skokovou potenci, ale hlavně na charakter. Ten je pro chov plemen s využitím pro děti velmi důležitý (DAVIES, 2003). O mechanice pohybu hovoří ve své publikaci SCHOPKE, K. – SWALVE, H. (2012), kteří se zaměřili na genetické parametry německých jezdeckých pony. Kde uvádějí, že exteriér, mechanika pohybu a výkonnost spolu souvisí.

Dle MARŠÁLKA a ZEDNÍKOVÉ (2001) včasný odhad výkonnostního potenciálu je rozhodující motivací u všech druhů hospodářských zvířat. Výkonnost je ovlivněna ze 2/3 exogenními vlivy, a proto zlepšování genofondu musí být paralelně doprovázeno vysokou chovatelkou úrovní jezdeckou a trenérskou.

Oficiální soutěže pro pony se začaly v naší republice pořádat od roku 2001. Český systém hodnocení sportovních koní je založen na penalizaci trestnými body v jezdeckých soutěžích. Charakteristika sportovní výkonnosti, penalizace trestnými body, je v souladu s mezinárodními pravidly jezdeckého sportu Mezinárodní jezdecké federace (FEI). Česká jezdecká federace vydává pravidla jezdeckého sportu platná v České republice, která jsou obsahovým překladem pravidel mezinárodních (www.cjf.cz in NEVŘIVÁ, 2010). Od roku 2001 se změnil systém kategorizace jezdců i koní, vytvořily se tři kategorie dle věku jezdců a kohoutkové výšky ponyho.

Kategorizace Mistrovství České republiky:

- Mistrovství České republiky v drezuře pony 8-12 let, do 135 cm
KVH
- Mistrovství České republiky v drezuře pony 8-12 let, do 148 cm
KVH
- Mistrovství České republiky v drezuře pony 13 - 16 let, do 148 cm
KVH

MATERIÁL A METODIKA

Pro práci byla zpracována data, která byla čerpána dostupných dat a výsledkových listin České jezdecké federace, dále pak z plemenných knih, které jsou dostupné na internetových stránkách Asociace chovu koní v České republice.

Zpracovávali jsme data z Mistrovství republiky v drezuře a skoku pony v letech 2010 až 2012. Vyhodnoceny byly následující kategorie:

- Mistrovství České republiky v drezuře pony 8-12 let, do 135 cm
KVH
- Mistrovství České republiky v drezuře pony 8-12 let, do 148 cm
KVH
- Mistrovství České republiky v drezuře pony 13 - 16 let, do 148 cm
KVH

Zaměřili jsme se především na úspěšnost plemene velšský pony a kob v jednotlivých disciplínách a kategoriích a dále pak na zhodnocení jednotlivých disciplín mezi roky 2010 – 2012.

Zhodnotili jsme rozdíly mezi velšským plemenem pony a kob a českých sportovním pony. Tato plemena jsou si chovatelsky blízká a chovatelé obou plemen se zaměřují více na uplatnění ve sportu.

Statistické vyhodnocení bylo realizováno pomocí statistického programu STATISTIKA. Průkaznost mezi výslednými hodnotami byla hodnocena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), GLM (základní lineární model), bližší průkaznost pak byla hodnocena S - testem (Scheffesův test).

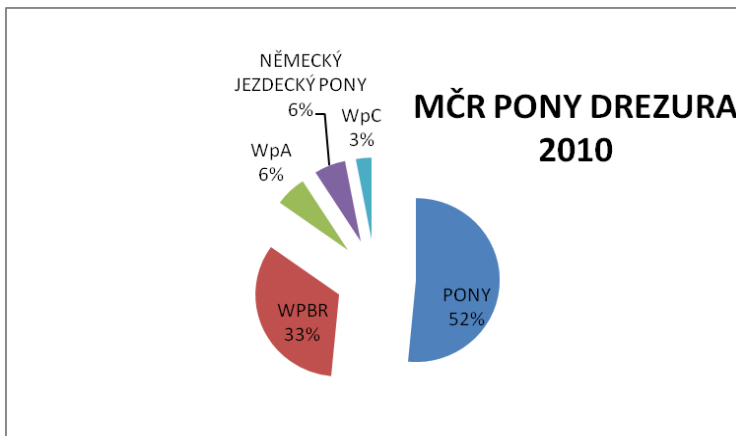
Statisticky průkazné rozdíly mezi průměry jsou označeny písmeny u jednotlivých čísel. Pokud průkaznost zjištěna nebyla (mezi průměry) písmenka (horním indexem) u výsledků uvedena nejsou.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Zastoupení jednotlivých plemen na MČR

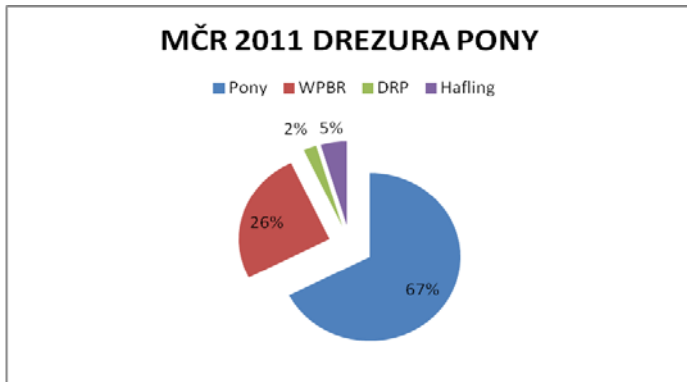
Na základě námi naměřených dat, jsme zpracovali jednotlivé roky samostatně. U drezurních soutěží v roce 2010 jsme vyhodnotili jednotlivé počty účastníků. Na Grafu 1 můžeme vidět, že v roce 2010 bylo zastoupeno 5 plemen, z toho nejčastěji zástupci plemene pony, z 52% (zde myšleno český sportovní pony i pony bez plemenné příslušnosti), dále pak podílový velšský pony s 33%, ostatní plemena byla zastoupena pod 10%.

Graf č. 1 – Vyhodnocení Mistrovství České republiky v drezuře v roce 2010 – dle plemen



Graf 2 ukazuje, že v roce 2011 se zvětšil počet startujících plemene pony o 15%, snížil se však o 7% počet startujících podílových velšských pony, i německých jezdeckých pony na 2%. V roce 2011 se na startovní listině umístilo plemeno hafling, které v roce 2010 nestartovalo. V tomto roce také nestartoval žádný zástupce plemene velšský horský pony ani velšský pony v typu koba.

Graf č. 2 – Vyhodnocení Mistrovství republiky v drezuře pony v roce 2011 – dle plemen



Vyhodnocení plemene velšský pony a kob v drezurních soutěžích

Jak je uvedené v tab. Č. 1 zhodnotili jsme rozdíl výkonnosti mezi plemeny velšský pony a kob a plemenem pony. Jak uvádí tabulka č. 1, plemeno pony je statisticky průkazně lepší v letech 2010, 2011 i 2012. Výsledky mohou být ovlivněny tím, že na startovních listinách se nevyskytují další zástupci plemene velšský pony a kob, které je zastoupeno pouze sekci podílového velše. Ti jsou však chováni v naší republice velice krátkou dobu a jejich populace není prochována na mechaniku pohybu. U ostatních sekcí je cílené šlechtění na mechaniku pohybu zřejmé. To uvádí ve své práci Příkladová (2011), která poukazuje na excelentní mechaniku pohybu především v klusu, a to u plemene velšský horský pony. Chov sportovních pony je založen také na plemenném materiálu plemene velšský pony a kob, ale stále častěji jsou používáni hřebci německých pony a ostatních plemen.

Tab. Č. 1 – Statistické vyhodnocení plemen Pony a velšský pony a kob

Plemeno	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2012
Pony	**	**	**
Velšský pony a kob			

ZÁVĚR

Při vyhodnocení Mistrovství republiky v drezuře pony v letech 2010 až 2012. U drezurních soutěží v roce 2010 jsme vyhodnotili jednotlivé počty účastníků. V roce 2010 bylo zastoupeno 5 plemen, z toho nejčastěji zástupci plemene pony, z 52% (zde myšleno český sportovní pony i pony bez plemenné příslušnosti), dále pak podílový velšský pony s 33%, ostatní plemena byla zastoupena pod 10%. Oproti tomu v roce 2011 se zvětšil počet startujících plemene pony o 15%, snížil se však o 7% počet startujících podílových velšských pony, i německých jezdeckých pony na 2%. V roce 2011 se na startovní listině umístilo plemeno hafling, které v roce 2010 nestartovalo. Jak je vidět z uvedených výsledků, startuje v drezurních soutěžích stále méně zástupců plemene velšský pony a kob, a to pouze zástupce podílového velše. To je oproti zahraničí velmi málo. V drezurních soutěžích pony ve Francii je na startovních listinách velmi často zastoupen velšský kob, ale také ostatní sekce tohoto plemene. Stejně tak tomu je ve Velké Británii, která je však domovskou zemí tohoto plemene. Při hodnocení úspěšnosti plemen mezi sebou, jsme porovnávali plemeno pony s podílovým velšským pony. Zde jsme zjistili, že plemeno pony je statisticky významně lepší z hlediska umístění než podílový velšský pony v letech 2010 až 2012. Otázkou zůstává zda tento výsledek neovlivňuje především to, že se na mistrovsky významných soutěžích neobjevují zástupci dalších sekcí tohoto plemene. Chov podílových velšských pony je v České republice na začátku svého působení a často jsou do chovu používáni jedinci s nevýraznou mechanikou pohybu a nekvalitním exteriérem. Jak uvádí Příšová (2010) ve své práci uvádí, že: „Při srovnání jednotlivých sekcí z hlediska prostornosti v kroku a klusu jsme zjistili, že délka kroku v chodech krok a klus je úměrná tomu jaké je omezení kohoutkové výšky jednotlivých sekcí. Přesto maximum, které bylo naměřeno u velšského horského ponyho (126 cm) v klusu ukazuje, že i nejmenší sekce (kohoutková výška hůlková do 122cm) má velmi prostorný krok a přibližuje se i sekci velšského koba s kohoutkovou výškou hůlkovou nad 137 cm, zde bylo naměřena maximální hodnota 130 cm v klusu.“ Dále také publikuje, že při statistická hladina významnosti pro srovnání prostornosti chodů byla prokázána i u příslušnosti k jednotlivým sekcím. Především velšský horský pony a velšský kob jsou šlechtěni na mechaniku pohybu.

POUŽITÁ LITERATURA

BOWLING, A.T. – A. RUVINSKY: The Genetic of The Horse, CAB Internacional, 2000, ISBN 0-85199-429-6

DAVIES, W. : The welsh mountain pony, J.A. Allen, London, 1993, s. 134, ISBN 0-85131-571-2

DAVIES, W. : The welsh Ponies and Cobs, J.A. Allen, London, 1997, s. 3 -25, ISBN 0-85131-361-2

DAVIES, W.: The welsh cobs, J.A. Allen, London, 2006, s. 209, ISBN 0-51317219

KRČOVÁ, S., 2007: *Zhodnocení významu hannoverského koně ve šlechtění českého teplokrevníka*. Diplomová práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MZLU v Brně, 52 s.

MARŠÁLEK, M., ZEDNÍKOVÁ, J., 2001: Možnosti hodnocení teplokrevných hřebců podle výkonnosti jejich potomstva. *Koně*, č. 1, s. 14 – 16.

PÍŠOVÁ ET. ALL: *Evaluation of basic body measure to movement of the welsh ponies and cobs*, In *MendelNet 2010 Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, s. 297--301. ISBN 978-80-7375-453-2.

PÍŠOVÁ ET ALL: *Zhodnocení mechaniky pohybu plemene velšský horský pony a velšský pony*, In MARŠÁLEK, M. *Koně 2012*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, ISBN 978-80-7394-344-8.

SCHOPKE, K. – SWALVE, H.H. : *The German Riding Pony – a genetic-statistical analysis*, *Zuchtungskunde*, Vol. 84, Iss.2, 2012, **ISSN**: 0044-5401

APPARENT IDEAL AMINO ACIDS DIGESTIBILITY OF RAW FULL-FAT SOYBEAN IN BROILER DIETS

ZDÁNLIVÁ IDEÁLNÍ STRAVITELNOST AMINOKYSELIN SUROVÉ PLNOTUČNÉ SÓJE VE VÝŽIVĚ BROJLERŮ

Rada V.¹, Foltyn M.¹, Lichovnikova M.¹, Safarik I.², Lohnisky A.¹

¹Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Nanobiotechnology, Institute of Nanobiology and Structural Biology of GCRC, Academy of Science, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

E-mail: xrada@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to attempt to influence of soybean meal (SBM) replacement by multiple levels of raw full-fat soybean (RFFS) in broiler diets on the apparent ileal amino acids digestibility (AIAAD). In the experiment in total 208 ROSS 308 male chickens were used to examine the effect of RFFS on AIAAD and fat digestibility when four dietary treatments were used; Control group (without RFFS) and groups containing 4%, 8% and 12% of RFFS. The experiment lasted from 10th to 38th day of age. The AIAAD was lower when diets contained RFFS in all observed amino acids except methionine. Higher AIAAD was obtained in RFFS12 in comparison with RFFS8 and RFFS4.

Key words: raw full-fat soybean, soybean meal, broiler, apparent ileal amino acids digestibility

Acknowledgments: Authors thank the projects of IGA IP 4/2011 and IGA TP 1/2012 for financial support.

INTRODUCTION

Currently, the most soybeans in poultry diets are used in the form of soybean meal and extruded soybeans (Karr-Lilienthal et al. 2005). Both of these soybean forms are treated through its process by heat and pressure in order to reduce the effect of antinutritional substances (trypsin inhibitor, antigenic proteins, estrogens, lectins, saponins and non-starch polysaccharides), which are present in soybean (Liener and Kakade, 1980) and limiting its use. But the thermal treatment process could also destroy other essential nutrients (Chunmei et al. 2010). For the most problematic antinutritional compounds are considered a trypsin inhibitors (TI) that consists in two types Bowman-Birker's and Kunitz's. TI reduces the proteolytic action of the pancreatic enzyme trypsin (Rackis et al. 1986) in the digestive tract of animals and thereby reduces the digestibility of feed protein and it is associated with a growth reduction. Earlier studies have dealt with the use of raw full-fat soybean, but the with negative results linked to TI impact, especially Kunitz's trypsin inhibitors (Han et al., 1991; Zhang et al., 1991; Chohan et al., 1993). Limited data are available on the lower TI soybean hybrids less-required treatment for optimally inclusion full-fat soybeans in to the broilers diets. In recent years, there has been progress in soybean breeding with lower TI content in soybean hybrids as outcome (Bernard and Hymowitz, 1986; Han et al., 2005; Hymowitz, 1986). These hybrids can be used by omit the energy and costly intensive operation for soybean treatment and get better use of its nutrients.

The aim of this study was to attempt to influence of soybean meal (SBM) replacement by multiple levels of raw full-fat soybean (RFFS) in broiler diets on the apparent ileal amino acids digestibility.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted to determine the ileal amino acids digestibility and fat digestibility of diets with improving content of EFFSB when four treatments that differed in the percentage of RFFS were used. The broilers were fed diets formulated to resemble industry ingredient and nutrient specifications. Diets were offered in 2 feeding phase, starter from 0 to 10th day and grower from 10th to 38th day, both in grout. Starter diet had for all treatment same composition (21,5 % CP; 12,2 MJ MEN/kg). Grower diets were the experimental and based primarily on wheat, SBM, and corn and contained 0, 4, 8 or 12% RFFS (20,5 % CP; 12,7 MJ MEN/kg). Diets were formulated to be isocaloric and similar in limiting and other nutrients (Table 1) and were formulated to meet or exceed NRC nutrient recommendations (NRC, 1994). Broilers consumed feed and water on an ad libitum basis.

Table 1. Composition of the diets (%)

Ingredient	Experimental diets			
	C	RFFS4	RFFS8	RFFS12
Wheat	39.08	39.08	39.08	39.08
Maize	25.00	25.00	25.00	25.00
Soybean meal	27.3	24.02	20.74	17.46
Raw full-fat soybean	0	4	8	12
Soybean oil	4.5	3.78	3.06	2.34
Complex of minerals and vitamins*	4.12	4.12	4.12	4.12

* One kilogram of premix contained : Retinol: 75.75 mg, Vit. D3: 1 mg ; Vit. E (alfa tokoferol): 700 mg; Vit. K3: 30 mg; Vit. B1: 30 mg; Vit. B2: 60 mg; Vit. B6: 25 mg; Vit. B12: 0,2 mg; Niacinamid: 210 mg; Cholin chloride: 6 200 mg; DL-methionin: 20 g; L-lysine: 14 g; Ca: 200 g; P: 48 g; Na: 15 g; Fe: 880 mg; Cu: 100 mg; Zn: 740 mg; Mn: 1 240 mg; Co: 4,5 mg; I: 5 mg; Se: 1,4 mg

Experiment was executed at the Mendel University Brno, Czech Republic. The cage technology with collecting belt for excreta was used. In total of 208 x ROSS 308 male broiler chicks were obtained from a commercial hatchery and were kept according to the principles referred to breeding instructions for this hybrid. At the beginning of the experimnet broilers were individually labeled by wing makrs and distributed equally across 16 cages so that each treatment was replicated 4 times with 13 broilers each. Chicks were vaccinated at the hatchery for Marek's disease and Infectious Bronchitis. Each cage was equipped with a lying feeder and a nipple drinker line. Target temperature were 32, 29, 27, 26, 24, 23, and 21 C for d 0 to 2, d 3 to 4, d 5 to 9 d 10 to 14, d 15 to 21, d 22 to 33, and d 34 to 38 respectively. The broiler house was completely enclosed, and fluorescent bulbs provided the lighting. Photoperiods was 23L:1D and followed a continuous schedule with lighting intensities of 30 lx from 0 to 7 d of age, 10 lx from 7 to 22 d of age, and 3 lx from 22 to 38 d of age, and light intensity was verified at bird level (30 cm) using a photometric sensor.

At 38 d, birds were killed by decapitation and dissected in order to obtain the digesta content of ileum (section between Meckel's diverticulum and the 4 cm from ileocecal junction). Digesta collected from each bird was stored at -30 °C (one sample – five chickens). Samples were lyophilized, ground and analyzed for amino acids, dry matter and insoluble ash in 4 mol.l-1 HCl, which was used as indicator. The samples of the feed and ileal digesta were treated by oxidative acid hydrolysis HCl (c= 6 mol.l-1). The chromatographic analysis of the hydrolysate samples was performed in the analyser AAA 400 (f. Ingos, Prague) using Na-citrate buffers and ninhydrin detection to find the amounts of certain amino acids. The content of fat in the diets and excreta was determined according to Soxhlet. Apparent ileal amino acids digestibility (fat digestibility) was calculated with the following formula:

$$\text{AIAAD} = 100 - (100 \times \text{Id} \times \text{AAdc} / \text{Idc} \times \text{AAAd}) (\%)$$

Apparent ileal amino acid digestibility (AIAAD), content of indicator in the diet (Id), content of amino acid in the digesta (AAdc), content of indicator in the digesta (Idc), content of amino acid in the diet (AAAd).

Statistical Analysis

Observed characteristics were expressed as mean and standard error of the mean and were analyzed using the single factor analysis of variation. Data of ileal amino acid and fat digestibility were followed by the Kruskal-Wallis analysis. For a statistical analysis was used software UNISTAT 5.1 (UNISTAT Ltd., England).

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of feeding RFFS on AIAAD for each amino acid was expressed by polynomial function (Figure 1):

$$y = ax^2 + bx + c,$$

where a, b, c are parameters of the polynomial function, x is level of EFFSB and y is coefficient of digestibility.

The AIAAD, expressed as coefficient of AIAAD showed in Table 2, decreased at most observed amino acids (Thr, Ile, Leu, Phe, His, Arg and Lys) with increasing level of RFFS in the experimental diets. Only methionine AIAAD decreased in group RFFS4, but increased in groups RFFS8 and RFFS12 without significant difference ($P < 0.05$) between experimental groups. Markedly ($P < 0.05$) lower AIAAD in all groups fed with RFFS in diets have been observed for Ile and His compare to group fed with basal diet. The AIAAD for Thr, Leu, Phe, Arg and Lys were significantly ($P < 0.05$) lower in groups RFFS4 and RFFS8, but not in group RFFS12. Significantly ($P < 0.05$) higher AIAAD for Phe and Lys compare to RFFS4 and for Ile and His compare to RFFS8 were obtained when 12 % of RFFS were in diet. No significant differences were reached at Thr, Leu and Arg in comparison between group RFFS12 to RFFS4 and RFFS8, even the values for RFFS12 were higher. For all experimental groups fed RFFS in the diets were observed significantly ($P < 0.05$) lower fat digestibility.

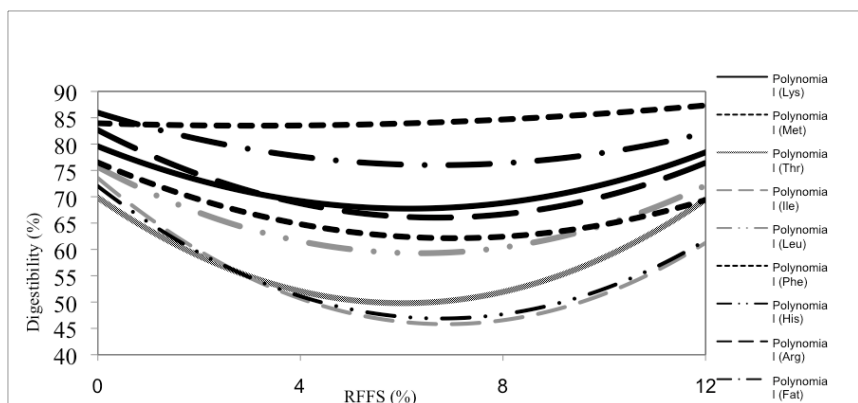
Table 2. Coefficients of apparent ileal amino acid digestibility and fat digestibility

	C	RFFS4	RFFS8	RFFS12
Lysine	0.803 ^{a,c}	0.670 ^b	0.710 ^{b,c}	0.777 ^{a,c}
Methionine	0.841 ^a	0.831 ^a	0.851 ^a	0.872 ^a
Threonine	0.696 ^a	0.528 ^b	0.512 ^b	0.697 ^a
Isoleucine	0.734 ^{a,c}	0.511 ^{b,c}	0.461 ^b	0.614 ^{b,c}
Leucine	0.758 ^a	0.611 ^b	0.608 ^b	0.720 ^a
Fenylalanine	0.760 ^{a,c}	0.663 ^{b,c}	0.609 ^b	0.699 ^{a,c}
Histidine	0.717 ^{a,c}	0.520 ^b	0.468 ^b	0.620 ^{b,c}
Arginine	0.826 ^a	0.689 ^b	0.665 ^b	0.765 ^a
Fat digestibility	0.873 ^a	0.736 ^b	0.804 ^b	0.808 ^b

Note: Different superscripts (a, b, c) indicate statistical significant difference between groups ($P < 0.05$)

Many studies have found that protein digestibility was decreased by 20-40 % in animal fed with diets containing raw soybean or high level of trypsin inhibitor compared with those fed with diets containing heated soybean or soybean meal (Qin, G.X. 1996; Li et al. 1998; Caine et al. 1998). Likewise, Herkelman et al. (1992) showed that low-trypsin inhibitor soybean had significant greater amino acid and nitrogen digestibility compared with conventional SB when fed to growing pigs. Contrary to these authors, Batal and Parsons (2003) showed that the AA digestibility values of the Williams 82 soybeans (Kunitz-free and lectin-free soybeans) diets were much lower than those for the SBM diet.

Figure 1. Effect of RFFS on AIAAD and fat digestibility



In the present study, raw full-fat soybean was used as the source of crude protein, and the results showed that amino acids digestibility was decreased by its presence. On the other hand, many scholars considered that thermal treatment improving digestibility and nutritional value of soybean (Wuersch et al., 1986; Bengala Freire et al. 1991). Our result showed, that RFFS in diets depressed broiler fat digestibility. In contrast with Chunmei et al. (2010), which discovered that fat digestibility in rats fed by raw full-fat soybean was significantly higher than control group fed by common diet.

CONCLUSION

The present study has shown that the addition of RFFS to the broiler diets decreased AIAAD. The AIAAD was lower when diets contained RFFS in all observed amino acids except methionine. Higher AIAAD was obtained in RFFS12 in comparison with RFFS8

REFERENCES

- Batal, A. B., Parsons, C. M. (2003): Utilization of Different Soy Products as Affected by Age in Chicks, *Poultry Science*, Volume 82: 454–462
- Bengala Freire, J., Aumaitre, A. and Peiniau, J. (1991): Effects of feeding raw and extruded peas on ileal digestibility, pancreatic enzymes and plasma glucose and insulin in early weaned pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65: 154-164.
- Bernard, R.L. and Hymowitz, T. (1986): Registration of L81-4590, L81-4871 and L83-4387 soybean germplasm lines lacking the kunitz trypsin inhibitor. *Crop Science*, 26: 650-651.
- Caine, W.R., Sauer, W. C., Versteegen, M.W., Tamminga, S., Li, S. and Schulze, H. (1998): Guanidinated protein test meal with higher concentration of soybean trypsin inhibitors increase ileal recoveries of edogenous amino acids in pigs. *Journal of Nutrition*, 128: 598-605.
- Chohan, A.K., Hamilton, R.M.G., McNiven, M.A. and MacLeod, J.A. (1993): High protein and low trypsin inhibitor varieties of full-fat soybeans in broiler chicken starter diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 73: 401-409.
- Chunmei, G., Hongbin, P., Zewei, S. and Guixin, Q. (2010): Effect of Soybean Variety on Anti-Nutritional Factors Content, and Growth Performance and Nutrients Metabolism in Rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 1048-1056.
- Karr-Lienthal, L.K., Kadzere, C.T., Grieshop, C.M. and Fahey, G.C. (2005): Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science*, 97: 1-12.
- Han, Y., Parsons, C.M. and Hymowitz, T. (1991): Nutritional evaluation of soybeans varying in trypsin inhibitor content. *Poultry Science*, 70: 896-906.
- Han, F.X., Ding, A.L., Sun, J.M. and Li, G.Y. (2005): Development of new soybean germplasm with null lipoxygenase and kunitz trypsin inhibitor genes. *Acta Genetica Sinica*, 32: 417-423.

Herkelman, K.L. Cromwell, G.L., Stahly, T.S., Pfeiffer, T.W. and Knabe, D.A. (1992): Apparent digestibility of amino acids in raw and heated conventional and low-trypsin inhibitor soybeans for pigs. *Journal of Animal Science*, 70: 818-826.

Hymowitz, T. (1986): Genetics and breeding of soybeans lacking the Kunitz trypsin inhibitor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 199: 291-298.

Li, S.Y., Willem, C.S. and William, R.C. (1998): Response of nutrient digestibilities to feeding diets with low and high levels of soybean trypsin inhibitor in growing pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 357-363.

Liener, I.E. and M.L.Kakade. (1980): Protease inhibitors. In: I. E. Liener (Ed.) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, PP 7-71. Academic Press, New York.

National Research Council (U.S.) (1994): Subcommittee on Poultry Nutrition. Nutrient requirements of poultry. 9. Washington: National Academics Press, 155 p.

Qin, G.X. (1996): Processing soybeans of different origins. Response of a Chinese and a Western Pig Breed to Dietary Inclusion; van der Poel, A.F.B., Huisman, J., Saini, H.S., Eds.; Pudoc: Wageningen, The Netherlands.

Rackis, J.J., Wolf, W.J. and Baker, E.C. (1986): Protease inhibitors in plant foods: Content and inactivation. In: M. Friedman (Ed.) *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*, PP 299-347. Plenum Publishing. New York.

Wuersch, P., Del Vedevo, S. and Koellreutter, B. (1986): Cell structure and starch nature as key determinants of the digestion rate of starch in legumes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 25-29.

Zhang, Y., Parsons, C.M. and Hymowitz, T. (1991): Effect of soybeans varying in trypsin inhibitor content on performance of laying hens. *Poultry Science*, 70: 2210-2213.

THE USING OF CLAY MINERALS IN POULTRY

VYUŽITÍ JÍLOVÝCH MINERÁLŮ V CHOVU DRŮBEŽE

Škarková M., Havlíček Z.

Department of Animals Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: skarkova.m@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of our experiment was to examine the impact of the absorption capacity of clay minerals applied to bedding to reduce the production of NH_3 and to evaluate the effect of bentonites containing 50.1 or 73.4% of montmorillonite, not only in practical conditions but also in laboratory conditions. In the practical part of the experiment, doses were 4 and 5.5 kg of clay applied on 6m^2 of litter. The experiment was divided into nine experimental groups within there were placed 900 chicken meat hybrid ROSS 308. Each group had the same microclimatic conditions, including the used litter (wood shavings). There was used complete mixture BR 1 and BR 2 for fattening of all experimental groups and the fattening were fed *ad libitum*. The experimental period lasted from the first day to thirty-sixth day of fattening. In the stable, there were monitored ammonia, temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (%). For measurements, there were used several data loggers observing parameters at one-minute intervals from placement in a stable. The measuring technique was positioned to record the microclimate objectively not only in the life zone of chickens, but also the average value in the whole area of stable. There was also sampled the litter in seven-day intervals with subsequent analysis on the contents of total, ammonia and nitrate nitrogen. The second part of the experiment was used for monitoring of the absorption capacity of clays in laboratory-controlled conditions with subsequent measurement of the concentration ammonia in exact time interval. The experiment was carried out in glass containers of 1 liter which were always applied to different amounts of a specific type of clay mineral (2, 4, 6 and 8 g), followed by the addition of technical ammonia (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 μl). The concentration of the first sample of bentonite (containing 50.1% montmorillonite) was in the range from 4.3 to 94.3 ppm two days after the application (the first control measurement). The second sample (73.4% montmorillonite) showed the value 0 to 131.7 ppm. The values in the other measurements (6, 10 and 14 day after application) were largely zero.

Key words: poultry, chicken, clay minerals, ammonia, ammonia elimination

Acknowledgments: This publication was created from the results of the project IGA in 2011 under the title "The impact of feed additives on the metabolism of farm animals, the use of absorptive properties of clay substrates in crop and animal production". The publication was also support by the research project MSM 6215648905 "Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptation to climate change "from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

ÚVOD

Drůbeží hnůj je výborným dusíkatým hnojivem a hlavním problémem je ztráta N ve formě amoniaku (NH_3), která představuje až 80% z celkového N v podestýlce (Kelleher et al., 2002.; Ritz et al., 2004). V drůbežím trusu se nachází 70 % dusíkatých látek ve formě kyseliny močové, přibližně dalších 27 % je pak ve formě močoviny (McCrory et al., 2011), což zmínil i Smits et al. (1995) u skotu, Kay a Lee (1997) u prasat a Elwinger a Svensson (1996) u drůbeže. V podestýlce je pak močovina a kyselina močová poměrně rychle hydrolyzována prostřednictvím enzymu ureáza, obsažené ve výkalech popř. i v půdě či na kořenech rostlin (Elzing a Monteny, 1997, Whitehead, 1990), na amoniak NH_4^+ a bikarbonátové ionty. Amoniak následně přechází do stájového prostředí, kde v plynné formě ovlivňuje přítomná zvířata a následně přechází do atmosférického vzduchu (McCrory et al., 2011). Amoniak jako plyn má relativně krátkou životnost v atmosféře. Od několika hodin do několika dnů (Warneck, 1988; Dentener a Crutzen, 1994). V kontrastu, amonné ionty, jako aerosol, mohou mít životnost v řádu 1-15 dnů (Aneja et al., 1998). Plynný amoniak obvykle reaguje s oxidy dusíku a oxidy síry za vzniku dusičnanu a síranu amonného (Seinfeld a Pandis, 1998), formovaných do partikulů o velikosti pod 2,5 μm . Úplná přeměna močoviny na NH_4^+ je potenciálně možná již během několika hodin, v závislosti na podmínkách prostředí (McCrory et al., 2011). Mineralizace fekálního proteinu je pak výsledkem působení proteolytických a deaminačních bakterií, které nejprve hydrolyzují proteiny na peptidy a aminokyseliny s konečnou deaminací na NH_4^+ . Tento rozkladný proces je poměrně pomalý, při značné závislosti na teplotě (McCrory et al., 2011). Z tohoto důvodu má pak větší význam při skladování hnoje, než při vlastním výkrmovém cyklu. Značná část emitovaného amoniaku, odhadovaná v množství 30 %, je ukládána v sousedství do 5 km od vlastního zdroje, s toxickým efektem na ekosystémy. Kromě hospodářské ztráty je pak uvedená depozice velkým zdrojem znečištění, což způsobuje obohacování N, okyselování půd a povrchových vod, a znečištění podzemních a povrchových vod nitráty.

Amoniak je velmi reaktivní plyn, který je normálně ve vzduchu přítomen pouze ve stopových koncentracích, a proto ho je obtížné změřit (Nicholson et al., 2011). Má negativní efekt na zdravotní stav a užitkové vlastnosti brojlerů a z tohoto pohledu je nutno zvolit vhodný management péče o podestýlku vedoucí k redukci uvolňujícího se amoniaku. Ten spočívá ve sledování a možnosti ovlivnění teploty, vlhkosti a ventilačního poměru stájového vzduchu, typem, množstvím, teplotou, vlhkostí a parametru pH podestýlky (Carr et al., 1990). V dalším kroku pak o koncentraci amoniaku rozhoduje intenzita ventilace. Její ovlivnění patří k běžné praxi pro odstranění NH_3 z chovů brojlerů (Ritz et al., 2004). Bez dostatečného větrání se v závislosti na zdroji může koncentrace amoniaku ve stájovém vzduchu vyšplhat až na 40-70 ppm. Při těchto

koncentracích už nejde jenom o pachové obtěžování, neboť je silně ovlivňován dýchací aparát kuřat. Z důvodů minimalizace negativních dopadů a ztrát způsobených amoniakem byla stanovena maximální povolená koncentrace amoniaku 25 ppm. Kvalitní vzduch by měl ale vykazovat maximální koncentraci pouze do 10 – 12 ppm. Některé práce řešící tuto problematiku, jako např. Anderson et al. (1964). Kuřata vystavena nepřetržitě 20 ppm NH₃ po dobu šesti týdnů trpěla plicním edémem, zácpami, krvácením a zvýšenou náchylností k onemocnění. Když byly koncentrace NH₃ zvýšeny na 25-50 ppm, Kleven a Glisson (1997) pozorovali snížení tělesné hmotnosti (0,23 kg za méně než 49 dnů).

Jedním z důležitých úkolů při skladování hnoje je stabilizace a omezení ztrát živin. Z tohoto důvodu lze ošetřit hlubokou podestýlku přídatnými látkami, které se využívají při samotném výkrmovém cyklu. Mezi ně patří i různé druhy jílových minerálů. O jejich využití rozhodují vlastnosti, jako je jejich struktura a chemické složení, druh vyměnitelných iontů, přičemž velikost částic a struktura rozhodují o vhodnosti pro jejich různá použití (Slámová, 2011). Jílové minerály patří bezesporu k nejstarším, ale také nejrozšířenějším a velice účinným sorbentům v přírodních i technologických procesech. Je třeba zdůraznit, že nejsou selektivními sorbenty aniontů díky nízkým hodnotám pH nulového náboje na povrchu pevné fáze. Jednoduchou povrchovou modifikací jílových minerálů, nebo obecně aluminosilikátů, dojde ke změně povrchového náboje a tím i adsorpční affinity materiálu vůči aniontům. Hlavním důvodem obrovského rozvoje těchto technologií v posledních letech jsou příznivé vlastnosti výchozích surovin, strukturní a chemická stabilita aluminosilikátů a šetrnost k životnímu prostředí (Doušová et al., 2010).

Mezi nejvíce průmyslově využívané jílovými minerály patří montmorillonit, kaolinit, illit a halloysit. Široké využití jílových surovin s jejich unikátními vlastnostmi je umožněno jejich hojným výskytem (u bentonitu se výskyt po celém světě odhaduje až na 1,4 bilionu tun, Roskill 1997), snadnou dostupností a tím i relativně nízkou cenou. Jejich absorpční / adsorpční vlastnosti se využívají ve výživě zvířat a významně přispívají k jejich zdraví. Vážou na sebe škodlivé látky a vylučují je z těla zvířat (Slámová et al., 2011). Nedávné nálezy podporují jejich roli v prevenci některých metabolických chorob u dojníc, stejně jako jejich vliv na vylučování dusíku u monogastričních zvířat (Papaioannou et al., 2005). U volně žijících zvířat hrají důležitou roli při detoxikaci anti-nutričními látkami v potravinách a pro zmírnění gastrointestinálních onemocnění (Williams et al., 2004). U hospodářských zvířat, jsou jílové minerály primárně používány jako pojiva při výrobě granulovaných krmiv. Jedním z nejnovějších přístupů je použití inertních nutričních adsorbentů ve stravě, izolují mykotoxiny, což snižuje jejich vstřebávání a navíc, se vyhneme toxickým účinkům u zvířat a přenesení toxických látek do živočišných produktů. In vitro výsledky pokusů Papaioannou et al. (2005) ověřily závaznou účinnost modifikovaného montmorillonitu a klinoptilolitu proti zearalenonu a ochratoxinu A. Mnoho výzkumů ukázalo, že

dietní zahrnutí např. zeolitů zvyšuje průměrný denní přírůstek nebo konverzi krmiva u prasat, telat, ovcí i brojlerů. Zeolity také posilují reprodukční výkonnosti prasnic, zvyšují dojivost krav, produkci vajec u nosnic a mají příznivý vliv na hmotnost vajec a vlastnosti vaječného obsahu. Svě uplatnění pak také nacházejí při využití pro ošetření podestýlky zvířat.

MATERIÁL A METODIKA

První část experimentálního měření byla provedena v testovací stáji ÚKZUZ Lípa u Havlíčkova Brodu na kohoutcích masného hybrida ROSS 308 z líhně Best Opava. Ustájení odpovídalo běžným požadavkům velkovýrobní technologie na hluboké podestýlce z dřevěných hoblin a řízenými podmínkami prostředí, uvedených ve vyhlášce č. 208/2004 Sb. V experimentu byl sledován vliv aplikace bentonitu (vzorek A), obsahujícího 73,4 % montmorillonitu, 12,7 % kaolinitu, 4,6 % sadinitu, 4,5 % muskovitu, 0,7 % anatasu, 4,1 % quartzu a bentonitu (vzorek B) obsahujícího 50,1 % montmorillonitu, 13,2 % kaolinitu, 12,5 % sideritu, 10,4 % sadinitu, 6,1 % muskovitu, 5,8 % anatasu a 1,9 % quartzu na emisi amoniaku ve stájovém prostředí. Použitý bentonit byl v jednotlivých kotcích o ploše 6 m², rovnoměrně aplikován jedenáctý den výkrmu v dávce 1 a 1,5 kg, přičemž byla aplikace opakována 17. den výkrmu vždy v dvojnásobném množství, tedy v dávce 2 a 3 kg. Vše bylo provedeno ve dvou opakováních oproti kontrolní skupině. Hodnocení emise amoniaku byly prováděny opakovaně v intervalech sedmi dní na čtyřech měřicích místech v každé sekci analyzátozem plynů Multiwarn II. Měření proběhlo pod měřicím zvonem o objemu 8 litrů, s pomocí dataloggerů, měřicích na principu elektrochemických čidel, ukládajících hodnoty v minutových intervalech. V rámci pokusu byly současně s měřením emise amoniaku pod zvony odebírány průměrné vzorky podestýlky z každého kotce, sloužící k následné analýze. U těchto vzorků se vzhledem k předpokládanému absorpčnímu efektu aplikovaných preparátů zjišťoval obsah celkového dusičnanového a amoniakálního dusíku. K výkrmu byla použita jednotná kompletní krmná směs BR 1 do 9. dne stáří kuřat. Od 9. dne stáří kuřat byla každá pokusná skupina krmena kompletní krmnou směsí BR 2 dle schématu. Kompletní krmné směsi byly zkrmovány formou *ad libitum* ve formě granulí z tubusových krmítek a čerstvá napájecí voda byla neustále k dispozici.

Druhá část experimentálního měření byla provedena v laboratorních podmínkách na MENDELU v Brně. Experiment probíhal v řízených mikroklimatických podmínkách a pro sledování absorpční schopnosti jílnů byly zvoleny totožné vzorky jílových minerálů, jako v první části pokusu probíhající v testovací stáji. Ve skleněných nádobách o objemu 1 litr byly odzkoušeny dva preparáty s obsahem 50,1 a 73,4 % montmorillonitu, přičemž oba byly testovány v granulaci 0-2 mm. Do nádob byl aplikován příslušný vzorek ve čtyřech opakováních v dávce 2, 4, 6 a 8 g s následným přidáním technického amoniaku o koncentraci 6,5 % v množství 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 µl ve všech variantách, vždy v uvedeném opakování. Nádoby byly vzduchotěsně uzavřeny, přičemž vlastní měření uvolněného amoniaku bylo 2., 6., 10. a 14. den po aplikaci. Zjištění koncentrace bylo zajištěno pomocí dataloggeru se speciální úpravou vstupní části, sloužící k nasátí plynu z experimentální láhve.

Cílem pokusu bylo ověřit vhodnost přírodních jílů s obsahem 50,1 a 73,4 % montmorillonitu na vhodnost pro ošetření podestýlky, přičemž bylo hlavním cílem dodržet požadavky kladené na podestýlku uvedené ve vyhlášce 208/2004 Sb. Druhým cílem bylo otestovat jílové minerály v laboratorních podmínkách námi vyvinutou metodou, která eliminuje působení často neznámých vlivů ovlivňujících emise amoniaku ve stáji.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Aktuální stav podestýlky, který je možno hodnotit z hlediska složení, ale i aktivity fermentačních pochodů, významně ovlivňuje celkové ztráty dusíku, které se ve stáji projeví uvolňováním amoniaku, který svým působením ovlivňuje pohodu a zdravotní stav zvířat (Hartung a Phillips, 1994). Rychlost uvolňování těchto těkavých látek závisí nejen na množství a poměru jednotlivých forem dusíku, ale i na environmentálních faktorech stáje a podestýlky, které ovlivňují aktivitu ureolytických a proteolytických bakterií (Muck a Richards, 1980). Mnoho autorů doporučuje k omezení emise amoniaku využití krmných aditiv, okyselovadel, inhibitorů ureázy, rostlinných extraktů, či absorbentů. Diskutabilní ale zůstává ověření účinnosti jednotlivých preparátů ovlivňujících celkovou emise amoniaku.

Předmětem práce je vyhodnocení účinku jílových minerálů, které se využívají u prasat a drůbeže jako přídatek do krmiva, nebo v našem případě do podestýlky. Charakteristika podestýlky na konci výkrmového cyklu, která byla kontrolní (bez ošetření) a podestýlky ošetřené přidáním jílových minerálů lišících se obsahem montmorillonitu (A- 50,1 % a B – 73,4 %) je uvedena v tab. 1. Z výsledků je patrná zvýšená teplota podestýlky, měřená vpichovým teploměrem, u kontrolní skupiny, oproti skupinám s ošetřením aplikací jílu. Třebaže byl v podestýlce od kontrolní skupiny zjištěn nejnižší obsah celkového dusíku, z grafu 1 je patrná nejvyšší emise amoniaku, měřená v měřicím zvonu po dobu 10 minut, s měřicí stopou po jedné minutě. Třebaže byla měřená emise v jednotlivých měřicích cyklech velice rozkolísaná, je u ní možno sledovat nejvyšší hodnoty po celou dobu měření. Z těchto výsledků jsou patrné vysoce významné rozdíly mezi jednotlivými zásahy. Naproti tomu byl zjištěn nejvyšší obsah amoniakální formy dusíku u skupiny ošetřené preparátem obsahujícím 73,4 % montmorillonitu, avšak s nejnižší emisí amoniaku, což je možno vysvětlit fixací této formy dusíku přidáním jílovým minerálem.

Tabulka 1: Charakteristika podestýlky na konci výkrmového cyklu

	T	SD	S	SD	NO3	SD	NH4	SD	N-celk	SD
K	26,23	1,44	54,80	4,11	147,33	3,77	8800,00	424,26	51533,33	1225,65
B	24,33	1,53	60,80	5,31	139,33	7,54	8600,00	282,84	52800,00	1979,90
A	24,23	2,75	52,71	2,45	147,33	3,77	9200,00	848,53	53233,33	3582,67

Hodnocení emise amoniaku u jednotlivých ošetřené podestýlky ukázala významné snížení emise amoniaku o 54, 23 % a 30,44 %. Při měření emise je vidět nárůst uvolněného amoniaku

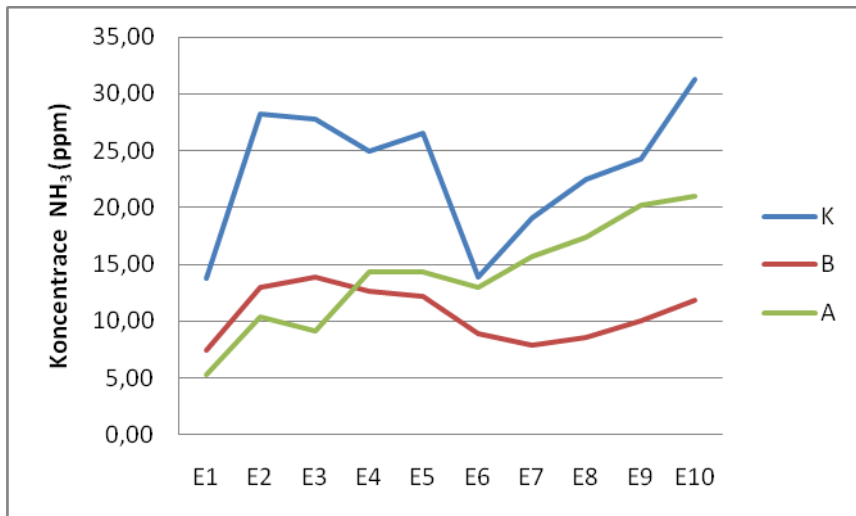
MENDELNET 2012

v minutových intervalech. Pro rozlišení rozdílů bylo nutno provádět měření minimálně 8 minut, lépe pak 10 minut, přičemž rozhodující měření vyjadřující účinnost jednotlivých preparátů se zpřesňuje prodloužením měřicí doby. Námi zjištěné hodnoty v tomto krátkém intervalu není možné hodnotit a brát za směodatnou z pohledu snížení celkové emise během trvání celého výkrmového cyklu, neboť v předešlých měřeních (předcházejících týdnech) nebyly zjištěny tak významné rozdíly. Ukazuje ale na schopnost fixace dusíku, což je důležité z pohledu fixace živin, ale také z pohledu omezení emise amoniaku ve stáji, v době skladování a vlastní aplikaci na pole, především s pozdějším zapravením do půdy.

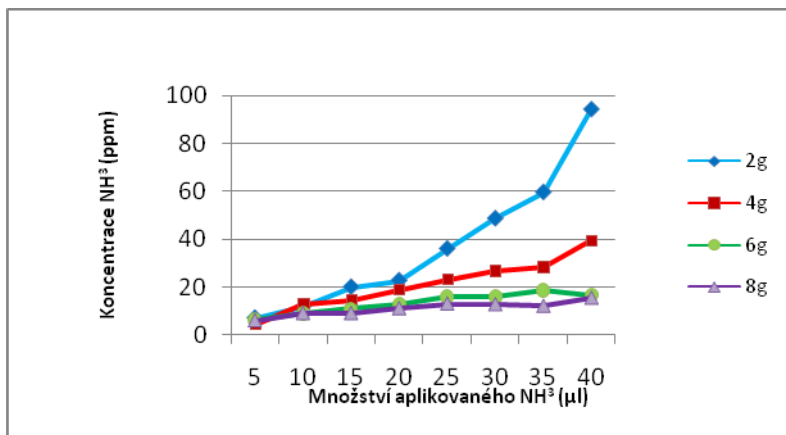
Třebaže byly u kontrolní skupiny naměřeny v úrovni podestýlky pod měřicím zvonem hodnoty amoniaku převyšující nejvyšší doporučenou hodnotu amoniaku (20 ppm), stejně jako povolenou koncentraci amoniaku (25 ppm), není možno považovat zjištěné výsledky jako kritické, neboť byly v zóně zvířat (bez použití měřicích zvonů) naměřeny nejvyšší koncentrace amoniaku 17,9 ppm. Naměřené hodnoty v zóně zvířat je možno vysvětlit turbulencí stájového vzduchu, závisující na funkčnosti ventilačního systému, který pak efektivně odvádí emitovaný amoniak ze stáje.

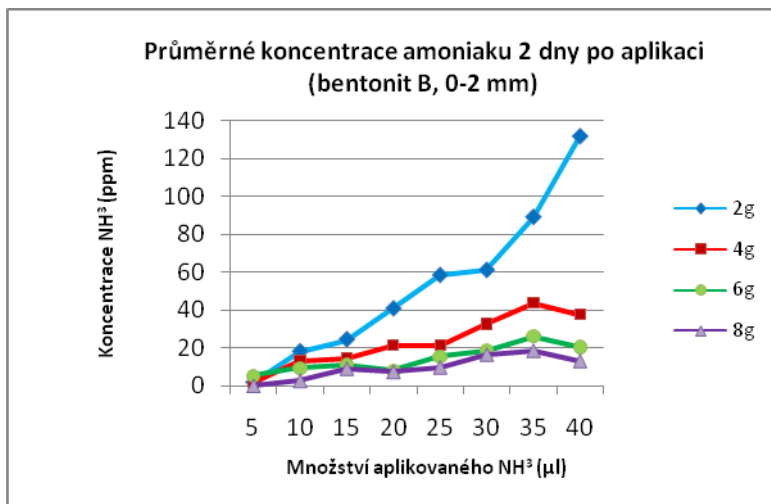
Při ověřování laboratorních přístupů použitelný pro plošné testování jílových minerálů byl hledán optimální poměr zkoumaného vzorku a aplikovaného vodného roztoku amoniaku. S ohledem na měřitelnost byla navržena koncentrace 6,5 %, při aplikovaném množství, nyní již využívaného v metodice pokusu v kombinaci s uvedeným množstvím jílových minerálů.

Graf 1: Hodnocení emise amoniaku z podestýlky na konci výkrmového cyklu



Graf 2: Průměrné koncentrace amoniaku 2 dny po aplikaci (bentonit A, 0-2 mm)

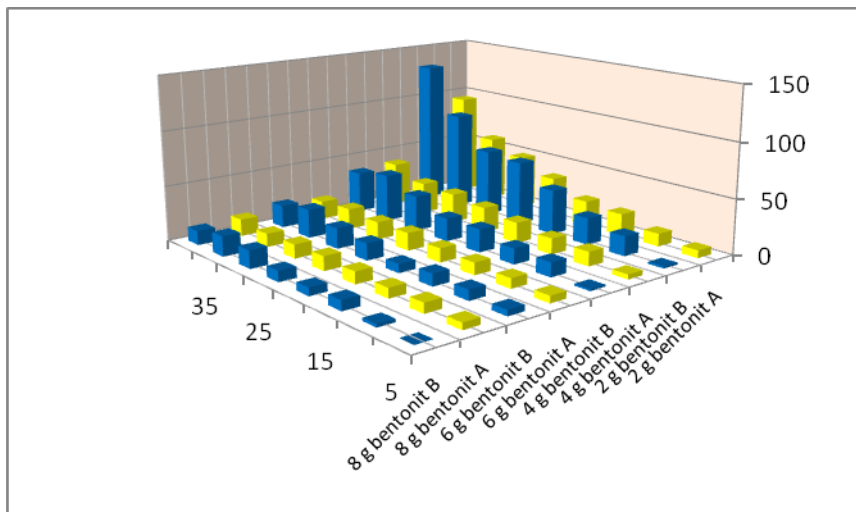




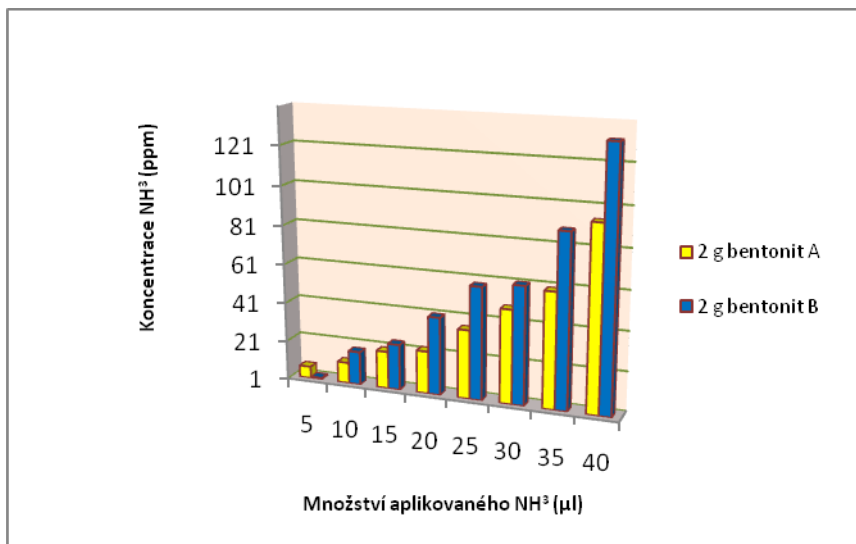
Z uvedených grafů 2 a 3 je patrný rozdíl v naměřené emisi při aplikaci 10 – 30 μl. Vzhledem k tomu, že se jedná o měření amoniaku, který se nenavázal na aplikovaný a testovaný vzorek jílu, je takto možno posoudit sorpční schopnost daného vzorku. Logicky nejrychlejší reakce nastává u varianty aplikace nejvyššího množství vzorku. Pokud bylo pro měření použito vyšších dávek amoniaku, došlo k problémům s měřením, neboť byla zvýšená hladina amoniaku v měřicí láhvi vyšší jak 200 ppm, což je běžnými měřicími přístroji neměřitelné. Navíc by docházelo k rychlé spotřebě elektrochemických čidel použitých analyzátorů.

Výsledky jednotlivých laboratorních měření jsou uvedeny v grafech 4 až 8. Naměřené hodnoty vychází ze znalosti analyticky aplikovaného množství posuzovaného jílu i množství vodného roztoku amoniaku, který v experimentální láhvi téká a následně je fixován testovaným přírodním minerálem. Třebaže byl vypočítán korelační koeficient mezi hodnotami emisí ve stáji a v laboratorních podmínkách na úrovni 0,767 – 0,896, lze ve stáji očekávat rozdíly způsobené otevřeným prostorem, prouděním vzduchu, ale také nerovnoměrností aplikace do podestýlky a tedy následnou nerovnoměrnou sorpcí uvolněného amoniaku.

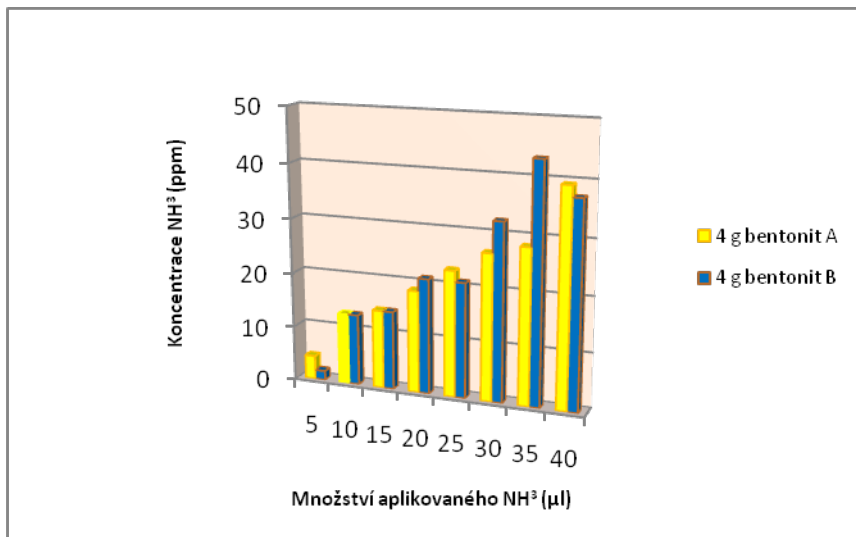
Graf 4: Porovnání průměrné koncentrace amoniaku 2 dny po aplikaci podle druhu a dávky jílů (granulace 0-2 mm)



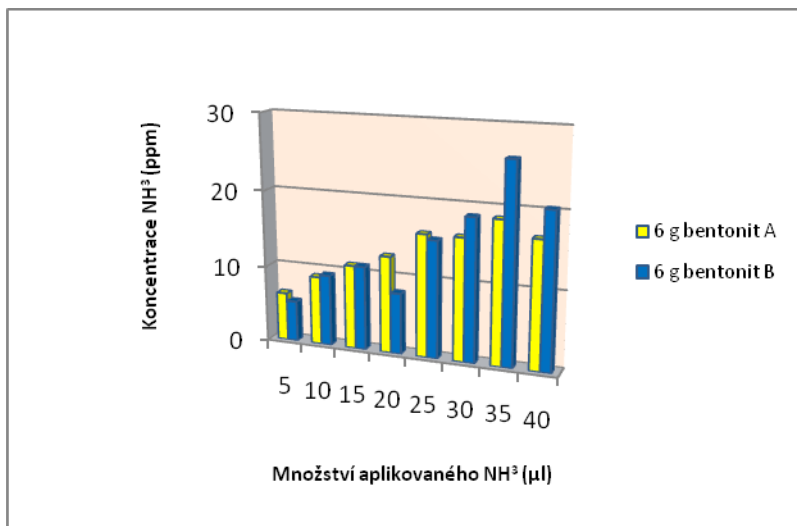
Graf 4: Laboratorní hodnocení vzorků jílových minerálů při dávce 2 g



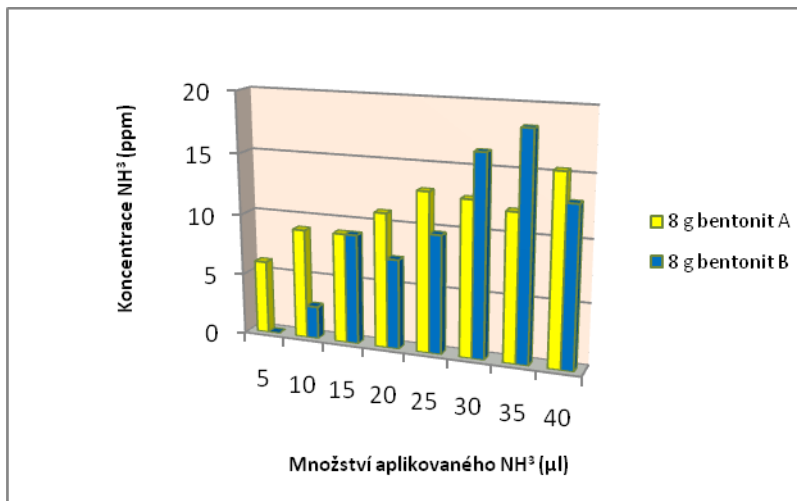
Graf 5: Laboratorní hodnocení vzorků jílových minerálů při dávce 4 g



Graf 6: Laboratorní hodnocení vzorků jílových minerálů při dávce 6 g



Graf 7: Laboratorní hodnocení vzorků jílových minerálů při dávce 8 g



ZÁVĚR

Výsledky ukázaly, že je k zajištění objektivnosti měření emise amoniaku s pomocí měřicího zvonu zajistit měření minimálně 8 minut, nejlépe pak déle, vždy v měřící stopě jedné minuty.

O úrovni amoniaku ve stáji rozhoduje emisní zdroj v kombinaci s výkonem a funkcí ventilacího systému.

Navržená metodika posouzení sorpční účinnosti je využitelná k posouzení jednotlivých preparátů.

LITERATURA

Anderson DP, Beard CW, and Hanson RP. 1964. The adverse effects of ammonia on Dickens including resistance to infection with Newcastle disease virus. Avian. Dis. 8:369-379.

Aneja, V.P., Murray, G.C., Southerland, J., 1998. Atmospheric Nitrogen Compounds: Emissions, Transport, Transformation, Deposition, and Assessment. EM (AWMA), pp. 22-25.

Dentener FJ, Crutzen PJ. A three-dimensional model of the global ammonia cycle. J Atmos Chem 1994; 19:331–69.

Doušová B. et al.: Příprava anioaktivních (nano)sorbentů z jílových minerálů, Informátor 5/2010, Česká společnost pro výzkum a využití jílu [online], [citace 7. října 2011]. Dostupné na internetu <<http://www.czechclaygroup.cz/informatory/informator43.pdf>>

Elwinger, K., Svensson, L., 1996. Effect of dietary protein content, litter and drinker type on ammonia emission from broiler houses. Journal of Agricultural Engineering Research 64, 197–208.

Elzing A, Monteny GJ. Ammonia emission in a scale model of a dairy-cow house. *Trans Am Soc Agric Eng* 1997;40:713–20.

Hartung, J., Phillips, V. R., 1994. Control of gaseous emissions from livestock buildings and manure stores. *J. Agric. Eng. Res.*, 57, 173-189.

Kay, R.M., Lee P.A., 1997. Ammonia emissions from pig buildings and characteristics of slurry produced by pigs offered low crude protein diets. In: Voermans, J.A.M., Monteny, G.J. (Eds.), *Ammonia and Odour Emission from Animal Production Facilities*. Vinkeloord, The Netherlands, pp. 253–259.

Kelleher, B. P., Leahy, J. J., Henihan, A. M., O'Dwyer, T. F., Sutton, D., Leahy, M. J., 2002. Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Biodegrad. Tech.* 83, 27-36.

Kleven, S.H. and J.R. Glisson, 1997. *Multicausal Respiratory Disease; Disease of Poultry*. 10th Iowa State University Press, pp: 1008-1010.

McCrory, D.F., Hobbs, P.J., 2011: Additives to Reduce Ammonia and Odor Emissions from Livestock Wastes [online], [citace 13. března 2011]. Dostupné na internetu <<https://www.soils.org/publications/jeq/articles/30/2/345>>

Muck, R. E., Richards, B. K.: 1980: Losses of manurial N in freestall barns. *Agric. Manure*, 7, 41-54.

Nicholson, F.A., Chambers, B.J. and Walker, A.W. (2004) Ammonia emissions from broiler litter and laying hen manure management systems. *Biosystems Engineering*, 89 175-185.

O'Neill, D. H., and V. R. Phillips. 1992. A review of the control of odor nuisance from livestock buildings: Part 3. Properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. *J. Agric. Eng. Res.* 53:23–50.

Papaioannou, D., Katsoulos, P. D., Panousis, N. and Karatzias H. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: a review, *Microporous Mesoporous Mater.*, 84 (2005) 161–170.

Ritz, C.W. et al., 2004: Implications of Ammonia Production and Emissions from Commercial Poultry Facilities: A Review, Department of Poultry Science, The University of Georgia, Athens, Georgia 30602, [online], [citace 21. února 2011]. Dostupné na internetu <<http://japr.fass.org/cgi/reprint/13/4/684.pdf>>

Roskill, 1997. *The Economics of Bentonite*. Roskill Information Services, London. UN, 2005. *United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water*. May, <www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic3>.

Slámová R. et al.: Clay minerals in animal nutrition, *Veterinary Research Institute* [online], [citace 20. února 2011]. Dostupné na internetu <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016913171100010X>>

Seinfeld JH, Pandis SN. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*. New York, NY: Wiley; 1998. p. 523– 39.

MENDELNET 2012

Smits, M.C.J., Valk, H., Elzing, A., Keen, A., 1995. Effect of protein nutrition on ammonia emission from a cubicle house for dairy cattle. *Livestock Production Science* 44, 147–156.

Warneck P. *Chemistry of the Natural Atmosphere*. New York: Academic Press; 1988. p. 429– 515.

Whitehead DC. Atmospheric ammonia in relation to grassland agriculture and livestock production. *Soil Use Manage* 1990;6:63–5.

Williams et al., L.B. Williams, M. Holland, D.D. Eberl, T. Brunet and L. Brunet de Coursou, Killer Clays! Natural antibacterial clay minerals. *Mineralog. Soc. Bull.*, 139 (2004), pp. 3–8.

EFFECTS OF MECHANICAL IMPACTS ON HATCHABILITY OF BROILER BREEDERS

Torma T.¹, Kovácsné K.G.²

¹Aviagen Kft. Fehervari u. 75. Győr, 9028, Hungary

²University of West Hungary Faculty of Agricultural and Food Sciences, Institute of Animal Sciences Mosonmagyaróvár 9200, Vár, Hungary

E-mail: ttorma@aviagen.com, gaal@mtk.nyme.hu

ABSTRACT

The effects of transport and other mechanical impacts have been mainly investigated in table egg production industry. Although the effects on hatchability are known they have not been examined on a large scale even though sophisticated equipments are widely available on the market to monitor mechanical effects during transport. Transporting hatching eggs from Hungary and incubating them abroad revealed lower hatchability compared to when the eggs were incubated in Hungary. Following transport, there were higher embryo losses and, notably, more malformed embryos. The aim of these initial trials was to determine if a testing device (Crazy Fit Massage machine – CFM machine) was able to replicate and model the mechanical impacts experienced during transport and reproduce the reduction in hatchability and increase the level of malformed embryos as have been observed in commercial practice. Tinytag® high sensitivity shock and vibration loggers were used to monitor the impacts under field and trial conditions.

Applying single 10 minute treatments on the CFM machine using the same frequency (10-30 Hz) as the eggs experience under field conditions induced the negative effect of transport and lower hatching results were experienced. Three trials were conducted. Treated eggs in Trial No. 1 and 2 received automatically and periodical changing vibration in a range between 10-30 Hz for 10 minutes while in Trial 3 two different level of impact were applied at 20 and 30 Hz, respectively.

Hatchability decreased due the treatment although in only Trial No. 3 was the difference significant, also the difference in early dead levels in Trials 2 and 3 and occurrences of malformation in Trial 1 and 3. All these results are in accordance the field experience.

Thus, the trials examined the equipment was able to produce mechanical impacts that were repeatable in order to set up statistically reliable trials on hatching eggs.

Key words: mechanical impacts, hatchability, loggers

Acknowledgments: I like to thank the University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Institute of Animal Sciences Mosonmagyaróvár, Aviagen Kft, the hatchery and personnel of Hegyhát Br. Kft. at Bábolna and Dr. Steve Tullett who is helping with technical inputs into this study.

INTRODUCTION

The effects of transport and other mechanical impacts have been mainly investigated in table egg production (Carter, 1970). Walker et al. (1972) already stated that, during transport, shaking of the eggs should be held to a minimum since shaking has been found to have a detrimental effect on egg quality.

Their main concerns were the damage during transport on the egg shell integrity and through this the levels of saleable table eggs and other effects on internal egg quality which could affect the value of the table eggs. This is one of the main concerns in hatching eggs also, but because hatching eggs have a higher value, the economic loss is even higher than on table eggs.

The negative effects of mechanical impacts on hatchability are widely known and it was investigated even as early as the 1830s (I. Geoffroy-Saint-Hilaire). It is common belief that jarring of eggs during shipment may seriously reduce their hatchability. Enquires into this problem have been made by I. Geoffroy-Saint-Hilaire (1836), Dareste (1867) and Launder (1943). Saint-Hilaire produced malformed chick embryos by subjecting eggs to various environmental conditions including physical trauma (jarring, inversion, pricking) and toxic exposures. However, Proudfoot (1969) observed the hatchability did not appear to be affected the vibration treatments used in his work.

The negative effect of transport on hatchability is known widely and customers are warned about the importance of good transporting conditions by representatives of incubator manufacturers (Gerd de Lange) and breeding companies (Tullett) but no measurements work has been done so far to determine the threshold for mechanical impacts to minimize the negative effect of transport.

Although there are many data loggers on the market to monitor the actual level of mechanical shock and vibration during egg handling, only one scientific work was accomplished when level of impact was actually measured, in correlation with the hatchability this was done by a Department of Conservation in New Zealand with kiwi and emu eggs (Potter and Bassett, 2001). They examined the effects of transportation-induced jarring on ratite embryo development and hatching success. They concluded that jarring did not increase physical abnormalities or defects in developing or hatched chicks within the level of jarring applied in this experiment. However, they collected eggs from the wild forests and therefore some of these eggs were already in the incubation cycle when treated.

Within Aviagen, egg shipments are equipped with shock and vibration loggers to monitor transport conditions. A database has been established but the effect of transport is difficult to interpret

because the location of the pallet and the eggs on the truck has a big effect as have the particular egg characteristics of the load. The observations are often not repeatable because the chances of driving twice with the same pattern over the long distance is very low. Berardinelli et al. (2003) examined the effect of transport by modelling the impacts on a vibrating table of an electrodynamic shaker, which gave us the idea to use a device for modelling the transport conditions under better controlled and repeatable manner.

The aim of these initial trials was to determine if the testing device (Crazy Fit Massage machine – CFM machine) was able to replicate and model the mechanical impacts experienced during transport when applying the same level of shaking and vibration as the eggs facing with during transport. The long-term plan is to determine whether the g-force or the vibration pattern has the bigger impact and set up a threshold for the more critical parameter for hatching egg transport on the field.

MATERIAL AND METHODS

Eggs

All eggs originated from young GP flocks, which were underweight to consider them as hatching eggs, but they were suitable to test the equipment.

In each trial, the same number of untreated eggs from the same origin and collection period were set as control groups. In the field, eggs were collected and temporarily stored before despatch and after arrival to the destination they are incubated within a few days. The same scenario was used during these trials. In the case of Trials 1 and 3 eggs were stored for less than one day and in the case of Trial 2, three days was the storage period before set.

All eggs were stored in an egg storage room controlled to 16-17°C and 80-85 RH%.

Modelling the transport conditions on CFM machine

The Crazy Fit Massage Machine is a vibration machine with a two dimension vibration plate moved by a motor with the capacity of 1.5 HP. The machine can be set for different levels of vibration between 0-30 Hz, the maximum amplitude is 12 mm.

Treated eggs were placed on Keyes trays (the same type of fibre trays used on the field for transportation) then placed onto the CFM machine in subgroups (each group consisted of 150 eggs) and received single 10 minute long treatments. The motions were monitored and recorded by a Tinytag® TGP – 0650 vibration logger and Tinytag® TGP – 0605 high sensitivity shock logger/accelerometer to ensure the applied conditions did not exceed those that have been measured under field transport conditions.

In Trials 1 and 2, the trial eggs were treated for 10 minutes with periodically changing vibration in a range between 10-30 HZ. In Trial 3, trial eggs were divided into two groups. Eggs in the first trial

group received a 10 minute treatment of 20 Hz constant vibration, while in the second trial group the eggs received a 10 minute treatment of 30 Hz constant vibration.

Incubation and data collection

Treated eggs were placed onto the same setter trolley as their control group and incubated and hatched together.

The initial egg number in Trials 1 and 2 were 2100 eggs in each of the control and trial groups. In Trial 3, there were 1350 eggs in each of the control and treated groups. Eggs were divided into 150 eggs subunits (capacity of one Petersime setter trays). Treatments and data collection were performed on the individual subunits.

Eggs broken during treatment did not get incubated, but their number was recorded. Eggs with hair line cracks were incubated.

Eggs were incubated and hatched in the hatchery at Bábolna in Petersime machines. The incubation profile was modified according the length of the storage and the characteristics of eggs originating from young flock.

Eggs removed at candling (only in Trial 2) and the hatch debris (in all trials) were broken out in order to determine fertility and the different categories of dead embryos in the unhatched eggs. The following categories were determined during egg break-out: infertile, early-dead embryos, mid-dead embryos, late-dead embryos, embryos with malformations, embryos not in the correct hatch position (malposition), cracked/eggs with shell problems. Pipped embryos were regarded as late deads. No subcategories were determined in the case of malpositions or malformations.

The number of hatched chicks and the result of the egg break-outs were recorded by subunits (setter trays, hatching baskets).

The egg break-out and the categorization of embryos were performed according to the Ross Tech “Investigating Hatchery Practice” (Tullett, 2009).

From the data, the hatch of eggs set, hatch of fertile eggs (HOF%), early-dead as a percentage of the fertile eggs (EDoF%), mid-dead as a percentage of the fertile eggs (MDoF%), late-dead as a percentage of the fertile eggs (LDoF%), malformed embryos as a percentage of the fertile eggs (MALFoF%) and embryos in malpositions (MALPoF%) were calculated. Malformations, malpositions and pipped eggs were subcategories under late-dead but their ratios were also calculated separately.

SPSS software was used to analyze the data statistically.

RESULTS AND DISCUSSION

In Trial 1, the treated eggs had a lower hatchability, a higher level of dead embryos in every category, more cracks/shell problems and more malformations and malpositions. When independent samples T test was performed it revealed significant ($P < 0.05$) differences only for the percentage of malformed embryos (*Table 1.*)

In Trial 2, the treated eggs had a lower hatchability, higher level of dead embryos in every category, more cracks/shell problems and more malformations and malpositions. When independent samples T test was performed it revealed significant ($P < 0.05$) differences in case of early-deads and the occurrence of malpositioned embryos (*Table 2.*).

In Trial 3, two groups of eggs were treated with different vibrations. Eggs in the first trial group received 10 minutes treatment on 20 Hz constant vibration, while the second trial group received 10 minutes treatment at 30 Hz constant vibration. To analyse if the difference between the results was statistically reliable ANOVA was applied (*see Table 3.*). There were significant differences (at the 0.05 level with Tukey t-test) as follows:

- Hatch of fertiles between the control and the both treated groups and between the two treatment groups
- EDoF and MDoF: between the control group and the 30 Hz treated group and between the two treated groups
- MALFoF: between the control group and the 30 Hz treated group (*Table 3.*).

Table 1. Trial 1 - hatchability and egg break-out results in control and trial groups (eggs received periodical changing vibration in a range between 10-30 Hz for 10 minutes)

	HOF%	EDoF%	MDoF%	LDoF%	Crack/shell problem%	MALFoF%	MALPoF%
Control	61.78 ^a ±13.45	18.80 ^a ±7.04	0.59 ^a ±0.61	11.64 ^a ±5.78	3.00 ^a ±2.10	1.12 ^a ±0.63	5.17 ^a ±2.52
Treated group	55.47 ^a ±13.62	23.56 ^a ±8.59	1.34 ^a ±0.93	14.66 ^a ±5.87	3.29 ^a ±2.21	2.28 ^b ±0.97	5.50 ^a ±3.03

^{a,b} Values containing the same superscript are not significantly different (P>0.05).

Table 2. Trial 2 - hatchability and egg break-out results in control and trial group (eggs received periodical changing vibration in a range between 10-30 Hz for 10 minutes)

	HOF%	EDoF%	MDoF%	LDoF%	Crack/shell problem%	MALFoF%	MALPoF%
Control	80.06 ^a ±3.17	9.00 ^a ±2.97	0.61 ^a ±0.56	7.94 ^a ±1.87	0.62 ^a ±0.81	0.55 ^a ±0.57	2.22 ^a ±1.12
Treated group	59.09 ^a ±8.11	21.68 ^b ±5.29	0.96 ^a ±0.95	13.85 ^a ±4.04	4.24 ^a ±2.21	1.32 ^a ±1.12	4.21 ^b ±1.51

^{a,b} Values containing the same superscript are not significant (P>0.05).

Table 3. Trial 3 hatch and egg break -out results in control and trial groups (eggs received constant vibration for 10 minutes on 20 or 30 Hz, respectively)

	HOF%	EDoF%	MDoF%	LDoF%	Crack/shell problem%	MALFoF%	MALPoF%
Control	80.75 ^a ±1.39	9.66 ^a ±1.74	0.56 ^a ±0.70	2.99 ^a ±1.16	1.78 ^a ±0.89	0.55 ^a ±0.59	1.89 ^a ±1.27
20 Hz treated group	76.80 ^b ±2.97	11.15 ^a ±3.12	0.39 ^a ±0.37	2.92 ^a ±1.69	1.50 ^a ±0.89	1.27 ^{ab} ±1.06	3.37 ^a ±1.84
30 Hz treated group	64.89 ^c ±4.27	19.52 ^c ±4.76	1.68 ^c ±0.88	4.69 ^a ±2.44	1.50 ^a ±0.88	1.85 ^{bc} ±0.77	3.20 ^a ±0.97

^{a,b,c} Values containing the same superscript are not significant (P>0.05).

The decrease in hatchability was only significant ($80.75 \text{ a} \pm 1.39$ vs. $76.80 \text{ b} \pm 2.97$ vs. $64.89 \text{ c} \pm 4.27$) in Trial No.3. The observed loss in hatchability was mainly due to the increased level of embryo mortality in the early-dead category.

The higher level of early-dead was expected based on the field experiments and Trial 2 ($9.00^{\text{a}} \pm 2.97$ vs. $21.68^{\text{b}} \pm 5.29$) and in the 30 Hz treated group in Trial 3 ($9.66^{\text{a}} \pm 1.74$ vs. $19.52^{\text{c}} \pm 4.76$) also showed a significant difference in this category. *Besch et al.* (1965b) established in their work that the accelerative force on the blastoderm resulted in cellular displacement and, as the germinal cells were eroded from the blastoderm, the potential hatchability of the egg tended to decrease - although the accelerative force used to apply the high level of g-force would not usually occur under commercial conditions. The microscopic examination of germinal disc and early-dead embryos will be the next step in this project.

Gerd de Lange in his articles states after transportation, eggs need to be rested for at least 12 hours before starting incubation. Immediate setting will increase early embryonic mortality. In Trials 1 and 3 eggs were set within one day of treatment, while in Trial 2 it was three days after treatment. The effect of the length of storage after treatment will be part of my future investigations.

The significant ($0.56^{\text{a}} \pm 0.70$ vs. $1.68^{\text{c}} \pm 0.88$) increase in mid-term dead embryos in Trial 3 between the control and the 30 Hz treated group was unexpected because embryos tend to be more resistant in that embryonic stage and the probability of embryonic loss is the lowest during the incubation cycle (*Tullett, 2009*).

The fact that there was no significant difference in late-dead embryos in any of the trials is in accordance with the field experience.

Besch et al. (1965a) found in their work on the effect of accelerative forces on avian embryogenesis and the impact force necessary to cause failure of embryo development was in excess of shell failure stress. In the current trials the higher embryonic losses were not due to shell damage. No significant differences were detected in the crack/shell problem category between the control and the trial groups. This could be due to the good shell quality that is usually found in eggs from young flocks. In future trials, eggs originating from flocks of different age will be examined.

The difference in malformations was significant ($P < 0.05$) in Trials 1 ($1.12^{\text{a}} \pm 0.63$ vs. $2.28^{\text{b}} \pm 0.97$) and 3 ($0.55^{\text{a}} \pm 0.59$ vs. $1.85^{\text{bc}} \pm 0.77$). The explanation could be as found by *Dareste (1877)* where eggs which had been allowed to rest for two days after shipment produced normal embryos, whereas those which had been incubated immediately on arrival gave a majority of abnormal embryos. In Trials 1 and 3 eggs were set within one day, while in Trial 2 they were not set until three days after treatment. The length of storage after treatment will be part of the future investigations.

Tullett (2009) specified the specific malformations (extra legs and/or wings) to be expected as a result of rough handling or jarring of eggs during collection and/or transport. Although the different type of malformations were not recorded in these trials, dead embryos were found with extra legs (Picture 1) and duplication in the face (Picture 2.). Rumplessness was observed in malformed embryos by Landauer and Baumann (1943) but was not feature of any embryos in this study.

Picture 1. Late dead embryo with extra legs



Picture 2. duplication in the face



In Trial 2, the significant difference ($2.22^a \pm 1.12$ vs. $4.21^b \pm 1.51$) in malpositioned embryos could be due to the small eggs on the top of the stack turning upside down due to the higher level of vibration. At the moment this is only an assumption and more trials are needed to test this hypothesis.

CONCLUSIONS

The trials confirmed that the CFM Machine was able to create mechanical impacts that were repeatable in order to set up statistically reliable trials on hatching eggs.

Hatchability decreased significantly due the treatment in Trial No.3 ($80.75^a \pm 1.39$ vs. $76.80^b \pm 2.97$ vs. $64.89^c \pm 4.27$). The observed loss in hatchability was mainly due to the increased level of embryo mortality in early-dead stage which is in accordance with the field observations following transportation of eggs. Although the difference in early-dead levels was statistically significant in Trial 2 ($9.00^a \pm 2.97$ vs. $21.68^b \pm 5.29$) and in the 30 Hz treated group in Trial 3 ($0.55^a \pm 0.59$ vs. $1.85^{bc} \pm 0.77$) we need to investigate in more depth the mechanical effect on the early-dead embryos and the supposed damage on the germinal disc will be observed with more sophisticated tools.

The significant ($0.56^a \pm 0.70$ vs. $1.68^c \pm 0.88$) increase in mid-term dead embryos in Trial 3 between the control and the 30 Hz treated group was unexpected.

There was no significant difference in late-dead embryo levels in any of the trials which is in accordance with the field experience after transportation of eggs.

The significantly higher occurrence of malformations in Trial 1 ($1.12^a \pm 0.63$ vs. $2.28^b \pm 0.97$) and 3 ($0.55^a \pm 0.59$ vs. $1.85^{bc} \pm 0.77$) might be in correlation with the short resting period between the

treatment and the incubation of the eggs. This will be the subject for further trials as well as the significantly increased level of malpositions in Trial 2 ($22^a \pm 1.12$ vs. $4.21^b \pm 1.51$).

To analyze further the reason for the elevated number of malformations and malpositions, sub-categories will be introduced when examining the egg break-outs.

REFERENCES

- Berardinelli, A.; Donati, V.; Giunchi A.; Guarnieri A.; Ragni L. (2003). Effects of Transport Vibrations on Quality Indices of Shell Eggs Biosystems Engineering, 86 (4), 495–502
- Besch E. L., A. H. Smith, and S. Goren (1965a) The effect of accelerative forces on avian embryogenesis; Journal of Applied Physiology November 1, 1965 vol. 20 no. 6 1232-1240
- Besch E. L., A. H. Smith, and M. W. Walker (1965b) Morphological changes in avian eggs subjected to accelerative force; Journal of Applied Physiology November 1, 1965 vol. 20 no. 6 1241-1248
- Carter, T.C. (1970) Why do eggshells crack? World's Poultry Science Journal, 26: 549–561
- Dareste, Camille (1877) Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou, Essais de tératogénie expérimentale par m. Camille Dareste Published 1877 by C. Reinwald & cie in Paris.
- Landauer, W. and Baumann, L. (1943) Rumplessness of chicken embryos produced by mechanical shaking of eggs prior to incubation. J. Exp. Zool. 93: 51-74
- Gerd de Lange. Hatching egg transport Pas Reform website
<http://www.pasreform.com/academy/frequently-asked-questions/hatching-eggs/14-hatching-egg-transport.html>
- Potter, M.A.; Bassett, S.M. (2001). Effects of transportation-induced jarring on ratite embryo development and hatching success. Conservation Advisory Science Notes 341, Department of Conservation, Wellington.
- Proudfoot, F.G., (1969). Effect of packaging orientation, daily positional change and vibration on the hatchability of chicken eggs stored up to four weeks. Can. J. Animal Sci. Vol. 49,29-35
- Saint-Hilaire, Geoffroy Etienne, (1836). 1772-1844. Rapport du 19 xbre 1836 teratologique 1836 Dec. 19 5p.
- Tullett, S. G (2009). Ross Tech – Investigating Hatchery Practice. Aviagen Ltd, Newbridge, Scotland.
- Walker, G.C.; Braden, E.A.; Hicks, C.L. and Tuomy, J.M. (1972). The Effect of Position, Storage Time and Shaking on The Quality of Shell Eggs Poultry Science, 51: 287-293

DIFFERENCE IN OCCUPATION OF CUBICLE ROW OF DAIRY COWS CZECH FLECKVIEH-SIMMENTAL BEFORE THE START AND AFTER MORNING MILKING

DIFERENCE V OBSAZOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH ŘAD BOXŮ
DOJNICEMI PLEMENE ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU PŘED
ZAČÁTKEM A PO SKONČENÍ RANNÍHO DOJENÍ

Večeřa M., Falta D., Velecká M., Javorová J., Andrýsek J., Studený S., Chládek G.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 brno, Czech Republic

E-mail: VeceraM@email.cz

ABSTRACT

The aim of study was analyze difference in occupied of cubicle row of dairy cows czech fleckvieh-simmental before the start and after morning milking. Experiment conducted in farm GenAgro Ricany a. s. (49°12'30.370"N, 16°23'43.092"E). The objective of monitoring was one section - one quarter of stable (n = 98 cows), where 103 cubicles are arranged in three rows (32 cubicles in row A – close to feed alley; 33 cubicles in row B – in the middle; and 38 cubicles in row C - at the edge). Observation was carried out at weekly intervals in months March, April and May 2012 (8 observations). Experiment began always at 8:00 a.m. (befor milking) and second monitoring at 10:00 am (after milking).

Our monitoring of differences in occupation of rows of boxes before and after the morning milking. Was found significant ($P < 0.05$) preferences of boxes located in a row on the edge of the stable, which was selected by the cows after milking most often. On the other hand the row, which was located in the middle section, was chosen by minority of cows. It was also revealed significantly higher ($P < 0.01$) percentage of filling all rows of boxes after milking, which was connected with the necessary rest and recovery.

Key words: cows, cubicle-row, milking, Czech fleckvieh-SIMMENTAL

Acknowledgments: This study was supported by the Research plan No. MSM6215648905 “Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change”, which was financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by Internal Grant Agency of FA, MENDELU TP 1/2012

ÚVOD

I když zvířata prošla v průběhu domestikace řadou velmi významných až zásadních změn (užitkovost, exteriér) jejich nároky na prostředí zůstaly víceméně nezměněny po celou historii jejich fylogeneze. Systém faktorů vnějšího prostředí, které působí na chovaná zvířata je nesmírně komplikovaný a pro člověka prakticky nedefinovatelný. Čím více totiž chovatel vyloučil domestikovaná zvířata z jejich přirozených životních podmínek, tím větší zodpovědnost musí přijmout za to, že jí vytvořené podmínky jsou adekvátní jejich potřebám (Chládek, 2004).

Čas, který dojnice stráví ležením, lze použít k hodnocení kvality stáje a pohodlný prostor k ležení je jedním z nejdůležitějších designových kritérií pro ustájení dojených krav (Ito et al., 2009). Pohodlné ležení je zásadní součástí dne každé produktivní dojnice (Thorne, 2008).

Pro úspěšný chov skotu by se měl chovatel zaměřit nejen na správnou výživu, zoohygienu a ustájení dojnic, ale také se snažit pochopit chování zvířat a umožnit tak jejich přirozené chování, pohodu a s tím související úspěšnost chovu. Porozumět chování zvířat v uzavřeném prostoru, znamená předejít případným nedostatkům v projekci nových stájí.

MATERIÁL A METODIKA

Pozorování proběhlo ve stáji chovatele GenAgro Říčany, a.s. (49°12'30.370"N, 16°23'43.092"E), kde jsou ustájeny dojnice českého strakatého skotu ve volné boxové stáji. Stáj je rozdělena na čtyři sekce, přičemž předmětem sledování byla jedna sekce (98 krav), kde se nachází 103 boxů umístěných ve třech řadách (řada A – nejbliže krmnému stolu – 32 boxů; řada B – přibližně ve středu sekce – 33 boxů a řada C – nejbliže obvodové stěně stavby – 38 boxů). Pozorování se uskutečnilo v měsících březen, duben a květen roku 2012 (8 pozorování). Byly sledovány pozice všech krav v sekci v jednotlivých řadách (A, B a C) před dojením (cca v 8:00 hod) a následně po dojení (cca v 10:00 hod), tj. 2 záznamy denně. Celkem bylo vyhodnoceno 1 568 pozorování jednotlivých dojnic.

Byla sledována preference řady A (32 boxů), řady B (33 boxů), řady C (38 boxů), dále procentuální zaplněnost jednotlivých řad a ostatní životní projevy (žraní, pití, stání v uličce, apod.). Záznam byl prováděn při přímém sledování dojnic do přesného schématu stáje (sekce). Následně byl zpracován a vyhodnocen v programu Microsoft Excel 2007 a dále statisticky vyhodnocen Chí-kvadrát testem v programu UNISTAT verze 5.1.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování rozdílů v obsazování jednotlivých řad před a po ranním dojení, jsme došli k následujícím poznatkům:

Z krav nacházejících se v boxech celkem leželo 820 kusů (z toho 310 kusů leželo před a 510 kusů po dojení). Celkový počet stojících krav v boxech byl 144 kusů (z toho 76 kusů před a 68 kusů po dojení). Dojnic vyskytujících se mimo box bylo celkem 604 kusů (z toho 398 kusů před a 206 kusů po dojení). Jak vyplývá z **Tab. 1**, tak z krav nacházejících se v boxech před dojením (ležících i stojících) bylo 177 kusů v řadě A (nejblíže krmnému žlabu), 95 kusů v řadě B (přibližně ve středu sekce) a 114 kusů v řadě C (nejblíže obvodové stěně stavby). Nejvíce obsazována byla řada A (v průměru 22,1 kusů), dále řada C (v průměru 14,3 kusů) a nejméně pak řada B (v průměru 11,9 kusů). Po dojení obsazenost řad vypadala následovně: řadu A si vybralo 190 kusů, řadu B 142 kusů a řadu C 246 kusů dojnic. V průměru pak nejvíce dojnice preferovaly řadu C (30,8 kusů), dále řadu A (23,8 kusů) a nejméně krav si k odpočinku vybralo řadu B (17,8 kusů). Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl zjištěn pouze u průměrného obsazení řady C před a po dojení. Statisticky vysoce průkazný rozdíl ($P < 0,01$) byl pak zjištěn u celkové zaplněnosti řady B a C před a po ranním dojení. Ostatní výsledky byly statisticky neprůkazné ($P > 0,05$).

Při procentuální vyjádření míry obsazenosti jednotlivých řad za všechna sledování jsme došli k závěru, že: řada A (32 boxů) byla zaplněna v průměru za všechna sledování před dojením ze 69,1 % a po dojení ze 79,3 %, řada B (33 boxů) byla obsazena před dojením ze 36,0 % a po dojení ze 53,9 %, řada C (38 boxů) byla využita před dojením ze 37,6 % a po dojení ze 81,1 %. Statisticky vysoce průkazně ($P < 0,01$) se zvýšilo procento obsazenosti pouze v řadě C, ostatní rozdíly v obsazení byly statisticky neprůkazné ($P > 0,05$). Dojnic, které neobsadily žádnou řadu boxů a raději se věnovaly ostatním činnostem (žraní, pití, komfortní chování, atd.), bylo před dojením 398 kusů a po dojení 206 kusů, tento rozdíl byl statisticky vysoce průkazný ($P > 0,05$).

Wagner – Storch et al. (2003) zjistili, že zvýšení míry obsazenosti boxové řady, nacházející se na okraji stáje, může být způsobena vyšší ventilací v tomto místě. Obsazenost také závislá na času stráveném v boxu, povrchu a teplotě uvnitř stáje. Doležal (2003) uvádí, vyšší preferenci v obsazování první řady boxů, která se nachází nejblíže krmnému žlabu oproti ostatním řadám. Také Gaworski et al. (2003) také potvrzují, že dojnice preferovaly z větší části řadu boxů, nacházející se u krmného stolu, než řady vzdálenější. Poněkud jiné výsledky uvádějí Natzke et al., (1982) kteří tvrdí, že prostřední řady boxů jsou preferovanější, než řady umístěné na okrajích. Toto zjištění také potvrzuje Večeřa et al., (2011) kteří uvádějí, že dojnice po příchodu z dojírny, pokud mají možnost si vybrat, preferují řadu která je nejblíže krmnému stolu a následně pak druhou (prostřední) řadu boxů. Dále upřesňuje Večeřa et al., (2012), že dojnice ve vyšším stádiu laktace, více upřednostňují v obsazování řadu boxu nejblíže u krmného stolu.

Tab. 1 Rozdíly v obsazenosti jednotlivých řad před a po ranním dojení

Řada (počet boxů)	Před dojením			Po dojení			Rozdí t ²
	avg. (ks)	Celke m (ks)	zaplněnost řady ¹ (%)	avg. (ks)	celke m (ks)	zaplněnost řady ¹ (%)	
A (32 boxů)	22,1	177	69,1	23,8	190	79,3	+1,7
B (33 boxů)	11,9	95 ^A	36,0	17,8	142 ^B	53,9	+5,9
C (38 boxů)	14,3 a	114 ^A	37,6 ^A	30,8 b	246 ^B	81,1 ^B	+16,5 *
mimo box	49,8	398 ^A	-	25,8	206 ^B	-	- 24
suma	98	784	-	98	784	-	-

Statisticky průkazný rozdíl $P < 0,05$ (a, b, *), statisticky vysoce průkazný rozdíl $P < 0,01$ (A, B, **), popřípadě statisticky neprůkazný rozdíl $P > 0,05$ (NS)

1 procentuální zaplnění řady v závislosti na počtu boxů

2 rozdíl mezi průměrným obsazením řad dojnici před a po dojení

ZÁVĚR

Naše sledování odhalilo rozdíly v obsazování boxových řad před a následně po ranním dojení. Byla zjištěna průkazná preference boxů nacházejících se v řadě na okraji stáje, kterou si dojnice po dojení vybíraly nejčastěji. Naproti tomu si řadu, která se nacházela uprostřed sekce, vybíralo ze všech sledování nejméně dojnic. Dále bylo odhaleno průkazně vyšší procentuální zaplnění všech řad boxů u krav po dojení, což souviselo s nutným odpočinkem a regenerací.

LITERATURA

CHLÁDEK, G. Složení mléka jako levný a účinný prostředek pro hodnocení chovného prostředí dojnic. In HANUŠ, O. a kol. Aktuální problémy řízení v chovu skotu. Rapotín. AGRÁRNÍ KOMORA Olomouckého kraje, OKRESNÍ AGRÁRNÍ KOMORA ŠUMPERK, listopad 2004, s. 56-60.

DOLEŽAL, O. (2003): Vyhodnocení čtyřřadové dispozice boxových loží metodou preferenční testace. [on-line], Dostupné z: www.mze-vyzkum-infobanka.cz/DownloadFile/41757.aspx. (cit. 1. 3. 2012)

GAWORSKI, M. A., TUCKER, C. B. AND WEARY, D. M. (2003): Effects of two free-stall designs on dairy cattle behavior. Proceedings of the Fifth International Dairy Housing Conference, American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, pp. 139-146.

ITO, K., et. al. (2009): Lying behavior: Assessing within – and between – herd variation in free-stall-housed dairy cows. *Journal of dairy science*, 92 (9): s. 4412-4420, ISSN 0022-0302

NATZKE, R. P., BRAY, D. R. AND EVERETT, R. W. (1982): Cow Preference for Free Stall Surface Material. *Journal of Dairy Science* 65, 146-153. ISSN 0022 - 0302

THORNE, M., (2008): Busy cows need comfort when they take a rest. *Farmes weekly* (10/2008). ISSN 0014-8474

VEČEŘA, M., STUDENÝ, S., POLÁK, O., ZEJDOVÁ, P., FALTA, D., CHLÁDEK, G. (2012): Vliv pořadí laktace na celodenní preferenci boxové řady dojníc českého strakatého plemene. [CD-ROM]. In *Animal Breeding*. s. 62-66. ISBN 978-80-7157-224-4.

VEČEŘA, M., FALTA, D., ZEJDOVÁ, P., POLÁK, O., STUDENÝ, S., CHLÁDEK, G. (2011): Výběr řady boxů dojnicemi po návratu z ranního dojení. [CD-ROM]. In *MendelNet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. s. 56. ISBN 978-80-7375-563-8.

WAGNER-STORCH, A. M., PALMER, R. W. AND KAMMEL, D. W. (2003). Factors Affecting Stall Use for Different Freestall Bases. *Journal of Dairy Science* 86, 2253-2266. ISSN 0022 - 0302

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE TEMPERATURE IN THE STABLE, COMPOSITION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK IN CZECH FLECKVIEH BREED

VZTAH MEZI TEPLOTOU VE STÁJI, SLOŽENÍM A TECHNOLOGICKÝMI VLASTNOSTMI MLÉKA U ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU

Velecká M., Falta D., Javorová J., Večeřa M., Andryšek J., Studený S., Chládek G.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: velecka@tiscali.cz

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the relationship between the temperature in the stable, composition and technological properties of bulk tank milk samples. Altogether 87 bulk milk samples obtained in identical herds within 87 weeks (3. 6. 2010 – 2. 2. 2012) were divided into six groups depending on average diurnal pattern of air temperatures (less than 0.00 °C; 0.01 to 5.00 °C; 5.01 to 10.00 °C; 10.01 to 15.00 °C, 15.01 to 20.00 °C and above 27.00 °C). Viewed samples came from the farm GenAgro Říčany a. s., which reared with Czech Fleckvieh breed. The average values of milk parameters under study (n = 87) were as follows: rennet coagulation time 199.53 sec., curd quality class 1.50, titratable acidity 7.03 °SH, active acidity pH 6.72, milk density 1.030 kg.l⁻¹, fat content 3.95 g.100g⁻¹, protein content 3.58 g.100g⁻¹, lactose content 4.80 g.100g⁻¹, solids non-fat content 8.99 g.100g⁻¹ and the average diurnal temperature was 11.05 °C. We found that with increasing average daily temperature in the barn with a statistically significantly (P<0.01) reduced the quality of the curd and the protein content, fat content, solids non-fat content, while increasing the lactose content. Rennet coagulation time, titratable acidity and active acidity remained almost unchanged (P>0.01).

Key words: cows, stable temperature, milk components, technological properties, Czech Fleckvieh

Acknowledgments: This research was supported by grant project IGA TP 1/2012 FA MENDELU and by the research plan MSM 6215648905.

ÚVOD

Obsah jednotlivých složek mléka není konstantní (SOMMER, 1987), je ovlivněn vnitřními faktory (např. genotyp, věk, zdravotní stav atd.) a vnějšími faktory (např. výživa, lidský faktor, sezónnost atd.) (SENKA, 2011). Skot poměrně dobře snáší nízké teploty, hůře se však vyrovnává s vysokými teplotami vnějšího prostředí (ILLEK et al., 2007). Termoneutrální zóna u dojníc je proto definována v rozmezí teplot vzduchu od 3 do 12 °C (HANUŠ et al., 2008). Vyšší teplota vzduchu pro skot je již 16 °C, teploty nad 25 °C lze označit za vysoké (KNÍŽKOVÁ, KNÍŽEK, 1995). Negativní vliv se projevuje se zpožděním přibližně 24 až 48 hodin (KAMARÁDOVÁ et al., 2008).

Technologické vlastnosti jsou znaky charakterizující z nějakého pohledu vhodnost syrového mléka k následnému zpracování (HANUŠ et al., 2004). Řadíme mezi ně např. syřitelnost, kysací schopnost a tepelnou stabilitu (GAJDUŠEK, 2003). CHLÁDEK a ČEJNA (2006), uvádí i další parametry: obsah kaseinu, bod mrznutí, inhibiční látky, tukuprostá sušina, aktivní a titrační kyselost.

MATERIÁL A METODIKA

Bazénové vzorky, použité pro tuto práci, pocházely ze zemědělského podniku GenAgro Říčany, a.s. (GPS 49°12'32.319" N, 16°23'42.666" E), který se zabývá chovem českého strakatého skotu. V průběhu 87 týdnů (od 3. 6. 2010 do 2. 2. 2012) byly jednou týdně, v rámci jednoho dne, odebrány bazénové vzorky, které představovaly směs ranního a večerního nádoje z předchozího dne. V laboratoři na Ústavu chovu a šlechtění zvířat Mendlovy univerzity v Brně byla prováděna analýza vzorků druhý den po odběru. Byly stanoveny průměrné hodnoty: složení mléka zahrnovalo zjištění obsahu tuku ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), kaseinu ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), laktózy (monohydrát laktózy; $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), hrubých bílkovin ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), hustoty ($\text{kg}\cdot \text{l}^{-1}$) a tukuprosté sušiny ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) pomocí MilkoScope Julie C5 Automatic od společnosti Scope-Electric pracující na principu termoanalýzy. Syřitelnost byla stanovena pomocí "Nefelo-turbidimetrického snímače koagulace mléka" měřící principem popsáným v PŘIBYLA a ČEJNA (2006). Kvalita syřeniny byla zjišťována po inkubaci zasyřené mléka dle upravené metodiky GAJDUŠKA (1997) hodnotící vzhled syřeniny a syrovátky (třída 1 = nejlepší, třída 5 = nejhorší). Teplota vzduchu představovala aritmetický průměr teplot v kontrolní dny, zjišťovaných každých 15 minut s použitím 3 čidel s dataloggerem HOBO (Onset Computer) v kohoutkové výšce. Dle zjištěné teploty byly vzorky rozděleny do šesti intervalů: méně než 0,00 °C; 0,01 až 5,00 °C; 5,01 až 10,00 °C; 10,01 až 15,00 °C; 15,01 až 20,0 °C a nad 20,01 °C. Aktivní kyselost byla měřena pH-metrem WTW pH 197. Titrační kyselost podle Soxhlet-Henkela pomocí odměrného roztoku NaOH. Ke zpracování výsledků byl použit program MS Office Excel 2003 a Unistat verze 5.1.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vliv teploty ve stáji na složení a vybrané technologické parametry je uveden v Tab. 1. Z tabulky je patrné, že počet vzorků analyzovaných v rámci šesti teplotních intervalů se pohyboval od 9 případů (teplotní rozmezí méně než 0,00 °C) po 24 případů (teplotní rozmezí 15,01 do 20,00 °C). Česká republika leží v mírném podnebném pásu s typickým střídáním čtyř ročních období, kdy nejteplejším měsícem bývá červenec a nejméně chladným leden.

Průkazně nejvyšší průměrné hodnoty tuku ($4,32 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), bílkovin ($3,77 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), kaseinu ($2,94 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a tukuprosté sušiny ($9,13 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) byly naměřeny v intervalu s nejnižším průměrem denních teplot ve stáji (méně než 0,00 °C). Naopak průkazně nejnižší průměrné hodnoty tuku ($3,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), bílkovin ($3,43 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), kaseinu ($2,69 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a tukuprosté sušiny ($8,86 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) byly zjištěny v intervalu s nejvyšší průměrnou denní teplotou (nad 27,00 °C). Dále nejvyšší průměrné hodnoty laktózy ($4,83 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) byly naměřeny v intervalu od 10,01 do 15,00 °C a naopak nejnižší průměrné hodnoty ($4,76 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) byly naměřeny v intervalu s nejnižší průměrnou denní teplotou (méně než 0,00 °C). Nejvyšší průměrná hustota ($1,0302 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$) byla zjištěna v intervalu od 5,01 do 15,00 °C a naopak nejnižší průměrná hustota ($1,0294 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$) byla naměřena v intervalu od 0,01 do 5,00 °C. Nejlepší průměrné kvality (třída 1,15) dosahovala sýřenina v intervalu do 0,00 °C a naopak nejhorší průměrná kvalita sýřeniny (třída 1,71) byla zjištěna v intervalu průměrné denní teploty ve stáji od 15,01 do 20,00 °C. Bylo zjištěno, že s klesající průměrnou denní teplotou ve stáji se vysoce průkazně ($P < 0.01$) zvyšoval obsah tuku, bílkovin, tukuprosté sušiny, kaseinu a kvalita sýřeniny se zlepšovala. Naopak se vysoce průkazně ($P < 0.01$) snižoval obsah laktózy. Rozdíly průměrů titrační kyselosti (maximálně 0,24 °SH), aktivní kyselosti (maximálně pH 0,06), syřitelnosti (maximálně 15,67 s) v rámci sledovaných rozmezí průměrných denních teplot nebyly průkazné ($P > 0.01$).

Výsledky jsou v souladu s tvrzením SARGEANT et al. (1998), že v teplejších měsících je procento tuku a bílkovin nižší v porovnání s výrobou v chladných měsících. V souladu s obecně známými vztahy mezi složkami mléka byl tento pokles bílkovin a pokles tuku doprovázen vzestupem obsahu laktózy v mléce. Kromě klasických obsahových složek mléka se stále častěji dostávají do popředí ukazatele související s technologickými vlastnostmi mléka ČEJNA a CHLÁDEK (2004). Změny v koncentraci tukuprosté sušiny odpovídají změnám v koncentraci bílkovin (ŠUSTOVÁ, 2010), laktózy a minerálních látek (DOLEŽAL et al., 2000). Bílkoviny v sýru, zejména kasein, dávají svoji vápníkovou vazbou sýru pevnost, formu a stabilitu (HERIAN, 2004). Můžeme vzhledem ke konzistenci sýru říct, že čím byly naměřeny nižší teploty ve stáji, tím vznikala pevnější sýřenina. FALTA et al. (2010) dále nalezl vyšší výskyt horší kvality sýřeniny ve dnech, kdy teplota převyšovala 21 °C.

Tab. 1 Vliv průměrné denní teploty ve stáji na složení a technologické vlastnosti mléka u českého strakatého skotu

Ukazatel	Jednotka	\bar{x}	Intervaly rozdělené podle průměrných denních teplot ve stáji						
			Méně než 0,00 °C	0,01 do 5,00 °C	5,01 do 10,00 °C	10,01 do 15,00 °C	15,01 do 20,00 °C	Více než 20,01 °C	
Počet vzorků	N	87	10	17	13	9	24	14	
Průměrná denní teplota ve stáji	°C	11,05	-3,72 ^a	2,74 ^b	7,72 ^c	12,53 ^d	17,50 ^e	22,77 ^f	
Syrčitelnost	sec.	199,5 3	207,30 ^a	207,41 ^a	201,54 ^a	199,44 ^a	191,63 ^a	196,14 ^a	
Titrační kyselost	°SH	7,03	7,13 ^a	7,06 ^a	6,98 ^a	7,19 ^a	6,95 ^a	6,98 ^a	
Aktivní kyselost	pH	6,62	6,62 ^a	6,62 ^a	6,58 ^a	6,59 ^a	6,64 ^a	6,62 ^a	
Hustota	kg.l ⁻¹	1,30	1,0300 ^a	1,0294 ^a	1,0302 ^a	1,0302 ^a	1,0299 ^a	1,0298 ^a	
Tuk	g.100g ⁻¹	4,02	4,32 ^d	4,27 ^{cd}	4,10 ^{bc}	3,99 ^b	3,85 ^a	3,75 ^a	
Bílkoviny	g.100g ⁻¹	3,58	3,77 ^d	3,72 ^{cd}	3,65 ^{bc}	3,56 ^b	3,47 ^a	3,43 ^a	
Laktóza	g.100g ⁻¹	4,80	4,76 ^a	4,77 ^a	4,81 ^{ab}	4,83 ^b	4,82 ^b	4,82 ^b	
Tukuprostá sušina	g.100g ⁻¹	8,99	9,13 ^c	9,09 ^c	9,01 ^c	8,97 ^b	8,90 ^{ab}	8,86 ^a	
Kvalita syřeniny	třída	1,50	1,15 ^a	1,47 ^{ab}	1,46 ^{ab}	1,33 ^{ab}	1,71 ^b	1,57 ^{ab}	

Kasein	g. 100g ⁻¹	2,81	2,94 ^d	2,90 ^c	2,87 ^{bc}	2,80 ^b	2,72 ^a	2,69 ^a
--------	-----------------------	------	-------------------	-------------------	--------------------	-------------------	-------------------	-------------------

^{a-d} – hodnoty označené ve stejném řádku odlišnými písmeny se liší výsoce statisticky průkazně (P<0,01)

ZÁVĚR

Na základě analýzy 87 bazénových vzorků kravského mléka od dojníc plemene české strakaté bylo zjištěno, že se vzrůstající průměrnou denní teplotou ve stáji, vysoce průkazně klesal obsah tuku, bílkovin, tukuprosté sušiny, kaseinu a zhoršovala se kvalita syřeniny. Naopak se průkazně zvyšoval obsah laktózy. Dále byla zjištěna statisticky neprůkazná tendence, kdy s rostoucí teplotou, klesal čas potřebný k zasýření. U hustoty, aktivní a titrační kyselosti byly rozdily neprůkazné.

LITERATURA

Čejna, V., Chládek, G. (2004): Vliv stádia laktace na titrační kyselost a syřitelnost mléka dojníc českého strakatého plemene. In: Kuchtík, J. *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků*. Brno: MZLU v Brně, s. 33-34. ISBN 80-7157-771-5.

Doležal, O., Gregoriadesová, J. (2000): Efekty vícekrát denního dojení u našich stád. In: *Den mléka 2000*. Praha: Katedra chovu skotu a mlékařství ČZS AF ČZU a ISV Praha, s. 29-31. ISBN 80-213-0630-0.

Falta, D., Skýpala, M., Polák, O., Chládek, G. (2010): Vliv teploty a vlhkosti ve stáji na složení a technologické vlastnosti bazénových vzorků mléka v letním období. In: *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VII*. Brno: Mendelova universita v Brně, s. 69-72. ISBN 978-80-7375-402-0.

Gajdůšek, S. (2003): *Laktologie*. 1.vyd., Brno: MZLU, 84 s. ISBN 80-7157-657-3.

Gajdůšek, S. (1997): *Mlékařství II: (cvičení)*. 1.vyd. MZLU Brno, 84 s. ISBN 80-7157-278-0.

Hanuš, O., Vyletělová, M., Genčurová, V., Jedelská, R., Kopecký, J., Nezval, O. (2008): Hot stress of Holstein dairy cows as substantiv factor of milk composition. In: *Scientia Agriculturae Bohemica*, 39 (4): 310–317. ISSN 0582 - 2343.

Hanuš, O., Janů, L., Vyletělová, M., Macek (2004): Vliv faktorů prvovýroby jako genotypu dojnice, krmení a bakteriální a ekotoxické kontaminace mléka na jeho technologické ukazatele typu obsah volných mastných kyselin, kysací schopnosti a syřitelnosti. Sborník: *Aktuální problémy řízení v chovu skotu*, Rapotín, s. 32-55.

Herian, K. (2004): Niektoré praktické skúsenosti pri výrobe tavených a terminovaných mliečnych výrobkov; In: *Mliekarstvo*. Žilina: Výskumný ústav mliekárenský, č. 4, s. 28-31. ISSN 1210-3144.

Chládek, G., Čejna, V. (2006): Vliv časné a pozdní laktace na technologické vlastnosti mléka holštýnských dojníc. In Štetina, J., Čurda, L. *Celostátní přehledka sýrů a seminář Mléko a sýry 2006*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, s. 144-148. ISBN 80-7080-620-6.

Illek, J., Kudrna, V., Matějčiek, M., Novák, P., Slavík, P. (2007): Tepelný stres dojníc – zdraví, produkce, reprodukce. In: *Náš chov*. Praha: Profi Press s.r.o., č. 6, s. 63-65. ISSN 0027-8068.

Knížková, I., Knížek, J. (1995): Termoregulace a adaptační schopnosti skotu. In: *Náš chov*, Praha, roč. 55, č. 6, s. 28. ISSN 0027-8068.

Příbyla, L., Čejna, V. (2006): Porovnání vizuálního a nefelo – turbidické metody pro měření syřitelnosti mléka, s. 110-111. In: *Den mléka 2006*. ČZU Praha, 172 s. ISBN 80-213-1498-2.

Sargeant, J., M., Leslie, K., E., Shoukri, M., M., Martin, S., W., Lissemore, K., D. (1998): Trends in milk component production in dairy herds in Ontario: 1985-1994. In: *Can. J. Anim. Sci.*, roč. 78, s. 413-420.

Senka, P. (2011): Kvalita mléka dojníc. In: *Slovenský chov: Odborný mesačník pre chovateľov hospodárskych zvierat a veterínárov*. Nitra, roč. 16, č. 5, s. 32. ISSN 1335-1990.

Sommer, A. (1987): Výživa dojníc a kvalita mléka. Ministerstvo poľnohospodárstva a výživy Slovenskej Socialistickej republiky. Bratislava: Príroda.

Šustová, K. (2010): Variabilita kaseinu ve vztahu k dalším dusíkatým látkám v mléce. In: *Výzkum v chovu skotu*, Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, č. 1, s. 61-72. ISSN 0139-7265.

Elektronické zdroje

Kamarádová, J. et al. (2008): Vztah prostředí, zdraví a produkce. In: *AGROWEB: internetová zemědělský portál* [online]. 2008-10-30 [cit. 2012-09-18]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/Vztah-prostredi-zdravi-a-produkce__s260x32040.html

COMPARISON OF SEMEN TRAITS OF CROSSBRED BOARS AND HYBRIDS RAISED AT INSEMINATION STATION

Zejer P., Milewska W.

Department of Pig Breeding, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 5, 10-957 Olsztyn, Poland

E-mail: malwa@uwm.edu.pl

ABSTRACT

In pig production in Poland important role is played by crossbred boars and hybrids. In the year 2010, the crossbred boars semen used in the insemination was 14.77%, and 26.30% for the hybrids. The semen collected from crossbred boars (Duroc x Pietrain) and hybrids (PIC) enjoyed the most popular in the insemination. The aim of this study was to compare the semen characteristics of crossbred (Duroc x Pietrain) and hybrids (PIC and NECKAR) boars.

Materials for the study were 747 ejaculates collected from 10 boars by one year (2010). Semen was collected using manual method. The following traits were identified among physical characteristics of ejaculates: volume (ml), spermatozoa concentration (thousand/mm³), the number of live spermatozoa (%), the content of spermatozoa in the ejaculate (billions), the number of insemination doses produced from a one ejaculate (units). Furthermore, ejaculates divided into two groups, depending on the lean content of boars (group I. ≤60% and group II. >60%). Boars lean content was determined by performance test.

It was found that the characteristics of boar semen have changed depending on the genotype, season and lean content of boars. Semen of crossbred boars was characterized by significantly higher volume and number of spermatozoa in the ejaculate than ejaculates obtained from hybrids, which them produced more insemination doses ($P \leq 0.05$). Both crossbred and hybrids boars responded similarly to changes in the seasons. Best ejaculates were obtained in the autumn and winter months. At the turn of October and November there was observed dynamically increase in the spermatozoa concentration of the boars semen. Variability of hybrids boars ejaculates was greater than the crossbred. Moreover there was determined a negative impact of high meatiness of boars on volume of the ejaculates.

Key words: boars crossbred, hybrids, semen traits, lean content

INTRODUCTION

In pig production in Poland important role is played by crossbred boars and hybrids. Crossbreds compared to pure breeds have a stronger constitution, higher weight gains and better libido (Bobčák and Rehaček, 2000). In the year 2010, the sperm of crossbred used in the artificial insemination was 14.77%, and 26.3% for hybrids boars (Mucha and Tyra, 2011). The highest popularity enjoyed sperm obtained from crossbreds Duroc x Pietrain boars and among the hybrids of the PIC line. In the insemination stations are kept the best boars in terms of fattening and slaughtering performance (Milewska et al. 2005). From an economic point of view it is also important that they produce a lot of semen with a high concentration of live spermatozoa from which is possible to obtain multiple insemination doses. The purpose of this study was to compare the characteristics of boar semen of crossbreds (Duroc x Pietrain) and hybrids (PIC and NECKAR line) used in insemination station.

MATERIAL AND METHODS

Materials for the study were 747 ejaculates collected from 10 boars within one year (2010). Semen collected by manual method. The following traits of ejaculates were identified: volume (ml), sperm concentration (thousand/mm³), the number of live spermatozoa (%), the content of spermatozoa in the ejaculate (billions), the number of insemination doses produced from a one ejaculate (units). Boars semen characteristics were analyzed according to the season (group A spring - summer, group B autumn-winter). Furthermore, ejaculates were divided into two groups, depending on the lean content of boars (group I. $\leq 60\%$ and group II. $\geq 60\%$). Boars lean content was determined by performance test based on measurements of backfat thickness and loin eye height at the points P2 and P4 and P4M on the right side of the animal. The results were analyzed statistically using ANOVA test. Calculations were performed in STATISTICA 9.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Semen of crossbreds boars was characterized by significantly higher volume and number of spermatozoa in the ejaculate than hybrids semen ($P \leq 0.05$), which resulted in production of more insemination doses (Table 1.). In addition, greater variability of boars ejaculates among the hybrids indicates that there were outstanding individuals and average boars among them. The crossbreds and hybrids boars responded similarly on season changes. Best ejaculates were obtained in the autumn and winter season (table 2., and 3). At the turn of October and November was observed dynamical increase in the concentration of spermatozoa in the semen of boars. Effect of season changes on characteristics of boar ejaculates in their research confirmed Frydrychová et al., (2007), Milewska and Falkowski (2004) and Park and Yi (2002). As is clear from the data presented in Table 4, boars of greater meatiness (group B) produced ejaculates of smaller volume,

higher concentration and greater spermatozoa count than those in group A. The reports of Chen et al. (2003) showed that semen characteristics, such as volume and sperm concentration are negatively correlated, which was confirmed in the present study.

CONCLUSION

Based on the results, it was found that the characteristics of boar semen used in artificial insemination have changed depending on the genotype, season and lean content of boars. Ejaculates better overall, with higher volume and spermatozoa concentration were produced by crossbred boars, in the autumn and winter, and by the males with less lean content in the body. Greater variability of ejaculates of hybrids proves that among them were both of outstanding individual and also average.

REFERENCES

- Bobček B., Rehaček P. 2000. Situation of breeding pigs of meat production of the basis of dam and sire breeds in the Slovak Republic. *Biuletyn Naukowy ART w Olsztynie* 7: 27-31.
- Chen P., Baas T.J., Dekkers J.C.M., Koehler K.J., Mabry J.W. 2003. Evaluation of strategies for selection for lean growth rate in pigs. *J. Anim. Sci.*, 81: 1150-1157.
- Frydrychová S., Lustyková A., Čerovský J., Lipenský J., Rozkot M. 2007. Seasonal changes of boar semen production. *Research in Pig Breeding*, 1: 31-33.
- Milewska W., Falkowski J. 2004. Effects of season on some semen characteristics in purebred and crossbred boars. *Animal Science Papers and Reports*. 22(3): 289-295
- Milewska W., Falkowski J., Čechová M. 2005. Analysis of intravital assessment results in purebred and crossbred boars. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIII, 4: 81-86
- Mucha A., Tyra M. 2011. Inseminacja trzody chlewnej. W: Stan hodowli i wyniki oceny świń w 2010r. I. *Zoot. PIB, Kraków*: 70-75 [Results of pig insemination. in: Report of pig breeding in Poland].
- Park C.S., Yi Y.J. 2002. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim. Reprod. Sci.*, 73: 53-61.

Table 1. Semen traits of boars (mean \pm SD)

Boars	Volume (ml)	Sperm concentration (ths./mm ³)	Percentage of live spermatozoa	Number of spermatozoa in ejaculate (mld)	Number of insemination doses
crossbred	228 ^a \pm 23	365 \pm 42	71,45 \pm 0,86	59,0 \pm 7,88	22,10 ^a \pm 2,09
hybrids	203 ^b \pm 33	417 \pm 143	72,24 \pm 1,08	56,2 \pm 12,49	18,02 ^b \pm 0,66

a,b - P \leq 0,05

Table 2. Volume of ejaculate of boars semen in seasons of the year

Boars	Statistics	Group A	Group B
		spring-summer	autumn-winter
crossbred	Mean	221	239
	SD	22	38
hybrids	Mean	186 ^a	218 ^b
	SD	37	34

a,b - P \leq 0,05

Table 3. Sperm concentration in the boars semen in seasons of the year

Boars	Statistics	Group A	Group B
		spring- summer	autumn-winter
crossbred	Mean	343 ^a	399 ^b
	SD	35	95
hybrids	Mean	402	416
	SD	26	52

a,b - P \leq 0,05

Table 4. Semen traits depending on boars meatiness

Group	Volume (ml)	Sperm concentration (ths./mm ³)	Percentage of live spermatozoa	Number of spermatozoa in ejaculate (mld)
I. (<60%)	226 ^A ±29	367±100	71,31±0,82	58,15±12,5
II. (≥60%)	196 ^B ±32	453±128	71,17±1,10	59,06±9,9

A,B - P≤0,01

Section – Agroecology

CONTENT OF RADIOCAESIUM IN FOREST BLACKBERRY AND RASPBERRY FRUITS

OBSAH RADIOCESIA V LESNÍCH MALINÁCH A OSTRUŽINÁCH

Červinková, A., Pöschl, M.

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xcervin4@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Radiation contamination, which was caused by Chernobyl accident, is detectable in our country until today. Trace amount of radiocaesium (^{137}Cs) can be identified in fruits of forest plants, which were taken from wild nature of the Czech Republic. This study provides new knowledge about the content of radiocaesium (^{137}Cs) in the wild blackberries and raspberries. Also radiocaesium transfer (T_F) from soil to berries was analyzed. Samples of the fruits together with the upper soil environment under the plants were taken on pre-selected locations of Jeseníky PLA. The ^{137}Cs activity was measured by gamma spectrometric analysis using HPGe detector. It was found that the radiocaesium concentration in the fruits of blackberry and raspberry reaches average 0.828 ± 0.30 Bq kg^{-1} and 0.445 ± 0.14 Bq kg^{-1} respectively. Soil-to-fruit transfer factors were 5.25×10^{-3} (into blackberries) and 6.27×10^{-3} (into raspberries). The determined values of ^{137}Cs concentrations did not exceed the intervention limit specified for food (600 Bq kg^{-1}), and do not represent health risk for the population.

Key words: ^{137}Cs , blackberry, raspberry, Jeseníky PLA, transfer factor

Acknowledgments: This study was funded by Faculty of Agronomy of Mendel University in Brno.

ÚVOD

Nehoda černobylské jaderné elektrárny 26. dubna 1986 způsobila kontaminaci rozsáhlého území severní polokoule. V průběhu nehody došlo k uvolnění $1,2 \times 10^7$ TBq radioaktivních látek, z nichž $8,5 \times 10^4$ TBq tvořilo radiocesium ^{137}Cs (UNSCEAR, 2000). Radioaktivita byla přenesena a rozptýlena atmosférickými vzdušnými proudy a následně deponována na zemský povrch především prostřednictvím dešťových srážek (Pietrzak-Flis et al., 2003). Životní prostředí České republiky bylo kontaminováno v průběhu 29. dubna až 7. května velmi nehomogenně. Nejvyšší depozice nastala v oblastech jižní a severní Moravy (Peterka et al., 2007), především pak na území CHKO Jeseníky, kde byly ve výše položených lesních půdách zjištěny koncentrace radiocesia dosahující aktivit až $50 \text{ kBq} \cdot \text{m}^{-2}$ (Hanák et al., 2007). V důsledku černobylské havárie bylo území České republiky postiženo průměrnou depozicí radiocesia ^{137}Cs $7,6 \text{ kBq} \cdot \text{m}^{-2}$ (SÚRO, 1996). Do dnešní doby je naše životní prostředí stále zatěžováno tímto antropogenním radionuklidem z důvodu jeho poměrně dlouhého poločasu přeměny (30, 07 let). Vzhledem ke specifickým půdním vlastnostem si deponované radiocesium v poměrně vysokých koncentracích uchovávají především zemědělsky neobdělávané ekosystémy, a tak může tento polutant druhotně a významně kontaminovat i bobule lesních plodin (maliny a ostružiny), které jsou dobře známé jako tzv. super ovoce pro jejich mimořádné nutriční i farmaceutické hodnoty (Ding et al., 2006; Tulipani et al., 2008).

Cílem této práce bylo přinést nové poznatky o obsahu radiocesia (^{137}Cs) v plodech lesních rostlin - ostružinách a malinách, které byly sbírány v oblasti CHKO Jeseníky.

MATERIÁL A METODIKA

Zájmovou lokalitou se stala chráněná krajinná oblast Jeseníky. Samotné odběrné lokality byly dále rozděleny na parcely o ploše 100 m^2 . Na vytyčených lokalitách byly odebírány vzorky plodů lesních rostlin rodu ostružiník (*Rubus*): ostružiníku křovitého (*R. fruticosus*) a ostružiníku maliníku (*R. idaeus*). Plody byly odebírány, společně se vzorkem svrchní vrstvy (10 cm) půdy pod zájmovými rostlinami, standardním manuálním postupem. Vzorky plodů malin a ostružin byly rozmělněny, ve formě pyré zamrazeny a až do doby měření aktivity ^{137}Cs uloženy v mrazicím boxu při teplotě $-10 \text{ }^\circ\text{C}$. Půda byla zbavena hrubších částic a rostlinných zbytků, vysušena do konstantní hmotnosti a rozdrcena. Aktivita ^{137}Cs ve vzorcích o objemu 100 ml byla stanovena na gama spektrometrické trase s použitím detektoru HPGe. Za účelem zhodnocení transferu radiocesia z půdy do rostliny byly vypočteny faktory transferu (T_F) jako poměr hmotnostní aktivity obsažené v plodech ($\text{Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$) k hmotnostní aktivitě obsažené v půdě ($\text{Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Hmotnostní aktivita radiocesia v plodech ostružiníků dosahovala průměrných hodnot ($r \pm \text{SEM}$) $0,828 \pm 0,30 \text{ Bq.kg}^{-1}$ (v případě ostružin) a $0,445 \pm 0,14 \text{ Bq.kg}^{-1}$ (v případě malin). Aktivita v plodech odebraných na jednotlivých lokalitách uvádí Obrázek 1 a Obrázek 2. Zjištěné aktivity radiocesia jsou srovnatelné s publikovanými daty autora Aarkrog et al. (1989). Zmíněné hodnoty jsou relativně nízké a nepředstavují environmentální problém ani zdravotní riziko pro obyvatelstvo. Hodnoty hmotnostní aktivity radiocesia obsaženého v ostružinách a malinách zdaleka nedosahují nejvyšší přípustné úrovně radioaktivní kontaminace dané skupiny potravin pro přetrvávající ozáření po černobylské havárii 600 Bq.kg^{-1} (Vyhláška č. 307/2002 Sb.).

U vzorků půdy odebraných v blízkosti kořenového systému zájmových rostlin byla zjištěna hmotnostní aktivita ($r \pm \text{SEM}$) $139,7 \pm 26,03 \text{ Bq.kg}^{-1}$ (pod ostružinami) a $177,2 \pm 83,19 \text{ Bq.kg}^{-1}$ (pod malinami). Aktivita v půdách odebraných na jednotlivých lokalitách uvádí Obrázek 1 a Obrázek 2. Naměřené hodnoty jsou poměrně vysoké, protože překračují stanovenou limitní (přípustnou maximální) hodnotu v půdách v České republice (100 Bq.kg^{-1}). Nicméně tato hodnota je stanovena pro půdy agro-ekosystému nikoliv pro přírodní (lesní) ekosystém, který z dlouhodobého hlediska představuje hlavní rezervoár radiocesia v životním prostředí.

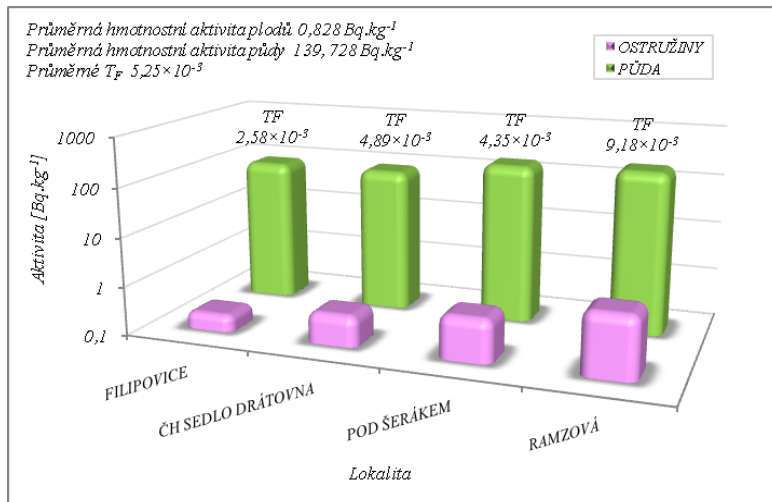
Vyvstává otázka, proč analyzované plody nepřijímají a neobsahují vyšší koncentrace radiocesia vzhledem ke zjištěným aktivitám v půdě. Zvláště uvážíme-li, že rostliny přijímají radiocesium na podkladě běžného příjmu živin – důvodem takového příjmu je skutečnost, že je radiocesium chemicky i metabolicko-fyziologicky podobné draslíku (Kornberg, 1961).

Důvodem, proč přijímá ostružiník o poznání méně radiocesia než například borůvka, která představuje lesní plodinu vykazující vyšší koncentraci radiocesia až o 100 % (Švadlenková et al., 1996) oproti ostružiníku, může být samotná individualita rostliny – růstová fáze rostliny, mechanismy kořenového příjmu, hloubka kořenění rostliny, mykorrhiza, metabolická aktivita (Coughtrey a Thorne, 1983), kdy různé druhy cévnatých rostlin přijímají radiocesium v odlišných hodnotách (Horrill et al., 1990), ale také samotné ekologické nároky rostliny. Ostružiník vyhledává vlhké živinami bohaté alkalické ojediněle minerální půdy planárního až subalpínského stupně – najdeme jej převážně na pasekách, křovinatých pastvinách či stráních a v lesních ekotonech (Dostál, 1989), kde můžeme očekávat silný konkurenční boj o živiny (Calmon et al., 2008). Důvodem ale mohou být i vlastnosti půdy, především pak půdní reakce, kdy půdy disponující alkalickým pH obecně snižují příjem radiocesia rostlinou (Caput et al., 1990). Nutno také konstatovat, že třebaže lesní půdy obsahují v porovnání s ornými půdami vyšší koncentrace radiocesia, samotný transfer do lesních rostlin není tak významný. Důvodem je především vysoké množství jílových minerálů, které radiocesium váže za účelem vyrovnání iontového náboje. To má potom za následek omezenou dostupnost radiocesia pro rostliny (Shand et al., 1994).

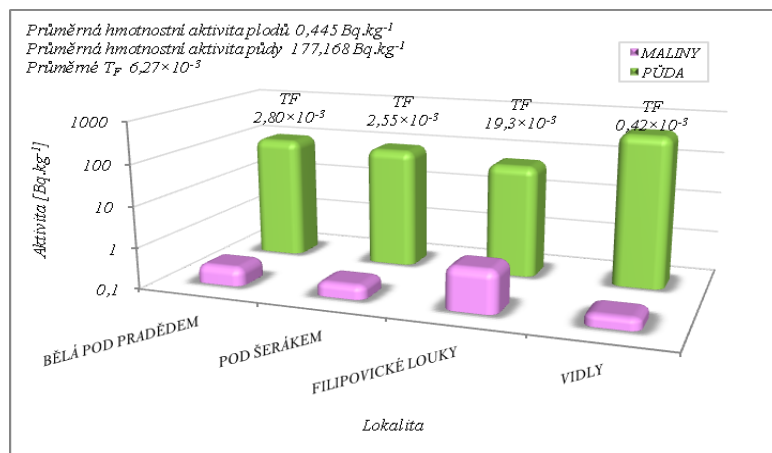
Za účelem analýzy transferu radiocesia z půdy do plodů rostliny byl vypočítán faktor transferu (T_F), jehož průměrná hodnota činila u ostružin $5,25 \times 10^{-3}$ a u malin $6,27 \times 10^{-3}$. V rámci ostružin a malin

se typické hodnoty T_F pohybují v rozmezí $6,9 \times 10^{-4}$ až $5,7 \times 10^{-3}$ (Nielsen et al., 2010). Avšak podle Miller a Hoffmann (1983) a Boikat et al. (1985) je porovnání vypočtených hodnot faktoru transferu (T_F) velmi náročné z důvodu mimořádné variability a poměrně malé vypovídací hodnoty tohoto koeficientu. Obecně lze ale konstatovat, že příjem radiocesia rostlinou je nižší, jedná-li se o půdu minerální (která je často vyhledávaná ostružiníkem křovitým), naopak obecně vyšší příjem radiocesia je znám u půdy písčité a organické (Sanchez et al., 1999; Nisbet a Woodmann, 2000).

Obr. 1 Průměrná aktivita ostružin a půd na jednotlivých lokalitách s výpočtem faktoru transferu



Obr. 2 Průměrná aktivita malin a půd na jednotlivých lokalitách s výpočtem faktoru transferu



ZÁVĚR

Na základě provedené analýzy bylo zjištěno, že hmotnostní aktivity radiocesia obsaženého ve vzorcích plodů rostlin rodu ostružiník (ostružin a malin) dosahují průměrných hodnot pod 1 Bq.kg^{-1} . Zjištěná hodnota je velmi nízká a nepředstavuje žádný environmentální problém ani zdravotní riziko pro obyvatelstvo konzumující zmíněné plody. Hmotnostní aktivity ^{137}Cs v půdě odebírané pod zájmovými rostlinami překonaly limitní hodnotu (100 Bq.kg^{-1}). Tato aktivita je však stanovena pro agro-ekosystémy, resp. pro půdy zemědělsky obdělávané. Transferové faktory radiocesia na dráze půda – analyzované plody dosáhly u zájmových rostlin hodnot od $0,42 \times 10^{-3}$ do $19,3 \times 10^{-3}$. Jejich hodnocení je však komplikované z důvodu malé vypovídací hodnoty tohoto koeficientu i mimořádné variability publikovaných dat týkajících se T_F .

LITERATURA

AARKROG, A., BOTTER JENSEN, L., CHEN QING JIANG (1989): *Environmental radioactivity in Denmark in 1987*. Denmark: Riso national laboratory, 144 s. ISBN 87-550-1532-8

BOIKAT, U., FINK, A., BLACK-NEUHAUS J. (1985): Cesium and cobalt transfer from soil to vegetation on permanent pastures. *Radiation and environmental biophysics*, 24 (4): 145 – 151.

CALMON, P., THIRY, Y., ZIBOLD, G., RANTAVAARA, A., FESENKO, S. (2009): Transfer parameter values in temperate forest ecosystems: a review. *Journal of environmental radioactivity*, 100 (9): 757– 766

CAPUT, C., CAMUS, H., BELOT, Y. (1990): *Observations on the behaviour of radiocesium in permanent pastures after the Chernobyl accident*. In: DESMET, G. Transfer of radionuclides in natural and semi-natural environments. London a New York: Elsevier, s. 283 – 291. ISBN 1851665390

COUGHTREY, P.J., THORNE, M.C. (1983): *Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems, A critical review of data*. Rotterdam: A A Balkema Publishers. 2544 s. ISBN 9789061912774

DING, M., FENG, R., WANG, S.Y., BOWMAN, L, LU, Y., QIAN, Y., CASTRANOVA, V., JIANG, B.H., SHI, X. (2006): Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of biological chemistry*, 281 (25):17359–17368.

DOSTÁL, J. (1989): *Nová květena ČSSR*. Praha: Akademie Praha. 1548 s. ISBN 80-200-0095-x

HANÁK, J., MÜLLER, P., MÜLLEROVÁ, H., KAŠPAREC, I. (2007): *Kontaminace půd v horských oblastech severní Moravy izotopem ^{137}Cs* . Brno: Geologické výzkumy na Moravě a ve Slezsku, 3 s.

HORRILL, A. D. (1990): *Natural and semi-natural pasture ecosystems and their importance in the context of environmental contamination*. In: DESMET, G. Transfer of radionuclides in natural and semi-natural environments. London a New York: Elsevier, s. 231 – 237. ISBN 1851665390

KORNBERG, H.A. (1961): The use of element-pairs in radiation hazard assessment. *Health physics*, 6 (1): 46 – 62.

MILLER, C.W., HOFFMANN, F.O. (1983): An examination of the environmental half-time for radionuclides deposited on vegetation. *Health physics*, 45 (3): 731 – 744.

NIELSEN, P.N, ANDERSSON, K.G. (2010): *PardNor – Parameters for ingestion dose models for Nordic areas – Status report for the NKS-B activity 2009*. Denmark: Risoe national laboratory for sustainable energy, 50 s. ISBN 978-87-7893-279-2

NISBET, A., WOODMAN R. (2000): Soil-to-plant transfer factor for radiocaesium and strontium in agricultural systems. *Health physics*, 78 (3): 279 – 288.

PETERKA, M., PETERKOVÁ, R., LIKOVSKÝ, Z. (2007): Chernobyl: Relationship between the number of missing newborn boys and the level of radiation in the Czech regions. *Journal Environmental health perspectives*, 115 (12): 1801-1806.

PIETRZAK-FLIS Z., KRAJEWSKI P., RADWAN I., MURAMATSU Y. (2003): Retrospective evaluation of 131I deposition density and thyroid dose in Poland after the Chernobyl accident. *Health physics*, 84 (6): 698–708.

SANCHEZ A., WRIGHT, S., SMOLDERS, E., NAYLOR, C., STEVENS P., KENNEDY, V., DODD, B., SINGLETON, D., BARNETT, C. (1999): High plant uptake of radiocaesium from organic soils due to Cs mobility and soil K content. *Environmental science and technology*, 33 (16): 2752 – 2757.

SHAND, C.A., CHESHIRE, M.V., SMITH, S. (1994): Distribution of radiocesium in organic soil. *Journal of environmental radioactivity*, 23 (3): 285–302.

SÚRO (1996): KOLEKTIV AUTORŮ: *10 let od havárie jaderného reaktoru v Černobylu – důsledky a poučení*. Praha: Státní úřad pro jadernou bezpečnost, Státní ústav radiační ochrany, 80 s.

ŠVADLENKOVÁ, M., KONEČNÝ, J., SMUTNÝ, V. (1996): Model calculation of radiocaesium transfer into food products in semi-natural forest ecosystems in the Czech republic after a nuclear reactor accident and an estimate of the population dose burden. *Journal of environmental pollution*, 92 (2): 173 – 184.

TULIPANI, S., MEZZETTI, B., CAPOCASA, F., BOMPADRE, S., BEEKWILDER, J., DE VOS, CH.R., CAPANOGLU, E., BOVY, A., BATTINO, M. (2008): Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of agriculture and food chemistry*, 56 (3): 696–704.

UNSCEAR (2000): Sources and Effects of Ionizing Radiation; Annex J. Exposure and Effects of Chernobyl Accident. Report to General Assembly. United Nations, New York. 2000., *Journal of radiological protection*, 21(1): 453 – 551.

VYHLÁŠKA 307/2002 Sb. o radiační ochraně (ruší vyhlášku č. 184/1997 Sb.) ve znění vyhlášky č. 499/2005 Sb., kterou se mění vyhláška Státního úřadu pro jadernou bezpečnost č. 307/2002 Sb., o radiační ochraně.

LEACHING OF MINERAL NITROGEN FROM ARABLE LAND IN RELATION TO THE PREVIOUS TYPE OF SOIL FERTILIZATION

VYPLAVOVÁNÍ MINERÁLNÍHO DUSÍKU Z ORNÉ PŮDY V ZÁVISLOSTI NA KVANTITĚ A KVALITĚ PŘEDCHOZÍCH DÁVEK ŽIVIN

Elbl J., Kintl A., Záhora J.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xelbl@mendelu.cz

ABSTRACT

Realized laboratory experiment builds on research of escape mineral forms of N from arable land, which has long been carried out in The Department of Microbiology. The basis of our research is the use of experimental containers ($d = 110\text{mm}$ and $v = 400\text{ mm}$). The containers are for each experiment filled with agricultural lands (from arable horizon and under-arable horizon). These soils were removed from interest area (water source protection zone – Březová nad Svitavou) and these soils were fertilized various types of fertilizers. For the experiment *leaching of mineral nitrogen in relation to the previous type of soil fertilization*, we used samples of arable land from the previous long-term experiment. This long-term experiment was made by five variants of the fertilizer (each variant had three repeat): V1 – control, without the application of fertilizers; V2 – application of 90 g/m^2 mineral fertilizer GSH (N:P: K:S ~ 10: 10: 10: 13, registration number 2007), V3 – application of 50ml/m^2 B Lignohumat B (registration number 2723), V4 – application of 50 ml/m^2 Lignohumat B + 45g/m^2 mineral fertilizer GSH (50% of the recommended dose); V5 – application of 150ml/m^2 Lignohumat B (300% of the recommended dose) + 45g/m^2 mineral fertilizer GSH. In each experimental pot were planted indicator plant *Deschampsia caespitosa*. Indicator plant grew in the experimental containers for 72 day. After the end of the long-term experiment, we removed from each variant arable horizon (from all repetition of each variant) and we homogenized these samples of arable land in each variant. After homogenization, we obtained from each variant (V1 - V5) five samples of arable land. For the implementation *Availability of mineral nitrogen in relation to the previous type of soil fertilization* experiment has been used cylindrical experimental pots. We used plastic (PVC) pots with the following dimensions $d(\text{diameter})= 120\text{mm}$ and $v(\text{height})= 90\text{mm}$. Each experimental pot we filled by arable land form previous experiment (after homogenization). It was created again five variants (V1 - V5) and three repetitions for each variant. This way we determined availability of mineral nitrogen in land from arable horizon, after soil fertilization. The obtained results detection of N_{\min} confirmed a different influence of fertilizer to saturate soil by mineral nitrogen.

Key words: nitrogen, experimental pot, arable land, fertilizers

Acknowledgments: This work was supported by the project NAZV reg. number: QJ1220007

ÚVOD

Předkládaná práce se věnuje problematické oblasti úniku minerálního dusíku (N_{\min}) z orné půdy, která je v posledních letech velmi diskutovaným problémem, a to z důvodu kontaminace zdrojů pitné vody. Podle Šimka (2003) je N_{\min} v půdě tvořen amonným ($N - NH_4^+$) a dusičnanovým dusíkem ($N - NO_3^-$). Kontaminovány jsou jak povrchové, tak i podzemní zdroje jinak kvalitní pitné vody. Největší riziko představují dusičnany neboli nitráty, které jsou autory z ČR (Úlehlová 1989; Kočí, Burkhard & Maršálek 2000; Šimek 2003; Nohel, Záhora & Mejzlík 2008; Pitter 2009) i ze zahraničí (Galloway & Cowling 2002; Schimel & Bennett 2004; Sutton 2011) označovány za hlavní hrozbu pro kvalitu pitné vody, získávanou ze zdrojů lokalizovaných v zemědělských oblastech.

Úlehlová (1989); Aber *et al.* (1989); Galloway (2002); Sutton (2011); Erisman (2011) a další upozorňují na riziko, které takto uniklý N_{\min} představuje. Hlavním nebezpečím, vyplývajícím z uvedených prací, je saturace půdního prostředí dusíkatými látkami. Přesněji stav, kdy dochází k větší dostupnosti amonného a dusičnanového dusíku, než je celková kombinovaná rostlinná a mikrobiální nutriční poptávka. Pokud vezmeme v úvahu minimální afinitu půdního sorpčního komplexu k záporně nabitým částicím, tak při saturaci půdního prostředí vzniká předpoklad pro značný únik nitrátů například do podzemních vod.

Realizovaný laboratorní experiment navazuje na práci Elbl (2012), hlavním cílem bylo potvrzení vlivu aplikace organické látky v kombinaci s minerálním hnojivem na pozdější dostupnost N_{\min} v půdě.

MATERIÁL A METODIKA

Schéma laboratorního experimentu

K posouzení dostupnosti N_{\min} v půdních vzorcích z orničního horizontu, byly využity plastové experimentální nádoby válcového tvaru ($s = 120\text{mm}$; $v = 90\text{mm}$). Bylo připraveno celkem pět variant experimentu V1 – V5, a to vždy se třemi opakováními. Jak již bylo uvedeno v abstraktu a úvodu, experiment navazuje na dlouhodobě prováděný výzkum v zájmové oblasti Březová nad Svitavou. Přesněji navazuje na experiment Elbl (2012), z uvedeného pokusu byla použita orná půda, která byla vystavena aplikaci hnojiv za současného růstu indikační plodiny *Deschampsia caespitosa* /L./ P. Beauv. Elbl (2012) vytvořil pět variant: V1 – kontrolní, nehnojená, V2 – 100% dávka NPK, V3 – 100% dávka Lignohumát B, V4 – 100% dávka Lignohumát B + 50% dávka NPK, V5 – 300% dávka Lignohumát B + 50% dávka NPK. Doba trvání experimentu (Elbl, 2012) byla 72dnů. Elbl (2012) využil PVC válce o $d = 110\text{mm}$ a $v = 400\text{mm}$, ve kterých byl uměle vytvořen orniční a podorniční horizont. Po ukončení pokusu byly půdní vzorky (celý orniční

horizont z každé varianty) uloženy do termostatu ($T \approx 5,5^\circ\text{C}$) a po 33 dnech využity pro předkládaný experiment. Před aplikací do nově připravených experimentálních nádob byla provedena homogenizace dřívě odebraných vzorků. Došlo tak ke vzniku pěti vzorků orné půdy (V1 – V5). Hmotnost orné půdy byla ve všech nádobách stejná ($m = 570\text{g}$). Nebylo prováděno nové hnojení, indikační plodiny získávaly živiny pouze z dostupných zásob v půdě. Stejně tak k vyplavení N_{\min} mohlo dojít pouze na základě přítomnosti nebo absence dusíkatých sloučenin a to v souvislosti s předchozím způsobem hnojení.

Za indikační plodinu byl zvolen salát setý (*Lactuca sativa*). Všechny experimentální nádoby byly umístěny do Fytotronu po dobu 48 dní. Závlaha byla pro celý experiment jednotná a byla rozdělena v rámci jednoho týdne do tří dávek: 100ml (po), 70ml (st) a 100ml (pá) destilované vody. Tři dny před ukončením pokusu byly všechny varianty zavlaženy dávkou 3x 200ml. Dávkování závlahy bylo zvoleno vzhledem k objemu zeminy v jednotlivých nádobách, charakteru indikační plodiny a nutnosti dosáhnout průsaku půdního roztoku do IER disků.

Přesné dávkování hnojiv, původní odběr a skladování půdních vzorků atd. je uvedeno v Elbl (2012), dále jsou pro všechna hnojiva dohledatelná složení na základě čísla registrace.

Dostupnost minerálního dusíku

Pro účely interpretace provedeného laboratorního experimentu, je vyplavování N_{\min} z orné půdy vyjádřeno jako záchyt minerálního dusíku. Samotné hodnoty záchytu N_{\min} (mg) jsou přepočteny na objem zeminy ($\text{mg}/\text{dm}^3 N_{\min}$). K zjištění záchytu N_{\min} byly využity směsné iontoměniče (IER, ion exchange resin). IER byly tvořeny směsí aniontových zrn (AER, anion exchange resin) a kationtových (CER, cation exchange resin) v poměru 1:1. Zrna AER a CER byla vložena do těl speciálních disků, které byly tvořeny prstenci z novodurového potrubí, každý o vnějším průměru 75mm a tloušťce 5mm. Jednotlivé prstence byly z obou stran opatřeny polyamidovou síťovinou UHELON tak, aby mohly být naplněny směsí CER a AER. Naplněné novodurové prstence jsou dále označovány jako IER disky (Novosádová, Záhora & Ruiz-Sinoga 2011). Pod každou experimentální nádobu byl umístěn vždy jeden IER disk. Uvedeným způsobem tak mohl být pro každou variantu ve třech opakováních zjišťován záchyt N_{\min} , který se uvolnil vyplavováním z půdního prostředí.

N_{\min} zachycený na zrnech IER byl po ukončení experimentu získán resorpcí, která byla vyvolána 10%-ním roztokem NaCl. Volné ionty amonného a dusičnanového dusíku byly stanoveny podle Peoples *et al.*, (1989) destilačně titrační metodou.

Stanovení sušiny rostlinné biomasy

Sušina rostlinné biomasy byla stanovena podle Valenta, Urban & Pukrábek (2008). Jednotlivé vzorky indikační plodiny *Lactuca Sativa* byly odebrány v celku (nadzemní a podzemní biomasa). Parametr sušiny pro účely předkládané práce představuje hodnotu produkce nadzemní a podzemní rostlinné biomasy jednotlivých indikačních plodin.

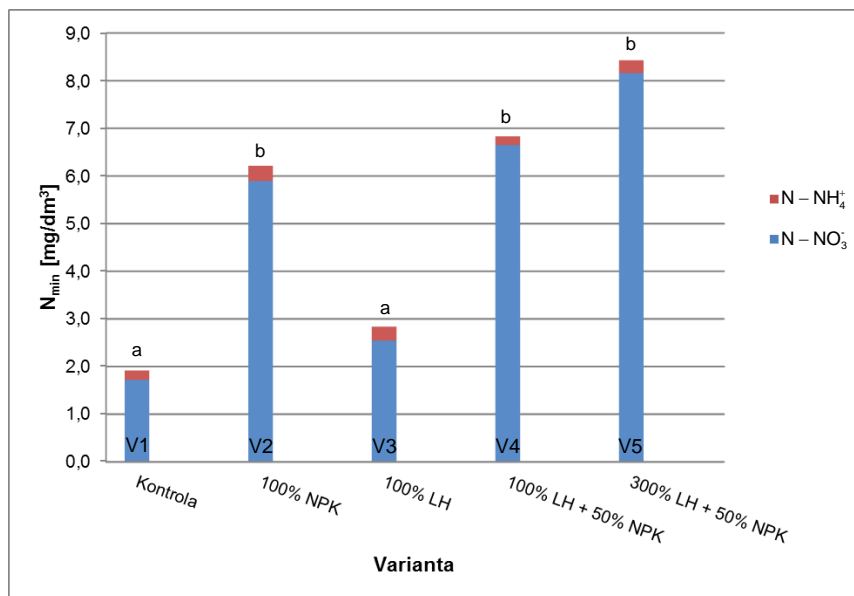
VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem našeho zájmu bylo zjištění vlivu předchozí aplikace různých druhů hnojiv a jejich vzájemné kombinace na vyplavování N_{\min} z orné půdy. Hodnoty záchytu jsou doplněny o produkci nadzemní a podzemní rostlinné biomasy, která je vyjádřena jako sušina.

Záchyt minerálních forem dusíku

Měření záchytu N_{\min} probíhalo po dobu 48 dnů za využití IER disků, které byly umístěny pod výtokovými otvory experimentálních nádob. Získané hodnoty byly statisticky vyhodnoceny za využití metody jedno-faktorové analýzy a variance (ANOVA), dále byl proveden výpočet LSD (Least Significant Difference) na 5%-ní hladině významnosti ($p < 0,05$) s Post-Hoc Tukey's HSD testem. V grafech č. 1 a 2 jsou znázorněny zjištěné záchyty N_{\min} , který je zde vyjádřen jako součet váženého průměru záchytu amonného a nitratového dusíku jednotlivých variant experimentu. Vážený průměr byl zjištěn ze tří opakování v každé variantě.

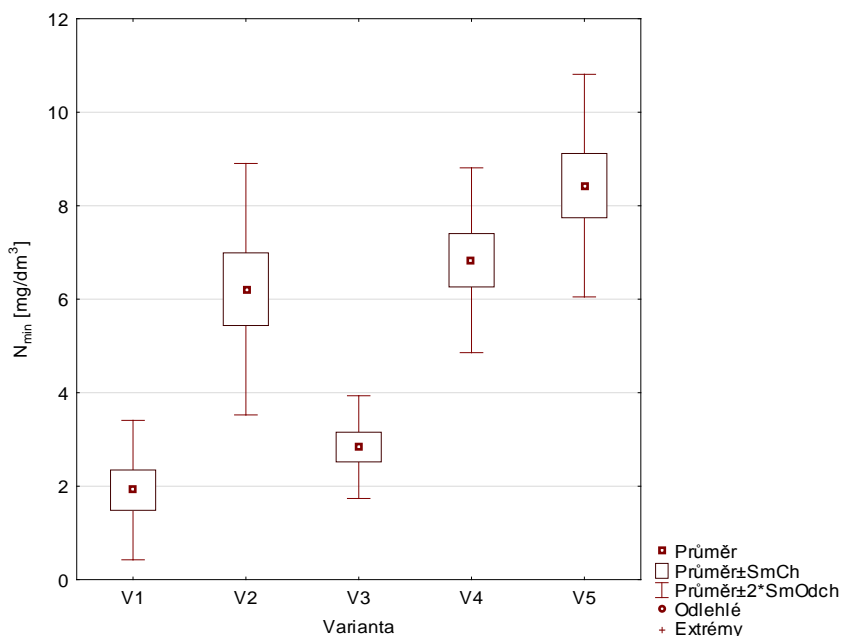
Graf 1 Porovnání průměrných hodnot (\bar{x} z každé varianty, $n = 3$) záchytu minerálního dusíku mezi rozdílnými variantami experimentu. Jednotlivá písmena indikují významné rozdíly.



Z hodnot uvedených v grafu č. 1 vyplývá, že nejvyššího záchytu N_{\min} bylo dosaženo u variant, které byly v předchozím experimentu hnojeny kombinací minerálního hnojiva a organické látky (V4= 6,84mg/dm³ a V5= 8,43 mg/dm³). Rozdíl v záchytu N_{\min} mezi kontrolní variantou V1, kde byla naměřena nejnižší hodnota záchytu V1= 1,92mg/dm³ a variantami V4 a V5 je statisticky průkazný.

Zvýšenou dostupnost minerálního dusíku u variant V4 a V5 lze vysvětlit přidavkem dostupného organického uhlíku (C_{org} ve formě lignohumátu) při předchozím experimentu. Na základě prací Buterbach & Gundersen (2011); Barrett & Burke (2000); Wolf & Snyder (2003) a Sutton (2011), ve kterých jednotliví autoři na základě konkrétních experimentů nebo závěrů z dlouhodobých pozorování, potvrzují vliv C_{org} na mikrobiální aktivitu. Lze tedy předpokládat, že v přítomnosti dostupného C_{org} zvyšují MO svoji činnost a tím i zpracování N_{min} . Dochází tak ke zvyšování kapacity půdního prostředí pro dusíkaté sloučeniny, a to nejenom pro minerální formy dusíku. Vytváření zásob organických dusíkatých látek je pro půdu absolutně nezbytné. Důvod je jednoduchý, popisuje ho například Sutton (2011): organické formy N jsou minimálně pohyblivé a mohou tak zůstat v půdním prostředí i při zvýšených dávkách závlahy (nedochází k vyplavování). Následně pak v příhodných podmínkách může dojít k depolymeraci těchto organických (makromolekulárních) sloučenin a posléze i k mineralizaci na jednotlivé minerální formy dusíku.

Graf 2 Porovnání průměrných hodnot (\bar{x} z každé varianty, $n = 3$) záchytu minerálního dusíku mezi rozdílnými variantami experimentu.



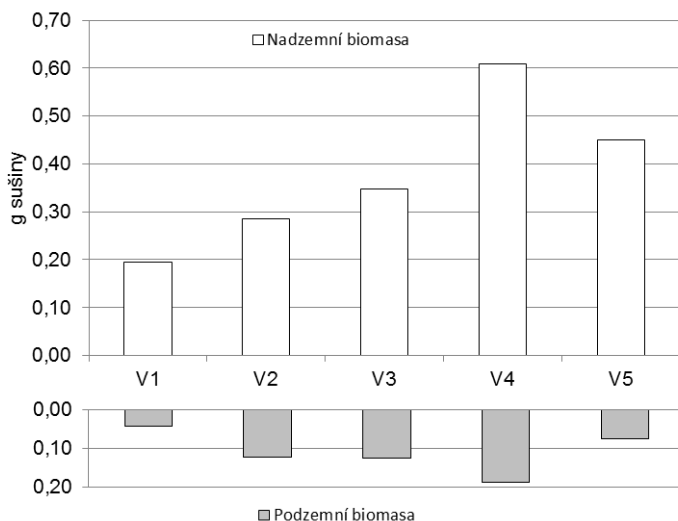
Poměrně vysokého záchytu bylo dosaženo i u varianty V2, a to i přes skutečnost, že tato varianta vykazovala vysoký záchyt už v předešlém experimentu. Očekávali jsme tedy, že většina N_{min} byla již u této varianty z půdy vyplavena. Rozdíly v záchytech mezi variantami V1 a V2, V3, V4 jsou velmi dobře patrné z grafu č. 2 (krabicový graf ANOVA analýzy). Vysvětlení je možné nalézt

například v práci Aber *et al.* (1989). Zde autoři definují saturaci půdního prostředí minerálním dusíkem a tím i spojené projevy jeho úniku z půd. Při předchozím experimentu byla zvolena doporučená dávka směsného minerálního hnojiva (NPK) pro extenzivní trávníky. Domníváme se proto v kontextu s prací Aber *et al.* (1989), že zvolená dávka hnojiva byla pro daný půdní systém v experimentální nádobě nad limitní a došlo k saturaci půdního prostředí N_{min} . Nadměrné množství takto uložených dusíkatých bylo uvolněno až v rámci druhého experimentu při zvýšených dávkách závlahy. Pokud porovnáme hodnoty zachytu pro Varianty V2, V4 a V5 neexistuje mezi nimi statisticky průkazný rozdíl.

Produkce nadzemní a podzemní biomasy

Pro účely provedeného laboratorního experimentu, byla jako hlavní indikační faktor vlivu předchozích dávek hnojiv na rostlinu zvolena produkce nadzemní a podzemní biomasy. Hodnoty produkce nadzemní a podzemní biomasy jsou uvedeny v grafu č. 3, která je zde vyjádřena v g sušiny.

Graf 3 Porovnání průměrných hodnot (\bar{x} z každé varianty, $n = 3$) produkce nadzemní a podzemní biomasy mezi rozdílnými variantami experimentu.



Z průběhu grafu 3 je patrná nejnižší produkce biomasy pro kontrolní variantu (V1= 0,24g), naopak varianty hnojené kombinací minerálního hnojiva a organické látky vykázaly celkově nejvyšší hodnoty produkce biomasy (V4= 0,80g; V5= 0,53g). Mezi jednotlivými variantami, ale neexistuje

statisticky průkazný rozdíl. Pouze u V4 byla zjištěna průkazně vyšší produkce podzemní biomasy (V4= 0,19g) v porovnání s kontrolou (V1= 0,04g).

Podle Rychnovské *et al.* (1987) byl určen hmotnostní poměr z produkce nadzemní a podzemní biomasy tzv. poměr „root and shoot“, vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Hmotnostní poměr nadzemních a podzemních částí rostlin R/S

V1	V2	V3	V4	V5
0,214555	0,436511	0,36292	0,307322	0,168967

Při porovnání všech variant nejvyššího poměru R/S dosáhla varianta V2, tuto skutečnost je možné vysvětlit sníženou dostupností N_{\min} . Z důvodu ztrát, které byly v dané variantě dosaženy při předcházejícím experimentu. Nedostatek živin způsobil nižší produkci nadzemní biomasy, a dále i podporu rozvoje kořenového systému. Důvodem byla absence živin v prvních 5cm orné půdy v experimentálních nádobách. Nejvyšší produkci nadzemní a podzemní biomasy byla zjištěna u varianty V4 (nadzemní 0,61g; podzemní 0,19g). Tento stav je možné vysvětlit dostatečnou zásobou C_{org} a dalších látek, které se vytvořily při specifickém způsobu hnojení v předcházejícím experimentu. Například podle Richtera & Hluška (2006) je obsah N_{\min} v půdě rozhoduje o intenzitě růstu rostlin a rozhodující měrou se uplatňuje N z půdní zásoby. Takový N ale musí být uvolněný procesem mineralizace, Schimel a Bennet (2004) objevili nové skutečnosti v rámci cyklu N. Konkrétně proces depolymerace, který předchází samotné mineralizaci, kdy půdní organismy zpracovávají depolymerizované látky za produkce jednodušších minerálních sloučenin například minerálního dusíku. K takové činnosti, ale půdní mikroorganismy potřebují energii, kterou získají právě z přidaného C_{org} .

Nižší poměr R/S i produkci nadzemní a podzemní biomasy v rámci V5 (v porovnání s V4), lze vysvětlit zvýšenou dávkou C_{org} (Lignohumát B) v kombinaci s NPK. Zvýšená dávka C_{org} při realizaci původního experimentu iniciovala mikrobiální aktivitu, která měla za následek akumulaci většího množství živin. Rostlina tak mohla využít bez větší nutnosti rozvoje kořenového systému látky, které byly dostupné v rhizosféře.

ZÁVĚR

Únik N_{\min} a produkce rostlinné biomasy mohla být realizována pouze na základě přítomnosti živin z předchozího experimentu, přesněji jen díky rozdílnému způsobu hnojení. Na základě publikovaných prací Paustian (1987), Šimek (2003) a Wolf & Snyder (2003) předpokládáme, že vzorky orné půdy hnojené minerálními hnojivy nebo pouze přidávkem organické hmoty (lignohumátem), nebyly schopny vytvořit vhodné podmínky pro rozvoj mikrobiální biomasy. Mikroorganismy jsou nezbytným faktorem pro funkčnost cyklů dusíku a uhlíku v půdě. Pro varianty experimentu V1, V2 a V3 je proto typický nižší únik N_{\min} a produkce nadzemní a podzemní biomasy, protože byla v půdě celkově nižší zásoba živin, které mohly být využity rostlinami nebo vylaveny.

Provedený experiment byl zároveň zkouškou vhodnosti úpravy půdních vzorků, které byly již jednou v nádobovém experimentu využity. Orná půda aplikovaná v předkládaném experimentu nebyla znovu před aplikací pomleta ani proseta přes síto s průměrem ok 2mm, tak jako pro první experiment. Existuje tak možnost vlivu nově tvořených půdních agregátů, které vznikly při prvním využití půdy. Pro porovnání bude proveden nový experiment. Přesněji experiment Elbl (2012) bude zopakován při respektování původní metodiky, po ukončení se provede znovu homogenizace, ale tentokrát až po přesetí půdních vzorků přes síto o velikosti oka 2mm. Takto připravené vzorky orné půdy podrobíme experimentu podle metodiky uvedené výše a výsledky porovnáme.

LITERATURA

Aber, John D., Knute J. Nadelhoffer, Paul Steudler a Jerry M. Melillo. Nitrogen Saturation in Northern Forest Ecosystem: Excess nitrogen from fossil fuel combustion may stress the biosphere. *BioScience*. 1989, roč. 39, č. 6, s. 378-38.

Barrett, J.E. a I.C. Burke. Potential nitrogen immobilization in grassland soils across a soil organic matter gradient. *Soil biology & Biochemistry*. 2000, roč. 32, 11-12, s. 1707-1716. ISSN 0038-0717. DOI: 10.1016/S0038-0717(00)00089-4

Butterbach-Bahl, Klaus a Per Gundersen. Nitrogen processes in terrestrial ecosystems. Sutton, Mark A. *The European nitrogen assessment: sources, effects, and policy perspectives*. New York: Cambridge University Press, 2011, s. 99-125. ISBN 978-1-107-00612-6.

Dykyjová, Dagmar, et al. *Metody studia ekosystémů*. 1. Vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1989, 692 s.

Elbl, Jakub. *Porovnání vývoje obsahu dusíku v různých hloubkách půdy a ve vodě získané z jímací oblasti Březová nad Svitavou*. Brno, 2012, 88 s. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Jaroslav Záhora, CSc.

Elbl, Jakub a Jaroslav Záhora. *Dynamika úniku klíčových živin z jímací oblasti pro zásobování města Brna pitnou vodou*. 2012. In press.

Erisman, Jan Willem. The European nitrogen in a global perspective. Sutton, Mark A. *The European nitrogen assessment: sources, effects, and policy perspectives*. New York: Cambridge University Press, 2011, s. 9-31. ISBN 978-1-107-00612-6.

Galloway, James a Ellis Cowling. Reactive Nitrogen and The World: 200 Years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 2002, roč. 31, č. 2, s. 64-71. ISSN 0044-7447.

Galloway, James N., John D. Aber, Jan W. Erisman, Sybil P. Seitzinger, Robert W. Howarth, Ellis B. Cowling a B. Jack Cosby. The Nitrogen Cascade. *BioScience*. 2003, roč. 53, č. 4, s. 341-356. ISSN 0006-3568. DOI: 10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2.

Kočí, Vladimír, Jiří Burkhard a Blahoslav Maršálek. Eutrofizace na přelomu tisíciletí. In: *Eutrofizace 2000: sborník semináře, Praha 10. 10. 2000*. 1. Vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2000, s. 3-13. ISBN 80-7080-396-7.

Nohel, Petr, Jaroslav Záhora a Lukáš Mejzlík. Sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v ochranném pásmu vodního zdroje II. stupně Březová nad Svitavou. Praha: SOVAK – *Časopis oboru vodovodů a kanalizací*, 2008, roč. 17, s. 48-51.

Novosadová, Irena, Jaroslav Záhora aj. D. Ruiz-Sinoga. Vliv trsnaté trávy *Stipa tenacissima* L. na mikrobiální transformaci půdního uhlíku a dusíku v aridních podmínkách středozemního klimatu. *Úroda časopis pro rostlinnou výrobu vyd. Min. Zemědělství a Výživy: Vědecká příloha*. 2011, LIX č. 10. ISSN 0139-6013

Paustian, Keith. Rapport /Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för ekologi och miljövård = Report/ Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Ecology and Environmental Research. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1987. ISBN 0348-422X.

Peoples, M. B., A. W. Faizah, B. Rerkasem a D. F. Herridge. *Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989. ISBN 09-495-1190-0.

Pitter, Pavel. *Hydrochemie*. 4. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2009, 568 s. ISBN 978-80-7080-701-9.

Richter, Rostislav a Jaroslav Hlušek. Využití dusíku rostlinami z aplikovaných hnojiv. In: *Nové trendy v používání dusíkatých hnojiv: sborník vědeckých a odborných prací z konference: 25. října 2006 Brno MZLU, 26. října 2006 VÚRV Praha – Ruzyně*. Editor Pavel Růžek, Jana Pišánová. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006, s. 5-14. ISBN 80-865-5596-8.

Rychnovská, Milena a kol. *Metody studia travinných ekosystémů*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1987. 269 s.

Schimmel, Joshua P. a Jennifer Bennett. Nitrogen mineralization: Challenges of a changin paradigm. *Ecology*. 2004, roč. 85, č. 3, s. 591-602. ISN 0012-9658. DOI: 10.1890/03-8002.

Sutton, Mark A. The European nitrogen assessment: sources, effects, and policy perspectives. 1. vydání. New York: Cambridge University Press, 2011, 612 s. ISBN 11-070-0612-0.

Šimek, Miloslav. *Základy nauky o půdě: 3. Biologické procesy a cykly prvků*. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 2003, 151s. ISBN 80-704-0630-5.

Úlehlová, Blanka. *Koloběh dusíku v travních ekosystémech*. 1. vydání. Praha: Academia, 1989, 110 s. Studie ČSAV, 1989, č. 20. ISBN 80-200-0192-1.

Valenta, Jan, Jaroslav Urban a Josef Pulkrábek. Analýza herbicidního stresu rostlin cukrové řepy. In: Bláha, Ladislav. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2007, s. 117-122. ISBN 978-80-87011-18-8.

Wolf, Benjamin a George H. Snyder. *Sustainable soils: the place of organic matter in sustaining soils and their productivity*. New York: Food Products Press, 2003, 352 s. ISBN 1-56022-916-0.

MONITORING OF A POTENTIAL POLLUTION SOURCES OF THE RIVER SVRATKA

MONITORING POTENCIÁLNÍCH ZDROJŮ ZNEČIŠTĚNÍ ŘEKY SVRATKY

Grmela J., Kopp R.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy,
Mendel University, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jan.grmela@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to observe potential sources of organic pollution of Svatka River in a section above the Brno reservoir, between Veverská Bytíška and Nedvědice. For observation were chosen tributaries Nedvědička, Besének, Loučka, Lubě, Bílý potok and Kuřimka. For just reason were chosen Wastewater treatment plants at this river section – WWTP Nedvědice, WWTP Doubravník, WWTP Březina, WWTP Veverská Bytíška. The quality of water was examined on sites by portable devices (Hach HQ40d, Hanna combo). For laboratory analysis were taken water samples into plastic bottles from depth about 10 cm. Directly in terrain was measured water temperature, content of dissolved oxygen, pH and conductivity. Water samples were analyzed for total nitrogen, nitrate, nitrite, total phosphorus, orthophosphate, COD and TOC. For analysis were used a commercial semi-micro methods WTW and spectrophotometric assessment. The highest concentrations of organic and anorganic pollution from our observation were found in WWTP Březina, WWTP Nedvědice and in tributaries Lubě and Kuřimka nearby their estuaries to the Svatka.

Key words: Svatka, river, tributary, wastewater treatment plant, hydrochemistry

Acknowledgments: Authors thank to Individual project IGA IP 13/2012

ÚVOD

Řeka a všechny organismy v ní žijící jsou ohroženy lidskou činností v okolí řeky. Splachy a výluhy z okolních pozemků přinášejí do řeky a jejich přítoků společně s čistírnami odpadních vod určité množství organických i anorganických látek, které mohou při vyšších koncentracích způsobit ekologickou havárii, nebo z dlouhodobého hlediska výrazně urychlovat eutrofizaci. Pro sledování a zhodnocení ekologické stability rybích společenstev je znalost potenciálního ohrožení ichtyofauny důležité. Sledování kvality vody v řece je důležité pro její udržení a případně také zlepšení stavu. Úsek řeky Svratky nad údolní nádrží Brno je významným biotopem pro mnoho živočichů vázaných na kvalitní vodu. Z ryb žijících v tomto úseku jsou to především hospodářsky významné druhy Lipan podhorní (*Thymallus thymallus*) a Pstruh obecný (*Salmo trutta m. fario*), který je využíván jako bioindikátor (WINKLEROVÁ 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Sledování kvality vody proběhlo ve vegetační sezoně roku 2012. Pro účely monitoringu bylo vytipováno 10 lokalit, které by mohly být možnými významnými zdroji organického znečištění. Sledování a vzorkování probíhalo na přítoku Nedvědička při ústí do Svratky v obci Nedvědice, na přítoku Loučka při ústí do řeky u obce Předklášteří, na přítoku Besének při ústí do řeky u obce Předklášteří, na přítoku Lubě pod přemostěním toku 130 metrů nad ústím do řeky, na přítoku Bílý potok při ústí do řeky v obci Veverská Bytíška a na přítoku Kuřimka při ústí do řeky na počátku vzdutí ÚN Brno. Dále byly odebírány vzorky vody vytékající z ČOV Nedvědice, ČOV Doubravnik, ČOV Březina a ČOV Veverská Bytíška. Přímě v terénu byly pomocí přenosných přístrojů měřeny hodnoty základních hydrochemických parametrů. Hodnoty pH, množství rozpuštěného kyslíku a teplota byly měřeny přístrojem Hach HQ40d a vodivost vody (konduktivita) přístrojem Hanna combo. Všechny hodnoty zjišťované v terénu byly měřeny přímo v recipientu. Vzorky vody pro laboratorní analýzy byly odebírány do PE lahví z hloubky 10 – 20 cm pod hladinou. Vzorky vody z čistíren odpadních vod byly odebírány do PE lahví přímo z potrubí.

Laboratorní analýzou byly stanovovány následující parametry vodního prostředí: Celkový organický uhlík (TOC) – stanoven spotřebou kyseliny sírové a peroxidisíranu a přeměnou na oxid uhličitý. N celkový – měřen s dimethylphenolem po přeměně dusíku na dusitany Koroleffovou metodou. Fosfor celkový a fosforečnany byl měřen za použití kyseliny askorbové a molybdenanu amonného, CHSK_c bylo stanoveno pomocí komerčního setu od firmy WTW. Amonné ionty byly stanoveny indofenolovou metodou, Dusitany pomocí N-(1-naftyl)-ethyldiaminu a Dusičnany za použití salicylátu sodného.

Tabulky a grafy byly zpracovány v programu Excel ze sady Microsoft Office 2007 společnosti Microsoft.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Základní fyzikálně chemické ukazatele

Teplota má zásadní vliv na kyslíkovou bilanci v toku. Obsah kyslíku je nepřímo úměrný teplotě (Pitter 2009). Klíčovou roli hraje teplota vody při samočisticích procesech, kdy reguluje intenzitu biochemických procesů (Langhammer 2009). Podle Nařízení vlády č. 88/1999 je maximální přípustné tepelné znečištění vodárenských toků 20°C a u ostatních 26°C. Nejvyšší naměřená teplota byla na lokalitách Loučka 25,7°C a Nedvědička 25,2°C v měsíci červenci. Úsek Nedvědičky před ústím do řeky Svratky v délce cca 500m je regulován. Koryto tvoří kameny usazené do betonu a je lemováno kamennou zdí a není zastíněno vegetací. Výška vodního sloupce je zde nízká, proto se voda v přítoku prohřívá. Přítok Loučka v úseku před ústím do řeky teče přirozeným korytem. Je zde však stejně jako v předchozím případě malý vodní sloupec a tok není zastíněn vegetací.

Hodnoty pH zjištěné při terénních měřeních byly v rozmezí od pH 6,59 (Svratka pod. - 8. 8. 2012 7: 35) do pH 9,42 (Nedvědička – 18.5.2012 12:45). V průměru bylo na všech lokalitách zjištěno pH vyšší než 7. V neznečištěných povrchových vodách ovlivňuje pH vody nejvíce horninové prostředí, přičemž hodnoty pH se pohybují zpravidla v rozmezí 4,5–8,3 (Pitter, 2009).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě je velmi důležitým indikátorem celkové čistoty vody v toku. Na obsahu rozpuštěného kyslíku ve vodě přímo závisí život ryb a vodních organismů. Jako kritická mez pro většinu druhů ryb je považována hranice 3–4 mg/l, pro citlivější druhy ryb, jakými jsou například ryby lososovitě, potom hranice 6 mg/l (Lellák a Kubíček, 1991). Nejnižší zjištěná koncentrace rozpuštěného kyslíku na přítocích byla naměřena na lokalitě Kuřimka v ústí do řeky (2,95 mg.l⁻¹). Řeka v místě kde ústí přítok Kuřimka je obhospodařován jako mimopstruhový. Vůbec nejnižší koncentrace kyslíku byla naměřena na lokalitě ČOV Doubravník v měsíci dubnu (0,32 mg.l⁻¹). Průměr naměřených hodnot obsahu rozpuštěného kyslíku u přítoků splňuje požadavky nařízení vlády č. 71/2003 Sb.

Konduktivita je dobrým ukazatelem možného znečištění. Hodnoty konduktivity v toku výrazně kolísají v závislosti na úrovni antropogenní zátěže. Míru přítomnosti kationtů a anionů ve vodě zvyšuje výskyt znečišťujících látek v toku. Vysoké hodnoty konduktivity tak jsou symptomem přítomnosti antropogenní zátěže, ukazatel nicméně neumožňuje hodnotit nebo odlišit charakter znečištění (Langhammer 2009, Hájek 2000). Konduktivita velmi výrazně závisí na teplotě vody (Grünvald, 1997, Heteša a Kočková 1997).

Hodnoty základních fyzikálně chemických ukazatelů vodního prostředí na sledovaných přítocích jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1 hodnoty základních hydrochemických parametrů na zkoumaných lokalitách (průměr)

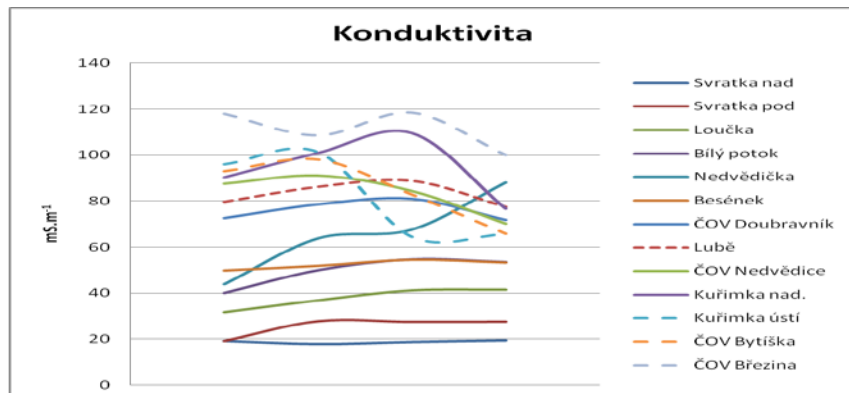
lok	t (°C)	O ₂ %	O ₂ mg.l ⁻¹	pH	Vodivost mS.m ⁻¹
Svratka nad	10,8	98,7	10,7	8,13	18,9
Svratka pod	15,4	111,8	10,7	8,00	25,6
Loučka	17,3	116,5	11,0	8,79	37,8
Bílý potok	15,6	122,4	12,0	8,82	49,5
Nedvědička	16,9	111,7	10,6	8,92	65,8
Besének	14,2	99,4	10,1	8,49	52,4
Lubě	15,5	69,0	6,9	8,21	83,2
Kuřimka nad.	15,3	80,1	8,0	8,22	94,5
Kuřimka ústí	14,8	60,2	6,2	7,91	81,9
ČOV Nedvědice	16,1	59,6	5,8	7,37	83,2
ČOV Doubravník	13,8	29,6	2,3	7,68	75,9
ČOV Bytíška	12,9	68,4	7,2	7,70	84,9
ČOV Březina	16,9	69,5	6,6	7,53	111,3

Tab. 2 Ukazatele a hodnoty jakosti povrchových vod vhodných pro život a reprodukci.

Ukazatel	Hodnoty pro vody lososové		Hodnoty pro vody kaprové	
	cílové	přípustné	cílové	přípustné
Rozpuštěný kyslík (mg/l)	50 % <input type="checkbox"/> 9	50 % <input type="checkbox"/> 9	50 % <input type="checkbox"/> 8	50% <input type="checkbox"/> 7
	100% <input type="checkbox"/> 7		100% <input type="checkbox"/> 5	
pH		6,9		6,9
Amonné ionty (mg/l)	<input type="checkbox"/> 0,04	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0,2	<input type="checkbox"/> 1
Dusitany (mg/l)	<input type="checkbox"/> 0,6		<input type="checkbox"/> 0,9	

(dle nařízení vlády č. 71/2003 Sb.)

Graf č. 1 Hodnoty konduktivity jednotlivých lokalit v průběhu sledování



Graf č. 1 znázorňuje vývoj konduktivity v průběhu sledování. Vzorky z přítoků měly spíše nižší vodivost než vzorky vody z čistíren. V grafu je patrné, že se konduktivita měnila jen málo, což značí poměrně stálou kvalitu přitékající vody. U lokalit Kuřimka nad, Kuřimka ústí a u posledního odběru na lokalitě Nedvědička došlo k výraznější změně vodivosti. Jak ale uvádí Langhammer (2009) může být náhlý výkyv způsoben změnou vodnatosti. Jinými slovy může být vodivost náhle ovlivněna naředěním například srážkami, nebo naopak zkoncentrováním v důsledku malého průtoku. Změna vodivosti u přítoku Nedvědička mohla být způsobena snížením průtoku z důsledku dlouhotrvajícího sucha v letním období roku 2012.

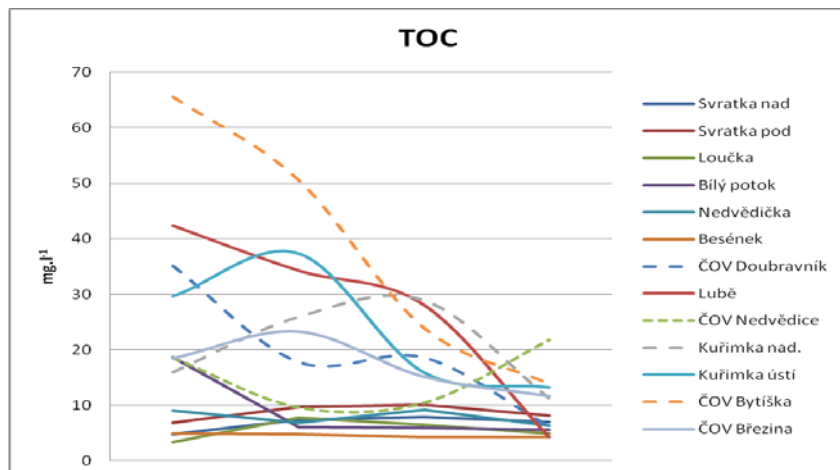
Organické látky

Organické látky v povrchových vodách mohou mít dvoji původ. Přirozeně se do toků dostávají výluhem z půd a sedimentů nebo jako produkty životní činnosti živočišných a rostlinných organismů a bakterií. Značná část organického znečištění má však antropogenní charakter. Zdrojem takového znečištění může být průmysl, zemědělství a komunální odpadní vody (Langhammer 2009, Pitter 2009, Moriarty 1983). Pro zjištění množství organických látek byly sledovány hodnoty celkového organického uhlíku (TOC) a hodnoty chemické spotřeby kyslíku (CHSK_{Cr}).

Tab. č. 3 Hodnoty TOC a CHSK

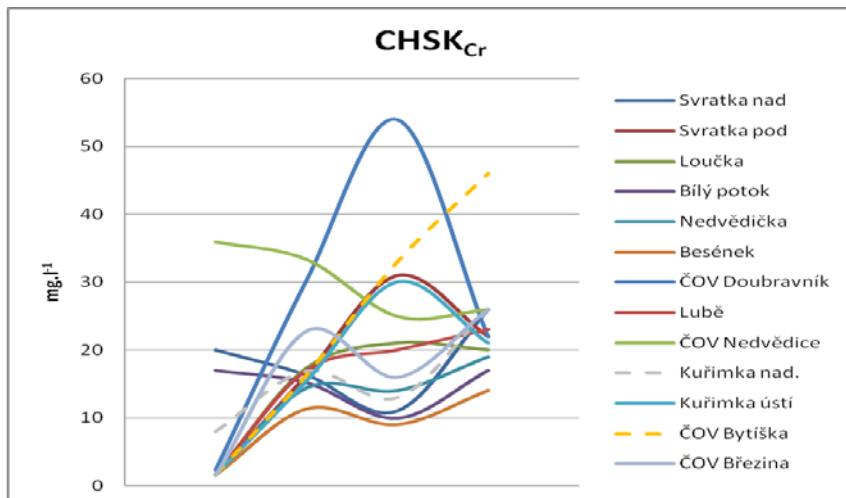
	Svratka nad	Svratka pod	Loučka	Bílý potok	Nedvědička	Besének	ČOV Doubravnik	Lubě	ČOV Nedvědice	Kuřimka nad.	Kuřimka ústí	ČOV Bytíška	ČOV Březina
TOC	6,8	8,7	5,6	9,1	7,8	4,6	19,4	27,3	15,1	20,5	24,0	38,5	17,2
CHSK _{Cr}	18,3	17,7	15,0	14,8	12,2	9,0	27,2	15,4	30,1	16,0	17,0	24,2	16,6

Graf č. 2 Obsah celkového organického uhlíku v průběhu sledování

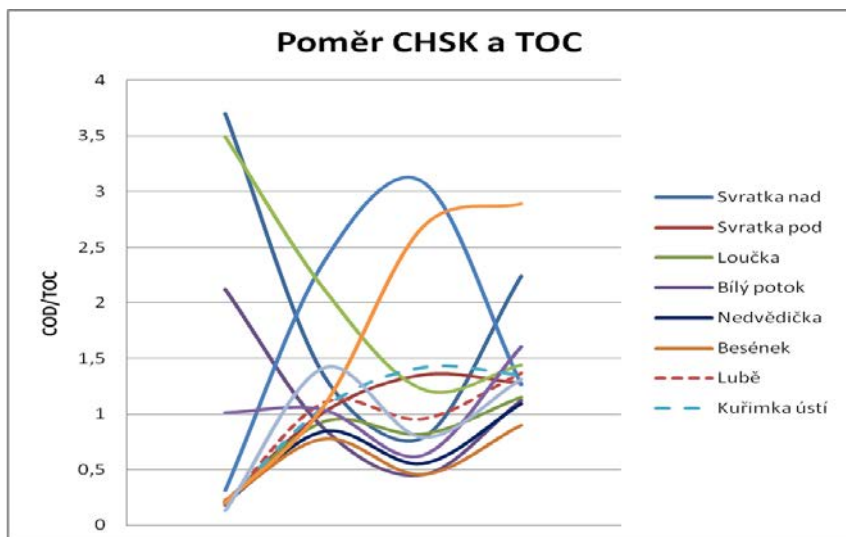


Hodnota TOC vyjadřuje množství CO_2 vzniklého při oxidaci organických látek. Vysoké hodnoty vykazují silné organické znečištění způsobující úbytek kyslíku ve vodě.

Graf č. 3 Obsah CHSK_{Cr}



Graf č. 4 Poměr CHSK/TOC na přítocích



Výrazné změny poměru mezi *toc* a *chsk* mohou znamenat měnění se charakter znečištění nebo strukturální změny zdrojů znečištění (Langhammer 2009). Hodnoty *chsk* a *toc* jsou využívány pro hodnocení kvality vody. Česká technická norma čsn 75 7221 jakost vod – klasifikace jakosti povrchových vod využívá tyto dvě hodnoty pro zařazení do tříd jakosti vody.

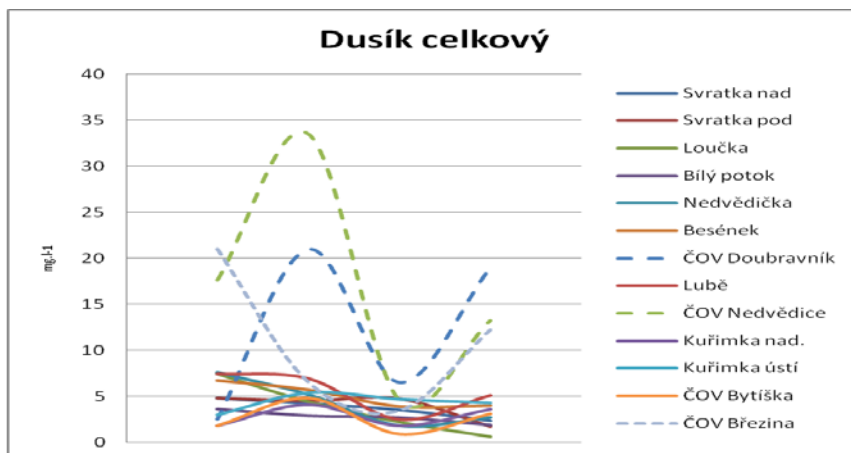
Tab. č. 4 třídy jakosti dle *toc* a *chsk* dle čsn 75 7221

Ukazatel	Jednotka	Třída				
		I	II	III	IV	V
CHSK _{Cr}	mg/l	< 15	< 25	< 45	< 60	> 60
TOC	mg/l	< 7	< 10	< 16	< 20	≥ 20

Anorganické znečištění

Mezi ukazatele anorganického znečištění patří tzv. nutrienty neboli živiny, které jsou důležité pro život a růst organismů. Patří sem sloučeniny dusíku a fosforu (Langhammer 2009). Nejvyšší zátěž v našem sledování z hlediska koncentrace sloučenin dusíku, tedy námi analyzované koncentrace celkového dusíku, amonných a dusičnanových iontů, představují ČOV Doubravnik, ČOV Nedvědice a ČOV Březina. Z přítoků jsou to lokality Besének a Lubě. Dle Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod je přípustná koncentrace amonných iontů je u vodárenských toků 0,39 mg.l⁻¹ a u toků ostatních 2,33 mg.l⁻¹.

Graf č. 5 Celkový dusík zjištěný na lokalitách



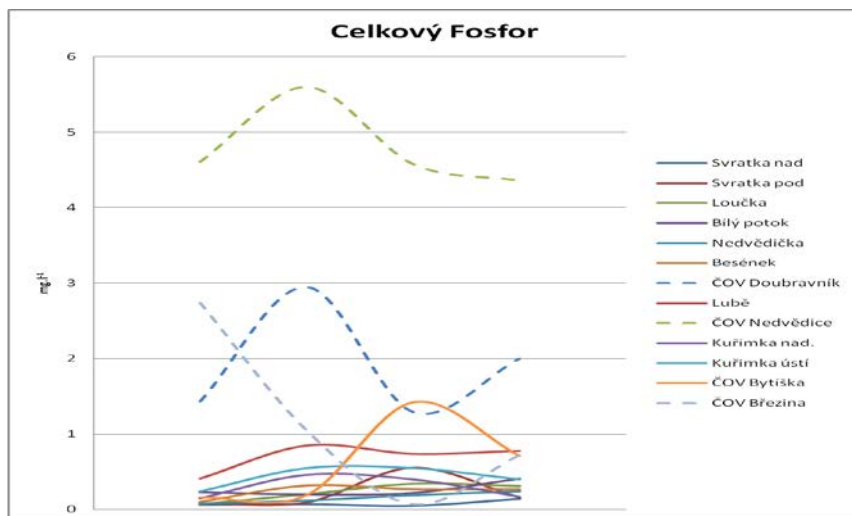
Dalším ukazatelem anorganického znečištění je koncentrace celkového fosforu a koncentrace fosforečnanových iontů. Nejvyšší koncentrace celkového fosforu byla vysledována na lokalitě

ČOV Nedvědice ($5,6 \text{ mg.l}^{-1}$). Průměrná koncentrace v průběhu sledování byla na této lokalitě $4,79 \text{ mg.l}^{-1}$. Druhá v pořadí s nejvyšší koncentrací celkového fosforu byla lokalita ČOV Doubravník ($1,92 \text{ mg.l}^{-1}$). Z přítoků ukázalo naše sledování nejvyšší koncentraci celkového fosforu na lokalitě Kuřimka ústí ($0,435 \text{ mg.l}^{-1}$). Tento přítok s malou vodnatostí protéká mezi obhospodařovanými zemědělskými pozemky. V době sledování byla kolem dolní části toku pěstována kukuřice. Největším zdrojem fosforu z přítoků ve sledovaném úseku je podle studie zabývající se bilancí fosforu v povodí UN Brno řeka Loučka přinášející $10,6 \text{ t P}$ za rok (Gardavská 2012).

Tab. č. 5 Nejčastěji používané hodnoty typické produkce fosforu z komunálních zdrojů (Langhammer 2009)

(Pitter, 2009)	(Nesměrák, 1997)
celková produkce 3 g/os/den	celková produkce $1,57 \text{ g/os/den}$
vylučování $1,5 \text{ g/os/den}$	vylučování $1,2 \text{ g/os/den}$

Graf č. 6 Celkový fosfor (koncentrace)



Kvalita vody

Dle normy ČSN 75 7221 se vody dělí do pěti tříd jakosti na základě koncentrace daných ukazatelů.

Tab. č. 6 Mezní hodnoty námi sledovaných ukazatelů pro určení třídy jakosti povrchových vod dle ČSN 75 7221

Obecné, fyzikální a chemické ukazatele						
Ukazatel	Jednotka	Třída				
		I	II	III	IV	V
rozpuštěný kyslík	mg/l	>7,5	>6,5	>5,0	>3,0	≤ 3,0
konduktivita	mS/m	< 40	< 70	< 110	< 160	> 160
TOC	mg/l	< 7	< 10	< 16	< 20	≥ 20
CHSK _{Cr}	mg/l	< 15	< 25	< 45	< 60	> 60
amoniakální dusík	mg/l	< 0,3	< 0,7	< 2	< 4	≥ 4
dusičnanový dusík	mg/l	< 3	< 6	< 10	< 13	> 13
celkový fosfor	mg/l	< 0.05	< 0.15	< 0.4	< 1	> 1

Tab. č. 7 Třídy jakosti sledovaných ukazatelů na jednotlivých lokalitách

jakost	Vodivost	O ₂	TOC	CHSK	N-NH ₄	N-NO ₃	P _{total}
Svratka nad	I	I	I	II	I	II	II
Svratka pod	I	I	II	II	I	II	III
Loučka	I	I	I	II	I	II	III
Bílý potok	II	I	II	I	I	I	III
Nedvědička	II	I	II	I	I	II	III
Bešének	II	I	I	I	I	II	III
ČOV Doubravník	III	IV	IV	III	III	II	V
Lubě	III	II	V	II	II	II	IV
ČOV Nedvědice	III	III	III	III	III	V	V
Kuřimka nad	III	I	V	II	II	I	III
Kuřimka ústí	III	III	V	II	II	II	IV
ČOV Bytíška	III	II	V	II	I	I	IV
ČOV Březina	IV	II	IV	II	III	IV	V

I. třída velmi čistá voda Voda je obvykle vhodná pro všechna užití, mj. pro

- vodárenské účely
- potravinářský průmysl
- koupání
- chov lososovitých ryb

Voda má velkou krajinnotvornou hodnotu

II. třída čistá voda Voda je obvykle vhodná pro většinu užití, mj. pro:

- vodárenské účely
- chov ryb
- vodní sporty
- zásobování průmyslu vodou

Voda má krajínotvornou hodnotu

III. třída znečištěná voda Voda obvykle vhodná jen pro zásobování průmyslu vodou.

Pro vodárenské účely je voda použitelná jen podmíněčně, pokud není

k dispozici zdroj lepší jakosti, při vícestupňové úpravě

Voda má malou krajínotvornou hodnotu

IV. třída silně znečištěná voda Voda je obvykle vhodná jen pro omezené účely.

V. třída velmi silně znečištěná voda Voda se obvykle nehodí pro žádný účel. (ČSN 75 7221)

ZÁVĚR

Všechny sledované lokality odpovídaly v průměru požadavkům na kvalitu vody pro vody kaprové (Bílý potok, Kuřimka, Lubě, Svratka pod) respektive pro vody pstruhové (Loučka, Besének, Nedvědička, Svratka nad.). Největšími potenciálními zdroji ve sledovaném úseku jsou z hlediska koncentrace vybraných parametrů čistírny odpadních vod. Nejvyšší koncentrace celkového N přináší ČOV Doubravník (900 os.) a Březina (cca 10000 os.). Nejvyšší koncentrace celkového P byly zjištěny u ČOV Nedvědice a ČOV Doubravník. Při dostatečném průtoku vody v řece dojde k výraznému naředění znečištění. Negativní dopad na kvalitu v řece se tak v případě čistíren odpadních vod výrazně zmenšuje. Z přítoků vybraných pro monitoring byly nejvyšší koncentrace znečištění naměřeny v přítocích Lubě a Kuřimka. Ale vzhledem k množství přitékající vody se zvýšenou koncentrací látek ovlivňujících kvalitu vody jsou největšími přirozenými zdroji znečištění přítoky Loučka a Lubě. Tyto přítoky protékají intenzivně zemědělsky využívanou krajinou. S tím souvisí další možné problémy s výluhem látek z okolních polí. Ze sledovaných čistíren odpadních vod se jako nejvýznamnější znečišťovatel jeví ČOV Březina, která je napojena na největší počet osob a tedy zpracovává největší množství odpadních vod. Sledování množství organických látek a živin přitékajících řekou Svratkou má v posledních letech význam ve vztahu ke snahám o snížení vodního květu na ÚN Brno. Vědomosti o zdrojích organického znečištění mohou usnadnit řešení příčin nadměrného vodního květu.

LITERATURA

GARDAVSKÁ, Z. a kol. (2012) *Bilanční model povodí VN Brno*. In Vodárenská biologie Praha 2012. Ekomonitor. s. 60- 65. 218 s. ISBN 978-80-86832-65-4

GRÜNVALD, A. (1997) *Hydrochemie*, Praha, ČVUT.

HÁJEK, M. (2000): *Měření fyzikálně-chemických vlastností vody přenosnými přístroji* In: Stanová, V. (ed.) Rašelinská Slovenska. DAPHNE . Inštitút aplikovanej ekológie, Bratislava, str. 77-83.

HETEŠA, J. - KOČKOVÁ, E. (1997): *Hydrochemie*. – Skriptum MZLU Brno, 106 s.

MORIARTY F. (1983): *Ecotoxicology*. Academic press. 2. vydání. ISBN 0-12-506761-5

LANGHAMMER, J. (2009): *Kvalita povrchových vod a jejich ochrana*. Praha 2002. Skriptum Univerzita Karlova. 225 s.

LELLÁK, J. AND KUBÍČEK, F. (1991) *Hydrobiologie*, Praha, Karolinum.

NESMĚRÁK, I. (1997) *Města a obce jako zdroj fosforu*. VTEI, 27(2).

PITTER, P. (2009): *Hydrochemie*. VŠCHT Praha 2009. 4. Vydání. ISBN 978-80-7080-701-9

WINKLEROVÁ, L. (2008): *Bioindikátory – jejich role při hodnocení stavu životního prostředí*. Bakalářská práce. VUT Brno 2008.

ČR (1998) Česká technická norma ČSN 75 7221 Jakost vod – klasifikace jakosti povrchových vod

Nařízení vlády č. 82/1999 Sb. kterým se stanoví ukazatele a hodnoty přípustného znečištění vod.

Nařízení Vlády č. 71/2003 Sb. - o stanovení povrchových vod vhodných pro život a reprodukci původních druhů ryb a dalších vodních živočichů a o zjišťování a hodnocení stavu jakosti těchto vod

THE FLUCTUATION OF PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS IN HYPERTROPHY FISHPONDS DURING THE DAY AND NIGHT

Hadašová L., Kopp R.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: hadasova.lenka@gmail.com

ABSTRACT

The level of eutrophication in fish ponds has increased during the period of last fifty years from oligotrophic to hypereutrophic because of influence of growing intensification in productive pond fishery. As a consequence of these, there are either fluctuations in physicochemical parameters caused by destabilization of ecosystem, or changes in aquatic organism diversity and abundance. The main course of the experiment was to record the changes of these parameters in hypertrophy fishponds during the day and night and draw a comparison between measurements realized close above the bottom and under the surface. The results clearly show the dependence of physicochemical parameters on many factors and it's fluctuation is considerable even in short period of time on the both levels. In comparison with the literature, the fluctuation showed strong variability.

Key words: Fish pond, eutrophication, physicochemical parameters, diurnal changes, plankton

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency Individual Project IP 4/2012 and by the Research plan No. MSM6215648905 "Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change", which is financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

ÚVOD

Rybníky v České republice byly a jsou účelové vodní nádrže, reprezentující důležitý a nejvíce zastoupený typ stojatých vod. Dnes představují řízený akvatický ekosystém, jehož vodní hladina, rybí obsádka a do určitého rozsahu i vstupy živin jsou pod kontrolou člověka (Pechar 2000). V současné době se na území ČR rozkládá více než 24 000 rybníků a rezervoárů, jejichž celková plocha je více než 52 000 ha. Management českého rybníkářství od dob neprodělal do poloviny 19.století mnoho změn, intenzifikace rybníkové produkce (hnojení, vápnění, umělá krmiva ve formě obilovin a pelet) byla započata až během první poloviny 20. Století a během 50 let se zvedla rybníková produkce z méně než 50 na více než 500 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ (Pechar et. al 2002). Ve stejné době se ovšem také výrazně zhoršila kvalita vody a sedimentů a funkce rybníčního ekosystému byla narušena. Není výjimkou, že rybníky s použitím intenzifikačních opatření jsou obhospodařovány až na hranici únosnosti a rybníční systém je pak velmi nestabilní (Kopp et al. 2012). Současný stav vysoké úrovně eutrofizace vychází z nadměrného zatížení živinami. Toto zatížení je nejčastěji způsobeno top – down efektem zooplanktonu a vysoké rybníkové obsádky a ovlivňuje celou dynamiku akvatického ekosystému (Potužák et al. 2007). Proto se u těchto nádrží setkáváme s masivním výskytem vodního květu fytoplanktonu, zejména sinic, doprovázeným výrazným kolísáním koncentrace kyslíku a pH. Často tak nastávají podmínky, které mohou mít a pravděpodobně mají silně nepříznivý vliv ať už na účelovou obsádku ryb nebo na ostatní vodní organismy.

Hlavním cílem této práce je sledování změn fyzikálně-chemických parametrů hypetrofních rybníků v průběhu dne a noci. Zejména rozdílů mezi těmito parametry u dna a u hladiny, což není standardní způsob měření těchto parametrů. Tato pozorování mají ukázat, zda by nebylo vhodné zahrnout dvouúrovňové měření do běžných metodik hodnocení kvality vody nejen pro rybářské účely a potvrdit nebo vyvrátit tak hypotézu, že průběh těchto parametrů se v různých hloubkách liší. Dále byly hodnoceny změny fyzikálně-chemických parametrů v hlavním vegetačním období (srpen) a mimo něj (říjen).

MATERIÁL A METODIKA

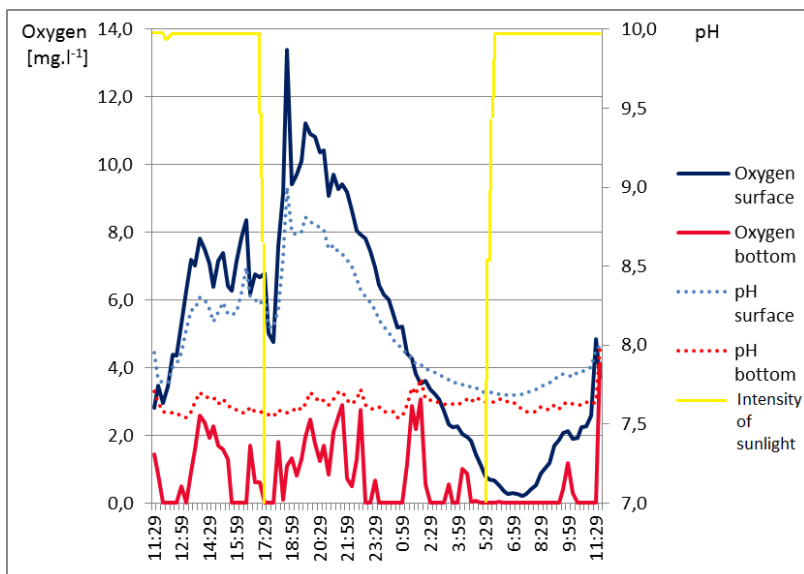
Měření probíhalo ve dvou etapách. První etapa byla v hlavní vegetační sezóně (srpen) a termín byl stanoven dle aktuálního stavu počasí vhodného pro rozvoj fytoplanktonu – předcházelo kontinuální slunečné počasí bez srážek s vysokými denními teplotami (až 30°C ve stínu). Druhé měření probíhalo po konci vegetační sezóny (říjen). Počasí bylo chladné (max.15°C), převážně bylo zataženo s dešťovými přeháňkami. Měření v hlavní sezóně bylo v následujícím roce opakováno. Samotné měření bylo realizováno pomocí dvou přístrojů HACH Hq 40d (Hach-Lange, Colorado, USA), které byly nastaveny na kontinuální 24-hodinové měření v 15-minutových intervalech. První přístroj byl ponořen těsně pod hladinu do hloubky cca 20cm, druhý přibližně 20cm nad úroveň dna,

tedy do hloubky cca 110 - 150cm. Takto byl zaznamenáván rozpuštěný kyslík, pH a teplota vody. Vzorky zooplanktonu a fytoplanktonu byly odebrány standartní metodou pomocí planktonní sítky o velikosti ok 20 μm .

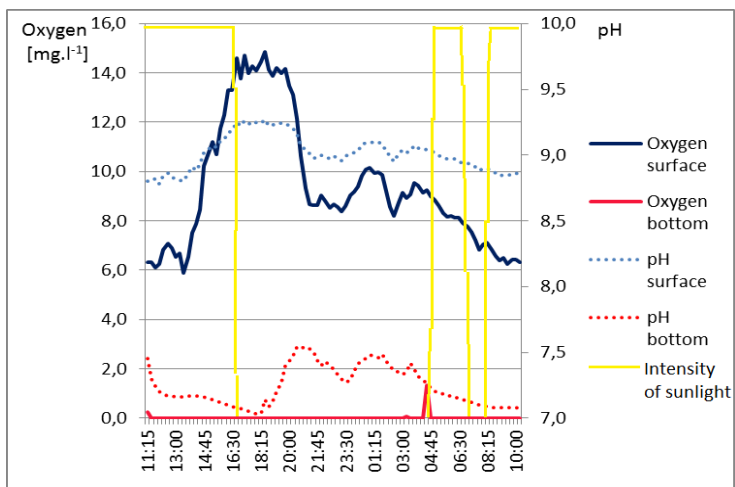
VÝSLEDKY A DISKUZE

Měření v hlavní vegetační sezóně v obou letech ukázala, že se křivka koncentrace kyslíku na dně a na hladině ve velmi krátkých časových intervalech mění a její průběh u hladiny a u dna není shodný. Zatímco u hladiny kopíruje světelné podmínky (Heteša a Sukop, 1985) dle očekávání (Fig. 1 and Fig. 2), koncentrace kyslíku u dna má minimální výkyvy. Křivky naměřených hodnot pH byly ve shodě s hodnotami naměřených koncentrací kyslíku bez signifikantních anomálií. Celkově odpovídaly výsledky letního měření u hladiny literatuře, kde jsou uváděny (Horký, 1978, Lellák a Kubiček, 1992, Pitter, 1999, Kayombo et al., 2002).

Graf.1 Průběh změny kyslíku a pH u dna a u hladiny během 24 hodin, srpen 2011

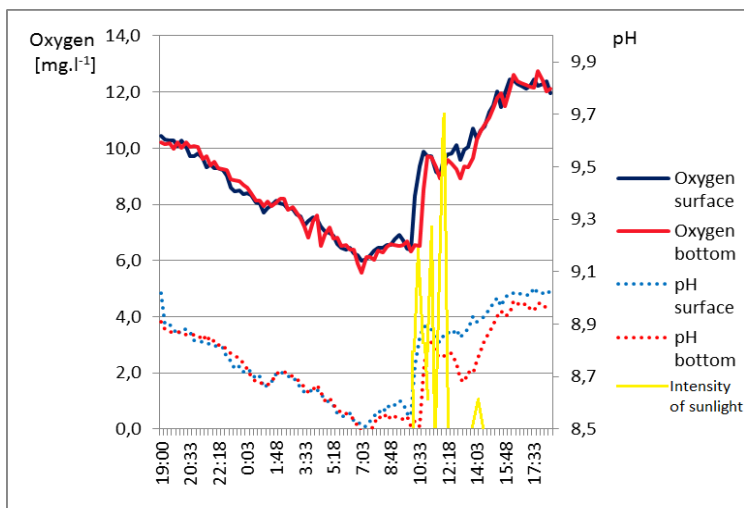


Graf 2. Průběh změny kyslíku a pH u dna a u hladiny během 24 hodin, srpen 2012



Měření po skončení vegetační sezóny ukázala, že není téměř žádný rozdíl v průběhu změn sledovaných parametrů mezi dnem a hladinou. Křivka koncentrace kyslíku i pH kolísá dle předpokladů (Fig.3).

Graf 3. Průběh změny kyslíku a pH u dna a u hladiny během 24 hodin, říjen 2011



Fytoplankton na sledovaných rybnících byl z 80 – 100% zastoupen sinicemi. Nejčastěji se vyskytujícími druhy byly *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii* a *Pseudanabaena limnetica*. Tyto druhy jsou charakteristickými zástupci vodního květu (Kalina a Váňa, 2005). Rozsivky a zelené řasy byly ve vzorcích zastoupeny do 10%. Což je dle Maršálka (2000) běžný stav eutrofních nádrží nejen ČR. Obecně lze konstatovat, že podíl sinic ve fytoplanktonu značně přibývá a spolu s měnícími se podmínkami se mění i jejich druhové spektrum (Hašler et al., 2000). Je známo, že sinice samotné své prostředí mění (Kitner a Pouličková, 2001) a přetváří ho dle svých potřeb. To je jeden z důvodů, proč se domnívám, že diurnální změny fyzikálně-chemických parametrů, hypertrofních nádrží, kterou jsou dnes osídleny sinicemi, vypadá jinak než před 50 lety. Druhové složení sinic se měnilo od velkých vodních kolonií *Aphanizomenonflosaqua* přes *Microcystis aeruginosa* a malé koloniální druhy rodu *Anabaena* k vláknitým druhům (*Planktothrix agardhii*, *Limnothrix redekei*, *Aphanizomenon gracile*) nebo kokálním formám (*Microcystis ichtyoblabe*). Kopp et al. (2012), tento jev vysvětlují nejen nízkými nároky na světelné podmínky a nízkým poměrem N:P, ale i nízkým žracím tlakem zooplanktonu. Primární příčinou je absence velkých perlooček, které potlačují rozvoj právě vláknitých druhů sinic. To vyplývá i z rozboru zooplanktonu sledovaných rybníků. Zastoupeny byly pouze malé planktonní druhy. Z vířníků byl nejčastější *Filinia longiseta*, dále *Asplanchna priodonta* a *Keratella quadrata*. Perloočky byly zastoupeny pouze druhy *Chidorus sphaericus* a *Bosmina longirostris*. Nejhojněji vyskytující se zooplanktonní složkou byla naupliová stadia buchaneč čeledi *Cyclopidae*. Takovéto zastoupení v intenzivně obhospodařovaných rybnících uvádí i Potužák et al. (2007).

ZÁVĚR

Dle výsledků této práce je patrné, že diurnální fluktuace fyzikálně-chemických parametrů hypertrofních nádrží záleží na mnoha faktorech a kolísání je výrazné i v krátkých časových úsecích a výrazně se liší v různých hloubkách. Rostoucí fluktuace parametrů prostředí jsou obecně považovány za základní projev nestability ekosystému, které mohou postupně vést až k jeho trvalé změně. Vlivem intenzivního obhospodařování je přirozená struktura rybníčního ekosystému značně zjednodušena, což dále přispívá k jeho nestabilitě. Následkem toho dochází ke změně druhové diverzity a původní druhy organismů jsou často nahrazovány druhy nepůvodními s nižšími nároky na prostředí. Z tohoto důvodu se domnívám, že udržování ekologické stability vedoucí k dobře fungujícímu ekosystému by mělo být jedním ze záměrů managementu rybníčního hospodaření nejen z hlediska ochrany ekosystému ale i ke snížení ohrožení účelové obsádky.

LITERATURA

Hašler P., Pouličková A., Vařeková Š., 2000: Vliv intenzity osvětlení na druhové složení „vodních květů“ sinic. Sborník referátů z XII. Limnologické konference Limnologie na přelomu století. Univerzita Palackého v Olomouci s. 69 - 73

Heteša J., Sukop I., 1985: Aplikovaná hydrobiologie II. Skriptum VŠZ Brno, SPN Praha, s. 83

Horký Z., 1978: Diurnální změny v obsahu kyslíku ve vodě intenzivně obhospodařovaných rybníků. Diplomová práce (in MS), Vysoká škola zemědělská v Brně, Brno, 50 s.

Kalina T., VÁŇA, J., 2005: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, s.1-606.

Kayombo S., Mbwette T. S. A., Mayo A. W., Katima J. H. Y., Jorgensen S. E., 2002: Diurnal cycles of variation of physical-chemical parameters in waste stabilization ponds. *Ecological Engineering* 18, s. 287 – 291.

Kitner M., Pouličková A., 2001: Sezónní dynamika fytoplanktonu dvou rybníků u Protivanova. – *Czech Phycology* 1: 45-51.

Kopp R., Mareš J., Ziková A., Vítek T. 2012: Variations of physical and chemical parameters in hypertrophic pond within pig slurry application. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2008, LVI, No. 2, s. 95-100

Lellák J., Kubíček F., 1992: *Hydrobiologie*. Karolinum, Praha, s.1-257.

Maršálek B., 2000: Hledání Achillovy paty cyanobakterií. Sborník referátů z XII. Limnologické konference Limnologie na přelomu století. Univerzita Palackého v Olomouci s. 88- 92.

Pechar L., 2000: Impacts of long-term changes in fishery management on the trophic level water quality in Czech fish ponds. *Fisheries Management and Ecology*, 7, s. 23-31.

Pechar L., Přikryl I., Faina R., 2002: Hydrobiological evaluation of Třeboň fishponds in the end of the nineteenth century. In: Květ J., Jeník J., Soukupová L. (eds.) *Freshwater wetlands and their sustainable future*, Paris, s.31 – 61

Pitter P., 1999: *Hydrochemie. třetí přepracování* vyd. Praha, VŠCHT 568

Potužák J., Hůda J., Pechar L., 2007: Changes in fish production effectivity in eutrophic fishponds—impact of zooplankton structure. *Aquacult Int* 15:201–210

VORACIOUS LARVAE AND BIOLOGICALLY DEGRADABLE WASTE

NENASYTNÉ LARVY A BIOLOGICKÝ ROZLOŽITELNÝ ODPAD

Kalová M.¹, Borkovcová M.²

¹Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: marketa.kalova@node.mendelu.cz, borkov@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to know the ability of insects *Hermetia illucens* consume biodegradable waste. It was confirmed that the larvae *Hermetia illucens* consume decaying material, thus opening the possibility of another way to reduce the proportion of biodegradable waste sent to landfill in the Czech Republic, as our country is committed to the legislation of the European Union. This option is interesting from the perspective of municipal waste that is inherent problematic for further use of the material (composting, processing into biogas) as required by the current wording of the Act No. 185/2001 Coll., Which provides landfill as a last resort hierarchy of waste management. It was also confirmed that in the setting of appropriate temperature and light conditions are the larvae unable to complete their life cycle when they are close to suitable places for eggs laid by. The larvae that hatch from eggs, would have gone longer used for waste treatment, and thereby reach a cyclical supply of larvae to consume other waste materials. Other potential areas where insects *Hermetia illucens* could be used is prevention of waste generation.

Key words: Black soldier fly, *Hermetia illucens*, waste management, compost technology, strategy of municipal waste

Acknowledgments: This study was supported by the IGA - Internal Grant Agency Faculty of Agronomy MENDELU No. IP14/2012 and No. TP 4/2012.

ÚVOD

Vlastností *Hermetia illucens*, která je z pohledu odpadového hospodáře výhodná, je nepreference konzumovaného materiálu z hlediska původu. Není tedy nutné odlišovat materiál rostlinného či živočišného původu, jak to vyžadují postupy kompostování i zpracování na bioplyn. V rámci diplomové práce navrhovatelky se realizovaly úspěšné pokusy zjišťující schopnost bráněnky *Hermetia illucens* konzumovat biologicky rozložitelný odpad, a to včetně srovnání polních a laboratorních podmínek. Tato studie přináší rozšíření výzkumu na vybrané druhy odpadů ze skupin 02, 19 a 20 dle Katalogu odpadů (stanoven vyhláškou č. 381/2001 Sb.). Tyto skupiny zahrnují i odpady typické svým problematickým zpracováním jako jsou kaly z čistíren odpadních vod, odpady z dešťových vpustí či biologicky rozložitelné odpady z kuchyní a stravoven. Cílem výzkumu je prozkoumat další možnost, jak omezovat množství biologicky rozložitelného odpadu ukládaného na skládky a zároveň vytvářet kvalitní hnojivo či jeho části, tedy navracet živiny zpět do půdy.

MATERIÁL A METODIKA

Pro účely experimentů byl použit hmyz známý jako forenzní indikátor *Hermetia illucens* (běžnější anglický výraz je Black soldier fly). Český název tato dvoukřídla moucha, bráněnka, prozatím nemá. Cílem pokusů bylo zjistit, které vybrané odpady jsou larvy bráněnky *Hermetia illucens* schopny konzumovat. Pokusy byly založeny v laboratoři na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství. Podmínky jedné laboratoře zajistily stejnou teplotu a vlhkost, přesto byly měřeny pomocí teplotních čidel typu minikin TH a minikin TT. Součástí metodiky bylo srovnání hmotnosti jak předkládaných materiálů před a po ukončení experimentu, tak hmotnosti larev a kulek *Hermetia illucens* na začátku a na konci pokusu.

Dvanáct speciálních nádob (značka BioPod) umožnilo pestrost vybraných odpadů. Jednotlivé nádoby BioPodu byly zásobovány vybranými druhy odpadů, na které byly následně nasazeny larvy *Hermetia illucens*, včetně chovného substrátu, se kterým byly larvy dodány. Ze skupiny 02 „Odpady z prvovýroby v zemědělství, zahradnictví, myslivosti, rybářství a z výroby a zpracování potravin“ byly předkládány následující materiály: odpad rostlinných pletiv, slepičí trus, zahradní odpad. Ze skupiny 19 „Odpady ze zařízení na zpracování (využívání a odstraňování) odpadu, z čistíren odpadních vod,...“ byly vybrány a následně předkládány tyto materiály: kaly z čistíren odpadních vod, separát z bioplynové stanice, odpad z dešťových vpustí. Ze skupiny 20 „Komunální odpady (odpady z domácností a podobné živnostenské, průmyslové odpady a odpady z úřadů), včetně složek z odděleného sběru“ byly zkrmovány tyto materiály: kuchyňský odpad, zahradní odpad, odpad ze stravovacích zařízení, exkrementy domácích mazlíčků, kvalitně i nekvalitně vyříděný komunální biologicky rozložitelný odpad.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování konzumace jednotlivých odpadů bylo pozorováno, že larvy upřednostňují vlhký tlející materiál. Vlhkost larvám umožňuje snadnější konzumaci, protože mají pouze drásací sací ústní ústrojí. Tlení materiálu je podmínkou, aby larvy začal zajímat: netlejícím materiálům se věnují, jen pokud nenajdou jiný tlející materiál. Nejprve vždy konzumují odpad, který tleje. U odpadních materiálů, kde k tlení dochází minimálně (např. kaly z čistíren odpadních vod či separát z bioplynových stanic), se larvy snaží materiál přemístit, rozvrstvit. U odpadu z dešťových vpustí toto rozložení výrazně urychlilo stabilizaci materiálu i díky výběrové konzumaci organických částí odpadu. Tato výběrová konzumace se může jevit jako výhodná i pro nekvalitně vytříděný biologicky rozložitelný komunální odpad, kde si larvy samy vyberou vhodnou potravu a nežádoucí příměsi ignorují. Nežádoucí příměsi bude komunální odpad pravděpodobně obsahovat vždy, snad jen s výjimkou komunitního kompostování, kdy občané budou sami výsledný kompost odebírat a používat. Velkou výhodou je schopnost larev konzumovat odpady živočišného původu jako jsou mléčné výrobky, zbytky jídel, zkažené potraviny.

Vhodnost zvoleného odpadního materiálu můžeme posuzovat dle velikosti kukel (následující vývojové stádium po larvách), popřípadě vylíhlých dospělců - much. Čím je odpadní materiál pro larvy vhodnější, tím jsou větší. Velikost je samozřejmě ovlivněna teplotou, za které se larvy vyvíjely. Jelikož naše experimenty probíhaly současně lze říci, že jako nevhodnější materiál pro larvy využívané v odpadovém hospodářství, se jeví „gastro“odpad, který je uváděn v Katalogu dopadů pod číslem 20 01 08 jako Biologicky rozložitelný odpad z kuchyní a stravoven jako ostatní odpad. Nadprůměrně vzrostlé byly kukly z odpadu rostlinných pletiv a z kvalitně i nekvalitně vytříděného biologicky rozložitelného komunálního odpadu. Dále bylo pozorováno, že konzumace probíhá v závislosti na teplotě.

ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že larvy Black soldier fly konzumují rozkládající se materiál, a tím se otevírá možnost dalšího způsobu snižování podílu biologicky rozložitelného odpadu ukládaného na skládky v podmínkách České republiky, jak je naše republika zavázána vůči legislativě Evropské unie. Tato možnost je zajímavá z pohledu nakládání s komunálním odpadem, který je svými vlastnostmi problematický pro další využívání materiálu (kompostování, zpracování na bioplyn), jak vyžaduje současné znění zákona o odpadech č. 185/2001 Sb., které skládkování uvádí jako poslední možnost v hierarchii s nakládání s odpady.

Dále bylo potvrzeno, že za nastavení vhodných teplotních a světelných podmínek jsou larvy schopny dokončit svůj životní cyklus, pokud jsou v blízkosti vhodná místa pro naklazení vajíček. Larvy, které se vylíhnou z vajíček, by šly nadále využívat pro zpracování odpadů, a tím dosáhnout cyklického přísunu dalších larev pro konzumaci odpadních materiálů. Další potenciální oblastí, kde by mohl být hmyz *Hermetia illucens* využit, je předcházení vzniku odpadů.

LITERATURA

KALOVÁ M., 2011: Možnosti využití bráněnky *Hermetia illucens* při zpracování biologického odpadu. Diplomová práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MZLU v Brně, Brno, 65 s.

KALOVÁ M.; BORKOVCOVÁ M., 2011: Možnosti využití bráněnky *Hermetia illucens* v odpadovém hospodářství, s. 99 In: BRYJA J., ŘEHÁK Z., ZUKAL J. (eds): *Zoologické dny Brno 2011. Sborník abstraktů z konference 17.-18. února 2011*. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno, 282 s. Dostupné na: http://zoo.ivb.cz/doc/sborniky/sbornik_2011.pdf.

KALOVÁ M.; BORKOVCOVÁ M., 2010: Waste management and *Hermetia illucens*, s. 91. In: ŠKARPA P., CERKAL R., RYANT P. et al. (eds.): *Mendelnet 2010. Sborník abstraktů z konference 24.11.2010*. Agronomická fakulta Mendlovy univerzity v Brně, 168 s. ISBN: 978-80-7375-453-2

MYERS H. M., TOMBERLIN J. K., LAMBERT B.D., KATTES D., 2008: Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Fed Dairy Manure. *Environmental Entomology*, 37(1): 11-15.

SHEPPARD D. C., TOMBERLIN J. K., JOYCE J. A., KISER B. C., SUMNER S. M., 2002: Rearing methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*, 95(4): 695-698.

TOMBERLIN J. K., ADLER P. H., MYERS H. M., 2009: Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environmental Entomology*, 38(3): 930-934.

TOMBERLIN J. K., SHEPPARD D. C., JOYCE J. A., 2002a: Select Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on three Artificial Diets. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(3): 379-386.

**EFFECT OF CARBON STIMULATED MICROBIAL ACTIVITY
ON PLANT GROWTH AND LOSS OF NITROGEN FROM THE SOIL**

VLIV UHLÍKEM STIMULOVANÉ MIKROBIÁLNÍ AKTIVITY NA RŮST ROSTLIN A
ZTRÁTY DUSÍKU Z PŮDY

Kintl A., Plošek L., Hynšt J., Tůma I., Záhora J.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkintl0@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the effect of added carbon (C) on activity of soil microorganisms and growth of plants in soil fertilized with high level of mineral nitrogen (N). Soil was sampled at the locations of protected area of water catchment Březová nad Svitavou. Selected experimental area is included in vulnerable area (according to Nitrate direction). Samples of soil were sieved, homogenized and placed into 125 ml experimental pots. All pots were planted with model crop *Lactuca sativa*. For simulation of different level of nutrient availability, urea was applied at the rate of 175 kg N/ha, commercial phosphate was applied as a source of P – 35 kg/ha of P and ground cellulose was used as a source of C. The treatments were: control, addition of N + C; N + P + C; C; N and N + P. At the end of experiment, basal respiration was measured to determine activity of soil microorganisms and substrate induced respiration was measured to determine soil microbial biomass. Leaching of N during experiment was measured using extraction of mineral N, adsorbed in ion exchange resins placed under experimental pots in flat plastic holders. Production of aboveground biomass of cultivated plants was also determined (expressed as g of dry matter). Significant differences were observed between the rates of basal respiration in soils amended with C and unamended ones. It indicates increased activity of microbial communities in treatments amended with cellulose. Addition of cellulose also increased the rate of substrate induced respiration, that indicates higher amount of microbial biomass in these treatments.

Amount of aboveground biomass was without difference in control and treatment C+N+P. At the treatment with amendment of cellulose, lowest growth of aboveground biomass of indicator plant was observed. It was probably caused by strong competition with microbes on nutrients. Also the treatment N+C was not suitable for plant growth and the plants died.

Results suggest that high level of mineral N causes leaching of N from soil and they can have impact on cultivated plants. Addition of C may eliminate these effects of N application. However, at excessive level of C microbial community compete with plants on nutrients. When we add sufficient amount of nutrients, microbial activity increases and conditions remain suitable for plant growth.

Key words: soil carbon, microbial activity, plant growth

Acknowledgments: This work was supported by the project NAZV reg. no: QJ1220007.

ÚVOD

Jímací území vodního zdroje Březová nad Svitavou je zdrojem pitné vody pro brněnskou oblast a okolí. Z převážné části využívá zásoby vody ze střednoturonského kolektoru křídového souvrství Ústecké synklinály. Jedná se o velmi kvalitní podzemní vodu, v níž však, bohužel, dochází k mírnému, ale stálému nárůstu koncentrace nitrátů a to i přes radikální omezení aplikace průmyslových hnojiv již před více než 20 lety (Nohel et al., 2008). Zkoumané lokality se nacházejí v Ochranném pásmu vodního zdroje (OPVZ II. Stupně) Březová nad Svitavou a jsou zařazeny do zranitelné oblasti (dle Nitrátové směrnice, prováděcí předpis NV 103/2003 Sb.).

Za stávajících podmínek, kdy je určujícím hlediskem bezprostřední zisk, není ekonomicky rentabilní produkce možná bez přidavku dusíku, jehož nedostatek limituje výnos. Dusík je do půdy dodáván především ve formě minerálních hnojiv s obsahem NO_3^- a NH_4^+ (N_{min}). Ale dodávat rostlinám minerální dusík je žádoucí pouze v takové míře, aby nedocházelo k jeho ztrátám. Bylo empiricky zjištěno, že pro zajištění dostatku minerálních forem dusíku v rhizosféře pěstovaných plodin, je nutno hnojit dusíkem v nadbytku. Rostlinami nevyužitý minerální dusík, snižující poměr C:N v půdě, může stimulovat všudypřítomné půdní mikroorganismy k vyšší aktivitě a tím i k mineralizaci.

Zvyšuje se tak riziko úbytku organické hmoty, dále je část nadbytečného dusíku v půdě nitrifikována za vzniku NO_3^- (Záhora, 2011). Vysoká pohyblivost tohoto aniontu v půdě umožňuje jeho snadné vyplavení z orničního profilu v doprovodu bazických kationtů. Vyplavení nitrátového dusíku z orniční vrstvy nejen znemožňuje jeho dalšího využití při tvorbě biomasy a potenciálního výnosu, ale také negativně ovlivňuje kvalitu podzemní vody.

Uhlíkaté látky jsou významným zdrojem energie pro mikrobiální procesy a tím i hnacím motorem půdní mikrobiální aktivity, která je nezbytná pro mikrobiální transformace půdního dusíku. Pro funkčnost mikrobiálního společenstva je důležité zastoupení biogenních prvků, které udává Redfieldův poměr, jež vyjadřuje molekulární poměr mezi uhlíkem, dusíkem a fosforem v organismech. Tento poměr je 106:16:1 tzn., že na každý 1 atom fosforu připadá 16 atomů dusíku a 106 atomů uhlíku. V nespočetných výzkumech bylo zjištěno, že terestrické prostředí má stejné zastoupení uhlíku, fosforu a dusíku v rostlinné biomase (Elser a kol 2000).

Obsah organických složek (uhlíkatých sloučenin), který tvoří jen malý podíl celkové hmotnosti (zpravidla se pohybuje v rozmezí 2-5%), významně ovlivňuje vlastnosti půdy a život v ní, a právě obsah uhlíku, prezentující rozhodující element organických sloučenin, odlišuje půdu od neživé zvětraliny (regolítu) původního geologického substrátu. Význam organické části půdy byl znám

jíž v dávné minulosti (Vaněk, 2010), je základním faktorem půdní úrodnosti, stability výnosů a v převážné míře je podmínkou existence velmi bohaté a diversifikované půdní bioty. Půdy dobře zásobené organickou hmotou mají vyšší schopnost vyrovnávat výkyvy počasí, nebo jiných biotických a abiotických faktorů. Vedle agronomického významu půdní organické hmoty se v poslední době zvláště oceňuje její význam pro životní prostředí, a to zejména z hlediska akumulace organického C a jeho sekvestrace do půdy a dále také z hlediska zachování ekologických funkcí půdy (Kubát, 2008).

Cílem nádobového pokusu bylo prokázat vliv přidaných uhlikatých látek (použita drcená celulóza) na aktivitu půdních mikroorganismů a růst rostlin v půdě hnojené vysokou dávkou minerálního dusíku (N). Tůma *et al.* (2010) ve své práci uvádí, že konkurence mikroorganismů o dostupný dusík je velice vysoká po dodání celulózy, která následkem toho může omezovat množství minerálního dusíku v půdním roztoku. Díky vyššímu obsahu uhlikatých organických látek by mikrobiální imobilizace dusíkatých iontů mohla vést ke snížení množství pohyblivých forem dusíku v půdním prostředí (Kintl, 2011).

MATERIÁL A METODIKA

Porušený půdní vzorek byl odebrán v zájmovém území na třech lokalitách Ochranného pásma vodního zdroje (OPVZ II. Stupně) Březová nad Svitavou. Vybrané území je zařazeno do zranitelné oblasti (dle Nitrátové směrnice, prováděcí předpis NV 103/2003 Sb). Na třech vybraných lokalitách byl odebrán reprezentativní vzorek z výměry cca 0,5 ha. Odběr byl prováděn 28. 10. 2011. Na vzduchu vyschlé vzorky půdy byly v laboratoři homogenizovány a přesety přes síto o velikosti ok 2 mm, vznikla tak jemnozem I. Následně byly vzorky preinkubovány při laboratorních podmínkách po dobu 30 dní. Po uplynutí doby preinkubace byla půda promíšena a naplněna do nádob o objemu 0,125 litru. Všechny nádoby byly osazeny modelovou plodinou *Lactuca sativa*. Pro simulaci různé úrovně zásobené živin byla použita močovina - 175 kg čistého dusíku (N) v přepočtu na 1 ha, zdrojem fosforu byl superfosfát - 35 kg/ha čistého fosforu (P) a drcená celulóza v dávce 4664 kg C/ha byla použita jako zdroj uhlikatých látek (C). Byly připraveny tyto varianty pokusu: kontrola bez přísad živin a drcené celulózy, aplikace N + C; N + P + C; C; N; N + P.

Do připravených nádob byla vyseta indikační plodina *Lactuca sativa* a po dobu 36 dní probíhala kultivace ve fytotronu, při konstantní teplotě 22°C. Po ukončení pokusu, byla stanovena suchá hmotnost nadzemní biomasy indikační plodiny .

Pro měření unikajících minerálních forem dusíku byla naplněna plochá válcovitá pouzdra (disky) o vnitřním průměru 70 mm a výšce 5 mm, zhotovená z novoduru a uzavřená z obou stran polyamidovou síťovinou UHELON, smíšenými iontoměniči (katex : anex = 1:1). Používané iontoměniče vyrábí firma PUROLITE (katex – PUROLITE C100E, anex – PUROLITE A520E). Iontoměniče byly třikrát opakovaně kondicionovány v 10% roztoku NaCl a mnohonásobně vymývány v destilované vodě. Disky byly umístěny pod pokusné nádoby takovým způsobem, aby všechna

voda unikající z pokusné nádoby musela protéci přes disk a tím byla zaručena výměna iontů mezi vodou a iontoměnič. Po ukončení pokusu byly disky vysušeny na vzduchu a byla zjištěna jejich hmotnost. Obsah disků byl nasypan do předem připravených polyetylenových lahvíček. Podle hmotnosti ionexů bylo ke směsi přidáno 8-10ml destilované vody. Po přidání destilované vody došlo k nabobtnání ionexů. Následně se obsah lahvíček doplnil na obsah 100 ml 10% roztokem NaCl. Přidaný roztok NaCl způsobil vytěsnění nasorbovaných amonných a nitrátových iontů z nitra ionexů. Uzavřené lahvíčky se nechaly třepat, a po uplynutí doby 45 minut byly tyto vzorky připraveny k analýze.

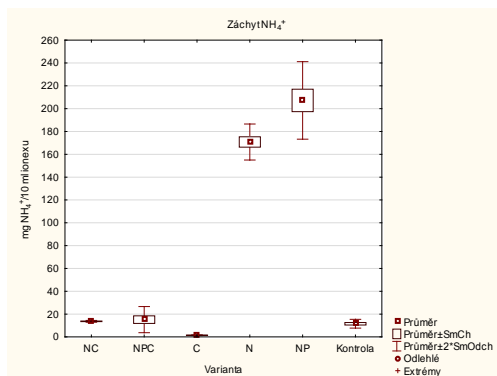
Roztok 10 % NaCl byl použit k resorbci zachycených iontů NH_4^+ a NO_3^- . Amonné ionty byly v extrakčním roztoku stanoveny destilačně titrační metodou v alkalickém prostředí s MgO (Peoples et al., 1989). Pomocí indikátoru s HBO_2 byl amonný dusík jímán a následnou titrací HCl bylo zjištěno množství NH_4^+ . NO_3^- ionty jsou stanoveny stejným způsobem po redukci Devardovou slitinou. Zjištěné hodnoty byly přepočteny na srovnatelné objemové množství katexu a anexu v mg N/10 ml ionexu⁻¹.

Bazální respirace (BR) byla stanovena měřením produkce CO_2 z půdy inkubované v uzavřené lahvi po dobu 24 hodin. Navážka půdy byla 15g do každé 120 ml láhve ve třech opakováních od každé varianty. Láhve byly uzavřeny pryžovou zátkou a inkubovány při 25°C. Po 3 a 24h, bylo 0,5ml vzorku vnitřní atmosféry v láhvi analyzováno plynovou chromatografií (Agilent Technologies 7890A GC Systém, který je vybaven detektorem tepelné vodivosti). Respirace byla vypočtena z nárůstu koncentrace CO_2 ve vnitřním prostoru lahve během 21 h inkubace. Na konci měření, byl stanoven celkový objem lahve pro každé opakování měřením množství vody potřebné k jejímu naplnění. Naměřené množství CO_2 bylo opraveno pro plyny rozpuštěné v kapalně fázi. Výsledky jsou vyjádřeny na gram suché půdy a hodinu.

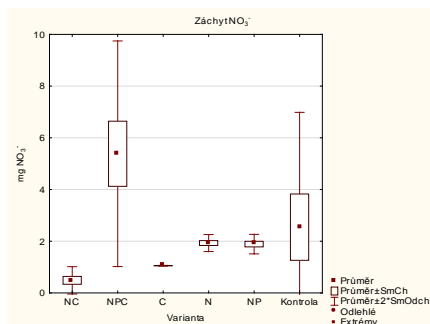
Substrátem indukovaná respirace (SIR) byla stanovena měřením produkce CO_2 z půdy inkubované v lahvích po dobu 3 h po přidání glukózy. Navážka půdy byla (15 g) do každé 120 ml láhve ve třech opakování od každé varianty. K půdní navážce byly přidány 2 ml roztoku glukózy což znamená 4 mg C g⁻¹ sušiny půdy. Láhve byly uzavřeny pryžovou zátkou a inkubovány při 25°C. Po

0 a 3h bylo 0,5 ml vzorku vnitřního prostředí analyzováno pomocí plynové chromatografie (viz předchozí odstavec). SIR byla vypočtena z nárůstu koncentrace CO_2 ve vnitřním prostoru lahve v průběhu 3h inkubace. Na konci měření, byl stanoven celkový objem lahve, jak je popsáno pro měření BR.

VÝSLEDKY A DISKUZE

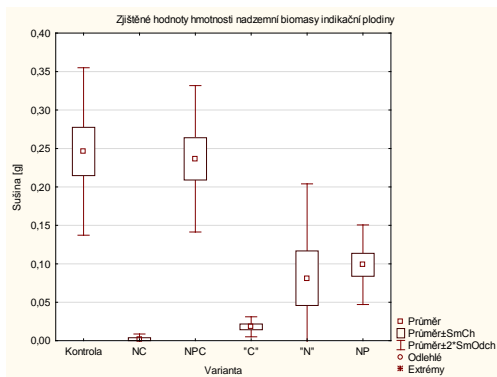
Obr. 1 Záchyt NH_4^+ /10 ml ionexu.

Z obrázku č. 1 je zřejmé, že hnojení významně zvýšilo vyplavování amonných iontů (NH_4^+). Naopak, u všech třech variant s přidáním celulózy (NC, NPC, C) byl záchyt (NH_4^+) na úrovni kontroly. Dostatek uhlíku u těchto variant pravděpodobně umožnil dostatečnou imobilizaci amonného iontů a proto nedocházelo k jeho ztrátám vyplavením.

Obr. 2 Záchyt NO_3^- /10 ml ionexu.

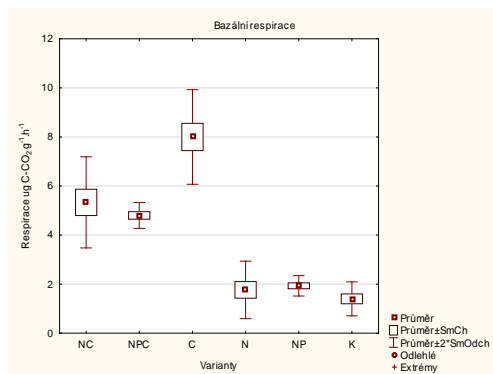
Obrázek č.2 znázorňuje záchyt NO_3^- /10 ml ionexu. Hodnoty záchytu nitrátů jsou až 800 nižší než hodnoty záchytu amonných iontů. Ale i zde je vidět rozdíl v naměřených hodnotách ztrát nitrátů vyplavením při dodání a nedodání uhlíkatých látek.

Obr. 3 Biomasa indikační plodiny v (g).



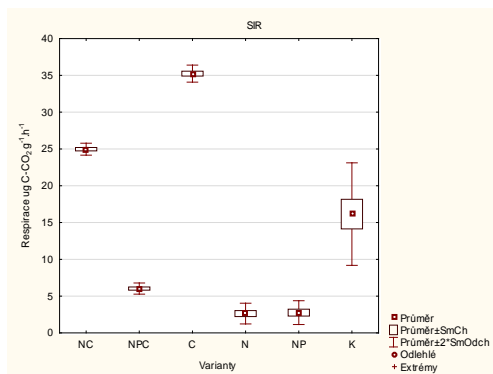
Při vyhodnocování nadzemní biomasy indikační plodiny byly zjištěny významně nižší hodnoty u rostlin hnojených dusíkem, zřejmě v důsledku toxického působení vysoké dávky minerálních hnojiv. Nejmenší nárůst u varianty NC, kde došlo během expozice k uhnutí rostlin. Kontrola a varianta NPC vykazují shodně největší nárůst biomasy. U varianty s přísadkou pouze celulózy byl zjištěn nejmenší nárůst nadzemní biomasy indikační rostliny, který byl pravděpodobně vyvolán konkurencí mikroorganismů v příjmu živin. Kaye 1997, popisuje experimenty naznačující, že rostliny a půdní mikroorganismy, limitované anorganickým dusíkem, a to i na poměrně úrodných stanovištích. V důsledku toho si mohou rostliny a půdní mikroorganismy konkurovat v příjmu dusíku.

Obr. 4 Hodnoty bazální respirace ug C-CO₂g⁻¹.h⁻¹



Statisticky průkazné rozdíly mezi naměřenými hodnotami bazální respirace ve variantách s přidavkem (NC, NPC, C) a bez přidavku uhlíku (N, NP, kontrola) vypovídají o zvýšené aktivitě mikrobiálních společenstev ve variantách s přidavkem celulózy. Mikrobiální aktivita je limitována množstvím dostupného uhlíku. I když je reakce mikrobiálních společenstev na stres (nedostatek některých živin) omezena, fyziologické náklady, které jsou na půdní mikroby kladeny dost velké, že mohou způsobit významné změny v přidělování a osudu C a N (Schimel, 2007).

Obr. 5 Hodnoty substrátem indukované respirace ug $C-CO_2 g^{-1} \cdot h^{-1}$



Substrátem indukovaná respirace potvrzuje závislost mikrobiálních společenstev na dostupnosti uhlíkatých látek, což se odráží na jejich biomase. Varianty NC a C poskytly dostatek uhlíku a mikrobiální biomasa zde byla největší. Výjimku tvoří kombinace živin NPC, kde jsou hodnoty jen o málo větší než u bezuhlíkatých variant N a NP.

Mikrobiální procesy imobilizace a mineralizace jsou odvislé od dostupnosti dusíku v ekosystému, což potvrzuje Záhora (2001). Pokud dusík není limitující živinou převládne mineralizace a dostupné formy dusíku se budou vyskytovat v půdě pro potřeby metabolismu mikroorganismů a umožní jejich zvýšený záchyt. V případě, kdy bude dusík limitující faktorem převládne imobilizace. Ve variantách kdy bylo dodáno dostatečné množství uhlíku (celulózy) bude v půdě poutáno i odpovídající množství dusíku. Dostupný uhlík usnadnil mikroorganismům poutat pohyblivé formy dusíku (NH_4^+) a (NO_3^-) ionty do své biomasy a tím snížil jejich množství sorbované do zrn iontoměničů i při vysoké dávce aplikovaného hnojiva. Tůma et al. (2010) potvrzují, že soupeření mikroorganismů o dostupný dusík je velmi značné po přidání lehce dostupného zdroje uhlíku ve formě celulózy, které následně omezuje rychlost záchytu minerálního dusíku do pastí ionexových zrn. Uhlíkaté látky jsou významným zdrojem energie pro mikrobiální procesy a tím i hnacím motorem půdní mikrobiální aktivity, která je nezbytná pro mikrobiální transformace půdního dusíku (nitrifikace, denitrifikace, biologická fixace dusíku apod).

ZÁVĚR

Z výsledků vyplývá, že vysoké dávky N způsobují jeho vyplavování z půdy a mohou mít i dopady na pěstované plodiny a mikrobiální společenstvo v půdě. Přidávky C mohou tyto negativní jevy spojené s aplikací minerálního N do jisté míry eliminovat. Nicméně, při nadbytku uhlíkatých zdrojů mohou být mikrobiální společenstva významným konkurentem v příjmu živin pro rostliny. Pokud zaručíme dostatečné množství živin (varianta N+P+C), dojde k nárůstu mikrobiální aktivity a zachování vyhovujících podmínek pro růst rostlin.

LITERATURA

Elser, J.J., Sterner, R. W., Galford, A.E., Chrzanowski, T. H., Findlay, D. L., Mills, K.H., Peterson, M.J., Stainton, M.P. and Schindler, D.W (2000): Pelegic C:N:P stoichiometry in a eutrophic lake: response to a whole-lake food-web manipulation. *Ecosystems*, 3: 293-307

Kintl, A., Záhora, J., Tůma, I., 2011: Vliv uhlíku na dostupnost půdního dusíku v aplínské louce - metodický přístup. [CD-ROM]. In MendelNet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference. s. 372--377. ISBN 978-80-7375-563-8.

Kubát, J., Cerhanová, D., Mikanová, O., Šimon, T. (2008): Metodika hodnocení množství a kvality půdní organické hmoty v orných půdách, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha ISBN: 978-80-87011-65-2

Kaye, J. P., Hart S. C., (1997): Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms *Trends in Ecology and Evolution* 12:139–143

Nohel, P., Záhora, J., Mejzlík, L. (2008): Sledování úniku minerálního dusíku z půd různých ekosystémů v OPVZ II. st. Březová nad Svitavou. SOVAK, 7-8: 48-51.

Peoples, M. B., Faizah, A. W., Rerkasen, B., Herridge, D. F., 1989: *Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field*. Aciar Monograph. 11:76. ISBN 978921531569

Schimel, J., Balsler, T. C., Wallenstein, M., (2007): Microbial stress–response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecological Society of America, Ecology*, 88(6), 2007, pp. 1386–1394

Tůma, I., Holub, P., Záhora, J., Fiala, K., (2010): Effect of enhanced nitrogen input on release of nutrients and nutrient availability in stand of tall fern *Athyrium distentifolium*. *Geophysical Research Abstract* [online]. vol. 12, April [cit. EGU 2010–8266]. Dostupný z WWW: <http://geophysical-research-abstracts.net/gra_volume_12.pdf > . eISSN 1607-7962.

Vaňek, V., Kolář, L., Pavlíková, D., (2010): Úloha organické hmoty v půdě. Racionální použití hnojiv - sborník z konference, ISBN 978-80-213-2006-2

Záhora, J., (2001): Dostupnost dusíku v půdě vřesovišť Národního parku. *Thayensia*.

Znojmo, roč. 4, č. 1, s. 169-181. ISSN 1212-3560.

Záhora, J., Nohel, P., KINT, A., (2011): Vyplavování minerálního dusíku z orných, lučních a lesních půd v OPVZ II. st. Březová nad Svitavou. In: *Sborník příspěvků XV. mezinárodní vodohospodářské konference VODA ZLÍN 2011*. Zlín: Voding Hranice a Moravská vodárenská, s. 49-54. ISBN 978-80-254-9113-3.

EVALUATION OF ARANEOCENOSIS OF VINEYARD TERRACES IN INTENSIVELY EXPLOITED LANDSCAPE OF SOUTH MORAVIA (CZECH REPUBLIC)

ZHODNOCENÍ ARANEOFAUNY VINIČNÍCH TERAS V INTENZIVNĚ
VYUŽÍVANÉ KRAJINĚ JIŽNÍ MORAVY (ČESKÁ REPUBLIKA)

Košulič O., Hula V.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: ondra.kosulic@seznam.cz

ABSTRACT

This study deals with the assessment of spiders diversity, abundance and environment factors which affect spiders of the vineyard terraces at the most. Among main factors that are analyzed belong management system, environment heterogeneity and microbiotop features. There had been chosen 4 localities situated in the pannonian region of southern Moravia (Czech Republic). Examined vineyards are under integrated pest management, one of the vineyards is under organic farming. Spiders are being collected by three methods – pitfall traps, collecting of land snail shells, and day and night sweeping. We found 171 species belonging to 24 families. 25 species listed on the Red List of Invertebrates of the Czech Republic were recorded (CR, EN, VU categories). To the interesting finding belongs record of the steppe habitat bioindicator *Eresus kollari* Rossi, 1846 on the vineyard terraces in the Mutěnice (Hodonín region). The evaluation of environment factors shows that the presence of the spiders is affected by the microclimatic conditions first of all (vegetation structure, presence of the disturbed grass turf. We found significant effect of heterogeneity environment and presence of mosaic landscape structure which is a very important for spreading and distribution of spiders. In this study we found that artificial habitats such as vineyard terraces, the importance of which was found out, are certain to be the perfect habitats for a wide spectrum of xerothermic spider species of the Czech Republic.

Key words: spiders, Araneae, agroecosystems, vineyard terraces, landscape structure, south Moravia

Acknowledgments: Authors would like to thank dr. Milan Řezáč (Prague), dr. Bryja (Brno) and Mgr. Jan Dolanský (Pardubice) for helping in the determination of taxonomically difficult group of spiders. This study has been supported by grant IGA MENDELU Brno no. IP3/2012 and no. TP4/2012.

ÚVOD

Krajina jižní Moravy je charakteristická díky výrazně silné zemědělské intenzifikace s mizejícím počtem xerothermních otevřených biotopů a roztráštěnými lesními porosty. Mimo lesy se jedná o charakteristickou agrární krajinu s největší rozlohou vinic u nás. V druhém přelomu 20. století byla velká část xerothermních svahů a lučních biotopů zterasována pro produkci révy vinné. Bezsporu to byl velmi negativní zásah do ekosystému a celkového krajinného rázu. Ale díky působení času a zbrzdění sukcese díky svažitosti těchto teras je možné na některých terasách zjistit unikátní druhy xerothermních druhů pavouků (Košulič & Hula, 2011; Hula et al., 2009). O rozšíření a ekologii pavouků v České republice máme relativně dobré znalosti (Buchar & Růžička, 2002; Růžička & Buchar, 2008). Bohužel naše agrární biotopy byly arachnology celkově spíše opomíjeny. Existuje několik málo prací z řepných polí (Miller, 1974), slunečnicových polí (Pekár, 2005) a jablečných sadů (Pekár et al., 1997; Pekár & Kocourek, 2004). O výskytu pavouků ve vinicích, ač se jedná o velmi charakteristický biotop, neexistuje v České republice v podstatě žádná publikace. O jiných skupinách bezobratlých (především motýli a brouci) přinášejí dílčí výsledky práce Hluchého (2008), v zahraničí nalezneme publikací více. Ze Slovenska to je např. výzkum epigeické fauny pavouků ve viničné oblasti Svätý Jur (Gajdoš & Dankaninová, 2010). Několik zahraničních publikací je věnováno výzkumu využití pavouků jako biologické ochrany vinic před hmyzími škůdci, např. (Chatterjee et al., 2008; Hoffmann & Thomson, 2009) a způsobu šíření pavouků v zemědělské krajině s osidlováním viničních biotopů (Isaia et al., 2006).

MATERIÁL A METODIKA

Výzkumné plochy

Výzkum byl proveden na 4 lokalitách jižní Moravy. Byly vybrány viniční terasy v okolí Popic, Mikulova, Morkůvek a Mutěnic. Hospodaření ve vinicích je v rámci integrované produkce révy vinné, pouze na lokalitě u Popic se hospodaří dle pravidel ekologického hospodaření, které zamezuje využívání veškerých syntetických pesticidů. Jednotlivé lokality se dále lišily v mozaice krajinné struktury, která obklopovala viniční terasy (především přítomnost otevřených xerothermních biotopů). Na každé lokalitě byly vybrány 4 výzkumné plochy na celkem dvou svazích viničních teras. Pro posouzení významnosti mikrohabitatových podmínek byla plocha 1 a 3 charakteristická rozvolněnou a nízkou vegetační strukturou s množstvím obnažených plošek půdního substrátu. Plocha 2 a 4 byla typická silnější vegetační strukturou, zapojeným travním drnem, na několika místech byl silný negativní tlak šíření kustovnice cizí, lékořice sivé a jiných bylinných a keřových porostů, které na těchto místech zarůstaly svahy teras.

Sběr a vyhodnocení materiálu

Sběr pavouků probíhal pomocí metody formalinových zemních pastí zachycující především epigeickou složku arachnofauny, mezi kterou patří většina ochránářsky významných druhů. Na každé línii byly umístěny 3 pasti a to ve středu svahu terasy a na spodní a vrchní patě svahu. Dále byly provedeny smyky bylinné vegetace (denní i noční) a netradiční metoda sběru prázdných ulit suchozemských plžů pro zjištění druhů, které využívají tyto ulity pro přezimování. Materiál pavouků byl determinován do druhů pomocí arachnologické literatury (Heimer & Nentwig 1991; Roberts 1995) a dále vyhodnocen na základě druhové diverzity, abundance, přítomnosti vzácných a xerothermních druhů. Hlavním cílem bylo identifikovat převažující faktor, který ovlivňuje přítomnost pavouků na terasách a na základě toho posoudit významnost viničních teras coby refugij v intenzivně využívané krajině jižní Moravy.

VÝSLEDKY A DISKUZE

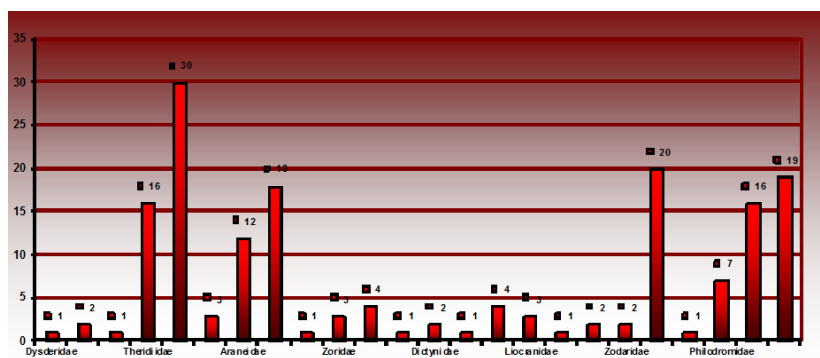
Diverzita a početnost

Celkem bylo determinováno 6020 dospělých jedinců pavouků náležících do 171 druhů, které patří do 24 čeledí (graf 1). Nejvyšší druhové zastoupení bylo zjištěno u čeledi Linyphiidae (30 druhů) a Gnaphosidae (20 druhů). Celkový počet 171 druhů vytváří téměř 20% všech druhů pavouků vyskytujících se na území České republiky a 32% druhů žijících na jižní Moravě (Buchar & Růžička, 2002; Bryja et al., 2005). Mezi nejpočetnější druhy zjištěného materiálu patří všeobecně rozšířené ruderální druhy *Trochosa terricola* Thorell, 1856 a *Pardosa agrestis* (Westring, 1861). Dále zde patří i vzácné xerothermní druhy otevřených biotopů *Thanatus arenarius* L. Koch 1872 a *Zelotes longipes* L. Koch (graf 2). Poměrně hojně byly nalézány i vzácnější druhy *Zelotes pygmaeus* Miller 1943 and *Haplodrassus dalmatensis* (L. Koch 1866), kteří byli zjištěni na každé zkoumané lokalitě. Nejvyšší druhová diverzita a procentuální zastoupení vzácných druhů bylo zjištěno na viničních terasách u Mikulova, kde byl zároveň zjištěn i nejvyšší počet vzácných druhů dle Červeného seznamu (Růžička, 2005). Nejvyšší abundance pavouků byla zjištěna na viničních terasách v Popicích, kde bylo ovšem nejnižší procentuální zastoupení množství jedinců vzácných druhů. Přehled zjištěných indexů diverzity, ekvitability a procentuálního zastoupení množství jedinců vzácných druhů na jednotlivých zkoumaných lokalitách je zobrazeno v tab. 1.

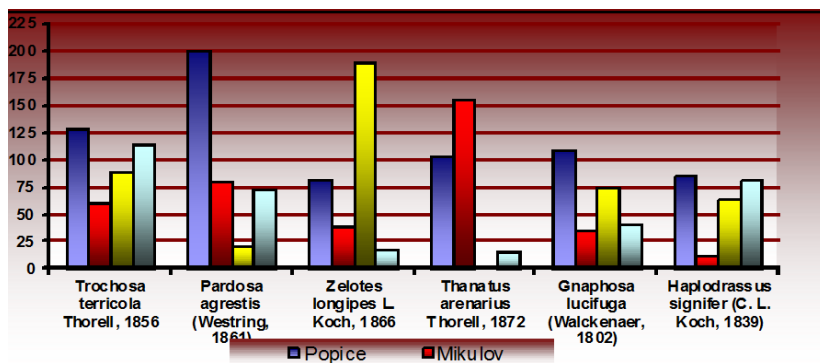
Tab 1: Souhrný přehled ekologických ukazatelů druhové diverzity zkoumaných lokalit

Locality	Species number	Total abundance	Diversity index	Equitability index	Rare species (%)
Popice	120	1889	3,8	0,79	20,5
Mikulov	126	1406	4,2	0,87	54,3
Morkůvky	106	1248	3,7	0,79	24,8
Mutěnice	119	1476	3,8	0,80	30,1

Graf 1: Zjištěné čeledi pavouků s počtem druhů



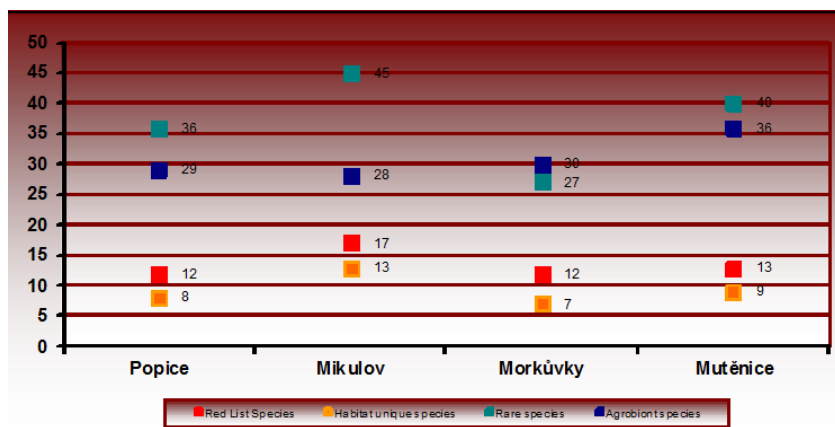
Graf 2: Nejpočetnější zástupci pavouků na jednotlivých lokalitách



Zjištěné vzácné druhy pavouků

Na zkoumaných biotopech bylo zjištěno celkem 25 druhů pavouků evidovaných v Červeném seznamu ohrožených živočichů České republiky (Růžička, 2005). Mezi nejvýznamější nálezy patří kriticky ohrožené xerothermní druhy *Dysdera hungarica* Kulczyński 1897, *Tibellus macellus* Simon 1875 a *Cheiracanthium pennyi* O. P.-Cambridge 1873. Poslední zmíněný druh vytvářel dokonce subdominantní část materiálu na lokalitě v Mutěnicích, kde byl velmi hojný především na ploše 1. U tohoto druhu byla také zjištěna významná vazba na prázdné ulity suchomilek (*Hellicela* sp.), které využívá pro přezimování. Na stejné lokalitě byl nalezen i ohrožený (EN) druh vzácné skálovky *Haplodrassus minor* (O. P.-Cambridge 1879), která je známa pouze z 5 lokalit v České republice v několika jedincích (Buchar & Růžička, 2005). Na viničních terasách v Mutěnicích bylo zjištěno 13 dospělých jedinců na všech liniích. Tento druh nebyl zjištěn na žádné jiné zkoumané lokalitě. Mezi další významné nálezy patří *Alopecosa solitaria* (Hermann, 1877), *Euryopis sauvea* Levi, 1951, *Diplocephalus coracina* (C. L. Koch, 1837), *Euryopis laeta* (Westring, 1861), *Micaria dives* (Lucas, 1846), *Synageles hilarulus* (C. L. Koch, 1846), *Heriades mellotei* (Simon, 1886), *Styloctetor romanus* (O.P.-Cambridge, 1872) a další vzácné teplomilné druhy pavouků. Všechny tyto druhy jsou známy z maximálně 8-10 faunistických čtvrců a jsou výrazně vázány na teplé oblasti České republiky. V porovnání jednotlivých lokalit byl zjištěn nejvyšší počet vzácných a xerothermních druhů na viničních u Mikulova, nejméně na viničních u Morkůvek, kde převažoval počet typických agrobiontů (hojných druhů typických pro agroekosystémy). Na lokalitě u Mikulova byl také zjištěn nejvyšší počet habitatově unikátních druhů, které byly zjištěny pouze na jedné zkoumané lokalitě. Porovnání jednotlivých lokalit je zobrazeno v grafu č. 3.

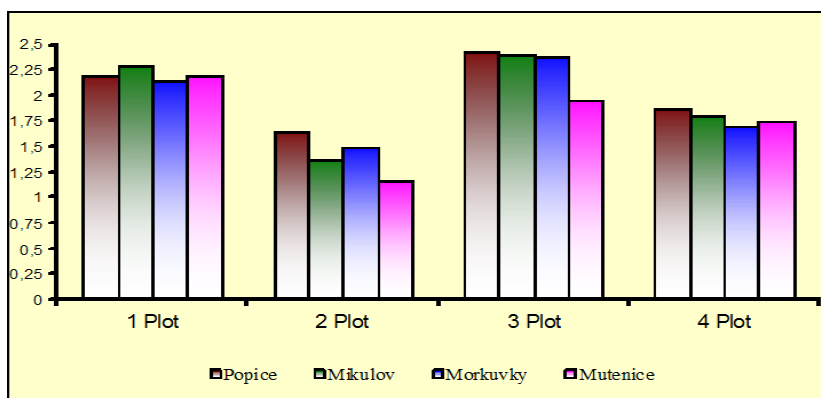
Graf 3: Porovnání jednotlivých lokalit: vzácné druhy s kategorií ochrany, habitatově unikátní druhy, vzácné xerothermní druhy, agrobiotní druhy



Vliv environmentálních faktorů

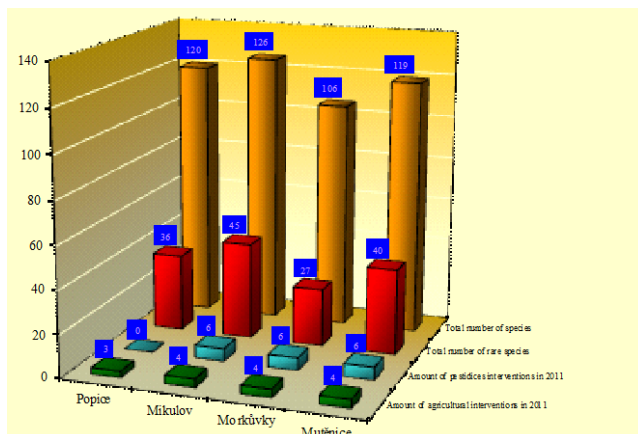
Z předběžných výsledků bylo zjištěno, že výskyt pavouků byl ovlivněn především mikrohabitatovými podmínkami biotopu – vegetační strukturou, intenzitou růstu, přítomností obnažených plošek půdního substrátu. Na výzkumných plochách 2 a 4, které jsou typické hustou vegetační strukturou, druhová diverzita klesala a na těchto místech převažovaly hojně a euryvalentní druhy pavouků. Vzácné druhy zde byly zjištěny v menší míře. Index diverzity vždy stoupal na plochách 1 a 3 každé zkoumané lokality (graf č. 4).

Graf 4: Shannon Wienerův index diverzity jednotlivých ploch na každé lokalitě

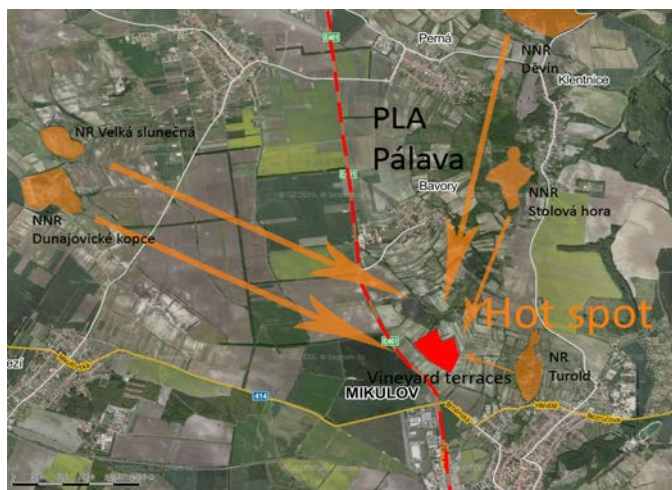


V porovnání jednotlivých typů hospodaření nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi IPM a ekologickým hospodaření. Viniční terasy Popice (ekologické hospodaření) nevykazovala pozitivní korelaci v množství druhů a přítomnosti vzácných xerothermních druhů v porovnání s plochami pod integrovaným hospodařením (graf č. 5). Velmi významným prvkem, který ovlivňoval druhovou diverzitu pavouků byl zjištěn vliv heterogenity prostředí. Na příkladu viničních teras u Mikulova je vyobrazena mozaika krajiny na obrázku č.1, kde je zřetelné množství otevřených xerothermních biotopů (okolí CHKO Pálavy a PR Dunajovických kopců), které jsou velmi významné pro přežívání a šíření xerothermních druhů pavouků. Na studované ploše u Mikulova byl zjištěn nejvýraznější komplex xerothermních pavouků – vzácných druhů a druhů zjištěných pouze na dané lokalitě výskytu. Je zřetelné, že tyto druhy se dokáží šířit z původních stepních habitatů a vytvářet populace na umělém agroekosystému vinic. Naopak na lokalitě Morkůvky, která vytváří izolovanou plochu v homogenní krajíně (bez přítomnosti otevřených biotopů) okolí Klobouk u Brna, byla zjištěna výrazně nejnižší druhová diverzita a nízký počet vzácných reliktních druhů (obr. č. 2) s převahou běžných druhů pavouků. Stejně výsledky jsou publikovány i Isaiou et al. (2006) z prostředí italských vinic. Pro zjištění vlivu heterogenity prostředí a matrixu krajiny je potřeba vytvořit model pro posouzení a šíření druhů v krajíně a jejich osídlování viničních teras.

Graf 4: Druhová diverzita a množství vzácných druhů v porovnání s pesticidními a agrotechnickými zákroky na každé sledované lokalitě



Obr.1: Letecký snímek krajinné mozaiky v okolí lokality u Mikulova



Obr.2: Letecký snímek krajinné mozaiky v okolí lokality u Morkůvek (červeně vyznačena výzkumná plocha)



ZÁVĚR

Z předběžných analýz jsme zjistili, že viniční terasy dokážou při působení a zachování určitých faktorů fungovat jako významné refugium pro xerothermní druhy pavouků v jinak unifikované zemědělské krajině jižní Moravy. Důležitým faktorem jsou mikrohabitatové podmínky na svazích teras. Tyto podmínky jsou vytvářeny vegetační strukturou, která má zásadní vliv na prostupující světlo, vlhkost a teplotu mikroklimatu., což jsou důležité prvky pro výskyt xerothermních druhů pavouků. V rozdílu hospodaření na jednotlivých terasách nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Naopak velmi významným prvkem je heterogenita prostředí a přítomnost xerothermních biotopů v krajině odkud se mohou druhy šířit a na viničních terasách vytvářet životaschopné populace. Viniční terasy jsou významným krajinným prvkem a výrazně zvyšují biodiverzitu v zemědělské krajině jižní Moravy.

LITERATURA

Bryja, V. et al. 2005. Spiders (Araneae) of the Lower Morava Biosphere Reserve and closely adjacent localities (Czech Republic). *Acta Musei Moraviae, Scientiae Biologicae*, vol. 90, p. 13-184.

Buchar, J. & Růžička, V. 2002. Catalogue of Spiders of the Czech Republic. *Peres*, Praha, p. 351.

Gajdoš, P. & Dankaninová L. 2010: Epigeické pavuky ve vazbe na vinohradnické historické krajinné struktury (modelové území Svatý Jur) In *Mezinárodní vědecká konference doktorandov, mladých vědeckých a pedagogických pracovníkov*. Nitra: Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University, p. 201-209.

- Heimer S. & Nentwig W. 1991: *Spinnen Mitteleuropas: ein Bestimmungsbuch*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 544 pp.
- Hluchý M., 2008: Biodiverzita vinic 2008-2010 - denní motýli. Dostupné online: <http://www.biocont.cz/PDF%20download/motyli.pdf>
- Hoffmann, A. & Thomson, L. 2009. Vegetation increases the abundance of natural enemies in vineyards. *Biological Control*, vol. 49, no. 3, p. 259-269.
- Hula V., Niedobová J., Košulič O. 2009: Overwintering of spiders in land-snail shells in South Moravia (Czech Republic). *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* 94 (1): 1–12.
- Chatterjee, S. et al. 2008. Spiders as biological controllers in the agroecosystem. *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 258, no. 3, p. 352-362.
- Issaia M. et al., 2006: Influence of Landscape Diversity and Agricultural Practices on Spider Assemblage in Italian Vineyards of Langa Astigiana (Northwest Italy). *Environmental Entomology*, 35(2):297-307.
- Košulič O. & Hula V., 2011: Spiders of vineyard terraces in northern part of Pannonian region (South Moravia, Czech Republic) - a preliminary results. In *26th ECA European Congress of Arachnology Israel, 3-8 September 2011 - Book of Abstracts*. 1. vyd. Ben-Gurion University of the Negev, 2011, s. 135.
- Miller F., 1974: Pavoučí fauna řepných polí v okolí Chválkovic a Nákla na Hané. *Acta UPO, Fac. rer. nat., Biologica* 15, Supplementum: 175-181
- Pekár S., 2005: Horizontal and vertical distribution of spiders (Araneae) in sunflowers. *Journal of Arachnology* 33: 197-204
- Pekár S. & Kocourek F., 2004: Spiders (Araneae) in the biological and integrated pest management of apple in the Czech Republic. *Journal of Applied Entomology* 128: 561-566
- Roberts M. 1995: *Spiders of Britain & Northern Europe*. Harper Collins Publishers, London, 383 pp.
- Růžička, V. 2005: Araneae (pavouci). Pp. 76–82. In: Farkač, J. et al. (eds): *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, p. 760.
- Růžička V. & Buchar J. 2008: Dodatek ke katalogu pavouků České republiky 2001–2007. (Supplement to the Catalogue of Spiders of the Czech Republic 2001–2007). *Sborník Oblastního muzea v Mostě, Řada přírodovědná* 29-30: 3–32 (in English and Czech).

SPECTRAL ANALYSIS OF DEFLAMETRIC RECORDS OCCASIONED DURING THE PERIODS OF THE EROSIVELY DANGEROUS WINDS

SPEKTRÁLNÍ ANALÝZA DEFLAMETRICKÝCH ZÁZNAMŮ Z OBDOBÍ VÝSKYTU EROZNĚ NEBEZPEČNÝCH VĚTRŮ

Krmelová P., Toman F., Středová H.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel university in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: krmelovapavlina@centrum.cz

ABSTRACT

Deflameter with active trap soil particles and time recording allows monitor the qualitative and quantitative properties including time recording of macroscopic and microscopic soil particles, carried by the wind. The term of the particle transport was designated by deflameter. Also the number of soil particles was possibly to quantify and determine the size of it. The deflameter and anemometer was located at the field. Between 5:52 p.m. to 6:40 p.m. the episode with gusts up to $11.24 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ was recorded, accompanied by obvious signs of soil particles drift. These drifted soil particles were captured by deflameter. Then the soil particles parameters were assessed by a digital microscope and special software to measure the size of objects. The maximum reported size of transported particles under these conditions was $559 \mu\text{m}$, average particle size was $50 \mu\text{m}$. Thus, it was confirmed that a high wind speed has the ability drift soil particles sizes of $50 \mu\text{m}$ or more under appropriate conditions.

Key words: deflameter, wind erosion, wind speed

Acknowledgments: This work was prepared with the support from the Excellence Ph.D. studies at the AF MENDELU for related European scientific research career (CZ.1.07/2.3.00/20.0005). I also thank for help the Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine at the AF MENDELU.

ÚVOD

Práce se zabývá analýzou vzorků, které byly odebrány v době výskytu erozně nebezpečných větrů. Eroze půdy je přirozený proces v krajině. Eroze jako taková ochuzuje půdy o nejúrodnější část (ornici), zhoršuje fyzikálně-chemické vlastnosti půd, zmenšuje mocnost půdního profilu, zvyšuje šterkovitost, snižuje obsah živin a humusu, poškozují plodiny a kultury, znesnadňuje pohyb strojů po pozemcích a způsobuje ztráty osiv a sadby, hnojiv a přípravků na ochranu rostlin. Avšak bez erozní činnosti by nevznikla současná zemědělská půda. Problémem současné zemědělské krajiny je tzv. nadměrná (zrychlená) eroze zemědělské půdy, kdy dochází k odnosu povrchových vrstev půdy rychlostí vyšší než rychlost přirozené tvorby půdy z půdotvorného substrátu.

Větrná eroze je přírodní jev, kdy vítr působí na půdní povrch svou mechanickou silou, rozrušuje půdu a uvolňuje půdní částice, které uvádí do pohybu a přenáší je na různou vzdálenost, kde se po snížení rychlosti větru ukládají. Pohyb půdních částic při větrné erozi může probíhat ve třech formách. První z nich je pohyb nejjemnějších půdních částic ve formě suspenze, které jsou větrem zvedány a přenášeny na velké vzdálenosti (tím vznikají prašné bouře). Druhou formou je pohyb půdních částic skokem, při němž dochází k přemísťování největšího množství půdní hmoty. K této první a druhé fázi dochází působením turbulentního proudění přízemního větru s energií, jež je schopna překonat gravitační síly půdních částic. Poslední formou pohybu půdních částic při větrné erozi je sunutí částic po povrchu půdy, kterým se pohybují větší a těžší částice. Tato fáze nastává při poklesu energie pod uvedenou mez.

Větrná eroze je jedna z mnoha příčin vážného ohrožení produkční i mimoprodukční funkce zemědělských půd. Transportované částice, které jsou větrem unášeny, a na ně vázané látky způsobují především poškozování klíčících rostlin, znečišťování ovzduší a škody navátím ornice.

Na vzniku větrné eroze mají vliv dva základní faktory. Prvním je faktor meteorologický, především rychlost větru, doba jeho trvání a četnost výskytu. K pohybu půdních částic stačí někdy i malé rychlosti větru. Druhým důležitým faktorem je struktura a vlhkost půdy. Větrnou erozi můžeme zaznamenat především v sušších a teplejších klimatických oblastech s lehkými půdami. Jaro (březen až květen) a podzim (září až listopad) jsou období s nejvýznamnější ohrožeností půd větrnou erozí. Vyskytují se totiž erozně nebezpečné větry a půda je bez vegetačního krytu.

Vítr je tedy nejdůležitější klimatický faktor pro rozvoj procesů větrné eroze. Působí na povrch půdy svou kinetickou energií, kterou uvolňuje a uvádí do pohybu a jinde opět ukládá jednotlivé částice půdy vlivem síly vzdušného proudu. Množství a zejména rovnoměrné rozdělení atmosférických srážek má příznivý nepřímý efekt na snížení velikosti větrné eroze zajištěním vláhy pro dobrý stav vegetačního krytu a udržení půdní vlhkosti. Teplota vzduchu je společně se srážkami hlavním

faktorem určujícím klimatický ráz oblasti. Teplota ovzduší tak ovlivňuje vlhkost půdy, kvalitu a vývojové fáze pěstovaných plodin a v kombinaci se srážkami pak ovlivňuje erodovatelnost půdy větrem (DUFKOVÁ, ROŽNOVSKÝ, POKLADNIKOVA, 2005).

Trendy rychlostí větru klimatologických stanic na území jižní Moravy v normálovém období a v posledním desetiletí se zabývá práce DUFKOVÉ, ROŽNOVSKÉHO a POKLADNIKOVÉ (2005). Tato práce poukazuje i na to, že v celkovém hodnocení se rychlost větru v budoucnu nezmění, avšak výrazné jsou (ať již pozorované, či scénářem predikované) změny v ročním chodu srážek. A právě tyto změny by mohly mít zásadní negativní vliv na ohroženost půdy větrnou erozí, především v jarním období, kdy by se úhrn srážek měl snižovat.

Cílem práce DUFKOVÉ a TOMANA (2004) bylo stanovit trend výskytu sucha v oblasti jižní Moravy a jeho vliv na erozi půdy. Práce dokládá, že klimatická změna, projevující se snížením vlhkosti půdy, bude mít nepříznivý dopad na půdu a bude znamenat rozšíření větrné eroze.

I dle práce TOMANA (2001) je možné, že očekávaná klimatická změna (zejména zvýšení teploty) by mohla způsobit změnu intenzity využívání půdního fondu a zároveň i ovlivnění erozního ohrožení území. Změna intenzity obdělávání by se nejvíce projevila na velikosti pozemků a jejich polohového a tvarového uspořádání. Obecně lze konstatovat, že čím nižší je vlhkost půdy, tím větší je její náchylnost k větrné erozi. Je tedy zřejmé, že dopad očekávané klimatické změny se projeví na výrazném rozšíření půd ohrožených větrnou erozí.

Tab. 1 uvádí potenciální ohrožení orné půdy dle databáze LPIS větrnou erozí (zdroj: VÚMOP – SOWAC). Zde je vidět, že více jak 3 % orné půdy České republiky je na stupnici ohrožení půd nejvíce ohroženo větrnou erozí.

Tab. 1 Potenciální ohroženost orné půdy větrnou erozí (výpočet je vztážen k databázi LPIS ze dne 15.4.2010)

STUPEŇ OHROŽENÍ	PODÍL (%)
Nejohroženější	3,15
Silně ohrožené	1,80
Ohrožené	5,77
Mírně ohrožené	7,34
Náchylné	7,02

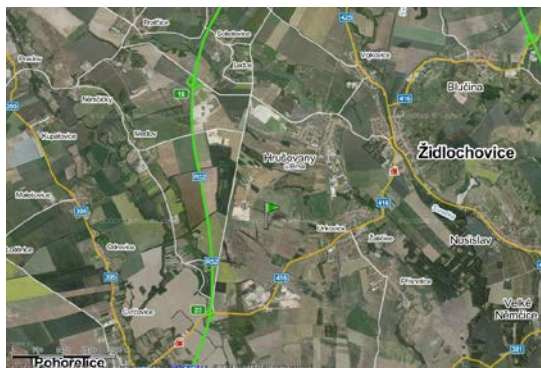
Grafické záznamy ohroženosti orné půdy ČR je vidět na obr. 1. Tmavá barva značí nejvyšší ohrožení orné půdy větrnou erozí. Je patrné, že nejohroženější orné půdy se vyskytují na jižní Moravě, v Polabí a Ústeckém kraji. PASÁK (1984) uvádí, že větrnou erozí je u nás ohroženo téměř 29 % zemědělské půdy, přičemž na Moravě je to asi 40 % a v Čechách 23 % zemědělské půdy.

Obr. 1 Ohroženost orné půdy ČR větrnou erozí (zdroj: <http://ms.sowac-gis.cz/mapserv/php/maps.php>)



MATERIÁL A METODIKA

Z důvodu postrádání jednoduchého a efektivního zařízení pro měření aktuálního množství unášených půdních částic, byl terénní monitoring větrné eroze v minulosti prováděn pouze ojediněle. Tím bylo ohrožení území větrnou erozí kvantifikováno pouze jako potenciální riziko prostřednictvím výpočtů nebo simulování polních podmínek pomocí aerodynamického tunelu. Z tohoto podnětu byl v roce 2012 zapsán užitečný vzor deflametru s aktivním lapačem půdních částic a časovým záznamem. Majiteli užitečného vzoru jsou ČHMÚ, Praha – Komořany a VÚMOP, Praha. Původci jsou Ing. Hana Středová, Ph.D., Ing. Jana Podhrázká, Ph.D. a Ing. Tomáš, Středa, Ph.D. Tento deflametr s aktivním lapačem půdních částic a časovým záznamem („deflametr“) byl vyvinut ke stanovení relativního množství a zrnitostního složení půdních částic erodovaných a unášených větrem. Záznamy analyzované v této práci jsou pořízeny tímto deflametrem. Hlavice přístroje nese nasávací štěrbinu, která byla situována proti směru větru. V trupu deflametru je otáčecí zařízení a páska se svrchní lepicí vrstvou. Pomocí aktivního nasávání vzduchu se na otáčející lepicí pásku zachytily půdní částice erodované větrem.

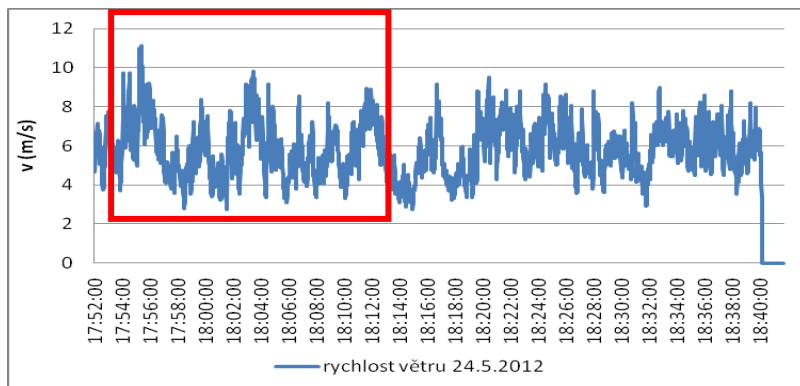
Obr. 2 Mapa s vyznačenou lokalitou (zdroj <http://mapy.cz>)

Lokalita, na které bylo měření prováděno, se nachází v Jihomoravském kraji, západně od Židlochovic, jižně od Hrušovan u Brna. Toto území lze dle Quittova členění klimatických oblastí (1971) zařadit do teplé klimatické oblasti T4, což je oblast s velmi dlouhým vegetačním obdobím, kdy hlavní vegetační období trvá 170 až 180 dní. Léto je velmi dlouhé, velmi teplé a suché, přechodné období s teplým jarem a podzimem je velmi krátké, zima je krátká, mírně teplá a velmi suchá. Letních dní je 30-40, mrazových dní 100-110, průměrná teplota v červenci je 19-20 °C a v lednu -2 až -3°C. Dnů se sněhovou pokrývkou je zde průměrně 40-50. Srážkové úhrny za vegetační období se pohybují mezi 300 a 350 mm a v zimním období v rozmezí 200-300 mm. Půdním typem zde je (dle mapového podkladu <http://geoportal.gov.cz>) regozem arenická. Měření proběhlo na orné půdě dne 24.5.2012. V období, kdy byla půda ohrožena větrnou erozí nejvíce, tj. mimo hlavní vegetační období polních plodin (půda ještě nebyla zcela kryta vegetací). Měření proběhlo po dobu 2 hodin. Následně proběhla analýza záznamů pomocí mikroskopu OLYMPUS CX 41. Obraz byl zachycen digitální kamerou Lumera INFINITY 1-3C a velikost půdních částic byla vyhodnocena za pomoci programu QUICKphoto Micro 2.3. V kombinaci s meteorologickým měřením rychlosti větru (anemometr registrující rychlost větru v jednosekundové frekvenci), bylo možno specifikovat podmínky v době epizody.

VÝSLEDKY A DISKUZE

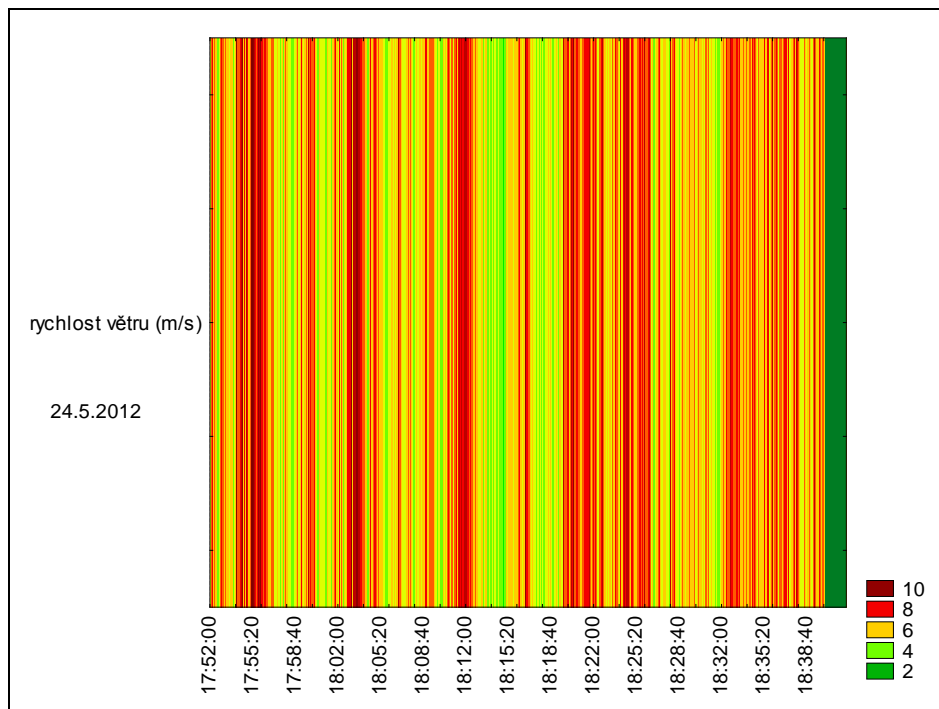
Na obr. 3 je znázorněn graf rychlosti větru zaznamenaný anemometrem při pokusu v době od 17:52 – 18:40. Analyzované období deflametrických záznamů bylo v rozmezí 17:53 až 18:13, které je na grafu vyznačeno červeným ohraničením.

Obr. 3 Graf rychlosti větru s červeně vyznačeným analyzovaným obdobím (17:53 – 18:13)



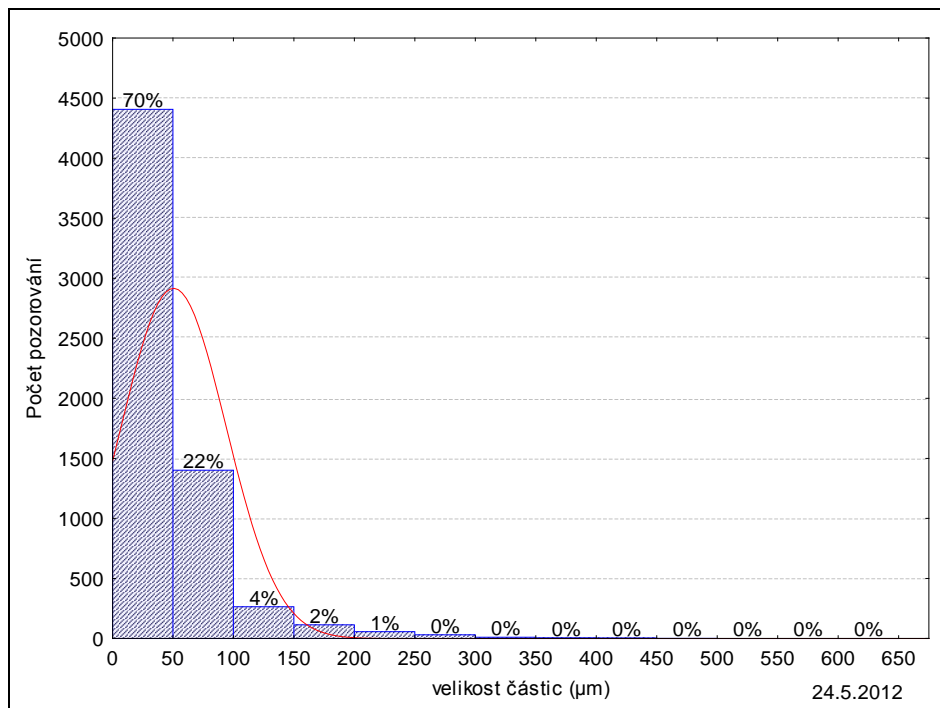
Nejvyšší náráz větru byl naměřen v 17:55, kdy maximální rychlost větru dosahovala $11,24 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Hodnot nad $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ bylo v této době naměřeno devět krát (obr. 4). Vysoká rychlost větru byla provázena zřejmými projevy vznosu půdních částic. Největší naměřená částice analyzovaná v této době dosahovala rozměru $559 \mu\text{m}$. Průměrná rychlost za celé zkoumané měření byla $5,62 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Obr. 4 Znáznornění rychlosti větru s tmavě hnědě vyznačeným obdobím výskytu rychlosti větru nad 10 m.s-1



Celkové množství částic naměřené pomocí software bylo 3152. Kdy průměrná velikost částice byla 50 μm . Nejmenší rozměr částice byl 2 μm a největší 559 μm . Dle obr. 5, který znázorňuje histogram četností velikostního složení, má 70 % analyzovaných půdních částic velikost do 50 μm a 22 % půdních částic má velikost v rozmezí 50 – 100 μm .

Obr. 5 Spektrum půdních částic zachycených deflametrem vyjádřený histogramem



ZÁVĚR

Deflametr s aktivním lapačem půdních částic a časovým záznamem umožňuje monitorovat kvalitativní i kvantitativní vlastnosti včetně časového záznamu výskytu makroskopických i mikroskopických půdních částic unášených větrem. Bylo jej využito pro přímé měření v terénu v rámci práce, která vyžadovala údaje o množství a spektrálním složení unášených částic. Díky deflametru byl určen termín transportu částic, množství částic bylo možno kvantifikovat a stanovit velikost deflátů. Lokalita (pole) se v době měření nacházela bez zapojené vegetace. Byl zde umístěn zmiňovaný deflametr a anemometr, registrující rychlost větru v jednosekundové frekvenci. V období od 17:52 do 18:40 byla zaznamenána epizoda s nárazy větru až $11,24 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, provázená zřejmými projevy vzhonu půdních částic. Unášené půdní částice byly během výrazné epizody mezi 17:53 až 18:13 zachyceny deflametrem. Jejich parametry byly následně hodnoceny metodou digitální analýzy obrazu pomocí digitálního mikroskopu a software pro měření velikosti objektů. Maximální zjištěná velikost transportované částice za těchto podmínek byla $559 \text{ }\mu\text{m}$, průměrná velikost částic $50 \text{ }\mu\text{m}$. Bylo tedy potvrzeno, že vysoká rychlost větru má za vhodných podmínek (povrch bez zapojené vegetace, nepřítomnost překážek, bezesrážkové období apod.) schopnost unášet půdní částice o

velikostech 50 μm a více. Do budoucna je plánované pokračování v měření v terénu a další analyzování půdních částic zachycených deflametrem. Důležité bude sledovat předpověď povětrnostních podmínek, které budou z hlediska nebezpečí větrné eroze nejvhodnější.

LITERATURA

DOSTÁL, T., KRÁSA, J., VÁŠKA, J., VRÁNA, K.: Mapa erozního ohrožení půd a transportu sedimentu v České republice. In: Vodní hospodářství. 2002, roč. 52, č. 2, s. 46-48. ISSN 1211-0760.

DUFKOVÁ, J., ROŽNOVSKÝ, J., POKLADNIKOVÁ, H.: Aplikace scénářů změny klimatu na meteorologické prvky ovlivňující větrnou erozi, In: *Meteorologické zprávy: Meteorological Bulletin*. Praha: Český hydrometeorologický ústav. 2005, ročník 58, č. 2, str. 47 - 50.

DUFKOVÁ, J., TOMAN, F.: Eroze půdy v podmínkách klimatické změny. In: Rožnovský, J., Litschmann, T. (ed): Seminář „Extrémny počasí a podnebí“. Brno 11.3.2004. ISBN 80-7157-723-5.

HLAVÁČKOVÁ, V.: Sborník ze semináře: *Eroze půdy a protierozní ochrana půdy*. 1. vyd. Praha 1: Institut vzdělávání v zemědělství o.p.s., 2011. ISBN 978-80-87262-11-5.

HOLÝ, M.: *Eroze a životní prostředí*, Vydavatelství ČVUT, Praha. 1994. 383 s.

JANEČEK, M. a kol.: *Ochrana zemědělské půdy před erozí: metodika*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, 2007, 76 s. ISBN 978-80-254-0973-2.

MUŽÍKOVÁ, B. a kol.: Ochrání větrlam půdu i při vysoké rychlosti větru?. In: *Acta horticulturae et regioteecturae*, Nitra, Slovac Unoversitas Agroculturae Nitrae, roč. 15, 2012, č. Mimoriadne – Special, str. 40 – 42.

PASÁK V. a kol.: *Ochrana půdy před erozí*. Praha. Státní zemědělské nakladatelství. 1984. 164 s.

QUITT, E.: *Klimatické oblasti Československa*. Studia geographica 16. Geografický ústav ČSAV Brno. Academia. 1971

TOMAN, F.: Ochrana půdy před větrnou erozí v podmínkách možné klimatické změny. In: *Bioklimatologické pracovní dny 2001: Extrémny prostredia (počasia) – limitujúce faktory bioklimatologických procesov*. Medzinárodná vedecká konferencia Račková dolina, Slovensko, 10. – 12. september 2001.

ASSESSING THE SUSTAINABILITY OF FARMING ON ARABLE LAND AND ITS USE IN THE EDUCATION

Marada P., Valtýníová S., Verner. F.

Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xmarada@mendelu.cz

ABSTRACT

The paper presents the importance and possibilities for assessing the sustainability of farming on arable land. The methodology SAGROS was developed at the Mendel University in Brno to provide tool for these assessments in the Czech conditions. It covers environmental as well as economic and social dimension of sustainability using set of 21 main and 32 partial indicators. Final result is presented by overview of normalised values in radial graph to make identification of week points of farm management easier.

This method was used to assess particular agricultural enterprise in the period 2009–2011. The results have shown satisfactory performance in 18 of 21 main indicators. Week points were recognized in economic and social area. Indicators farm income, gross margin and salaries, value of which was below desired threshold, define areas to be improved.

Because it is necessary to establish awareness of sustainable use of arable land in practice, the above mentioned methodology is being introduced into the teaching of students in agricultural branches, as future professionals in agriculture.

Key words: farming, sustainability, indicator

Acknowledgments: The study was supported by project of University Development Fund within project No. 2791/2012.

ÚVOD

Zemědělství po staletí přispívalo k vytváření a zachování nejrůznějších cenných polopřirozených biotopů, které dnes určují ráz významné části krajiny na celém území a jsou domovem širokého spektra planě rostoucích rostlin a volně žijících živočichů. Zemědělci v ČR hospodaří přibližně na polovině (54 %) celkové rozlohy státu. To samo o sobě podtrhuje význam daného odvětví pro přírodní prostředí a krajinu. Zemědělství a příroda se navzájem významným způsobem ovlivňují. Úkolem zemědělství dnes není jen výroba potravin, ale také tvorba a ochrana krajiny. Ve vyspělých zemích se proto zvyšuje důraz na udržitelné neboli setrvalé hospodaření, tak aby byly co nejvíce potlačeny jeho negativní vlivy na životní prostředí.

Aby bylo možné tyto negativní vlivy co nejvíce potlačit a naopak rozvinout aktivity vedoucí k rozvoji setrvalosti hospodaření, je nutné stanovit oblasti hodnocení a pro ně vymezit hranice setrvalosti. A právě vymezení těchto hranic vyvolává nejvíce odborných debat, protože je v různých regionech rozdílné.

Cílem příspěvku je prezentace metody hodnocení setrvalosti hospodaření na orné půdě (metoda SAGROS), která je využitelná v běžné zemědělské praxi v podmínkách ČR. Zároveň má dostatečný odborný základ a lze s jejím využitím provádět hodnocení a optimalizaci hospodaření zemědělských podniků. Jsou uvedeny také konkrétní výsledky na základě tříletých dat z konkrétního zemědělského podniku. V současnosti jsou prováděna další hodnocení farem, také v rámci studentských projektů, což má podstatný význam pro vytvoření povědomí o setrvalém využívání orné půdy v praxi.

Neméně významným problémem je, jak dostat do povědomí zemědělské praxe požadavky setrvalosti a snahu o jejich dodržování. Proto je zde prezentován způsob, jakým je zavedeno hodnocení setrvalosti do výuky pro studenty na zemědělských oborech.

MATERIÁL A METODIKA

Zájmové oblasti pro hodnocení jsou definovány pomocí 32 indikátorů setrvalosti. Indikátory jsou ukazatele, jimiž jsou předávány informace o sledovaných či hodnocených systémech. V zemědělském hospodaření lze pomocí vhodných indikátorů hodnotit dopady výrobních postupů na prostředí, agroekosystémy a rovněž hospodářské a sociální poměry zemědělského podniku. Indikátory musí být v praxi použitelné a mít odpovídající vypovídací hodnotu a dostatečný rozsah v hodnocené oblasti. Požadavky indikátorů musí být realizovatelné a vycházet ze spolehlivých a objektivních základů.

Prostřednictvím dosažených hodnot indikátorů, ze všech tří dimenzí udržitelnosti (ekonomické, ekologické a sociální), může uživatel získat představu o stavu svého podniku (používaného způsobu hospodaření).

Oblasti hodnocení

1) Ekologická dimenze

Indikátory ekologické (biologicko-fyzikální) dimenze hodnotí bilanci živin a organické hmoty, energetickou náročnost technologie pěstování plodin, míru spotřeby pesticidů u hlavních plodin v porovnání s ostatními zemědělskými podniky. Rovněž je zohledněna míra ochrany půdy proti erozi a v neposlední řadě je hodnocena pomocí řady ukazatelů biodiverzita na obhospodařovaných plochách. Seznam hodnocených indikátorů je uveden v tab. 1.

Tab. 1. Indikátory ekologické dimenze setrvalosti

Kategorie	Indikátory
Bilance látkových toků	Bilance dusíku
	Bilance fosforu
	Bilance draslíku
	Bilance organické hmoty
Zatížení životního prostředí	Měrná spotřeba energie
	Intenzita ochrany rostlin
	Eroze půdy
Ovlivňování životního prostředí	Biodiverzita

2) Ekonomická dimenze

Cílem ekonomických indikátorů je posouzení zajištění financování výrobních prostředků pro zemědělkou výrobu a efektivního využití výrobních faktorů, obzvláště půdy a práce. Hodnoceno je také dosahování odpovídajícího zisku. Seznam hodnocených indikátorů je uveden v tab. 2.

Tab. 2. Indikátory ekonomické dimenze setrvalosti

Kategorie	Indikátory
Stabilita	Tržby
	Zisk
	Zadluženost
Likvidita	Rentabilita
	Likvidita
Rentabilita	Rentabilita

3) Sociální dimenze

Cílem je udržení a tvorba pracovních míst. Zajištění odpovídající odměny za práci pro zaměstnance. Zabezpečení vhodných pracovních podmínek například v oblasti bezpečnosti práce, úrovně vzdělávání, odpovídající rozsah odpočinku, atd. Hodnoceno je také vystupování podniku směrem k okolí. Seznam hodnocených indikátorů je uveden v tab. 3.

Tab. 3. Indikátory sociální dimenze setrvalosti

Kategorie	Indikátory
Práce a zaměstnanost	Odměna za práci
	Pracovní doba
	Dovolená
	Vzdělávání
	BOZP
Společenská angažovanost	Zapojení zaměstnanců do řízení podniku
	Společenská angažovanost

Způsob hodnocení

Při hodnocení jednotlivých indikátorů jsou zjištěné a vypočítané údaje (v původních měrných jednotkách) pomocí vyhodnocovací funkce převedeny na bezrozměrné číslo v rozmezí 0 až 1. To umožňuje integrovat (načítat) jednotlivá kritéria odlišné povahy a provádět tak celkové hodnocení pomocí souboru indikátorů.

Při hodnocení je nejdříve pro každý indikátor stanoven práh udržitelnosti (požadovaná hodnota), který odpovídá hodnotě 0,75. Optimální výsledky dostávají hodnotu indikátoru 1, hodnotu 0 již z hlediska udržitelnosti nelze tolerovat.

Hodnoty indikátorů se počítají z dat nejméně za tři roky. Z hodnot indikátorů pro jednotlivé roky je vypočítán průměr, který slouží pro výsledné hodnocení zemědělského podniku.

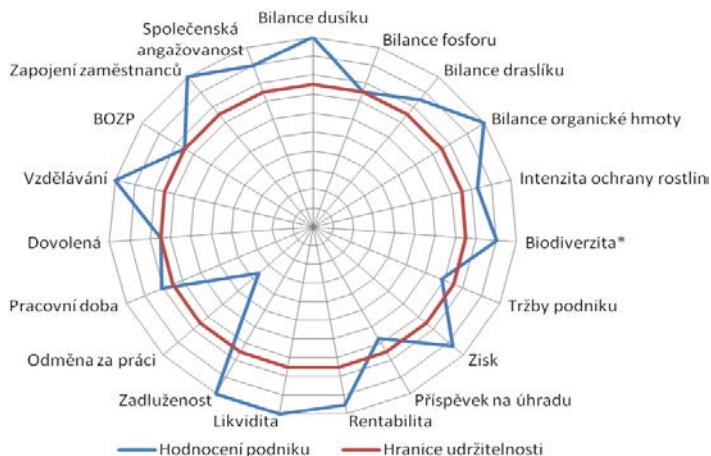
Znázornění hodnocení setrvalosti hospodaření na orné půdě

Pro znázornění a prezentaci výsledků komplexního hodnocení hospodaření zemědělských podniků pomocí indikátorů setrvalosti je využit kruhový diagram (obr. 1.) Z něj je zřejmé, které z indikátorů splňují kritéria udržitelnosti a které mají být zlepšovány k dosažení vyváženosti agrosystému. Toto grafické znázornění tak umožňuje identifikovat a přehledně znázornit „slabá místa“ v hospodaření zemědělského podniku nebo jeho jednotlivých částí a problémy, které by měly být řešeny.

PRAKTICKÉ VÝSTUPY VYUŽITÍ METODY HODNOCENÍ SETRVALOSTI

Hodnocený podnik hospodaří v bramborařské výrobní oblasti v Orlických horách. Nadmořská výška kolísá v rozsahu 515 až 700 m n.m. Podnik se zabývá rostlinnou produkcí – 728 ha a živočišnou produkcí – 440 VDJ. Základní rostlinou komoditou jsou krmné obilniny, tj. pšenice ozimá, ječmen jarní, oves, triticale ozimé. Podnik se dále zabývá pěstování konzumních a sadbových brambor, řepky ozimé, máku, semenářským množením trav a svazanky vratičolisté.

Obr. 1. Výsledné hodnocení zemědělského podniku



Hospodaření hodnoceného zemědělského podniku lze ve všech posuzovaných oblastech považovat za setrvalé (obr. 1.) s přihlédnutím ke slabším výsledkům v ekonomické oblasti (hodnoty <0,75 byly zjištěny u indikátorů tržby a příspěvek na úhradu) a odměňování pracovníků (sociální oblast). Výsledek ekonomických indikátorů souvisí s orientací podniku na technologie s nižšími vstupy. Ve spojení s nižšími výnosy v oblasti LFA, ve které se podnik nachází, a vyšší mírou nezaměstnanosti v regionu klesá do nežádoucí oblasti hodnot také hodnocení indikátoru odměna za práci.

Využití metody hodnocení setrvalosti ve výuce studentů

Znalost podstaty a možností praktického využití jednotlivých indikátorů setrvalosti hospodaření si student ověří při zpracování projektu hospodaření modelového zemědělského podniku v oblasti svého bydliště. Výběr regionu zohledňuje znalost místních podmínek, které jsou v zemědělství výrazným faktorem podílejícím se na úspěchu zemědělské činnosti. Do projektu je možné použít i data ze skutečného zemědělského podniku.

Projekt je sestavován v interaktivní šabloně. Jako pomůcka slouží multimediální prezentace pro výuku, která je zpracována ve formě webové prezentace.

Struktura projektu

Vlastní projekt je členěn do 14 vzájemně propojených a na sebe navazujících částí (tab. 4.). Na začátku projektu student definuje podmínky výrobního území, následně popíše strukturu a fungování svého podniku. Pro každou z pěstovaných plodin je vytvořena pěstební technologie, na základě které jsou vyplněny také evidence plynoucí ze základních legislativních požadavků na evidence hnojení a pesticidů. Navržené technologie jsou v dalších částech projektu zhodnoceny s využitím vybraných indikátorů z výše popsané metody SAGROS. Pozornost je věnována zejména bilanci živin a organické hmoty. Vyhodnocena je také ekonomická situace podniku. Výsledky návrhu hospodaření na orné půdě (úroveň dosažení požadovaných hodnot indikátorů setrvalosti) jsou shrnuty do tabulky a přehledně graficky znázorněny. Souhrnné zhodnocení výsledků je provedeno v poslední části projektu a student zde výsledky okomentuje a vyvodí z nich závěry ohledně setrvalosti hospodaření své farmy.

Tab. 4. *Struktura projektu*

Struktura projektu			
1)	Charakteristika výrobního území	8)	Evidence hnojení a pesticidů
2)	Požadavků na rostlinnou výrobu	9)	Bilance organické hmoty
3)	Návrh struktury rostlinné výroby	10)	Bilance živin
4)	Podnikatelský záměr a marketingová studie	11)	Ekonomická bilance
5)	Plán hnojení	12)	Dotace
6)	Pěstební technologie	13)	Grafické vyjádření hodnocení setrvalosti
7)	Výrobnost osevního postupu	14)	Závěr

ZÁVĚR

Navrženou sadu indikátorů lze použít pro vlastní sebekontrolu a sebehodnocení podniku včetně optimalizace slabých míst, identifikovaných na základě nesplnění požadované hodnoty příslušného indikátoru (stanovené hranice setrvalosti). Je vhodná také pro hodnocení podniku a úroveň jeho řízení ze strany externích subjektů. Podniky hodnocené jako udržitelně hospodařící toto mohou využít při prezentaci své produkce a samotného podniku ve vztahu ke svému okolí a tím získat pozitivní hodnocení od veřejnosti. Popsanou sadu indikátorů lze velmi dobře uplatnit při výuce studentů, kteří si mohou ověřit vzájemnou závislost mezi navrženým způsobem hospodaření a plněním kritérií setrvalosti.

LITERATURA

Křen, J., a kol. (2011): Metodika hodnocení trvalé udržitelnosti systémů rostlinné produkce pro podmínky ČR, ISBN 978-80-7375-588-1

Häni, F. J., Studer, C., Thalmann, C., Porsche, H., Stämpfli, A. (2008): RISE - maßnahmenorientierte Nachhaltigkeitsanalyse landwirtschaftlicher Betriebe. Weltweit anwendbares Instrument für standardisierte Nachhaltigkeitsevaluation sowie für nachhaltigkeitsbetonte Betriebsführung und Umfeldplanung. KTBL-Schrift 467.

Hülsbergen, K. J., Christen, O., Holz, F., Schüler, E., Nehring, W., Kamm, U. (2002): REPRO bewertet die Landwirtschaft - Betriebsbilanzierungsprogramm dokumentiert Umweltwirkungen. Neue Landwirtschaft 12: 34-37.

LIMESTONE QUARRIES AS A REFUGIUM FOR ENDANGERED SPECIES OF INVERTEBRATE – PRELIMINARY RESULTS

VÁPENCOVÉ LOMY JAKO ÚTOČIŠTĚ PRO OHROŽENÉ DRUHY BEZOBRATLÝCH – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY

Nováková L.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: lucie.novakova@mendelu.cz

ABSTRACT

The paper deals with the limestone quarries as refuges for invertebrates. Six quarries in various stages of succession were selected for the research. The aim is to cover the widest range of habitats which quarries can offer - from the initial succession on bare substrate of a still active quarry to the succession in the high level of development in the quarry which is closed for more than two decades. After the last sampling, the level of biodiversity will be assessed according to the degree of succession, level of vegetation cover and distance of surrounding vegetation and its type.

The result will determine what stage of succession is the most convenient for animals. The knowledge will help us to deduce the best solutions of the maintenance of excavated quarries.

The work has provided only preliminary results in the form of a list of species found so far. A total of eight species protected under Decree No. 395/92 Coll. and five species listed in the Red List were found.

Key words: Carabidae, limestone quarry, biodiversity, succession

Acknowledgments: This work was developed with financial support from an Internal Grant Agency FA MENDELU No. IP17/2012 and IGA FA MENDELU No. TP04/2012. I thank especially to Luboš Purchart for his help with determination and I thank also to other my colleagues for their help in the field.

ÚVOD

V naší velmi uniformní krajině se stále se snižující biologickou rozmanitostí rostlin i živočichů se naštěstí vyskytují ostrůvky, na kterých je možné objevit výskyt „nových“ druhů. Nejedná o nové druhy jako takové, spíše jde o druhy „ztracené“, v dřívějších dobách i hojně. Postupem času však byly bohužel vytlačeny díky rozšiřujícímu se zemědělství na velkých souvislých plochách, pěstováním jen několika málo plodin, používáním těžké mechanizace a vysokým zatížením půdy chemií.

Zmíněné záchranné ostrůvky se v krajině neobjevily samovolně, nýbrž činností člověka. Jedná se o místa, která dříve sloužila těžbě – lomy, pískovny, důlní výsypky, deponie popílku... V současné době jsou opuštěná a ponechaná samovolnému vývoji. Jedna z prvních zmínek o bohaté biodiverzitě takovýchto degradovaných stanovišť pochází již ze 70. let 20. století, kdy Jefferson (1984) publikoval práci o důležitosti vápencových lomů. V našich podmínkách se vápencovými lomy a jejich potenciálem zabývali např. Beneš *et al.* (2003) na příkladu denních motýlů, Tropek & Konvička (2008) u pavouků. Jako další zajímavé práce, díky kterým byl vyzdvihnut význam postindustriálních stanovišť pro teplomilné bezobratlé, lze uvést např. Kůrku (2000), Pracha (2006), Tropa (2007).

Všechny práce vyzdvihují pozitivní vliv samovolné sukcese při vývoji rostlinných a živočišných společenstev. Po těžbě jsou opuštěná místa vysoce degradovaná, chybí zde půdní profil, vegetace, vlhkost. Taková stanoviště jsou členitá, zarůstají velice pomalu a dávají tak možnost vzniku různých sukcesních stádií. Vytváří se zde suché stepní trávníky, místa s obnaženým sypkým substrátem, nebo mokřadní jezírka. Různorodost podmínek spolu s členitým reliéfem a podložím umožňuje vznik a existenci druhově bohatých společenstev (Konvička, 2012). V současné době bychom podobné lokality hledali snad jen v podhorských a horských oblastech.

Na následujících stránkách bych ráda představila svou práci, která se týká vápencových lomů jakožto útočišť pro bezobratlé živočichy. Cílem práce je obsáhnout co nejširší spektrum stanovišť, jaké mohou lomy nabídnout – od počáteční sukcese na holém substrátu stále aktivního lomu po sukcesi ve vysokém stupni vývoje v lomu, který je více než dvě desetky let uzavřen. Bude posouzena úroveň biodiverzity v závislosti na stupni sukcese, vzdálenosti okolního porostu a jeho typu. Mezi další proměnné bude patřit i způsob těžby vápence a úroveň vegetační pokrývnosti v lomech.

Vzhledem ke stále probíhajícímu terénnímu pracím zde budou uvedeny pouze předběžné výsledky ve formě výčtu dosud nalezených druhů. Statistické zpracování bude provedeno až po posledním

odběru letošního roku, který se uskuteční na konci října 2012. Průzkum je plánovaný minimálně na roky (2012 a 2013).

Jako modelová skupina pro výzkum byli zvoleni střevlíkovití brouci. Jedná se o velmi důležitou ekologickou skupinu, která se v roli predátora významně podílí na koloběhu života bezobratlých i obratlovců. A díky citlivé a rychlé reakci na okolní změny se z nich stávají vhodné biologické indikátory změn prostředí.

MATERIÁL A METODIKA

Výzkum je prováděn v šesti vápencových lomech. Jednotlivé dvojice lomů byly vybrány tak, aby bylo možné zaznamenat měnící se trend výskytu střevlíků v závislosti na stupni sukcese lomu:

- aktivní lomy – Prostřední lom (Mokrá – Horákov), lom Malá dohoda (Holštejn)
- lomy s relativně nedávno ukončenou těžbou (cca 10 let) – Lesní lom (Brno – Hády), lom pod PP Svatý kopeček (Mikulov)
- staré opuštěné lomy (více než 20 let) – NPP Státní lom (Čelechovice na Hané), Na Turoldu (Mikulov)

Jako metoda odchyty střevlíkovitých brouků byly zvoleny zemní pasti. Past se skládá ze dvou 0,5l plastových kelímků (průměr 95 mm). Vnější kelímek zůstává trvale v půdě, do vnitřního je nalita fixační tekutina – 4% formaldehyd s příměsí glycerolu, který zamezí vysychání. Pasti jsou bez návnady, kryté stříškou z přírodních materiálů jako ochrana proti dešti.

Aby bylo pokryto co nejširší spektrum výskytu střevlíků, jsou zemní pasti umístěny ve vlastním tělese lomu i v jeho okolí. V každém lomu byly zemní pasti zakopány v liniích po třech na šesti stanovištích. Tři stanoviště jsou **na biotopech s ranou sukcesí** (jedna linie přímo v lomu (stanoviště 4), jedna na okraji lomu (stanoviště 5) a jedna v okolí lomu (stanoviště 6) a další tři stanoviště jsou **na biotopech s pokročilou sukcesí** (rovněž jedna linie přímo v lomu (stanoviště 1), jedna na okraji lomu (stanoviště 2) a jedna v okolí lomu (stanoviště 3).

Odběr vzorků probíhá vždy ve vegetačním období (březen – říjen) s měsíčním intervalem výběru pastí. Determinace získaného materiálu byla provedena podle Hůrky (1996). Nomenklatura je převzata dle Audisio & Taglianti (2011).

V každém lomu bude zaznamenána početnost a druhové spektrum střevlíkovitých brouků. K jednotlivým druhům bude dle Hůrky *et al.* (1996) přiřazena bioindikační skupina vzhledem k jejich ekologické valenci a vázanosti k biotopu: druhy skupiny R jsou stenotopní druhy s nejužší ekologickou valenci, většinou se jedná o vzácné a ohrožené druhy přirozených, nepoškozených ekosystémů. Skupinu A charakterizují druhy adaptabilní, vyskytující se na biotopech blízkých přirozenému stavu. Do poslední bioindikační skupiny E jsou řazeny eurytopní druhy, které nemají

žádné zvláštní nároky na kvalitu prostředí (druhy nestabilních a měnících se biotopů, stanoviště silně ovlivněná činností člověka).

Dále budou vyhodnoceny synekologické charakteristiky – dominance, ekvitabilita, druhová diverzita. Dominance druhů bude dle Tischlera (1965) rozdělena na pět skupin: druhy eudominantní (zahrnovali více než 10% zastoupení jedinců daného druhu z celkového počtu jedinců na daném stanovišti), dominantní (5 – 10%), subdominantní (2 – 5%), recedentní (1 – 2%) a druhy subrecedentní s méně než 1% zastoupením.

Pomocí Jaccardova indexu budou mezi sebou porovnány jednotlivé lomy, dvojice lomů stejného sukcesního stadia, také dojde k porovnání sukcesních stadií mezi sebou. Environmentální proměnné (vegetační pokrývnost lomu, typ a vzdálenost okolního porostu od lomu, způsob těžby a stadium sukcese) budou vyhodnoceny pomocí programových balíčků Canoco a Statistica.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Dosud bylo ze všech šesti lomů nalezeno a determinováno 1533 jedinců střečlíků náležících k 62 druhům. Nejvíce kusů bylo nalezeno ve stále *aktivním lomu Malá dohoda* – 621 jedinců (29 druhů). Přehled druhů s počty jedinců na jednotlivých stanovištích je uveden v Tab. I. Byly zde zaznamenány druhy chráněné jako ohrožené dle Vyhlášky č. 395/92 Sb. - *Brachinus crepitans* (Linne 1758), *Cicindela campestris* Linne 1758, *Cicindela sylvicola* Dejean in Latreille & Dejean 1822, a druhy chráněné dle Červeného seznamu (Veselý *et al.*, 2005) – téměř ohrožený *Carabus cancelatus* Illiger 1798, dále dva druhy, které jsou současně uvedeny ve zmíněné Vyhlášce i v Červeném seznamu - *Carabus ullrichi* Germar 1824, *Cylindera germanica* (Linne 1758). *Carabus ullrichi* i *Carabus cancelatus* se vyskytovaly početně na všech stanovištích Malé dohody. Nejvíce byly zastoupeny na stanovišti 6, které představuje okolí lomu rané sukcese. Hojně se vyskytovala *Cylindera germanica* (33 jedinců) na stanovišti 1, které reprezentuje pokročilejší sukcesí avšak uvnitř lomu. Dle Hürky (1996) se jedná spíše o druh nížin a okrajů polí.

Ve druhém taktě *aktivním lomu Mokrá* bylo zaznamenáno 176 jedinců (20 druhů) (Tab. I). Nejhojnějším druhem byl ohrožený druh dle Vyhlášky č. 395/92 Sb. *Cicindela sylvicola* v počtu 33 jedinců, který se vyskytoval pouze na stanovišti 1, tj. přímo na lomové terase. Dalšími ohroženými druhy byly, podobně jako v lomu Malá dohoda, *Cylindera germanica* a *Cicindela campestris*. Druhy podrodu *Cicindela* se vyskytovaly pouze v aktivních lomech. Podrod *Cylindera* se navíc vyskytoval i v lomu s nedávno ukončenou těžbou, avšak ve starších lomech výskyt zaznamenaný nebyl.

Tab.1: Přehled druhů střevlíků v aktivních lomech

DRUH	Dohoda						Mokrá					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Abax ovalis</i> (Duftschmid 1812)		1										3
<i>Abax parallelepipedus</i> (Piller & Mitterpacher 1783)	5	1	7		1	2	1	3	4		1	23
<i>Abax parallelus</i> (Duftschmid 1812)	1						1					5
<i>Amara convexior</i> Stephens 1828									1			
<i>Amara equestris</i> (Duftschmid 1812)		1		1	2	6						
<i>Amara lunicollis</i> Schiodte 1837						3						
<i>Amara nitida</i> Sturm 1825						1						
<i>Amara praetermissa</i> (C.R. Sahlberg 1827)		2										
<i>Amara similata</i> (Gyllenhal 1810)						5						
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan 1763)						2						
<i>Aptinus bombardus</i> (Illiger 1800)	2	1	70									
<i>Bembidion lampros</i> (Herbst 1784)											1	
<i>Brachinus crepitans</i> (Linne 1758)					1							
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze 1777)		5			2							
<i>Calathus melanocephalus</i> (Linne 1758)									1			
<i>Carabus cancellatus</i> Illiger 1798	24	24	13	31	31	94						
<i>Carabus glabratus</i> Paykull 1790									2			9
<i>Carabus granulatus</i> Linne 1758	1	2	2			1						
<i>Carabus hortensis</i> Linne 1758												2
<i>Carabus intricatus</i> Linne 1761			1	1								
<i>Carabus nemoralis</i> O.F. Muller 1764												4
<i>Carabus ullrichi</i> Germar 1824	3	2	34	36	12	75						
<i>Carabus violaceus</i> Linne 1758											1	3
<i>Cicindela campestris</i> Linne 1758		1						5			21	
<i>Cicindela sylvicola</i> Dejean in Latreille & Dejean 1822								33				
<i>Cylindera germanica</i> (Linne 1758)	33	11			2	24	1	4			21	
<i>Harpalus affinis</i> (Schrank 1781)	1					3						
<i>Harpalus atratus</i> Latreille 1804					1			1				
<i>Harpalus distinguendus</i> (Duftschmid 1812)					1							

MENDELNET 2012

<i>Harpalus latus</i> (Linne 1758)		1			1									
<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid 1812)		3		1	1						11			
<i>Ophonus azureus</i> (Fabricius 1775)	1										1			
<i>Ophonus rupicola</i> (Sturm 1818)					1		1				1			
<i>Poecilus cupreus</i> (Linne 1758)							4							
<i>Poecilus versicolor</i> (Sturm 1824)							4		2		1			
<i>Pseudoophonus griseus</i> (Panzer 1796)								1						
<i>Pseudoophonus rufipes</i> (De Geer 1774)		2	8				4		2	4	1			
<i>Pterostichus melanarius</i> (Illiger 1798)	1						3							
Celkový součet		72	56	136	70	55	232		38	13	12	0	62	51

Druhou skupinou jsou *lomy s nedávno ukončenou těžbou* **Lesní lom a lom pod PP Svatý Kopeček**. V Lesním lomu bylo celkem nalezeno 209 jedinců (19 druhů) a u Svatého Kopečku 140 jedinců (21 druhů) (Tab. II). Na obou lokalitách se překvapivě na rozdíl od aktivních lomů na lomových terasách (stanoviště 1 a 4) střevlíci téměř nevyskytovali. Opět zde byly zaznamenány významné chráněné druhy (pro přehlednost uvedeny níže, Tab. IV). Za zmínku stojí *Carabus irregularis* Fabricius 1792, tento druh je chráněn dle Vyhlášky i podle Červeného seznamu (Veselý a kol., 2005). Vyskytuje se vzácně až ojediněle a bývá označován jako indikátor původních lesů (Hůrka, 1996).

Tab. 2: Přehled druhů střevlíků v lomech s ukončenou těžbou (cca 10 let)

DRUH	Kopeček						Lesní					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Abax parallelepipedus</i> (Piller & Mitterpacher 1783)									2		3	1
<i>Abax parallelus</i> (Duftschmid 1812)	1											
<i>Amara bifrons</i> (Gyllenhal 1810)			1									
<i>Amara equestris</i> (Duftschmid 1812)			1									
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan 1763)	1								1	17	1	
<i>Aptinus bombardia</i> (Illiger 1800)								7				
<i>Badister bullatus</i> (Schrank 1798)		1										
<i>Brachinus crepitans</i> (Linne 1758)											1	
<i>Calathus ambiguus</i> (Paykull 1790)			1									
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze 1777)			10								3	9

MENDELNET 2012

<i>Carabus coriaceus</i> Linne 1758	1	1										
<i>Carabus granulatus</i> Linne 1758									1			
<i>Carabus intricatus</i> Linne 1761							8					
<i>Carabus irregularis</i> Fabricius 1792							1					
<i>Carabus nemoralis</i> O.F. Muller 1764							2					
<i>Carabus ullrichi</i> Germar 1824	4						2	4	23 53			
<i>Carabus violaceus</i> Linne 1758							1					
<i>Cimindis axillaris</i> (Fabricius 1794)				1								
<i>Cylindera germanica</i> (Linne 1758)	1						11		1 1			
<i>Harpalus atratus</i> Latreille 1804			2									
<i>Harpalus caspius roubali</i> (Steven 1806)					1		1		1 1			
<i>Harpalus pumilus</i> Sturm 1818			1									
<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid 1812)		2	2					1	3			
<i>Leistus ferrugineus</i> (Linne 1758)							1		1			
<i>Ophonus azureus</i> (Fabricius 1775)			1									
<i>Ophonus rufibarbis</i> (Fabricius 1792)					1							
<i>Ophonus rupicola</i> (Sturm 1818)					1							
<i>Pseudoophonus calceatus</i>		7	1		1							
<i>Pseudoophonus griseus</i> (Panzer 1796)		26	2						3			
<i>Pseudoophonus rufipes</i> (De Geer 1774)	2	65	1				1	1	22 11			
<i>Pterostichus melanarius</i> (Illiger 1798)									1			
<i>Zabrus tenebrioides</i> (Goeze 1777)									4 4			
Celkový součet	3	8	118	5	5	1	0	15	26	3	83	82

Poslední dvojici jsou *lomy uzavřené více než 20 let* – **Na Turoldu** a **NPP Státní lom**. Na Turoldu bylo nalezeno 179 (25 druhů) a ve Státním lomu 208 jedinců (23 druhů) (Tab. III). Mezi jinými chráněnými druhy byl Na Turoldu nalezen vzácný a již mizející druh *Licinus Cassideus* (Fabricius 1792) (Hůrka, 1996). Druh byl zaznamenán na stanovišti 4, na lomové terase s ranou sukcesí. Na stejném stanovišti byl zjištěn i lokální, v poslední době ubývající ohrožený druh *Brachinus crepitans* (Hůrka, 1996). Dalším velmi významným druhem je *Syntomus obscuroguttatus* (Duftschmid 1812), který se na Moravě vyskytuje pouze vzácně a lokálně (Hůrka, 1996). Státní lom byla jediná lokalita, kde se vyskytoval ohrožený druh *Carabus sheidleri* Panzer 1799.

Tab. 3: Přehled druhů střevlíků v lomech uzavřených více než 25 let

DRUH	Státní						Turold					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Abax parallelepipedus</i> (Piller & Mitterpacher 1783)	4		13				31	1				
<i>Abax parallelus</i> (Duftschmid 1812)								1				
<i>Amara equestris</i> (Duftschmid 1812)										2		
<i>Amara familiaris</i> (Duftschmid 1812)										1		
<i>Amara ovata</i> (Fabricius 1792)	1		1							1		
<i>Amara similata</i> (Gyllenhal 1810)	1					1						
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan 1763)			3	1		11						
<i>Brachinus crepitans</i> (Linne 1758)										2		
<i>Brachinus explodens</i> Duftschmid 1812										1		
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze 1777)			3		1							
<i>Callistus lunatus</i> (Fabricius 1775)										1		
<i>Carabus cancellatus</i> Illiger 1798							23	1	6	4		
<i>Carabus coriaceus</i> Linne 1758							6		1	4	1	
<i>Carabus granulatus</i> Linne 1758										2		
<i>Carabus hortensis</i> Linne 1758		1	9			2		1				
<i>Carabus intricatus</i> Linne 1761	3					1	5					
<i>Carabus irregularis</i> Fabricius 1792				1								
<i>Carabus nemoralis</i> O.F. Muller 1764							7			2		
<i>Carabus scheidleri</i> Panzer 1799	1	5	11			2						
<i>Carabus ullrichi</i> Germar 1824			2			2	24		2	4		
<i>Carabus violaceus</i> Linne 1758		2	6			1						
<i>Harpalus atratus</i> Latreille 1804			1							16		
<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid 1812)			1			3				1		
<i>Leistus ferrugineus</i> (Linne 1758)							1					
<i>Licinus cassideus</i> (Fabricius 1792)										1		
<i>Manodromius linearis</i> (Olivier 1795)						1						
<i>Microlestes maurus</i> (Sturm 1827)						1				1		
<i>Microlestes minutulus</i> (Goeze 1777)		1										
<i>Ophonus azureus</i> (Fabricius 1775)						1						1

MENDELNET 2012

<i>Ophonus ruficola</i> (Sturm 1818)										1		
<i>Poecilus cupreus</i> (Linne 1758)	3	1		2	53							
<i>Poecilus versicolor</i> (Sturm 1824)						1						
<i>Pseudoophonus griseus</i> (Panzer 1796)	1	2						1		1		
<i>Pseudoophonus rufipes</i> (De Geer 1774)	8	11		1	14	1		1		18		
<i>Pterostichus melanarius</i> (Illiger 1798)	2	1	8							1		
<i>Pterostichus vernalis</i> (Panzer 1796)			1									
<i>Syntomus obscuroguttatus</i> (Duftschmid 1812)								1				
Celkový součet	13	29	66	2	3	95	100	4	10	63	1	1

Tab. 4: Přehled nalezených chráněných druhů

Druh	Lom + stanoviště	Vyhláška č. 395/92 Sb.	Červený seznam
<i>Brachinus crepitans</i>	Dohoda 5; Lesní 5; Na Turoldu 4	ohrožený	-
<i>Brachinus explodens</i>	Na Turoldu 4	ohrožený	-
<i>Carabus irregularis</i>	Lesní 3; Státní 4	ohrožený	téměř ohrožený
<i>Carabus scheidleri</i>	Státní 1, 2, 3, 6	ohrožený	-
<i>Carabus ullrichi</i>	Dohoda 1-6; Lesní 2, 3, 5, 6; Kopeček 2; Na Turoldu 1, 3, 4; Státní 3, 6	ohrožený	téměř ohrožený
<i>Carabus violaceus</i>	Mokrý 5, 6; Lesní 2; Státní 2, 3, 6	-	zranitelný
<i>Cicindela campestris</i>	Dohoda 2; Mokrý 2, 5	ohrožený	-
<i>Cicindela sylvicola</i>	Mokrý 1	ohrožený	-
<i>Cylindera germanica</i>	Dohoda 1, 2, 5, 6; Mokrý 1, 2, 5; Lesní 2, 5, 6; Kopeček 1;	ohrožený	zranitelný
<i>Licinus cassideus</i>	Na Turoldu 4	-	ohrožený

ZÁVĚR

Výzkum probíhá v šesti vápencových lomech, které se nacházejí v různém stupni sukcese. Jako metoda odchytu brouků byly zvoleny zemní pasti s konzervačním roztokem. Tyto pasti byly umístěny na šesti stanovištích po třech v každém lomu. Jejich výběr a následná determinace byly prováděny v měsíčním intervalu.

Předběžné výsledky zahrnují data z 5 odběrů vzorků v roce 2012. Celkem bylo odchyceno 1533 jedinců střevlíků náležících k 62 druhům. Nejvyšší počet jedinců i druhů byl zaznamenán ve stále aktivním lomu Malá dohoda – 621 jedinců (29 druhů).

Bylo nalezeno celkem 8 druhů chráněných dle Vyhlášky č. 395/92 Sb. - *Brachinus crepitans* (Linne 1758), *Brachinus expodens* Duftschmid 1812, *Carabus irregularis* Fabricius 1792, *Carabus scheidleri* Panzer 1799, *Carabus ullrichi* Germar 1824, *Cicindela campestris* Linne 1758, *Cicindela sylvicola* Dejean in Latreille & Dejean 1822 a *Cylindera germanica* (Linne 1758) a dále pět druhů uvedených v Červeném seznamu - *Carabus irregularis* Fabricius 1792, *Carabus ullrichi* Germar 1824, *Carabus violaceus* Linne 1758, *Cylindera germanica* (Linne 1758), *Licinus cassideus* (Fabricius 1792).

Stanoviště aktivních lomů poskytovaly útočiště pro druhy rodu *Cicindela*, staré lomy hostily zajímavé a vzácné druhy jako jsou *Licinus cassideus* (Fabricius 1792), *Syntomus obscuroguttatus* (Duftschmid 1812), *Carabus irregularis* Fabricius 1792, *Carabus scheidleri* Panzer 1799.

LITERATURA

Audisio P., Taglianti A. V. (eds.), 2011: Fauna europaea – Carabidae, verze 2.4. Dostupné on-line: www.faunaeur.org, (cit. dne 26. 9. 2012).

Beneš J., Kepka P., Konvička M., 2003: Limestone quarries as refuges for european xerophilous butterflies. *Conservation Biology*, Volume 17, 4: 1058–1069

Hůrka K., 1996: Carabidae of the Czech and Slovak Republics. Kabourek, Zlín, 566 s.

Hůrka K., Veselý P., Farkač J., 1996: Využití střevlíkovitých (Coleoptera, Carabidae) k indikaci kvality prostředí. *Česká společnost entomologická, Praha, Klapalekiana*, 32: 15–26

Jefferson R. G., 1984: Quarries and wildlife conservation in the Yorkshire Wolds, England. *Biological Conservation*, 29: 363–380

Konvička M., 2012: Postindustriální stanoviště z pohledu ekologické vědy a ochrany přírody, s. 11–18 In: Tropek R., Řehounek J. (eds.), 2012: Bezobratlí postindustriálních stanovišť: Význam, ochrana a management, ENTÚ BC AV ČR & Calla, České Budějovice, 152s.

Kůrka, A., 2000: Sukcese arachnocenóz v povrchových vápencových lomech v Českém krasu (pavouci – Araneae). *Český kras*, 26: 22–27

Prach K., 2006: Příroda pracuje zadarmo. *Vesmír*, 85: 272–277

Tischler W., 1965: Agradarökologie. Jena: VEB Gustav Fischer. 499 s.

Tropek, R., Konvička, M., 2008: Can quarries supplement rare xeric habitats in a piedmont region? Spiders of the Blansky les Mts., Czech Republic. *Land Degradation and Development*, 19: 104–114.

Tropek, R., 2007: Pavouci (Araneae) xerothermních travníků a lomů Chráněné krajinné oblasti Blansky les. *Klapalekiana*, 43: 65–77

Veselý P., Moravec P., Stanovský J., 2005: Carabidae (střevlíkovití), s. 406–411 In: Farkač J., Král D., Škorpík M. (eds.), 2005: Červený seznam ohrožených druhů České republiky – Bezobratlí. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha, 760 s.

DIVERSITY AND ABUNDANCE OF SMALL MAMMALS OF AGRICULTURAL LANDSCAPE

DIVERZITA A POČETNOST DROBNÝCH SAVCŮ ZEMĚDĚLSKÉ KRAJINY

Nytra L.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: nytra.lu@seznam.cz

ABSTRACT

This paper presents partial results of the research of small mammals. It introduces with the species diversity and abundance of this group in the Czech part of Silesia in the Petrovice u Karviné. It states differences in numbers between the observed species and the abundance of small mammals by habitats. Small mammals are collecting traps on eight lines (3 fields, 3 woods, meadow, poplar plantation). Research began in the summer of 2011 and will be finished in the summer 2013th. This method has been found the occurrence of 954 individuals, five species of rodents (*Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*, *Apodemus agrarius*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*) and two species of insectivores (*Sorex araneus*, *Neomys fodiens*). The most abundant species is *A. agrarius*. In this locality were also observed: *Talpa europaea*, *Neomys anomalus*, *Rattus norvegicus*, *Arvicola terrestris*, *Mus musculus*. Comparison of abundance of small mammals between 2011 and 2012 showed the gradation of the population in 2012.

Key words: Diversity, abundance, agriculture landscape, small mammals

Acknowledgments: Supported by IGA FA MENDELU No. TP 5/2011, TP 4/2012.

ÚVOD

V příspěvku jsou publikována dosavadní data o početnosti a druhové rozmanitosti drobných savců získaná za období červenec 2011 – září 2012. Drobní savci jsou studováni v obci Petrovice u Karviné v okrese Karviná, Moravskoslezském kraji, obec má výměru 2047 ha a skládá se ze čtyř částí: Dolní Marklovice, Petrovice u Karviné, Prstná a Závada.

MATERIÁL A METODIKA

Klimatické charakteristiky řadí toto území mezi mírně teplé oblasti MT 10 a průměrná roční teplota vzduchu se pohybuje v rozmezí 7,5 – 8,5 °C, průměrný roční úhrn srážek dosahuje 600 – 700 mm, rozpětí nadmořských výšek 208 – 272 m (WEISSMANNOVÁ et. al., 2004). Do obce zasahují čtyři mapovací čtverce: 6076d, 6077c, 6176b, 6177a (Novák J. et. Zicha O., 1999 – 2012). Drobní savci jsou chytáni od července 2011 s předpokládaným ukončením v roce 2013. Odchyty jsou prováděny pomocí sklapovacích pastí v 250 m liniích (50 pastí s rozstupem 5 m) na standardní návnadu. Odchyt probíhá na devíti stálých liniích vždy 3 noci po sobě. Čtyři linie jsou umístěny v lesích: bučina (řídký podrost), mokřadní olšina (bohatý podrost), měkký luh (bohatý podrost, linie zrušena) zaplavovaný s pastvinou, mladý měkký luh (bohatý i řídký podrost) nezaplavovaný a částečně pasený. Pátá linie prochází nivní loukou, další tři jsou umístěny na polích a poslední je v tříleté topolové plantáži na okraji rozsáhlých polních celků. Mimo abundanci a druhovou diverzitu bude studována struktura populací, střevní paraziti a obsah těžkých kovů. Tkáně myšic temnopásých (*Apodemus agrarius*) budou též využity pro výzkum hantavirů.

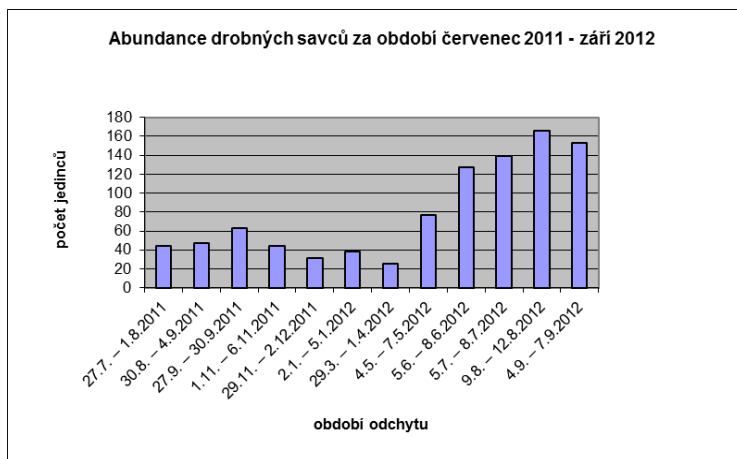
VÝSLEDKY A DISKUZE

V dvanácti odchytovéch termínech (v odstupu cca 1 měsíce) bylo celkem odchyceno 954 jedinců drobných savců z čehož 945 (99,1%) tvořili hlodavci a pouze 9 (0,9%) jedinců byli hmyzožravci. Nejvyšší abundanci vykazuje topolová plantáž (L 8) s 248 (25,9%) jedinci 5 druhů s výraznými nárůsty v letních měsících kdy toto území představuje po žních jedno z mála refugií. Následuje se stabilně vyšší početností mokřadní olšina (L 4) s 166 (17,4%) jedinci 5 druhů. Třetí linie dle početnosti je pole (L 7) sousedící s lesem 138 (14%) jedinců 4 druhů, v roce 2011 zde byl mák a nebyl zjištěn žádný drobný savec ale v roce 2012 v ozimě pšenici byla linie do sklízně hojně využívaná hlodavci. Početnou linii a druhově nejrozmanitější byl i měkký zaplavovaný luh (L 3) se 128 (13,4%) jedinci 6 druhů. Pole (L 17) s ozimou pšenicí v roce 2011 a cukrovkou v roce 2012 uprostřed komplexů rozsáhlých polí obývalo 93 (9,7%) jedinců min. 3 druhů. V bučině dosáhla početnost (L 2) 67 (7,%) jedinců 4 druhů, nižší pak byla na nivní louce (L 5) s 54 (5,6%) jedinci 5 druhů. Nejnížší abundanci z lesních stanovišť byla v nezaplavovaném mladém měkkém luhu (L 1) 52 (5,5%) jedinců min. 3 druhů. Nejnížší abundanci celkově byla zjištěna na poli (L 14) (kukuřice 2011, ozimá pšenice 2011/2012, sója 2012) 8 (0,8%) jedinců min. 3 druhů. Materiál ještě nebyl zcela determinován, při jeho sběru byly dosud vylišeny tyto druhy: rejsek obecný (*Sorex araneus*

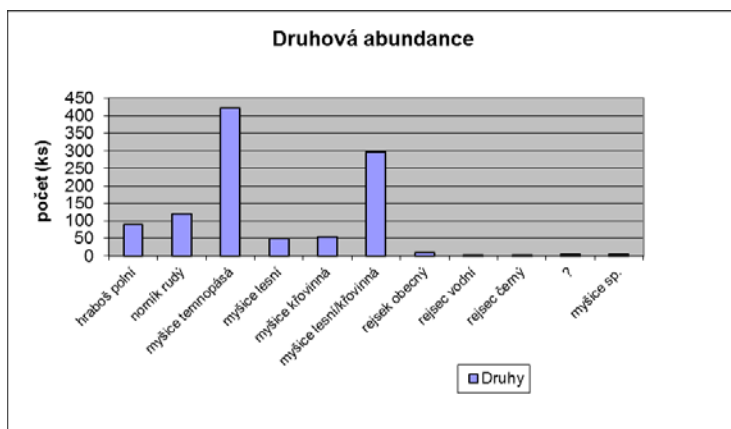
MENDELNET 2012

Linnaeus, 1758), rejsek vodní (*Neomys fodiens* Pennant, 1771), norník rudý (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780), hraboš polní (*Microtus arvalis* Pallas, 1778), myšice temnopásá (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771), myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758), myšice lesní (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834). V obci se rovněž vyskytují: krtek obecný (*Talpa europaea* Linnaeus, 1758), rejsek černý (*Neomys anomalus* Cabrera, 1907), potkan (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), hryzec vodní (*Arvicola terrestris* Linnaeus, 1758) a myš domácí (*Mus musculus* Linnaeus, 1758).

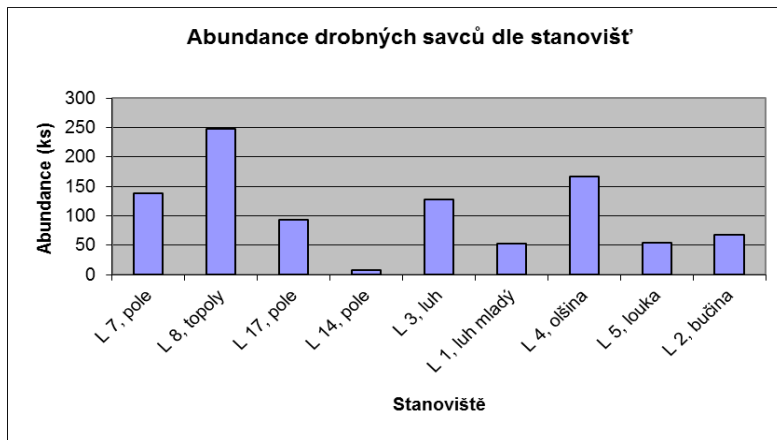
Graf 1. Abundance drobných savců dle období. Meziroční srovnání vykazuje populační nárůst v roce 2012.



Graf 2. Druhová rozmanitost a abundance drobných savců.



Graf 3. Abundance drobných savců dle stanovišť



ZÁVĚR

Tyto dílejší informace o drobných savcích v zemědělské krajině byly získány jako podklad pro autorovu disertační práci, která se věnuje studiu biodiverzity na území obce Petrovice u Karviné.

LITERATURA

Anděra M., Horáček I., 2005: *Poznáváme naše savce*. Sobotáles, Praha, 328 s.

Novák J., Zicha O., 1999 – 2012: BioLib. Nástroj pro výpočet mapovacích čtverců metodou KFME [cit. 2012-01-31]. Dostupné na: <http://www.biolib.cz/cz/toolKFME/>

CENIA, 2009 – 2012: Ortofoto národní inventarizace kontaminovaných míst [cit. 2012-01-31]. Dostupné na: <http://kontaminace.cenia.cz/>

WEISSMANNOVÁ H. a kol., 2004: *Ostravsko. Chráněná území ČR, svazek X. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, Brno, Praha, 456 s.*

POSSIBILITIES OF DIGESTATE UTILIZATION FROM BIOGAS PLANT IN ŽĎÁR NAD SÁZAVOU

MOŽNOSTI VYUŽITÍ DIGESTÁTU Z BIOPLYNOVÉ STANICE VE ŽĎÁŘE NAD SÁZAVOU

Petráková V., Kotovicová J.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xpetrakl@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the legislative environment and legislative support of digestate use, inventarization of technical and technological possibilities of the utilization, its assessment as a fertilizer or as a fuel. Further the evaluations of energetic demands of digestate treatment, economical and ecological contribution to different ways to its use are solved. The result is the proposal of optimal way of digestate use in the biogas plant in Žďár nad Sázavou. According to the beneficial nutrient content and sublimit content of heavy metals, the author proposed the use of digestate as fertilizer, which, by its physico – chemical properties will not only improve soil conditions and supply the plants with the necessary nutrients, but also will replace the part of used industrial fertilizers.

Key words: Biomass, digestate, fertilizer, fuel, biogas plant, dry anaerobic fermentation

Acknowledgments: Many thanks to my thesis supervisor, Mrs. doc. RNDr. Jana Kotovicová, Ph.D., for her professional guidance and willing cooperation. I would also like to thank the company ODAS ODPADY a. s., namely Mr. Jan Svoboda, for providing a valuable advices and materials. I also thank Mr. Ing. Miroslav Florián, Ph.D., Mr. doc. Ing. Eduard Pokorný, Ph.D. and Mr. Ing. Martin Fajman, Ph.D., for their valuable advices a helpful hand and willing cooperation. My big thank belongs to my family and friends, who afforded me fulltime comfort, support and background during the realization of this thesis.

ÚVOD

Využívání obnovitelných zdrojů energie je v současné době stále častěji diskutovaným tématem, na které díky jeho mnohovrstevnatosti nelze pohlížet zcela jednoznačně. Střet pohledů a názorů ať už politických, ekonomických, sociálních či ekologických vede v diferenciaci společnosti na odpůrce a zastánce. Jedním z problémů, kdy dochází ke konfrontaci různých pohledů (např. ekonomický vs. ekologický) je i využití sekundárních produktů (digestát při výrobě bioplynu). Jedním ze subjektů, který řeší otázku následného využití digestátu, je i bioplynová stanice ve Žďáře nad Sázavou.

I když je digestát odpadem po fermentačním procesu, může se dále využít buď jako hnojivo díky obsahu minerálních látek nebo jako palivo po nezbytném vysušení. Ačkoliv oba tyto způsoby nabízejí slibné možnosti a vyhlídky na úplné využití použitého bioodpadu s možností buď obohacení půdy o chybějící látky, nebo produkce další energie, přesto existuje mnoho důvodů a problémů, které ať jedno nebo druhé využití příliš nepodporují a přináší mnohá úskalí. Pokud budeme o digestátu uvažovat jako o možném hnojivu, nabízí se zde otázka, jaké jsou jeho hnojivé schopnosti, zda by se do půdy touto cestou nedostaly škodlivé látky, jaké jsou vůbec požadavky dané půdy na hnojení a zda mají zemědělci o toto hnojivo zájem, jak z hlediska jeho složení, tak i jejich potřeby hnojit půdu. Bude – li digestát dále použit jako palivo ve spalovací jednotce a vzniklá energie bude v kogenerační jednotce převedena na teplo elektrickou energií, je nutné vzniklý digestát po fermentačním procesu vysušit. Navíc na usušení digestátu je potřeba energie, která může představovat zvýšení finančních nákladů. Stejně tak i výhřevnost materiálu musí být dostatečná a to v případě digestátu, který při fermentaci „ztratil“ převážnou část uhlíku, který je obsažen právě v požadovaném plynu, je nízká. V této diplomové práci jsou výše vyjmenované problémy řešeny a výsledkem je návrh optimálního využití, respektive návrh, zda je lepší využít digestát jako hnojivo, či jako palivo.

MATERIÁL A METODIKA

Předmětem práce bylo zhodnocení využití digestátu jako hnojiva, nebo jako paliva. V obou případech byl digestát podroben analýze. Jednotlivé analýzy jsou následovně popsány. S výzkumnou částí, kde je digestát posuzován jako hnojivo, souvisí i průzkum půd a zemědělské činnosti v okolí Žďáru nad Sázavou. Z průzkumu jsem zjišťovala, jaké půdy se zde nacházejí a jaké plodiny se na nich převážně pěstují. U jednotlivých plodin jsem zjišťovala, jaká je jejich potřeba přísunu živin a tedy z jaké části by digestát jako hnojivo mohl nahradit průmyslová hnojiva.

Pro hodnocení digestátu jako hnojiva byla provedena analýza v laboratořích Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži. Pro laboratorní zkoušku bylo odebráno 6 vzorků digestátu. Pověřeným pracovníkem BPS byl pokaždé odebrán průměrný vzorek o hmotnosti cca 0,3 kg. 1. odběr proběhl 12. 1. 2012 a další vzorky byly odebrány v termínech: 20. 1., 24. 1., 26. 1., 31. 1. a 2. 2. 2012. Termíny odběru se odvíjely od termínu vyvážky materiálu z reaktoru. Vzorky byly následně uloženy do chladicího zařízení do doby transportu. Laboratorní analýza probíhala od 10. 2. 2012 do 2. 3. 2012. Nejprve byly vzorky analyzovány v původním stavu (s původním obsahem vody), poté byly vzorky vysušeny na bezvodý stav a opět analyzovány. U obou byl zjištěn obsah N, N – NH₄, P, K, Ca, Mg a Na. U všech vzorků s původním obsahem vody byla změřena hodnota pH, u všech vzorků v bezvodém stavu byl zjištěn obsah organických látek. Z jednotlivých hodnot byl vypočítán aritmetický průměr, který sloužil jako reprezentativní hodnota.

Tab. 1 Výsledky analýzy fermentátu v původní sušině

označení vzorku zákazníka	datum odběru	sušina %	Hodnoty jsou uvedeny v původní sušině							pH
			N %	N-NH ₄ %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	
F č.1	12.1.2012	31,54	0,55	0,189	0,101	0,91	0,603	0,159	0,086	9,12
F č.2	20.1.2012	24,25	0,48	0,187	0,035	1,07	0,423	0,119	0,084	9,15
F č.3	24.1.2012	28,57	0,50	0,165	0,090	0,95	0,675	0,168	0,084	9,03
F č.4	26.1.2012	31,75	0,46	0,187	0,074	0,99	0,607	0,128	0,066	9,15
F č.5	31.1.2012	31,67	0,56	0,183	0,139	0,84	0,521	0,183	0,064	9,20
F č.6	2.2.2012	29,06	0,52	0,178	0,092	0,86	0,571	0,154	0,060	9,13
	PRŮMĚR	29,47	0,512	0,181	0,089	0,935	0,567	0,152	0,074	9,13

Pro posouzení vhodnosti využití digestátu jako hnojiva byla dále laboratorní analýzou zjištěna přítomnost těžkých kovů. Odběr vzorků proběhl 22. 2. 2012 pověřeným pracovníkem BPS. Celkem bylo odebráno 8 litrů fugátů do 6 PET lahví (2 x 1 a 4 x 1,5 l). Jednotlivé lahve se vzorky byly po odběru uloženy do chladicího zařízení a poté transportovány do Národní referenční laboratoře ÚKZUZ, konkrétně do regionální pobočky v Plzni. Zde byly vzorky analyzovány metodou absorpční spektrometrie

Tab. 2 Obsah jednotlivých těžkých kovů v digestátu

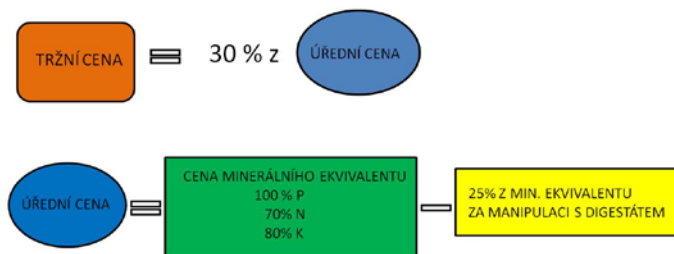
Prvek	Kadmium (Cd) v sušině	Olovo (Pb) v sušině	Rtuť (Hg) v sušině	Arsen (As) v sušině	Chrom (Cr) v sušině	Měď (Cu) v sušině	Molybden (Mo) v sušině	Nikl (Ni) v sušině	Zinek (Zn) v sušině
Množství	0,4916	15,26	0,06006	4,781	21,53	24,23	9,784	15,91	126,5
Limit	2	100	1	10	100	100	5	50	300

V rámci výzkumu byla provedena zkouška výhřevnosti fermentátu, kterou vypracovala společnost TŮV NORD Czech s.r.o., Laboratoře a zkušebny v Brně. Analýza byla realizována v laboratořích analytické a energetické chemie v Brně.

Tab.3 Výsledky zkoušky výhřevnosti digestátu

Stanoveno	Vzorek v dodaném	Vzorek bezvodý	Hořlavina vzorku
Voda hrubá (%)	-	-	-
Voda zbytková (%)	-	-	-
Voda celková (%)	43,80	-	-
Popel při 550°C (%)	13,30	23,42	-
Hořlavina (%)	43,59	76,58	100,00
Spalné teplo při 25°C	8694	15 274	19 945
Výhřevnost při 25°C	7 021	14 193	18 534
Prchavá hořlavina (%)	-	-	-
Neprchavá hořl. (%)	-	-	-
Vodík (%)	2,81	4,93	6,44
Uhlík (%)	-	-	-
Dusík (%)	0,98	1,73	2,26
Kyslík (%)	-	-	-
Síra prchavá (%)	0,25	0,43	0,56
Síra v popelu (%)	0,07	0,13	-
Síra veškerá (%)	0,32	0,56	-

Po vyhodnocení množství živin v digestátu jsem pomocí vzorce výpočtu tržní ceny digestátu vypočítala finanční částku, za kterou by měla být prodávána jedna tuna.

Obr. 1 Výpočet tržní ceny digestátů^[8]

Poté jsem porovnávala ceny při prodeji digestátů jako hnojiva a jako paliva.

Tab. 4 Předpokládané a průměrné předpokládané ceny hnojiv pro jaro 2012

UKAZATEL	CENA v Kč/kg	PRŮMĚRNÁ CENA v Kč/kg
N	22 – 25	23,5
P ₂ O ₅	22 – 23	22,5
K ₂ O	17 - 18	17,7

Vhodnost využití digestátů jako hnojiva

Současné výsledky průzkumu zemědělské půdy v ČR poukazují na její zhoršující se stav. Při porovnávání výsledků agrochemických zkoušek s rozmezím 10 – ti let od roku 1999 do roku 2008 bylo zjištěno, že dochází k okyselení půd, snížení obsahu přístupného draslíku, fosforu a vápníku^[6]. Za poklesem makroprvků v půdách může stát nárůst cen minerálních hnojiv a pokles chovu hospodářských zvířat, kterým se snižuje možnost aplikace organických látek na půdu, které jsou obsaženy ve statkových hnojivech. Z hlediska množství statkových hnojiv by v ideálním případě měla připadnout 1 dobytčí jednotka na 1 ha zemědělské půdy v ČR. Ve skutečnosti však připadá na 1 ha pouze 0,3 dobytčí jednotky a to se projevuje na ztrátě půdní síly (Dostál, Rychter, 2008). Podle výzkumného úkolu Interní grantové agentury MENDELU se používáním digestátů jako hnojiva do půdy dostávají potřebné makro- i mikroživiny. Problémem je však pokles obsahu uhlikatých látek, jelikož převážná část uhlíku byla právě v procesu anaerobní fermentace přeměněna na žádaný metan a oxid uhličitý (bioplyn) a to na poloviční i nižší hodnotu. Tím se poměr C:N v digestátu snižuje. Dalším problémem je, že dusík je v digestátu obsažen ve formě amonné a při aplikaci hrozí jeho uvolňování do atmosféry^[2,4] Obsah uhlíku a tím i hnojivý účinek digestátu zle zvýšit přidáním posklizňových zbytků (slámy). Digestát je tedy za předpokladu úpravy poměru C:N hnojivem, které může pomoci k udržení současné úrovně půdní úrodnosti. Podle zprávy pana prof. Stanislava Kužela o efektivním využití digestátů pro časopis energie 21 je „Stabilní organická hmota pevné fáze digestátů výborným, pomalu se rozkládajícím prostředkem pro zlehčení půd a úpravu jejich

vlastností. Zvýšení provzdušenosti takových půd může mít větší výnosový efekt, než intenzivní hnojení půdy se špatnými fyzikálními vlastnostmi.“^[5]

Popis a hodnocení digestátů jako paliva

Digestát po procesu anaerobního vyhnívání obsahuje už jen špatně rozložitelnou, stabilní organickou hmotu. Míra stability, hloubka degradace organické hmoty a tím i výtěžek bioplynu závisí na teplotě procesu. V bioplynových stanicích s mezofilním režimem vzniká digestát s mnohem horší kvalitou organické hmoty. (Ve starším typu bioplynových stanic, které využívaly psychrofilní režim, vznikala z hlediska kvality organické hmoty lepší digestát. Tyto bioplynové stanice však převážně zpracovávaly kanalizační kaly.) A právě tato velmi stabilní, špatně rozložitelná hmota může být dále využita pro výrobu energie spalováním.^[50] Při vylišování nebo částečném vysušení digestátu se odstraní nežádoucí voda. Na typu materiálu i na obsahu vody závisí výhřevnost materiálu. Dá se říct, že čím více bioplynu při anaerobní digestaci vznikne, tj. čím více uhlíku se uvolní ve formě sloučenin metanu a oxidu uhličitého, tím méně uhlíku zůstane na proces hoření a tím méně tepla při spalování vznikne. Voda obsažená v digestátu snižuje jeho výhřevnost, protože se materiál musí nejprve vysušit a až teprve potom začne hořet a uvolňovat požadované teplo.^[5]

Nejčastějším způsobem úpravy digestátů jako paliva je výroba pelet, tedy granulí, které jsou vyráběné na potlačovaných matricových lisech pod vysokým tlakem, což způsobuje jejich vysokou hustotu důležitou pro minimalizaci objemu paliva na jednotku energetického obsahu.^[2] Spalováním digestátů se ale do ovzduší dostávají látky jako chlór v iontové formě a při spalovacích teplotách od 350 – 700 °C z nich mohou vznikat jedovaté a karcinogenní polychlorované dioxiny a dibenzofurany. Při obsahu draslíku, síry nebo sodíku vznikají spalováním silně korozivní spaliny a teplota tání popela se rapidně snižuje.^[1]

V článku Termické využití separátu po anaerobní fermentaci biologicky rozložitelných odpadů od ing. Romana Koutného se diskutuje o tom, že *“digestát (kal s 25% sušiny) ani separát samotný či v příměsí s biomasou není zrovna ideální palivo a rozhodně není šetrný k životnímu prostředí.“* Stejně tak jako autor článku i společnost EUROFERN s.r.o., která se zabývá výstavbou a provozem technologií zpracování odvodněných čistírenských kalů doporučuje *“spalovat digestát v zařízeních, která jsou vybavena čištěním i monitoringem spalin, aby nedocházelo k vypouštění škodlivých látek do ovzduší”* (Koutný 2010).

VÝSLEDKY A DISKUSE

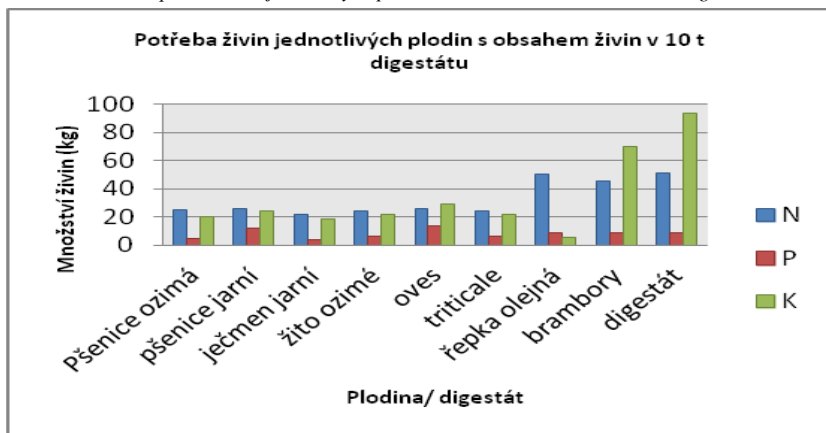
Žďár nad Sázavou se nachází v bramborářské výrobní oblasti s hnědými slabě kyselými až kyselými půdami s převážně dobrým až vysokým obsahem fosforu, vyhovujícím až dobrým obsahem draslíku, hořčíku a vápníku. Při pěstování plodin je třeba do půdy dopravit takové množství živin, které pěstované plodiny vyžadují. Převážně se zde pěstují obilniny, brambory a řepka olejná.

V této diplomové práci jsme zjistila, jaký je obsah základních živin v digestátu a tedy, z jaké části by mohl nahradit průmyslová hnojiva. Z výsledků laboratorní zkoušky vyplývá, že pH digestátu je zásadité o průměrné hodnotě 9,13. Obsah organických látek dosahuje téměř 57%. V jedné tuně digestátu je obsaženo 5,12 kg N, 0,89 kg P, 9,35 kg K, 5,67 Ca a 1,52 kg Mg.

Z těchto hodnot jsem stanovila poměry C: N, K : Mg a N : P : K. Poměr C: N roven 19,1: 1. Vysoký obsah organických látek (téměř 57%) je způsoben příměsí dřevní štěpky do procesu anaerobní fermentace, při kterém se dřevní hmota nerozkládá a z uhlíku v ní obsaženém nevzniká bioplyn. Vysoký obsah organických látek by vzhledem ke snižující se hodnotě v zemědělských půdách mohl být přínosný. Poměr K: Mg je roven 6,15 : 1. Draslík a hořčík působí ve výživě rostlin jako antagonisté a proto by jejich optimální poměr měl být roven 1. Jelikož je obsah draslíku 6,15 – krát vyšší, než obsah hořčíku a to by se mohlo při hnojení negativně projevit. Proto by v případě využití digestátu jako hnojiva bylo vhodné doplnit množství hořčíku dávkou přibližně 7,8 kg na 1 t

hnojiva. Poměr zastoupení živin N : P : K je 5,75 : 1 : 10,5. Z obrázku č. 2 je patrné, jakou část NPK hnojiv, které jednotlivé plodiny potřebují, by digestát mohl pokrýt na produkci 1 t zrna, hlíz atd. Pro vysoký obsah draslíku by digestát mohl být použit na hnojení brambor, které mají oproti ostatním plodinám na přísun draslíku vyšší nároky.

Obr. 2 Porovnání potřeb živin jednotlivých plodin s obsahem živin v 10 tunách digestátu



Chemickou zkouškou byla zjištěna v analyzovaném vzorku digestátu dvojnásobná hodnota molybdenu, než je dovolený limit. Tato limitní hodnota byla po odevzdání mé diplomové práce navýšena z 5 mg na 20 mg /kg a proto již nepředstavuje z hlediska posouzení toxicity žádný problém.

Topnou zkouškou byla pro vysoký obsah organických látek ve vzorku s původním obsahem vody 43,8 % stanovena výhřevnost materiálu 7 021 kJ. kg⁻¹. Vlhkost materiálu by pro jeho spalování nebyla překážkou, protože technologie úpravy paliva, kterou ve firmě ŽĐAS a.s. používají, je pro vlhký materiál vybavená dosušovacími zařízeními.

Podstatným výsledkem pro posouzení využití digestátu je cena, za kterou by byl buď jako hnojivo nebo jako palivo prodán. Tržní cenu hnojiva jsem vypočítala pomocí vzorce, ve kterém se vychází z předpokládané ceny minerálních hnojiv pro rok 2012, ztrát živin a ceny za manipulaci. Ve výpočtu se také zohledňuje uživatelské riziko hnojení digestátem, které představuje 70% snížení ceny. Cena digestátu pro hnojení je 53,25 Kč/t. Při prodeji a následním energetickém využití firmou ŽĎAS a.s. by jedna tuna stála 500 Kč/t. Při prodeji digestátu jako kompostu se cena za 1 t pohybuje okolo 400 Kč, přičemž je tato cena nezahrnuje náklady na dopravu. Z ekonomického hlediska se nejlépe jeví prodej digestátu jako paliva.

Tab. 5 Stanovení ceny živin z předpokládané ceny pomocí minerálního ekvivalentu^[9]

UKAZATEL	PRŮMĚRNÁ	KOEFICIENT	MNOŽSTVÍ	CENA
N	23,5	0,7	5,12	84,224
P ₂ O ₅	22,5	1	0,89	20,025
K ₂ O	17,7	0,8	9,35	132,396

Ačkoliv by prodej paliva znamenal nejvyšší výtěžek z 2 možných variant, je na způsob následného využití digestátu potřeba pohlížet nejen z finančního hlediska, ale také z hlediska možného přínosu pro životní prostředí. Současná vláda má na jednu stranu snahu vytvářet a zesilovat opatření na ochranu půd, ale na druhou stranu se snaží podporovat energetické využití bioodpadu, který by v problematice ochrany půd např. vodní a větrné eroze či nedostatku organické hmoty v půdách mohl sehrát nemalou roli. Jak uvádějí Dufková, Podhrázská (2005):*“ Problémem zvýšení eroze půd, způsobeným z velké části velkovýrobním způsobem hospodaření, byl u nás dříve značně podceňen a následky zrychlené eroze zemědělských půd vážně ohrožují její úrodnost”*. S klesající živočišnou výrobou klesá i přísun organických látek do půdy. Podle Nováka a Vopravila (2008) je *„ půdní organická hmota do určité míry podstatou života půdy. Je nezbytná k udržení půdní struktury, k zadržování vody, jako rezervoár živin a jako pufrací médium, vyrovnávající např. vlivy kyselých hnojiv. Je nutná k optimálnímu biologickému životu půdy.“* Množství organických látek v půdě je možno udržovat vhodnou agrotechnickou a dodáváním organických hmot do půdy.(Novák, Vopravil 2008). Snížení přísunu organické hmoty do půdy se primárně projeví na kvalitě půdy, což má přímý vliv na kvalitu rostlinné produkce. Jak uvádí Vach, Javůrek a Šimon (2008) *„ Je všeobecně známo, že nedostatečné hnojení statkovými hnojivy během několika let, zvláště na méně úrodných půdách, znamená pokles rostlinné produkce o 10 až 20 % “*.

ZÁVĚR

Bylo Digestát pocházející z bioplynové stanice ve Žďáře nad Sázavou je bezesporu cenným materiálem jak pro jeho vysoký obsah organické hmoty, tak pro minerální složení. Uvážím-li fakt, že jde v podstatě o odpad po procesu anaerobní fermentace, je z environmentálního hlediska jeho opětovné využití a navrácení živin zpět do přírodního koloběhu látek krokem, který by mohl přispět ke zlepšení půdní kvality. V praxi se digestát běžně aplikuje zpět na pole, protože část živin, které pěstované plodiny z půdy vyčerpají, se touto cestou navracují zpět. K tomuto způsobu využití bych se přikláněla i z toho důvodu, že zkoumaný digestát (v rámci mé diplomové práce) nemá parametry, které by zabráňovaly jeho aplikaci na půdu. Jediným problémem může být dvojnásobný obsah molybdenu ve vzorku digestátu, jelikož molybden spadá do kategorie rizikových prvků, jejichž množství v hnoјivu je limitováno. Pokud by nadlimitní množství molybdenu bylo překážkou, navrhovala bych, aby proběhla analýza, pomocí které by se dalo zjistit, co je zdrojem nadměrného množství Mo a zda je možné tento zdroj odstranit. Důležitým faktorem, který má vliv na rozhodnutí o využití digestátu, je poptávka. Pokud nebude o takové hnoјivo zájem a nebude pro něj zajištěn odbyt, nebude firma motivována k produkci hnoјiva, ale paliva, které je mimo jiné i finančně výhodnější. Primárním principem BPS není nakládání s digestátem za účelem finančního zisku, ale produkce bioplynu a jeho prodej. Digestát je pouze vedlejší produkt, který není hlavním předmětem činnosti. Jestliže by mohl následně posloužit ke zlepšení stavu půdy a tím i životního prostředí, zamyslela bych se nad tím, co je prioritou, zda ekonomický, či environmentální přínos. Vzhledem k tomu, že princip BPS vychází se snahy omezit závislost na fosilních palivech a je úzce spjat s šetrným přístupem k ŽP, navrhla bych využití digestátu jako hnoјiva.

LITERATURA

1. BROŽEK, J., 2011: *Využití reaktoru s kalovým mrakem a externím separátorem biomasy pro výrobu metanu ze substrátu pro BPS Chotýčany, zpracovaném technologii IFBB (Integrated Generation of Solid Fuel and Biogas from Biomass)*. Diplomová práce, JČU, České Budějovice, 57 s. Dostupné z: theses.cz/id/rs3kzn/Ji_Broek_diplomov_prece.pdf
2. ČUMPL, R., 2011: *Žďár nad Sázavou: Oficiální stránky města památky UNESCO*. Databáze online [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: <http://www.zdarns.cz/mestsky-urad/zodboru/UAP2010/kartogramy/13.pdf>.
3. DOSTÁL, J., RICHTER, R. 2008: *Porovnání kvality kejdy s digestátem z bioplynových stanic a jejich využití ke hnoјení zemědělských plodin*. In: Kukuřice v praxi. MZLU v Brně. ISBN 978-80-7375-135-7.
4. KRATOCHVÍLOVÁ, Z., HABART, J., SLADKÝ, V., 2009: *Průvodce výrobou a využitím bioplynu*. CZ Biom, Praha, 155 s. ISBN 978-80-903777-5-2
5. KUŽEL, S., 2010: *Jak efektivně využít digestát?*. Energie 21., Databáze online [cit. 2012-03-01]. Dostupné z: http://www.energie21.cz/archiv-novinek/Jak-efektivne-vyuzit-digestat__s303x46878.html

6. LOŠÁK, T., HLUŠEK, J., 2011: *Jak přistupovat k výživě a hnojení kukuřice při snižujících se zásobách živin v půdě?* In: Kukuřice v praxi 2011. MENDELU, Brno. ISBN 978-80-7375-477-8
7. NOVÁK, P., VOPRAVIL J.: 2008: AGRO Magazín – Pole, stáje, technika. *Degradační vývoj půdy*. 1/2008, 63 s
8. Ústní sdělení – DOSTÁL J., (AGROEKO Žamberk s.r.o.)
9. Ústní sdělení – FLORIÁN, M., (ÚKZUZ)
10. VACH, M., JAVŮREK, M., ŠIMON, J., 2008: AGRO Magazín – pole, stáje, technika. *Hlavní pěstitelská opatření v technologii polních plodin z agroekologických hledisek*. 9/2008, 63 s

CHARAKTERISTICS OF SELECTED TYPES OF COMPOSTS AND THEIR IMPACT ON SOIL

VLASTNOSTI VYBRANÝCH DRUHŮ KOMPOSTŮ A JEJICH VLIV NA
PŮDU

Plošek L.^{1,2}, Elbl J.¹, Záhora J.¹, Groda B.²

¹Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xplosek@mendelu.cz

ABSTRACT

With the advent of excessive amounts of mineral fertilizers in conventional agriculture, soil degradation in Europe has been occurring. Excessive use of mineral fertilizers also carries risks for surface water and groundwater. Therefore it is necessary to increase the use of organic fertilizers, such as compost. Correct application of compost into soil can improve physicochemical properties of the soil, it improves the activity of soil microorganisms and it also affects soil fertility. The assessment of the impact of composts must be based on appropriate criteria. In this work composts and control soil are assessed on the basis of microbial composition, amount of soil organic matter and phytotoxicity test.

Key words: compost, soil, microbial communities, soil organic matter

Acknowledgments: This work was supported by the project National Agency for Agriculture Research reg. No. QJ1220007.

ÚVOD

Stav půdy v EU se neustále zhoršuje, takový závěr vyplývá z poslední zprávy Evropské komise z února 2012. Důvody tohoto zhoršení jsou eroze, zábor volné půdy, acidifikace, úbytek půdní organické hmoty apod. (COM (2012) 46, MZV ČR).

Úbytek půdní organické hmoty (POH) přímo souvisí se špatným hospodařením na zemědělsky využívané půdě. Laegreid et al. (1999) uvádí, že úbytek POH se týká zemědělsky využívaných půd, kde nedocházelo k pravidelnému střídání plodiny nebo kde jsou nadměrně používána minerální hnojiva.

Vztah mezi syntetickými hnojivy, půdní mikrobiální biomasou a množstvím půdní organické hmoty, byl vědci několikrát prokázán. Dusík obsažený v hnojivech podpoří činnost půdní mikroflóry, která jej následně zpřístupní rostlinám. Na druhou stranu zvýšená činnost mikroorganismů sebou nese vyšší nároky na energii, kterou ovšem mikroorganismy získávají přeměnou uhlíku z půdní organické hmoty. To vede postupnému snižování obsahu půdní organické hmoty vyjádřené v uhlíkovém ekvivalentu (SPARLING, 1997).

Používání minerálních hnojiv sebou také nese riziko nadměrné kontaminace povrchových a podpovrchových vod, převážně se jedná o znečištění látkami obsahující ve svých molekulách dusík.

Příkladem takto dotčené lokality jsou půdy v okolí Březové nad Svitavou, kde vlivem nadměrného používání minerálních dusíkatých hnojiv dochází k výrazným únikům amoniakálního a dusičnanového N do podzemních vod, což zároveň negativně ovlivňuje zásobu POH a jiné půdní vlastnosti. V Březové nad Svitavou se zároveň nalézají nejvýznamnější zdroje pitné vody pro město Brno, z toho důvodu únik živin do povrchových a podzemních vod může mít zároveň negativní dopady na zdraví lidí (ELBL, 2010).

Možností jak opět zvýšit množství půdní organické hmoty v půdě a tím podpořit činnost půdních mikroorganismů je využívat ve větší míře organické hnojiva. Jedním z takovýchto hnojiv může být produkt aerobního rozkladu biologicky rozložitelných odpadů – kompost.

Kompost je organické hnojivo s širokým poměrem živin (C:N až 30:1) a s pomalu působícími formami dusíku. Formy dusíku a obsah živin má zásadní význam při aplikaci kompostu z pohledu ochrany životního prostředí, zejména s ohledem na povrchové a podzemní vody. Živiny jsou plynule uvolňovány pro potřebu rostlin a nejsou vyplavovány do spodních vod.

MATERIÁL A METODIKA

U 3 vzorků kompostů, 1 vzorku rekultivačního substrátu a 1 vzorku půdy byl proveden mikrobiální rozbor na stanovení počtu kolonií tvořících jednotek (KTJ), dále bylo provedeno stanovení půdní organické hmoty (spalitelných látek) a test fytoxicity. Pro přesnější interpretaci výsledků bylo rovněž změřeno aktivní pH a stanovena vlhkost a sušina u všech substrátů.

Vzorky kompostů a rekultivačního substrátu byly odebrány z Centrální kompostárny Brno - CKB (Černý drak, Zelený drak, Šedý drak – rekultivační substrát) a kompostárny CMC Náměšť (CMC kompost), kontrolním vzorkem půdy byla orníční vrstva z lokality Březová nad Svitavou. Odběr vzorků vycházel z ČSN ISO 10381-6 Kvalita půdy - Odběr vzorků - Část 6. Minimální množství vzorku pro mikrobiální analýzu je 500 g (MATĚJŮ, 1999). Odebrané vzorky půdy a kompostů byly po převozu homogenizovány a prosety na sítu o velikosti ok 2 mm (MATĚJŮ, 1999). Takto upravené vzorky byly uloženy v označených vzorkovnicích ve skříňovém termostatu při teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Stanovení aktivní půdní reakce

Stanovení pH (H_2O) vycházelo z metodiky ČSN EN 46 5735 Průmyslové komposty.

Stanovení momentální vlhkosti a sušiny

Stanovení momentální vlhkosti a sušiny vycházel z metodiky ČSN EN 46 5735 Průmyslové komposty.

Výpočet se provedl dle uvedených rovnic, počet opakování byl 3 ($n=3$).

$$w = \frac{(m_1 - m_2) - 100}{m_1}$$
$$dm = \frac{m_2 - 100}{m_1}$$

w – momentální vlhkost (%)

dm – množství sušiny (%)

m_1 – hmotnost vzorku před sušením (g)

m_2 – hmotnost vzorku po vysušení (g)

Metodika mikrobiálních analýz

Stanovení indikátorových skupin vycházelo z metodiky Mikrobiologicko – hygienické vyšetřovací metody pro půdy, komposty, a jiná neminerální hnojiva, čistírenské kaly a další tekuté a tuhé odpadní materiály (KOMÁREK, 1998).

Příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění byla provedena dle ČSN EN ISO 6887-1. Počet opakování byl 3 (n=3).

Jako indikátorové skupiny mikroorganismů byly zvoleny: celkový počet mikroorganismů, sporulující mikroorganismy, aktinomycety, plísňe a kvasinky, koliformní bakterie a bakterie rodu *Azotobacter*.

1) Celkový počet mikroorganismů

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito Nutrient Agar No. 2 (Himedia, India). Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 dnů.

2) Sporulující mikroorganismy

Zkumavky se suspenzemi jednotlivých substrátů byly nejprve podrobeny procesu pasterizace při teplotě $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Pro stanovení sporulujících mikroorganismů ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito Nutrient Agar No. 2 (Himedia, India), Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dnů.

3) Aktinomycety

Pro stanovení aktinomycet ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito Actinomycetes Agar (Himedia, India). Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 dnů.

4) Plísňe a kvasinky

Pro stanovení plísni a kvasinek ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito Chloramphenicol Glucose Agar (Biokar Diagnostics, France). Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 dnů.

5) Koliformní bakterie

Pro stanovení koliformních bakterií ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito VRBL Agar (Biokar Diagnostics, France). Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin.

6) Bakterie rodu *Azotobacter*

Pro stanovení bakterií rodu *Azotobacter* ve vzorcích bylo jako kultivační medium použito Ashby's Mannitol Agar (Himedia, India). Petriho misky s 1 ml suspenze byly kultivovány při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dnů.

Stanovení půdní organické hmoty (spalitelné látky)

Stanovení půdní organické hmoty vycházelo ze stanovení množství spalitelných látek dle metodiky ČSN EN 46 5735 Průmyslové komposty. Počet opakování byl 3 (n=3).

Test fytotoxicity

Analýza fytotoxicity jednotlivých substrátů vycházela z Řeřichového testu fytotoxicity uvedeného v Metodické pomůcce – Kompostování přebytečné travní biomasy.

Metodika vlastního testu:

Do Petriho misek se vloží filtrační papír, který pokryje dno misky, a ovlhčí se pipetou odměřeným 1 ml výluhu. Na takto upravený filtrační papír se pravidelně rozmístí 20 semen řeřichy seté (*Lepidium sativa*). Pro každý vzorek je potřeba použít alespoň 4 Petriho misky s 20 semeny (celkem tedy 80 semen). Připravené a uzavřené misky se vloží do termostatu, kde semena klíčí 24 hod. za tmy při teplotě 28 °C. Současně s testovanými výluhy se do termostatu vloží také kontrolní vzorek pouze s destilovanou vodou. Po 24 hodinách se změří délky všech kořínků. Výsledný index klíčivosti, který je ukazatelem zralosti či toxicity kompostu, se získá dle vztahu:

$$IK = \frac{k_v \cdot l_v}{k_k \cdot l_k}$$

IK - index klíčivosti (%)

k_v - klíčivost vzorku (%)

k_k - klíčivost kontroly (%)

l_v - průměrná délka kořínků vzorku (mm)

l_k - průměrná délka kořínků kontroly (mm)

Index klíčivosti je jako kvalitativní znak stability platný pouze v souvislosti s ostatními parametry deklarovanými podnikovou normou. Při hodnotách do 50 % index uvádí nepoužitelnost kompostu k přímé aplikaci, od 60 do 80 % dává možnost aplikace s určitým rizikem poškození citlivých rostlin, při hodnotách 80 % a vyšších deklaruje zralý kompost. Je-li index klíčivosti mezi 60 – 80 %, lze říci, že je kompost ve fázi přeměny a má nejlepší hnojivý účinek. Nad 80 % tento účinek klesá a vliv humusu je silnější, tzn. že živiny jsou více vázány. Uvolňování dusíku a fosforu je pomalejší a nedochází k vyplavování živin do spodních vod (HEJÁTKOVÁ, K. et al., 2007).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Aktivní půdní reakce

Tab. 1: Výsledky aktivní půdní reakce (pH/H₂O)

Substrát	pH/H ₂ O
kontrola	5,81
Černý drak	7,82
Šedý drak	7,71
Zelený drak	8,11
CMC	8,42

Hodnoty aktivního pH pro komposty jsou slabě bazické, pH zralých kompostů by měla být dle ČSN EN 46 5735 v rozmezí 6 – 8,5, tzn. tomuto kritériu všechny zkoumané komposty vyhovují. Komposty by se vzhledem ke svému složení a původu měly vyznačovat spíše mírně bazickým pH než kyselým. Rekultivační substrát Šedý drak, rovněž nebyl příliš ovlivněn přidanou zeminou a pH je slabě bazické.

Kontrola (ornice) se naopak vyznačuje kyselým pH, což je charakteristické pro hlavní půdní jednotky (HPJ) 25 a 31, které se vyskytují v lokalitě Březové nad Svitavou. Otázkou ovšem je nakolik je původní slabě kyselé pH ovlivněno zemědělskou výrobou.

Momentální vlhkost a sušina

Tab. 2: Výsledky stanovení momentální vlhkosti (w) a množství sušiny (dm)

Substrát	w (%)	dm (%)
kontrola	21,25	78,75
Černý drak	43,69	56,31
Šedý drak	33,32	66,68
Zelený drak	41,27	58,73
CMC	37,75	62,75

Vlhkost zralých kompostů má být dle ČSN EN 46 5735 v rozmezí 45 – 60 %. Z výsledků je patrné, že v daném rozmezí se nenachází žádný ze zkoumaných kompostů, toto může být způsobeno ztrátou vlhkosti od ukončení procesu kompostování nebo způsobem uskladněním kompostů, kdy je kompost z ekonomických důvodů nejčastěji uložen na volné ploše. U substrátu ŠD je vlhkost ovlivněna zeminou, která se přidává do kompostu za účelem výroby rekultivačního substrátu. Vlhkost zeminy u ornice byla ovlivněna stávajícími klimatickými podmínkami, které předcházely odběru vzorků.

Mikrobiální rozbor substrátů

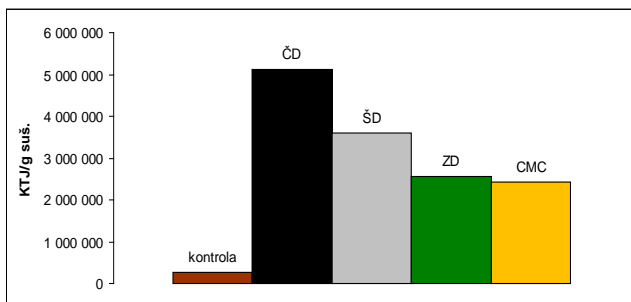
V rámci mikrobiálního rozboru se hodnotili indikátorové skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, sporující mikroorganismy, aktinomycety, plísně a kvasinky, koliformní bakterie zahrnující bakterii *E. coli* a vzdušný dusík fixující bakterie rodu *Azotobacter*.

Naměřené počty kolonií mikroorganismů jednotlivých indikátorových skupin jsou zaznamenány v tabulce s výsledky mikrobiálního rozboru. Výsledky jsou uváděny v jednotkách KTJ/g suš. (kolonií tvořících jednotky na 1 gram sušiny vzorku). Pro přehlednost jsou počty jednotlivých skupin mikroorganismů všech substrátů zobrazeny v grafech na obrázcích 1 – 6.

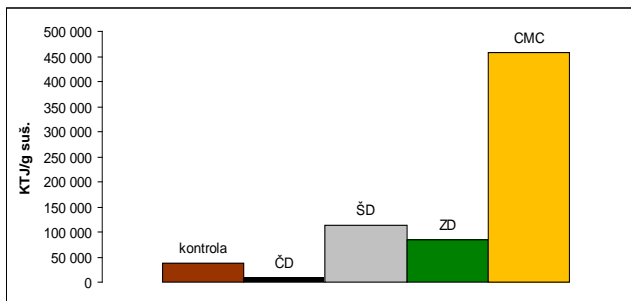
Tab. 3: Výsledky mikrobiálního rozboru

Substrát	CPM	Sporující bakterie	Aktinomycety	Plísně a kvasinky	Koliformní bakterie	N ₂ bakterie <i>Azotobacter</i>
kontrola	$2,7 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,40 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^2$	$7,6 \cdot 10^3$
Černý drak	$5,1 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$	$8,08 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^4$
Šedý drak	$3,6 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$4,57 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$
Zelený drak	$2,6 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^4$	$5,45 \cdot 10^4$	8	$3,3 \cdot 10^4$
CMC	$2,4 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,19 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$

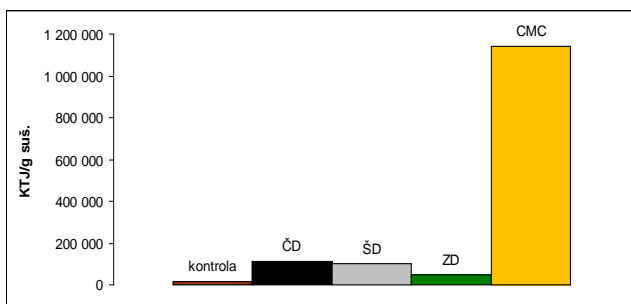
Obr. 1: Celkový počet mikroorganismů



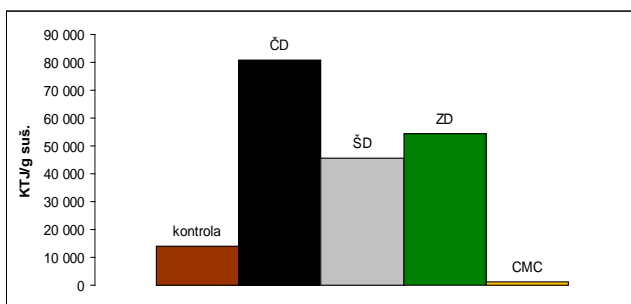
Obr. 2: Sporující mikroorganismy

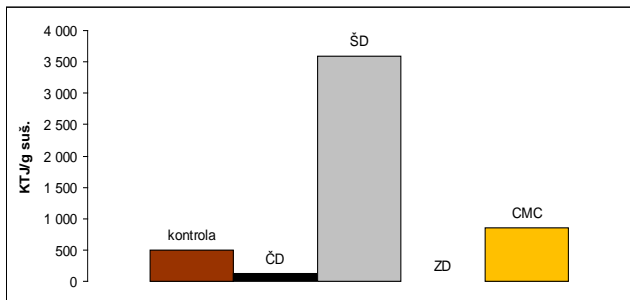
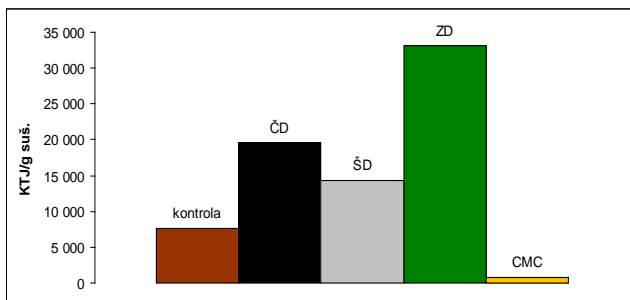


Obr. 3: Aktinomycety



Obr. 4: Plísně a kvasinky



Obr. 5: Koliformní bakterie (*E. coli*)Obr. 6: Bakterie rodu *Azotobacter*

Pokud porovnáme hodnoty jednotlivých skupin mikroorganismů u kompostů s kontrolním vzorkem, kterým byla orniční vrstva z lokality Březová nad Svitavou, tak lze konstatovat, že komposty dosahují téměř ve všech parametrech výrazně lepších hodnot než daný vzorek ornice. Údaje z literatury pro normálně fungující půdy udávají hodnoty pro CPM $10^6 - 10^9$ KTJ/g suš. a pro plísňe (mikromycety) $10^4 - 10^6$ KTJ/g suš. (GOBAT, ARAGNO, WILLY, 2004, FIALOVÁ, 2009). Z toho vyplývá, že ornice v Březové nad Svitavou je výrazně ochuzená o mikrobiální složku půdy, naopak hodnoty u všech kompostů se nacházejí v daném rozmezí hodnot.

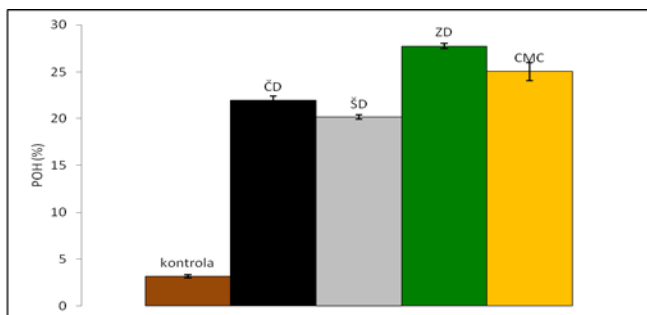
Lze rovněž pozorovat rozdíly mezi komposty z CKB a kompostárnou v Náměšti. Kompost v Náměšti se vyznačuje výrazným zastoupením v indikátorových skupinách Aktinomycety a sporulující mikroorganismy, naopak ve skupinách plísňe a kvasinky a vzdušný dusík fixující bakterie rodu *Azotobacter* je výrazně ochuzen oproti kompostům CKB.

Ve sledované skupině v půdě nežádoucích koliformních bakterií by u kompostů neměla být překročena hranice 10^3 KTJ/g kompostu pro koliformní bakterie (TESAŘOVÁ a kol., 2010). Tato hodnota byla překročena pouze u rekultivačního substrátu Šedý drak. Ačkoli se nejedná o kompost dle normy ČSN EN 46 5735 Průmyslové komposty, tak tokový substrát představuje potenciální riziko pro zemědělsky využívané půdy.

Stanovení půdní organické hmoty

Tab. 4: Výsledky stanovení půdní organické hmoty

Substrát	POH (%)
kontrola	3,16
Černý drak	21,99
Šedý drak	20,13
Zelený drak	27,75
CMC	25,03



Množství POH ornice (3,16 %) odpovídá hodnotám uváděných pro půdy v ČR (střední hodnoty pro zemědělské půdy 2 – 6 %), ovšem nižší hodnota pH nám může indikovat horší kvalitu POH, neboť nižší pH může značně omezovat mikrobiální aktivitu a tím pádem i proces mineralizace a humifikace. Rekultivační substrát Šedý drak se množstvím POH velmi blížil ostatním průmyslovým kompostům, z toho lze usuzovat, že pro výrobu daného substrátu bylo použito větší množství kompostu. Norma ČSN EN 46 5735 udává množství spalitelných látek v kompostech min. 25 %, tento limit nebyl splněn u kompostu ČD.

Test fytotoxicity

Tab. 5: Výsledky testu fytotoxicity

Substrát	k_v (%)	l_v (mm)	k_k (%)	l_k (mm)	IK (%)
kontrola (H ₂ O)	96,25	2,750	96,25	2,75	100
ornice	92,50	2,176	96,25	2,75	76,03
Černý drak	92,50	2,068	96,25	2,75	72,26
Šedý drak	91,25	1,973	96,25	2,75	68,00
Zelený drak	97,50	2,128	96,25	2,75	78,39
CMC	100	2,592	96,25	2,75	97,93

Z výsledku testu fytotoxicity vyplývá, že z pohledu vlivu na rostliny je nevhodnějším substrátem CMC kompost z kompostárny v Náměšti, kterým je možné hnojit i ty nejcitlivější rostliny. Naopak komposty z CKB svou fytotoxicitou odpovídají kompostům ve fázi přeměny, z toho důvodu nejsou vhodné pro použití pro citlivé rostliny.

ZÁVĚR

Z výsledků jednotlivých testů ornice z lokality Březová nad Svitavou, 3 druhů kompostů a 1 rekultivačního substrátu lze konstatovat, že komposty dosahují prakticky ve všech kvalitativních parametrech výrazně vyšších hodnot než kontrolní orníční vrstva. Z mikrobiálního hlediska jsou komposty zdrojem a zároveň zásobárnou živin a půdní mikroflóry a právě mikroflóra je zásadním činitelem pro zpřístupnění živin pro rostliny. Při porovnání kvalitativních parametrů pouze u kompostů je problematické říci, který kompost je kvalitnější, neboť všechny zkoumané komposty (ČD, ZD a CMC) jsou registrovány jako hnojivo dle zákona o hnojivech, tzn. musí splňovat základní podmínky dle normy ČSN EN46 5735. Proto pro posouzení je potřeba provést další testy, které budou rovněž zahrnovat vliv na produkci biomasy a schopnost zadržet minerální dusík v půdě.

LITERATURA

- 1) Elbl J. (2010): Dynamika úniku klíčových živin z jímací oblasti pro zásobování města Brna pitnou vodou. Bakalářská práce. MENDELU.
- 2) Fialová Z. (2009): Vliv vybraných fyzikálních faktorů na respirační aktivitu půdních mikroorganismů. Diplomová práce. MENDELU.
- 3) Gobat J.-M., Aragno M., Willy M. (2004): The living soil. Science Publishers Inc, 33-40, 337-360.
- 4) Hejátková K., et al. (2007): Metodická pomůcka - Kompostování přebytečné travní biomasy. ZERA, a.s.
- 5) Komárek L. (ed.) (1998): Mikrobiologicko – hygienické vyšetřovací metody pro půdy, komposty, a jiná neminerální hnojiva, čistírenské kaly a další tekuté a tuhé odpadní materiály. Mikrobiologicko – hygienické posouzení účinnosti procesu kompostování. In: Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, příloha 4/1998. Státní zdravotní ústav v Praze.
- 6) Laegreid M., Bøckman O. C., Kaarstad O. (1999): Agriculture Fertilizers and the Environment. CAB International, 97-104.
- 7) Matějů L. (2009): Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, pomocných růstových prostředcích a podobných matricích. In: Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, č. 1/2008 [2009]. Státní zdravotní ústav v Praze.

- 8) Sparling G. P. (1997): Soil Microbial Biomass, Activity and Nutrient Cycling as Indicators of Soil Health. In: PANKHURST, C. E., DOUBE, B.M., GUPTA, V. V. S. R. (eds.): Biological Indicators of Soil Health. CAB International, 97 – 156.
- 9) Tesařová M., Filip Z., Szostková M., Morscheck G. (2010): Biologické zpracování odpadů. MENDELU
- 10) COM (2012) 46: *The implementation of the Soil Thematic Strategy and on going activities*
- 11) Ministerstvo zahraničních věcí ČR: Stav půdy v EU se stále zhoršuje. 2012
[cit. 2012-03-12], dostupné na:
www.mzv.cz/representation_brussels/cz/evropska_unie/zivotni_prostredi/-zastupitelske_urady-representation_brussels-publish-cz-evropska_unie-zivotni_prostredi-stav_pudy_v_eu_se_stale_zhorsuje.html
- 12) ČSN EN 46 5735: Průmyslové komposty
- 13) ČSN EN ISO 6887-1: Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění.
- 14) ČSN ISO 10381-6: Kvalita půdy - Odběr vzorků - Část 6: Pokyny pro odběr, manipulaci a uchovávání půdních vzorků za aerobních podmínek pro studium mikrobiálních procesů, biomasy a diverzity v laboratoři.

APPLICABILITY OF BOWEN RATIO ENERGY BALANCE METHOD IN FETCH LIMITED CONDITIONS

APLIKOVATELNOST METODY BOWENOVA POMĚRU
V PODMÍNKÁCH S LIMITOVANÝM FETCH

Pozníková G.¹, Trnka M.^{1,2}, Fischer M.^{1,2}, Orság M.^{1,2}, Žalud Z.^{1,2}

¹Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Global Change Research Center AS CR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

E-mail: g.poznikova@gmail.com

ABSTRACT

Water plays a key role in the climatic processes of the Earth. In terrestrial ecosystems the main component of water loss is evapotranspiration. One of the standard techniques used to measure evapotranspiration indirectly is the Bowen ratio energy balance method (BREB). This study focuses on the quantification of errors caused by insufficient fetch (upwind distance from the edge of investigated cover) using data from two BREB systems obtained through intensive summer 2012 campaign. The measurement took advantage of one mobile and one fixedly positioned BREB systems employed at turf grass cover from the prevailing north-west wind direction surrounded by broadleaved trees, poplar stoolbed dirty road and buildings at experimental station in Domaníněk near Bystřice nad Pernštejnem. Surprisingly, the results showed no significant systematic deviation between the reference BREB with sufficient 180 m long fetch and mobile BREB positioned at fetches between 10 to 100 m. Moreover, it was not found any impact of the fetch on non-systematic errors leading to the conclusion that the fetch did not have any effect on the overall data quality and consistency. One of the explanations may be very similar response to soil moisture conditions of the selected contrasting living ecosystems and thus their similar Bowen ratios.

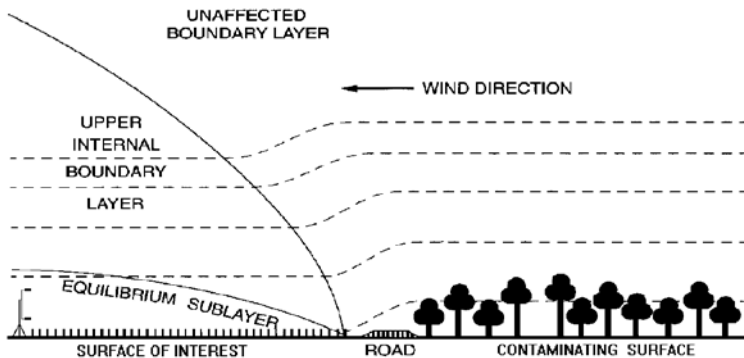
Key words: evapotranspiration, Bowen ratio energy balance method, limited fetch

Acknowledgments: This study was supported by the project CZ.1.07/2.3.00/20.0005: Excellence for Doctoral Studies at the Faculty of Agronomy at MENDELU for Following European Scientific Research Career. This activity is supported also by the Operational Programme of Education for Competitiveness of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project: Building up a multidisciplinary scientific team focused on drought, No. CZ.1.07/2.3.00/20.0248) the Soil Climate Atlas project funded by National Agency for Agricultural Research QI91C054, KONTAKT No. LH11010 and ME10128. Special thank belongs to Jiří Kučera from EMS Brno company and Martin Tuček for the calibration of the temperature and humidity sensors.

INTRODUCTION

Water plays a key role in the climatic processes of the Earth. Quantitative expression of all water within ecosystem can be described as water balance. In terrestrial ecosystems the main component of water loss is evapotranspiration (ET). One of the standard techniques to measure LE indirectly is the Bowen ratio energy balance method (BREB) (Heilman and Brittin, 1989). The BREB determines latent and sensible heat fluxes. The surface area that accounts for some large percentage of the measured flux (say more than 90 %) is called the source area of the measurement, and the horizontal distance from the sensor to the upwind discontinuity is called the fetch. The fetch divided by the sensor height is the fetch-to-height ratio. The surface downwind of the discontinuity is the surface of interest (Stannard, 1997). As Heilman and Brittin (1989) explain, as air moves downwind, after a change in surface roughness, it forms an internal boundary layer whose thickness increases with the fetch. For BREB it is required that temperature and humidity gradients are measured within the internal boundary layer that is in equilibrium with the surface (Heilman and Brittin, 1989). Fig. 1 shows the schematic of field layout, equilibrium sublayer and internal boundary layer using Stannard's (1997) picture.

Figure 1 Schematic of field layout for determining Bowen-ratio fetch requirements and approximate boundary layers (adapted from Stannard, 1997)



To ensure that measurements are made in the equilibrium layer the described minimum fetch-to-height ratios have been ranging from 10:1 (Panofsky and Townsend, 1964) to 200:1 (Dyer, 1965). General agreement considers the ratio 100:1 to be sufficient for the most measurements (Rosenberg et al., 1983) According to Heilman and Brittin (1989) calculations indicate that BREB may be less sensitive to inadequate fetch conditions when the Bowen ratio is small. It is often reality that a site

has not sufficient size. The micrometeorological measurements of LE are often affected to some degree by errors arising from limited fetch. Practically, fetch is often limited, and the measurements are somewhat affected by fluxes of sensible heat and water vapour from an upwind contaminating surface i.e. in this case dirt road, broadleaf trees, and buildings. That is why this study has been focusing on applicability of Bowen ratio energy balance method in fetch limited conditions. In particular, this study aims to deal with two hypotheses:

- 1) The measured evapotranspiration of the grass is increasing downwind from the possibly drier area due to the rising of equilibrium layer (Fig. 1).
- 2) As the wind blows along homogenous cover (turf grass) the overall data quality and consistency increases with fetch.

MATERIALS AND METHODS

This study takes advantage of BREB method which is based on rearrangement of the surface energy balance equation (Bowen, 1926). The surface energy balance equation is given by:

$R_n - G = H + LE$, where R_n is the net radiation flux, G is soil heat flux, H and LE are sensible heat and latent heat fluxes respectively (all in $W\ m^{-2}$), neglecting the energy used in photosynthesis and stored in canopy (Guo et al., 2007). The LE is basically evapotranspiration expressed in energy units ($LE = \lambda ET$). The Bowen ratio is defined as the ratio of sensible (H) and the latent (LE) heat

flux: $\beta = \frac{H}{\lambda ET}$ and based on the flux gradient relationship $\beta = \frac{\gamma K_H \partial T}{K_{LE} \partial e}$, where γ is psychrometric constant ($0.066\ kPa\ ^\circ C^{-1}$), K_H and K_{LE} ($m^2\ s^{-1}$) are eddy diffusivity for temperature and water vapour respectively, ∂T and ∂e are the vertical difference in temperature ($^\circ C$) and water vapour (kPa) respectively. According to the Bowen ratio similarity principle $K_H = K_{LE}$ and that is why they can be left out from the calculation. The combination of energy balance and BREB is then

following equation: $\lambda ET = \frac{R_n - G}{1 + \beta}$. To divide the available energy between the sensible- and the

latent-heat fluxes the temperature and humidity is measured at two heights above a surface (Savage, 2010). In this study the temperature and humidity were measured at two heights 0.4 m and 2 m above the surface using one mobile and one fixedly positioned BREB systems (EMS Brno, Czech Republic) employed at turf grass cover from the prevailing north-west wind direction surrounded by broadleaved trees, poplar stoolbed, dirty road and buildings. The experiment took place at an experimental field of the experimental station in Domanínek near Bystřice nad Pernštejnem in an area of the Czech-Moravian Highlands (Czech Republic, $49^\circ\ 31'\ N$, $16^\circ\ 14'\ E$ and altitude 530 m a.s.l.). The lawn was cut periodically to maintain 5–6 cm height of the turf grass. The data has been obtained through intensive summer 2012 campaign since 4th July to 10th October 2012. Before the meteorological stations were placed in the field for the first time all sensors were calibrated in the laboratory. After that, the BREB systems were placed next to each

other on the grassland of experimental station in Domaníněk in order to ensure the laboratory calibration was successful. This “field calibration” produced highly satisfactory results too. Subsequently, the mobile BREB system was moved to distance 10 m from the edge of homogenous cover (fetch = 10 m). Gradually, once in a week or two weeks (depending on the wind direction and occurrence of the anticyclonic weather conditions) this station was transferred to collect data from all fetches: 20, 25, 30, 40, 50 and 100 m. The dates and time of changes is showed in table 1 on the next page. Afterwards the data were calculated following BREB methodology and the suspicious data were removed according Guo et al. (2007). The remaining outliers were finally deleted graphically after visual control. In these calculations also data from another station were used. This station is positioned 100 m south from the fixedly positioned reference station and equipped with other auxiliary instrumentation - for more detail see Fischer (2012). Subsequently, the gathered data were filtered according to required wind directions between 230–300° from which the reference BREB was facing the longest fetch around 180 m.

Table 1 Dates and time of changing fetch and number of measured values

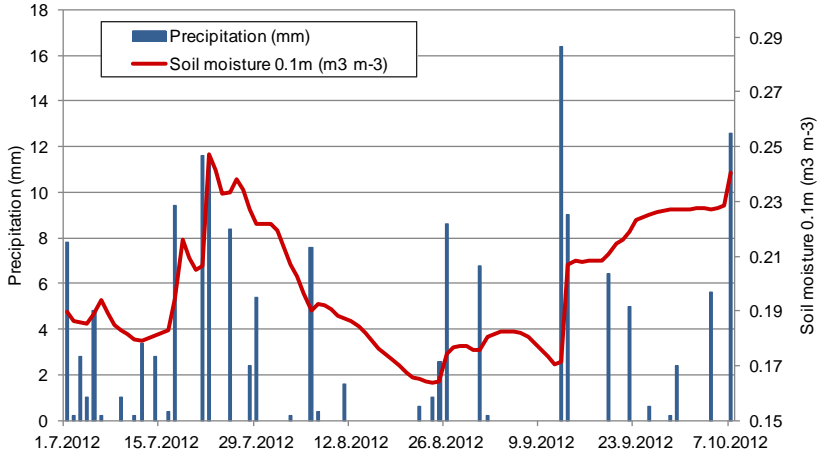
Number	Fetch (m)	Date	Time	N
1	10	11.7.	18:20	169
2	25	31.7.	9:15	84
3	40	10.8.	10:00	25
4	50	15.8.	9:14	51
5	100	23.8.	13:30	79
6	10	29.8.	10:10	28
7	20	6.9.	10:20	61
8	30	17.9.	17:20	27
9	50	27.9.	10:05	58
10	100	4.10.	9:20	28
The end of experiment		10.10.	10:00	

The evapotranspiration was calculated for three different BREB stations. Fixedly positioned BREB station with long fetch was considered as reference values. The LE was compared with the LE based on the data from the mobile station. The fetch of this station was being changed according to Tab. 1. The third BREB system placed nearby with limited 5 m fetch surrounded by bare soil with emerging weeds (maximum coverage was estimated to 10 %) served for confrontation.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to evaluate the dryness of the environment during the experiment the precipitation was compared with the long term average. The actual values are shown in following graph (Fig. 2). According to the long term average between 1981 and 2010 mean monthly precipitation in Domaníněk in July is 75.48 mm whereas this summer it was 3.0 % lower. In August it was 57.6 % lower than the long term average 69.41 mm and in September 20.0 % lower than the typical 50.28 mm.

Figure 2 Graph of precipitation (mm) in daily sums and soil moisture in 0.1 m (m³ m⁻³)



Figures 3, 4 and 5 show the examples of calculated LE for all three BREB stations in different weather conditions. Fig. 1 displays LE during wet conditions after rain. It can be mentioned that the difference between fixedly positioned BREB, mobile station with fetch 100 m, and BREB station with limited fetch 5 m is barely noticeable. On the other hand, while the weather conditions were drier the difference is much clearer as it is visible in the Fig. 5 when the mobile station had fetch 20 m. Fig. 4 shows the conditions in between.

Figure 3 Diurnal dynamics of evapotranspiration during wet conditions after precipitation and fetch 100 m

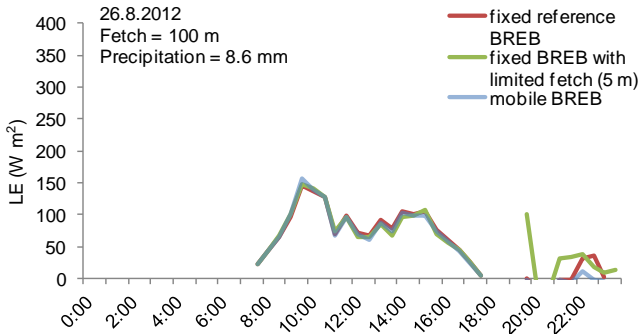
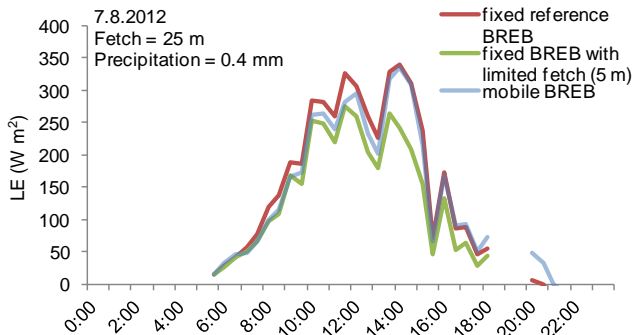
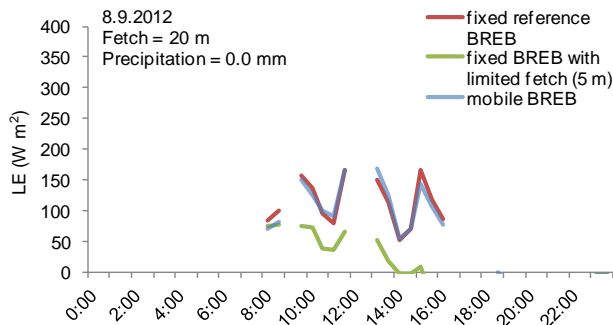


Figure 4 Diurnal dynamics of evapotranspiration during mild conditions and fetch 25 m*Figure 5 Diurnal dynamics of evapotranspiration with dry conditions and fetch 20 m*

Because of described results it can be stated that precipitation and subsequently soil moisture have considerable effect on the importance of fetch if LE is calculated. After the rain when the soil is refilled with water LE of reference, mobile and also fixed station with limited fetch, are basically the same. It means that in these conditions fetch itself does not play the key role for estimation of LE. On the other hand, when the weather conditions are dry the difference between fixed station with limited fetch and two other stations is emphasized (Fig. 5). Theoretically, if the two covers were more contrasting (irrigated lawn against dry bare soil) the effect of fetch would be more significant. In this part of article it can be summarized that the expected underestimation of calculated LE with shorter fetch in comparison with long fetch is negligible during wet conditions and even fetch shorter than 20 m can results in underestimation less than 10 %. This is also shown in the following Fig. 6 and 7. In the Fig. 6 the comparison of LE of fixed reference and mobile BREB system during the whole period is displayed. Linear regression line has slope 0.98 (2 % underestimation) and in the picture it is black. Two red dashed lines stand for the

slope 1.1 and 0.9 to demonstrate that the majority of values from the mobile BREB deviate mostly by $\pm 10\%$ from those measured at the fixed reference BREB.

Figure 6 Comparison of LE of fixed reference and mobile BREB, black linear regression line has slope 0.98, red dashed lines depict the slope 1.1 and 0.9.

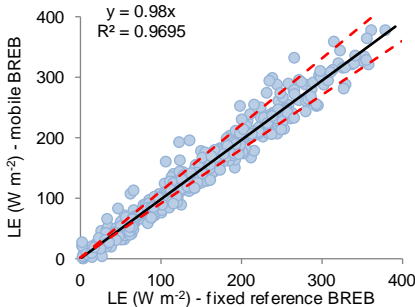
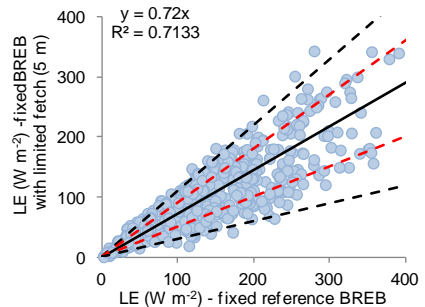


Figure 7 Comparison of LE of fixed reference and fixed BREB with limited fetch (5 m), black line has slope 0.72, red dashed lines have slope 0.9 and 0.5, and black dashed lines 1.1 and 0.3.



The graph in Fig. 7 shows the relation of LE (W m^{-2}) of fixed reference and fixed BREB with limited fetch. Two red dashed linear regression lines have slopes 0.9 and 0.5 which shows that most of the values for fixed BREB with limited fetch are underestimated between 10 and 50%. This is a result of the short 5 m fetch where the grassland is surrounded by bare soil. Overall, there is underestimation of 28% (slope 0.72). Two black dashed lines have slopes 1.1 and 0.3 and are displayed to demonstrate that fixed BREB system with limited fetch overestimate up to 10% but there are also values underestimating more than 70% although, there are not many of them. In general the underestimation station with short fetch occurs when the bare soil around the lawn is dry. In contrary, during wet conditions values calculated for short fetch can be very comparable with the ones for long fetch (fixed reference).

Furthermore, the LE from mobile BREB system and fixed station with long fetch were compared using statistical variables coefficient of determination (R^2), slope of linear regression line, mean bias error (MBE) and root mean square error (RMSE) according to Willmott (1982). The results are shown in subsequent figures (Fig. 8–10). It is obvious that even the random error (expressed as R^2 and RMSE) is not affected by the length of fetch. In other words, it means that fetch influences neither the data consistency nor their quality.

However, slow increase of the coefficients of determination (Fig. 8) and the slopes of linear regression lines (Fig. 9) can be observed, nevertheless, these trends are not statistically significant. Though, there is an unexpected result within the 10 m long fetch. This might be due to the sudden change of aerodynamical roughness caused by the transition from the area with high roughness (trees and shrubs) to the short aerodynamically smooth grass cover resulting in enhancement of the eddy diffusivities in a few first meters. Although the eddy diffusivities for temperature and water

vapour are expected to be the same (Stannard, 1997) and thus enhanced by the same portion, the latent heat flux is generally much higher in such kind of environmental conditions and therefore its absolute values will be more increased by this eddy diffusivity enhancement. Apart from the change of roughness another explanation can be seen in the fact that if the wind is bringing drier air it can cause higher LE at the edge of the lawn. This is well known as so called edge effect (Oke, 1987).

Figure 8 The coefficients of determination lines

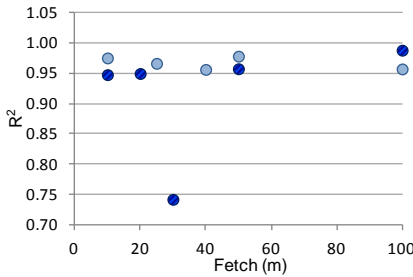


Figure 9 The slopes of linear regression lines

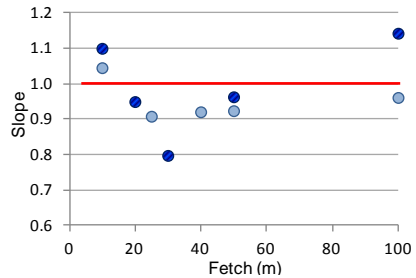


Figure 10 Root mean square errors (%)

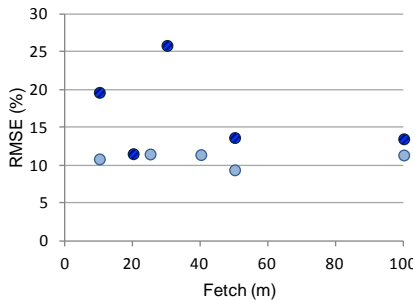
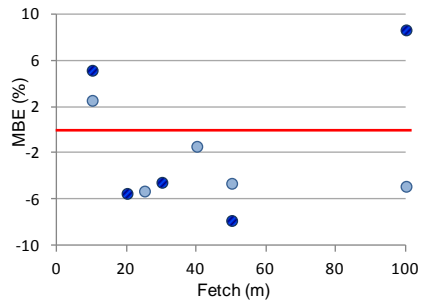
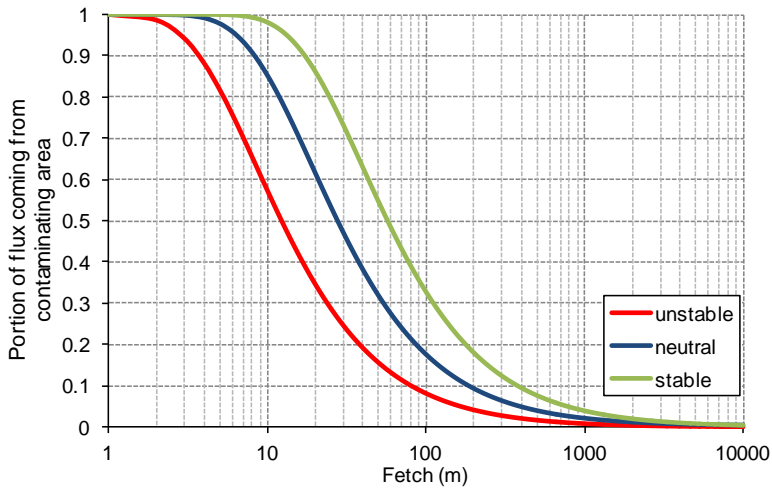


Figure 11 Mean bias errors (%)



Apparently, obtained results do not confirm given hypotheses at all. According to footprint models (see e.g. Hsieh et al. 2000) the effect of the contaminating area is decreasing downwind from the leading edge as it is shown in Fig. 12. This is in addition influenced by the stability of atmosphere. During the diurnal conditions which are typically unstable shorter fetch is needed compared to the night (stable conditions). In such type of conditions fluxes measured at 10 m long fetch should be contaminated roughly by 60 %, whereas at fetch 50 m by 15 %, and finally at fetch 100 by less than 10 %.

Figure 12 Footprint model according to Hsieh et al. (2000) describing portion of flux coming from contaminating area with respect to fetch under different atmospheric stability conditions



In order to observe similar results as those from the footprint model more contrasting covers would be needed. Since the BREB method relies on the equality of the eddy diffusivity of water vapour and temperature as a consequence of the same source of heat and water vapour (Stannard, 1997) this can be also violated by the sudden change of the surface features. To avoid the difficulties in interpretation different method like direct eddy covariance (EC) would be useful to reveal the answers to these issues. Considering the financial costs there is an option to use only one mobile EC system which can be firstly calibrated against the fixed reference BREB system and consequently moved to different fetches according to the scheme described in this study.

Taking into account overall complication with the interpretation and the need for additional measurement to make the results more generally valid, it seems that indeed the fetch to height ratio for BREB method is not so critical and probably lays closer to the values 10:1–20:1 given by Panofsky and Townsend (1964) or Heilman and Brittin (1989) and Stannard (1997) rather than the values 100:1–200:1 which are generally more deep-rooted and accepted within the scientific community.

CONCLUSIONS

The hypotheses of this study were not confirmed. The results showed no significant systematic deviation between the reference BREB with sufficient 180 m long fetch and mobile BREB positioned at fetches between 10 to 100 m. One of the explanations may be very similar response to soil moisture conditions of the selected covers resulting in similar Bowen ratios. Likewise, the difference between the soil moisture of the area of interest and the upwind area was not big enough to be detected in the results.

Moreover, there was not found any impact of the fetch on non-systematic errors. This leads to the conclusion that the fetch did not have any effect on the overall data quality and consistency. From the above mentioned it can be concluded, in the relatively wet environments typically with rather low Bowen ratio of all surrounding fields, the fetch is not so critical issue and produce comparable errors as the instruments themselves.

However, different method would be very desirable to reveal more of the mystery of such results. The direct eddy covariance method is suggested as a solution because it is often adopted to check the validity of other indirect methods. Considering the costs of this system a solution could be using only one mobile EC system. It might be firstly calibrated against the fixed reference BREB system and then moved to different fetches according to the scheme described in this study. Further experiments would uncover answers to many issues arising from this study.

REFERENCES

- Bowen I.S. (1926): The ratio of heat losses by conduction and evaporation from any water surface. *Physical Review*, 27: 779–787.
- Dyer A.J. (1965): Discussion on change of terrain roughness and the wind profile by H.A. Panofsky and A.A. Townsend, *Q.J.R.Meteorol. Soc.*, 91: 241.
- Fischer M. (2012): Water balance of short rotation coppice, Mendelu Brno. Ph.D thesis, 261 pp.
- Guo X., Hongsheng Zhang H., Kang L., Du J., Li W., and Zhu Y. (2007): Quality control and flux gap filling strategy for Bowen ratio method: revisiting the Priestley–Taylor evaporation model, *Environ Fluid Mech*, 7: 421–437.
- Heilman J.L. and Brittin C.L. (1989): Fetch Requirements for Bowen Ratio Measurements of Latent and Sensible Heat Fluxes, *Agricultural and Forest Meteorology*, 44: 261–273.
- Hsieh Ch.-I., Katul G., and Chi T.-W. (2000): An approximate analytical model for footprint estimation of scalar fluxes in thermally stratified atmospheric flows, *Advances in Water Resources* 23: 765–772.
- Oke T.R. (1987): *Boundary layer climates*, 2nd edition. Methuen, London, 435 pp.
- Panofsky H.A. and Townsend A.A. (1964): Change of terrain roughness and the wind profile, *Q.J.R. Meteorol. Soc.*, 90: 147–155.

Rosenberg N.J., Blad B.L., and Verma S.B. (1983): Microclimate: The biological environment, Wiley, New York, 495 pp.

Savage M. (2010): Field evaluation of polymer capacitive humidity sensors for Bowen ratio energy balance flux measurements. *Sensors*, 10: 7748–7771.

Stannard D.I. (1997): A Theoretically Based Determination of Bowen-Ratio Fetch Requirements. *Boundary-Layer Meteorology*, 83: 375–406.

Willmott C.J. (1982): Some comments on the Evaluation of Model Performance. *Bulletin of the American Meteorological Society* 63 (11): 1309–1313.

SOIL PHYSICAL PROPERTIES OF MULCHED AND MOWED GRASS-CLOVER TURFS

FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI PŮDY U SEČENÝCH A MULČOVANÝCH TRÁVNÍKŮ Z JETELOTRAVNÍ SMĚSI

Raus J., Knot P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: josef.raus@mendelu.cz

ABSTRACT

Effects of mulching and mowing of grass-clover low-input turfs on soil physical properties were observed in 2012 in field trial in Vatín, Vysočina Region, Czech Republic. Two levels of fertilization were used: no fertilization and 50 kg N/ ha /year. Soil moisture at the depth of 10 cm was significantly decreased by mulching (average difference 5.3 vol. %). The highest soil moisture was measured in cut fertilized sward, while the lowest in mulched non-fertilized one. Effect of fertilization on soil moisture was negligible – it caused only small increase in soil moisture. Bulk density at the depth of 5 cm was decreased by using fertilization compared to non-fertilized plots, while porosity was higher. The effect was opposite at the depth of 25 cm – bulk density was higher and porosity was lower in fertilized plots.

Key words: mulching, soil physical properties, low-input turf, grass-clover mixture

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency of the Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, project No. IP 21/2012 Effect of Mulching on soil physical properties and quality of grassland.

ÚVOD

Mulčování představuje alternativu k tradičnímu ošetřování travních porostů. Mulčováním lze dosáhnout snížení nákladů na transport a uložení posečené biomasy a také na hnojení při současném zachování ekologických funkcí travních porostů. Posečená biomasa je zpracována na mulč (drť 10 - 30 mm), který se ponechá na pokose, kde dojde k jeho rozkladu a mineralizaci. Vlivem mulčování, sečení, ponechání ladem a kombinacemi těchto opatření na pícninářské porosty se zabýval Fiala (2007). Z hlediska kritérií ekologické stability (botanické složení, akumulace biomasy a kvalita podzemní vody) doporučuje mulčování dvakrát nebo třikrát ročně, případně střídání mulčování a sklizně. Při dvousečném hospodářském využití (s exportem biomasy) docházelo k průměrné roční akumulaci nadzemní hmoty 0,15 t sušiny/ha/rok, u střídání sklizně a mulčování to bylo 0,46 t sušiny/ha/rok a u porostu ponechaného ladem 1,22 t sušiny/ha/rok. Nejmenší obsah minerálního dusíku byl zjištěn u třikrát ročně mulčovaného porostu (0,92 N/ha/rok) – rostlinná hmota byla mineralizována průběžně. Hodnoty u ostatních variant se pohybovaly od 118 do 2,82 kg N/ha/rok u mulčování jednou za dva roky. Bylo rovněž zjištěno, že u mulčovaných porostů je vyšší vlhkost půdy než u porostů sklizených a ponechaných ladem.

Otázky vlivu mulčování a sečení v kombinaci s faktorem úrovně hnojení a druhem porostu (lipnice luční, jílek vytrvalý, kostřava červená, travní směska, jetelotravní směska) na charakteristiky extenzivních travníků byly řešeny na Ústavu výživy zvířat a pícninářství MENDELU ve spolupráci s dalšími výzkumnými pracovišti v letech 2007-2010. Bylo zjištěno, že mulčované travníky po seči rychleji obrůstají než porosty s exportem biomasy. Toto se projevilo u všech variant hnojení a druhu porostu (Knot et al., 2011). Je též patrný kladný vliv mulčování na celkovou hmotnost kořenů. Mulčování může též zvyšovat odolnost travníku vůči některým houbovým chorobám. Na lokalitách Vatín a Zubří byl u monokultury kostřavy červené zjištěn vysoce průkazný rozdíl v napadení červenou nitkovitostí trav mezi variantou sečenou a mulčovanou. U porostů lipnice luční, jílku vytrvalého, travní a jetelotravní směsky, nebyly rozdíly tak výrazné, přesto byla situace lepší u mulčovaných porostů (Cagaš et al., 2011a). Rovněž výskyt sněžné plísňovitosti byl nižší u varianty mulčované (Cagaš et al., 2011b).

MATERIÁL A METODIKA

Pokus kombinující faktory úrovně a formy dusíkatého hnojení, druhu porostu a způsobu sklizně travníků byl založen ve třech opakováních v roce 2006 na Výzkumné pícninářské stanici ve Vatíně (535 m n. m., průměrná roční teplota 6,3°C, průměrný roční úhm srážek 737 mm). V roce 2012 byly ve vybraných variantách nainstalovány přístupové šachty pro profilové sondy PR2 a započalo měření vlhkosti půdy v týdenních intervalech. V tomto příspěvku jsou prezentovány naměřené

hodnoty z hloubek 10 a 20 cm z pěti po sobě jdoucích měření 10. 7. – 7. 8. 2012 v mulčovaných a sečených porostech jetelotravní směsi (kostřava červená, jálek vytrvalý, lipnice luční, jetel plazivý, štírovník růžkatý). Varianty úrovně hnojení jsou: bez hnojení, 50 kg N /ha/rok. Rovněž byly odebrány neporušené půdní vzorky v termínu 26. 4. 2012 z hloubky 5, 15 a 25 cm. Hodnoceny byly následující charakteristiky: objemová hmotnost ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), pórovitost (%), plná vodní kapacita PVK (% obj.), maximální kapilární kapacita MKK (% obj.) a retenční vodní kapacita RVK (% obj.). Vliv sklizně a druhu porostu na předmětné charakteristiky byl hodnocen jednofaktorovou analýzou variance a Tukeyovým testem ($P \leq 0,05$).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Z tab. 1 vyplývá, že v hloubce 5 cm nebyly zjištěny žádné větší rozdíly ve fyzikálních vlastnostech mezi variantami sklizně ani úrovněmi dusíkatého hnojení. Objemová hmotnost kolísala od $1,23 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ do $1,30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ a celková pórovitost od 48,9 do 51,8 %. Stejně v hloubce 15 cm (tab. 2) a 25 cm (tab. 3) nebyl zjištěn žádný průkazný rozdíl, i když hodnoty zde již dosahují většího rozsahu. V hloubce 5 cm byla vyšší pórovitost zjištěna u porostu hnojeného dusíkem v obou variantách sklizně, kdežto v hloubce 25 cm byla vyšší pórovitost u porostů nehnojených. Opačný trend lze zaznamenat u objemové hmotnosti. Může to souviset s distribucí kořenů v různých hloubkách vlivem hnojení. Fiala (2007) uvádí, že objemová hmotnost je nejnižší u lučního porostu ponechaného ladem ($1,32 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$), zvyšuje se přes porosty mulčované a sečené a nejvyšší je u černého úhoru ($1,5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Upozorňuje také na mírně vyšší pórovitost a plnou vodní kapacitu u mulčovaných porostů oproti sečeným.

Tab. 1 Vybrané fyzikální vlastnosti půdy v hloubce 5 cm

Hloubka 5 cm	Objemová hmotnost ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Pórovitost (%)	PVK (% obj.)	MKK (% obj.)	RVK (% obj.)
Seč 0	1,29 a	49,0 a	43,0 a	34,7 a	29,9 a
Seč 50	1,23 a	51,8 a	41,7 a	33,1 a	28,4 a
Mulč 0	1,30 a	48,9 a	43,2 a	34,1 a	36,2 a
Mulč 50	1,25 a	51,2 a	40,6 a	32,4 a	27,3 a
Seč průměr	1,26 a	50,44 a	42,36 a	33,91 a	29,13 a
Mulč průměr	1,28 a	50,05 a	41,92 a	33,30 a	31,76 a
0 průměr	1,29 a	48,96 a	43,13 a	34,42 a	33,03 a
50 průměr	1,24 a	51,53 a	41,16 a	32,79 a	27,86 a

Tab. 2 Vybrané fyzikální vlastnosti půdy v hloubce 15 cm

Hloubka 15 cm	Objemová hmotnost (kg·m ⁻³)	Pórovitost (%)	PVK (% obj.)	MKK (% obj.)	RVK (% obj.)
Seč 0	1,46 a	43,2 a	40,9 a	33,3 a	29,2 a
Seč 50	1,38 a	46,1 a	42,2 a	34,2 a	29,8 a
Mulč 0	1,35 a	47,6 a	42,5 a	33,1 a	28,0 a
Mulč 50	1,37 a	46,7 a	39,0 a	32,1 a	27,9 a
Seč průměr	1,42 a	44,66 a	41,51 a	33,78 a	29,51 a
Mulč průměr	1,36 a	47,15 a	40,74 a	32,60 a	27,94 a
0 průměr	1,40 a	45,40 a	41,69 a	33,20 a	28,57 a
50 průměr	1,37 a	46,41 a	40,57 a	33,18 a	28,87 a

Tab. 3 Vybrané fyzikální vlastnosti půdy v hloubce 25 cm

Hloubka 25 cm	Objemová hmotnost (kg·m ⁻³)	Pórovitost (%)	PVK (% obj.)	MKK (% obj.)	RVK (% obj.)
Seč 0	1,44 a	44,5 a	41,7 a	33,1 a	29,5 a
Seč 50	1,55 a	39,7 a	35,3 a	32,0 a	27,6 a
Mulč 0	1,45 a	43,7 a	37,1 a	30,6 a	26,4 a
Mulč 50	1,50 a	41,7 a	38,8 a	35,2 a	31,0 a
Seč průměr	1,49 a	42,10 a	38,50 a	32,56 a	28,55 a
Mulč průměr	1,48 a	42,71 a	37,91 a	32,90 a	28,69 a
0 průměr	1,44 a	44,10 a	39,37 a	31,86 a	27,96 a
50 průměr	1,53 a	40,72 a	37,05 a	33,60 a	29,28 a

V tab. 4 a 5 jsou zobrazeny hodnoty momentní vlhkosti v hloubce 10 a 20 cm v pěti po sobě jdoucích měřeních. V hloubce 10 cm byl zjištěn průkazný rozdíl mezi mulčovanými a sečenými porosty ve všech termínech měření, přičemž vlhkost u sečených porostů byla vyšší o 4,0 – 6,4 obj. % (průměr hnojení). Rovněž v hloubce 20 cm byla vyšší vlhkost u sečených variant. Nižší vlhkost půdy pod mulčovanými trávníky pravděpodobně souvisí s vyšším odběrem vody rostlinami v důsledku rychlejšího růstu, který popisuje Knot a kol. (2011). Ten může být podporován vyšším obsahem živin pocházejících z rozkládaného mulče. Kvítek a kol. (2000) konstatují, že pokud není

vliv managementu zastřen vysokými srážkami, je nejlhčí variantou porost s nejnižší produkcí biomasy.

Tab. 4 Momentní vlhkost půdy (% obj.) v hloubce 10 cm

10 cm	Termín				
	10. 7.	17. 7.	24. 7.	31. 7	7. 8.
seč 0	14,7 ab	17,3 a	22,0 ab	25,8 a	23,4 a
seč 50	15,7 a	17,8 a	24,4 a	26,5 a	22,9 ab
mulč 0	10,2 b	11,7 b	17,0 b	20,7 b	18,2 b
mulč 50	12,2 ab	12,8 ab	16,4 b	19,4 b	18,7 ab
seč průměr	15,2 a	17,6 a	23,2 a	26,1 a	23,2 a
mulč průměr	11,2 b	12,3 b	16,7 b	20,1 b	18,5 b
0 průměr	12,4 a	14,5 a	19,5 a	23,3 a	20,8 a
50 průměr	14,0 a	15,3 a	20,4 a	23,0 a	20,8 a

Tab. 4 Momentní vlhkost půdy (% obj.) v hloubce 20 cm

20 cm	Termín				
	10. 7.	17. 7.	24. 7.	31. 7	7. 8.
seč 0	23,1 a	22,6 a	26,6 a	31,5 a	25,9 a
seč 50	24,2 a	23,8 a	28,9 a	31,2 a	26,9 a
mulč 0	18,9 a	18,4 a	21,1 a	24,6 a	19,8 a
mulč 50	20,7 a	20,1 a	25,0 a	27,3 a	23,9 a
seč průměr	23,6 a	23,2 a	27,7 a	31,3	26,4 a
mulč průměr	19,8 a	19,3 a	23,0 a	26,0 a	21,8 a
0 průměr	21,0 a	20,5 a	23,8 a	28,0 a	22,8 a
50 průměr	22,4 a	22,0 a	26,9 a	29,2 a	25,4 a

ZÁVĚR

Z dosažených výsledků vyplývá, že mulčování vede ke snížení vlhkosti půdy pod travním porostem. Především v hloubce 10 cm je rozdíl velmi výrazný (statisticky průkazný). Důvodem tohoto jevu je zřejmě fakt, že mulčované porosty mají k dispozici živiny z rozkládající se hmoty, což vede k rychlejšímu růstu. To je samozřejmě spojeno s vyššími nároky na vodu. Z hlediska úrovně hnojení byla zjištěna mírně vyšší vlhkost půdy u porostů hnojených 50 kg N. U ostatních sledovaných charakteristik nebyly zjištěny průkazné rozdíly. Nehnojené varianty měly mírně vyšší objemovou hmotnost a nižší pórovitost v hloubce 5 cm, kdežto v hloubce 25 cm byla závislost opačná.

LITERATURA

CAGAŠ, B., KNOT, P., JANKŮ, L. (2011a): Impact of different management practices on the occurrence of some biotic disorders in turf grasses, s. 320 – 322. In: POETSCH, E. M., KRAUTZER, B., HOPKINS, A. (Eds.): *Grassland Farming and Land Management Systems in Mountainous Regions*. Groebming: Wallig Ennstaller Druckerei und Verlag Ges.m.b.H., 632 s. ISBN 978-3-902559-65-4.

CAGAŠ, B. et al. (2011b): *Zakládání a ošetřování krajinných trávníků a travnatých ploch veřejné zeleně*. Brno: Svaz zakládání a údržby zeleně, 2011, 65 s. ISBN 978-80-254-9834-7.

FIALA, J. (2007): *Modifikovaná pratotechnika trvalých travních porostů – mulčování*. Praha, VÚRV, v. v. i., 28 s. ISBN 978-80-87011-24-9.

KNOT, P., HRABĚ, F., VRZALOVÁ, J. (2011): Production of above ground phytomass of turf grass species during their extensive exploitation, s. 431 – 433. In: POETSCH, E. M., KRAUTZER, B., HOPKINS, A. (Eds.): *Grassland Farming and Land Management Systems in Mountainous Regions*. Groebming: Wallig Ennstaller Druckerei und Verlag Ges.m.b.H., 2011, 632 s. ISBN 978-3-902559-65-4.

KVÍTEK, T., DUFFKOVÁ, J., PETERKOVÁ, J., MAŠKOVÁ, Z., (2000): Teplota a vlhkost půdy rozdílně využívaných porostů lučního stanoviště na Šumavě. *Silva Gabreta*, 5: 51-62.

THE DYNAMICS OF TEMPERATURE IN BIRDBOXES

DYNAMIKA TEPLŮT V PTAČÍCH BUDKÁCH

Slavíková Z.¹, Žalud Z.¹, Bartošová L.², Fischer M.², Trnka M.^{1,2}

¹Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe, Centre for Global Climate Change Impact Studies, AS CR, v. v. i. Brno, Czech Republic

E-mail: zuza.slavikova@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of the study was to detect the changing temperature in bird boxes of two bird species-collared flycatcher (*Ficedula albicollis*, T.) and great tit (*Parus major*, L.).

The work is the result of the monitoring of nesting bird species for two years (2009 and 2010) by temperature sensors. Data was continuously recorded for several different breeding pairs with the micro-datalogers MINIKIN. Temperature sensors were fixed directly into the nest with eggs and also in the upper part of bird boxes or outside the boxes. Temperature data was then processed and analyzed.

Experimental work was carried out in a floodplain forest in nature reserve Plačkův les a říčka Šatava near Vranovice, altitude: 170; latitude: 48°56'54''; longitude: 16°35'50''. The forest is dominated by full-grown, multi-aged canopy with no forestry management. Experimental site belongs to the same natural biogeocenoses group (i.e. Ulmi-fraxineta carpini) and to the same geobotanical group (i.e. suballiance Ulmenion of the Alnion incanae alliance).

Our initial hypothesis assumed that the temperature of eggs in the nest and also the time spent in the bird boxes by both bird species (collared flycatcher and great tit) do not differ significantly. The results showed that during the period when the eggs were laid (by both bird species) the temperature were significantly however the temperature of eggs of collared flycatcher and great tit during the period of incubation were very.

Key words: temperature measurement, *Ficedula albicollis*, *Parus major*, egg-laying

Acknowledgments: This paper is a contribution from the CzechGlobe Centre, which is being developed within OP RDI and co-financed by EU funds and the state budget of the Czech Republic (Project: CzechGlobe – Centre for Global Climate Change Impacts Studies, Reg. No. CZ.1.05/1.1.00/02.0073) and has been also supported by „Partnership in Climate Research and Adaptation Strategies” reg. No. CZ.1.07/2.4.00/31.0056“.

“.

ÚVOD

Teplota vzduchu ovlivňuje chování ptáků při sezení na vejcích (Baerands, 1959; Drent, 1970; Haftorn, 1988; Lombardo et al., 1995; Weathers and Sullivan, 1989; Weeden, 1966; White and Kinney, 1974; Zerba and Morton, 1983). Rodiče musí vyrovnávat termální potřeby vyvíjejících se embryí s jejich vlastními energetickými potřebami tím, že opouští hnízdo k tomu, aby zajistili potravu (Williams, 1991, Conway a Martin, 1999). Těto problematice se věnoval Conway and Martin (1999), kdy zkoumali vliv okolní teploty na chování ptáků při sezení na vejcích.

Rodičovská péče hraje důležitou roli v reprodukčním úspěchu většiny ptačích druhů. Kvalita jednotlivce se z velké části projevuje v reprodukčním úspěchu (Stearns, 1992), a reprodukční úspěch, je ovlivněn množstvím a kvalitou péče poskytnutou potomstvu jejich rodiči (Kuitunenová a Suhonen, 1991; Reid *et al.*, 2000). Rodičovská péče, je však také nákladnější z hlediska času a energie, jakož i rizika pro jejich vlastní přežití (Carey, 1980, Curio, 1988, Joyce *et al.*, 2001).

Ptáci musí rozdělit svůj čas mezi sezením na vejcích a zajištěním potravy. Jones (1989) vyslovil názor, že rozdělení mateřského času (v případech, s jedním rodičem sedícím na vejcích) je pravděpodobně určeno tím, že minimalizuje energetický výdej na ohřátí vajec s ohledem na energetický příjem během příjmu potravy. To není v souladu s výsledky Reid *et al.*, (1999), a Cresswell *et al.*, (2004), kteří zjistili, že čas strávený v hnízdě se zvyšuje, pokud se rychle ochlazuje. Podle Haftorn (1988) je důležitým faktorem pro určení rozdělení mateřské doby fakt, že teploty vajec nesmí poklesnout pod určitou kritickou hodnotu – a to kolem 30°C , například u vrabců, ale v některých jiných případech i na 20°C (Reid *et al.*, 1999;. Cox a Martin, 2009). V extrémních podmínkách rodiče nechají vejce vychladnout i na 9°C (Jia *et al.*, 2010). V každém případě má teplota vajec velký vliv na ptačí chování (Bjorn *et al.*, 2012).

Cílem naší práce bylo experimentálně zjistit průběh teplot v ptačích budkách pomocí moderních teplotních čidel, které byly umístěny v bezprostřední blízkosti vajec a zároveň u střechy ptačí budky během hnízdění. Byly sledovány dva ptačí druhy, a to lejskek bělokřký (Ficedula albicollis, T.) a sýkora koňadra (Parus major, L.). Dále jsme na základě vyhodnocení teplot z let 2009 a 2010; určovali dobu (s přesností na hodiny), kdy je samička v hnízdě a kdy klade vajíčka a také teplotní rozdíl v období, kdy samička klade vajíčka a v období sezení na vejcích. Měření měla za cíl potvrdit nebo vyvrátit iniciační hypotézu, která předpokládala, že doba strávená zahříváním vajíček během období sezení na vejcích a jejich teplota se u obou ptačích druhů zásadně neliší. Další hypotézou byl naopak předpoklad, že v období kladení vajec je teplota u obou druhů rozdílná v závislosti na okolních podmínkách.

MATERIÁL A METODIKA

Měření teploty probíhalo v ptačích budkách dvou ptačích druhů - lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*, T.) a sýkory koňadry (*Parus major*, L.). V obou případech se jedná o drobné pěvce. Sýkora koňadra je největší a nejrozšířenější sýkora vyskytující se na území České republiky a je náš stálý druh. Koňadra je poměrně výrazně zbarvená. Má žluté břicho s podélným černým pruhem, černou čepičku a černě lemované bílé líce (www.ptacisvet.cz). Lejska bělokrký je migrant se zimovištěm ve střední a částečně východní Africe pod rovníkem. Samec je černobíle zbarvený, bílá barva je na spodní části těla, čele, širokém obojku, který vede přes krk a týl, kostřec a pole v křídlech jsou taktéž zbarveny bíle. Samice a mladí ptáci jsou zbarveni svrchu šedohnědě (www.biolib.cz)

Zaznamenávání průběhu teplot bylo prováděno na jaře v letech 2009 a 2010 a bylo prováděno přístroji Minikin, vyráběné firmou EMS Brno. Tento přístroj se skládá z dvou čidel (odporových teploměrů), které jsou spojeny s datalogerem a baterií přístroje pomocí kabelů a je možné je umístit na dvě rozdílná místa v okolí hnízda.

Instalace Minikinů do hnízd - ptačích budek byla prováděna před a nebo během stavby hnízda sledovaných ptačích druhů. Tak bylo zajištěno, že před začátkem kladení vajíček samičkou, byly v každé budce nainstalovány dvě čidla. Čidlo číslo 1 bylo umístěno skrze dno ptačí budky přímo do vystavěného hnízda ptačích druhů a zaznamenávalo tak teplotu v hnízdě, v bezprostřední blízkosti vajec. Čidlo číslo 2 byl situováno u stropu ptačí budky a nebo vně budky v její blízkosti. Data byla zaznamenávána teploměry každých 30 vteřin, 24 hodin denně po celou dobu hnízdění. Jednotlivé ptačí budky byly pozorovatelem navštěvovány 3-4x během jednoho týdne a zároveň tak probíhala kontrola průběhu kladení vajec u jednotlivých hnízdních párů.

Ptačí budky byly umístěny na kmenech stromů, vždy v minimální výšce 2m nad zemským povrchem. Budka byla tvořena odnímatelnou stříškou a pevným dnem. Minikin byl přichycen k boční stěně budky a čidla byla pomocí kabelů vedena vyvrtným otvorem ve dně budky k hnízdu a dalším otvorem těsně pod stříškou budky.

Měření se uskutečnilo v lokalitě Vranovice, v PR Plačkův les a říčka Šatava. V této lokalitě je dominantní vzrostlý, dlouhověký lužní les bez přítomnosti lesního hospodářství. Místo patří do přírodní skupiny geobiocenů (tj. ulmi-fraxineta carpini.) a do geobotanické skupiny (tj. suballiance Ulmenion na Alnion incanae-aliance) (Raušer a Zlatník 1966).

Pro rok 2009 byla získána data u třech hnízdicích párů sýkory koňadry a třech hnízdních párů lejska bělokrkého. Během roku 2010 probíhalo měření u 2 párů sýkory koňadry a 2 párů lejska bělokrkého.

Získaná teplotní data ze sledovaných objektů byla analyzována pomocí programu Mini32, pomocí kterého byly naměřené hodnoty převedeny do grafické podoby. Byly vyhodnocovány teplotní minima, maxima a standardní teplotní odchylky v námi určených časových úsecích, kterými byly:

Úsek č. 1 – celé období kladení vajec

Úsek č. 2 – období sezení na vejcích

VÝSLEDKY A DISKUZE

Období kladení vajec

Interval kladení vajec sýkory koňadry se pohyboval pro rok 2009 mezi 10. 4. – 21. 4, průměrná teplota vzduchu byla v tomto období 14,82°C. V tomto období sýkora nakladla do hnízda průměrně 12 vajec. V roce 2010 proběhlo kladení dřívě, a to 6. 4. – 17. 4., s průměrným počtem vajec 10 a při průměrné teplotě vzduchu 9,00°C. Lejssek bělokrký nakladl svá vejce v roce 2009 v rozmezí 3. 5. – 8. 5. v počtu 6 vajec, průměrná teplota vzduchu byla 13,58°C. V následujícím roce také začalo období kladení dřívě, proběhlo 1. 5. – 6. 5., kdy byla průměrná teplota vzduchu 13,85°C a bylo nakladeno v průměru 5,5 vajec.

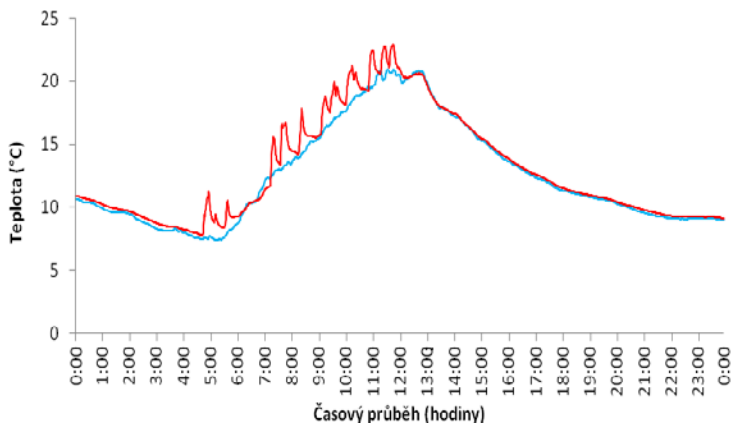
Průměrné teploty během kladení vajec v roce 2009 se, v porovnání u obou druhů, pohybovaly výše v budkách sýkory koňadry, přímo v hnízdě u vajec to bylo o 9,6°C a mimo hnízdo o 3,7 °C. V roce 2010 se průměrné hodnoty teplot pohybovaly výše u lejska, v hnízdě o 7,7°C a mimo hnízdo 9,7°C oproti sýkoře. Minimální a maximální teploty jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Rozdíly v teplotách v jednotlivých budkách lejska bělokrkého a sýkory koňadry během období kladení vajec v letech 2009 a 2010. K jednotlivým ptačím budkám je určena průměrná, minimální a maximální teplota za dané období. Čidlo č. 1 je umístěné v hnízdě přímo u vajíčka, čidlo č. 2 je u střechy ptačí budky.

Lejssek						Sýkora				
bělokrký						koňadra				
rok 2009	Č. budky	Čidlo	Teplota			Č. budky	Čidlo	Teplota		
			Průměr	Min	Max			Průměr	Min	Max
	16	1	14,7	5,5	27,6	22	1,0	20,6	8,0	30,8
		2	13,7	5,2	24,7		2,0	14,2	3,0	24,8
	3	1	15,0	5,5	28,8	1	1,0	17,4	6,8	26,9
		2	13,8	5,2	25,4		2,0	15,8	5,5	27,5
	70	1	16,4	5,9	26,4	45	1,0	17,6	7,1	28,7
		2	13,3	4,4	27,0		2,0	14,5	4,1	26,9
rok 2010										
	10	1	15,6	9,0	26,1	1	1,0	11,2	0,6	23,0
		2	14,1	8,7	26,4		2,0	9,9	-0,4	22,6
	64	1	14,4	9,0	24,6	22	1,0	11,1	-1,3	22,5
		2	13,6	8,2	24,9		2,0	8,1	-1,4	19,2

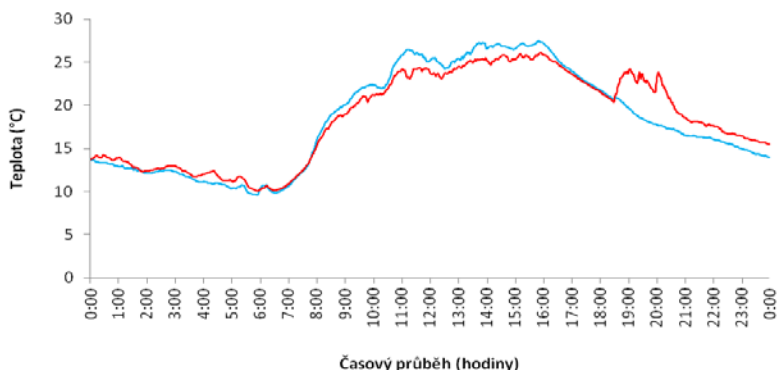
Dále byl určen průměr času (v hodinách), kdy je samička v hnízdě a kdy klade vajíčka na základě zvýšené teploty v hnízdě u vajíček. Vyšší teplota v hnízdech lejska bělokrkého byla naměřena ráno v průměru kolem 4:30h, kdy samička pravděpodobně přilétá do hnízda a zůstává zde hodinu, poté odlétá a v 7h se vrací a zůstává v hnízdě do 12h, v tomto období zde pravděpodobně klade vajíčka (graf č. 1). S přibývajícím počtem nakladených vajíček se časový úsek, který stráví v hnízdě, postupně prodlužuje.

Graf 1 Průběh teplot při kladení vajec v budce lejska bělokrkého ze dne 4. 5. 2009, číslo budky - 16, v průběhu jednoho celého dne. V hnízdě byly 2 vejce. Červená čára představuje teploty z čidla umístěného přímo v hnízdě u vajíček. Modrá čára vyjadřuje zaznamenané teploty z čidla, které bylo pod stříškou ptačí budky.



Vyšší teplota a pravděpodobný přilet samičky sýkory koňadry do hnízda byl zaznamenán v rozmezí 18 – 18:30h. Samička zde zůstává přibližně 1-2 hodiny, kdy pravděpodobně naklade vejce. Stejně jako u lejska se s přibývajícím počtem vajec v hnízdě tento časový interval prodlužuje (graf č. 2).

Graf 2 Jednodenní vývoj teplot při kladení vajec v budce sýkory koňadry při kladení vajec. Zobrazené měření je ze dne 11. 4. 2009, z budky číslo 1. V hnízdě byly 2 vejce. Červená čára vykresluje teploty z čidla v hnízdě. Modrá čára znázorňuje chod teplot, zaznamenané čidlem umístěným pod stříškou budky.



Během práce v terénu v roce 2009 a 2010 byla sledována teplota u celkem pěti hnízd lejska bělokrkého a pěti hnízd sýkory koňadry (Tab. 2).

Během roku 2009 se průměrná teplota přímo v hníždě lišila u sýkor a lejsků o 2,5°C (vyšší hodnoty byly naměřeny u sýkory koňadry), v roce 2010 byl rozdíl 1,0°C (vyšší teplota byla v hnízdech lejska bělokrkého). T-test provedený pro teploty naměřené v hnízdech u vajec nicméně nepotvrdil stejnost teplotních řad. Mimo hnízdo (u střechy ptačí budky) byla v roce 2009 zaznamenána vyšší teplota v budkách lejska bělokrkého a to o 8,2°C. V roce 2010 se tato hodnota snížila a teplotní rozdíl byl 1,82°C (vyšší teplota byla zaznamenána v budkách sýkory koňadry).

Teplotní rozdíl mezi čidlem u hnízda (průměrná teplota 23,99°C) a čidlem u střechy budky (16,89°C) pro rok 2009 činil u lejska 7,1°C, v roce 2010 byl teplotní rozdíl mezi hnízdem a stříškou budky 8,1°C. V hníždě sýkory koňadry činil teplotní rozdíl 10,7°C (průměrná teplota u vajec byla 14,14°C a u stříšky budky 24,84°C) v roce 2009 a 6,6°C v roce 2010. Minimální a maximální naměřené teploty jsou znázorněny v tab. 2.

Tab. 2 Teplotní rozdíly v jednotlivých budkách lejska bělokrkého a sýkory koňadry během období sezení na vejcích v letech 2009 a 2010. Ke každé konkrétní budce je vypsána průměrná, minimální a maximální teplota za dané období. Čidlo č. 1 bylo umístěno v hnízdě přímo u vajíček, čidlo č. 2 bylo u střechy ptačí budky.

Lejssek				Sýkora						
bělokrký				koňadra						
rok 2009										
Č. budky	Čidlo	Teplota			Č. budky	Čidlo	Teplota			
		Průměr	Min	Max			Průměr	Min	Max	
70	1	25,2	16,0	33,6	1	1	22,9	12,6	30,1	
	2	16,3	6,3	26,5		2	14,9	6,0	23,4	
	3	1	24,7	9,9	32,3	22	1	25,4	13,5	32,3
		2	17,3	7,4	27,6		2	13,6	3,6	23,2
	16	1	22,1	9,6	31,8	45	1	26,2	13,9	32,1
		2	17,1	7,8	28,5		2	13,9	4,0	24,1
rok 2010										
10	1	21,3	9,8	28,6	1	1	17,9	4,0	28,1	
	2	12,7	6,1	26,4		2	14,8	2,2	25,3	
64	1	20,1	11,5	29,6	22	1	22,5	2,2	31,0	
	2	12,7	6,3	23,5		2	12,4	0,8	25,5	

Z dat vyplývá, že teplota v budkách lejska bělokrkého a sýkory koňadry naměřená čidlem, které bylo uloženo přímo v hnízdě, je oproti teplotě u střechy budky zvýšená. Tento nárůst teploty byl zaznamenán v budce lejska bělokrkého v čase mezi 04:00 – 19:00 a v budce sýkory koňadry v časovém rozmezí 05:00 – 18:30.

Teploty během období kladení vajec jsou rozdílné a korespondují s okolní rozdílnou teplotou vzduchu. V této době samička ptáků přilétá do hnízda pouze na omezenou dobu, aby nakladla svá

vejce, a v tomto období je nezahřívá. Pravděpodobně vysvětlení je, že samičky vejce nezahřívají dostatečně, jelikož v hnízdě tráví od prvního nakladeného vejce krátký čas a vajíčka jsou vystavena okolním povětrnostním podmínkám, jejich teplota se proto mezi dvěma pozorovanými druhy i mezi jednotlivými lety liší tak jako se liší teplota okolního vzduchu. Teplotní rozdíl u vajíček mezi oběma sledovanými druhy se pohybuje v rozmezí 7,7°C až 9,6°C během kladení vajec. Výrazný rozdíl teplot byl zaznamenán zvláště mezi roky 2009 a 2010 v hnízdních budkách sýkory koňadry, kdy v roce 2010 byla průměrná teplota vzduchu 9,0°C během kladení vajec, při čemž teplota v hnízdě u vajec byla 11,1°C. Naopak v roce 2009 byla průměrná teplota vzduchu vyšší (14,8°C) s čímž korespondovala také průměrná teplota v hnízdě u vajec (18,6°C). V průběhu období sezení na vejcích, kdy jsou samičky sýkory koňadry a lejska bělokrkého po většinu času v hnízdě a vylétávají pouze za potravou, je teplotní rozdíl u vajíček nižší (teplotní rozdíl mezi sledovanými ptačími druhy je 1,0°C až 2,5°C během sezení na vejcích). Ačkoliv jsou teplotní rozdíly mezi pozorovanými ptačími druhy během období kladení vajec nižší, t-test provedený pro teplotní řady sýkory koňadry a lejska bělokrkého nepotvrdil podobnost těchto hodnot.

Sezení na vejcích je pro ptáky stresující období, protože rodiče musí vyrovnat tepelné potřeby embryí s vlastními energetickými požadavky (Williams 1991). Okolní teplota obvykle ovlivňuje ptačí chování během sezení na vejcích (Conway and Martin 2000) (Jia et al., 2010). Vzhledem ke zvýšené teplotě v hnízdě v období sezení na vejcích lze předpokládat pravděpodobný výskyt samičky v budce. Doba strávená samičkami v hnízdě ve fázi kladení vajec je rozdílná. Je i odlišná doba kladení vajec. Lejska bělokrký tráví čas v hnízdě v ranních až dopoledních hodinách a zdržuje se tu déle než sýkora koňadra. Ta je naopak v hnízdě v odpoledních hodinách a tráví tu kratší dobu. U obou druhů se ale s postupným přibýváním vajec v hnízdě doba strávená v hnízdě prodlužuje.

Vliv okolní teploty na délku trvání sezení se pravděpodobně liší mezi druhy a závisí na tukových rezervách samic a rozsahu krmení. Empirické studie ukázaly jak negativní a pozitivní vztah, tak i nulový vztah mezi okolní teplotou a dobou trvání sezení a vylétů (Conway a Martin, 1999). V našem případě průměrný čas strávený lejskem bělokrkým sezením na vejcích byl 15 hodin (od 4:00 do 19:00). Průměrný čas strávený sýkorou koňadrou sezením na vejcích byl 13,5 hodiny (od 5:00 do 18:30).

Energetické náklady na znovu-zahřátí zchladlých vajec jsou velice podobné jako k udržení optimální teploty během sezení (Biebach, 1986; Vleck 1981). V chladném klimatu vejce po odletu samice chladnou mnohem rychleji než se po návratu samice ohřívají. Naopak rozsah chladnutí vajec klesá během celé doby vylétu, až vejce dosáhne teploty okolí (Drent, 1975). (Conway a Martin, 1999)

V mírném pásmu je teplota vzduchu normálně nižší než požadovaná teplota na líhnutí. Proto se vejce ochlazují kdykoli samička opustí hnízdo a nedělí se samečkem v péči o vejce. Míra ochlazení závisí na okolní teplotě, ale je obecně vysoká prvních pár minut po opuštění a pak se zpomaluje, jak se teplota vejce přibližuje k venkovní teplotě. Samička potřebuje určitý minimální čas denně, aby nashromáždila dostatek potravy pro sebe i líhnutí (Hatforn, 1988).

Přerušování sezení na vejcích vychází ze dvou rozhodnutí ze strany rodičů. Za prvé, samička musí rozhodnout, kdy ukončit sezení na vejcích a opustit hnízdo, čímž ovlivňuje dobu sezení na vejcích. Za druhé musí rozhodnout, kdy ukončit shánění potravy a svůj návrat do hnízda a tím ovlivní trvání potravní periody. (Ried et al, 1999). Optimální rozdělení času se pravděpodobně liší podle podmínek prostředí a také v závislosti na počasí (Yom-Tov et al 1978; Davis et al 1984; Cartar a Montgomerie 1987), fázi inkubační doby (Drent 1975; Weathers & Sullivan 1989) a časem (Davis et al 1984; Morton & Pereya 1985; Haftorn & Ytreberg 1988). Proto je pravděpodobné, že samička při rozhodování reaguje na životní podmínky (Ried et al, 1999).

ZÁVĚR

Sledováním teploty v ptačích budkách lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) a sýkory koňadry (*Parus major*) bylo zjištěno, že v období kladení vajec je teplota přímo v hnízdě rozdílná, a to v závislosti na okolní teplotě vzduchu. V průběhu sezení na vejcích je naopak teplota u vajec dvou sledovaných druhů více podobná, tato podobnost ale nebyla signifikantně potvrzena. Doba výskytu samic lejska a sýkory v budce je rozdílná podle toho, zda kladou vejce nebo jsou ve fázi sezení na vejcích. Při kladení vajec v budce zpočátku samičky netráví příliš času a tento čas se mezi sýkorou koňadrou a lejskem bělokrkým liší; s přibývajícím počtem vajec se tento čas prodlužuje; během období sezení na vejcích tráví v budce samičky většinu času během světelné části dne a tento čas se mezi dvěma sledovanými druhy podstatně neliší.

LITERATURA

- Biebach H. 1986. *Energetics of rewarming a clutch in starlings (*Sturnus vulgaris*)*. *Physiol Zool* 59:69-75
- Bjorn L. O., Uvdal P., Shaoshan L. 2012. *Ecological importance of the thermal emissivity of avian eggshells*. *Journal of Theoretical Biology* 301 (2012) 62–66
- Carey, C. 1980. *The ecology of avian incubation*. *BioScience* 30:819-824.
- Cartar, R. V., Montgomerie, R. D. 1987. *Day-to-day variation in nest attentiveness of white-rumped sandpipers*. *Condor*, 89, 252–260.
- Conway, C. J., and T. E. Martin. 2000. *Effects of ambient temperature on avian incubation behavior*. *Behavioral Ecology* 11:178-188
- Cox, W. A., Martin, T. E., 2009. *Breeding biology of the three-striped warbler in Venezuela: a contrast between tropical and temperate parulids*. *Wilson J. Ornithol.* 121, 667–678.
- Cresswell, W., Holt, S., Reid, J. M., Whitfield, D. P., Mellanby, R. J., Norton, D., Waldron, S. 2004. *The energetic costs of egg heating constrain incubation attendance but do not determine daily energy expenditure in the pectoral sandpiper*. *Behav. Ecol.* 15, 498–507
- Curio, E. 1988. *Realized life span and delayed cost of parental care*. *Am. Nat.* 131:825-836.

- Davis, S. D., Williams, J. B., Adams, W. J. & Brown, S. L. 1984. *The effect of egg temperature on attentiveness in the Belding's savannah sparrow*. *Auk*, 101, 556–566
- Drent R. H. 1975. *Incubation*. In: *Avian biology*, vol. 5 (Farner DS, King JR, eds). New York: Academic press; 333–420
- Haftorn, S. 1988. *Incubating female passerines do not let the egg temperature fall below the 'physiological zero temperature' during their absences from the nest*. *Ornis Scand.* 19: 97–110.
- Haftorn, S., Ytreberg, N. J. 1988. *Incubation rhythm in the pied flycatcher*. *Fauna norvegica, Series C, Cinclus*, 11, 71–88.
- Jia, C.-X., Sun, Y.-H., Swenson, J. E. 2010. *Unusual incubation behavior and embryonic tolerance of hypothermia by the blood pheasant (Ithaginis cruentus)*. *Auk* 127, 926–931.
- Jones, G., 1989. *Optimizing time off the nest during incubation in fiale swallows (Hirundo rustica [L.])*. *Funct.Ecol.* 3, 303–309.
- Joyce E. M., Sillet T. S., Holmes R.T. 2001 *An expensive method for quantifying inubation patterns of open-cup nesting birds, with data for black-throated bleu warbles*. *J. Field OrnithoL*, 72(3):369–379
- Kuitunen, M., Suhonen, J. 1991. *Feeding time and brood-rearing capacity in the Common Tree Creeper (Certhia familiaris)*. *Auk* 108:180—184
- Lombardo, M. P., Bosman, R. M., Faro, C. A., Houtteman, S. G., Kluisza, T. S. 1995. *Effect of feathers as nest insulation on incubation behavior and reproductive performance of tree swallows (Tachycineta bicolor)*. *Auk* 112:973–981
- Morton, M. L., Pereya, M. L. 1985. *The regulation of egg temperatures and attentiveness patterns in the dusky flycatcher*. *Auk*, 102, 25–37.
- Reid, J. M., Monaghan, P., Ruxton, G. D., 1999. *The effect of clutch cooling rate on starling, Sturnus vulgaris, incubation strategy*. *Anim.Behav.* 58, 1161–1167.
- Williams, J.B. 1991. *On the importace of energy considerations to small birds with gynelateral intermittent incubation*. *Acta Congress Intl Ornithol* 20:1964–1975
- Raušer, J., Zlatník, A., 1966: *Biogeografie I, Separát z Atlasu Československé socialistické republiky, Praha*.
- Reid, J. M., Monaghan, P., Ruxton, G. D. 2000. *Resource allocation between reproductive phases: the importance of thermal conditions in determining the cost of incubation*. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 267:37–41.
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, New York.

Vleck, C. M. 1981. *Energetic cost of incubation in the Zebra finch*. Condor 82:229-237

Weathers, W. W., Sullivan, K. A. 1989. *Nest attentiveness and egg temperature in the yellow-eyed junco*. Condor, 91, 628–633.

Weeden, J. S., 1966. *Diurnal rhythm of attentiveness of incubating female tree swallows (Spizella arborea) at a northern latitude*. Auk 83:368-388

White, F. N., Kinney, J. L., 1974. *Avian incubation*. Science 189:107-115

Zerba, E., Morton, M. L. 1983. *Dynamics of incubation in Mt. White-crowned sparrows*. Condor 85:1-11

Yom-Tov, Y., Ar, A. & Mendelsohn, H. 1978. *Incubation behaviour of the Dead Sea sparrow*. Condor, 80, 340–343.

Online zdroje

Biolib (přístupné: říjen 2012) <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8934/> lejsek

Ptačí svět (přístupné: říjen 2012)
<http://www.ptacisvet.cz/index.php?browser=nn&menutype=Reduced&special=None&action=Detail&skupina=Druh&detail=S%FDkora+ko%F2adra%F2s%F2y%F2kora>

SOIL INFILTRATION CAPACITY IN DIFFERENT MANAGED GRASSLANDS

INFILTRAČNÍ SCHOPNOST PŮDY U ROZDÍLNĚ VYUŽÍVANÝCH TRAVNÍCH POROSTŮ

Sochorec M., Hejduk S.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel university in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: m.sochorec@seznam.cz

ABSTRACT

Object of this study was to evaluate effect of grassland utilisation on soil infiltration in three sward types: meadow (LO), cattle pasture (PA), and unutilized grassland (PN). Measurements were made during the year 2011 at the beginning of the vegetation period (April), after the first cut (July) and at the end of vegetation (November). Infiltration rate at the end of first minute measuring was significantly higher in PN compared to the rate in PA and LO in April and November. In July were detected no significant differences between all three variants. These results demonstrate considerable effect of different grassland exploitation on infiltration rate.

Key words: infiltration rate, soil compaction, pasture, meadow

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency Faculty of Agronomy MENDELU No. TP 3/2012.

ÚVOD

S rostoucím negativním vlivem civilizace na životní prostředí se zvyšují nároky společnosti na spotřebu kvalitativně hodnotné vody z podzemních i povrchových zdrojů. Výhradním zdrojem vody podzemních i povrchových vod na našem území jsou srážky a proto je nutno zajistit jejich maximální zadržení v krajině. Značná část srážek však odtéká ve formě povrchového odtoku. Jedná se o nežádoucí jev, který je urychlen účinkem dešťových srážek na vegetaci nekrytou půdu. Kinetickou energií dopadajících kapek dochází k rozpadu půdních agregátů a vytváření málo propustné krusty na povrchu půdy (Holý, 1998). Dalším faktorem snižující infiltraci je velkovýrobní hospodaření spojené s využíváním velkých půdních celků a těžké zemědělské mechanizace. Tyto faktory způsobují nadměrné ztuhnutí půdy se všemi jeho negativními důsledky. Nejzávažnější příčinou nadměrného ztuhování půd z technologického hlediska jsou opakované přejezdy těžkých mechanismů po pozemcích za nevhodné vlhkosti, kdy je půda snadno zranitelná (Pokorný a kol., 2001). Dle Šarapatky, Niggliho a kol. (2008) na ztuhnuté půdě klesá rychlost infiltrace, dochází k omezení biologické aktivity a snížení výnosů rostlin.

Travní porosty mají schopnost snižovat rychlost povrchového odtoku a prodlužovat dobu infiltrace srážkové vody. U těchto porostů však nebývají zohledněny případné rozdíly infiltrační schopnosti dané jejich různým využíváním. Řešení tohoto pokusu by mělo přispět k objasnění vlivu rozdílného obhospodařování pícních porostů (pastva skotu, konvenční obhospodařování, absence hospodaření) na schopnost zasakování srážek a tvorbu povrchových odtoků.

MATERIÁL A METODIKA

Pokus probíhal v roce 2011 v oblasti Českomoravské vrchoviny v katastru obce Jimramovské Pavlovice. Obec leží na hranici CHKO Žďárské vrchy v nadmořské výšce 550 m. Dle Novákovy zrnitostní klasifikace (Jandák a kol., 2003) se jedná o půdu střední, hlinitou až písčitolhinitou, půdní typ kambizem.

Měření infiltrace bylo prováděno na travních porostech bez vlivu ztuhnutí (pod ohrazením pastviny) (PN), na porostech spásaných skotem (PA) a na louce obhospodařované velkovýrobním způsobem (LO). Ke stanovení infiltrační schopnosti půdy byla použita výtopová metoda za pomoci soustředných válců o průměru vnitřního válce 17 cm a vnějšího 31 cm. Termíny měření byly před první sečí (duben), po první sečí (červenec) a na konci vegetace (listopad). Infiltrace byla hodnocena vždy ve třech opakováních na jedné variantě. Získaná data byla následně vyhodnocena graficko-empirickou metodou dle Kost'jakova (Kutílek, 1978) v bilogaritmickém měřítku. Pro statistické analýzy byla použita ANOVA (Statistica 8.0, StatSoft) s následným testováním podle Tukey ($p = 0.05$).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V tabulce 1 jsou statisticky vyhodnoceny infiltrační rychlosti na konci první minuty měření na jednotlivých stanovištích ve sledovaných termínech. Před první sečí (duben) byl na stanovišti PN zjištěna průkazně vyšší infiltrace ($53,0 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) v porovnání s variantami PA ($12,7 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) a LO ($8,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$). Po první seči byla zjištěna nejvyšší hodnota infiltrace na stanovišti PN ($26,1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$), u porostů PA a LO došlo k snížení infiltrace na hodnotu $7,7 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ a $7,2 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. V období na konci vegetace, bylo zjištěno průkazné snížení infiltrační rychlosti u travních porostů využívaných jako PA ($5,9 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) a LO ($10,4 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$). Nejvyšší infiltrační rychlost byla naměřena u travních porostů bez vlivu zhutnění PN $21,1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Baker (1991) uvádí, že největší změny fyzikálních vlastností půdy působí sečení, manipulace s píci a její sběr a odvoz, popřípadě pastva zvířat, neboť se tyto operace musí provádět v krátkém časovém období za příznivého počasí, často bez ohledu na vlhkost půdy. K nadměrnému zhutňování půdy přispívá používání stále těžší mechanizace, která umožňuje dosahování vysoké produktivity práce. K maximálnímu zhutnění půdy dochází za vlhkosti blízké polní kapacitě. Při vyšší vlhkosti je v půdě nedostatek vzduchu a voda v pórech je nestlačitelná. Dochází však k poškození až devastaci půdní struktury.

Tab. 1 Průměrná infiltrační rychlost na konci první minuty (mm/min)

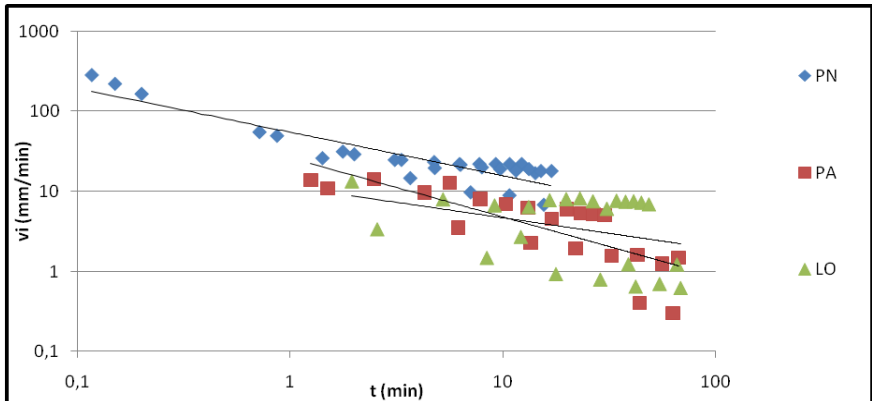
Způsob využívání	Období		
	Duben	Červenec	Listopad
PN	53,0 ^a	26,6 ^a	21,1 ^a
PA	12,7 ^b	7,7 ^a	5,9 ^b
LO	8,5 ^b	7,2 ^a	10,4 ^b

* Různá písmena označují statisticky průkazné rozdíly, Tukeyův test ($p \leq 0,05$)

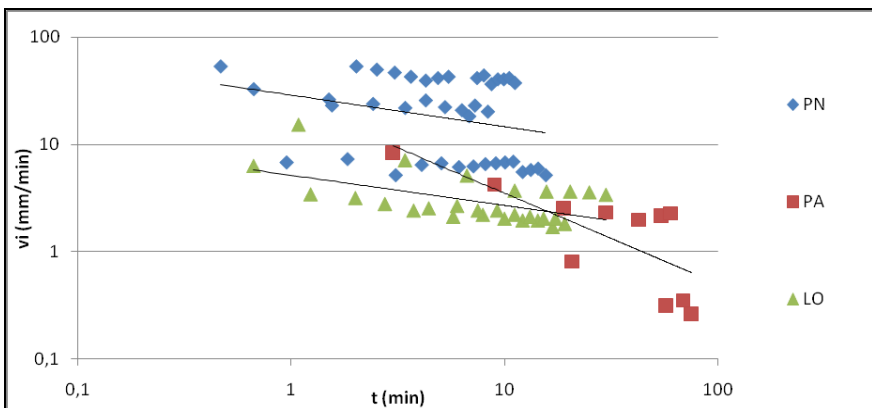
Vysoká infiltrační rychlost před první sečí (Obr. 1) u porostů PN může být způsobena zlepšením půdní struktury vlivem mrazu v jarním období. Na lokalitě PA a LO byla v tomto období infiltrační rychlost průkazně nižší vlivem zhutnění a absence mechanické kultivace půdy. Rovněž dle výsledků měření Hejduka a Kasprzaka (2008) prováděných v Brně – Kníničkách, docházelo u travních porostů díky absenci mechanické kultivace v období tání sněhu v předjaří k vyšším povrchovým odtokům než na stanovišti ozimé pšenice ponechané jako strniště.

Z měření prováděných po první seči a na konci vegetace je patrné zpomalení infiltrace na porostech PA a LO (obr. 2 a 3), způsobeným zhutněním pasoucími se zvířaty a zemědělskou technikou. Hansen (1995) popisuje účinek zhutnění půdy koly traktoru, které vedlo na lučních porostech v Norsku ke snížení výnosu z 9,0 na 6,6 t.ha⁻¹ sušiny. Zhutnění mělo na výnos píce větší vliv než dávky a termín použití minerálních hnojiv.

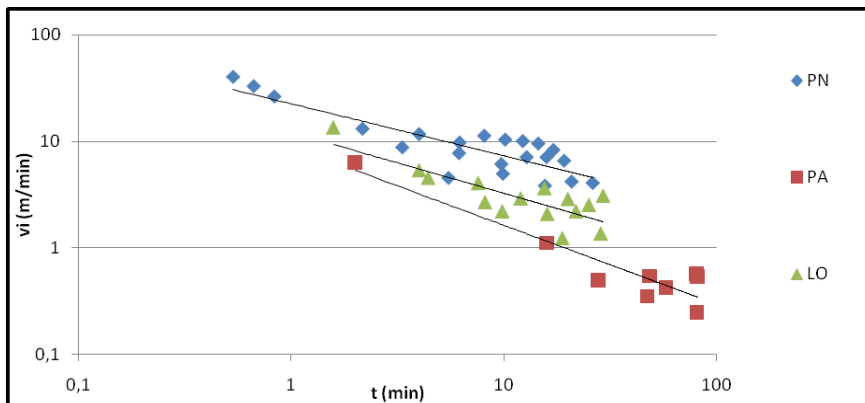
Obr. 1 Rychlost infiltrace na jednotlivých porostech před první sečí (duben)



Obr. 2 Rychlost infiltrace na jednotlivých porostech po první sečí (červenec)



Obr. 3 Rychlost infiltrace na jednotlivých porostech na konci vegetace (listopad)



ZÁVĚR

Způsob využívání travních porostů má významný vliv na infiltraci vody do půdy. Z výsledků vyplývá, že vlivem zatížení travních porostů sklízecí technikou a pasoucími se zvířaty, dochází ke značnému omezení infiltrační rychlosti. Při nízké úrovni infiltrace dochází při přívalových deštích a v období tání sněhu k vzniku povrchového odtoku, který může působit povodně, ochuzuje rostliny o půdní vláhu a omezuje dotaci podzemních vod. Současně může dojít ke smyvu zeminy, případně agrochemikálií do povrchových vod. S nárůstem produktivity práce v zemědělství dochází používání stále těžších mechanizačních prostředků i pro sklizeň travních porostů. Vzhledem k absenci kultivace půdy pod travními porosty je jejich infiltrační schopnost ovlivněna způsobem hospodaření více, než na oraných půdách.

LITERATURA

BAKER, S. W., 1991: *Compaction: a problem of wear and tear*. Turf Management, pp. 11-13

HANSEN, S., 1995: *Effect of manure treatment and soil compaction on plant production of a dairy farm system converging to organic farming practice*. Agriculture, ecosystems and environment, 56 (3): 173 - 186

HEJDUK, S., KASPRZAK, K., 2008: *Vliv travních porostů na erozi půdy a povrchový odtok vody*. In LEPIČOVÁ, J. Trávníky 2008. 1. vyd. Hrdějovice: Agentura Bonus, 2008, s. 13-16

HOLÝ, M., 1994: *Eroze a životní prostředí*. ČVUT Praha, 383 s.

JANDÁK, J. a kol., 2003: *Cvičení z půdoznalství*. Skriptum. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 92 s.

KUTÍLEK, M., 1978: *Vodohospodářská pedologie*. Praha: SNTL/ALFA, 261 s.

POKORNÝ E., FILIP J., LÁZNIČKA V., 2001: *Rekultivace*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 128 s.

STATSOFT Inc., 2007: STATISTICA data analysis software system, version 8.0., www.statsoft.com

ŠARAPATKA B., NIGGLI U., 2008: *Zemědělství a krajina: cesty k vzájemnému souladu*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 271 s.

DEVELOPMENT OF COMMUNITY COMPOSTING OPTIONS IN ŠTERNBERK

MOŽNOSTI ROZVOJE KOMUNITNÍHO KOMPOSTOVÁNÍ VE ŠTERNBERKU

Stonawská K., Vaishar A., Kotovicová J.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: katerina.stonawska@gmail.com

ABSTRACT

This paper deals with the issue of community composting in Šternberk in the Olomouc district. To describe and evaluate raw material sources for composting in town Šternberk as well as to assess the current state of raw material composition is the aim of this paper.

The author proposed the system of more efficient prevention and possible storage of biodegradable waste to landfills. The proposed system was based on her own analysis of the raw material composition of mixed municipal waste and on public inquiry investigation. The paper also outlined ongoing preparation of involvement the whole city into proposed pilot program.

It is conducted an analysis of the composition of a representative sample of municipal waste that was brought from the city to the landfill. This analysis was done to determine raw material composition of municipal waste and to determine whether it is useful to propose a system of community composting at that city.

Successful community composting depends primarily on the citizens. An anonymous questionnaire which examined their interest in waste separation was used for this reason. Answers from 50 respondents were received. The participation in biological waste separation system was considered by 18% of respondents, but only under the assumption that this activity would brought them a discount from charges for refuse waste. About 8% of respondents favoured for regular collection of bags with bio-waste. More than half (64%) would like to lent from city biocontainer. About 10% of respondents were undecided to sort bio-waste.

This paper was written for Šternberk city. It should help them devise a development of community composting. Currently, a pilot project, based on findings from this paper, is starting.

Key words: community composting, bio-waste container, high volume container, green waste, green waste compost

ÚVOD

Současná, konzumně zaměřená společnost je nucena nacházet alternativy pro řešení stále se zvyšujícího množství odpadů. Z veškeré produkce odpadů v České republice přibližně jedna pětina připadá na biologicky rozložitelné odpady.

Nejen ve světle této skutečnosti vešla v platnost a účinnost v souladu s právem Evropských společenství směrnice Rady č. 1999/31/ES, o skládkách odpadů, kterou ČR implementovala do svého právního systému nařízením vlády č.197/2003 Sb., o Plánu odpadového hospodářství České republiky, v platném znění, v němž se zavazujeme ke snížení maximálního množství biologicky rozložitelných komunálních odpadů ukládaných na skládky tak, aby podíl této složky činil v roce 2013 nejvíce 50 % hmotnostních s výhledovým snížením v roce 2020 na nejvíce 35 % hmotnostních z celkového množství biologicky rozložitelného komunálního odpadu vzniklého v roce 1995.

K dosažení tohoto cíle má napomoci mj. i podpora vytvoření sítě regionálních zařízení pro nakládání s komunálními odpady, zejména výstavba kompostáren.

Nový typ kompostáren, kdy se na kompostování podílí celá komunita (tedy proto komunitní kompostování), je z praktického i legislativního hlediska chápáno jako způsob předcházení vzniku odpadů. Jeho nevýhodou je pouze omezení typu surovin určených ke kompostování – „...nelze zpracovávat kuchyňský bioodpad, případně bioodpad od jiných původců na území obce (např. sportovní kluby či podnikatelé).“ (Jalovecký J., 2010)

Rozhodnutí obcí komunitně kompostovat je finančně podporováno. V rámci prioritní osy 4 operačního programu Životní prostředí je možné požádat o subvence na zkvalitnění nakládání s odpady.

MATERIÁL A METODIKA

Prvotním úkolem bylo zhodnocení surovinových zdrojů komunitního kompostování na základě informací Českého statistického úřadu, následně bylo zapotřebí analyzovat stávající stav surovinové skladby v regionu rozbořením složení směsných komunálních odpadů (zbytkový odpad po třídění) z města Šternberka.

Anonymním dotazníkovým šetřením byl zjištěn zájem obyvatel města o zapojení se do systému komunitního kompostování. Rozhovorem s místostarostou města, odpovědným za odpadové hospodářství, jsem zjistila, že v červenci 2011 byla uvedena do provozu Komunitní kompostárna Šternberk, avšak její provoz značně stagnuje. Nahlédla jsem i do technických zpráv komunitním kompostárny.

Na základě syntézy všech získaných údajů a poznatků jsem navrhla systém separovaného sběru ve městě Šternberk na všech jeho katastrálních územích, doporučila konkrétní typ nádob, systém svozu, navrhla možnosti nakládání se zeleným kompostem a doporučila osvětu obyvatel. Pro ověření navrženého systému separovaného sběru zeleného odpadu byla použita SWOT analýza.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Zhodnocení stávajícího stavu surovinové skladby

Za účelem zjištění surovinové skladby komunálních odpadů a zjištění, zda ve vybraném regionu bude účelné navrhnout systém komunitního kompostování, jsem provedla analýzu složení reprezentativního vzorku přivezeného komunálního odpadu z města Šternberka na skládku odpadů skupiny S-OO v Mrsklesích. Výsledky analyzovaných 78 kg odpadu popisuje tabulka 1.

Tabulka 1: Podílové zastoupení jednotlivých složek SKO – výsledek analýzy

složka směsného komunálního odpadu	hmotnost (kg)	% zastoupení
kovy	1,5	1,92
inertní odpad	11,2	14,36
sklo	4,7	6,03
papír	3,3	4,23
plasty celkem	3,6	4,62
z toho: PET	1,0	1,28
nápojové kartony	1,8	2,31
textil	0,3	0,38
pleny	1,0	1,28
kompostovatelný odpad	48,5	62,18
SKO	3,8	4,87
NO	0,1	0,13
celkem	78	100

Zdroj: Ing. K. Stonawská

Komunitní kompostování ve Šternberku

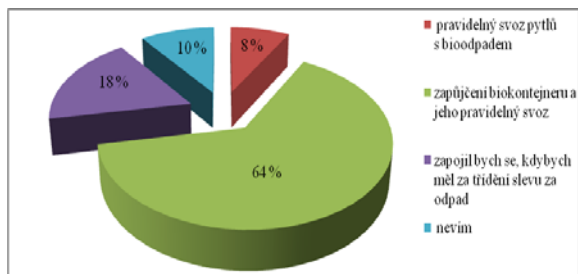
K 1. 7. 2011 byl ve městě zahájen provoz nové komunitní kompostárny, jejíž vybudování bylo jednou z nejdůležitějších investic ve Šternberku v oblasti životního prostředí za rok 2011. V souladu s platnou legislativou komunitní kompostárna zpracovává odpad z městské zeleně a je zde možné ukládat rostlinné zbytky vzniklé údržbou veřejných ploch zeleně (listí, tráva, větve), které pocházejí ze Šternberka a místních částí.

Úspěšné komunitní kompostování je však závislé především na občanech, z tohoto důvodu jsem formou anonymního dotazníkového šetření zjišťovala jejich zájem o separaci odpadu. Celkem jsem získala odpovědi od 50 respondentů.

Klíčovou otázkou dotazníku byla poslední otázka – zda vůbec jsou občané Šternberka ochotni se do systému sběru biologicky rozložitelného odpadu zapojit a třídit zeleň.

Předpokládala jsem nízký zájem o nabízenou možnost odevzdávat bioodpad ve sběrném dvoře (Uničovská 64). Můj předpoklad se naplnil, nikdo z dotazovaných o tuto možnost neprojevil zájem. Odpovědi na otázku shrnuje graf č. 1.

Graf 1: Zájem o zapojení do systému separace bioodpadu



Zdroj: Ing. K. Stonawská

Návrh rozvoje komunitního kompostování

Ve Šternberku jsou již patrné začátky komunitního kompostování. Občané začali kompostovat v zapůjčených 500 kompostérech, které však kapacitně nepokrývají potřeby obyvatel města. Nutnost zavedení navrhovaného systému komunitního kompostování ve Šternberku a naléhavost občany informovat o důležitosti odklonu zeleného odpadu od skládkování dokládá i obr. 1 pořízený v chatářské oblasti města.

Obr. 1: Sběrná nádoba v chatářské oblasti



Zdroj: MVDr. Jiří Neužil, 2011

Navrhla jsem proto zavedení separovaného sběru zeleného odpadu do nádob na bioodpad, 1 ks pro rodinné a bytové domy se zahradou. Ve Šternberku je podle sčítání ČSÚ (ke dni 26. 3. 2011) celkem 1 974 obydlených domů se zahradou, což činí 1 974 nádob. Pro část města s rekreačními soukromými chatami se mi jeví jako optimální varianta přistavení VOK ve stanoveném termínu. Současně by ve městě měla být možnost osobního, nezaplatněného odložení zeleného odpadu

ve sběrném dvoře nebo přímo v kompostárně. Rovněž navrhuji, aby město dalo k dispozici občanům města ještě dalších alespoň 1 000 kompostérů.

Náklady na pořízení kompostérů a sběrných nádob mají finanční návratnost do 4 let s využitím dotace ve výši 40 % uznatelných nákladů, bez využití dotace 6,59 let.

Využití komunitního kompostu

Vzhledem k tomu, že je zelený kompost produktem komunitního kompostování, je dle §10 zákona o odpadech určen pouze pro využití města na jeho pozemky. Jako klíčové bych viděla použití kompostu k rekultivaci bývalé skládky odpadů, která leží nedaleko od kompostárny, což by nezvyšovalo náklady na uložení kompostu. Jako vhodné řešení bych shledala i rozšíření veřejné zeleně ve městě, využití kompostu k rekultivaci „hluchých“ nebo „bílých“ míst města nebo přímo aplikovat kompost na veřejné plochy (parky, biokoridor řeky Sítky). Rovněž lze kompost bezplatně nabídnout občanům jako výměnu za zelený odpad dovezený na kompostárnu.

Pilotní projekt komunitního kompostování ve Šternberku

Rada města po zvážení výše popsaných návrhů na rozvoj komunitního kompostování rozhodla o přípravě pilotního projektu, který předpokládá podání projektu na SFŽP k získání dotace na nákup bionádob, a dále rozhodla zahájit pilotáž komunitního kompostování na jaře 2013 ve vybraných lokalitách (zástavba rodinných domů se zahradami). Vytipovaným občanům budou zdarma zapůjčeny nádoby na svoz separovaného zeleného odpadu a pro podpoření myšlenky separace i barevně označené pytle na papír, plasty a sklo. Projekt bude podpořen letákovou kampaní do domácností, billboardem u sběrného dvora a edukačními programy na základních a středních školách a v seniorských domech, na jejichž realizaci se podílím. Délka trvání pilotního projektu se předpokládá 2 roky, poté bude projekt vyhodnocen a v případě úspěchu rozšířen do dalších městských lokalit.

ZÁVĚR

V loňském roce bylo na pravidelném setkání obcí svazové oblasti firmy REMIT, s. r. o. v systému EKO-KOM a. s. ve Šternberku předneseno jednatelem společnosti REMIT, s. r. o. MVDr. Jiřím Neužilém několik závěrů. Jedním z prezentovaných závěrů bylo např. přesvědčení, že občané neshledávají životní prostředí jako aktuální problém a že odpady nejsou hlavním problémem životního prostředí. Právě s těmito závěry nemohu souhlasit. Nejen mé dotazníkové šetření, ale i anketa Hnutí DUHA z roku 2009 dokazuje, že lidé spojení odpadů se životním prostředím vnímají a mají zájem o řešení tohoto problému. Hnutí DUHA zjistilo při dotazníkovém průzkumu ve Šternberku v červenci 2009, že separace odpadů je samozřejmostí pro 86 % respondentů, v mém šetření v roce 2011 odpad separuje 92 % respondentů, 90 % dotazovaných by se do separace bioodpadů i rádo aktivně zapojilo.

S tezí pana MVDr. Neužila, že odpady je nutno „zatraktivnit“ (čistá separační místa, nové nádoby, čistota okolí), souhlasím. Hnutí DUHA získalo od 43 % dotazovaných nespokojené vyjádření

na vzhled okolí separačních nádob. V mém dotazníkovém šetření bylo pro 16 % dotazovaných demotivujícím faktorem pro zvýšení separace odpadu právě nepořádek v okolí kontejnerů, jejich nevzhlednost a přeplněnost.

Bude-li chtít město Šternberk rozvinout komunitní kompostování, nemůže se zaměřit pouze na separaci zeleného odpadu a následnou produkci zeleného kompostu. Nezbytná je výchova občanů k separaci odpadů jako takových, naučit je vnímat veřejné plochy ve městě jako místa, která jsou součástí jejich životů. Naprosto nezastupitelnou roli v úspěšném komunitním kompostování hraje osvěta a výchovný „bodový systém“, kdy po dobu trvání pilotního projektu svozu budou žlutou samolepkou označovány ty nádoby, do nichž občané vkládali jiný než daný odpad. Rovněž se již začínají plánovat semináře, přednášky pro dětské posluchače a seniory na téma komunitní kompostování, jeho klady a zápory a využívání kompostu. Pro školní třídy je na Den Země (22. 4. 2013) připraven zábavně naučný program v areálu komunitní kompostárny.

LITERATURA

Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů. In: Sbíрка zákonů, Česká republika. 2001.

ENERGYSAVINGCOMMUNITY.2010: Community Composting Projects online [cit. 2012-04-10]. Dostupné na: <http://www.energysavingcommunity.co.uk/community-composting-projects.html>

JALOVECKÝ J., 2010: *Budování kompostárny musí předejít podrobná analýza*. In: EnviGroup online [cit. 2012-03-10]. Dostupné na: <http://www.envigroup.cz/www/aktuality/aktualita-143.html>

KOTOULOVÁ Z., VÁŇA J., 2001: *Příručka pro nakládání s komunálním bioodpadem*. Ministerstvo životního prostředí ve spolupráci s Českým ekologickým ústavem, Praha, 69 s. ISBN 80-721-2201-0.

PASTOREK Z.,: *Legislativa bioodpadů - kompostování v praxi*. Text online [cit. 2012-03-22]. Dostupné na: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/legislativa-bioodpadu-kompostovani-v-praxi>. ISSN 1801-2655.

ESTIMATION OF ABOVE GROUND WOODY BIOMASS OF SRC HYBRID POPLAR CLONE J-105 IN DIFFERENT FERTILIZER TREATMENTS IN CZECH-MORAVIAN HIGHLAND

Tripathi A.M.^{1, 3}, Trnka M.^{1, 2}, Fischer M.^{1, 2}, Orság M.^{1, 2}, Fajman M.⁴, Marek M.V.¹, Žalud Z.^{1, 2}

¹Global Change Research Center AS CR, v. v. i., Brno, Czech Republic

²Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

³Institute of Forest Ecology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

⁴ Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: manicfre@gmail.com

ABSTRACT

Short rotation coppice poplar hybrid clone J-105 (*Populus nigra* x *P. maximowiczii*) is studied as an alternative source of bio-energy in the region of Czech-Moravian Highland. The plantation was established in 2001 at the locality Domanínek in the vicinity of Bystřice nad Pernštejnem (Czech Republic, 49°32'N, 16°15'E and altitude 530 m a. s. l.) where mean annual rainfall of 609 mm and mean annual temperature of 7.2°C was recorded between 1981 and 2010. The total area planted with the clone was close to 1.5 ha with total plantation area being close to 3.5 ha. The plantation with planned density of 9,216 trees ha⁻¹ was established on the former agricultural land and the length of the rotation cycle was set to 6-8 years. At the beginning of the second rotation period i.e. in spring 2009 (following winter harvest), the plantation was divided into four randomized blocks with different nutrient treatments and three replicates (4×3). These treatments comprised of application of mineral NPK fertilizer (nitrogen 305 kg ha⁻¹, phosphorous 154 kg ha⁻¹ and potassium 291 kg ha⁻¹), sewage sludge (4200 kg/ha⁻¹) and ash (1000kg ha⁻¹) and lime (5 ton ha⁻¹), while control was with natural nutrients content only (deposition and leaves mineralization). The objectives of the study were to estimate the above ground annual yields (based on allometry and stem inventory), the mortality and the shoot to stump ratio as the main productivity characteristics.

Key words: short rotation coppice, bio-energy, poplar, allometry, biomass dry matter content (dmc), shoot ratio

INTRODUCTION

Short-rotation coppice of fast growing woody biomass production represents the good source of alternative energy. This production is suitable where food production is low and also profitable due to soil and/or climate conditions. Short rotation forestry was introduced since 1960's with research focused on growing willows in Sweden (Siren et al. 1987). Fast growing broadleaved trees such as poplar and willow, switched to producing woody biomass for energy after the 1970's oil crisis. Coppice of the short rotation forestry refers to the tree cuttings at the base of trunk and mimics natural disturbance process for instance fire and resulting in the re-growth of new shoots from roots and or stump (Blake 1983). Coppicing could increase the final biomass production and is an alternative for replantation (Sennerby-Forsse et al. 1992). With respect to water use, biomass productivity of short rotation coppice (*Populus nigra* × *P. maximowiczii*) is more efficient than the most of the broadleaved species. However annual rainfall more than 450-500 mm is needed to ensure their profitable yields in the conditions of Czech Moravian highlands (Fischer et al. 2011). Apart from the water availability, the soil fertility constitutes one of the most preconditions for successful growing. Fertilization is typically one of the least expensive treatments for increasing yields. The establishment of new plantation can be improved by fertilizing at the time of planting to increase the fast growth rates, allowing the trees to overtop competing vegetation and form established stands earlier, ultimately reducing the time period between planting and harvest (Miller, 1981). Fertilization in fast growing hybrid poplar (*Populus sp.*) is more effective (Van den Driessche, 1999). The effects of the fertilizers in the second and third growing seasons of the poplar sp. is relatively small and negative effects of nitrogen fertilization on growth of some poplar such as clones 33 and 794 (DesRochers et al. 2006). In short rotation forestry (SRF) system fertility manage by the nutrient cycle in temperate region or under natural forest conditions, the nutrients leached from soils are usually almost negligible (Heilman et al 1998). In agricultural soils, enriched source of main nutrients (N, P, K and Ca) is maintained by the frequent use of mineral and organic fertilization. (Schwabisch 1994). In case of leaf growth, there is a requirement of such huge amount of nutrients but in some cases of poplar clones, mineral fertilizers can restricts the growth of stems (Van den Driessche 2007.). In case of some clonal experiments, comparison clones such as J-105, J-104 and P-473, highest survival rate was observed in J-105 of Czech Moravian Highlands (Trnka et al. 2008). Coppice cultures are specified by a high shoot density and high stool density and studies of mortality is dependent on intraspecific competition in crowded populations and shoots size and mortality was studied (Laureyens et al. 2005).

Aim of the presented paper is to estimate the biomass (dmc) standing stock annual yields (based on allometry and stem inventory), mortality and the shoot to stump ratio as the main productivity characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Site description and management regimes

The plantation was established in April 2001 with planned high density 9,216 trees ha⁻¹ on arable land and the length of the rotation cycle was set to 6-8 years for verification of performance of selected poplar hybrid clone J-105 (*Populus nigra* × *P. maximowiczii*). The total area is close to 1.5 ha with total plantation area being close to 3.5 ha. The site is located in Domaníněk near Bystřice nad Pernštejnem (Czech Republic, 49°32'N, 16°15'E and altitude 530 m a.s.l.) where mean annual rainfall of 609 mm and mean annual temperature of 7.2°C was recorded between 1981 and 2010. The area is wet and generally cold temperature climate typical for this part of Middle Europe with mingling continental and maritime influences. The site is suitable for the short rotation forestry based on *Populus sp.* and their clones according to Havlickova et al. (2006) as the area belongs to the climatic region (no. 7). Weather parameters were obtained from meteorological station Bystrice nad Pernštejnem (Czech Republic). At the beginning of the second rotation period in spring 2009 (following winter harvest), the plantation was divided into four randomized blocks with different nutrient treatments and three replicates (4×3). These treatments comprised of the application of mineral NPK fertilizer (nitrogen 305 kg ha⁻¹, phosphorous 154 kg ha⁻¹ and potassium 291 kg ha⁻¹); the sewage sludge (21,000 kg ha⁻¹ of raw sludge containing 4200 kg. ha⁻¹ of dry matter) and ash (1000 kg ha⁻¹); and the lime (5 ton ha⁻¹); while control was with natural nutrients content only (deposition and leaves mineralization). The mineral fertilizers used were urea (N 46%), amofos (P 52%) and potassium salt (K 58%). Lime as a source of Ca and Mg was used to improve the soil acidity (pH).

Tab. 1: Climatic and soil conditions on selected research site

Climatic characteristics						
Parameter	Units	Jan-Dec	Apr-Sep	Jun-Aug	Dec-Feb	
Mean air temperature (1961-1990)	°C	6.6	12.8	15.5	-2.7	
Mean air temperature (2002-2010)	°C	7.6	14.2	16.9	-2.3	
Mean precipitation sum (1961-1990)	Mm	580.6	359.6	208.3	113	
Soil characteristics						
Component	Units	Depth (cm)				
		0-24	24-66	66-94	94-130+	
Silt	wt %	50	46.1	38.7	19.6	
Clay	wt %	15.8	26.3	18.6	13.3	
Bulk density	g/cm ³	1.55	1.64	1.59	1.64	
Organic matter	wt %	2.65	0.28	0.14	0.14	
Total nitrogen	wt %	0.16	<0.05	<0.05	<0.05	
pH (KCl)		5.9	5.4	4	3.4	
Available P	mg/kg	148	1.3	0.9	24	
Available K	mg/kg	151	91	62	76	
Available Mg	mg/kg	143	230	278	291	
Available Ca	mg/kg	1230	1353	748	652	

Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was used to test the significance of differences in stool mortality, shoot to stump ratio and above ground woody biomass (dmc) standing stock between fertilizers in different years. The analysis was performed with the statistical package STATISTICA 9 (StatSoft, Inc., USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Mortality

Stool mortality rate naturally increased with the increase in the year but in some treatments, it stayed constant like e.g. in lime treatment. In case of control, the mortality was the lowest but the difference being non-significant. Interestingly, in some rare cases (e.g. in control) the mortality can be lower in the following year because of some shoots regeneration after years. However, its impact on the overall mortality was of minor interest. After the second year of the second rotation period, the average mortality of stools was recorded to be 17.86% in case of mineral, 22.62% in case of sewage sludge and ash, 5.35% in case of lime and 15.48% in case of control and third years it is varied as 20.83% in mineral, 22.62% in sewage sludge and ash, 5.36% in lime and 12.20% in the

control (Table 2). In 3rd years coppicing stool mortality increased but ANOVA results had no significant difference [$p > 0.05$ (Fig. A & D)].

Shoot to stump ratio

After coppicing, many shoots sprouted from the stumps. After the 2nd and the 3rd year an average of 4 or 5 shoots emerged from the stumps. The fertilizers mineral and the sewage sludge and ash had an average of 4 shoots per stump. The fertilizers lime and the control had an average of 5 shoots per stump. All fertilizers treated and non-treated shoots to stump mean and standard deviation ratio according to year (Table 2). After ANOVA results, it was observed that all fertilized and non-fertilized shoot to stumps ratio had no significance differences [$p > 0.05$ (Fig B & E)].

Biomass

We estimated the above ground woody biomass (dmc) standing stock in *Populus* hybrid clone J-105. We used the allometry power function equation (unpublished data) for the different fertilizer treatments including control. After the coppicing in 2nd year, an average biomass (dmc) production 16.67 ton ha⁻¹ was observed in mineral treatment, 15.12 ton ha⁻¹ sewage sludge and ash, 15.34 ton ha⁻¹ lime and 15 ton ha⁻¹ in control and after 3rd years, it was increased by almost two times in among all fertilizer and non-fertilizer treatments. The *Populus* hybrid clone J-105 mean and standard deviation of 2nd and 3rd year biomass production is shown (Table 2). The ANOVA results showed no significant difference ($p > 0.05$). The figure 1(C & F) shows biomass (dmc) production standing stock in fertilizer and non-fertilizer treatments, after the 2nd year (2010) and the 3rd year (2011). We also estimated the annual above ground woody biomass (dmc) increment in standing stock from 2nd to 3rd year. An average biomass (dmc) increment is 13.62 ton ha⁻¹ in mineral, 13.82 ton ha⁻¹ in sewage sludge and ash, 9.16 ton ha⁻¹ in lime and 14.49 ton ha⁻¹ in control. Annual mean and standard deviation of biomass increment among fertilized and non-fertilized (Table 3) and ANOVA results showed no significant differences ($p > 0.005$) figure 1 (G).

Tab. 2: Average mortality of stool in percentage, number of shoots per stump and above ground of woody biomass (dmc) standing stock ton per ha⁻¹ in different fertilizer treatments, the mineral (NPK), the sewage sludge and ash, the lime and the control (non-fertilized) after the first coppicing 2nd (2010) and 3rd (2011) year, respectively.

Year	Fertilizer	Traits		
		Stool mortality (%) (dmc) t/h	Shoot to stump ratio	Biomass production
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
2010	Mineral	17.86±14.29	4±1	16.67±4.35
	Sewage sludge and Ash	22.62±9.83	4±0	15.12±3.23
	Lime	5.36±4.72	5±0	15.34±3.11
	Control	15.48±5.74	5±1	15.00±1.42
2011	Mineral	20.83±17.89	4±1	30.29±6.68
	Sewage sludge and Ash	22.62±8.44	4±0	28.94±4.13
	Lime	5.36±7.78	5±0	24.50±7.56
	Control	12.20±8.10	5±1	29.49±2.57

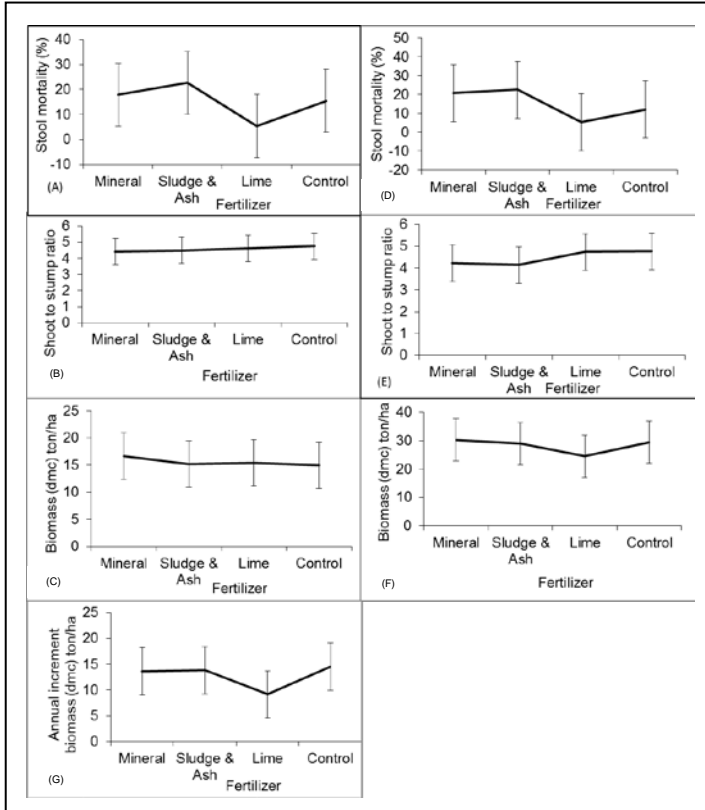
Tab. 3: Average annual above ground woody biomass (dmc) standing stock increment after the first coppice rotation from 2010 (2nd) to 2011 (3rd) year ton ha⁻¹ in different fertilizer treatments.

Fertilizer	Annual biomass (dmc) increment ton ha ⁻¹ (mean±sd)
Mineral	13.62±2.36
Sewage sludge and Ash	13.82±2.07
Lime	9.16±5.96
Control	14.49±1.28

Fig. 1: A & D shows shoot mortality (%), B & E shoot to stump ratio, C & F biomass (dmc) ton/ha in 2010 and 2011 individually and G annual biomass increment. Vertical error bars denote confidence interval of 0.95.

2010

2011



CONCLUSION

The study focused on the effect of the fertilisation during the second rotation at 11-year old experimental poplar coppice culture plantation. We estimated biomass (dmc) production of *Populus* hybrid clone J-105 using power allometry equation and inventory. This was used to estimate the biomass production of standing stock for hybrid clone J-105 in different fertilizer treatments and control (non-fertilized). The *Populus* hybrid clone J-105 of shoots per stump, mortality of stools as well as the production of biomass showed no significant difference across all treatments, thus, showing no benefit of fertilisation three years in the second rotation.

LITERATURE

- Blake, T.J. (1983): Coppice systems for short-rotation intensive forestry. The influence of cultural, seasonal and plant factors. Aust. For. Res. 13, 279-291
- DesRochers A., R. van den Driessche, Barb R. Thomas (2006): NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. (232) 216-225
- Fischer M., Trnka M., Kučera J., Fajman M., and Zalud Z. (2011): Biomass productivity and water use relation in short rotation poplar coppice (*Populus nigra* × *P. Maximowiczii*) in the conditions of Czech Moravian Highlands. Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae mendelianae Brunensis (LIX): 1-11.
- Havlickova K., Weger J., Havlickova B., Vranty F., Taborska M., Knappek J., Vasicek J., Soucekova H., Gallo P., Hejda J., Kajan M. (2006): Methodology for analysis of biomass potential as renewable source of energy. Acta pruhoniciana. (83): 1-96.
- Heilman P. and Richard J. N. (1998): Nutrient cycling and fertility management in temperate short rotation forestry systems. Biomass and bioenergy 14 (4): 361-370
- Laureysens I., Deraedt W., Ceulemas R. (2005): Population dynamics in 6-year old coppice culture of poplar II. Size Variability and one-sided competition of shoots and stools. Forest Ecology and Management 218, 115-128.
- Miller, H.G. (1981): Forest fertilization: Some guiding concepts. Forestry (54): 157-167
- Sennerby-Forsse, L., Ferm, A., kauppi, A. (1992): Coppicing ability and sustainability. In:
- Mitchell, C.P., Ford-Robertson, J.B., Hinckley, T.M., Sennerby-Forsse, L. (EDs.), Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops. Elsevier applied Science, Oxford, UK, pp. 146-184.
- Siren G., Sennerby-Forse L., Ledin S. (1987): Energy plantations-short rotation forestry. In: Hall D.O., Overend R. (eds.): Biomass-Regenerable Energy. John Wiley and Sons, Chichester. 199-143
- Schwabisch H.A. (1994): Soil management, soil functions, and soil fertility. Results and recommendations of an interdisciplinary workshop promoted by the Robert Bosch Foundation, Stuttgart. Bleicher, stuttgart i in Germany, with an extended English summary).
- Trnka M., Trnka P., Fialova J., Koutecky V., Fajman M., Zalud Z., Hejduk S. (2008): Biomass production and survival rates of selected poplar clones grown under a short-rotation system on arable land. Plant Soil Environ., 54 (2): 78-88.

THE EVOLUTION OF NATURE-LIKE VEGETATION IN ŘÍČKA CANYON BETWEEN ŠLAPANICE AND BEDŘICHOVICE DURING LAST 140 YEARS

VÝVOJ PŘÍRODĚ BLÍZKÉ VEGETACE BĚHEM POSLEDNÍCH 140 LET V ÚDOLÍ ŘÍČKY MEZI ŠLAPANICEMI A BEDŘICHOVICEMI

Trunda P., Štykar J.

Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocoenology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: petr@centrum.cz

ABSTRACT

This study engages Říčka canyon area, so called "Líchy" and its surroundings. The area takes place between town Šlapanice (approx. 10 km to the south-east from Brno), and village Bedřichovice. The work follows development of nature-like vegetation on the location from 1865 till nowadays (2006), based both on historical sources and the own research. The base of the work consists of detailed floristic research of the forest societies, the woodless grassland societies, and the water influenced societies. The study notices biodiversity development, the data are compared with data of previous studies. Simultaneously it researches a time development of the Ellenberg ecological-cenotical characteristics, including possible reactions of vegetation to climate changes. It deduces some generally valid conclusions from results for development of this locality's type - it means localities with original majority of grassland societies during the period from finished intensive agricultural management in 19th century until today. Some partial conclusions could be used in the landscape planning, the nature protection, and forestry - protecting practice.

Key words: land use development, biodiversity development, plant succession, Ellenberg indicator values, climate changes

ÚVOD

Vliv člověka na krajinu je dlouhodobý a setrvalý. S časem se pouze měnily způsoby a intenzita obhospodařování krajiny. Během pouhých 150 ti let jsme měli možnost pozorovat ústup od tradičního zemědělského využívání krajiny, přes kolektivizaci a velkoplošný způsob hospodaření až k nynějšímu stavu. Mnoho míst, kde se do dnešních dnů zachovala vysoká biodiverzita v porovnání s okolím, jsou kdysi intenzivně využívané plochy, jako bývalé pastevní lesy, výmladkové lesy, opuštěná lada, nebo pastviny.

Jedním z takových míst a *předmětem této práce* je přírodě blízká vegetace úzkého průlomového údolí Řičky, zvané Líchy, mezi Šlapanicemi a Bedřichovicemi, asi 10 km jihovýchodně od Brna. Díky druhovému bohatství místní flóry začali tomuto území již v druhé polovině předminulého století věnovat pozornost botanici. Jeden z prvních byl G. Niessl, profesor brněnské techniky, přítel J.G.Mendela, spoluzakladatel a sekretář „Přírodovědného spolku v Brně“. V časopise „Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn“ z roku 1865, uveřejňuje podrobný topografický a botanický popis lokality. Jako jeden z prvních botaniků ve střední Evropě uvádí z určitého území celkový výčet druhů. V roce 1914 rostlinstvo na lokalitě podrobně prostudoval H. Iltis, a publikuje v témže časopisu větší práci, v níž změny vegetace srovnává se stavem před 50 lety. V roce 1928 zahrnul J. Podpěra, tehdejší profesor MU v Brně, popis zdejší květeny do svého rozboru vegetace Moravského krasu, uveřejněném v Časopisu Moravského muzea. V témže roce pojednal o zdejší květeně i J. Hruby, v Průvodci brněnskou květenou. Na předchozí autory navázal F. Kühn. V roce 1965 popsal květenu mezi Šlapanicemi a Bedřichovicemi ve sborníku Klubu přírodovědeckého v Brně, 100 let po Niesslovi a 50 let po Iltisovi, a srovnal její vývoj s předchozími autory. V roce 1992 F. Kühn zpracoval pro odbor životního prostředí Okresního úřadu Brno - venkov studie z území, zabývající se inventarizačními průzkumy květeny.

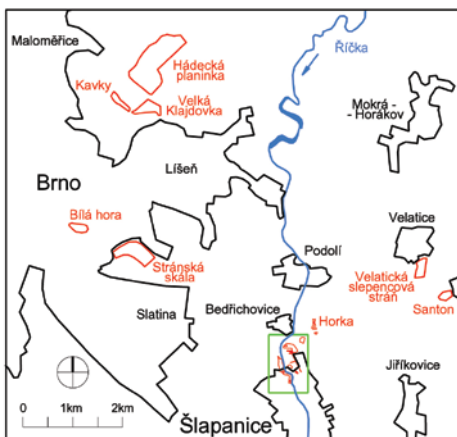
Vzhledem k této skutečnosti můžeme v území rekonstruovat časový vývoj vegetace od upuštění od pastvy a jiného tradičního obhospodařování krajiny, až do současnosti, a přitom poznat některé zákonitosti, jimiž prochází časový vývoj vegetace obdobných území.

Cílem práce je porovnání vývoje vegetace a hospodářského využívání zájmového území mezi lety 1865 a 2006.

Oblast výzkumu je vymezena obdélníkovým výřezem o ploše 79 ha. Vrcholy obdélníku mají souřadnice: 49°10'42.35683'' 16°42'58.72789''; 49°10'45.06780'' 16°43'37.51907''; 49°10'05.01561'' 16°43'04.80234''; 49°10'07.42595'' 16°43'43.58545''. Nejnižší místo leží na úrovni 223 m n.m., nejvyšší 267,5 m n.m. Území bylo zařazeno dle přírodních poměrů do Lechovického bioregionu, součásti Severopanonské podprovincie. V zájmovém území vystupuje

ostrov kulmu, zastoupený račickými slepenci, nad okolní tercierní a kvartérní sedimenty. Byly vymezeny čtyři základní půdní typy : kambizem, fluvizem, litozem a hnědozem. Na větší části území se dříve rozkládaly pastviny, na menší části les.

Obr. 1. Výřez, ve kterém leží zájmové území, a jeho vztah k okolním, botanicky chráněným lokalitám



MATERIÁL A METODIKA

1.

Vzhledem k tomu, že se jedná z velké části o historickou studii, bylo nezbytnou součástí práce studium historických materiálů a mapových podkladů, na jejichž základě byla provedena rekonstrukce vývoje území. Plochy s přírodě blízkou vegetací, popisované dřívějšími botaniky, díky různému obhospodařování v čase a prostoru, měnily svou rozlohu. Abychom tedy co nejpřesněji lokalizovali historickou situaci, popisovanou předchozími autory, bylo nezbytné vycházet z historických map. Vývoj byl rekonstruován od roku 1826 po současnost. Byly použity různé mapové podklady: I. a III. vojenské mapování a mapy tzv. stabilního katastru (indikační skicy). Údaje o obhospodařování území byly čerpány z těchto indikačních skic z let 1826, 1872, 1915. Dle Niesslových popisů rozloha a umístění vegetačních segmentů přírodě blízké vegetace stav z mapy z roku 1826 na pravé straně údolí odpovídal i roku 1865, na levé straně údolí pak roku 1872. Stav využití krajiny z 1980 byl čerpán z katastrální mapy 1981. Pro srovnání historických dat se současným stavem byla použita orthofotomapa z r. 2004. Z digitálně zpracovaných map byly zjištěny výměry jednotlivých kategorií využití pozemků zájmového území - vodní toky, orné půdy, pastvin, luk - sadů - zahrad, lesů, vinohradů, i tzv. ostatních ploch. Jako pastviny jsou v roce 1980 i v roce 2004 označeny hlavně plochy s přežívající xerothermní vegetací, jež se blíží původnímu stavu, popisovanému starými autory, i když se třeba už několik desítek let neobhospodařují.

Všechna data byla zpracována v prostředí programu Microstation SE. Veškeré mapové podklady byly uvedeny do souladu s kladem mapových listů SMO, a na tomto základě byly vytvořeny vektorové mapy využití území v letech 1865, 1914, 1928, 1965, 1992 a 2006, tak, aby bylo možno zodpovědně porovnat vývoj struktury daného krajinného segmentu od 19 století do současnosti.

2.

Bylo provedeno podrobné studium prací předchozích autorů (Niessl, 1865; Iltis, 1914; Podpěra, 1928; Kühn, 1965 a Kühn, 1992), následoval vlastní průzkum území. Tento se udál v delším časovém období, mezi lety 2002 až 2006. Nejintenzivnější byl v roce 2005 a 2006. V těchto letech byla lokalita navštěvována od konce března do poloviny srpna nejméně každý týden, poté až do poloviny října ve 14 denních intervalech. Probíhalo cílené hledání druhů, uvedených v zápisech svých předchůdců, i hledání nových druhů. Následovalo sepsání soupisů vegetace. Tyto soupisy vegetace jsou uvedeny dle jednotlivých vegetačních segmentů v Tabulce výskytu dřevin (87 taxonů) a Tabulce výskytu bylin (510 taxonů).

Území výzkumu, dle jednotlivých autorů, bylo lokalizováno. Latinská nomenklatura soupisů vegetace byla sjednocena. Vegetační segmenty popisované jednotlivými autory byly na základě jejich popisu, studia historických map a reliéfu terénu rekonstruovány, v situačních mapkách byl zakreslen jejich časový vývoj, závisející na stavu obhospodařování lokality a na to navazující sukcesi. Travnatá rostlinná společenstva v území odpovídají třídě FESTUCO-BROMETEA (svaz *Festucion valesicae*), na skalnatých místech třídě KOELERIO-CORYNEPHORETEA (svaz *Alyssso alyssoidis-Sedion albi*). Mozaika travnatých a křovinatých společenstev náleží do třídy RHAMNO-PRUNETEA (svaz *Prunion spinosae*, s vyššími keři do svazu *Berberidion*). Les náleží do třídy QUERCO-FAGETEA (svaz *Carpinion*). Vegetace podél potoka odpovídá botanickému svazu *Alnion incanae* (třída QUERCO-FAGETEA).

Máme-li dlouhodobé údaje o změnách vegetace v průběhu času, můžeme se snažit posoudit, které změny podmínek prostředí jsou její příčinou. To lze zjistit korelací hodnot faktorů, které mají na vegetaci vliv. Tyto informace lze odvodit z dat o druhovém složení na příslušné ploše. Ke zjištění rostlinné odpovědi na prostředí se běžně využívají soubory indikačních hodnot, v tomto případě Ellenbergovy indikační hodnoty pro středoevropskou flóru (Hedl, 2005 in Vačkář, 2005). Pomocí ordinální škály o devíti až dvanácti členech udávají indikaci pro více než 2700 rostlinných druhů k sedmi nejdůležitějším ekologickým faktorům. V tomto případě se jedná se o šest charakteristik, a to pro světlo (L_E), teplo (T_E), kontinentalitu (K_E), vlhkost půdy (F_E), reakci půdy (R_E), zásobením půdy dusíkem (N_E).

K celkovému porovnávání soupisů posloužily aritmetické průměry indikačních hodnot. V případě indiferentnosti na nějakou hodnotu, daný druh není započítán. Vzhledem k metodice předchozích autorů, na kterou bylo nutno navázat, má každý druh stejnou indikační hodnotu, bez ohledu na pokryvnost. Analýza časových změn podmínek prostředí je provedena testem jednofaktorová parametrická Anova, který se používá pro více výběrů. Pro zjištění tohoto výběru, nebo více výběrů, byla použita Scheffého metoda mnohonásobného porovnávání.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Z digitálně zpracovaných map byly zjištěny výměry jednotlivých kategorií využití pozemků vymezené části údolí Řičky pro roky 1826, 1872, 1915, 1980, 2004 (byly k dispozici mapové podklady), a vypočítány **rozlohy hlavních kategorií využití pozemků**, jak ukazuje tabulka 1.

Tab 1: změny ve využití půdy (ha) na lokalitě

	r. 1826	r. 1872	r. 1915	r. 1980	r. 2004
vodní tok	1,75	1,43	1,37	1,63	1,37
orná půda	53	63,39	65,96	30,67	16,32
pastviny	11,47	9,66	7,69	1,74	1,44
louky, sady, zahrady	4,99	5,85	5,19	13,89	19,61
lesy	11,34	1,76	1,72	8,55	10,05
park	0,74	0,76	0,81	1,42	1,44
vinohrady	0,58	0,72	0,38	0,53	0
ostatní	0	0,3	0,58	0	0
zastavěné území	7,77	7,77	7,94	33,27	41,41

Z výsledků vyplývá, že podíl orné půdy stoupla do r. 1915, následuje poměrně prudký pokles v závislosti na nárůstu zastavěnosti území. Výměra lesa byla nejmenší v r. 1915, poté se díky sukcesí a výsadbám zvyšovala. Kategorie pastviny (nesekané travnaté plochy) se do r. 1915 se snižovala jen mírně, po roce 1915 můžeme zaznamenat prudký pokles díky opuštění předchozích hospodářských postupů a následné sukcesí v území. Výměry luk - sadů - zahrad vzrostly po r. 1915 a zvláště po r. 1980, na úkor orné půdy. Zastoupení ostatních kategorií bylo nepodstatné a nemělo na vývoj krajiny vliv. Podobný vývoj se dá zobecnit (s výjimkou horských oblastí) pro většinu území našeho státu.

Poté byly plošně rekonstruovány změny rozlohy a umístění hlavních vegetačních formací v letech výzkumu. V roce 1865, kdy se zde hospodařilo ještě kontinuálně s minulostí, největší rozlohu v zájmové oblasti zabírala travnatá společenstva otevřených ploch, využívaná jako pastviny. Se změnou hospodaření (zrušení pastvin v roce 1867, viz též 4.3.2) travnatých ploch bez dřevinné vegetace kontinuálně ubývá. Zachovaly se pouze buď na primárním bezlesí (výstupy kulmu), nebo na místech s blokovanou sukcesí narušováním biomasy, jako sečením, sešlapáváním apod. Nárůst v roce 2006 na 2,1 ha, ve srovnání z rokem 1992, kdy zde bylo zaznamenáno pouze 0,65 ha, je dán tím, že Kühn v roce 1992 zkoumal pouze přírodní památky, a nebral v úvahu jiné plochy přírodě blízké vegetace, které se zachovaly.

Opačný vývoj můžeme pozorovat u ploch porostlých dřevinnou vegetací (křoviny a les). V tomto případě se, díky sukcesí, dané útlumem pastvy a kosení, a též díky výsadbám, výměra zvyšuje. Není brán v úvahu, na rozdíl od kapitoly 4.2, rozvoj akátin na levé straně údolí. Mírné snížení v roce 2006, oproti roku 1992, zapříčinil zásah proti akátu v roce 1998, v rámci péče o rezervaci.

Tab. 2: sukcesní změny v zastoupení hlavních vegetačních formací na lokalitě (ha)

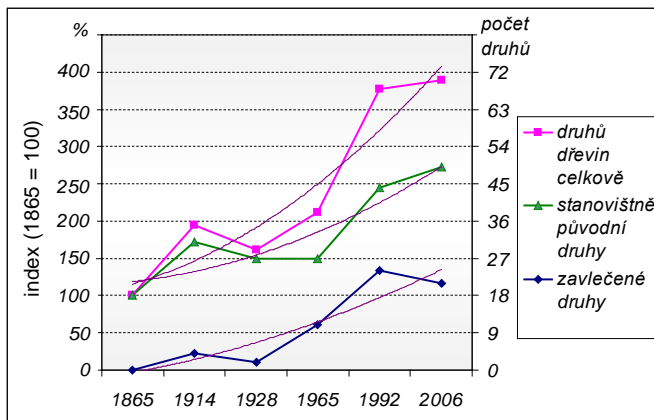
	otevřené plochy	les	společenstvo ovlivněné vodou
1865	12,86	2,08	-
1914	4,9	3,79	0,19
1928	4,85	4,02	0,19
1965	3,25	5,94	0,19
1992	0,65	5,61	0,53
2006	2,1	5,51	0,53

Důležitým ukazatelem vývoje vegetace jsou změny biodiverzity v čase. Výchozí podklad pro určení počtu jednotlivých kategorií druhů dřevin a bylin zkoumané oblasti v časové řadě (roky výzkumu) jsou „Tabulka výskytu dřevin“ a „Tabulka výskytu bylin“

Tab. 3: počet druhů jednotlivých kategorií dřevin na lokalitě v letech výzkumu

rok	1865	1914	1928	1965	1992	2006
druhů dřevin celkově	18	35	29	38	68	70
stanovištně původní druhy	18	31	27	27	44	49
zavlečené druhy	0	4	2	11	24	21

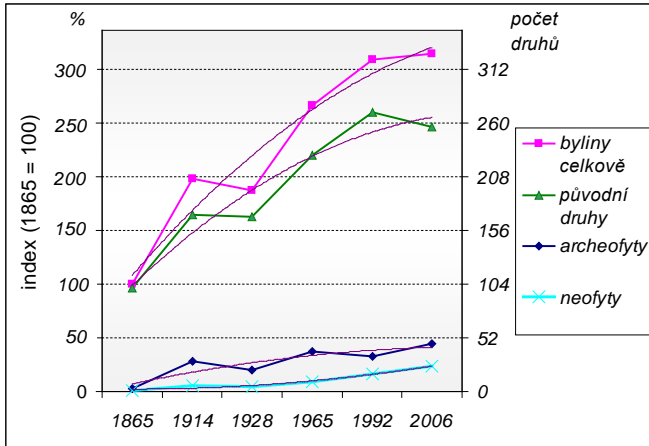
Obr. 2. Vývoj lokální (alfa-) diverzity jednotlivých kategorií druhů dřevin zkoumaného území v čase



Tab. 4: počet druhů jednotlivých kategorií bylin na lokalitě v letech výzkumu

rok	1865	1914	1928	1965	1992	2006
byliny celkově	104	206	195	277	322	327
původní druhy	100	171	169	229	271	256
archofyty	3	29	21	39	35	46
neofyty	1	6	5	9	16	25

Obr. 3. Vývoj lokální (alfa-) diverzity jednotlivých kategorií druhů bylin zkoumaného území v čase



Byla zpracována biodiverzita dřevin a bylin a rekonstruovány křivky vývoje trendů. U obou kategorií se v čase zvyšovala, zcela zřejmě jako následek sukcese území po přerušení intenzivního obhospodařování lokality a přilehlého okolí (pastva a jiné odstraňování nadzemní biomasy). Podíl nepůvodních druhů bylin a dřevin je ve srovnání s obdobnými lokalitami podléhajícími ochraně vysoký, což je nutno řešit managementem území. U nepůvodních druhů bylin (neofytů) bude pravděpodobně pokračovat vzestupný trend přílivu na lokalitu i v budoucnu, vzhledem k druhovému zastoupení neofytů v ČR a celkovému trendu vývoje. U původních druhů bylin se v r. 2006 ve srovnání s 1992 projevil pokles biodiverzity, což je způsobeno úbytkem druhově bohatých bezlesých ploch a jejich fragmentací.

Následně byly zpracovány ekologicko-cenotické charakteristiky dle Ellenberga pro světlo L_E , teplo T_E , kontinentalitu K_E , vlhkost F_E , půdní reakci R_E a dostupnost dusíku v půdě N_E pro jednotlivé časové řady botanických záznamů. Nejdříve byly zpracovány jednotlivé biotopy a poté i území jako celek.

V biotopu lesních společenstev u ekoelementu světlo L_E bylo zajištěno statisticky průkazné snížení aritmetických průměrů posledních tří výběrů. Je to pravděpodobně reakce na zvýšení zápoje stromového patra.

U ekoelementu teplo T_E u biotopu bezlesých ploch se projevilo statisticky významné snížení u výběrů z posledních dvou sledovaných období, tedy z let 1992 a 2006. Zřejmě díky fragmentaci bezlesých stanovišť a postupné změně hydrických poměrů (po útlumu pastvy a kosení byla na místě ponechávána stařina) se projevilo ústup ponticko-panonských a mediteránních xerotermofytů a nástup mezofilnějších druhů rostlin.

U ekoelementu kontinentality K_E v biotopu bezlesých ploch se projevuje shodná tendence z podobných příčin jako u tepla T_E . Většina teplomilných rostlin na lokalitě má i vysokou kontinentalitu.

U ekoelementu vlhkosti F_E v biotopu bezlesých ploch se projevuje statisticky výrazný nárůst hodnot v posledních dvou výběrech, oproti předchozím. Tento vývoj je vysvětlitelný tím, že se zde díky fragmentaci stanovišť a postupné změně hydrických poměrů (po útlumu pastvy a kosení byla na místě ponechávána stařina) projevil ústup na vláhu nenáročných xerothermofytů a nástup mezofilnějších druhů bylin. Tento trend potvrzují i výsledky u T_E .

Nároky druhů na půdní reakci R_E se statisticky významně v žádném biotopu neprojevily.

U ekoelementu dostupnost dusíku v půdě N_E v biotopu bezlesých ploch, hodnoty časových řad narůstají. Statisticky se liší výběr 1914 od výběru 1865, 1965 se liší s výběrem 1865 a 1928. Výběr 1992 se statisticky liší s výběry 1865 - 1965. Výběr 2006 se statisticky liší od výběrů 1865 - 1992. Vysoký, statisticky významný, nárůst mezi lety 1865 a 1914 je vysvětlitelný tím, že upuštění od pastvy může mít podobný efekt jako hnojení (rozklad stařiny). Výběr z roku 1992, který se týká pouze bezlesých ploch chráněného území, se statisticky odlišuje oproti předchozím. Vzhledem k tomu, že se na bezlesých plochách nevyskytuje akát, jedná se nepochybně o atmosférické depozice dusíku. V biotopu lesních společenstev se liší poslední dva výběry oproti předchozím. Vzrůst nepochybně souvisí s rozkladem biomasy na lesní půdě, kdy se již nevyhrabává hrabanka, dále souvisí se zavedením akátů. Zaujme zejména vysoké, statisticky významné zvýšení mezi lety 1992 a 2006 - dá se předpokládat, že na tomto výrazném zvýšení v tak krátké době se podílejí i atmosférické depozice dusíku.

V území jako celku, se statisticky významné rozdíly ve výběrech časových řad ekoelementů projevily u dostupnosti dusíku v půdě N_E , vlhkosti F_E , kontinentality K_E a tepla T_E .

U tepla T_E se statisticky liší výběr 1965, kdy byl zaznamenán nárůst, od výběru 1865. U výběrů z let 1992 a 2006 byl statisticky prokázán pokles od výběrů 1914, 1928 a 1965. U kontinentality K_E byl vzrůst ve výběrech 1914, 1928 a 1965 oproti výběru 1865; zřejmě vyšší poměrné početnosti teplomilných druhů v druhovém spektru lokality. Poté následoval, zřejmě díky fragmentaci bezlesých ploch a změně hydrických poměrů, pokles početnosti těchto druhů, i hodnot.

U ekoelementu F_E se statisticky odlišují výběry 1992 a 2006, kde je zaznamenán vzrůst, oproti čtyřem předchozím výběrům. Zřejmě to souvisí s ústupem xerothermofytů, zaznamenaným u ekoelementů kontinentality K_E a tepla T_E .

V prvních čtyřech obdobích sledujeme poměrně nepatrné kolísání středních hodnot N_E . V posledních dvou řadách pozorujeme statisticky výrazné poměrné zvýšení počtu druhů, náročnějších na dusík, oproti předchozím čtyřem obdobím. Výrazné zvýšení se projevilo i v roce 2006, oproti roku 1992.

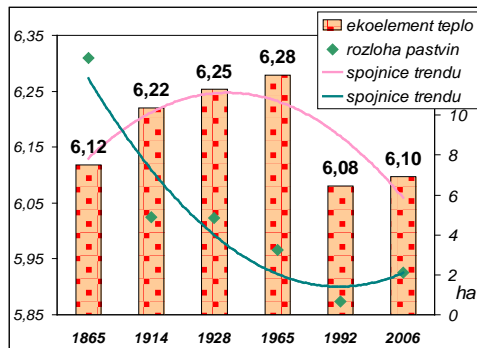
Otázka reakce druhového spektra zájmové oblasti na změny klimatu

Vzhledem ke globálnímu vývoji klimatu, zvláště v posledních desetiletích, očekáváme nárůst průměrných teplot. Tato otázka je v centru pozornosti odborné lesnické veřejnosti. Předpokládá se, že mezi jeho dopady budou náležet častější gradace hmyžích škůdců, změny patogenity a virulence cizopasných hub, ústup areálu jehličnatých dřevin (hlavně smrku) ve prospěch listnatých dřevin. Dále se bude patrně častěji objevovat zimní poškozování jehličnatých dřevin vytranspirováním atd. (Vinš a kol., 1996; Urban, Pokorný, 2002; Kupka, 2002; Janouš, 2002; Šišák, Purkrab, 2002; Jankovský, Cudlín, 2002).

Proto je důležité zjistit, jestli rostlinná společenstva v dlouhodobém časovém horizontu reagují na změny klimatu.

Vyhodnocení časové řady výběrů území jako celku z hlediska fytoecologicko-cenotické charakteristiky teploty T_E ukázalo nárůst do roku 1965, poté pokles. Rozdíl mezi výběry z let 1865 a 1965 je statisticky významný. Tento nárůst se neprojevil při srovnání průběhů výběrů v jednotlivých biotopech; v zájmovém území jako celku se ale projevil díky imigraci (nárůst počtu) teplomilných druhů rostlin na bezlesé území.

Obr. 4. Průměry T_E se spojnicemi trendu ekoelementu tepla a rozlohy pastvin (ha)



Na obr. 4 pozorujeme, že změna trendu po roce 1965 souvisí s úbytkem rozlohy nesekaných bezlesých ploch (kategorie pastviny), kde se nachází těžiště výskytu teplomilných druhů bylin. Trend zvyšování poměrného podílu teplomilných druhů rostlin v druhové skladbě lokality tak byl zvrácen sukcesním vývojem. Při tom do roku 1965 se projevil změny klimatu, co se týče oteplení jen nepatrně, v porovnání s posledními 20ti lety. V zájmovém území jako celku ekologická charakteristika teploty T_E tedy reaguje více na sukcesní změny v krajině – bezlesé plochy bez odpovídajícího nmanagementu zarůstají, nežli na změny klimatu. Problém je v homogenosti dat. Nelze získat modelově čistou studijní plochu; snad jen za stálého blokování sukcese což ovšem bude vyhovovat zase jen určitým druhům, které snášejí periodické narušování biomasy.

Přibývání teplomilných druhů na lokalitě do roku 1965 tak spíše souvisí s ústupem pastvy a imigrací druhů, kterým pastevní obhospodařování nevyhovovalo. Bylo využito v té době ještě existujících migračních koridorů, které zanikly s intenzifikací zemědělského využívání krajiny.

V zájmovém území jako celku, pozorujeme obdobný průběh fytoecologicko-cenotických charakteristik teplo, kontinentalita. Ve všech těchto případech se projevuje vysoký rozdíl hodnot mezi výběry z let 1965 a snížením v roce 1992, daným sukcesí na lokalitě.

ZÁVĚR

Trend ve vývoji využití území v čase, který jsme měli možnost sledovat, se dá zobecnit (s výjimkou horských oblastí) pro většinu území našeho státu. Platí i pro celou starosídelní oblast střední Evropy; odlišnosti v časovém posunu závisí na konkrétních sociálně - ekonomických podmínkách v jednotlivých zemích.

Vývoj biodiverzity dřevin se od roku 1865 až do současnosti zvyšoval, a to u původních i nepůvodních druhů, u nepůvodních druhů mezi lety 1992 a 2006 byl zaznamenán mírný pokles. Celkově se počet všech kategorií dřevin zvýšil téměř čtyřnásobně. Podíl nepůvodních druhů v dřevinné skladbě dosahuje téměř 30%. Přesto můžeme konstatovat, že celkový charakter současné dřevinné skladby po odstraňování akátu v 90. letech je víceméně přirozený, neboť nepůvodní druhy, přes jejich významné druhové množství, jsou počtem jedinců a tím i v pokryvnosti jednotlivých pater dřevin, zastoupeny nepatrně. Do budoucna lze očekávat jen mírný druhový vzrůst nebo stagnaci. V kontextu druhů, přítomných v okolní krajině, je lokalita již nasycena. Vývoj biodiverzity bylin se od roku 1865 až do současnosti zvyšoval, počet druhů se ve sledovaném období více než ztrojnásobil. U původních druhů byl mezi lety 1992 a 2006 zaznamenán mírný pokles, který byl dán úbytkem původních lesních druhů, zatímco počet druhů otevřených bezlesých ploch mírně stoupal. Na území lesa (severní enkláva na levé straně údolí) byl zaznamenán poměrně vysoký výskyt tzv. "špatných" a "pomalých" migrantů. Jejich výskyt zde indikuje dlouhodobou kontinuitu lesního prostředí. V roce 2006 byl zaznamenán díky fragmentaci bezlesých ploch a následné změně hydrických poměrů v území ústup ponticko-panonských a mediteránních xerotermofytů.

Podíl nepůvodních bylin v druhovém spektru lokality dosahuje téměř 22%. Přibližně dvojnásobně převažují archeofyty nad neofyty. U archeofytů bylo v posledním období zaznamenáno zpomalení přílivu nových druhů. Některé druhy archeofytů, které jsou závislé na tradičním obhospodařování území, se zařadily mezi chráněné druhy. Vzhledem k pokračující urbanizaci blízkých ploch, druhovému zastoupení neofytů v přírodě ČR a celkovému trendu vývoje, se do budoucna se pravděpodobně projeví pokračující trend šíření neofytů. To je třeba brát v úvahu při zpracování managementu území.

Důležitá, v lesnictví neustále přetřásaná otázka, je reakce rostlinných společenstev na předpokládané oteplení klimatu. Plynulý nárůst nároků na teplo T_E od výběru 1865 do výběru 1965 a statistický rozdíl mezi těmito dvěma krajními výběry, je dán, jak zjistíme ze srovnání vývoje

v jednotlivých biotopech, nárůstem počtu druhů otevřených ploch. Statistický pokles výběrů 1992 a 2006 je dán ústupem ponticko-panonských a mediteránních xerothermofytů díky fragmentaci stanovišť a změně hydrických poměrů a následujícím nástupu mezofilnějších druhů rostlin. Ekoelement teplo zde tedy reaguje víc na sukcesní změny v zájmové oblasti, než na průměrné oteplení klimatu, jehož jsme svědky zvláště v posledních letech. Problém je v homogenosti dat. Nelze získat modelově čistou studijní plochu; při potlačování sukcese budeme zvýhodňovat pouze některé druhy. Vliv oteplení klimatu na rostlinná společenstva se tedy nepodařilo prokázat.

Časová řada sledování rostlinného vývoje, dlouhá 140 let, je ve střední Evropě unikátem. Práce tak může sloužit jako modelová studie vývoje vegetace na obdobných lokalitách po upuštění od pastvy a jiných tradičních způsobů hospodaření.

LITERATURA

Andrš I. (2002): Zahraniční lesníci o oteplování, Lesnická práce 5/2002, Kostelec nad Černými Lesy, str. 208 – 209

Blažková D. (2003): Rostlinné expanze při sukcesi na opuštěných loukách. Zprávy české botanické společnosti, materiály 19 : 75 – 82.

Hayek A. (1916): Die Pflanzendecke Österreich – Ungarns. Leipzig und Wien, Franz Deuticke.

Hejný S., Slavík B. (1997) : Květena České republiky 1. Akademia, Praha.

Hejný S., Slavík B. (1990) : Květena České republiky 2. Akademia, Praha.

Hejný S., Slavík B. (1992) : Květena České republiky 3. Akademia, Praha.

Hejný S., Slavík B. (1995) : Květena České republiky 4. Akademia, Praha.

Hruby J. (1928): Botanischer Führer durch Brünn u. Umgebung. Brno, p. 1 – 192.

Iltis H. (1914): Die Steppenflora von Schlapanitz und ihre Veränderungen in den letzten 50 Jahren. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. LII, Brno, p. 252-272.

Jankovský L., Cudlín P. (2002): Dopad klimatické změny na zdravotní stav smrkových porostů středohor, Lesnická práce 3/2002, Kostelec nad Černými Lesy, str. 106 – 108

Jankovský L. (2002): Riziko aktivizace chorob lesních dřevin v podmínkách klimatické změny, Lesnická práce 5/2002, Kostelec nad Černými Lesy, str. 206 - 208

Janouš D. (2002): Pravděpodobný dopad klimatické změny na evropské lesy

LESNICKÁ PRÁCE 2/2002, KOSTELEK NAD ČERNÝMI LESY, STR. 55 - 57

Klimo E., Materna J., Vokoun J. (2002): Globální změny klimatu a potenciální změny lesních půd, Lesnická práce 2/2002, Kostelec nad Černými Lesy, str. 58 - 60

Kühn F. (1965): Xerothermní květena u Šlapanic po 100 letech. Práce z oboru botaniky, přednesené v Klubu přírodovědeckém při Moravském muzeu v Brně, Brno, s. 19-24.

- Kühn F. (1975): Rostlinné zbytky z velkomoravské sídlištní vrstvy ve Šlapanicích. Přehled výzkumů 1974. Archeologický ústav československé akademie věd v Brně. Brno, s. 50 – 52.
- Kühn F. (1978): Obilí z doby bronzové ze Šlapanic u Brna. Přehled výzkumů 1976.
- Kühn F. (1984): Květena okolí Šlapanic. Šlapanický zpravodaj. Šlapanice, str. 1 – 2.
- Kühn F. (1985): Chráněné vegetace ve Šlapanicích. Šlapanický zpravodaj. Šlapanice, str. 2 - 4.
- Kühn F. (1992): Andělka a Čertovka (k.ú. Šlapanice). Chráněný přírodní výtvar. Inventarizační průzkum květeny. 42 pp. Mskr.dep.Okr.úř.Brno-venkov
- Kühn F. (1992): Horka (k.ú. Podolí). Chráněný přírodní výtvar. Inventarizační průzkum květeny. 30 pp. Mskr.dep.Okr.úř.Brno-venkov
- Kühn F. (1992): Návřší (k.ú. Šlapanice). Chráněný přírodní výtvar. Inventarizační průzkum květeny. 23 pp. Mskr.dep.Okr.úř.Brno-venkov
- Kühn F. (1992): Velký Hájek (k.ú. Šlapanice). Inventarizační průzkum květeny. 50 pp.Mskr.dep.Okr.úř.Brno-venkov
- Archeologický ústav československé akademie věd v Brně. Brno, s. 31-33.
- Niessl G. (1865): Botanische Notizen. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV. Brno, p. 80-83.
- Podpěra J. (1928): Die Vegetationsverhältnisse des Mähren Karstes. Vergleichung mit der nächsten Umgebung. Časopis Moravského muzea, sv. 26. Brno, str. 67 - 74.
- Podzimková J. (1994): Historické mapy obcí a pozemkové úpravy v českých zemích. Ministerstvo zemědělství, Praha.
- Pyšek P., Mandák B., Sádlo J. (2002): Katalog zavlečených druhů flóry České republiky. Preslia 74, Praha, str. 97 – 186.
- Pyšek P., Tichý L. (2001): Rostlinné invaze. Rezekvítek, Brno.
- Quitt, E. (1975): Klimatické oblasti ČSR. Mapa 1 : 500 000. Geografický ústav ČSAV, Brno.
- Skaloš J. (2007): Czech and Swedish intensively utilised agricultural landscapes – parallels and divergences during the last 300 years. Abstrakt z konference Ekologie krajiny v ČR – výsledky, aplikace a perspektivy. Česká společnost pro ekologii krajiny CZ-IALE, Ústav lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie, LDF MZLU v Brně, 2-3 února 2007.
- Slavík B. (ed.) (2000) : Květena České republiky 6. Akademia, Praha.
- Šišák L., Pulkrab K.(2002): Odhad ekonomických důsledků dopadů klimatické změny na LH v ČR, Lesnická práce 4/2002, Kostelec nad Černými Lesy, str. 156 - 158

EVALUATION OF POSSIBLE SOURCES OF SURFACE WATER POLLUTION ON CHOSEN STREAMS IN JIZERA MOUNTAINS

ZHODNOCENÍ MOŽNÝCH ZDROJŮ ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH VOD NA VYBRANÝCH TOČÍCH JIZERSKÝCH HOR

Zákoutská K., Opletová P.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xzakouts@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to determine a foundation for subsequent investigation, which would deal with surface water quality in PLA Jizera Mountains. Measures for pollution control will be suggested purposed on this research. Five problematic locations were identified purposed on detailed field survey, available literature and information of civil servants of PLA Jizera Mountains and AOPK ČR. Water in Smědava and Jizerka area are influenced by water from domestic wastewater treatment plants of recreational facilities. Stream named Jeřice in Mníšek village is habitat of critically endangered species brook lamprey (*Lampetra planeri*). Therefore there is a very important point to eliminate water pollution, mainly in certain nameless left-hand tributary. Areas Tichá říčka a Panenský potok are for revitalization. The research will lay down the zero state, which will be compared with the state after realization adjustments. Quality indicators were chosen according to individual characteristics of surface water. There are microbial pollution (fecal and coliform bacteria), total nitrogen, total phosphorus, chemical oxygen demand, acidity, dissolved oxygen, etc. The results of the analysis will serve for propose measures for restrictions of surface water in problematic areas.

Key words: surface water, pollution, recreation, revitalization, chemical analysis

ÚVOD

Jizerské hory, stejně jako většina dalších pohoří, jsou prameništěm mnoha více či méně významných toků a tedy jedním ze zdrojů vody pro níže položené oblasti a to nejen na území České republiky. Voda odtékající z hor má mít co nejvyšší jakost, protože dává základ velkým tokům, jejichž vody jsou často eutrofizovány a jejich další využívání (rekreace, závlahy, zásobování pitnou vodou, apod.) je značně omezené.

Zdroje znečištění povrchových vody jsou různého typu, ať již z pohledu jejich působení (bodové, difúzní, liniové atd.) tak i jejich charakteru (odpadní vody, nelegální skládky odpadů, průmyslové i zemědělské provozy, rekreace atd.).

Cílem této práce bylo vytipovat lokality, které by mohly být nebo jsou zdrojem znečištění povrchových vod a jejich charakteristika. Podle dostupných informací o zvolených lokalitách, nejen charakteru zdroje znečištění, ale také předpokládaného složení znečišťujících látek, byla zvolena metodika pro budoucí praktický výzkum.

MATERIÁL A METODIKA

Jizerské hory jsou srážkově mimořádně bohaté a voda je také základní složkou formující jejich reliéf a podmiňující vznik zdejších ekosystémů. Hory jsou významnou pramennou oblastí. Po zdejších hřebenech prochází evropské rozvodí mezi Severním a Baltským mořem. Jižní a východní část pohoří náleží k povodí Labe a je odvodňována horními toky řek Jizery a Kamenice a jejich přítoky (Jizerka, Jedlová, Černá a Bílá Desná). Naproti tomu západ a sever hor patří do povodí Odry a hlavními toky jsou zde Nisa a Smědá s přítoky (Černá Nisa, Jeřice, Štolpich, Černý a Hájený potok, Lomnice atd.). Horní toky řek a potoků protékají náhorní plošinou s malými spády a rašelinnými pánvemi, některé zde vytvářejí bohatě meandrující trasu v široké nivě. [2]

Ze západní a jihozápadní části odvádí Lužická Nisa vodu do Baltského moře, sever Jizerských hor odvodňuje do téhož úmoří řeka Smědá. Východní a jihovýchodní území je odvodňováno Jizerou a jejími přítoky do Labe a Severního moře. [3]

Jizerské hory mají velmi hustou říční síť a mimořádně velké přírodní zdroje povrchové vody. Území má značný význam pro zásobování liberecko-jablonecké aglomerace pitnou vodou. V roce 1978 byla v hranicích území CHKO Jizerské hory vyhlášena Chráněná oblast přirozené akumulace vod (CHOPAV). [4]

Na území CHOPAV Jizerské hory jsou vodárenské nádrže Souš a Josefův důl, které zásobují pitnou vodou oblastní vodovod Liberec – Jablonec n. N. a pramení zde Jizera a Lužická Nisa. [9] CHOPAV je stanovené Nařízením vlády ČSR č. 40/1978 Sb.

Podle hydrologických podkladů a terénního průřezu byly ve spolupráci s pracovníky SCHKO Jizerské hory vytipovány problematické lokality, z hlediska znečišťování povrchových vod, nejen na území CHKO.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Dle dostupných informací a podrobného terénního průřezu bylo vytipováno pět problematických lokalit. Jedná se o oblast Smědava (mapa č. 1), osadu Jizerka, část povodí říčky Jeřice v k.ú. Mníšek u Liberce, Panenský potok v k.ú. Rynoltice a Tichou říčku u Jablonce nad Nisou.

Smědava je název oblasti kolem stejnojmenné horské chaty v Jizerských horách ve výšce 847 m n. m. Jde o místo soutoku Bílé, Černé a Hnědé Smědé a tedy vzniku říčky Smědé. Samotná chata Smědava i s větší částí parkovišť patří k obci Bílý Potok. Severně od turisticky velmi využívané chaty se nachází skupina domů, které již náležejí k městu Hejnice.

Důležitá turistická křižovatka s parkovištěm a chatou uprostřed Jizerských hor leží při bývalé poutní cestě z Tanvaldska do Hejnic – později označované jako Smědavská, dnes Soušská silnice (dokončena roku 1895, roku 1897 byla prodloužena až k osadě Souš). Poprvé je Smědava uváděna roku 1814, boudu tehdy obhospodařovali pastevci dobytka, kteří se zde po dřevařích a uhlířích usadili snad již na konci 18. století a hospodařili zde podobně jako na krkonošských boudách. [10]

Říčka Smědá pramení ve východní části Jizerských hor, kde má tři zdrojnice – Bílou, Hnědou a Černou Smědou, které se spojují pod Smědavou; přetíná státní hranici s Polskem u Vsi ve výšce 209 m n. m.; plocha povodí je 273,8 km², délka toku 45,9 km, průměrný průtok u státní hranice 3,61 m³.s⁻¹. V dolní části toku mezi Předláncemi a Černousy je přírodní rezervace Meandry Smědé. [6] Jakost vody v této říčce je negativně ovlivňována špatně fungující kanalizací, na kterou jsou odváděny odpadní vody z rekreačně vytěžované chaty Smědava.

Mapa 1: Oblast Smědava (www.geoportal.cz)



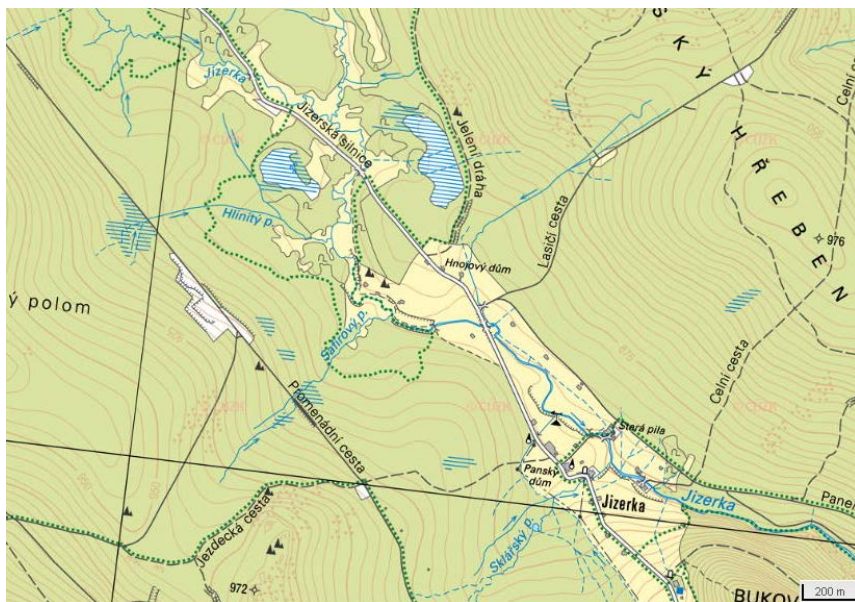
První zmínka o osadě Jizerka je z roku 1539 jako sídlo čihařů. Později ji osídlili dřevorubci a sběrači drahých kamenů. V polovině 19. století zde byly založeny dvě sklářské hutě, z nichž jedna

slouží dodnes. Osadou protéká stejnojmenný potok a také Safírový potůček (mapa č. 2), na němž bývalo vyhlášené naleziště drahokamů (safírů, rubínů, chalcedonů, topasů, atd.). Kolem potoků jsou rozestry chalupy a chaloupky horského typu, většinou celodřevěné, některé s dekorativními prvky (Stará pila, Panský dům, Pyramida...). Dnes je většina domů využívána k rekreačním účelům. [5]

Osada Jizerka je výjimečná svou nadmořskou výškou, která se pohybuje kolem 850 metrů. Kombinace nadmořské výšky, reliéfu údolí a říčky Jizerky nahrává extrémnímu počasí v zimním období. Teploty kolem $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a více nejsou na Jizerce v nočních hodinách mrazivých dnů ojedinělé. Jizerka je také bohatá na srážky, jak dešťové, tak sněhové. [5]

Vzhledem k výhodné poloze je osada častým cílem i východiskem nejrůznějších rekreačních aktivit. Tomu se postupně přizpůsobily také ubytovací kapacity rekreačních objektů. Vzhledem k odlehlosti osady od ostatní zástavby není ale lokalita napojena na veřejnou kanalizaci. Jednotlivé objekty mají zajištěno individuální odkanalizování. A právě účinnost a vliv těchto zařízení na říčku Jizerku bude předmětem dalšího výzkumu a rozborů vody.

Mapa 2: Osada Jizerka (www.geoportal.cz)

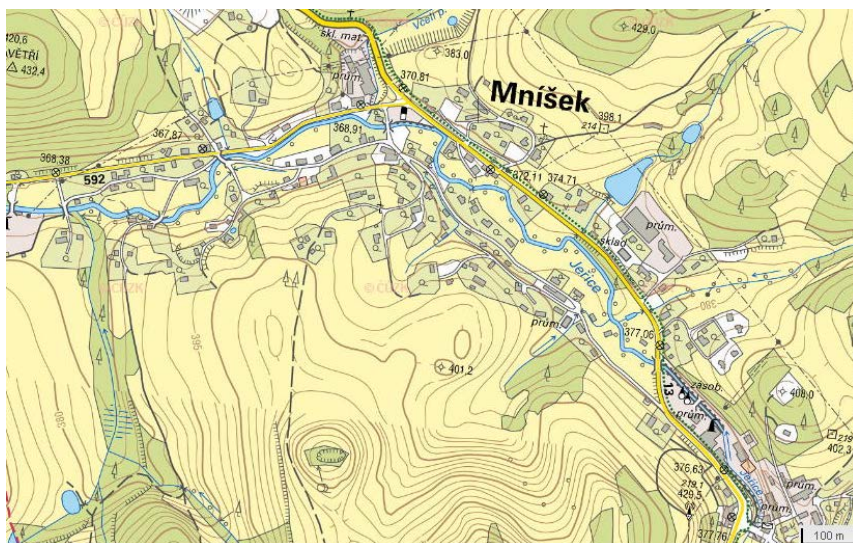


Říčka Jeřice pramení v horské úžlabině na jihovýchodním svahu Poledníku v nadmořské výšce 815 m. Vlévá se do Lužické Nisy v Chrástavě v nadmořské výšce 300 m. Plocha povodí je 77,8 km², délka toku 19,4 km. Říčka je v celém toku pstruhová, v horní části má bystřinný charakter s drobnými vodopády. [12]

Tok říčky je většinou přirozeného rázu, v horní části bystrinný, s peřejemi a drobnými vodopády, na průtoku Mníškem částečně regulovaný (mapa č. 3), výraznější regulace jsou patrné na konci toku v Chrastavě.

Jeřice má tři významnější levostranné přítoky – Malou Jeřici, Fojtku a Chrastavský potok, a dva pravostranné – Albrechtický a Vítkovský potok. Kromě toho také řadu dalších, z nichž mají některé viditelně horší jakost vody (nárůst biomasy). Toto znečištění může negativně ovlivňovat stávající populaci kriticky ohroženého druhu živočicha mihule potoční (*Lampetra planeri*), což bude předmětem dalšího zkoumání.

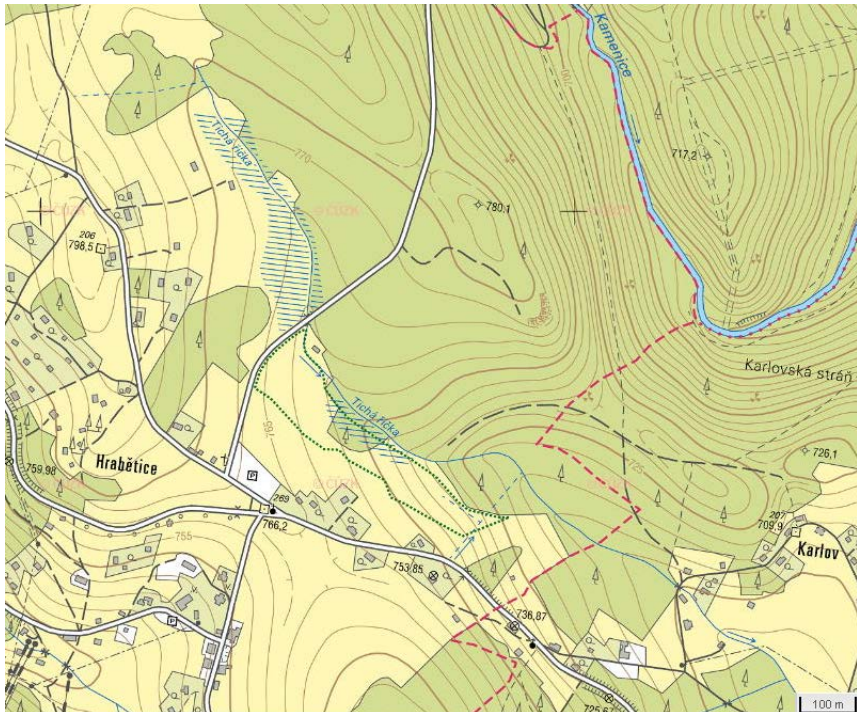
Mapa 3: Říčka Jeřice v obci Mníšek (www.geoportal.cz)



Poslední dvě lokality jsou toky, na kterých bude v horizontu několika let provedena revitalizace. Současný výzkum bude mít za úkol zjistit počáteční (nulový) stav, který bude po dokončení revitalizačních prací porovnán s novými hodnotami.

Tichá říčka je nenápadný potok pramenící nad podmáčenými loukami poblíž Hrabětic (okr. Janov nad Nisou) (mapa č. 4). Mokřady na horním toku Tiché říčky byly počátkem roku 2008 prohlášeny za přírodní památku. Chráněná lokalita se nachází v nadmořské výšce 730 - 740 metrů a zaujímá rozlohu necelých čtyř hektarů. Tato malá plocha je dnes jediným pozůstatkem někdejšího rozsáhlého a významného komplexu rašelinných a mokřadních luk, který se rozprostíral od tzv. Jablonecké chaty až po tzv. Okružní cestu (Podkovu) v Karlově. Území bylo v minulosti narušeno melioračními zásahy, ale i výstavbou silnice od hrabětické „kapličky“ k přehradní hrázi Josefodolské přehrady, která ho celé protнула a rozdělila na dvě části. Nejspodnější část rašeliníště byla kdysi vytěžena na palivo a snad i pro potřeby někdejších karlovských lázní. [11]

Mapa 4: Tichá říčka vč. PP (www.geoportal.cz)



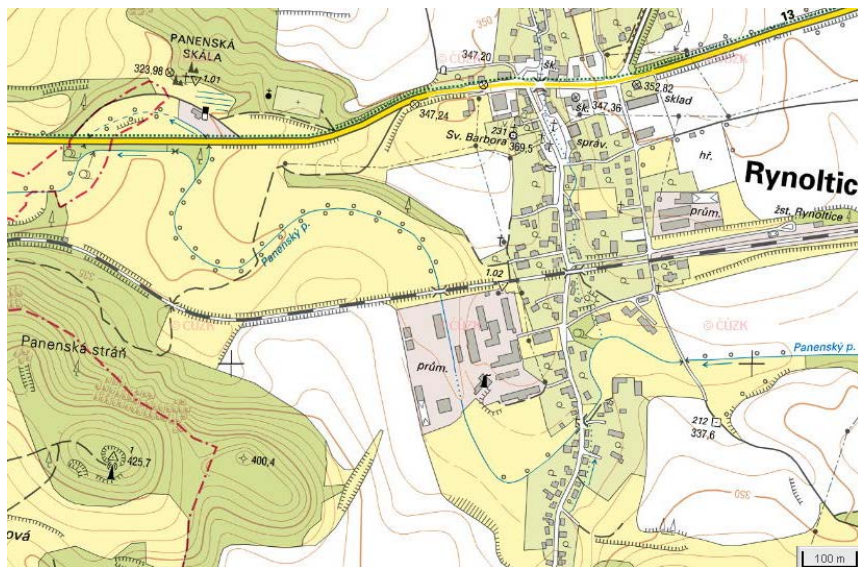
Poslední zjištěnou problematickou lokalitou je Panenský potok, který je negativně ovlivněn průmyslovou činností. Také tento tok bude předmětem revitalizace.

Panenský potok pramení 0,5 km východně od Jítravy v západním úbočí Vápenného, cca 650 m n. m., ústí zprava do Ploučnice v Mimoně ve výšce 275 m; plocha povodí je 133,2 km², délka toku je 28,8 km, průměrný průtok u ústí je 1,10 m³.s⁻¹. Jedná se o významný vodní tok se pstruhovou vodou. Část toku až po Jablonně v Podještědí je souvisle regulována, s lemovou výsadbou kanadských topolů, níže relativně přirozený průtok zachovalou nivou se zbytky vlhkých luk, zčásti opuštěných. Voda je mírně znečištěna. [6]

V rámci průzkumných prací byl zaměstnanci Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích proveden ichtyologický průzkum. Výsledky toho průzkumu byly dle Ing. Farského ze SCHKO Jizerské hory velice znepokojivé. Ukázalo se totiž, že se v podstatě jedná o mrtvý tok, ve kterém se v současnosti nevyskytují stále populace ani nejběžnějších druhů našich ryb.

Jednou z příčin může být provoz firmy Gesta, a.s., která se věnuje mimo jiné odstraňování nebezpečných i jiných odpadů. V obci Rynoltice (mapa č. 5) je sídlo a jedna z provozoven firmy Gesta a.s., kde dochází k úpravě a skládkování především nebezpečného odpadu. Přimo skrz tento areál protéká regulovaný tok Panenského potoka, a proto je zde podezření, že by mohlo docházet k úniku znečišťujících látek do vod.

Mapa 5: Panenský potok a areál firmy Gesta, a. s. v obci Rynoltice



Na těchto vybraných lokalitách budou v pravidelném měsíčním intervalu odebírány vzorky vody pro podrobný laboratorní rozbor. Kromě toho bude na místě pomocí mobilní sondy prováděno měření vybraných ukazatelů.

Analýzy jakosti vody budou prováděny v laboratoři Ústavu aplikované a krajinné ekologie Mendelovy univerzity na spektrofotometru značky Hach-Lange. Předmětem zjišťování budou nejvýznamnější chemické ukazatele jakosti vody (chemická spotřeba kyslíku, celkový dusík, celkový fosfor, dusičnany/dusičnanový dusík, dusitany/dusitanový dusík, amonné ionty, chloridy, sírany, fosforečnany, mangan, železo, celkový uhlík) a vybrané mikrobiologické ukazatele. Pomocí mobilního altimetru HQ30d značky Hach-Lange budou v terénu stanoveny další chemické a fyzikální ukazatele kvality vody, tj. teplota vody, obsah rozpuštěného kyslíku, konduktivita a hodnota pH.

ZÁVĚR

Zjištěné ukazatele jakosti povrchových vod budou statisticky zpracovány a porovnány s hodnotami přípustného znečištění danými legislativou, tj. NV č. 61/2003 a ČSN 75 7221 v aktuálním znění. Zda a do jaké míry je znečištění závislé na množství ubytovaných osob v rekreačních objektech, resp. na množství odpadních vod, které jsou čištěny domovními ČOV, bude zjištěno porovnáním výsledků rozborů s údaji o množství ubytovaných osob z evidence příslušných obcí (v rámci placení tzv. vzdušného).

Na základě výsledků monitoringu a podrobného terénního průzkumu budou vyhodnoceny bodové zdroje znečištění v povodí (předpokládá se především vliv rekreačních objektů ve vyšších partiích hor). Výsledky jakosti budou porovnány s Nařízením vlády č. 61/2003 Sb., v platném znění, kterým se stanovují ukazatele a hodnoty přípustného znečištění povrchových a odpadních vod, náležitosti povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. Předmětem tohoto nařízení je stanovení vyjadřující stav vody ve vodním toku, ukazatele a hodnoty přípustného znečištění povrchových a odpadních vod. Dále ukazatele a hodnoty přípustného znečištění pro zdroje povrchových vod, které jsou využívány nebo se předpokládá využití jako zdroj pitné vody a přípustné znečištění povrchových vod, které jsou vhodné pro život a reprodukci původních druhů ryb a vodních živočichů. Zjištěné výsledky budou porovnány také s českou státní normou ČSN 75 7221 Jakost vod – Klasifikace jakosti povrchových vod, která řadí povrchové vody do pěti tříd kvality. Tato norma je přizpůsobená dnešním potřebám pro hodnocení a kontrolu povrchových vod používaných v členských státech EU. Dále budou vybrané ukazatele porovnány také s hodnotami, které udává NV č. 71/2003 Sb., v aktuálním znění, o stanovení povrchových vod vhodných pro život a reprodukci původních druhů ryb a dalších vodních živočichů a o zjišťování a hodnocení jakosti těchto vod. Předmětem úpravy nařízení je stanovení povrchových vod, které jsou vhodné pro život a reprodukci původních druhů ryb a dalších vodních živočichů a rozděluje tyto vody na lososové a kaprové.

Na základě výsledků budou navržena opatření, která by zajistila zvýšení jakosti povrchových vod v zájmové oblasti. V případě rekreačních, průmyslových i jiných objektů, které nejsou napojeny na veřejnou kanalizaci a mají tedy vlastní čistírny odpadních vod, bude kladen důraz na zjištění kvality vypouštěné vody do povrchových recipientů a jejich vliv na kvalitu vody v tocích.

LITERATURA

- [1] ČSN 75 7221. *Jakost vody - Klasifikace jakosti povrchových vod*. Praha, 1998
- [2] Hydrologie. In: *Ochrana přírody a krajiny v České republice* [online]. 2010 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: http://www.cittadella.cz/europarc/index.php?p=Hydrologie&site=CHKO_jizerske_hory_cz
- [3] Hydrologie. In: *Agentura ochrany přírody a krajiny: CHKO Jizerské hory* [online]. 2006 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://old.ochranaprirody.cz/jizerskehory/index.php?cmd=page&id=431PiQ0YY0z6lgsOKqNSUbuC3bpfVgxlBe9DX3YNicIcqIT3GA9GF8ZrvVotPcgWtfvf0DDXJCHQ!!/?sentByLeftNavigation=true>
- [4] Hydrologie. In: *AOPK CR: Správa CHKO Jizerské hory a KS Liberec - Základní údaje o CHKO* [online]. 2008 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: http://www.jizerskehory.ochranaprirody.cz/wps/portal/cs/jizerske-hory/o-sprave-chko!/ut/p/c5/DcpLcoIwAADQs_QATIJKElhS-RT5tChpAhsnOEIOICBGISj19nbd9oAYvo7grKYzSo7gADmp8_E4LF4XIhpFLPRgnboD3B__d8W2wA7W86OY12e_JfPo6k0HMu4V0cotX0hudRyxQ4VcZZ8mocEmHdJ5Jf3fcDOIvMqNfluvNwk1pou5HkZRQI4YmosmfrIo-RHtGN7O9nYeTIXHnISarHc-3_ihW-
- [5] Jizerka. In: *České hory: Jizerské hory a Ještědský hřbet* [online]. 2011 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://jizerka.ceskehory.cz/>
- [6] Liberecký kraj: Povodňový portál libereckého kraje. Databáze online [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://maps.kraj-lbc.cz/mapserv/dpp/dokumenty/hydrologie.htm>
- [7] *Nářízení vlády č. 61/2003 Sb.* o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, v aktuálním znění
- [8] *Nářízení vlády č. 71/2003 Sb.*, o stanovení povrchových vod vhodných pro život původních druhů ryb, v aktuálním znění
- [9] Odbor životního prostředí a zemědělství, Liberecký kraj: Plán rozvoje vodovodů a kanalizací Libereckého kraje. Databáze online [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://maps.kraj-lbc.cz/mapserv/prvkuk/dokumenty/ekologie.htm>
- [10] Smědava. In: *Jizerská magistrála pro pěší turistiku* [online]. 2007 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://www.jizerskamagistrala.cz/cz/turisticke-trasy/smedava---jizerka/smedava/>
- [11] VITVAR, Petr. Přírodní památka Tichá říčka. *Jablonecký měsíčník*. 2008, roč. 2008, 07/08. Dostupné z: <http://www.mestojablonec.cz/cs/mesto/jablonecky-mesicnik/07-08-2008/prirodni-pamatka-ticha-ricka.html>
- [12] VLČEK, V.: *Zeměpisný lexikon ČSR. Vodní toky a nádrže*. Praha: Academia, 1984. 316 s.

INDUSTRIAL WASTE LANDFILLS AND METHODS THEIR RECLAMATION

Żmuda K., Wiśniowska-Kielian B.

Department of Agricultural and Environmental Chemistry, Faculty of Agriculture and Economics, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, Poland

E-mail: krzysiolzmuda@interia.pl

ABSTRACT

At the end of the landfill operation all the land requires remediation by soil-forming processes initiation of reclaimed ground, but most of all restoration of vegetation by selecting the appropriate species of crop plants. The aim of this study is to present the characteristics of industrial landfills on the example of incineration ash and carbide lime landfill, their impact on the environment and ways for their reclamation. Incineration ash and carbide lime located on the landfill should be classified as burdensome and harmful to the environment. The paper describes the most effective methods for these landfills reclamation. Currently, attempts are made to the introduction of vegetation in these areas which would cause of limiting the negative influence on the environment, and improved an esthetics of landscape.

Key words: reclamation, incineration ash, carbide lime, landfill

INTRODUCTION

Nowadays industrial waste create extremely complex and difficult economic, health and aesthetic problems to solve. Difficulties in the waste disposal and utilization result from a permanent increase the mass of waste as well as the development of industry and mining, and diverse their quality resulting from the diversity of industrial production [Maciak 1996]. In the last several decades the industrial activity of enterprises caused great damages to the environment. One of the most onerous problems is the growing amount of waste. To reduce the storage it becomes necessary to intensify in the direction of their disposal and recycling [Pyssa 2005]. In many developed countries waste is a valuable resource that not only can, but must be re-used, if the aim of action is reduction of natural resources use. Yet, current knowledge does not allow of all waste generated use, so the storage is unavoidable [Antonkiewicz 2010].

The main piece of legislation regulating the problem of waste is the Act on Waste of 27 April 2001 [Dz. U. 62, 2001]. It “determines the rules of proceeding with waste in a manner ensuring the protection of life, human health and the environment, in accordance with the rule of a sustainable development, and in particular the rule of preventing from producing waste or limiting the amount of waste and their negative environmental impact, as well as recovery or disposal of waste”. The Act also specifies that the waste can be used for industrial purposes, including energy, construction, as well as recyclable materials and nonindustrial for example to form the surface of the ground, as well as fertilize of soil.

One of these issues, which has become the subject of intensive research, it is appropriate management of landfills of furnace ash and carbide lime (residue after calcium carbide production). Waste deposited in the disposal site often degrade a larger area than they directly take and may adversely affect the natural environment by the occurrence of leachates, gases emitted from the ground or dust emissions into the atmosphere. Waste also pollute surface water and groundwater as well as soils. Understanding the physical and chemical properties of industrial waste will enable the selection of optimal methods of biological remediation of disposal sites [Woźniak, Żygadło 2002]. The use of furnace ash and carbide lime is often hindered, which is mainly related to the lack of appropriate processing technology of these materials. Therefore, only about 30% of the furnace ash (mainly from coal combustion) is utilized, and the carbide lime is usually accumulated in the disposal sites.

The aim of the study is to present the characteristics of industrial waste landfills and their impact on the environment and ways of reclamation on the example of landfills of furnace ash and carbide lime.

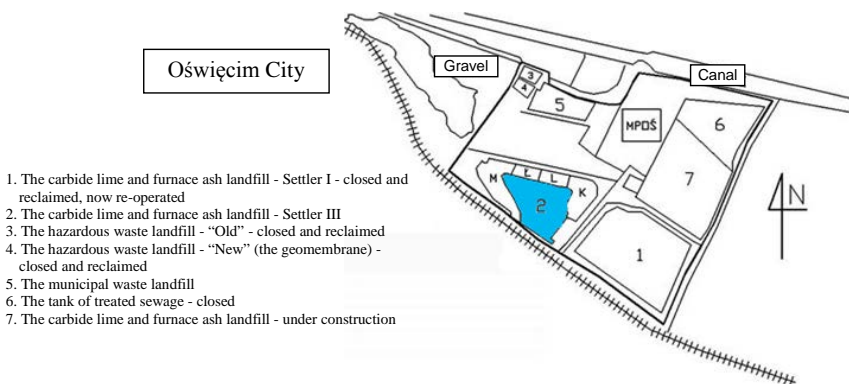
Industrial waste landfills

Landfills are the objects used for storage of waste on the ground without disadvantageous effects on the environment both during operation and after its completion. Also, they are the part of the waste management systems, because it is not possible to utilize the entire mass of waste [Łuniewski, Łuniewski 2010]. According to the Regulation of the Government dated November 9, 2004 [Dz. U. 257, 2004], landfills have been identified as objects could have a significant impact on the environment. Due to the threat posed, in the classification of construction objects they are in the third geotechnical category [Dz. U. 126, 1998]. They are considered the most difficult of construction objects which results from a large area (several hundred to several thousand m^2) and capacities (several million m^3) and the thickness of the waste storage (up to tens of meters), a long period of use (several years) and required maximum tightness, which is to ensure the least impact on the environment object [Sobik, Bojakowska 2007].

Characteristics of disposal site of furnace ash and carbide lime in Oświęcim

An example of industrial landfill is running in 1986 disposal site of furnace ash and carbide lime (Settler III) which is located east of The Synthos Dwory Oświęcim Company Limited near the Monowice village. Landfill area, belongs to The EMPOŚ Company Limited and covers an area of 0.32 km^2 . Active surface of carbide lime and furnace ash landfill when filled to a height of 13 m is about 0.23 km^2 , and the final capacity is estimated at approximately 3,000,000 m^3 . The landfill is designed for the storage of furnace ash, carbide lime and lime sludge, which are supplied by hydrotransport and placed in the individual quarters (Fig. 1) [Roszak 2002].

Fig. 1. Scheme of landfill belonging to The EMPOŚ Company Limited [Antonkiewicz 2011]



In April 1997 the storage of carbide lime after the cessation of the calcium carbide production in the Dwory JSC (now Synthos JSC) was completed. The mixtures of ash and slag from The Energetics Dwory Company Limited are multipoint placed on the outer lodging Settler III (labeled K, L, L, M). In each of the lodging the two overflow wells are located that gather water from above the sludge which then is discharged to the wastewater treatment plant through drainage ditches and open girdling. The amount of waste supplied to the landfill is determined by the amount of fossil fuels burned. For the protection of groundwater against pollution in the carbide lime and furnace ash landfill permeable layer (gravel, sand) is covered with a layer of low permeability soil (with a thickness of about 3 m), mostly silty clay, sandy clay, clay loam and sand, and then a layer of fertile soil with a thickness of 30-40 cm. The landfill has access roads to each of the lodging, so it is possible the transport of waste from outside by the lorries. As landfills are filling dams are constantly raised, superstructures endearing leachate wells, girdling ditches preserved and gradually reclaimed escarpment by seeding grass, planting trees and shrubs to create a green belt insulation limiting the inconvenience of dust emission (Fig. 2) [Roszak 2002].

Fig. 2. Vegetation inhabiting the lime carbide landfill in Oświęcim [photo J. Antonkiewicz]



LANDFILL RECLAMATION METHODS

At the end of the landfill operation all the land requires remediation by soil-forming processes initiation of reclaimed ground, but most of all vegetation restoration by selecting the appropriate utility plant species [Siuta 1998; Klimont 2011]. The aim of reclamation is to restore the utility value of grounds by implementation of the appropriate technical, agronomic and biological procedures, allowing use of the land for agriculture, municipal, forestry, etc. purposes. The formation of soil from dead or contaminated with harmful substances material can commence only when the plants appear on the wasteland. Spontaneous plants overgrowing such area occur slowly. This is *inter alia* due to the lack on-site or on adjacent terrain appropriate plant species and/or from habitat adverse conditions, such as: excess or deficiency of water, high salt and heavy metals concentration, nutrients deficiency, inadequate pH value and intensive wind or enhanced water erosion. Action of several of these factors can be minimized or eliminated by using agrotechnical measures. These include: an introduction to the top layer sufficiently large dose of compost,

FYM or sludge from biological wastewater treatment plant in amount of at least $100 \text{ t DM} \cdot \text{ha}^{-1}$, which leads to a reduction of the environment alkalinity to be tolerated by most of the crop plants, is a source of nitrogen, provides organic matter for microorganisms and protects the substrate against wind erosion [Maciak 1996; Siuta 1998]. The escarpments and storage shelves of the landfill should be covered by plants as soon as they shape, in order to protect against wind and water erosion and to improve the aesthetics of the landscape. Environmental protection against dusting is to consolidate the surface of ash during operation of lodging. To achieve this sludge is distributed by sprinkling irrigation. In the first stage of biological remediation are distributed plant seeds and sludge, with the use of a special tank with device for mixing the sludge with the seeds, and a spray nozzle for the mixture, or a specially adapted plane. This procedure may be repeated until a good coverage area by plants. Further sprinkling irrigation of sludge is to provide plants with nutrients and water, and can be supplemented with mineral fertilizers [Siuta 1998].

To enable the development of biological life in the dead surface sludge from municipal wastewater can be used. They cause a decrease of the pH value, an increase of organic matter and available P, K and Mg contents, enable initiation of humus layer formation in the surface of the substrate, as well as fuse volatile particles what prevents dust formation [Antonkiewicz 2009; Klimont 2011]. Liquid sludge can not be used once due to the low dry matter content and large volume, and therefore it is poured several times on the reclaimed surface at intervals ensuring dried-ground. The plants seeds are sown after the last sludge application directly onto the wet surface (without harrowing). When the ground and sludge is dry, the seeds are integrated with the substrate using harrow. The solid sludge can be used only once. Repeated dosing of solid sludge is appropriate when the plant mass is earmarked for economic purposes. To the vegetation formation about 50-60 t DM of sludge per hectare is sufficient. Mixing the sludge with the ground is not necessary, but beneficial for quick formation of dense vegetation. To accelerate the development of plants, and consequently the course of remediation, landfill area can be covered with a layer of soil with a thickness of 20-30 cm containing 1.5-3.0% of humus. Texture of superimposed soil is important because one can not use loose sand and sparsely loamy or very concise clay [Siuta 1998; Antonkiewicz 2009]. Loess, brown clay, marly clay, black soil, chernozems as well as peat and boggy soil are considered the most suitable for reclamation.

When reclamation of ash and carbide lime landfills is carried out using biological methods, the role of grasses that meet a number of conditions as pioneer plants in areas devastated and soilless land is underlined. To those landfills reclamation can be used selected plant species that initiate longtime biological renewal process. Their development prevents erosion and supports the process of soil formation (Fig. 3).

Fig. 3. Vegetation growing on the carbide lime landfill in Oświęcim [photo J. Antonkiewicz]



Moreover, the use of woody plants eliminates the possibility of consumption with yield of toxic or detrimental substances to humans and animals which can be taken in large quantities by certain plants species [Maciak 1996; Antonkiewicz 2011]. For planting in the landfill and in the protective belt is recommended the following species of trees and shrubs: *Robinia pseudacacia* L., *Betula verrucosa* Ehrh., *Alnus incana* L., *Alnus glutinosa* Gaertn., *Larix decidua* Mill., *Rosa rugosa* Thunb., *Populus robusta* and *serotina* R. Hartig, *Populus alba* L., *Salix purpurea* L., *Elaeagnus angustifolia* L. and *Tamarix gallica* L. [Maciak 1996, Bender, Gilewska 2004]. As proved Klimont and Bulińska-Radomska [2009], the ashes of heat and power plant, fertilized with concentrated municipal sludge are a good medium for the growth of selected species of meadow grass and alfalfa. The studied species of grasses sown with legume mixture for reclamation proved to be useful: *Dactylis glomerata* L., *Festuca pratensis* Huds., *Poa pratensis* L., and *Medicago sativa* L. However, the most suitable species for reclamation of furnace ash enriched with sewage sludge were: *Festuca arundinacea* Schreb., [Antonkiewicz, Radkowski 2006] and *Bromus inermis* Leysse., *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack., *Spartina pectinata* Bosc ex Link and *Leymus racemosus* (Lam.) Tzvelev.

According to Siuty [1998] for biological reclamation of incineration ash are particularly useful: *Melilotus albus* Medik. and *Medicago sativa* L., which intensive growth is a result most of all of large nutrients needs, especially calcium, toleration alkaline reaction and elevated salt concentration and ease of inaccessible water absorption. Nowak's research [2007] shows the usefulness of *Cotinus coggygria* Scop. to this type of landfills reclamation due to its small habitat and nutritional requirements, tolerance of alkaline soils and mild salinity.

Properly growing plants not only protects the surface of the landfill, but also enriches the landscape creating a friendly climate, and after a long time the conditions to recover the area and use it for

other purposes [Antonkiewicz 2007]. Remediation of such sites can be carried out in the direction of:

- agricultural reclamation, laying the groundwork for development as arable land, meadows, pastures, gardens, orchards, etc.,
- forest reclamation, preparing the ground for the forests and plantations,
- special reclamation, to prepare the landfill area for use as parks, green areas, green and recreation areas, playgrounds, etc.

Land reclamation conducted in these fields depends largely on the degree of degradation as well as the future use of land [Maciak 1996].

SUMMARY

Incineration ash and carbide lime deposited on the landfill can be classified as disruptive and harmful to the environment. The available literature suggests that there are many plants that can be used for the reclamation of degraded areas because they develop into barren substrates very well, often contain toxic substances. So now there are attempts to introduce vegetation to protect the landfills against water and wind erosion, so it is possible to reduce the negative impact on the environment and improving the aesthetics of the industrial landscape. However, it is necessary, continued monitoring of the landfill, which enables accurate tracking of changes in the quality of soil and water exposed to emissions from those areas.

REFERENCES

- Antonkiewicz J. 2007. Ocena zawartości metali ciężkich w trzeźniku piaskowym występującym na składowiskach odpadów paleniskowych i wapna pokarbidowego. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 518: 11-22.
- Antonkiewicz J. 2009. Ocena przyrodniczego wykorzystania popiołów paleniskowych i komunalnych osadów ściekowych. *Zesz. Nauk. UR w Krakowie* 454, Rozprawy 331, 129 p.
- Antonkiewicz J. 2010. Właściwości fizykochemiczne odpadów przemysłowych na składowiskach. *Roczn. Glebozn.*, 61(3): 5-12.
- Antonkiewicz J. 2011. Ocena biodostępności metali ciężkich w odpadach zastosowanych do przyrodniczej rekultywacji składowiska odpadów niebezpiecznych. *Zesz. Nauk UR w Krakowie*, 484, Rozprawy 481, 131 p.
- Antonkiewicz J., Radkowski A. 2006. Przydatność wybranych gatunków traw i roślin motylkowatych do biologicznej rekultywacji składowisk popiołów paleniskowych. *Annales UMCS, Sec. E*, 61: 413-421.
- Bender J., Gilewska M. 2004. Rekultywacja w świetle badań i wdrożeń. *Roczn. Glebozn.*, 55(2): 29-46.

Dz. U. 126, 1998. Rozporządzenie Ministra Spraw Wewnętrznych i Administracji z dnia 24 września 1998 r. w sprawie ustalania geotechnicznych warunków posadawiania obiektów budowlanych. Dz. U. Nr 126, 1998, poz. 839.

Dz. U. 257, 2004. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 9 listopada 2004 r. w sprawie określenia rodzajów przedsięwzięć mogących znacząco oddziaływać na środowisko oraz szczegółowych uwarunkowań związanych z kwalifikowaniem przedsięwzięcia do sporządzenia raportu o oddziaływaniu na środowisko. Dz. U. 257, 2004, poz. 257.

Dz. U. 62, 2001. Ustawa z 27 kwietnia 2001 roku o odpadach. Dz.U. nr 62, 2001, poz. 628.

Klimont K. 2011. Rekultywacyjna efektywność osadów ściekowych na bezglebowym podłożu wapna poflotacyjnego i popiołów paleniskowych. Probl. Inż. Rol., 2: 165-176.

Klimont K., Bulińska-Radomska Z. 2009. Badanie rozwoju gatunków traw do umacniania składowisk popiołów paleniskowych z elektrociepłowni. Probl. Inż. Rol., 2: 135-144.

Komornicki T. 1971. Gleby terenów zniszczonych lub przekształconych przez przemysł i górnictwo. Wyd. WSR, Kraków, 16 s.

Łuniewski A., Łuniewski S. 2010. Od prymitywnych wysypisk do nowoczesnych zakładów zagospodarowania odpadów. Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok, p. 159-162, 164, 172, 174-176, 179, 196-197.

Maciak F. 1996. Ochrona i rekultywacja środowiska. Wyd. SGGW, Warszawa, p. 120-122, 139, 141-144, 153, 259-266, 330, 334.

Mazur J., Koniecznyński J. 2004. Dystrybucja pierwiastków śladowych we frakcjach ziarnowych popiołu lotnego emitowanego z elektrowni. Monografia, Wyd. Polit. Śląskiej, Gliwice, 118 p.

Nowak G. 2007. Wzrost perukowca podolskiego (*Cotinus Cogygia*) na podłożu z odpadów paleniskowych. Roczn. AR w Poznaniu, 41: 141-145.

Pyssa J. 2005. Odpady z energetyki – przemysłowe zagospodarowanie odpadów z kotłów fluidalnych. Gosp. Sur. Mineral., 21(3): 83-92.

Roszak Z.T. 2002. Przegląd ekologiczny składowisk odpadów będących w posiadaniu Empos Sp. z o.o. Firma Edukacyjno-Konsultingowa „EKO-EKSPERT”, Kraków.

Siuta J. (Ed.). 2005. Degradacja i rekultywacja gruntów. Przyrodnicze użytkowanie odpadów. Inżynieria Ekologiczna, 124 p.

Siuta J. 1998. Rekultywacja gruntów. Poradnik. IOŚ, Warszawa, p. 108-114.

Sobik K., Bojakowska I. 2007. Badanie wpływu składowisk odpadów na środowisko gruntowo-wodne na przykładzie wybranych obiektów zlokalizowanych w obrębie zlewni Dunajca. Rozprawa doktorska. AGH, Kraków, manuscript.

Woźniak M., Żygadło M. 2002. Monitoring składowisk odpadów paleniskowych. Regionalny Monitoring Środowiska Przyrodniczego, Kieleckie Towarzystwo Naukowe, 3: 117-122.

Section – Rural Development

CONCENTRATION OF BOTANICALLY INTERESTING PIECES OF KNOWLEDGE IN LOCALITIES OF VYSOKOMÝTSKO – MICROREGION

SOUSTŘEDĚNÍ POZNATKŮ O BOTANICKY ZAJÍMAVÝCH LOKALITÁCH MIKROREGIONU VYSOKOMÝTSKO

Doskočilová V., Wagnerová Z.

Department of Biology, Faculty of Science and Faculty of Education, University of Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové III, Czech Republic

E-mail: V.Doskocilova@seznam.cz, zuzana.wagnerova@uhk.cz

ABSTRACT

The aim of the paper was to concentrate pieces of knowledge of botanically interesting sites in Vysokomýtsko microregion. This paper directly builds on the existing scientific and mainly botanical studies in Vysokomýtsko microregion. Botanically significant locations were separately processed, information about existing biologically significant sites, protected areas and memorial trees were taken from the literature.

The theoretical part of the work focuses on Vysokomýtsko microregion and its topographical definition and natural conditions. The practical part deals with some interesting botanical sites in Vysokomýtsko microregion. There were 15 botanically interesting sites, 4 existing biologically significant sites, two protected areas and memorial trees. The studied sites are located in Vysoké Mýto and its surroundings. The next part is focused on existing biologically important locations Knířov – Vanice, Vinice, Vraclav and municipal park. The last part deals with the existing protected areas natural landmark U Vinic, natural landmark Vstavačová louka and memorial trees.

The Vysokomýtsko microregion survey was conducted using standard floristic and phytocenological methods. Phytocenological frames and spectra of life forms were created for botanically interesting sites. The flora's list of studied sites was listed in the summary floristic table to clarity and comparison.

Key words: Pardubice Region, phytocenological frame, spectrum of life forms, vegetation, Vysoké Mýto, Vysokomýtsko microregion

ÚVOD

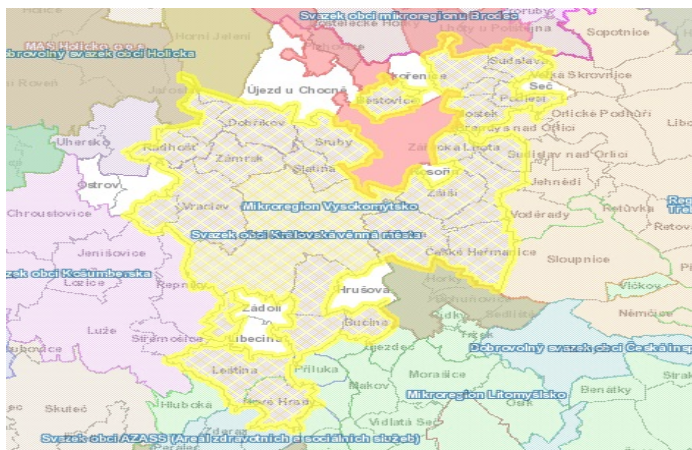
Mikroregion Vysokomýtsko je dobrovolný svazek obcí se sídlem ve Vysokém Mýtě. Mikroregion vznikl 8. března 2001 a sdružuje celkem 28 obcí. V mikroregionu žije více než 21 400 obyvatel. Převažují obce do 500 obyvatel, které tvoří cca 75 % celkového počtu obcí mikroregionu. Mikroregion má však podprůměrnou hustotu osídlení (113 obyvatel/km²). Území mikroregionu Vysokomýtsko (Obr. 1) se rozprostírá na ploše 19 100 ha. Z hlediska územního členění patří k Pardubickému kraji a zasahuje do 2 sousedících okresů - Ústí nad Orlicí a Chrudim.

Obr. 1 – Znak mikroregionu Vysokomýtsko (Zdroj: Mikroregion Vysokomýtsko)



Sdružené obce mikroregionu Vysokomýtsko (Obr. 2): Běstovice, Bučina, České Heřmanice, Dobříkov, Džbánov, Javorník, Koldín, Leština, Mostek, Nasavrky, Nové Hrady, Oucmanice, Podlesí, Pustina, Radhošť, Slatina, Sruby, Sudslava, Svatý Jiří, Tisová, Týnišťko, Vinary, Vraclav, Vračovice - Orlov, Vysoké Mýto, Zálší, Zámrs, Zářecká Lhota

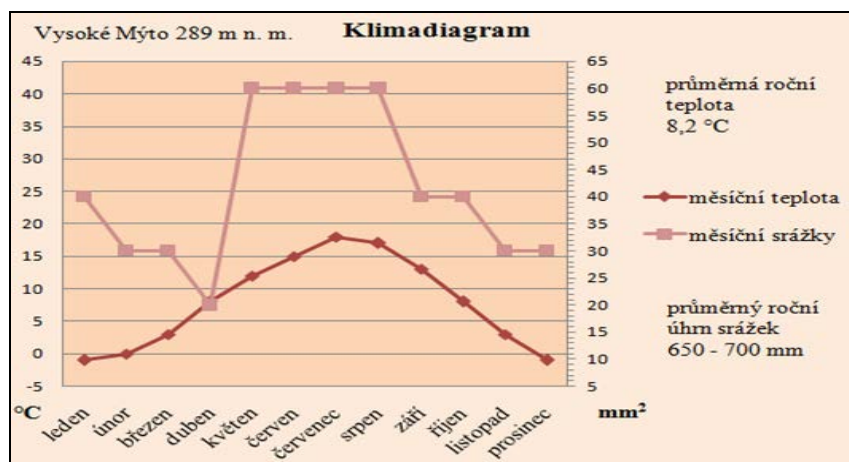
Obr. 2 - Sdružené obce mikroregionu Vysokomýtsko (Zdroj: Mapový server)



Cílem mikroregionu je realizace strategického plánu trvale udržitelného rozvoje regionu svazku obcí a dalších aktivit v oblasti ekonomického rozvoje, rozvoje venkova, kvality života, ochrany životního prostředí, rozvoje cestovního ruchu, propagace regionu a vytváření příznivých vnitřních a vnějších vztahů schválených orgány svazku obcí. Svazek obcí může vyvíjet vlastní hospodářskou činnost (Wikipedie).

Mikroregion Vysokomýtsko leží v podhůří Orlických hor a na západní straně je kryt výběžky Žďárských vrchů. Území spadá do geomorfologické oblasti Svitavská pahorkatina v České tabuli. Na severní straně je mikroregion lemován mohutným pásmem smíšených lesů. Centrum vyplňuje soustava rybníků. Jde o klimatickou oblast mírně teplou a mírně vlhkou s intenzivním využíváním zemědělských půd. Průměrná roční teplota zde dosahuje 8,2 °C a průměrný roční úhrn srážek se pohybuje kolem 650 - 700 mm (Tolasz a kol. 2007). Průměrné měsíční teploty a průměrné měsíční srážky jsou zaznamenány v klimadiagramu (Obr. 3).

Obr. 3 - Klimadiagram Vysokého Mýta (Zdroj: Tolasz a kol. 2007 – úpravy Doskočilová)



Krajina je velice malebná a zahrnuje několik evidovaných lokalit s výskytem zvláště chráněných druhů živočichů a rostlin. Podle Faltysové a Mackovčina (2002) se z pohledu potenciální přirozené vegetace v nejteplejších oblastech Vysokomýtska místy zachovaly zbytky dubohabřin (*Carpinion*). Podle geobotanické rekonstrukce (Mikyška a kol. 1970) by se na území mikroregionu Vysokomýtsko vyskytovaly nejvíce dubo-habrové háje (*Carpinion betuli*). Dále by zde byly acidofilní doubravy (*Quercion robori-petraeae*) a luhy a olšiny (*Alno-Padion*, *Alnetea glutinosae*, *Salicetea purpureae*). Květnaté bučiny (*Eu-Fagion*) by se na území objevovaly pouze fragmentálně.

MATERIÁL A METODIKA

Průzkum mikroregionu Vysokomýtsko proběhl ve vegetačních sezónách v letech 2009 – 2012 za použití standardních floristických a fytoocenologických metod (Slavíková 1986). Fytoocenologické snímky a spektra životních forem byly vytvořeny pouze u botanicky zajímavých lokalit. Při pořizování fytoocenologických snímků byla použita sedmičtená Braun - Blanquetova stupnice abundance a dominance (Moravec a kol. 1994, Prach 2001). Velikost fytoocenologických snímků byla použita podle minimálních areálů fytoocenóz.

Přírodovědné poměry mikroregionu Vysokomýtsko byly čerpány z Faltysová a Mackovčín (2002). Klimatické charakteristiky byly použity z Tolasz a kol. (2007) a Quitt (1967). Syntaxony geobotanické rekonstrukce uvedené v Geobotanické mapě ČSSR (Mikyška a kol. 1970) jsou uvedeny dle příslušného listu geobotanické mapy. Charakteristika biotopů vychází z Chytrého a kol. (2007), ale je upravená na studovaná území.

Práce se zabývá především cévnatými rostlinami, proto nebyla zařazena determinace mechorostů. Vrby a ostružiníky nebyly podrobněji určeny z důvodu jejich častého křížení. K určení rostlin byl použit Klíč ke květeně České republiky (Kubát a kol. 2002), podle kterého je uvedena i nomenklatura druhů. Flóra nalezená v mikroregionu Vysokomýtsko byla porovnávána s floristickými příspěvky (Faltys 1985, Duchoslav 1990, Filipov 1993).

Texty ke stávajícím biologickým lokalitám, chráněným územím a památným stromům vycházejí z průvodců (Anonymus 1996, Anonymus 2007 a, b, c), z informačních tabulí u lokalit a Chráněných území ČR - Pardubicko (Faltysová a Mackovčín 2002). Stávající chráněná území přírodní památka U Vinic a Vstavačová louka slouží jako ukázka ochrany botanicky významných lokalit. Lokality byly pozorovány s respektem na pravidla týkající se těchto chráněných území.

Fytoocenologické snímky jsou zařazeny do fytoocenologických tabulek (Tab. 1), ve kterých je v záhlaví jako první skutečné pořadí vyhotovených fytoocenologických snímků. Pod tímto údajem jsou fytoocenologické snímky seřazeny podle pořadí v dané lokalitě. Rostliny jsou ve fytoocenologické tabulce řazeny podle abundance a dominance od nejvyšší po nejnižší. Druhy vyskytující se v dané lokalitě pouze v jednom fytoocenologickém snímku jsou zařazeny za fytoocenologickou tabulkou. Pro komplexnost jsou dále uvedeny druhy vyskytující se v okolí fytoocenologických snímků v dané vegetaci. Přesné souřadnice fytoocenologických snímků jsou uvedeny v GPS souřadnicích získaných z internetové stránky Mapy.cz. Na základě fytoocenologických snímků byla vytvořena doplňková spektra životních forem (Obr. 4 – 8).

K zobrazení lokalit byly přiloženy podrobné letecké snímky (Obr. 9) a katastrální mapy (Obr. 10). Katastrální mapy pochází z internetového katastru (Katastrální mapy), letecké snímky byly získány z internetové stránky Mapy.cz. Popis lokalit je doplněn vlastní fotodokumentací.

Ukázka vyhodnocení fytoocenologických snímků:

Lokalita č. 7 - Vlhké tužebníkové lado

Tab. 1 – Fytoocenologická tabulka (Zdroj: Doskočilová)

Životní forma	Pořadí snímku	24	25	43	58	68	
	Číslo snímku	1	2	3	4	5	
	Plocha [m ²]	25	25	25	25	25	
	Nadmořská výška [m n. m.]	278	278	278	278	278	
	Expozice	V	V	V	V	V	
	Sklon [°]	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	
	Pokryvnost E1 [%]	100	100	100	100	100	
	Celková pokryvnost [%]	100	100	100	100	100	
	Počet druhů ve snímku	10	14	9	11	8	
	Datum	21.8.2010	21.8.2010	11.7.2011	21.8.2011	21.5.2012	
E1							K
Hkf	<i>Filipendula ulmaria</i> subsp. <i>ulmaria</i>	4.3	3.2	5.5	2.3	5.5	V
Hkf	<i>Urtica dioica</i>	4.5	3.5	2.3	4.5	2.3	V
Hkf a Gf	<i>Aegopodium podagraria</i>	2.2	1.1	1.1	1.1	1.1	V
Hkf	<i>Chaerophyllum hirsutum</i>	1.1	2.2	1.1	1.1	1.1	V
Gf	<i>Equisetum palustre</i>	3.3	1.1	2.1	●	1.1	IV
Hkf	<i>Alopecurus pratensis</i>	1.2	2.2	1.2	2.2	●	IV
Tf	<i>Impatiens glandulifera</i>	1.1	1.1	●	3.3	●	III
Hkf	<i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>	2.2	1.2	1.2	●	●	III
Hkf	<i>Epilobium hirsutum</i>	●	2.2	●	●	1.1	II
Hkf	<i>Humulus lupulus</i>	●	●	●	2.2	1.1	II
Hkf	<i>Lysimachia vulgaris</i>	●	1.1	2.2	●	●	II
Tf	<i>Impatiens parviflora</i>	●	1.1	●	1.1	●	II
NFf	<i>Rubus</i> sp.	●	1.1	●	1.1	●	II

Druhy vyskytující se pouze v jednom fytoocenologickém snímku:

snímek č. 1 Hkf *Cirsium oleraceum* 1.1, Hkf *Geranium pratense* 1.1

snímek č. 2 Chf *Lysimachia nummularia* 1.2, Hkf *Rumex obtusifolius* 1.1

snímek č. 3 Hkf *Convolvulus arvensis* 1.1

snímek č. 4 Hkf *Geranium palustre* 2.2, Hkf *Leontodon hispidus* 1.1

snímek č. 5 Hkf *Vicia cracca* 2.1

Druhy vyskytující se v okolí fytoocenologických snímků:

Hkf *Artemisia vulgaris*, Hkf *Circaea lutetiana*, Hkf *Crepis paludosa*, Hkf *Geum urbanum*, Hkf *Glechoma hederacea*, Hkf *Humulus lupulus*, Gf *Iris pseudacorus*, Hkf *Lythrum salicaria*, Hkf *Mentha longifolia*, Tf *Peplis portula*, Hkf *Phalaris arundinaceae*, Gf - Hf *Phragmites australis*, Hkf *Primula elatior* subsp. *elatior*, Ff *Salix* sp., Hkf a Gf *Symphytum officinale*

Lokalizace fytoocenologických snímků:

snímek č. 1 (49°56'3,121"S, 16°11'37,890"V)

levý břeh silnice Spálenec – Valcha - první mostek od Vysokého Mýta vpravo mezi keři

snímek č. 2 (49°56'4,488"S, 16°11'37,222"V)

levý břeh silnice Spálenec – Valcha - vlevo od posedu

snímek č. 3 (49°56'2,09"S, 16°11'38,470"V)

levý břeh silnice Spálenec – Valcha - první mostek od Vysokého Mýta vlevo

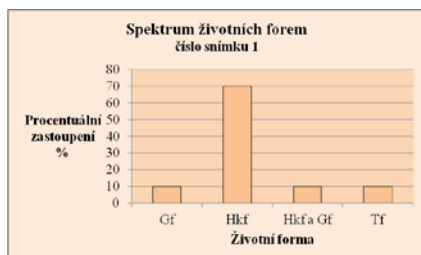
snímek č. 4 (49°55'56,100"S, 16°11'40,526"V)

levý břeh silnice Spálenec – Valcha - druhý mostek od Vysokého Mýta vpravo

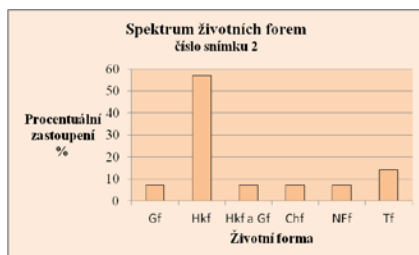
snímek č. 5 (49°55'55,255"S, 16°11'40,806"V)

levý břeh silnice Spálenec – Valcha - vlevo od stromu s chmelem otáčivým

*Obr. 4 - Spektrum životních forem
fytoocenologického snímku č. 1
(Zdroj: Doskočilová)*



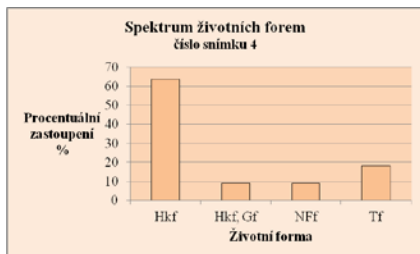
*Obr. 5 - Spektrum životních forem
fytoocenologického snímku č. 2
(Zdroj: Doskočilová)*



Obr. 6 - Spektrum životních forem
fytocenologického snímku č. 3
(Zdroj: Doskočilová)



Obr. 7 - Spektrum životních forem
fytocenologického snímku č. 4
(Zdroj: Doskočilová)



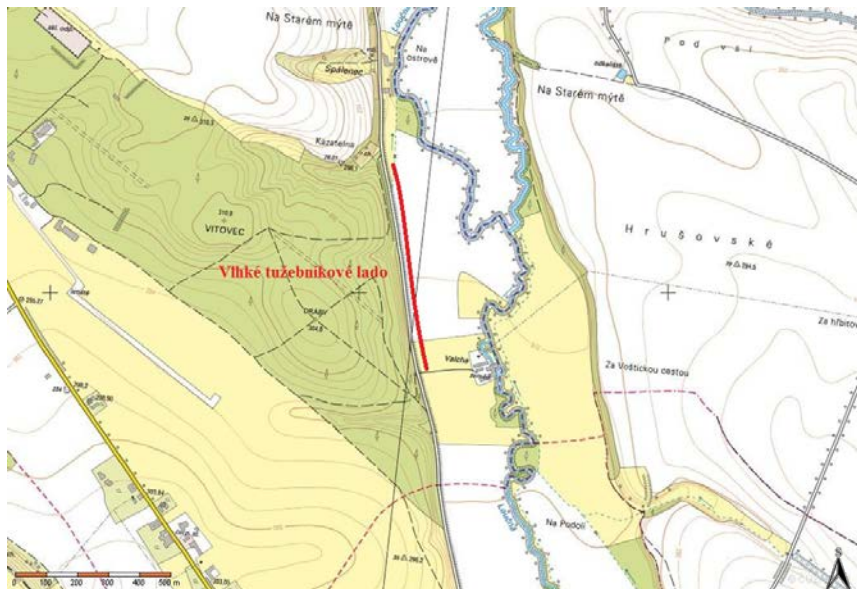
Obr. 8 - Spektrum životních forem
fytocenologického snímku č. 5 (Zdroj: Doskočilová)



Obr. 9 – Letecký snímek vlhkého tužebníkového lada (Zdroj: Mapy.cz – úpravy Doskočilová)



Obr. 10 – Katastrální mapa vlhkého tužebníkového lada
(Zdroj: Katastrální mapy – úpravy Doskočilová)



Soupis flóry studovaných lokalit je uveden v souhrnné floristické tabulce, která je abecedně seřazena podle českých názvů rostlin. Zde jsou pod čísly lokalit uvedeny jednotlivé lokality. U botanicky zajímavých lokalit (1 – 15) byl proveden samostatný floristický výzkum. U stávajících biologicky významných lokalit (16 - 19) jsou informace o druhovém složení přejaté z průvodců (Anonymus 1996, Anonymus 2007 a, b, c) a dále upřesněné. U stávajících chráněných území a památných stromů (20 – 22) jsou informace jen přejaté (informační tabule u chráněných území a památných stromů, Faltysová a Mackovčín 2002). Druhy vyskytující se v dané lokalitě jsou označeny [!]. Druhy, které se v lokalitě nevyskytují, mají označení [●]. Stupeň ochrany je uveden podle Procházka a kol. (2001). V tabulce jsou také uvedené druhy CITES (Botany). Ve floristické tabulce jsou označeny i druhy invazní [I] a druhy expanzivní [E].

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky v předložené práci vznikly převážně na základě vlastního geobotanického výzkumu.

BOTANICKY ZAJÍMAVÉ LOKALITY

A) Vodní toky a nádrže

Lokalita č. 1 - Makrofytní vegetace mezotrofní stojaté vody V1 je součástí svazu *Nymphaeion albae*. Nachází se v obci Slatina u areálu Českého svazu chovatelů 3 km severně od Vysokého Mýta. Břehy bezejmenného rybníka jsou v některých místech zpevněny. Rybník periodicky

nevysychá a jeho dno je pokryté silnou vrstvou organického bahna. Dominantním druhem je leknín bílý (*Nymphaea alba*) kořenující v organominerálním substrátu s listy plovoucími na hladině. Jeho populace zaujímá téměř jednu třetinu vodní plochy.

Lokalita č. 2 - Rybník Chobot se nachází v blízkosti lokality Vinice. Má rozlohu 49 ha a patří k soustavě Zálešsko – Vračovických rybníků. Je to rybník s intenzivním chovem ryb využívaný též rekreačně. Makrofytní vegetace přirozeně eutrofní stojaté vody V1 je ze svazu *Lemnion minoris*. Jedná se o vegetaci na hladině plovoucích rostlin. Vodní hladinu více nebo méně souvisle pokrývají pouze rostliny z čeledi okřehkovitých (*Lemnaceae*).

Lokalita č. 3 - Vysokým Mýtem a téměř celým mikroregionem Vysokomýtsko protéká řeka Loučná. Její vegetace je omezena pouze na lakušník vzplývavý (*Batrachium fluitans*). Tato vegetace vodního toku V4 náleží do svazu *Batrachion fluitantis*. Po přívalových deštích a po povodních je řeka občas zanesena pískem a zeminou, na které mohou vyklíčit i další rostliny. Jedná se většinou o rumištní druhy a trávy.

B) Pobřežní vegetace

Lokalita č. 4 - Rákosiny eutrofní stojaté vody M1.1 patřící do svazu *Phragmition communis* lemují téměř celý obvod rybníku Chobot. Vegetace rákosin je dosti chudá. Dominantně diagnostický je rákos obecný (*Phragmites australis*, Obr. 11). Místy k němu přistupuje chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea*). Oba tyto duhy jsou expanzivní a šíří se do okolí.

Obr. 11 - Detail rákosiny a dominantním rákosem obecným (*Phragmites australis*, Zdroj: Doskočilová)



C) Sekundární trávníky

Lokalita č. 5 - Mezofilní ovšková louka T1.1 náleží ke svazu *Arrhenatherion elatioris*. V tomto společenstvu dominují výběžkaté trávy, které vytvářejí vícevrstvé porosty. Louka se nachází asi 1 km od Hrušové u staré silnice, která spojuje Vysoké Mýto s Hrušovou. V horní vrstvě se vyskytují širokolisté druhy jako ovšik vyvýšený pravý (*Arrhenatherum elatius* subsp. *elatius*) a srha laločnatá pravá (*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata*), v dolní vrstvě lipnice luční (*Poa pratensis*) a psineček obecný (*Agrostis capillaris*). Pestrobarevný květnatý aspekt tvoří vytrvalé širokolisté byliny jako řeřichka obecná (*Achillea millefolium*), kakost luční (*Geranium pratense*) a chřastavec rolní pravý (*Knautia arvensis* subsp. *arvensis*). Na začátku léta se tu hojně nachází také kopretina bílá pravá (*Leucanthemum vulgare* subsp. *vulgare*), jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*), jetel luční (*Trifolium pratense*) a svízel povázka (*Galium mollugo*). Louka je závislá na pravidelném kosení, protože jinak by došlo k její degradaci. Nejprve by se na louce začaly vyskytovat širokolisté trávy a pak náletové dřeviny.

Lokalita č. 6 - Vlhká pcháčková louka T1.5 ze svazu *Calthion palustris* se nachází na fotbalovém hřišti v Javorníku. Louku obklopuje smrková monokultura a dubohabřina, kterou protéká Blahovský potok. Tato louka už není pravidelně kosena, protože se hřiště už delší dobu nepoužívá. Kosení se provádí maximálně jednou za rok, proto louka postupně zarůstá vysokými bylinami a bude se postupně měnit v tužebníkové lado. Jako dominantní rostliny zde jsou trávy a širokolisté byliny. Z rostlin zde převládá pcháč zelinný (*Cirsium oleraceum*), pcháč oset (*Cirsium arvense*) a pcháč různolistý (*Cirsium heterophyllum*). Další dominantou je lipnice luční (*Poa pratensis*), krabílčice chlupatá (*Chaerophyllum hirsutum*) a ocún jesenní (*Colchicum autumnale*). Z vedlejšího lesa se na louku dostává pitulník žlutý (*Galeobdolon luteum*) a semenáčky javoru mléč (*Acer platanoides*). Z trav zde roste tomka vonná (*Anthoxanthum odoratum*), psárka luční (*Alopecurus pratensis*), psineček obecný (*Agrostis capillaris*) a medyněk vlnatý (*Holcus lanatus*). Z kvetoucích druhů se vyskytuje mochna nátržník (*Potentilla erecta*), krvavec toten (*Sanguisorba officinalis*), prvosenka vyšší pravá (*Primula elatior* subsp. *elatior*), děhel lesní (*Angelica sylvestris*) a violka bahenní (*Viola palustris*). Na místech bohatých na dusík se expanzivně šíří kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*). Dále se tu invazně rozšiřuje netýkavka malokvětá (*Impatiens parviflora*).

Lokalita č. 7 - Vlhké tužebníkové lado T1.6 náleží do vegetační jednotky svazu *Calthion palustris* a podsvazu *Filipendulenion*. Nachází se kolem odvodňovacího kanálu u staré silnice spojující Vysoké Mýto s Hrušovou u mlýna Valcha. Je to zapojený porost se širokolistou vysokobylinnou vegetací. Tato fytoocenóza je především ovlivněna vlhkostí stanoviště. Tužebníkové lado vzniklo přirozenou sukcesí z vedlejší nekosené vlhké pcháčkové louky. Návrat k původnímu společenstvu by byl možný pravidelným kosením. Vlhké tužebníkové lado není druhově moc bohaté. Dominantním druhem je zde tužebník jilmový pravý (*Filipendula ulmaria* subsp. *ulmaria*), podle kterého je společenstvo pojmenováno. Dále zde můžeme najít kakost bahenní (*Geranium palustre*), krabílčici chlupatou (*Chaerophyllum hirsutum*), chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), vrbinu obecnou (*Lysiuachia vulgaris*) a vrbovku chlupatou (*Epilobium hirsutum*). Jako další bylina zde přistupuje škarda bahenní (*Crepis paludosa*). K těmto druhům se v jamním aspektu přidává prvosenka vyšší

pravá (*Primula elatior* subsp. *elatior*). Z běžných druhů zde můžeme najít bršlici kozí nohu (*Aegopodium podagraria*) a kyprej vrbici (*Lythrum salicaria*). Dále se zde také nachází vlhkomilný pcháč zelinný (*Cirsium oleraceum*) a přeslička bahenní (*Equisetum palustre*). V nejuvdálenější části od vlhké pcháčové louky se hojně šíří rákos obecný (*Phragmites australis*), chrstice rákosovitá (*Phalaris arundinaceae*) a kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*). V tužebníkovém ladu se také hojně šíří invazní netýkavka žláznatá (*Impatiens glandulifera*). Vegetace je též ohrožena náletovými dřevinami, které pochází především z blízké dubohabřiny.

Lokalita č. 8 - Suchý bylinný lem T4.1 se nacházel za hercynskou dubohabřinou vlevo od mezofilní ovsíkové louky nad starou silnicí směrem z Vysokého Mýta do Hrušové. Byl tvořen zapojeným porostem středně vysokých až vysokých bylin na výslunném místě. Tato vegetace ze svazu *Geranion sanguinei* byla vyvinuta mimo kontakt s lesem na neobhospodařovaném okraji pole a louky. Dominovala zde štetka planá (*Dipsacus fullonum*), kakost krvavý (*Geranium sanguineum*) a vikev tenkolistá (*Vicia tenuifolia*). Tato vegetace však byla zničena v létě roku 2010. Suchý bylinný lem byl rozorán a zároveň do úrovně zemědělsky obhospodařovaného pole, které je za ním. Mnoho rostlin zjištěných v minulých letech se tu tento rok už neobjevilo. Další rok již bylo druhové složení pestřejší. Proto by se v budoucnu bylinný lem mohl vrátit do původního stavu.

Lokalita č. 9 - Mezofilní bylinný lem T4.2 patřící do svazu *Trifolion medii* se vyskytuje na okraji dubohabřiny s velkým podílem smrku ztepilého (*Picea abies*) u cyklostezky Vysoké Mýto – Choceň. Dominantním druhem je černýš hajní (*Melampyrum nemorosum*). Diagnostickými druhy jsou jahodník obecný (*Fragaria vesca*) a chrastavec křovistní pravý (*Knautia drymeia* subsp. *drymeia*). Porost je druhově bohatý, protože do něho zasahují i druhy ze sousedních společenstev. Lem je ohrožován rozrůstáním dřevin, srhy laločnaté pravé (*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata*) nebo šířením nitrofilních druhů, zejména kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) a pcháče zelinného (*Cirsium oleraceum*). Lem se dá do budoucna ochránit odstraňováním náletových keřů a stromů, ruderalních a expanzivních druhů nebo také kosením.

D) Křoviny

Lokalita č. 10 - Mokřadní vrbina K1 ze svazu *Salicion cinereae* se nachází na křižovatce Bžundov. Dominantně diagnostické tu jsou vrby (*Salix* sp.), které mají neostrou hranici mezi keřovým a stromovým patrem. Dále je zde častý ostružiník (*Rubus* sp.), krušina olšová (*Frangula alnus*) a střemcha obecná pravá (*Prunus padus* subsp. *padus*). V bylinném patře jsou hojné druhy mokřadů jako blatouch bahenní (*Caltha palustris*), tužebník jilmový pravý (*Filipendula ulmaria* subsp. *ulmaria*), přeslička poříční (*Equisetum fluviatile*), vrbina obecná (*Lysimachia vulgaris*), kyprej vrbice (*Lythrum salicaria*) a rákos obecný (*Phragmites australis*). Vyskytuje se tu také autochtonní netýkavka nedůtklivá (*Impatiens noli-tangere*), která je vytlačovaná kontaktně zdatnější invazní netýkavkou malokvětou (*Impatiens parviflora*).

E) Lesy

Lokalita č. 11 - Mokřadní olšina L1 svazu *Alnion glutinosae* má bohatý jarní aspekt. Porost je spíše nezapojený a dominují v něm žluté blatouchy bahenní (*Caltha palustris*), které olšinu rozzáří. Po zbytek vegetační sezóny je vegetace zcela zapojená. Jedna část olšiny, která je v těsné blízkosti rybníka, je hodně podmačena. Druhá část olšiny je sušší. Po jižním okraji teče potůček, který přivádí vodu do rybníka. Kvůli velkému podmočení půdy odumírají olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) v těsné blízkosti tohoto rybníka.

Lokalita č. 12 - Hercynská dubohabřina L3.1 ze svazu *Melampyro nemorosi* - *Carpinetum* se rozprostírá nad starou silnicí spojující Vysoké Mýto s Hrušovou u mlýna Valcha. Ve stromovém patře převažuje habr obecný (*Carpinus betulus*), dub letní (*Quercus robur*) a dub zimní (*Quercus petraea*). Tyto lesní dominanty doplňuje javor babyka (*Acer campestre*), javor klen (*Acer pseudoplatanus*), buk lesní (*Fagus sylvatica*) a jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*). Příměsí je také lípa srdčitá (*Tilia cordata*). Místy se také objevuje borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Ve vykácených částech lesa je vysázen nepůvodní smrk ztepilý (*Picea abies*). Okraj lesa tvoří místy líska obecná (*Corylus avellana*) a bez černý (*Sambucus nigra*). Keřové patro je sporadické a tvoří ho nižší jedinci dřevin stromového patra. Na jaře se před olistěním stromů vyvíjí nápadný aspekt s geofyty, jako je sasanka hajní (*Anemone nemorosa*) a hrachor hajní (*Lathyrus vernus*). Ve svahu nad silnicí se hojně objevuje kopytník evropský (*Asarum europium*), jaterník podléška (*Hepatica nobilis*, Obr. 12) a plicník lékařský (*Pulmonaria officinalis*). Na stinných místech roste pstroček dvoulistý (*Maianthemum bifolium*) s hroznem bílých květů a obvykle dvěma srdčitými listy.

Obr. 12 - Diagnostický jaterník podléška (*Hepatica nobilis*, Zdroj: Doskočilová)



F) Biotopy silně ovlivněné člověkem

Lokalita č. 13 - Antropogenní plocha se sporadickou vegetací mimo sídla X6 se nachází v těsné blízkosti mezofilní ovskové louky v blízkosti staré silnice z Vysokého Mýta do Hrušové. Vegetace se nachází na haldě navezené sutě vpravo od závorou uzavřené cesty k hercynské dubohabřině. Usídlila se na ní pouze sporadická vegetace, protože zde není dostatečně vyvinutá půda. V této vegetaci se najde svačec rolní (*Convolvulus arvensis*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*), penízek rolní (*Thlaspi arvense*), pampeliška lékařská (*Taraxacum* sect. *Ruderalia*), divizna malokvětá (*Verbascum thapsus*) a lopuch plstnatý (*Arctium tomentosum*).

Lokalita č. 14 - Ruderalní bylinná vegetace mimo sídla X7 se vyskytuje na březích řeky Loučné. Ruderalní a synantropní byliny byly téměř zcela vytlačeny invazní netýkavkou žlaznatou (*Impatiens glandulifera*, Obr. 13), která se každým rokem více rozšiřuje. K jejímu šíření napomáhá i řeka Loučná, která roznáší semena dál po proudu. Porost je doplněn kopřivou dvoudomou (*Urtica dioica*), srhou laločnatou pravou (*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata*), krablicí chlupatou (*Chaerophyllum hirsutum*), lipnicí luční (*Poa pratensis*) a pampeliškou lékařskou (*Taraxacum* sect. *Ruderalia*).

Obr. 13 - Netýkavka žlaznatá (*Impatiens glandulifera*, Zdroj: Doskočilová)



Lokalita č. 15 - Lesní kultura s nepůvodními jehličnatými dřevinami X9A se nachází mezi Džbánovem a Javorníkem. Tato uměle vysázená rozlehlá smrková monokultura nese název Hatě. Smrková monokultura není moc druhově rozmanitá. Povrch půdy je pokryt vrstvou velmi pomalu se rozkládajícího jehličí, které tvoří kyselý surový humus. V uniformním porostu se jen tu a tam objevuje břıza bělokorá (*Betula pendula*), buk lesní (*Fagus sylvatica*), dub letní (*Quercus robur*), dub zimní (*Quercus petraea*), borovice lesní (*Pinus sylvestris*), jedle bělokorá (*Abies alba*) a

modřín opadavý (*Larix decidua*). V keřovém patře se vyskytuje bez černý (*Sambucus nigra*) a mladé dřeviny stromového patra. Hustými korunami smrků nepronikne mnoho slunečního záření, proto je bylinný podrost velmi chudý. Roztroušeně zde rostou keřky borůvky (*Vaccinium myrtillus*) a vřesu obecného (*Calluna vulgaris*), které doplňuje šťavel kyselý (*Oxalis acetosella*).

STÁVAJÍCÍ BIOLOGICKY VÝZNAMNÉ LOKALITY

Lokalita č. 15 - Stávající biologicky významné lokality Knířov – Vanice, Vinice, Vraclav a Městské sady a parky byly čerpány z průvodců (Anonymus 2007 a, b, c, Anonymus 1996). Vzhledem k tomu, že v těchto materiálech byly nalezeny některé chybné údaje, byly dílčí informace o těchto lokalitách upraveny. V průvodcovských textech nejsou u všech rostlin uvedena latinská jména (neuvedená v kurzívě). Byly nalezeny i chyby v nomenklatuře (rodová jména v latinské terminologii byla uvedena s malým počátečním písmenem). Dále bylo nutno sjednotit starší názvy rostlin podle současné botanické nomenklatury cévnatých rostlin (Kubát a kol. 2002). U řady rostlin byla uvedena pouze rodová jména, proto byly rostliny dodatečně určeny do příslušného druhového jména. V neposlední řadě byly převzaty informace z těchto průvodcovských textů upřesněny i po gramatické stránce. Rovněž fotografie v těchto průvodcovských brožurách byla považována za nevyhovující (malé obrázky a fotodokumentačně nevýznamné). Z tohoto důvodu byla zhotovena vlastní fotodokumentace v celkovém pohledu na lokalitu i v detailech.

Lokalita č. 16 - Na lokalitě Knířov – Vanice je možné se seznámit s mnoha zajímavostmi. Za příznivého počasí je z pár míst pěkný panoramatický rozhled do kraje. Křížová poutní cesta do Knířova byla tvořena dvouřadou lipovou alejí, která byla v roce 1848 vykácena. K její obnově došlo až na podzim roku 2000, kdy bylo nově vysázeno 105 lip srdčitých (*Tilia cordata*). Pod Knířovem se nachází chovný rybník. Na jeho severním a jižním břehu jsou zachovány břehové porosty, které jsou tvořeny domácími druhy vrb a dalšími dřevinami. Ve stromovém patře dominují vrba bílá (*Salix alba*), topol osika (*Populus tremula*) a břiza bělokorá (*Betula pendula*). V keřovém patře jednoznačně převládají keřové vrby, např. vrba popelavá (*Salix cinerea*), vrba košíkářská (*Salix viminalis*) a vrba nachová (*Salix purpurea*). V bylinném patře je možné najít hlavně vlhkomilné rostliny. Patří mezi ně tužebník jilmový pravý (*Filipendula ulmaria* subsp. *ulmaria*), kostival lékařský (*Symphytum officinale*) a opletník plotní (*Calystegia sepium*). Na severním a východním břehu rybníka je zachovalé litorální pásmo, kde roste rákos obecný (*Phragmites australis*), chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea*) a zblochan vodní (*Glyceria maxima*). Na vodní hladině rostou vzplývavé vodní rostliny indikující vysoký obsah živin ve vodě. Patří k nim okřehek menší (*Lemna minor*), závitka mnohokořená (*Spirodela polyrrhiza*) a rdesno oboživelné (*Persicaria amphibia*). Další zastavení je na jižně exponovaném svahu, který je porostlý teplomilnými společenstvy polostepních travin. Silnice z Knířova do Vanic byla dříve lemovaná sekanými květnatými příkopy, na kterých bylo možné nalézt mateřídoušku vejčitou (*Thymus pulegioides*) a bedrník obecný (*Pimpinella saxifraga*). Dnes jsou příkopy z velké části zarostlé náletovými i vysázenými dřevinami. Dominuje tu hlavně trnka obecná (*Prunus spinosa*), růže šípková (*Rosa canina*), brslen evropský (*Eyonymus europaea*), svída krvavá (*Cornus sanguinea*), jilm habrolistý (*Ulmus minor*) a třešně (*Prunus* sp.). Hlavní silnicí, kterou lemují jasaný ztepilý

(*Fraxinus excelsior*) a jeřáby (*Sorbus* sp.), se vrací zpět do Vysokého Mýta (Anonymus 2007 a - úpravy Doskočilová).

Lokalita č. 17 - Vinice se nachází na výletním místě obyvatel Vysokého Mýta - „Kujebáků“. Chodníček vedoucí na Vinice je lemován lípami srdčitými (*Tilia cordata*) a lípami velkolistými (*Tilia platyphyllos*) vysázenými v roce 1906. Ve svahu nad bývalou vilou Samokov roste chráněný vstavač nachový (*Orchis purpurea*). Již v 1. pol. 15. století se v těchto místech pěstovala réva vinná (*Vitis vinifera*), podle které nese tato lokalita své jméno. Nedaleko této oblasti se nachází přírodní památka U Vinic. Je to slatinná louka s bohatým výskytem chráněných druhů rostlin jako je prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), všivec lesní (*Pedicularis sylvatica*), ostřice Davallova (*Carex davalliana*) a suchopýr úzkolistý (*Eriophorum angustifolium*). Z hřebene Vinic je krásný pohled na Bůčkův kopec (315 m n. m.), Dvořisko a na biocentrum Oklikov. Biocentrum je místo, které umožňuje život původním druhům planě rostoucích rostlin a volně žijícím živočichům. Biocentrum Oklikov bylo vybudováno v letech 1998 – 1999. Jedná se o malou vodní plochu s doprovodnou zelení (Anonymus 2007 b - úpravy Doskočilová). Můžete zde najít dub letní (*Quercus robur*), lísku obecnou (*Corylus avellana*), olši lepkavou (*Alnus glutinosa*), vrbu bílou (*Salix alba*) a krušinu olšovou (*Frangula alnus*). V okolí Oklikova se také vyskytují významné druhy rostlin jako je chrpa luční ostropestrá (*Centaurea jacea* subsp. *oxylepis*), chrastavec Kitaibelův (*Knautia kitaibelii*), koromáč olešníkovaný (*Silaum silaus*) a žluťucha lesklá (*Thalictrum lucidum*).

Lokalita č. 18 - Vraclav se nachází v okolí členité krajiny Vysokého Mýta. Na této trase je možné si uvědomit důležitost lesa a seznámíte se také s jeho typickými rostlinami. Za pěkného podvečerního počasí je možné ze silnice nad lesem vidět Krkonoše s nejvyšší horou Sněžkou. Na okraji komplexu zvaného Koryta byly původní dubohabrové lesy nahrazeny smíšenými porosty s převahou smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*). V důsledku silné nitrifikace a splachu živin se zde šíří bez černý (*Sambucus nigra*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), netýkavka malokvětá (*Impatiens parviflora*), vlaštovičnick větší (*Chelidonium majus*) a kuklík městský (*Geum urbanum*). Z dalších zajímavých rostlin se tu vyskytuje žindava evropská (*Sanicula europaea*) a čarovník pařížský (*Circaea lutetiana*). Cestou je dále možné nalézt třeba ovsík vyvýšený pravý (*Arrhenatherum elatius* subsp. *elatius*), krabilici zápašnou (*Chaeraphyllum aromaticum*) nebo lopuch plstnatý (*Arctium tomentosum*). V místě, kde cesta s ovsíkovými lemy vstupuje do lesního komplexu je dominantní trnka obecná (*Prunus spinosa*). U památníku na Hradisku se vyskytují staré stromy jako jilm habrolistý (*Ulmus minor*), lípy (*Tilia* sp.), javory (*Acer* sp.) a modřín opadavý (*Larix decidua*). Na okraji lesního komplexu je možné najít trnovník akát (*Robinia pseudacacia*), netvařec křovitý (*Amorpha fruticosa*), šerík obecný (*Syringa vulgaris*) a pustoryl věncový (*Philadelphus coronarius*). Ve spárách hradeb kolem kostela sv. Mikuláše roste zvěšinec zední (*Cymbalaria muralis*), který se k nám dostal jako skalnička z jižní Evropy. Dominantou Vraclave je kostel Nanebevzetí Panny Marie, v jehož okolí se vyskytují okrasné rostliny. Jsou to zimostráž vždyzelený (*Buxus sempervirens*), svída bílá (*Cornus alba*), pámelník bílý (*Symphoricarpos albus*) a zlatice prostřední (*Forsythia x intermedia*). Kamennou zeď prorůstají různé druhy rozhodníků (*Sedum* sp.), mochna stříbrná (*Potentilla argentea*) a teplomilné

kostřavy (*Festuca* sp.). Nedaleko odtud se rozprostírá dubohabřina Varta (Anonymus 2007 c - úpravy Doskočilová). V jejich nejhodnotnějších částech byly zaznamenány chráněné rostliny jako prvosenka jarní pravá (*Primula veris* subsp. *veris*), krušík širolistý (*Epipactis helleborae*) a lilie zlatohlavá (*Lilium martagon*). Dalšími významnými bylinami jsou černýš hajní (*Melampyrum nemorosum*), tolita lékařská (*Vincetoxicum hirundinaria*), žindava evropská (*Sanicula europaea*), orlíček obecný (*Aquilegia vulgaris*) a jaterník podléška (*Hepatica nobilis*). Z keřů zde roste kalina obecná (*Viburnum opulus*), zimolez obecný (*Lonicera xylosteum*) a trnka obecná (*Prunus spinosa*). V lokalitě „V Dolích“ se vyskytuje střešníček pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) a také lilie zlatohlavá (*Lilium martagon*).

Lokalita č. 19 - Městské sady a parky se nacházejí v místech bývalého hradebního opevnění. V parku u náměstí Otmara Vaňorného se nacházejí významné stromy jako liliovník tulipánokvětý (*Liriodendron tulipifera*) a dřezovec trojtrnný (*Gleditsia triacanthos*). Dále zde můžeme najít dub zimní (*Quercus petraea*) a dub letní (*Quercus robur*), který byl díky své výjimečnosti a mohutnému vzrůstu vyhlášen v roce 1996 za památný strom. Mezi chrámem sv. Vavřínce a zvonice byla na jaře roku 1990 slavnostně vysazena lípa velkolistá (*Tilia platyphyllos*) jako lípa vlasti. Havlíčkovy sady byly zřízeny na místě původní jízdárny. Z významných stromů zde roste živá zkamenělina jinan dvoualokčný (*Ginkgo biloba*) a purpurově kvetoucí šacholan Soulangeův (*Magnolia x soulangeana*). Dominantou Masarykových sadů je platan javorolistý (*Platanus x hispanica*). Vysokomýtská botanická zahrada byla založena roku 1906. Se svými asi 300 druhy rostlin patřila v první třetině 20. století mezi významné evropské botanické zahrady. O její údržbu a zachování se do padesátých let staral Okrašlovací spolek, pak zahrada zanikla. V roce 1996 byl zpracován projekt na obnovu této botanické zahrady. Z dřevin se zde nalézají jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum*), javor mléč (*Acer platanoides*) a jilm vaz (*Ulmus laevis*). Jungmannovy sady byly upraveny v roce 1872 – 1875 na místě původních městských valů. K jejich rozšíření došlo v roce 1906 po zrušení starého hřbitova u kostela Nejsvětější trojice. Do části hradební zdi jsou od roku 1912 zasazovány pamětní desky. Z významných stromů zde rostou tři mohutní jedinci jilmu vaz (*Ulmus laevis*) a katalpa trubačovitá (*Catalpa bignonioides*) s dlouhými tobočkami. Nejmladší z městských parků U koruny byl založen v roce 1986 v proluce po zbořených domech (Anonymus 1996 – úpravy Doskočilová). Z významných stromů zde roste pavlovnie plstnatá (*Paulownia tomentosa*), metasekvoje čínská (*Metasequoia glyptostroboides*) a jinan dvoualokčný (*Ginkgo biloba*).

STÁVAJÍCÍ CHRÁNĚNÁ ÚZEMÍ A PAMÁTNÉ STROMY

Lokalita č. 20 - Přírodní památka U Vinic se nachází na louce u osady Na vinicích, severovýchodně od Vysokého Mýta. Předmětem ochrany je slatinná louka s vegetací svazu *Molinion* a *Caricion davallianae* s bohatým spektrem vzácných a ohrožených druhů rostlin. Mezi nejčastější patří silně ohrožené druhy – krušík bahenní (*Epipactis palustris*), vstavač kukačka (*Orchis morio*), ostřice oddálená (*Carex distans*) a ohrožené druhy – prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), upolín nejvyšší (*Trollius altissimus*), prvosenka jarní pravá (*Primula veris* subsp. *veris*) a ostřice Davallova (*Carex davalliana*). Zajímavostí tohoto slatinného území je i

výskyt dalších 18 druhů ostříc. Dále zde roste srpice barvířská (*Serratula tinctoria*), prvosenka vyšší (*Primula elatior*), kozlík dvoudomý (*Valeriana dioica*), suchopýr úzkolistý (*Eriophorum angustifolium*) a oman vrbový (*Inula salicina*). Podobný typ luk byl ještě v nedávné minulosti v této oblasti běžně rozšířen, velkoplošné rekultivace na sklonku 80. let 20. století však většinu z nich zničily. Podloží je tvořeno svrchnokřídovými vápnitými jílovcí až slínovci rohateckých vrstev. Půdní pokryv louky tvoří slatinový druh organozemě typické, v okolí se na svahovinách zdejších hornin vyvinula pararendzina kambizemní. Kosení porostů jednou ročně lehkou mechanizací s ručním dosekáváním zamokřených okrajů a ploch je nutné pro udržení porostů v současném stavu. V okraji chráněného území byl obnoven malý mokřad (Faltysová a Mackovčín 2002).

Lokalita č. 21 - Přírodní památka Vstavačová louka se rozprostírá na jižním okraji lesa mezi Chocní a obcí Sruby. Předmětem ochrany je poslední zbytek slatinné louky svazů *Molinion* a *Caricion davallianae* v nivě západně od Chocně, která přetrvala velkoplošné meliorace a rekultivace z 80. let 20. století. Zachovaly se zde dosud bohaté populace ohrožených druhů rostlin oddělené od okolních hospodářských luk melioračními kanály. Roste zde hladýš pruský (*Laserpitium pruthenicum*), koromáč olešníkovaný (*Silaum silaus*), vrba rozmarýnolistá (*Salix rosmarinifolia*), vstavač kukačka (*Orchis morio*), kosatec sibiřský (*Iris sibirica*), kozlík dvoudomý (*Valeriana dioica*), krušík bahenní (*Epipactis palustris*), ostřice Davallova (*Carex davalliana*), ostřice oddálená (*Carex distans*), prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), prvosenka vyšší pravá (*Primula elatior* subsp. *elatior*), prvosenka jarní pravá (*Primula veris* subsp. *veris*) a vemeník dvoulistý (*Platanthera bifolia*). Na okraji lesa nalezneme orlíček obecný (*Aquilegia vulgaris*). Podle Faltysové a Mackovčína (2002) jsou podkladem mírného, k jihozápadu skloněného svahu vápnité jílovce rohateckých vrstev svrchní křída. Vytvořila se zde půda typu organozemě, v okolí pak gleje a pseudogleje. K zachování charakteru porostu je nutno louku jednou ročně kosit za použití lehké mechanizace s ručním dosekáváním zamokřených ploch.

Lokalita č. 22 - Památné stromy jsou velmi staré stromy nebo skupiny stromů, které mohou mít oblastní kulturně historický význam. Okolo každého památného stromu platí ochranné pásmo, kde je zakázáno provádět činnost, která by strom mohla poškodit. Mezi nejčastěji vyhlášené památné stromy v mikroregionu Vysokomýtsko patří lípy (*Tilia* sp., 46 %) a duby (*Quercus* sp., 24 %).

Soupis flóry studovaných lokalit (Tab. 2) je uveden v abecedně seřazené souhrnné floristické tabulce. Všechny rostliny jsou dále zařazeny do čeledí. Dále jsou zde pod čísly lokalit uvedeny jednotlivé studované lokality.

Tab. 2 - Ukázka úvodní části soupisu flóry (Zdroj: Doskočilová)

Český název rostliny	Latinský název rostliny	Český název čeledě	Latinský název čeledě	Stupeň ochrany	Invazní / expanzivní rostliny	Číslo lokality																					
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
bařanka výtavná	<i>Marrubium perarmia</i>	prýčkovité	Euphorbiaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
boček obecný	<i>Pimpinella saxifraga</i>	malikovní	Astaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bez černý	<i>Sambucus nigra</i>	bobovité	Sambucaceae	-	E	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bika lidní	<i>Lactuca campestris</i>	řitovité	Juraceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
blatouch bahenní	<i>Callitriche palustris</i>	prýčkovité	Ranunculaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
borovice černá	<i>Pinus nigra</i>	borovicovité	Pinaceae	-	I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
borovice lemná	<i>Pinus sylvestris</i>	borovicovité	Pinaceae	-	E	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bořilka	<i>Vaccinium myrtillus</i>	heřmánkovité	Typhaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
brleň evropský	<i>Eleocharis europaea</i>	ješencovité	Callitricaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bršlice kozí noha	<i>Asopodum podagraceum</i>	malikovní	Astaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bruslicí olejka	<i>Bruceia nepus</i> subsp. <i>negus</i>	bruslicovité	Braziaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
brěčtan populátní	<i>Hedera helix</i>	aralkovité	Araliaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
břina bílokvětá	<i>Betula pendula</i>	břinovité	Betulaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
buk lemný	<i>Fagus sylvatica</i>	bukovité	Fagaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
buk lemný červenolalý	<i>Fagus sylvatica</i> <i>Atropurpurea</i>	bukovité	Fagaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
bukvice lékařská	<i>Betonica officinalis</i>	hluchákovité	Lamiaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
čaromník patibýlý	<i>Cincaea luteolata</i>	pupalkovité	Onopordaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
čekaník obecný pravý	<i>Ciclerium intybus</i> subsp. <i>intybus</i>	hvězdnicovité	Asteraceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
černobílek obecný	<i>Prunella vulgaris</i>	hluchákovité	Lamiaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
černý hajný pravý	<i>Melampyrum nemorosum</i> subsp. <i>nemorosum</i>	kráňkovité	Scrophulariaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
česnek lékařský	<i>Alliaria petiolata</i>	bruslicovité	Braziaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
česnek vlnitý	<i>Alliaria vinealis</i>	česnekovité	Alliaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
děbal lemný	<i>Angelica sylvestris</i>	malikovní	Astaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
divina malolepká	<i>Verbascum thapsus</i>	kráňkovité	Scrophulariaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
dízelec bojitý	<i>Gleditsia triacanthos</i>	sapanovité	Cesalpiniaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
dub lemný	<i>Quercus robur</i>	bukovité	Fagaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
dub nízký	<i>Quercus petraea</i>	bukovité	Fagaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
habr obecný	<i>Carpinus betulus</i>	lískovité	Corylaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
hláď pruhá	<i>Laserpitium pratense</i>	malikovní	Astaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
hlol jednosměrný	<i>Crataegus monogyna</i>	řízovité	Rosaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
hrachoř jámí	<i>Lathyrus vernus</i>	bobovité	Fabaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				
hrachoř luční	<i>Lathyrus pratensis</i>	bobovité	Fabaceae	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				

Legenda:

I (invazní druh), *E* (expanzivní druh), *!* (vyskytuje se), *•* (nevyskytuje se)

botanicky zajímavé lokality - *1* (Makrofitní vegetace mezotrofní stojaté vody), *2* (Makrofitní vegetace přirozeně eutrofní stojaté vody), *3* (Vegetace vodního toku), *4* (Rákosiny eutrofní stojaté vody), *5* (Mezofilní ovsíková louka), *6* (Vlhká pcháčová louka), *7* (Vlhké tužebníkové lado), *8* (Suchý bylinný lem), *9* (Mezofilní bylinný lem), *10* (Mokřadní vršina), *11* (Mokřadní olšina), *12* (Hercynská dubohabřina), *13* (Antropogenní plocha se sporadickou vegetací mimo sídla), *14* (Ruderální bylinná vegetace mimo sídla), *15* (Lesní kultura s nepůvodními jehličnatými dřevinami)

stávající biologicky významné lokality - *16* (Knířov - Vanice), *17* (Vinice), *18* (Vraclav), *19* (Vysokomyšské sady a parky)

chráněná území a památné stromy - *20* (Přírodní památka U Vinic), *21* (Přírodní památka Vstavačová louka), *22* (Památné stromy)

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvoření poznatků na základě vlastního botanického průzkumu mikroregionu Vysokomýtsko, ale i soustředění poznatků o lokalitách již zpracovaných (Obr. 14). Botanicky zajímavé lokality byly samostatně zpracovány, informace o stávajících biologicky významných lokalitách, chráněných územích a památných stromech byly čerpány z literatury. Prostudované lokality se nacházejí ve Vysokém Mýtě a v okolí Slatiny, Hrušové, Javorníku, Javorničku, Jangelce, Knířova, Vanic, Vraclave, Vinic, Srubů a rybníku Chobot.

Obr. 14 – Mapa studovaných lokalit bez památných stromů (Zdroj: Mapy.cz - úpravy Doskočilová)



Legenda:

čísla lokalit odpovídají legendě u Tab. 2

Všeobecná část práce informuje o topografických a přírodních poměrech, především o flóře a vegetaci, zevrubně o fauně a vlivu antropických faktorů. Praktická část se zabývá vybranými botanicky zajímavými oblastmi v mikroregionu Vysokomýtsko. V rámci práce bylo zmapováno

15 botanicky zajímavých lokalit, 4 stávající biologicky významné lokality, 2 chráněná území a památné stromy.

Botanicky zajímavé lokality jsou z kategorií vodní toky a nádrže, pobřežní vegetace, sekundární trávníky, křoviny, lesy a biotopy silně ovlivněné člověkem. U každé této kategorie je uveden alespoň jeden biotop. Na základě geobotanického průzkumu je charakterizována vegetace a flóra následujících biotopů: makrofytní vegetace mezotrofní vody, makrofytní vegetace přirozeně eutrofní vody, vegetace vodního toku, rákosiny eutrofní stojaté vody, mezotrofní ovsíková louka, vlhká pcháčová louka, vlhké tužebníkové lano, suchý bylinný lem, mezofilní bylinný lem, mokřadní vrba, mokřadní olšina, hercynská dubohabřina, antropogenní plocha se sporadickou vegetací mimo sídla, ruderalní bylinná vegetace mimo sídla a lesní kultura s nepůvodními jehličnatými dřevinami.

V botanicky zajímavých lokalitách mikroregionu Vysokomýtsko bylo determinováno 162 druhů cévnatých rostlin. Za zmínku stojí uvést čtyři zvláště chráněné a různým stupněm ohrožené druhy rostlin. Jsou to jedle bělokorá (*Abies alba*), jilm vaz (*Ulmus laevis*), lakušník vzplývavý (*Batrachium fluitans*) a leknín bílý (*Nymphaea alba*). Z ochrannářského pohledu je nutno upozornit na výskyt třech invazních druhů rostlin – netýkavka malokvětá (*Impatiens parviflora*), netýkavka žlaznatá (*Impatiens glandulifera*), zlatobýl kanadský (*Solidago canadensis*) a pěti expanzivních rostlin – bez černý (*Sambucus nigra*), borovice lesní (*Pinus sylvestris*), chřastice rákosovitá (*Phalaris arundinaceae*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a rákos obecný (*Pragmites australis*). Z celkového počtu determinovaných rostlin představují invazní rostliny 1,85 % a expanzivní rostliny 3,09 %.

Pro doplnění byly v práci také uvedeny stávající biologicky významné lokality Knířov – Vanice, Vinice, Vraclav a Městské sady a parky, stávající chráněná území přírodní památka U Vinic a přírodní památka Vstavačová louka a památné stromy. V těchto stávajících lokalitách se vyskytuje dalších 65 druhů cévnatých rostlin. Z toho jich je 16 zvláště chráněných nebo různým stupněm ohrožených. Z ochrannářského hlediska je důležité upozornění na invazní borovici černou (*Pinus nigra*).

LITERATURA

Anonymus: *Naučná stezka Knířov - Vanice*. ZO ČSOP, Vysoké Mýto, 2007 a.

Anonymus: *Naučná stezka Vinice*. ZO ČSOP, Vysoké Mýto, 2007 b.

Anonymus: *Naučná stezka Vraclav*. ZO ČSOP, Vysoké Mýto, 2007 c.

Anonymus: *Naučná stezka Vysokomýtskými sady a parky*. ZO ČSOP, Vysoké Mýto, 1996.

Botany [cit. 9. 11. 2008]. Přístupný z: <http://botany.cz/cs/>.

Buček a kol. Feudální výroby pro ŽP, AV ČR, Geografického ústavu: *Atlas životního prostředí a zdraví obyvatelstva ČSFR*. Brno, Československá akademie věd, Brno a Praha, 1992.

Duchoslav M.: *Floristický příspěvek ke květeně Vysokomýtska*. Československá botanická společnost, 1990.

Faltys V.: *Acta Musei Reginaehradecensis - Floristický materiál ke květeně Choceňska a Vysokomýtska*. Hradec Králové, 1985.

Faltysová H., Mackovčín P.: *Chráněná území ČR Pardubicko*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum, Praha a Brno, 2002. ISBN 80-86064-44-1.

Filipov P.: *Floristický příspěvek ke květeně okolí Chocně a Vysokého Mýta*. 1993.

Chytrý a kol.: *Katalog biotopů České republiky*. Agentura ochrany přírody a krajiny, Praha, 2001. ISBN 80-86064-55-7.

Katastrální mapy [cit. 9. 11. 2008]. Přístupné z: <http://sgi.nahlizenidokn.cuzk.cz/marushka/default.aspx?themeid=3&MarExtent=-990320.44597457629%201239836%20346646.55402542371%209223033&MarWindowName=Marushka>.

Kubát K. a kol.: *Klíč ke květeně České republiky*. Academia, Praha, 2002. ISBN 80-200-0836-5.

Mapový server [cit. 24. 6. 2012]. Přístupný z: http://mapy.crr.cz/tms/crr_a/mikro/index.php?interface=tmv&Theme=mikroregiony&alues=166&lg=#c=3582817%252C5531154&z=4&l=ajax_mikro,ajax_mikro_plochy&=&.

Mapy.cz [cit. 9. 11. 2008]. Přístupné z: <http://www.mapy.cz/>.

Mikroregion Vysokomýtsko [cit. 4. 9. 2010]. Přístupný z: <http://www.vysokomytsko.cz>.

Mikyška R. a kol.: *Geobotanická mapa ČSSR*. Academia, Praha, 1970.

Moravec J. a kol.: *Fytocenologie*. Academia, Praha, 1994.

Prach K.: *Úvod do vegetační ekologie (geobotaniky)*. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 2001.

Procházka F. a kol.: *Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky*. Příroda, Praha, 2000.

Quitt E.: *Klimatické oblasti ČSR*. Brno, Studia geographica, 1971.

Slavíková J.: *Ekologie rostlin*. SPN, Praha, 1986.

Tolasz R.: *Atlas podnebí Česka*. Český hydrometeorologický ústav a Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc a Praha, 2007. ISBN 978-80-86690-26-1.

Wikipedie [cit. 6. 3. 2011]. Přístupná z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/>.

THE INFLUENCE OF WIND TURBINES ON THE MORTALITY OF BIRDS - PRELIMINARY RESULTS

VLIV VĚTRNÝCH ELEKTRÁREN NA MORTALITU PTÁKŮ – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY

Fryželková L., Borkovcová M.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xfryzel0@mendelu.cz

ABSTRACT

Evaluation of the impact of wind turbines on the avifauna, are among the most important documents in the evaluation of the impact of wind power installation on the environment and is an essential part. The influence can be divided into three groups: 1) interference (alone or the presence of noise), 2) mortality due to collision with a building, 3) loss, removal or disturbance and habitat.

The aim of my work is to evaluate the impact of wind turbines on the birds mortality of alone, without examining other impacts.

The methodology is readmitted from Kočvara and Polasek (2005) and consists in determining the three selected monitoring sites throughout the year with a repeat at least twice a month during the period from March to November and once a month during the period from December to February. If a check can not take place as scheduled, executed as soon as possible.

During the period from January 2012 to September 2012 were by this method monitored wind farms in Horní Loděnice (9 wind turbines), Ostružná (6 wind turbines), and Hraničné Petrovice (2 wind turbines), and were found only two dead individuals - White Wagtail and Great Tit.

Provisional results indicate no significant the influence of wind turbines on the birds mortality of. While watching, however, met with the question of predation in the wild. To what extent can predators represent distortion of the research. On this aspect in the future focus and we will follow.

Key words: wind, wind energy, wind turbines, landscape, birds

Acknowledgments: The research has been supported by IGA Mendelu TP 4/2012.

ÚVOD

Po úspěšném splnění indikativního plánu České republiky pokrýt do roku 2010 8 % výroby elektrické energie z obnovitelných zdrojů byl určen další cíl, a to dosáhnout 13 % této výroby do roku 2020. Větrné elektrárny nezastávají v energetice ČR většinou roli, přesto jde o významný podíl a lze tedy předpokládat, že výstavba nových větrných elektráren (dále jen VTE) bude pokračovat. Při plánování výstavby VTE je nutné zvážit všechny možné vlivy těchto staveb na životní prostředí, zejména na krajinu a její přírodní složky, především pak na ptáky a netopýry. Co se týká vlivu na změnu krajinného rázu, je třeba si uvědomit, že se jedná o velmi subjektivní hodnocení, kdy každý člověk má jiný vkus a jiný úhel pohledu. Pro jednoho mohou VTE v krajině představovat cizorodý prvek přetvářející zemědělskou krajinu na krajinu agro-industriální, který narušuje svéráznou venkovskou krajinu, kdežto druhý pohled může VTE vnímat jako nový, zajímavý či dokonce elegantní prvek moderní krajiny. Má práce je zaměřena na hodnocení vlivu VTE na mortalitu ptáků.

MATERIÁL A METODIKA

Pro výzkum byly jako případové studie vybrány tři lokality s různým počtem i různou výškou větrných elektráren – Horní Loděnice s 9 větrnými turbínami, Ostružná s 6 turbínami a Hraničné Petrovice s 2 turbínami. Lokality byly vybírány tak, aby je bylo možné navštěvovat co nejčastěji a získané výsledky mohly být srovnány i mezi sebou – zda má velikost VTE nebo jejich počet vliv na větší úmrtnost ptáků.

Použitá metodika vychází ze zkušeností v Německu a byla upravena pro naše podmínky R. Kočvarou a Z. Poláškem, kteří se touto problematikou zabývali již dříve. S ohledem na dané území se dle metodiky považuje za minimální 12 počet návštěv za rok; a to 3 kontroly během jarního tahu ptáků, 4 v průběhu hnízdění, 3 v období podzimního tahu a 2 v zimě. V mém případě však monitoring probíhá v průběhu celého roku a to s opakováním co druhý týden každá jedna lokalita (březen – listopad) a jednou měsíčně v zimních měsících (prosinec - únor). Při kontrolách se dané území pečlivě prozkoumá a zaznamenají se případné nálezy, včetně fotodokumentace. Jestliže se kontrola nemůže provést v plánovaném termínu, např. z důvodu nepříznivého počasí, provede se kontrola v nejbližším možném termínu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Během monitoringu, započatého v lednu 2012 až do září 2012 byli nalezeni dva uhynulí jedinci. 22.4.2012 byl ve větrném parku na Ostružné nalezen konipas bílý. Nález byl čerstvý a lehce identifikovatelný. Další nález byl uskutečněn 9.7.2012 ve větrném parku v Horní Loděnici, jednalo se o sýkora koňadru. Nalezený kadaver byl již v pokročilém stadiu rozkladu, a proto byl také hůře identifikovatelný. V Hraničných Petrovicích zatím k žádnému nálezu nedošlo. Dva nálezy během 9

měsíců neprokazují žádný vliv větrných elektráren na mortalitu ptáků. Je třeba ale také přihlídnout k faktu, že v krajině existuje řada predátorů, pro které může sražený jedinec představovat snadno získanou potravu. Z toho vyvstává otázka, nakolik predátoři mohou ovlivnit nálezy kadaverů pod VTE? I přes predační tlak v krajině však nepředpokládám, že výsledky budou výrazně vyšší. Nesrovnatelně vyšší úmrtnosti nejen ptáků lze sledovat např. na silnicích, kde smrt naleznou denně stovky jedinců. Studie Sládečka, Nehasila a spol. předkládá výsledky sledování 105,5 km dlouhého úseku zahrnujícího komunikace první, druhé i třetí třídy. Výsledkem bylo 583 nalezených identifikovatelných exemplářů drobných obratlovců, z toho 132 exemplářů 28 druhů ptáků. V porovnání s tímto, nemají VTE na mortalitu ptáků téměř žádný vliv.

ZÁVĚR

Prozatímní výsledky monitoringu neprokázaly vliv větrných elektráren na mortalitu ptáků. Během provádění výzkumu byly však stanoveny další cíle, mezi nimi také sledování predačního tlaku v krajině s jeho případným vlivem na zkeslení výsledků monitoringu sražených ptáku větrnými elektrárnami.

LITERATURA

Buček A. (2007): Větrné elektrárny a venkovská krajina. Zpracováno na základě výzvy Krajského úřadu kraje Vysočina, nepublikováno.

Kočvara R., Polášek Z. (2005): Metodické doporučení pro postup hodnocení možných vlivů větrných elektráren (VTE) na ptáky a další obratlovce, 12; dostupné také na:

<http://nakale.wz.cz/Methodika.htm>

Sládeček M., Nehasil L., Kopic Š., Adamcová D., Jančařík D., Mucha T. (2008): Průzkum mortality obratlovců po srážce s vozidly na pozemních komunikacích I. až III. třídy, se zřetelem na

drobné druhy, 58; dostupné také na:

http://archiv.czweb.org/expedice/pribramsko2008/portality_2008.pdf

http://www.mzp.cz/cz/vetrne_elektrarny

ACTIVITIES OF TRADITIONAL AND WILD PROJECT ON FACULTY OF AGRONOMY OF MENDEL UNIVERSITY IN BRNO

ŘEŠENÍ PROJEKTU TRADITIONAL AND WILD NA AGRONOMICKÉ
FAKULTĚ MENDELOVY UNIVERZITY V BRNĚ

Gežová V.¹, Růžičková G.¹, Žitňáková J.²

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: veronika.gezova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this paper is to present activities of the project “Promoting traditional collection and use of wild plants to reduce social and economic disparities in Central Europe” with acronym “Traditional and wild” on MENDELU. The project is realized by nine partners from four Central European countries.

General objective of the project is to protect and share declining cultural heritage of collecting and processing useful wild plants and also to improve livelihoods of vulnerable groups, particularly the elderly, woman and the unemployed, in rural parts of Central Europe. The specific objective is to implement a pilot model, that is socially acceptable, economically-sound and environmentally viable for wild plants´ collection, processing and use. This model shall provide a sustainable source of income to vulnerable groups in selected areas in Central Europe.

The duration of the project is 36 months, from May 2011 to April 2014, therefore present paper evaluates the results gained on MENDELU after first half of the projects duration.

Key words: Central Europe, trans-national cooperation, wild plants, sustainable collection, cultural heritage

Acknowledgments: This paper arose within project „Promoting traditional collection and use of wild plants to reduce social and economic disparities in Central Europe“implemented through the CENTRAL EUROPE Programme co-financed by the ERDF, number 3CE361P4.

ÚVOD

Již od doby kamenné lidé sbírali planě rostoucí rostliny, aby jimi obohatili svůj jídelníček nebo léčili různá onemocnění. Tyto zkušenosti byly po stovky let předávány nepřetržitě z generace na generaci ústně nebo písemně a lidé s rostlinami byly ve styku téměř každý den. S rozvojem průmyslu a techniky však bylo předávání zkušeností přerušeno, lidé upustili od využití planých rostlin a mnoho vědomostí bylo zapomenuto. Ohrožené skupiny obyvatel ve střední Evropě, jako jsou senioři, ženy s dětmi nebo etnické menšiny však touto ztrátou informací přišli i o část svých příjmů, kterou v dřívějších dobách sběr rostlin představoval. Dnes, kdy lidé opět nalézají bohatství skryté v rostlinách, přichází šance pro tyto ohrožené skupiny obyvatelstva, aby si sběrem a zpracováním planých rostlin přivydělali a navýšili tak své běžné finanční příjmy. Sběr a zpracování však vyžaduje určité znalosti a dovednosti sběračů, které ač v dřívějších dobách samozřejmé, se pro některé z nich v dnešní době staly těžce dostupné. S rostoucí zátěží životního prostředí a poklesem biodiverzity by sběrači dnes navíc měli mít i povědomí o ochraně přírody a zdrojů.

Cílem tohoto příspěvku je představit projekt „Podpora sběru a zpracování tradičních, planě rostoucích rostlin pro zmírnění společenských a ekonomických nerovností ve střední Evropě“, zkráceně Traditional and wild – Tradiční využívání planých rostlin, poukázat na tématicky velice široký okruh řešených aktivit vyžadující spolupráci odborníků z mnoha vědních oblastí a zejména podtrhnout jeho význam pro Mendelovu univerzitu v Brně.

MATERIÁL A METODIKA

Mezinárodní projekt Traditional and wild je řešen v rámci programu CENTRAL EUROPE ve čtyřech zemích střední Evropy devíti projektovými partnery. Mendelova univerzita v Brně (dále jen MENDELU) je jedním ze dvou projektových partnerů z České republiky. Projekt je řešen od května roku 2011 na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Agronomické fakulty ve spolupráci s Ústavem aplikované a krajinné ekologie AF a Zahradnickou fakultou MENDELU. Hlavním cílem projektu je sběr a ochrana informací o sběru, zpracování, využití a etnobotanice planě rostoucích rostlin jako součásti kulturního dědictví regionů. Doba trvání projektu je tři roky.

Projekt je financován Evropským fondem pro regionální rozvoj (ERDF), vyžaduje spolufinancování a celkový objem prostředků činí 1 176 810 EUR. Národním koordinátorem a kontaktním místem je Ministerstvo pro místní rozvoj ČR.

Vedoucím partnerem projektu je Korvínova univerzita v Budapešti (Budapesti Corvinus Egyetem), dalšími maďarskými partnery jsou WWF WORLD WIDE FUND FOR NATURE Hungary (WWF Világ Természeti Alap Magyarország Alapítvány), Obecní úřad Kunadacs (Községi Önkormányzat Kunadacs) a nezisková organizace Regionální centrum zdrojů Jižní Zadunají s.r.o. (Dél-Dunántúli Regionális Forrásközpont Nonprofit Kft). Partnerem z Polska je Sdružení pro rozvoj a podporu vojvodství Podkarpacia „PRO CARPATHIA“ (Stowarzyszenie na Rzecz Rozwoju i Promoci

Podkarpacia „PRO CARPATHIA“). Slovinskými partnery jsou Rozvojová agentura Kozjansko (Razvojna Agencija Kozjansko) a nadace Instituce BIT Planota (Ustanova Fundacija BIT Planota). Druhým partnerem v České republice je Regionální agrární komora Jihomoravského kraje Brno.

Každý z partnerů vybral svoji cílovou oblast čímž definoval také cílovou skupinu. V cílových oblastech probíhá výzkum, dotazníková šetření a na podkladech vznikne pilotní model sběru, využití a zpracování volně rostoucích rostlin aplikovatelný v celé střední Evropě. Model, který by měl být přijatelný ze společenského a kulturního hlediska, ekonomický, plní svoji funkci s ohledem na životní prostředí zajistí dlouhodobý zdroj zisku ohroženým skupinám jako jsou ženy na mateřské dovolené, nezaměstnaní, senioři a etnické menšiny. Dále povede k zachování tradic ve sběru a zpracování planě rostoucích rostlin a sníží tím riziko ztráty těchto informací. Model, který je jedním z hlavních cílů projektu, bude vypracován do konce řešení v dubnu 2014.

V současné době partneři sbírají informace o hodnotách a vlastnostech místních druhů planě rostoucích rostlin a jejich využití, které dále šíří v podobě studií, prezentací volně stažitelných na internetu, workshopů a seminářů. V budoucnu přibudou také interaktivní databáze rostlin, komplexní výukové materiály a film. Dochází také k pravidelné výměně informací mezi partnery na meetinzích a workshopech s účastí zahraničních externích expertů.

Velký důraz je kladen na vypracování souboru principů udržitelného sběru, který bude mimo primárního účelu zajištění zachování druhů sloužit také jako podklad pro získání certifikátu pro výrobky z planě rostoucích rostlin. Dle specifických podmínek regionu a možností zpracovatelů lze uvažovat o regionálních či národních certifikátech (Regionální potravina, Produkt ekologického zemědělství) anebo např. mezinárodním certifikátu FairWild.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V průběhu první poloviny řešení projektu (17 měsíců) bylo za projektového partnera MENDELU zpracována více jak polovina relevantních klíčových aktivit. Na řešení rozpracovaných aktivit se nadále podílí jak odborníci z řad zaměstnanců MENDELU, tak externí experti na daná témata.

Popis cílové oblasti

Cílovou oblastí dle místní příslušnosti obou českých partnerů byl zvolen region jižní Morava. Obec v tomto regionu se velmi liší v závislosti na vzdálenosti od centra regionu Brna. K dosažení očekávaných výsledků studií bylo třeba vybrat v tomto regionu čtyři mikroregiony okrajového (periferního) charakteru, které sice tvoří souvislý geografický celek, ale svojí strukturou nejlépe odpovídají požadavkům projektu. Kritérii pro výběr mikroregionů byly např. nezaměstnanost, dosažené nejvyšší vzdělání a negativní migrační bilance. Ve zvolených mikroregionech jsou tyto ukazatele ovlivněny větší vzdáleností od větších měst a nedostatečnou dopravní dostupností (Vaishar, 2012).

Pro účely projektu Traditional and wild byly zvoleny periferní mikroregiony v příhraničních oblastech (Hornácko a Vranov nad Dyjí) a při vnitřních hranicích Jihomoravského kraje (Velké

Opatovice a Nedvědice). Z každé oblasti byly vybrány 2 obce s podobnou velikostí a strukturou, v rámci jejichž katastrů jsou prováděny všechny šetření a studie. V mikroregionu Hornácko byly vybrány obce Kuželov a Malá Vrbka, v mikroregionu Vranov nad Dyjí obce Lačnov a Zálesí, mikroregionu Velké Opatovice obce Uhřice a Úsobrno a v mikroregionu Nedvědice obce Křížínkov a Pernštejnské Jestřabí.

Popis cílové skupiny

Cílová skupina jsou lidé, kteří by potenciálně mohli sbírat a zpracovávat planě rostoucí rostliny, patří mezi nezaměstnané, matky na mateřské dovolené, seniory nebo etnické menšiny a žijí v cílových oblastech. Hlavním úkolem projektu je poskytnout těmto osobám základní znalosti o sběru a zpracování rostlin odvislé od lokálních a středoevropských kulturních tradic, které by sami v budoucnu mohli uplatnit a tím alespoň sezónně získávat peníze nad rámec jejich běžných příjmů.

Ve venkovských oblastech cílových mikroregionů v České republice se nevyskytují etnické menšiny, které by se výrazným způsobem odlišovali od běžného obyvatelstva (Vaishar, 2012), proto jsou cílovou skupinou projektu nezaměstnaní, matky na mateřské dovolené a senioři.

Cílové druhy rostlin

Cílové druhy planě rostoucích rostlin byly vybrány z několika hledisek. Rozhodovala jejich četnost v cílové oblasti, potenciál a tradice jejich využití a status ochrany druhu.

Na základě obecných znalostí o sběrových druzích planých rostlin v České republice byly cílovými druhy navrženy růže šípková (*Rosa canina*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a bez černý (*Sambucus nigra*). Hojnost těchto druhů v cílových regionech byla potvrzena botanickým mapováním a tradice jejich využití v dotazníkovém šetření, které bylo součástí etnobotanické studie. Žádný z těchto druhů není chráněn (Vyhláška č. 395/1992 Sb.).

Etnobotanická studie

Etnobotanika je nauka zabývající se tradičními vědomostmi lidí o rostlinách, jejich význam a využití v dané kultuře (Martin, 2004). Etnobotanická studie je výzkum zaměřený na tradiční rostliny regionu, jejich etnobotanický význam, využití a význam pro lokální společnost.

Dotazníkové šetření k etnobotanické studii v regionu jižní Moravy mělo za úkol zjistit znalosti lidí o planě rostoucích rostlinách, jejich využití a zpracování tradičními způsoby předávanými z generace na generaci. Studie byla rozdělena na část pro dospělé a část pro děti. Dílčí výsledky byly zveřejněny na webových stránkách projektu.

Etnobotanická studie bude po skončení polským partnerem zpracována pro všechny vybrané regiony střední Evropy a stane se součástí publikace o tradičním sběru planých rostlin ve střední Evropě. Tato publikace bude přeložena do pěti jazyků, volně stažitelná z internetu a v tištěné podobě distribuována na veřejných akcích.

Socio-ekonomická analýza

Socio-ekonomická analýza detailně popisuje obce v cílové oblasti od geografické charakteristiky, klimatických a přírodních podmínek, přes historii, populační charakteristiky, demografická data, až po dopravní dostupnost.

Analýza byla po zpracování prezentována na mezinárodní akci „Workshop on socio-economic analysis“ která se konala 18. září 2012 v Brně za účasti všech partnerů projektu a externích expertů. Analýza bude do konce října 2012 zpracována souhrnně pro celý region střední Evropy a publikována.

Semináře

Od listopadu 2011 do března 2012 proběhlo 6 seminářů „Tradiční využívání planých rostlin“. Na aktivitě se MENDELU podílela společně s Regionální agrární komorou Jihomoravského kraje.

Na seminářích byly kromě detailního popisu hlavních sběrových druhů otevřena také témata jako ochrana přírody, pozemkové právo, legislativa v potravinářství a kosmetice anebo odbyt a cena nasbíraných planých rostlin.

Průměrná účast na seminářích byla 80 osob. Semináře probíhaly na MENDELU, která je veřejnou univerzitou, a proto byla účast na seminářích umožněna i zájemcům nespádajícím do cílových regionů.

Lidé z navštěvující semináře jsou motivovaní sbírat rostliny ať již pro vlastní využití nebo prodej. Někteří účastníci našich seminářů již aktivně vyrábějí výrobky a využívají pomoc, kterou jim projekt nabízí, jako je poradenská činnost a částečná propagace jejich výrobků. Příkladem může být Charita sv. Anežky Otrokovice, která sice nespadá do cílového regionu, avšak svým odhodláním, aktivitou a ochotou spolupracovat přispívá k řešení některých klíčových aktivit projektu.

Semináře rozvinuly i téma potravinářské legislativy v České republice, která se ukázala být klíčovým problémem při výrobě a prodeji výrobků z planě rostoucích rostlin potravinářského charakteru. Požadavky na prostory pro přípravu, ošetření nebo zpracování potravin jsou stejné pro malovýrobce i velkovýrobce. Zahrnuje to např. použití odolných, nenásákových, omyvatelných materiálů na povrchy stěn s hladkým povrchem až do výšky odpovídající pracovním operacím nebo použití hladkých, omyvatelných, korozivzdorných materiálů povrchů přicházející do styku s potravinami (Nařízení č. 852/2004). Takové požadavky jsou pro většinu osob z cílové skupiny nad jejich finanční možnosti. Úplně jiná situace je například v Maďarsku, kde je v zákoně definován malovýrobce a to množstvím produkce (v kilogramech, litrech, kusech) za časový úsek (Géher, Gula, 2010).

Všechny prezentace ze seminářů jsou volně ke stažení z webových stránek projektu.

Výukové materiály

Výukové materiály mají za cíl přiblížit druhy planě rostoucích rostlin, které jsou po staletí sbírány a využívány v cílových regionech střední Evropy, jejich botanickou charakteristiku, vlastnosti, způsob sběru a jejich využití. Uživatelé v nich naleznou návod, jaké rostliny mohou být sbírány, jak dané rostliny rozeznat a nezaměnit je s podobnými druhy, seznámí se s metodami sběru, s pravidly a nařízením, najdou rady pro vytvoření možnosti se umístit na trhu nebo tvorbu produktů z planě rostoucích rostlin a to vše s ohledem na zachování a udržení místních tradic.

MENDELU byla partnerem zodpovědným za zpracování materiálů o planě rostoucích druzích rostlin hojně se vyskytujících v cílovém regionu s potenciálem ke sběru a zpracování. Zpracovány byly druhy růže šípková (*Rosa canina*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), bez černý (*Sambucus nigra*) a bříza bělokorá (*Betula pendula*).

Soubor výukových materiálů od všech projektových partnerů bude do konce řešení projektu přeložen do 5 cizích jazyků, publikován a volně šířen v elektronické podobě na internetu.

Investice - sušárna rostlinného materiálu

Sušárna rostlinného materiálu, která je investicí MENDELU v rámci projektu, bude umístěna na školním statku v lokalitě Lednice na Moravě. Lidé z cílové skupiny budou moci za provozní náklady sušárnu využívat k sušení rostlinného materiálu. Využívat ji však budou moci i vyučující a studenti MENDELU, jak při výuce, tak při výzkumu pro bakalářské nebo diplomové práce a studenti a žáci středních základních škol. Tyto aktivity zaručí tzv. udržitelnost investice po skončení realizace projektu.

Projekt požaduje, aby sušárna byla pronajata obci v regionu, která zajistí stabilnější spolupráci a přístup pro cílovou skupinu k sušárně. Sušárna byla zakoupena v rámci výběrového řízení. V současné době se řeší právní aspekty pronájmu sušárny obci. Procedury kolem výběru a zakoupení si vyžádaly téměř 1 rok.

Analýza udržitelného sběru

Výsledky projektu Traditional and wild přispívají k uskutečňování Strategie Evropské unie (dále jen EU) pro udržitelný rozvoj, kterým se dle Smlouvy mají řídit všechny politiky a činnosti EU. „*Spočívá v zajištění schopnosti země udržovat život v celé jeho rozmanitosti a je založen na zásadách demokracie, rovnosti žen a mužů, solidarity, právního státu a dodržování základních práv, včetně svobody a rovných příležitostí pro všechny. Má za cíl neustále zlepšovat kvalitu života a životní podmínky na zemi pro současné i budoucí generace*“ (Rada EU, 2006).

Ze Strategie EU pro udržitelný rozvoj jsou projektem plněny zejména cíle v oblasti ochrany a hospodaření s přírodními zdroji a v oblasti veřejného zdraví obyvatel.

Analýza udržitelného sběru cílových rostlin v regionech byla započata v katastru všech cílových obcí. Pro svoji obrovskou finanční i časovou náročnost však bylo třeba upustit od mapování ve

všech oblastech a pro další výzkum byl vybrán mikroregion Horňácko, kde byla zaznamenána největší aktivita a zájem cílové skupiny o spolupráci na projektu.

Certifikované produkty

Dalším výstupem projektu je alespoň jeden produkt z volně rostoucích rostlin z každého regionu střední Evropy. Výrobky budou mít společný design obalů s logem projektu Traditional and wild ve všech zemích a navíc by tyto produkty měly v rámci projektu být certifikovány lokálním nebo nadnárodním certifikátem. Jednou z možností je mezinárodní certifikát FairWild Standard.

Certifikát FairWild podporuje udržitelný a spravedlivý management sběru planě rostoucích rostlin a produktů z nich. Certifikát spočívá v dodržování FairWild Standard principů, kterými jsou:

- Zachování zdrojů planě rostoucích rostlin.
- Předcházení negativním dopadům na životní prostředí.
- Dodržování zákonů, nařízení a vyhlášek .
- Respektování obyčejových práv a sdílení výhod.
- Podpora spravedlivých smluvních vztahů mezi podnikateli a sběrači.
- Omezení účasti dětí na aktivitách při sběru planých rostlin.
- Zajištění výhod pro sběrače a jejich komunity.
- Zajištění spravedlivých pracovních podmínek pro všechny pracovníky v rámci všech činností souvisejících se sběrem planých rostlin.
- Uplatňování odpovědných správních postupů.
- Uplatnění odpovědných obchodních praktik.
- Podpora požadavků FairWild odběratelů.

Dle podílu složek certifikovaného rostlinného materiálu pak výrobek může být označen štítkem „Obsahuje FairWild složku“, pokud je FairWild ingredience v celkovém obsahu do 20 % anebo logem FairWild®, pokud je certifikovaných složek nad 20 % celkového obsahu. Certifikát je platný jeden rok a poté musí být proveden audit FairWild inspektorem, který rozhodne o vydání nového certifikátu (FairWild Foundation, 2009).

Publicita

Velmi významnou aktivitou je povinná publicita projektu jejíž nedílnou součástí je i zviditelnění Agronomické fakulty MENDELU v médiích. Za 17 měsíců řešení projektu bylo zaznamenáno:

- 4 vystoupení v televizi (ČT1, ČT24, regionální TV).
- 5 vystoupení v radiu (Český rozhlas, Český rozhlas Brno, Český rozhlas Vysočina).

MENDELNET 2012

- 17 článků v novinách (Lidové noviny, Právo, Mladá Fronta DNES aj.).
- 12 online článků na internetu (idnes.cz, ceskenoviny.cz, denik.cz aj.).

Propagace je řešena také na všech dokumentech a propagačních předmětech. V záhlaví pozvánek, prezenčních listin, zápisů a prezentací jsou uvedena loga programu CENTRAL EUROPE, projektu Traditional and wild a věta o spolufinancování: „Tento projekt je realizován v rámci programu CENTRAL EUROPE a je spolufinancován z Evropského fondu pro regionální rozvoj (ERDF)“.

Obr. 1 Logo programu CENTRAL EUROPE, projektu Traditional and wild a ERDF



Na posteru, který je vystaven na všech akcích pořádaných projektem se vyskytují všechna loga projektových partnerů a poskytovatele. Pokud není poster vystaven na žádné z akcí, je umístěn viditelně na pracovišti projektového týmu (Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství).

Letáky se základními informacemi o projektu jsou distribuovány na školeních, na farmářských trzích a veletrzích. Projekt byl prezentován na Floře Olomouc v srpnu 2011, srpnu 2012, na TechAgru v dubnu 2012 a MendelAgru v červnu 2012.

Na webu Mendelovy univerzity v Brně i webu Agronomické fakulty MENDELU je umístěn banner s logem projektu a programu s prolinkem na českou verzi stránek projektu Traditional and wild (www.traditionalandwild.eu/cz). Na stránkách je banner s možností být fanouškem Traditional and wild Česká republika na Facebooku (<https://www.facebook.com/traditionalandwild.cz>). Na webu i na Facebooku jsou umístěny věty o spolufinancování ERDF.

Na seminářích pro cílovou skupinu byly viditelně umístěny vlajky ČR a EU, poster a letáky. Na všech prezentacích použitých na seminářích je logo projektu, programu i věta o spolufinancování ERDF, tyto prezentace lze stáhnout z projektového webu.

ZÁVĚR

Věcné aktivity projektu se na MENDELU daří plnit úspěšně a kvalitně. V některých případech došlo ke zpoždění realizace některých aktivit z mnoha důvodů. Internacionalizace je jedním z hlavních témat dlouhodobého záměru MENDELU. Řešení mezinárodních projektů a eliminace problémů při realizaci aktivit by mělo být prioritou podporovanou na jednotlivých pracovištích univerzity. Začlenění do mezinárodních týmů je prestižní, zvyšuje kredit univerzity a umožňuje získávání dalších projektů na mezinárodní úrovni. Na řešení rozpracovaných aktivit se i v druhé polovině řešení projektu budou podílet odborníci z řad zaměstnanců MENDELU i externí experti.

LITERATURA

Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin [online]. Ministerstvo zemědělství, ©2009-2011 [cit. 2012-10-04]. Dostupné z:

http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/predpisy-es-cu/Legislativa-EU_hygienicky-balicek_narizeni-2004-852.html

FairWild Foundation. FairWild Standard in practice: certification and more [online]. ©2009 [cit. 2012-10-02]. Dostupné z: <http://www.fairwild.org/standard>

Géher D.J., Gula K. (2010): Tájékoztató a kistermelők élelmiszer- löállítással kapcsolatos lehetőségeiről. Vidékfejlesztési Minisztérium (Ministerstvo pro rozvoj venkova Maďarsko), Budapešť. 31 pp.

Martin G.J. (2004): Ethnobotany: A Methods Manual. Earthscan, London, 268 pp. ISBN 1-84407-084-0

Vyhláška č. 395/1992 Sb. ministerstva životního prostředí České republiky ze dne 11. června 1992, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny [online]. MŽP, ©2008-2012 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/d79c09c54250df0dc1256e8900296e32/7698185C778DA46FC125654B0044DDBC/>

Rada Evropské Unie (2006): Obnovená strategie udržitelného rozvoje Evropské unie [online]. CENIA, ©2012 [cit. 2012-10-02]. Dostupné z: [http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/\\$pid/MZPMSFHD4PB3](http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/$pid/MZPMSFHD4PB3)

Vaishar A. (2012): South Moravan Region. Nepublikováno.

TOURISM POTENTIAL AND THE WAY TO ACHIVE SUCCESS ALONG THE DANUBE REGION BASED ON THE DATOURWAY PROJECT

Talabos I.

Department of Tourism, College of Commerce, Catering and Tourism, Budapest Business School, 1054 Budapest, Alkotmany str. 9-11 Hungary

E-mail: talabos.istvan@kvifk.bgf.hu

ABSTRACT

The objective of the paper is to highlight the tourism potential of the Danube region and the findings/conclusions of the Datourway project, that is the first tourism strategy prepared specially for the Danube.

There were 7 countries (Slovakia, Hungary, Romania, Bulgaria, Serbia, Croatia and Italy) participating in the project in the period of 2009-2012 and all 7 countries agreed on a common strategy, i.e. how the tourism could be developed along the Danube considering the tourism potential of each country.

The paper shows the results and gives answer how the different (economically and organisationally) regions can cooperate with each other to achieve their common goal. At the same time also will be highlighted how and why the Datourway project could and will contribute to the sustainable development along the Danube.

The paper is highlighting the requirements of tourism development, how the tourism potential might be used considering the present expectations of the visitors and tourists.

Key words: Danube, attraction, development of destination, image, brand, sustainability, tourism potential

Acknowledgments: The author expresses his acknowledgment to all participants but wishes to highlight the lead partner of the project i.e. VÁTI Hungarian Nonprofit Ltd. Company for Regional Development and Town Planning and its main partner Scientific Association for Spatial Development that worked out the strategy and on behalf of which the author has been participating in the process.

INTRODUCTION

Tourism, specially nowadays needs sustainable solutions ie. development that is contributing to the economy. Over the past six decades, tourism has experienced continued expansion and diversification becoming one of the largest and fastest growing economic sectors in the world.

As a matter of fact despite of the world wide economical crisis tourism after a slight decrease contiues to grow and went back to the foreseen tendency, reaching 940 million tourist arrival in 2010.

Appr. 50 % of the tourist arrivals and international tourist receipts is realized in Europe. Within Europe in the European Union tourism is playing a very important role because there are 1.8 million enterprises having relationship to the tourism, providing 9.7 working places and contributing indirectly 10 % the GDP.

The Danube provides 2,800 km long water route in Europe going through 10 countries to reach the Black Sea. In the last years there were several European projects with the aim of developing the Danube Region (Europeanization of the Danube Region: The Blue Ribbon Project, European Danube Strategy, Donauregionen+ and Donauregionen++) but the Datourway project is the first with the aim to develop tourism.

The Datourway projects one of main achievement is that the concept of tourism is interpreted in a broad sense. It is regarded as a complex activity either at short or long term, oriented towards recreation, resort and leisure, cultural enrichment, enjoyment of natural beauty as well as physical exercise.

At the same time the Datourway project shows a way for effective transnational cooperation of countries engaged in developing tourism along the Danube and using Danube as a natural attraction meantime highlighting various exesting not yet used touristic potential of the river and its neighborhood.

The main aims of the project were:

- setting up a GIS based information system
- to integrate national, regional and local statistical data
- to carry out national targeted analyses and also to synthesize evaluating the findings
- to carry out pilot projects (showing best practices)
- to collect information and complete a database of attractions

The Datourway project is an outstanding example of cooperation of the participating 7 countries and the paper is intended to show how the tourism potential of the Danube region along the middle and southern region can be utilized in the future using the tourism potential.

The paper is showing that how the presenting and showing that the participating countriesThe DATOURWAY project presents an outstanding example of transnational cooperation committed to the development of tourism along and on the middle and south-eastern section of the Danube River, while paying particular attention to the protection and enhancement of the natural and cultural resources linked to this area of the great European waterway. It is not the aim of the projects to create new institutional structures. The intended transnational co-operation shall be based on common agreements on the working structure without institutional settings. In DATOURWAY the principle is to reach a transnational agreement on a common tourism strategy and integration of policies and pilot projects into national, regional and local as well as European plans and policies.

MATERIAL AND METHODS

The study is prepared partly with the help of the internet and also with the help of those documents and workmaterials, presentations that were prepared during the Datourway project. At the same time research is carried out to investigate the tourism potential. There is a special desk research is carried out in order to outline the issues that are considered developing tourism.

TOURISM – AIM AND ITS CONTRIBUTION TO THE ECONOMY

Tourism has several definitions. There are several tourism experts, scientists giving definition for tourism: Kaspar, Hunziker, Krapp, Freyer, Cohen, Krippendorf, Pernyez etc. The definitions given by the experts, aim to cover all fields, and forms of tourism therefore the outcome somehow philosophical.

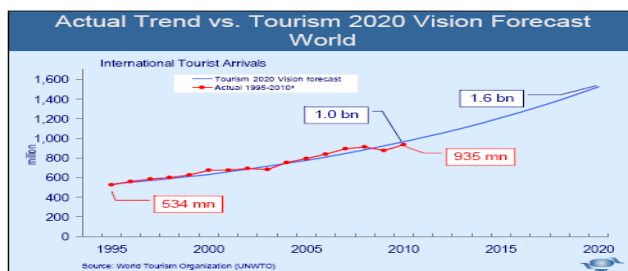
According to Pompl (2000 p. 17) Tourism Society gives the following definition of tourism: "Tourism is deemed to include any activity concerned with the temporary short-term movement of people to destinations outside the places where they normally live and work, and their stay at these destinations."

Tourism is a world wide industry playing very important role in the economy having connection to the several fields of the economy. Its importance is clear and understandable because receiving a tourist we need 8 workplaces. The tourism system is complex at the same time. The tourism system is complex because there are 7 industrial fields which is the base of tourism states the UNWTO according to Babu-Mishra-Parida (2008, p. 44.) and the US Standard Industrial Classification System lists 35 different industrial components (Roehl 1998) mentions Babu-Mishra-Parida (2008, p. 44)

The A United Nations World Tourism Organisation (UNWTO) in 2010 showed 935 million tourist arrivals. It is 22 million more than the figure of 2008 (913 million) just before the crisis when in 2009 the tourism suffered a decrease (877 million tourist arrivals). This figure of 2010 already shows that tourism is going back to the level before the economic crisis and continues to grow, showing the UNWTO tendency to reach 1.6 billion tourist arrivals by 2020 as shown on Figure No.1.

Trend of tourism

Figure No.1



34

Source: John G. C. Kester (2011 UNWTO Madrid) p.34.

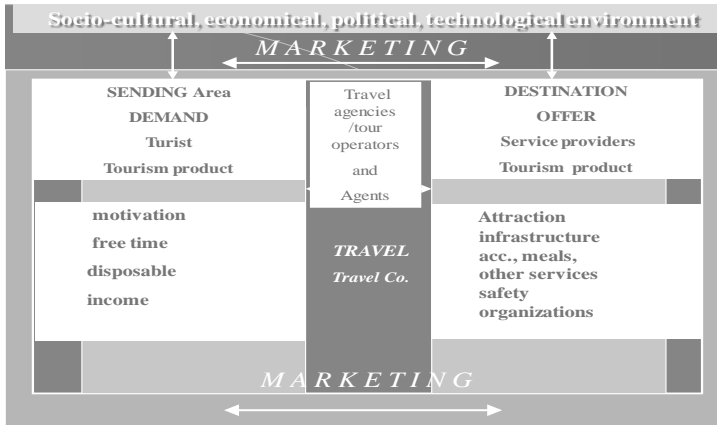
The tourism as of this aims to satisfies the participants i.e. tourist creating value for them providing quality service. The touristic product is complex containing different services. The services are fitting to each other and they are never on its own but in the “space” where the infrastructure surrounds. As of this the product itself is part/element of the destination to which the tourist would like to travel. It means that the touristic product is dependent on the local possibilities that makes the destination attractive. Therefore the attraction is the key and is the start of the tourism but there but the service providers and the environment – hotels, restaurants, transportation companies, travel agencies, tour operators etc. – the complex infrastructure is also required.

The attraction means on local, regional and country level the potential of tourism. Not the attractions mean the potential only but accessibility and the entire infrastructure must be evaluated too.

The system of tourism and success of touristic service providers based on the attraction and also how is it communicated as Figure 2 shows it.

The complex system of tourism

Figure No. 2.



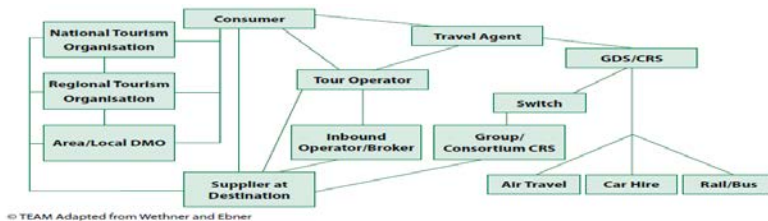
Source: prepared by the author based on Pompl 1, 2000 p. 21 p.60 and Bridging¹ 2010, p. 4

It is obvious that tourism is a complex system with a number of participants and an intensive marketing activity, communication is a key factor of this industry having a huge competition. In this environment it is not surprising that quality plays important role in the success because the tourists perceive quality.

The participants of the system are shown on Figure No.3 by UNWTO.

The travel system

Figure No. 3



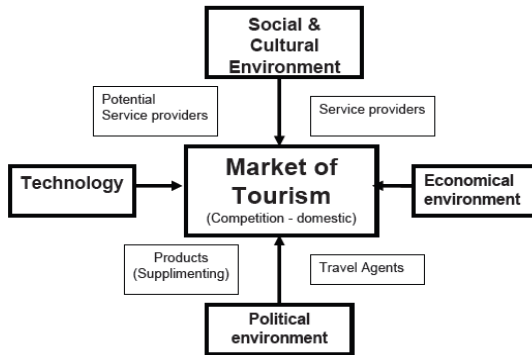
Source: UNWTO 2007 pp 73

¹ The author is the owner of Bridging having prepared a number of tourism related research and strategy for region, small region

The situation of the competition within the tourism industry can be explained by the model of Pompl based on the Porter model (Figure No.4).

Market of tourism based on the Porter model

Figure No. 4



Source: Pompl 1 (2000 pp 60)

In the 1970s the companies more and more focused on reaching the customers not by the product directly but communicating to them a certain image. It means that the customer receives a lots of information that changed the customer (Fabricius 2002).

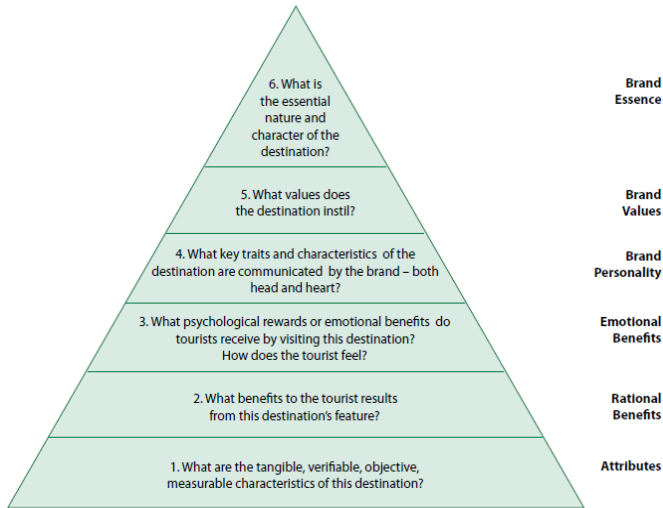
The result is that the customer and as of this the tourist aims to receive not the product directly but aims to have and receive experience. The new tourist aims to have good experience that he/she will remember for a long time so a kind of *brand experience* must be communicated because this makes the customer to return.

The geographical place chosen/visited by the tourists has special, individual historical cultural characteristics meaning the experience (Aubert 2006 after TH Bieger 1997 pp 369). The key is to provide i.e. communicate the information with outlining what is the Unique Selling Proposition, what means the unique experience.

In this sense the key is to built up a brand and image for the destination. How it should be built up explained by the Brand pyramid (Figure No. 5.)

The brand pyramid

Figure No. 5.



Source: UNWTO 2007 pp 49

Today in the global market of tourism in the decision making process the communication and the cooperation of the participants is the key element. Only those regions, destinations can be successful that are able to define and are aware of their own attractions and are able to built up image and brand for themselves. This is not a question in those countries where tourism is successful like Austria, Switzerland, Great Britain etc.(Hoffmann-Semsei 2012)

RESULTS AND DISCUSSION

The strategy defines that for the Danube in all countries developing a brand should be an overall vision carrying the message, that the Danube is an attractive and unique destination. Creating a Danube “brand” is the tool to achieve economic development of the region too.

Considering all the above and the fact that the Danube region can be attractive by connecting tourism and culture by defining a quality riverside brand based on the heritage of Danube and identity the strategy defined that is accepted by all participating countries: .

„ Attractive and unique Danube region (by the connection of tourism and the Danube culture)”

„In the Danube countries of the DATOURWAY project area there are ample potentials for short

term as well as week-long or even longer tourism. These *potentials are not fully exploited, at some places they are not used* at all, although all national governments and the majority of local governments are eager to attract visitors and benefit from tourist activities.

In the DATOURWAY region of 6 countries there are altogether 384 tourist accommodations.

Nearly 47% is in Romania, 40 % in Hungary. The rest of 13 % is share by the other four

COUNTRIES IN MORE OR LESS ACCORDANCE WITH THE TERRITORIAL DISTRIBUTION.” (Datourway Strategy 2012)

In order to achieve the brand touristic products must be identified based on attraction, infrastructure, services and transportation. The attraction is the main element that creates motivation that makes the tourists to visit the places of interest.

Nowdays, in order to achieve success that is tourists visit the places and spend overnights there, the role of internet is obvious. It means that the places of interest must make the information available about themselves in order to motivate the potential visitors to come spend overnights, trying and having good experience.

CONCLUSIONS

In DATOURWAY the principle is to reach a transnational agreement on a common tourism strategy and integration of policies and pilot projects into national, regional and local as well as European plans and policies.

It was not and it is not the aim of the projects to create new institutional structures. The intended transnational co-operation shall be based on common agreements on the working structure without institutional settings. In DATOURWAY the principle is to reach a transnational agreement on a common tourism strategy and integration of policies and pilot projects into national, regional and local as well as European plans and policies.

There are pilot projects defined that have all the information in order to start the project as a tourism development.

The final document - DATOURWAY Strategy: Transnational Strategy for the Sustainable territorial Development of the Danube Area with special regard to Tourism – focuses on developing destination and attractions as it is required for the future economic development. Therefore it is important to mention that together with collecting the data Investment Guide Book was also prepared giving suggestions. The main outcome of the project is finding the common way for development in the heterogenous region.

The future of the Danube Region tourism means that the aim of the strategy defined must be systematically carried out. There is no new institutional set up suggested but the existing one must be used in an effective way. In those countries where the tourism is not managed by a destination organization it is suggested to develop and established. In this sense within the Danube region and

the participating countries Hungary can be an example of the “Good Practices” because there is a tourism destination management both on local and regional level. These Tourism Destination Management Organizations help in the clusterization and in the branding process

REFERENCES

- Aubert Antal Desztináció-építés és menedzsment (Building and managing destination)
Pécs 2000
- Babu S. Sutteeshna – Mishra sitikantha – Parida Bivraj Bhusan
Tourism Development Revisited
Concepts, issues and paradigms
Delhi, 2008
- Datourway Strategy (2011)
VATI Hungarian Nonprofit Ltd. Company for Regional Development and Town Planning (lead partner of Datourway project)
Scientific Association for Spatial Development (main partner of the lead partner)
Hoffmann Henrik- Semsei Sándor
- Javaslat a turizmus törvény tervezetéhez (Suggestion to be considered to the tourism law)
Comitatus 2012 July-August p. 3-15
- John G. C. Kester 2011 UNWTO Madrid
UNWTO Tourism Highlights 2011 edition
- Pompl Wilhelm Tourism management 1 (Hungarian translation) 2000, Budapest
- Tourism policy and public-private cooperation (Seville Declaration) European Economic and Social Committee 2004
- Gabor Fabricius
Az image-en túl az élmény világa! (Beyond the image – World of the experience)
Marketing Menedzsment 2002/1 p. 73-78
- Internet**
- www.datourway.eu
www.unwto.org/facts
www.tfte.hu

ANALYSIS OF PUBLIC PLACES IN RURAL SETTLEMENT

ANALÝZY VEREJNÝCH PRIESTOROV NA VIDIEKU

Jančovičová M., Titková D., Štěpánková R.

Department of Garden and Landscape Architecture, Horticulture and Landscape Engineering Faculty, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, Slovak Republic

E-mail: monika.jancovicova@gmail.com, dominika.titkova@gmail.com

ABSTRACT

This article is focused on evaluation of public places, the actual condition. We elaborate one aspect – social evaluation of a place using two Methods of Šilhankova: Behavior mapping and Counting of movement of pedestrians.

We applied the Behavior mapping Method of Šilhankova to selected area – public place in two villages and our purpose was to evaluate and compare the results. Due to some differences and similarities, two villages were selected – Hruboňovo, Podhorany. Observation was done in a sunny day in August. We were inscribing obtained data into in to prepared tables. We evaluated the gained information and we got clear image about frequency of the place, activities of inhabitants there, more and less used spaces. We were expecting more children, because of the summer holidays.

Methods of Šilhankova - Behavior mapping and Counting of movement of pedestrians show higher activity in Podhorany. Also Activities of people are in higher range. Due to that observation we may say, that during the day the places are mostly used for a transport of inhabitants (pedestrians/by car). Those places are most frequented in the morning and at the lunch time (transport).

It is necessary to apply the observation also in weekend days, in different seasons to have complex picture of behavior and movement in all conditions. This methods help to understand the social parameter of public places.

Key words: rural settlement, public place, methods of creation of public space

Acknowledgments: The article was created with the support of academic grant agency VEGA as a part of project VEGA 1/0769/12 - Creation of sustainable public spaces of rural settlements using modern methods.

ÚVOD

Verejné priestory sú v súčasnosti témou veľmi diskutovanou. Venujú sa im tak odborníci z rôznych oblastí výskumu, ako aj laická verejnosť, ktorej sa konkrétne verejné priestory buď priamo týkajú, alebo ktorá má v záujme krajšie prostredie okolo nás. Všetkých. Pretože verejné priestory majú byť verejné. Patria verejnosti.

Áké sú teda požiadavky jednotlivých ľudí na ne? Máme nejaké spoločné? Odlišné? Podľa čoho si ľudia vyberajú trasu, kadiaľ pôjdu? Áké verejné priestory najčastejšie navštevujú? Ákými rôznymi spôsobmi sa presúvajú z miesta na miesto? Áj to sú otázky, ktoré sa v súvislosti s verejnými priestormi vynárajú a ktoré sa nám na základe výskumu čiastočne podarilo zodpovedať.

Obce, miesta a všetky verejné priestory sú navzájom prepojené. Komunikácie v sídle spájajú strategické body a sídla navzájom tak, aby zabezpečili ich vzťahy, komunikáciu medzi nimi, aby tvorili živý organizmus. Cez ne turista vníma systém sídla a návštevník si utvorí obraz aj o jeho obyvateľoch. Ákú úlohu plnia v každodennom živote obyvateľov? Sústreď sa v nich len transport, alebo slúžia aj pre iné aktivity?

Verejným priestorom, ich úprave a využitíu v súčasnej dobe je nutné sa venovať. Existujú metodiky a postupy na ich hodnotenie, ktoré poukazujú na jednotlivé skúmané aspekty. Tak, ako je každé miesto špecifické a má svojho Genia loci, tak má aj určité spoločné črty s inými verejnými priestormi a dá sa istým spôsobom zhodnotiť tak, aby sa v konečnom dôsledku poukázalo na nie markantnú prestavbu, ale len na jeho dotvorenie, doplnenie tak, aby plnohodnotne plnilo svoju funkciu.

Ikonou v oblasti verejných priestorov je Jan Gehl, ktorý sa tejto problematike venuje dlhý čas. Výsledky práce publikuje (napr. *Life between buildings* (1987), *New City Spaces* (2000), *Public Spaces*, *Public Life* (2004), *Cities for People* (2010) a pod.). Aktivity ľudí v priestore delí na nevyhnutné, voliteľné a spoločenské. Kritériom v tomto prípade je, nakoľko je zapojenie ľudí vyžadované, resp. či ľudia vykonávajú tieto aktivity len vtedy, keď chcú a umožňuje im to ich voľný čas a miesto, prípadne prítomnosť iných ľudí vo verejných priestoroch. Svoju rolu zohrávajú aj vonkajšie parametre, ktoré priamo rôznou mierou ovplyvňujú kategórie vykonávaných aktivít.

V nadväznosti na jeho prácu sa objavujú metodiky ako skúmanie pohybu peších a mapovanie správania užívateľov, ktoré sa spájajú s výskumom Šilhánkovej (1996 a 2008). Tie majú pomôcť zhodnotiť aktuálny stav verejného priestoru vzhľadom na občana, ktorý sa v ňom pohybuje, odrážajú najčastejšiu smer jeho pohybu, aktivity, ktoré tu vykonáva. Pomocou výsledkov by sme mali potom určiť, ako podporiť tieto aktivity, či zamedziť nežiaducim aktivitám, zistiť, či a áké sú konflikty medzi chodcami a vozidlami, áké obmedzenia sú v priestore a podobne.

Podľa Lipovskej (2011) sa prvé časti metodík odlišujú v charaktere hodnotenia fyzického stavu verejných priestranstiev. V metodike Šilhánková (1996) sú verejné priestranstvá hodnotené na základe typu, funkcie a polohy v rámci sídla. Aktivity sú analyzované vzhľadom na funkciu,

sociálny charakter a vzhľadom na charakter verejného priestranstva. V Gehlovej metodike (2004) je kladený väčší dôraz na spôsob prepravy, ako je využívané verejné priestranstvo chodcami, cyklistami a autami a ich vybavenosť mobilizáciou, najmä prvkami na sedenie.

Podľa Lipovskej (2011) metodika Šilhánkovej (1996) poskytuje informácie, ktoré pomáhajú pri oživení verejného priestranstva. Analýzy metodikou Gehl (2004) sú orientované najmä na možnosti strávenia voľného času na verejných priestranstvách, teda aj analýzy fyzického stavu verejného priestranstva sú zamerané na sedacie prvky. Tieto sú dôležité pri zvýšení spoločenského významu verejného priestranstva. Obidve metodiky využívajú okrem formulárov na zapisovanie aj mapy, kde je zaznačovaný smer pohybu chodcov a ich najväčší výskyt.

Vekové kategórie sú u Šilhánkovej (1996) i Gehla (2004). Šilhánková definuje aktivity ako státie, sedenie a pod., u Gehla (2004) aktivity nie sú uvedené. Zber dát by podľa Šilhánkovej (1996) mal prebehnúť aspoň v dvoch dňoch, pričom jeden by mal byť pracovný a druhý víkendový.

Ďalšie mená autoriek spojených s verejnými priestormi sú Miková, Pauliniová, Paulíková (2010), ktoré svoju aktivitu orientujú na problematiku zapojenia občana do plánovacích procesov verejných priestranstiev, a teda participáciu.

MATERIÁL A METODIKA

Aby sme poznali, či je verejný priestor skutočne úspešný, musíme skúmať množstvo ľudí, ktorí sa tu v rôznych denných časoch nachádzajú a aktivity, ktoré sa tu odohrávajú. Z Gehlovho poňatia priestoru vyplýva, že čím je lepšie fyzické prostredie mesta [obce], tým sú väčšie predpoklady pre užívanie verejných priestorov ľuďmi a tým aj mesto, resp. verejný priestor lepšie plní svoju spoločenskú úlohu. Otázkou potom je, ako zistiť, koľko ľudí sa vo verejných priestoroch vyskytuje. Americkí architekti vedení W.H. Whyte-om vyvinuli v sedemdesiatych rokoch 20. storočia mapovanie správania a stopovanie (trecking), ktoré sa v polovici deväťdesiatych rokov pokúšali transformovať pre využitie v podmienkach Českej republiky Tilley, Šilhánková, Navrátilová (1996). Na základe tejto práce vznikli dve metódy vhodné pre použitie v našich podmienkach: sčítanie pohybu peších a mapovanie správania (Šilhánková 2008).

Sčítanie pohybu peších je technika terénneho zberu informácií, pri ktorej sa údaje o počte osôb, ktoré prejdú sledovaným územím, zaznamenávajú do sčítacích formulárov. Technika sčítania skúma (Šilhánková 2008):

1. Počet ľudí nachádzajúcich sa na stanovenom mieste. Sčítaním sa zisťuje "zahustenosť" priestoru ľuďmi.

2. Konflikty medzi chodcami a vozidlami. Sčítanie umožňuje pochopiť vzťahy medzi chodcami a vozidlami zvlášť v miestach, kde sa chodci snažia prejsť komunikáciu, aj keď pre to nie sú podmienky.

Mapovanie správania je technika terénneho zberu informácií, pri ktorom výskumník na základe vlastného pozorovania značí údaje o správaní ľudí do pripravených formulárov. Technika mapovania správania skúma (Šilhánková 2008):

1. Činnosti ľudí vo verejných priestoroch

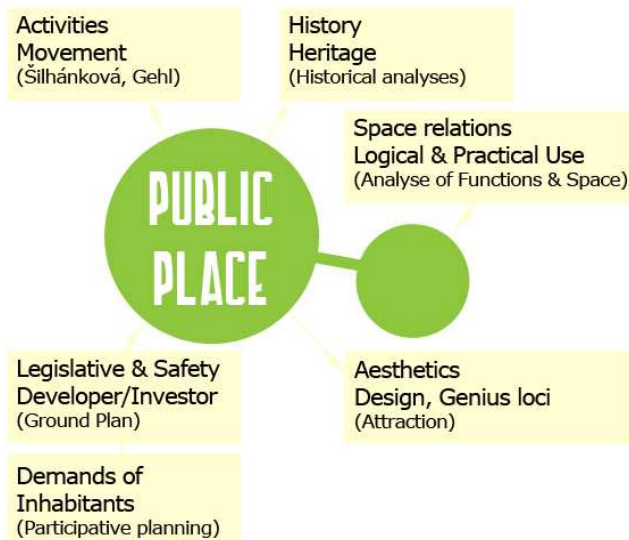
Analýzou činností možno zistiť, akými ľudskými činnosťami tento priestor žije a aké podmienky potrebuje k tomu, aby činnosti, ktoré slúžia k oživeniu priestoru, mohli byť ďalej rozvíjané. Na základe výsledkov sa jednak určí druh mestského mobiliáru, ktorým by mal byť priestor vybavený (lavičky, odpadkové koše, hodiny, pútače atď.), jednak sa určí jeho rozmiestnenie, vzhľadom k ľudským činnostiam a potrebám. Rovnako sa sleduje, či je optimálna šírka chodníkov vzhľadom k množstvu ľudí, ktorí tu prechádzajú a činnostiam, ktoré vykonávajú.

2. Využívané a nevyužívané časti verejného priestoru

Analýza priestoru z hľadiska jeho využitia ľuďmi zisťuje, ktoré miesta v skúmanom priestore patria medzi príťažlivé a ľuďmi navštevované a ktoré, naopak, sú prázdne a neobľúbené. Na základe analýzy výsledkov môžeme určiť miesta, ktoré je potrebné vybaviť tak, aby sa stali pre ľudí opäť príťažlivé.

Hoci tieto metódy sa zdajú byť vhodnejšie pre námestia, pešie zóny a verejné priestory bodového charakteru, rozhodli sme sa ich aplikovať aj na vybrané úseky komunikácií, aby sme zistili, ako ich hodnotenie dopadne. Formuláre týchto metód sme pre naše pozorovanie upravili. Doplnili o informáciu o počasí, parkujúcich a prechádzajúcich autách.

Obrázok 1: Schéma komplexného pohľadu na priestor (Jančovičová, Titková, 2012)



Analýzy podľa metodiky Šilhánkovej, či Gehla tvoria len jednu časť, jeden pohľad na dané územie. Bez ďalších analýz by informácie neboli postačujúce a splňali by len jednu časť požiadaviek.

Ku komplexnému pohľadu na riešené územie je potreba zohľadniť aj historické súvislosti a funkčno- priestorovú analýzu, ale aj požiadavky obyvateľov a developera. História danej obce môže ponúknuť nové možnosti v spracovaní a využití priestoru. Na základe historických máp, podkladov, dotazníkov a rozhovorov so staršími občanmi je možné dopracovať sa k novým informáciám, ktoré môžu poslúžiť ako oporný bod pri tvorbe alebo dotvorení riešeného územia. Nezanedbateľnou súčasťou je aj funkčno-priestorová analýza, ktorá poskytuje informácie o vzťahoch a nadväznosti so širším okolím, ako aj praktického a logického využitia územia.

Na základe pozorovania a hodnotenia verejných priestranstiev s prihliadnutím na ich potenciál môžeme kategorizovať nasledovné:

- prechodové
- prechodové s potenciálom zotrvania
- stretávacie
 - rekreačné
 - športové

- kultúrne
- so špecifickou funkciou
- účelovo-prevádzkové
- s historickým významom a potenciálom jeho obnovenia

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pozorovanie vybraných verejných priestorov vo zvolených obciach prebehlo 7. augusta 2012. Jednotný termín pozorovania sme volili, aby zistenia z oboch obcí boli z hľadiska podmienok čo možno najviac porovnateľné. Zvolenými obcami sú Hruboňovo a Podhorany. V nich sme metodiku aplikovali na úseky komunikácií. Teplota ovzdušia sa v priebehu pozorovania pohybovala v rozmedzí 17°C – 27°C.

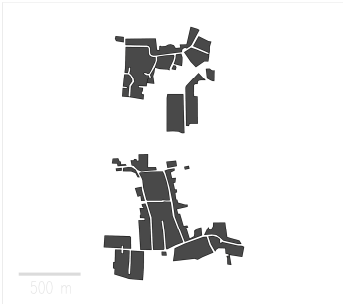
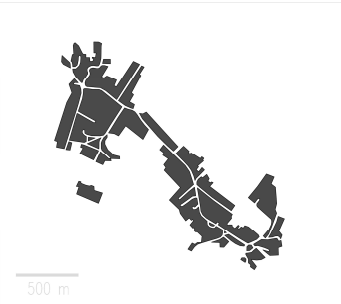
Obrázok 2 Hruboňovo¹



Obrázok 3 Podhorany¹

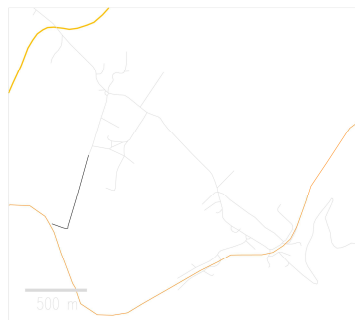


¹ Zdroj: www.maps.google.sk

	Hruboňovo	Podhorany
základné	Samosprávny kraj: Nitriansky Okres: Nitra Počet obyvateľov: 494 Rozloha: 1155 ha Prvá písomná zmienka: v roku 1247	Samosprávny kraj: Nitriansky Okres: Nitra Počet obyvateľov: 1110 Rozloha: 1770 ha Prvá písomná zmienka: v roku 1113
pôdorys obce	 <p>Ide o lineárno zložitú sídelnú sústavu na dolnom toku Perkovského potoka. Možno vidieť čtyri sídla ulicového typu viazaného na vodný tok.</p>	 <p>V obciach bola potočná radová zástavba (Mechenice) a hromadná zástavba (Sokolníky).</p>

²Zdroj: <http://www.e-obce.sk/obec/podhorany-nitra/podhorany.html>, <http://www.e-obce.sk/obec/hrubonovo/hrubonovo.html>, <http://www.podhorany.sk/>, [cit. 2012-08-09].

komunikácie



prírodné

podmienky

Hruboňovo leží v západnej časti Nitrianskej sprašovej pahorkatiny na dolnom toku Perkovského potoka. Nadmorská výška chotára obce je 157 – 248 m n.m. Odlesnený povrch chotára na pahorkatine s pozdĺžnymi chrbtami, rozčlenenými úvalmi, tvoria mladotret'ohorné usadeniny pokryté sprašou. Má hnedozemné pôdy.

Podhorany ležia pri severozápadnom úpätí pohoria Tríbeč na náplavových kuželoch ľavostranných prítokov Nitry. Nadmorská výška chotára obce je 146 – 617 m n. m. Chotár na aluviálnej rovine tvoria sprašové a nivné uloženiny, na vrchovine a hornatine druhohorné horniny. Sčasti je zalesnený teplomilnými dúbavami a bučinami. Má rendziny, hnedozemné a nivné pôdy.

pamiatky

Sulany
Súsošie kalvárie barokové z roku 1772.
Zvonica drevená z konca 18. storočia.

Výčapky
Kaštieľ barokovo-klasicistický z 2. polovice 18. storočia.

Mechenice
Kostol rímskokatolícky, románsky z 12. storočia, rozšírený v roku 1794.

Sokolníky
Kostol rímskokatolícky, neskorobarokový z roku 1758, klasicisticky upravený v 2. polovici 19. storočia.
Dve kúrie klasicistické zo začiatku 19. storočia.

erb obce



Červený štít, v ktorom medzi strieborným /bielym/ čerieslom a lemešom zo zelenej pažite vyrastajú tri zlaté /žlté/ pšeničné klasy. V strede štítu sa vznáša nápadne veľký strieborný /biely/ stravec hrozna so zelenou stopkou a viničným listom.



Zo spodného okraja modrého štítu erb obce Podhorany vyrastá zlatou, perlami a rubínmi zdobený korunou obopätý kríž, vľavo sprevádzaný zlatým plamenným mečom so striebornou priečkou.

Kríž s korunou symbolizuje sv. Helenu a plamenný meč symbolizuje sv. Michala

občianska

vybavenosť

Predajňa potravinárskeho tovaru

Pohostinské odbytové stredisko

Futbalové ihrisko

Pošta

Verejný vodovod

Verejná kanalizácia

Kanalizačná sieť pripojená na ČOV

Rozvodná sieť plynu

Komunálny odpad

Využívaný komunálny odpad

Zneškodňovaný komunálny odpad

Materská škola

Predajňa potravinárskeho tovaru

Pohostinské odbytové stredisko

Futbalové ihrisko

Knížnica

Pošta

Verejný vodovod

Rozvodná sieť plynu

Komunálny odpad

Využívaný komunálny odpad

Zneškodňovaný komunálny odpad

Vlaková zastávka

Základná škola

Materská škola

spoločné

znaky

Obec Hruboňovo vznikla v roku 1960 zlúčením obcí Sulany a Výčapky.

Prameň Perkovského potoka vyviera severne od obce Horné Štitáre, v pramennej oblasti preteká Kobylou dolinou, napája vodné nádrže Horné Štitáre a Bodok, Horné Obdokovce, preteká územím takzvaného Čermianskeho močiara a vzápätí napája vodnú nádrž Hruboňovo.

Obec Podhorany vznikla v roku 1960 zlúčením obcí Bádice, Mechenice a Sokolníky. V roku 2002 sa obec Bádice osamostatnila.

Potok Hunták, prameniaci v Žiranoch, vytvára v kremencoch eróznú dolinu, podobne ako aj Mechenický potok s prítokmi. V obci vyviera aj tzv. Bartošov prameň a tiež prameň v Mecheniciach nazvaný obyvateľmi ako "Horná studňa".

Sčítanie pohybu peších

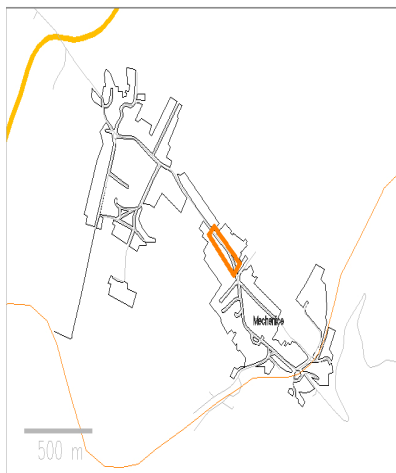
Táto časť pozorovania prebehla každú hodinu v dĺžke trvania 15 minút v čase od 6:15 do 23:30. Výsledky pozorovania boli zaznačené do formulárov, z ktorých boli spracované grafy, odzrkadľujúce priebeh pozorovania.

Obrázok 4 Lokalita pozorovania a smery (Jančovičová, 2012)

Hruboňovo



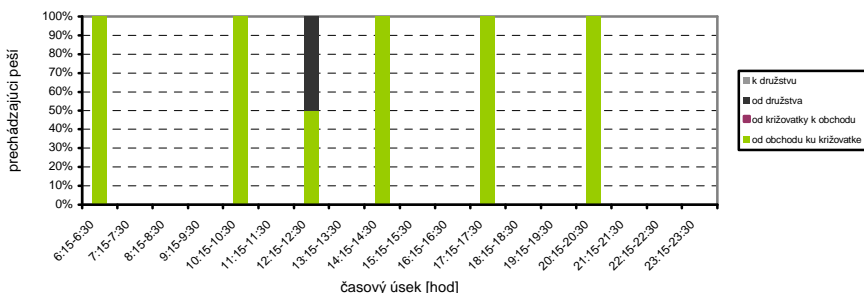
Podhorany



Obrázok 5 Sčítanie pohybu peších - formulár na zapisovanie (podľa Šilhánkovej, 1996 vypracovala Jančovičová, 2012)

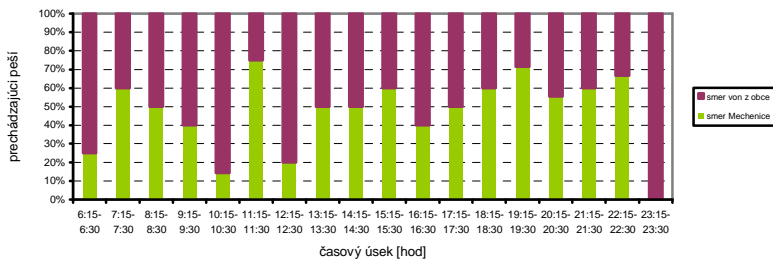
Miesto:	Dátum:	Pozorovateľ:	Počasie:	por. č.
---------	--------	--------------	----------	---------

Čas	Smer.....	Počet	Čas	Smer.....	Počet	Celkovo
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			
od			od			
do			do			

Obrázok 6 Smery ciest peších v Hruboňove (Jančovičová, 2012)


V skúmaných časových úsekoch prešlo územím v Hruboňove celkovo len 8 peších. Títo sa pohybovali prevažne v smere od obchodu ku križovatke. Každý prechádzajúci sa pritom započítal len raz, podľa toho, z ktorého smeru, kam išiel (človek, ktorý išiel v smere od obchodu ku križovatke už nebol zarátaný v smere od družstva/ku družstvu, aby sa predišlo zdvojeniu údajov, t.j. ako by prešli dve osoby). V prehľade sa už nezohľadňovali ľudia cestujúci v dopravných prostriedkoch – v aute prešlo ľudí 64, v bagri 1, na traktore 1, cyklisti 12-ti a smerom k družstvu prešli dva autobusy.

Obrázok 7 Smery ciest peších v Podhoranoch (Jančovičová, 2012)



V skúmaných časových úsekoch prešlo vybraným územím v Podhoranoch celkovo 91 peších. Ich pohyb bol v oboch smeroch približne rovnaký. Hodnotíme, že viac ľudí sa vyskytovalo vždy pred odchodom alebo po príchode autobusu, podvečer a večer, zrejme kvôli poklesu teploty.

Mapovanie správania

Sledovanie správania ľudí prebiehalo 15 minút každú hodinu v čase od 6:00 do 23:15. Výsledky pozorovania boli zaznačené do formulárov, z ktorých boli spracované grafy odzrkadľujúce jednak aktivity ľudí, ako aj informácie o počte áut prechádzajúcich, parkujúcich, obsadenosť automobilu ľuďmi celkovú – teda koľko ľudí sa celkovo prepravilo i čiastkovú – aké počty osôb sa v automobiloch prepravujú.

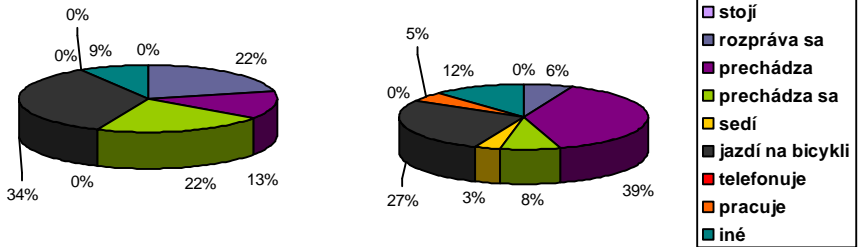
Obrázok 8 Mapovanie správania - formulár na zapisovanie (podľa Šilhánkovej, 1996 vypracovala Jančovičová, 2012)

Miesto:	Dátum:	Čas:	Pozorovateľ:	Počasia:	por. č.		
Mapka územia:			AKTIVITA		DOPRAVA		
			STOJI ROZPRÁVA SA PRECHÁDZA PRECHÁDZA SA SEDÍ JAZDÍ NA BICYKLI TELEFONUJE PRACUJE VONKU		PARKUJÚCE ÁUTÁ PRECHÁDZAJÚCE ÁUTÁ Poznámky:		
skupina	POHLAVIE		VEK			INÉ AKTIVITY	
	M	Z	0-6	7-14	15-30	31-64	65+

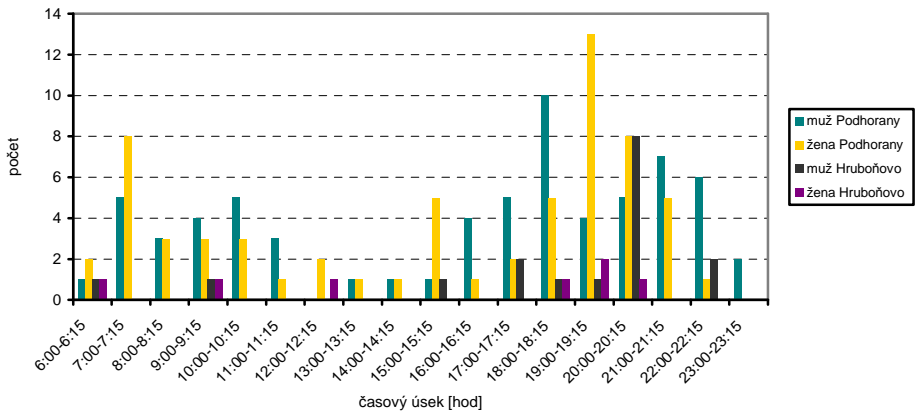
Obrázok 9 Prehľad aktivít celkovo (Jančovičová, 2012)

Hruboňovo

Podhorany



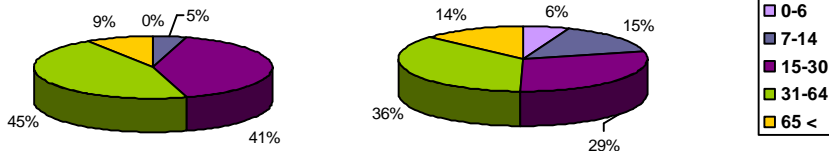
Obrázok 10 Štruktúra pozorovaných obyvateľov



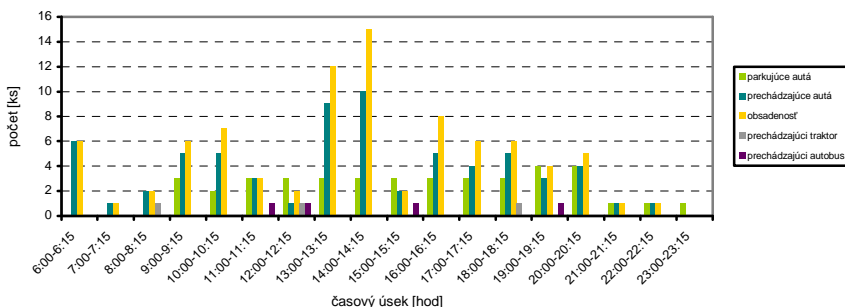
Obrázok 11 Veková štruktúra pozorovaných (Jančovičová, 2012)

Hruboňovo

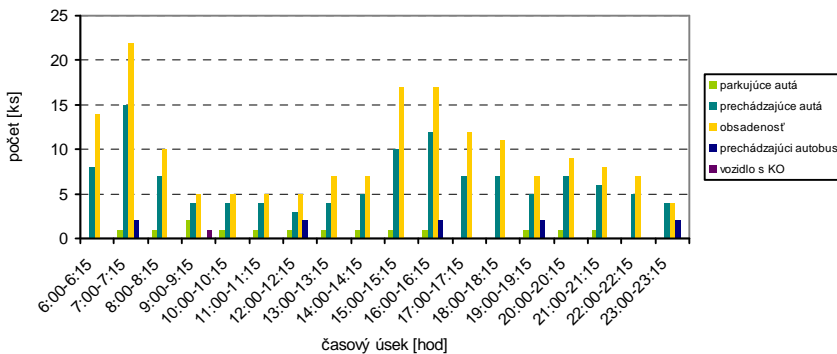
Podhorany



Obrázok 12 Automobily a počet prepravených osôb v Hruboňove (Jančovičová, 2012)



Obrázok 13 Automobily a počet prepravených osôb v Podhoranoch (Jančovičová, 2012)



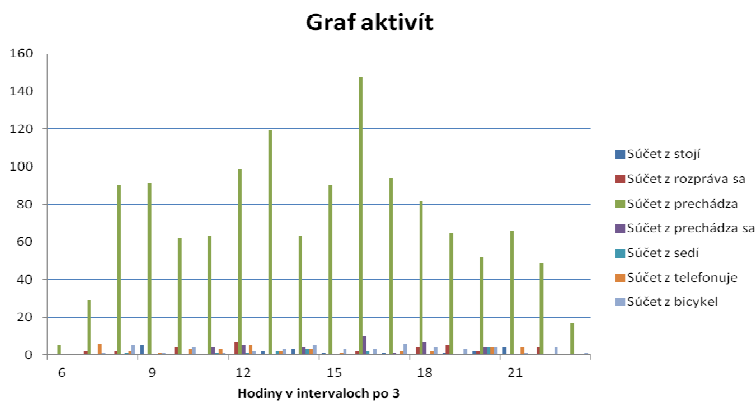
Pri pohľade na grafy je zrejmé, že širšia škála aktivít vykonávaných na ulici je v Podhoranoch. Vekové zloženie sledovaných peších je najčastejšie v rozmedzí 15-30 a 31-64 rokov.

V sledovanom období sa v autách prepravilo v Hruboňove celkovo 68 a v Podhoranoch 113 ľudí. Zo zistených údajov vyplýva, že v oboch obciach sa v autách prepravuje väčšinou len jeden človek (71% v Hruboňove, 60% v Podhoranoch), menej dvaja, traja ľudia.

Priamo pozorovacou metódou sme chceli zaznamenať pohyb a aktivity ľudí v záujmových územiach. V tomto prípade nešlo o participáciu občanov, bolo by nežiaduce, keby boli obyvatelia výskumom ovplyvnení, o pozorovaní preto nevedeli a ani neboli pri svojich aktivitách vo verejných priestoroch oslovovaní.

Metodiku Šilhánkovej sme aplikovali aj na verejný priestor v meste (Nitra, Župné námestie). Pre porovnanie s obcou je konkrétny priestor očakávané viac využívaný. Má potenciál hlavne prechodový. Priestor mal v minulosti významný historický charakter, ktorý bol však potlačený vytvorením parkovacích miest. Je vo veľmi problematickej časti, na základe funkčno– priestorovej analýzy v centre stretu peších ciest od rekreačnej časti parku do časti s firmami a do centra mesta. Pri porovnaní s konkrétnymi priestormi v obciach je v mestskom vybranom priestore širšia škála aktivít. Príklad je uvedený ako ukážka aplikácie Šilhánkovej metodiky aj na mestské verejné priestory.

Obrázok 14. Graf aktivít v mestskom verejnom priestore- Župné námestie, Nitra (Titková, 2012)



ZÁVER

V tomto príspevku sme sa snažili aplikovať metodiku Šilhánkovej na vybrané verejné priestory vo dvoch obciach a preskúmať tak spoločné a odlišné znaky, čo sa týka nielen lokality, podmienok a charakteru, ale hlavne sociálnej stránky verejných priestorov.

Modelové obce boli zvolené na základe porovnania podobných a odlišných znakov, Podhorany majú dvojnásobný počet obyvateľov, ich rozloha je o niečo väčšia než je rozloha Hruboňova, sú bližšie k mestu Nitra, z hľadiska prírodných podmienok sú si obce podobné. Aplikáciou zvolenej metodiky sme chceli preveriť frekvenciu obyvateľov vo vybraných úsekoch v priebehu dňa, zistiť, akými aktivitami priestor žije. Aká kategória občanov ho najčastejšie využíva a akým spôsobom. Boli skúmané dva vybrané verejné priestory líniového typu, a teda časti ulíc. Obe by mali byť frekvenciou, nakoľko sa jedná o podstatné komunikačné spojenia v obciach.

Pri tematike verejných priestorov netreba zabúdať, že sú nimi nielen parky, námestia a iné zhromažďovacie priestory, ale práve aj komunikácie, ktoré najčastejšie využívame, po ktorých dennodenne chodíme, aby sme sa tak dostali k cieľovým bodom cesty. Na základe nášho pozorovania máme údaje o využívaní vytypovaných komunikácií v obciach a ďalej je na zváženie, akým spôsobom ich využívanie a vzhľad podporiť, aby sa tak stali vizitkou obce, tvorili reprezentatívne priestory, ktorými občan i návštevník budú s radosťou prechádzať.

Terénny prieskum prebehlo 7. augusta 2012 (slnečný, jasný, teplý, pracovný deň), predchádzala mu úprava zapisovacích tabuliek danej pozorovacej metódy podľa Šilhánkovej (1996), aby tak boli vhodnejšie pre naše pozorovanie.

Predpokladali sme, že pohyb obyvateľov v Podhoranoch bude výraznejší, nakoľko daná obec má približne dvojnásobný počet občanov. Ďalej sme predpokladali väčšiu koncentráciu peších a cyklistov v oboch sídlach, nakoľko sa jedná o obce vidieckeho charakteru. Naše predpoklady boli naplnené len čiastočne. Je pravdou, že pohyb obyvateľov bol zreteľnejší v Podhoranoch. Druhý predpoklad však naplnený nebol. Obyvatelia sa v oboch obciach presúvajú väčšinou automobilom, obsadenosť automobilov je zväčša len jednou osobou. Najviac prepravených ľudí bolo v Hruboňove v čase 14:00-14:15, v Podhoranoch to bolo ráno medzi 7:00 a 7:15. Sledovali sa tiež smery pohybu obyvateľov. V Hruboňove v sledovaných časoch jednoznačne prevláda pohyb smerom od obchodu ku križovatke, v Podhoranoch je pomer smerov pohybu celkovo viac-menej vyrovnaný. V Podhoranoch prevládajú muži, rovnako tak aj v Hruboňove. Bol predpoklad, že aktivity uskutočňované vo verejných priestoroch budú orientované najmä na presun. V Hruboňove je najviac zastúpenou aktivitou jazda na bicykli, ktorú vykonávalo 34% pozorovaných. V Podhoranoch je toto percento len o niečo nižšie (27%) a v početnosti ju prevýšila aktivita prechádza. V sledovaných územiach vôbec nebolo zastúpené: stojí a telefonuje. V Hruboňove sa v niektorých časových intervaloch nevyskytovali žiadne osoby, predpokladali sme väčší pohyb detí, nakoľko pozorovanie prebehlo počas letných prázdnin. Náš predpoklad sa však nenaplnil. Do

budúca máme v pláne doplniť rovnaké pozorovanie aj v priebehu víkendového dňa a porovnať zistené údaje.

Pri porovnaní pôvodnej metodiky s aplikovanou, pozmenili sme vzhľad formulára, doplnili počasia, nakoľko tento faktor vidíme ako veľmi dôležitý pri využívaní verejných priestorov, doplnili sme priestor na poznámky a iné aktivity. Takisto nás zaujímala frekvencovanosť automobilov a iných dopravných prostriedkov a ich obsadenosť, ktorým sme vo formulári vyčlenili priestor.

Pred samotným návrhom úpravy verejného priestoru je potrebné ho analyzovať. Čím lepšie a dôkladnejšie sú prvotné analýzy, tým väčší je predpoklad návrhu úspešného a udržateľného verejného priestoru, ktorý bude nielen lepšie prijatý zo strany verejnosti, ale úspešný i z pohľadu dlhodobého využívania. Metodika Šilhánkovej sítě hodnotí len aktuálny stav verejného priestranstva z pohľadu využívania ľuďmi, nerieši, ako by nejaký vonkajší prvok/zásah ovplyvnil atraktivitu verejného priestoru a aktivity ľudí v ňom, je však z kategórie priamo pozorovacích metód užitočným ukazovateľom sociálneho aspektu priestoru. Dopomôže teda k lepšiemu pochopeniu pohybu a aktivít človeka v priestore sídiel.

LITERATÚRA

LIPOVSKÁ, Barbora. 2011. Renewal of public spaces in rural areas-by using the participant observation methods. Dizertačná práca. Nitra. SPU Nitra, 2011. 142 s.

ŠILHÁNKOVÁ, Vladimíra. 2008. Veřejné prostory našich měst in Veřejná správa, číslo 6. 2008. Dostupné na: http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/s/2003/0006/pri1_3.html [cit. 2012-08-09]

TILLEY, Joan - ŠILHÁNKOVÁ, Vladimíra – NAVRÁTILOVÁ, Jitka. 1996. Metodika operativního zlepšení veřejného prostoru výpis, United States Peace Corps, Washington D.C, Útvar hlavního architekta, Magistrát města Brna (ÚHA, MMB), Brno, 1996. 10 s.

<http://ukr.plzen.eu/analyticke-a-koncepcni-dokumenty/doprava-3/pesi-doprava/pesi-doprava.aspx>

<http://www.e-obce.sk/obec/podhorany-nitra/podhorany.html> [cit. 2012-08-09]

<http://www.e-obce.sk/obec/hrubonovo/hrubonovo.html> [cit. 2012-08-09]

www.maps.google.sk

<http://www.podhorany.sk/> [cit. 2012-08-09]

THE EVALUATION OF LAND USE CHANGES IN LAND SURROUNDING WATERCOURSES AS ONE OF THE KEY ELEMENTS FOR ASSESSING THE ECOLOGICAL STABILITY IN RURAL AREAS

HODNOTENIE ZMIEN KRAJINNEJ ŠTRUKTÚRY V OKOLÍ VODNÝCH TOKOV AKO NÁSTROJ HODNOTENIA EKOLOGICKEJ STABILITY RURÁLNEJ KRAJINY

Krivosudský R.

Department of Landscape Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

E-mail: krivosudsky@fns.uniba.sk

ABSTRACT

The rural areas in Slovakia have gone through a significant transformation over the past 100 years. This transformation is linked to modifications in the land ownership, machining processes or economy focus in the respective areas. These modifications are mostly manifested by means of changes in land use and ecological stability. One of the possible ways to improve the ecological stability is through building a territorial system of ecological stability framework (MUSES) at a local level. In order to set up the suitable and sustainable management of countryside, we have to build it based on its potential and refrain from exceeding its limitations.

The aim of this paper is to observe and evaluate the changes in land use of land surrounding watercourses, as one of the key elements for assessing the ecological stability in rural areas, by using the tools in GIS. The outcome of this paper can be used as the entry data for evaluation of the connection of bio corridors and modelling programmes for the proposals of new elements of MUSES. The model area is the land surrounding the Malina watercourse (in the cadastral area of Kuchyna) and the Rohoznický potok watercourse (in the cadastral area of Rohozník) in the district of Malacky. These watercourses have their sources in the Male Karpaty Mountains, they then run through a forest massive and enter the contact foothill area. The contact foothill area consists mainly of rural agricultural land and the tracking of the changes in this area is of a crucial importance. Raster maps, historical aerial photographs and current orto-photomaps of the land were used as the entry data. The land use in the distance of 200metres from both shores of the main flow for 1892, 1958, 1991 and 2011 was evaluated. The outcome data were maps of land use, table of changes and the set coefficient of ecological stability for the respected period.

Key words: rural landscape, hydric bio corridors, land use changes, ecological stability, GIS

Acknowledgments: The paper is prepared under projects GUK No. UK/460/2012 and VEGA No. 1/1139/11.

ÚVOD

Vidiecka krajina Slovenska sa dynamicky mení v priebehu času. Markantné zmeny, ktoré v nej nastávajú sú následkom činnosti človeka, ktorý ju osídlil a využíva k uspokojovaniu svojich potrieb. V priebehu 20. storočia nastali výrazné zmeny v spôsobe využitia rurálnej krajiny, ktoré súviseli najmä s kultúrno-spoločenskými zmenami v spoločnosti, orientácií výroby a stupnici hodnôt vtedajšej majoritnej spoločnosti. Tieto zmeny sa prejavili najmä v krajinskej štruktúre a priamo súviseli so zmenou jej ekologickej stability a stavom biodiverzity (Lipský, 2000). Pôvodná krajinná štruktúra existujúca do 50. rokov 20. storočia na mnohých miestach zanikla. Vodné toky a ich brehová vegetácia, ktoré z hľadiska ekológie okrem iného predstavujú prirodzené ekostabilizačné prvky s úlohou biokoridorov, boli umelo pretvorené reguláciou koryt, spevnením brehov či melioračnými zásahmi. Tým ich ekostabilizačná funkcia v krajine výrazne klesla.

Pokiaľ chceme v kultúrnej krajine hovoriť o vyváženom rozvoji a plánovať nové aktivity, je nutné rešpektovať prírodné, kultúrne a spoločenské danosti toho ktorého miesta či regiónu. Obnova ekologickej stability krajiny a zvyšovanie jej biodiverzity by mali byť prirodzenou súčasťou každého plánovacieho procesu. Jedným z možných nástrojov ako takýto stav dosiahnuť je aj vhodné krajinné plánovanie, ktorého súčasťou je aj tvorba Územných systémov ekologickej stability (Kozová, Pauditšová, Finka, 2010). Existuje niekoľko metodických postupov ako vyhodnocovať ekologickú stabilitu krajiny, navrhovať a vytvárať nové prvky ekologických sietí, napríklad práca Pauditšovej, Reháčkovej, Ružičkovej (2007). Pri mnohých je kľúčové sledovanie zmien vo vývoji krajiny a jej stability, rozmiestnenie ekostabilizačných prvkov, ich typ či veľkosť, druhové zloženie a pod. Moderné postupy, ako práca s digitálnymi mapami v prostredí GIS a následné vyhodnocovanie konektivity pomocou softvérových programov (napr. LARCH), napomáhajú v procesoch územného plánovania, krajinného plánovania, či pri projektoch pozemkových úprav k naplneniu jedného zo základných cieľov strategického priestorového plánovania krajiny – ochrane a tvorbe životného prostredia, to jest najmä k stabilizácii a obnove prirodzeného druhového zloženia a s tým spojených ekosystémov a konektivity koridorov v krajine.

Preto základným cieľom predloženého príspevku bolo zhodnotiť stav a zmeny krajinskej štruktúry v okolí vodných tokov vo vidieckej poľnohospodárskej krajine za rôzne časové obdobia jej vývoja. Tieto výsledky môžu predstavovať analytický vstup do hodnotenia konektivity krajiny a návrhu obnovy, respektíve tvorby nových prvkov ekologických sietí, ktoré povedú k zvýšeniu ekologickej stability tohoto územia. Sekundárnym cieľom práce bolo vyhodnotiť ekologickú stabilitu za zvolené časové obdobia.

MATERIÁL A METODIKA

Príkladom rurálneho priestoru, kde došlo vďaka zmenám v štruktúre a využití krajiny k zmenám v konektivite a funkčnosti hydrických biokroidorov je kontaktné územie medzi Záhorskou nížinou a Malými Karpatmi v západnej časti Slovenska. Dominantným spôsobom využitia krajiny v priestore medzi lesným masívom Karpát a borovicovými lesmi Záhorskej nížiny bolo poľnohospodárstvo, ako rastlinná, tak aj živočíšna výroba. V náväznosti na prebiehajúce súvisiace výskumné úlohy boli pre účely výskumu zmien v štruktúre krajiny v okolí vodných tokov vybrané dva vodné toky: Malina, v katastrálnom území obce Kuchyňa a Rohožnícky potok, v katastrálnom území obce Rohožník. Obec Kuchyňa má približne 1667 obyvateľov, Rohožník 3556 (ŠtÚ SR, 2012).

Hodnotená bola štruktúra krajiny v transekte 200 metrov po oboch brehoch hlavného koryta toku. Zvolené boli 4 časové hladiny (obdobia vývoja) na základe spoločensko-kultúrnych zmien a zmien v hospodársko-technickom využití pôdy. Vybrané boli obdobia rokov 1892 - obdobie pred I. svetovou vojnou, 1958 - obdobie začiatku kolektívizácie a sceľovania pozemkov, 1991 - obdobie po rozpade družstiev a začiatku reštitúcií, a 2011 - odzrkadľujúce aktuálny stav.

Metodicky bola štruktúra krajiny pokrývky hodnotená podľa práce Pucherovej et al. (2007) a Boltžiara, Olaha (2009), pričom jednotlivé prvky boli zaradené do 8 skupín a to:

- skupina prvkov lesnej a nelesnej drevinovej vegetácie,
- skupina prvkov trvalých trávnatých porastov,
- skupina prvkov poľnohospodárskych kultúr,
- skupina prvkov podložía a substrátu,
- skupina prvkov vodných tokov a plôch,
- skupina sídelných prvkov a rekreačných priestorov,
- skupina technických prvkov a
- skupina prvkov dopravy.

Ako podklad pre spracovanie máp krajiny štruktúry za zvolené obdobia slúžili pre rok 1892 historické mapy stabilného katastra, pre rok 1991 štátne mapy odvodené v mierke 1:5 000, oboje poskytnuté Ústredným archívom geodézie a kartografie (UGKaK). Pre rok 1958 boli použité letecké meračské snímky poskytnuté Topografickým ústavom plukovníka Jána Lipského (ASR) a podklad pre obdobie roku 2011 tvorili ortofosnímky dostupné z programu GoogleEarth. Rastrové dáta boli spracované a vektorizované podľa Boltžiara, Olaha (2009).

Pre výpočet koeficientu ekologickej stability krajiny bol použitý vzorec K_{es2} podľa Miklóša (1986) upravený podľa existujúcich typov prvkov krajiny štruktúry. Výpočet je založený na podiele

relatívne stabilných prvkov krajiny a relatívne menej stabilných k celkovej ploche územia, pričom jednotlivým

prvkom priradujeme váhové koeficienty ekologickej významnosti. Tie sa pohybujú v intervale 0 až 1, kedy 0 sú prvky najmenej stabilné a 1 sú prvky najstabilnejšie. Koeficient má tvar

$$K_{es2} = \frac{\sum_1^n P_a K_{pn}}{P}$$

P_a = plocha (výmera) prvku

P = celková plocha územia

K_{pn} = koeficient ekologickej významnosti

Koeficient (K_{pn}) ekologickej významnosti má hodnoty: 0,00 - zastavaná plocha (spevnené komunikácie, železnice, budovy, technické prvky a priemyselné areály,...); 0,14 – ostatné prvky (nespevnené komunikácie, odkryvy podlažia, polia...); 0,30 – sady (ovocné sady, vinice, ...); 0,50 – záhrady (prídomové záhrady, záhradkárske osady, rekreačné chatové osady, ...); 0,62 – trvalé trávnaté porasty (lúky, pasienky, trávnaté brehové porasty, ...); 0,79 – vodné plochy (vodné nádrže, rybníky, ...) a nelesná drevinová vegetácia – NDV (NDV plošná, NDV líniová, brehové porasty, ...); 1 – lesy.

Na základe vzniknutých koeficientov môžeme určiť do akej kategórie podľa ekologickej stability územie zaraďujeme. Na toto hodnotenie sme použili tabuľku klasifikácie krajiny podľa koeficientu ekologickej stability – K_{es2} (Miklós, 1986), vid'. Tab 1.

Tab. 1 Klasifikácie krajiny podľa koeficientu ekologickej stability – K_{es2} (Miklós, 1986)

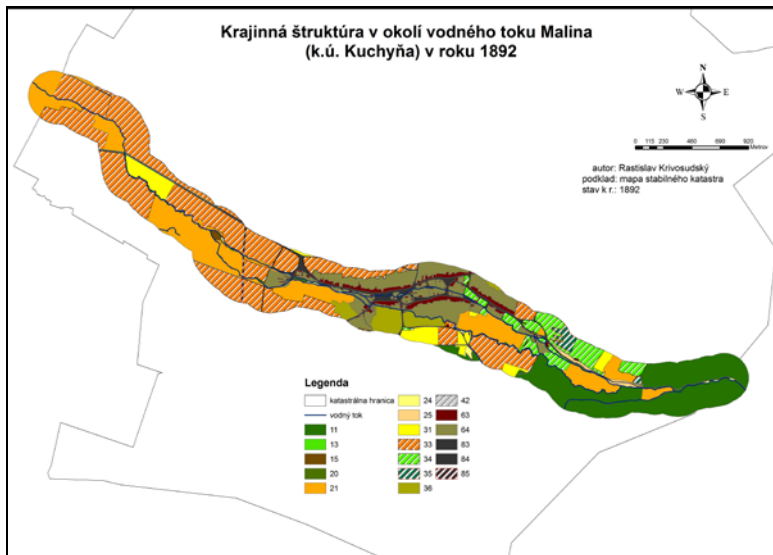
koeficient K_{es2}	typ krajiny
< 0,2	výrazne nestabilizovaná krajina
0,2 – 0,4	nestabilizovaná krajina
0,4 – 0,6	čiastočne stabilizovaná krajina
0,6 – 0,8	stabilizovaná krajina
0,8 - 1	výrazne stabilizovaná krajina

VÝSLEDKY A DISKUSIA

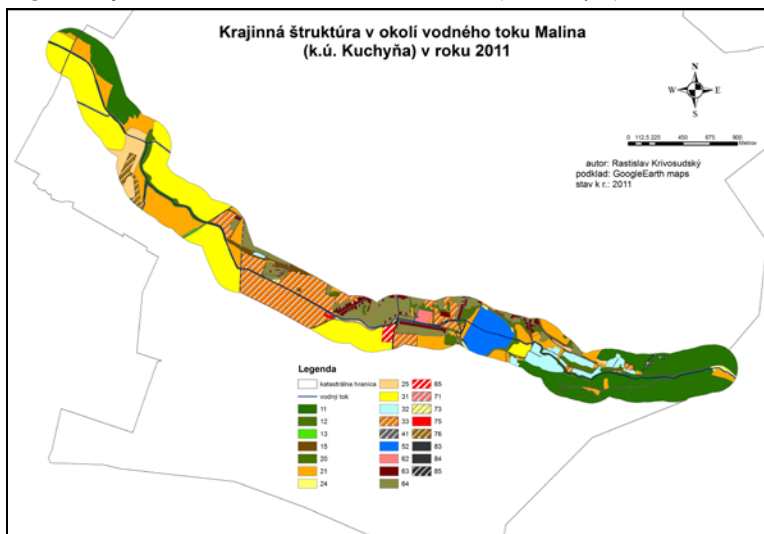
Aplikáciou zvoleného metodického postupu na spracovanie podkladových mapových zdrojov boli vytvorené pre každý vodný tok série 4 máp krajiny štruktúry (podľa zvolených časových období), ku ktorým vznikli databázové tabuľky s kódmi jednotlivých typov prvkov. Celkovo tak vzniklo 8 analytických máp, vid' príklad Mapa 1 a Mapa 2. Keďže ako už bolo povedané, poloha

a rozvetvenosť vodných tokov (poloha hlavného toku, množstvo a dĺžka bočných ramien) sa menila v čase, menil sa aj skúmaný transekt v ich okolí a tým aj veľkosť skúmaného územia.

Mapa. 1 Krajinná štruktúra v okolí vodného toku Malina (k.ú. Kuchyňa) v roku 1982



Mapa. 2 Krajinná štruktúra v okolí vodného toku Malina (k.ú. Kuchyňa) v roku 2011



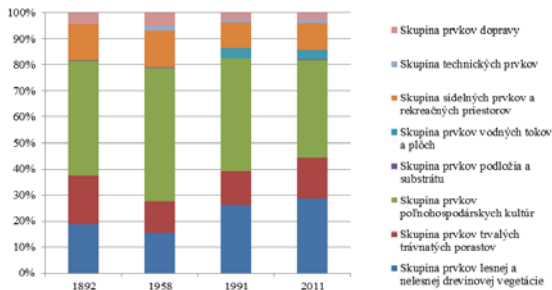
Skombinovaním a úpravou atribútových tabuliek vznikla výsledná tabuľka zastúpenia jednotlivých prvkov krajinynej štruktúry, odzrkadľujúca veľkosť a percentuálne zastúpenie jednotlivých typov prvkov k celkovej ploche transektu (viď Tab. 2).

Tab. 2 Sumárna tabuľka prvkov krajinynej štruktúry v okolí vodných tokov Malina a Rohožnícky potok v rokoch 1892, 1958, 1991 a 2011

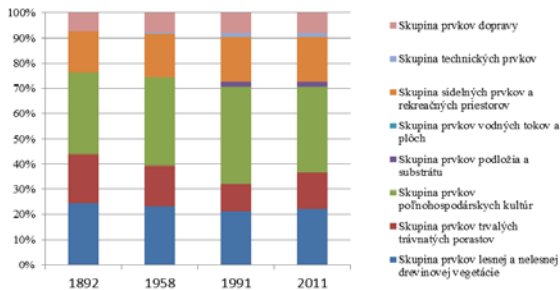
Skupiny a prvky (skladajúcej krajinynej štruktúry kód + prvok	Malina (k.u. Kuchyná)								Rohožnícky potok (k.u. Rohožník)							
	1892		1958		1991		2011		1892		1958		1991		2011	
	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]	Area [ha]	Area [%]
Skupina prvkov lenej a nelejnej drevinovej vegetácie	60,21	18,69	49,99	15,52	73,96	26	81,09	28,5	60,07	24,61	56,82	23,28	51,38	21,1	53,82	22,1
11 Lesy	54,55	16,93	43,44	13,49	58,78	20,66	61,42	21,59	53,09	21,75	50,76	20,79	48,61	19,96	50,33	20,67
12 NDV - plošná	-	-	2,1	0,65	4,92	1,73	6,35	2,23	2,1	0,86	1,36	0,56	-	-	-	-
15 NDV - líniová	0,73	0,23	0,65	0,20	2,07	0,73	3,17	1,11	1,12	0,46	1,12	0,46	0,54	0,22	0,86	0,35
20 NDV - brehové porasty	4,02	1,25	2,89	0,90	7,47	2,63	9,69	3,41	3,59	1,47	3,41	1,40	2,13	0,87	2,54	1,04
13 Aleje	0,91	0,28	0,91	0,28	0,72	0,25	0,46	0,16	0,17	0,07	0,17	0,07	0,1	0,04	0,09	0,04
Skupina prvkov trvalých trávnatých porastov	60,49	18,78	39,04	12,12	37,58	13,21	45,49	15,99	46,99	19,25	39,32	16,11	27,01	11,09	35,41	14,54
21 TTP - lúky a pasienky	57,29	17,79	36,28	11,26	29,05	10,21	33,96	11,94	23,65	9,69	18,11	7,42	7,16	2,94	10,17	4,18
24 TTP - brehové porasty	1,58	0,49	1,58	0,49	2,89	1,02	3,52	1,24	3,99	1,63	2,17	0,89	0,81	0,33	1,35	0,55
25 TTP - ostatné plochy	1,62	0,50	1,18	0,37	5,64	1,98	8,01	2,82	19,35	7,93	19,04	7,80	19,04	7,82	23,89	9,81
Skupina prvkov poľnohospodárskych kultúr	142,36	44,2	166,5	51,38	123,03	43,25	106,19	37,33	79,04	32,38	85,77	35,14	93,63	38,45	82,72	33,97
31 Omá pôda - veľkobilková	13,07	4,06	105,93	32,89	71,17	25,02	62,04	21,81	21,22	8,69	38,96	15,96	87,38	35,88	77,06	31,64
33 Omá pôda - malobilková	100,16	31,09	40,21	12,48	33,99	11,95	34,97	12,29	50,62	20,74	43,88	17,98	5,42	2,23	4,83	1,96
34 Sady	16,73	5,19	16,73	5,19	8,23	2,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 Vinice	2,63	0,82	2,63	0,82	1,87	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 Záhrady (záhumenné)	9,77	3,03	-	-	-	-	-	-	7,2	2,95	2,93	1,20	-	-	-	-
32 Záhradkárske a chatové osady	-	-	-	-	7,77	2,73	9,18	3,23	-	-	-	-	0,83	0,34	0,83	0,34
Skupina prvkov podložná a substrátu	0,46	0,14	0,48	0,15	0,42	0,15	0,42	0,15	-	-	-	-	4,87	2	4,87	2
41 Odčrpy podložia	0,42	0,13	0,42	0,13	0,42	0,15	0,42	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
42 Pieskovna	0,04	0,01	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	4,87	2,00	4,87	2,00
Skupina prvkov vodných tokov a plôch	-	-	-	-	10,75	3,78	10,76	3,78	-	-	-	-	-	-	-	-
52 Vodné plochy	-	-	-	-	10,76	3,78	10,76	3,78	-	-	-	-	-	-	-	-
Skupina sídelných prvkov a rekrečných priestorov	43,94	13,64	45,48	14,12	28,48	10,01	29,55	10,39	40,2	16,47	41,52	17,01	43,3	17,78	43,3	17,78
63 Zástavba	8,59	2,67	8,68	2,69	5,01	1,76	5,34	1,88	10,23	4,19	14,83	6,08	16,79	6,89	11,79	4,84
64 Prídomové záhrady	35,35	10,97	36,8	11,42	20,94	7,36	21,68	7,62	29,97	12,28	25,94	10,63	25,53	10,48	25,53	10,48
62 S. a FS arešly, úhrtiky	-	-	-	-	1,25	0,44	1,25	0,44	-	-	0,75	0,31	0,98	0,40	0,98	0,40
65 Catoriny	-	-	-	-	1,28	0,45	1,28	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-
Skupina technických prvkov	-	-	5,15	1,6	3,1	1,09	3,27	1,15	-	-	1,83	0,78	3,41	1,4	3,41	1,4
71 Przemyselné arešly	-	-	1,14	0,35	0,09	0,03	0,09	0,03	-	-	0,81	0,33	1,75	0,72	1,75	0,72
73 Poľné hnojiská	-	-	0,33	0,10	0,33	0,12	0,19	0,07	-	-	-	-	0,05	0,02	0,05	0,02
75 Arešly vodného hospodárstva	-	-	-	-	-	-	0,31	0,11	-	-	-	-	0,51	0,21	0,51	0,21
76 Ostatné technické plochy	-	-	3,68	1,14	2,68	0,94	2,68	0,94	-	-	1,02	0,42	1,1	0,45	1,1	0,45
Skupina prvkov dopravy	14,65	4,55	16,46	5,11	7,14	2,51	7,72	2,71	17,79	7,29	18,82	7,71	19,92	8,18	19,99	8,21
84 Komunikácie hlavné	1,06	0,33	7,87	2,44	3,01	1,06	3,08	1,08	3,89	1,59	4,2	1,72	7,81	3,21	7,81	3,21
83 Komunikácie vedľajšie	12,88	4,00	7,88	2,45	3,42	1,20	3,93	1,38	13,3	5,45	14,02	5,74	11,45	4,70	11,52	4,73
85 Železnica	0,71	0,22	0,71	0,22	0,71	0,25	0,71	0,25	0,6	0,25	0,6	0,25	0,66	0,27	0,66	0,27
Spolu	322,12		322,12		284,48		284,48		244,1		244,1		243,52		243,52	

Area – plocha, NDV – nelejná drevinová vegetácia; TTP – trvalé trávnaté porasty, S a FS – Skotické a predskotické arešly

Graf. 1 Percentuálne zastúpenie skupín krajinných prvkov v okolí vodného toku Malina



Graf. 2 Percentuálne zastúpenie skupín krajinných prvkov v okolí vodného toku Rohožnícky p.



V grafoch číslo 1 a 2 možno vidieť percentuálne zastúpenie skupín prvkov krajiny štruktúry k celkovej ploche územia v danom čase. Výsledky poukazujú na celkový charakter okolitej krajiny. Ako možno vidieť z grafov oboch tokov, dominantnou skupinou prvkov krajiny štruktúry sú poľnohospodárske kultúry nasledované lesnou a nelesnou drevinovou vegetáciou a trvalými trávnatými plochami. Sídelné prvky, najmä nízkopodlažná radová zástavba vidieckeho typu s prídumovými záhradami dotvárajú obraz rurálnej krajiny počas sledovaných 120 rokov. V priebehu vývoja územia však prichádza k výrazným percentuálnym posunom na úrovni skupín, pričom tieto zmeny sú pozorovateľné aj v rámci jednotlivých skupín (viď tabuľka 2).

Tab. 3 Koefficient ekologickej stability – K_{es2} (Mikláš, 1986) pre modelové územie

vodný tok/rok	1892	1958	1991	2011
Malina	0,47	0,36	0,47	0,5
Rohožnícky p.	0,48	0,44	0,39	0,41

V tabuľke číslo 3 sú uvedené vypočítané hodnoty ekologickej stability pre vodný tok Malina a Rohožnícky potok v jednotlivých obdobiach.

Z výsledkov vyplýva, že krajina v okolí vodného toku Malina si v priebehu sledovaného času zachovávala status čiastočne stabilizovanej krajiny. Koefficient ekologickej stability tu v roku 1958 klesol pod úroveň 0,4, čo znamená, že krajina sa stala nestabilizovanou. Tento pokles mohol súvisieť ako s výstavbou vojenského letiska (v období rokov 1918 - 1936), tak aj hospodársko-technickými zmenami na poľnohospodárskej pôde (na začiatku 50. rokov 20. storočia), to jest rozorávanie medzí, transformácia časti trvalých trávnatých pozemkov na polia, likvidácia niektorých plôch líniovej nelesnej drevinovej vegetácie, a reguláciou vodného toku (preloženie koryta, spevnenie brehov a odstránenie časti brehovej vegetácie). Na základe dostupných podkladov nemožno presne určiť do kedy tento stav nestability krajiny trval, ale výsledky z roku 1991 ukazujú, že došlo k zvýšeniu ekologickej stability, a to najmä výstavbou vodnej nádrže, zmenou časti polí na trvalé trávnaté porasty a úspešným zárastom bývalých sádov a viníc.

Vodný tok, Rohožnícky potok a krajina v jeho bezprostrednom okolí podobne ako v prípade toku Malina predstavoval počas sledovaných období podľa koeficientu ekologickej stability čiastočne stabilizované územie. Aj tu však došlo k poklesu koeficientu pod hranicu 0,4 v roku 1991. Opäť, ani tu nemožno povedať, kedy v predchádzajúcom období tento pokles nastal. Z výsledkov porovnania máp krajiny štruktúry však možno povedať (v porovnaní so stavom k roku 1958), že došlo ku zániku časti brehovej vegetácie, k regulácii toku a k čiastočnému odlesneniu územia v jeho západnej časti. V roku 2011 (o 20 rokov neskôr) možno pozorovať opätovné zvýšenie stability územia čo je spôsobené parciálnym úspešným zarastaním časti polí a zmenou na trvalé trávnaté porasty a zvýšením podielu lesov.

ZÁVER

Sledovanie zmien v štruktúre krajiny okolia vodných tokov, následné obnovenie prirodzeného koryta, či výsadba nového, druhovým zložením sa čo najviac prirodzenému stavu približujúceho sa brehového porastu, sa stávajú nástrojmi renaturácie krajiny. V kultúrnej krajine terestrické a hydrické biokoridory plnia niekoľko dôležitých úloh z hľadiska ochrany a tvorby krajiny (Ružičková, Lehotská, 2011). Predložený príspevok priniesol náhľad do možností ako hodnotiť okolie vodných tokov, ako sledovať zmeny vo využití krajiny a na zmene ekologickej stability poukázať na vplyvy konkrétnych činností. Použitý metodický postup, ako aj výstupné dáta (ako priestorové, tak databázové) môžu slúžiť ako vhodný vstup do ďalších, pokročilejších analýz (pozri práce Marcucci, 2000 a Theobald., Norman, Sherburne, 2006) a následne vyústiť do návrhu nových prvkov ekologických sietí v krajine. Tvorbou a ochranou ekologicky významných segmentov krajiny a zosúladníť potrieb územného rozvoja s prírodným potenciálom sa vytvárajú predpoklady pre optimálny a udržateľný spôsob využitia krajiny.

LITERATÚRA

Boltziar M., Olah B. (2009): Krajina a jej štruktúra – mapovanie, zmeny a hodnotenie. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Nitra, 148 p.

Kozová M., Paudišová E., Finka M. (eds.) (2010): Krajinné plánovanie. Nakladateľstvo STU v Bratislave, Bratislava, 301 p.

Lipský Z. (2000): Sledování změn v kulturní krajině. Učební text pro cvičení z předmětu Krajinná ekologie, ÚAE LF, Kostelec nad Černými lesy, Praha: Vyd. ČZU, Lesnická práce s.r.o., 71 p.

Marcucci D. J. (2000): Landscape history as a planing tool. *Landscape and Urban Planning*, Vol. 49, Elsevier, pp. 67-81.

Miklós L. (1986): Stabilita krajiny v ekologickom genereli SSR. *Životné prostredie*, Vol. 20, No. 2. Ústav krajinej ekológie SAV, Bratislava, pp. 87-93.

Paudišová E., Reháčková T., Ružičková J. (2007): Metodický návod na vypracovanie miestneho územného systému ekologickej stability. *Acta Envir. Univ. Com. (Bratislava)*, Vol. 15, No. 2. PriF UK, Bratislava, pp. 66-87.

Pucherová Z. et al. (2007): Druhotná krajinná štruktúra – metodická príručka k mapovaniu. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Nitra, 124 p.

Ružičková J., Lehotská B. et al. (2011): Vybrané terestrické biokoridory a biocentrá v kontaktnej zóne Trnavskej pahorkatiny a Malých Karpát. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, 204 p.

Štatistický úrad Slovenskej republiky (2012): Mestská a Obecná Štatistika. dostupné na: <http://app.statistics.sk/mosmis/sk/run.html>, citované dňa: 15.9.2012.

Theobald D.M., Norman J.B., Sherburne M.R. (2006): FunConn v1 User's Manual: ArcGIS tools for Functional Connectivity Modeling. Natural Resource Ecology Lab, Colorado State University, Fort Collins, CO., 51 p.

DIPLOMA PROJECT TO THE COMPLETION OF SELECTED URBAN AREAS - THE SELECTED EXAMPLE: KRÁLOVOPOLSKÁ STROJÍRNA BRNO

DIPLOMNÍ PROJEKT DOTVOŘENÍ VYBRANÝCH URBÁNNÍCH PROSTORŮ MODELOVÝ OBJEKT: KRÁLOVOPOLSKÁ STROJÍRNA BRNO

Lorková H., Damec J.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: LorkovaHelena@seznam.cz

ABSTRACT

The Diploma thesis consists of theoretical and practical sections.

The theoretical section deals with the regeneration of brownfield sites pertaining to the subject of protection of industrial heritage. Also, it states the historical development of this issue, comparing the situation in the Czech Republic and abroad, and defines methods of assessment for industrial sites as well as how their transformation came about. By using selected examples, this shows how global trends affect architectural completion of these places that could become an inspiration for the future brownfield regeneration projects, not only industrial.

The practical section pertains to a deep analysis of Královopolská Brno Engineering Works and the subject of. This section analyzes Královopolská Brno Engineering Works from the point of view of historical context as well as its wider and closer relations. By using this complete synopsis, this section defines the main positives and negatives of this territory. Based on the results, the thesis has selected sections of the complex that would be best chosen for drafting a post-industrial park.

The draft shows a system of five selected areas that are treated as distinct functional types with adequate program, contents and the form of all the individual elements of the composite. All of these link a common understanding that is based on the respect for existing attributes and building new ones. Such as: the organization of managing with the help of tiles, the identification of new functions, bringing in the element of water and vegetation, assessment of existing buildings and creating original. The result would be a modern multi-functional park that is designed to meet the requirements and needs of each of its users. The draft was done at the level of architectural study.

Key words: industrial heritage, brownfields, conversion, renewal, urban design, public space, park, function, program

ÚVOD

Pojem „brownfields“ (v doslovném překladu: hnědá pole) pochází z anglického jazyka a popisuje plochy uvnitř urbanizovaného území, které již ztratily svou původní funkci a jsou úplně, popřípadě zčásti opuštěné nebo minimálně využívané. Může se jednat o průmyslové areály (tzv. výrobní brownfields), ale také o zemědělské a vojenské areály, drážní pozemky a v poslední době i o nepotřebnou veřejnou vybavenost (tzv. nevýrobní, neboli ostatní brownfields). Tyto plochy fyzicky a ekonomicky negativně ovlivňují své okolí a v důsledku své původní činnosti jsou povětšinou kontaminovány nebo jinak zdevastovány, což snižuje jejich atraktivitu pro budoucí využití. (Drkošová, 2005)¹

Zejména výrobní brownfields jsou v současné době velice frekventovaným bodem zájmu na poli ochrany průmyslového dědictví, územního plánování, architektury, zahradní a krajinné architektury, a v neposlední řadě také ekonomiky. Jedná se především o objekty pocházející z doby industrializace a postindustrializace, která byla spojena s úpadkem řady tradičních výrobních odvětví.

Nebylo tomu však vždy. Ještě v 60. letech 20. století byla většina postindustriálních staveb s ukončeným provozem odsouzena k úplnému zániku. Na mnohdy architektonicky hodnotné stavby z dob ekonomické a vědecké prosperity se nahlíželo jako na přebytečné a nevyhovující. Ale průmyslová revoluce s sebou přinesla mimo pokrok ve výrobě i pokrok ve stavebnictví a zpracování.

Teprve na počátku 70. let minulého století došlo k ocenění hodnot těchto objektů a celých zastavěných území. Odborná i laická veřejnost začala vnímat brownfields jako představitele kulturní tradice a nositele dobové svědectví, vypovídající o technické, sociální a ekonomické úrovni jejich vzniku. Mimo samotnou ochranu tohoto průmyslového dědictví je vedlejším produktem jejich obnovy omezení postupné suburbanizace a zamezení vzniku sídelní kaše.

Z hlediska zahradní a krajinné architektury, interdisciplinárního oboru, který si klade za cíl komplexní a hlubinné propojení všech souvisejících odborných úhlů pohledu, jsou brownfields obrovskou výzvou a možností, jak přesvědčit okolí o své potřebě a uplatnění na tomto poli.

¹ DRKOŠOVÁ, Marcela: *Brownfields a jejich opětovné využití ve městě Brně*. In: Urbanismus a územní rozvoj. 7 ročník 4/ 2005.: s. 2-6. Brno, Ústav územního rozvoje, 2005. ISSN: 1212-0855

MATERIÁL A METODIKA

Práce je rozdělena do dvou částí: teoretické a návrhové.

V teoretické části je nejdříve zevrubně objasněna problematika průmyslového dědictví a brownfields. Text sleduje historický vývoj této problematiky ve světě i na území České republiky a srovnává aktuální stav. Dále se zaměřuje na studium metodiky a možností přístupu k přeměně brownfields na znovu plně funkční urbánní prostor. Po studii literárních pramenů se teoretická část věnuje rozboru ukázkových příkladů, které již byly ve světě realizovány a během času se i osvědčily. Jednotlivé ukázky reprezentují odlišné přístupy k uchopení problematiky.

Praktická část řeší konkrétní vybraný objekt brněnského brownfieldu. Nejdříve jej důkladně analyzuje v širších i užších územních souvislostech, a to z hlediska historie, přírodních, provozních, funkčních a výtvarných podmínek. Veškeré tyto dílčí analýzy poté ústí v konečnou syntézu problémů a hodnot v území, která je stavebním základem pro výběr konkrétní části areálu a návrh postindustriálního parku.

Samotný návrh se zabývá kompletní architektonickou studií a pomocí textu, ale i schémat, situací, řezů a perspektiv prokazuje vhodnost vlastního návrhu. Řeší funkční členění, provozní podmínky, programovou náplň a zejména úlohu prostorotvorných prvků – dlažby, staveb, mobiliáře, terénu, vodního prvku a vegetace. Návrh není omezen finančními prostředky, majetkovým uspořádáním ani navrhovaným řešením, zaneseným v územním plánu.

Při grafické úpravě diplomové práce byla použita digitální katastrální mapa města Brna (zdroj ČUZK), která byla následně zpracována v programech AutoCAD, SketchUp a Adobe Photoshop.

VÝSLEDKY

Na základě podrobných analýz celého areálu Královopolské strojírny byly vybrány jednotlivé prostory, které společně vytvářejí území nově navrženého parku. Každý z nich je svým typem, programovou náplní a použitými prvky jedinečný, přesto ale vychází z konceptu, který je pro všechny společný. Koncept návrhu je mnohovrstevný. Následující text proto popisuje jednotlivé tematické celky.

1. ZACHOVÁNÍ HODNOT

Návrh staví na zachování a respektování stávajících hodnot. Jako hodnoty jsou chápány historicky hodnotné a architektonicky zachovalé budovy, industriální prvky (portálové jeřáby, železniční vlečky, torza zásobních věží), někteří jedinci stromového patra (solitéry a spontánně vzniklé sukcesní březové hájky) a plochy dlažby (vějířová mozaika a malá kostka).

Oproti tomu návrh počítá s odstraněním architektonicky nehodnotných stavebních objektů (Unimo buněk, apod.) a různě znehodnocujících přístavků. Obnova zachovalých budov i jejich případná nová podoba je čistě v rukou stavebního architekta.

2. URČENÍ NOVÝCH FUNKCÍ BUDOV

Budovy, které jsou v návrhu ponechány, vyžadují určení nové funkce tak, aby se pokryly všechny potřeby potenciálních uživatelů. Nové funkce výrazně ovlivňují typ budoucího prostoru mezi budovami a jeho program. Spektrum nových funkcí bylo inspirováno příklady ze zahraničí.

3. USMĚRNĚNÍ PROVOZU POMOCÍ DLAŽBY

Provoz je usměrněn pomocí dělicích prvků dlažby. Ty sledují členění fasád, hlavní pěší tahy a vstupy do budov. Většina zpevněných ploch je z renovovaných stávajících (malá kostka a vějířová mozaika), zbytek ploch je z pohledového betonu, betonových dlaždic a bezpečnostního povrchu. V areálu parku se vyskytují také tři menší parkoviště.

4. VEGETACE

Mimo zachovalých jedinců stávající vegetace se v prostoru vyskytují nové formy a druhy inspirované sukcesními stádii a potenciální vegetací doplněné o stanovištně a esteticky vhodné druhy (podrobný rozpis navrhovaného sortimentu je v následující kapitole a kapitole Přílohy). Záhony a plochy trávníku jsou lemovány betonovými obrubníky a cortenovým lemem.

5. VODNÍ PRVKY

Základním předpokladem pro existenci vodních prvků je přivedení vody do areálu. Nabízí se dvě možnosti řešení, popřípadě jejich kombinace. První možností je čerpání vody ze stávajících vrtů, které jsou ale kontaminované a vyžadovaly by chemickou úpravu. Druhou možností je přivedení vody z blízké Ponávky, a to buď podzemním vedením z jejich stok, nebo v případě její současné revitalizace nově vzniklým ramenem.

6. STAVBY V PROSTORU

Stavby v prostoru slouží k zlepšení pohledových a funkčních vazeb. Jsou buďto zcela nové, nebo navazují na stávající hodnotné struktury.

7. MOBILIÁŘ

Mobiliář se v celém areálu vyskytuje v mnoha formách. Stejným však zůstává materiál, a to beton a ocel s povrchovou úpravou CORTEN.

Obr. 1 Celkový návrh řešení



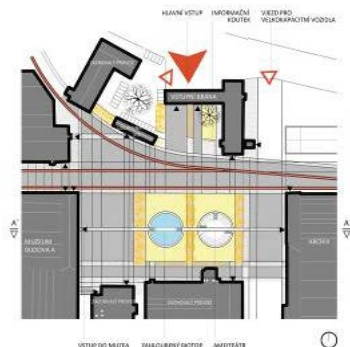
PROSTOR Č. 1

Popis: Celková kompozice hlavního vstupního prostoru je výrazně ovlivněna trasou železničních vleček, které jej ve východo-západním směru podélně protínají. Na sever od nich je provoz a program určen pohybu do areálu a z něj (parkoviště, vstup, vjezd), na jih pobytu kolem přeměněných nádrží a budovy muzea.

Torza nádrží jsou přeměněny v amfiteátr a zahlušený biotop. V polovině jsou protnuty cestou, která spojuje hlavní budovu muzea a protilehlý archiv. Cesta v případě amfiteátru zůstává na úrovni okolního povrchu, v případě biotopu klesá a umožňuje člověku přímý kontakt s vodní hladinou či pohled do vnitra biotopu. Stěny biotopu a nosná konstrukce lávky jsou z ocele s povrchovou úpravou CORTEN, zbytek je ponechán v betonu.

Oba dva objekty leží v ploše parkového trávníku. Pro zvýraznění odlišného programu jsou odděleny stromovými pásy různorodých bříz s variabilním podrostem. Pravý a střední pás tvoří dvojkmenné druhy, levý pás solitery. Ty tak zdůrazňují nastávající funkci nástupu do hlavní budovy. Zde je prostor pouze vydlážděn a opatřen mobiliárem (sedací objekty, zábrany vjezdu) tak, aby poskytoval co nejvíce místa k seskupování a shromažďování návštěvních skupin.

Obr. 2 Situace prostoru č.1



Obr. 3 Pohled od vstupu



Obr. 4 Zahloubená nádrž



Obr. 5 Průchozí biotop



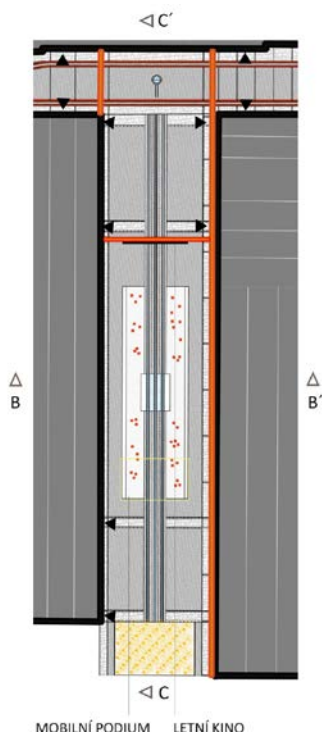
PROSTOR Č. 2

Popis: Návrh členění pobytového náměstí vychází z jeho současné dispozice a existujících prvků. Celý prostor protíná v severojižním směru trojice vodních kanálků, jež tak spojuje dva významné objekty- upravený březový hájek na jižním okraji a fontánu v plášti z parního kotle (nalezen v areálu) při severním okraji, která, ač se nachází v prostoru č. 3, funguje kompozičně i zde. Posledním formou vody v prostoru jsou vodní stříky, které se nacházejí v polovině trasy kanálků a jejich tok zde graduji. Všechny vodní prvky fungují na principu uzavřené cirkulace.

V pomyslné prostřední třetině (podél vodních stříků a kanálků) je zpevněná plocha z pohledového vymývaného betonu, která je lemována sedacími betonovými pásy. Druhou, mobilní, formou sedacích objektů jsou jednoduché duté krychlové sedáky (ocelová konstrukce z ohýbaného plechu).

Programová náplň prostoru, který leží mezi budovami muzea, je variabilní a umožňuje kreativní přístup. Může tak fungovat jako otevřený výstavní prostor, jako sezónní letní kino (s plátnem připevněným na konstrukci portálového jeřábu), nebo například jako divadlo (mobilní podium instalované nad sedacími objekty) nebo prostor pro módní přehlídku.

Obr. 6 Situace prostoru č. 2



Obr. 7 Pohled od jeřábu



Obr. 8 Letní kino



PROSTOR Č. 3

Popis: Jak již napovídá současný stav a lokalizace této plochy, je i její nově zvolená náplň orientována na aktivní pěší provoz. Jedná se propojující dopravní koridor, na který ze všech světových stran navazují další prostory. K tomuto přispívá ještě fakt, že okolní vysoká zástavba prakticky neumožňuje jakoukoli trvale udržitelnou formu vegetace. Prostor proto typově funguje jako pěší zóna v městském prostoru. Je dlouhý a výrazně lineární, a proto je v průběhu několikrát členěn.

Více než kde jinde v nově navrženém postindustriálním parku, zde prostředí formují a člení prvky dlažby. Plochy z mozaikovitě vějířovité dlažby (mezi kolejemi vlečky) a z malé kostky (2-3m podél staveb) jsou členěny pásy z betonových dlaždic, jež sledují rytmus fasád a vstupů do budov.

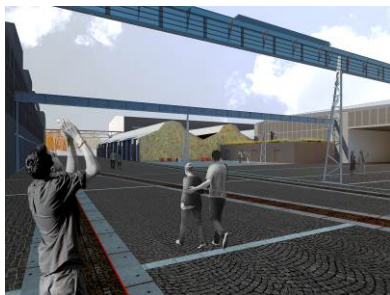
Dalším výrazným orientačním prvkem je fontána v plášti parního kotle (viz. prostor č. 2) a kavárna umístěná ve středu, u rozšířeného průchodu do prostoru č. 5. Kavárna je jak venkovní, tak vnitřní, přízemní i nadpodlažní. Její prostředí zpřijemňuje popnutá fasáda navazujícího historického objektu, jež tak současně zvýrazňuje.

Celý prostor je výrazně rozdělen portálovými jeřáby, které se zde vyskytují ve třech podobách. Na posledním z nich, který nově funguje i jako spojovací prvek muzeí, je nově umožněn přístup po venkovním schodišti z ocelové konstrukce. Pobyt na této lávce tak umožňuje pohled na areál z pačiči perspektivy.

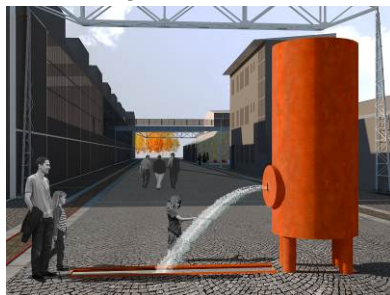
Obr. 9 Situace prostoru č.3



Obr. 10 Pohled na kavárnu



Obr.11 Vodní prvek: konverze kotle



PROSTOR Č. 4

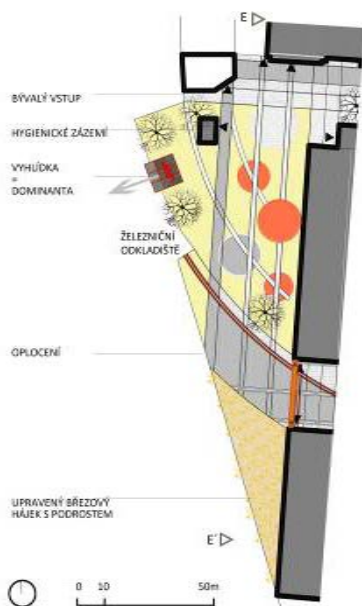
Popis: Programová i kompoziční náplň prostoru je zde koncipována jako vybidka ke hře. Proto je obvyklé pravoúhlé členění převedeno do hravé formy kruhů a oblouků. Stejně jako v prostoru č. 1 je i zde typ provozu ovlivněn trasou vlečky. Veškerá pobytová aktivita se odehrává severně nad ní. Jižně od vlečky se rovnoběžně od rohu budovy táhne hrana upraveného březového hájku s podrostem z kapradin.

Program je na sever od vlečky ještě dále rozdělen cestou ze stávající mozaiky. Napravo od ní se vyskytují již zmiňované hrací kruhy. Každý z nich nabízí spočinutí pro jinou věkovou skupinu. Jedním z kruhů s bezpečnostním povrchem je ve skutečnosti terénní modelace o výšce 1,5 m. Plocha mezi kruhy je z parkového trávníku.

Nalevo od cesty je zájem směřován k navržené dvoupodlažní ocelové konstrukci, která má umožňovat pohledovou vazbu na obytnou zástavbu Králova Pole a mimo to poukazovat na původní historické spojení (tunýlek, jež vedl pod bývalým železničním tělesem tišnovské trati a ústí v severozápadním cípu areálu). Ocelové konstrukce je práškově barvená do červena a funguje tak jako obousměrný „point se vue“. Plocha v okolí konstrukce je taktéž z parkového trávníku.

Návrh ocelové skeletové konstrukce vychází z opakovaného rozměru členění fasád průmyslových staveb (3x3m). Pochozí plocha konstrukce je z hustého tahokovu, v místě vykonzolování z tvrzeného skla (stejně jako zábradlí).

Obr. 12 Situace prostoru č. 4



Obr.13 Pohled od jihu



Obr.14 Pohled od jihu



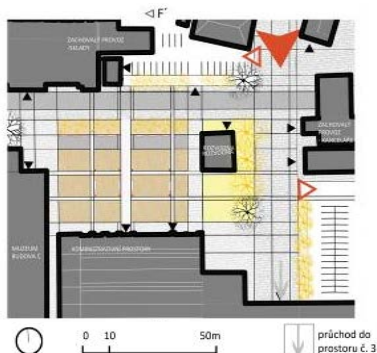
PROSTOR Č. 5

Popis: Návrh prostoru vychází z potřeby pokrytí několika funkcí, které mají skloubit jak potřebu pěšího pohybu a rekreace, tak vyřešení parkování. Z hlediska náplně okolních budov, která je převážně orientována na zachování provozu (skladu a administrativních budov) i navržení jim podobných, je pobytová část ztvárněna jako oáza klidu pro zaměstnance, ale i pro případné návštěvníky.

Zejména proto zde hraje hlavní úlohu vegetace, která vytváří kontrast k pracovnímu prostředí uvnitř budov. Od pěšího a automobilového provozu po severní a východní straně je oddělena stromovými pásy s podrostem a řadou solitér. Hlavní roli pro navození příjemného prostředí hrají záhony travin. V kombinaci s větrným a vodním živlem ve formě mlhových sloupů poskytují možnost k setrvání, poznávání, ale i procházení. To umožňuje cestní síť z vymývaného betonu. Za setmění je prostor zvýrazněn světelnými sloupky v rozích záhonu. Větší prostor k pobytu je pak umožněn na sever od záhonů pod korunami březek.

Neméně významná je funkce propojující. Díky rozšířenému průchodu je zde možnost průchodu do prostoru č. 3 (k objektu kavárny). Trasa parku je tímto ukončena a vytváří uzavřený cyklus.

Obr. 15 Situace prostoru č. 5



Obr. 17 Záhony travin



Obr. 16 Pohled od rozvodny



Obr. 18 Pohled na průchod



DISKUZE

Návrh postindustriálního parku v části areálu Královopolské strojírný je ideovou studií urbánního prostoru. Nesnaží se zlehčit problematiku regenerace brownfields, ani netvrdí, že je jediným možným řešením. Nastiňuje však způsob zhodnocení objektu, který kdysi býval nositelem tradice a kvality, ikonou města Brna s významem v nadnárodním měřítku.

Areál Královopolské strojírný patří mezi největší brownfields města Brna. Rozlohou 38 ha je srovnatelný s objekty tzv. Posvitavské průmyslové zóny a díky svému charakteristickému tvaru je snadno rozeznatelný v jakémkoli měřítku mapy. Všechny tyto jeho kvantitativní atributy s sebou ale nesou kvalitativní břemena, která potenciálně brání jeho možnosti stát se objektem zájmu regenerace brownfields.

Prvním z nich je jeho lokalizace a s ní spojené písmeno C². Není ku prospěchu věci, pokud se takto rozlehlý areál nachází na okraji zastavěného území. O to víc, pokud je obehnán bariérou dopravního tělesa z jihu i severu a jakékoli jeho napojení na okolní obytnou zástavbu je závislé na budování pěších lávek a podchodů. Není tedy divu, že se veškeré snahy o regeneraci brněnských průmyslových úhorů obracejí jiným směrem a jeho funkční využití ve stávajícím i navrhovaném územním plánu zůstává víceméně beze změny. Obdobně i napojení parku na systém zeleně a začlenění do urbanistické struktury činí jeho umístění obtížným.

Tento první problém otevírá diskusi, jak s ní naložit. Je zřejmé, že přilákat investory i uživatele do okrajové a špatně přístupné lokality je obtížným úkolem. Možným řešením by bylo otevření přístupu po trase nefunkční vlečky, jež vede z areálu směrem na jih do již přístupné obchodní zóny. Tento způsob však bude vyžadovat vnímání a plánování v širších souvislostech a naznačuje tak téma chybějící koncepce v regeneraci brownfields na území města Brna (dále v textu).

Druhým břemenem Královopolské strojírný je její obrovská rozloha a procento zastavění, které činí až 50 %. Jen těžko se na takto strukturované ploše může budovat propojovací princip veřejných prostor. Pro vznik parku či jakékoli nové urbanistické struktury by bylo nutno vypracovat asanační plán zahrnující demolici stávajících budov i infrastruktury. A to nelze bez souhlasu všech majitelů.

² Kategorizace brownfields města Brna dle Kovoprojekty (2009): písmeno C charakterizuje polohu brownfield vzhledem ke středu města, a to jako: „okrajová část, ostatní území až po hranice zastavěného území“. Areál Královopolské strojírný vykazuje i známky třídy C dle dělení CABERNET (IURS, 2010): „kategorie brownfields, která v současné době nemají řešení, ale tam kde je možné je určitou formou veřejné intervence posunout do kategorie B, veřejná podpora začíná být smysluplná a udržitelná“.

Nelze čekat, že se právě v tomto případě objeví osvícený investor, který vyřeší otázku složitých majetkových poměrů. První krok k obnově a zhodnocení prostoru bývalé brněnské pýchy, by měla udělat veřejná správa. Město Brno je navíc (dle ČUZK) vlastníkem všech volných ploch v areálu, a tak by se mohlo nechat inspirovat příkladem švýcarského Winterthuru (viz. kapitola 4. 8. 11).

K takovému jednání by ale mělo mít racionální důvod. Nikde není řečeno, že postindustriální park by měl vzniknout právě v areálu Královopolské strojírny. Pro správný výběr jeho lokality i detailního určení nových funkcí je zapotřebí celkové koncepce znovu využitých průmyslových úhorů. Její vytvoření může trvat pět let, realizace i deset až dvacet, nemluvě o časovém úseku rozhodování, který by tomu předcházel.

Řešit všechny předešlé problémy (i mnoho dalších souvisejících) není předmětem této diplomové práce. Jejím cílem je návrh ideového stavu. Pro areál Královopolské strojírny ale mluví i několik současných faktů (vyjádření majoritního vlastníka, historický význam, zachovalé industriální prvky, apod.). Společně se současnými tendencemi a plány na revitalizaci vodních toků lze doufat, že by jeho realizace byla v budoucnosti možná. Po obnově brownfields, které se nacházejí blíže centru města a leží podél vodních toků, by mohla na řadu přijít i Královopolská strojírna, jež leží v blízkosti zatrubněné Ponávky. Studie postindustriálního parku se zabývá spíše konceptuálním návratem- možností přivedení vody z přilehlých štol do navržených vodních prvků. Lze ale zvážit i možnost celkové revitalizace vodního toku, která by mohla formu i umístění vodních prvků, ne-li celý návrh, ovlivnit.

Návrh jinak pracuje se současnými podmínkami. Respektuje provozní vztahy vně i uvnitř areálu, zachovalé funkce a hodnoty a pro zvolené prostory hledá nejlepší možné řešení. Snaží se zaujmout potenciálního uživatele parku, kterým je jak obyvatel Králova Pole, návštěvník muzea, kulturně dychtivý člověk, tak i místní zaměstnanec. Typy skupin, které lze najít v již realizovaných příkladech jinde po světě. Rozdělení funkcí jednotlivých budov a ploch tak vychází z jejich požadavků a potřeb.

Areál Královopolské strojírny je velkým oříškem nejen pro představitele Brna, investory a architektky. Svou rozlohou, strukturou a obsahem nabízí možnost různorodého využití na poli ochrany industriálního dědictví, regenerace brownfields, udržitelného rozvoje a urbanismu. A jako takový vstupuje do života každého obyvatele města. Je tedy na nás, jak se k jeho rozlousknutí postavíme.

ZÁVĚR

Cílem této práce byl návrh postindustriálního parku v areálu Královopolské strojírny Brno. Sousloví „postindustriální park“ je přitom v současnosti v České republice stále více teoretickým termínem, než hmatatelnou skutečností. Realizace obdobně rozsáhlých projektů je zde v porovnání se západem teprve na začátku (pomineme-li projekt ostravských Nových Vítovic) a tak je nutno hledat inspiraci jinde. Z hlediska české zahradní a krajinné tvorby je výhodou stát na počátku a mít možnost nastolit vysokou úroveň v přeměně brownfields a dotváření urbánních prostorů.

V teoretické části se proto diplomová práce zabývala srovnáním světové a domácí situace na poli konverze průmyslových brownfields a uváděla výhradně zahraniční příklady realizací.

Samotný návrh byl vytvářen jako ideového řešení. Nebyl omezen žádnými předpisy, limity a finančními toky. Hledal nejlepší možné řešení pro danou lokalitu. Jelikož je areál Královopolské strojírny velice rozsáhlý (a jeho celostní řešení by bylo v rozsahu disertační práce), soustředil se na vybranou část, jejíž výběr odůvodnil v předcházejících analýzách.

Konkrétní prostory návrh řešil jako funkční celek, systém schopný samostatné existence, avšak s možností zachování provozu ve zbytku areálu i v samotné části postindustriálního parku. Koncept návrhu vycházel z výsledků podrobně zpracovaných analýz. Nesnažil se ohromit autorskou originalitou, ale originalitou vlastní pro areál Královopolské strojírny. Díky tomu vznikla studie přiměřená, respektující hodnoty dané lokality, vyjadřující svůj názor pomocí moderních prostředků a forem. Park splňující současné nároky společnosti, ale i jasně odkazující na kvality dob minulých.

LITERATURA

DRKOŠOVÁ, Marcela: *Brownfields a jejich opětovné využití ve městě Brně*. In: *Urbanismus a územní rozvoj*. 7 ročník 4/ 2005.: s. 2-6. Brno, Ústav územního rozvoje, 2005. ISSN: 1212-0855

RURAL DEVELOPMENT FROM THE PERSPECTIVE OF LOCAL ACTORS (CASE STUDY OF BREZNO REGION)

Máliková L., Spišiak P.

Department of Human Geography and Demogeography, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina 842 15, Slovak Republic

E-mail: malikova@fns.uniba.sk

ABSTRACT

This article is dedicated to development of rural areas from the perspective of local actors, especially local communities and mayors. Our objective was to point out the importance of these actors and their role in addressing issues related to rural development. At the beginning, a brief description and categorization of rural development actors is introduced with emphasis on the lowest - local level. The theoretical framework is supported by empirical research conducted in the region of Brezno (central part of Slovakia) that aimed to highlight perception of rural development from the perspective of local residents (based on questionnaire survey) as well as representatives - local mayors (based on expert interviews). The outputs of two partial sections of research show some differences but mostly similar features in the perception of rural development from the perspective of two different entities. Some of the most significant remarks were related to natural potential, diversification of economic activities and cooperation between local mayors and residents. Each of these views reveals various approaches to rural development, however it is important to take both parties into account, when applying theoretical knowledge into practice.

Key words: region of Brezno, rural areas, development potential, local actors

Acknowledgments: This study was supported by project VEGA 1/1247/12 „Socio-economic and cultural underexposed rural landscape as a phenomenon of activation of human geography“.

ÚVOD

Rozvoj vidieka a vidiek ako taký sú v súčasnosti veľmi aktuálnou a zaujímavou problematikou. Skutočnosť, že v rámci Slovenska dominantnú časť územia (86 %) tvoria práve vidiecke oblasti, potrebu zaoberať sa ich rozvojom ešte umocňuje. O to viac, ak ide o rurálne štruktúry so špecifickým postavením, napr. v periférnych oblastiach. Takýto vidiecky priestor predstavuje aj región Brezno so špecifickým postavením v kotlinovej krajine.

V rámci problematiky rozvoja vidieka zohrávajú významnú úlohu najmä rozvojové prístupy, nástroje ako i samotní aktéri. Práve posledná zložka sa stala predmetom nášho záujmu. Za aktérov rozvoja vidieka možno v tomto ponímaní považovať všetky subjekty (tak inštitúcie ako i jednotlivcov), ktoré sú zainteresované do rozvojových aktivít na vidieku. Binek, et al. (2009) rozlišuje podľa pôsobnosti tri hierarchické úrovne aktérov (národnú, regionálnu a lokálnu úroveň). V rámci jednotlivých úrovní ďalej rozlišuje aktérov verejného, podnikateľského a neziskového sektoru. Pre nás je relevantná práve najnižšia, lokálna úroveň. Na úrovni samotných vidieckych obcí predstavujú aktérov rozvoja vidieka samospráva, obyvatelia a podnikatelia, tiež rôzne spolky, či združenia. Práve zosúladenie činností a vzájomná spolupráca jednotlivých miestnych aktérov (predovšetkým obyvateľov a starostov) zohráva v tejto oblasti kľúčovú úlohu.

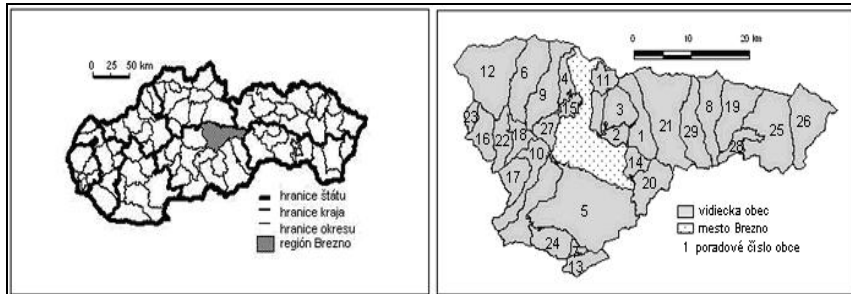
Cieľom príspevku je na príklade regiónu Brezno poukázať zvlášť na dvoch aktérov, a to miestne obyvateľstvo a starostov, ich vnímanie vidieka, postavenie pri riešení otázok spojených s rozvojom vidieka ako i potrebu vychádzať pri realizácii rozvojových zámerov z požiadaviek a postrehov oboch subjektov.

Prípadové územie

Región Brezno leží v geometrickom strede Slovenska, pričom sa tiahne v smere západ – východ. Napriek centrálnej polohe sa však z rôznych uhlov pohľadu vyznačuje niekoľkými znakmi periférnosti – či už ide o postavenie v kotlinovej krajine, mimo hlavných dopravných ťahov, alebo okrajovú polohu v rámci kraja. Ide navyše o vidiecky región, kde viac ako 50 % obyvateľov (k 31.12.2010 59 %, tj. 37 836 obyv.) žije vo vidieckych obciach s hustotou osídlenia nižšou ako 150 obyvateľov/km² (Program rozvoja vidieka SR 2007-2013). Z administratívneho hľadiska ho možno stotožniť s okresom Brezno, ktorý sa rozlohou 1 265 km² zaraďuje k najväčším okresom Slovenska. Pozostáva z jedného mesta (okresné mesto Brezno) a 29 vidieckych obcí¹, ktoré predstavujú objekt nášho výskumu (Obr. 1).

¹ 1.Bacúch, 2.Beňuš, 3.Bravácovo, 4.Bystrá, 5.Čierny Balog, 6.Dolná Lehota, 7.Drábsko, 8.Hel'pa, 9.Horná Lehota, 10.Hronec, 11.Jarabá, 12.Jasenie, 13.Lom nad Rimavicou, 14.Michalová, 15.Mýto pod Ďumbierom, 16.Nemecká, 17.Osrblie, 18.Podbrezová, 19.Pohorelá, 20.Pohronská Polhora, 21.Polomka, 22.Predajná, 23.Ráztoka, 24.Sihla, 25.Šumiac, 26.Telgárt, 27.Valaská, 28.Val'kovňa 29.Závadka nad Hronom

Obr. 1: Poloha regiónu Brezno v rámci Slovenska



Zdroj: vlastné spracovanie

MATERIÁL A METODIKA

V teoretickej časti sa pozornosť sústredila najmä na štúdium a analýzu odbornej domácej i zahraničnej literatúry týkajúcej sa problematiky rozvoja vidieka, ako i jednotlivým aktérom (zvlášť na najnižšej úrovni), ktorí sa na ňom aktívne alebo pasívne zúčastňujú. Išlo teda o spracovávanie sekundárnych dát. V empirickej časti išlo o prácu s primárnymi dátami, ktoré boli získané na základe dotazníkového prieskumu medzi miestnym obyvateľstvom a expertnými rozhovormi so starostami vidieckych obcí regiónu Brezno.

Dotazníkový prieskum sa realizoval v období október 2011 – február 2012. Spracovaných bolo spolu 137 dotazníkov, pričom respondenti boli zvolení náhodným výberom. Prieskum bol vyhodnocovaný kvalitatívne (otvorené otázky) i kvantitatívne (otázky s výberom odpovede) za vidiek ako celok (nie za jednotlivé obce), avšak s ohľadom na špecifiká tej ktorej oblasti študovaného regiónu. Vzhľadom na rozsiahlosť sledovaného územia, zámerom nebolo obsiahnuť percentuálne reprezentatívnu vzorku za každú obec, ale predstaviť názory určitej vzorky obyvateľstva z rôznych častí regiónu, podobne ako pri kvalitatívnom výskume vo všeobecnosti nejde o reprezentatívnosť respondentov, ale reprezentáciu údajov (Rochovská et al., 2007). Metodika, štruktúra otázok, či spôsob samotného vyhodnocovania dotazníkového prieskumu v podobne zameraných štúdiách, boli inšpiráciou aj pri tvorbe dotazníkového prieskumu v regióne Brezno. Išlo predovšetkým o štúdie autorov Spišiak, 2001; Sharpley – Vass, 2005; Džupinová et al., 2008; Spišiak et al., 2009; Oremusová, 2009; Binek et al., 2010; Chromý et al., 2011.

Druhú časť praktického výskumu tvorili rozhovory s predstaviteľmi miestnych samospráv (spolu 17 zrealizovaných rozhovorov). Z hľadiska formy išlo o pološtruktúrované interview². Porovnaním výsledkov oboch parciálnych častí sme dospeli k odhaleniu spoločných i rozdielnych črt vo vnímaní vidieka a jeho rozvoja z pohľadu obyvateľov i starostov.

² V pološtruktúrovanom interview nie sú stanovené presné otázky, ale len akási kostra, resp. tematické okruhy, pričom počas voľne prebiehajúceho rozhovoru vyplývajú zo situácie mnohé ďalšie otázky (Rochovská et al., 2007).

V neposlednom rade boli cenným zdrojom vlastné poznatky autora získané z predchádzajúcich štúdií v rámci problematiky rozvoja vidieka (Máliková - Charvát, 2010; Máliková 2011). Vo vzťahu k skúmanému územiu je tiež potrebné zdôrazniť, že autor pri štúdiu konkrétne zvolenej oblasti vychádza z pozície tzv. „insidera“³.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzhľadom na rozsiahlosť problematiky rozvoja vidieka sme sa v dotazníkovom prieskume zamerali na 7 tematických okruhov, ktoré zastrešujú akoby základný rámec:

I Bývanie a kvalita života v obci (otázky 1 - 10)

II Verejná doprava a dopravná infraštruktúra (otázky 11 - 14)

III Kvalita a sortiment obchodu a služieb (otázky 15 – 20)

IV Zdravotná a sociálna starostlivosť (otázky 21 – 22)

V Pracovné príležitosti (otázky 23 – 26)

VI Aktivity a verejný život v obci (otázky 27 – 33)

VII Rozvoj obce (otázky 34 – 38)

V rámci jednotlivých okruhov sa respondenti vyjadrovali k 11 otázkam slovné, kde prezentovali vlastné názory a postrehy, ostatné otázky boli formulované s vopred daným výberom odpovedí. Respondenti boli ďalej špecifikovaní podľa socioekonomickej štruktúry na základe pohlavia, veku, vzdelania, dĺžky bývania v danej obci a zamestnania, resp. statusu respondenta vo vzťahu k ekonomickým činnostiam.

Z vyhodnotenia dotazníkového prieskumu medzi obyvateľstvom vidieckych obcí regiónu Brezno nám v rámci jednotlivých okruhov vyplynulo niekoľko záverov⁴:

- I. Prevažná časť respondentov (66 %) vyjadrila spokojnosť so životom na vidieku, pričom ako najväčšie pozitíva, resp. výhody uvádzali čistejšie životné prostredie, pokojnejší život v porovnaní s mestom a lepšie medziľudské vzťahy. Takmer ¼ zaujala neutrálny postoj a 10 % vyjadrilo nespokojnosť. Ako príčinu uvádzali najmä nedostatok pracovných príležitostí, nevyhovujúcu infraštruktúru či nedostatočný rozsah poskytovaných služieb. Na druhej strane, spokojnosť vyjadrovali predovšetkým s reálnymi výsledkami aktivít v obci ako napr. rekonštrukcia námestia, školy, obnova verejných priestranstiev, vybudovanie kanalizácie a pod.

³ Výskumník môže nadobúdať dve pozície - outsider (človek „z vonku“) a insider („zasvätený do problému“), teda ten, ktorý sa respondentom v mnohých oblastiach podobá (Dowling (2000) In Rochovská et al., 2007).

⁴ Vzhľadom na obsiahlosť výsledkov získaných z dotazníkového prieskumu sú v tejto štúdií uvedené len tie najvýznamnejšie

- II. Pri hodnotení dopravy a dopravnej infraštruktúry sa ukázalo, že takmer 1/2 respondentov je so súčasným stavom cestnej infraštruktúry nespokojných, z čoho následne vyplýva aj nespokojnosť s dopravným spojením (26 % pri autobusovej a viac než 1/2 pri vlakovej doprave)
- III. Kvalitu a sortiment obchodu a služieb hodnotila väčšina respondentov ako priemernú, pričom značné rozdiely boli u menších obcí s prevažne základnými obchodmi a službami v porovnaní s obcami s pestrejším sortimentom a rôznymi službami. Tento fakt vyplýva zo skutočnosti, že s rastúcou veľkosťou obce sa spravidla zvyšuje aj rôznorodosť služieb.
- IV. Rozsah poskytovanej zdravotnej a sociálnej starostlivosti v jednotlivých vidieckych obciach možno na základe vyjadrení väčšiny respondentov zhodnotiť neutrálne (39 %) až negatívne (38 %). Dôvodom je opäť spravidla úmerný vzťah medzi veľkosťou obce a rozsahom poskytovanej zdravotnej a sociálnej starostlivosti.
- V. Zhodnotenie pracovných príležitostí, ktoré predstavujú (nielen na vidieku) jeden z hlavných faktorov rozvoja, vzišlo z prieskumu negatívne, keďže väčšina respondentov vníma situáciu na trhu práce nepriaznivo nielen pokiaľ ide o situáciu v jednotlivých obciach (86 %), ale i v celom okrese (76 %). Medzi návrhmi pracovných príležitostí, ktoré by jednotliví obyvatelia v obciach privítali dominovali služby, cestovný ruch, tradičné remeslá, či znovuoobnovenie priemyselnej výroby v bývalých prevádzkach.
- VI. Z otázok týkajúcich sa aktivít a verejného života v obci vyplynulo, že napriek realizácii rozličných športových a kultúrnych podujatí sa do diania v obci zapája pravidelne len 17 % opýtaných a takmer 1/2 sa nezapája vôbec. Tieto výsledky sú zaujímavé najmä z toho pohľadu, že hoci respondenti v ďalšej časti uvádzali ako jedno z negatív rozvoja vidieka práve nezaujímavosť obyvateľov a vecí verejných a o dianie v obci, v praxi sa žiaľ (na základe zaznamenaných odpovedí) nesnažia túto bariéru odstrániť.
- VII. Tematický okruh týkajúci sa priamo rozvoja obce umožnil respondentom vyjadriť svoje postrehy k otázkam smerovania rozvoja ich obce, resp. regiónu Brezno. Medzi faktory prispievajúce k rozvoju vidieka uviedli najmä skvalitnenie dopravnej infraštruktúry, rozvoj služieb, lepšiu spoluprácu samosprávy s občanmi a vznik nových pracovných príležitostí. Za negatívne pôsobiace označili zlý stav cestných komunikácií, nezaujímavosť mladých o dianie v obci, nechota a neschopnosť obyvateľov spolupracovať či nedostatok finančných prostriedkov. Zaujímavé bolo vnímanie najlepších rozvojových možností v sledovanom regióne z pohľadu respondentov. Tie vidia predovšetkým v rozvoji cestovného ruchu (37 %), v podpore malého a stredného podnikania (27 %) a v súčasnosti čím ďalej tým viac sa rozvíjajúceho agroturizmu (20 %). Skutočnosť, že aj samotní obyvatelia si uvedomujú význam diverzifikácie ekonomických činností na vidieku deklaruje len 15 %-ný podiel respondentov, ktorí ako najlepšiu možnosť rozvoja uviedli práve poľnohospodárstvo.

Druhú časť empirického výskumu tvorili rozhovory so starostami vidieckych obcí v sledovanom regióne. Obsah rozhovorov sa dotýkal rôznych aspektov v rámci problematiky rozvoja vidieka – postavenie štátu k rozvoju vidieka, faktory a limity tohto rozvoja, rozvojový potenciál a možnosti obcí, spolupráca miestnych aktérov, aktivity v rámci mikroregionálnych združení, vypracovanie rozvojových dokumentov, realizované a plánované projekty. Zaujímavou skutočnosťou bolo zistenie, že hoci boli rozhovory zrealizované v obciach z rôznych častí regiónu, názory ich predstaviteľov sa v mnohých kľúčových otázkach (napríklad identifikácia faktorov a limit rozvoja vidieka) zhodovali.

Ako hlavné faktory nevyhnutné pre rozvoj vidieka uviedli starostovia najmä tieto:

- vzájomná spolupráca miestnych aktérov (13)
- ľudský faktor – správne vedenie samosprávy, angažovanosť miestnych obyvateľov, mladí ľudia (13)
- pracovné príležitosti (7)
- financie (4)
- infraštruktúra (dopravná, technická, infraštruktúra služieb) (4)

Pri uvádzaných limitách rozvoja vidieka starostovia vychádzali z reálnej situácie a postavenia obce v sledovanom regióne. Tie sú v konečnom dôsledku akoby protikladom vyššie uvedených faktorov:

- nedostatočná angažovanosť miestnych aktérov, nedostatok spolupráce („každý si kope a svojom piesočku“) (14)
- nedostatok financií, obecných prostriedkov najmä u malých obcí (9)
- nedostatok pracovných príležitostí a z toho plynúca vysoká nezamestnanosť (7)
- veľkoplošná ochrana na území obce bráni stavebnej a priemyselnej činnosti, teda jej ďalšiemu rozvoju (3)
- absencia infraštruktúry, resp. jej nedostatočná úroveň (3)
- odliv mladých ľudí z regiónu (5)

Binek, et al. (2010) uvádza, že vo všeobecnosti sa hlavné rozvojové priority u jednotlivých aktérov nelíšia a obyvatelia ako i starostovia vidieckych obcí sa skôr orientujú na realizáciu tzv. „tvrdých projektov“, teda takých, ktorých výsledky sú viditeľné (napr. riešenie problémov s technickou infraštruktúrou). Túto skutočnosť potvrdili aj výsledky empirického výskumu realizovaného v regióne Brezno, na základe ktorých možno poukázať na niekoľko zaujímavých skutočností:

- Obyvatelia i predstavitelia obcí za najväčší potenciál vidieka regiónu Brezno považujú predovšetkým peknú prírodu a čisté životné prostredie ako dôležitý predpoklad rozvoja

cestovného ruchu.

- Z hľadiska limití vidieckych obcí v sledovanom regióne vzišli z oboch pohľadov najmä nedostatok pracovných príležitostí a nevyhovujúci stav technickej a dopravnej infraštruktúry.
- Obyvatelia i starostovia obcí sú si vedomí rozvojového potenciálu i nedostatkov, ktorými daná obec disponuje, pričom ich vyjadrenia v súvislosti s faktormi rozvoja vidieka sú v zásadných bodoch identické. V oboch prípadoch vystupuje význam ľudského faktora a potreba intenzívnejšej medziobecnej spolupráce (zvýšenie záujmu o veci verejné, zapájanie mladých ľudí).
- Podľa vyjadrení respondentov sú obyvatelia pomerne dostatočne informovaní o dianí v obci, avšak na jej aktivitách participuje len asi 1/2 z nich, čo je z pohľadu starostov nedostatočné.
- Z hľadiska existujúcich väzieb možno identifikovať napojenie na extrarurálne štruktúry či už v rámci sledovaného regiónu (mesto Brezno) alebo v náväznosti na susediace okresy, kde tieto väzby majú rôzny charakter - dochádzka za prácou, do škôl, za nákupmi, u ukrajových obcí regiónu možno sledovať aj väzby na základe kultúrnych a športových aktivít s obcami mimo sledovaného vidieckeho priestoru.
- Realizované projekty (či už samotných obcí alebo v rámci mikroregionálnych združení) reagujú na základné požiadavky a potreby zo strany občanov, týkajúc sa najmä budovania technickej infraštruktúry a revitalizácie obce.
- Pri stanovení rozvojových možností sa obyvatelia i starostovia zhodli v tom, že najlepšie podmienky sú v regióne pre rozvoj cestovného ruchu, zvlášť agroturizmu či rozvoj malého a stredného podnikania. Potenciál vidia aj v znovuoobnovení bývalých prevádzok (zväčša priemyselného zamerania) vo vidieckych obciach a podpore tradičnej remeselnej výroby.

ZÁVER

V rámci problematiky rozvoja vidieka možno identifikovať rôzne skupiny aktérov. Keďže výsledky jednotlivých aktivít, a teda skutočný rozvoj vidieka sa realizuje na miestnej úrovni, je potrebné zdôrazňovať najmä význam lokálnych aktérov, zvlášť obyvateľov a starostov. Ľudia žijúci na vidieku totiž najlepšie poznajú jeho silné a slabé stránky a predstavujú tak dôležitých aktérov, ktorých nápady a návrhy by nemali ostať nepovšimnuté, ale naopak, mali by byť neodmysliteľnou súčasťou tvorby rozvojových stratégií ako i jej samotnej realizácie. Možno teda tvrdiť, že ľudský faktor predstavuje jeden z najdôležitejších prvkov trvalej udržateľnosti rurálnych systémov (Spišiak et al., 2005). Výstižne to zachytil Dr. Marko Koščák⁵, keď sa vyjadril nasledovne:

⁵ Geogram inžinier a plánovač rozvoja vidieka v Slovinsku

"Je nebezpečné pridržať sa prístupu kopírovanie/vkladanie (copy/paste approach) ... je potrebné ísť na miestnu úroveň - vidieť, navštíviť a rozprávať sa s miestnymi ľuďmi . pochopiť ich situáciu a zistiť, čo je potrebné, aby sa navrhované projekty či myšlienky čo najlepšie prispôbili novým (miestnym) pomerom"

Percepciu vidieka a jeho samotného rozvoja z pohľadu miestneho obyvateľstva i samotného vedenia obce sme sledovali na príklade regiónu Brezno. Porovnanie postrehov týchto dvoch aktérov ukázalo, že ich názory sa v mnohých kľúčových oblastiach zhodovali, predovšetkým pri zhodnotení faktorov a limit rozvoja alebo návrhu konkrétnych rozvojových možností na vidieku. To len potvrdzuje skutočnosť, že obaja aktéri majú pri rozvoji vidieka významnú úlohu, zvlášť ak jeho realizácia vychádza z ich vzájomnej spolupráce.

LITERATÚRA

BINEK, J. - SVOBODOVÁ, H. - HOLEČEK, J. - GALVASOVÁ, I. - CHABIČOVSKÁ, K. (2009): *Synergie ve venkovském prostoru – Aktéři a nástroje rozvoje venkova*. 1. VYD. BRNO: GAREP PUBLISHING, 2009. 96 S. ISBN 978-80-904308-0-8.

BINEK, J. - SVOBODOVÁ, H. - HOLEČEK, J. - GALVASOVÁ, I. - CHABIČOVSKÁ, K. (2010): *Synergie ve venkovském prostoru – Přístupy k řešení problémů rozvoje venkovských obcí*. 1. vyd. Brno: GaREP Publishing, 2010. 120 s. ISBN 978-80-904308-4-6.

CHROMÝ, P. - JANČÁK, V. - MARADA, M. - HAVLÍČEK, T. (2011): *Venkov – žitý prostor: regionální diferenciacie percepcie venkova představiteli venkovských obcí v Česku*. Geografie, 116, č. 1, s. 23–45.

DŽUPINOVÁ, E. - HALÁS, M. - HORŇÁK, M. - HURBÁNEK, P. - KÁČEROVÁ, M. - MICHNIAK, D. - ONDOŠ, S. - ROCHOVSKÁ A. (2008): *Periférnosť a priestorová polarizácia na území Slovenska*. Bratislava: Geografika, 2008. 183 s. ISBN 978-80-89317-06-6.

EU Rural Review: Rural diversity. [online]. Luxembourg: European Network for Rural Development, 2010, No.3. p. 36-44. [cit. 2012-01-03]. ISSN 1831-5267. Dostupné na: http://enrd.ec.europa.eu/app_templates/filedownload.cfm?id=3E3F4C22-0331-99A3-AD5F-C25FF369EF68

MÁLIKOVÁ, L. - CHARVÁT, T. (2010): Rozvojový potenciál obce Závadka nad Hronom. In *Zborník recenzovaných príspevkov*. Študentská vedecká konferencia 28. 4. 2010. Bratislava: Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, 2010. ISBN 978-80-223-2819-7, s. 941-946.

MÁLIKOVÁ, L. (2011): Možnosti rozvoja vidieka na Slovensku (prípadová štúdia víťazných obcí súťaže Dedina roka 2009). In *Zborník recenzovaných príspevkov*. Študentská vedecká konferencia 27. 4. 2011. Bratislava: Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, 2011. ISBN 978-80-223-3013-8. s. 1456-1461.

OREMUSOVÁ, D., (2009): *Geografické aspekty regionálneho rozvoja mikroregiónu Termál*, Nitra: UKF, Fakulta prírodných vied, 2009.146 s. ISBN 978-80-8094-556-6.

Program rozvoja vidieka SR 2007-2013. [online]. 2007. [cit. 2012-01-03]. Dostupné na internete:

ROCHOVSKÁ, A., BLAŽEK, M., SOKOL, M. (2007): Ako zlepšiť kvalitu geografie: o dôležitosti kvalitatívneho výskumu v humánnej geografii. In *Geografický časopis*, 2007, roč. 59, č. 1, s. 323-358.

SHARPLEY, R. - VASS, A. (2006): Tourism, farming and diversification: An attitudinal study. In *Tourism Management*. ISSN: 0261-5177, 2006, Vol. 27, p. 1040–1052. THE LEADER APPROACH - a basic guide. 2006. European Communities, 28s. ISBN 92-79-02044-7.

SPIŠIAK, P. (2001): Účasť verejnosti na tvorbe rozvojových dokumentov obcí a regiónov (Prípadová štúdia mikroregiónu Javorina). In *Životne prostredie*. 2001, č.1, s. 37-41.

SPIŠIAK, P. (2005): Rozvoj vidieka v mikroregionálnych štruktúrach Slovenska. *Acta Facultatis Rerum Naturalium, Geographica, Supplementum Nr.3*, Bratislava.s.567-573. ISBN 80-223-2144-3.

SPIŠIAK, P. - KULLA, M. - NESTOROVÁ-DICKÁ, J. (2009): Vybrané aspekty kvality života v obciach Regionálneho združenia obcí Hornád. In *Geografické informácie*. 2009, č.12, UKF, Fakulta prírodných vied, Katedra geografie a regionálneho rozvoja, Nitra, ISBN 978-80-8094-541-1. s. 324-333.

THE CURRENT STATE OF SUBURBANIZATION IN BRNO HINTERLAND

SOUČASNÝ STAV SUBURBANIZACE V ZÁZEMÍ MĚSTA BRNA

Pákozdiová M., Křenovská I., Žitňáková J.

Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: 1Meryl@seznam.cz

ABSTRACT

The objective of the research is the evaluation of the landscape changes. The observed changes originated over the last 20 years. Our studied area consists of 94 municipalities located within a circle of 15 km long radius from the borders of the city of Brno. From the point of methodology the statistical and other hard data, own field survey and remote sensing photographs study, methodological survey based on facebook conversation and email conversation and interviews with mayors and/or members of municipal council were used. Our preliminary results have shown that the Brno surroundings can be divided into few areas where the attractiveness of natural environment plays a big role. Concerning this in Brno the northern semicircle is more favourable, containing predominantly rugged landscape with a higher share of forest land and involving an attractive area linked to the Brno Dam and the Moravian Karst. The southern part, open to lowland and predominantly surrounded by agricultural land, followed next. The crucial factors for suburbanization advance are the transportational accessibility, attractiveness of landscape, presence of natural barriers and last but not least the willingness of municipal mayors to support the suburban development.

Key words: suburbanization, suburbanized countryside, landscape changes

Acknowledgments: This paper is based on results of the project called *Landscape changes at the periphery of large-sized cities. Is suburbanized countryside still countryside?* The project was carried out with the support of Internal Grant Agency of Mendel University in Brno.

ÚVOD

V dnešní době velice diskutovaný fenomén suburbanizace ve velké míře ovlivňuje a mění životní prostředí a krajinu v zázemí velkých a středních měst. Proces suburbanizace do dnešní doby změnil okolní venkovské obce natolik, že můžeme mluvit o suburbanizovaném venkově. Proces suburbanizace s sebou ale přináší velkou spoustu problémů a rizik. Suburbanizace má výrazný vliv na životní prostředí. Ovlivňuje živou i neživou složku krajiny, mění krajinnou matici i celkový krajinný ráz. Krajina je konzumována a fragmentuje se. Neméně významný je vztah suburbanizace a sociálního prostředí. Hrozbou je migrace specifických vzdělanostních a věkových skupin obyvatel do zázemí velkých měst či konflikty novousedlíků se starousedlíky. Další skupina problémů souvisí s dopravou. Je třeba zmínit individuální dopravu, která suburbanizaci původně umožnila. Prudce stoupají počty automobilů, směřující každé ráno do města a večer zpět. Jejich množství způsobuje vzrůstající exhalace, hluk, zápach, nebezpečí nehod. Navíc mnoho silnic není dimenzováno na takové množství dopravních prostředků. Jiným aspektem je urbanistická a architektonická hodnota nových suburbií, která je zcela nekompatibilní s venkovem a okolní krajinou. Architektonické řešení typových subúrbánních domů je rovněž značně sporné.

Výše nastíněné problémy rozhodně nepředstavují kompletní výčet a jasně dokazují důležitost studia suburbanizačního procesu jako jednoho z hlavních faktorů přetváření obrazu naší krajiny.

MATERIÁL A METODIKA

Sledované území je tvořeno celkem 94 obcemi, které se nachází v okruhu 15 km od hranic města Brna. Toto zájmové území bylo rozděleno dle světových stran na oblast Sever, oblast Jih, oblast Východ a oblast Západ. Změny krajiny byly posuzovány v rozpětí posledních 20 let. Z metodologického hlediska bylo pro hodnocení krajinných změn a sociální struktury obcí využito kombinace statistických dat, vlastního terénního výzkumu, hodnocení snímků dálkového průzkumu Země. Dále proběhly rozhovory se zástupci obcí a průzkum veřejného mínění s využitím sociální sítě Facebook. Na základě statistických dat, dostupných na serveru Českého statistického úřadu, byla vymezena základní kritéria k posouzení stupně suburbanizace sledovaného území. Údaje byly přepočteny na 1000 obyvatel a následně byla pro každou skupinu stanovena kritická hodnota pro posouzení reálné změny vlivem suburbanizace.

Jednalo se o následující kritéria:

- Změna počtu obyvatel → nárůst o více jak 50 obyvatel mezi lety 2001–2011
- Dokončené byty → nárůst o více jak 30 bytů mezi lety 2001–2010
- Počet vysokoškoláků → nárůst o více jak 80 vysokoškoláků

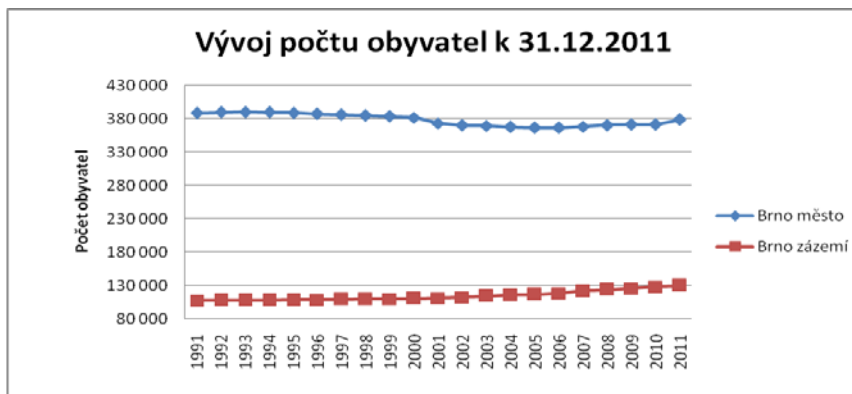
- Změny plochy orné půdy → zmenšení výměry o 1,67 ha mezi lety 2001–2010
- Změna plochy zastavěného území → zvětšení výměry o více jak 0,30 ha mezi lety 2001–2010

Z celkového počtu 94 obcí splňovalo všech 5 kritérií 31 obcí, 25 obcí splňuje 4 kritéria, 15 obcí splňuje 3 kritéria, 16 obcí splňuje 2 kritéria, 5 obcí pouze 1 kritériem a zbylé 2 obce nespĺňují žádné z kritérií. V celkem 40 vybraných obcí byl poté proveden detailní terénní průzkum, jehož cílem bylo pořízení fotodokumentace, rozhovory s představiteli obcí a hlavně komparace statistických dat se samotným terénním pozorováním.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Suburbanizaci můžeme chápat jako proces přesunu obyvatel, jejich aktivit a některých funkcí z jádrového města do zázemí. Proto se výzkum nejdříve zaměřil na analýzu vývoje stavu obyvatelstva. Následující graf zobrazuje vývoj počtu obyvatel ve sledovaném území za období 1991–2011.

Graf 1 Vývoj počtu obyvatel k 31.12.2011. Zdroj dat ČSÚ. Graf vytvořila Jana Žitňáková.



K 31. 12. 2011 žilo na území Brna-města celkem 378 965 obyvatel. Počet obyvatel se od roku 1961 do roku 1991 trvale zvyšoval. V uplynulých 20 letech ale dochází k postupnému úbytku a to nejen vlivem nepříznivého vývoje přirozeného přírůstku, ale i záporným saldem migrace. Za sledované období 1991–2011 vznikl záporný přirozený přírůstek, který tvořila hodnota -9 118 obyvatel, přírůstek migrací byl také záporný a tvořila ho hodnota -3 524 obyvatel. Celkem tak došlo k poklesu obyvatel o víc než 12 600 osob. V zázemí města Brna naopak počet obyvatel od roku 1991 trvale roste.

V zázemí města Brna zaznamenaly největší nárůst obyvatel obce v oblasti Jih a to Popůvky (o 131 %) a Moravany (o 105 %), Rebešovice (o 95 %), Popovice (o 59 %), Otmarov (o 54 %), Troubsko (o 53 %). V oblasti Sever došlo k nejvyššímu nárůstu počtu obyvatel v obci Rozdrojovice (o 93 %),

Kanice (o 90 %), Bílovice nad Svitavou (o 76 %), Česká (o 73 %), Svinošice (o 51 %) a v obci Březina (o 50 %).

Jedním z nejvýznamnějších projevů suburbanizace je stavební aktivita, která může být jak rezidenční, tak komerční. Intenzita bytové výstavby v období 2001–2011 byla pro potřeby výzkumu přepočtena na počet bytů na 1000 obyvatel. Souhrnně bylo ve sledovaném území v časovém období 2001–2011 dokončeno celkem 24 500 bytů. Z toho 64,4 % bytů připadalo na město Brno. Největší počet dokončených bytů byl zaznamenán v obci Popůvky, dále v obcích Moravany, Rebešovice, Kanice a Česká. Brno se při přepočtu na 1000 obyvatel umístilo na 64. místě s počtem 42,6 dokončených bytů.

Tabulka 1 Obce s největší intenzitou bytové výstavby. Zdroj dat ČSÚ. Tabulku vytvořila Jana Žitňáková.

Pořadí	Obec	Dokončené byty v období 2001 - 2011		Pořadí	Obec	Dokončené byty v období 2001 - 2011	
		Celkem	na 1000 obyvatel			Celkem	na 1000 obyvatel
1.	Popůvky	300	342,1	11.	Lesní Hluboké	25	139,1
2.	Moravany	397	239,7	12.	Syrovice	162	134,6
3.	Rebešovice	147	220,7	13.	Troubsko	236	128,0
4.	Kanice	130	200,6	14.	Otmarov	28	126,2
5.	Česká	153	194,9	15.	Modřice	506	122,8
6.	Bukovinka	64	170,3	16.	Vohančice	18	120,3
7.	Bílovice nad Svitavou	452	165,2	17.	Řícmanice	76	116,7
8.	Březina (dříve okres Blansko)	104	151,5	18.	Ostopovice	164	112,3
9.	Rozdrojovice	106	151,4	19.	Habrůvka	40	112,2
10.	Zbýšov	68	142,1	20.	Sokolnice	214	112,2

Tabulka 2 Obce s největším počtem dokončených bytů. Zdroj dat ČSÚ. Tabulku vytvořila Jana Žitňáková.

Pořadí	Obec	Dokončené byty v období 2001 - 2011		Pořadí	Obec	Dokončené byty v období 2001 - 2011	
		Celkem	na 1000 obyvatel			Celkem	na 1000 obyvatel
1.	Brno	15774	42,6	11.	Mokrá- Horákov	195	72,9
2.	Kuřim	1048	107,8	12.	Újezd u Brna	185	63,5
3.	Modřice	506	122,8	13.	Ostopovice	164	112,3
4.	Šlapanice	458	68,8	14.	Syrovce	162	134,6
5.	Bílovice nad Svitavou	452	165,2	15.	Česká	153	194,9
6.	Moravany	397	239,7	16.	Rebešovice	147	220,7
7.	Popůvky	300	342,1	17.	Střelice	147	55,8
8.	Rosice	268	49,2	18.	Drásov	134	105,9
9.	Troubsko	236	128,0	19.	Kanice	130	200,6
10.	Sokolnice	214	112,2	20.	Adamov	124	25,5

Z hlediska hodnocení intenzity bytové výstavby se obce s největší intenzitou bytové výstavby nachází v oblastech Sever (9 obcí: Kanice, Česká, Bukovinka, Bílovice nad Svitavou, Březina – okres Blansko, Rozdrojovice, Vohančice, Řícmanice a Habrůvka) a Jih (9 obcí: Popůvky, Moravany, Rebešovice, Syrovce, Troubsko, Otmarov, Modřice, Ostopovice a Sokolnice). Další leží v oblasti Východ (Zbýšov) a 1 v oblasti Západ (Lesní Hluboké).

Z hlediska hodnocení počtu dokončených bytů se obce s největším počtem dokončených bytů nachází v oblastech Sever (6 obcí: Kuřim, Bílovice nad Svitavou, Česká, Drásov a Adamov) a Jih (10 obcí: Modřice, Moravany, Popůvky, Troubsko, Sokolnice, Újezd u Brna, Ostopovice, Syrovce, Rebešovice a Střelice). V oblasti Východ se nachází obce 2 (Šlapanice a Mokrá-Horákov) a v oblasti Západ 1 (Rosice). Samostatně pak stojí město Brno.

Protože sociální skladba obyvatel obcí v zázemí velkých měst je ovlivňována nově přistěhovanými, byl jako třetí zvolený ukazatel suburbanizace stanoven počet vysokoškoláků. Obecně se dá říct, že nově přistěhovalí jsou zastoupeni zejména mladými rodinami s vyšším sociálním statusem, který představuje vyšší příjmy a vyšší dosažené vzdělání. Ve vybraných obcích jsme sledovali změnu vysokoškolsky vzdělaného obyvatelstva v letech 2001 a 2011. Následující tabulka ukazuje obce s nejvyšším nárůstem počtu vysokoškoláků.

Tabulka 3 Obce s nejvyšším nárůstem počtu vysokoškoláků. Zdroj dat ČSÚ. Tabulku vytvořila Jana Žitňáková.

Pořadí	Obec	Nárůst mezi lety 2001 a 2011 v %	Pořadí	Obec	Nárůst mezi lety 2001 a 2011 v %
1.	Popůvky	854,2	11.	Lesní Hluboké	237,5
2.	Zbýšov	533,3	12.	Sokolnice	236,5
3.	Syrovice	359,4	13.	Nebovidy	227,3
4.	Březina (dříve okres Blansko)	328,6	14.	Kanice	220,5
5.	Bukovinka	323,1	15.	Kobylnice	214,7
6.	Hostěnice	311,1	16.	Habrůvka	200,0
7.	Moravany	303,2	17.	Hostěrádky- Rešov	190,0
8.	Otmarov	300,0	18.	Popovice	183,3
9.	Hajany	277,8	19.	Lažánky	181,8
10.	Rozdrojovice	273,2	20.	Bukovina	180,0

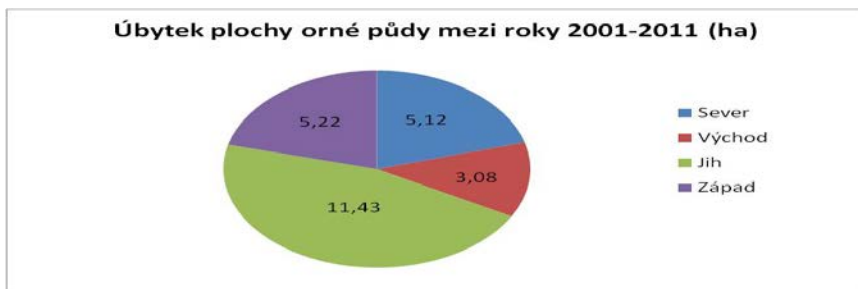
Největší nárůst počtu vysokoškolsky vzdělaného obyvatelstva zaznamenala obec Popůvky, kde došlo ke zvýšení o téměř 855 %. Nejmenší nárůst zaznamenalo město Brno, kde se počet vysokoškoláků zvýšil o 30 % a potom obce v oblasti Západ. Při porovnání 20 obcí s nejnižším nárůstem by tuto oblast zastupovaly obce Domašov, Kratochvilka, Javůrek, Omice, Říčky, Veverská Bítýška a Rosice. Z oblasti Sever to jsou Adamov, Křtiny, Lipůvka, Moravské Knínice, Říčmanice. Z oblasti Východ Šlapanice, Jiříkovice a Blažovice. V oblasti Jih nám poté zůstávají obce Střelice, Ořechov, Ostopovice a Telnice s nejnižším nárůstem počtu vysokoškolsky vzdělaného obyvatelstva.

Nejvíce obcí s nárůstem počtu vysokoškoláků opět spadalo do jižní oblasti (Popůvky, Syrovice, Moravany, Otmarov, Hajany, Sokolnice, Nebovidy, Popovice). Ze severní oblasti to jsou obce Březina, Bukovinka, Rozdrojovice, Kanice, Habrůvka a Bukovina. Do západní oblasti spadají Lažánky a Lesní Hluboké a do východní obce Zbýšov, Hostěnice, Kobylnice a Hostěradky – Rešov s největším nárůstem počtu vysokoškolsky vzdělaných obyvatel.

„Suburbanizace v sobě nese kromě kvantitativních charakteristik růstu suburbí i znaky kvalitativní přeměny fyzického a sociálního prostředí předměstských oblastí.“ (Ouředníček, 2002:39) Doprovodným jevem suburbanizace jsou tedy viditelné (i neviditelné – zvýšená prašnost, vyšší hluk, změna místních hydrologických podmínek – především zvýšený výpar a zvýšení teploty v dané lokalitě a zvýšený povrchový odtok a s ním spojená možnost zaplavení části obce aj.) změny krajiny, jednak změny land use/struktury pozemků, zábory zemědělské půdy

pro výstavbu, anebo také změny krajinného a venkovského rázu (charakteru). Chuman a Romportl (2008) v publikaci *Suburbanizace.cz*, která vznikla jako součást projektu s názvem: „Suburbánní rozvoj, suburbanizace a Urban sprawl v České republice: omezení negativních důsledků na životní prostředí“ na půdě Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity v Praze, shrnují procesy, ke kterým dochází v krajině pod vlivem suburbanizace do následujících bodů: ovlivnění živé složky krajiny (biodiverzity); ovlivnění neživé složky krajiny (reliéfu, půdy, vody, ovzduší); konzumace krajiny a změna krajinné matrice; změny krajinného rázu. V našem výzkumu byla však zatím rozhodující tato dvě kritéria: změna plochy orné půdy a změna plochy zastavěného území. Vzhledem k rozdílné výměře zájmových oblastí Sever, Jih, Východ a Západ byly jednotlivé údaje pro potřeby relativního porovnání přepočteny na 1000 ha. Co se týká změny plochy orné půdy, největší úbytek orné půdy byl zaznamenán v oblasti Jih a to celkem o 245,39 ha, což představuje ztrátu 11,43 ha na 1000 ha půdy. Právě v oblasti Jih došlo i k největšímu nárůstu zastavěné plochy (graf 3) – a to zejména na úkor orné půdy. Tento fakt je o to více znepokojivý z toho důvodu, že právě na jihu se obecně vyskytují jedny z našich neúrodnějších půd a jejich zábor tak představuje velkou ztrátu pro potřeby produkce potravin a ekosystémových služeb vůbec. Největší úbytek plochy orné půdy byl zjištěn v Modřicích a to o celých 50 ha, přičemž výměra zastavěné plochy narostla o více než 25 ha.

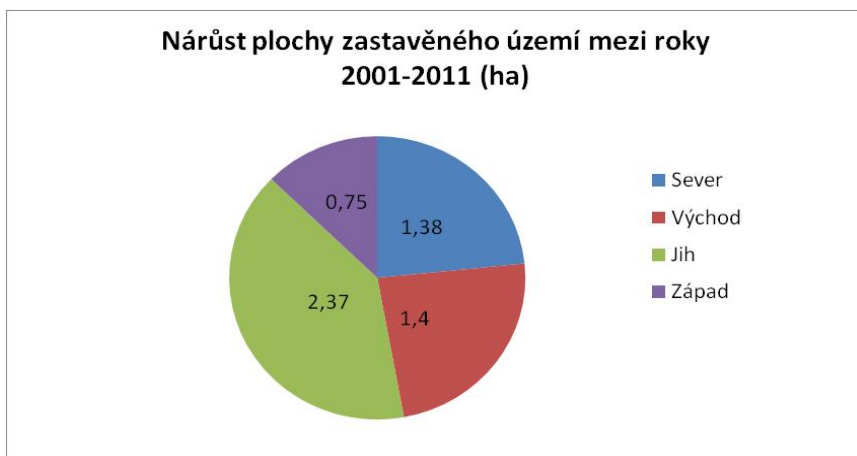
Graf 2 Úbytek plochy orné půdy mezi roky 2001-2011 (ha). Zdroj dat ČSÚ. Graf vytvořila Iva Křenovská.



Nejmenší úbytek orné půdy byl zjištěn v zájmovém území Východ. Výměra orné půdy zde klesla pouze o 47,64 ha, tedy o 3,08 ha na 1000 hektarů půdy.

Změna plochy zastavěného území byla největší stejně jako v případě úbytku orné půdy v oblasti Jih. Celkem zde narostla výměra zastavěného území o 50,84 ha (2,37 ha na 1000 ha půdy). Na východu a severu byl tento nárůst prakticky srovnatelný – jednalo se o zvýšení o zhruba 1,4 ha na 1000 ha půdy. Nejmenší nárůst plochy zastavěného území vykazuje oblast Západu.

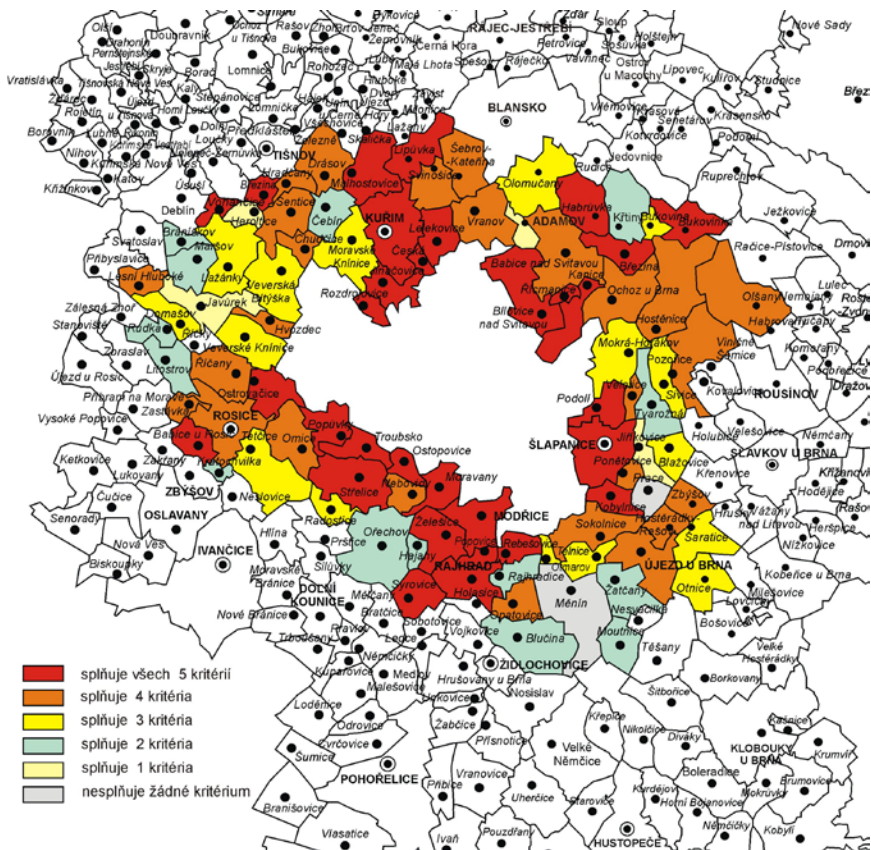
Graf 3 Nárůst plochy zastavěného území mezi roky 2001-2011 (ha). Zdroj dat ČSÚ. Graf vytvořila Iva Křenovská.



Z terénního výzkumu dále vyplývá, že ve většině obcí se nachází bývalé JZD, dnešní zemědělské družstvo, často ve formě akciové společnosti. Toto družstvo obhospodařuje většinu obecních i soukromých zemědělských pozemků v katastru dané obce. Živočišná výroba už ve většině obcí zanikla, anebo postupně zaniká. Rostlinná výroba se unifikuje, pěstují se zejména řepka, kukuřice (obě plodiny hlavně pro energetické účely), obilniny (ječmen a pšenice), často se objevuje i slunečnice (hlavně na jih od Brna). V oblasti Sever je převládající plochou v katastru obcí les, většinou ve vlastnictví Školního lesního podniku Křtiny. V oblasti Jih jsou to jen zbytky, většinou v obecním vlastnictví, které jsou obhospodařované soukromíky anebo samotnou obcí. Větší část lesů je však v soukromých rukách, často obhospodařovaná společnostmi Lesy města Brna nebo Lesy ČR.

Jedním z hlavních výstupů dosavadního výzkumu je mapa zájmového území s rozlišením obcí podle počtu splněných zvolených kritérií suburbanizace. Výzkum v rámci projektu probíhá dál (do konce roku 2012), v současnosti jsou zpracovávány případové studie pro oblasti Sever, Jih, Východ a Západ.

Obrázek 1 Mapa zájmového území (obce jsou barevně rozlišené podle počtu splněných zvolených kritérií suburbanizace. Zdroj dat: Mapy.cz. Mapu vytvořila: Jana Pokorná.



ZÁVĚR

Průzkum potvrdil zjištěná statistická data a z nich odhadovaný vývoj změn. Obce s největším přírůstkem obyvatel, největším nárůstem dokončených bytů, největším úbytkem plochy orné půdy a největším nárůstem plochy zastavěného území se nejintenzivněji rozvíjí a jsou tedy nejvíc zasáhnuty suburbanizací, jak rezidenční, tak komerční. Na základě uvedených zjištění můžeme konstatovat, že oblast Sever a Jih se rozvíjí nejvíce a je u nich očividná velmi silná suburbanizace. V oblasti Jih se jako nejpravděpodobnější příčina tohoto faktu jeví přítomnost rozsáhlých ploch úrodné zemědělské půdy, které byly v minulosti zákonem č. 334/1992 Sb. o ochraně ZPF nedostatečně chráněny před záborem (zejména ty nejkvalitnější půdy kategorií I. a II.). Velkou roli

hraje také přítomnost dálnice D2. V případě oblasti Sever se jedná především o dobrý stav přístupových komunikací a atraktivitu přírodního prostředí.

Oblasti Východ a Západ se rozvíjí s menší intenzitou, přičemž oblast Západ se rozvíjí jen velmi pozvolna. Předpokládaným důvodem tohoto téměř stagnujícího vývoje v oblasti Západ je přítomnost přírodních bariér – Bobravské vrchoviny s rozsáhlými úseky lesa. Dalšími příčinami je obecně nedostatečná infrastruktura obcí, především špatný stav příjezdových komunikací (ve velké části obcí až v současné době probíhá výstavba splaškové kanalizace apod.) a výměra obcí – jedná se zejména o malé obce mimo rozvojovou osu. Takovéto důvody uvádí i Perlín (2002:143): „Pro budoucí rozvoj území je velmi významná kvalitní občanská vybavenost. Preferované jsou obce, kde existuje základní technická infrastruktura a současně jsou v místě dostupné základní služby pro obyvatele.“ Uvedené podmínky však ve sledovaných obcích dané oblasti v dnešní době chybí. Naproti tomu v oblasti Východ je vývoj značně intenzivnější a do budoucna se dá očekávat větší rozmach suburbanizace právě v tomto směru, k čemuž přispívá i fakt, že v oblasti do budoucna povede plánovaná jihovýchodní tangenta dálnice D1.

LITERATURA

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. *MOS - Městská a obecní statistika* [online]. 2012 [cit. 2012-08-09]. Dostupné z: http://www.czso.cz/lexikon/mos_vdb.nsf/openkraj?openform&:cz062

CHUMAN, Tomáš a Dušan ROMPORTL. Suburbanizace a přírodní prostředí. In: OUŘEDNÍČEK, Martin. *Suburbanizace.cz*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2008, 20 - 26. ISBN 9788086561721.

GEODIS BRNO, s.r.o. *Mapy.cz* [online]. 2011 [cit. 2012-08-09]. Dostupné z: <http://www.mapy.cz/>

OUŘEDNÍČEK, Martin. Suburbanizace v kontextu urbanizačního procesu. In: SÝKORA, Luděk. *Suburbanizace a její sociální, ekonomické a ekologické důsledky*. 1. vyd. Praha: Ústav pro ekonomiku, 2002, s. 39-54. ISBN 8090191495.

PERLÍN, Radim. Nízkopodlažní výstavba v územních plánech obcí v zázemí Prahy. In: SÝKORA, Luděk. *Suburbanizace a její sociální, ekonomické a ekologické důsledky*. 1. vyd. Praha: Ústav pro ekonomiku, 2002, s. 141-155. ISBN 8090191495.

UK PŘF - KATEDRA SOCIÁLNÍ GEOGRAFIE A REGIONÁLNÍHO ROZVOJE, Urbánní a regionální laboratoř. *Suburbanizace Česká republika* [online]. 2008-2012 [cit. 2012-08-09]. Dostupné z: <http://suburbanizace.cz/pracovni.htm>

VAISHAR, A. a J. ZAPLETALOVÁ. Suburbanization in small towns - case study of Modřice u Brno. *Analele Universității din Craiova = Annals of the University of Craiova Geografie*. 2007, VOL. X, 112 - 126. ISSN 1224-4112.

ASSESSING TOURISM DEVELOPMENT IN THE TATRA REGION AND THE VISITORS' PERSPECTIVE

HODNOTENIE VPLYVU ROZVOJA TURIZMU V TATRANSKOM
REGIÓNE AJ Z POHLĀDU NÁVŠTEVNÍKOV

Streberová E., Baus P.

Department of Landscape Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

E-mail: streberova@fns.uniba.sk

ABSTRACT

The article starts with an introduction on the role and influence that tourism development has had in Slovakia's oldest and largest national park – the Tatra National Park throughout the centuries on local communities, settlements and environments in the High Tatra Mountains and the High Tatra municipality. The second part of the article presents preliminary results of a visitor survey aimed at visitors' perspective of the park, the surrounding region, tourism development and nature conservation and future development paths in the study area. In the Tatra national park, as in many other protected areas, the local economy is very much dependent on tourism development as it constitutes the major financial income, because other economic activities are perceived as a considerable threat to the nature conservation priority. Thus tourism development can become a big opportunity as well as a great threat for the study area. Knowing the visitor perspective of optimal visitor experience and visitor use is economically important, however meeting visitor expectations should be done in a manner that necessarily does not negatively impact on the environmental, socio-cultural and economic sphere in the study area. The following paragraphs outline some of the results of the web-based survey carried out during the summer season 2012 in the High Tatras. According to the survey results, the majority of visitors prefer outdoor recreation especially hiking and taking pictures of wildlife and the landscape. It is obvious that the natural potential of the area is a synonym for an active holiday in a well preserved natural environment. In terms of nature protection, most of the respondents claimed they would prefer if service suppliers and owners of leisure facilities more environmentally responsible and that natural reserve should be in a strict conservation regime. When taking a look into the future, visitors preferred a future scenario of qualitative development and conservative regime rather than if current development trends would continue („business as usual“ scenario). Thus any further building and urbanisation processes should be carried out very carefully considered in the study area, as well as an increase of visitor numbers, because visitor nuisance proved to have a negative influence on the visitor experience.

Key words: protected areas, tourism development, Tatra national park, visitor use

Acknowledgments: This research and presentation is supported by the VEGA project No. 2/0016/11.

INTRODUCTION

Undisturbed areas of nature have been always attracting visitors searching for a getaway from busy daily routines. Protected areas are therefore sought after nature experiences and related recreational activities. However, recreational use of protected areas has created new and exciting opportunities to serve and provide different sorts of visitor experiences, it has also created difficult environmental and social problems or conflicts - like for example conflicts among user groups, vandalism, crowding, etc. In many protected areas, the local economy is very much dependent on tourism development as it constitutes the major financial income, because other economic activities are perceived as a considerable threat to the nature conservation priority. Visitor use impacts are primarily attributable to visitor behaviour, use levels, types of use, timing of use, and location of use and can be managed effectively to avoid overuse of natural resources and preserve cultural values attached to this site or area (Belnap, 1997, Eagles et al., 2002, Manning, 2007).

The study area for this article is the High Tatras as part of the Tatra Mountains. The Tatra mountains create a natural border between Poland and the Slovak Republic and are the highest mountain range within the province of Western Carpathians of the Carpathian biogeographical sub region (Boltízar, 2007). The elevation reaches the maximum over the Slovak border at Gerlachovsky peak (2 654 m a.s.l.). The mountain range occupies an area of 785 km² of which 175 km² (approx. 25%) of which lies in Poland, while 610 km² (75%) belongs to the territory of the Slovak Republic (Lukniš 1973, Izakovičová et al. 2008, Vološčuk et al., 2004, Vološčuk 2011).

The Tatra mountains have a long tradition in hosting visitors not only for recreational purposes but also for supporting nature research since the 18th century and have been always attracting people for their uniqueness as well as for their climatic conditions suitable for building health spas. Especially in the Eastern part of Tatras– the High Tatra mountains are well known. What in the 19th century were only scattered groupings of recreational and leisure houses, later on became 15 settlements which today constitute 15 districts of the cadastral territory of the Town of High Tatras.

Currently, the cadastral territory of High Tatras spreads over a total area of 359,8 km², thus the area ranks among Slovakia's largest cadastral territories. Administratively the High Tatras belong to Poprad City district within the Prešov self-governing region. Despite the fact that the High Tatra municipality is located in the national park territory and is one of Slovakia's tourism hotspots (especially Starý Smokovec, Tatranská Lomnica and Štrbské Pleso) there is a continuous decrease in population since the 1980s. According to the Population census (2011) currently there are only 4,250 inhabitants living in the High Tatras municipality and the population is growing old (High Tatra Municipal Corporation, 2005, www.vysoketatry.sk, www.statistics.sk).

Because of its favourable alpine climate conditions as well as hot springs, in 1957 the High Tatras were declared a health spa resort with the following functions: tourism development, health treatment, protection of nature and research. The Tatras became accessible through a dense network of hiking trails and also cable cars – in 1937 a cable car was built at the Lomnický peak, later on cable car to Solisko and Hrebienok were built. Nowadays cable cars are being renovated and their capacities upgraded, especially in winter sport resorts like for example Tatranská Lomnica, Starý Smokovec and Štrbské pleso (Andrássy, 1991, High Tatra Municipal Corporation, 2005, Izakovičová, 2008, www.lanovsky.sk).

With further building and development in the socialist era, the High Tatras were chosen as the hosting destination for the Skiing World Championship in 1970. During this event the High Tatras and the surrounding region absorbed 130,000 visitors. The Tatras became criticised for their “noisiness, crowdedness, amount of vehicles and rather urban character of settlements”. The development trend followed several years later until the number of visitors started to decline in the early 1980s rapidly and thus nature protection measures became more stricter towards new building activities and the number of beds was downscaled (Harvan, et al., 2010, High Tatra Municipal corporation, 2005). In the beginning of the new millennium there was an evident increase in number of leisure and accommodation facilities of all categories by 40%. In 2002 the number of beds was not on a rise anymore, although building processes continued. However the number of overnight stays has not copied this rising trend in facilities and the overall occupancy of accommodation facilities remains on a 60-65% level until today. The daily visitation rate reached its 10-year maximum in 2009 when there were 21,000 visitors counted per day in the mountains, according to the visitor census in 2011 there have been only roughly 17,00 visitors per day (Huba et al, 2005, Municipality of high Tatras, 2009, 2011, www.minzp.sk).

In the following paragraphs we will present some of the findings from a visitor survey and draw linkages between these findings, opportunities and threats relevant for future development of the study area in terms of sustainable development of tourism and nature conservation.

MATERIALS AND METHODS

During field research in the summer season of 2012 a visitor survey, observation and photodocuemntation were carried out. Questionnaires can be designed to be either administered by the interviewer (face-toface) or intended for self-completion by survey participants (paper-based, web-based) (Brace, 2008, Tomal, 2010). For the purpose of this research a web-based survey has been carried out, which is continuing until winter 2013.

Visitors – respondents were asked to participate in a web-based survey, and their email addresses were collected. Within a short period of time they have received an email with a hyperlink to the online questionnaire. The questionnaire comprised of different types of questions, however in this article, several preliminary results from the survey are presented.

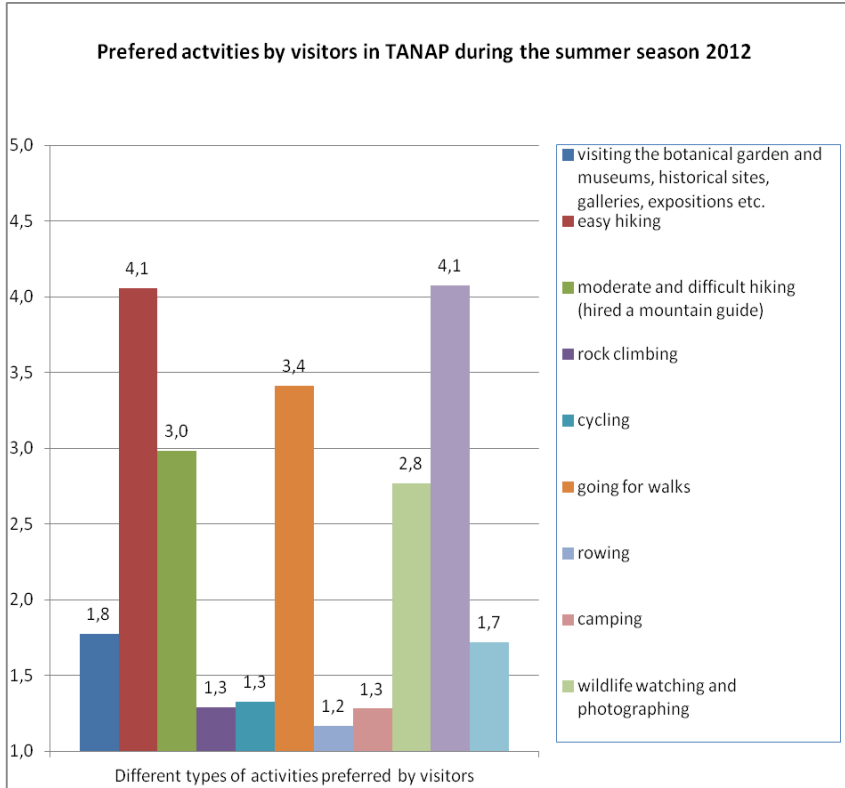
Observation and photodocumentation are largely applied in social sciences and qualitative approaches to research. The focus of observation varies with the research goal – it can be participant observation – to capture their “natural” behaviour, descriptions of individuals, descriptions of physical environment (surroundings), etc. (Schensul et al., 1990, Padgett 1998, Berg, Ketchen, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Tourism has many aspects especially in connection to protected areas, where tourism development can become a big opportunity as well as a great threat. We argue that these threats can be in some cases eliminated by respecting the visitor perspective and preferences when managing for a sustainable visitor experience and tourism development. In the following paragraphs we will focus on visitor use in terms of preferred visitor activities, factors that have a negative effect on visitor experiences. Subsequently we will touch upon often discussed issues like perspectives of nature protection and future development paths (scenarios) by visitors themselves.

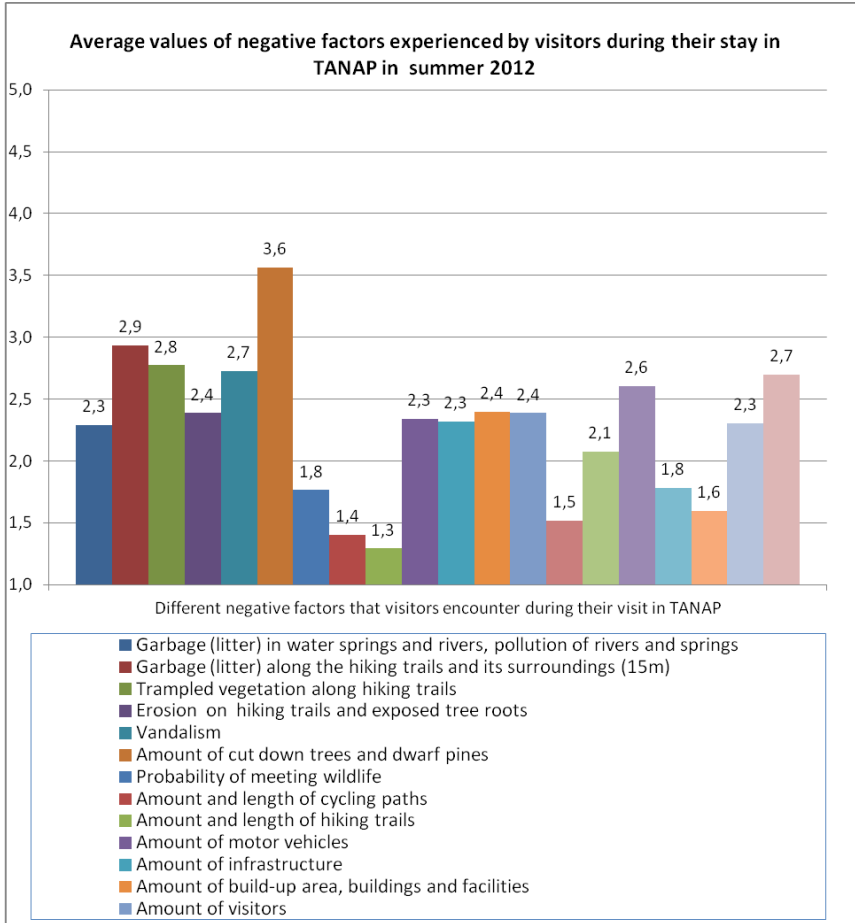
The survey results showed that visitors spent their leisure time mostly with the following activities: *hiking on easy trails, taking pictures of the scenery and sightseeing, as well as hiking more difficult trails, going for walks and taking pictures of wildlife*. On the other hand the least carried out activities were *cycling, rock-climbing, camping and rowing*. More details and the average values for each activity are shown in the Figure 1. below, where visitors had to attach a value from a scale of 1 to 5 (where 1 meant „I have not participated in this activity at all“, 5 meant „I have participated in this activity the most“).

Fig. 1. Preference of activities among the respondents – visitors in TANAP in summer season 2012.



Another set of relevant findings is related to different negative factors that can have an effect on the visitor experience. The respondents were asked to evaluate a set of listed negative factors by choosing a value from 1 to 5, where 1 meant “it is not disturbing at all”, and 5 meant “it is absolutely disturbing”. The highest mean average was for the factor of “Amount of cut down trees and dwarf pines” followed by several factors with approximately the same value: “Amount of garbage and litter along the hiking trails”, “Trampled vegetation on hiking trails” and “Availability of toilet facilities”. From the results it is evident that the least stressful for the visitors were noise created by motor cars, cable cars, length of cycling and hiking trails and pets that visitors take with them for hiking trips. The whole list of assessed factors is shown in the graph in Figure 2.

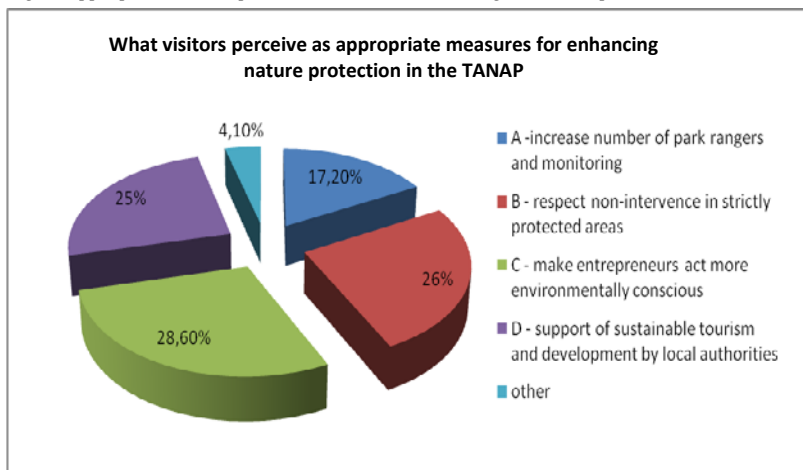
Fig. 2. Different negative factors that visitors encounter during their visit in TANAP.



Out of total 108 respondents, only 15% answered that they think it is *not* necessary to protect nature better. Out of the positive answers for nature protection measures, the respondents could then choose several options from a multiple-choice answer provided in the questionnaire. As we can see in Figure 3., the majority - 28,6 % answered *they think nature protection should be protected better by making service suppliers (sports and recreational activities, accommodation services, etc.) and owners of leisure facilities more environmentally responsible* or engage in enhancing the natural environment (for example: revitalisation activities in areas exposed to tourism load, pressure from human activities or visitor use). Subsequently, 26 % believe nature should be protected by leaving *the nature (in the most valuable areas – natural reserves) to self-development without any human*

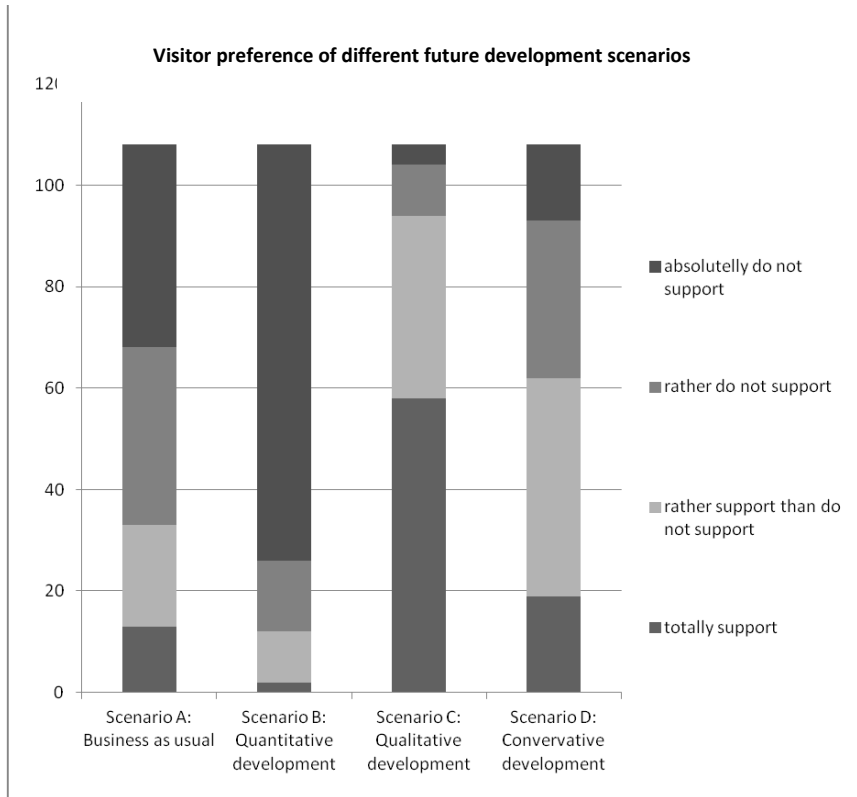
intervention (forest management and hunting). Additionally 24,9 % of respondents think that *local authorities should promote and support sustainable forms of tourism (e.g. hiking, climbing, skialpinism), which do not require greater infrastructure capacities, building construction or further interventions into the natural environment of the national park*. Thirty-three respondents (17,2 %) believe that an increase of staff (rangers) is necessary to monitor the state of natural environment and visitor safety. Only 4% of respondents think that nature protection would benefit from other activities – for example investing revitalising activities to help minimise the impact of the windbreak from 2004 and the subsequent bark-beetle infestation or that it is the visitors, that should be re-educated to behave more appropriate during their stay in a protected area. A graphic illustration of these results is below in Figure 3.

Fig. 3. Appropriate nature-protective measures according to visitor opinion



The last survey question that we will mention in this article is the one dealing with an overall vision - a future development scenario of Tatra mountains, the park and the town of High Tatras. Four different development scenarios adapted from a study developed shortly after the windbreak in 2004 (Huba et al., 2005) were described in the questionnaire. Basically these were 4 different development paths for the upcoming 50 years: a) *business as usual* (current development continues), b) *quantitative development*, c) *qualitative development*, d) *conservative development* (for more detailed information see Annex 1.). The respondents then rated each of the scenarios using values from the scale of 1 to 4 (Figure 4.). The visitors prefer the *Scenario C (Qualitative development)* the most, the second most preferred was the nature conservative *Scenario D (Conservative development)*. The visitors preferred this option more, than if current development path would continue (*Scenario A – Business as usual*). The last preferred as the Figure 4. below shows, is *Scenario B – Quantitative development*.

Fig. 4. Visitor preference - perspective on future development paths (scenarios).



From existing strategic documents for the study area, it is evident that local authorities and other relevant organisations in the local tourism and nature protection sector are aware of the visitors needs, which the documents divide as follows: needs of sufficient quality of environment, quality of accommodation and restaurant services, spectrum of guided tours and related services, spiritual experiences, sport and recreational activities, educational activities and leisure activities (High Tatra Municipal Corporation, 2005).

From an economical point of view, “satisfying the customers is inevitable” thus if the visitors that have an enjoyable visitor experience they are more likely to return or extend their visit and also give good reference to their relatives and friends. Because of this, visitor experience has to be viewed “as a product and as a product it has to be sold”, which “ in order to be successful, must be a quality product, which satisfies the wants and needs of as wide a range of buyers as possible”

while “the process of producing and selling the product must not be done in a manner that negatively impacts on the environmental, socio-cultural and economic sphere in the area” (Tayler 2004:10).

CONCLUSIONS

We believe that the results of the survey are part of the missing knowledge on the entangled host-guest or development-nature conservation relationships. First of all it is very interesting, that despite local ambitions of widening the spectrum of additional services (leisure and sport activities) people prefer to spend their free time in TANAP and the High Tatras outdoors, mostly with hiking or going for walks, and enjoy watching the scenery of the alpine landscape or taking photographs of wildlife and the mountains the most. From the results it is evident, that visitor experience was in the most cases negatively affected with the current state of forests – especially the effects of the windstorm and barkbeetle infestation that followed. However on the other hand, several respondents recognised that a recovery process of this scale simply needs a lot of time. Next to this, visitor nuisance – especially littering along the trails, crowding and related impacts (trampling of vegetation along trails) were also bothering the visitors. The majority of visitors think that nature protection in the park is not sufficient and that entrepreneurs should take-over their environmental responsibilities. Additionally they think that areas of strictest nature protection regime, should be left to self-development (natural reserves should be without human interventions). Last but not least, the visitors prefer a rather qualitative development or conservative development path instead of the current state or quantitative development in the study area. Especially in this case, the survey yielded somewhat surprising findings, especially in terms of visitors preferring the conservative development scenario rather than the business as usual scenario. Because the majority of visitors have spent their leisure time with outdoor recreation (hiking) and taking pictures of wildlife and the landscape, we claim that natural potential of the area is a synonymum for an active holiday in a well preserved natural environment. Thus any other building and urbanisation processes should be very carefully considered in the study area, as well as an increase of visitor numbers, because visitor nuisance proved to have a negative influence on the visitor experience as well.

REFERENCES...

- Andráši, J. 1991. Vysoké Tatry – Turistický sprievodca ČSFR, 3. ed., Bratislava: Šport. 304 p. (in Slovak).
- Belnap, J., Freimund, W., Hammett, J., Harris, J., Hof, M., Johnson, Lime, D., Manning, R., Rees, M. 1997. VERP: The Visitor Experience and Resource Protection (VERP) Framework A Handbook for Planners and Managers. U.S. Department of the Interior, National Park Service. 103p.
- Berg, D.D., Ketchen, J.D. 2011. Building Methodological Bridges: Qualitative Methods in Strategy and Management Research. United Kingdom: Emerald Group Publishing Ltd. 326p.
- Brace, I. 2008. Questionnaire Design: How to plan, structure and write survey material for an effective market research. London: Kogan Press Limited. 2nd ed. 305p.
- Boltižar, M. 2007 Structure of the alpine landscape of Tatras. Nitra: University of Cyril and Methodius. Faculty of Natural Sciences. 248p. (in Slovak)
- Eagles, P.F.J., McCool, S. F., Haynes, C.D. 2002. Protected Area Management: A Guide For Planning and Management, Gland, Cambridge: IUCN. 183 p.
- Harvan, L., Chudý, P., Mráz, J. 2012. Lyžiarske slávnosti vo Vysokých Tatrách 1970- 2010. Nový Smokovec: Lyžiarska Asociácia. 198s. (in Slovak).
- Huba, M., Beták, M., Hanušin, J., Berková, A., Bíziková, L., Díte, D., Ira, V., Lacika, J., Kluvánková-Oravská T., Maňkovská, B., Mídiak, R., Kozová, M., Pirošík, v., Plesník, P., Soták, Š., Stanková, E., Topercer, J. 2005. Towards sustainable development of the Tatra region. Bratislava: Regional Environmental Center. 96 p.
- Izakovičová, Z., Boltižiar M., Celer S., David S., Dítě D., Gajdoš P., Hreško J., Ira V., Grotkovská L., Kenderessy P., Kozová M., Oszlányi J., Petrovič F., Válkvcová Z., Vološčuk I., 2008. Krajinnooekologicky optimálne priestorové a funkčné využitie územia Biosférickej rezervácie Tatry. Bratislava: Veda. 196. (in Slovak)
- High Tatra Municipal Corporation . 2005. Plan of economic and social development. 83p. Available online www.vysoketatry.sk/download_file_f.php?id=81288. (in Slovak)
- Lukniš, M. 1973. Reliéf Vysokých Tatier a ich predhoria. Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, 375 p. (in Slovak).
- Manning, R.E. 2007. Parks and Carrying Capacity: Commons Without Tragedy. Washington, DC: Island Press. 313p.
- Municipality of High Taras, 2009. Evaluation of the summer tourist season 2009. 10p. Available online: www.vysoketatry.sk. Accessed: 03-10-2012.
- Municipality of High Taras, 2011. Evaluation of the summer tourist season 2011. 10p. Available online: www.vysoketatry.sk. Accessed: 03-10-2012.

Padgett, D.K. 1998. Qualitative methods in social work research: challenges and rewards. Thousand Oaks, CA: Sage Publications. 178p.

Vološčuk, I. Berková, A., Pavlík, J., Jančura, P., 2004. TANAP Management plan - draft. Liptovský Mikuláš. 156p. (in Slovak)

Vološčuk, V. 2011. The MAB Programme – Vision and Reality: Case Study of the Transboundary Tatry Biosphere Reserve. In Biosphere Reserves in the Mountains of the World: Excellence in the Clouds? Austrian Academy of Sciences Press, Vienna, pp. 41-45.

Taylor, W.D. 2004. Managing the Visitor Experience within Europe's Protected areas. PAN Parks.101p. Accessed: 22-10-2011. Available online:http://www.panparks.org/sites/default/files/docs/publicationsresources/managing_the_visitor_experience_within_europes_protected_areas.doc.pdf

Tomal, D.R. 2010. Action Research for Educators. Plymouth, UK: Rowman&Littlefield Education. 197p.

Schensul, S., Schensul J., LeCompte, M.D. 1999. Essential Ethnographic Methods: Observations, Interviews & Questionnaires. Walnut Creek, CA: AltaMira Press. 318 p.

Websites:

Cable cars in Slovakia (private website): www.lanovsky.sk

Municipality of High Tatras: www.vysoketatry.sk

Ministry of Environment of the Slovak Republic: www.minzp.sk

State Nature Conservancy of the Slovak Republic: www.sopsr.sk

State statistical office: www.statistics.sk

ANNEX 1.

Four different development paths (scenarios) outlining the future of Tatra region (Huba et al., 2005).

Scenario A: "Business as usual"

": The amount of visitors continues to increase, as well as the capacities of infrastructure (also ski lifts and ski slopes; pistes) and number of motor vehicles. Surface sealing and construction continues on the foot of mountains (apartment houses, hotels, villas, parking lots, etc.). This contributes to gradual load and pressure on the environment - air, water and soil pollution and increases the demand for freshwater and noise levels. The recreational, climatic (health & spa) and research functions of TANAP are jeopardized. Forest management focuses on clearing the forests from trees infested after the calamity of 2004 and timber logging. In the High Tatra municipality slight decrease of population continues, the overall orientation of the municipality remains focused on tourism related services

Scenario B "Quantitative development"

Fast increase in accommodation and transportation capacities, surface sealing and building and ski-facilities construction enables great increase in visitor numbers beyond the carrying capacity of the park, which affects the environmental, psychological, hygienic and overall quality of life of local inhabitants as well as visitors. Forest management focuses on timber logging. Parks' ecosystems degrade quickly and the area loses its naturalness. It is highly probable that part of the income made locally is re-invested elsewhere outside the national park. In the end the attractiveness of the area is threatened by unregulated development directly in the park boundaries, which leads to loss of natural values and visitor interest.

Scenario C: "Qualitative development"

The region and the national park focuses on balanced long-term gains (economical, social, environmental), which build upon the diversity of natural, cultural and historic values of the area. Besides tourism, the High Tatra municipality promotes also traditional activities and ceremonies, arts and crafts, which also serve as additional income. Preserved natural ecosystems are left for self-development without human intervention. Tourism is developing rather in terms of quality than quantity, and respects the environmental carrying capacity of the park and social carrying capacity of visitors and local inhabitants, quality than quantity, and respects the environmental carrying capacity of the park and social carrying capacity of visitors and local inhabitants.

Scenario D "Conservative development"

The existence of TANAP is an economical gain in the long-term. The territory of the park is enlarged by its buffer-zone on the foothills. Norms and regulations for nature protection are strictly complied with and no surface sealing and construction outside the already build-up area is not possible under any circumstances. In the areas of strictest conservation, the natural reserves, ski slopes and other recreational facilities and areas are being re-forested. In the park, the principle of non-intervention is dominant, whereas human interventions are completely minimised. The visitors are restricted to enter only certain valleys and peaks in the park. Sport and other recreational facilities are re-settled into the buffer-zone of the national park and the underlying podtatranská valley.

THE OPPORTUNITIES OF BUILDING OF ECO-COMMUNITIES IN RURAL AREAS

MOŽNOSTI BUDO VANIA EKOKOMUNÍT VO VIDIECKOM PROSTREDÍ

Škvarková J., Halašová M.

Department of Landscape Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina - B2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

E-mail: skvarkova@fns.uniba.sk

ABSTRACT

The main aim of this article is to propose possibilities for creating ecological communities (Eco-community) in the rural environment. The second aim of this article is to explain the life of Eco-communities in relation to the constant sustained growth. Additionally the article provides theoretical background on constant sustained growth, its historical progress and its local and global dimensions. The examples of real, functional Eco-communities confirm the connection with the principles of constant sustained growth of human settlements. The philosophy of permaculture, as one of the possibilities in the creation of Eco-communities, is also explained in the article. Among the alternatives we describe the investment project model for eco-suburbs and its community planning using the tools of environmental management and Local Agenda 21. The last paragraphs were dedicated to spatial - functional analysis and a description of community survey for a model area. After the survey was completed a proposal plan of action was developed and its results were included in the swot analysis of the model area.

Key words: constant sustained growth, eco-community, urban and rural environment, community planning, possibilities of creation of eco-communities

ÚVOD

Téma komunít je v súčasnosti stále aktuálnejšia a tento pojem sa začína stále výraznejšie etablovať aj u nás. Viac sa hovorí o trvalo udržateľnom rozvoji, uplatňovaní miestnej Agendy 21 a o zainteresovanosti ľudí do vecí verejných. Veľa ľudí sa zamýšľa nad zmyslom života a pri pohľade na svet okolo seba prepadá pocitu nezmyselnosti, rozčarovania a bezmocnosti. Moderná spoločnosť, v súlade s ekonomickou teóriou, smeruje k stále väčšiemu ekonomickému rastu, z ktorého si urobila životné krédo: „Produkovanie – spotreba – materiálny blahobyt“. Existuje však aj iná alternatíva, kde nerozhoduje štát, ani všemocná ruka trhu. Tou alternatívou je komunita, ktorej hlavným cieľom je trvalo udržateľný život, rešpektujúci prírodné zákonitosti, ľudskú individualitu, ale aj napĺňanie ideí o spolupatričnosti a nezištnej pomoci. Skupina ľudí, ktorých spája miesto, kde žijú, vízia, ku ktorej smerujú a hodnoty, ktoré zdieľajú. Spoločenstvo, ktoré na základe konsenzu rozhoduje o svojich aktivitách a súčasných potrebách svojich členov v záujme zachovania zdrojov pre generáciu v budúcnosti. Komunity miestnych ľudí, ktorí riadia vlastné ekonomické záležitosti v záujme všetkých a zároveň sa snažia žiť trvalo udržateľným spôsobom života, nie sú žiadnou utópiou. Vo svete už existuje veľa príkladov. My sa tomu musíme ešte učiť. Je to možno dôsledok

dlhého obdobia totality, kde všetko riadil štát a doznievajúceho obdobia bezbrehého materializmu, kedy sa ľudia snažia naplniť všetky materiálne túžby, ktoré im boli odopierané. Pre všetkých, ktorí premýšľajú o dnešnom svete, o jeho budúcom smerovaní a o dôsledkoch nášho dnešného konania pre generácie, ktoré prídu po nás, môže byť komunitný spôsob života veľkou inšpiráciou. Práca na tejto téme bola veľmi inšpiratívna aj pre mňa. Aj keď som patrila do skupiny ľudí, ktorí sa nad problémami tohto sveta zamýšľali, ale prepadal ich pocit bezmocnosti, že jednotlivec nič nezmení, štúdium a analýza komunitného spôsobu života motivoval aj mňa. Heslo: „Mysli globálne a konaj lokálne“ to vystihuje dokonale. Každý môže začať sám od seba, pretváraním svojho okolia a pozitívnym príkladom pre ostatných. Veď malá zápalka dokáže zapáliť les a jednotlivec svojím príkladom môže strhnúť aj ostatných a potom spoločne pracovať na lepšom a hlavne udržateľnom živote.

MATERIÁL A METODIKA

Práca má prevažne teoretický charakter. Hlavný cieľ príspevku – popisanie a navrhnutie možností budovania ekokomunit v rurálnom prostredí, bolo možné uskutočniť za pomoci rôznych výskumných nástrojov.

Medzi kľúčové inštrumenty patrilo štúdium dokumentov a odbornej literatúry o problematike trvalo udržateľného rozvoja, živote a charakteristike komunít, ako aj špecifickosti ekokomunity.

Internetové zdroje poskytli relevantné informácie pre popis konkrétnych, fungujúcich ekokomunit, ktoré boli konfrontované a verifikované prostredníctvom rozhovoru s reálnymi účastníkmi komunitného spolunažívania. Boli navrhnuté a popísané tri možné prístupy budovania trvalo udržateľnej komunity.

Prvou možnosťou je uplatnenie individuálneho prístupu, tzv. domáca ekológia a dobré susedstvo, čo v sebe zahŕňa rozhodnutie a realizáciu zásad permakultúry. Ďalšou možnosťou je vybudovanie ekosídlička, čo je možné realizovať len v spolupráci s investormi, projektantmi a samosprávou. Poslednou, popísanou možnosťou je postupné budovanie ekokomunity v mestskej štvrti, mestskom sídlisku, alebo vidieku prostredníctvom environmentálneho manažmentu, komunitného plánovania a realizácie miestnej Agendy 21.

Výskumná časť príspevku sa zaoberá realizáciou počiatočných krokov postupu vytvárania ekokomunity v časti urbanistického obvodu Banská Štiavnica – Juh, ktorá je lokalizovaná na ulice Dobšinského a Krasku. Z navrhnutého postupu sa realizovala priestorová a funkčná analýza lokality a bol vykonaný komunitný prieskum s pozitívnym navrhnutého anketového lístka. Výsledky ankety boli spracované kvalitatívnymi a kvantitatívnymi štatistickými metódami a ich vyhodnotenie a interpretácia sú základom pre vytvorenie SWOT analýzy tejto konkrétnej komunity.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Neschopnosť spoločenských systémov 20. storočia reálne dosiahnuť stanovenú tézu „urbanity“, t.j. „vyššie naplnenie ľudského života“ viedlo isté skupiny ľudí k zakladaniu spoločenstiev, nazývaných „komunity“. Uvedený názov nepochádza zo slova „komúna“ alebo „komunizmus“, ale pochádza z anglického označenia „common unity“ t.j. spoločná jednota a označuje skupinu ľudí dobrej vôle snažiacich sa o vybudovanie spoločenstva na základe spolupráce ľudí medzi sebou a spolupráce s prírodou bez ohľadu na ich sociálnu a národnostnú príslušnosť, politické alebo náboženské presvedčenie. Bola to zároveň reakcia na rozbitie sociálnych medziľudských väzieb spoločenských systémov nášho storočia, či už v dôsledku kapitalistického systému maximalizácie ziskov za každú cenu a z nej vyplývajúceho individualizmu a konkurencie alebo komunistických zámerov ideovo jednotných más s následným potieraním ľudskej individuality a slobodnej vôle. Zakladanie komunít prinieslo so sebou nielen rešpekt k prírode ako takej a k jej prirodzeným zákonitostiam, ale aj praktickú realizáciu v dnešnom poňatí „trvalo udržateľných stratégií“. Cieľom komunít je a aj v budúcnosti bude poskytnúť reálnu alternatívu k životu súčasnej spoločnosti, ktorá evidentne nie je schopná zabezpečiť spôsob ľudskej existencie, ktorý by sa mohol označiť ako plnohodnotný alebo trvalo udržateľný, pretože celospoločensky zatiaľ nie je ochota k zmene systému hodnôt a spôsobu života. Komunitný systém realizovaný od 60. rokov nášho storočia v krajinách západnej Európy, USA, Austrálie atď. vyvinul prvky vedúce k vyváženej ľudskej spoločnosti nielen poskytnutím priestoru pre skutočné ľudské potreby, ale systémom opatrení v oblasti hospodárstva a správy, podriadené cieľom „urbanity“ (Nagy, 2002).

Jednoduchá definícia komunity je takáto: skupina ľudí, ktorí majú niečo spoločné – vieru, miesto bydliska, cieľ potreby, ktorí si želajú byť identifikovaní ako skupina kvôli vzájomnému zdieľaniu a/alebo vzájomnému úžitku alebo jednoducho preto, že cítia, že tam patria (Szabóová, Flenley, 2005). Sarason (Halasová, 2002) hovorí o komunite ako o ľahko dostupnej vzájomne sa podporujúcej sieti vzťahov, na ktorú sa človek môže spoľahnúť. Charakteristickou črtou komunitných iniciatív (ktoré nemajú len podobu malých záujmových skupín, ale realizovali sa zatiaľ aj v okruhu sídiel, miest alebo dokonca regiónov) je ich aktivizácia zdola, t.j. neboli iniciované oficiálnymi štátnymi ani hospodárskymi štruktúrami. Počas v podstate už niekoľkých desaťročí sa podarilo zrealizovať mnohé životaschopné a funkčné prvky komunitných systémov ako napr. etické komunitné investície, podnikanie, obchody a banky, bezpečný LETS – systém výmeny tovaru a služieb, pozemkové trusty, lesy a záhrady, ekosídlišká a ekodediny postavené na základe ekologických stavebných postupov s centrami využívajúcimi ekologické technológie, s komunitnými recyklačnými strediskami atď. Život v eko-dedínach sa zakladá na spojení a rozvíjaní aspektov duchovnosti, kultúry, ekonómie a ekológie (Nagy, 2002). Komunitné plánovanie je proces vyžadujúci dôkladné mapovanie všetkých predstaviteľných oblastí života ľudí v danom definovanom priestore a vzťahov vo vnútri komunity a medzi komunitami a väčšími územnými celkami (Wates, 2006). Ekokomunita je spoločenstvo ľudí žijúcich v mestskom, vidieckom sídle alebo osade, v rovnováhe s prírodou. Ekokomunita môže existovať v akejkoľvek krajine, regióne alebo sídle pričom ekonomická vyspelosť danej krajiny vôbec nie je dôležitá. Naopak, záleží na snahe ľudí, žijúcich v komunite, ísť cestou hľadania a praktického uplatňovania takých technológií a vzorcov chovania (dobrovoľná skromnosť), ktoré povedú k šetrnejšiemu využívaniu prírodných zdrojov, k ešte dokonalejšiemu pochopeniu nášho miesta v prírode a tým aj trvalo udržateľnému životu. Ekokomunity sú spoločenstvá, v ktorých sa ľudia navzájom podporujú a cítia zodpovednosť za druhých. Vyznačujú sa silným vedomím príslušnosti ku komunite. Tieto spoločenstvá sú také malé, že v nich každý cíti, že nie je prehliadaný, že je ho počúvajú a aj on je otvorený komunikácii s ostatnými členmi spoločenstva. Každá ekokomunita má svoje špecifické kultúrne i geografické rysy. Život v ekokomunite má štyri hlavné rozmery – spoločenský, ekologický, kultúrny a duchovný, ktoré spolu tvoria trvalo udržateľný celok, ktorý podporuje rozvoj osobností všetkých jej členov (Halasová, 2008). Ekokomunity sú laboratória, v ktorých vzniká nová, spravodlivejšia spoločnosť, založená na vzájomnej úcte, porozumení a spolupatričnosti. Sú to semienka budúcnosti. Ich cieľom je vytvoriť také spoločensko-kultúrne prostredie, ktoré podporuje rozvoj človeka, ale zároveň ho začleňuje do prirodzeného prírodného prostredia. Ako nová spoločenská štruktúra, sú alternatívou proti súčasnému paradoxnému trendu rozvoja sídiel so sebaštruktúrnym základom, závislosti na najslabšom článku v reťazci. Ekokomunity predstavujú model, ktorý môže byť široko použitý pri plánovaní a reorganizácii ľudských sídiel v 21. storočí. V ekokomunitách sa realizuje to, o čom sa inde iba rozpráva. Prenášajú ekologickú teóriu do každodennej praxe a sú tak vzorom rozvoja, ktorý dáva do rovnováhy najhlbšie potreby ľudí so starostlivosťou o prirodzené životné prostredie. Základnou myšlienkou rozvoja ekokomunit je pranie byť zodpovedný za svoj život i životy druhých a túžba vytvárať takú budúcnosť, v ktorej môže človek žiť v trvalej rovnováhe s prírodou. Ekokomunity vznikajú často na odľahlých miestach, kde sa ľudia snažia nájsť trvale udržateľný životný štýl.

Cieľom je čo najmenšia závislosť na zvyšku spoločnosti a potravinová, materiálna a energetická sebestačnosť. Z toho dôvodu pracujú viacerí členovia výhradne vo vnútri komunity. Najčastejšie majú podobu novodobých dedín, osád (ekodedinky), ale môžu byť i súčasťou bežnej obce (Brúna, 2011). Uvádzajú sa nasledovné osobitosti, charakteristiky:

- Poľnohospodárska výroba sa vykonáva na okolitých poliach a lúkach bez využitia umelých hnojív a najmodernejšej mechanizácie. Využíva sa i sila hospodárskych zvierat.
- Energie je z veľkej časti získavaná z obnoviteľných zdrojov – spaľovaním biomasy, využitím solárna energie pre ohrev vody či výrobu elektrickej energie.
- Vznikajúci odpad je dôsledne triedený, bioodpad sa kompostuje, odpadová voda je spracovávaná v biologických čistiarnach odpadových vôd. Oproti bežným domácnostiam tu vzniká menej odpadu vďaka menšiemu množstvu obalov a nekonzumnému spôsobu života.
- Voda býva z vlastných zdrojov. Pitná voda sa využíva výhradne pre prípravu potravy a na pitie, na ostatné činnosti vrátane prania sa používa voda dažďová (závisí na miestnych podmienkach).
- Dôležitá býva i samotná architektúra. Stavby spĺňajú nároky zelenej architektúry, dá sa však vysledovať niekoľko odlišných prístupov, ktoré sa môžu rôzne prelínať (Brúna, 2011).

Wisner (1996) hovorí o troch základných kvalitatívnych predpokladoch trvalo udržateľnej komunity. Po prvé je to etický základ komunity, jej hodnoty, ideály a vízie, spoločná viera o možnosti žiť zodpovedne a vzájomne sa rešpektovať. Po druhé, trvalo udržateľná komunita musí mať vlastnú identitu, vedieť kto je a aká je jej história, pretože z identity vyplýva sebadôvera. Silný vzťah ľudí k miestu kde žijú, posilňuje ich spoločné záujmy a vyznávanie spoločných hodnôt založených tak na vzťahu k minulým generáciám, ako aj záujmu o budúcnosť. A tretí predpoklad je o poznaní výnimočnosti miesta, kde ľudia žijú a ktoré volajú domov, ktoré ich formuje a obohacuje o starostlivosti, ktorú mu venujú. Vypracovať stratégie, ktoré komunity môžu použiť v procese trvalo udržateľného rozvoja, znamená vyhľadať a formulovať také ciele a opatrenia, ktoré zamedzia odstredivým silám pôsobiacim v komunitách, zmiernia vonkajšie tlaky, ktorým sú vystavené, a posilnia vnútorné predpoklady pre vyvážený a udržateľný rozvoj (Švihlová, 2006). Nozick (1999) zhrnula obsah stratégie, ktorá by vyhovovala takto formulovaným kritériám do nasledovných piatich oblastí:

- zlepšenie miestneho blahobytu prostredníctvom ekonomickej sebestačnosti,
- získanie kontroly nad miestnymi zdrojmi,
- zabezpečenie ekologickej udržateľnosti,
- uspokojovanie individuálnych potrieb,
- budovanie komunitnej kultúry.

Základom permakultúry je etika o starostlivosti o Zem, teda o celý zemský ekosystém, o všetky jeho druhy (Kotoučková, 2004). Jadrom je základná túžba robiť to, o čom si myslíme, že je správne

a stať sa tak aktívnym elementom riešenia vedúceho k uzdraveniu a nezostávať ako súčasť problému. Etika Permakultúry sa dá podľa Whitefielda (1996) zhrnúť do troch základných bodov:

1. starostlivosť o Zem,
2. starostlivosť o ľudí,
3. každému spravodlivo.

Starostlivosť o Zem sa dá chápať ako osvietené seectvo, pochopenie, že my ľudia sa musíme starať o Zem a všetky jej životné systémy, pretože naše prežitie priamo na nich závisí. Na hlbšej úrovni je to však uvedomenie, že celá Zem je jediný živý organizmus, ktorého neoddeliteľnou súčasťou sme i my, ľudia, tak isto ako všetky ostatné živočíchy a rastliny. Ochrana zostatkovej nedotknutej prírody by sa mala stať jednou z našich najvyšších priorít. Ľudské sídla, vytvorené permakultúrou sú oveľa priateľskejšie k Zemi než tie, ktoré sú formované dnešnou poľnohospodárskou a priemyselnou technológiou. Permakultúra však neznamená premenu celého sveta na produktívny konzumovateľný ekosystém. Naopak, prijatím princípov permakultúry môžeme zvýšiť produktivitu nami obrábanej pôdy natoľko, že jej budeme musieť obhospodarovať oveľa menej (Whitefield, 1996). Celý systém je postavený na dizajne zjednocujúcom nízkoenergetické bývanie a krajinu. Používanie čo najmenej materiálov, minimálneho znečisťovania životného prostredia a šetrného využívania prírodných zdrojov. Pri praktickom projektovaní sa využívajú znalosti z viacerých odborov – vlastnosti vody, prúdenie vzduchu, pôsobenie slnečnej energie, geodézie, pôdoznanectvo, znalosti vzájomného prepojenie funkcií živočíšnych a rastlinných systémov, zadržovanie vody v krajine. Je to vlastne aktívna aplikácia vecí a princípov, ktoré sú odporované z prírody, na systémy, ktoré vytvárame my sami. Tento dizajn integruje domy, rastliny a živočíchy do jedného živého systému, ktorým kopírujeme prírodu. Takto sa dá vytvoriť prirodzené prostredie, rovnako stabilné ako je napríklad dažďový prales. Stabilitou je myslený ekologicky zdravý a ekonomicky výnosný ekosystém. Môže byť jednoduchý alebo zložitý, ale vždy vychádza z podmienok konkrétneho miesta (Kotoučková, 2004).

Starostlivosť o ľudí je rovnako dôležitá, ako starostlivosť o Zem. V minulosti existovali v podstate udržateľné spoločnosti, ale za cenu otrockého života väčšiny ľudí. Permakultúra sa však nechce vracieť do týchto dôb, ale chce nahradiť otrockú drinu a fosílna palivá používaním inteligentného hospodárenia. V praxi je všeobecne známe, že technické riešenia sa hľadajú oveľa ľahšie ako ľudské a spoločenské. V podstate je dobre známe, ako je potrebné zmeniť priemysel a poľnohospodárstvo, aby sa stali udržateľnými. Ale ako si poradiť s ľudskými emóciami ako je strach alebo chamtivosť sa zatiaľ nezistilo a práve tieto dve ľudské vlastnosti sú hlavné príčiny, ktoré nám bránia v ďalšom pokroku. Ľudia praktizujúci permakultúru si stále viac uvedomujú, že ak chceme uspieť vo vytváraní udržateľných ľudských sídiel, musíme sa okrem starostlivosti o Zem venovať hlavne starostlivosti o ľudí. Táto problematika zahŕňa všetko, od učenia sa komunikovať a počúvať druhých, až po projektovanie miest spôsobom, ktorý bude napĺňať skutočné ľudské potreby (Whitefield, 1996).

Každému spravodlivo je filozofia pochopenia, že Zem má svoje obmedzenia. Nemá nekonečné rozmery, takže ani naše „chute“ nemôžu byť nekonečné. Aj keď už recykujeme, alebo dávame prednosť „ekologicky priaznivým“ produktom, vzhľadom na stále zvyšujúcu sa spotrebu, sa z našich problémov nedostaneme. Podľa Whitefielda (1996) nie je reálna náhrada za stále zvyšujúcu sa spotrebu neobnoviteľných zdrojov. Naša súčasná ekonomika vyrába takmer všetko zo zdrojov neobnoviteľných. Dokonca i obnoviteľné zdroje, ktoré sú spotrebúvané rýchlejšie ako sa obnovujú, sa touto nadmernou spotrebou stávajú prakticky neobnoviteľné. To však neznamená, že by sme mali trpieť biedou. Znamená to len toľko, že Zem môže prežiť v zdravom stave len vtedy, keď budeme schopní zladit' svoju spotrebu s našimi skutočnými potrebami a nie a našou chamtivosťou. To znamená ponechať dostatok priestoru aj ostatným druhom, dostatok potravín a zdrojov pre všetkých ľudí a zanechať budúcim generáciám planétu ako dôstojné miesto pre život a uspokojovanie základných potrieb. Inými slovami, musíme sa naučiť brať si len svoj spravodlivý podiel.

Významnú úlohu pri vytváraní a fungovaní ekokomunity plnia nástroje, ktoré sú zamerané na spoluprácu s verejnosťou a aktivity komunity. Nástroje komunitného plánovania sú zamerané na vyhľadávanie problémov, zvyšovanie povedomia verejnosti a jej účasť v rozhodovacom procese, od prípravy až po ukončenie plánovacieho procesu. Environmentálny komunitný manažment podľa Halašovej (2008), predstavuje využitie nástrojov a metód všeobecného manažmentu na dosahovanie trvalej udržateľnosti v spoločnostiach (ekologická, ekonomická, sociálna, spirituálna vyváženosť) a na zavádzanie environmentálnych manažérskych systémov v ľudských sídlach (aplikácia normy rady ISO 14 000). Komunitný aspekt riadenia sa môže prejavovať v identifikovaní, kreovaní a hodnotení komunitných prvkov v konkrétnom sídelnom prostredí, v organizácii, v komunitných projektoch na samosprávnej alebo nevládnej úrovni (nadácie, občianske združenia).

Komunitný prieskum

Technika, na zisťovanie názorov obyvateľov miestnej komunity. Je to prvý krok v praktickej realizácii budovania ekokomunity. Základným prostriedkom v realizácii prieskumu je dobrovoľník, dobrovoľníci z prostredia komunity, ktorí získavajú informácie od ostatných. Získané informácie sa použijú ako pomocný materiál, ktorý bude usmerňovať prácu na rozvoji komunity. Po vykonaní prieskumu sa dobrovoľníci stretnú, prieskum vyhodnotia a na základe odpovedí si dohodnú ďalší postup a rebríček priorit.

NÁVRH ANKETOVÉHO LÍSTKA

1. Vyjadrite na škále 1-5, nakoľko sa zaujímate o životné prostredie
2. Na škále 1-5 určite nakoľko ste spokojný s bývaním v tejto lokalite.
3. Vyhľadáвате aktívne informácie a aktuality z oblasti starostlivosti o ŽP ? (áno, nie).
4. Myslíte si, že jednotlivec môže svojím správaním ovplyvniť celkový stav ŽP? (áno, nie)
5. Zúčastnili ste sa už niekedy na seminári, školení, besede, alebo prednáške? (áno – aká téma, nie – na akej by ste sa zúčastnili)
6. Zúčastnili ste sa už niekedy aktívne na zlepšovaní lokálneho prostredia? (áno, nie)
7. Počuli ste už o termíne dobrovoľná skromnosť? (áno, nie)
8. Separujete odpad? (áno, nie – prečo?)
9. Zhodnocujete bioodpad prostredníctvom kompostovania? (áno, nie – prečo?)
10. Pestujete vo svojej záhradke, balkóne úžitkové rastliny? (áno, nie)
11. Využívate alternatívny vodný zdroj? (áno, nie)
12. Ako vykurovate svoje obydlie?
13. Spotreba energie vo vašej domácnosti v poslednom období : stúpa, je rovnaká, klesá?
14. Aký spôsob dopravy preferujete?
15. Zúčastnili by ste sa aktívne pri vytváraní ekokomunity?
16. Aké aktivity by ste navrhli pre zlepšenie života v tejto lokalite?

Pre overenie navrhnutého postupu budovania ekokomunity, sme v praxi vyskúšali realizovať pociatočný krok, vstupnú analýzu v modelovom území. Najskôr sa vykonala priestorovo - funkčná analýza, ktorá vyústila do anketového prieskumu s využitím navrhnutého anketového lístka.

Vybratá lokalita sa nachádza v urbanistickom obvode Banská Štiavnica – Juh, konkrétne ulica P. Dobšinského a I. Krasku. Tieto ulice vytvárajú akoby uzavretý okruh s vnútornými väzbami, ideálne modelové prostredie pre vytvorenie ekokomunity. Táto lokalita bola vybratá aj z dôvodu trvalého bývania autorky práce a detailného poznania obyvateľov aj priestoru, čím sa zjednodušila komunikácia a ochota odpovedať na otázky z komunitného prieskumu. Podľa Územného plánu mesta Banská Štiavnica (2008) je urbanistický obvod Juh s prevahou funkcie bývania hromadného charakteru doplnený funkciou bývania individuálneho charakteru (rodinné domy), funkciou občianskej vybavenosti (základná škola, komplex obchodov a služieb, katastrálny úrad, pobočka sociálnej poisťovne) a priemyselnej výroby (objekt textilnej fabriky Pleťa, v súčasnosti z časti využívaný na drevozvýrobu, z časti chátrajúci). Najrozmanitejší záber funkcií sa odrzrkadľuje na

kompozične i funkčne nevyvázenej štruktúre. Objekty bytových domov sú v ostrom kompozičnom kontraste s historickou štruktúrou jadra. Poloha a veľkosť areálu priemyselnej výroby vytvára stret medzi susediacimi funkciami. Stavebnotechnický stav štruktúry je výborný s výnimkou nedostavaného objektu Plety. Intenzita funkčného využitia je primeraná. Severozápadná časť obvodu zasahuje do pamiatkovej rezervácie Banská Štiavnica. Pre toto územie platí potreba konzervácie fyzickej pamiatkovej štruktúry, obnovy chýbajúcej pamiatkovej štruktúry a revitalizácia funkčného využitia. V tomto obvode sa nachádza aj vybraná lokalita, v ktorej boli realizované základné kroky budovania ekokomunity. V lokalite dominuje zástavba využívaná na individuálne bývanie (jednopodlažné rodinné domy s pozemkom a predzáhradkou). Na ulici Dobšinského je zastúpená aj radová výstavba dvojpodlažných bytových domov taktiež s pozemkom a predzáhradkou. V tesnej blízkosti sídli základná škola J. Horáka, čo je veľkým prínosom pre realizáciu komunitného spoločenského života, lebo podľa Vincikovej (2008) školy tvoria kľúčový článok systému v spoločnosti orientovanej na udržateľný rozvoj. Objekt ZŠ bol daný do užívania v roku 1961. V rokoch 2009-2010 bola vykonaná kompletná rekonštrukcia všetkých budov v areáli školy (investícia vo výške 1,5 mil. eur zo štrukturálnych fondov EÚ). Areál pozostáva zo 4 budov: hlavná, prístavba INPAKO pre primárne vzdelávanie, školská jedáleň – dielne – klub, telocvična. V areáli školy sa nachádza školský pozemok so skleníkom, 2 antukové ihriská, pieskovisko a asfaltový školský dvor. Vykurovanie je zabezpečené vlastnou plynovou kotolňou a kompletne zmodernizované šatne, triedy, hygienické zariadenia, telocvična, jedáleň, kabinety, všetky vnútorné priestory poskytujú žiakom aj personálu vysoký štandard pracovného prostredia. Školu navštevuje cca 500 žiakov a prácu tu našlo 30 pedagogických a nepedagogických zamestnancov.

Podľa žijúcich pamätníkov, obyvateľov tejto štvrti, sa výstavba domčekov začala za podpory Prvého Slovenského štátu v rámci akcie Usmievavé Slovensko. Boli vybrané dva projekty, podľa ktorých sa súčasne začala výstavba solitérnych domčekov a dvojdomov. Projekty boli realizované ako družstevná zástavba z peňazí požičianých z banky a vkladov družstevníkov. Pozemok určený na výstavbu bol pôvodne trvalo trávnatý porast a zároveň areál konečnej železničnej stanice s priestorom na otáčanie a váženie vagónov. Tento fakt nám v súčasnosti pripomína už len názov ulice a zrenovovaná budova železničnej stanice, ktorá je využívaná ako dvojgeneračný rodinný dom. Technický stav a dizajn domov, ktoré potrebujú len minimálne opravy nasvedčujú, že tento projekt bol na tie časy mimoriadne moderný a nadčasový. V šesťdesiatych rokoch, už za socialistického zriadenia sa rozhodlo o pokračovaní zástavby, opäť v rámci družstevných projektov. Boli postavené 4 štvorbytové a ako posledné, 2 šesťbytové obytné domy. Zároveň sa začalo s výstavbou budovy základnej školy, ktorá niesla označenie II.ZŠ a v deväťdesiatych rokoch dostala názov ZŠ J. Horáka. Zelené plochy, prislúchajúce k domom a bytovkám, sú veľmi udržiavané a dobre rozvinuté. Taktiež v rámci areálu školy je zeleň dobre kultivovaná. Problematickou plochou, ktorú môžeme zaradiť medzi verejnú zeleň, je pozemok, ktorý sa nachádza pri areáli základnej školy a vznikol nasypáním pri výstavbe základnej školy. V minulosti bol vysadený ihličanmi a udržiavaný žiakmi základnej školy v rámci školských brigád. V tom čase bol aj miestom lokálnej meteorologickej stanice, čo zabezpečovalo sústavnú starostlivosť. Zmenou režimu a vlastníka došlo k úplnému zanedbaniu a nárastu náletových drevín. Postupne sa stáva aj

miestom vzniku divokej skládky. Fakt, že pozemok patrí mestu, vytvára možnosť využiť tento priestor pre vznik komunitnej permakultúrnej záhrady alebo ekocentra. Poloha, pri areáli školy tu ponúka možnosť výbornej spolupráce komunity so školou v rámci aktivít na vytvorení a kultivovaní tejto záhrady, s ponukou príjemného oddychového a relaxačného miesta, ktoré môžu využívať obyvatelia i žiaci. Taktiež by sa zabezpečila osobná zainteresovanosť žiakov na udržiavaní poriadku v prostredí, ktoré si sami vytvoria. Dopravná situácia bola v posledných rokoch predimenzovaná v dôsledku skracovania si cesty z hlavnej ulice Križovatka na obchvat a zvýšeného prechodu aut rodičov, privádzajúcich svoje deti do školy. Stále častejšie dochádzalo v ranných a popoludňajších hodinách ku dopravným kolapsom s ohrozením peších, preto mesto pristúpilo po dohovore s miestnou komunitou a vedením školy k zavedeniu opatrenia. Komunikácia, ktorá vedie cez ulicu Dobšinského sa stala jednosmernou s možnosťou parkovania. Situácia si vyriešila len z časti a nepriaznivá situácia sa presunula na ulicu Železničiarisku, kde navyše parkujúce autá znemožňujú prístup do garáží, ktoré sú súčasťou radovej výstavby. Táto vyhranená situácia je však len otázkou cca 2 hodín z celého dňa a vo zvyšnom čase sa stala táto štvrť zavedením tohto opatrenia veľmi tichou (pred zavedením opatrenia prechádzalo podľa prieskumu mesta cca 60 aut za hodinu, po zavedení „jednosmerky“ cca 2 autá; podľa vlastného pozorovania). Kvalita cestnej komunikácie je veľmi vysoká, je pravidelne udržiavaná v zimných mesiacoch. V jarných a letných mesiacoch sa na údržbe podieľa samotná miestna komunita. Napojenie dopravnej siete na autobusovú a železničnú stanicu je uspokojivé. Pre obyvateľov je podstatná vzdialenosť k občianskemu vybaveniu. V našom prípade sa jedná o štvrť Križovatka, ktorá sa stáva centrom urbanistického obvodu Juh a na pešo je cca 5 min od modelovej lokality.

Komunitný prieskum bol vykonaný autorkou, formou rozhovoru, kladením anketových otázok z Návrhu anketového lístka. Navštívených bolo 30 domácností zo 45 trvalo obývaných. Pri prieskume bolo zistené, že z 55 bytových jednotiek je 45 používaných na trvalý pobyt a 10 je využívaných prechodne, víkendovo alebo sú na predaj. Pri osobných návštevách a rozhovoroch v rámci komunitného prieskumu sme sa presvedčili, že demografické trendy sa potvrdili aj v tejto lokalite: vekový priemer v navštívených domácnostiach je 53 rokov, pričom len v 5 domácnostiach sa nachádzajú deti (3 domácnosti do 10 rokov, 2 domácnosti do 18 rokov). Z rozhovoru vyplynuli aj ďalšie zaujímavé fakty. Viac ako polovica obyvateľov tejto lokality je v dôchodku, zvyšná časť má pestré zastúpenie rôznych povolání (živnostníci, úradníci, advokát, učiteľ, policajt, stavbár, údržbár a ďalší), ale aj ženy na materskej a v domácnosti. Autorka viedla s respondentmi štandardizovaný rozhovor – kategorizovaný (výskumník má vopred pripravený súbor otázok). V navrhnutom anketovom lístku sú dva typy otázok:

uzavreté (alternatívne – áno/nie; výberové – škála odpovedí)

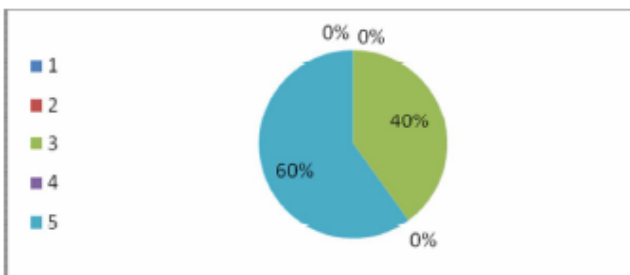
otvorené (neštruktúrované) – dávajú respondentom vzťahový rámec, ale neurčujú podrobnejšie ani obsah, ani formu jeho odpovede. Otvorené otázky umožňujú lepšie odhaliť skutočné postoje respondentov.

Počet trvalo obývaných domácností 45

Výsledky ankety

1. Vyjadrite na škále 1-5, nakoľko sa zaujímate o životné prostredie.

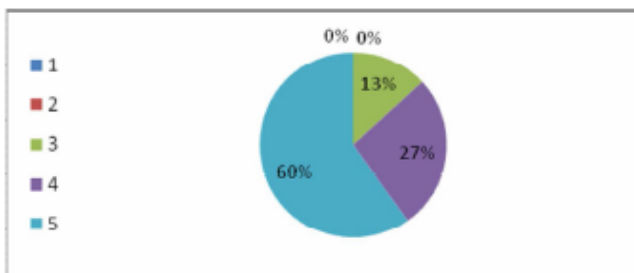
1	0	0%
2	0	0%
3	12	40%
4	0	0%
5	18	60%



Obyvatelia lokality vyjadrili vysoký záujem, ktorý je viditeľný aj navonok.

2. Na škále 1-5, nakoľko ste spokojný s bývaním v tejto lokalite.

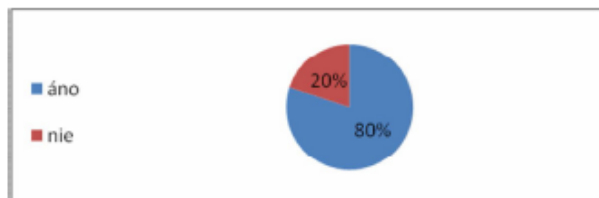
1	0	0%
2	0	0%
3	4	13,3%
4	8	26,7%
5	18	60%



Obyvatelia, ktorí svoju spokojnosť ohodnotili najvyššou známku, zároveň konštatovali, že táto lokalita napĺňa ich predstavu o bývaní a považujú ju za najkrajšiu v Banskej Štiavnici.

3. Vyhľadáвате aktívne informácie a aktuality z oblasti starostlivosti o životné prostredie?

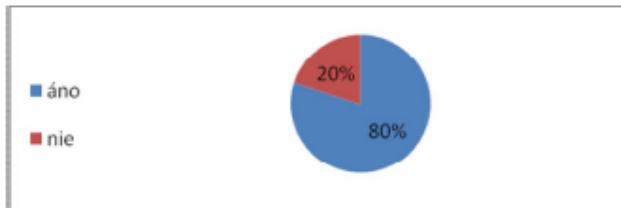
áno	24	80%
nie	6	20%



Medzi najviac preferované zdroje informácií patria: STV – Zelená revue, Enviromagazín, Separé; rôzne časopisy s tematikou životného prostredia a starostlivosti o dom a záhradu, Slovenský rozhlas, internet, ale aj návšteva rôznych seminárov a besied.

4. *Myslíte si, že jednotlivec môže svojím správaním ovplyvniť celkový stav životného prostredia?*

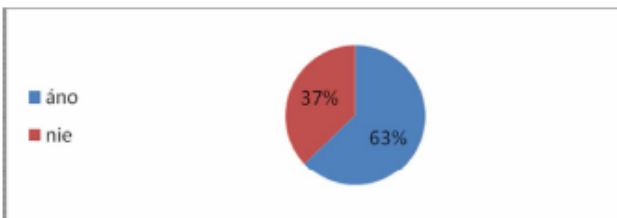
áno	24	80%
nie	6	20%



Tí, ktorí odpovedali nie, kladú bremeno zodpovednosti na plecia štátu cez vytváranie legislatívnych predpisov po ich dôsledné dodržiavanie a kontrolovanie.

5. *Zúčastnili ste sa už niekedy na seminári, školení, besede alebo prednáške (uved'te témy)?*

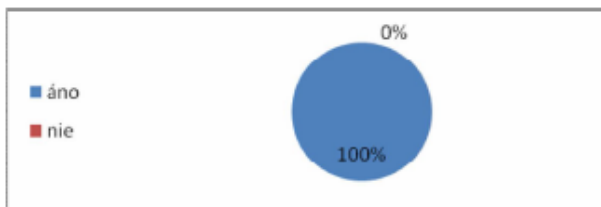
áno	19	63%
nie	11	37%



Áno – záhradkárčenie, včelárstvo, ochrana ŽP, bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci, zdravé stravovanie, sloboda zvierat, alternatívna liečba, turistika, muzeológia, nové trendy v edukácii, domácnosť – prezentačné akcie, psychosociálne, duchovné cvičenia, jóga Vyjadrený záujem o ďalšie témy – lunárne pestovanie, permakultúra, komunitné spoločenstvo, ekoporadenstvo.

6. *Zúčastnili ste sa už niekedy aktívne na zlepšovaní lokálneho prostredia?*

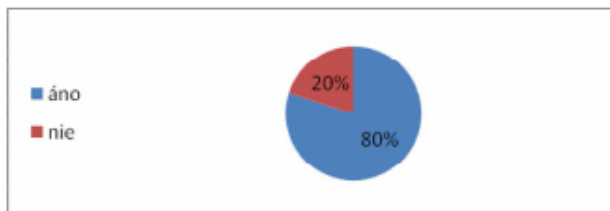
áno	30	100%
nie	0	0%



Všetci trvalo žijúci obyvatelia sa zúčastňujú na starostlivosti v okolí svojich príbytkov, kultivovaním záhradiek a predzáhradiek, ale aj udržiavaním cestnej komunikácie a chodníkov.

7. Počuli ste už o termíne dobrovoľná skromnosť?

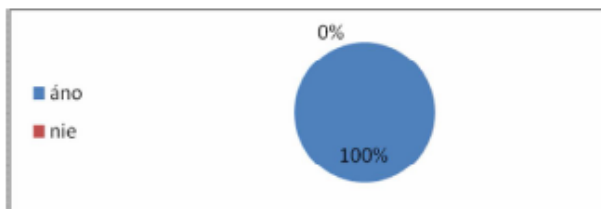
áno	24	80%
nie	6	20%



Pri rozhovore vyplynulo, že obyvatelia o tomto termíne nielen počuli, ale dobrovoľnú skromnosť aj reálne praktizujú, čo sa odzrkadľuje aj na ich zákazníckom chovaní. Keďže sú zastúpené hlavne vyššie vekové kategórie – dôchodcovia, byť skromný je samozrejmosť, v súčasnosti podporovaná aj zlou ekonomickou situáciou a neustále zvyšujúcou sa cenou energií.

8. Separujete odpad?

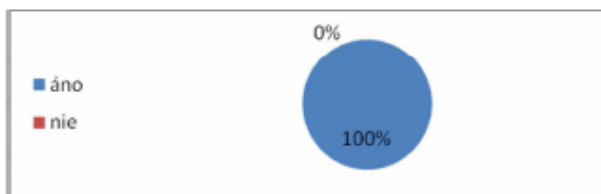
áno	30	100%
nie	0	0%



Všetci obyvatelia separujú odpad, ak keď nie všetci separujú všetky komodity. Väčšinou sú to plasty, sklo, kov a tetrapaky. Papier využívajú na rozkurovanie, alebo ho odovzdávajú žiakom pri hromadnom zbere papiera. Všetci by uvítali uzamykateľné stojiská s originálnymi nádobami na separovaný zber, nakoľko v súčasnosti zber realizujú do zberných vriec.

9. Zhodnocujete bioodpad prostredníctvom kompostovania?

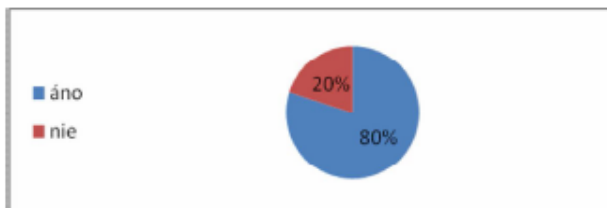
áno	30	100%
nie	0	0%



Kompostovisko sa nachádza pri každom rodinnom dome, ale aj v úžitkových záhradách za bytovkami. Obyvatelia vyjadrili záujem o komunitné kompostovanie a drvenie drevitého odpadu, ktorý vzniká pri jarnej prerezávke ovocných a okrasných stromov. V súčasnosti je likvidovaný spaľovaním, čo nie je vyhovujúce, žiaľ pri zlom servise technických služieb, jediné, možné riešenie.

10. Pestujete vo svojej záhradke, balkóne úžitkové rastliny?

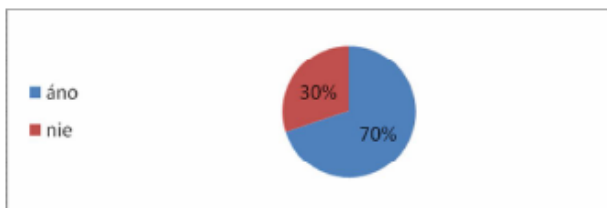
áno	24	80%
nie	6	20%



Keďže ku každému domu prislúcha pozemok s predzáhradkou a úžitkovou záhradou, väčšina obyvateľov túto časť využíva na domáce pestovanie zeleniny. Niektorí využívajú pre pestovanie skleníky a predpestuvávajú si vlastné sadeničky v pareniskách alebo zimných záhradách.

11. Využívate alternatívny vodný zdroj?

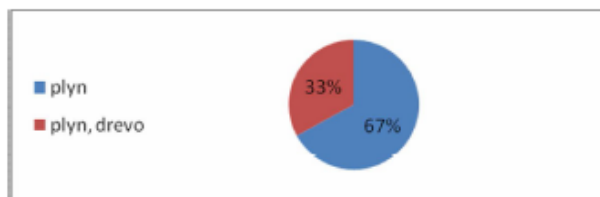
áno	21	70%
nie	9	30%



Ako alternatívny vodný zdroj sa využívajú hlavne zásobníky dažďovej vody, do ktorých je zvädzaná dažďová zo striech domov a garáží a používaná na polievanie a zalievanie WC. V niektorých domoch sa v pivnici zachovali studne s úžitkovou vodou, ktorá je aj takto využívaná.

12. Ako vykurujete svoje obydľie?

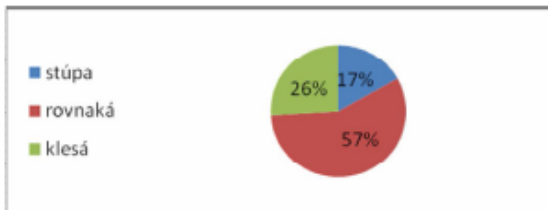
plyn	20	67%
plyn, drevo	10	33%



Lokalita bola plynofikovaná ako jedna z prvých v Banskej Štiavnici, zhruba pred 30 rokmi, preto je vykurovanie plynom na úrovni 100%. V poslednom období, hlavne pri vykonávaní rekonštrukčných prác sa 33% domácností rozhodlo pre doplnkové vykurovanie drevom prostredníctvom krbov s teplovzdušnými rozvádzačmi (prieduchmi).

13. Spotreba energie vo vašej domácnosti v poslednom období:

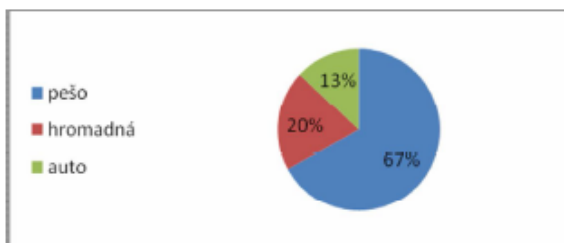
stúpa	5	17%
rovnaká	17	57%
klesá	8	26%



Stúpajúcu tendenciu zaznamenávajú rodiny s malými deťmi pre vyššie nároky na energiu, klesajúcu tendenciu zaznamenali domácnosti, kde boli realizované opatrenia znižujúce energetické požiadavky: zateplenie, výmena okien, ohrev teplej vody slnečnými kolektormi, výmena elektrických spotrebičov, doplnkové kúrenie drevom.

14. Aký spôsob dopravy preferujete?

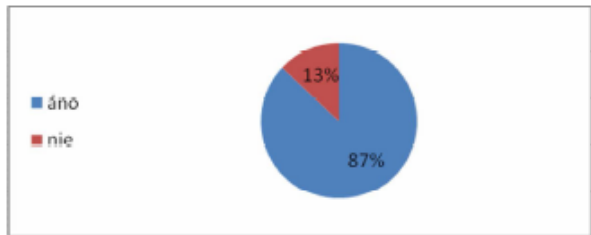
pešo	20	67%
hromadná	6	20%
auto	4	13%



Nakoľko sa v lokalita nachádza blízko k občianskej vybavenosti, obyvatelia preferujú pešiu prepravu, obyvatelia vo vyššom veku využívajú na prepravu po meste miestnu kyvadlovú prepravu. Na medzimestskú prepravu je uprednostnená hromadná preprava, pred autom aj z dôvodu neustále sa zvyšujúcich finančných nárokov na benzín a udržiavanie automobilu.

15. Zúčastnili by ste sa aktívne pri vytváraní ekokomunity?

áno	26	87%
nie	4	13%



Väčšina obyvateľov prejavila veľký záujem o projektovanie a realizáciu spoločných aktivít. Hlavné starší spoluobčania na dôchodku pociťujú prázdnotu a absenciu spolupatričnosti, ktorá by sa mohla obnoviť pri spoločných aktivitách. Tým, že už nemajú hlavné pracovné povinnosti, stávajú sa veľkým prínosom a vítaným ľudským zdrojom pri vytváraní ekokomunity. Keďže je zastúpené široké spektrum povolání a tým aj skúseností, komunita by mohla byť značne samostatná a nezávislá s možnosťou zaviesť LETS obchodovanie.

16. Aké aktivity by ste navrhli pre zlepšenie života v tejto lokalite?

Vytvárať spoločenstvo – ekocentrum, kultivovať susedské vzťahy, spríjemňovať okolie starostlivosťou o verejné zelené plochy, vytvárať partnerstvo so školou pri spoločných aktivitách, aktivity obmedzujúce dopravu, vytvárať parkovacie miesta, komunitné kompostovanie v rámci permakultúrnej záhrady, estetické zjednotenie plotov, vypracovať projekt pre zabezpečenie uzamknateľných stojísk na odpadové nádoby a separovaný zber.

<p style="text-align: center;">SLABÉ STRÁNKY</p>	<p style="text-align: center;">SILNÉ STRÁNKY</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Vysoký priemerný vek obyvateľov • Vysoká migrácia za prácou • Zhoršená dopravná situácia • Kontaminácia pôdy ťažkými kovmi • Nízke využívanie obnoviteľných zdrojov energií 	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoký záujem obyvateľov o ŽP • Aktívna starostlivosť o lokálne ŽP • Vysoká úroveň domácej ekológie • Čiastočná potravinová sebestačnosť • Vysoká motivácia a akcieschopnosť obyvateľov komunity
<p style="text-align: center;">OHROZENIA</p>	<p style="text-align: center;">PRÍLEŽITOSTI</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Nekončiaca a prehlbujúca sa ekonomická kríza • Absencia environmentálnych aktivistov z externého prostredia • Zvyšovanie množstva sociálne slabšej vrstvy obyvateľstva (existenčné problémy, krádeže úrody vypestovanej v domácich záhradkách) • Vandalizmus, sprajerstvo, duchovná apatia a ničenie majetku ľudmi, ktorí prechádzajú lokalitou v nočných hodinách 	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalizácia v peknom prostredí v novej časti historického mesta, uprostred Štiavnických vrchov • Možnosť čerpať prostriedky z fondu rozvoja bývania na revitalizáciu, zateplenie bytových jednotiek a nákup solárnych kolektorov • Možnosť spolupracovať s Miestnym skrášľovacím spolkom • Vytvoriť permakultúrnu záhradu s neudržiavanej plochy susediacej s areálom školy za pomoci nadácie EKOPOLIS

ZÁVER

Žiadna ekokomunita nie je rovnaká, žiadna neponúka uniformné a všade platné riešenia. Každá je jedinečná, každá sa musí snažiť hľadať svoju vlastnú cestu k trvalo udržateľnému životu. Štúdiom pri vytváraní tohto príspevku sme sa presvedčili, že k cieľu nevedie len jedna cesta. Možnosť, ako vytvoriť a naplniť vízie trvalej udržateľnosti je množstvo. V predkladanom príspevku sme si vytýčili prioritný cieľ: konkretizovať a popísať niektoré z možností budovania ekokomunit v ľudských sídlach. Vyšpecifikovali sme tri možné prístupy. Charakterizovali a popísali sme filozofiu permakultúry a dali sme ju do súvisu s vytváraním ekokomunity. Na vybratom modelovom území boli vykonané základné kroky vytvárania ekokomunity ako sú priestorovo – funkčná analýza a komunitný prieskum. Z analýzy vyplynulo, že územie je lokalizované vo vyhovujúcom prostredí a poskytuje veľmi dobrú materiálnu – technickú základňu pre budovanie ekokomunity. Veľká výhoda je umiestnenie základnej školy v danej lokalite, čo poskytuje veľké možnosti pre potencionálnu spoluprácu pri činnostiach s miestnou komunitou. V prieskume sme zistili, že tunajší obyvatelia sú ekologicky uvedomelí. Domáca ekológia je na vysokej úrovni a väčšina prejavuje aktívny záujem o problémy životného prostredia. Tento záujem sa odrzkadľuje aj v starostlivosti o lokálne životné prostredie a intuitívne sa už v súčasnosti snažia žiť trvalo udržateľným životom s čiastočnou potravinovou sebestačnosťou. V prípade aktuálneho vytvárania ekokomunity, väčšina prejavila záujem o aktívne spolupodieľanie sa na jej činnostiach a projektoch. Môžeme konštatovať, že sledovaná lokalita, je už v súčasnosti vzorom modelu „mestskej dediny“. Navrhované aktivity z prieskumu by mohli tvoriť základ komunitného Akčného plánu a ostatné zistenia z prieskumu sú zhrnuté vo SWOT analýze modelovej lokality. Vznik komunity je dlhodobý proces, riešenie problémov na princípe ľudskej spolupráce. K tomu, aby komunita vôbec vznikla, je nutné spojiť a motivovať skupinu ľudí, ktorí majú záujem spoločne pracovať na spoločnej úlohe, dlhodobom ciele, vízii o trvalo udržateľnom živote.

LITERATÚRA

- BRŮNA, J. 2011 . *Ekokomunity* [online]. Enviwiki, ; [cit. 4. 4. 2011]. Dostupné na internete: <http://www.enviwiki.cz/w/index.php?title=Ekokomunity&oldid=12015>
- HALAMOVÁ, J. 2002. Psychologický zážitok komunity I. Historické, metodologické a výskumné východiská problematiky. In *Československá psychologie* XL VI/5, 2002. ISSN 0009-062X
- HALAŠOVÁ, M., VINCÍKOVÁ, S. 2008. *Škola a miestna komunita v intenciách trvalo udržateľného rozvoja*. Banská Bystrica: UMB FPV, 2008. 90 s. ISBN 978-80-8083-685-6.
- KOTOUČKOVÁ, J. 2004. Co je permakultura (volně přeloženo – trvalo udržitelné hospodářství či způsob života). In *Klíčová dírka*, roč.1, 2004, č. 1.
- NAGY, E. 2002. *Nízkoenergetický ekologický dom – novostavba a renovácia*. Bratislava: Jaga group, 2002. 283 s.
- NOZICK, M. 1999. Sustainable Development Begins at Home: Community Solutions to Global Problems. In Pierce, J. T., Dale, A. (ed) 1999. *Communities, Development and Sustainability across Canada*. Vancouver: UBC Press, 1999, ISBN 0-7748-0722-9.

SZABÓOVÁ, S., FLENLEY, C. 2005. *Tvorba partnerstiev a rozvoj komunity*. Košice: SOSNA, 2005. 71 s.

ŠVIHLOVÁ, D. 2006. Postavenie komunít v trvalo udržateľnom rozvoji. In *Národohospodársky rozvoj*. Brno: Masarykova Univerzita, roč. 2, 2006. ISSN 1213-2446.

WATES, N. (ed) 2006. *The Comunita Planning Handbook*. London: Earthscan Publishes, 2006. 230 s. ISBN 1-85383-654-0.

WISMER, S. 1996. *Sustaining Communities: The Dynamics of the Dispersed City: Geographic and Planning Perspectives on Waterloo Region*. Waverloo: University of Waterloo, 1996.

WHIETEFIELD, P. 1996. *Permakultura v kostce*. Praha: Synergia, 1996. 115 s. ISBN 80-901797-4-6.

THE CUMULATIVE EFFECTS OF ASSESSED DEVELOPMENT PROJECTS ON THE MALACKY LANDSCAPE

KUMULATÍVNE VPLYVY POSÚDENÝCH PROJEKTOV NA KRAJINU MESTA MALACKY

Vyskupová M.

Department of Landscape Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University
Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

E-mail: vyskupova@fns.uniba.sk

ABSTRACT

Our objective in this research was to outline the need of cumulative impact assessment in the EIA process and the possibility to assess cumulative impacts taking into account also the carrying capacity of landscape components. On the model area in Slovakia we predicted the impacts of individual development projects, specified their potential accumulation and determined their significance according the set of vulnerability of each affected environmental component. We came to the conclusion that this possibly could be a method for practical use in maintaining sustainable development of concrete area.

Key words: cumulative impact assessment, impact, landscape

Acknowledgments: The contribution was prepared within the grant project of Comenius University for PhD. students and young researchers No. UK/84/2012.

INTRODUCTION

Cumulative environmental impact assessment as a part of environmental impact assessment process (EIA) is a pre-decision tool for avoiding adverse anthropogenic effects on the environment. This process focuses on those effects which can occur when impacts on the natural and social environments take place so frequently in time or so densely in space that the effects of individual projects cannot be assimilated (Ramachandra, 2007). In practice, the most difficult part of this process is to identify related impacts of various development projects in terms of a potential occurrence of cumulative effect and to consider their significance for the affected environment as a base for specifying appropriate mitigation measures.

The important part of our environment which is affected by development projects almost every time is a landscape itself. We can notice the basic landscape changes as changes of landscape structure. Although we can see fragmentation or conversion of land structure elements, these processes are more extensive and are usually connected with decreasing of landscape stability and subsequently with reduction in quality of human life because the state of landscape is a fragile expression of natural conditions, regional culture and local identity (Lipský, Romportl, 2007). To avoid the oncoming problems we can operate with landscape carrying capacity. It is a landscape characteristic which expresses how many changes caused by exogenous factor the landscape sustains. It determines the range of feasible human land use activities, while the natural characteristics, the basic processes and interactions between landscape elements and the quality of the environment will not be disrupted or destroyed (Drdoš, Hrnčiarová, 2003).

Otherwise the carrying capacity can be expressed as a vulnerability of landscape elements which represents an extent of acceptable volume of landscape changes while respecting its thresholds (Wilson et al., 2005). So the potential solution to maintain the quality of the landscape at the suitable level is to determine the carrying capacity of each affected component and subsequently select activities whose impacts will not exceed it and for the other ones suggest appropriate mitigation.

Practically we can say that the vulnerability of geological substrate and rock base is linked to its thickness, nature, integrity, and lithology, hydrological and hydrogeological conditions. The vulnerability of soil is connected with its types, granularity, and structure, position of the soil layers and also the way how the contaminants can penetrate into them. The vulnerability of water surface is given by the presence of sources of pollution, the character of water flow, if it is widely open and its self-cleaning ability. For the groundwater is important the collector position, the quality of infiltration and the aquifer level. The air condition is influenced by discharging emissions so the

vulnerability of this environmental component depends on the amount of emissions and the type and multiplicity of sources. Important factors for the carrying capacity of this element are also the amount of precipitation that falls in the locality, strength and direction of wind and also types of filtration in the sources. The vulnerability of biota is predominantly based on the type of plant cover, their origin and current state and also on its distance from urban settlement and other human-influenced territories. For animal species their abundance on the locality is important, also the authenticity to that place, the state of their habitats and representation of their food options. Regarding the structure of landscape we can mainly talk about its sensitivity to land use conversion and the vulnerability of the landscape view is linked with the architectural trends of urban settlement, typical rural character of marginal places, eventual inappropriate landscape features or possible vertical distortion of today's components.

MATERIALS AND METHODS

In our research we outline a possible method how to identify impacts with eventual cumulative occurrence, how to evaluate their significance and how to predict potential landscape changes in terms of its carrying capacity. For this investigation we have chosen a model area Malacky situated near the western border of the Slovak Republic (map 1). The exact time frame for our research was determined from 1st of September 1994 when the first Slovak law on EIA was effective to 1st September 2012. During this time 30 different development projects were proposed. All of these projects met the limit values prescribed by actual law on EIA (Act No. 127/1994 Coll., Act No. 391/2000 Coll., Act No. 24/2006 Coll. as amended) so they were individually assessed.

For cumulative assessment it is necessary to consider not only time frame of construction and operation of activities but also their spatial context (Smit, Spaling, 1995). So in addition we checked other projects near this selected area proposed on set time. We found other 5 industrial projects near the eastern border of Malacky, which potentially have considerable impacts on the affected environment. So we had to set a new southeast border of our model area (see map 2) and while assessing took into account also these five activities. Then we detected the technical and technological construction and main features of operation of proposed activities using the documentation from the EIA process. The realization of all of them was in final statements and decision from screening step recommended although for some of them with necessary mitigation measures. For verifying this written information we predicted the potential impacts on the environment including landscape of each action individually during their construction, operation and after operation. Finally we identified the potential accumulation of them as you can see in table 1.

To consider the effects of proposed projects on the landscape structure we created a map of current landscape structure using the tourist map of this region, aerial photos and additional field survey. We further identified 21 basic structural elements of current land use (see map 2). The map was

created as an extension of previous simple map in the geographic information system ArcGis 9.3. in the Cartesian coordinate system S-JTSK.

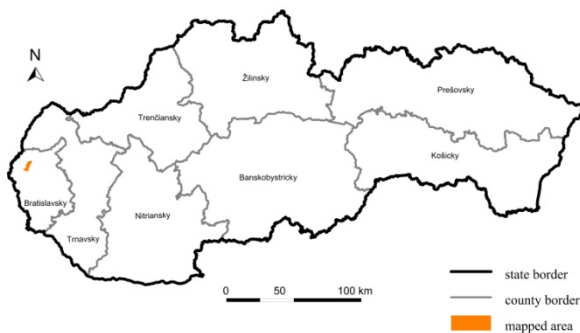
The carrying capacity of affected parts of environment was specified for determining the significance of the identified impacts (table 2). For the detection of changes of affected landscape we first carried out some basic literature search about the environment of model area such as information about local climate, geology of locality, occurring soil types, hydrological conditions, potential vegetation etc. Using the literature review about the environment of selected locality, the obtained information about their originality, their current state of pollution and from EIA documentation we subjectively characterize the vulnerability of each environmental component verbally and also by numeric values (table 2). We assigned the numeric values to the components according this evaluation scale developed by Roberts (1991): 5 – critically vulnerable, 4 – high vulnerable, 3 – slightly vulnerable, 2 – softly vulnerable and 1 – little vulnerable.

With the weighted matrix method (table 2) we evaluated the impact significance. For this evaluation we used the vulnerability of each affected environmental component multiplied by the assigned weight of impact strength using the following range suggested by Pavličková (2009): value 0 (without impact – the proposed activity will not affect landscape components in any way), value 1 (insignificant impact – mainly impact with character of risk or coincidence), value 2 (small significant impact – impact with low quantitative influence, local impact), value 3 (significant impact – the impact on the wider environment with high reception) and value 4 (very significant impact (reception is very high).

RESULTS AND DISCUSSION

The model area of presented research is situated in the western part of the Slovak Republic in the Bratislava region and Malacky district (see map 1). This zone covers an area of 2618.92 hectares and according to urban and municipal statistics (Statistical Office, 2012) has in the year 2010 18 132 inhabitants.

Map 1 A placement of model area within the Slovak Republic



According to Mazúr and Lukniš (2002) the relief there consists of plains and floodplains on the west and of undulated plains on the southeast. The whole area extends on the Bor lowland which is a part of Záhorská lowland, Vienna basin, Pannonia basin and the Alpine-Himalayan system. Lapin et al. (2002) ranked this territory to the warm moderately dry region with 50 or more summer days annually in average with daily maximum air temperature min. 25 °C and with mild winter. The geological structure of this zone is formed with Pannonian and Pontian gray, mostly calcareous clays, silts, sands, gravels, lignite seams and freshwater limestone horizons. The quaternary deposits consist of fluvial sediments (mainly floodplains humic loam or loam and sandy loam, partly with gravel-sandy loams of river valley floodplains) and calcareous and noncalcareous wind-blown sand (Maglay, Pristaš, 2002). According to Slovak soil map (1993) for the southern part of this locality are typical arenosols, on the southwest we can find mollic fluvisols and mollic gleysols and on the northeast cambic arenosols. Maglocký (2002) described the potential natural vegetation in the river basin as hardwood alluvial forests, in lowlands as hygrophilous oak-hornbeam forests and on the south pine forests on sand and sand-dune grasslands.

During the last 18 years 35 various development projects were planned in this locality. Specifically, the majority of these intentions were connected with industrial development of this region, such as modernization and increasing of production, reconstruction of existing halls and enlargement of storages. Also three shopping centres, three larger groceries and two residential zones were planned. The realization of all of them was in final statements and decision from screening step recommended although for some of them with necessary mitigation measures. For verifying this written information we predicted the potential impacts of each action individually as you can see in table 1 below. Basically almost all of proposed activities will cause during their construction more temporary impacts such as the building mechanisms will produce more emissions into air, their mobility and service will cause more dust, animals living near the site will be disturbed and so on. One of the permanent effect that we carried out is that more proposed industrial plants will have negative effect on the local air due to discharge of emissions of CO₂, particulate matter and NO_x. When we also consider obtained information from noise studies done by the EIA, intensive are also the noise values of seven proposed industrial plants. The larger activities such as golf park near pinewoods and residential zones with 62 and 80 detached houses on former arable land will radically change the landscape view. Landscape structure will be affected by some of these activities which will change the current land use to a new one. The other activities will be constructed on the paved surfaces in built-up areas of settlement or industrial use so the land structure elements there will not be changed.

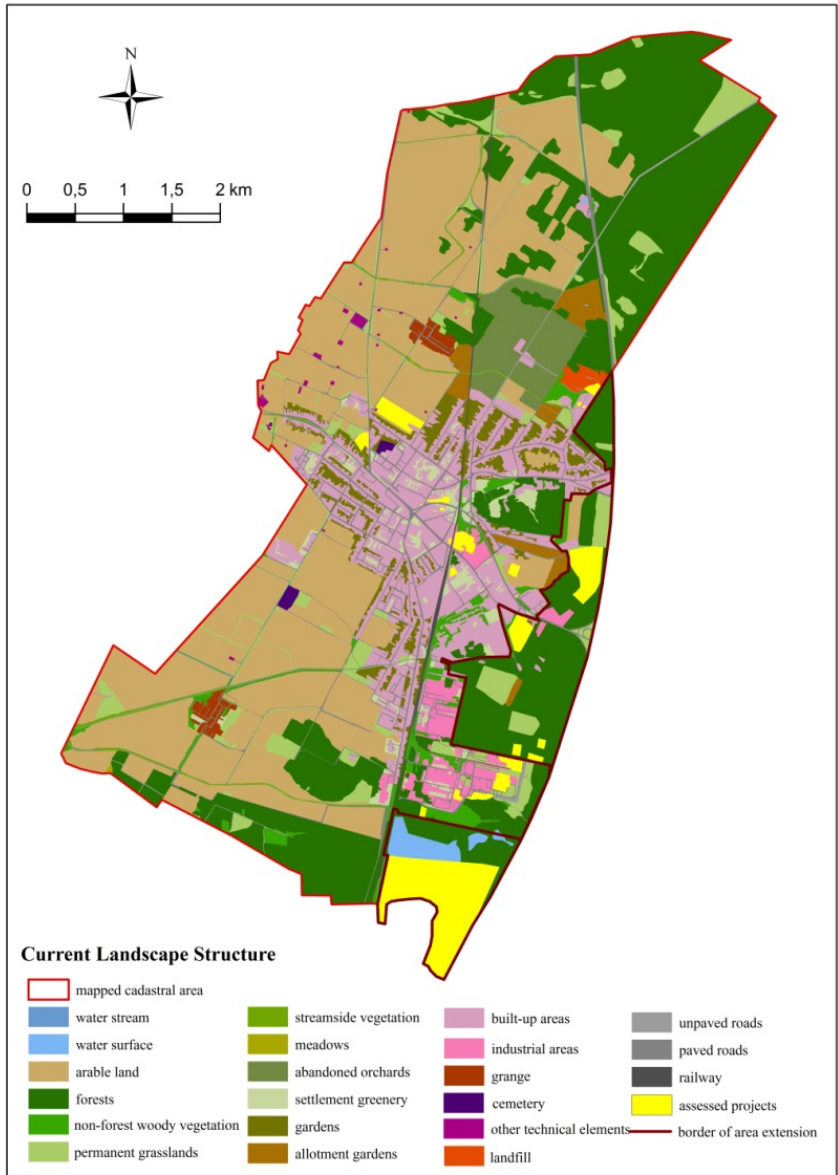
Tab. 1 The model of a simple matrix used for identifying permanent potential impacts

Receptor	Project 1	Project 2	Project 3	...	Project 34	Project 35	Cumulative impacts
geology and rock base		x		...			
soils		x	x	...	x		
water areas		x		...			
air	x	x	x	...	x	x	x
biota		x	x	...	x		x
protected areas		x		...			
noise		x	x		x		x
landscape structure	x	x	x	...	x		x
landscape view	x	x		...		x	x

In almost all related final statements and decisions from the screening step the impacts of proposed projects were evaluated as little significant. However when we put the related impacts together and consider also the carrying capacity of affected environmental components, the potential impact is more extensive and could cause effects which are more important because could endanger the environment.

As we mentioned before, people can notice the basic landscape changes as changes of landscape structure. So both dimensions, the time and the spatial, were taken into account while considering the adverse effects on the Malacky landscape. From these points of view we detected that the size of industrial area is getting bigger in recent years mostly on the eastern part of Malacky (see map 2). We tried to review the importance of this potential cumulative impact setting the impact significance and the vulnerability of each affected environmental component in the weighted matrix below. We found out that the overall effect of this landscape has really strong influence on landscape ability to cope with adverse effects.

Map 2 Current landscape structure of mapped area and the placement of assessed projects



The rock base and geological structure of affected area will not be markedly influenced neither the quaternary cover. The proposed projects can little increase the evaporation because the cover layer can be removed due to construction activities. Also if there is detected some eolic erosion on sandy soils, these activities can accelerate this current geodynamic process. These effects are not so likely so we marked the vulnerability of this environmental component with value 1.

The affected soil we also marked with value of vulnerability 1. The reason is that even these soils are sandy and little resistant, the concrete projects are situated into areas where these are already fixated or the other activities are not so expansive. But there is still some possibility of contamination risk or eolic erosion.

The water areas are also marked with the value of vulnerability 2. This is due to the distance of water surface from development projects and the depth intervention of mentioned projects. The final recipient for sewage of all of these projects is Malina stream which means that there will be greater load and potentially the stream quality can be worse.

The air condition in this area is given the vulnerability of value 5 because according the available materials which we had, the current quality of air in this locality, mostly in the southeast part, is considerably worse. To not exceed the permissible limits for pollution the local air quality various kinds of mitigation measures have been set as conditions for implementation of some projects. The air is influenced also by the movement of car traffic on roads and by the close railway.

The vulnerability of local biota we marked with value 3, because the animal and plant species were significantly important during the construction phase of projects by increased noise, local higher production of air pollutants by movement of building mechanisms, then by the local conversion of soils, local deforestation, by the reduction of plant cover etc. During the operation phase of activities there will be other potential threats such as spreading of synanthropic species, potential introduction or permanent occupation of habitats.

For the close protected areas we selected the degree of vulnerability 2 because near the majority of proposed activities there is no concrete locality valuable in terms of biodiversity conservation. Only on the eastern part of the area we can find Marhecke ponds which are special area of conservation labelled as SKUEV0121, a part of the European net NATURA 2000 and according the territorial system of ecological stability one local biocorridor Mlaka stream.

The sensitivity value of noise we marked with value 4 because in this locality there are a lot of sources which currently influenced the limits permitted by actual Slovak law. The actual noise level in this locality is due to close first class road, railway and industrial activities high enough so even small increases can cause crossing these limits.

Also the structural components of this area are given the value of sensitivity 4. The reason is contingent by very frequent change of recent land features to new ones which means total conversion of land use. With this is partly connected also the landscape view which we gave the vulnerability values 3 because half of projects is proposed into the urban settlement with

appropriate architectural proposals and other are nominated as a fluent contiguity of it to the rural parts.

Tab.2 The model of a weighted matrix used for evaluating the significance of potential permanent impacts

Receptor	Vulnerability A	Project 1		Project 2		Project 3		Project 34		Project 35		CI (A.a)+(A.b)..+(A.e)
		a	A.a	b	A.b	c	A.c	d	A.d	e	A.E	
geology and rock base	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
soils	1	0	0	2	2	2	2	1	1	0	0	5
water areas	2	2	4	3	6	0	0	1	2	1	2	14
air	5	4	20	4	20	3	15	3	15	4	20	90
biota	3	3	9	4	12	3	9	3	9	0	0	39
protected areas	2	2	4	2	4	0	0	1	2	0	0	10
noise	4	1	4	3	12	4	16	3	12	2	8	52
landscape structure	4	4	16	4	16	4	16	3	12	1	4	64
landscape view	3	3	9	4	12	2	6	2	6	4	12	45
together	-	-	66	-	85	-	64	-	59	-	46	320

*CI – cumulative impacts, a,b,c,d,e – degree of impact significance

The most significant impact according our outcomes (with total value 324) is impact on landscape structure of the model area. As we mentioned before, the proposed actions mean a great modification of land use and conversion of actual land use elements to other ones. For example the intention suggesting to build a new shopping centre will change the current abandoned arable land to paved area full of amenity objects.

The second most significant impact with total value 315 from these activities is an effect on local air quality. According to seven noise studies made as a part of environmental impact statements and intentions in the EIA process, air quality in the southeast part of model area is due to industrial use currently very low. If we start more activities discharging a bigger amount of emissions into air without properly mitigation measures, the quality of air will get worse and it will negatively affect local inhabitants, home biota and also the macroclimatic conditions.

Also important is that the deforestation on the eastern part will cause smaller mitigation of air flow. Very important impact is also overcoming the noise limits (reached the total value 240). The most liable parts of the model area are in the industrial southeast and the eastern part with urban settlement near that. There are planned a lot of noisy activities such as furniture production, mill for car bodies or waste shredders. There will be also an increase in car traffic and in carriage. All of these actions are situated near the railway and first class road which are very frequent. For these reasons and because of the proximity of urban settlement it is essential to use special technologies or to built there some noise barriers.

Not least significant are also impacts on landscape view (the total value 201) which will be supplemented in the industrial part by more storage, parking places, roads and produce halls. In the

northern part it will be supplemented by waste storages and in the urban area by more shopping places. More visible will be the changes in the peripheral rural parts where the residues of pine and alder forests will be changed to built-up areas or golf course.

Due to all this mentioned changes will be large affected also local biota (the total value 168), ie. there will be made a little deforestation in the eastern part, many plant species will be destroyed and replaced by new landscaping activities as creating urban greenery. Subsequently this will change also the representation of animal species, which will have destroyed or drastically changed habitats.

CONCLUSION

Landscape carrying capacity is always related to the anthropogenic activity. In one area more various thresholds can exist so the basic problem there is to determine these critical thresholds which point out on the intervention which can cause irreversible changes in landscape. It means the quality of landscape will get worse which will affect also the quality of human life. As one solution we have to consider the actual state of the environmental components locally and take into account every potential disruption not only these which are located immediately into rated landscape element.

As we know, all of development activities can have various adverse impacts on the environment and not only on the exact parts where these projects are proposed. Cumulative impact assessment can help to predict that kinds of impacts which can supposedly multiplied and can cause worse effects than they could cause individually. The great advantage of this process is that we can assess the predicted impacts thinking of the actual carrying capacity of each affected environmental component. With our research we confirmed our conviction that this preventive process is one of the suitable tools which can show us how to use our landscape sustainable and how to harmonize human requirements for land use with the options which are offered by the landscape itself.

REFERENCES

- Biely A. (2002): Geological Structure, 1 : 500 000, In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency
- Drdoš J., Hrnčiarová T. (2003): The evaluation of landscape carrying capacity in Slovakia, The international workshop of impact assessment, Teplý vrch, Slovakia, p. 27-37
- Hraško J., Linkeš V., Šály R., Šurina B. (1993): Slovak soil map, 1 : 400 000, In: Soil portal, http://www.podnemapy.sk/portal/prave_menu/podna_mapa/podna_mapa.aspx
- Lapin M., et al. (2002): Climatic regions, 1 : 1 000 000. In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency
- Lipský Z., Romportl D. (2007): Classification and typology of cultural landscapes: methods and applications. In: The role of landscape studies for sustainable development, University of Warsaw, p. 519-535

Low J., et al. (1984)? Principles for determination and design of territorial systems of ecological stability. Agroprojekt, Brno.

Maglay J., Pristaš J. (2002): Quaternary deposits, 1 : 1 000 000, In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency

Maglocký Š. (2002): Potential natural vegetation, 1 : 500 000, In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency

Mazúr E., Lukniš M. (2002): Geomorphological situations, 1 : 500 000. In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency

Mazur E., Lukniš M. (2002): Geomorphological units, 1 : 1 000 000. In: Landscape Atlas of the SR. Bratislava, ME SR, Banska Bystrica, Slovak Environmental Agency

Pavličková K., et al. (2009): The Impact Assessment: The university educational text, The Comenius University in Bratislava, 122 p.

Ramachandra T., V. (2007): Cumulative environmental impact assessment, Gardners Books LiD., 200 p.

Roberts C. (1991): The carrying capacity interpretation by the vulnerability of environmental components

Smit B., Spaling H. (1995): Methods for cumulative effects assessment, In: Environmental impact assessment review, Vol. 15: p. 81-106

Statistical Office (2012): Urban and Municipal Statistics, (online). Bratislava : Statistical Office of the Slovak Republic, <http://app.statistics.sk/mosmis/sk/run.html>

Wilson K., Pressey R., Newton A., Burgman M., Possingham H., Weston Ch. (2005): measuring and incorporating vulnerability into conservation planning, In: Environmental Management, Vol. 35, No. 5: p. 527-543

TRADITIONAL COLLECTION OF WILD PLANTS AS SUPPORT FOR WEAK REGIONS

TRADICE SBĚRU ROSTLIN JAKO PODPORA SLABÝCH REGIONŮ

Žitňáková J.¹, Vaishar A.¹, Gežová V.²

¹Department of Applied and Landscape Ecology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jana.zitnakova@mendelu.cz, antonin.vaishar@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to compare geographical characteristics, structure of settlement, economy, historical characteristics, composition of population on the demographic, social and economic level, unemployment rate, job opportunities and also activities for conservation of local traditions and building local communities. The paper deals with the partial conclusions of the social-economic analysis, questionnaire survey and field study within the project Traditional and wild. Four regions were selected within the South Moravian Region. At first the definition of these areas through literature, maps and statistical data was created. This was followed by field study in the regions, on the basis of which information obtained before have been modified or added. The interviews were conducted with the representatives of municipalities and the questionnaire survey with residents. All regions are losing population, population is aging and there is a high unemployment rate. People have to commute to work even over long distances. The preliminary results of the questionnaire survey show, that the majority of the respondents still use plants to prepare meals, drinks and for treatment and decorative purposes. People at least occasionally collect the plants in nature. People received the information about these plants from literature or from their grandparents. People have very positive attitude to collection of wild plants and they would like to know more new information about it. The most popular recipes for homemade products are honey of dandelions, syrup of plantain or of elderflower, stuffing and spinach of nettle and rosehip tea. The existing research shows, that in the regions, where the traditions are preserved, there is a strengthened regional identity among people and it leads to the establishment of local communities. Then these groups are able to organize various regional events, which contribute to the visibility of the region. Based on attendance of these events financial support (for example in form of voluntary admission or buying local products) begins to generate in the region.

Key words: the South Moravian Region, Traditional and wild, microregions

Acknowledgments: This paper arose within project „Promoting traditional collection and use of wild plants to reduce social and economic disparities in Central Europe“ implemented through the CENTRAL EUROPE Programme co-financed by the ERDF, No. 3CE361P4.

ÚVOD

Příspěvek se věnuje dílčím výsledkům socioekonomické analýzy, dotazníkového šetření a terénního výzkumu v projektu Traditional and wild, který je realizován v rámci programu Central Europe a je spolufinancován z Evropského fondu pro regionální rozvoj. Řešení projektu probíhá v období květen 2011 až duben 2014.

Projekt Traditional and wild se mimo jiné zabývá několika otázkami, které přímo souvisí s životem na venkově. Jedny z nejdůležitějších otázek, které byly stanoveny, se ptají, zda lidé žijící na venkově, i v dnešní době, stále umí rozpoznat, jaké poklady jim příroda poskytuje, zda může zachování místních kulturních tradic znamenat nějaký ekonomický přínos a zda mohou být kultura a rostliny vůbec v nějaké souvislosti.

Využívání volně rostoucích rostlin je spojeno s lidstvem a jeho vývojem již po staletí. Sběr a využití volně rostoucích rostlin bývala běžná činnost, která byla součástí práce lidí v zemědělství. Po 2. světové válce se začalo stále více výrobků dostávat do obchodů, kde si lidé mohli čaj, koření a podobné produkty jednoduše koupit, takže navštěvovat přírodu přestávalo být nutné. V současné době již nakupujeme potraviny v supermarketech a medicína je podřízena nadnárodním farmaceutickým společnostem. V důsledku toho tedy došlo ke zmenšení přímého kontaktu člověka s přírodou a k omezení sběru volně rostoucích rostlin jako přírodních léčiv a potravin.

Jedním z hlavních cílů projektu je chránit a rozvíjet upadající kulturní dědictví, jež se týká znalostí o volně rostoucích rostlinách, předávaného z generace na generaci. Snahou je podpořit regiony s vysokou nezaměstnaností, kde lidé mohou zkusit prodávat to, co sami již léta pro sebe vyrábějí a tím zlepšit svoji ekonomickou situaci. I současná krajina dává dostatek příležitostí ke sběru, ale je třeba se naučit postupovat šetrně. Nevhodný či necitlivý zásah by vedl k ohrožení jednotlivých druhů na jejich přirozených stanovištích. Záměrem není vybudovat masovou produkci, ale ukázat určitou možnost přivýdělku seniorům, ženám na mateřské dovolené i etnickým menšinám.

Jako případová studie byl vybrán Jihomoravský kraj, ale jelikož venkov zde je velmi diferencovaný především v závislosti jednotlivých částí od města Brna, byly vybrány čtyři mikroregiony představující dva typy periferního venkova. Mikroregiony Malá Haná a Nedvědice jsou případy regionu na vnitřní periférii a mikroregiony Vranov nad Dyjí a Hornácko jsou příklady pohraničních oblastí. V rámci těchto mikroregionů byly vybrány dvě obce s více než 100 a méně než 500 obyvateli. Mikroregion Malá Haná zastupují obce Uhřice a Úsobrno, obce Pernštejské Jestřábí a Křížinkov byly vybrány na Nedvědicku, na Vranovsku jsou to Lančov a Zálesí a region Hornácka zastupují obce Kuželov a Malá Vrbka.

MATERIÁL A METODIKA

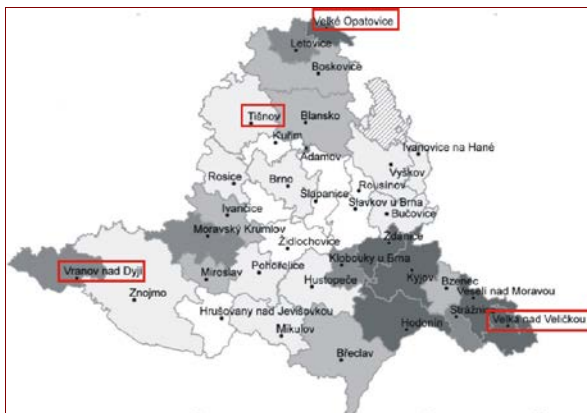
V projektu bylo využito především dostupné literatury k jednotlivým regionům, uskutečnilo se terénní šetření a fotodokumentace vybraných oblastí, byly vedeny rozhovory s představiteli vybraných obcí o sociální, kulturní i ekonomické situaci v obci a jejím okolí. Pro potřeby socioekonomické analýzy byla použita statistická data Českého statistického úřadu, popř. údaje od místních institucí.

Nejdříve probíhaly práce na vymezení daného regionu pomocí literatury, mapových podkladů a statistických dat. Poté následovaly práce v terénu, na jejichž základě byly dosavadní získané informace upraveny či doplněny.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Sledované oblasti se vyznačují vysokou mobilitou obyvatel, nedostatečným počtem pracovních míst, dojížděnkou za prací, vyšší mírou nezaměstnanosti, nižší vzdělanostní strukturou obyvatelstva, záporným migračním saldem a relativně špatnou dopravní dostupností.

Obr. 1 Mapa Jihomoravského kraje s vybranými regiony (<http://www.rrajm.cz/>)



Následující tabulka ukazuje napojení na lokální a regionální centra v rámci vybraných mikreregionů. Podstatná je dostupnost regionálních center, kde se mimo jiné nachází významnější nabídka pracovních míst.

Obr. 2 Vzdálenost místních a regionálních center (zpracoval A. Vaishar)

	Místní centrum		Regionální centrum		IDS JMK Spoje (pracovní dny) alespoň
	km	min	km	min	
Malá Haná	18	23	57	54	20
Nedvědice	16(13)	22(15)	41	48	13
Hornácko	16	16	95(54)	87(63)	17
Vranov nad Dyjí	22	25	89(73)	79(66)	8

Obrázek 3 ukazuje tabulku demografického vývoje v jednotlivých regionech. Ve třech regionech se počet obyvatel trvale snižuje. Pouze Nedvědiccko se nachází v kladných hodnotách. Vnitřní periferie vykazuje lepší situaci než pohraničí. Nízký přirozený přírůstek na Vranovsku by mohl být stále důsledkem etnické výměny obyvatel po 2. světové válce.

Obr. 3 Demografický vývoj ve vybraných mikroregionech v letech 2006 – 2010 (data ČSÚ, zpracoval A. Vaishar)

Mikroregion	Sřední stav populace	Přirozený přírůstek	Migrační přírůstek	Celkem
Velké Opatovice	6 177	-2.75 ‰	-7.12 ‰	-9.87 ‰
Nedvědice	6 681	-1.00 ‰	+36.52 ‰	+35.52 ‰
Hornácko	8 298	-15.43 ‰	-9.76 ‰	-25.19 ‰
Vranov nad Dyjí	5 262	-4.18 ‰	-13.30 ‰	-17.48 ‰
BRNO	-	+6.44 ‰	+6.07 ‰	+12.51 ‰

Všechny mikroregiony vykazují příznaky stárnutí. Tato statistická data však mohou být ovlivněna například umístěním domu pro seniory či pro mládež. Index stárí vyjadřuje, kolik je v populaci obyvatel ve věku 60 let a více na 100 dětí ve věku 0-14 let.

Obr. 4 Věková struktura populace k 31. 12. 2012 (data ČSÚ, zpracoval A. Vaishar)

Mikroregion	0 - 14	15 - 64	65 a více	Index
Velké Opatovice	899	4 300	966	0.93
Nedvědice	932	4 732	1 193	0.78
Hornácko	1 079	5 771	1 320	0.82
Vranov nad Dyjí	706	3 701	790	0.89
BRNO	-	-	-	0.73

Výsledky vzdělanostní struktury ukazují, že méně příznivá byla situace na Vranovsku, kde podíl obyvatel s post-sekundárním vzděláním byl extrémně nízký. Výrazně lepší byla situace na Nedvědicu, ale i zde byl podíl vysokoškolsky vzdělaného obyvatelstva nižší než je celostátní průměr.

Obr. 5 Vzdělanostní struktura (%) podle SLDB 2001 (data ČSÚ, zpracoval A.Vaishar)

Mikroregion	Bez vzdělání	Základní	Odborné	Středoškolské	Vysokoškolské
Velké Opatovice	1.4	20.5	40.8	27.4	7.1
Nedvědice	0.3	18.0	38.3	31.0	9.6
Horňácko	0.6	23.6	36.9	26.6	8.7
Vranov nad Dyjí	0.8	26.7	40.9	21.4	5.7
BRNO	0.3	13.2	23.6	33.8	22.6

Míra nezaměstnanosti byla ve všech oblastech vyšší než celostátní průměr, který ve sledovaných měsících tvořily hodnoty 5 % v květnu 2008; 9,9 % v únoru 2010 a 8,2 % v srpnu 2011. Nejhorší situace byla v únoru 2010. Oblast vnitřní periferie se jeví jako méně problematická než oblast pohraničí. Pomoc, která by byla poskytnuta do oblasti vnitřní periferie, by mohla být neúčinnější, protože zmíněné mikroregiony zřejmě umí nakládat s vnitřními zdroji, které by mohly zajistit pokračující aktivity i po ukončení podpory zvenčí. V případě pohraničních oblastí je toto téma diskutabilní.

Obr. 6 Míra nezaměstnanosti (data ČSÚ, úřad práce, zpracoval A. Vaishar)

Mikroregion	V/2008	II/2010	VIII/2011
Velké Opatovice	5.3 %	15.0 %	10.3 %
Nedvědice	4.7 %	13.9 %	10.4 %
Horňácko	8.7 %	19.1 %	12.7 %
Vranov nad Dyjí	9.8 %	25.2 %	12.3 %
BRNO	5.3 %	8.6 %	8.3 %

Mikroregion Malá Haná leží na rozhraní tří krajů: Jihomoravského, Pardubického a Olomouckého. Centrum se nachází ve čtyřtisícovém městě Velké Opatovice, které je střediskem základních služeb a stojí zde továrna na výrobu žáruvzdorného zboží. Území regionu pokrývají úrodné půdy a celá oblast patří k zemědělsko-průmyslovým oblastem. Zastupující obce jsou Uhřice a Úsobno. Lidé jsou nuceni dojíždět do práce, někdy i na relativně dlouhé vzdálenosti. V Úsobně jsou v provozu sklárny. Z hlediska turistiky je oblast zajímavá pro pěší turistiku a cykloturistiku. V okolí se nachází několik architektonických památek spíše lokálního významu. Lokální produkty se nevyskytují. Lidé pěstují třešně a švestky, z nichž pak vyrábí slivovici pro vlastní spotřebu. Častým

domácím produktem je také med či medovina, ale tyto produkty jsou taktéž pouze pro vlastní potřebu. Lidé si své domácí výrobky směňují mezi sebou.

Mikroregion Nedvědice se nachází na rozhraní dvou krajů, relativně blízko u města Brna. Centrem regionu je město Tišnov. V oblasti převažuje elektrotechnický, potravinářský a papírenský průmysl, který je však koncentrován v okolí Tišnova, Kuřimi a Brna. Díky chladnějšímu klimatu zde nejsou vhodné podmínky pro zemědělství. Vybrané obce jsou Pernštejnské Jestřábí a Křižinkov. Lidé z těchto obcí jsou taktéž nuceni dojíždět za prací. Celá oblast Nedvědice slouží jako druhý domov pro obyvatele Brna, kteří zde mají chaty či chalupy. Oblast je turisticky atraktivní pro své historické památky, ke kterým patří hrad Pernštejn a klášter Porta Coeli. Lokální produkt se nevyskytuje.

Mikroregion Vranov nad Dyjí leží na česko-rakouské hranici. Centrem je městys Vranov nad Dyjí. V oblasti se nacházejí především malé a střední podniky, průmysl je zastaralý. Pracovní příležitosti jsou pouze sezónního charakteru. Lidé musí za prací dojíždět. Území Vranovska patří k nejnámějším rekreačním oblastem v České republice. Nachází se zde Národní park Podyjí, Vranovská přehrada, Vranovský zámek a hrad Bitov. Lokální produkt není vyráběn. Vybrané obce jsou Lančov a Zálesí. V těchto obcích je velmi populární výroba sirupu a limonády z černého bezu, kterou si lidé rozdávají mezi sebou. Protože není k dispozici dostatek pracovních příležitostí ani v lokálních či regionálních centrech a obyvatelé jsou znechuceni touto situací, tak dochází ke krádežím železa v obcích. Lidé nemají zájem se sdružovat do spolků.

Mikroregion Hornácko se nachází na česko-slovenské hranici na úpatí Bílých Karpat. Centrem je obec Velká nad Veličkou, kde je továrna na výrobu geotextilů. Oblast má vhodné podmínky pro živočišnou výrobu. Na území zasahuje CHKO Bílé Karpaty. K vybraným obcím pro tento region patří Kuželov a Malá Vrbka. Částečně se zde dochovaly lidové kroje a tradice. Pro potřeby projektu je tento region velmi zajímavý. Lidé stále sbírají rostliny na lukách Hornácka a malé děti se již v mateřské školce učí rozeznávat rostliny na „dobré“ a „špatné“. Děti také bylinky sbírají a vše jde na domácí použití. V rámci rostlin má oblast orientaci například na mateřídoušku, dobromysl nebo zeměžluč. Z regionu pochází jeden lokální produkt. Jedná se o bylinný čaj Hornácký odzemek. Bylinky pro čaj jsou sbírány místními i zahraničními dobrovolníky. Použité bylinky jsou prvosěnka, dobromysl, ostružina a lípa. Čaj se pije proti všemu nachlazení a vyrábí se v Čejkovicích. Projekt podporuje SOM Hornácko, Tradice Bílých Karpat, realizace: INEX – SDA Bílé Karpaty. Čaj není masově produkován. Na území Malé Vrbky se každoročně koná tradiční kosení orchidejových luk s názvem Hornácké kosení, které doprovází jarmark s prodejem místních výrobků.

Z vyhodnocených statistických dat lze usuzovat, že oblasti na vnitřní periferii vykazují lepší situaci než regiony v pohraničí. Ve všech regionech jsou lidé nuceni dojíždět za prací. Průmysl je spíše tradiční, zaměřený na místní suroviny a podmínky. V této oblasti však nedochází k velkým inovacím. Turismus se jeví jako více perspektivní větev, ale problém je v jeho sezónnosti. Malé obce netvoří dostatečný trh pro základní služby.

První výsledky dotazníkového šetření ukazují, že většina z 33 dotázaných lidí získala znalosti o zpracování bylin z literatury a od svých předků. Nasbírané rostliny se nejčastěji využívají pro přípravu jídel, nápojů a k léčebným účelům. Pravidelně sbírá rostliny v přírodě 20 % z dotázaných a 60 % dotázaných sbírá rostliny příležitostně. K nejčastěji vyráběným domácím produktům z rostlin patří pampeliškový med, bezový a jitrocelový sirup, nádivka a špenát z kopřiv a šípkový čaj. Téměř všichni dotázaní by si chtěli prohloubit své znalosti o planě rostoucích rostlinách a jejich využití.

ZÁVĚR

Z dosavadního pozorování vyplývá, že lidé žijící na venkově jsou určitým způsobem svázáni s přírodou, ale záleží na tom, o jaký region se jedná. Velmi dobrým příkladem je vybraný region Hornácka, kde lidé žijí více izolovaně od okolního světa a tím si zachovali pozitivní vztah k přírodě. Spojitost s rostlinami se odráží v jejich současné kultuře, která již malé děti učí jak s bylinkami zacházet a jak je využívat. Lidé zvládnou pomocí bylin léčit nejen sami sebe, ale i svá domácí zvířata. Na tomto základě jsou pak založeny kulturní tradice, které se promítají do slavností, jež jsou v regionu pořádány. Prvotním posláním těchto kulturních akcí je udržet tradici a lidé je pořádají z vlastní vůle. Návštěvníci mohou dobrovolným vstupným či zakoupením výrobku od místních obyvatel přispět ke zlepšení ekonomické situace. Tím se tyto slavnosti odlišují od komerčních akcí, jejichž hlavním cílem je peněžní zisk.

Projekt Traditional and wild je v současné době jedním z mála projektů, který se prostým způsobem snaží ukázat lidem možnosti přivýdělnku a pokud tito lidé nebudou ihned očekávat horentní zisky, pak mají šanci uspět. Bohužel se již objevil kámen úrazu a tím je česká legislativa.

LITERATURA

Projekt Traditional and wild [online]. [cit.2012-10-05]. Dostupné z:
<http://www.traditionalandwild.eu/cz/about>

Tisková zpráva k projektu Traditional and wild [online]. [cit.2012-10-01]. Dostupné z:
<http://www.kisjm.cz/default.asp?ids=0&ch=637&typ=1&val=122268>

Statistická data z Českého statistického úřadu. Dostupné z: <http://www.czso.cz/>

Vaishar, A. (2012): The South Moravian Region. Nепublikováno.

Žitňáková, J. (2012): Rozhovory s představiteli vybraných obcí. Nепublikováno.

Section – Food Technology

BASIC NUTRITION PROFILE OF WAXMOTH LARVAE (*GALLERIA MELLONELLA*)

ZÁKLADNÍ NUTRIČNÍ PROFIL LAREV ZAVÍJEČE VOSKOVÉHO (*GALLERIA MELLONELLA*)

Bednářová M.¹, Borkovcová M.², Fišer V.¹

¹Department of Information Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: bednarova@mendelu.cz

ABSTRACT

Aim of this work was to generally evaluate potential of waxmoth larvae (waxworm) as an alternative food source. Using common laboratory methods we analyzed content of proteins, fatty acids and purines. Honeycomb moth contains 45.7% of dry matter. 14% of dry matter is formed by proteins, 22% by fatty acids. Indispensable amino acids formed 34.5% of total amino acids. Monounsaturated fatty acids were 58% of the sum of fatty acids, polyunsaturated 7%. Total evaluated purines content was 1114 mg/kg dry matter. Results show, that waxworms may be possible alternative protein source with suitable fat composition.

Key words: entomophagy, protein, fatty acid, purine

ÚVOD

Hmyz je významným zdrojem bílkovin a některé druhy obsahují značné množství esenciálních aminokyselin (Verkerk et al., 2007, Xiaoming et al., 2008, Ramos-Elorduy et al., 1997). Stravitelnost hmyzího protein je srovnatelná s masem (Longvah et al., 2011; Verkerk et al., 2007), proto je hmyz Organizací OSN pro výživu a zemědělství (FAO) prezentován jako cenná alternativa k masu hospodářských zvířat (FAO, 2011). Z výzkumů zahraničních autorů vyplývá například, že larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) obsahují více než 50% tuku v sušině (např. Barker, Fitzpatrick and Dierenfeld, 1998), přičemž mononenasycené mastné kyseliny mohou tvořit až 90% tuků (Finke, 2002). Výživná hodnota hmyzu je však do značné míry závislá na prostředí a především potravě (např. Ramos-Elorduy et al., 1997; Barker et al., 1998). Cílem práce bylo proto získat údaje o nutriční hodnotě larev zavíječe voskového z chovu v České Republice pro možnost porovnání s výsledky zahraničních autorů a pro zhodnocení potravinového potenciálu u nás chovaného zavíječe voskového jako alternativní potraviny.

MATERIÁL A METODIKA

Chov housenek a odběr vzorků

Housenky zavíječe voskového byly zakoupeny na Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Zde jsou zavíječi pro biologické pokusy odchováni ve standardizovaných podmínkách na standardní krmné směsi složené z medu, kukuřičného šrotu a včelího vosku (Know-how MU Brno). Housenky byly z chovu odebrány v době dosažení migračního stadia, kdy se samovolně čistí před kuklením. V této fázi dosahují také největších rozměrů, což je z pohledu entomofágie výhodné. Bezprostředně po odebrání byly housenky usmrceny horkým vzduchem (120° C po dobu 5 minut) a poté pomalým sušením při teplotě do 75°C vysušeny do 100% sušiny.

Sušina a popelovina byly stanoveny podle ANONYM (2000; 2001). Analýza aminokyselin byla provedena metodou podle Sochor et al. (2011). Sušené vzorky byly hydrolyzovány HCl a ponechány 24 hodin při teplotě 120°C a vystavení mikrovláknému záření 80 W. Pro analýzu aminokyselin byl použit analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, ČR). Jako derivatizační činidlo byl použit ninhydrin. Rozbor tuků byl proveden pomocí Soxhlet-Henkelovy metody (Luthria, 2004). Pro statistickou analýzu byla použita metoda ANOVA (Software Statistica.10, StatSoft, 2011). Pro porovnání středních hodnot byla použita metoda Fisherova LSD (Software Statistica.10, StatSoft, 2011).

Puriny byly stanoveny modifikací metod Reynal a Broderick (2009) a Vlassa et al. (2009). Sušené vzorky (10-100 mg podle odhadovaného obsahu purinů) byly homogenizovány a převedeny do skleněných vialek (25ml, DURAN, Czech Republic) spolu se 4 ml 2M HClO₄ a 0,25 ml 6M allopurinolu (vnitřní standard). Standardy purinů (adenin, kyselina močová, xantin,

a hypoxanthin byly připraveny v definovaných koncentracích rozpuštěním čistých sloučenin ve 2M HClO₄.

Vzhledem k předpokládanému nerovnoměrnému rozložení byla použita Box-Coxova transformace a následně stanoven bodový a intervalový odhad. Pro porovnání středních hodnot byla použita metoda Kruskal-Wallis (Software Statistica.10, StatSoft, 2011).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Základní nutriční hodnoty housenek zavíječe voskového ukazuje Tab. 1. Housenky jsou velmi bohaté na tuky, což se zobrazuje také ve vysoké hodnotě metabolizovatelné energie. Ostatní hodnoty jsou velmi podobné hodnotám zjištěným u jiných druhů hmyzu.

Tab. 1 Základní nutriční hodnoty larev zavíječe voskového

<i>Galleria mellonella</i> larva	jednotky	
Váha	mg/kus	322
Voda	g/kg	543
Proteiny	g/kg sušiny	140
Lipidy	g/kg sušiny	223
Bezdušíkaté látky výtažkové	g/kg sušiny	11
Neutrálně-detergentní vláknina	g/kg sušiny	46
Acido-detergentní vláknina	g/kg sušiny	26
Popelovina	g/kg sušiny	7,3
Metabolizovatelná energie	kcal/kg	2658

Obsah esenciálních a neesenciálních aminokyselin

Esenciální i neesenciální aminokyseliny byly ve sledovaných vzorcích v množství nijak se průměrem nelišícím od obsahu těchto látek u jiných druhů hmyzu sledovaných z pohledu možného zařazení mezi entomofágní druhy (Tab. 2).

Tab. 2 Obsah esenciálních a neesenciálních aminokyselin u larev *G. mellonella*

Postradatelné aminokyseliny	Průměr g/kg sušiny	Nepostradatelné aminokyseliny	Průměr g/kg sušiny
Alanin	10,5	Isoleucin	6,5
Arginin	7,6	Leucin	11,9
Kys. asparagová	14,1	Lysin	8,6
Cystein	1,6	Metionin	3,4
Kys. glutamová	19,5	Phenylalanin	5,7
Glycin	8,4	Threonin	5,9
Histidin	3,4	Tryptofan	1,3
Prolin	11,2	Valin	7,5
Serin	11,5		
Tyrosin	8,7		

Obsah mastných kyselin

Za zmínku stojí vysoký obsah kyseliny palmitové a olejové, který je výrazně vyšší, než u dalších druhů hmyzu sledovaných z pohledu možné entomofágie.

Tab. 3 Obsah mastných kyselin u larev *G. mellonella* (g/kg sušiny)

12:0	<0,2
14:0	0,1-0,4
15:0	<0,2
16:0	19,18-79,6
16:1	1,23-5,1
17:0	<0,2
17:1	0,07-0,3
18:0	0,82-3,4
18:1	29,88-124
18:2	3,66-15,2
18:3	0,27-1,1
20:0	0,07-0,3

ZÁVĚR

Zavíječ voskový je v České republice chován již dlouhodobě v umělých chovech pro biologické pokusy. Z tohoto pohledu se jedná o velmi výhodný druh, jehož chov je v našich podmínkách možný celoročně a jehož další využití – například pro entomofáгии – se tedy nabízí. Provedené rozborů nutričního složení ukázaly, že ačkoliv se nejedná o nijak mimořádně nutričně významný druh, je možné s ním počítat jako s alternativou bílkovinné složky potravy v jídelníčku člověka.

Navíc je chuťově velmi atraktivní a většina účastníků ochutnávek neměla tak výrazné psychologické zábrany při jeho konzumaci, což obvykle bylo zdůvodňováno pozitivním vztahem lidí ke včelám a všemu, co s nimi souvisí.

LITERATURA

ANONYM, 1997. Vyhláška 293/1997 Sb. MZd. O způsobu výpočtu a uvádění výživné (nutriční) hodnoty potravin a označení údaje o možném nepříznivém ovlivnění zdraví.

ANONYM, 2000. Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů I. ÚKZÚZ Brno, 266 s.

BARKER, D., FITZPATRICK, M.P. and DIERENFELD, E.S., 1998. Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo biology*, 17(2), pp. 123-134.

DADD, R.H., 1983. Long-chain polyenoics and the essential dietary fatty acid requirement of the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Journal of insect physiology*, 29(10), pp. 779-786.

DADD, R.H., 1966. Beeswax in the nutrition of the wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of insect physiology*, 12(12), pp. 1479-1492.

DADD, R.H., 1964. A study of carbohydrate and lipid nutrition in the wax moth, *Galleria mellonella* (L.), using partially synthetic diets. *Journal of insect physiology*, 10(2), pp. 161-178.

FAO, 2011. Food and Agricultural organization of the United Nations. A good source of food [online]. Last updated 30.3.2012 [cited 3.4.2012], available online at: <<http://www.fao.org/forestry/65426/en/>>.

LONGVAH, T., MANGTHYA, K. and RAMULU, P., 2001. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. *Food Chemistry*, 128, 400-403.

LUTHRIA, D. L. Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies. 1 ed. USA: AOCS Publishing, 2004. 282 s. ISBN 1-893997-78-2.

RAMOS-ELORDUY, J., MORENO, J.M.P., PRADO, E.E., PEREZ, M.A., OTERO, J.L. AND DE GUEVARA, O.L., 1997. Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 142-157.

ROY, D.N., 1937. On the nutrition of larvae of bee-wax moth, *Galleria mellonella*. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 24(5), pp. 638-643.

VERKERK, M.C., TRAMPERA, J., VAN TRIJPB, J.C.M. AND MARTENSA, D.E. (2007) Insect cells for human food. *Biotechnology Advances*, 25, 198–202.

XIAOMING, CH., YING, F., HONG, Z. and ZHIYONG, CH., 2008. Review of the nutritive value of edible insects. Edible insects and other invertebrates in Australia: future prospects. In DURST, P.B., JOHNSON, D.V., LESLIE, R.N. AND SHONO, K. (eds.) *Proceedings of the Forest Insects as Food: Humans Bite Back workshop*, 19-21 February, FAO Chiang Mai University, Bangkok, Chiang Mai, Thailand.

CORELLATION BETWEEN INCIDENCE OF *FUSARIUM* SPECIES AND MYCOTOXINS OCCURRENCE IN DIFFERENT CLIMATIC REGIONS OF SLOVAKIA

KORELÁCIA VÝSKYTU HÚB Z RODU *FUSARIUM* A MYKOTOXÍNOV V RÔZNYCH KLIMATICKÝCH REGIÓNOCH SR

Bíliková J., Hudec K., Tóthová M.

Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: bilikova.jana86@gmail.com

ABSTRACT

Fusarium head blight is a destructive disease of wheat and barley in environment with prolonged wet climatic conditions from flowering through the soft-dough stage of kernel development. These fungi produce dangerous mycotoxins, which accumulation is harmful for health of animals and people. The aim of this work was evaluation of incidence of *Fusarium* species at different locations of Slovakia and different growth stages. Heads of wheat were collected every week from growth stage end of flowering to the harvest, in order to determine the *Fusarium* species composition and the level of mycotoxins. Species composition of the genus *Fusarium* was identified by the specialist after cultivation. The concentration of mycotoxins in kernels was evaluated by ELISA method. *Fusarium* species isolated from wheat kernels collected at different locations were following: *F. poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. avenaceum*. Level of DON was relatively constant in all samples. Its concentration ranged from 0.171 ppm to 0.225 ppm. Level of T-2 toxin in wheat kernels varied between 0.587 ppb and 1.516 ppb, and was in correlation with incidence of *Fusarium poae*. Concentration of ZEN ranged from 0.731 ppb to 1.55 ppb. Correlation between incidence of *Fusarium* spp. and mycotoxins was confirmed at each locality. Regulatory limits of mycotoxins in foods were not exceeded.

Key words: *Fusarium*, mycotoxins, incidence, wheat, kernels

INTRODUCTION

The information about incidence of *Fusarium* on wheat and other cereals is known from all Europe (Bottalico et Perrone, 2002). Some species of these fungi prefer tropic and subtropics regions, other species prefer colder climatic zone. Actually some of them have a cosmopolitan incidence (Burgess et al., 1988). Hudec et Roháčik (2005) observed wider spectrum of *Fusarium* in infected grains in locality with higher altitude and closer spectrum in less infected grains in dry years. The new species of *Fusarium* has a high degree of variation within physiological, morphological and pathogenic properties. From this reason these fungi are able to exist in variable ecological conditions in different geographical areas (Leslie et Summerell, 2006). A mycotoxin is a toxic secondary metabolite produced by organisms of the fungus kingdom, commonly known as molds. Mycotoxins can contaminate foods and also feed. A low amount of mycotoxins is toxic for vertebrates, including people (Tančinová, 2009). These substances cannot be destroyed neither by baking nor malt and ethanol production (Bailey, 2007). *Fusarium* produces a lot of secondary metabolites, ZEA, trichothecenes and fumonisins (Sorensen, 2009). Production of mycotoxins is influenced by several factors. The amount and type of mycotoxins depends on species of *Fusarium*. Their production is influenced also by a stress (Chrpová et al., 2007). Andersen et Thrane (2006) claimed that the incidence of metabolites from these fungi and their toxicity is a serious problem for the future and the scientists should pay attention in this direction.

MATERIALS AND METHODS

The samples were collected in weekly intervals from localities in Komárno, Velké Úřany, Špačince and Jacovce (Table 1). Heads of winter wheat (*Triticum aestivum*) were collected from growth stage end of flowering to the harvest. Grains were separated from head and cultivated on PDA medium. *Fusarium* species spectrum was determined by cultivation methods according to the manual from Nelson et al. (1983) and Leslie et Summerell (2006). Subsequently the frequency of species of *Fusarium* was determined by formula (González et al., 1996):

Fr – frequency of incidence, ns – number of samples with *Fusarium*, N – total number of samples

Quantitative evaluation of mycotoxins DON (deoxynivalenol), ZEN (ZEA) and T-2 toxin was carried out by ELISA Reader machine (NOACK, SR), working on spectrophotometry principle.

Table 1: Description of collected samples, 2011

Code of clim. region	Localities	Date of collection									
		15.6	21.6	22.6	22.6	28.6	7.7	10.7	11.7	13.7	20.7
0	Komárno		X		X			X			
0	V. Úľany	X		X		X	X		X		
1	Špačince	X		X		X	X			X	X
1	Jacovce			X		X	X			X	X

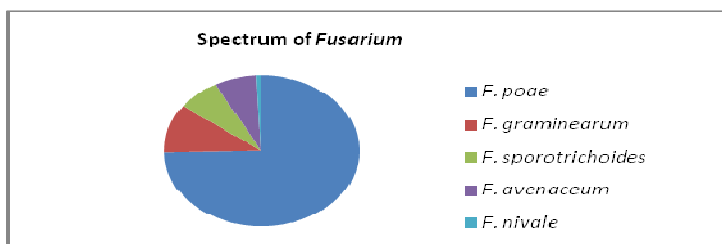
00 – very warm, very dry, lowland

01 – warm, very dry, lowland

RESULTS AND DISCUSSION

During vegetation in the year 2011 5 species of the genus *Fusarium* were found at observed localities (Graph 1). From total amount of evaluated heads the share of infected grains was 1.7%. Calculation of incidence frequency revealed as the most dominant species *F. poae* (6, 4%), followed by *F. graminearum* (0.9%), *F. sporotrichoides* (0.6%), *F. avenaceum* (0.6%) and *Monographella nivale* (0.075%). Šrobárová and Vašková (1987) defined during their research as the most frequent species *F. culmorum*, followed by *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *Monographella nivale*. These results indicate change in the composition of *Fusarium* species over the years. Mašková et al. (2008) collected samples from 7 regions of Slovakia. They found out that the most frequent species was *F. poae*. These results are identical with our results. Roháčik and Hudec (2005) also found the highest incidences of *F. poae* during the vegetation period of the years 1999, 2000, 2002 and 2003. Increased share of *F. poae* was observed also in France (Ioos et al., 2004). Xu et al. (2008) claimed that *F. poae* prefers dry and hot climatic conditions. The higher incidence of *F. poae* can be justified by change of climatic conditions and low rainfall in Slovakia in 2011.

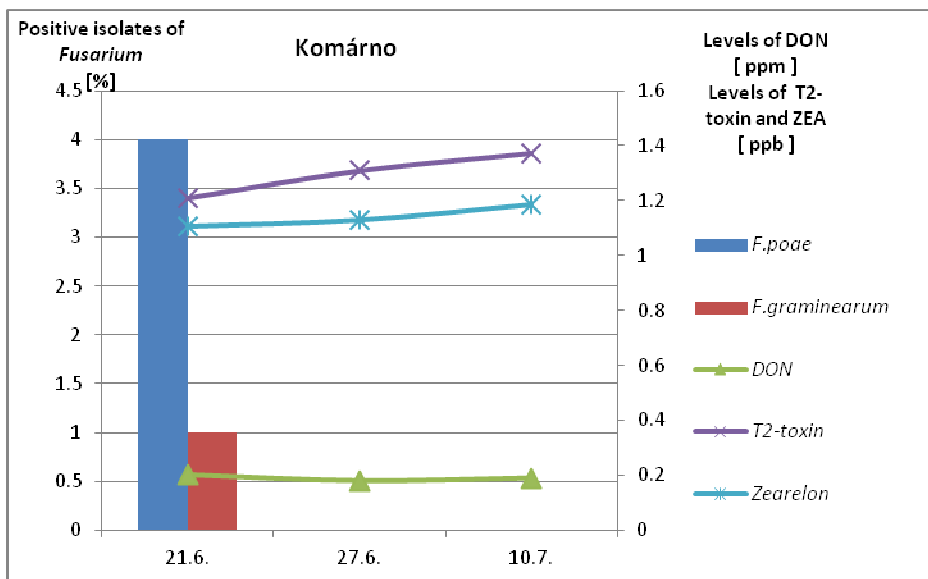
Graph 1: Share and spectrum of *Fusarium* species at all observed localities in year 2011



Komárno

The most prevalent species in Komárno was *F. poae* (1.3%). Besides of this one also the *F. graminearum* (0.3%) was identified. No *Fusarium* species was detected from the last week of June (Graph 2), which can be caused by collection of samples from different part of the location. Graph 2 shows incidence of mycotoxins. Level of DON was relatively constant in every date. Total level of DON didn't exceed allowed level according to the Commission Regulation (EC) number 1881/2006 from 19. December 2006. This Commission Regulation sets maximum levels of some contaminants in foodstuffs. Šudyová et al. (2006) reported 32% samples from Slovakia, which had exceeded limit for DON. These high levels of DON can be explained by favorable climatic conditions for *Fusarium* outbreak in 2004 (high rainfall during flowering and temperature 28°C). However level of DON is affected by several factors, the most important are weather conditions during wheat flowering (Xu, 2003). T-2 toxin had increasing tendency because of incidence of *F. poae*, which is dominant producer of this mycotoxin. ZEA has the same tendency as the T-2 toxin, but in lower level.

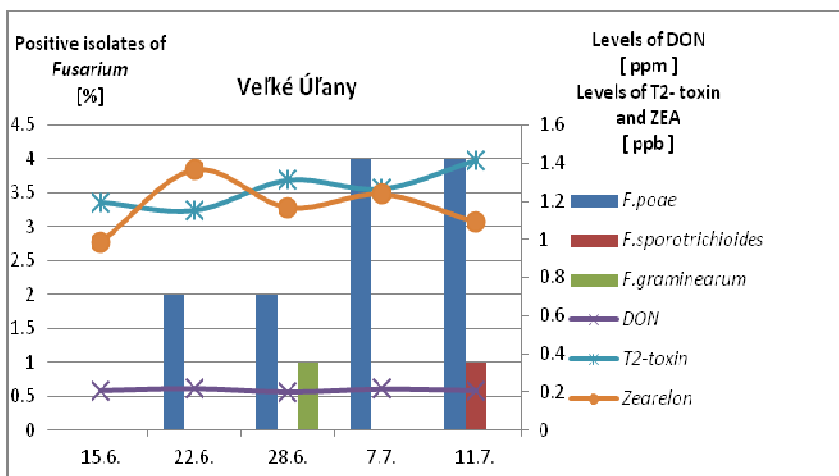
Graph 2: Spectrum of *Fusarium* spp. and mycotoxins content in wheat kernels in Komárno, 2011



Velké Úřany

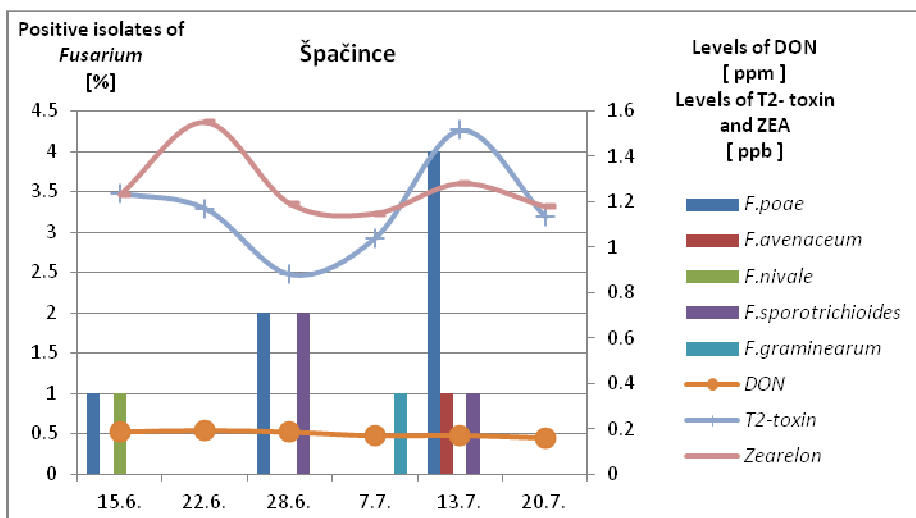
Fusarium poae (2.4%) was also dominant species in Velké Úřany. Incidence of *F. sporotrichioides* (0.2%) and *F. graminearum* (0.2%) was the same. Mycotoxins were present even during the period when *Fusarium* spp. weren't visually found. Levels of DON were relatively constant. Levels of the T-2 toxin were in correlation with increasing incidence of *F. poae*. Levels of ZEA were variable.

Graph 3: Spectrum of *Fusarium* spp. and mycotoxins content in wheat kernels in Velké Úřany, 2011



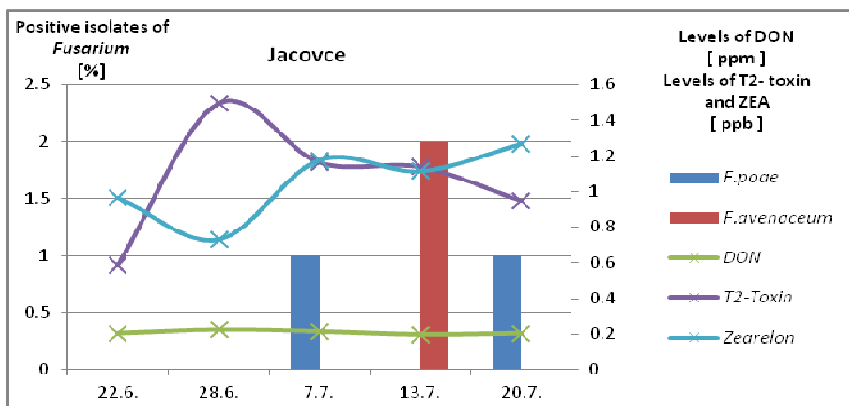
Špačince

The highest diversity of *Fusarium* spp. was recorded in Špačince (Graph 4). The most dominant was again *Fusarium poae* (1.17%). Among less frequent species belonged: *F. sporotrichioides* (0.5%), *F. graminearum* (0.17%), *F. nivale* (0.17%) and *F. avenaceum* (0.17%). We didn't consider the incidence of *F. avenaceum* as important, because this species does not produce mycotoxins DON, T-2 toxin and ZEA (Mašková, 2011). Level of DON was low and relatively constant similarly as in the case of above mentioned localities. This low level can be caused by absence of *F. graminearum* and *F. culmorum*, which are considered as the major producer of these mycotoxins (Bottalico et Perrone, 2002). Špačince was the locality with the lowest level of DON (0.171 ppm). Šudyová et al. (2006) reported minimum level of DON (0.2 ppm) in year 2004. Compared with their results we found even lower level of DON, probably due to the extremely dry conditions during the vegetation period 2011. We can find some correlation between incidence *F. poae* and amount of T-2 toxin. ZEA had no fixed tendency which can be caused by diversity of samples.

Graph 4: Spectrum of *Fusarium* spp. and mycotoxins content in wheat kernels in Špačince, 2011

Jacovce

Graph 5 shows incidence of *F. poae* (0.4%) and *F. avenaceum* (0.4%), the only two species identified in Jacovce. The highest level of DON (0.225 ppm) was found in Jacovce, in contrast to previously mentioned location. The incidence of DON was detected even when *Fusarium* was not visually present. T-2 toxin has decreasing tendency by the end of vegetation, because incidence of *F. poae* was low. Levels of ZEA were variable.

Graph 5: Spectrum of *Fusarium* spp. and mycotoxins content in wheat kernels in Jacovce, 2011

CONCLUSION

In the wheat kernels, following *Fusarium* species were found in the year 2011: *F. poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. avenaceum*, *F. nivale*. Dominant species was *Fusarium poae*. Level of DON was relatively constant in all localities and did not change over the time. Incidence of T2-toxin and ZEA was variable and changed with the time. We observed positive correlation between *F. poae* incidence and level of T-2 toxin in grains. In our samples levels of all evaluated mycotoxins did not exceed levels set according to the Commission Regulation (EC) number 1881/2006 from 19. December 2006.

LITERATURE

- ANDERSEN, B. – THRANE, U. 2006. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In *Advances in Food Mycology*, vol. 571, 2006, p.137-152.
- BAILEY, K. L. - GOSSEN, B. D. - GUGEL, R. K. - MORRALL, R. A. A. 2007. Diseases of Field Crops in Canada. University Extension Press, Saskatoon. ISBN 0-9691627-6-6.
- BOTTALICO, A. - PERRONE, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. In *European Journal of Plant Pathology*, vol. 108, 2002, p. 611 - 642.
- BURGESS, L. W. - NELSON, P. E. - TOUSSOUN, T. A. - FORBES, G. A. 1988. Distribution of *Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum* and *Discolor* recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of Eastern Australia. In: *Mycologia*, vol.80, 1988, p. 815 – 824.
- GONZÁLES, H. H. L. - PACIN, A. - RESNIK, S. L. - MARTÍNEZ, E. J. 1996. Deoxynivalenol and contamination mycoflora in freshly harvested Argentinean wheat in 1993. In *Mycopathologia*, vol.135, 1996, p. 129-134.
- HUDEC, K. - ROHÁČIK, T. 2005. Influence of Agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. In *Ann Agric Environ Med*, vol. 12, 2005, no. 1, p. 39 - 45.
- CHRPOVÁ, J. - ŠÍP, V. - SÝKOROVÁ, S. - SYCHROVÁ, E. 2007. Možnosti snížení rizika napadení obilnin klasovými fuzariózami. 2007. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha 6-Ruzyně. ISBN 978-80-87011-33-1.
- IOOS, R. - BELHADJ, S. - MENEZ, M. 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. In *Mycopathologia*, vol. 158, 2004, p. 351 - 362.
- LESLIE, J. F. - SUMMERELL, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First edition. USA: Blackwell Publishing Professional, 387 p., ISBN- 13: 978-0-8138-1919-8.
- MAŠKOVÁ, Z. - TANČINOVÁ, D. - BARBORÁKOVÁ, Z. - MOKRÝ, M. 2011. Frequent species of field fungi on wheat and their potential production of toxic metabolites. In *Potravinářstvo*, vol. 5, 2011, p.43 - 50.

NELSON, P. E. - TOUSSOUN, T. A. - MARASAS, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University, University Park, USA.

ORT, P. 2011. Fuzária obilnin. Hrozba pro výnos a kvalitu. In *Agromanuál*, 2011, č. 5, s. 26-27.

SORENSEN, J. L. 2009. Preharvest fungi and their mycotoxins in maize. PhD. Thesis. Lyngby: Center for Microbials Technology, 2009. ISBN 978-87-91494-68-0.

ŠROBÁROVÁ, A. - VAŠKOVÁ, M. 1987. *Fusarium* spp. associated with scab of wheat in Slovakia. In *Sborník ÚVTIZ – Ochrana rostlin*, 23, 1987, p. 279-284.

ŠUDYOVÁ, V. - ŠLIKOVÁ, S. - HERZOVÁ, E. 2006. Mykotoxín deoxynivalenol vo vybraných registrovaných odrodách pšenice ozimnej v rokoch 2004 a 2005. In *Zborník z 13. vedeckej konferencie*, Piešťany: VÚRV, 2006, p. 153-154. ISBN 80-88872-57-X

TANČINOVÁ, D. 2009. Žatva a skladovanie obilnín z hľadiska výskytu mykotoxínov. 2009. Vystavené: 15.1.2009. Dostupné na: http://www.agroporadenstvo.sk/rv/ochrana/obilniny_mykotoxiny.htm

XU, X. M. - NICHOLSON, P. - THOMSETT, M. A. - SIMPSON, D. - COOKE, B. M. - DOOHAN, F. M. - BRENNAN, J. - MONAGHAN, S. - MORETTI, A. - MULE, G. - HOMOK, L. - BEKI, E. - TATNELL, J. - RITIENI, A. - EDWARDS, S. G. 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. In *Phytopathology*, vol. 98, 2008, no. 1, p. 69 - 78.

XU, X. M. 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight, In *Eur.J. Plant Pathol.*, vol. 109, 2003, no.7, p. 683 - 689.

THE MONITORING OF DIBUTYL PHTHALATE AND DI-2-ETHYLHEXYL PHTHALATE IN MORAVIAN AGRICULTURAL SOILS

MONITORING DIBUTYL FTALÁTU A DI-2-ETHYLHEXYL FTALÁTU V MORAVSKÝCH ZEMĚDĚLSKÝCH PŮDÁCH

Daňková R.¹, Jarošová A.¹, Poláková Š.²

¹Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Hroznová 2, 656 06 Brno, Czech Republic

E-mail: xdankov5@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was monitoring of two phthalic acid esters: dibutyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in soils. The monitoring was performed in five regions of the Czech Republic: Zlínský, Jihomoravský, Olomoucký, Moravskoslezský and the region Vysočina. The soil samples were collected from two layers of arable land and grassland. The upper layer of arable land was from 0 to 25 cm, lower layer from 35 to 60 cm. The upper layer of grassland was from 0 to 10 cm, lower layer from 11 to 25 cm. The soil samples were lyophilized and extracted with acetone:hexan (1:1). Then, the samples were purified by sulphuric acid. The levels of DBP and DEHP were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. The concentrations of DBP ranged from 0.1 to 1.1 mg·kg⁻¹ of original weight in the upper horizon and from 0.07 to 0.87 mg·kg⁻¹ of original weight in the lower horizon. The concentrations of DEHP ranged from 0.1 to 1.31 mg·kg⁻¹ of original weight in the upper horizon and from 0.12 to 0.6 mg·kg⁻¹ of original weight in the lower horizon. The concentrations of phthalic acid esters did not significantly differ from themselves in soil samples in this study. These results indicate the uniform load of soils of esters of phthalic acid in Czech Republic.

Key words: soils, dibutyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate

Acknowledgments: This work was supported by the Internal Grant Agency AF MENDELU IP12/2012.

ÚVOD

Ftaláty neboli estery kyseliny ftalové (PAE) se staly všudypřítomnými organickými kontaminanty životního prostředí, a to především kvůli svému širokému využití v mnoha oblastech lidské spotřeby. Používají se v první řadě jako změkčovadla plastů (PVC). Můžeme je nalézt v mnoha běžných produktech každodenního života jako jsou barvy, laky, tmely, lepidla, podlahové krytiny, nátěry, domácí vybavení, oblečení, kosmetika, zdravotnické produkty (vaky pro krevní transfuze, dialyzační jednotky) a nebo také omezeně v obalech potravin (Williams et al., 1995, Staples et al., 1997, Otton et al., 2008).

Vysoká celosvětová produkce ftalátů se odhaduje až na 6 milionů tun ročně (Mackintosh et al., 2006).

Široce využívány jsou pro své výhodné fyzikálně chemické vlastnosti. Jsou to čiré, olejovité, nehořlavé kapaliny bez zápachu, s nízkou tenzí par a vysokým bodem varu (Velíšek, 2002). Jsou to velmi stabilní sloučeniny s lipofilním charakterem, vysokými oktanol/voda rozdělovacími koeficienty a jsou prakticky ve vodě nerozpustné (Wang et al., 2004). Tyto vlastnosti jsou příčinou kumulace ftalátů v tucích a mnoha složkách životního prostředí, především v sedimentech a v půdě. Hlavním zdrojem těchto sloučenin je lidská činnost. Odtud se mohou dále dostávat do dalších složek životního prostředí, kontaminovány, tak mohou být voda, ovzduší, rostliny i živočichové, a tím potažmo i potravní řetězec. Mezi nejrozšířenější estery kyseliny ftalové v životním prostředí patří di-2-ethylhexyl ftalát a dibutyl ftalát (Jarošová, 2010). K degradaci ftalátů přirozeným rozkladem prakticky nedochází, vzhledem k vysoké stabilitě těchto sloučenin, ale mohou být degradovány mikrobiálně a to půdními a vodními bakteriemi za aerobních podmínek.

Byly zjištěny škodlivé účinky ftalátů na lidské zdraví. Akutní toxicita ftalátů je nízká. Ale zatím existuje jen velmi málo poznatků o účincích dlouhodobé expozice na zdraví člověka. Primárními zasaženými orgány jsou játra, ledviny a další orgány. Ftaláty také vykazují teratogenní, karcinogenní a estrogenní účinky, čímž mohou nepříznivě ovlivnit reprodukční systém (Arcadi et al., 1998, Matsumoto et al., 2008). Existují úvahy, které toto dávají do souvislosti se vzrůstajícím počtem rakoviny prsu a varlat (Velíšek, 2002). Je prokázáno, že vystavení krys a myší působení di-2-ethylhexyl ftalátu, u nich způsobuje rakovinu jater (Wang et al., 2002).

Šest ftalátů a to: dimethyl ftalát (DMP), diethyl ftalát (DEP), dibutyl ftalát (DBP), butylbenzylftalát (BBP), dioktyl ftalát (DOP) a di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP) bylo označeno Americkým Úřadem pro ochranu životního prostředí (EPA) jako prioritní kontaminanty životního prostředí (Velíšek, 2002).

Možnými cestami expozice člověka jsou: ovzduší, kontakt s kůží, voda, za hlavní zdroj expozice ftalátů u člověka jsou ovšem považovány potraviny. Potraviny mohou být kontaminovány ftaláty v průběhu celého procesu výroby, od kontaminace vstupních surovin, v průběhu jejich zpracování až po kontaminaci finálních výrobků obalovými materiály (Velíšek, 2002; Nanni et al., 2011).

Do zemědělské půdy se ftaláty dostávají spadem z ovzduší, ze zemědělských strojů nebo častým hnojením různými druhy organických hnojiv (Vikelsøe et al., 2002; Cai et al., 2006). Rostlina tak spolu s příjmem živin může přijímat i tyto látky, zejména prostřednictvím kořenového systému a nadzemními zelenými částmi rostlin. Což může vést ke kontaminaci zeleniny a tím i potravního řetězce (Zeng et al., 2009).

Zásadou lipofilního charakteru ftalátů může také docházet k akumulaci ftalátů z krmiva a z prostředí v živočišných tkáních (svalovině, tuku) a dále také mohou ftaláty přecházet z trávicího traktu do mléka (Rhind et al., 2005).

Z těchto důvodů je monitoring esterů kyseliny ftalové v půdách nutný pro ochranu zdraví lidí a ochranu životního prostředí.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky půd byly odebrány ve spolupráci s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně. Vzorky půd byly získány z 18 vybraných pozorovacích ploch v oblasti kraje Vysočina (3 plochy) a Moravy a to z krajů: Zlínského (4 plochy), Jihomoravského (1 plocha), Olomouckého (2 plochy) a Moravskoslezského (8 ploch). Jednalo se o okresy: 2 vzorky okres Havlíčkův Brod, 2 vzorky okres Jihlava, 2 vzorky okres Třebíč, 4 vzorky okres Uherské Hradiště, 2 vzorky okres Zlín, 2 vzorky okres Vsetín, 2 vzorky okres Brno-město, 4 vzorky okres Jeseník, 2 vzorky okres Ostrava, 6 vzorků okres Nový Jičín, 4 vzorky okres Karviná, 2 vzorky okres Bruntál a 2 vzorky okres Frýdek Místek.

Odběr vzorků byl proveden ze dvou horizontů: orná půda – samostatný vzorek z ornice (0 – 25 cm) a podorničí (35 – 60 cm), trvalé travní porosty (TTP) – odběr ze dvou horních vrstev 0 – 10 cm, 11 – 25 cm s odstraněním svrchní dmové vrstvy.

Odebráno bylo cca 0,5 kg půdy z jednoho horizontu. Toto množství se přímo v terénu ručně zhomogenizovalo a odstranil se hrubší skelet. Po provedené homogenizaci se vzorek vložil do mikroténového sáčku, který se zavázal a vložil do PE sáčku a opět zavázal. Zabalené a označené vzorky se přepravovali v chladících boxech, poté byly uloženy do mrazničky při teplotě -18°C do doby předání do laboratoře.

Vzorky byly analyzovány na Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně. Byla použita metoda Jarošová et al. (1999), tato metoda byla optimalizována pro potřebu analýzy vzorků zeminy. Bylo stanoveno optimální množství vzorku potřebné pro analýzu ftalátů v půdě. K extrakci

MENDELNET 2012

vzorků byl použit ultrazvuk, byl určen čas potřebný k extrakci půd ultrazvukem. Bylo analyzováno 36 vzorků. Analýza všech vzorků byla prováděna duplicitně, celkový počet analyzovaných vzorků byl tedy 72. Před analýzou byly zmražené vzorky rozmrazeny a z každého bylo odebráno asi 10 g půdy. Následně bylo těchto 10 g půdy opět zmrazeno a poté zlyofilizováno. Následovala extrakce směsí aceton:hexan 1:1 pomocí ultrazvuku třikrát po dobu 5 minut. Spojené extrakty byly přefiltrovány a následně odpařeny na vakuové rotační odparce a dosušeny dusíkem do sucha. Poté byly extrakty převedeny pomocí hexanu do vialek. Následovalo přečištění koncentrovanou kyselinou sírovou. Přečištěné vzorky byly dosušeny dusíkem do sucha a doplněny acetonitrilem se standardním přídatkem na objem 1 ml. Analýza ftalátů byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí při vlnové délce 224 nm. Byla použita kolona Zorbax Eclipse C8. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky za použití softwaru Agilent ChemStation for LC and LC/MS systems.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky zeminy byly odebírány ze dvou vrstev půdy. A to u orné půdy ze svrchního horizontu od 0 do 25 cm a spodního od 35 do 60 cm, u trvalých travních porostů ze dvou horních vrstev 0 – 10 cm, 11 – 25 cm s odstraněním svrchní drnové vrstvy. Vzorky byly odebírány ve 4 moravských krajích (Zlínský, Jihomoravský, Olomoucký a Moravskoslezský) a v kraji Vysočina.

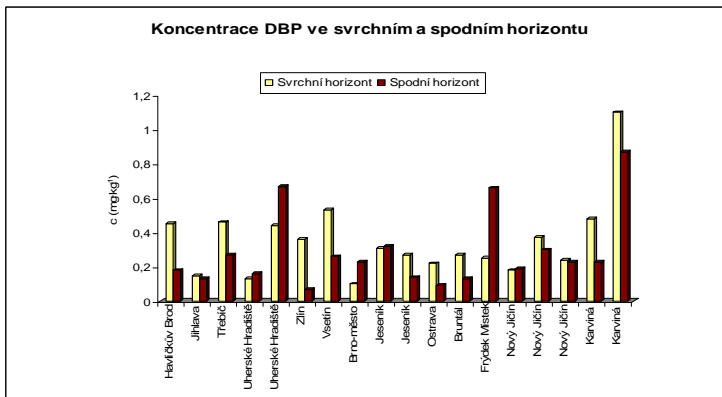
Naměřené výsledky koncentrací dibutyl ftalátu ve spodním i svrchním horizontu půdy rozdělené dle příslušných krajů, okresů a použité kultury uvádí následující tab. I.

Tab. I Zjištěné koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dibutyl ftalátu (DBP) ve svrchním (O) a spodním (P) horizontu půdy

Č. vz.	Kraj	Okres	Kultura	DBP $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (O)	DBP $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (P)
1	Vysočina	Havlíčkův Brod	OP	0,45	0,18
2	Vysočina	Jihlava	OP	0,15	0,13
3	Vysočina	Třebíč	OP	0,46	0,27
4	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,13	0,16
5	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,44	0,67
6	Zlínský	Zlín	OP	0,36	0,07
7	Zlínský	Vsetín	OP	0,53	0,26
8	Jihomoravský	Brno-město	OP	0,10	0,23
9	Olomoucký	Jeseník	OP	0,31	0,32
10	Olomoucký	Jeseník	OP	0,27	0,14
11	Moravskoslezský	Ostrava	OP	0,22	0,09
12	Moravskoslezský	Bruntál	OP	0,27	0,13
13	Moravskoslezský	Frýdek Místek	OP	0,25	0,66
14	Moravskoslezský	Nový Jičín	OP	0,18	0,19
15	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,37	0,30
16	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,24	0,23
17	Moravskoslezský	Karviná	TTP	0,48	0,23
18	Moravskoslezský	Karviná	TTP	1,10	0,87

OP – orná půda, TTP – trvalý travní porost, O – ornice (svrchní horizont), P – podorničí (spodní horizont)

Údaje uvedené v tab. I jsou přehledně zobrazeny na následujícím obrázku 1.



Jak je patrné z obr. 1 zjištěné hodnoty dibutyl ftalátu se pohybovaly ve svrchním horizontu od hodnot $0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Brno-město – orná půda) do $1,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Karviná – trvalý travní porost). Ve spodním horizontu se jednalo o koncentrace od $0,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Zlín – orná půda) do $0,87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Karviná – trvalý travní porost).

Naměřené koncentrace di-2-ethylhexyl ftalátu ve spodním i svrchním horizontu půdy rozdělené dle příslušných krajů, okresů a použité kultury jsou uvedeny v následující tab. II.

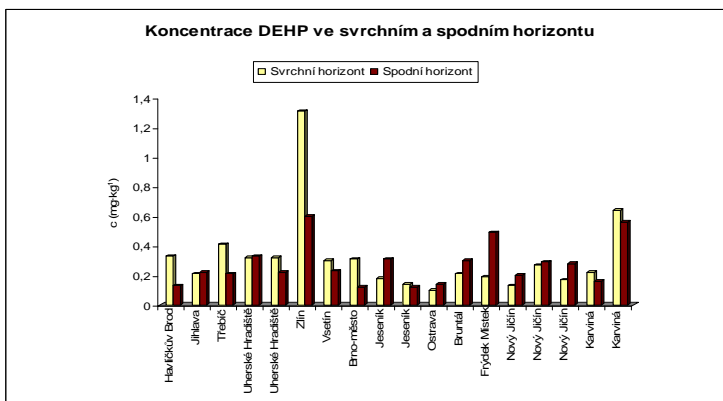
Tab. II Koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) di-2-ethylhexyl ftalátu (DEHP) ve svrchním (O) a spodním (P) horizontu půdy

Č. vz.	Kraj	Okres	Kultura	DEHP $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (O)	DEHP $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (P)
1	Vysočina	Havlíčkův Brod	OP	0,33	0,13
2	Vysočina	Jihlava	OP	0,21	0,22
3	Vysočina	Třebíč	OP	0,41	0,21
4	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,32	0,33
5	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,32	0,22
6	Zlínský	Zlín	OP	1,31	0,60
7	Zlínský	Vsetín	OP	0,30	0,23
8	Jihomoravský	Brno-město	OP	0,31	0,12
9	Olomoucký	Jeseník	OP	0,18	0,31
10	Olomoucký	Jeseník	OP	0,14	0,12
11	Moravskoslezský	Ostrava	OP	0,10	0,14
12	Moravskoslezský	Bruntál	OP	0,21	0,30
13	Moravskoslezský	Frýdek Místek	OP	0,19	0,49
14	Moravskoslezský	Nový Jičín	OP	0,13	0,20
15	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,27	0,29
16	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,17	0,28
17	Moravskoslezský	Karviná	TTP	0,22	0,16
18	Moravskoslezský	Karviná	TTP	0,64	0,56

OP – orná půda, TTP – trvalý travní porost, O – ornice (svrchní horizont), P – podomíči (spodní horizont)

Údaje o koncentracích DEHP uvedené v tab. II jsou přehledně zobrazeny na následujícím obr. 2.

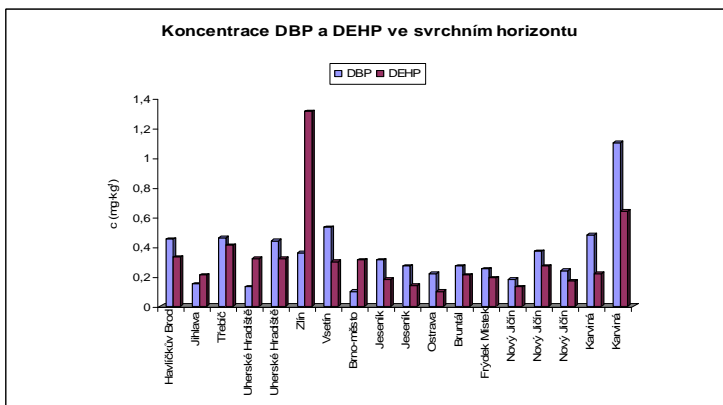
Obr. 2 Porovnání koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) DEHP ve svrchním a spodním horizontu půdy

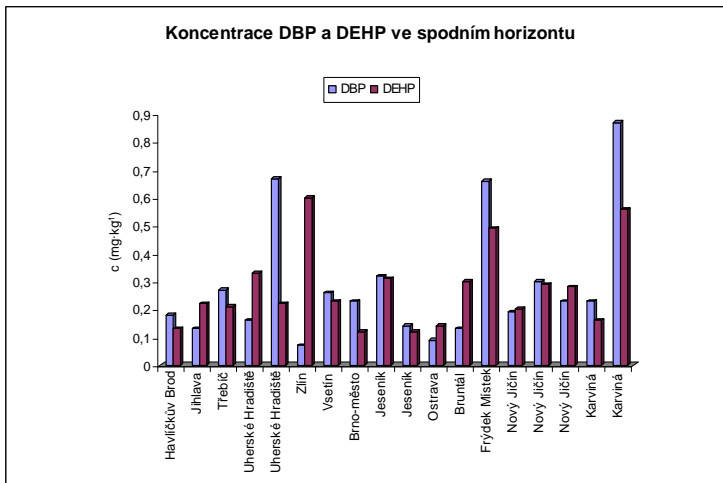


Jak je zřejmé z předešlého obr. 2 zjištěné hodnoty di-2-ethylhexyl ftalátu se pohybovaly ve svrchním horizontu od hodnot $0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Ostrava – orná půda) do $1,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Zlín – orná půda). Ve spodním horizontu potom byly zjištěny koncentrace od $0,12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Brno-město – orná půda a okres Jeseník – orná půda) do $0,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti (okres Zlín – orná půda).

Porovnání koncentrací dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu je uvedeno na následujících dvou obrázcích. Koncentrace zmíněných ftalátů ve svrchních horizontech půdy jsou zobrazeny na obrázku 3, koncentrace zmíněných ftalátů ve spodních horizontech půdy jsou zobrazeny na obrázku 4.

Obr. 3 Porovnání koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) DBP a DEHP ve svrchním horizontu půdy





Sumy koncentrací dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu ve svrchním a spodním horizontu půdy rozlišené dle kraje, okresu a použité kultury jsou uvedeny v tabulce III.

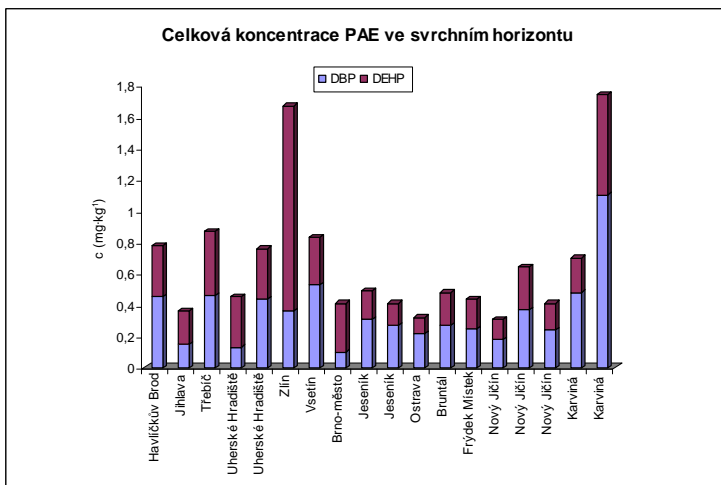
Tab. III Zjištěné celkové koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Σ dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu ve svrchním (O) a spodním (P) horizontu půdy

Č. vz.	Kraj	Okres	Kultura	Σ PAE (O) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Σ PAE (P) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
1	Vysočina	Havlíčkův Brod	OP	0,78	0,31
2	Vysočina	Jihlava	OP	0,36	0,35
3	Vysočina	Třebíč	OP	0,87	0,48
4	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,45	0,49
5	Zlínský	Uherské Hradiště	OP	0,76	0,89
6	Zlínský	Zlín	OP	1,67	0,67
7	Zlínský	Vsetín	OP	0,83	0,49
8	Jihomoravský	Brno-město	OP	0,41	0,35
9	Olomoucký	Jeseník	OP	0,49	0,63
10	Olomoucký	Jeseník	OP	0,41	0,26
11	Moravskoslezský	Ostrava	OP	0,32	0,23
12	Moravskoslezský	Bruntál	OP	0,48	0,43
13	Moravskoslezský	Frýdek Místek	OP	0,44	1,15
14	Moravskoslezský	Nový Jičín	OP	0,31	0,39
15	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,64	0,59
16	Moravskoslezský	Nový Jičín	TTP	0,41	0,51
17	Moravskoslezský	Karviná	TTP	0,70	0,39
18	Moravskoslezský	Karviná	TTP	1,74	1,43

OP – orná půda, TTP – trvalý travní porost, O – ornice (svrchní horizont), P – podorničí (spodní horizont)

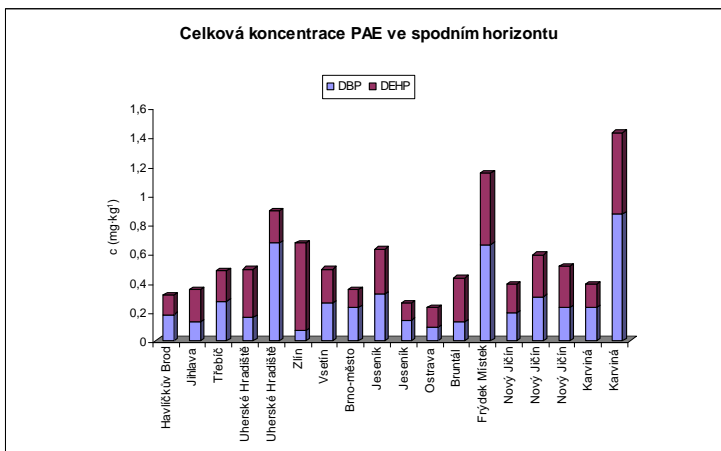
Celková koncentrace dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu je zobrazena na následujících uvedených obrázcích a to na obr. 5 ve svrchních horizontech půdy a na obr. 6 ve spodních horizontech půdy.

Obr. 5 Celková koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu ve svrchním horizontu půdy



Jak je zřejmé z výše uvedeného obr. 5 jsou výrazně vyšší celkové koncentrace v okresech Zlín (orná půda - $1,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pův. hm.) a Karviná (trvalý travní porost - $1,74 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pův. hm.). Nejnížší celkové koncentrace byly až pětkrát nižší a byly zjištěny v okresech Nový Jičín (orná půda - $0,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pův. hm.), Ostrava (orná půda - $0,32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pův. hm.) a Jihlava (orná půda - $0,36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pův. hm.).

Obr. 6 Celková koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu ve spodním horizontu půdy



Jak je patrné z obr. 6 jsou nejvyšší celkové koncentrace v okresech Uherské Hradiště (orná půda - 0,89 mg·kg⁻¹ pův. hm.), Frýdek Místek (orná půda - 1,15 mg·kg⁻¹ pův. hm.) a Karviná (trvalý travní porost - 1,43 mg·kg⁻¹ pův. hm.). Tyto nejvyšší koncentrace ftalátů jsou až šestinásobně vyšší oproti nejnižším celkovým koncentracím, které byly zjištěny v okresech Ostrava (orná půda - 0,23 mg·kg⁻¹ pův. hm.) a Jeseník (orná půda - 0,26 mg·kg⁻¹ pův. hm.).

Hodnoty zjištěné v této studii jsou srovnatelné se zjištěnými hodnotami koncentrací ve studii Zorníková et al. (2011), která sledovala obsah dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu v půdě a zemědělských plodinách *Triticum aestivum*, *Brassica napus*, *Zea mays*. Lokality zmiňované v této studii se nacházely na střední Moravě. Zjištěné koncentrace ftalátů byly pro DBP od 0,28 do 1,59 mg·kg⁻¹ sušiny a koncentrace DEHP od <0,03 do 0,73 mg·kg⁻¹ sušiny. Nejvyšší hodnoty obou esterů byly zjištěny v lokalitě, která byla nejvíce hnojena organickými hnojivy.

Rozdíl v obsahu ftalátů na základě způsobu hnojení zkoumal Vekselsoe et al. (2002). U polí s přidáním nízkých dávek kalu byly hodnoty srovnatelné jako u polí hnojených hnojem nebo umělými hnojivy. Stejně tak u neobdělávaných půdy byly zjištěny podobné hladiny ftalátů, což autor připisuje atmosférické depozici. K významnému zvýšení koncentrace ftalátů v půdě dochází při vysokých dávkách kalu jako hnojiva, v tomto případě zůstávají ftaláty v půdě i po 8 letech.

Wezel et al. (2000) ve své studii za použití ekotoxikologických dat a chemie životního prostředí určil hodnoty environmentálního rizika pro DEHP a DBP. V půdě a sedimentu s obsahem 10 % organické hmoty se jedná o 0,7 mg·kg⁻¹ pův. hm. pro DBP a 1,0 mg·kg⁻¹ pův. hm. pro DEHP. Tyto hodnoty byly v některých lokalitách této studie překročeny. Ovšem v České republice byl vydán Metodický pokyn MŽP vycházející ze screeningových hodnot RSL (Regional Screening Levels) vydaných Americkou agenturou pro ochranu životního prostředí USEPA (United States Environmental Protection Agency). RSL jsou koncentrace chemických látek v jednotlivých složkách životního prostředí, jejichž překročení by si mělo vyžádat další výzkum nebo odstranění kontaminace především vzhledem k rizikům pro případného příjemce znečištění a ohrožení ekosystémů. Hodnoty pro DEHP jsou uvedeny v příloze příslušného Metodického pokynu MŽP: pro průmyslově využívaná území 120 mg·kg⁻¹ sušiny, ostatní plochy 35 mg·kg⁻¹ sušiny. USEPA udává i hodnoty pro DBP a to 62.000 mg·kg⁻¹ sušiny pro průmyslově využívané plochy a 6.100 mg·kg⁻¹ sušiny pro ostatní plochy. Žádná z těchto hodnot nebyla v této studii překročena.

Obsah ftalátů v zemědělských půdách může být potenciálním ohrožením potravin. Například Fierens et al. (2012) zkoumal vliv okolního prostředí a dojícího zařízení na obsah koncentrace ftalátů v mléce krav ze dvou farem. Na základě koncentrace ftalátů v půdě (DBP 0,58 µg·kg⁻¹ pův. hm. a 2,67 µg·kg⁻¹ pův. hm., DEHP 12,20 a 4,49 µg·kg⁻¹ pův. hm.) byly vypočteny hodnoty příjmu ftalátů vlivem půdy (DBP 1,2 a 2,0 µg·kráva⁻¹·den⁻¹, DEHP 9,2 a 3,4 µg·kráva⁻¹·den⁻¹). V mléce byl DBP zjištěn jen v jednom vzorku narozdíl od DEHP, který byl zjištěn s výjimkou 1 vzorku, ve všech vzorcích mléka. Což je pravděpodobně způsobeno metabolismem krav, vzhledem k tomu, že oba ftaláty se nacházely i v krmivu. Kromě DEHP byly v mléce zjištěny i další ftaláty: diisobutyl ftalát (DIBP) a benzylobutyl ftalát (BBP). Sezónní výkyvy v obsahu DEHP v mléce byly

dány přestupem z různých složek životního prostředí. Přičemž hodnoty koncentrace ftalátů v půdě zmíněné v této studii jsou mnohonásobně nižší než hodnoty zjištěné v naší studii.

Vysoké koncentrace ftalátů se nachází v městských půdách. Ma et al. (2003) zkoumal půdu ve sklenicích na okrajích Pekingu hlavního města Číny, Li et al. 2006 se zaměřil na městskou půdu Pekingu. Co se týče obou studií dominantním zjištěným ftalátem byl di-2-ethylhexyl ftalát, dále dibutyl ftalát, diisobutyl ftalát. Vzorky ze skleníku měly v porovnání s kontrolní zemědělskou půdou vyšší hodnoty ftalátů, koncentrace ftalátů v městské půdě Pekingu byly ještě vyšší. Komplexní studii výskytu ftalátů v environmentálních médiích (vzduch, povrchová voda, půda, sediment) a potravinách v Číně zveřejnil Chen et al. (2012). Výzkum probíhal od ledna 2000 do října 2010 a bylo do něj zahrnuto 53 studií. Denní příjem ftalátů se lišil dle krajů. Za hlavní cestu příjmu ftalátů organismem byl označen dietární příjem, přičemž příjem DEHP tvořil 48 – 73 % z celkového příjmu ftalátů.

ZÁVĚR

V této práci jsou uvedeny zjištěné výsledné koncentrace esterů kyseliny ftalové, a to dibutyl ftalátu a di-2-ethylhexyl ftalátu v půdních vzorcích ze čtyř moravských krajů (Zlínský, Jihomoravský, Olomoucký a Moravskoslezský kraj) a z kraje Vysočina. Zjištěné koncentrace obou ftalátů se v jednotlivých krajích příliš nelišily, významný rozdíl v koncentracích nebyl zjištěn ani mezi jednotlivými kulturami tj. ornou půdou a trvalým travním porostem. Což svědčí o rovnoměrném zatížení životního prostředí moravské části České republiky estery kyseliny ftalové. Vyšší koncentrace jak dibutyl ftalátu tak i di-2-ethylhexyl ftalátu byly zjištěny jen u vzorků z Moravskoslezského kraje okres Karviná u trvalého travního porostu (koncentrace DBP ve svrchním horizontu $1,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, DBP ve spodním horizontu $0,87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, koncentrace DEHP ve svrchním horizontu $0,64 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, DEHP ve spodním horizontu $0,56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a u vzorků ze Zlínského kraje okres Zlín u orné půdy byly zjištěny vyšší koncentrace DEHP ve svrchním horizontu $1,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, DEHP ve spodním horizontu $0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. V těchto lokalitách lze proto předpokládat určitý zdroj tohoto znečištění, popř. použití hnojiv s vyšším obsahem esterů kyseliny ftalové.

Zjištěné koncentrace DBP ve svrchním horizontu se pohybovaly v rozmezí od 0,1 do $1,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ve spodním horizontu v rozmezí od 0,07 do $0,87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Koncentrace DEHP ve svrchním horizontu se pohybovaly v rozmezí od 0,1 do $1,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ve spodním horizontu v rozmezí od 0,12 do $0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Výše uvedené výsledné koncentrace esterů kyseliny ftalové zjištěné v moravských krajích a na Vysočině tvoří jen část monitoringu. V rámci monitoringu dibutyl ftalátu a di-2ethylhexyl ftalátu v půdách budou analyzovány vzorky zeminy i z dalších krajů České republiky.

LITERATURA

Arcadi F. A., Costa C., Imperatore C., Marchese A., Rapisarda A., Salemi M., Trimarchi G. R., Costa G. (1998): Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem. Toxicol.*, 36 (11): 963 – 970.

Cai Q. Y., Mo C. H., Wu Q. T., Zeng Q. Y. (2006): Accumulation of phthalic acid esters in Water Spinach (*Ipomoea aquatica*) and in paddy soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 77 (3): 411 – 418.

Fierens T., Van Holderbeke M., Willems H., De Henauf S., Sioen I. (2012): Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food Chem. Toxicol.*, 50 (8): 2945 – 2953.

Chen L., Zhao Y., Li L., Chen B., Zhang Y. (2012): Exposure assessment of phthalates in non-occupational populations in China. *Sci. Total Environ.*, 427 – 428 (15): 60 – 69.

Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K. (1999): Di-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral administration. *Veterinární Medicina*, 44 (3): 61–70.

Jarošová A. (2010): Možné cesty vstupu ftalátů do rostlin. *Acta Universitas Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58 (2): 299 – 302.

Li X. H., Ma L. L., Liu X. F., Fu S., Cheng H. X., Xu X. B. (2006): Phthalate Ester Pollution in Urban Soil of Beijing, People's Republic of China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 77 (2): 252 – 259.

Ma L. L., Chu S. G., Xu B. (2003): Phthalate Residues in Greenhouse Soil from Beijing Suburbs, People's Republic of China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71 (2): 394 – 399.

Mackintosh C. E., Maldonado J. A., Ikonomou M. G., Goba F. A. P. C. (2006): Sorption of phthalate esters and PCBs in a marine ecosystem. *Environ. Sci. Technol.*, 40 (11): 3481 – 3488.

Matsumoto M., Hirata-Koizumi M., Ema M. (2008): Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 50 (1): 37 – 49.

Metodický pokyn MŽP Indikátory znečištění [cit. 3. 9. 2012] Dostupné na: <http://www.mzp.cz/cz/metodiky_ekologicke_zateze>

Nanni N., Fiselier K., Grob K., Di Pasquale M., Fabrizi L., Aureli P., Coni E. (2011): Contamination of vegetable oils marketed in Italy by phthalic acid esters. *Food Control*, 22 (2): 209 – 214.

Otton S. V., Sura S., Blair J., Ikonomou M. G., Gobas F. A. P. C. (2008): Biodegradation of mono-alkyl phthalate esters in natural sediments. *Chemosphere*, 71 (11): 2011 – 2016.

Regional Screening Level (RSL) [cit. 3. 9. 2012] Dostupné na: <http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/rb-concentration_table/Generic_Tables/index.htm>

- Rhind S. M., Kyle C. E., Mackie C., Telfer G. (2007): Effects of exposure of ewes to sewage sludge-treated pasture on phthalate and alkyl phenol concentrations in their milk. *Sci. Total Environ.*, 383 (1 - 3): 70 – 80.
- Staples C. A., Peterson D. R., Parkerton T. F., Adams W. J. (1997): The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*, 35 (4): 667 – 749.
- Van Wezel A. P., Van Vlaardingen, Posthumus R., Crommentuijn G. H., Sijm D. T. H. M. (2000): Environmental Risk Limits for Two Phthalates, with Special Emphasis on Endocrine Disruptive Properties. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46 (3): 305 – 321.
- Velišek J. (2002): *Chemie potravin 3*. OSSIS – Ing. Václav Šedivý, Tábor, 343 s.
- Vikelseo J., Thomsen M., Carlsen L. (2002): Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. *Sci. Total Environ.*, 296 (1 - 3): 105 – 116.
- Wang X. K., Guo W. L., Meng P. R., Gan J. A. (2002): Analysis of Phthalate Esters in Air, Soil and Plants in Plastic Film Greenhouse. *Chin. Chem. Lett.*, 13 (6): 557 – 560.
- Wang J., Zhao X., Wu W. (2004): Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge. *Process Biochem.*, 39 (12): 1837 – 1841.
- Williams M. D., Adams W. J., Parkerton T. F., Biddinger G. R., Robilards K. A. (1995): Sediment sorption coefficient measurements for four phthalate esters: experimental results and model theory. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 (9): 1477 – 1486.
- Zeng F., Cui K., Xie Z., Luo D., Chen L., Lin Y., Liu M., Sun G. (2009): Distribution of phthalate esters in urban soils of subtropical city, Guangzhou, China. *J. Haz. Mat.*, 164 (2 - 3): 1171 – 1178.
- Zorníková G., Jarošová A., Hřivna L. (2011): Distribution of phthalic acid esters in agricultural plants and soils. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59 (3): 233 – 238.

MICROFLORA OF SELECTED SPICE MIXTURES WITHOUT ADDED SALT

MIKROFLÓRA VYBRANÝCH DRUHŮ KOŘENÍČÍCH SMĚSÍ BEZ PŘÍDAVKU SOLI

Dostálová L., Kalhotka L.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xdosta13@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The objective of the study was to determinate the microflora of selected spice mixtures without added salt. In the offer is a large number of spice mixtures without added salt. Prevails four-colour pepper, herbes de Provence and blends for meat condiment. Selected were three types of blends for analysis. Herbes de Provence, four-color pepper and salad seasoning. These blends were chosen deliberately because dishes flavored with these spices can be consumed by the consumer without subsequent heat treatment. This preserves the original microflora of spices. In these samples were determined the total plate count, the number of spore-forming bacteria, the number of coliform bacteria and the number of molds and yeasts. The thesis was to compare quantity of microorganisms in spices with legislative requirements and with specialized literature and to compare the microflora blended spices from various companies. All samples were contaminated with microorganisms. The most contaminated was four-colour pepper and then Provençal spices. Salad spices were contaminated less than Provençal. Any of the spice mixtures did not exceed limit values for the number of microorganisms given by the legislation. Microbiologically seems to be the best producer Vitana, contamination of Provençal spices was the lowest and contamination of pepper belonged too between the lowest.

Key words: microflora, spice blend without added salt, spice, mikroorganism, contamination

ÚVOD

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 331/1997 Sb. je kořením definováno jako části rostlin tj. kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena nebo jejich části, uvedené v příloze č. 2, v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivňování chutě a vůně potravin; u mletých koření se připouští přidávek protispěkových látek nejvýše do jednoho procenta hmotnosti. Směsí koření se rozumí směs jednotlivých koření uvedených pod písmenem a), bez použití přídatných látek, u mletých a drcených směsí koření se připouští přidávek protispěkových látek nejvýše do jednoho procenta hmotnosti.

V obchodní síti je nabízeno velké množství kořenících směsí bez přídavku soli. Dominantní postavení má především pepř čtyř barev, provensálské koření, dále různé směsi na dochucení vařeného, pečeného či grilovaného masa, pizzy, těstovin, polévek nebo různých druhů salátů. Kromě směsí pro ochucení slaných jídel jsou v nabídce také směsi pro okoření jídel sladkých, například jablečného štrúdlu, a alkoholických nápojů, jako je svařené víno nebo jablečný punč.

Některé kořenící směsi nabízené v obchodní síti jsou označeny jako bio. To znamená, že se na ně vztahují speciální požadavky stanovené evropskou legislativou (Nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů).

K nejvýznamnějším bakteriím, které mohou být pozorovány na koření patří půdní bakterie r. *Clostridium* a *Bacillus* a jejich spory, plísňe, stejně jako mikroorganismy zvířecích a lidských fekálií. Hygienické problémy mohou způsobit zejména salmonely a jiné patogenní fekální bakterie, a také ve větších počtech přítomní původci mikrobiálních intoxikací, sporotvorné bacily *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* nebo *Bacillus cereus* (GÖRNER, VALÍK, 2004). V koření byla také zjištěna *E. coli*, mikrokoky, sarciny, streptokoky, pseudomonády, flavobakterie, achromobakterie, corynebakterie a aktinomyceity. Plísňe a kvasinky zaujímají až druhé místo jak kvantitou, tak druhovou rozmanitostí, jistě z toho důvodu, že koření přichází většinou v suchém stavu (HAMPL, 1968). Mikroorganismy může být velmi často kontaminována mletá paprika, kmín, skořice a pepř (GÖRNER, VALÍK, 2004). Tepelnou úpravou kořeněných potravin a jídel se vegetativní formy mikroorganismů devitalizují, ale přežívají termorezistentní spory, které opět vyklíčí a mohou způsobit vážné onemocnění a kažení připravených jídel. Mikroorganismy málo kontaminované koření je teoreticky možné získat pěstováním a sběrem za přísných hygienických podmínek. Většinou ale spotřebitel nemá na získávání koření vliv, je importované z rozvojových zemí, proto jsou povolené technologické postupy na jejich dekontaminaci (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Kontaminované koření představuje v mnohých potravinářských výrobcích (uzeniny, hotová jídla) značné hygienické a technologické riziko. Určitým východiskem jsou extrakty koření (HAMPL, 1968).

V případě, že mikrobiální kontaminace koření je příliš vysoká (stupeň znečištění může být až 10 mld. KTJ·g⁻¹), je několik možných způsobů jak ji snížit. Patří mezi ně chemické ošetření, ozáření nebo termosterilace. Chemické ošetření je již dnes zastaralý a kvůli vysoké toxicitě chemických látek nevhodný způsob. Používaly se plyny, např. ethylenoxid nebo fosfin (ŠILHÁNKOVÁ, 2002). Ozařování koření se řídí vyhláškou č. 133/2004 Sb. o podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší dávce záření a o způsobu označení ozáření na obalu. Maximální dávka ionizujícího záření může být aplikována jednorázově nebo v opakovaných dílčích dávkách až do výše 10 kGy. Standardní dávka pro dekontaminaci koření je 3 – 7 kGy a při této dávce dochází ke snížení koncentrací koliformních bakterií, celkového počtu mikroorganismů a plísní o dva až tři řády (ARVANITOYANNIS, 2010). Ošetření potravin a surovin ionizujícím zářením nesmí být použito v kombinaci s chemickým ošetřením, které má stejný účel. Další možností je použití UV záření. UV záření však ničí mikroorganismy pouze na povrchu koření, neničí je v jeho záhybech, kam nepronikne. Ošetření koření termosterilací umožňuje řízené snížení celkového počtu mikroorganismů v koření, sušených aromatických bylinách, a dále v sušených houbách, ořeších nebo sušené zelenině. Může se jednat o sterilaci horkou vodní parou nebo suchým vzduchem (HOUŠKA, 2007).

Cílem práce bylo stanovení mikroflóry kořenících směsí bez přídavku soli, dále porovnání zjištěných výsledků s českou a evropskou legislativou a s odbornou literaturou. V rámci práce byla také vzájemně porovnána míra znečištění jednotlivých druhů kořenících směsí a mikrobiální kvalita směsí různých výrobců.

MATERIÁL A METODIKA

Z nabízeného sortimentu kořenících směsí byl vybrán pepř čtyř barev, dále provensálské koření a salátové koření. Tyto směsi byly zvoleny proto, že s nimi může být dochuceno jídlo bez následné tepelné úpravy. Díky tomu si koření zachová svou původní mikroflóru. Analyzované vzorky pocházely od různých výrobců:

1. pepř čtyř barev – Kotányi, Ramram, Sindibád, Spice cellar, Ukuva i Afrika, Vitana
2. provensálské koření – Kotányi, Ramram, Samuel, Sindibád, Spice cellar, Vitana
3. salátové koření – Alnatura, Samuel

MENDELNET 2012

Salátové koření mohlo být zakoupeno pouze od dvou výrobců, protože v salátovém koření jiných výrobců je obsažena sůl. U všech druhů kořenících směsí byly analyzovány od každého výrobce tři balení.

Vitana a Kotányi jsou výrobci českému spotřebiteli dobře známí. Samuel, Sindibád a Ramram jsou zástupci českých výrobců koření, Alnatura je bio koření německého původu a Ukuva i Afrika je koření africké, které je dováženo centrem rovného obchodu. Spice cellar je značka koření, které je vyráběno pro obchodní řetězec Tesco.

Ve vybraných kořenících směších byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM), sporulující mikroorganismy, koliformní bakterie a kvasinky a plísně. Pro jejich stanovení byla použita plotnová metoda se zalitím inokula živnou půdou. Zaléváno bylo vždy příslušné ředění, které bylo získáno oplachem naváženého vzorku koření směsí a následným ředěním destilovanou vodou. Pro stanovení sporulujících mikroorganismů byly vzorky zahřívány ve vodní lázni o teplotě 85 °C po dobu 15 minut. Tím došlo ke zničení vegetativních forem mikroorganismů a přežily pouze spory, které následně vyklíčily při vhodných kultivačních podmínkách.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) a sporulující bakterie byly stanoveny na PCA (Biokar Diagnostic, Francie) při 30 °C za 72 hodin. Koliformní bakterie byly stanoveny na VRBL (Biokar Diagnostic, Francie) při 37 °C za 24 hodin a kvasinky a plísně byly stanoveny na Chloramphenicol glucose agaru (Biokar Diagnostic, Francie) při 25 °C za 120 hodin. Po kultivaci bylo odečteno množství narostlých kolonií na Petriho miskách a vyjádřeno jako $\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ (kolonie tvořící jednotky v 1 g vzorku).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ve vzorcích směsí koření od různých výrobců byly stanovovány významné skupiny mikroorganismů. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce č. 1.

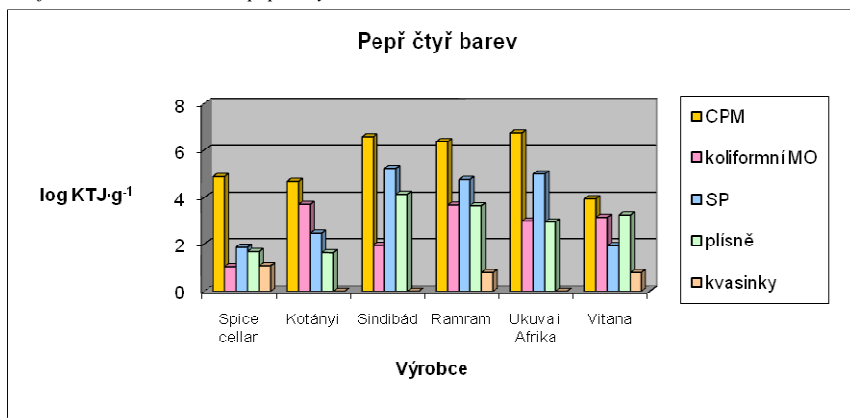
Tab. 1 Mikrobiální kontaminace vzorků kořenících směsí

Druh kořenící směsi	Výrobce	n [KTJ·g ⁻¹]				
		CPM	Koliformní MO	SP	Plísně	Kvasinky
Pepeř čtyř barev	Spice cellar	7,5·10 ⁴	11	70	47	12
	Kotányi	4,7·10 ⁴	4,9·10 ³	2,8·10 ²	42	ND
	Sindibád	3,9·10 ⁶	86	1,6·10 ⁵	1,4·10 ⁴	ND
	Ramram	2,4·10 ⁶	4,6·10 ³	5,6·10 ⁴	4,4·10 ³	6
	Ukuva i Afrika	5,6·10 ⁶	9,9·10 ²	9,9·10 ⁴	9,2·10 ²	ND
	Vitana	8,8·10 ³	1,4·10 ³	83	1,8·10 ³	6
Provensálské koření	Spice cellar	8,1·10 ⁵	3,3·10 ⁴	4,2·10 ⁴	1·10 ³	44
	Kotányi	1,8·10 ⁶	3,4·10 ⁴	8,4·10 ⁴	9,5·10 ²	65
	Samuel	2,2·10 ⁵	6,4·10 ³	2,7·10 ⁴	7,2·10 ²	2
	Sindibád	9,6·10 ⁵	8,4·10 ⁴	1,9·10 ⁴	1,3·10 ³	20
	Ramram	5,1·10 ⁵	2·10 ⁴	2,4·10 ⁴	5,5·10 ²	18
	Vitana	4,1·10 ⁴	1,9·10 ³	9,9·10 ²	6,3·10 ²	20
Salátové koření	Alnatura	1·10 ⁵	2,2·10 ³	6,1·10 ²	1,5·10 ²	82
	Samuel	5,9·10 ⁵	6,8·10 ³	4,6·10 ⁴	4,3·10 ²	ND

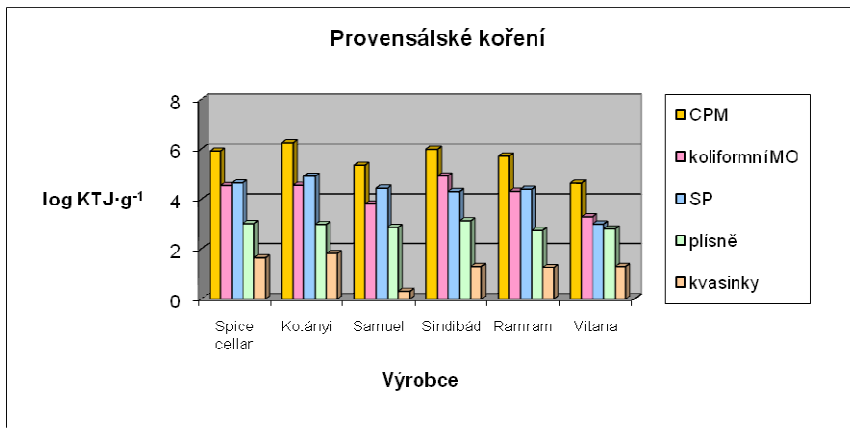
n = průměrný počet kolonií mikroorganismů v 1 g vzorku získaný ze dvou po sobě následujících ředění, CPM = celkový počet mikroorganismů, SP = sporulující bakterie, ND = nedetekováno

Mezi nejvíce mikrobiálně kontaminované vzorky koření patřil pepř čtyř barev. Pepř obecně patří mezi koření s největší kontaminací. Množství mikroorganismů stanovených v různých studiích se pohybuje v řádech 10^3 až 10^8 KTJ·g⁻¹. Například PAFUMI (1987) uvádí, že kontaminace černého pepře byla konstantně nejvyšší, a to $2 \cdot 10^8$ KTJ·g⁻¹. Nižší počty mikroorganismů v černém pepři stanovil KRISHNAWAMY a kol. (1976) – $3,7 \cdot 10^3$ až $9 \cdot 10^7$ KTJ·g⁻¹. FREIRE a OFFORD (2002) analyzovali pepř černý, zelený, bílý a červený a zjistili, že nejvíce kontaminován byl pepř černý, s průměrným počtem mikroorganismů $1,9 \cdot 10^8$ KTJ·g⁻¹. Pepře ostatních barev byly znečištěny méně, v řádech 10^6 až 10^7 KTJ·g⁻¹. V rámci této skupiny analyzovaných vzorků byly zjištěny výrazné rozdíly v mikrobiální kontaminaci. Nejvíce znečištěný byl pepř čtyř barev Ukuva i Afrika, Sindibád a Ramram. Naopak výrazně nižšího počtu mikroorganismů dosahovaly pepře značky Vitana a Spice cellar, kde hodnoty n [KTJ·g⁻¹] některých skupin mikroorganismů byly oproti jiným vzorkům i méně než poloviční. Rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny metodou ošetření koření.

Graf 1 Kontaminace vzorků pepře čtyř barev

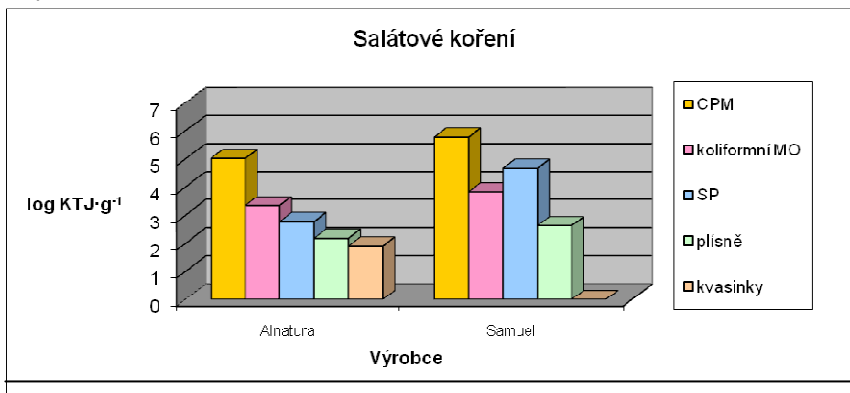


Provensálské koření bylo také značně kontaminované, hodnoty n [KTJ·g⁻¹] se pohybovaly v podobném rozmezí jako u pepře čtyř barev. Oproti pepři byly počty mikroorganismů u jednotlivých vzorků poměrně vyrovnané. Nejnižšího stupně kontaminace dosahovala kořenící směs značky Vitana. U poloviny skupin mikroorganismů v tomto vzorku nebyl rozdíl oproti ostatním vzorkům významný. Ovšem u celkového počtu mikroorganismů, sporulujících a koliformních bakterií se množství mikrobů lišilo o jeden až dva řády. Míra kontaminace jednotlivých složek provensálského koření se pohybuje v různých studiích v řádech 10^2 až 10^6 KTJ·g⁻¹ u celkového počtu mikroorganismů. HAMPL (1968) uvádí ve své knize tabulku dle Alejeva, v níž jsou počty mikroorganismů pro koriandr ($0,6 \cdot 10^2$ – $2,7 \cdot 10^6$ KTJ·g⁻¹), bobkový list ($1,8 \cdot 10^3$ – $2,3 \cdot 10^4$ KTJ·g⁻¹), rozmarýn ($4 \cdot 10^3$ KTJ·g⁻¹) a majoránku ($6,3 \cdot 10^4$ KTJ·g⁻¹). Kontaminaci plísněmi stanovil v majoránce KOCIĆ-TANACKOV a kol. (2007), dosáhla množství $2,6 \cdot 10^5$ KTJ·g⁻¹. Stanovení plísní a kvasinek v koriandru se věnoval MANDEEL (2005). Počet plísní byl nízký, 5 KTJ·g⁻¹, kvasinek bylo ve vzorku koriandru obsaženo více, 10^2 KTJ·g⁻¹.



U salátového koření je porovnání výrobců omezené z důvodu užšího sortimentu. Porovnány jsou zde tedy dvě značky, Alnatura a Samuel. Většího znečištění bylo dosaženo u koření směsi Samuel, rozdíly v počtech mikroorganismů však nebyly příliš výrazné. Mikroflóra salátového koření byla velmi podobná koření provensálskému, počty mikroorganismů dosahovaly přibližně takových hodnot jako provensálské koření značky Vitana. Jednou ze složek salátového koření je sušený citron, který analyzoval MANDEEL (2005). Stanovil v něm $10 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ kvasinek a $37 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ plísní. KRISHNAWAMY a kol. (1976) stanovovali celkový počet mikroorganismů v dehydrované cibuli, která může být také použita jako součást této koření směsi. Obsahovala $3,7 \cdot 10^3$ až $9 \cdot 10^7 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Graf 3 Kontaminace vzorků salátového koření



Zjištěné počty mikroorganismů byly porovnány s legislativními požadavky, jak českými, tak evropskými, a dále s hodnotami uvedenými v odborné literatuře. Počty mikroorganismů obsažených v kořeni a kořenicích směsích uváděné v odborné literatuře se mnohdy výrazně liší. Z tohoto důvodu se výsledky získané analýzami s některými údaji uvedenými v literatuře shodovaly a s jinými ne. V literatuře jsou uváděny většinou konkrétní mikroorganismy, nikoli skupiny mikroorganismů, proto jsou srovnání spíše orientační. Z evropské legislativy se limitům pro množství mikroorganismů v kořeni věnuje Nařízení Komise 1441/2007, kterým se mění Nařízení Komise 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. V tomto nařízení je uveden pouze limit pro *Listeria monocytogenes*, a proto srovnání s evropskou legislativou nebylo možné. Z české legislativy uvádí limitní počty mikroorganismů v kořeni norma ČSN 56 9609 (Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny). Po srovnání výsledků analýz s kritérii této normy bylo zjištěno, že zřejmě nedošlo k překročení limitních množství daných touto normou.

Tab. 2 Limitní počty mikroorganismů obsažených v kořeni - Norma ČSN 56 9609

Mikroorganismus	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	3	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> ssp.	5	0	0/10	-
Koagulázopozitivní stafylokoky	5	3	10 ²	10 ³
<i>Clostridium perfringens</i>	5	3	10 ²	10 ³
Potenciálně toxigenní plísně <i>Aspergillus flavus</i>	5	2	10 ³	5·10 ³

Kdy:

n - je počet vzorků určených k vyšetření, jehož účelem je rozhodnout, zda posuzovaná šarže výrobku nebo její část bude posouzena jako vyhovující nebo nevyhovující stanoveným mikrobiologickým požadavkům

m - je množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků výběru n

M - je množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c

c - je rozhodné číslo, čímž se rozumí počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští hodnota M

V normě ČSN 56 9609 jsou uvedeny limity pro *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp., koagulázopozitivní stafylokoky, *Clostridium perfringens* a *Aspergillus flavus*. S výsledky analýz mohou být porovnány hodnoty pro *Escherichia coli* a *Aspergillus flavus*. V normě jsou uvedeny dva limity. Jeden je pro množství mikroorganismů ve všech vzorcích výběru (m), druhý pro

omezený počet vzorků (M), ve kterém mohou mikroorganismy dosahovat vyšších hodnot. Protože počet vzorků uvedených v normě a počet analyzovaných se liší, nemůže být porovnávána hodnota M. Pro *E. coli* je v normě uveden limit (m) 10^2 KTJ·g⁻¹, pro *Aspergillus flavus* 10^3 KTJ·g⁻¹. Limit určený pro *E. coli* byl téměř ve všech vzorcích, kromě pepře čtyř barev Ukuva i Afrika, překročen o jeden až dva řády. *E. coli* je pouze součástí širší skupiny koliformních mikroorganismů, proto nelze přesně určit, zda byl limit v některých vzorcích opravdu překročen. Zaplísnění vzorků lze porovnat s limitem pro *Aspergillus flavus*. Ve vzorcích byl identifikován rod *Aspergillus*, druh blíže určen nebyl. V tomto případě většina vzorků hodnoty limitu nedosáhla. Mezi vzorky, které obsahovaly více plísní než 10^3 KTJ·g⁻¹ patřily pepře čtyř barev Sindibád, Ramram a Vitana a provensálské koření Sindibád. Ve všech vzorcích byly přítomny i další rody plísní, jako *Rhizopus* a *Penicillium*. K překročení limitu tedy opět zřejmě nedošlo.

ZÁVĚR

U všech analyzovaných vzorků byla zjištěna mikrobiální kontaminace. Počty mikroorganismů se u koření mnohdy výrazně lišily a to jak v rámci druhu koření, tak mezi jednotlivými výrobci. Nejvyšších hodnot kontaminace dosáhly vzorky pepře čtyř barev. Nižší kontaminace byla zjištěna u provensálského koření. V rámci této skupiny byly jednotlivé vzorky srovnatelné. Nejméně bylo kontaminováno koření salátové.

Jako mikrobiologicky nevhodnější se jevíly kořenící směsi značky Vitana. Provensálské koření tohoto výrobce dosáhlo nejnižších hodnot znečištění a také pepř čtyř barev patřil mezi nejméně kontaminované.

Spotřebitel může zabránit množení mikroorganismů vhodným uchováváním koření, osobní hygienou, hygienou prostředí a tepelnou úpravou pokrmů (pokud je možná).

LITERATURA

ARVANITTOYANNIS, Ioannis S. *Irradiation of food commodities: techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion*. 1st ed. London: Academic, 2010, 1143 s.

FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira a Lisa OFFORD. Bacterial and trast counts in Brazilian commodities and spices. *Brazilian Journal of Mikrobiology* [online]. 2002, roč. 33, č. 2, s. - [cit. 2012-04-03]. ISSN 1517-8382. DOI: 10.1590/S1517-83822002000200009. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.

HAMPL, Bohuš. *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: SNTL/ALFA, 1968, 205 s.

HOUŠKA, Milan. VÝZKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÝ PRAHA, v.v.i. *Metody tepelné konzervace partikulárních potravin*. 2007.

KOCIC-TANACKOV, Suncica, Gordana DIMIC a Dragana KARALIC. Contamination of spices with moulds potential producers of sterigmatocystine. *Acta periodica technologica* [online]. 2007, č. 38, s. 29-35 [cit. 2012-04-03]. ISSN 1450-7188. DOI: 10.2298/APT0738029K. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1450-71880738029K>

KRISHNASWAMY, M. A., J. D. PATEL, K. K. S. NAIR a M. MUTHU. Microbiological quality of certain spices. *Indian spices* [online]. 1976, č. 11 [cit. 2012-04-03]. ISSN 0019-6401. Dostupné z: <http://www.fstadirect.com/GetRecord.aspx?AN=1976-07-T-0321>

MANDEEL, Qaher A. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*. 2005, roč. 159, č. 2, s. 291-298. ISSN 0301-486x. DOI: 10.1007/s11046-004-5496-z. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11046-004-5496-z>

PAFUMI, J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of food protection* [online]. 1987, č. 12 [cit. 2012-04-03]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://www.fstadirect.com/GetRecord.aspx?AN=1987-06-T-0062>

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů.

Vyhláška č. 331/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici.

Vyhláška č. 133/2004 Sb., o podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší dávce záření a o způsobu označení ozářených na obalu.

ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Praha: Český normalizační institut, 2008.

THE QUALITY OF SANITATION IN THE PRODUCTION OF CHILLED READY MEALS

Dvořák L., Šulcerová H.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xdvora57@seznam.cz

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the quality of sanitation in the operation of production of chilled ready meals. The observation was carried out in food production in Brno and after sanitizing this area were carried out cultivation for total count of microorganisms (TCM), *Enterobacteriaceae* bacteria, fungi and yeasts, the genus *Enterococcus* and coliform bacteria. The obtained results were compared each other and subsequently evaluated the quality of sanitation in this operation. Samples were taken from the production facility after the sanitation and on a quarterly basis in year 2011 (February, May, August, November) in order to compare the effect of contamination and the effect of environment. Samples were taken from wooden butcher block, workers' hands, surfaces of stainless steel tables, glasses, pot and plastic wrap. All of smears were processed in accordance with Czech standards. The results were evaluated by Duncan's test ($P < 0.05$) and processed in graphs and tables.

Key words: quality of sanitation, ready meals, food control

ÚVOD

V dnešní době je produkce potravin ve vyspělých zemích nadprůměrná, což může mít za následek zhoršování kvality a zdravotní nezávadnosti. Většina potravinářských podniků v dnešní době preferuje automatizaci výroby, čímž odpadá lidský faktor a snižuje se tak i možnost kontaminace výrobků, která může být zapříčiněna právě lidskou chybou. Před vstupem ČR do EU nebyl na hygienické požadavky kladen tak velký důraz jako po vstupu, kdy tlak na provozovatele potravinářských podniků vzrostl. Došlo k přijetí nových norem a standardů, pro provozovatele potravinářských podniků vznikla legislativní povinnost zavedení systému Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP), který přímo souvisí s udržením zdravotní nezávadnosti potravin a v jehož důsledku musela řada podniků své provozovny zmodernizovat. Hygiena v potravinářském podniku závisí na mnoha faktorech, mezi které patří např. správná volba technologického postupu výroby, správně zvolené sanitační postupy a prostředky, kvalita zařízení provozovny a její umístění a v neposlední řadě také správné hygienické návyky zaměstnanců. Faktory ovlivňující hygienické požadavky na potravinářské provozy jsou označeny jako tzv. správná hygienická a výrobní praxe.

Řada podniků má ve svých prostorách laboratoře, kde dochází k vnitropodnikové kontrole kvality produktů, ale také ke kontrole sanitace provozu. Tyto rozbory si podniky provádí samy pro svoji vlastní kontrolu, ale také orgány Státní veterinární správy či Státní zemědělské a potravinářské inspekce. Jejich vyhodnocení by mělo vést ke zlepšení hygienických kvalit pracovního prostředí nebo k udržení těchto kvalit na aktuální úrovni, což v konečném důsledku vede k produkci kvalitních a zdravotně nezávadných potravin, které nebudou nijak nebezpečné pro konzumenta.

MATERIÁL A METODIKA

Stěry ze zařízení byly získány v podniku zabývajícím se výrobou hotových výrobků se sídlem v Brně. Vzorky byly následně zpracovány a analyzovány v mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně, kde byly sledovány mikroorganismy (MO) a skupiny MO, které bychom ve výrobních prostorách mohli očekávat s ohledem na jejich možnou patogenitu pro člověka (Tab. I). Stěry byly odebírány čtvrtletně po celý rok 2011 (únor, květen, srpen a listopad), pro porovnání vlivu kontaminace vnějšího prostředí dle ČSN ISO 18593, pomocí Transbak - transportního média s tamponem (Copan, Itálie). Vzorky byly odebrány z vytipovaných míst výrobního zařízení a výrobních prostor po provedení sanitace, vždy ve třech opakováních - dřevěný řeznický špalek, nerezové pracovní stoly, sklenice, hrnec, plastový obal a ruce pracovníka.

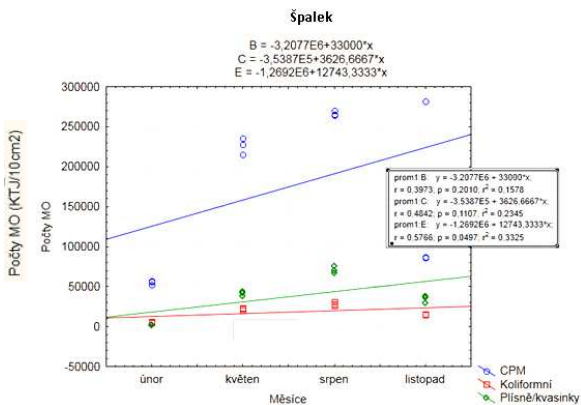
Tab. 1 Přehled stanovených skupin MO v provozu

MO	Kultivační médium	Výrobce	Země	Česká státní norma
Celkový počet mikroorganismů (CPM)	Plate Count Agar (PCA)	Noack	Francie	ČSN EN ISO 4833
rod <i>Enterococcus</i>	Slanetz-Bartley agar (SB) with TTC supplement	Noack	Francie	-----
čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose agar (VRBG)	Noack	Francie	ČSN ISO 8523
Plísně / kvasinky (P/K)	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar (YGC)	Noack	Francie	ČSN ISO 7954
Koliformní bakterie	Violet Red Bile Lactose agar (VRBL)	Noack	Francie	ČSN ISO 4832

VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem za sledované období bylo provedeno 84 stěrů. Prvním místem, ze kterého byly stěry odebírány byl přípravný řeznický dřevěný špalek. Po výpočtu regresních křivek jsme mohli konstatovat, že počet plísní a kvasinek statisticky narůstal v závislosti na ročním období. U CPM a koliformních bakterií statistická průkaznost nárůstu zjištěna nebyla (Obr. 1). Problematiku požadavků na hygienu provozů řešila vyhláška č. 137/2004 Sb. o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných, která byla ale nahrazena Nařízením komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Přes vysoké počty MO vykultivovaných z jednotlivých stěrů provedených na řeznickém přípravném špalku by se na základě výše zmíněné vyhlášky dalo říct, že sanitace je vyhovující, protože hodnoty nepřekračovaly stanovenou mez 10^6 KJT*cm⁻² ani v jednom případě. RODRÍGUEZ-CATURLA a kol. (2012) uvádějí ve své studii, že na dřevěných krájecích deskách se počty CPM pohybovaly kolem 10^4 KJT*cm⁻². Výsledky této práce se dostávaly i k $2 \cdot 10^4$ KJT*cm⁻². To je s největší pravděpodobností způsobeno vznikem nerovností na povrchu a různými záseky a zářezy do povrchu dřevěného špalku. Tyto nerovnosti značně ovlivňují kvalitu sanitace z důvodu nerovnosti povrchu.

Obr. 1 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované u řeznického špaluku



Pozn.:	Proml. B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Proml. C	Koliformní
	Proml. E.....	Plísně/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

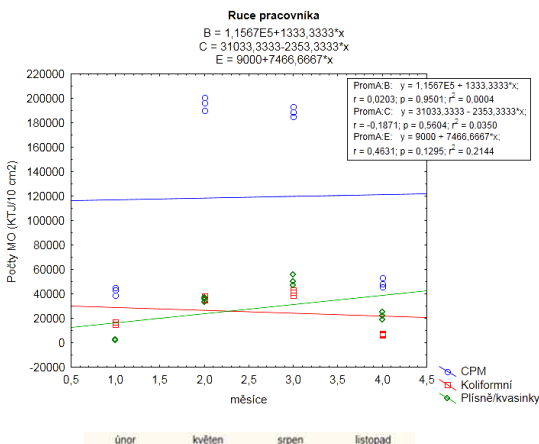
RODRÍGUEZ-CATURLA a kol. (2012) také uvádějí, že většina jimi provedených stěrů byla negativní na *Enterobacteriaceae*, přesto se v jejich výsledcích objevovaly nárůsty zástupců této čeledi, ale pouze v množství kolem 1 KTJ*cm⁻². Na dřevěném špaluku v námi sledované firmě, za celý rok, se nevyskytl ani jeden stěr, který by byl pozitivní na čeledi *Enterobacteriaceae*, což je velmi dobrý výsledek v porovnání s počty CPM, koliformních bakterií, plísní a kvasinky CHRISTISON a kol. (2008) uvádí nejvyšší počty koliformních bakterií na krájecích deskách ve výrobě lahůdek v množství 4_{log10} KTJ*cm⁻², což odpovídá zhruba 1*10⁴ KTJ*cm⁻², ale námi naměřené výsledky vykazovaly nejnižší hodnoty v 1. čtvrtletí (únor), a to 6*10² KTJ*cm⁻² a nejvyšší hodnoty ve 3. čtvrtletí, a to 4*10³ KTJ*cm⁻².

Následně byly prováděny i stěry z rukou pracovníka. Po výpočtu regresních přímk bylo zjištěno, že statisticky průkazná závislost mezi změnami počtu MO na ročním období neexistovala u žádného ze stanovovaných mikroorganismů (Obr. 2).

Daleko nižší výsledky udávají LUES a TONDER (2007), kteří sledovali počty CPM, koliformních bakterií a *Enterobacteriaceae* na rukou pracovníků v maloobchodní výrobě lahůdek. Počty CPM se u pracovníků pohybovaly v rozmezí od 5 KTJ*cm⁻² do 9*10¹ KTJ*cm⁻². Naše výsledky, získané kultivací stěru rukou pracovníka, vykazovaly počty CPM v rozmezí od 4*10³ KTJ*cm⁻² do 5*10³ KTJ*cm⁻² v chladnějších měsících a v letních měsících dosahovaly výsledky hodnot ještě vyšších, a to téměř 2*10⁴ KTJ*cm⁻².

MOORE a GRIFFITH (2002) uvádějí, že pro řadu povrchů je dosažitelné, při správně prováděné dezinfekci, udržet počty koliformních mikroorganismů pod $3 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. LUES a TONDER (2007) dále uvádějí počty koliformních bakterií na rukou pracovníků v rozmezí od $2 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ do $1 \cdot 10^1 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Opět jsou to hodnoty mnohonásobně nižší, než výsledky sčítů rukou pracovníka námi hodnocené firmy. Výsledky totiž vykazovaly hodnoty v průměrech od $4 \cdot 10^3 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ do $7 \cdot 10^2 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Obr. 2 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované na rukou zaměstnance



Pozn.:	Proml.B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Proml.C	Koliformní
	Proml.E.....	Plísně/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

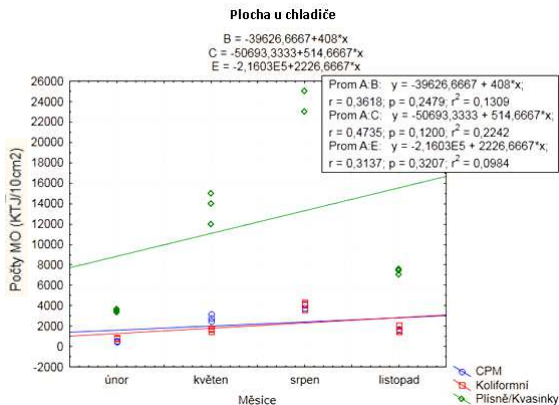
LUES a TONDER (2007) dále uvádějí přítomnost *Enterobacteriaceae* v hodnotách od $5 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ do $2 \cdot 10^1 \text{ KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Přes vysoké počty CPM, P/K a koliformních bakterií ve sčítu z ruky pracovníka námi sledované firmy se po kultivaci za celý rok nepodařilo nalézt ani jednu Petriho misku, na které by zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* narostli.

Vysoký nárůst koliformních bakterií ukazuje na, zřejmě, špatně prováděnou osobní hygienu u pracovníků. Velký vliv na takové hodnoty může mít i skutečnost, že pracovníci po omytí rukou nepoužili k osušení rukou jednorázový papírový ručník, ale látkový ručník, který představuje vhodné prostředí pro růst bakterií.

Dalším místem odběru sčítů byla pracovní plocha u šokového chlazení. Po výpočtu regresních přímků bylo zjištěno, že statisticky průkazná závislost mezi změnami počtu MO na ročním období neexistovala u žádného ze stanovovaných mikroorganismů (Obr. 3).

V prvním čtvrtletí kultivace CPM na pracovní ploše u chladíče vykazovala hodnoty v průměru $5 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². SNEED a kol. (2004) uvádějí ve své studii podobné počty CPM u pracovních ploch. Uvádějí v průměru kolem $1,51_{\log 10}$ KTJ*cm⁻², což odpovídá zhruba $3 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². V průběhu roku se ale naše výsledky CPM zvyšovaly. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána ve 3. čtvrtletí, kdy se počet CPM vyšplhal na hodnotu $4 \cdot 10^3$ KTJ*cm⁻². RODRÍGUEZ-CATURLA a kol. (2012) ve své studii, týkající se hodnocení hygienických postupů a mikrobiologické kvality zeleninových salátů připravených k přímé spotřebě uvádí, že ze sčítání provedených na pracovních stolech výsledky vykazují hodnoty mezi $4 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻² a $7 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻², což je zhruba podobné, jak ve své studii uvádějí SNEED a kol. (2004) a opět jsou to hodnoty výrazně nižší než námi získané. Přes vysoké počty narostlých MO jsme nedetekovali zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*. RODRÍGUEZ-CATURLA a kol. (2012) uvádí ve své práci přítomnost *Enterobacteriaceae* většinou kolem 1 KTJ*cm⁻². Výsledky počtů MO nepřekračovaly hodnoty 10^6 KTJ*cm⁻² a kdybychom prováděli stěry v době, kdy byla v platnosti vyhláška č. 137/2004 Sb. mohli bychom sanitaci na ploše u šokového chlazení označit za vyhovující.

Obr. 3 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované na ploše u chladíče

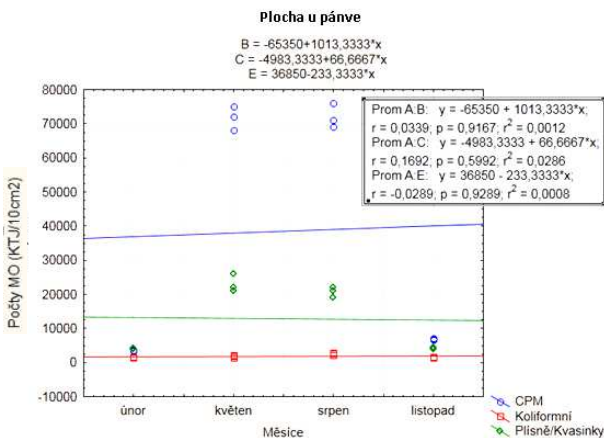


Pozn.:	Prom1.B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Prom1.C	Koliformní
	Prom1.E	Plísně/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

Místem provádění sčítání byla i plocha u varné pánve. I zde, po výpočtu regresních přímků bylo zjištěno, že statisticky průkazná závislost mezi změnami počtu MO v závislosti na ročních obdobích neexistovala u žádného ze stanovovaných mikroorganismů (Obr. 4).

Pracovní plocha u pánve těsně sousedí s pracovní plochou u šokového chladiče, tudíž existoval předpoklad podobných výsledků jako u plochy u šokového chladiče. Výsledky se mírně lišily ve všech stanovovaných skupinách MO, důvodem mohl být větší pohyb osob okolo plochy u varné pánve. Jedná se opět o pracovní plochu, a proto bylo použito srovnání výsledků s výše uvedenými SNEED a kol. (2004) a RODRÍGUEZ-CATURLA a kol. (2012). Ani zde však výsledky počtů kolonií stanovených skupin mikroorganismů nepřekračovaly limit 10^6 KTJ*cm⁻², který stanovovala vyhláška č. 137/2004 Sb., takže i zde se dá sanitace označit za vyhovující.

Obr. 4 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované na ploše u pánve



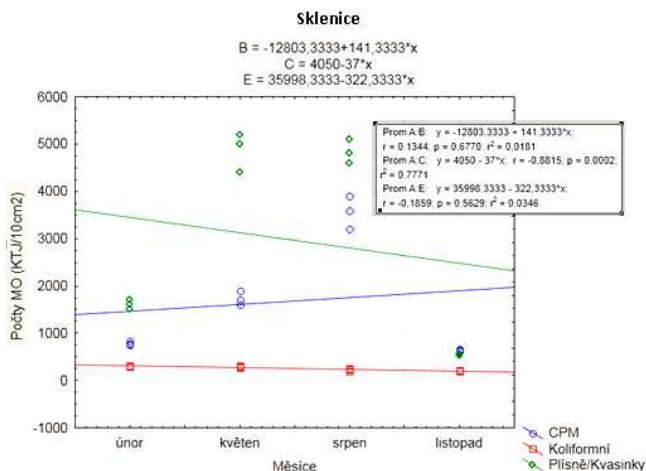
Pozn.:	Proml.B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Proml.C	Koliformní
	Proml.E	Plísně/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

Dalším místem odběru vzorků byla sklenice. Nárůst počtu CPM a P/K jsme sledovali hlavně v letních měsících, kdy počty dosahovaly hodnot v 2. čtvrtletí (květen) zhruba $2 \cdot 10^2$ KTJ*cm⁻² a ve 3. čtvrtletí (srpen) téměř $4 \cdot 10^2$ KTJ*cm⁻² pro CPM. U P/K průměrné počty pohybovaly kolem $5 \cdot 10^2$ KTJ*cm⁻² pro 2. čtvrtletí a $5 \cdot 10^2$ KTJ*cm⁻² pro 3. čtvrtletí. U koliformních bakterií se počty měnily v závislosti na ročním období v hodnotách $3 \cdot 10^1 - 2 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². Výpočet regresních přímků ukázal statisticky průkaznou závislost změn počtů MO v závislosti na ročních obdobích u koliformních bakterií (Obr. 5).

HRUBÝ (2007) se zabýval kontrolou kvality stravování v menze UTB ve Zlíně z hygienického hlediska, přičemž odebíral vzorky stěrů, které následně kultivoval, přičemž stanovoval podobně volené mikroorganismy a skupiny mikroorganismů jako v této práci.

Po vyhodnocení výsledků stěrů ze sklenice uvádí, že po kultivaci byly Petriho misky bez nárůstu kolonií. Námi naměřené počty nebyly vysoké, v případě, že bychom tyto stěry prováděli dříve a to v době, kdy byla v platnosti vyhláška č. 137/2004 Sb., která povolovala hodnoty 10^6 KTJ*cm⁻², výsledky by této legislativě vyhověly. Tento nárůst kolonií ze stěrů sklenice může být důsledkem nedokonalého omytí, ale také se může jednat o přenos MO z utěrky při osoušení sklenice.

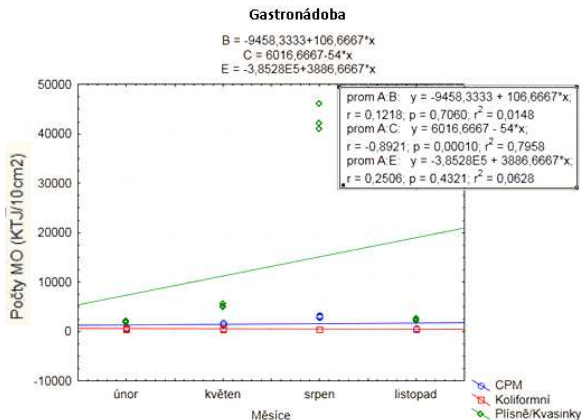
Obr. 5 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované u sklenice



Pozn.:	Prom1.B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Prom1.C	Koliformní
	Prom1.E.....	Plísně/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

Další vzorky se byly odebírány z gastrónadoby. I u gastrónadoby výpočet regresních průmek ukázal statisticky průkaznou závislost nárůstu počtů MO v závislosti na ročním období u koliformních bakterií (Obr. 6).

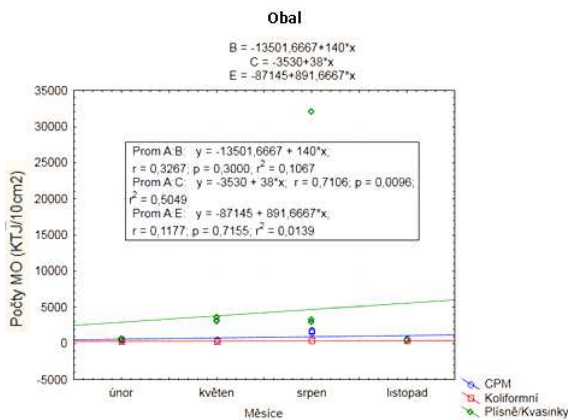
Obr. 6 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované u gastronádoby



- Pozn.: Proml.B Celkový počet mikroorganismů (CPM)
 Proml.C Koliformní
 Proml.E Plísně/kvasinky
 KTJ Kolonie tvořící jednotky

Posledním místem, které sloužilo k odběru vzorků, byla plastová miska, které pro potřeby firmy slouží jako obal pro produkty této firmy. Nakonec i u obalu výpočet regresních přímků prokázal statisticky průkaznou závislost změn počtů MO v závislosti na ročním období u koliformních bakterií (Obr. 7). Plastové obaly vykazovaly jedny z nejnižších hodnot počtů narostlých kolonií sledovaných skupin mikroorganismů. Pouze ve 3. čtvrtletí se počty P/K vyhouply k hodnotě $3 \cdot 10^3$ KTJ*cm⁻², ale pouze v jednom z trojice odebíraných stěrů. Plastové obaly bývají před plněním omyty, čímž se docílí jejich minimální mikrobiální kontaminace. Důvodem nárůstu P/K bylo zřejmě použití nevysušených obalů k plnění potravinou, vytření obalu po mytí nějakým hadrem nebo může být chyba na straně dodavatele popř. výrobce.

Obr. 7 Statistické vyjádření závislosti nárůstu či poklesu CPM, počtu koliformních bakterií a plísní a kvasinek v závislosti na ročním období sledované u obalu



Pozn.:	Proml.B	Celkový počet mikroorganismů (CPM)
	Proml.C	Koliformní
	Proml.E.....	Plísňe/kvasinky
	KTJ	Kolonie tvořící jednotky

Jelikož v celém průběhu sledování ani u jednoho ze vzorků nenabývaly kultivace *Enterobacteriaceae* a rodu *Enterococcus* žádných hodnot, nejsou tato stanovení v následujících výsledcích uváděna. Nulové hodnoty byly pro tato stanovení velmi dobrým zjištěním, což ukazovalo také na pozitivní účinky a kvalitu prováděné sanitační v podniku.

ZÁVĚR

Hygiena v potravinářském podniku závisí na mnoha faktorech, mezi které patří např. správná volba technologického postupu výroby, správně volené sanitační postupy a prostředky, kvalita zařízení provozovny a její umístění a v neposlední řadě také správné hygienické návyky zaměstnanců.

Při vyhodnocování výsledků bylo zjištěno, že ve většině případů se počty MO měnily v závislosti na ročním období. Nejmenší počty vycházely téměř pravidelně u 1. čtvrtletí, protože zde byly zastoupeny zimní měsíce, ve kterých je díky nízkým teplotám inhibován růst bakterií. Naopak ve 3. čtvrtletí, tedy v letních měsících počty MO prudce vzrůstaly. Důvodem jsou vysoké teploty, které umožňují rychlý vývoj zárodků. V těchto měsících také vlivem sucha vzrůstá prašnost, takže zabránit kontaminaci z vnějšího prostředí je možné jen se zavřenými okny a dveřmi. Ve 4. čtvrtletí vzrůstaly většinou počty plísní a kvasinek, na čemž se podepsalo hlavně vlhko způsobené větším výskytem srážek v tomto čtvrtletí.

V průběhu celého měření byl naměřen nejvyšší počet CPM u řeznického přípravného špalku ve 3. čtvrtletí, kdy hodnota CPM dosahovala $3 \cdot 10^4$ KTJ*cm⁻², nejnižší hodnota CPM byla naměřena na pracovní ploše u šokového chladiče v 1. čtvrtletí, a to $5 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². Nejvíce koliformních bakterií bylo zjištěno ve 3. čtvrtletí na rukách pracovníka. Hodnota počtu byla $4 \cdot 10^3$ KTJ*cm⁻², nejnižší hodnota byla stanovena ve 4. čtvrtletí u stěru ze sklenice, a to $2 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². U kvasinek a plísní nejnižší hodnotu vykazovalo 4. čtvrtletí u stěru z obalu, kdy hodnota počtu kvasinek a plísní byla $4 \cdot 10^1$ KTJ*cm⁻². Naopak nejvyšší hodnotu vykazoval řeznický přípravný špalek ve 3. čtvrtletí, a to hodnotou téměř $7 \cdot 10^3$ KTJ*cm⁻². V celém průběhu provádění kontroly sanitace nebyl detekován na žádném z prováděných stěrů růst rodu *Enterococcus* ssp. ani čeledi *Enterobacteriaceae*.

Žádné normy ani právní předpisy stanovující limity MO v prostředí provozu a na používaném zařízení a nástrojích v současné době neexistují. Záleží na samotném výrobcí, na jaké hodnoty mikroorganismů má nastavený svůj systém HACCP. Právní předpisy EU se zabývají především kvalitativním stanovením MO přímo v potravinách. Kvantitativní ani kvalitativní stanovení MO v prostředí provozu v současné době žádná legislativa neřeší. Výrobce tedy nemá povinnost nějak přehnaně dezinfikovat prostory výroby, ani to z hygienického hlediska není dobré, protože v důsledku přehnané hygieny vzniká velký počet alergií a různých onemocnění. Sanitaci v podniku je samozřejmě potřeba provádět alespoň na takové úrovni jako do teď.

Je třeba si uvědomit, že potravinářský provoz není sterilní místo, takže vždy by se mělo počítat s výskytem mikroorganismů. S přihlédnutím k faktu, že námi sledovaný podnik doposud neměl žádný problém s přemnožením nebo výskytem mikroorganismů patogenních pro člověka, shledávám kvalitu sanitace v tomto podniku na dobré úrovni.

Pro ještě větší efektivnost sanitace a hygieny doporučuji obměňování mycích a čistících prostředků, aby se zabránilo případné rezistenci MO na účinné látky, které jsou v používaných čistících a dezinfekčních prostředcích obsaženy.

LITERATURA

- HRUBÝ R., 2007: *Sledování kvality stravování v Menze UTB ve Zlíně z hygienického hlediska*. Diplomová práce, Zlín, Univerzita Tomáše Bati, in MS, 97 s.
- CHRISTISON C. A., LINDSAY D., von HOLY A., 2008: *Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa*, Food Control, Volume 19, Issue 7, pages 727–733.
- LUES J. F. R., Van TONDER I., 2007: *The occurrence of indicator bacteria hands and aprons of foodhandlers in the delicatessen section of a retail group*, Food Control, Volume 18, Issue 4, Pages 326–332.

MOORE G., GRIFFITH C., 2002: *A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces*, Food Microbiology, Volume 19, Issue 1, Pages 65–73.

RODRÍGUEZ-CATURLA Y, M. a kol., 2012: *Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens*, Journal of the science of food and Agriculture, first online published article, ISSN: 1097-0010.

SNEED J. a kol., 2004: *Microbiological evaluation of food service contact surfaces in Iowa assisted-living facilities*, Journal of the American Dietetic Association, Volume 104, Issue 11, Pages 1722–1724.

EVALUATION OF PROTEIN COMPLEX QUALITY ON SELECTED VARIETIES OF WHEAT

HODNOCENÍ KVALITY BÍLKOVINNÉHO KOMPLEXU VYBRANÝCH ODRŮD PŠENICE PRO PEKÁRENSKÉ A PEČIVÁRENSKÉ VYUŽITÍ

Homola L.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

Email: ludhom@gmail.com

ABSTRACT

The basis for this project was the set of selected samples of winter wheat of various technological quality grown in two different production conditions. The observed effects in this group of samples were year, location and variety groups by baking quality (E, A, B, C) on the parameters of the grain and its protein profile. This evaluation was conducted in three fractions grinding grain - flour, semolina and bran.

The result was a summary of a protein profile of each fraction grist grain of winter wheat with different technological quality.

The effect of year and location on the representation of individual protein fractions was confirmed. The significant influence of qualitative groups was not confirmed, which was probably influenced by the extremely high yields and minimal differences between qualitatively different groups of wheat. A lower dose of N had a negative effect because of high yield. Different composition of the protein complex in comparison to other bran fractions (flour, semolina) was confirmed.

Key words: wheat, quality, protein complex,

Acknowledgments: This project was carried out with the support of the Internal Grant Agency of Mendel University in Brno (IP 16/2011).

ÚVOD

Základem pro řešení tohoto projektu byl soubor vybraných vzorků pšenice ozimé o různé technologické kvalitě pěstované ve dvou odlišných pěstitelských podmínkách. U tohoto souboru byly sledovány vlivy ročníku, lokality a skupin odrůd dle pekařské kvality (E,A,B,C) na parametry zrna a jeho bílkovinný profil. Dále byly získány vzorky zrna pšenice, hnojené během vegetace diferencovaně dusíkem a sírou. U těchto vzorků byl rovněž stanoven bílkovinný profil a provedena detailní frakcionace gliadinové frakce na jednotlivé subfrakce (α , β , γ , ω). Toto hodnocení bylo provedeno ve třech frakcích mletí zrna – mouka, krupice a otruby.

Výsledkem je souhrn údajů o bílkovinném profilu jednotlivých frakcí meliva zrna pšenice ozimé s odlišnou technologickou kvalitou. Dále byly získány informace o vlivu aplikace síry na změny bílkovinného složení zrna pšenice.

V rámci tohoto projektu se podařilo při analýze vzorků pšenice najít a aplikovat metodu vhodnou pro měření bílkovinných frakcí zrna pšenice. Metoda, která byla použita se ukázala být vhodnou také pro stanovení detailní frakcionace gliadinového komplexu, tato metoda, především část týkající se vyhodnocení naměřených dat se ještě dopracovává. Byl potvrzen vliv ročníku a lokality na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí, nepotvrdil se výraznější vliv kvalitativní skupiny, což bylo zřejmě ovlivněno extrémně vysokými výnosy a minimálními výnosovými rozdíly mezi jednotlivými kvalitativně odlišnými skupinami pšenic. Negativně se zřejmě odrazila i nízká dávka N neodpovídající dosahovaným výnosům zrna. Potvrdilo se rozdílné složení bílkovinného komplexu v otrubách oproti ostatním frakcím (mouka, krupice). Byl prokázán vliv aplikace síry na bílkovinný komplex pšenice.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky pšenice pochází z odrůdových pokusů založených na lokalitě ŠZP Žabčice ze sklizně roku 2009 a 2010. Pro vlastní analýzu bylo vybráno 16 odrůd pšenice. A to vždy 4 odrůdy z každé kvalitativní skupiny - E, A, B, C. Každá z odrůd pak byla pěstována na dvou vláhově odlišných stanovištích. Stanoviště Obora se vyznačovalo dobrými vláhovými podmínkami a stanoviště Prásky pak je považováno za stanoviště velmi suché. Pěstitelská technologie na obou stanovištích byla shodná, dávka dusíku za vegetaci představovala 150 kg.N.ha⁻¹. Porosty byly vždy sklizeny v plné zralosti.

Maloparcelní pokus, ve kterém byl hodnocen vliv aplikované S a N na bílkovinný profil zrna pšenice odrůdy Mulan (A), probíhal v roce 2010/2011 na lokalitě ve Velké Bystřici u Olomouce. Pšenice byla zasetá 7.10.2010 po předplodině ozimé řepce, výsevек činil 4MKS. Schéma pokusu je uvedeno níže (tab.1):

Var.	Schéma pokusu	Termín aplikace a dávka (kgN + 1 Thiotrac)				Celkem kg/ha		
		Regenerace1B	1.prod	2.prod	kvalita	N	S-Sulfan	S-Thiotrac
1	LAV	40	30	30	20	174		
2	YARA Sulfan	40	30	30	20	174	30	
3	LAV+ Thiotrac	40	30/5 1	30	20	174		1,5
4	YARA Sulfan+ Thiotrac	40	30/5 1	30	20	174	30	1,5
5	LAV+ Thiotrac	40	30	30	20/5 1	174		1,5
6	YARA Sulfan+ Thiotrac	40	30	30	20/5 1	174	30	1,5

Poznámka: Porost byl plošně vyhnojen dusíkem v rámci 1A regeneračního hnojení dávkou 54kgN/LAV/ha (25.2.2011), tato dávka není v tabulce uvedena, celkový součet N a S (viz. poslední sloupec tabulky) s ní již ale počítá. Každá varianta měla 4 opakování

U vzorků zrna z lokality Žabčice i Velká Bystřice byly stanoveny parametry mlynářské a pekařské jakosti. Pro stanovení bílkovinného profilu bylo zrna pomlety na laboratorním mlýnu fy Chopin na frakci mouka, krupice a otruby. U těchto frakcí meliva byl následně stanoven jeho bílkovinný profil i zastoupení jednotlivých subtraktů gliadinů.

Příprava vzorků pšenice pro HPLC

Získané vzorky pšenice o známé jakosti byly na laboratorním mlýnku SHOPIN rozemlety a rozděleny na tři frakce: mouku, krupici a otruby. Z každého vzorku se následně odebralo množství 200 mg, které se rozpustilo ve 3 ml připraveného extrakčního činidla (H₂O + Acetonitril v poměru 3:1). Vzorek se následně třepal na vortexové třepače po dobu 5 minut. Poté se odstředily při 10 000 ot./min. po dobu 10 minut. Takto odstředěný vzorek se pipetoval do označené vialky. Všechny vzorky byly připraveny najednou a změřeny v průběhu následujících 72 hodin. Takto se připravovaly vzorky pro stanovení komplexního přehledu frakcí bílkovin v zrna pšenice.

Příprava vzorků pro detailní stanovení gliadinových frakcí probíhala obdobně, s výjimkou použití vhodného extrakčního činidla z důvodu eliminace ostatních frakcí bílkovin. Tímto rozpouštědlem byl 50% n-propanol.

Podmínky měření komplexního zastoupení bílkovinných frakcí

Izokratický režim, průtok 0,4ml/min., detekce UV při 214 nm.

Extrakční činidlo : H₂O : ACN (3:1)

Mobilní fáze : dvousložková - ACN + 0,1% TFA

- H₂O + 5 % ACN + 0,1 % TFA,

Použitý gradient : 20:80-45:55-20:80

Podmínky měření gliadinových frakcí

Izokratický režim, průtok 0,4ml/min., detekce UV při 210 nm.

Extrakční činidlo : 50% n-propanol

Mobilní fáze : dvousložková - ACN + 0,1% TFA

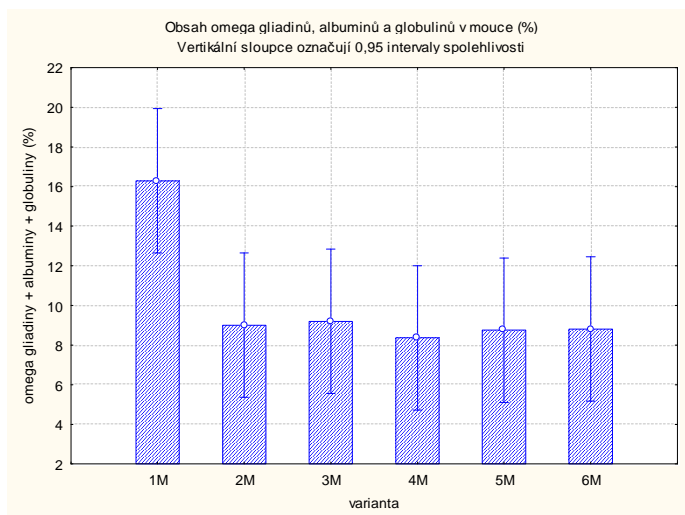
- H₂O + 5 % ACN + 0,1 % TFA,

Použitý gradient : 25:75-47:53-25:75

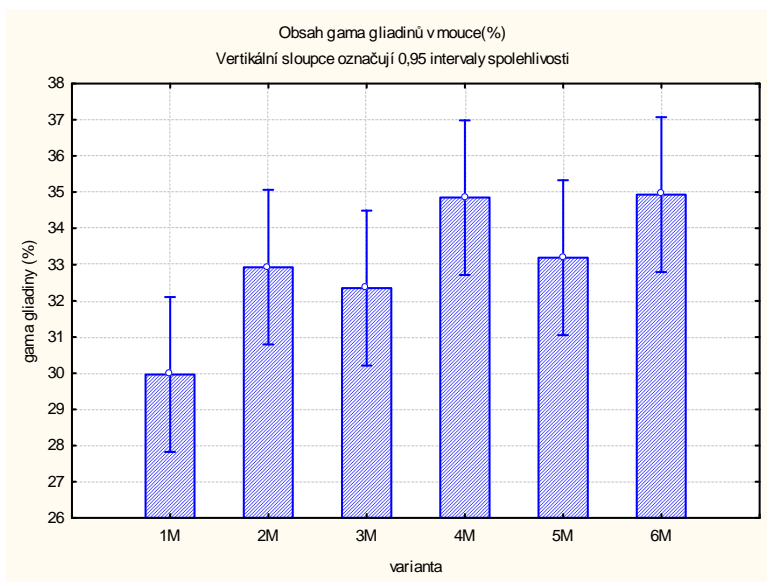
VÝSLEDKY A DISKUZE**Maloparcelní pokus – hodnocení hnojení N a S během vegetace (lokality Velká Bystřice)**

V grafech 1-2 je uvedeno zastoupení bílkovinných frakcí u jednotlivých variant pokusu. Graf 1 ukazuje, že hodnota skupiny omega gliadinů, albuminů a globulinů byla u kontrolní varianty č.1 téměř dvakrát vyšší než u ostatních, sírou hnojených variant. Tato první skupina bílkovinných frakcí je z technologického hlediska nejméně významná a z tohoto pohledu můžeme usuzovat, že přihnojení sírou v průběhu vegetace je pro technologickou jakost výsledného produktu pozitivní. Naopak zbylé 4 bílkovinné frakce jsou u většiny „sirných“ variant výrazněji zastoupeny, což lze pozorovat v grafu 2. Za cenné můžeme považovat zvýšené zastoupení vysokomolekulárních podjednotek gluteninů a γ -gliadinů.

Graf 1



Graf 2

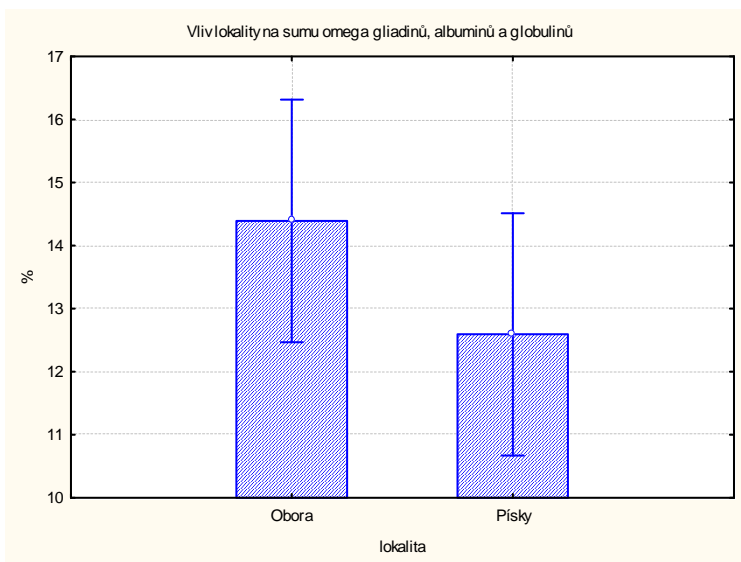


Maloparcelní pokus – bílkovinný komplex (lokality Žabčice-Obora, Písky)

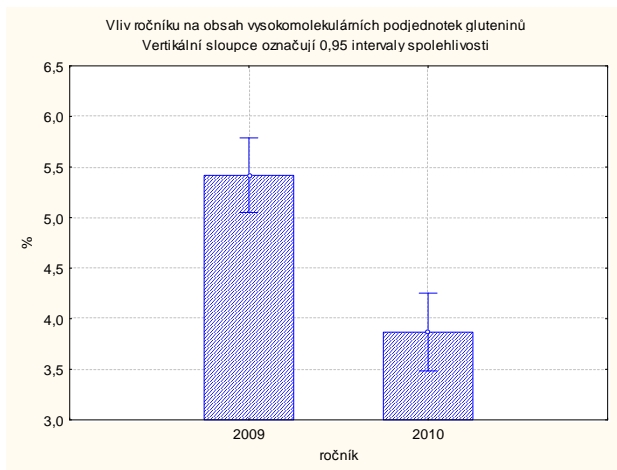
Jak již bylo uvedeno výše, byly zde hodnoceny vzorky ze sklizně 2009 a 2010. Celkem se jednalo o 186 jednotlivých dílčích stanovení. U těchto vzorků bylo provedeno hodnocení vlivu lokality, ročníku a technologické skupiny pšenice na bílkovinný profil. Každá z lokalit (Obora, Písky) má jinou charakteristiku půdy, lokalita Písky je výrazně sušší než lokalita Obora. V souvislosti s tím je patrný nižší obsah sumy omega gliadinů, albuminů a globulinů v lokalitě Písky než v lokalitě Obora (graf 3). Prakticky bez vlivu byl ročník na sumu gliadinů, albuminů a globulinů a na frakci gama gliadinů. Naopak tomu bylo v případě vysokomolekulárních podjednotek gluteninů, kde byl pozorován dokonce průkazný rozdíl mezi oběma ročníky (graf 4). U zbývajících frakcí, nízkomolekulárních podjednotek gliadinů a nízkomolekulárních podjednotek gluteninů byl jistý rozdíl pozorován, nebyl však již průkazný. Obecně můžeme charakterizovat ročník 2010 jako méně příznivý z hlediska technologické kvality bílkovinného komplexu. Klesal obsah vysokomolekulárních podjednotek gluteninů na úkor nízkomolekulárních podjednotek gliadinů a gluteninů. Vliv kvalitativní skupiny (E,A,B,C) nebyl prokázán. Zde se zřejmě negativně promítalo nedostatečné hnojení dusíkem, kdy dávka N byla 150kg/ha ale čerpání bylo o cca 100kg/ha vyšší, a příčinu musíme rovněž vidět v průběhu povětrnosti a vlivu lokality, kdy v roce 2009 na stanovišti Písky byly v důsledku sucha velmi nízké výnosy, což se do bílkovinného profilu výrazným způsobem promítlo. Všechny tyto vlivy způsobily, že se zřejmě vliv genotypu nemohl projevit a zkrusily i profil méně kvalitních tj. chlebových (B) a keksových (C) odrůd pšenic, které

vykazovaly lepší vlastnosti, než je obvyklé. Grafu 5 vyjadřuje interakci vlivů lokality a kvalitativní skupiny na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí. Jedná se tedy o dvoufaktorovou analýzu variance, kde můžeme současně sledovat, jak se projeví genotyp odrůdy v interakci se stanovištními podmínkami dané lokality. Na sušší lokalitě Písky se snižoval obsah nutričně hodnotných ale technologicky nevýznamných albuminů a globulinů včetně omega gliadinů. U vysokomolekulárních podjednotek gluteninů byly rozdíly mezi skupinami nepatrné na obou lokalitách, průkazně se zde ale projevila lokalita, kdy na stanovišti Písky byla tato bílkovinná frakce velmi nízká

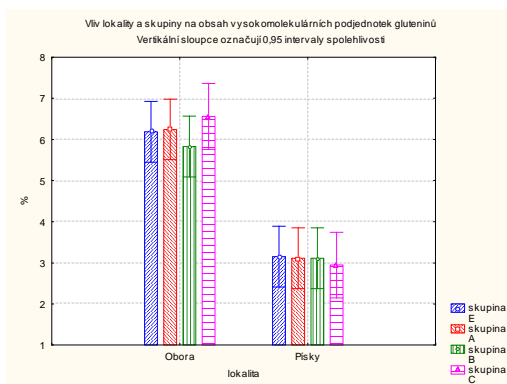
Graf 3



Graf 4



Graf 5



ZÁVĚR

V rámci tohoto projektu se podařilo při analýze vzorků pšenice najít a aplikovat metodu vhodnou pro měření bílkovinných frakcí zrna pšenice. Metoda, která byla použita se ukázala být vhodnou také pro stanovení detailní frakcionace gliadinového komplexu. Byl potvrzen vliv ročníku a lokality na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí, nepotvrdil se výraznější vliv kvalitativní skupiny, což bylo zřejmě ovlivněno extrémně vysokými výnosy a minimálními výnosovými rozdíly mezi jednotlivými kvalitativně odlišnými skupinami pšenic. Negativně se zřejmě odrazilo i nízká dávka N neodpovídající dosahovaným výnosům zrna. Potvrdilo se rozdílné složení bílkovinného

komplexu v otrubách oproti ostatním frakcím (mouka, krupice). Byl prokázán vliv aplikace síry na bílkovinný komplex pšenice.

LITERATURA

HŘIVNA, L., RICHTER, R., RYANT, P. (1998): *The effect of sulphur on nitrogen utilisation and food quality of winter wheat*. In: Short Communications (Volume I), Fifth Congress, European Society for Agronomy, Nitra, 1998. s. 235 - 236

MENGEL K., 1991: *Ernahrung und Stoffwechsel der Pflanze*. Jena: Gustav Fisher Verlag, 466 s.

RICHTER R., HŘIVNA L., RYANT, P. ŠOTNÍKOVÁ, V. (2001): *Vliv síry na výnos a kvalitu zemědělských plodin*. In.: Sborník z konference „Racionální použití hnojiv“, CZU Praha. s. 62 – 69

WIESER, H., GUTSER, R. (2004): Influence of sulphur fertilisation on quantities and proportions of gluten protein types in wheat flour. *Journal of Cereal Science* 40 (3). pp. 239-244

ZELENÝ F. - ZELENÁ E. - ČERMÁK M., 1996: Zlepšení využití řízenou aplikací síry a mikroelementů. *Výroční zpráva, Praha, VÚVR*, 11s.

ZIMOLKA, J. a kol., 2005: *Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna*. Profi Press s r.o. Praha. 180 s.

THE EFFECT OF PROBIOTICS CULTURES ON *ESCHERICHIA COLI* AND *CLOSTRIDIUM* COUNTS IN INTESTINAL TRACT OF PIGLETS

VLIV PROBIOTICKÝCH KULTUR NA POČTY BAKTERIÍ *ESCHERICHIA COLI* A *CLOSTRIDIUM* VE STŘEVNÍM TRAKTU SELAT

Kolářová M., Sládková P., Zorníková G.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkolaro1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficiency of probiotics cultures in intestinal tract of piglets. Three groups of piglets were fed with and without probiotic (two groups with and one control group without). For this experiment was used 10 healthy piglets in each group. The first group was fed probiotic *Enterococcus faecium* DSM 7134 and the second group EM-EKO ProBio original with mixture probiotics cultures. All groups were fed identically for first three weeks of rearing. For two experimental groups were given probiotic since 4 weeks. Fecal samples were collected at days: 0 (without consumption), 15 (during consumption) and 30 (end consumption). Fecal samples were collected in sterile sample containers.

From this experiment was evident in both experimental groups (P1, P2) consuming probiotics to reduce the total number of potential pathogens species *Escherichia coli* and genus *Clostridium*. This effect was more pronounced the experimental group P2, particularly in the case of clostridia. The results of the experiment suggest the positive effect of probiotic consumption in the digestive tract of pigs, thereby to reduce of risk for example diarrheal diseases.

Key words: microbial community, probiotics, intestinal microflora

Acknowledgments: This research was supported by grant IGA MENDELU grant no. TP5/2012.

ÚVOD

Střevní mikroflóra prasat tvoří komplex více než 500 různých bakteriálních druhů (Gaskins, Croix *et al.*, 2008). Jednotlivé druhy střevní mikroflóry mají stimulační, nebo naopak potlačující vliv na ostatní druhy v závislosti na věku zvířete, skladbě stravy a míře stresu, kterému jsou hospodářská zvířata často vystavována (Gaggia, Mattarelli, Biavati, 2010). Probiotika podávaná v určených krmných dávkách jsou schopna kolonizovat zvířecí trávicí trakt a zachovávat nebo zvyšovat přirozenou střevní mikroflóru a bránit kolonizaci patogenních mikroorganismů (Maré, 2009; Kaboosi, 2011). Hlavními rody bakterií v trávicího traktu prasete jsou *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* a druh *Escherichia coli* (Metzler, Mosenthin, 2008).

Účinek probiotik je vyšší u mladých zvířat, která ještě nemají zcela vyvinutý stabilní systém mikroflóry, a u zvířat po léčbě antibiotiky, při níž dojde k potlačení střevní mikroflóry (Maré, 2009). Kultury prospěšných mikroorganismů, které zvíře přijme spolu s krmivem, se množí a kolonizují střevo zvířete. Probiotické mikroorganismy nekolonizují střevo natrvalo, ale jen dočasně, proto pro udržení jejich stabilní hladiny by měly být součástí každé krmné dávky (Václavíková, Lustyková, 2011). Probiotika jsou živé mikroorganismy, které se po požití musejí dostat do střeva, aniž by došlo k omezení jejich životaschopnosti (Santos *et al.*, 2010).

Komplexně vzato, probiotika by měla mít svými obecnými vlastnostmi a schopnostmi příznivý vliv například na léčbu střevních zánětů a velké množství studií (Frič, 2005; Liang, 2007) tuto jejich schopnost potvrdilo. Na druhé straně existují i studie (Lata *et al.*, 2007; Zbořil *et al.*, 2005), které jejich jednoznačné příznivé působení neprokázaly. Rozdíly výsledků mohly být způsobeny v důsledku použitím různých probiotických bakterií, zkoumaných skupin zvířat či jiných faktorů. Všichni autoři a odborníci se však shodují v jednom bodě, tato oblast působení je, i když se jí v současnosti věnuje více pozornosti, stále málo probádaná a definitivní výsledky přinesou až další studie a výzkumy.

Předmětem této práce se tedy stalo srovnání účinku dvou různých probiotických krmných směsí na kvantitativní zastoupení vybraných druhů zvířecí střevní mikroflóry, obzvláště druhu *Escherichia coli*.

MATERIÁL A METODIKA

Výzkum byl zaměřen na sledování vlivu probiotických kultur na druh *Escherichia coli* (*E. coli*) vyzisolované ze střevním traktu odstavených selat.

K pokusu byla vybrána selata (prasničky) plemene České bílé ušlechtilé v průměrné hmotnosti při naskladnění 25 kg. Selata byla rozdělena do tří skupin po 10 kusech (dvě pokusné skupiny a jedna skupina kontrolní, kde nebylo použito žádné probiotikum). První tři týdny odchovu byly všechny skupiny krmeny identicky. Od 4 týdne dostávaly dvě pokusné skupiny probiotické směsi po dobu 30-ti dní. První pokusná skupina byla krmena minerálním krmivem, které obsahovalo probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB10415) a druhá pokusná skupina dostávala krmivo EM-EKO ProBio original se směsí probiotických kultur. Obsah krmné dávky byl u obou pokusných skupin stejný - 1×10^9 KBE/g. V průběhu pokusu byl skupinám 3x odebrán vzorek stolice, a to 0. den (na konci 3. týdne), 15. den (během konzumace) a 30. den (konec konzumace). Exkrementy byly odebírány do sterilních vzorkovnic.

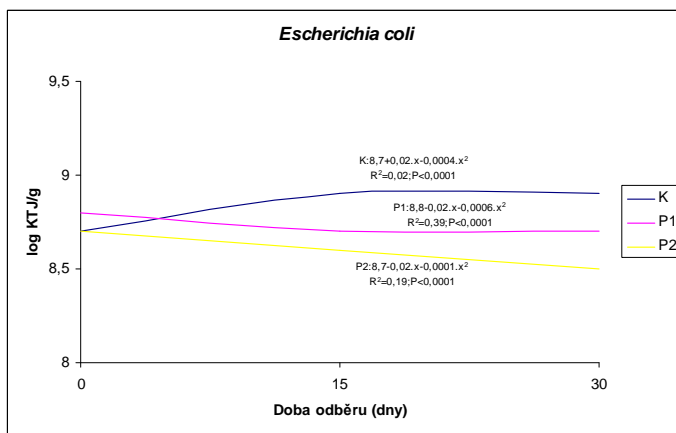
Při rozborech bylo použito pomnožování médium Nutrient Broth Peptone (Himedia, Itálie). Kultivace probíhala plotnovou metodou pomocí roztěru, při níž byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů: bakterie mléčného kvašení (BMK) na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h anaerobně. *E. coli* na ENDO agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h aerobně. Rod *Enterococcus faecium* na médiu HICrome *E. faecium* (Himedia, Itálie) při teplotě 37 °C po dobu 48 h aerobně, druh *Lactobacillus acidophilus* na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) s přísadkou suplementu Clindamycin hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C za 72 h anaerobně, druh *Lactobacillus rhamnosus* na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) s přísadkou suplementu vancomycin (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C za 72 h anaerobně, druh *Lactobacillus casei* na MRS-IM-sorbitol agaru při 37 °C za 72 h anaerobně. Rod *Bifidobacterium* na BSM agaru (Fluka, Švýcarsko) s přísadkou BSM suplementu (Fluka, Švýcarsko) při teplotě 42 °C po dobu 125 h anaerobně, rod *Clostridium* na Bouillon RCM de Hirsch (Biokar Diagnostics, Francie) s přísadkou Bacteriological agar Type E (Biokar Diagnostics, Francie). Po ukončení kultivace byly na jednotlivých Petriho miskách odečteny narostlé kolonie a výsledek vyjádřen v KTJ/g. Vybrané kolonie byly dále vyzisolovány a purifikovány na selektivních živných půdách.

Mikrobiologické ukazatele byly měřeny ve dvou opakováních u každého odebraného vzorku. Průměry z těchto dvou měření byly použity ve statistickém vyhodnocení. Program Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) byl použit pro výpočet základních statistických charakteristik a regresí (testování kvadratické funkce), rozdílů mezi skupinami vzorků v počtu mikrobiálních kolonií (jednostupňové třídění analýzy rozptylu, včetně post hoc Duncanova testu).

VÝSLEDKY A DISKUZE

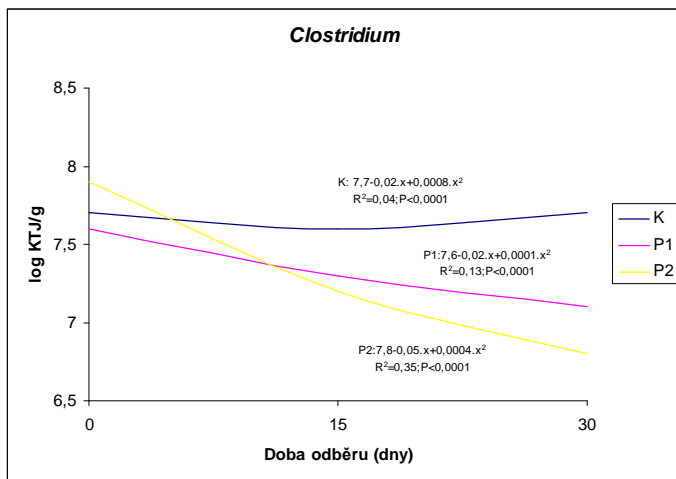
Výsledky stanovení počtů závislosti jednotlivých sledovaných mikroorganismů přítomných ve stolici prasniček kontrolní skupiny (K) a dvou pokusných skupin (P1 a P2) jsou znázorněny na Obr. 1 až 4. Skupiny P1 a P2 byly krmeny odlišnými probiotickými krmivky. Na Obr. 5 jsou zvláště zobrazeny růstové křivky u vybraných bakterií mléčného kvašení u skupiny P2.

Obr. 1 Celkový počet druhu *Escherichia coli* ve vzorcích



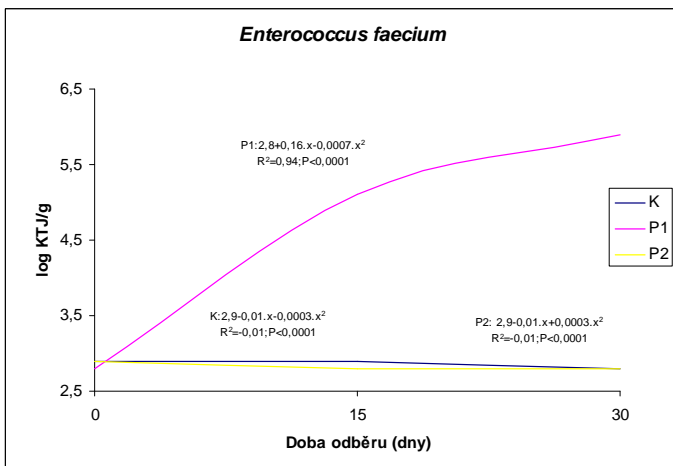
Na Obr.1 jsou znázorněny logaritmické hodnoty z celkového počtu druhu *Escherichia coli* ve vzorcích. Počáteční hodnoty skupin K a P2 začínaly ve stejných počtech těchto bakterií (8,7 log KTJ/g). U skupiny P1 byl zaznamenán v 0. dni nepatrně vyšší počet těchto bakterií (rozdíl pouze o 0,1 log KTJ/g). U obou pokusných skupin (P1,P2) nedošlo k výraznému snížení druhu *E. coli*. Probiotikum *E. faecium* SF 68 používané u skupiny P1 mělo vliv na snížení počtu bakterií pouze do 15.dne, poté zůstala udržena stejná hladina až do konce celého pokusu. Kdežto u skupiny P2 s použitím probiotické směsi tento mírný pokles přetrvával do 30. dne. V kontrolní skupině (K) došlo od 0. do 15. dne k navýšení počtu těchto bakterií o 0,5 log KTJ/g, od 15. dne docházelo k nepatrnému poklesu. Smith *et al.* (2011) zaznamenali již v minulosti účinek probiotické snížení na počet bakterie *E. coli*, avšak nikoli ve střevním traktu prasat, ale s použitím biofilmu in vitro.

Probiotika zamezují přítomnosti a růstu potencionálních patogenů, což se potvrdilo i v naší studii. Mezi možné patogeny řadíme například druhy *Escherichia coli*, rod *Clostridium* a další. Tyto bakterie mohou při vyšším výskytu způsobovat infekce, průjemová onemocnění a jiné zdravotní potíže (Rosenbaum, 2006). V našem pokusu (Obr. 1 a 2) se oproti skupině P1 projevil vyšší inhibiční účinek na tyto bakterie u pokusné skupiny P2, kde byla použita směsná probiotická kultura. Stejný vliv probiotických směsí byl zaznamenán ve studii Gagnona *et al.* (2004).

Obr. 2 Celkový počet rodu *Clostridium* ve vzorcích

Obr. 2 znázorňuje průměr absolutních hodnot vyjádřených v log KTJ/g počtu bakterií *Clostridium* ve střevním traktu prasniček v průběhu celého pokusu. Z těchto hodnot je patrné, že u obou pokusných skupin, tedy P1 (použité probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68) a P2 (použita probiocká směs EM-EKO ProBio originál), došlo ke snížení počtu klostridií od počátečního dne pokusu (0. den) až po jeho ukončení (30.den). Výraznější snížení počtu bakterií však bylo zjištěno u skupiny P2, oproti skupině P1. Tento pokles činil rozdíl jednoho logaritmického řádu. U kontrolní skupiny byl zaznamenán mírný pokles klostridií od 0. do 15. dne, avšak od 15. dne začaly počty opět mírně vzrůstat.

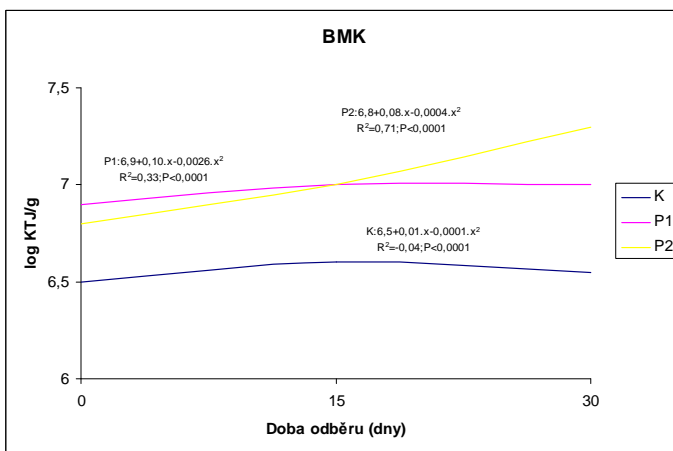
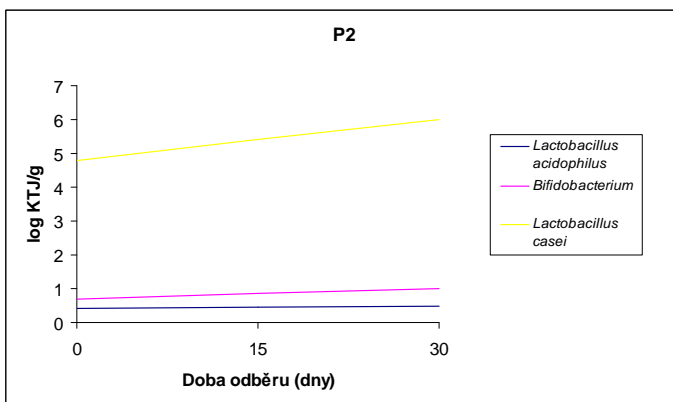
V našem experimentu (Obr. 2) byl zaznamenán inhibiční vliv probiotik na bakterii *Clostridium*, stejný účinek potvrdil i Palaria (2011), avšak v lidském trávicím traktu. Tento inhibiční účinek je pozitivní, jelikož zvýšením počtu klostridií mohou nastat poruchy trávení (průjmy) a další střevní problémy (Berild *et al.*, 2003; Ben-Horin *et al.*, 2009).

Obr. 3 Celkový počet druhu *Enterococcus faecium* ve vzorcích

Na Obr. 3 je patrné, že u pokusné skupiny P1, která byla krmena pouze probiotikem *Enterococcus faecium* SF 68 došlo k výraznému nárůstu tohoto druhu bakterií již od 0. do 15. dne (o 2,1 log KTJ/g) a toto zvýšení pokračovalo až do 30. dne, ale jen o 1 log KTJ/g. U skupin K a P2 zůstávaly počty bakterie *Enterococcus faecium* po celou dobu pokusu přibližně ve stejných hodnotách (2,7 log KTJ/g).

Pokusná skupina P1 byla krmena probiotikem *Enterococcus faecium*, což se také pozitivně projevilo jeho zvýšením v průběhu celého pokusu. Zvýšení počtu těchto bakterií bylo také zaznamenáno ve studiích (Taras *et al.*, 2007; Apás *et al.*, 2010), kde byl pozorován pozitivní vliv na různé hostitele (myši, kozy). Nicméně studie účinku probiotika *E. faecium* na patogenní bakterie (*E. coli*, *Clostridium*) na hospodářských zvířatech jsou velmi vzácné (Szabó *et al.*, 2009). U pokusné skupiny P2, kde byla podávána probiotická směs nebyl nárůst pozorován z důvodu použití jiných bakteriálních druhů, než tomu bylo například ve studii Apás *et al.* (2010), kde probiotická směs zaznamenala zvýšení tohoto druhu ve střevním traktu koz.

Obr. 4 Celkový počet bakterií mléčného kvašení ve vzorcích

Obr. 5 Celkový počet *L. acidophilus* a *L. casei* a bifidobakterií ve vzorcích u pokusné skupiny P2

V počtech bakterií mléčného kvašení (Obr. 4) byl patrný rozdíl mezi skupinami K, P1 a skupinou P2, kde byl zaznamenán nárůst o 1 logaritmičkový řád od počátečního až do 30. dne konzumace probiotického krmiva. Autoři Klein *et al.* (2008) zjistili ve stolici probandů průkazně vyšší množství bakterií mléčného kvašení (Obr. 4), zejména druhu *Bifidobacterium lactis* a *L. acidophilus* v reakci na konzumaci 300 g jogurtu obsahující tato probiotika po dobu 5-ti týdnů. Také výsledky autorů Uyeno *et al.* (2008) ukázaly, že v průběhu 20denní konzumace probiotických jogurtů došlo k zvýšení počtu životaschopných laktobacilů ve střevě. Oproti tomu u skupiny K a P1 došlo k mírnému nárůstu počtu těchto bakterií od 0. do 15. dne, poté počty u kontrolní skupiny (K)

začaly mírně klesat. U pokusné skupiny P1 nedošlo od 15. dne k tomuto snížení, početní hladina 15. dne zůstala udržena až do konce konzumace.

Na Obr. 5 jsou znázorněny logaritmické hodnoty z celkového počtu bifidobakterií, druhu *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* u pokusné skupiny P2, která byla krmena probiotickou směsí s obsahem těchto bakterií. Je zde patrné (Obr. 5), že od začátku pokusu byl ve střevní mikroflóře prasniček nejvíce zastoupen druh *Lactobacillus casei* (4,9 log KTJ/g). V průběhu pokusu pak docházelo k mírnému nárůstu u všech pozorovaných bakterií. Mírně vzrůstaly bifidobakterie i druh *Lactobacillus acidophilus*, nejvíce byl však nárůst pozorován v druhu *Lactobacillus casei*. Ve studii Yadav *et al.* (2007) bylo při podávání probiotik také zaznamenáno nejvyššího růstu těchto bakterií, které měli ve střevním traktu prasniček četné zastoupení.

ZÁVĚR

Z tohoto experimentu bylo patrné, že u obou pokusných skupin (P1, P2) konzumujících probiotika docházelo ke snížení celkového počtu potencionálních patogenů druhu *Escherichia coli* i rodu *Clostridium*. U pokusné skupiny P2 byl tento efekt mnohem znatelnější, zvláště v případě klostridií. K navýšení počtu bakterií mléčného kvašení došlo v průběhu celého pokusu u pokusné skupiny P2, u skupiny P1 docházelo k mírnému nárůstu pouze do 15. dne. U pokusné skupiny P2 byly dále zkoumány vybrané bakterie (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*) na celkové počty ve střevním traktu prasniček. Bylo zjištěno, že během celého pokusu si udržoval nejvyšší zastoupení druh *Lactobacillus casei*.

Výsledky experimentu tedy naznačují pozitivní vliv konzumace probiotických krmných směsí na zažívací trakt prasat, a tím snižování rizika např. vzniku průjemových onemocnění.

LITERATURA

- APÁS, A., L. *et al.*, 2010: Probiotic administration effect on fecal mutagenicity and microflora in the goat's gut, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 110, No. 5., 537 – 540
- BEN–HORIN, S. *et al.*, 2009: Combination Immunomodulator and Antibiotic Treatment in Patients With Inflammatory Bowel Disease and *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 7, Issue 9, 981–987
- BERILD, D. *et al.*, 2003: *Clostridium difficile* infections related to antibiotic use and infection control facilities in two university hospitále. *Journal of Hospital Infection*. Vol. 54, Issue 3, 202–206
- FRIČ, P., 2005: Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*, roč. 7, č. 10, s. 435
- GAGNON, M., KHEADR, E. E., BLAY, G., FLISS, I., 2003: In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology* 92, 69 – 78.

GASKINS, H. R., CROIX J. A. *et al.* 2008: Impact of the Intestinal Microbiota on the Development of Mucosal Defense Oxford Journals Medicine ,Clinical Infectious Diseases, Volume 46, Issue Supplement 2, Pp. S80-S86.

KABOOSI, H., 2011: Antibacterial effects of probiotics isolated from yoghurts against some common bacterial pathogens, African Journal of Microbiology Research Vol. 5(25), pp. 4363-4367

KLEIN, A., FRIEDRICH, U., VOGELSANG, H., JAHREIS, G., 2008: *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. European Journal of Clinical Nutrition 62, 584-593.

LATA, J., JURÁNKOVÁ, J., PŘÍBRAMSKÁ, V., 2007: Probiotika v gastroenterologii a hepatologii. Interní medicína pro praxi, 2007, roč. 9, č. 1, s. 8.

LIONG, M., T., 2007: Probiotics: A critical Review of their Potential Role as Antihypertensives, immune Modulators, Hypocholesterolemic, and Premenopausal Treatments. Nutrition Reviews, vol.65, No 7, pg. 320

MARÉ, L., 2009: The use of prebiotics and probiotics in pigs: A review [online]. Agricultural Research Council – Livestock Business Division: Animal Production, Dostupný z WWW: <<http://www.sapork.biz/the-use-of-prebiotics-and-probiotics-in-pigs-a-a-review/>>

METZLER, B. U., MOSENTHIN, R., 2008: A Review of Interactions between Dietary Fiber and the Gastrointestinal Microbiota and Their Consequences on Intestinal Phosphorus Metabolism in Growing Pigs, Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 21, No. 4 : 603 - 615

PALARIA, A. *et al.*, 2011: Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal *Bifidobacteria*, *Clostridia* and *Enterobacteria*. Appl. Environ. Microbiol. Appl Environ Microbiol 2009 May, 75 (9): 2621-2628.

ROSENBAUM, F., 2006: Probiotika. Pharmanews [cit. 20. března 2008]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.pharmanews.cz/2006_03/probiotika.html>

SANTOS, L., M. *et al.* 2010: Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. Med Microbiol Immunol 200, 29–38

SANTOS, L., M. *et al.* 2010: Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. Med Microbiol Immunol 200, 29–38

SMITH, R., A. *et al.*, 2011: Effect of synbiotic on microbial community structure in a continuous culture model of the gastric microbiota in enteral nutrition patients. FEMS Microbiology ecology, 1–11

SZABÓ, I. *et al.*, 2009: Influence of a Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104 Infection in a Porcine Animal Infection Model, Appl Environ Microbiol.; 75(9): 2621–2628.

TARAS, D. *et al.*, 2007: Probiotics in pigs – modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance, ScienceDirect, Livestock Science 108, 229 – 231 článek

UYENO, Y., SEKIGUCHI, Y., KAMAGATA, Y., 2007: Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. International Journal of Food Microbiology 122, 16–22.

VÁCLAVÍKOVÁ, E., LUSTYKOVÁ, A., 2011: Probiotika ve výživě prasat. Krmivářství č. 5, 15 – 17, ISSN 1212-9992.

YADAV, H., M. *et al.*, 2007: Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats, Nutrition, Volume 23, Issue 1, January 2007, Pages 62–68

ZBOŘIL, V. *et al.*, 2005: Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Praha: Grada, s.15, 86-87, ISBN 80-247-0584-2

THE YIELD AND GRAIN QUALITY OF WINTER WHEAT AFTER APPLICATION OF NITROGEN AND SULPHUR

VÝNOS A KVALITA ZRNA OZIMÉ PŠENICE PO APLIKACI N A S

Kotková B., Hřivna L.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkotkov1@node.mendelu.cz, hrivna@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of the work within small-plot field trials was to check out the effect of nitrogen fertilizers and nitrogen fertilizers with sulphur in nutrition of winter wheat (variety Mulan). The yields and parameters of miller's and baker's quality were determined on grain samples. With the application of HPLC was analysed the percentage presence of individual proteinous fractions (glutelins, gliadins, albumins and globulins) in the grain protein complex. The colour of baked goods was evaluated spectrophotometrically with the help of the device Konica Minolta. The greatest fertilization effect from the point of view of grain yield proved after the application of the preparation YARA Sulfan and Thiotrac in the latest vegetation phase. The content of N-substances was positively influenced after application of the fertilizer Thiotrac. The grain, where the sulphur fertilizers were not applied, has in comparison with the variants treated in this way the significantly higher percentage proportion in sulphur low Ω -gliadins, albumins and globulins and at the expense of this the content of technologically more important proteins which can create gluten (gliadins and glutenins) is reduced.

Key words: wheat, grain quality, grain protein, crop nutrition, HPLC

Acknowledgments: This study was supported by the project IGA FA MENDELU No. IP 9/2012

ÚVOD

Síra patří k významným esenciálním živinám a jako taková je pro vývoj a růst rostlin nezbytná. Hraje zásadní roli v rostlinném metabolismu, její nedostatek negativně ovlivňuje kvalitu sklizně (Zhao et al., 1996). Síra je z 80 – 90% využita pro tvorbu sirmých aminokyselin. Při jejím deficitu tvoří rostliny méně sirmých aminokyselin, které zásadním způsobem ovlivňují kvalitu bílkovin, především lepkových. Hlavní biochemickou úlohou síry je tvorba disulfidických můstků mezi peptidickými řetězci a stabilizace bílkovinných struktur. Nedostatek síry snižuje mj. i celkovou efektivnost aplikace N-hnojiv a zvyšuje ztráty nitrátů vyplavováním (Zelený, 1993; Hřivna et al., 1999). Opaření pro zlepšení čistoty ovzduší a omezení průmyslových emisí vedla k velmi výraznému poklesu imisí síry. V současnosti již tento spad nestačí krýt potřebu tohoto prvku pro rostliny a je proto nutná aplikace průmyslových hnojiv s obsahem síry (Flohrová, 1996).

Zralá zrna pšenice obsahují celou škálu proteinů, které se liší svou funkcí, umístěním, strukturou a dalšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Frakční složení bílkovin ovlivňuje jak technologickou, tak i nutriční a nepřímo i hygienickou kvalitu zrna (Kuktaite, 2004). Klasifikace zásobních proteinů obilovin je historicky založena na tzv. Osbornově (1907) postupné extrakci a rozdílné rozpustnosti bílkovin, což vedlo k jejich rozdělení do čtyř základních skupin: albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny, přičemž lepkotvorné, a tedy technologicky nejdůležitější jsou prolaminová a glutelinová frakce, které tvoří přibližně 80 % celkového obsahu bílkovin (Hulín et al., 2007; Bradová et al., 2011). Pšeničné prolaminy se nazývají gliadiny a pšeničné gluteliny jsou označovány jako gluteniny (Dendy & Dobraszczyk, 2001). Podle strukturálních a funkčních vlastností byly prolaminy rozděleny do tří skupin a to na S-Poor (chudé na síru), S-Rich (bohaté na síru) a HMW prolaminy (Hulín et al., 2007). Gluteniny mají polymerní charakter a jejich jednotlivé podjednotky jsou vázány disulfidickými vazbami, které lze účinkem redukčních činidel rozštěpit na vysokomolekulární podjednotky gluteninů (HMW-GS) a nízkomolekulární podjednotky gluteninů (LMW-GS) (Bradová et al., 2011). Cílem práce bylo mimo jiné ověřit, zda má diferencovaná aplikace síry vliv na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusy, ve kterých byl ověřován účinek dusíkatých hnojiv a dusíkatých hnojiv se sírou YARA Sulfan a Thiotrac při výživě ozimé pšenice, byly založeny v roce 2011 na pozemku patřícím do katastru ZD Agrosopol Velká Bystřice jako maloparcelkové. Pozemky se nachází v klimatickém regionu mírně teplém, mírně vlhkém. Půdu lze charakterizovat jako středně těžkou, půdní typ hnědozem. Zemědělský podnik hospodaří bez živočišné výroby, to znamená, že všechny posklizňové zbytky zaorává. Průběh povětrnosti v nejvýznamnějších měsících uvádí tabulka č. 1.

Tab. 1 Průběh povětrnosti

Měsíc	Den	Průměrná teplota (°C)	Úhrn srážek (mm)	Max	Min
leden	1. – 31.	-1,0	28	10,6	-15,4
únor	1. – 28.	-1,4	3	11	-13,5
březen	1. – 31.	5,1	38,4	24,8	-8,4
duben	1. – 30.	11,8	33,5	26,3	-0,6
květen	1. – 31.	15	71,5	28,3	-2
červen	1. – 30.	19	126,7	30,7	7,8
červenec	1. – 31.	18,4	136	32,3	9,4
srpen	1. – 31.	20,3	81,8	34,9	7

Pro pokus byla použita odrůda ozimé pšenice *Mulan* (A), po předplodině ozimé řepce. Dne 7. října 2010 byl proveden výsev, který činil 4 MKS. Pokus byl ošetřen herbicidy, morforegulátory a insekticidy na jaře 2011: 11. dubna *Retacel* (1,6 l.ha⁻¹), 18. dubna *Hurricane* (200 g.ha⁻¹), 19. května *Cerone* (0,65 l.ha⁻¹) a 7. června *Nurelle D* (0,6 l.ha⁻¹). Aplikace dusíkatých hnojiv a dusíkatých hnojiv se sírou byla provedena dle schématu uvedeného v tabulce č. 2. Každá z variant byla založena ve čtyřech opakováních, velikost parcel brutto 21,6 m².

Tab. 2 Varianty pokusu

Var.	Schéma pokusu	Termín aplikace a dávka (kg N + I Thiotrac)				Celkem kg.ha ⁻¹		
		Regenerace IB	1. prod	2. prod	kvalita	N	S-Sulfan	S - Thiotrac
1	LAV	40	30	30	20	174		
2	YARA Sulfan	40	30	30	20	174	30	
3	LAV+ Thiotrac	40	30/5 1	30	20	174		1,5
4	YARA Sulfan+ Thiotrac	40	30/5 1	30	20	174	30	1,5
5	LAV+ Thiotrac	40	30	30	20/5 1	174		1,5
6	YARA Sulfan+ Thiotrac	40	30	30	20/5 1	174	30	1,5

Poznámka: Porost byl plošně vyhnojen dusíkem v rámci 1A regeneračního hnojení dávkou 54kgN/LAV/ha (25. 2. 2011), tato dávka není v tabulce uvedena, celkový součet N a S (viz poslední sloupec tabulky) s ní již ale počítá.

Během vegetace byly odebírány vzorky rostlin v rozdílných růstových fázích (tab. 3).

Tab. 3 Odběry vzorků rostlin

Var.	Schéma pokusu	DC 28 - 30	DC 39 - 43	DC 65 - 70
1	LAV	+	+	+
2	YARA Sulfan	+	+	+
3	LAV+ Thiotrac		+	+
4	YARA Sulfan + Thiotrac		+	+
5	LAV+ Thiotrac			+
6	YARA Sulfan + Thiotrac			+

+ odběr vzorku

U odebraných vzorků rostlin byla stanovena hmotnost sušiny 1 rostliny a v sušině celých rostlin pak stanoven obsah N, P, K, Ca, Mg a S. Obsah N byl stanoven Kjeldahlovou metodou a ostatní živiny po mineralizaci v HNO_3 a H_2O_2 v uzavřeném mikrovlnném systému metodou ICP OES na přístroji JOBIN YVON 24. Obsah živin v půdě byl stanoven dle Mehlicha III a Svod v půdě byla stanovena po extrakci vodou metodou ICP OES. Sklizeň pokusu proběhla v plné zralosti porostu 6. 8. 2011 maloparcelní sklízecí mlátičkou Wintersteiger.

U vzorků zrna byly stanoveny parametry mlynářské a pekařské jakosti. Sedimentační hodnota byla stanovena jako sedimentační index dle ČSN ISO 5529, stanovení objemové hmotnosti dle ČSN ISO 7971-2. Směšné vzorky byly semlety na laboratorním mlýnu Chopin a byl proveden pekařský pokus. Hnětení těsta bylo po stanovení vaznosti vody na valorigrafu provedeno na rychlohnětači po dobu 1 min ($1200 \text{ otáček} \cdot \text{min}^{-1}$). Následovalo kynutí po dobu 20 minut v laboratorní kynárně (teplota $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, relativní vlhkost vzduchu $80 \pm 5 \%$). Tvarování těsta do klonků o hmotnosti 80 g a pečení nejdříve v zapálené peci (50 ml vody na začátku pečení) po dobu 20 minut. Hodnocení výrobků proběhlo 1 hodinu po upečení. Stanoven byl měrný objem pečiva a další parametry. Stanovení proběhlo na pracovišti Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně.

Barva pečiva byla vyhodnocena na přístroji Konica Minolta kolorimetricky. Stolní spektrofotometr Konica Minolta CM – 3500d s geometrií $d/8^\circ$ umožňuje měření reflektance na štyřbině 8 mm. S použitím software CM-S100w byla vyjádřena barva a světlost kůrky v barevném prostoru CIELAB. Hodnoty L^* (lightness) představují rozmezí od 0 (černá) do 100 (bílá). Barevné souřadnice a^* a b^* nabývají kladných nebo záporných hodnot podle umístění v trojrozměrném systému. Na základě odchylky ΔE lze potom popsat právě znatelný rozdíl mezi dvěma měřeními.

Analýza procentuálního zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí (gluteninů, gliadinů, albuminů a globulinů) v bílkovinném komplexu zrna pšenice byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí při vlnové délce 214 nm. Použitá kolona Vydac 218TP C18, vyhodnocení pomocí software Agilent Chemstation for LC and LC/MS Systems.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Z analýzy chemického složení rostlin z posledního odběru dne 15. 6. 2011 je patrné, že aplikace síry se v chemickém složení rostlin pozitivně odrazila zejména v případě variant hnojených kombinací přípravků Yara Sulfan a Thiotrac, a to v případě aplikace hnojiva Thiotrac ve fázi sloupkování DC 31-32, i ve fázi, kdy byl porost vymetaný a začínal kvést DC 59- 61 (tab. 4).

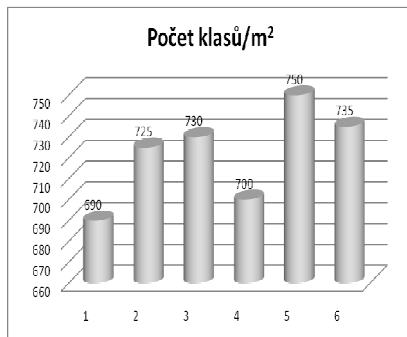
Tab. 4 Chemické složení rostlin (odběr 15. 6.2011)

Varianta	HISR	N	P	K	Ca	Mg	S
1) LAV	7,169	1,919	0,250	2,001	0,261	0,109	0,122
2) YARA Sulfan	5,875	1,444	0,208	1,870	0,265	0,103	0,103
3) LAV + Thiotrac	6,325	1,729	0,224	2,045	0,290	0,125	0,111
4) YARA Sulfan + Thiotrac	5,686	1,614	0,229	2,122	0,287	0,112	0,126
5) LAV + Thiotrac	9,693	1,659	0,224	1,965	0,259	0,102	0,111
6) YARA Sulfan + Thiotrac	7,625	1,664	0,238	2,032	0,260	0,102	0,128

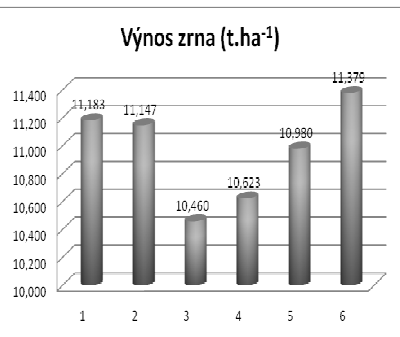
Pozn.: Obsah živin je uveden v %, HISR – hmotnost sušiny jedné rostliny

Ve stejném termínu byly zjištěny také počty klasů. Odpočty klasů potvrdily příznivý vliv aplikované síry na jejich počet. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny u variant 5 a 6 (obr. 1). Největší efekt hnojení z hlediska výnosu zrna je patrný u varianty 6 po aplikaci hnojiv YARA Sulfan a Thiotrac v pozdní fázi vegetace. Petr (2011) ovšem uvádí, že tento efekt je závislý na dostatku srážek po aplikaci, což bývá v tomto období nejisté. Z toho důvodu je lépe aplikovat dusík již před metáním (Růžek et al., 2012). Dosažené výnosy jsou nejnižší u variant s aplikacemi hnojiva Thiotrac (var. 3 a 4) ve fázi sloupkování (obr. 2). Skutečnost, že výnos zrna zcela nekoreluje s počtem klasů, odpovídá zařazení odrůdy Mulan do kategorie odrůd tvořící výnos počtem zrn/m², tj. hustotou zrna v klase (Bezdičková & Kryštof; 2010).

Obr. 1: Počet klasů (odběr 15. 6. 2011)



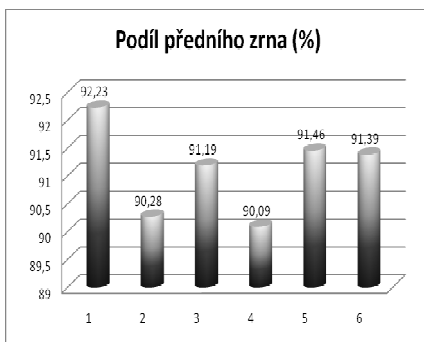
Obr. 2: Výnos zrna



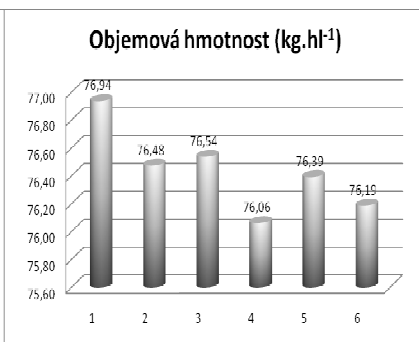
Vyhodnocení kvalitativních parametrů zrna

Podíl předního zrna byl vyrovnaný u všech variant (obr. 3). Objemová hmotnost nebyla v důsledku nepříznivých povětrnostních podmínek vysoká a pohybovala se v rozmezí od 76,1 do 76,9 kg.hl⁻¹ (obr. 4). Optimální rozmezí objemové hmotnosti je 78-82 kg.hl⁻¹. Pro pečárenskou pšenici kategorie jakosti A- kvalitní se vyžaduje hodnota minimálně 78 g.l⁻¹. Bezdíčková & Kryštof (2010) uvádí, že aplikace hnojiva Thiotrac v období metání – kvetení se na objemové hmotnosti a HTZ projevila velmi příznivě.

Obr. 3: Podíl předního zrna

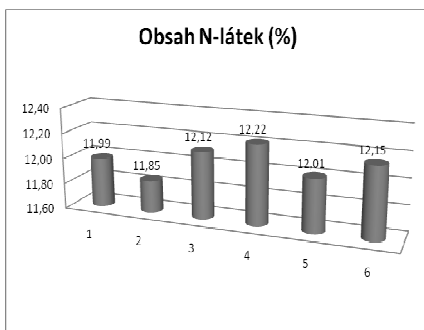


Obr. 4: Objemová hmotnost

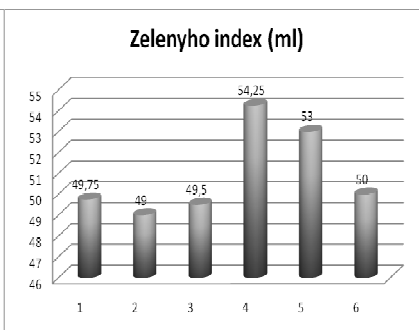


Přihnojením ozimé pšenice na konci sloupkování a v metání dusíkem se snažíme zvýšit a prodloužit aktivitu asimilačního aparátu rostlin a tím vytvořit předpoklady pro zvýšení obsahu bílkovin v obilkách (Růžek et al., 2012). Obsah N-látek a hodnoty Zeleného indexu u všech variant vyhovují požadavkům na odrůdy kategorie jakosti A. Obsah N-látek byl pozitivně ovlivněn aplikací hnojiva Thiotrac (obr. 5). To se odrazilo i v příznivých hodnotách sedimentačního indexu dle Zeleného (obr. 6). Zeleného index charakterizuje bobtnatelnost pšeničných bílkovin; je to hodnota odrůdově založená, která má vztah k obsahu hrubých bílkovin a objemu pečiva (Petr, 2011).

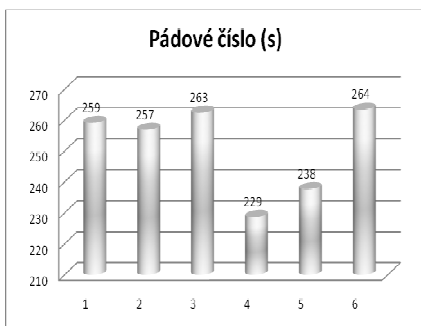
Obr. 5: Obsah N-látek



Obr. 6: Zelený index



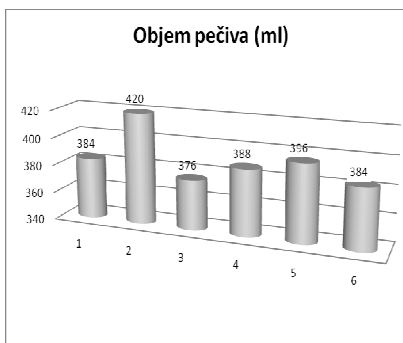
Obr. 7: Pádové číslo



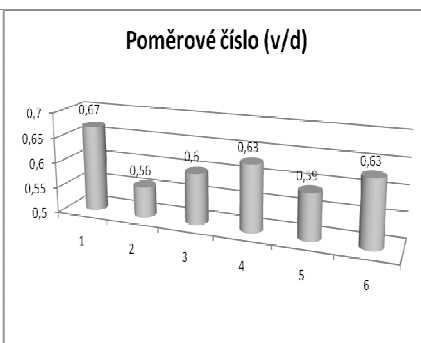
Hodnoty pádového čísla byly uspokojivé (obr. 7). Všechny varianty dosahovaly hodnot vyšších než 226 sekund, potřebných pro zařazení do jakostní kategorie A. Je významně ovlivňováno průběhem počasí v době dozrávání a sklizně (Petr, 2011). Zrno s číslem poklesu nižším než 200 s, nebo vyšším než 400 s je nevhodné pro pekárenské využití. Česká státní norma ČSN 46 1100-2:2001 požaduje, aby zrno určené na pekárenské zpracování mělo číslo poklesu alespoň 220 sekund (Palík et al., 2009).

Výsledky pokusného pečení ukázaly na převažující příznivý vliv hnojiv se sírou na objem pečiva a to i přes to, že kvalita suroviny v důsledku výše uvedených skutečností (průběh povětrnosti v době dozrávání) nebyla vysoká. Nej kvalitnější zrno bylo sklizeno z var. 2, kde byl aplikován samostatně YARA Sulfan (obr. 8).

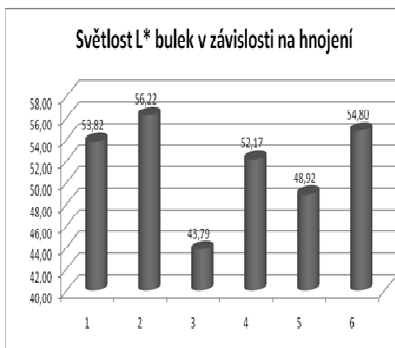
Obr. 8: Objem pečiva



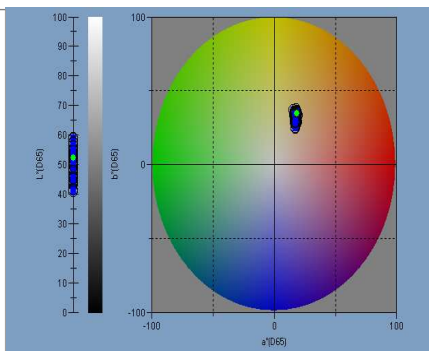
Obr. 9: Poměrové číslo



Z výsledků spektrofotometrického měření barvy byly potvrzeny rozdíly mezi variantami, které byly pozorovatelné i lidským zrakem. Nejsvětlejší bylo pečivo varianty 2. Aplikace hnojiva YARA Sulfan vykazovala příznivější hodnoty (obr. 10). Lin et al. (2009) uvádí, že spotřebitelé žádanejší je tmavší pečivo. Bylo zjištěno, že lidé žijící v jižních oblastech Evropy preferují pečivo světlejší a chuťově méně výrazné, naopak v severnějších oblastech je více oblíbené pečivo tmavší. Barva kůrky závisí na chemické reakci při pečení mezi přítomnými redukcujícími cukry a volnými aminokyselinami, dále na produktech vzniklých karamelizací a také na podmínkách samotného pečení (doba, teplota, vlhkost). Zbarvení střídy je dáno spíše surovinou, než zmíněnou chemickou reakcí (Prugar, 2006). Oblast umístění barvy obrazu v systému CIELab prezentuje obr. 11.

Obr. 10 Světlost L^* pečiva

Obr. 11 Barva pečiva v systému CIELab



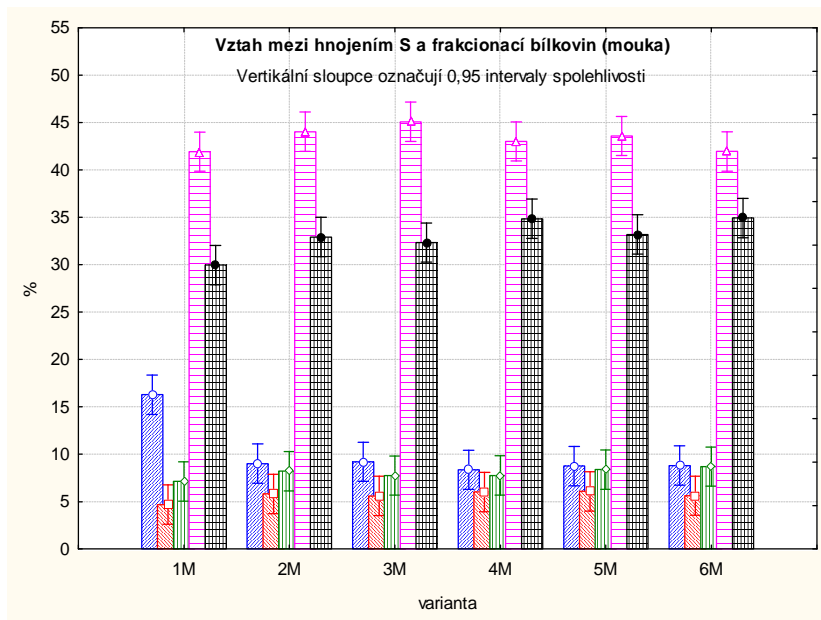
Vztah mezi aplikací síry a frakcemi bílkovin meliva

Frakční složení bílkovin ovlivňuje jak technologickou, tak i nutriční a nepřímo i hygienickou kvalitu zrna (Kuktaite, 2004). Mezi nejdůležitější zásobní proteiny patří skupina na síru bohatých gliadinů (S-rich: frakce α , β a γ), na síru chudých gliadinů (S-poor: frakce Ω) a vysokomolekulární frakce gluteninů (Shimoni & Galili, 1996).

Z obr. č. 12 je patrné, že varianta č. 1, která nebyla hnojena dusíkatým hnojivem se sírou, má v porovnání s takto ošetřenými variantami významně vyšší podíl na síru chudých Ω -gliadinů, albuminů a globulinů, na úkor čehož dochází ke snížení obsahu technologicky důležitějších lepkotvorných bílkovin (gliadinů a gluteninů).

Hnojení sírou se pozitivně projevilo zejména u frakce γ -gliadinů variant 4 a 6, u kterých byla aplikována kombinace hnojiv YARA Sulfan a Thiotrac ve fázi sloupkování, respektive metání a kvetení. Nejvyšší obsah na síru bohatých α a β gliadinů vykazovala varianta 6, kde byla aplikována hnojiva YARA Sulfan a Thiotrac v pozdní fázi vegetace. Zastoupení vysokomolekulárních podjednotek gluteninů (HMW-GS) u variant hnojených sírou bylo poměrně vyrovnané (5,6 – 6 %), výrazně nižší podíl byl zaznamenán u varianty 1 bez aplikace sírných hnojiv (4,7%), viz graf 11. Srovnatelné výsledky ukazuje i práce Godfrey et al. (2010).

Obr. 12: Bílkovinné frakce mouky



- omega gliadiny, albuminy a globuliny
- nízkomolekulární podjednotky gliadinů
- gama gliadiny
- HMW gluteniny
- LMW gluteniny

ZÁVĚR

Cílem práce bylo posoudit vliv aplikace dusíkatých hnojiv a dusíkatých hnojiv se sírou na výnos zrna a parametry mlynářské a pekařské jakosti zrna ozimé pšenice. Největší efekt hnojení z hlediska výnosu zrna se projevil po aplikaci přípravků YARA Sulfan a Thiotrac v pozdní fázi vegetace. Obsah N-látek byl pozitivně ovlivněn aplikací hnojiva Thiotrac. Výsledky pokusného pečení ukázaly na převažující příznivý vliv hnojiv se sírou na objem pečiva a to i přes to, že kvalita suroviny v důsledku průběhu povětrnosti v době dozrávání nebyla vysoká. Zrno, které nebylo hnojeno dusíkatým hnojivem se sírou, má v porovnání s takto ošetřenými variantami významně vyšší podíl na síru chudých Ω -gliadinů, albuminů a globulinů, na úkor čehož dochází ke snížení obsahu technologicky důležitějších lepkotvorných bílkovin (gliadinů a gluteninů).

LITERATURA

BEZDÍČKOVÁ A. & KRYŠTOF Z., 2010: Nový pohled na tvorbu výnosu ozimé pšenice. *Agromanuál* 5 (4): 44-45.

BRADOVÁ J., DVOŘÁČEK V. & ŠTOČKOVÁ L., 2011: Využití gelové a čipové elektroforézy k identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice. Databáze online [cit. 2012-09-09]. Dostupné na: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-056-7.pdf>

DENDY D. A. V. & DOBRASZCZYK B. J., 2001: *Cereals and Cereal Products. Chemistry and Technology*. Gaithersburg, Aspen Publishers, 429 s.

FLOHROVÁ A., 1996: Důsledky nedostatečného hnojení. Praha, ÚZPI, 48 s. ISSN 0862-3562

GODFREY D., HAWKESFORD M., POWERS S., MILLAR S. & SHEWRY P., 2010: Effect of Crop Nutrition on Wheat Grain Composition and End Use Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3012-3021.

HŘIVNA L., RICHTER R., RAŠKOVÁ J. & RYANT P., 1999: Ovlivnění kvality ozimé pšenice při hnojení dusíkem a sírou. *Výživa rostlin, kvalita produkce a zpracovatelské využití*, sborník konference. ISBN:80-7157-368-X.

HULÍN P., DOSTÁLEK P. & HOCHEL I., 2008: Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chem. Listy* 102: 327-337.

KUKTAITE R., 2004: *Protein Quality in Wheat. Changes in protein polymer Composition During Grain Development and Dough Processing*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.

LIN L. (ed.), 2009: Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread. *Food Chemistry*, 112 (4): 987-991.

PALÍK S., BUREŠOVÁ I., EDLER S., SEDLÁČKOVÁ I., TICHÝ F. & VÁŇOVÁ M., 2009: Metodika pěstování ozimé pekárenské pšenice. Databáze online [cit. 2012-09-09]. Dostupné na: <http://www.vukrom.cz/vyzkum/ukoncene-2009/qg50041/metodika>

PETR J., 2011: Agrotechnika cílená na jakost potravinářské pšenice. *Úroda*, 59 (8):10-13.

PRUGAR J., 2006: Funkční potraviny: obiloviny. Databáze online [cit. 2011-02-15]. Dostupné na: <http://www.dtest.cz/>

RŮŽEK P., KUSÁ H., VAVERA R., 2012: Pozdní přihnojení ozimé pšenice dusíkem. *Úroda*, 60 (3): 58-60.

SHIMONI Y. & GALILI G., 1996: Intramolecular Disulfide Bonds between Conserved Cysteines in Wheat Gliadins Control Their Deposition into Protein Bodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (31):18869–1887.

ZELENÝ F., 1993: *Výživa rostlin a potřeba hnojení*. Praha, ÚZPI, Stud. Inform., Ř. Rostl. Vyr., č. 4, 60 s.

ZHAO F. J., HAWKESFORD M. J., WARILLOW A. G. S., MCGRATH, S. P. & CLARKSON D. T., 1996: Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant Soil* 181, 317–323.

DYNAMICS OF SUGAR BEET GROW CHANGE AND QUALITY AFTER EXTRA-ROOT NUTRITION

DYNAMIKA ZMĚN RŮSTU A KVALITY CUKROVÉ ŘEPY PO MIMOKOŘENOVÉ VÝŽIVĚ

Pechková J., Hřivna L.

Food technology, Institute of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: pechkovajana@tiscali.cz

ABSTRACT

Within the field experiment, the effect of extra-root nutrition for the growth and quality of sugar beet was verified. On the base of the laboratory analysis, sugar content, soluble ashes content and alpha-aminonitrogen content were determined. The results were used for determination of technological quality of bulbs and so their suitability for subsequent processing in sugar factory. Also, for the whole time of vegetation period the dynamics of the growth of root and leaf area was monitored. The leaf surface kept growing until the end of August when it reached the maximum of 1013 g. Since then there was a decrease in the weight of leaf area because of old leaves necrosis. Concerning the weight of root, over a period of four collections we could observe regular weight increases from 462 g in the second decade of July till 955 g at the end of September. Definitely the biggest final weight – both of the root (1704 g) and the leaf area (1462 g) – was reached when fertilizer called Carbonbor was applied, that means the variation when boron was applied. At the beginning of the sampling, digestion was very low and reached only 13.7% of sugar content, however, at the end of September it increased for the average value of 16.2%. The highest sugar content (16.9%) was reached with the variation of application of NaCl p.a + DAM 390. Soluble ashes content ranged between 0.4 – 0.6 %. The alpha-aminonitrogen content was high and as early as from the end of August showed the values 42 mg. 100g⁻¹. Both with the soluble ashes as well as with the alpha-aminonitrogen, the differences between the variations were not large. For the whole period of collection, MB-factor referred to insufficient ripeness of sugar beet which is showed by the average values in the range of 37 – 55, that are considerably unsatisfactory.

Key words: sugar beet, digestion, soluble ashes, alpha-aminonitrogen, extra-root nutrition

ÚVOD

Kvalita cukrové řepy, tedy její technologická jakost se utváří již na poli. Podle všeobecně platné definice si pod pojmem technologická jakost představíme komplex biologických, chemických, fyzikálně chemických a mechanických vlastností řepné bulvy. Právě tyto vlastnosti rozhodují o jejím skladování a budoucím zpracováním při získání vysoké výtěžnosti bílého cukru = rafinády (Kulovaná, 2001). Z biologických vlastností jsou to především: tvar, velikost a hmotnost bulvy, její vyvráskost, zdravotní stav a rezistence vůči skládkovým chorobám. Z vlastností chemických je to: pH, turgor a barva buněčné šťávy. Z mechanických vlastností má největší význam pružnost, pevnost a odpor k řezání (Zahradníček, 2003).

Cukrová řepa je jednou z nejnáročnějších plodin, pokud se týká příjmu živin. Je citlivá zejména na nedostatek dusíku, draslíku, fosforu, hořčíku, bóru a manganu (Bittner, 2012). Při výnosu 50 t/ha spotřebuje cukrová řepa cca: 257 kg N, 252 kg K, 96 kg Na, 60 kg Mg, 50 kg Ca a 35 kg P (Kováčová a spol., 2002). Její produktivita je limitována především suchem, extrémními teplotami a nedostatkem živin v půdě (Grzebisz a spol., 2005). Nesmíme věnovat pozornost pouze množství použitých makro a mikro prvků, ale taktéž vhodné době a metodě aplikace. Aplikace hnojiv na list nemůže plně nahradit hnojení do půdy, může však snížit vyplavování prvků z půdy a omezit nepříznivý vliv na životní prostředí. Pokud však dojde v letních měsících k vysušení vrchní vrstvy půdy, je tento způsob často až nepostradatelným (Pospíšil a spol., 2005). Při dostatečném množství srážek stačí k dosažení požadovaného výnosu menší dávky živin a naopak. Nedostatek vody může brzdit pohyb živin v půdě a tedy i v rostlině (Kováčová, 2003).

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl založen dne 19. 5. 2011. Umístěn byl na pozemku patřícím do katastru ZD Agropol Velká Bystrice jako maloparcelový. Pozemek se nachází v klimatickém regionu mírně teplém, mírně vlhkém. Půda je středně těžká, půdní typ hnědozem.

Dynamika změn růstu a kvality cukrové řepy byla sledována na parcelách o velikosti 1,45 x 20 m, plocha jedné parcely tedy činila 29 m². Celkem bylo vyměřeno 16 parcel.

Variety hnojení použité v pokusu (viz. tab. I). První postřik byl uskutečněn dne 28. 6. 2011. Doba postřiku byla 38 sec. Postřik byl proveden v dávce vody 300 l/ha. Výpočet hnojení na plochu 60 m² (viz. tab. I). Dne 23. 8. 2011 proběhlo na pokusu druhé hnojení.

Celkem byly provedeny čtyři odběry v následujících termínech: 19. 7. 2011, 3. 8. 2011, 30. 8. 2011 a 27. 9. 2011. Z každé varianty se odebralo po třech řepách.

V průběhu celé vegetace byla u odebraných vzorků stanovována hmotnost chrástu a kořene jednotlivých rostlin.

Po předchozí homogenizaci vzorku byly u kořene stanoveny tyto parametry:

1. **Stanovení digesce:** obsah sacharózy byl stanoven horkou digescí po číření octanem olovnatým, filtrát byl následně proměřen na polarimetru. Použit byl přístroj Polamat S.
2. **Stanovení rozpustného popela:** obsah rozpustného popela byl stanoven konduktometricky po vyluhu destilovanou vodou. Měření bylo prováděno na konduktometru Inolab Level 1 WTW.
3. **Stanovení α – aminodusíku (modrého čísla, škodlivý amidický dusík):** stanovení obsahu α – aminodusíku bylo stanoveno dle zabarvení, jaké nabude šťáva přidáním měďnatého činidla. Stanovení je prováděno kolorimetricky na základě srovnání s barevnými standardy etalonu. Barevně souhlasící etalon pak udává přímo množství α – aminodusíku v mg.100 g⁻¹ řepy.
4. Jako poslední byl dle vzorce vypočten **MB faktor**, který udává vyzrálост cukrové řepy. Pro výpočet tohoto faktoru je třeba znalost předchozích parametrů: digesce, rozpustného popela a α – aminodusíku.

Vzorce:

B faktor = výtěžnost bílého cukru.

$$B = P - 4,25 \cdot P_p - \alpha N \cdot 25 (\%)$$

M faktor = produkce melasy.

$$M = 8 \cdot P_p (\%)$$

MB faktor = vyjadřuje množství vyprodukované melasy na vyrobený bílý cukr v %.

$$MB = 100 \cdot M / B (\%)$$

kde je P – cukernatost

P_p – obsah rozpustného popela

α N – α -aminodusík

Zpracování výsledků:

Hodnocení získaných dat bylo provedeno metodou jednofaktorové analýzy variace s následným testováním průkaznosti rozdílů dle Tukeye (STÁVKOVÁ, DUFEK 2005) při využití software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.).

Tab. I Varianty pokusu

Var.	hnojivo	Dávka/ha	Složení (g.l-l, %)
1	kontrola		
2	CARBONBOR	1 l	185 g B, 90 g C
3	CARBONBOR Na	1 l	185 g B, 90 g C, 35 g Na
4	CARBONBOR K	1 l	185 g B, 90 g C, 35 g K ₂ O
5	Bortrac	1,23 l	150 g B
6	FUMAG 6NK-SB	5 kg	12 % MgO, 6 % N, 6 % K ₂ O, 20 % S, 1 % B, 8 % C, Na < 1 %
7	SULFIKA SB-C	5 kg	(35 % S, 5 % B, 2,5 % C, 1 % Na)
8	YARAVitaBrassitrel	2,3 kg	(115 g S, 83 g MgO, 80 g B, 70 g Mn, 4 g Mo)
9	Thiotrac	1 l	300 g S, 200g N
10	Magnitra L	6 kg	10 % (115 g S, 83 g MgO, 80 g B, 70 g Mn, 4 g Mo) MgO, 7 % N
11	NaNO ₃ p.a.	9 kg	(27 % Na, 16,5 % N)
12	NaCl p.a.	6 kg	(39,7 % Na)
13	NaCl p.a. + DAM 390	6 kg + 9 kg	DAM 390 (30 % N)
14	Fertiacyl Starter	1 l	NPK 13/5/8; aktivované fulvo a huminové kyseliny; Zeatin; Glycin betain
15	Fertileader Elite	1 l	125 g N, K ₂ O 96 g/l; CaO 177 g/l; B 3 g/l; Seactiv
16	F. Starter + F. Elite	1 + 1 l	

Tab. 2 Průběh teplot a úhrn srážek

Měsíc	Průměrná teplota	Úhrn srážek	Maxima	Minima
Březen	5,1	38,4	24,8	-8,4
Duben	11,8	33,5	26,3	-0,6
Květen	15	71,5	28,3	-2
Červen	19	126,7	30,7	7,8
Červenec	18,4	136	32,3	9,4
Srpen	20,3	81,8	34,9	7

Tab. 3 Vzorkování cukrovky 27. 9. 2011

Var.	Chrást	Kořen	Digestce	Rozpustný popel	Alfa-aminodusík
1	985	985	15,8	0,55	38
2	1462	1704	16,3	0,62	40
3	849	863	15,8	0,65	43
4	790	855	16,7	0,58	38
5	767	1115	16,8	0,59	43
6	559	917	16,4	0,66	48
7	929	970	15,9	0,62	48
8	637	815	16,5	0,48	40
9	584	805	16,4	0,56	38
10	669	785	16,9	0,55	38
11	668	960	17,3	0,47	40
12	817	1190	15,8	0,71	45
13	677	722	16,9	0,48	43
14	665	739	15,8	0,54	43
15	645	864	15,4	0,67	48
16	919	997	15	0,52	45

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cukrovka prochází nejdříve pomalým počátečním růstem, který trvá 30 – 35 dní. K rozvoji listové plochy dochází až v dalším období. Po dosažení maxima listové plochy pokračuje růst bulvy, do té doby, kdy již přírůstek hmoty vytvořené fotosyntézou nestačí pokrýt úbytek hmoty spotřebované dýcháním. Tedy to fyziologické zralosti porostu prvního roku (Zimolka, 2008).

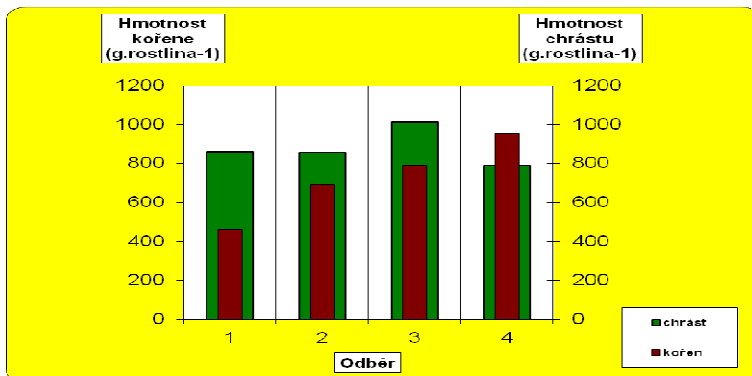
Dynamika tvorby chrástu a kořene (viz. obr. 1), z grafu je zřejmé, že kořen pravidelně přirůstal v průběhu odběrů. Od průměrné hodnoty 462 g při prvním odběru až po průměrnou hodnotu 955 g při odběru posledním.

Cukrová řepa je citlivá na nepříznivé vlivy počasí. Je velice náročná na množství srážek (Potop, Türkott, 2011). Naopak sucho velmi negativně ovlivňuje výnos, cukernatost se však může navýšit. Zvyšuje se s ní bohužel i alfa-aminodusík. Při silném vodním deficitu nakonec dojde k degradaci cukru, vzniká invertní cukr (Bittner, 2010). Klimatické podmínky (viz. tab. 2) umožnily zvýšit hodnotu kořene až nad rozpětí 600 – 800 g. Hmotnost bulvy pohybující se v tomto rozmezí, byla experimentálně zjištěna jakožto příznivá pro chemicko-technologické složení bulev (Zahradníček, 2003). Jelikož poslední odběr byl proveden 27. 9. 2011, nedá se předpokládat, že by tato hodnota byla v období sklizně překonána.

Co se týká přírůstku chrástu, jeho hmotnost se výrazně zvýšila při třetím odběru (30. 8. 2011) a to na průměrnou hodnotu 1013 g, po dosažení tohoto vrcholu již hmotnost klesala. Maximum listové plochy je u cukrovky dosaženo v druhé polovině srpna (Pulkrábek, 2007). Z tohoto důvodu můžeme do období sklizně očekávat z poslední průměrné hodnoty 789 g další pokles hmotnosti chrástu v důsledku odumírání starších listů.

Jak je dále vidět na grafu, v poslední dekádě září již hmotnost kořene přesahuje hmotnost chrástu, a to průměrně o 166 g.

Jednoznačně nejvyšší konečné hmotnosti, jak kořene (1704 g), tak chrástu (1462 g), bylo dosaženo při aplikaci hnojiva Carbonbor, tedy u varianty 2 s aplikací bóru (viz. tab. 2). Cukrovka spotřebovává více bóru než jiné plodiny, její spotřeba je 300 – 500 g/ha. Pokud je půda dobře zásobená bórem, dochází ke zrychlení transportu cukru. Mimo to se účastní dělení buněk (Kristek a spol., 2003).

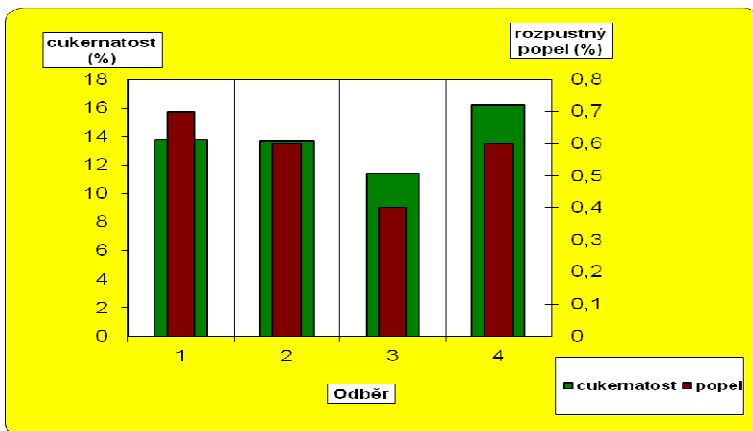


Cukernatost byla na začátku vzorkování poměrně nízká, v prvním odběru (19. 7.) bylo dosahováno průměrných hodnot 13,8 % cukernatosti (viz. obr. 2). Dle Pulkrábka má cukrovka v poslední dekádě července má cukrovka 1/4 cukru, 1/3 hmotnosti kořene a 9/10 hmotnosti kořene oproti sklizňovým výnosům. Při druhém odběru (3. 8.) byla naměřena průměrná cukernatost 13,7 %. A při třetím odběru (30. 8.) cukernatost dokonce poklesla na 11,3 %, což bylo zapříčiněno nízkými teplotami a vysokými srážkami v průběhu července (viz. tab. 2). Nastane-li v počasí zlom a přijdou bohaté dešťové srážky, cukrová řepa začne znovu vegetovat (retrovegetovat), tj. tvořit nové listy na úkor cukru (Zahradníček, 2003). Lepší klimatické podmínky během měsíce srpna umožnily dosáhnout průměrné cukernatosti 16,2 % při posledním odběru 27. 9. To znamená měsíční přírůstek o 4,8 %, což je velmi nadprůměrný nárůst. Dle Pulkrábka bývá měsíční nárůst v rozmezí 0,5 až 2,5 % cukernatosti (Pulkrábek, 2007).

Nejvyšší cukernatosti (16,9 %) bylo dosaženo u varianty 13, kde byl aplikován: NaCl p.a. + DAM 390. Předpokládáme, že sklizňová hodnota vzroste a bude se pohybovat v rozmezí 15 – 18 %, maximální hodnota pak 20 – 22 %, jak uvádí Diviš a kol., 2010.

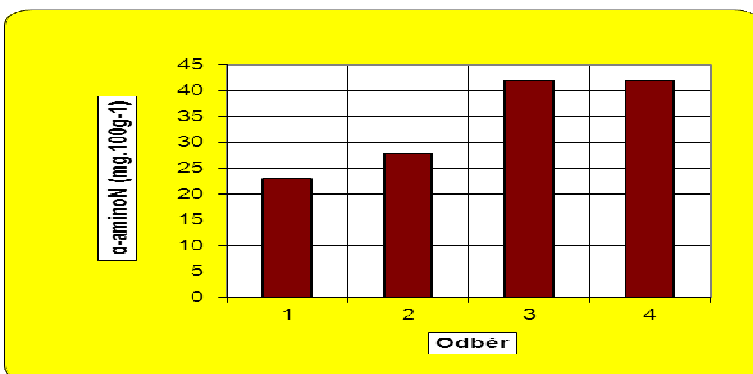
Obsah rozpustného popela se pohyboval v průběhu téměř celé vegetační doby v rozmezí 0,6 - 0,7 %. Při třetím odběru (30. 8. 2011) se jeho obsah snížil na průměrnou hodnotu 0,4 %. Rozdíl mezi jednotlivými variantami však nebyl výrazný. Vysoké srážky v průběhu července nejspíš způsobily vyplavení živin do spodních vrstev mimo dosah kořenového systému, čímž se omezil jejich příjem. Z tohoto důvodu mohla být naměřena nejnižší průměrná hodnota 0,4 při srpnovém odběru.

Obr. 2 Dynamika tvorby cukru a změny obsahu popela



Obsah α -aminodusíku naopak od druhé dekády srpna spoušel a vysoké průměrné hodnoty 42 mg. 100 g⁻¹ se zachovaly až do konce září (viz. obr. 3). Stejně jako u obsahu rozpustného popela nebyly mezi jednotlivými variantami velké rozdíly (viz. tab. 3). Dusík má kladný vliv na velikost listové plochy a její fotosyntetickou činnost. Nadměrné dávky dusíkatých hnojiv však mohou mít negativní dopad na technologickou jakost právě vlivem akumulace alfaaminodusíku. Nadměrné hodnoty pak narušují proces krystalizace cukru (Pospíšil a kol., 2005). Vysoké hodnoty při srpnovém a zářijovém odběru si můžeme vysvětlit průběhem povětrnosti a malým množstvím srážek v srpnu a září. Dusík se tak z půdy nevyplavoval a koncentroval se v řepné bulvě.

Obr. 3 Změny obsahu alfa-aminodusíku

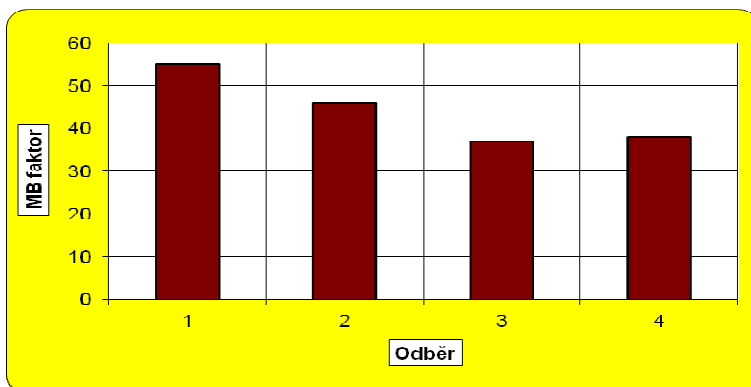


Se zvyšováním obsahu rozpustného popela a α -aminodusíku se zvyšovala i hodnota MB-faktoru (viz. obr. 4), nejvyšší průměrné hodnoty MB = 55 bylo dosaženo v druhé dekádě července. Poté

hodnoty pozvolna klesaly, přesto však byly výsledky nevyhovující a MB faktor byl nadprůměrně vysoký z důvodu kombinace nízkého množství cukru a vysokého obsahu rozpustného popela a α -aminodusíku.

Čím je řepa vyzrálejší, tím je jakostnější (má méně škodlivých necukrů, nižší MB faktor a vyšší pH). Zejména MB faktor je proto hlavním kritériem pro určení doby sklizně. U jakostní řepy je MB faktor 12 – 22, méně jakostní 30 a více (Skalický, 1997).

Obr. 4 Dynamika změn MB faktoru



ZÁVĚR

Výsledky polního pokusu byly variabilní, přesto však můžeme konstatovat, že zařazení mimokořenové výživy je přínosné. Výsledky nám slouží především k zhodnocení technologické kvality bulev, která významně pomáhá při průběžném monitoringu zemědělských podniků. Dále data poslouží v rámci univerzity pro zpracování závěrečných prací a tím i propojení teorie s praxí.

Výsledky bohužel poukazovaly na nedostatečnou technologickou kvalitu bulev. Vysoký obsah rozpustného popela a α -aminodusíku společně s nízkým obsahem cukru a výslednou vysokou hodnotou MB-faktoru vypovídají o nevyzrálosti řepy. Pokud by se tyto parametry do sklizně nezlepšily, znamenalo by to nižší výnos bílého cukru a vznik vyššího množství melasy.

LITERATURA

Bittner, V., Běhal, R., 2010: *Škodlivé organismy cukrovky*, Maribo Seed, Slavkov, 102 s. ISBN 978-80-254-8494-4.

Bittner, V., 2012: *Poruchy ve výživě cukrovky*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 128, č. 2, s. 56. ISSN 1210-3306.

Diviš, J., 2010: *Pěstování rostlin: (učební texty pro obor provozní podnikatel a pozemkové úpravy a převody nemovitostí)*, České Budějovice, 260 s. ISBN 978-80-7394-216-8.

Grzebisz, W., Musolf, R., Szczepaniak, W., 2005: *Agronomická a ekonomická reakce cukrovky na stres v obsahu draslíku a vody – polní simulační studie*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 121, č. 7-8, s. 222. ISSN 1210-3306.

Kováčová, M., Žáková, J., Žák, Š., 2002: *Čerpanie fosforu úrodou fytozmysy cukrovej repy v priebehu vegetačného obdobia pri rozdielnych agrotechnických zásahoch*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 118, č. 5-6, s. 131. ISSN 1210-3306.

Kováčová, M., 2003: *Účinnok fosforečného a draselného hnojenia na úrodu a kvalitu cukrovej repy*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 119, č. 9-10, s. 240. ISSN 1210-3306.

Kristek, A., Antunović, M., Brkić, S., Kanisek, J., 2003: *Vliv hnojení bórem a hořčíkem na list a výnosové prvky u cukrovky*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 119, č. 4, s. 106. ISSN 1210-3306.

Kulovaná, E., 2001: *Vliv animální a minerální výživy na metabolismus a technologickou jakost cukrovky*, dostupné na: www.agroweb.cz

Pulkrábek, J., 2007: *Řepa cukrová: pěstitelský rádce*, Praha, 64 s. ISBN 978-80-87111-00-0.

Pospišil, M., Pospišil, A., Sito, S., 2005: *Listová aplikace hnojiva Fertina B na cukrovku*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 121, č. 5-6, s. 174. ISSN 1210-3306.

Potop, V., Türkott, L., 2011: *Variabilita výnosů cukrovky ve vztahu k suchým a vlhkým obdobím*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 127, č. 11, s. 338. ISSN 1210-3306.

Potop, V., Türkott, L., 2011: *Variabilita výnosů cukrovky ve vztahu k suchým a vlhkým obdobím*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 127, č. 11, s. 338. ISSN 1210-3306.

Skalický, J., 1997: *Technika pro setí, pěstování a sklizeň cukrovky*, Praha, 55 s. ISBN 80-7105-156-X.

Stávková, J., Dufek, J., 2005: *Biometrika*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 194 s.

Zahradníček, J., 2003: *Technologická jakost cukrovky a vlivy na ni působící*, Listy cukrovarnické a řepařské, roč. 119, č. 12, s. 307. ISSN 1210-3306.

Zimolka, J., 2008: *Speciální produkce rostlinná – rostlinná výroba*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 245 s. ISBN 978-80-7375-230-9.

THE DYNAMIC OF MICROBIAL DEVELOPMENT IN THERAPEUTIC AGENT MADE OF ALOE

DYNAMIKA VÝVOJE MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH Z ALOE

Přichystalová J.¹, Kalhotka L.², Pellizzoni M.², Růžicková G.³

¹Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Institute of Agricultural and Environmental Chemistry, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 84. I-29122 Piacenza, Italy

³Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jitka@prichystal.eu

ABSTRACT

Aloe is succulent plant which is used for therapeutical impact. Aloe, with its chemical composition, can heal various skin burns and injuries, shows anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-tumorigenic effect.

Our objective was to set convenient storage on the base of growth of contaminating microflora. Therapeutical aloe agent, made by Dester Company (Italy) was provided for 47 days cultivation at two different temperatures (25 °C and 6 °C). These groups of microorganisms were monitored on set days – total counts of microorganisms, lactic acid bacteria, psychrotrophic bacteria, yeast and moulds. There were also samples which were kept closed and microbiological analyses were done after 47 day cultivation at two temperatures (6 °C and 25 °C). Microbiological analysis has revealed that therapeutical agent made of aloe can be stored at 6 °C for whole period.

Key words: aloe, microorganisms, storage, temperature, therapeutical agent

Acknowledgments: Special thanks belong to the Dester Company which funded this experiment and provided the samples.

ÚVOD

Na celém světě se vyskytuje přibližně 275 druhů aloe, nicméně pouze 3 druhy jsou komerčně využívány. Pravděpodobně nejčastějším druhem, který se vyskytuje v komerčních přípravcích, je *Aloe barbadensis* Miller známý také jako *Aloe vera*. Barva jeho trnitých listů se může lišit od zelené po šedou. Svým vzhledem aloe připomíná kaktus, ale ve skutečnosti připadá do čeledi *Liliaceae*, čímž je více podobný česneku nebo lilii. Pro aloe je typický žlutý květ (Gage, 1996).

Aloe se převážně vyskytuje v bylinné medicíně. Mnoho vědeckých studií prokazuje jeho léčivé účinky. Extrakty z aloe vera mohou být užity při léčení různých popálenin, ran, diabetu a zvýšené hladině lipidů v krvi. Tyto pozitivní účinky jsou připisovány přítomností látek jako jsou polysacharidy, antrachinony, C-glykosidy a lektiny.

U aloe je důležité rozlišovat mezi dvěma tekutinami s rozdílným působením na lidský organismus – průhledný gel a žlutý mýza vytékající z vnitřní části pokožky (Reynolds, 1999). Při produkci léčiv jsou od sebe separovány, aby se eliminoval nežádoucí dopad na zdraví.

Zeleno-žlutá mýza vytéká z pericyklických buněk a obsahuje značné množství aloinu (Langmead et al., 2004). Obsahuje antrachinony, které ve svém středu integrují molekulu antracenu. Mezi antrachinony pocházející z mýzy mohou být nalezeny aloin, barbaloin, aloe-emodin atd. Protirakovinné působení emodinu a aloe-emodinu způsobuje zejména indukce apoptické smrti nádorové buňky (Lee et al., 2001, Yeh et al., 2003). Japonský patent uvádí, že aloe-emodin pocházející z *Aloe arborescens* dokáže inhibovat mutagenezi (Inahata and Nakasugi, 1995).

Průhledný gel vytéká z parenchymatických buněk, které tvoří vnitřní část listu. Podporuje léčení, vyhlazuje a hydratuje kůži (Langmead et al., 2004; Reynolds, 1999). Nejdůležitějšími látkami gelu vykazujícími imunomodulační efekt jsou polysacharidy (Schechter, 1994). Aktivní polysacharid známý jako acetylovaná manosa nebo acemannan jsou jedněmi z nejzajímavějších látek objevených v aloe vera (Lourdes, 2008). Gel aloe působí antimikrobiálně, antifugálně, antivirovicky a antioxidačně (Klein a Penneys, 1988, Newton, 1987).

Během extrakce a výroby přípravků z aloe vera, může být gel kontaminován mikroorganismy, které jsou běžně přítomné na jeho listech (Coats, 1979). Růst a aktivita kontaminující mikroflóry může následně mít nežádoucí vliv na kvalitu a skladovatelnost konečného produktu (He et al., 2005).

MATERIÁL A METODIKA

Cílem experimentu bylo zjistit vhodné podmínky skladování léčivého přípravku z aloe. Přípravek byl dodán firmou Dester Company v Manerba del Garda (Brescia), která se specializuje v produkci aloe přípravku téměř 20 let. Rostliny, které byly využity pro výrobu přípravku byly pěstovány po tři roky ve sklenicích.

Složení aloe léčivého přípravku:

350g aloe

500g medu

50 ml alkoholu

Pro experiment byla využita plotnová metoda. Vzorky byly dodány ve 4 oddělených nádobách. Dvě sklenice byly ponechány uzavřené v termostatech a 2 sloužily k mikrobiologickým analýzám během skladování. Mikrobiologická analýza byla prováděna každý druhý den do 26. dne a každý pátý den do 47. dne skladování. Pro skladování byly vybrány dvě teploty – 6 °C prezentující teplotu v chladicím zařízení a 25 °C prezentující pokojovou teplotu.

Vzorky byly připraveny desetinným ředěním, čili 1 ml aloe přípravku byl zředěn 9 ml destilované vody. 1 ml příslušného ředění byl napipetován do petriho misky a zalit tekutým médiem viz Tab 1. Kolonie byly po uplynutí kultivační doby odečteny. Výsledky jsou vyjádřeny v koloniích tvořících jednotky na ml (KTJ/ml).

Tab. 1 Podmínky pro stanovení jednotlivých skupin mikroorganismů

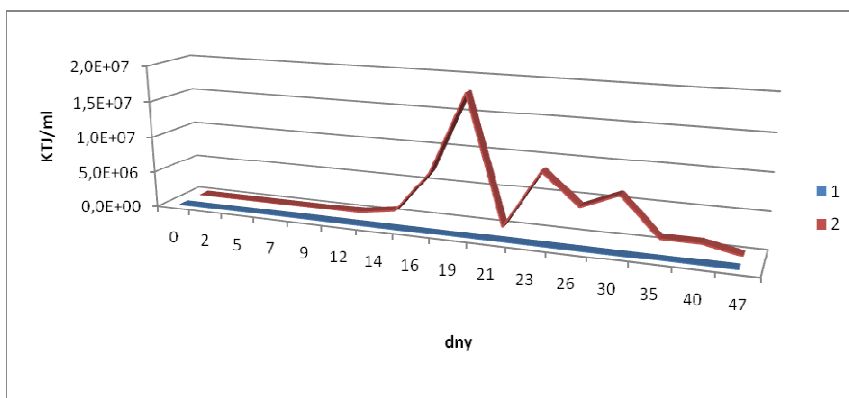
Skupiny mikroorganismů	Živné médium	Teplota kultivace	Délka kultivace
Celkový počet mikroorganismů	Plate count agar (Biokar Diagnostic, France)	30 °C	72 h
Bakterie mléčného kvašení	Meat broth rogosa (Biokar Diagnostic, France)	30 °C	72 h
Kvasinky	Medium with Chloramphenicol (Biokar Diagnostic, France)	25 °C	120 h
Plísně	Medium with chloramphenicol (Biokar Diagnostic, France)	25 °C	120 h
Koliformní bakterie	Violet Red Bile Glucose agar (Biokar Diagnostic, France)	37 °C	24 h
Psychrotrofní mikroorganismy	Plate Count Agar (Biokar Diagnostic, France)	6 °C	10 dnů

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky mikrobiologické analýzy během 47 dní

Nadzemní části rostlin jsou běžně kolonizovány různými bakteriemi, kvasinkami a mikromycetami. Zatímco některé bakterie jsou izolovány i z tkání rostlin, mnohem více mikroorganismů se nachází na povrchu listů. Nejpočetnější skupinou mikroorganismů vyskytujících se na povrchu listů jsou bakterie, v průměru se zde vyskytují až v množství $10^6 - 10^7$ (Lindow et Brandl, 2003). Při sledování celkového počtu mikroorganismů (viz Graf 1) lze s jistotou tvrdit, že pokojová teplota výrazně ovlivnila průběh rozvoje mikroflóry. U vzorku skladovaného při 25 °C se z jednotek mikroorganismů detekovaných v prvních dnech v 16. a 17. dni počet zvýšil o 7 řádů. Další dny analýz počty začaly klesat. Může to být způsobeno například vyčerpáním živin a hromaděním zplodin metabolismu mikroorganismů. Naproti tomu vzorek skladovaný při 6 °C si svou mikrobiologickou stabilitu uchoval po celou dobu skladování.

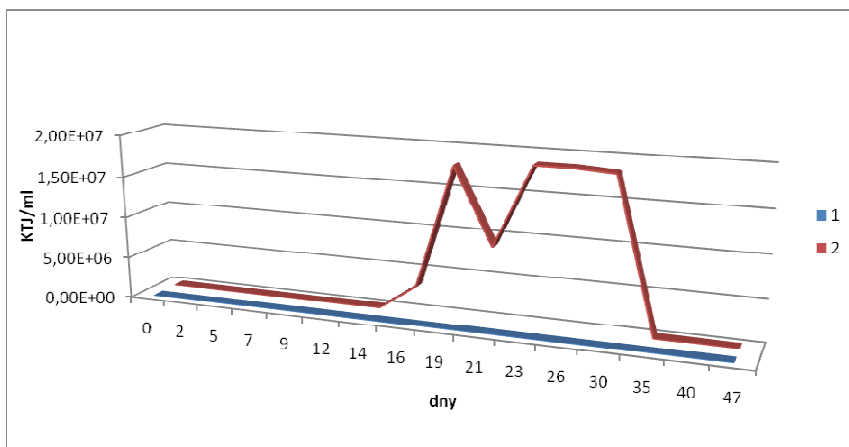
Graf 1 Celkový počet mikroorganismů během 47 dnů

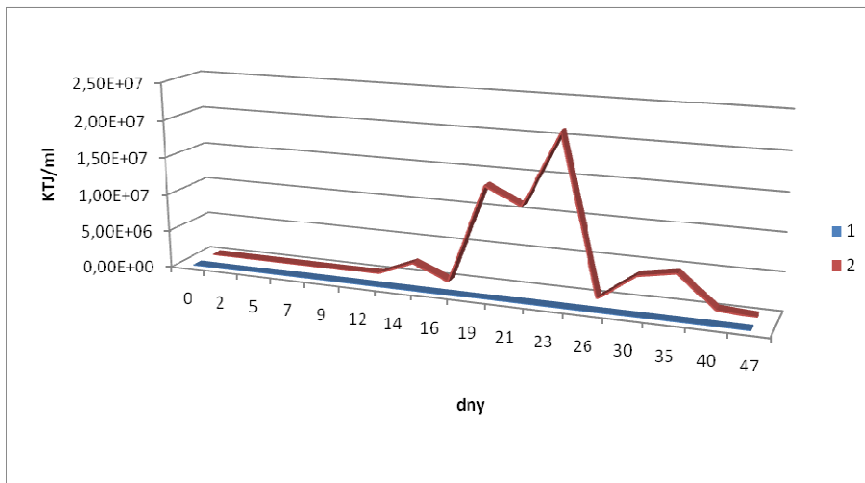


1 – vzorek skladovaný při 6 °C; 2 – vzorek skladovaný při 25 °C

Podobná situace nastala i u vývoje bakterií mléčného kvašení a kvasinek (viz Graf 2 a 3). Tyto dvě skupiny tak tvořili hlavní část všech mikroorganismů intenzivně se množících ve vzorku. Intenzivní rozvoj kvasinek při 25 °C je přičítán přítomnosti medu, který se skládá hlavně z glukosy a fruktosy a poskytuje tak kvasinkám kvalitní substrát pro jejich růst a množení. Kvasinky jsou mikroorganismy, které jsou oproti plísním poměrně aktivními obyvateli povrchu listu (Andrew et Harris, 2000). Bakterie mléčného kvašení a kvasinky dosáhly počtu až 10^7 přičemž následující dny jejich počet opět poklesl. Vzorky skladované při 6 °C vykazovaly velice nízké počty bakterií mléčného kvašení i kvasinek.

Graf 2 Počet bakterií mléčného kvašení během 47 dnů



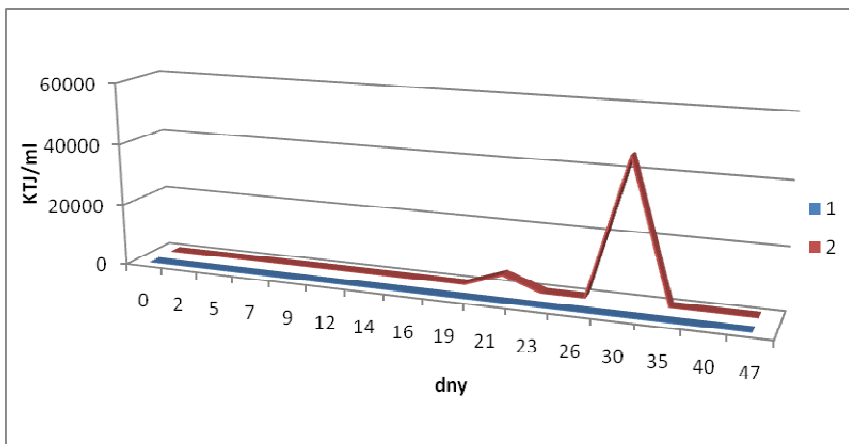


Počet psychrotrofních bakterií a plísní vzrostl u vzorků skladovaných při 25 °C jen krátkodobě viz Grafy 4 a 5. Plísně dosahovaly ve 30. dnu počtu 10^3 a psychrotrofní bakterie až 10^7 . Mezi psychrotrofní bakterie velice pravděpodobně patřily bakterie mléčného kvašení a kvasinky, které byly ve stejných dnech detekovány ve stejném množství.

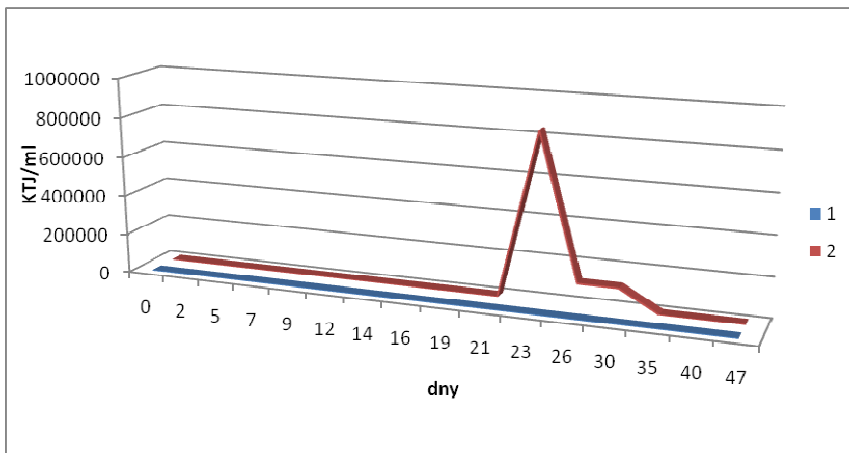
Počet plísní i psychrotrofních mikroorganismů u vzorků skladovaných při 6 °C byl detekován v řádech jednotek. Mikroskopické houby jsou považovány za přechodné obyvatelé povrchu listů a jsou zde přítomné ve formě spor (Andrew et Harris, 2000).

Koliformní bakterie nebyly v žádném vzorku detekovány. To svědčí o vysoké úrovni hygieny technologického procesu, jakým byly léčivé přípravky vyrobeny.

Graf 4 Počet plísní během 47 dnů



Graf 5 Počet psychrotrofních mikroorganismů během 47 dnů



Po uplynutí 47 dnů byly vzorky skladované při 25 °C senzoričky odlišné od vzorků skladovaných při 6 °C. Vzorky skladované při pokojové teplotě nevykazovaly znaky čerstvosti. Barva léčivých přípravků byla tmavší a vznikající oxid uhličitý způsoboval značnou perlivost přípravku. Znatelný byl i alkoholový zápach, který spolu s oxidem uhličitým byl vytvořen sacharolytickými kvasinkami. Vzorky skladované v chladicím zařízení oproti tomu nezměnily svou podobu ani vůni. Vzhledem k mikrobiální stabilitě aloe přípravků tedy lze usoudit na vhodnost skladování při teplotě 6 °C po celou dobu 47 dní.

Aloe díky své přirozené antimikrobiální aktivitě může potlačovat růst nežádoucích mikroorganismů. Spolupůsobící antimikrobiální látky, vyšší osmotický tlak způsobený přidávkem medu a přítomnost alkoholu tak mohou prodlužovat údržnost přípravku při vhodném skladování. Při různých studiích antimikrobiální aktivity aloe byly objeveny protichůdné výsledky (Reynolds, 1999). Mnohé studie potvrzují antimikrobiální aktivitu aloe proti mnohým mikroorganismům. Pro zjišťování antimikrobiální aktivity byl použit gel, míza i celý list. Aloe tak vykazovalo inhibiční efekt proti bakteriím *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium xerose*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (George et Pandalai, 1949; Gottshall et al., 1949; Lorenzetti et al., 1964; Soeda et al., 1966; Bruce, 1967; Hegggers et al., 1979; Heck et al., 1981; Robson et al., 1982; Levin et al., 1988; Stuart et al., 1997). Velice podrobná studie naopak vyvrací antimikrobiální aktivitu gelu i jiných látek z povrchu listu (Fly et Kiem, 1963).

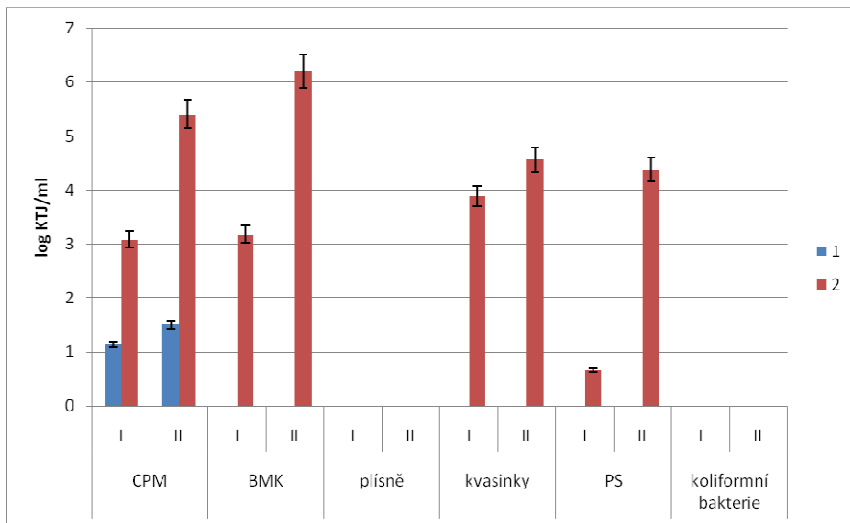
Srovnání uzavřených vzorků se vzorky používanými pro půběžnou mikrobiologickou analýzu

Po uplynutí doby 47 dnů byly uzavřené vzorky otevřeny a mikrobiologicky analyzovány. Výsledky srovnání poslední analýzy otevřených vzorků a analýzy uzavřených vzorku lze vidět v Grafu 6, kde jsou výsledky KJT uvedeny pro lepší přehlednost v logaritmické funkci.

Z Grafu 6 je patrné, že uzavřené vzorky skladované při 25 °C vykazovaly mnohem vyšší počty mikroorganismů všech skupin oproti vzorkům otevřeným. Lze to vysvětlit tím, že uzavřením vzorku byl zamezen přístup kyslíku a intenzivní růst mikroorganismů nastal mnohem později než u otevřených vzorků, kde byla většina mikroorganismů 47. den devitalizovaná vyčerpáním živin a nahromaděním zplodin metabolismu. Lze také usoudit na to, že vzorky během analýz nebyly kontaminovány a že vysoké počty mikroorganismů byly dosaženy intenzivním růstem endogenní mikroflóry.

Uzavřené vzorky skladované při 6 °C vykazovaly nepatrně vyšší počty ve srovnání s otevřenými vzorky. Rozdíl se ale pohybuje od 1 do 2 řádů celkového počtu mikroorganismů.

Graf 6 celkové srovnání otevřených a uzavřených po 47 dnech



CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, PS – psychrotrofní mikroorganismy
I – otevřené vzorky; II – vzorky uzavřené ; I - vzorky skladované při 6 °C ; 2 - vzorky skladované při 25 °C

ZÁVĚR

Z výsledků je patrné, že celkový počet mikroorganismů byl z větší části ovlivněn počty bakterií mléčného kvašení a kvasinkami. Koliformní bakterie nebyly vůbec detekovány. Ukazuje to na vysokou úroveň technologického procesu, hygieny a eliminaci sekundární kontaminace. Teplota skladování hraje důležitou roli při skladování léčivého přípravku z aloe. Intenzivní rozvoj a změny sensorické kvality (zápach, perlivost a pravděpodobná přítomnost alkoholu vzniklého fermentací sacharidů) byly zaznamenány u všech vzorků skladovaných při 25 °C.

Z výsledků je patrné, že otevřené i uzavřené vzorky byly mikrobiologicky stabilní během 47 dnů skladování při teplotě 6 °C. Léčivý přípravek z aloe skladovaný při 25 °C se kazil mnohem rychleji, proto jeho stabilita a kvalita nemůže být zaručena.

Je přirozené, že mikrobiální stabilita záleží i na hygienických návycích konzumentů, kteří do přípravku mohou vnášet kontaminaci. Při vhodné manipulaci a skladování by se počty mikroorganismů neměly výrazně zvyšovat po celou dobu trvanlivosti výrobku.

LITERATURA

- Andrews J. H. et Harris R. F. (2000): The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces, *Annu Rev. Phytopathology* 38: s. 145 - 180
- Coats, B.C., (1979): Hypoallergenic stabilized Aloe vera gel. US Patent 4, s. 178–372.
- Gage D. (1996): Aloe vera: Nature's soothing healer, Healing Arts Press, Vermont, 119 p.
- George, M., Pandalai, K.M., (1949): Investigations on plant antibiotics, Part IV. Further search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. *Indian Journal of Medical Research* 37, 169.
- Gottshall, R.Y., Lucas, E.H., Lickfeldt, A., Roberts, J.M., (1949): The occurrence of antibacterial substances active against *Mycobacterium tuberculosis* in seed plants. *Journal of Clinical Investigation* 28, 920–923.
- He, Q., Changhong, L., Kojo, E., Tian, Z., (2005): Quality and safety assurance in the processing of Aloe vera gel juice. *Food Control* 16, 95–104
- Heck, E., Head, M., Nowak, D., Helm, P., Baxter, C., (1981): Aloe vera (gel) cream as a topical treatment for outpatient burns. *Burns* 7, 291–294.
- Heggens, J.P., Pineless, G.R., Robson, M.C., (1979) Dermaide Aloe: *Aloe vera* Gel®: comparison of the antimicrobial effects. *Journal of American Medical Technologists* 41, 293– 294.
- Inahata K., Nakasugi T., (1995): Mutagenesis inhibitors, Japanese Patent JP 7053397
- Klein A.D., Penneys N.S. (1988): Aloe vera, *Journal of the American Academy of Dermatology* 18, p. 714–720
- Langmead L., Makins R. J., Rampton D. (1997): Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro *Drug Saf*, 17(5), p. 342-56.
- Lee H.Z., Hsu S.L., Liu M.C., Wu C.H. (2001): Effects and mechanisms of aloe emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma *Eur. J. Pharmacol.*, 431 (2001), pp. 287–295
- Levin, H., Hazenfratz, R., Friedman, J., Palevitch, D., Perl, M., (1988): Partial purification and some properties of an antibacterial compound from *Aloe bera*. *Phytotherapy Research* 2, 67–69.
- Lindow S., Brandl M., (2003): Microbiology of Phyllosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, s. 1875 - 1883
- Lorenzetti, L.J., Salisbury, R., Beal, J.L., Baldwin, J.N., (1964) Bacteriostatic property of *Aloe vera*. *Journal of Pharmaceutical Science* 53, 1287.
- Lourdes R., Jorge R., Scott B., Dea H., Eliseo T. (2004): Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México, *Aliment Pharmacol Ther.*, 19(5) 521-7
- Newton, L.E. (1987): On the suitability of Kenyan aloes for commercial cultivation, *East Africa Natural History Society Bulletin* 17, p. 5–8.

Reynolds T., Dweck A. C., (1999): Aloe vera leaf gel review, Journal of Ethno-Pharmacology, Elsevier science Ireland, p 3 – 37

Robson, M.C., Hegggers, J.P., Hagstrom, W.J., (1982): Myth, magic, withcraft or fact? Aloe vera revisited. Journal of Burn Care and Rehabilitation 3, 157–163.

Schechter S.R., (1994): Aloe vera:the healing plant. Health Foods Business, p. 23–24

Soeda, M., Otomo, M., Ome, M., Kawashima, K., (1966): Studies on anti-bacterial and anti-fungal activity of Cape Aloe. Nippon Saikingaku Zasshi 21, 609–614.

Stuart, R.W., Lefkowitz, D.L., Lincoln, J.A., Howard, K., Gelderman, M.P., Lefkowitz, S.S., (1997). Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant, acemannan. International Journal of Immunopharmacology 19, 75–82.

Yeh G., Eisenberg D., Kaptchuk T., Phillips R.(2003): Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes, Diabetes Care, 26(4) p. 1277-94.

EFFECT OF PALM OIL AND SALMON OIL ON FATTY ACIDS COMPOSITION IN THE TISSUES OF RATS

VLIV PŘÍDAVKU PALMOVÉHO A LOSOSOVÉHO OLEJE NA ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V TKÁNÍCH POTKANA

Rozíková V., Zorníková G., Gregor T., Komprda T., Krobot R.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xrozikov@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of our study was to compare the effect of intake fatty acids on animal organism. Higher content of polyunsaturated fatty acids leads to decrease cholesterol and HDL cholesterol. It should prove to increase of LDL cholesterol level. 30 rats were used in our experiment. They were divided in 3 groups: control group, group with 3% addition of salmon oil a group with 3% addition of palm oil. Palm oil mainly contains saturated fatty acids (palmitic acid, 39.8%). Salmon oil contains physiologically important compounds (linolenic acid, EPA and DHA). The samples were taken after 48 days. Liver, fat and muscle tissues were analyzed by gas chromatography. Determination of cholesterol was performed in animal blood. The results confirmed our mentioned prediction. The highest content of polyunsaturated acids was in the group with addition of salmon oil. This group was achieved significantly reduction in total cholesterol and HDL cholesterol. Significant increase in LDL cholesterol fraction was not proved.

Key words: palm oil, salmon oil, fatty acids, gas chromatography

Acknowledgments: This project was made with support of Internal Grant Agency of Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, TP2/2011 “The effect of feed additives for livestock on their metabolism, the utilization absorbency of clay substrates in the animal and plant production”.

ÚVOD

Studie je založená na ovlivnění zastoupení mastných kyselin v tkáních laboratorních krys přidáním palmového a lososového oleje do krmiva a jejich vliv na celkový cholesterol, LDL a HDL frakce. Pro živočišný organismus jsou esenciálními kyselinami linolová a α -linolenová. Linolenová kyselina (LNA) je výchozím metabolitem pro n-3 řady, mezi které patří eikopentanová (EPA, 20: n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6 n-3) kyselina. Linolová kyselina je výchozím metabolitem n-6 řady, např. kyselina arachidonová (20:4 n-6). EPA a DHA působí protektivně na kardiovaskulární systém, zvýšený příjem LNA má za následek snížení agregace trombocytů, zvýšení vazodilatace nebo zvýšení HDL- cholesterolu (Komprda, 2007). Důležitý je poměr mezi n3/n6 kyselinami ve stravě a měl by být 2/5, ideální poměr 1/1.

Pro porovnání vlivu krmiva na zastoupení mastných kyselin v tkáních živočišného organismu je zkoumána skupina laboratorních krys, která má do stravy přidáno 3% palmového oleje. Tento olej obsahuje vysoké množství zejména laurové a palmitové kyseliny. Z hlediska zastoupení mastných kyselin má olej převahu nasycených mastných kyselin, jež je vhodné pro kulinární a technologické zpracování, ale ze zdravotního hlediska přispívá ke zvyšování cholesterolu a následně i k arteroskleróze. Množství palmitové kyseliny je v palmovém oleji trojnásobně zvýšené oproti lososovému oleji.

Důsledek vlivu stravy na zastoupení mastných kyselin byl porovnáván mezi skupinami a mezi jednotlivými tkáněmi. Ve viscerální tukové tkáni je předpokládán nízké zastoupení polynenasycených kyselin, jelikož tukové zásoby jsou ukládány ve formě nasycených mastných kyselin kvůli svým fyzikálním vlastnostem. Nadvarlatový tuk obsahuje průměrně 60-75% tuku. Ve svalové tkáni krys je intramuskulární tuk v množství 3-4%. Jaterní tkáň je složena z 2-4% tuku.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu byli zařazeni dospělí samci laboratorního potkana outbredního kmene Wistar albino z SPF chovu společnosti BioTest s.r.o., Konárovice. Pokus probíhal 48 dní. Zvířata (n=30) byla rozdělena po 10 kusech do 3 pokusných skupin s odlišným druhem krmiva. Zvířata byla ustájena po 5 kusech v plastových boxech a z důvodu identifikace zvířat byla barevně označena na různých částech těla. V pokusné laboratoři byla udržována teplota $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, vlhkost vzduchu 60% a světelný režim 12 hodin světlo a 12 hodin tma o maximální intenzitě 200 lx.

Výchozím krmivem byla kompletní krmná směs pro myši a potkany od firmy Biokron (Blučina, kontrolní skupina), u dalších skupin bylo po šrotování přimícháno 3% palmového oleje (PAL), 3% lososového oleje (LOS). Z namíchaných krmných směsí byly odebírány vzorky pro analytické

stanovení obsahu mastných kyselin. Zvířata byla krmena každý den ad libitum a také byl zajištěn adlibitní příjem pitné vody.

Po ukončení pokusu byly u všech zvířat odebírány vzorky krve do heparinových zkumavek (Dispolab), u kterých byly provedeny analýzy na koncentraci celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a triacylglycerolů. Dále byly odebírány vzorky jater, stehenního svalu a viscerálního tuku pro analytické stanovení obsahu mastných kyselin.

Každý vzorek tkáně (jaterní, svalové a tukové) pro stanovení mastných kyselin byl před extrakcí lyofilizován. Extrakce jednotlivých vzorků probíhala metodou Hara a Radin v rozpouštědle hexan: isopropanol (HIP). Gravimetricky byl stanoven obsah tuku ve vzorku. Navážka čistého vzorku byla rozpuštěna ve 3 ml isooktanu obsahujícího kyselinu pentadekanovou jako vnitřní standard ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$) a 1 ml 1% roztoku butylhydroxytoulenu v metanolu jako antioxidant. Derivatizace mastných kyselin byla provedena dle metody uvedené ve studii Komprda et al. (1999), která vychází z postupů Morrison a Smith (1964), Banon et al. (1982), Ichihara et al. (1996) a Sattler et al. (1996).

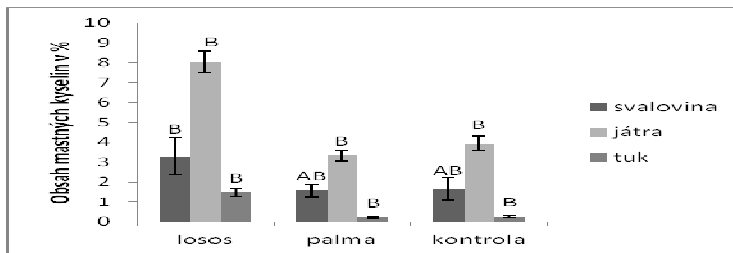
Stanovení příslušných methylesterů mastných kyselin bylo provedeno na plynovém chromatografu GC HP 6890 s plamenově-ionizačním detektorem (FID), kapilární kolona Innowax 30m x 0.25 mm x 0.25um (Agilent Technologies, J & W Scientific, USA). Teplota injektoru 260 °C, teplota detektoru (FID) 275°C, teplotní program: 150°C/1 min., gradient 10°C na teplotu 200°C, následně gradient 3°C/min na teplotu 260°C/3 min. Nosný plyn N_2 , průtok 1 ml/min, tlak 145 kPa, split 60:1, nástřik 1µl. Pro identifikaci Fame byl použit standard PUFA No.2, 47015-U (Supelco, Bellefonte, USA).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Kvalitativní a kvantitativní zastoupení mastných kyselin závisí na přijaté stravě a na následné konverzi živin, která je ovlivněna řadou faktorů: metabolismem, věkem, ročním obdobím, teplotou a délkou světla a chemickou formou, ve které jsou živiny podávány.

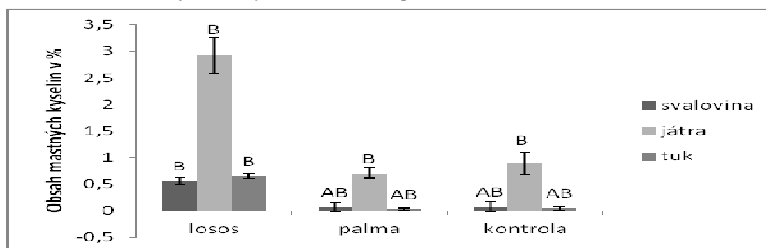
V rámci vyhodnocení jsme srovnávali množství MK mezi skupinami a v jakém poměru se přídavek palmového a lososového oleje projevil v jednotlivých tkáních a změnil poměr jednotlivých mastných kyselin. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica 9.0.

Obr. 1 Obsah DHA v jednotlivých tkáních a skupinách krmiv

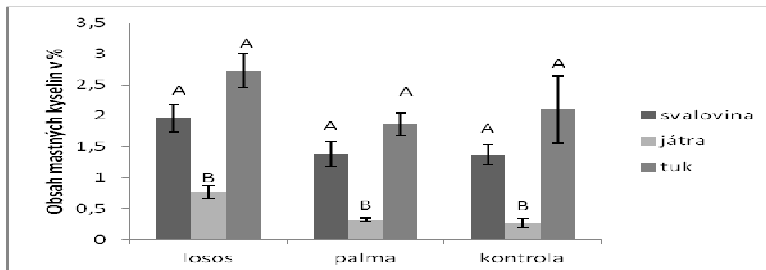


Dokosahexaenová kyselina má vysoké zastoupení u skupiny s přidavkem lososového oleje, což bylo statisticky vysoce potvrzené ($P < 0,001$) ve srovnání s ostatními skupinami ve tkáni tukové, jaterní a svalovině. Stejně vysoce průkazné rozdíly ($P < 0,001$) jako pro výše uvedenou eikosapentaenovou kyselinu jsou mezi skupinou kontrolní a skupinou s přidavkem palmového oleje, kde je prokazatelně nižší obsah, v tukové a jaterní tkáni. Tento rozdíl je pro svalovou tkáň neprůkazný ($P < 0,05$).

Obr.2 Obsah EPA v jednotlivých tkáních a skupinách krmiv

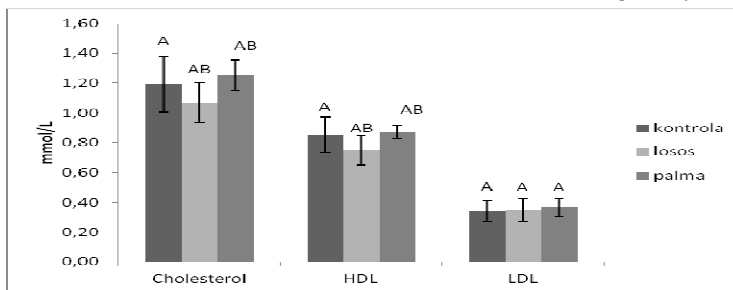


Ve statistickém zpracování rozdílů množství pro eikosapentaenovou kyselinu bylo ve tkáni tukové a jaterní naměřeno vysoce průkazné rozdíly ($P < 0,05$) mezi skupinou kontrolní a skupinou s přidavkem lososového oleje a skupinou s přidavkem palmového oleje a skupinou s přidavkem lososového oleje, ve které bylo zastoupeno její nejvyšší množství. Neprůkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi skupinou kontrolní a s přidavkem palmového oleje, kde se očekávalo průkazně nižší množství oproti skupině kontrolní. V jaterní tkáni jsou statisticky vysoce průkazné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,001$) dle prvotní teze a to, že navýšení EPA je u skupiny s přidavkem lososového oleje oproti skupině kontrolní a ve skupině s přidavkem palmového oleje je množství nižší než u skupiny kontrolní.

Obr.3 Obsah α -linolenové kyseliny v jednotlivých tkáních a skupinách krmiv

Vysoce průkazné rozdíly ($P < 0,001$) mezi jednotlivými skupinami byly zanalyzovány v jaterní tkáni pro α -linolenovou kyselinu. Nejvyšší zastoupení měla skupina s přidavkem lososového oleje proti kontrolní skupině a skupině s přidavkem palmového oleje. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s přidavkem palmového oleje nebyl statisticky prokázán. Kvantitativní rozdíly mezi skupinami nebyly v tukové ani svalové tkáni zaznamenány ($P < 0,05$).

Obr.4 Obsah celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu v krevní plazmě jednotlivých skupin



Vliv mastných kyselin na celkový cholesterol, HDL a LDL byl částečně prokázán. Statistické rozdíly ($P < 0,05$) byly naměřeny mezi skupinou s přidavkem palmového a lososového oleje u celkového cholesterolu a HDL frakce, kde skupina s přidavkem palmového oleje, tedy vysokým zastoupením nasycených mastných kyselin, měla oba parametry průkazně vyšší. Porovnání parametrů s kontrolní skupinou bylo neprůkazné. LDL frakce cholesterolu neměla průkazné snížení se zvyšujícím se obsahem polynenasycených mastných kyselin. Pro tento parametr nebylo kvantitativní zastoupení průkazné srovnáním mezi skupinami.

Lososový olej nebo obecně rybí olej je využíván ve studiích pro vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin, kde je zkoumán vliv na ochranu proti civilizačním chorobám. V experimentální studii na lidských dobrovolnících byl pozorován účinek rybího oleje jako prostředku pro ochranu tlustého střeva proti karcinogenezi. Analyzované byly 3 skupiny po 12 dobrovolnících po dobu 4 týdnů, kdy první skupina užívala (4,4g) rybího oleje, druhá skupina ve stejném množství kukuřičného oleje a třetí skupina byla kontrolní. Závěrem studie uvádí, že skupina užívající rybí olej měla prokazatelně nižší bromodeoxyuridine index i ornitin dekarboxylázovou aktivitu než

skupina užívající kukuřičný olej. Výsledky potvrzují jejich hypotézu, že rybí olej může chránit před rakovinou tlustého střeva. Tato studie nepřímo potvrzuje naši studii, že rybí olej slouží k ochraně proti civilizačním chorobám jakou je rakovina nebo vysoký cholesterol.

Ve studii (*Shiba a kol., 2011*) měli v rámci svého projektu pokus založený na námi analyzované predikci jako byl náš experiment. Pokus zkoumal účinek DHA a EPA jako regulátory metabolismu lipidů enzymatickou činností vedoucí ke snížení celkového cholesterolu. Pokusné skupiny myši (6 týdnů) byly krmeny rybím olejem, hydrogenovaným olejem, jež obsahoval nasycené mastné kyseliny a sojovým olejem. Analyzovanými tkáněmi byly rovněž jaterní, tuková a krev měřené plynovou chromatografií. Závěr této studii je podobný se závěrem našeho experimentu, ve kterém skupiny, v jejichž dietě nebyl obsažen rybí olej, vykazovaly zvýšené hodnoty nasycených mastných kyselin.

Experiment (*Chowdhury, 2007*) analyzoval 5 druhů rostlinných olej (sojový, hořčičný, slunečnicový, palmový a kokosový) pěstovaných za různých podmínek k ovlivnění poměru nasycených a nenasyčených mastných kyselin. Mastné kyseliny byly stanoveny plynovou chromatografií s plamenově-ionizačním detektorem. Výsledkem pokusu bylo docílení a zvýšení poměru mononenasycených (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) k nasyceným mastným kyselinám. Nejvyšší poměr MUFA+PUFA bylo u slunečnicového oleje (91,5%), následně v hořčičném oleji (86,2%), sojovém oleji (81,1%). U palmového oleje bylo dosaženo MUFA+PUFA 53,30% a nejnižší zastoupení bylo pro kokosový olej (7,1%). Zastoupení MUFA+PUFA palmového oleje užitého v našem experimentu bylo 54,5%.

Celkovým shrnutím našich výsledků s výsledky uvedených článků jsme dospěli k podobným závěrům

ZÁVĚR

Z výše uvedených hodnot lze celkově shrnout, že odpovídají našim predikcím. Skupina s přidavkem lososového oleje vykazovala nejvyšší množství EPA a DHA v testovaných tkáních. V jaterní tkáni kvantitativní zastoupení činilo nejvyšší poměr, což je dáno účastí EPA a DHA v játrech jako regulátory metabolismu lipidů. Celkově množství DHA dvojnásobně převyšovalo druhý metabolit tvořený z α -linolenové kyseliny, EPA. Obsah α -linolenové kyseliny byl v nejvyšším množství stanoven v tukové tkáni a následně ve svalovině a jaterní tkáni u skupiny krmené lososovým olejem, tedy v opačném pořadí než její metabolity. Dle našich očekávání zvýšený obsah polynenasycených mastných kyselin ve stravě vedlo ke snížení celkového a HDL cholesterolu u skupiny s přidavkem lososového oleje. Skupina kontrolní měla celkový a HDL cholesterol průkazně nižší než skupina s přidavkem palmového oleje. Můžeme tímto odvodit, že zvýšený obsah nasycených mastných kyselin ve stravě vede i ke zvýšení celkového a HDL cholesterolu. Statisticky prokazatelné nebylo ovlivnění ve stravě obsažený zvýšený poměr nasycených ani nenasyčených mastných kyselin.

LITERATURA

Bartram HP, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao CV, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H.(1993): Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E2 release in healthy subjects, Department of Medicine, University of Würzburg, Germany.

Gastroenterology (105(5):1317-1322).

Shiba, S. and col. (2011): Unsaturated fatty acids in fish oil play a role adequate fat distribution to plasma, liver and white adipose tissue, Journal of Health Science, 57(4) 341-349.

Chowdhury, K., Banu, L.A., Khan, S., Latif, A. (2007): Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 42(3), 311-316.

Komprda, T.: Výživa člověka, skripta MZLU, 2007, Brno, 162 stran.

Rozíková, V.: Plynová chromatografie esterů mastných kyselin ve vybraných druzích potravin, AF Mendelu, 2010, Diplomová práce, 83 s.

DETERMINATION OF SMEAR-RIPENED CHEESE TEXTURAL PROPERTIES BY OBJECTIVE METHODS IN DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

STANOVENÍ TEXTURNÍCH VLASTNOSTÍ SÝRU ZRAJÍCÍHO POD MAZEM OBJEKTIVNÍMI METODAMI PŘI RŮZNÝCH ZPŮSOBECH SKLADOVÁNÍ

Strnková J., Nedomová Š., Cwiková O.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 631 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xstrnkol@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to observe textural Olomouc Curd Cheese properties stored in different temperature conditions and find the optimal storage method in terms of the final cheese texture. The samples of Olomouc Curd Cheese were stored in different conditions (cooling and cooling/freezing combination). The rod probe penetration tests by TIRATEST 27025 were used. Cooling (A) was evaluated as the best storage method in terms of the Olomouc Curd Cheese final texture. The Olomouc Curd Cheese where devoured in a homogeneous consistency throughout its volume – hardness in range from 1.26 to 2.15 N. The optimal ripening was not achieved for the cooling/short-term freezing (B) storage method. The Olomouc Curd Cheese had inhomogeneous structure – hardness in range from 1.38 to 1.72 N. This storage method is not suitable in terms of Olomouc Curd Cheese texture. In terms of textural properties cooling/long-term freezing (C) storage method was evaluated as statistically equivalent to the cooling storage method (A) – hardness in range from 1.24 to 1.30 N.

Key words: Olomouc Curd Cheese, penetration, hardness, storing

ÚVOD

Texturní vlastnosti sýru patří mezi nejdůležitější charakteristiky vypovídající o jeho senzorycké kvalitě spolu s jeho chutí a vůní. Každý druh sýru je specifický svou chutí, vůní, barvou a v neposlední řadě právě texturou.

Texturou sýrů rozumíme souhrn všech fyzikálních vlastností vnímatelných dotykem, zrakem nebo sluchem (Fox *et al.*, 2004). Texturní vlastnosti sýrů mají vliv na senzoryckou jakost pro konzumenta, chování při přípravě u spotřebitele (krájení, strouhání) a technologické vlastnosti - stálost tvaru, odolnost proti deformacím, tvorbu ok či prasklin (Prentice *et al.*, 1993). Fyzikální vlastnosti sýrů (stejně jako aroma) jsou ovlivněny řadou faktorů, mezi něž patří např. složení mléka, kvalita mléka, teplota, rychlost a míra okyselování podle zvolené startovací kultury, koncentrace solí vápníku (podíl rozpustné a nerozpustné formy), rozsah proteolýzy, výrobní postup, podmínky zrání atd. (Němcová *et al.*, 1999). Fyzikální vlastnosti sýrů jako např. textura či barva, jsou primárně určeny interakcí kaseinových molekul (Lucey *et al.*, 2003).

Pravé olomoucké tvarůžky získaly v polovině roku 2010 chráněné zeměpisné označení Evropské unie. Výroba Pravých olomouckých tvarůžků začíná přípravou suroviny, následuje formování tvarůžků, jejich sušení, koupání, rolování, zrání a balení. Cílem přípravy suroviny je promíchání tvarohů ve stanovených váhových poměrech společně s regulátory kyselosti, kuchyňskou solí, mlékařskými kulturami a přidavkem pitné vody v homogenní formovací směs a mletí směsi na požadovanou konzistenci. Formování tvarůžků se provádí na formovačkách, kdy je tvaroh dopraven do násypného koše formovačky, v němž je promíchán pomocí šnekových nožů. Tvaroh padá na válec formovačky a je vytlačován do formy, která formuje tvarůžky předepsaného tvaru, hmotnosti a velikosti. Sušením, při kterém dochází pomocí výměny vzduchu ke zvýšení obsahu sušiny a rozvoji proteolytické mikroflóry na povrchu polotovaru, začíná první fáze zrání tvarůžků. Po dosažení optimálního povrchového pH se tvarůžky musí zbavit povrchové oxidační mikroflóry omytím povrchu. Praní se provádí ve speciálních strojních pračkách. Tvarůžky se rolují do válečků po 5 kusech do dřevěných zracích beden. Zrání tvarůžků je složitý enzymatický proces, převážně se jedná o enzymové odbourávání laktózy a bílkovin (někdy i tuků). Rozkladem bílkovin dochází k tvorbě typické chuti, vůně a mazu. Během zrání sýrů dochází k řadě biochemických změn, které se odrážejí nejen v senzoryckých vlastnostech, ale i ve vlastnostech texturních. Vývin správné chuti, vůně a konzistence sýrů je určen především chemickými a fyzikálními změnami jednotlivých složek sýrů (Kněz a Sedláčková, 1992). Tvarůžky se balí prozrálé do 1/3 na řezu, zabalené balíčky se po kontrole ukládají do krabic a dopravují se do chladiřenského skladu. V průběhu skladování a expedice tvarůžky dále dozrávají. Reologické vlastnosti sýrů závisí na stupni proteolýzy. Během

zrání dochází k chemickým a fyzikálním změnám (pH, rozklad bílkovin), kdy čerstvě vyrobené sýry ztrácí pevnost, tvarohovitost a stávají se měkčími (Romdhane a Dufour, 2003). V obchodní síti je nutné uchovávat tvarůžky při teplotě do 10 °C, datum minimální trvanlivosti je 35 dnů od data výroby.

Cílem této práce bylo zhodnocení texturních vlastností Pravých olomouckých tvarůžků, které mají své specifické vlastnosti v podobě rychle se měnící konzistence v průběhu zrání a nízké tvrdosti, skladovaných různými způsoby (teplotními režimy) jako modelových situací pro vývoz do vzdálených zemí a nalezení nejvhodnějšího způsobu skladování s ohledem na optimální texturní vlastnosti tvarůžků.

MATERIÁL A METODIKA

V této práci byly sledovány texturní vlastnosti sýru zrajícího pod mazem s názvem Pravé olomoucké tvarůžky. Vzorky, tvaru „koleček“, zabalené ve spotřebitelském obalu (100 g, 5 ks), pocházely z výrobního podniku v Lošticích. Základní složení vzorků Olomouckých tvarůžků je uvedeno v tab. 1. Do laboratoře byly vzorky dopraveny chladícím vozem a dále byly skladovány třemi různými způsoby.

Tab. 1 Základní složení Olomouckých tvarůžků

Složení	[%]
bílkoviny	29
sacharidy	1
tuk	0,6
sůl	max. 5,5
sušina	33

Vzorky A (značeny jako „chlazené“) byly po výrobě skladovány v chladničce při teplotě 6 °C po celou dobu minimální trvanlivosti, tj. 35 dnů a dva týdny po ukončení minimální trvanlivosti, tj. 49 dnů. Odběry vzorků a následné stanovení byly provedeny v den výroby (A/0), na konci data minimální trvanlivosti (A/35), dva týdny po ukončení data minimální trvanlivosti (A/49). Vzorky B (značeny jako „chlazené/krátkodobě zmražené“) byly skladovány po výrobě v chladničce při teplotě 6 °C po dobu 21 dnů, poté byly zmrazeny na dobu 7 dnů při teplotě -18 °C. Následně byly skladovány dalších 7 dnů (pro vzorek B/35) a 14 dnů (pro vzorek B/49) při chladírenské teplotě 6 °C, pak byly rozmrazeny. Odběry vzorků a následné stanovení byly provedeny na konci data minimální trvanlivosti (B/35), dva týdny po ukončení data minimální trvanlivosti (B/49). Vzorky C (značeny jako „chlazené/dlouhodobě zmražené“) byly skladovány po výrobě v chladničce při teplotě 6 °C po celou dobu minimální trvanlivosti, tj. 35 dnů a následně zmrazeny při teplotě -18 °C na dobu 49 dnů. Dalších 7 dnů byly skladovány při chladírenské teplotě 6 °C, pak rozmrazeny a analyzovány. Odběry vzorků a následné stanovení byly provedeny osm týdnů po ukončení data minimální trvanlivosti (C/91).

Měření tvrdosti sýru zrajícího pod mazem bylo provedeno pomocí přístroje TIRATEST 27025 penetračním testem pomocí sondy válcového tvaru s rovným zakončením. Pro zajištění reprezentativnosti vzorků bylo z každého balení odebráno vždy jiné kolečko tvarůžku, tj. z prvního balení bylo odebráno první kolečko v pořadí, z druhého balení druhé kolečko v pořadí, ze třetího balení třetí kolečko v pořadí, ze čtvrtého balení čtvrté kolečko v pořadí a z pátého balení páté kolečko v pořadí. Stanovení texturních vlastností bylo prováděno vzhledem ke struktuře tvarůžků a charakteru prozrávání zvlášť pro okraj (značeno „o“) a zvlášť pro střed tvarůžku (značeno „s“). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny metodou jednofaktorové analýzy rozptylu a mnohonásobným porovnáním podle Tukeyova testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejvyšší tvrdost ze všech vzorků byla zjištěna u vzorku ihned po výrobě (A/0), a to ve středu i na okraji tvarůžku. Tvrdost vzorků skladovaných způsobem chlazení (A) se pohybovala v rozpětí 1,26 až 2,15 N. Hodnoty tvrdosti naměřené u chlazeného vzorku na konci data minimální trvanlivosti (A/35) a chlazeného vzorku, kde bylo provedeno stanovení dva týdny po ukončení data minimální trvanlivosti (A/49) byly téměř shodné (ve středové i okrajové části), což znamená prozráání tvarůžku do homogenní konzistence v celém jeho objemu. Skladováním způsobem chlazení (A) tedy dochází k optimálnímu a nepřerušovanému dozrání. Z výsledků vyplývá, že v průběhu zrání dochází ke snižování tvrdosti tvarůžků, což shodně uvádí i Cwíková a Nedomová (2007) a také Karoui a Dufour (2003).

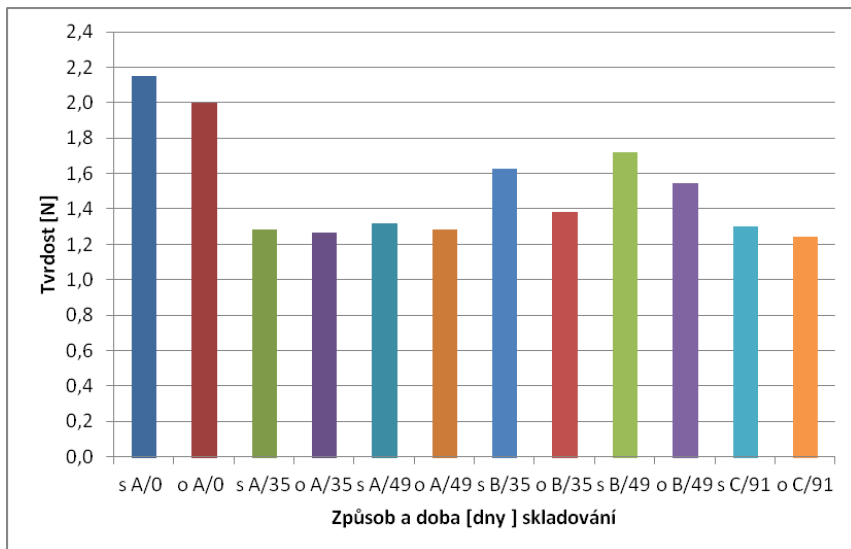
U vzorků skladovaných způsobem chlazení/krátkodobé zmražení (B) byla tvrdost středové části podstatně vyšší než okrajové, a to jak u vzorku, u něž bylo provedeno stanovení dva týdny po ukončení data minimální trvanlivosti (B/49), tak i u vzorku, kde bylo provedeno stanovení na konci data minimální trvanlivosti (B/35). Tvrdost vzorků skladovaných způsobem chlazení/krátkodobé zmražení (B) se pohybovala v rozpětí 1,38 až 1,72 N. Při uvedeném způsobu skladování vykazovaly tvarůžky značnou nevyrovnanost v textuře okraje a středu – nedochází tedy k optimálnímu prozrávání tvarůžků, které pak mají nehomogenní strukturu. Způsob skladování chlazení/krátkodobé zmražení (B) není tedy z hlediska výsledné textury tvarůžků příliš vhodný.

U vzorku skladovaného způsobem chlazení/dlouhodobé zmražení (C/91) vykazovala středová i okrajová část podobné hodnoty tvrdosti, z čehož vyplývá, že tvarůžky již prozrály do homogenní konzistence. Tvrdost vzorků skladovaných způsobem chlazení/dlouhodobé zmražení (C) se pohybovala v rozpětí 1,24 až 1,30 N. Chlazený/dlouhodobě zmražený vzorek (C/91) se v parametrech tvrdosti přibližoval vzorkům skladovaným v chladničce (A/35 a A/49), tedy odpovídal prozrálým tvarůžkům. Zároveň se avšak statisticky průkazně ($P < 0,05$) lišil od vzorků skladovaných způsobem chlazení/krátkodobé zmražení (B/35 a B/49).

Na texturu tvarůžků má tedy významný vliv způsob skladování. Díky zmražení dochází k zastavení zrajícího procesu, který se opět obnoví až po ukončení zmrazování. Při skladování v chladničce (A/35 a A/49) dochází k vyššímu poklesu tvrdosti od dne výroby než je tomu v případě, kdy se

vzorky na 7 dnů zamrazí (B/35 a B/49). Statistické vyhodnocení průkaznosti rozdílů tvrdosti tvarůžků při různém způsobu a délce skladování je uvedeno v tab. 2.

Obr. 1 Tvrdost Olomouckých tvarůžků skladovaných způsobem uvedeným pro vzorky (A), (B) a (C) po dobu 35 dnů (A/35), (B/35), 49 dnů (A/49) a (B/49), 91 dnů (C/91) a ihned po výrobě (A/0)



Tab. 2 Statistická průkaznost rozdílu tvrdosti tvarůžků stanovené penetračním testem v různých režimech skladování

Způsob skladování	s A/0	o A/0	s A/35	o A/35	s A/49	o A/49	s B/35	o B/35	s B/49	o B/49	s C/91	o C/91
s A/0		NS	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
o A/0	NS		**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**
s A/35	**	**		NS	NS	NS	**	NS	**	*	NS	NS
o A/35	**	**	NS		NS	NS	**	NS	**	*	NS	NS
s A/49	**	**	NS	NS		NS	**	NS	**	**	NS	NS
o A/49	**	**	NS	NS	NS		**	NS	**	**	NS	NS
s B/35	**	**	**	**	**	**		**	NS	NS	**	**
o B/35	**	**	NS	NS	NS	NS	**		**	NS	NS	NS
s B/49	**	NS	**	**	**	**	NS	**		NS	**	**
o B/49	**	**	*	*	**	**	NS	NS	NS		*	**
s C/91	**	**	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	*		NS
o C/91	**	**	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	**	NS	

P<0,05 *, P<0,01**, NS – statisticky neprůkazný rozdíl

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovení a zhodnocení texturních vlastností Pravých olomouckých tvarůžků skladovaných v různých teplotních režimech a nalezení optimálního způsobu skladování z hlediska výsledné textury tvarůžků. Textura Pravých olomouckých tvarůžků patří společně s jejich chutí, vůní a barvou k nejdůležitějším kritériím, které vypovídají o jejich výsledné kvalitě a také se podílí na rozhodnutí spotřebitele o koupi a přijetí výrobku. Výsledky této práce nepotvrdily obecně vžitý předpoklad, že uchování výrobků tohoto typu jiným než tradičním způsobem (chlazením) je nemožné z důvodu výrazného zhoršení jejich texturních vlastností. Způsoby skladování chlazení (A) a chlazení/dlouhodobé zmrazení (C) byly statisticky vyhodnoceny jako ekvivalentní z hlediska texturních vlastností. Získané výsledky budou využity pro rozšíření možnosti exportu Olomouckých tvarůžků do vzdálenějších zemí.

LITERATURA

Cwiková O., Nedomová, Š. (2007): Vliv délky zrání Olomouckých tvarůžků na jejich senzorní a texturní vlastnosti. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55(5): 45-50.

Fox P. F., Mc Sweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (2004): *Chemistry, Physics and Microbiology*. London: Elsevier Academic Press, 434s. ISBN 0-1226-3653-8.

Karoui R., DUFOUR, E. (2003): Dynamic testing rheology and fluorescence spectroscopy investigations of surface to centre differences in ripened soft cheeses. *International Dairy Journal*, 13(12): 973–985.

Kněz V., Sedláčková H. (1992): *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. 336s.

Lucey J. A., Johnson M. E., Horne D. S. (2003): Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9): 2725 - 2743.

Němcová L., Štětina J., Piska I. (1999): Srovnání reologických vlastností tvrdých a polotvrdých sýrů, In: *Celostátní přehlídka sýrů* Praha: Česká společnost chemická, s. 46–54. ISBN 90-86238-02-4.

Prentice J.H., Langley K. R., Marshall R.J. (1993): *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*. Chapman and Hall, London, vol. 1, s. 303–340.

Romdhane K., Dufour E. (2003): Dynamic testing and fluorescence spectroscopy investigations of surface to centre differences in ripened soft cheeses. *International Dairy Journal*, 13(12): 973–985.

INFLUENCE OF THE TECHNOLOGY OF CULTIVATION ON THE QUALITY OF POTATO TUBERS VARIETIES OF RED ANNA AND KARIN

VLIV TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ BRAMBOR NA KVALITU HLÍZ
ODRŮD RED ANNA A KARIN

Sýkora V., Strnková J., Nedomová Š., Jůzl M.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 631 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xsykora3@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to observe two different types fertilizers (urease inhibitor and conventional urea) and their effect on the potato tubers. This work observed and evaluated the color of potatoes (spectroscopy in CIELAB system), starch (Ewers polarimetric method), rheological characteristics (TIRATEST) and table value of potatoes. There were evaluated two varieties of potatoes: Red Anna and Karin and two kinds of fertilizer (urea, urea with urease inhibitor) in different concentration 100%, 80% and 60% with fertilizer and for check one control sample of tuber. Results of starch measurement showed significantly lower percent of starch in the variety Red Anna, but the rheological characteristics of Red Anna was bigger than variety Karin. The sensory analysis done with table value was with minor variations similar to standards reported in catalog of register potatoes tuber in the Czech Republic. The samples were different between the varieties, but through the cultivation group was similar or same. The spectroscopy of color measurement showed different between the color of two sample potatoes tuber (Red Anna x Karin).

Key words: tuber, potatoes, fertilizer, color, starch

Acknowledgments: This study was supported by Research plan No. MSM 6215648905 called “Biological and technological aspects of the sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change” which is financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and Research project National Agency for Agriculture Research No. QI101A184 called: Potato Growing Technology – New Environmentally Friendly Approaches.

ÚVOD

Výnos i kvalita hlíz brambor spolu úzce souvisejí. Obě složky jsou závislé kromě potenciálu odrůdy na dalších faktorech, které vstupují do pěstitelského systému. Jsou to zejména podmínky prostředí určené expozicí pozemku, kvalitou a složením půdy, povětrnostními poměry v průběhu vegetace, ale i zvolenou pěstitelskou technologií (Prugar et al., 2008).

Brambory jsou plodinou náročnou na živiny. Velmi významným faktorem je samotná přítomnost živin v půdě, která bývá souhrnně označována jako stará půdní síla. O výživu rostlin se stará půdní síla, která se podílí v přímém dodání živin hnojiv. Půdní síla se vytváří pravidelným hnojením i střídáním plodin v rámci osevního sledu (Kasal et al., 2010).

Hnojení má nezastupitelnou roli v přísunu organických látek a živin do půdy, a tím i v udržování a zvyšování půdní úrodnosti. Brambory patří mezi rostliny obvykle pěstované v první trati, to znamená, že se k nim aplikují hnojiva, jejichž pozitivního působení využívají plodiny pěstované v rámci celého osevního sledu. Hnojení nabývá na významu i v oblasti dodávání živin bramborovým hlízám, kde může mít různou podobu (Čepl, 2004).

Dusíkatá hnojiva při pěstování brambor obsahují dusík, a to ve formě NO_3 , NH_4 nebo jako močovinu. Pro dobrý růst plodin se používají všechny formy, nejčastěji se užívají NO_3 formy a aplikace NH_4 v malých množstvích. Močovina se užívá pro stabilizaci pH půdy ve vodných roztocích (Sonneveld, 2009). Při nesprávném používání především těchto dusíkatých hnojiv může dojít nejen k nežádoucímu ovlivnění kvality bramborových hlíz, ale také k ohrožení životního prostředí např. vyplavením nitrátového dusíku, těkáním čpavkového dusíku (Mengel, 2001).

Používáním inhibitorů ureázy při aplikaci močoviny dochází k ovlivnění míry hydrolyzy a následně volatilizace amoniaku. Inhibitory ureasy potlačují aktivitu enzymu ureasy, a tím zpomalují hydrolyzu močoviny. Umožňují tak uchovat nerozloženou močovinu do období, než se dostaví srážky, které posunou hnojivo do půdního profilu. V půdě dochází k přeměně amonného iontu na mobilní nitrátový ion, který může být dále vyplaven nebo denitrifikován. Tento proces přeměny může být zpomalen použitím inhibitoru nitrifikace spolu s močovinou, čímž dojde k omezení ztrát nitrátového dusíku, který není sorbován rostlinou (Wollnerová-Pišanová, 2006).

Z hlediska dopadu na životní prostředí se v nových technologických postupech při hnojení rostlin, má brát ohled na nařízení, které vydala Evropská komise v nařízení č. 1107/2008, aby byly agronomické a environmentální přínosy inhibitorů nitrifikace nebo ureázy dostupnější, mělo by být použití inhibitorů nitrifikace nebo ureázy povoleno pro většinu typů dusíkatých hnojiv a mělo by

být povoleno více typů inhibitorů. Hnojiva s inhibitorem ureázy jsou pro životní prostředí šetrnější a omezují znečišťování vod a ovzduší (Růžek, 2008).

Stolní hodnota je soubor ukazatelů kvality, kam patří např. konzistence, rozvářivost (struktura, vlhkost, moučnatost), vůně, barva hlízy a chuť. Zásadní vliv na hodnotu hlíz má odrůda, dalšími významnými faktory jsou ročník, podnebí a agronomické postupy jako je hnojení (Prugar et al., 2008). Vliv ročníku a hnojení ne vždy dávají jasně průkazné výsledky na kvalitu hlíz, ale i přesto bylo dokázáno, že konzistence hlíz bývá pevnější v teplejších oblastech (Vokál et al., 2000).

Cílem této práce bylo prověřit rozdíly ve využití dusíku z hnojiv s postupným uvolňováním dusíku (inhibitorem ureázy) a srovnat je s hnojivy bez řízeného uvolňování dusíku a jejich vlivem na kvalitu bramborových hlíz.

MATERIÁL A METODIKA

K pokusu byly použity bramborové hlízy odrůd Red Anna a Karin. Hlízy byly získány ze stanoviště na jižní Moravě (ŠZP MENDELU, Žabčice). Hlízy obou odrůd byly hnojeny dvěma druhy hnojiva, a to hnojivem s inhibitorem ureázy o dávkách 100 %, 80 % a 60 %. U hnojiva bez inhibitoru ureázy byly dány stejné dávky močoviny a pro kontrolu byl použit vzorek bez přídavku jakéhokoliv hnojiva.

Pro porovnání obou odrůd (Red Anna a Karin) byly sledovány barva hlíz, obsah škrobu, reologické vlastnosti a stolní hodnota.

Barva byla měřena v systému CIELAB, kde byl využit stolní spektrofotometr KONICA MINOLTA CM-3500d, který využívá charakteristiku (geometrii) měření d/8. Pro přesné měření barevnosti se využil měřící otvor na horní straně přístroje, který je navržen pro široký rozsah aplikací a měření barevnosti o velikosti 30 mm.

Fyzikální vlastnosti bramborových hlíz byly stanoveny na TIRATESTU 27025 pomocí kompresního testu. Přírodní škrob (škrobnatost) bramborových hlíz se měřil normovanou metodou – Ewersovou polarimetrickou metodou, která vychází ze směrnice Komise č. 99/79/ES resp. z ČSN EN ISO 10520.

Posledním kritériem pro kvalitu bramborových hlíz bylo posuzování stolní hodnoty. U stolní hodnoty se posuzovalo bodovým systémem: konzistence, struktura, moučnatost, vlhkost, nedostatky v chuti, tmavnutí hlíz po uvaření (Čermák, 2010).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při měření barvy bramborových hlíz se sledovaly rozdíly mezi odrůdami Red Anna a Karin. Základní charakteristiky barvy u syrových a vařených hlíz v systému CIELab jsou uvedeny v Tab. 1, kde jsou porovnávány hodnoty L^* , a^* , b^* a ΔE^*_{ab} . Z uvedených hodnot je patrné, že rozdíly v barvě mezi jednotlivými odrůdami jsou patrné lidským okem (ΔE^*_{ab} větší než 2,0). Rozdíl nebyl

MENDELNET 2012

zaznamenán v rámci jednoho souboru (různé dávkování hnojiv) ani u odrůdy Karin ani u odrůdy Red Anna v hodnotě L^* .

Pro fyzikální vlastnosti bramborových hlíz byl využit texturometr, přístroj TIRATEST 27 025. Zkouška pevnosti hlíz prokázala, že odrůda Red Anna byla pevnější oproti odrůdě Karin, z hlediska statistického vyhodnocení rozdíl mezi odrůdami byl statisticky průkazný ($P < 0,05$). Vyšší hodnotu škrobnatosti (obsahu škrobu) vykazovala odrůda Karin, která v průměru vykazovala hodnotu $17,00 \pm 2,06$ (%), což bylo opět průkazně vyšší než u druhé odrůdy ($P < 0,05$).

V rámci jedné odrůdy (Karin) byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly ($P < 0,05$) v barvě syrových i vařených hlíz mezi skupinami. Hodnoty L^* , a^* , b^* a barevné odchylky jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 1: Znaky jakosti u syrových a vařených hlíz, rozdíly mezi odrůdami

Odrůda	KARIN	RED ANNA	P
CIELAB			
- L^* SYR	$72,28 \pm 2,54$	$71,41 \pm 1,95$	$P=0,07$
- a^* SYR	$-0,19 \pm 0,37$	$1,06 \pm 0,51$	$P < 0,01$
- b^* SYR	$28,17 \pm 3,17$	$34,71 \pm 2,10$	$P < 0,01$
- $\Delta E^*_{ab\ SYR}$	6,71		*
- L^* VAR 0	$73,80 \pm 2,10$	$65,34 \pm 1,59$	$P < 0,01$
- a^* VAR 0	$-0,05 \pm 0,52$	$1,05 \pm 0,94$	$P < 0,01$
- b^* VAR 0	$36,11 \pm 1,61$	$43,33 \pm 2,20$	$P < 0,01$
- $\Delta E^*_{ab\ VAR 0}$	11,18		*
- L^* VAR 2	$73,62 \pm 2,10$	$66,94 \pm 1,88$	$P < 0,01$
- a^* VAR 2	$0,14 \pm 0,39$	$1,56 \pm 0,80$	$P < 0,01$
- b^* VAR 2	$34,96 \pm 1,81$	$40,92 \pm 3,24$	$P < 0,01$
- $\Delta E^*_{ab\ VAR 2}$	9,07		*
F [N]	$9,06 \pm 2,88$	$15,06 \pm 3,77$	$P < 0,01$
Obsah škrobu [%]	$17,00 \pm 2,06$	$12,60 \pm 1,53$	$P < 0,01$

Pozn. *- ΔE^*_{ab} je rozeznatelná lidským zrakem

V Tab. 4 a 5 je dále popsána stolní hodnota brambor, kde byly posuzovány jednotlivé znaky (charakteristiky): konzistence – velmi měkká (1) až velmi pevná (9), struktura- jemná (3) až hrubá (7), moučnatost – velmi slabá (1) až velmi silná (9), vlhkost – velmi slabá (1) až velmi silná (9),

nedostatky v chuti – nepatrné (1) až velmi silné (9), tmavnutí hlíz po uvaření – velmi slabé (1) až velmi silné (9) (Čermák, 2010). Přestože odrůda Karin patří mezi hlízy řazené do varného typu B-B/A (Čermák, 2010), v našem pokusu byly zjištěny výsledky pro varný typ u většiny skupin jako B/C. Přesto se jedná o nevýznamné zjištění, pro konzumenta by tento rozdíl nebyl významný.

Tab. 2 Znaky jakosti u syrových a vařených hlíz odrůdy KARIN a rozdíly mezi skupinami

Odrůda	KARIN						
	K	MO 100	MO 80	MO 60	U 100	U 80	U 60
Skupina							
CIELAB (n=6)							
- L* _{SYR}	73,42±2,20	72,93±2,18	72,03±1,82	71,52±3,61	71,91±3,07	71,81±3,10	72,38±2,14
- a* _{SYR}	-0,60±0,19a	-0,01±0,19b	-0,06±0,21b	0,01±0,38b	0,00±0,50b	-0,37±0,38	-0,33±0,21
- b* _{SYR}	28,44±1,29b	24,95±2,61a	27,87±3,05	27,89±3,30	28,76±3,23b	32,19±2,67b	27,08±1,54
- ΔE* _{ab SYR*}	0	3,57	1,6	2,07	1,66	4,09	1,73
- L* _{VAR}	71,45±2,33	75,02±1,70	71,88±1,61	72,13±0,37	76,17±0,33	75,70±0,01	74,24±0,69
- a* _{VAR}	0,21±0,21	0,05±0,18	0,35±0,29	-0,59±0,25	0,18±0,47	-0,77±0,77	0,23±0,38
- b* _{VAR}	35,37±1,68	35,52±0,51	37,73±0,79	37,43±0,71	35,64±2,02	34,43±2,76	36,64±0,66
- ΔE* _{ab VAR*}	0	3,58	2,41	2,31	4,73	4,46	3,07
- L* _{VAR 2}	72,99±3,08	74,84±2,08	71,98±1,67	70,68±0,50	75,22±0,08	75,65±0,29	73,98±0,48
- a* _{VAR 2}	0,07±0,12a	0,30±0,10	0,37±0,09	-0,41±0,03a	0,78±0,23b	-0,09±0,24a	-0,01±0,28a
- b* _{VAR 2}	31,98±0,98a	34,81±1,31	36,17±1,36b	37,03±0,43b	36,24±0,31b	34,23±1,67	34,28±0,63
- ΔE* _{ab VAR 2*}	0	3,39	4,32	5,57	4,87	3,49	2,51
- ΔE* _{ab SYR/VAR**}	7,25	10,78	9,87	9,58	8,09	4,35	9,75
- ΔE* _{ab VAR/VAR 2**}	3,73	0,78	1,57	1,51	1,28	0,7	2,39
F [N] (n=10)	10,45±2,71b	10,93±2,82b	14,73±5,12b	10,39±1,61b	4,87±1,51a	5,47±1,32a	6,39±1,51a
Obsah škrobu [%] (n=4)	18,91±0,01c	13,27±0,44a	18,86±0,31c	17,75±1,88	15,49±1,44b	16,91±0,31b	17,80±0,32c

a,b,c – rozdílné indexy označují průkazné rozdíly mezi skupinami ve sloupcích na hladině (P<0,05)

*- ΔE*_{ab} vztahena ke kontrole K

** - ΔE*_{ab} vztahena k rozdílné úpravě v rámci stejné skupiny hnojení

V rámci jedné odrůdy (Red Anna) byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly (P<0,05) mezi skupinami a statisticky průkazné rozdíly v rámci jedné skupiny, a to pro tepelnou úpravu a měření barvy syrových hlíz. Barva před a po tepelné úpravě se měnila (viz Tab. 3). V Tab. 5 je dále popsána stolní hodnota brambor, kde byly posuzovány jednotlivé znaky (charakteristiky jakosti). Přestože odrůda Red Anna patří mezi hlízy řazené do varného typu B/A (Čermák, 2010), v našem

pokusu vycházely výsledky pro varný typ u většiny skupin B nebo B-A. Z hlediska stolní hodnoty vykazuje odrůda Red Anna spotřebitelem žádanější výsledky než odrůda Karin.

Tab. 3: Znaky jakosti u syrových a vařených hlíz odrůdy RED ANNA a rozdíly mezi skupinami

Odrůda	RED ANNA						
	K	MO 100	MO 80	MO 60	U 100	U 80	U 60
CIELAB (n=6)							
- L* _{SYR}	72,12±1,04	72,15±0,99	70,28±2,12	71,33±1,55	72,75±0,73	70,49±2,85	70,73±2,66
- a* _{SYR}	1,75±0,54b	0,83±0,20	0,68±0,36a	0,78±0,28a	1,06±0,28	0,90±0,62	1,45±0,16b
- b* _{SYR}	36,21±1,37	36,08±1,32	33,15±2,73	34,18±0,95	34,50±1,92	34,33±0,84	34,55±3,38
- ΔE* _{ab} SYR*	0	0,93	3,73	2,34	2,01	2,63	2,18
- L* _{VAR 0}	65,00±1,63	67,61±0,49	66,06±1,08	63,59±2,21	65,68±1,63	64,72±1,03	64,71±0,77
- a* _{VAR 0}	0,78±0,92	-0,32±0,02	1,01±0,41	1,99±1,43	1,86±0,24	1,61±0,21	0,45±0,33
- b* _{VAR 0}	42,24±0,91	40,58±1,03	41,18±1,25	45,76±2,63	45,11±0,45	44,96±0,83	43,48±1,11
- ΔE* _{ab} VAR*	0	3,28	1,51	3,98	3,14	2,86	1,32
- L* _{VAR 2}	65,44±0,79a	70,17±0,16 b	66,42±1,22 a	67,96±1,70	67,73±0,61	66,03±0,85 a	64,82±0,13 a
- a* _{VAR 2}	1,44±1,11	0,26±0,16	1,81±0,22	2,06±1,04	2,32±0,07	1,76±0,35	1,28±0,52
- b* _{VAR 2}	42,92±1,08	37,13±3,17	37,31±1,35	39,79±4,97	44,26±0,01	42,76±0,46	42,28±0,23
- ΔE* _{ab} VAR ₂ *	0	7,57	5,71	4,07	2,8	0,69	0,9
- ΔE* _{ab} SYR/VAR**	9,38	6,5	9,08	14,82	12,05	12,11	10,82
- ΔE* _{ab} VAR ₀ /VAR ₂ **	1,04	4,33	3,97	7,4	2,27	2,56	1,46
F [N] (n=10)	10,15±2,21a	31,71±2,44 b	10,98±2,14 a	12,86±2,51 a	14,10±2,67 a	10,98±2,90 a	10,02±1,46 a
Obsah škrobu [%] (n=4)	13,00±0,44	11,28±1,51	10,65±0,25	13,01±0,32	12,43±0,01	15,40±0,31	12,43±0,01

a,b,c – indexy označující průkazné rozdíly mezi skupinami ve sloupcích na hladině ($P < 0,05$)

*- ΔE*_{ab} vztažena ke kontrole K

** - ΔE*_{ab} vztažena k rozdílné úpravě v rámci stejné skupiny hnojení

Stolní hodnota brambor je senzorický ukazatel, který je možná důležitější než chemické nebo fyzikální metody hodnocení bramborových hlíz, protože konzumenti si kupují hlízy na základě stolní hodnoty.

Tab. 4 Stolní hodnota bramborových hlíz odrůdy KARIN

Odrůda	KARIN						
Skupina	K	MO 100	MO 80	MO 60	U 100	U 80	U 60
Stolní hodnota (n=4)							
konzistence	5	4	5	4	4	4	4
struktura	4	5	4	5	5	5	5
moučnatost	6	5	4	5	6	6	6
vlhkost	4	4	5	4	4	4	4
nedostatky v chuti	3	4	3	3	3	3	3
tmavnutí vařených hlíz	4	2	2	2	2	2	3
stabilita kvality	5	5	6	6	6	6	6
varný typ	BC	BC	B	BC	BC	BC	BC

Tab. 5 Stolní hodnota bramborových hlíz odrůdy RED ANNA

Odrůda	RED ANNA						
Skupina	K	MO 100	MO 80	MO 60	U 100	U 80	U 60
Stolní hodnota (n=4)							
konzistence	6	8	6	6	6	5	5
struktura	4	3	4	4	3	5	5
moučnatost	4	3	4	4	3	4	4
vlhkost	5	4	5	4	4	4	4
nedostatky v chuti	3	4	3	4	3	3	3
tmavnutí vařených hlíz	3	4	3	5	4	4	4
stabilita kvality	7	5	6	5	7	7	7
varný typ	B	B/A	B	B	B/A	B	B

Stolní hodnota patří mezi jedny z nejdůležitějších kritérií pro spotřebitele/konzumenta. Po uvaření hlíz vykazovaly obě odrůdy poměrně stabilní barvu tmavnutí po dvou hodinách, odrůda Karin zde byla hodnocena jako stabilnější.

Mezi odrůdami (Red Anna a Karin) byl nalezen statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). U odrůdy Red Anna klesl obsah škrobu v závislosti na hnojivo, ale u odrůdy Karin nebyl tento pokles patrný. Rozdíl mezi obsahem škrobu byl pak pozorován i při senzorickém hodnocení stolní hodnoty, kde jsou pozorovány podobné výsledky. Odrůda Karin dle senzorického hodnocení vykazuje větší moučnatost než odrůda Red Anna.

Při porovnávání stolní hodnoty v laboratoři se stolní hodnotou dle Katalogu odrůd, bylo zjištěno, že výsledky v laboratoři nevykazují žádné velké odchylky od katalogu. Vzhledem k tomu, že stolní hodnotu posuzují hodnotitelé, dochází občas mírným odchylkám, které souvisí s chemickým složením (obsah škrobu, ap.).

ZÁVĚR

Cílem příspěvku bylo vyhodnotit možné rozdíly ve stolní jakosti hlíz dvou odrůd brambor pod odlišnými agrochemickými podmínkami. Dusík je významným prvkem na naší planetě pro všechny živé organismy, protože slouží jako stavební kámen pro tvorbu aminokyselin resp. bílkovin. Kromě jeho pozitivních vlastností je potřeba myslet na to, že ve větších koncentracích může být dusík vyplavován z polí do spodních nebo povrchových vod a kontaminovat je. Proto se s ohledem na životní prostředí používají šetrné systémy hnojení, jako je například hnojivo s inhibitorem ureázy, které uvolňuje dusík postupně po celou dobu, po kterou rostlina dusík potřebuje. Tímto způsobem se zvyšuje efektivnost využití dusíku rostlinou a maximálně se zabudovává do jejího těla a snižuje se i riziko vyplavení dusíku do životního prostředí.

Z výsledků vyplývá, že druh použitého hnojiva nemá vliv na parametr L^* (parametr světlosti), ale na další parametry (a^* , b^*) vliv má. Z výsledků chemické analýzy vyplývá, že hnojivo s inhibitorem ureázy do jisté míry ovlivňovalo obsah škrobu a podobné výsledky vykazuje i senzorická analýza pro stolní hodnotu brambor. Patrné rozdíly byly zaznamenány mezi odrůdami Karin i Red Anna, ovšem v rámci jedné skupiny nebyly rozdíly zřetelné. V porovnání s předchozími ročníky (Bubeničková, Jůzl, 2010) došlo k mírným rozdílům ve sledovaných parametrech, a to s ohledem na ročník.

LITERATURA

Bubeničková, A., Jůzl, M. (2010): Vliv technologie pěstování brambor na jakost hlíz, In sborník MendelNET 2010, s. 688-693, ISBN: 978-80-7375-453-2

Čepl, J. (2004): Brambory od hnojení po kultivaci, Zahradka web, cit. online http://www.zahradaweb.cz/Brambory-od-hnojeni-po-kultivaci__s512x42375.html

Čermák, V. (2010): Seznam doporučených odrůd bramboru, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, 127 s, ISBN 978-80-7401-025-5

Kasal, P., Čepl, J., Vokál, B. (2010): Hnojení brambor, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 24 s., ISBN 978-80-86940-24-3

Mengel, K., Kirkby, E. A. (2001): Principles of Plant Nutrition. 5th Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 849 s.

Prugar, J. et al. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, ISBN 978-80-86576-28-2, Praha, s. 241-257

Sonneveld, C., Voogt, W. (2009): Plant Nutrition of Greenhouse Crops, 431 p., ISBN 978-90-481-2531-9

Vokál, B., Hamouz, K., Čepl, J. (2000): Vliv rozdílných ekologických podmínek pěstování na stolní hodnotu hlíz brambor. Rostlinná výroba 46 (11), s. 487-493

Wollnerová-Pišanová, J., Růžek, P. (2006): Uplatnění inhibitorů ureázy a nitrifikace při používání dusíkatých hnojiv, In: sborník Nové trendy v používání dusíkatých hnojiv, s. 36-39, ISBN 80-86555-96-8

PLANT PRODUCTS TREATMENT WITH ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS

VYUŽITÍ SILIC K OŠETŘENÍ ROSTLINNÝCH PRODUKTŮ PROTI PATOGENNÍM ORGANISMŮM

Šmíd J., Klouček J., Pulkrábek J.

Department of Crop Production, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamycka 129, 165 21 Praha 6 - Suchdol, Czech Republic

E-mail: smidj@af.czu.cz

ABSTRACT

Seeds (100 pcs.) of *Papaver somniferum* and *Triticum aestivum* were treated with four Essential oils (EO). Seeds were placed onto the filter paper infused with EO on the bottom of Petri dishes (90 mm diameter), hermetically sealed and kept in 20 or 50°C for 24 hours. EOs from *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* and *Cymbopogon citratus* were tested in concentrations of 8; 16; 32 and 64 $\mu\text{l.l}^{-1}$ of air. Chemical composition of EOs were analyzed by GC-MS. After the treating, seeds were placed on sterile Petri dishes with Sabouraud Dextrose Agar with tetracycline (15 mg.l^{-1}) and kept in 25°C. 48 hours after placement on agar number of contaminated seeds were counted. Seeds treated with the same manner were tested for germination. The highest inhibition of fungi growth shown treating of poppy seeds with *O. vulgare* EO (75% above the control in 8 $\mu\text{l/l}$ concentration and 100% in 32 $\mu\text{l/l}$), less inhibition shown treating wheat seeds with *C. citratus* (66% in 64 $\mu\text{l/l}$). There were no significant difference in germination between the control and seeds treated in 16 $\mu\text{l/l}$ concentration, but difference between control and seeds treated in 64 $\mu\text{l/l}$ concentration were significant. Use of EOs in seed treatment is possible, but the method is still not developed.

Key words: Essential oils, plant pathogens, seed treatment, oregano, clove, cinnamon, lemongrass

Acknowledgments: This presentation is supported by University internal grant agency - CIGA 20122008 – Plant products treatment with essential oil vapours under different physical conditions.

ÚVOD

Lidé využívali antimikrobiální aktivity silic odedávna. Ještě před objevem mikroorganismů v 17. st. pozorovali lidé výsledky jejich činnosti a hledali prostředky k jejich potlačení, jelikož mikroorganismy způsobovaly kažení potravin, choroby i epidemie. Brzy poznali, že substráty ošetřené siličnatými rostlinami méně podléhají zkáze, čehož využívali při mumifikaci, kořenění jídel, vykuřování prostor atd. Jako první popsal inhibiční účinky silic na mikroorganismy Chamberlain v r.1887. Po objevu antibiotik ustoupily silice jako antimikrobiální agens do pozadí, jelikož účinek antibiotik byl rychlejší, spolehlivější i levnější. V poslední době ale opět roste zájem o přírodní antimikrobiální látky, protože mikroorganismy tvoří rezistentní kmeny a současná antimikrobiální agens mohou mít negativní dopad na životní prostředí. Předmětem naší práce bylo ošetřování přirozeně kontaminovaného osiva máku a pšenice z ekologického zemědělství. Kromě vlivu na míru kontaminace byl sledován i vliv na klíčivost semen. Cílem práce, jejichž dílčí výsledek je prezentován, je ověření možnosti využití silic jako antimikrobiálního agens k ošetřování rostlinných produktů.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky osiva a sadby byly pořízeny z polních pokusů katedry rostlinné výroby. Osivo a sadba byly pěstovány v režimu ekologického zemědělství, byl tak minimalizován vliv předchozího ošetření při pěstování. Silice byly zakoupeny od firmy BIOMEDICA spol. s r.o.

Pro analýzu složení pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), relativní podíly jednotlivých složek silice byly hodnoceny pomocí plynového chromatografu s plamenionizačním detektorem Agilent 6890 GC-FID.

Použité silice a jejich složení je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1: Silice a jejich chemické složení

Latinský / český název	Čeď	Složení silice
<i>Origanum vulgare</i> / Dobromysl obecná	<i>Lamiaceae</i> / Hluchavkovité	p-cymen 5,16 % tymol 2,93 % karvakrol 64,56 %
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> / Skořicovník cejlonský	<i>Lauraceae</i> / Vavřínovité	limonen 4,98 % linalool 4,97 % cinamaldehyd 73,06 % eugenol 3,54 % cinamylacetát 3,7%
<i>Syzygium aromaticum</i> / Hřebíčkovce vonný	<i>Myrtaceae</i> / Myrtovité	eugenol 82,32 % beta-karyofylen 14,44 %
<i>Cymbopogon citratus</i> / Voňatka citronová	<i>Poaceae</i> / Lipnicovité	verbenol 33,49 % nerol 3,96 % neral 45,3 % neryl acetát 3,27 %

Dávky silic 8 µl, 16 µl, 32 µl a 64 µl byly v mikrozkušavkách doplněny ethylacetátem (CH₃COOCH₂CH₃; Lach-Ner, s.r.o.) na objem 250 µl. Pipetou byl objem přenesen na disky z filtračního papíru o průměru 90 mm. Ethylacetát se nechal z disku odpařit po dobu 1 minuty. Do skleněné Petriho misky (objem 110 ml) bylo spolu s diskem napuštěným silicí umístěno 100 semen máku nebo 50 semen pšenice a miska uzavřena parafilmem. Byly tak získány výsledné koncentrace 73 µl/l, 146 µl/l, 292 µl/l, 584 µl/l silice na litr vzduchu. Testy byly provedeny pro každou koncentraci po 200 semenech. Misky s disky pouze s ethylacetátem nebo bez ethylacetátu sloužily jako kontrolní vzorky.

Misky byly ponechány při teplotě 20 °C nebo 50 °C v termostatu po dobu 24h. Během této doby došlo k odpaření silice z filtračního papíru.

Do plastové Petriho misky bylo pomocí krokového dávkovače (Eppendorf) odměřeno 20 ml média, na které bylo přesypáno ošetřené osivo. Jako médium byl použit SDA (Saboured Dextrose Agar; OXOID LTD.) s přísadkou antibiotika (Tetracyklin 15 mg/l; SIGMA-ALDRICH), antibiotikum bylo do agaru přidáno pro zamezení růstu bakterií. Po zatuhnutí agarů byly na médium přenesena ošetřená semena. Misky s agarem a osivem byly uloženy při teplotě 25 °C a vizuálně hodnocen počet napadených semen po 24 – 36 hodinách.

U semen ošetřených silicí byla srovnána klíčivost se semeny neošetřenými. Zkouška byla provedena standardním testem podle vyhlášky č. 369/2009 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu. Test klíčivosti byl proveden při 20 °C v plastových miskách na filtračním papíru, ve čtyřech opakováních po 50 semenech. Klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu.

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program STATISTICA (data analysis software system), verze 9.1., StatSoft, Inc. Nejdříve byl proveden rozbor naměřených dat a analýza vlivných

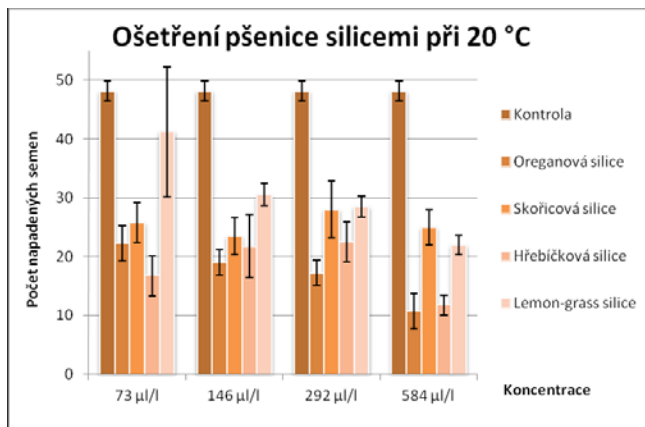
bodů. Vlastní hodnocení bylo provedeno analýzou rozptylu – ANOVA (GLM metoda – General Linear Model). Pro podrobnější vyhodnocení a porovnání rozdílů mezi průměry byla využita metoda Tukey (HSD).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ošetření osiva pšenice

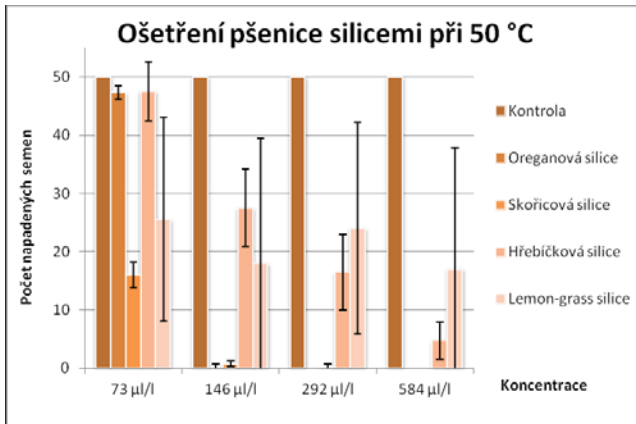
Výsledky ošetření při teplotě 20 °C jsou uvedeny v grafu 1 a ošetření při 50 °C v grafu 2.

Graf 1: Ošetření pšenice silicemi při 20 °C



Z grafu je patrné, že neúčinnější při teplotě ošetření 20 °C je oreganová a hřebíčková silice v koncentraci 584 µl/l. Dále je účinná hřebíčková silice v koncentraci 73 µl/l, oreganová silice 146 µl/l a 292 µl/l. Obecně lze konstatovat, že při této teplotě ošetření není statisticky významný rozdíl v působení mezi koncentracemi 73 µl/l – 292 µl/l jednotlivých silic. Nejméně účinná je silice voňatky citronové.

Graf 2: Ošetření pšenice silicemi při 50 °C

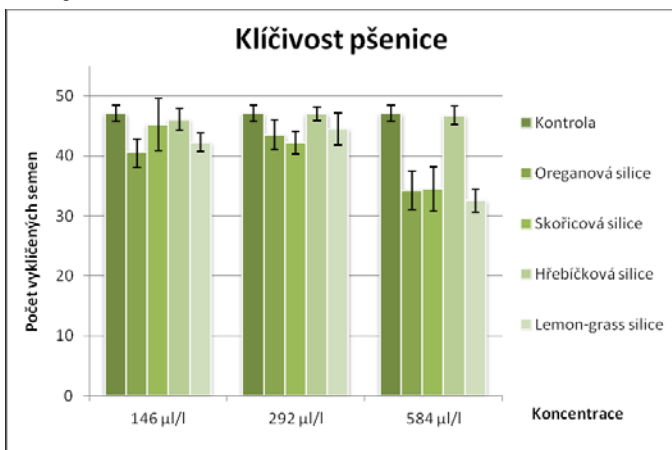


Působení silic při teplotě 50 °C je jasně účinnější oproti teplotě 20 °C, oreganová a skořicová silice jsou při této teplotě výrazně účinné již v koncentraci 146 µl/l. Oreganová silice v koncentraci 292 µl/l a 584 µl/l a skořicová v koncentraci 584 µl/l inhibují výskyt mikroorganismů úplně (výskyt 0 %). Nejnižší koncentrace 73 µl/l je neefektivní, jistou účinnost v této koncentraci vykazuje jen skořicová silice. Nejméně účinné jsou silice hřebíčková a voňatky citronové.

Klíčivost pšenice

Osivo bylo ošetřeno silicemi v teplotě 50 °C po dobu 24h. Test klíčivosti byl proveden při 20 °C na filtračním papíru, klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 3.

Graf 3: Klíčivost pšenice



Nejméně ovlivňuje klíčivost hřebíčková silice ve všech koncentracích, skořicová v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ a voňatka citronová v koncentraci 292 $\mu\text{l/l}$. Největší inhibici klíčení vykazují silice voňatková, oreganová a skořicová v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$.

Neúčinnější proti patogenům na osivu pšenice jsou silice skořicová a oreganová v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$ a oreganová v koncentraci 292 $\mu\text{l/l}$, které ovšem negativně působí na klíčivost a rychlost růstu pšenice.

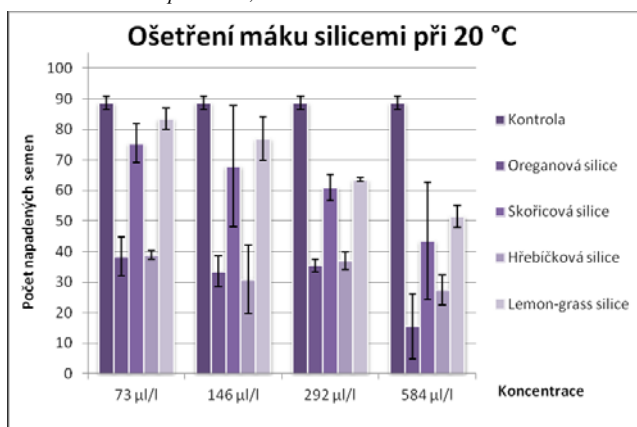
Proto se pro ošetření nejlépe hodí silice skořicová v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření

50 °C. Silice v této koncentraci potlačuje patogeny a zároveň výrazně neovlivňuje klíčivost a vzrůst semen.

Ošetření osiva máku

Osivo ošetřené silicemi při teplotě 20 °C a 50 °C bylo přesypáno na agar SDA s přidavkem antibiotika tetracyklinu, hodnocen byl počet napadených semen houbovými patogeny. Výsledky ošetření při teplotě 20 °C jsou uvedeny v grafu 4 a ošetření při 50 °C v grafu 5.

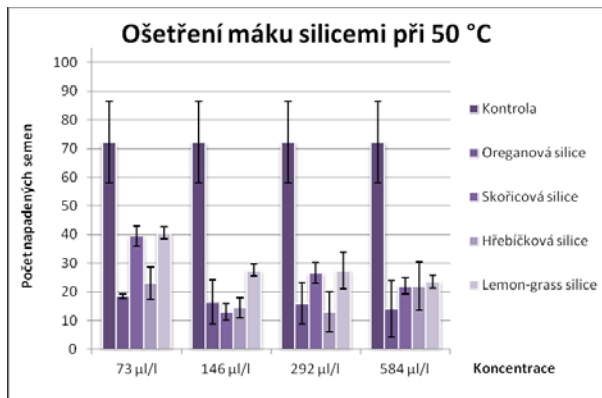
Graf 4: Ošetření máku silicemi při 20 °C,



Z grafu je patrné, že neúčinnější při teplotě ošetření 20 °C je oreganová silice v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$. Dále je účinná hřebíčková silice v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$ a 146 $\mu\text{l/l}$.

Lze konstatovat, že v této teplotě ošetření nejsou statisticky významné rozdíly v působení silic oreganové, skořicové a hřebíčkové v koncentracích 73 $\mu\text{l/l}$ – 292 $\mu\text{l/l}$.

Graf 5: Ošetření máku silicemi při 50 °C,



Při teplotě ošetření 50 °C je neefektivnější hřebíčková silice v koncentraci 292 µl/l, skořicová 146 µl/l, oreganová 584 µl/l a hřebíčková 146 µl/l. Dále oreganová v koncentracích 73 µl/l – 292 µl/l.

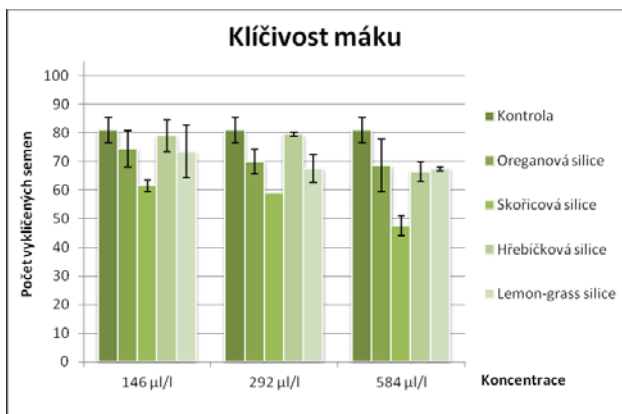
Je zajímavé, že v koncentraci 146 µl/l a 292 µl/l vykazuje hřebíčková silice lepší výsledky než při ošetření vyšší koncentrací, taktéž skořicová silice 146 µl/l je účinnější než ve vyšších koncentracích.

Klíčivost máku

Osivo bylo ošetřeno silicemi v teplotě 50 °C po dobu 24h.

Test klíčivosti byl proveden při 20 °C na filtračním papíru, klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 6.

Graf 6: Klíčivost máku



Nejvíce klíčivost inhibuje skořicová silice ve všech koncentracích. Nejméně naopak silice hřebíčková v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ a 292 $\mu\text{l/l}$. Pro ošetření máku proti plísnovým patogenům je nejvhodnější silice hřebíčková v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ nebo 292 $\mu\text{l/l}$ při teplotě působení

50 °C, která výrazně neinhibuje klíčivost semen.

ZÁVĚR.

Na základě výsledků této studie se silice jeví jako perspektivní látky využitelné pro ošetření osiva a sadby zemědělských plodin. Díky přírodnímu původu silic a jejich antimikrobiálním účinkům jsou vítanou alternativou k běžně používaným chemickým látkám. Použití silic je vhodné především v ekologickém zemědělství, kde není moření chemickými látkami povoleno. Pro použití v praxi je nutné ověřit tyto výsledky v provozních podmínkách.

Section – Plant Biology

AXILLARY BUD OUTGROWTH AFTER DECAPITATION IN PEA CAN BE BASED ON THE CANALIZATION OF AUXIN

VYRASTANIE AXILÁRNEHO PUPEŇA PO DEKAPITÁCII U HRACHU
MÔŽE BYŤ PODMIENENÉ KANALIZÁCIOU AUXÍNU

Medved'ová Z.¹, Balla J.^{1,2}, Procházka S.¹

¹CEITEC - Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: zuzana.medvedova@mendelu.cz

ABSTRACT

Initiation of bud outgrowth in pea (*Pisum sativum* L.) after release from the apical dominance by removal of the dominant apex is accompanied by polar auxin transport. Following decapitation the axillary buds establish directional auxin export by subcellular polarization of PIN1 auxin transporters. Competition between two lateral auxin sources after removal the primary source and application of auxin efflux inhibitor, and furthermore, influence of length of the decapitated stem stump on gene expression in axillary buds was studied. Application of auxin efflux inhibitor (NPA, TIBA) to the second axillary bud of decapitated plants reduces bud outgrowth. Inhibition of outgrowth of the second axillary bud in these plants caused outgrowth of the first bud. This competition between the second and first axillary buds is associated with changes in expression profiles of *AUX1*, *PIN1* and *DRM1* genes. These results support the competitive canalization theory, by which canalization of auxin from the lateral auxin source is possible only if the primary source is removed or weakened. Length of the decapitated stem stump may affect timing of changes in expression of *AUX1*, *PIN1* and *DRM1* genes in the second axillary bud and hence the timing of bud outgrowth initiation after removal of the dominant apex. The signal for axillary bud outgrowth therefore could be the auxin decrease or depletion in the stem.

Key words: polar auxin transport, *Pisum sativum* L., bud outgrowth

Acknowledgments: This work was supported by the project "CEITEC - Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ÚVOD

Rastlinný hormón auxín je nevyhnutný pre ovplyvňovanie rôznych vývojových procesov v rastlinách a podstatnú úlohu má i v apikálnej dominancii. Apikálna dominancia je fyziologický jav charakterizovaný ako nadvláda vrcholu stonky nad postrannými pupeňmi, ktorým zabraňuje vo vyrastaní (Cline, 1997). Pre udržanie apikálnej dominancie je nevyhnutný polárny transport auxínu, ktorý je produkovaný z väčšej časti v apikálnej oblasti rastliny a transportovaný v stonke bazipetálne (Ongaro a Leyser, 2008). Polárny transport auxínu je v bunkách sprostredkovaný pomocou proteínových prenášačov AUX1 a PIN1, ktoré sú v rastlinách hrachu (*Pisum sativum* L.) kódované génni *PsAUX1* a *PsPIN1*. AUX1 proteín umožňuje vstup auxínu do bunky, PIN1 proteín naopak zabezpečuje výstup auxínu z bunky (Vieten et al., 2007), pričom smerovanie auxínového toku je podmienené predovšetkým subcelulárnou lokalizáciou PIN1 proteínu (Wisniewska et al., 2006). Auxínový tok repolarizuje bunky v smere jeho prúdenia a formuje nové vaskulárne spojenia pozdĺž týchto buniek (Sauer et al., 2006).

Pokiaľ sú založené dva zdroje auxínu, dochádza medzi nimi ku kompetícii, pričom jeden zdroj môže inhibovať tvorbu kanálu pre auxín zo zdroja druhého, na čom je založená teória kompetitívnej kanalizácie. U rastlín, ktoré majú vyvinutú silnú apikálnu dominanciu, prítomnosť primárneho auxínového zdroja zabraňuje počas vývoja rastliny exportu a kanalizácii auxínu zo sekundárneho zdroja. Kanalizácia auxínu z axilárneho pupeňa alebo z laterálneho zdroja auxínu je možná len v prípade, ak je primárny zdroj odstránený či oslabený (Balla et al., 2011). Po odstránení apikálneho vrcholu dekapitáciou dochádza k vyrastaniu axilárnych pupeňov. Pupene sú po výstupe z inhibície schopné syntetizovať vlastný auxín, čím sa stávajú jeho novým zdrojom. Tento proces je sprevádzaný zmenou v expresii génov ako je *PsPIN1* a *PsAUX1* kódujúcich prenášače auxínu i zmenou v expresii génu *PsDRM1*, ktorý je spojený s dormantným stavom pupeňa (Stafstrom et al., 1998). Výrazný auxínový export, ktorý vznikne na základe polarizácie PIN1 transportných prenášačov formuje auxínové transportné kanály a následne vaskulárne zväzky, ktoré sú potrebné pre sústavný rast pupeňa (Balla et al., 2011).

Polárny transport auxínu môže byť špecificky blokovaný kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA) alebo 1-N-naftylftalámovou (NPA). Inhibitory polárneho transportu auxínu sú dôležitý nástroj pre štúdium jeho funkcie vo vývoji rastlín, čo bolo sledované i v tejto práci. Narušujú výstup auxínu z bunky bez toho aby interagovali so samotnými prenášačmi (Geldner et al., 2001).

MATERIÁL A METODIKA

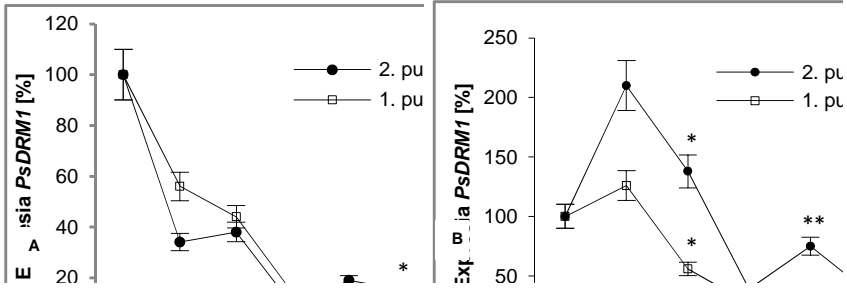
Pre jednotlivé experimenty boli použité sedem dní staré rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan dopestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/18 °C a fotoperióde 16/8 hod (deň/noc). Na druhý axilárny pupeň bola nanosená 1% kyselina 1-N-naftylftalámová (NPA) alebo 1% kyselina 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA) v lanolínovej paste v závislosti na experimente. Po aplikácii NPA/TIBA boli rastliny dekapitované 10 mm nad ošetrovaným pupeňom. Pre stanovenie expresie génov transportných proteínov auxínu boli odoberané ošetrované druhé axilárne pupene a neošetrené prvé axilárne v časových intervaloch po aplikácii NPA/TIBA a dekapitácii.

Vplyv dĺžky ponechanej dekapitovanej stonky, a tým aj vyprázdnenia auxínu zo stonky na zmenu expresie transportných proteínov auxínu v axilárnych pupeňoch bol tiež sledovaný na rastlinách hrachu. Pre prvý variant boli rastliny dekapitované tesne nad druhým axilárnym pupeňom a pre druhý variant boli rastliny dekapitované 60 mm nad druhým axilárnym pupeňom. Pre stanovenie génovej expresie boli odoberané druhé axilárne pupene u oboch variantov v časových intervaloch po dekapitácii.

V závislosti na experimente bola z axilárnych pupeňov dekapitovaných rastlín za použitia produktu RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemecko) izolovaná celková RNA. RNA bola metódou dvojkrokovej semikvantitatívnej RT-PCR najprv reverznou transkripciou prepísaná na cDNA. Prepis izolovanej celkovej RNA na cDNA a následná amplifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou kitu Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma-Aldrich, USA). Pre vlastnú PCR boli použité špecifické primery sledovaných génov *PsAUX1*, *PsPIN1* a *PsDRM1*. PCR produkty boli rozdelené pomocou agarózovej elektroforézy a elektroforeogramy produktov PCR boli vyhodnotené pomocou počítačového programu. Vlastné experimenty boli vykonané v štyroch opakovaniach. Získané priemerné hodnoty expresie génov v jednotlivých časoch boli normalizované na expresiu konštitutívneho génu *Psβ-tubulín* a výsledné hodnoty boli prepočítané na percentá vzťahujúce sa na expresiu kontrolných rastlín jednotlivých variantov. Štatisticky významné rozdiely boli identifikované pomocou t-testu ($\alpha=0,05^*$ a $\alpha=0,01^{**}$).

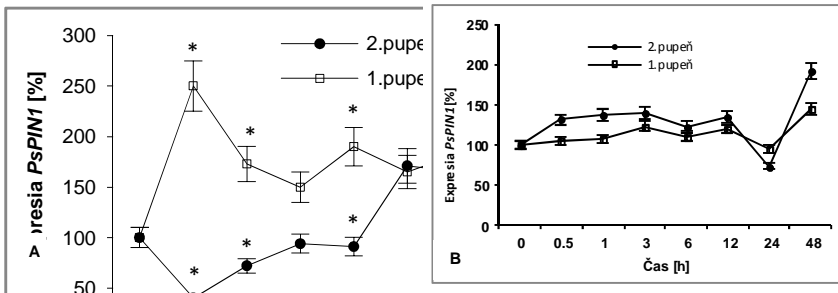
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe izolovanej RNA bolo zistené, že po aplikácii 1% NPA na druhý axilárny pupeň dochádza v tomto pupeni k miernejšiemu poklesu expresie v porovnaní s neošetreným prvým pupeňom. V priebehu 6 hodín od dekapitácie klesne hladina *PsDRM1* mRNA 20-krát a po 12 hodinách je takmer nedetekovateľná (Stafstrom et al., 1998). Napriek tomu, že rastliny boli dekapitované, v ošetrovaných druhých pupeňoch bola expresia *PsDRM1* zaznamenaná vo všetkých časových intervaloch po odstránení apikálneho vrcholu (obr. 1A). Výrazný pokles však bol sledovaný v neošetrených prvých axilárnych pupeňoch, v ktorých expresia klesla nulovým hodnotám. Podobný expresný profil *PsDRM1* bol zistený i u rastlín, u ktorých bola na druhý axilárny pupeň aplikovaná 1% TIBA. TIBA viedla k výraznejšiemu poklesu expresie *PsDRM1* v prvom neošetrenom pupeni v porovnaní s pupeňom z rastlín ošetrovaných NPA (obr. 1B).



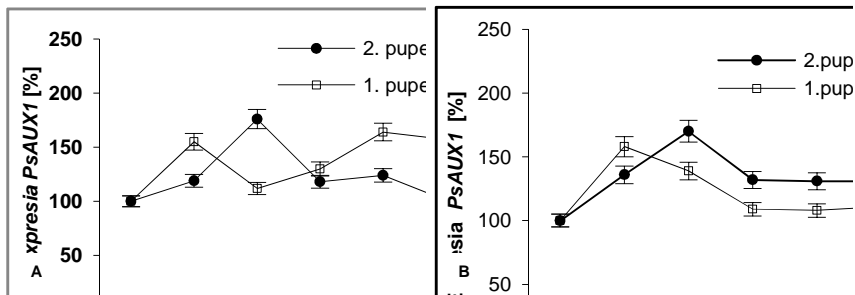
Obr. 1: Expresia génu *PsDRM1* v neošetrenom prvom axilárnom pupeni a v druhom pupeni ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

V prípade génu *PsPIN1* bol zaznamenaný len mierny nárast expresse v ošetrených pupeňoch 1% NPA, pričom sa expresia po 12 hodinách od aplikácie NPA a dekapitácie začala znižovať. Naopak v neošetrených pupeňoch bol zistený podstatne vyšší nárast expresse *PsPIN1* (obr. 2A). Vzhľadom na to, že auxín sám o sebe spolu s bunkovo špecifickými faktormi pozitívne ovplyvňuje transkripciu *PIN* (Vieten et al., 2005), v aktivovanom pupeni dochádza k transportu auxínu, a tak aj k zvyšovaniu expresse *PsPIN1*. Aj keď takto významný rozdiel v expresii *PsPIN1* medzi ošetreným a neošetreným pupeňom v porovnaní s NPA nebol sledovaný po aplikácii TIBA i v tomto prípade bola expresia v ošetrenom pupeni na nízkej úrovni a nedochádzalo k významnému nárastu (obr. 2B).



Obr. 2: Expresia génu *PsPIN1* v neošetrenom prvom axilárnom pupeni a v druhom pupeni ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

Rovnako ani v expresii génu *PsAUX1* v druhých axilárnych pupeňoch ošetrených NPA či TIBA nedochádzalo po dekapitácii rastlín k významnému nárastu. U rastlín, u ktorých bola aplikovaná NPA bol v neošetrených prvých pupeňoch zistený stály nárast expresse (obr. 3A). U variantu s TIBA podobne ako v prípade génu *PsPIN1* nebol zaznamenaný výrazný nárast expresse *PsAUX1* v prvom pupeni, avšak ani v druhom pupeni (obr. 3B).

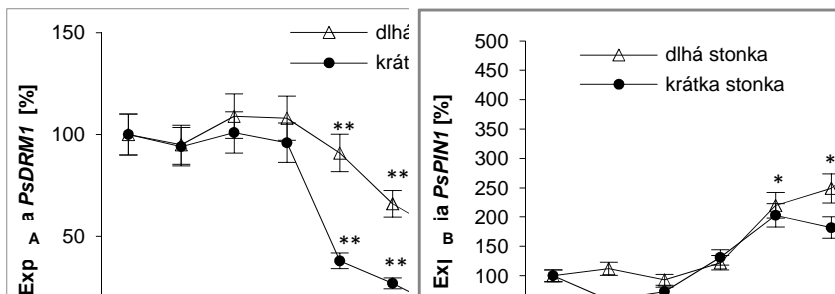


Obr. 3: Expresia génu *PsAUX1* v neošetrenom prvom axilárnom pupení a v druhom pupení ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že v skorých časových intervaloch po dekapitácii génová expresia nespôsobuje jednoznačnú aktiváciu ošetreného ani neošetreného pupeňa. Zistená expresia génov v axilárnych pupeňoch však poukazuje na to, že medzi prvým a druhým pupeňom ako potenciálnymi zdrojmi auxínu dochádza po dekapitácii ku kompetícii. Na základe toho je možné predpokladať, že aj po aplikácii NPA alebo TIBA na druhý axilárny pupeň je do neho prenesený signál o odstránení primárneho zdroja auxínu (apexu), rovnako ako aj do pupeňa prvého. Aj keď by ošetrený druhý pupeň mohol byť týmto signálom aktivovaný k rastu, NPA či TIBA v ňom inhibujú polárny transport auxínu, a tým aj podstatne redukovujú vyrastanie ošetreného pupeňa v neskorších časových intervaloch po dekapitácii. V dôsledku toho dochádza k vyrastaniu prvého neošetreného pupeňa, ktorý sa stáva novým primárnym zdrojom auxínu. Toto je v súlade s teóriou kompetitívnej kanalizácie. Po dekapitácii sa zvyšuje hladina endogénnej IAA v axilárnom pupení u hrachu medzi 2 až 6 hodinami (Balla et al., 2002), pričom auxín je dostatočný signál pre indukciu expresie *PIN1* a polarity v kompetentných pletivách, ktoré sa následne diferencujú na nové vaskulárne spojenia pozdĺž *PIN1* značeného auxínového kanálu (Sauer et al., 2006). Následne dochádza k spojeniu nového auxínového zdroja s centrálnym vodivým systémom stonky, pričom tvorba nových auxínových kanálov je spojená so zmenami v expresii transportných auxínových proteínov ako je *PsPIN1* a *PsAUX1* (Balla et al., 2011). NPA i TIBA blokuje tok auxínu, a tým aj diferenciaciu vaskulárnych elementov (Yoshida et al., 2005).

Dekapitácia spôsobuje rýchly pokles expresie *PsPIN1* i *PsAUX1* v stonke, čo je spôsobené vyprázdňovaním auxínu zo stonky a poklesom jeho hladiny v dôsledku absencie jeho zdroja (Hoshino et al., 2005; Kitazawa et al., 2008). Po 4 až 6 hodinách od odstránenia apexu je indukovaný rast pupeňa (Morris et al., 2005), ktorý sa môže stať novým primárnym zdrojom auxínu. Vzhľadom na to, že auxín je v stonke transportovaný rýchlosťou $1\text{cm}\cdot\text{hod}^{-1}$, je možné po dekapitácii predpokladať rýchlejšiu aktiváciu axilárneho pupeňa u rastlín, ktoré majú apikálny vrchol odstránený tesne nad pupeňom, než u rastlín, kde je ponechaná 60 mm stonka, čo bolo tiež sledované v tejto práci. Po odstránení apikálneho vrcholu bolo zaznamenané rýchlejšie znižovanie expresie génu *PsDRM1* vo variante, v ktorom boli rastliny dekapitované tesne nad druhým axilárnym pupeňom, než vo variante, v ktorom bola ponechaná 60 mm dekapitovaná stonka

(obr. 4A). Rozdiel medzi variantmi bol približne 3 hodiny. Podobný rozdiel v expresii bol zistený i v prípade expresie génu *PsPIN1*, pričom k rýchlejšiemu nárastu expresie dochádzalo u rastlín dekapitovaných tesne nad pupeňom druhého nodu (obr. 4B). Výsledky ukazujú, že dĺžka ponechanej dekapitovanej stonky nad pupeňom môže ovplyvniť rýchlosť zmien v génovej expresii po odstránení apikálneho vrcholu, a tým aj rýchlosť iniciácie rastu axilárneho pupeňa, ktorý začína fungovať ako nový primárny zdroj auxínu.



Obr. 4: Expresia génu *PsDRM1* (A) a génu *PsPIN1* (B) v axilárnom pupeni dekapitovaných rastlín

ZÁVER

Modelová rastlina hrach má geneticky podmienenú silnú apikálnu dominanciu. Po dekapitácii dochádza k vyrastaniu postranných pupeňov, čo je spojené i so zmenou génovej expresie v axilárnych pupeňoch. Jeden z vyrastajúcich pupeňov preberá funkciu dekapitovaného apikálneho vrcholu, stáva sa novým primárnym zdrojom auxínu a na základe kompetície bráni transportu auxínu zo sekundárneho zdroja auxínu.

Pokiaľ bola pred dekapitáciou na druhý axilárny pupeň aplikovaná kyselina 1-N-naftyftalómová (NPA) alebo kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA) ako inhibítor polárneho transportu auxínu, vyrastanie druhého axilárneho pupeňa bolo významne redukované. Následne však bolo sledované vyrastanie prvého axilárneho pupeňa. Tento proces bol spojený so zmenami v expresii génov *PsPIN1* i *PsAUX1* kódujúcich transportné prenášače auxínu a génu *PsDRM1* súvisiacim s dormantným stavom pletív v rastline. Vzhľadom na to, že apikálny vrchol ako primárny zdroj auxínu bol odstránený a druhý axilárny pupeň ako nový potenciálny primárny zdroj auxínu bol v dôsledku aplikácie NPA alebo TIBA inhibovaný, úlohu primárneho zdroja auxínu prebral prvý axilárny pupeň, čo je v súlade s teóriou kompetitívnej kanalizácie auxínu.

Zmeny v expresii génov *PsPIN1*, *PsAUX1* i *PsDRM1* v axilárnom pupeni po dekapitácii môžu byť ovplyvnené dĺžkou ponechanej dekapitovanej stonky. Dĺžka dekapitovanej stonky preto môže mať vplyv aj na rýchlosť iniciácie rastu axilárneho pupeňa, ktorý sa po odstránení apikálneho vrcholu stane novým primárnym zdrojom auxínu. Toto naznačuje, že signálom pre vyrastanie pupeňa môže byť pokles koncentrácie auxínu v stonke alebo jeho vyprázdnenie zo stonky.

LITERATÚRA

- Balla J., Blažková J., Reinohl V., Procházka S. (2002): Involvement of auxin and cytokinins in initiation of growth of isolated pea buds. *Plant Growth Regulation*, 38: 149 – 156.
- Balla J., Kalousek P., Reinohl V., Friml J., Procházka S. (2011): Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *The Plant Journal*, 65: 571-577.
- Cline M. G. (1997): Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, 84 (9): 1064–1069.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y. D., Jurgens G., Palme K. (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413: 425-428.
- Hoshino T., Hitotsubashi R., Miyamoto K., Tanimoto E., Ueda, J. (2005): Isolation of PsPIN2 and PsAUX1 from etiolated pea epicotyls and their expression on a three-dimensional clinostat. *Space life sciences*, 36 (7): 1284 - 1291.
- Kitazawa D., Miyazawa Y., Fuji N., Hoshino A., Iida S., Nitasaka E., Takahashi H. (2008): The gravity-regulated growth of axillary buds is mediated by a mechanism different from decapitation-induced release. *Plant Cell Physiology*, 49(6): 891–900.
- Morris S. E., Cox M. C. H., Ross J. J., Krisantini S., Beveridge CH. A. (2005): Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology*, 138: 1665-1672.
- Ongaro V., Leyser O. (2008): Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59 (1): 67–74.
- Sauer M., Balla J., Luschnig CH., Wisniewska J., Reinohl V., Friml J., Benková E. (2006): Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes and Development*, 20: 2902-2911.
- Stafstrom J. P., Ripley B. D., Devitt M. L., Drake B. (1998): Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. *Planta*, 205: 547-552.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P., Friml J. (2007): Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*, 12 (4): 160-168.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P. B., Ružička K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006): Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312: 883.
- Yoshida S., Kuriyama H., Fukuda H. (2005): Inhibition of transdifferentiation into tracheary elements by polar auxin transport inhibitors through intracellular auxin depletion. *Plant Cell Physiology*, 46 (12): 2019–2028.

DETERMINATION OF CANDIDATE SEQUENCES CHALCONE ISOMERASE AND DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE IN WHEAT

STANOVENÍ KANDIDÁTNÍ SEKVENCE CHALKON IZOMERÁZY A DIHYDROFLAVONOL REDUKTÁZY U PŠENICE

Ondroušková J., Vyhnánek T., Musilová M. Trojan V., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jana.ondrouskova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work is identification of genes from the anthocyanins biosynthetic pathway that are responsible for grain color and comparison of their sequences. We used ripened caryopsis of spring wheat with different coloration of the aleurone and pericarp layers as an experimental material. Genotypes UC66049 and Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen have blue aleurone. Genotypes Abissinskaja arrasajta and ANK-28B have purple pericarp. Genotype Novosibirskaja 67 was used as standard. It has a white caryopsis as well as a genotype Heroldo (a form of winter wheat). RNA from caryopsis was isolated using phenol-chloroform extraction and reverse transcribed into cDNA. House keeping gene GAPDH (the gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was chosen as a control for PCR to verify the successful transcription of cDNA. For designing primers we used the cDNA sequences for CHI and DFR obtained from the database NCBI were used for primers designing. Via PCR reactions were amplified segments of sequences for CHI and DFR, which were used for direct sequencing of PCR product. The obtained candidate sequences were compared with sequences in the NCBI database and their polymorphisms were evaluated. We acquired a partial sequence for genes chalcone isomerase and dihydroflavonol reductase. By comparing sequences for each gene was found homology in the range from 95 to 100%. The variability caused single nucleotide polymorphism and indels. Sequences were sent to the Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc. There were compared our cDNA sequences with BAC library of wheat chromosomes. A sequence for CHI was found on chromosome 5B. In the case of DFR was found a sequence on 3B and on long arm 3A chromosome. Downstream step in this work is to get the whole sequence of the transcribed genes by 3'RACE and 5'RACE PCR reactions. Furthermore, the complete cDNA sequences will be compared with genomic DNA sequences to determine the presence of introns in genes. Finally, the data will be used for the design of qPCR for the study of genes expression during caryopsis maturation.

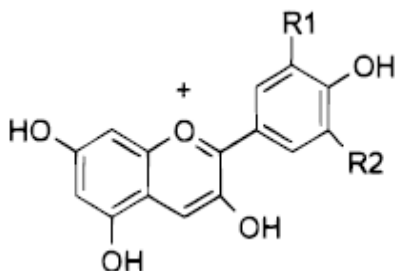
Key words: wheat, chalcone isomerase, dihydroflavonol reductase

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge Mgr. Jan Bartoš, Ph.D. from Institute of Experimental Botany, Olomouc. We also thank Ing. Tomáš Koloušek, Head of Botanical Gardens and Arboretum for cultivating plant material. This study was supported by project GAČR No. 204/09/H002.

ÚVOD

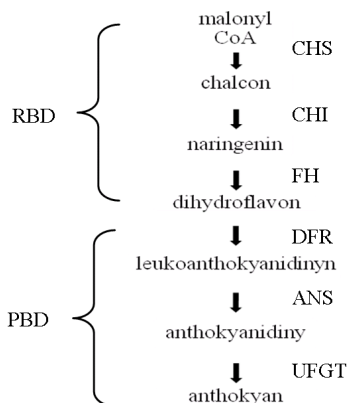
Chalkon izomeráza (CHI) a dihydroflavonol reduktáza (DFR) jsou enzymy, které se účastní biosyntetické dráhy anthokyanů. Anthokyany jsou přírodní pigmenty, které zbarvují květy, listy, plody, semena a další pletiva do modré, purpurové až oranžové barvy. V pšenici seté (*Triticum aestivum*) zodpovídají mj. za různé zbarvení obilek. Modrá barva je ukládána v aleuronové vrstvě obilky, purpurová barva v perikarpu. V současné době bylo popsáno více než 500 druhů anthokyanů. Jsou vysoce ceněné nejen pro své organoleptické vlastnosti, ale zejména pro blahodárný vliv na zdraví. Jejich benefitem je zejména antioxidační aktivita a pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Anthokyany jsou na světle nestabilní a ve vodě nerozpustné, tudíž se obvykle přirozeně nenachází ve volném stavu. Místo toho se ve vakuolách buňky vyskytují sloučené s cukry, které jim poskytují stabilitu a rozpustnost ve vodě. V takovém případě je aglykonová (necukerná) část označována jako anthokyanidiny (de Pascual-Teresa *et al.*, 2010). Obecné schéma nejběžnějších anthokyanidinů je zobrazeno na obrázku 1. V širším slova smyslu můžeme v souvislosti s anthokyany hovořit o biosyntetické dráze flavonoidů, jelikož anthokyany do této skupiny spadají společně s chalkony, aurony, flobafeny a dalšími látkami. První v biosyntetické dráze flavonoidů je enzym chalkon syntáza, který katalyzuje vznik chalkonu. Biosyntetická cesta dále vede s několika enzymatickými kroky k ostatním třídám flavonoidů, jako jsou flavonoly, dihydroflavonoly a nakonec k anthokyanům. Další třídy flavonoidů (tj. izoflavony, aurony, flavony a pro-anthokyanidiny) představující vedlejší větve flavonoidů, které jsou odvozeny z meziproduktů anthokyanových sloučenin (Ahmed *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2008; Schijlen *et al.*, 2004). Geny pro enzymy uplatňující se v biosyntetické dráze anthokyanů (obr. 2) jsou rozdělovány na dvě skupiny: geny rané biosyntézy a geny pozdní biosyntézy. V této práci se zabýváme genem pro chalkon izomerázu, která patří do rané biosyntetické dráhy a genem pro dihydroflavonol reduktázu, která je řazena do pozdní biosyntetické dráhy.

Obr. 1: Obecné schéma nejběžnějších anthokyanidinů



Anthokyanidin	R1	R2
pelargonidin	H	H
kyanidin	OH	H
delfinidin	OH	OH
peonidin	OCH ₃	H
petunidin	OCH ₃	OH
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

CHS – chalkon syntáza, CHI – chalkon izomeráza, FH – flavanon hydroxyláza, DFR – dihydroflavonol reduktáza, ANS – anthokyanidyn syntáza, UFGT – UDPG-flavonoid glukosyl transferáza, RBD - raná biosyntetická dráha, PBD – pozdní biosyntetická dráha



MATERIÁL A METODIKA

Jako materiál byly použity obilky pšenice jarní formy s nestandardním zbarvením obalových vrstev (obr. 3). Genotyp UC66049 a Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen mají modře zbarvený aleuron. Genotypy Abissinskaja arrasajta a ANK-28B se vyznačují purpurovým perikarpem. Genotyp Novosibirskaja 67 byl použit jako standard a vyznačuje se bílou barvu obilky stejně jako odrůda Heroldo (ozimá forma pšenice). Vzorky osiva byly získány z Agrotest fyto, s.r.o. Kromčářů. Rostliny byly vypěstovány v maloparcelkovém pokusu na pozemku Arboreta MENDELU ve vegetačním období 2010/2011.

Z obilek byla fenol-chloroformovou extrakcí izolována celková RNA a přepsána pomocí komerčního kitu (M-MLV Reverzní transkriptáza, Top-Bio) do cDNA. Ověření úspěšnosti přepisu bylo provedeno prostřednictvím provozního genu GAPDH (gen pro glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázu), který byl vybrán dle Wang et al. (2003). Při návrhu primerů byly použity sekvence cDNA získané z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Pro CHI byla vybrána sekvence cDNA s kódovým označením v databázi AB187026.1. Pro DFR byla vybrána sekvence s kódovým označením AB162138. Primery byly navrženy pomocí programu Primer3. K zjištění optimální teploty anealingu navržených primerových kombinací byla provedena gradientová PCR. PCR reakcí byly amplifikovány úseky sekvencí pro CHI a DFR, které byly po purifikaci použity pro přímé sekvenování PCR produktu, které bylo provedeno

specializovanou laboratoří (Macrogen, Holandsko). Získané kandidátní sekvence byly pro vyhodnocení polymorfizmu porovnány programem ClustalW2 vzájemně mezi sebou a se sekvencí z databáze NCBI, podle které byly navrženy primery. Sekvence byly odeslány do laboratoře molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky, Olomouc. Zde bylo provedeno porovnání získaných sekvencí se sekvencemi v BAC knihovně jednotlivých chromozomů pšenice seté.

Obr. 3: Použité genotypy pšenice

a) UC66049, b) Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, c) Novosibirskaja 67, d) Abissinskaja arrasajta, e) ANK-28B



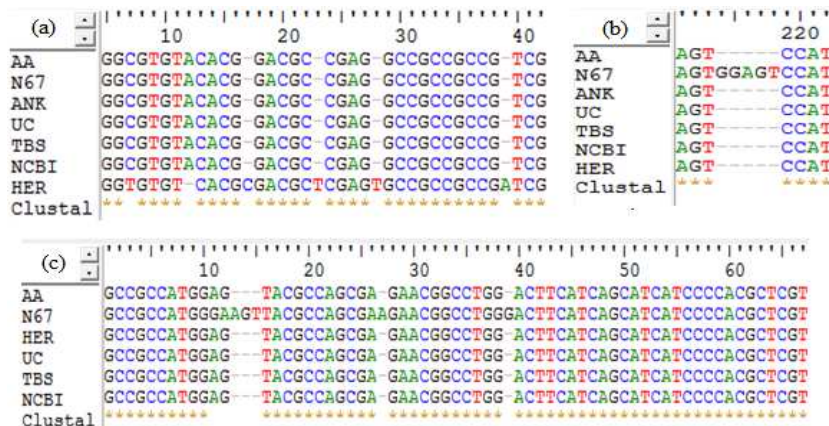
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky sekvenování PCR produktu pro CHI: sekvenováním jarních forem pšenice seté (genotypy UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Abissinskaja arrasajta, ANK-28B a Novosibirskaja 67) jsme získali sekvenační data fragmentu DNA o velikosti 335 bp. Pro genotyp Heroldo byla velikost sekvence 338 bp. Odchylka v počtu bazí nukleotidů je dána jednonukleotidovými insercemi/delecemi (dále jen indel) (obr. 4a). V jednom případě jsme našli indel o velikosti 5 bp (obr. 4b). Tento indel přerušuje čtecí rámec a může způsobit nefunkčnost nově vznikajícího proteinu. Ze získaných dat není možné určit, jestli se jedná o inserci v genotypu Novosibirskaja 67 nebo o delecii v sekvenci ostatních genotypů. Vzájemná podobnost mezi sekvencemi se pohybovala v rozmezí hodnot 98 - 100 %. Variabilita v sekvencích byla mírně ovlivněna i jednonukleotidovým polymorfizmem, který jsme u CHI zaznamenali pouze v jednom případě, a to u genotypu Heroldo. Musilová *et al.* (2011) detekovali v sekvenci chalkon syntázy několik podobných případů jednonukleotidového polymorfizmu, nicméně nedetekovali žádný indel.

Sekvenováním PCR produktu pro DFR: jsme získali data o velikosti 148 bp pro genotypy UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Abissinskaja arrasajta, ANK-28B a Heroldo. U genotypu Novosibirskaja 67 byla získaná sekvence veliká 153 bp. Odchylka ve velikosti sekvenačních dat u genotypu Novosibirskaja 67 je způsobena třemi indely (obr. 4c). První indel je velikosti tří nukleotidů. Další dva indely jsou jednonukleotidové. Vzájemná podobnost mezi sekvencemi se pohybovala v rozmezí hodnot 95 - 100%, což je vyšší stupeň podobnosti jaký zjistili Trojan *et al.* (2011) v případě chalkon syntázy (82 - 100%).

Porovnání sekvencí pro CHI a DFR s BAC knihovnou pšenice seté: sekvence DFR byla nalezena ve dvou kopiích. Na chromozomu 3B a na dlouhém rameni chromozomu 3A. Himi a Noda (2004) lokalizovali gen pro DFR na chromozomech 3A, 3B a 3D. Shoda v sekvencích se u jednotlivých genotypů pohybovala v rozmezí 96 – 98 %. V případě CHI byla nalezena shoda na dlouhém rameni chromozomu 5B. Podobnost byla 98 – 100%. Data pro chromozom 5DL nejsou v současné době dostupná a proto je možné, že kopie genu CHI se nachází i v této oblasti.

Obr. 4. Vybrané úseky sekvencí



(a) jednonukleotidové indely v sekvenci CHI

(b) indel přerušující čtecí rámec v sekvenci CHI

(c) indely v sekvenci DFR

AA - Abissinskaja arrasajta, N67 - Novosibirskaja 67, ANK - ANK-28B, UC - UC66049, TBS - Tchermaks Blaukörniger Sommerweizen, NCBI – sekvence použitá pro návrh primerů, HER – Heroldo

ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že sekvenční analýzou jsme získali částečnou sekвени pro geny CHI a DFR. Po srovnání byla zjištěna vzájemná homologie mezi sekvencí v rozmezí 95 - 100%. Bylo potvrzeno, že navržené primery skutečně amplifikují úseky genu CHI a DFR. V sekvencích se podařilo detekovat jednonukleotidové polymorfizmy i indely, které narušují čtecí rámec a mohou tak mít významný vliv na funkčnost nově vznikajícího transkriptu. Porovnáním sekvencí cDNA pro DFR s BAC knihovnou pšenice seté jsme zjistili přítomnost genu ve dvou kopiích (chromozom 3B a dlouhé rameno 3A). V případě CHI byl gen lokalizován na chromozomu 5B. Navazujícím krokem na tuto práci je získat sekvence celé části transkribovaných genů prostřednictvím 3'RACE a 5'RACE PCR reakce. Dále porovnat sekвени kompletní cDNA se sekvencí genomické DNA

a zjistit tak oblasti intronů v genech. V neposlední řadě budou data sloužit pro návrh qPCR pro studium exprese genů v průběhu zrání obilky.

LITERATURA

Ahmed N., Maekawa M., Noda K. (2009): Anthocyanin accumulation and expression pattern of anthocyanin biosynthesis genes in developing wheat coleoptiles. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 223-228.

Himi E., Noda K (2004): Isolation and location of free homoelogenous dohydroflavonol-4-reductase (DFR) gene of wheat and their tissue-dependent expression. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 365-375.

Musilová M., Trojan V., Vyhnánek T., Martinek P., Havel L. (2011): Application of genetic markers in wheat donors with unusual kernel colour. *Agriculture*, 57 (4): 19.

de Pascual-Teresa S., Moreno A. D., García-Viguera C. (2010): Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (4): 1679-1703.

Schijlen E. G., Ric de Vos CH., van Tunen A. J., Bovy A. G. (2004): Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65 (19): 2631-2648.

Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54 (4), 733-749.

Trojan V., Musilová M., Vyhnánek T., Havel L. (2011): Chalkon synthase gene detection in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 57 (4), 23.

Wang A., Xia Q., Xie W., Datla R., Selvaraj G. (2003): The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (24): 14487-14492

STOMATAL CONDUCTANCE OF SHORT ROTATION COPPICE BASED ON SAP FLOW MEASUREMENTS AND ITS RESPONSE TO CHOSEN METEOROLOGICAL VARIABLES

STOMATÁLNÍ VODIVOST PLANTÁŽE RYCHLE ROSTOUČÍCH DŘEVIN ODVOZENÁ Z MĚŘENÍ SAP FLOW A JEJÍ OVLIVNĚNÍ VYBRANÝMI METEOROLOGICKÝMI PROMĚNNÝMI

Orság M.^{1,2}, Trnka M.^{1,2}, Fischer M.^{1,2}, Kučera J.³, Žalud Z.^{1,2}

¹Department of Agrosystems and Bioclimatology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe – Global Change Research Centre AS CR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

³EMS Brno, Turistická 5, 621 00 Brno, Czech Republic

E-mail: orsag.matej@gmail.com

ABSTRACT

The main aim of this study was to derive stomatal conductance (gs) from sap flow measurements and explore some of possible applications of this method. Sap-flow and other meteorological variables were continuously monitored in poplar-based short rotation coppice (SRC) plantation in Bystřice nad Pernštejnem during growing season 2012. Sap flow of 8 trees was measured using heat dissipation method, then expressed as transpiration per square meter of projection area and by adding into rewritten Penman-Monteith equation the canopy conductance (gs) was obtained. Compared with direct measurements on leaf level this approach is advantageous for obtaining gs, because of integrating all leaf categories of tree or whole canopy. Further analysis also proved, that gs is strongly driven by VPD. Finally, it was found that the relationship between gs and VPD is also influenced by available soil moisture content.

Key words: sap flow, canopy conductance, transpiration, short rotation coppice

Acknowledgments: This text is supported by the Operational Programme of Education for Competitiveness of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project: Building up a multidisciplinary scientific team focused on drought, No. CZ.1.07/2.3.00/20.0248), by the CzechGlobe Centre, which is being developed within OP RDI and co-financed by EU funds and the state budget of the Czech Republic (Project: CzechGlobe – Centre for Global Climate Change Impacts Studies, Reg. No. CZ.1.05/1.1.00/02.0073) and by LH12037 „ Development of models for assessment of abiotic stresses in selected bio-energy plants “

INTRODUCTION

Fast growing forests are broadly defined (Vitousek, 1991) as having average growth rates ranging from 10 to 40 m³/ha/year, with a rotation period shorter than 35–40 years. “Short rotation coppice” (SRC) is one type of fast growing forests systems intended for biomass production on (former) arable land, thus representing an alternative method to food production, especially in those regions where food production is less profitable due to inconvenient climate and/or soil conditions (Trnka et al. 2008). SRC in Europe is usually based on Poplar (*Populus* spp.) or willow (*Salix* spp.), grown with dense spacing (up to 10 000 for poplars resp. 20 000 trees/ha for willows). Poplar plantations under climate of Czech Republic usually achieve average biomass increment over 10 m³/ha/year (4.5 t/ha/year of dry matter) and rotation period is typically shorter than 8 years (Havlíčková 2009). High biomass production and vigorous juvenile growth on one hand demands sufficient and regular water income on the other hand. In the early screening and breeding efforts on energy crops the main focus was on aspects such as potential productivity, disease and frost resistance, coppicing and resprouting ability (Hall & Hanna, 1995; Zsuffa, 1995). However, more recently it has been acknowledged that available water will very often be the most important yield-limiting factor (e.g. Lindroth & Båth, 1999). In last decades SRC plantation based on poplar (*Populus* spp.) and willow (*Salix* spp.) are increasingly being grown in Europe as a sustainable source of bioenergy. The largest areas of SRC are situated in Scandinavia (Sweden 12 500 ha) (Dimitriou et al, 2011), Germany, UK, Italy, Belgium and France (Slater et al., 2001). Establishment of new fast growing forests is an effective way to meet the growing demand for wood, therefore reducing the pressure on natural forests (Migliavacca 2008). At the same time, intensively managed “industrial” monospecific forest plantations with a short-rotation period arouse controversy as concerns their benefits for the community, the land and the environment (McKenney et al., 2004). Inadvertent consequences may arise when biomass production is inappropriately maximized. Competition for water resources may, therefore, become important if energy forests are to cover areas on a regional scale, esp. in semiarid areas. Thus, the evapotranspiration (ET) (as the main loss component of water balance) from energy forests is the key factor determining how the overall water balance will be affected (Grip et al., 1989) and at the same time sets the limits for sustainable growth and development of SRC. ET is referred as combination of two separate processes whereby water vapour is lost on the one hand from the soil surface by evaporation (E_s) and on the other hand from the plant by transpiration (T). The driving force to remove water vapour from the evaporating surface (e.g. leaves) is direct solar radiation, water vapour pressure deficit (VPD) and wind speed. Both evaporation and transpiration occur simultaneously and there is no easy way of distinguishing between the two processes (Allen 1998). Water fluxes in forest ecosystems can be determined by

means of several different approaches: water balance, vapour flux, or sap flow. Water vapour flux measurements over forests (via eddy correlation or Bowen ratio) typically provide average estimates for large areas (ha); the main weakness of these techniques is the inability to determine the exact origin of measured fluxes, since this changes depending on wind direction and wind speed. Sap flow techniques provide information at the individual tree scale (m^2). Thus, estimates of stand sap flow are directly dependent on local conditions which may vary over a short distance (Granier et al., 1994). ET can be further described by gradient-diffusion theory with two conductances indicating the major controls of water from the vegetation to the atmosphere. The physiologically based canopy (g_c), or (when divided by LAI) stomatal conductance (g_s), describes transport from the saturated inner-leaf surface through stomata to the air just outside the leaf. The aerodynamic conductance describes further transport from the air just outside the leaf to the air at a certain reference height above the canopy. The behavior of stomatal conductance (rate of stomata opening/closure) is affected by a number of environmental factors, such as solar radiation, water pressure deficit, temperature, or soil moisture. Thus, the stomatal conductance represents a key parameter that determines energy and water exchanges between canopy and the atmosphere (Wang, 1999). In presented study, the measurements of sap flow were used to calculate stand canopy conductance, by adding it into rewritten Penman-Monteith formula. Calculated stomatal conductance was subsequently linked to the VPD, global radiation and soil moisture.

MATERIALS AND METHODS

Research locality Domanínek is situated near town Bystřice nad Pernštejnem (Czech Republic, Czech-Moravian highland, $49^{\circ}52'N$, $16^{\circ}23'E$, altitude 530 m a.s.l., rain-fed area with mean annual precipitation 587.8 mm, mean annual temperature $6.6^{\circ}C$). In April 2001, a high density experimental field plantation of poplar clone J-105 (*P. nigra* x *P. maximowiczii*) with the total area of 4 ha was established here. The plantation was set up on agricultural land previously seeded predominantly with cereals and potatoes. Hardwood cuttings were planted in a double row design with inter-row distances of 2.5 m and spacing of 0.7 m within rows accommodating density of nearly 10,000 trees/ha. Soil conditions at the location are representative to the wider region with deep luvisol cambisol influenced by gleyic processes and with limited amount of stones in the profile. The site itself is situated on a mild slope of 3° with an eastern aspect and is generally subject to cool and relatively wet temperate climate typical for this part of Central Europe with mingling of continental and maritime influences (Trnka et al., 2008). Sap flow of 8 trees was measured during growing season 2012 (2. 6. – 9. 9.), using heat dissipation method (HDP) proposed by Granier (1985) with 20 mm needle sensors (UP GmbH, Cottbus, Germany) used. Trees were chosen in order to express stem diameter variability comprising both dominant and suppressed trees. The measuring element consists of two needle probes (20 mm long and 2 mm in diameter). Each one contains a copper-constantan thermocouple. Those probes are radially inserted in the sapwood of the trunk at distance of approximately 15 cm from each other. The upper probe is

heated at a constant power (0.2 W) and the lower probe is considered as temperature reference. The measurement method relies on the fact, that the sap flow per unit of sapwood area is deducted from the thermal difference between the heated and the reference probe, using an empirical relationship determined in laboratory conditions: $v = 0.199 * [(\Delta T_{\max} / \Delta T) - 1]^{1.231}$, [$\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1}$], where ΔT is the temperature difference between heated and reference probe and ΔT_{\max} means the maximum temperature difference representing zero sap flux, usually occurring at nighttime (esp. predawn). In this study the sapwood was assumed to be equal to the whole cross sectional area (CSA) which was determined from the diameter measurements (the thickness of the bark was deducted in order to get the diameter of the xylem) just between heated and reference probe. The CSA value is necessary for relating the calculated sap flux per 1 m^2 of CSA to sap flow of particular tree. Further, taking into account the total CSA (0.11 m^2) of all stems ($n = 160$) (measured at 130 cm now including the bark) occupying experimental area (60.76 m^2) and assuming mean LAI to be 7, the conversion constant 3688.45 (total LAI / total CSA) was developed, allowing derivation of projection area and LAI for each tree from its CSA. Then sap flow could be expressed as transpiration per square meter of foliage. In the next step the rewritten Penman-Monteith equation was used to calculate stand canopy resistance ($= r_c$, which is inverted value of g_c).

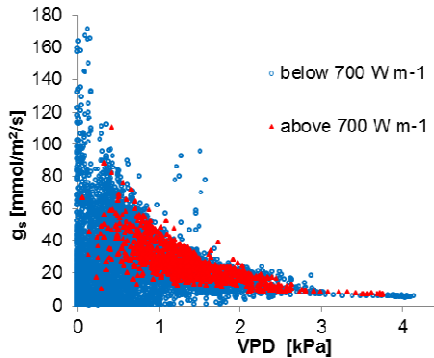
$$r_c = r_a \left[\frac{\Delta R_n - G}{\lambda ET} - \frac{\Delta + \gamma}{\gamma} \right] + \frac{\rho c_p VPD}{\gamma \lambda ET}$$

where r_a (s m^{-1}) is the aerodynamic resistance calculated from wind speed, Δ is slope of saturated vapour pressure, R_n (W/m^2) represents net radiation (we considered R_n to be 70 % of global radiation), G (W/m^2) soil heat flux (G was neglected), γ ($0.066 \text{ kPa } ^\circ\text{C}^{-1}$) is the psychrometric constant, ρ (1.23 kg m^{-3}) is the density of air, c_p is the specific heat of air ($1004 \text{ J kg}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$) and VPD (kPa) is the water vapour pressure deficit. All variables were calculated using climate data originated from 12 m high mast (measured ca. 2 m above canopy) in the center of the plantation. Wind speed was measured from nearby meteo station at turf grass. Soil moisture was measured using TDR probe (CS616, Campbell Scientific, USA), vertically inserted into the soil in the center of experimental plot, monitoring soil moisture from surface down to 30 cm depth.

RESULTS AND DISCUSSION

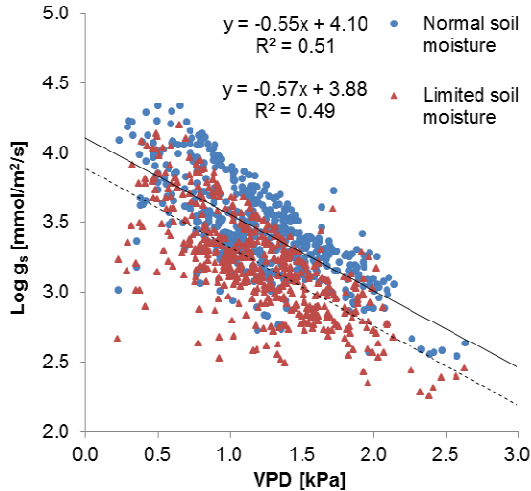
Highest g_s values were usually observed between 7:00 and 11:00 each day. Maximum peak g_s , 528.46 $\text{mmol/m}^2/\text{s}$ of tree with highest transpiration rate was reached on July 13th, when maximum VPD per this day was only 0.19 kPa. Hinckley et al. (1994) reported maximum g_s of 480 $\text{mmol/m}^2/\text{s}$, Ceulemans et al. (1989) reported maximum stomatal conductances of about 500 $\text{mmol/m}^2/\text{s}$ for five year old trees of the poplar clone Unal (*P. trichocarpa x deltoides*), in the field. g_s derived from sap flow integrates all leaves (both sunlit and shaded) and thus usually provides lower values than g_s measured by porometer, where typically the most active leaves at the upper part of canopy are investigated as e.g. just in Ceulemans et al. (1989) or Hinckley et al. (1994).

Fig. 1 Relationship between g_s and VPD with global radiation below and above 700 W/m^2 .



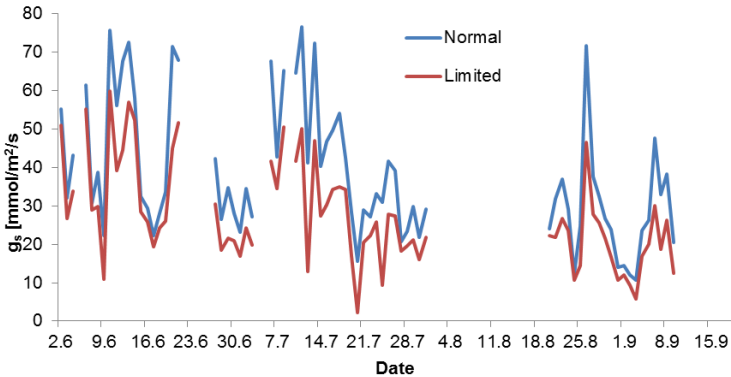
After midday g_s starts to decline in response to increasing evaporative demand, which means that stomatal conductance decreases as VPD increases. In Fig. 1 is shown negative relationship between stomatal conductance and VPD for the period June–September 2012. The g_s decreased with an exponential decay function from 171.3 to $0.1 \text{ mmol/m}^2/\text{s}$ for increasing VPD from 0.2 to 4.12 kPa . The 10 minute g_s was strongly driven by VPD. The values in Fig. 1 are divided into two groups according solar radiation level. Red triangles are above and blue circles below 700 W/m^2 . It was expected that in time with solar radiation above 700 W/m^2 the stomata opening are already limited by radiation but may be controlled by VPD. This type of stomatal response to VPD can avoid excessive water loss at high VPD and prevent leaf water potential from falling to a dangerous level, which can be very beneficial during periods of water shortage. Volumetric soil moisture descended from 18 % in mid-June to 9 % in mid-July and remained this low for the rest of the growing season 2012. In Fig. 2 is shown different stomatal response to VPD in relation to soil moisture content.

Fig. 2 Values of stomatal conductance. Blue circles represent conditions with normal soil moisture (15 – 18 %), and red triangles represent limited soil moisture (9 – 10 %).



Ten minutes values of stomatal conductance processed as natural logarithm are divided into two groups, blue circles represent conditions with normal level of soil moisture (15 – 18 %), and red triangles represent limited soil moisture (9 – 10 %). It can be seen, that in conditions of limited soil water availability closes stomata earlier comparing with higher soil moisture level. Fig. 3 expresses different levels of stomatal behavior between normal and limited soil water treatment in period 2. 6. – 9. 9. 2012. Stomatal conductance of drought stressed poplars was in average by 11.84 % lower compared with normal soil water level. Ceulemans et al. (1988) reported that low soil moisture and soil water potential decreases g_s . Also Hall et al. (1998) observed very low conductances coincided with the large soil water deficit. Generally there is a large variation in stomatal response reaction and in seasonal patterns of stomatal activity observed among different poplar clones, which adds to the physiological explanation of the large plasticity of the genus *Populus*.

Fig. 3 Different levels of stomatal conductance between normal and limited soil water content. Poplars under drought stress shows lower g_s during whole period 2. 6 – 9. 2012.



Further analysis also proved that g_c / g_s can be successfully modeled as a function of global radiation and water pressure deficit (VPD) according Lohammar (Lohammar et al. 1980). Deriving g_s from parameterized Lohammar equation (using only global radiation and VPD), multiplying it by LAI, adding it as r_c (inverted value of g_c) into rewritten Penman-Monteith equation and subsequent expressing of sap flow per square meter of projection area can serve as reverse estimation of canopy transpiration under various soil water conditions.

CONCLUSIONS

It was proved, that stomatal conductance of executed poplar plantation moderately responds to soil moisture availability and strongly responds to VPD, which means that in time of higher VPD poplars are able effectively regulate their transpiration by stomata closing. This finding is important because there were found several clones (mainly the productive hybrids of *P. trichocarpa*) for which very pure stomatal control was reported. The stomatal control preventing tree against cavitation and embolism should be taken into account especially when the SRC are established in rain fed areas. This has also very important consequence with respect to climate change when more drought periods are expected. The approach of calculating g_s using Penman-Monteith and Lohammar equations has further application as the core for models estimating transpiration and later balance and last but not least can be helpful during extrapolation and generalization of measured data, gap-filling, etc.

REFERENCES

- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M. (1998): Crop evapotranspiration (Guidelines for computing crop water requirements). FAO Irrigation and Drainage Paper No. 56, 290 pp.
- Ceulemans, R., Impens, I., Imler, R., (1988): Stomatal conductance and stomatal behavior in Populus clones and hybrids. Canadian Journal of Botany, 1988, 66(7): 1404-1414.
- Dimitriou, I., Rosenqvist, H., Berndes, G. (2011): Slow expansion and low yields of willow short rotation coppice in Sweden; implications for future strategies, Biomass and Bioenergy, Available online 29 September 2011.
- Granier, A. (1985): Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. Ann. Sci. For. 42, 193–200.
- Grip, H., Halldin, S., Lindroth, A. (1989): Water use by intensively cultivated willow using estimated stomatal parameter values. Hydrological Processes, Vol. 3: 51 – 63.
- Hall, R., B., Hanna, R., D. (1995): Exchange, evaluation and joint testing of genetic stock. Biomass and Bioenergy 9, 81 – 88.
- Hall, R., L., Allen, S., J., Rosier, P., T., W., Hopkins, R. (1998): Transpiration from coppiced poplar and willow measured using sap flow methods. Agricultural and Forest Meteorology, Vol. 90: 275–290.
- Havlíčková, K., Weger, J. (2009): Short Rotation Coppice for Energy Purposes — Economy Conditions and Landscape Functions in the Czech Republic. Proceedings of ISES World Congress 2007 (Vol. 1–5), 2482–2487.
- Hincley, T. M., Brooks, J. R., Čermák, J., Ceulemans, R., Kučera, J., Meinzer, F. C., Roberts, D. A. 1994: Water flux in a hybrid poplar stand. Tree Physiology, Vol. 14: 1005–1018.
- Lindroth, A., Båth, A. (1999): Assessment of regional willow coppice yield in Sweden on basis of water availability. Forest Ecology and Management 121, 57 – 65.
- Lohammar, T., Larsson, S., Linder, S., Falsk, S. 1980: FAST – Simulation models of gaseous exchange in Scots pine. In: Persson, T. (ed.): Structure and function of northern coniferous forests – an ecosystem study. Ecological Bulletins (Stockholm), No. 32, Swedish Natural Science Research Council, p. 505–523.
- Migliavacca, M., Meroni, M., Manca, G., Matteucci, G., Montagnani, L., Grassi, G., Zenone, T., Teobaldelli, M., Goded, I., Colombo, R., Seufert, G. (2009): Seasonal and interannual patterns of carbon and water fluxes of a poplar plantation under peculiar eco-climatic conditions. Agricultural and Forest Meteorology 149, 1460 – 1476.
- McKenney, D.W., Yemshanov, D., Fox, G., Ramlal, E., (2004): Cost estimates for carbon sequestration from fast growing poplar plantations in Canada. Forest Policy and Economics 6 (3–4), 345–358.

Trnka, M., Trnka, M., Fialová, J., Koutecký, V., Fajman, M., Žalud, Z., Hejduk, S. (2008): Biomass production and survival rates of selected poplar clones grown under a short-rotation on arable land, *Plant Soil Environ.*, 54: 78 – 88.

Vitousek, P.M., (1991): Can Planted Forests Counteract Increasing Atmospheric Carbon Dioxide? *Journal of Environmental Quality* 20 (2), 348–354.

Wang, J., Bras, R. L. (1998): A new method for estimation of sensible heat flux from air temperature. *Water Resources Research*, Vol. 34: 2281–2288.

Zsuffa, L. (1995). Characterisation of poplar and willow clones and cultivars. *Biomass and Bioenergy* 9, 53-68.

THE USE OF PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS FOR EVALUATION OF DROUGHT STRESS RESPONSE OF WINTER WHEAT DURING PLANT WILTING

Ryšková T., Truhlářová E., Klimešová J., Smutná P.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xsiplako@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Some physiological and morphological parameters were evaluated in four winter wheat varieties during gradual drying. These parameters can influence the level of sensitivity of plants to drought.

Intact plants at the stage of the fourth true leaf were exposed to gradual drying and their stress response was evaluated using the measures Relative Water Content and Osmotic Pressure. The size and structure of the root system was simultaneously evaluated as the Specific Root Length parameter.

The variety Meritto showed notable differences in all examined parameters. Its plants exhibited delayed onset of wilting, probably due to bigger Specific Root Length and high vigour of plant.

Key words: drought tolerance, RWC, osmotic pressure, roots, wheat

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency of Faculty of Agronomy at Mendel University in Brno, project TP 10/2012.

ÚVOD

Tolerance vůči suchu je polygenně založený komplex znaků, který zahrnuje celou řadu morfofyziologických a biochemických adaptací zaměřených nejen na přežití rostlin v podmínkách vodního deficitu, ale v případě hospodářských plodin i na získání co nejmenšího poškození výnosu v podmínkách sucha. Vzhledem k výrazným klimatickým změnám, které s sebou přinášejí vyšší teploty, nižší srážky a jejich nevyrovnané rozložení během vegetačního období, ukazuje se jako stále aktuálnější výběr tolerantnějších genotypů (např. Bláha, 2011). Tyto genotypy se mohou vyznačovat rozdíly v celé řadě fyziologických reakcí, například změnami osmotického přizpůsobení rostlin, změnami hladin obranných proteinů a jiných metabolitů, antioxidační kapacitou rostlin atd. Pro naše klimatické podmínky však má smysl vybírat jen takové znaky, které u tolerantnějších odrůd nevedou ke snížení výnosů a kvality. Jsou to takové znaky, které při nástupu sucha jen částečně uzavírají průduchy, nemění intenzitu fotosyntézy, zvyšují mírně obsah ABA a současně zvětšují kořenový systém. (Bláha, 2011). Příjem a výdej vody z buňky je ovlivněn osmotickým a tlakovým potenciálem rostliny. Lepší schopnost rostliny regulovat osmotický gradient napomáhá během sucha udržet základní růstové funkce, což se projeví na vyšší produkci suché hmoty i výnosu (Morgan, 1995). V případě nedostatku vody je rostlina schopna regulovat osmotický tlak (OA) akumulací určitých látek, což se projeví na udržení turgoru a vyššího relativního obsahu vody v listech. Izanloo et al. (2008) zjistili, že úroveň OA byla hlavní fyziologickou charakteristikou vztahující se k toleranci k opakovanému stresu suchem a související se schopností rychlé regenerace rostliny po zalití. Snadno hodnotitelným symptomem ztráty turgoru je vadnutí listů. Opožděný projev tohoto znaku v podmínkách nedostatku vláhy může souviset se schopností lépe přijímat vodu, nebo s kapacitou OA (Blum, 2011).

Naším cílem bylo porovnat meziodrůdové rozdíly v některých fyziologických znacích, které by bylo možné potenciálně využít jako kritérium při výběru vhodných odrůd pro další šlechtění a současně sledovat reakce odlišných genotypů na stejné stresové podmínky.

MATERIÁL A METODIKA

Pro porovnání stresové reakce na náhlé suchu v růstové vegetativní fázi byly vybrány tři odrůdy pšenice ozimé (Etela, Meritto a Venistar) pěstované v naší republice a jedna syrská linie (S27) pocházející z ICARDA, Sýrie.

Hodnocené pšenice byly vysety do truhlíku s hrubým perlitem (od každé odrůdy 3 truhlíky po 20 rostlinách). Rostliny byly nechány v režimu 12 hodinového dne při teplotách 18°C a 12 hodinové noci při teplotách 10°C až do stádia 3-4 pravých listů. Odrůda Meritto za stejných podmínek narostla o 1 pravý list více než ostatní. Rostliny z truhlíků byly vytaženy a osušeny na filtračním

papíru. Fyziologické hodnocení RWC (Relative water contents) a OP (Osmotic potencial) bylo provedeno v 11 odběrech (v hodinových intervalech). RWC bylo hodnoceno dle Barr and Weatherley, (1962) na druhém nejmladším listu. V nejmladší části usychajících rostlin byl měřen osmotický potenciál pomocí přístroje VAPRO 5600 (Vapor pressure osmometr).

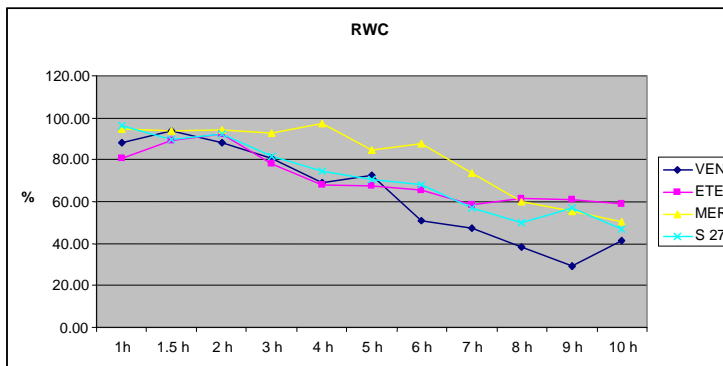
Stanovení velikosti kořenového systému bylo provedeno metodou digitální analýzy obrazu pomocí skeneru Epson perfection 700 photo, následná analýza pak programem WinRHIZO, verze basic (Régent Instruments Inc., Quebec, Kanada). U analyzovaných kořenů byla stanovena sušina a vypočítány hodnoty SRL (Specific Root Length), které představují podíl celkové délky kořenového systému (m)/ sušina (g) (Ostonen et al., 2008)

VÝSLEDKY A DISKUZE

Míra tolerance rostlin vůči suchu bývá hodnocena na základě fyziologických reakcí na nedostatek vody v rostlinných buňkách. V posledních letech jsou pro hodnocení citlivosti rostlin vůči abiotickému stresu využívány také postupy vycházející z hodnocení exprese ochranných genů ze skupiny Cor/Lea (např. Suprunova et al., 2004). Ukazuje se, že čím jsou genotypy odolnější, tím je během stresu vyšší exprese těchto genů a je zaznamenáván dřívější nástup této reakce. Bylo však také pozorováno (Mikulková et al., 2009), že aktivace některých dehydrinových genů u tolerantnějších genotypů byla zaznamenána později, pravděpodobně v souvislosti s odlišným fyziologickým stavem rostlin, za stejných aktivačních podmínek, ovlivněným pravděpodobně odlišnou mírou nebo způsobem adaptace na suchu. Proto jsme se v prezentované práci zaměřili na hodnocení vybraných fyziologických a morfologických parametrů rostlin odrůd pšenice ozimé vykazujících nejen odlišnou toleranci vůči suchu, ale i pravděpodobně různé způsoby adaptace dané původem jednotlivých odrůd/linií.

V průběhu usychání celých rostlin byla v první řadě sledována bilance vody v rostlinách, kterou dobře vyjadřuje parametr RWC (obr. 1).

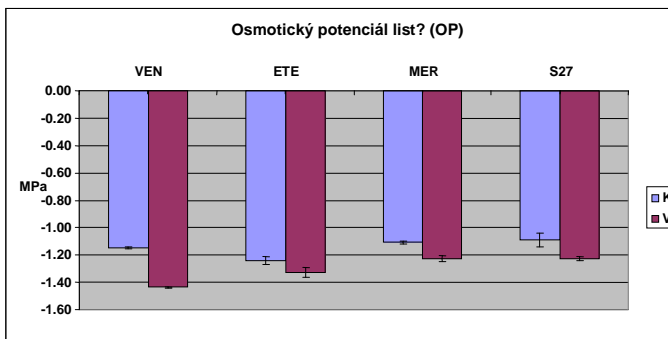
Obr. 1 Hodnocení RWC ve vadnoucích listech usychajících rostlin (hodnocení bylo provedeno na 2. nejmladším listu v hodinových intervalech po vytažení a osušení celých rostlin ze substrátu; VEN – Venistar, ETE – Etela, MER – Meritto, S27 – syrská linie 27)



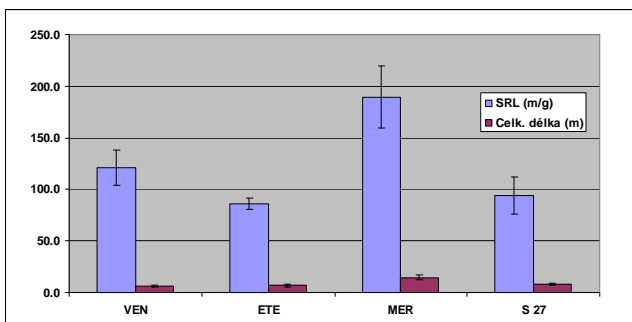
Z grafu (obr. 1) je zřejmé, že za daných podmínek se nejvíce odlišovala odrůda Meritto, u které byl nástup vadnutí vyjádřený poklesem RWC zaznamenán až o 2 hodiny později než u zbývajících odrůd/linií, i když na počátku vykazovaly rostliny všech testovaných odrůd podobný obsah vody v pletivech (80 – 96%). Odrůda Meritto patří v našich klimatických podmínkách k tzv. stabilním odrůdám, pro které je typický stabilní výnos v různých prostředích (Smutná a Ryšková, 2012). Nižší pokles RWC díky suchem indukovaného stresu, je spojován se schopností tolerantnějších genotypů lépe absorbovat vodu z půdy a lepší schopnosti zabránit ztrátám vody přes průduchy (např. Keyvan, 2010). Vzhledem k tomu, že hodnocené rostliny usychaly volně na filtračních papírech (nebyly v kontaktu s půdou) je pravděpodobnější, že pozorovaný rozdíl souvisel spíše s větším počtem listů u této odrůdy. Je známo, že v průběhu vadnutí dochází k transportu vody ze starších spodních listů do mladších a proto rostliny s větším počtem listů byly v takto uspořádaném pokuse zvýhodněny.

Snížení osmotického potenciálu (OP) vlivem sucha je mechanismus, kterým se mohou rostliny přizpůsobit nízké dostupnosti půdní vody (Morgan, 1984). Jak ukazují hodnoty OP v době vadnutí (obr. 2), tato schopnost se více projevila u odrůd (Venistar) s vyšší mírou adaptace na suché podmínky a syrské linie S27. Vyšší odolnost vůči suchu vyjádřenou vyšším výnosem na suché lokalitě byla u odrůdy Venistar prokázána ve víceletých polních pokusech (Smutná a Ryšková, 2012).

Obr. 2 Hodnocení OP ve vadnoucích listech usychajících rostlin (hodnocení bylo provedeno u nejmladších listů nestresovaných kontrol – K a při nástupu vadnutí - V; VEN – Venistar, ETE – Etela, MER – Meritto, S27 – syrská linie 27)



Obr. 3 Hodnocení SRL a celkové délky testovaných odrůd (hodnoty představují průměr měření kořenů 5 rostlin \pm SD; VEN – Venistar, ETE – Etela, MER – Meritto, S27 – syrská linie 27)



Reakce rostlin na stres suchem mohou být ovlivněny velikostí a architekturou kořenového systému. Obr. 3 znázorňuje rozdíly ve velikosti a struktuře kořenových systémů testovaných odrůd/linií pomocí hodnot celkové délky skenovaných kořenů jedné rostliny a parametru SRL. Tento parametr je pravděpodobně nejčastěji hodnocený morfologický znak vyjadřující stavbu (jemnost) kořenů. Bývá závislý na kvalitě půdy, ale bývají pozorovány i genotypové závislosti, případně vliv interakce genotypu a prostředí (Ostonen et al., 2008; Hajzler et al., 2012). Z výsledků na obr. 3 je zřejmé, že největší kořenový systém s nejménějším kořenovým vlášením měla odrůda Meritto. Kořenové vlášení zvětšuje zevní povrch kořene, což vede ke zvýšenému vstřebávání vody a živin rostlinou. Tato vlastnost by mohla u odrůdy Meritto přispívat k pozorovanému většímu nárůstu biomasy v daných podmínkách.

ZÁVĚR

Z hlediska hodnocených fyziologických a morfologických znaků se jako nejvíce tolerantní genotyp jevila odrůda Meritto. U rostlin této odrůdy byl v dané fázi vegetativního vývoje zaznamenán nejpomalejší nástup stresové reakce podmíněný nejpomalejší ztrátou vody z listových pletiv. Rostliny tolerantnější odrůdy Venistar a syrské linie S27 ztrácely vodu z listových pletiv rychleji (nástup vadnutí o 2 hod dříve) a po 10 hodinách usychání vykazovaly větší poškození než rostliny odrůdy Meritto. Zvýhodnění rostlin této odrůdy, za daných experimentálních podmínek, souviselo pravděpodobně spíše s větší velikostí a strukturou kořenového systému než s mírou tolerance vůči suchu. Míra intenzity stresových reakcí u morfologicky odlišných rostlin by se měla pravděpodobně hodnotit ve vztahu k počátku vadnutí.

LITERATURA

Barr HD, Weatherley PE (1962): A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. Aust J Biol Sci 15:413-428.

Bláha L (2011): Znaky adaptability k podmínkám stresu u zemědělských plodin. Úroda 59 věd.př.10:726-734.

Blum A (2011): Plant Breeding for Water-Limited Environments. Springer New York, Dordrecht – Heidelberg - London pp. 255, eISBN 978-1-4419-7491-4

Hajzler M, Klimešová J, Středa T (2012): Biomass production of white mustard (*Sinapis alba* L.) varieties in relation to the root system size In Tagungsband der 62. Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. 1. vyd. Raumberg-Gumpenstein: LFZ Raumberg-Gumpenstein, 2011, s. 105-108. ISBN 978-3-902559-74-6

Izanloo A, Condon AG, Langridge P, Tester M, Schnurbusch T (2008): Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars. J Exp Bot 59 (12):3327-3346.

Keyvan S (2010): The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. J Anim Plant Sci 8 (3): 1051- 1060.

Mikulková P, Holková L, Hronková M, Klemš M, Bradáčová M (2009): Efficiency of differential laboratory methods for selection of drought tolerance barley genotypes. Cereal Res Commun 37, Suppl.:277-280.

Morgan JM (1984): Osmoregulation and water stress in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 35:299-319.

Morgan JM (1995): Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. Field Crop Res 40 (3): 143-152.

Ostonen I, Puttsepp U, Biel C, Alberton O, Bakker MR, Lohmus K, Majdi H, Metcalfe D, Olsthoorn AFM, Pronk A, Vanguelova E, Weih M, Brunner I (2007): Specific root length as an indicator of environmental change. Plant Biosystems 141(3):426-442.

Smutná P, Ryšková T, (2012): Evaluation of stress susceptibility in winter wheat varieties using drought tolerance indices. Növénytermelés 61, Supplement: 41-44

Suprunova T, Krugman T, Fahima T, Chen G, Shams I, Korol A, Nevo E (2004): Differential expression of dehydrin genes in wild barley (*Hordeum spontaneum*), associated with resistance to water deficit. Plant Cell Environ 27:1297-1308.

NATURAL VARIATION IN THE CYTOKININ METABOLIC NETWORK IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

PŘÍRODNÍ VARIACE METABOLISMU CYTOKININŮ U *ARABIDOPSIS THALIANA*

Samsonová Z.^{1, 2, 3}, Kuklová A.^{1, 2}, Mazura P.^{1, 2}, Rotková G.^{1, 2}, Novák O.⁴, Brzobohatý B.^{1, 2}, Kiran N. S.^{1, 2}

¹Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CEITEC – Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

³Department of Plant Anatomy and Physiology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

⁴Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, 783 71 Olomouc, Czech Republic

E-mail: 223212@mail.muni.cz

ABSTRACT

Cytokinins are key determinants of cellular plasticity and are crucial for several processes that together determine overall fitness under any given conditions.

Like any other signal molecule, the action of cytokinins is determined by the amount of active hormone exposed to receptor molecules, and the strength and duration of the subsequent signalling. Active hormone levels are the result of the combinatorial regulation of their biosynthesis, reversible and irreversible metabolic interconversion, and terminal degradation.

The existence of genetically determined variation in geographically distinct populations within the model species *Arabidopsis thaliana* is being increasingly documented. We are exploring the cytokinin status of young *Arabidopsis* seedlings from a collection of accessions that represent maximal genetic diversity within the species. We will present data regarding cytokinin levels and some examples of physiological analysis of the variation in response to exogenous cytokinin. Comprehensive mapping of the variation in cytokinin metabolism will allow us to establish a basis for understanding how relatively minor changes in hormone status are used by the plant to form and fine-tune adaptive processes.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; cytokinin metabolism; homeostasis; metabolic and regulatory networks; natural variation; zeatin

Acknowledgments: Czech Science Foundation P305/11/P768 (to PM); CZ.1.07/2.3.00/30.0017 “Postdocs in Biological Sciences” (to GR) & CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

INTRODUCTION

Tightly regulated cellular plasticity is the main response mechanism in plants to changing environmental conditions. Phytohormones have simple chemical structures, but are capable – on their own and in co-operation with each other – of bringing about profound changes in plant structure and physiology. Naturally occurring cytokinins (CKs) are N⁶-substituted adenine derivatives and are involved in regulating a wide range of developmental processes including chloroplast differentiation, nutrient assimilation and translocation, seed germination, leaf expansion, flowering, and senescence (reviewed in Sakakibara 2006). Highly active molecules like CKs have a rather narrow band of concentrations of the active form at the steady-state and this has been confirmed via quantification in several plant species (Benková et al., 1999, Kiran et al., 2006, Hradilová 2007). This steady state is the result of a combinatorial regulation of all the processes that the molecule is subject to, including, among others, biosynthesis, transport, conjugation and degradation. The resulting level at which this steady-state is established can vary depending on the plant species (monocot/dicot), plant part (cell/tissue/organ), developmental phase (flower bud/developing fruit), internal cues (other hormones/nutrition status), external cues (light/pathogen), etc. We have previously determined that the plant probably uses modification of zeatin metabolism to vary internal CK levels even when the external source of CKs is of the non-zeatin type (Lexa et al., 2003). Thus the regulation of zeatin-type CKs is a central component of overall CK metabolism *in planta*.

There is growing interest in the response of naturally occurring *Arabidopsis* accessions and a variety of abiotic and biotic factors, and these investigations have resulted in the recognition that natural *Arabidopsis* diversity can be used to discover information about those factors. The existence of natural variation in pathways that are crucial for the co-ordination of developmental and environmental cues is becoming increasingly clear from various recent studies focused on analyzing diversity among *Arabidopsis* accessions for a variety of physiological processes such as nitrogen uptake (Chardon et al., 2010), response to the hormone salicylic acid (van Leeuwen et al, 2007) and resistance to the biotrophic pathogen *Botrytis cinerea* (Rowe & Kliebenstein, 2008). Therefore, *A. thaliana* natural variation provides a relevant resource to uncover such gene functions, particularly for traits related to adaptive plasticity, such as those controlling CK homeostasis. Analyzing the existing variation among different *A. thaliana* accessions with regard to accumulation patterns of different CK metabolites is expected to yield information about the regulatory mechanism(s) controlling CK homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Seeds of 20 *Arabidopsis* accessions described previously as representing maximal genetic diversity in the species (Clark et al., 2007) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. Seeds were sterilized, plated on square petri plates containing 0.5X MS medium, without sucrose and solidified with 1.2% agar. The seeds were stratified in the dark at 4 °C for 3 days and then transferred to a cultivation chamber (Percival AR36L, Percival, USA) and incubated under long day conditions (16h light; 21 °C/8h dark; 19 °C) with illumination corresponding to 90-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Seedlings were harvested at 14 and 21 days after sowing (DAS) with the roots and shoots collected separately. The samples were then frozen and stored until processed for CK quantification. CK extraction and quantification was carried out in the Laboratory of Growth Regulators, Palacký University according to established procedures (see e.g. Novák et al. 2008). The root inhibition tests were carried out under identical conditions with the exception that the test medium was supplemented with 1 μM trans-zeatin. These seedlings were photographed at 6, 8, 10, 12 and 14 DAS and root lengths measured using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The hypocotyl elongation test was conducted under similar conditions except that the light intensity was 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the seedlings were photographed at 11 DAS.

RESULTS AND DISCUSSION

Arabidopsis accessions show a distinct variation in CK metabolite levels

The collection of 20 genetically diverse *Arabidopsis* accessions show distinct variations in CK levels. We measured the levels of all isoprenoid CK derivatives in the roots and shoots separately at 14 DAS and 21 DAS and we found that the total CK levels showed substantial differences when compared to the reference accession Col-0 (Fig. 1). Col-0 has roughly the same

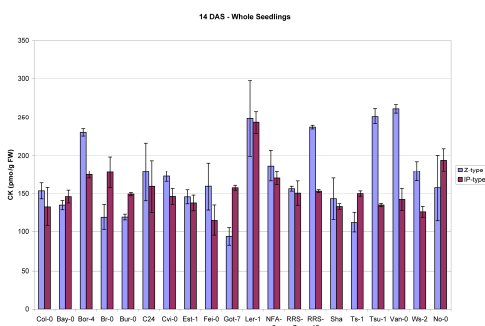


Figure 1: Quantification of isoprenoid CKs from whole 14-day old seedlings, blue bars – zeatin-type and red bars – iP-type CKs.

levels of iP-type and zeatin-type CKs, as do some other accessions, like NFA-8, RRS-7, Bay-0 and C24. However, we have identified accessions that are significantly enriched in zeatin-type CKs like Tsu-1, Bor-4 and Van-0 (Fig 1). Some accessions like Br-0, Got-7, Bur-0 and Ts-1 display the reverse, i. e., are significantly enriched in iP-type CKs (Fig.1). It is already known that the iP-type CKs are probably synthesised by AtIPT7 and AtIPT8 (Miyawaki et al., 2004; Sun et al., 2003).

On the other hand zeatin-type CKs are probably synthesised in the chloroplasts by the action of enzymes like AtIPT3 (Kasahara et al.,

2004). Thus we predict that there could be widely different regulation of these gene products in our collection of accessions. A comprehensive analysis of the transcriptional regulation of these genes is a challenge for the future and will form part of a separate study.

Organ-specific distribution of CK levels

The analysis of CK levels has also revealed a substantial difference between the root and the shoot in terms of the steady-state levels of CK metabolites. We find that in general the roots have significantly higher levels of CKs in comparison to the shoots and that this difference is true for all the accessions in our collection. A similar distribution is found at both 14 and 21 DAS. That CKs play opposite roles in the root and the shoot has been shown by over-expression of CK-degrading enzymes (see e.g., Werner et al., 2008). Our results with the diverse accessions point to a more general trend which probably led to the conclusion (before the discovery of plant-encoded IPTs) that CKs were produced exclusively in the roots (see e.g., Letham & Palni, 1983). Our observations lends credence to the hypothesis that the root is the predominant organ of CK production. However this then begs the transport question and the differential distribution of CK types in the xylem and phloem sap (Kudo et al., 2010) needs to be fully explained.

Response to exogenous CK is different

We have established that *Arabidopsis* seedlings elongate their hypocotyls in response to exogenous

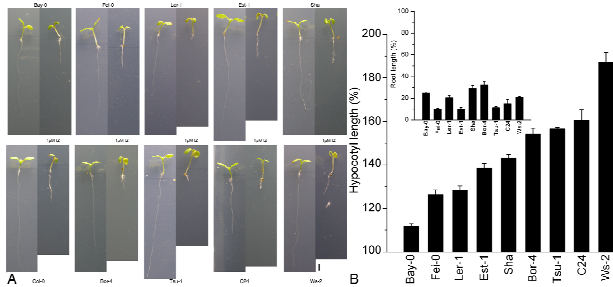


Figure 2: CK-dependent stimulation of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* accessions under decreased light intensity. **A:** photographs of 11-day-old seedlings on medium with (right) and without (left) $1\mu\text{M}$ iZ. **B:** quantification of results from A, expressed as percentages of the respective untreated controls.

zeatin when grown under low light intensity ($20\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). In this bioassay we have found that there is considerable variation in the physiological response of the hypocotyl to zeatin (Fig. 2).

Under normal light intensities, preliminary results from the root elongation bioassay

shows that there is probably a substantial difference in the sensitivities of these accessions to exogenous zeatin (Fig. 3). The sensitivity of the plant to CKs is determined by the activity and the sensitivity of the different CK receptors. Recent work has shown that the sensitivity of the plant to CKs is determined by the expression and distribution of CK receptors that have different substrate specificities (Stolz et al., 2011). A thorough examination of the CK receptor expression profile enabling us to explain this divergent response to exogenous CK will be the subject of future research.

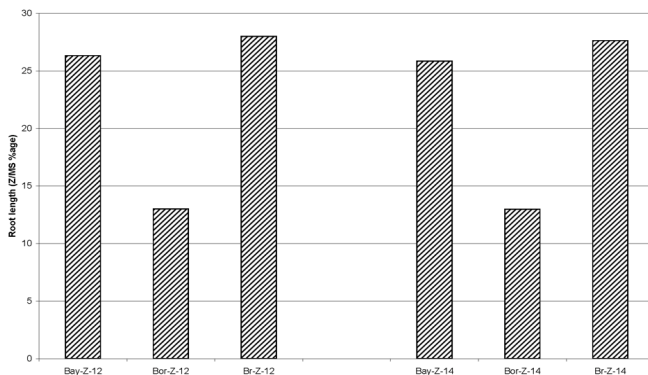


Figure 3: CK-dependent inhibition of root elongation is significantly different in Bor-4 from two other accessions at both 12DAS (left) and 14DAS (right).

CONCLUSIONS

We have determined the metabolite profile of isoprenoid CKs in a collection of Arabidopsis accessions representing maximal genetic diversity.

The CK profiles show a substantial variation in iP- and zeatin-type CKs.

We observed a general trend of higher total CK content in the roots.

Preliminary experiments have produced results that show substantial differences in the sensitivities to exogenous CKs in two different bioassays.

LITERATURE CITED

- Benková E, et al. *Plant Physiol.* 121: 245-251 (1999).
- Chardon F, et al. *J. Exp. Bot.* 61: 2293-2302 (2010).
- Clark RM, et al. *Science* 317: 338–342 (2007).
- Hradilová J, et al. *J. Plant Growth Regul.* 26: 229-244 (2007).
- Kasahara H, et al. *J. Biol. Chem.* 279: 14049–14054 (2004).
- Kiran NS, et al. *J. Exp. Bot.* 57: 985-96 (2006).
- Kudo T, et al. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 53–60 (2010).

Letham DS. & Palni LMS. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 163–197 (1983).

Lexa M, et al. *Ann. Bot.* 91: 585-597 (2003).

Miyawaki K, et al. *Plant J.* 37: 128–138 (2004).

Novák O, et al. *Phytochemistry* 69: 2214-2224 (2008).

Rowe HC. & Kliebenstein DJ. *Genetics* 180: 2237–2250 (2008).

Sakakibara H. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 431–449 (2006).

Stolz A, et al. *Plant J.* 67: 157-68 (2011).

Sun J, et al. *Plant Physiol.* 131: 167–176 (2003).

van Leeuwen H, et al., *Plant Cell.* 19: 2099-110 (2007).

RESPONSE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* TO HEAT STRESS

ODPOVĚĎ *ARABIDOPSIS THALIANA* NA TEPLOTNÍ STRES

Skalák J.¹, Černý M.¹, Jedelský P.², Vaňková R.³, Brzobohatý B.¹

¹Laboratory of Molecular Plant Biology, CEITEC MENDELU, Mendel University in Brno & Institute of Biophysics AS CR, v. v. i Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Charles University in Prague, Faculty of Science, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

³Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Prague 6, Czech Republic

E-mail: skalak.jan7@gmail.com

ABSTRACT

The climate on Earth is rapidly changing. Thus, plants have to change their responses to environment factors and adapt their growth and development to it. We used methods from proteomics, 2D electrophoresis followed by mass spectrometry analysis, to study this problem. We found over 100 proteins significantly regulated by heat stress. Differential regulations of identified proteins correlated with hormonal profiling and physiology status of treated plants. Measurement of stomata movement, thermocamera plant body temperature screening and hormonal and proteomic profiling indicate that temperature response in *Arabidopsis thaliana* is influenced by plant hormone cytokinin signaling. Our results provide a new overview of signaling pathways of plants involved in response to changing environment conditions.

Key words: *Arabidopsis*, cytokinin, heat stress, proteomics

Acknowledgments: This work was supported by grants LC06034 and 1M06030 (Ministry of Education of the Czech Republic), IAA600040701 (Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic), GA206/09/2062 (Czech Science Foundation), and AV0Z50040507, AV0Z50040702 and AV0Z40310501 (Academy of Science of the Czech Republic).

ÚVOD

Tato práce řeší problematiku teplotního stresu na různé části rostlinného těla a zkoumá molekulární odpovědi pomocí moderních metod molekulární biologie, převážně proteomiky. S využitím těchto technik je možné zaznamenat funkční změny v odpovědi na teplotní stres a zkoumat tak podstatu ovlivněných molekulárních reakcí. Dále jsme schopni s pomocí transgenních linií upravovat hladiny fytohormonů, cytokininů, které stojí za celou řadou odpovědí rostliny na změnu vnitřních, ale i vnějších podmínek (Černý et al., 2011).

MATERIÁL A METODIKA

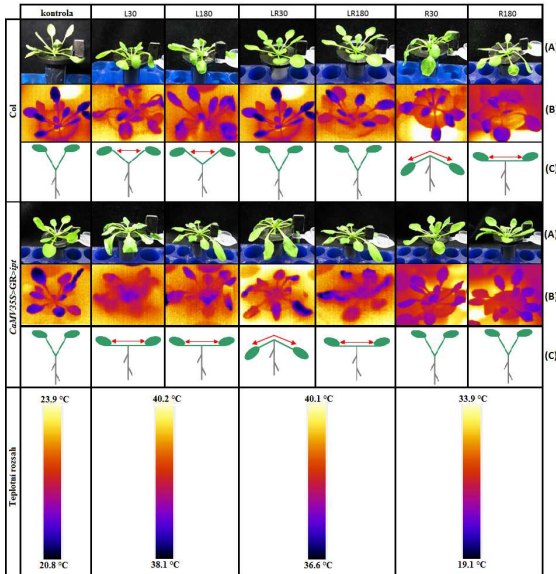
Jako modelové organismy byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (Col-0) a transgenní linie *CaMV35S>GR>ipt* (pOpBK-*ipt*) (Craft et al., 2005), u kterých je možné indukovatelně zvýšit hladiny aktivních cytokininů. Rostliny byly pěstovány po 4 týdny za standardních podmínek (21 °C/19 °C den/noc, 16-h fotoperioda 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ světelné intenzity) v kultivačním boxu (AR36LX, Percival) v hydroponii (Hoaglandovo medium). Po 4 týdnech kultivace byly rostliny ošetřeny 24 hodinovou aplikací 20 μM dexamethazonu (DEX; aktivátor systému transgenní linie). Poté byly rostliny vystaveny teplotnímu stresu zvlášť na kořeny, zvlášť na listy a na kořeny s listy dohromady. Sběrání vzorků probíhalo ve třech časových bodech (0 min, 30 min, 180 min). Po sběru byla část vzorku podrobena fenotypové analýze pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Ixus 120 IS, termokamerou IRISYS4000 a inverzním fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 70 a část vzorků byla okamžitě zamrazena v tekutém dusíku. Homogenizace vzorků probíhala vždy v množství po 180 mg a celkový protein byl vyextrahován pomocí 0,5 ml TBS pufru (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, inhibitory proteas a PVPP polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich). Listový extrakt byl přenesen na IgY-Rubisco Spin Column (GenWay Bitech/Sigma-Aldrich). Po 20 minutách v třepačce (20°C, 800 RPM) byl vzorek zbavený RuBisCO získán centrifugací. Listové i kořenové vzorky byly zkoncentrovány pomocí Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit a extrahovány acetonovou (TCA) extrakcí (Damerval, 1986). Pro elektroforetickou analýzu byl vzorek nejprve nanesen na IPG stripy (pI 3-10, nelineární gradient, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>) a po izoelektrické fokusaci (150 V 20 min, 300 V 20 min, 600 V 20 min, 1500 V 20 min, 3000 V 20 min a 4000 V stoupající na 12 000 V za hodinu, PROTEAN IEF Cell Unit, Bio-Rad) byl vzorek proteomu dále rozdělen pomocí SDS-PAGE (dodecylsírán sodný v gradientovém 8-20% polyakrylamidovém gelu, Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell, Bio-Rad; 100 V 10 minut a 150 V 60 minut). Výsledné gely byly obarveny Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) a neskenovány kalibrováním Densitomentrem GS-800 (Bio-Rad) s rozlišením 700 dpi. Analýza obrazu byla provedena Decodon Delta 2D softwarem, kde míra signifikace byla nastavena při $p < 0,05\%$ na +/- 1,4 (porovnání relativního objemu nultých bodů obou linií s ostatními časovými body). Signifikantně regulované spoty byly digestovány trypsinem a podrobena analýze MALDI TOF/TOF MS.

VÝSLEDKY A DISKUZE

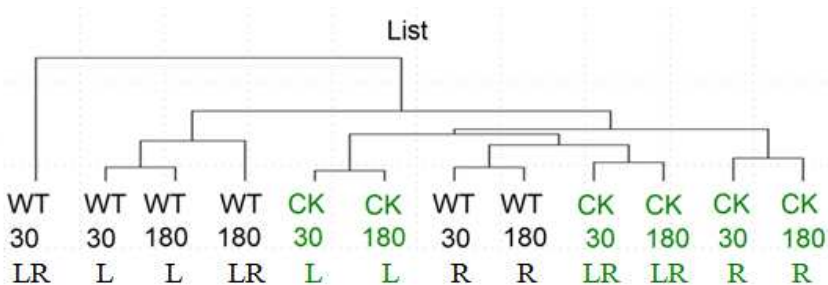
Před samotnou proteomickou analýzou bylo provedeno otestování funkčnosti kolony pro afinitní odstranění RUBISCO Seppro IgY-Rubisco Spin Column (Sigma-Aldrich). Bylo zjištěno, že dané kolony jsou schopny snížit hladinu tohoto abundantního proteinu na 25% z původního obsahu. Díky tomu jsme na gelu po depleci Rubisko schopni identifikovat více skvrn odpovídajících proteinům ležícím ve shodné oblasti MW/pI jako RuBisCO. Tyto výsledky byly publikovány (Černý et. al, 2011).

Fenotyp nadzemní části rostlin *Arabidopsis thaliana* standardního typu vystavených teplotnímu stresu závisel na způsobu jeho aplikace. V případě ohřevu celé rostliny nebyly pozorovány v průběhu 3 hodin působení teplotního stresu významné odchylky od fenotypu při standardní kultivační teplotě. Vadnutí bylo zjištěno při aplikaci teplotního stresu na nadzemní část rostliny. Nejvyšší stupeň vadnutí byl pozorován v případě působení teplotního stresu pouze na kořeny. Zvýšené hladiny cytokininů u transgenní linie *CaMV35S>GR>ipt* tuto odpověď změnilo. Vadnutí nebylo pozorováno při ohřevu pouze kořenů. Při ohřevu pouze nadzemní části rostlin bylo vadnutí výraznější než u rostlin se standardními hladinami cytokininů. Při ohřevu celých rostlin byl rozsah vadnutí nejsilnější a podobal se situaci u rostlin se standardními hladinami cytokininů, u kterých došlo k ohřevu pouze kořenů. Nejvyšší stupeň fenotypových změn pozorovaných v těchto dvou případech velmi dobře koreloval s výsledkem shlukové analýzy diferenciálně regulovaných proteinů listového proteomu (Obr. 2). Tato analýza ukázala, že odpovědi na úrovni proteomu jsou si nejbližší u standardní linie při teplotním působení na kořeny a transgenní linie při teplotním působení na celou rostlinu. K průkazu, že teplota listu odpovídala očekávání pro jednotlivé způsoby aplikace teplotního stresu, bylo využito techniky termálního snímání (Obr. 1).

Obr.1: fotografie (A) a termo snímky (B) působení teplotního stresu na kontrolní (Col) a transgenní (CaMV35S>GR>ipt) linie *Arabidopsis thaliana*. Pro lepší přehlednost byly stanoveny 4 parametry signifikantního vadnutí (C) u těchto linií, kde červená šipka značí odlišnou polohu listů oproti kontrole (L = teplotní stres pouze na listy; LR = teplotní stres na celou rostlinu; R = teplotní stres na kořeny; 30 a 180 = časový interval měření v minutách).

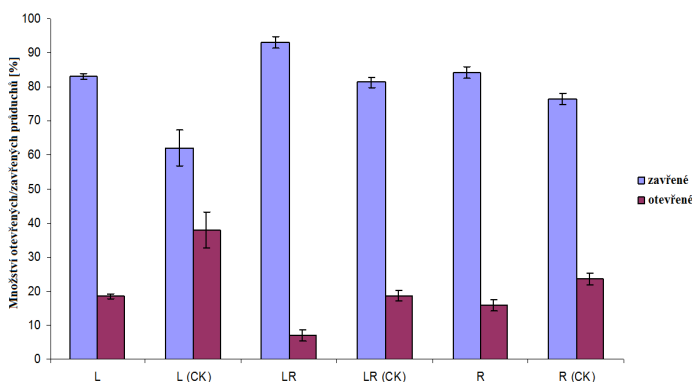


Obr. 2: rozdělení jednotlivých skupin regulovaných proteinů v listovém proteomu pomocí metody City-block distance (WT – kontrola, CK – zvýšená hladina cytokininů, 30 a 180 – časový údaj sběru v minutách).



V práci Dobrá et al., 2010, byla na hormonální úrovni prokázána změna hladiny nejenom cytokininů, ale i ostatních hormonů v reakci na teplotní stres. Efekt zvýšené teploty a změny hladin fytohormonů se projevil na vodní bilanci u pozorovaných linií tabáků (*Nicotiana tabacum*). Vypařování vody z rostlinného těla probíhá prostřednictvím průduchů, jejichž pohyb reguluje vodní bilanci rostlin. Efekt teploty na pohyb průduchů byl již pozorován (Zhang et al., 2008) a můžeme tak vysvětlit rozdílnou úroveň epinastie u našich pokusných linií (Obr. 1). Zvýší-li se vodivost průduchů, zvýší se úbytek vody v rostlině. To povede ke ztrátě turgoru a následné epinastii. Odlišný pohyb průduchů byl pozorován jak u linií se standardní hladinou cytokininů, tak u transgenních linií v závislosti na odlišných aplikacích teplotního stresu (Obr. 3).

Obr. 3: relativní počet otevřených/zavřených průduchů v důsledku odlišného teplotního stresu po 180 minutovém působení teplotního stresu (relativní hodnoty byly vztaženy vždy k nulovému bodu měření dané linie).



ZÁVĚR

Zvýšená teplota se ukázala jako silný stimul pro signifikantní změnu v profilu mnoha proteinů vyskytujících se ve všech typech organel rostlinné buňky. Výsledky této práce poslouží k dalšímu pátrání po teplotních receptorech v rostlinách a otevrou tak možnost vytváření nových transgenních systémů odolných vůči působení extrémních teplot, kterým jsou rostliny v současné době čím dál častěji vystavovány.

LITERATURA

Craft J., Samalova M., Baroun C., Townley H., Martinez A., Jepson I., Tsiantis M., Moore I. (2005): New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *Plant Journal*, 41: 899-918.

Černý M., Dyčka F., Bobalová J., Brzobohatý B. (2011): Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of Arabidopsis thaliana identified by proteome and phosphoproteome profilig. *Journal of Experimental Botany*, 62: 921-937.

Černý M., Skalák J., Kurková B., Brzobohatý B. (2011): Využití komerční metody imunochemického odstranění RUBISCO v analýze rostlinného proteomu. *Chemické Listy*, 105: 640-642.

Damerval C., Devienne D., Zivy M., Thiellement H. (1986): Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54.

Dobrá J., Motyka V., Dobrev P., Malbeck J., Prasil I. T., Haisel D., Gaudinová A., Havlová M., Gubis J., Vaňková R. (2010): Comparison of hormonal responses to heat, drought and cobined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1360-1970.

Zhang X., Wollenbeweberg B., Jiang D., Thao L. F. (2008): Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic Arabidopsis thaliana constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 59, 839-848.

COMPARISON OF ^{14}C 2,4-D AND ^{14}C FLT UPTAKE BY TOBACCO CELL SUSPENSION BY-2

SROVNÁNÍ PŘÍJMŮ ^{14}C 2,4-D A ^{14}C FLT BUNĚČNOU SUSPENZÍ TABÁKU BY-2

Štěpán Z.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: zdenek279@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this work was to compare uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, a substrate necessary for division and growth of cells of BY-2 suspension with uptake and accumulation of fluoranthene, a toxic substance, which on the contrary negatively influences the cell division. It was observed the kinetics of uptake of both xenobiotics labeled with ^{14}C carbon isotope (1 μM 2,4-D, 1 μM FLT), their metabolism and distribution in cells. The cells of suspension and medium were separated, fractionated ^{14}C activity of cells derivable from both separate marked substances to activity of protoplast and apoplast. For examination of viability of cells after mentioned expositions was carried out standard cultivation of suspension. 2,4-D was accumulated in protoplasts of cells, slight deposition of ^{14}C activity was detected for apoplast. [^{14}C]FLT was incorporated into the protoplast and slightly metabolized in comparison with [^{14}C]2,4-D. The difference in the uptake kinetics, metabolism and accumulation of used xenobiotics in the protoplast can be reached to the toxicity of this substances; it had stood that the fluoranthene was uptaken quicker than 2,4-D.

Key words: fluoranthene, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, ^{14}C activity, protoplast, apoplast, toxicity, uptake

Acknowledgments: This experiment was financed from grant number IP 16/2012 IGA FA Mendel University in Brno.

INTRODUCTION

Uptake of particular substances and their distribution in cell are realized on physico-chemical interactions of particular molecule and biological membrane. Resulting of these interactions are translocation mechanisms, which are important for saturation of biological processes. On protoplasts and cellular suspensions were in two latest centuries elucidated the mechanism of auxin transport throughout cell membranes. (Delbarre et al. 1996, Zažímalová and Petrášek 2000, Hoyerová et al. 2008); this transport determines realization of much physiological processes in plants. Plant cell suspensions are good models for observing substance uptake and kinetic of translocation mechanisms. For a very long time is used tobacco cell suspension BY-2 (Nagata et al. 1992). For cultivation and cell division of BY-2 suspension is necessary to add synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid into the medium. Since its uptake mechanism is known, is using ^{14}C -2,4-D appropriate for comparison with ^{14}C -FLT uptake. Fluoranthene is polycyclic aromatic hydrocarbon, toxic for organisms; it's influencing above all bioenergetics processes and cell division. However the dynamics of fluoranthene uptake and its accumulation in plant cells haven't yet been elucidated. The aim of the work was to determine kinetics of uptake of ^{14}C -2,4-D and ^{14}C -FLT, distribution and accumulation of ^{14}C -activity in apoplast and protoplast and bioconcentration factors of substances (BCFs).

MATERIAL AND METHODS

Fractionation of ^{14}C -activity in apoplast and protoplast was performed by Briskin *et al.* (1987). At first, the BY-2 suspension was filtered throughout big sinter. Then was applied the radioactive chemicals. We incubated BY-2 suspension in 2 radioactive chemicals - ^{14}C -2,4-D (specific activity 15,7 mCi/mmol, radioactive concentration 250 kBq/ml) and ^{14}C -FLT (specific activity 50 mCi/mmol, radioactive concentration 100 kBq/ml); there was 8 intervals of suspension output - 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 and 15 minutes. These intervals of time caused different uptake and final content of measured activity. After the incubation the cells and medium were separated by underpressure from -20 to -40 kPa on dorcus (vacuum separator). The medium and filtration papers were than given to ampules. The cells were than given to small conical flasks and 5 ml of infiltration buffer (50 mM MES, 0,3 M NaCl, pH 5,5) was added. Then the suspension was infiltrated by using -80 kPa underpressure in dorcus. The underpressure was reduced slowly. Then we used the dorcus to separate infiltration buffer and cells. The buffer was given to ampules. The cells in separation syringes were given to plastic test glasses and centrifuged by max. 2000 rpm. Gained apoplastic liquid and cells was given into the ampules. To cells was added small amount of methanol (max. 1 ml). Then scintillation liquid (SLD-41) was added into all ampules. After measurement on Packard-TriCarb were determined bioconcentration factors (BCF)- it was used method by Polder *et al.* (1995). In our case the BCF is proportion of ^{14}C -labelled substance concentrations in cell mass and

cultivation medium. Measurements of radioactivity in dpm were three times repeated for statistical purposes.

RESULTS

It was proved that the amount of uptaken ^{14}C -activity into the protoplast and partially also into the apoplast and cell surface has grown up with time (see figures 1,2,3,4). The amount of ^{14}C -2,4-D activity in medium with time decreased (see figures 1 and 3). The biggest amount uptaken into the apoplast was in the seventh minute. This also stand for the cell mass by ^{14}C -2,4-D (see Figures 1,2,4). By ^{14}C -FLT variant the amount of apoplastic ^{14}C -activity decreased from seventh to tenth minute; this activity increased in cell mass (protoplast; see figures 3,4). The percent of apoplastic activity from cellular activity was increasing from second minute to seventh minute by variant ^{14}C -2,4-D and decreasing from seventh minute to twelfth minute (see figure 4). By variant ^{14}C -FLT the percent of apoplastic activity from cellular activity remained low to twelfth minute and from twelfth to fifteenth minute it was increasing (see figure 4). The contained amounts of both radiochemicals in μmol s increased throughout the time in protoplast and decreased in medium. There was ten times more 2,4-D accumulated in protoplast than FLT(see figures 5 and 6). The highest bioconcentration factors were by ^{14}C -FLT variant, the one which is related to the real sample. Bioconcentration factors by ^{14}C -FLT variant related to the theoretical amount in sample (the added amount) were significantly lower. Theoretical and real bioconcentration factors were increasing (see figures 7 and 8).

Figure 1:

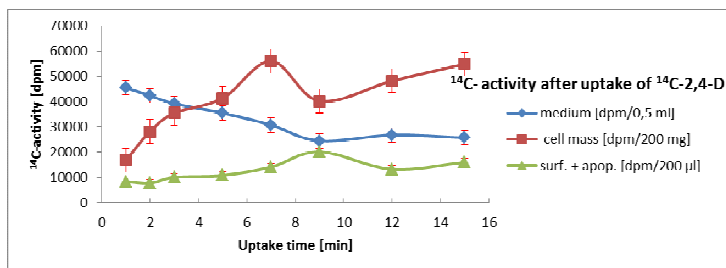


Figure 2:

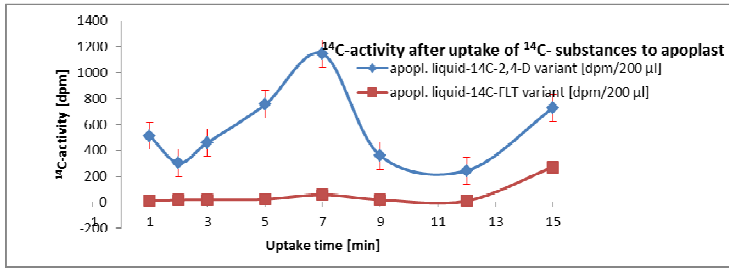


Figure 3:

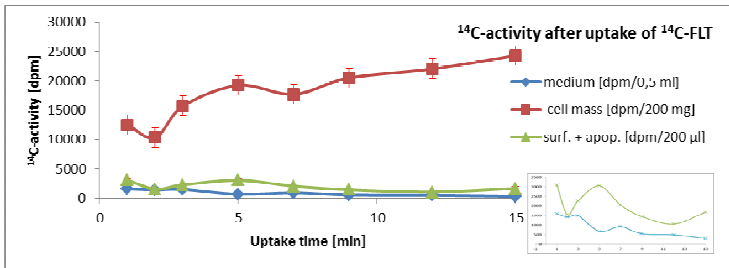


Figure 4:

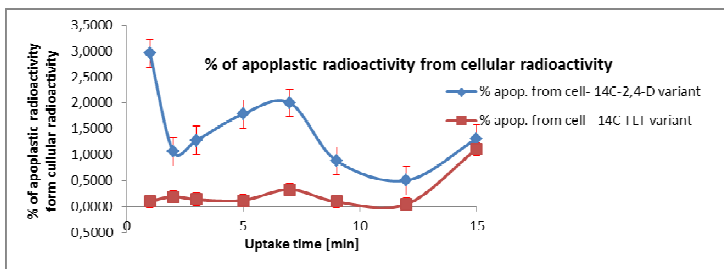


Figure 5:

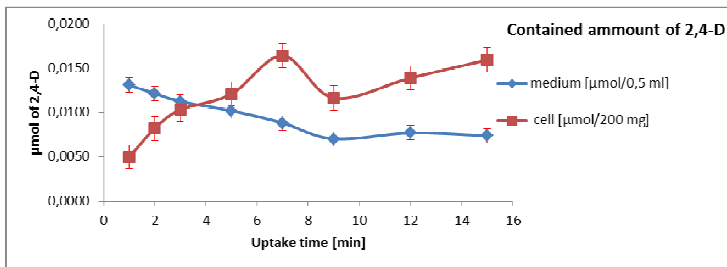


Figure 6:

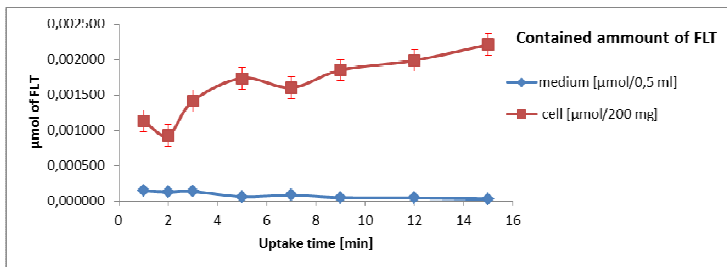


Figure 7:

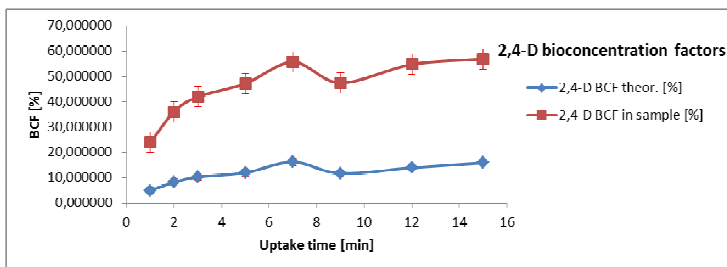
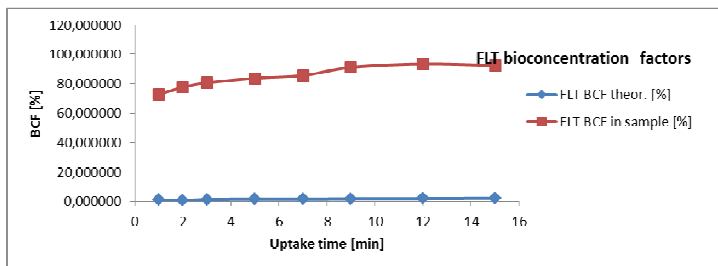


Figure 8:



DISCUSSION

Transport of xenobiotics is a very important area of plant physiology, because it, amongst other factors (eg. concentration of xenobiotic, temperature, insolation, type of xenobiotic...), determines the effects of this xenobiotics on cells. Substance uptake by plant cell suspensions is deciding phenomenon especially in the stage of depletion of nutrients from cultivation medium. The method of observing ^{14}C -activity was used by many other research teams, for example Delbarre *et al.* 1994. In this paper it was used to determine the dynamics of ^{14}C -2,4-D and ^{14}C -FLT uptake. There are still a lot questions that have to be answered. For example, by my experiment by the ^{14}C -FLT variant the amount of apoplastic ^{14}C -activity decreased from seventh to tenth minute and cell mass activity increased, so it's possible that the ^{14}C -activity was translocated from apoplast to protoplast in these periods of time. It was observed that the percent of apoplastic activity from cellular activity was increasing from second minute to seventh minute by variant ^{14}C -2,4-D and decreasing from seventh minute to twelfth minute, so we can say that in the first mentioned time interval the ^{14}C -activity was probably translocated from protoplast to apoplast and in the second mentioned interval it was probably translocated backwards. There is also evidence of extracellular deposition of 2,4-D in explant cultures (Morita *et al.* 1999). Nissen and Minocha (1993) suggested that that the extracellular 2,4-D is transferred by an auxin carrier into the cells in which it acts. Results of ^{14}C -2,4-D and ^{14}C -FLT uptake and deposition of ^{14}C -activity into the apoplast demonstrated that the utilization of both substrates is different. Plant *et al.* (1987) observed quick penetration of hydrophobic molecules throughout plasma membrane on benzo(a)pyrene. From my results ensue that by variant ^{14}C -FLT the percent of apoplastic activity from cellular activity remained low to twelfth minute and from twelfth to fifteenth minute it was increasing, so we can say that in the first mentioned timed it wasn't probably translocating from protoplast to apoplast; it was probably translocating only from the twelfth to fifteenth minute. Kolb and Harms (2000) described metabolism of ^{14}C -FLT in dependence of decrease of cell cycle count, but they haven't observed the mechanism of its uptake. Because there was ten times more 2,4-D accumulated in protoplast than FLT, we can say that the 2,4-D was probably much more taken up into the cells than FLT.

Kinetics of ¹⁴C-2,4-D was described before now by Delbarre *et al.* (1994), Delbarre *et al.* (1996). Authors show on isolated tobacco protoplasts and also on cell suspensions that the uptake of 2,4-D is characteristic by facilitated diffusion, what was confirmed by using transport inhibitors (Imhoff *et al.* 2000), whereas the uptake and utilization of fluoranthene as a hydrophobic molecule proceed by simple diffusion. Results of this work testify to it.

CONCLUSION

Fluoranthene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid have different mechanism of uptake and utilization, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid is much more taken up to cell than fluoranthene.

REFERENCES

- Briskin, D.P., Leonard, R.T., and Hodges, T.K. (1987): isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Meth. Enzymol.* 148: 542-558.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Morgat, J.L. and Barrier-Brygoo, H. (1994): Uptake, accumulation and metabolism of auxins in tobacco leaf protoplasts. *Planta.* 195: 159-167.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V. and Guern, J. (1996): Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension cultured tobacco cells. *Planta.* 198 (4): 532-541.
- Hoyerová K., Perry L., Hand P., Laňková M., Kocábek T., May S., Kottová J., Pačes J., Napier R., Zažímalová E.(2008): Functional characterization of PaLAX1, a putative auxin permease, in heterologous plant systems. *Plant Physiol.* 146, pp. 1128–1141.
- Imhoff, V., Muller, P., Guern, J. and Delbarre, A. (2000): Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta.* 210: 580-588.
- Kolb, M. and Harms, H. (2000): Metabolism of fluoranthene in different plant cells cultures and intact plants. *Environ. Tox. Chem.* 19 (5): 1304-1310.
- Morita, M., Xing, X.-H., Unno, H. (1999): Synchronized shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration. *Plant Cell Rep.*, 18 (7-8), pp. 633-639.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992): Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132, pp. 1-30.
- Nissen, P., Minocha, S. C. (1993): Inhibition of 2,4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. *Physiol. Plant.* 89:673–680.
- Plant, A.L., Knapp, R.D. and Smith, L.C. (1987): Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem.* 262(6):2514-2519.

MENDELNET 2012

Polder, M.D., Hulzebos, E.M., Jager, D.T. (1995): Validation of models on uptake of organic chemicals by plant roots. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 (9), pp. 1615-1623.

Zažímalová E., Petrášek J. (2000): Estimation of activity of auxin uptake and efflux carriers in the cells of VBI-O tobacco strain. *Biologické listy* 65.

EXPRESSION OF SELECTED COR/LEA GENES IN WINTER WHEAT PLANTS DURING WILTING

EXPRESE VYBRANÝCH COR/LEA GENŮ U PŠENICE OZIMÉ V PRŮBĚHU VADNUTÍ ROSTLIN

Truhlářová E., Smutná P., Holková L.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: eva.truhlarova@mendelu.cz

ABSTRACT

Drought tolerance of plants is a complex character influenced both constitutive and stress responsible traits.

The aim of this work was to identify differences in wheat seedlings responses to drought stress at the physiological a molecular level. The plants of three winter wheat varieties (Meritto, Etela and Venistar) and a Syrian line with different tolerance to drought were cultivated until the stage of 4-5 leaves and then subjected to drought. Stress reaction of plants was evaluated by Relative Water Content (RWC) and Osmotic Pressure (OP) in leaves and by expression level of two *Cor/Lea* genes (*Wdhn13* and *Wrab17*).

The obtained results clearly indicate a relation between the expressions of both genes and tissue water content; the reduction in RWC was strongly connected with changes in genes activity. Particularly the *Wdhn13* gene expression in Meritto variety increased even though the tissue hydration level was only slightly reduced, which can be related to the good adaptiveness of this genotype to stress.

Key words: winter wheat, drought tolerance, expression, *Cor/Lea* genes

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency of Faculty of Agronomy in Mendel University in Brno, project TP 10/2012.

ÚVOD

Vzhledem k výrazným klimatickým změnám, které s sebou přinášejí vyšší teploty, nižší srážky a jejich nevyrovnané rozložení během vegetačního období, ukazuje se jako stále aktuálnější výběr tolerantnějších genotypů. Zvýšení výnosu zemědělských plodin v suchých podmínkách je cílem výzkumů po celém světě. Při výběru genotypů nezáleží jen na přežití rostlin v podmínkách vodního deficitu, ale v případě hospodářských plodin i na získání kvalitního výnosu v podmínkách sucha (Bláha, 2011), (Shabala, 2012).

Po vystavení rostlin stresovým podmínkám u nich dochází k indukci celé řady biochemických a fyziologických změn, které směřují k vytvoření ochranných mechanismů zaměřených na účinné využívání dostupné vody, přičemž nejodolnější genotypy bývají ty, které vykazují toleranci na více úrovních současně (Riechmann et al. 2000). Snížení RWC v průběhu indukovaného stresu pozoroval Keyan (2010) na rostlinách pšenice. Zjištěné rozdíly mezi některými genotypy vysvětluje lepší schopností absorbovat vodu z půdy nebo lepší možnosti zabránit ztrátám vody. Dle Keyana (2010) genotypy, které jsou odolnější suchu, mají vyšší relativní obsah vody v listech. Sucho je spojeno s nedostatkem vody v buňce, a proto akumulace dehydrinových proteinů velmi často koreluje s odolností rostliny k stresovým podmínkám a mohly by být významnými aplikovatelnými markery suchovzdornosti rostlin (Atienza et al. 2004). V posledních letech jsou pro hodnocení citlivosti rostlin vůči abiotickému stresu využívány také postupy vycházející z hodnocení exprese ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (např. Suprunova et al., 2004).

Cílem naší práce bylo porovnat meziodrůdové rozdíly v některých fyziologických znacích a expresi ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (*Wdhn13* a *Wrab17*), které by bylo možné použít jako návrh selekčních kritérií při výběru vhodných odrůd do suchých podmínek pro další šlechtění a současně sledovat reakce odlišných genotypů na stejné stresové podmínky.

MATERIÁL A METODIKA

Pro porovnání stresové reakce na náhlé suchu v růstové vegetativní fázi byly vybrány tři odrůdy pšenice ozimé (Meritto, Etela a Venistar) pěstované v naší republice a jedna syrská syntetická linie pocházející z ICARDA Sýrie. Zvolené odrůdy se liší citlivostí vůči suchu. Jejich hodnocení probíhalo v rámci víceletých pokusů, při kterých byly hodnoceny výnosy na suchých lokalitách a v nádobových pokusech při pěstování v řízených režimech omezené závlivky. Nejcitlivější vůči suchu se jevila odrůda Etela. Venistar je odrůda doporučovaná do suchých podmínek a také odrůda Meritto vykazovala značnou toleranci vůči suchu. O syntetickou linii S1, kterou jsme zařadily do hodnocení, nejsou zatím dostupné informace o úrovni citlivosti vůči suchu.

Pšenice byly vysety do truhlíku s hrubým perlitem (od každé odrůdy 3 truhlíky po 20 rostlinách). Rostliny byly nechány v režimu 12 hodinového dne při teplotách 18°C a 12 hodinové noci při teplotách 10°C až do stádia 3-4 pravých listů. Odrůda Merrito za stejných podmínek narostla o 1 pravý list více než ostatní. Rostliny byly vytaženy z truhlíku a osušeny na filtračním papíru. Rozdíly mezi genotypy v reakci na vodní stres byly měřeny pomocí RWC (Relative water contents). Fyziologické hodnocení RWC bylo hodnoceno dle Barr and Weatherley, (1962). Odstřižené, nepoškozené, druhé nejmladší listy se zvážily (Hodnota H₀) a ponechaly 4 hodiny na světle v uzavřené nádobě na hladině vody (Petriho miska). Po této době jsme listy zvážily (H_S) a následně vysušily do konstantní hmotnosti (H_d). Rostliny dobře zásobené vodou mají RWC mezi 90-100 %, hodnoty okolo 70 % indukují silný stres. RWC souvisí s velikostí buňky a může silně odrážet rovnováhu mezi přívodem vody do listů a transpirací Fisher and Wood, (1979).

$$\text{RWC (\%)} = 100 * (H_0 - H_S) / (H_S - H_d)$$

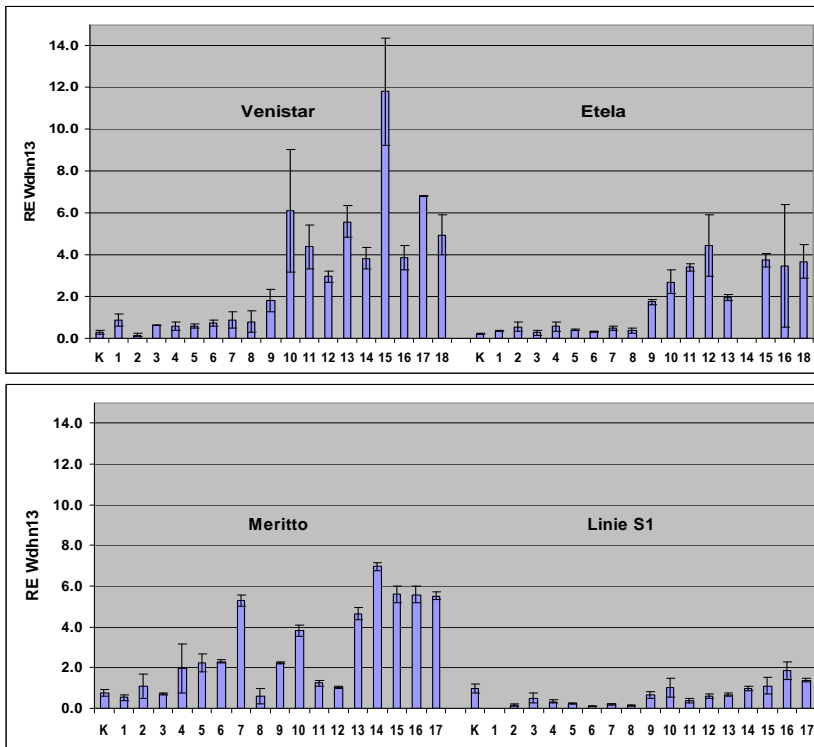
Vzorky na hodnocení osmotického potenciálu byly odebírány v 11 odběrech z nejmladších listů usychajících rostlin a vloženy do sterilních plastových stříkaček a zamrazen. OP (Osmotic potencial) byl měřen pomocí přístroje VAPRO 5600 (Vapor pressure osmometr) v nejmladší části usychajících rostlin. Po rozmrazení byla tlakem vytlačena tekutina pro měření hodnoty osmolarity, která byla vynásobena koeficientem (-0,00227) na hodnotu osmotického potenciálu.

Vzorky na izolaci byly odebírány v 19 časových intervalech. K-kontrola, 1-10 min, 2-15 min, 3-20 min, 4-25 min, 5- 30 min, 6-60 min, 7-90 min, 8-2h, 9-3h, 10-4h, 11-5h, 12-6h, 13-7h, 14-8h, 15-9h, 16-10h, 17-12h, 18-24h. Izolace RNA, syntéza cDNA a qPCR byly provedeny za pomoci komerčních kitů dle standardních protokolů. V PCR reakcích byly použity již známé genově specifické primery (Kobayashi et al., 2008, Holková et al., 2009). Podmínky reakcí pro jednotlivé geny byly částečně převzaty z Holková et al., 2009 a optimalizovány. Relativní exprese genů byla počítána dle Pfaffl, 2001. Hodnocení exprese bylo provedeno proti referenčnímu genu ubiquitin.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V podmínkách postupného usychání celých rostlin byla hodnocena exprese dvou genů (*Wdh13* a *Wrab17*). Oba geny jsou aktivovány suchem a proteiny, které tyto geny kódují, jsou zapojeny v ochranných mechanismech rostlinných buněk proti vysychání (Kobayashi et al., 2008). Rychlejší nástup či vyšší úroveň exprese odpovídajících genů v závislosti na stresovém stavu rostlin by měly být vlastností tolerantnějších genotypů. Nástup a průběh exprese obou genů byla sledována v průběhu postupného usychání rostlin za přesně definovaných podmínek, aby bylo možno porovnat předpokládané odrůdové rozdíly. Úroveň exprese genu *Wrab17* byla v porovnání s úrovní exprese genu *Wdh13* poměrně nízká a v průběhu usychání rostlin značně kolísala, proto jsme se zaměřili více na hodnocení exprese genu *Wdh13* (obr. 1).

Obr.1 Hodnocení relativní exprese (RE) genu *Wdhn13* v průběhu postupného usychání rostlin pšenice ozimé; porovnání reakce 4 různých odrůd /linie s odlišnou citlivostí vůči suchu



Nástup aktivity tohoto genu se projevil nejdříve u odrůdy Meritto. Již po 25 minutách od vytažení rostlin z truhlíku bylo zaznamenáno dvojnásobné zvýšení oproti kontrolním rostlinám. K dalšímu nárůstu exprese došlo po 90 minutách (7. odběr) a po 7 hodinách postupného usychání došlo k ustálení exprese tohoto genu na 5-7 násobek oproti kontrolám. U odrůdy Venistar byly sice zaznamenány ve dvou odběrech (4 a 9 hodin usychání) až dvojnásobně vyšší hodnoty relativní exprese tohoto genu, ale počáteční zvýšení exprese nad úroveň kontrol bylo zaznamenáno až v 9. odběru, tedy až po 3 hodinách postupného usychání. Podobná dynamika exprese hodnoceného genu byla pozorována u odrůdy Etela a linie S1. Úroveň exprese celkově však byla oproti Merittu a Venistar nižší, což bylo patrné hlavně u linie S1. Jak ukázalo následné porovnání hodnot relativní exprese tohoto genu se postupem vadnutí vyjádřeného hodnotami RWC (obr. 2) dřívější nástup zvyšování exprese genu *Wdhn13* u odrůdy Meritto nesouvisel s úrovní vadnutí. Došlo k němu v době, kdy si rostliny ještě udržovaly vysoký obsah vody v listech (RWC = 90%). Podobný jev zaznamenali ve svých experimentech Rampino et al., (2006) u pšenice tvrdé (*T. durum*) Aktivace

exprese jimi sledovaných genů ze skupiny *Cor/Lea* byla u genotypů tolerantnějších vůči suchu zaznamenávána dřívě (při vyšších hodnotách RWC) než u genotypů citlivějších. Proč nebyl podobný mechanismus pozorován u odrůdy Venistar není jasné. Při růstu v přirozených podmínkách je zřejmě nahrazen jiným ochranným nebo regulačním mechanismem. Podobně tomu může být u syntetické linie S1, ale u ní není jisté, zda je vůči suchu tolerantní. Poškození porostu této linie v polních podmínkách po zimě 2011/2012 (data zde neuvedena) ukazuje na obecně nižší toleranci k abiotickému stresu, což by bylo v souladu s výsledkem našeho experimentu.

Těsný vztah mezi úrovní vysychání a následného vadnutí rostlin vyjádřenou hodnotami RWC a OP a úrovní stresové reakce hodnocené na úrovni relativní exprese obou genů (*Wdhn13* i *Wrab17*) je vyjádřen pomocí statisticky průkazných hodnot korelačních koeficientů (tab. 1). Korelační koeficienty dokazují závislost relativní exprese genu *Wdhn13* a *Wrab17* na RWC i OP u odrůdy Venistar. U odrůdy Etela byla zjištěna závislost RWC a OP pouze u genu *Wdhn13* a u odrůdy Meritto byla prokázána závislost genu *Wdhn13* pouze na RWC. U syntetické syrské linie je závislost RWC i OP u obou genů. Dle Kamoshita et al., 2008 jsou genotypy, které udrží vyšší RWC odolnější vůči suchu, protože mají vyšší stav vnitřní vody. Z našich hodnocených genotypů (obr. 2) si po dobu vysychání dokázala udržet vyšší hodnotu RWC nad 70 % až do 90 minut po vytažení z truhlíku odrůda Meritto. Odrůda Meritto patří v našich klimatických podmínkách k tzv. stabilním odrůdám, pro které je typický stabilní výnos v různých prostředích (Smutná a Ryšková 2012). Tahara et al., (1990) pozorovali pozitivní vztah mezi výnosem zrna a RWC měřeným v průběhu reprodukčního stádia u pšenice. Odrůdy s vyšší výtěžností udržovaly výrazně vyšší RWC než málo výnosné odrůdy. Nižší pokles RWC vlivem suchem indukovaného stresu, je spojován se schopností tolerantnějších genotypů lépe absorbovat vodu z půdy a/nebo lepší schopností zabránit ztrátám vody přes průduchy (např. Keyvan, 2010). V našich experimentálních podmínkách byly rostliny vytaženy z půdy, proto zde mohl působit pouze druhý faktor, tedy regulace transpirace, ale mohly zde působit ještě další faktory. Rostliny odrůdy Meritto rostly rychleji, měly v daných podmínkách o jeden list více, a proto měly v listových pletivech k dispozici více vody pro distribuci do mladších částí rostliny. Hodnoty RWC a aktivita genů byla sledována vždy u druhého listu odshora.

Odrůda Venistar by měla mít dle Smutné a Ryškové, 2012 vyšší míru adaptace na suché podmínky prokázanou víceletými polními pokusy. Hodnota RWC u odrůdy Venistar však padá pod 70 % (obr. 2) již po 25 minutách od vytažení z truhlíku. V dané fázi růstu rostliny této odrůdy nevykazovaly vyšší odolnost než rostliny ostatních odrůd. Schonfeld et al. (1988) došel k závěru, že při vyšším stresu pšenice suchem klesá RWC a obvykle, ale ne vždy, v podmínkách sucha mají kultivary s vyšší odolností k suchu vyšší hodnotu RWC. Ritchie et al. (1990) uvádí, že vyšší RWC je výsledkem lepší osmotické regulace nebo méně pružných buněčných stěn. Relativně vysoká úroveň exprese genu *Wdhn13* by mohla ukazovat na přítomnost dalších ochranných mechanismů, které se mohou projevit v přirozených podmínkách (růst v půdě). Součástí mechanismů její adaptace na suchu by mohla být obecně vyšší úroveň exprese genů ze skupiny *Cor/Lea*.

Tab. 1 Korelační koeficienty (r) vyjadřující vztahy mezi relativní expresí genů *Wdhn13* a *Wrab17* a fyziologickým stavem rostlin jednotlivých odrůd/linie vyjádřeným hodnotami RWC a OP v průběhu postupného vysychání rostlin

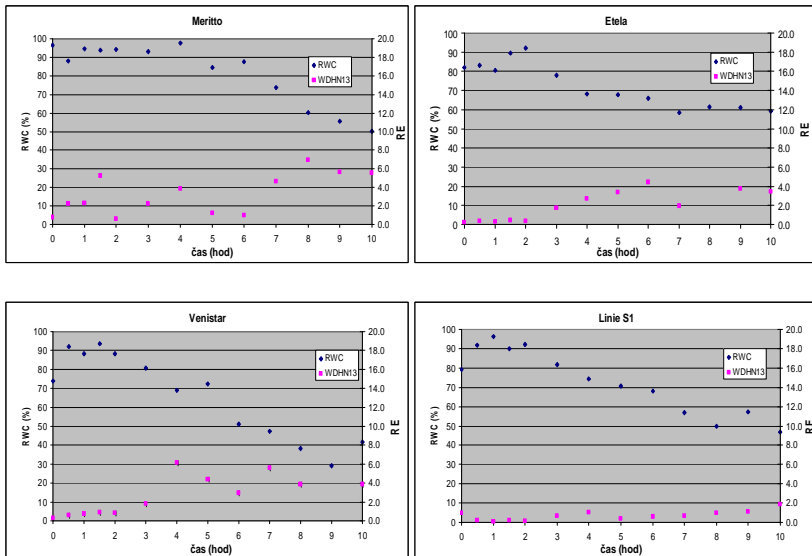
VEN	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.70**	-0.55*
OP	-0.54*	-0.87**
ETE	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.78**	-0.43
OP	-0.73**	-0.35
MER	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.75**	-0.14
OP	-0.33	-0.05
S1	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.81**	-0.58*
OP	-0.64**	-0.65**

** $P=0,01$, * $P=0,05$

U rostlin ječmene jarního bylo pozorováno (Mikulková et al, 2009), že aktivace některých dehydrinových genů u tolerantnějších genotypů byla zaznamenána později, pravděpodobně v souvislosti s odlišným fyziologickým stavem rostlin za stejných aktivčních podmínek ovlivněným pravděpodobně odlišnou mírou nebo způsobem adaptace na sucho.

Na obrázku 2 je znázorněn vztah mezi regulací exprese genu *Wdhn13* a RWC při postupném usychání listů. Odrůda Meritto a Etela reagují při poklesu hodnoty RWC vzrůstem aktivace exprese genu *Wdhn13*. Syrská syntetická linie reaguje na ztrátu vody z listů vyjádřenou hodnotou RWC pouze nízkým nástupem relativní exprese genu *Wdhn13*.

Obr. 2 Vzájemný vztah mezi regulací exprese genu *Wdhn13* a postupem usychání listů daným hodnotami RWC u hodnocených odrůd/linie



ZÁVĚR

V podmínkách tohoto experimentu byl prokázán jednoznačný vztah mezi ztrátou vody z listových pletiv a úrovní exprese genů *Wdhn13* a *Wrab17* u pšenice ozimé.

Opakovaně se projeví vazby tolerantnějších odrůd na dřívější nástup a/nebo vyšší úroveň exprese genů ze skupiny Cor/Lea.

Na základě hodnocení následujících parametrů stresové reakce (změny RWC, OP, a relativní exprese genů *Wdhn13* a *Wrab17*) se jako nejvíce tolerantní genotyp jevila odrůda Meritto. Rostliny této odrůdy nejdéle držely vodu v listových pletivech nad úrovní RWC = 70 % a byl u nich zaznamenán nejrychlejší nástup ochranné reakce na úrovní aktivace genu *Wdhn13*. Pozorované vlastnosti by mohly přispívat k výnosové stabilitě této odrůdy.

LITERATURA

- Atienza, S. G., Faccioli, P., Perrota, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, M., Cattivelli, L. (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167: 1359-1365.
- Barr, H. D., Weatherley, P. E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413-428.
- Bláha, L. (2011) Znaky adaptability k podmínkám stresu u zemědělských plodin. *Úroda* 59 vědecká příloha 10:726-734
- Fisher, R. A. and Wood, J. T. (1979) Drought resistance in spring wheat cultivars, III. Yield association with morpho-physiological traits. *Australian Journal of Agricultural Research* 30, 1001-1020.
- Holková L, Prášil IT, Bradáčová M, Vítámvás P, Chloupek O (2009): Screening for frost tolerance in wheat using the expression of dehydrine genes Wcs120 and Wdhn13 at 17 °C. *Plant Breed* 128: 420-422.
- Kamoshita, A., Babu, R. C., Boopathi, N. M. and Fukai, S. (2008) Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crops Research* 109: 1-23.
- Keyvan, S., (2010) The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of animal and plant science*, vol. 8, 1051-1060. ISSN 2071-7024.
- Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S (2008): Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 17(5): 755-67.
- Mikulková. P., Holková, L., Hronková, M., Klemš, M., Bradáčová, M. (2009) Efficiency of differential laboratory methods for selection od drought tolerance barley genotypes. *Cereal Research Communications* 37, Supplement: 277-280.
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007.
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C (2006): Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ* 29 (12): 2143-2152.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide komparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., Holaday, A. S., (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science* 30: 105-111.

Shabala, S. (2012) Plant stress physiology. CABI, ISBN-13: 978-1-84593-995-3

Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., Mornhinweg, D. W. (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop science* 28: 526-531

Smutná, P., Ryšková, T. (2012) Evaluation of stress susceptibility in winter wheat varieties using drought tolerance indices. *Növénytermelés* 61, Supplement: 41-44

Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A., Nevo, E., (2004) Differential expression of dehydrin genes in wild barley (*Hordeum spontaneum*), associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* 27:1297-1308.

Tahara, M., Carver, B. F., Johnson, R. C. and Smith, E. L. (1990) Relationship between relative water-content during reproductive development and winter wheat grain yield. *Euphytica* 49: 255-262.

THE EFFECT OF SIMULATED EUTROFICATION ON THE GROWTH AND MYCORRHIZAL SYMBIOSIS OF *SERAPIAS LINGUA*

EFEKT SIMULOVANÉ EUTROFIZACE NA RŮST A MYKORHIZNÍ SYMBIÓZU DRUHU *SERAPIAS LINGUA*

Veselá B., Baláž M.

Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University,
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: vesela.b@czechglobe.com

ABSTRACT

Eutrofication is one of key factors affecting decline of orchid populations in nature. Although this phenomenon has been observed many times and is generally accepted, there is very little information about the mechanisms of eutrofication on terrestrial orchids of temperate or Mediterranean climatic zone. In principle, two modes of action may occur: direct toxic effect of higher nutrient content on orchids or their mycorrhizal fungi, and/or indirect effect mediated by altered competition with surrounding vegetation. I tested the significance of direct effect in a three-year lasting pot greenhouse experiment using Mediterranean orchid *Serapias lingua*. Indirect effect of eutrofication was excluded by omitting any co-cultivated plant species, eutrofication was simulated by the series of nutrient solutions. The most concentrated basic solution containing 6 mM N-NO₃⁻, 2.4 mM N-NH₄⁺, 2 mM P, 8 mM K, 2.6 mM Ca a 2 mM Mg was gradually diluted with distilled water in 1:1 ratio, in order to prepare 2, 4, 8, and 16× diluted treatments. No data suggesting direct negative effect of eutrofication on orchids were obtained. After the first growing season, no effect of simulated eutrofication on the ratio of fresh mass of tubers in 2007 and 2006 (FM₂₀₀₇/FM₂₀₀₆) was observed. The highest value of this coefficient was 7.79, SD=2.68, n=115. Positive effect of higher nutrient availability on the FM₂₀₀₈/FM₂₀₀₇ was observed after the second growing season, during which the nutrient demand was higher due to higher count of greater plants planted in individual pots. For example, the mean FM₂₀₀₈/FM₂₀₀₇ value of *S. lingua* treated with 16× diluted solution was 1.21 (SD=0.31, n=23), while for plants treated with undiluted basic solution was the mean 2.20 (SD=0.58, n=23). These results strongly support the opinion that indirect, by competition mediated effect of eutrofication on adult, photosynthesizing plants is responsible cause decline of orchid population and the published evidence was discussed with this respect.

Key words: Orchidaceae, eutrofication, mycorrhizal symbiosis, *Serapias lingua*

ÚVOD

Vstavačovité (Orchidaceae) jsou nejpočetnější a nejrozmanitější čeledí kvetoucích rostlin na Zemi. Bohužel se zároveň jedná o čeleď, která je působením člověka velmi ohrožená, zejména kvůli svým specifickým nárokům na životní prostředí. Výrazným faktorem podléjícím se na úbytku vstavačovitých je bezesporu eutrofizace související se špatným zemědělským hospodařením v krajině a s automobilovou dopravou. Bylo publikováno několik studií, jejichž autoři se zabývali vlivem eutrofizace na orchideje (Dijk & Olf 1994, Mattila & Kuitunen 2000, Dijk & Eck 1995, Hejzman et al. 2010). Bezprostřední příčina úbytku lokalit a zmenšování populací orchidejí po eutrofizaci ovšem dosud není známa. Uvažován je jak přímý negativní vliv zvýšené dostupnosti živin na metabolismus orchidejí a jejich mykorhizní symbiózy, popřípadě nepřímý vliv zprostředkovaný ovlivněním kompetice s jinými rostlinnými druhy. Pro efektivní ochranu a management lokalit těchto rostlin je proto důležité poznat mechanismus ovlivnění jejich růstu eutrofizací.

V kulivačním experimentu jsem se zabývala přímým vlivem zvýšeného přísunu živin na růst a mykorhizní symbiózu mediteránní orchideje *Serapias lingua*. Vzhledem k absenci kompetujících rostlin v průběhu kultivace jsem byla schopna vyloučit nepřímý vliv eutrofizace, spojený se změnou kompetice, a odhalit případný přímý negativní efekt zvýšené dostupnosti živin na růst orchidejí a jejich mykorhizní symbiózu. Výsledky mnou docílené jsou nejen přispěvkem k pochopení biologie orchidejí, ale mohou nalézt i praktické uplatnění při záchranných *ex situ* kultivacích těchto rostlin (Swart & Dixon 2009).

MATERIÁL A METODIKA

Rostliny byly pěstovány ve studeném skleníku, kde byla teplota regulována tak, aby simulovala podmínky na přirozeném stanovišti druhů v mediteránních oblastech. V celém období kultivace nebyly tyto rostliny nikdy záměrně inokulovány orchideoidními mykorhizními houbami.

Rostliny byly zasazeny po jedné do polyetylenových květináčů TEKU 0350 (Pöppelmann, Lohne, Německo) o rozměrech 90×90×95mm. Jako substrát byla použita směs zeolitu klinoptilolitu o velikosti částic 1,5–2 mm (Zeocem Bystré, Slovensko) a organického substrátu na bázi světlé a tmavé rašeliny Klasmann Substrate No.1 (Klasmann-Deilmann, Geest, Německo), v poměru 1:1 vol/vol. Pokusných rostlin bylo celkem 115. Před zasazením byly zváženy a rozděleny do 23 bloků s přibližně stejnou hmotností, v jejichž rámci bylo jednotlivým rostlinám náhodně přiřazováno 5 experimentálních variant. Těmito variantami byla zálivka roztokem s různou koncentrací živin. Pro simulovanou eutrofizaci byl připraven jako výchozí roztok varianty 4×, který obsahoval v 1 litru destilované vody 193 mg NH₄NO₃, 500 mg MgSO₄·7H₂O, 614 mg Ca(NO₃)₂·4H₂O, 137 mg K₂HPO₄·3H₂O, 191 mg KH₂PO₄, 421 mg K₂SO₄, 16 mg FeNaEDTA,

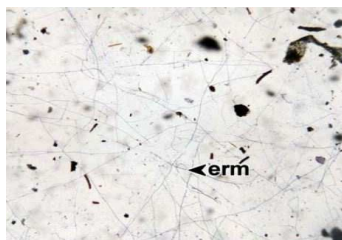
15 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mg KI, 3 mg H_3BO_3 , 4,8 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,024 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tento roztok, obsahující 7,6 mM N-NO_3^- , 2,4 mM N-NH_4^+ , 2 mM P, 8 mM K, 2,6 mM Ca a 2 mM Mg byl postupně ředěn destilovanou vodou vždy v poměru 1:1, čím byly připraveny varianty 2× až 0,25×.

Minerální výživa byla rostlinám aplikována ve formě roztoku vždy po 50ml, což je množství nad zádržnou kapacitu substrátu v kontejneru. Zálivka byla aplikována v první sezóně třikrát, poprvé 25. 2. 2007, podruhé 24. 3. 2007 a potřetí 17. 4. 2007. Analogicky byla zálivka rostlinám aplikována ve druhé sezóně, a to v datech 26. 2. 2008, 23. 3. 2008 a 20. 4. 2008. Pro hodnocení růstu rostlin byly po prvním roce kultivace hlízy vyjmuty z kontejneru, očištěny štětcem, spočítány, zváženy a všechny zasazeny zpět do původního substrátu, po druhém roce kultivace byla zasazena vždy pouze jedna hlíza. Při sázení po druhém roce kultivace byla do substrátu přidána ještě membrána pro hodnocení rozvoje mimokořenového mycelia (ERM).

Růst rostlin byl hodnocen jako počet a čerstvá hmotnost (FM, angl. fresh mass) dceřiných zásobních hlíz vždy v období končící dormance, tedy na podzim let 2007 a 2008. Pro statistické hodnocení dat byly vypočteny tři koeficienty mezisezónního přírůstku FM zásobních hlíz. Koeficient $\text{FM}_{2007}/\text{FM}_{2006}$ je podílem celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po prvním roce kultivace a FM zásobních hlíz jednotlivých rostlin na začátku kultivace; analogicky koeficient $\text{FM}_{2008}/\text{FM}_{2007}$ je analogicky podílem celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po druhém roce kultivace a celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po prvním roce kultivace. Koeficient $\text{FM}_{2008}/\text{FM}_{2006}$ integruje přírůstek za oba dva roky kultivace.

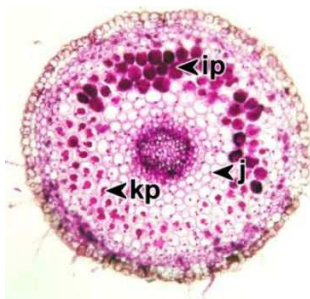
Mimokořenové mycelium (ERM) bylo ze substrátu vyextrahováno pomocí techniky vnořené membrány (Baláž & Vosátka 2001, obr. 1). Ze substrátu každé kultivační nádoby byla vyjmuta membrána s narostlým myceliem, která byla obarvena 0,05% trypanovou modří v laktoglycerolu (stejně objemové díly 80% kyseliny mléčné, glycerolu a destilované vody; Brundrett et al. 1984). Preparáty pro hodnocení denzity ERM (délky mycelia vztahené na jednotkovou plochu membránového filtru) byly pozorované a náhodně vybraná místa na membráně byla fotografována pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-50 s objektivem 4× a digitální kamerou Olympus C-5050Z. Vzniklé snímky byly hodnoceny pomocí průsečíkové metody (Gryndler et al. 2004).

Obr. 1: Mimokořenové mycelium (erm) izolované z půdy pomocí techniky vnořené membrány.



Pro vyhodnocení kolonizace kořenů mykorrhizní houbou byl 27.3.2009 z každé rostliny odebrán jeden reprezentativní kořen. Odebraný kořen byl rozdělen na tři úseky - bázi, střed a apex. Z každého úseku bylo zhotoveno 5 kompletních tenkých řezů a ty byly následně barveny 0,01% kyselým fuchsinem v laktoglycerolu. Preparáty byly fotografovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-50 s objektivem 4× a digitální kamerou Olympus C-5050Z. V rámci každého řezu bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení kortikálních buněk s intaktními pelotony, kolabovanými pelotony a nekolonizovaných buněk kortexu, přičemž jako potencionální hostitelské buňky byly uvažovány pouze ty vrstvy primární kůry, které mohou být houbou kolonizovány (obr.2).

Obr. 2: Kolonizace adventivního kořene S. lingua hyfami mykorrhizní houby, která uvnitř buněk primární kůry tvoří typické pelotony, které jsou buď intaktní (ip) nebo kolabované (kp). Uvnitř buněk jsou viditelná jádra (j).



VÝSLEDKY A DISKUZE

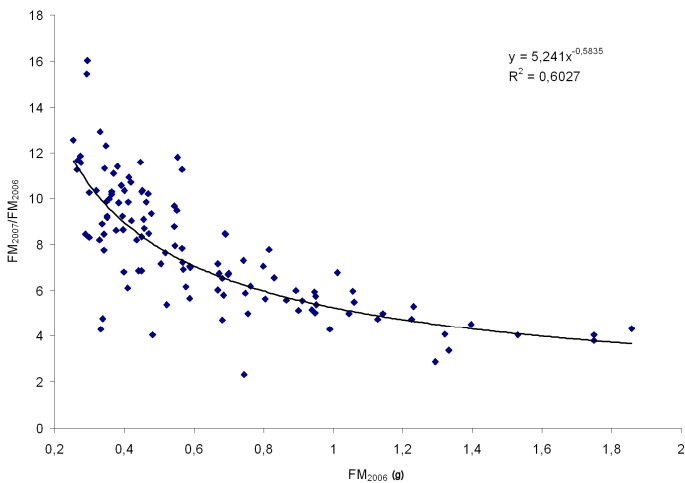
Tvorba zásobních hlíz

Mezisezónní koeficient čerstvé hmotnosti hlíz FM2007/FM2006 u druhu *Serapias lingua* nebyl statisticky průkazně ovlivněn různými dávkami minerálních živin ($F=0,55$; $P=0,70$), průměrná hodnota tohoto koeficientu činila 7,79 ($SD=2,68$; $n=115$). Naproti tomu v druhém roce kultivace byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezisezónního koeficientu FM2008/FM2007 v závislosti na různých dávkách minerálních živin ($F=22,08$; $P<0,001$). Vyšší dávka minerálních živin tedy pozitivně ovlivnila růst rostlin, koeficient FM2008/FM2007 byl největší při nejvyšší dávce minerální výživy (2,20; $SD=0,58$; $n=23$) a nejmenší při nejnižší dávce minerální výživy (1,21; $SD=0,31$; $n=23$). Průměrná hodnota koeficientu FM2008/FM2007 činila bez ohledu na výživovou variantu 1,57 ($SD=0,55$; $n=115$). Rozdíly v růstu v sezóně 2007/2008 se projeví i v mezisezónním koeficientu FM2008/FM2006, kdy se podle výživových variant statisticky průkazně lišily ($F=13,78$; $P<0,01$); opět byl v průměru nejvyšší ve variantě 4× (17,24; $SD=7,54$; $n=23$) a nejnižší ve variantě 0,25× (9,34; $SD=4,14$; $n=23$). Mezi přírůstkem hmotností hlíz rostlin v první sezóně, vyjádřeným koeficientem FM2007/FM2006, a výchozí hmotností hlíz (FM2006) byla statisticky průkazná korelace (Spearmanův korelační koeficient $R=-0,77$, $P<0,001$, $n=115$). Tento vztah byl nelineární (obr. 3.)

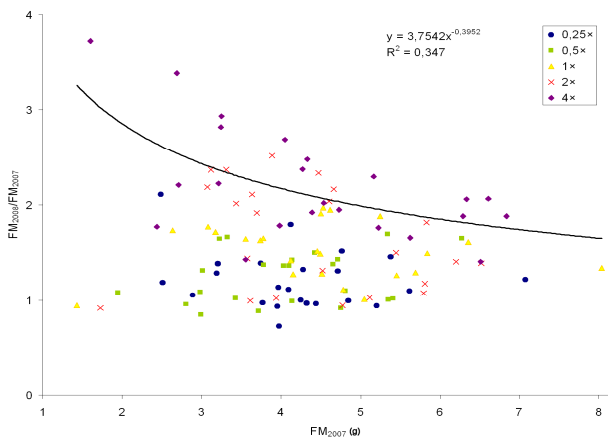
MENDELNET 2012

a ukazuje, že nejvyšší potenciál přírůstku měly rostliny s nejmenší výchozí hmotností hlíz. Obdobná závislost po druhém roce kultivace se projevila pouze u rostlin z varianty 4× (obr. 4), tedy těch, které měly nejvyšší hodnotu koeficientu FM_{2008}/FM_{2007} (Spearmanův korelační koeficient $R = -0,49$, $P = 0,02$, $n = 23$).

Obr. 3: Závislost koeficientu mezisezónního přírůstku FM_{2007}/FM_{2006} na čerstvé hmotnosti zásobních hlíz před začátkem experimentu (FM_{2006}). Mocninnou závislostí jsou proložena všechna data ($n = 115$).



Obr. 4: Závislost koeficientu mezisezónního přírůstku FM_{2008}/FM_{2007} na čerstvé hmotnosti zásobních hlíz druhu *Serapias lingua* po prvním roce kultivace (FM_{2007}). Mocninnou závislostí jsou proložena data z varianty 4× ($n = 23$).



Denzita mimokořenového mycelia

Denzita mimokořenového mycelia mykorhizní houby byla statisticky průkazně ovlivněna různými dávkami minerální výživy ($F=3,08$; $P=0,04$; tab. 1), kdy nejvyšší denzita byla zjištěna u varianty s nejvyšší dostupností živin ($4\times$), nejnižší hodnoty byly naopak zjištěny pro varianty $0,25\times$ a $0,5\times$. Zjištěná hustota mimokořenového mycelia tedy vzrůstala se zvyšující se koncentrací živin v živném roztoku. Existují dvě možná vysvětlení těchto rozdílů: zálivka roztokem s vyšším obsahem živin, zejména N, mohla zlepšit C/N poměr v substrátu, který mohl být příznivější pro saprotrofní růst OM houby. Druhou variantou je, že vyšší hustota ERM byla způsobena vyšším biotrofním přenosem C látek z kořenů orchideje do ERM. Pro tento jev, který byl poprvé kvantifikován teprve nedávno (Látalová a Baláz 2010), svědčí zjištěná pozitivní korelace mezi hmotností sázených hlíz (FM2008) a zjištěnou denzitou ERM (Pearsonův $r=0,513$, $P=0,004$).

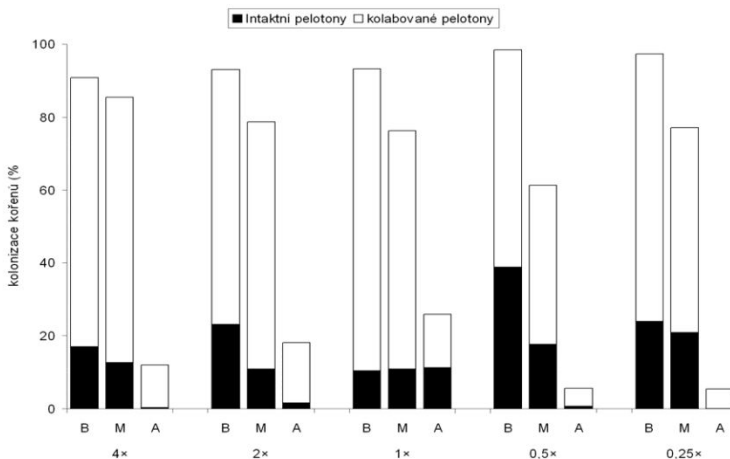
Tab. 1: Vliv minerální výživy na denzitu mimokořenového mycelia (ERM) mykorhizní houby

Efekt	d.f./n	denzita ERM
typ hnojení	1	3,78 (0,07)
minerální výživa	4	3,08 (0,04)
0,25×	6	44,08 (13,16) a
0,5×	6	30,43 (15,54) a
1×	6	48,40 (25,16) ab
2×	6	47,55 (29,88) ab
4×	6	71,90 (22,07) b

Kolonizace kořenů

Mykorhizní houby vytvářely ve středních vrstvách kořenového kortexu všech rostlin pelotony typické pro OM mykorhizu, které byly buď intaktní, nebo částečně či úplně zkolabované. Výskyt intaktních pelotonů byl statisticky průkazně ovlivněn efektem minerální výživy a byl odlišný i v závislosti na hodnoceném segmentu kořene (obr.5). Byl zjištěn vyšší výskyt intaktních pelotonů v bazálních a středních segmentech kořenů rostlin z variant $0,25\times$ a $0,5\times$. V apikálním segmentu kořene byl navíc zjištěn velmi malý výskyt nejen intaktních, ale i kolabovaných pelotonů a tedy i celkové kolonizace u všech variant minerální výživy – celková kolonizace činila v průměru 12,8 % ($sd=23,3$ %, $n=30$; tab. 2).

Obr. 5: Kolonizace kořenů mykorrhizní houbou v závislosti na různých dávkách minerální výživy ($4\times$ až $0,25\times$) a na segmentu kořene (B – báze, M – střed, A – apex).



Tab. 2: Výsledky analýz rozptylu s opakovanými měřeními kolonizace kořenů (bazální, střední a apikální segment). V tabulce jsou uvedeny výsledky F-testů, v závorkách jejich statistické průkaznosti. MV – minerální výživa, SG – segment kořene.

Intaktní pelotony	minerální výživa	0,55 (0,702)
	segment	28,08 (<0,001)
	MV×SG	3,25 (0,005)
Kolabované pelotony	minerální výživa	1,72 (0,178)
	segment	99,76 (<0,001)
	MV×SG	0,44 (0,889)
Celková kolonizace	minerální výživa	0,43 (0,785)
	segment	139,17 (<0,001)
	MV×SG	0,88 (0,541)

ZÁVĚR

Výsledky experimentu ukazují na neexistenci přímého negativního působení simulované eutrofizace na růst orchidejí. Vzhledem k mnohokrát zdokumentovanému faktu, že eutrofizace na lokalitách vede k poškození populací orchidejí, je zřejmé, že větší význam v tomto případě bude mít nepřímý, kompetičí zprostředkovaný efekt eutrofizace, v minulosti opakovaně uváděný jako pravděpodobné vysvětlení tohoto jevu (Silvertown et al. 1994, McKendrick 1996, Mattila & Kuitunen 2000, Hejcman et al. 2010). Z tohoto pohledu se jeví vysoká účinnost managementu lokalit orchidejí založeného na spásání či kosení následovaném odnosem biomasy, empiricky ověřeno jako velmi účinné opatření (Wotavová et al. 2004, Janečková et al. 2006), jako logický důsledek existence kompetičí zprostředkovaného negativního působení eutrofizace.

LITERATURA

- Baláž M., Vosátka M. 2001. A novel inserted membrane technique for studies of mycorrhizal extraradical mycelium. *Mycorrhiza* 11:291–296.
- Brundrett M.C., Piche Y., Peterson R.L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*. 62: 2128–2134.
- Dijk E., Eck N. 1995b. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist*, 131, 361–367.
- Dijk E., Olf H. 1994. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of *Dactylorhiza majalis*. *Acta Botanica Neerlandica*, 43: 383–392.
- Gryndler M., Baláž M., Hřelová H., Jansa J., Vosátka M. 2004. Mykorrhizní symbiózy. Praha: Academia, pp. 366.
- Hejcman M., Schellberg J., Pavlů V. 2010. *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* and *Listera ovata* survive N application under P limitation. *Acta Oecologica*, 138: 684–688.
- Janečková P., Wotavová K., Schödelbauerová I., Jersáková J., Kindlmann P. 2006. Relative effects of management and environmental conditions on performance and survival of populations of a terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis*. *Biological Conservation* 129: 40–49.
- Látalová K., Baláž M. 2010. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza sp.* *Biologia plantarum* 54: 97–104.
- Mattila E., Kuitunen M.T. 2000. Nutrient versus pollination limitation in *Platanthera bifolia* and *Dactylorhiza incarnata* (*Orchidaceae*). *Oikos* 89: 360–366.
- McKendrick S.L. 1996. The effects of fertilizer and root competition on seedlings of *Orchis morio* and *Dactylorhiza fuchsii* in chalk and clay soil. *New Phytologist* 134: 335–342.
- Silvertown J., Wells D.A., Gillman M., Dodd M.E., Robertson H., Lakhani K.H. 1994. Short-term effects and long-term after-effects of fertilizer application on the flowering population of green winged orchid *Orchis morio*. *Biological Conservation* 69: 191–197.

Swart N.D., Dixon K.W. 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 11: 590-598.

Wotavová K., Balounová Z., Kindlmann P. 2004. Factors affecting persistence of terrestrial orchids in wet meadows and implications for their conservation in a changing agricultural landscape. *Biological Conservation* 118: 271–279.

ANALYSIS OF VARIABILITY AND GENERATIVE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF THE GENUS *PRUNUS* L. IN THE BIOCORRIDORS ON THE TERRITORY OF WESTERN SLOVAKIA

HODNOTENIE VARIABILITY A GENERATÍVNEHO REPRODUKČNÉHO POTENCIÁLU TAXÓNOV RODU *PRUNUS* L. VO VYBRANÝCH LOKALITÁCH ZÁPADNÉHO SLOVENSKA

Žgančíková I.¹, Vereš T.², Baranec T.¹

¹Department of Botany, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

²Department of Sustainable Agriculture and Herbology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: ivanazgancikova@yahoo.com

ABSTRACT

Continuity of landscape vegetation improves the variability of populations of many species. In this paper we focused on the evaluation of morphological characteristics and weight of fruits mass and generative reproductive potential taxa of the genus *Prunus* L. (*Prunus spinosa* L. *Prunus* × *fruticans* Weihe, *Prunus* × *dominii* Baranec, *Prunus dasyphylla* Schur), these species formed linear vegetation formations (corridors), in the growing seasons 2010, 2011 and 2012 at two localities (Lošonec, Jelenec), western part of Slovakia. Evaluated was also a plant community composition of the bio-corridors. Surveys were conducted during phenophases of flowering and fruit development of taxa in April and September. In the year 2012 was generative reproduction potential balanced in both localities and during this period was detected only small infestation of fruit and leaves with pathogens. The highest values showed GRP by *P.* × *fruticans* (81.45% - Lošonec, 92.15% - Jelenec). Incidence of pests and diseases had no effect on the development of morphological characteristics such as fruit weight, stone weight and their variability. Variability in weight of fruit and stones was medium to high. The highest coefficient of variation were recorded for *P.* × *fruticans* ($c_v = 34.52\%$). Biocorridors in which occur determined taxa were mainly represented by thorny bushes and small leafed species. Biocorridor Lošonec is characteristic due to its line spatial structure in compare with the biocorridors in locality Jelenec.

Key words: biocorridor, genus *Prunus* L. variability of *Prunus* L., GRP

Acknowledgments: This work was supported by the research project VEGA no. 1/0779/11 titled "Comparative analysis of population structure of dominant taxa of major vegetation fragments in agricultural landscape of southern Slovakia."

ÚVOD

Človek spôsobuje v krajine zmeny a jeho vplyv zasahuje čím ďalej, tým väčšie územia v krajine. Dôležitým nástrojom na zvýšenie kvality antropogénne ovplyvnených území je obnova ekologickej stability daného územia ako aj obnova prirodzených biokoridorov. Vegetačná štruktúra biokoridorov, ktoré sa vyvinuli na neobrábaných plochách poľnohospodárskej pôdy v oblasti západného Slovenska je tvorená prevažne vegetáciou radu *Prunetalia spinosae*, ktorých dominantné druhy patria do rodov *Prunus* L., *Crataegus* L. a *Rosa* L. (Baranec et al., 2009). Dôsledkom zásahov človeka do agroekosystému je znižovanie potravinových zdrojov a to nie len pre človeka, ale aj pre ostatné živočíšne druhy. V práci sme sa zamerali na vývoj populácií taxónov rodu *Prunus* L. nachádzajúcich sa v biokoridoroch poľnohospodársky využívanej krajiny na lokalitách Lošonec a Jelenec. V práci zhodnocujeme výsledky v oblasti štúdia reprodukčnej biológie, základných morfológických znakov a jednotlivé lokality porovnávame aj z hľadiska fytoecológie a pôsobenia abiotických, biotických faktorov. Rod *Prunus* L. (slivka) je druhovo rozsiahly a hospodársky významný rod so zastúpením viac ako 200 druhov krov a stromov. Je rozšírený najmä na severnej pologuli (Euroázia) ako dôležitý komponent nelesných prirodzených a pestovaných spoločenstiev (Bertini, Hewel, Potter, 2006). Rod zahŕňa niekoľko druhov, hlavne listnaté stromy a kry. Predstavuje dôležitú ekonomickú zložku, pretože veľa druhov poskytuje jedlé plody, olej, drevo a niektoré sú významné ako okrasné rastliny (Lee, Wen, 2001).

MATERIÁL A METODIKA

Terénnym výskumom sme hodnotili dva fragmenty biokoridorov, na ktorých sme zaznamenali krovinaté fytoocenózy taxónov rodu *Prunus* L. (*Prunus spinosa* L., *Prunus* × *fruticans* Weihe, *Prunus* × *dominii* Baranec, *Prunus dasyphylla* Schur), ktoré sa vyskytujú predovšetkým v podobe neutržiavaných subspontánnych krovinných pásov. Lokality sa nachádzajú v oblasti poľnohospodárskej krajiny na okraji pohoria Trábeč (Jelenec) a pohoria Malé Karpaty (Lošonec). Materiál – kôstkovice sme získavali odberom počas vegetačného obdobia september – október 2010 – 2012 v počte 40 z označených ramét. Pri štúdiu generatívneho reprodukčného potenciálu a hodnotení variability morfológických znakov plodov a kôstok za obdobie 2010 – 2012 využívame metodické postupy, ktoré uplatnil vo svojich prácach Baranec (1996) a Eliáš (2004) pričom sú sledované nasledovné charakteristiky:

- tvorba kvetov – počet kvetov sme zisťovali vo fenofáze plného kvitnutia (apríl) na vybraných koncových konárikoch jedincov,
- tvorba plodov – počet plodov sme zisťovali v mesiacoch september – október, metodický postup ako v prvom bode,

- generatívny reprodukčný potenciál (GRP) – bol stanovený v každom roku výskumu (2010 – 2012) ako pomer počtu plodov na označených jedincoch k počtu kvetov na označených jedincoch resp. konárikoch.

Generatívny reprodukčný potenciál stanovíme ako percentuálny podiel vytvorených kvetov a plodov: $GRP = \text{počet plodov} / \text{počet kvetov} \times 100 (\%)$ (Baranec, 1996).

Na plodoch a kôstkach sme zisťovali nasledovné charakteristiky:

- hmotnosť plodov - zisťovaná vážením na elektronických váhach KERN 440-45N na analyzovanej vzorke v počte 40 ks plodov,
- hmotnosť kôstok – po odstránení dužinatého oplodia a osušení kôstok zisťovaná vážením na elektronických váhach KERN 440-45N,
- index relatívnej guľatosti kôstky – stanovený ako podiel priemerných hodnôt hrúbky a šírky kôstky ($100 \times T/W$). Čím vyššie sú hodnoty indexu, tým sú kôstky plochejšie (Depypere et al., 2007, Van Zeist, Woldring, 2000).
- index relatívnej štíhlosti kôstky – stanovený ako podiel priemerných hodnôt hrúbky a dĺžky kôstky ($100 \times T/L$). Čím nižšie sú hodnoty indexu, tým je kôstka užšia (Depypere et al., 2007, Van Zeist, Woldring, 2000).

Z označených jedincov sme odobrali listy a plody (40 ks) na základnú analýzu chorôb a škodcov. Odobraté vzorky sme vyhodnotili v laboratóriu na Katedre ochrany rastlín SPU v Nitre.

Pre všetky parametre sme určili štandardné charakteristiky popisnej štatistiky. Zistené parametre sme spracovali vo formáte tabuliek v programe Excel 2007. Na základe zistených hodnôt koeficientov variability sme stanovili nízku ($c_v < 10\%$), normálnu variabilitu ($c_v = 10-20\%$) a vysokú variabilitu ($c_v > 20\%$) (Hubner, Wissmann, 2004).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pri sledovaní generatívneho reprodukčného potenciálu a hodnotení variability morfológických znakov taxónov rodu *Prunus* L. na úrovni lokálnych populácií boli získané nasledovné výsledky:

Stanovenie generatívnej reprodukcie

Pre výskum generatívneho reprodukčného potenciálu (GRP) a morfológických znakov sme analyzovali nasledovné taxóny: *Prunus spinosa* L., *Prunus* × *fruticans* Weihe, *Prunus* × *dominii* Baranec, *Prunus dasyphylla* Schur. Na lokalite Jelenec najvyššie hodnoty GRP sme zaznamenali pri *P.* × *fruticans* (92,15%) a *P.* × *dominii* (73,91%) v roku 2012. Vo vegetačnom období 2011 sa na lokalite Jelenec hodnoty GRP pohybovali od 22,72% do 47,06%. Najvyššia variabilita na lokalite Lošonec bola za rok 2012, kde sa hodnoty pohybovali od 78,38% (*P. dasyphylla*) do 81,45% (*P.* × *fruticans*) (tab. 1). Minimálna generatívna reprodukcia bola v roku 2011 (22,72% - *P.* × *dominii*).

Tab. 1 Hodnoty GRP na lokalite Lošonec a Jelenec (%)

	Lošonec (GRP)			Jelenec (GRP)		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012
<i>P. spinosa</i>	-	-	-	81,94	47,06	73,21
<i>P. × fruticans</i>	51,55	37,37	81,45	76,34	42,35	92,15
<i>P. × dominii</i>	-	-	-	55,55	22,72	73,91
<i>P. dasyphylla</i>	63,93	48,36	79,38	-	-	-

Rybníkářová (2010) práci uvádza najvyššiu hodnotu GRP pri *Prunus spinosa* L. ($c_v=21,25\%$) na lokalite Šindolka v roku 2009. Muráňová (2012) uvádza takmer rovnakú hodnotu GRP pri taxóne *Prunus × fruticans* Weihe ($c_v=21,85\%$) na lokalite Veľké Úľany za rok 2010. V porovnaní s našimi výsledkami sú to veľmi nízke hodnoty, ktoré autorky zdôvodňujú poškodením vyvíjajúcich sa plodov na sledovaných taxónoch grmaníkom slivkovým (*Taphrina pruni* L.), ktorý sa na našich lokalitách nevyskytoval. K narušeniu generatívneho reprodukčného procesu sledovaných taxónoch a následnej redukcii v tvorbe generatívnych diaspór dochádza vplyvom viacerých činiteľov, ako sú nepriaznivé klimatické podmienky v čase kvitnutia pozorovaných taxónoch, ktoré vedú k neúspešnému opeleniu, poškodenie kvetných častí a plodov živočíšnymi škodcami a chorobami, zasychávanie púčikov počas leta, nedostatok vlhky, negatívny priamy a nepriamy antropický vplyv na rastlinné spoločenstvá. Vegetačné obdobie roku 2012 bolo priaznivejšie pre tvorbu plodov a v tomto roku nebol zaznamenaný žiadny výskyt chorôb a škodcov. Rybníkářová (2010) uvádza, že výskyt grmaníka slivkového zaznamenala vo vegetačnom období 2008 – 2010, kde infikované plody boli tvarovo deformované a na priereze plodov bolo možné pozorovať iba zvyšky spór a mycéliá. Vo vegetačnom období 2010 – 2012 na lokalitách Lošonec (tab. 2) a Jelenec (tab. 3) nebol zaznamenaný výskyt grmaníka slivkového, ale zistili sme ochorenie, ktoré spôsobuje huba *Clasterosporium carpophilum* L. (dierkovitosť listov) a taktiež aj výskyt hniloby plodov, ktorú spôsobuje *Monilinia laxa* (moniliová hniloba).

Tab. 2 Základné hodnotené parametre na lokalite Lošonec

Taxóny	Ochorenie	
	2011	2012
<i>P. × fruticans</i>	<i>C. carpophilum</i> (67,5% plody /80% listy)	-
<i>P. dasyphylla</i>	<i>C. carpophilum</i> (57,5% plody/ 42,5% listy)	-

Tab. 3 Základné hodnotené parametre na lokalite Jelenec

Taxóny	Ochorenie	
	2011	2012
<i>P. spinosa</i>	-	-
<i>P. × fruticans</i>	<i>C. carpophilium</i> (33% plody/ 50% listy)	<i>C. carpophilium</i> (10,3% plody/ 3,2 % listy)
<i>P. × dominii</i>	<i>Monilinia laxa</i> (60% plody)	<i>C. carpophilium</i> (0,05% plody/ 15 % listy)

Muráňová (2012) uvádza, že v roku 2010 na lokalite Čechynce spozorovala napadnutie plodov larvou piliarky (rod *Hoplocampa*). Na skúmaných lokalitách prevláda vegetatívny spôsob rozmnožovania (tvorba ramet). Z pozorovania generatívneho reprodukčného potenciálu vyplýva, že najmenej náchylný je pôvodný, domáci taxón *P. spinosa* a *P. × fruticans* vytvára pomerne rovnaký počet kvetov na oboch sledovaných lokalitách. Najmenej kvetov za tri roky pozorovania vytvára *Prunus dominii* Baranec.

Stanovenie základných morfológických znakov hmotnosti plodov a kôstok

Plodmi sú holé kôstkovice, ktoré dozrievajú koncom leta. Bertová (1992) uvádza, že zrelé plody sú guľaté, modré až čierne. Na identifikáciu taxónov rodu *Prunus* L. je analýza veľkostných parametrov kôstok a tvarových znakov veľmi dobrá metóda (Depypere et al., 2007, Depypere et al., 2009, Van Zeist, Woldring, 2000).

Chceme poukázať na rozdielnosť resp. podobnosť plodov a kôstok taxónov rodu *Prunus* L. na rôznych lokalitách. V sledovaných rokoch 2010 – 2012 na lokalite Jelenec sa priemerná hmotnosť plodov pri *P. spinosa* L. pohybovala od 1,14 g do 1,25 g, pri *P. × fruticans* od 1,33 g do 2,05 g a pri *Prunus dominii* Baranec od 1,17 g do 1,28 g. Rybníkárová (2010) na lokalite Šindolka zaznamenala priemernú hmotnosť *P. × fruticans* 2,17 g. Počas celého obdobia výskumu (2010 – 2012) bola zistená stredná až vysoká variabilita v hmotnosti plodov, pričom najvyššie hodnoty koeficientu variability ($c_v=34,52\%$) boli zaznamenané pri *P. × fruticans* (2010) (tab. 4). V skúmanom biokoridore v Lošonci boli nižšie priemerné hodnoty v hmotnosti plodov ako na lokalite Jelenec. Pri všetkých sledovaných taxónov sme zistili strednú variabilitu v hmotnosti plodov. Koeficient variability sa pohyboval od $c_v=13,26\%$ do $c_v=19,34\%$. Analýzou variancie na hladine významnosti $\alpha=95\%$ boli zistené rozdiely v hmotnosti plodov medzi *P. × fruticans* a *P. × dominii*. Plody *P. × fruticans* z lokality Jelenec a Lošonec nevykazovali rozdiely počas celého obdobia výskumu. Index štihlosti kôstky na lokalite Jelenec sa pohyboval v rozmedzí od 56,78 % (*P. spinosa*) do 89,67 % (*P. × dominii*). Na lokalite Lošonec index štihlosti kôstky sa pohyboval od 54,86 % (*P. × fruticans*) do 72,34% (*P. × fruticans*) (tab.4). Depypere et al. (2007) uvádza pri *P. spinosa* nižšie hodnoty indexu relatívnej štihlosti kôstok (60,2 – 79,2 %) a pri *P. × fruticans* (68,4 – 79,1 %). Na lokalite Jelenec sme zaznamenali hodnoty indexov relatívnej guľatosti kôstok

skúmaných taxónov od 102,67 % *P. × dominii* do 164,49 % *P. spinosa*. Relatívne plochejšie kôstky v porovnaní s *P. spinosa* mal *P. × dominii* a *P. dasyphylla*.

Tab. 4 Variabilita hmotnosti plodov a kôstok (%)

	Jelenec					
	Hmotnosť plodov (%)			Hmotnosť kôstok (%)		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012
<i>P. spinosa</i>	19,89	23,86	19,86	6,69	6,41	6,28
<i>P. × fruticans</i>	34,52	32,66	31,45	4,93	4,86	5,46
<i>P. × dominii</i>	33,24	27,86	28,16	7,2	7,08	6,71
	Lošonec					
<i>P. × fruticans</i>	19,35	18,61	19,41	6,57	5,63	6,94
<i>P. dasyphylla</i>	19,43	13,26	15,64	6,13	7,57	6,31

Hodnotenie floristického zloženia skúmaných biokoridorov

Čiastkovým cieľom bolo vyhodnotenie flóry v skúmaných biokoridoroch. Výskum prebiehal na lokalite Lošonec, kde skúmaná časť oddeľuje poľnohospodársky využívanú pôdu od lesa a na lokalite Jelenec, biokoridor oddeľuje rybník od lúky. Na oboch lokalitách sme zaznamenali výskyt druhov radu *Prunetalia spinosae*, zväzu *Prunion spinosae-Crataegetum monogynae*. Porasty sú tvorené prevažne tŕnistými a malolistými druhmi krov (*Prunus spinosa* L., *Crataegus monogyna* L., *Rosa canina* L.). Z hľadiska vegetačnej skladby na území Jelencu majú dominantné zastúpenie druhy rodu *Prunus* L. Porasty sú tvorené prevažne tŕnistými a malolistými druhmi krov (*Rosa canina* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus × dominii* Baranec, *Eonymus europaeus* L., *Swida sanguinea* L.). V etáži E3 dominantné zastúpenie majú *Acer campestre* L., *Malus domestica* Borkh., *Salix caprea* L. a *Pyrus communis*. V bylinnej vrstve prevažujú druhy ako: *Calistegia sepium* L., *Dactylis glomerata* L., *Daucus carota* L. Porasty sú zapojené a viacvrstvové s veľmi výrazným zastúpením krovinného podrastu. Biokoridor na lokalite Lošonec sa vyznačuje charakteristickou líniovou priestorovou štruktúrou v porovnaní s lokalitou Jelenec. Skúmané porasty sú v spoločenstve duba zimného.

ZÁVĚR

Skúmané taxóny rodu *Prunus* L. (*Prunus spinosa* L., *Prunus × fruticans* Weihe, *Prunus × dominii* Baranec, *Prunus dasyphylla* Schur) v oblasti pohoria Malé Karpaty a Trábeč sa vyznačujú strednou až vysokou variabilitou v hmotnosti plodov. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že na lokalite Jelenec sa jednotlivým taxónom darí lepšie ako na lokalite Lošonec. Na jednotlivých jedincoch v sledovaných biokoridoroch sme zaznamenali ochorenia plodov a listov, ktoré

spôsobujú huby *Clasterosporium Carpophilum* L. a *Monilinia laxa*. Na lokalite Lošonec sú pôvodné fytoocenózy analyzovaných biokoridorov negatívne ovplyvnené a potenciálne ohrozené antropogénnou činnosťou v súvislosti s obrábaním pôd a pestovateľskými postupmi, ktoré sú realizované na príľahlých agroekosystémoch.

LITERATURA

1. BARANEC, T. 1996. *Monitoring reprodukčného procesu niektorých ohrozených druhov čeľade Rosaceae L. v Trávníci*. In Rosalia, roč. 11, 1996.
2. BARANEC, T., IKRÉNYI, I., DEBNÁRIKOVÁ, P., RYBNÍKÁROVÁ, J. 2009. Analysis of vegetation structure of biocorridors on the territory of agricultural landscape in SW Slovakia. In *Landscape – theory and practice. Abstracts of the 15th International symposium on Problems of Landscape ecological research*. Bratislava, 2009. s.128.
3. BARANEC, T. – ŽGANČÍKOVÁ, I. – MURÁŇOVÁ, K. 2011. Predbežné výsledky štúdia taxonomickej a morfolgickej variability rodu *Prunus* L. v biokoridoroch poľnohospodárskej krajiny v JZ Slovensku. *Acta Pruhoniana*. č. 99, s 97 – 101.
4. BERTOVLÁ, L. (ed.) 1992. *Flóra Slovenska IV/3*. Bratislava: VEDA, 566 s. ISBN 80-224-0077-7
5. BORTIRI, E. - HEUVEL, B.V. - POTTER, D. 2006. Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy. In: *Plant Systematics and Evolution*, vol. 259, 2006, p. 53 - 71. DOI:10.1007/s00606-006-0427-8
6. DEPYPERE, L., CHAERLE, P., MIJNSBRUGGE, K., GOETGHEBEUR, P. 2007. Stony Endocarp Dimension and Shape Variation in *Prunus* Section *Prunus*. In *Annals of Botany*, roč. 100, 2007, č. 7, s. 1585-1597. ISSN 0305-7364.
7. ELIÁŠ, P. jun. 2004. Populačná a reprodukčná biológia vybraných ohrozených druhov flóry Slovenska: dizertačná práca. Nitra: SPU, 2004, 114 s.
8. FIALA, K. – KOBZA, J. – MATUŠKOVÁ, L. – BREČKOVÁ, V. – MAKOVNÍKOVÁ, J. – BARANČÍKOVÁ, G. – BŮRIK, V. – LITAVEC, T. – HOUŠKOVÁ, B. – CHROMANIČOVÁ, A. – VÁRADIOVÁ, D. – PECHOVÁ, B. 1999. Závazné metódy rozborov pôd. Čiastkový monitorovací systém – Pôda. 1. vyd. Bratislava : VUPOP, 1999, s. 142.
9. HARPER, J.L. 1977. *Population biology of plants*. London: Academic Press, 1977. 892 p. ISBN 0-12-325850-2
10. HÜBNER, S., WISSEMAN, V. 2004. Morphometrische Analysen zur Variabilität von *Prunus spinosa* L.–Populationen (Prunoideae, Rosaceae) im Mittleren Saaletal, Thüringen. In *Forum geobotanicum*, roč. 1, 2004, s. 19–51. ISSN 1867-9315, DOI 10.3264/FG.2004.1215
11. Lee S, Wen J. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Am J Bot.* 2001;88(1):150-160. <http://dx.doi.org/10.2307/2657135>
12. MURÁŇOVÁ, K. 2012. Taxonomická a populačná štruktúra krovinných biokoridorov v poľnohospodársky využíwanej krajiny. Dizertačná práca. Nitra: SPU, 2012, 135 s.

13. RYBNÍKÁROVÁ, J. 2010. Reprodukčná biológia vybraných autochtónnych druhov rodu *Prunus* L.: dizertačná práca. Nitra: SPU, 2010, 124 s
14. SAVIČ, M. – VRAČAN, L. 2011. Properties of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) from Stara Planina. Agroekonomija, 2011. Dostupné na internete: [cit. 2012 09 .08] <<https://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/21/properties-of-blackthorn-prunus-spinosa-l-from-stara-planina/>>
15. ŤURIN, I.V. 1966. K metodike analýza deya stravniteľnogo izučenja sostava počvennogo peregnoja ili gumusa. In: Voprosy genezisa i plodorodija počv. Moskva: Nauka, 1966. P. 186.
16. VAN ZEIST, W. – WOLDRING, H. 2000. Plum (*Prunus domestica* L.) varieties in late- and post-medieval Groningen: the archaeobotanical evidence. In *Palaeohistoria*, roč. 39/40, 2000, s. 563–576, ISSN 0552-9344, ISBN 905410465 1

Section – Animal Biology

EFFECT OF COLOURFUL DRINKERS AND GENDER OF PARROTS LORICULUS GALGULUS TO INTAKE OF HONEY WATER

VLIV BARVY NAPÁJEČEK A POHLAVÍ PAPOUŠKŮ LORICULUS GALGULUS NA PŘÍJEM MEDOVÉ VODY

Andrýsek J., Chládek G., Javorová J., Velecká M., Večeřa M., Falta D.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xandryse@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of colourful drinkers (yellow, blue, red and green) and gender of parrots (male/female) *Loriculus galgulus* to intake of honey water. The observations realized at private breeder for 30 consecutive days in group containing 4 males and 2 females of this genus. By recording apparatus were making pictures in ten-minutes intervals. Than these pictures were evaluate and the results tested by Chi – square test. Over some differences in frequency of visits to coulour drinkers, the highest percent (27.6%) showed yellow drinker and the lowest percent (21.3%) showed green drinker, were results nonsignificant. As well as effect of gender was without significant differences, what higher percent (69%) of males and lower percent (31%) of females responds to the share of genders in group.

Key words: loriculus, colour of drinkers, *Loriculus galgulus*, honey water

Acknowledgments: This research was supported by the research programme MSM 6215648905 and by grant project IGA TP 1/2012 AF MENDELU.

ÚVOD

Loriové jsou hned na první pohled odlišnou skupinou papoušků z důvodu potravní specializace (SMRČEK, 2010). Tvrdá semena u lorikulů nahradila směs dužnatých plodů, nektar, pyl, med a moučnící červi (REINSCHMIDT, 2010) vzhledem k této potravní specializaci je velmi důležitý zrak, který je nejdůležitějším smyslovým orgánem sloužícím k rozpoznání objektů. Evoluce však vybavila ptáky soustavou barevného vidění, které převyšuje vidění všech savců (CUTHILL et. al., 2000). Znalosti ohledně barevného vidění jsou docela přirozeně založeny na lidském pohledu. Na spolupracujících lidech mohou vědci snadno provádět experimenty, díky kterým by zjistili, které směsice barev vypadají stejně nebo odlišně (GOLDSMITH, 2008).

Oproti lidem se vnímání barev u ptactva liší hned ve dvou aspektech. Nejsou omezeni pouze na vlnovou délku 400 – 700 nm., jak je tomu u lidí, ale jsou schopni vnímat také ultrafialové záření o vlnové délce 300 – 400 nm (CUTHILL et. al., 2000).

I když některé vlnové rozsahy světla mají zvláštní význam pro zvířata, ultrafialové vlnové délky se nezdají být významnější než jiné vlnové délky barevného spektra. Pro smysluplné hodnocení chování zvířat, zabývající se barevným viděním, můžeme říci, že ultrafialové záření je pouze jednou ze součástí vizuálních podnětů, které by mohli být pro zvířata zajímavé (KEVAN, CHITTKA A DYER, 2001).

MATERIÁL A METODIKA

Předmětem pozorování byla skupina papoušků *Loriculus galgulus*, která zahrnovala 2 samce a 4 samice, do jejich voliéry byly nainstalovány čtyři barevné napáječky, u nichž bylo pomocí spektrofotometru Minolta CM 2600 d určeno barevné spektrum a to žlutá ($L = 75,6193$; $a = 19,3215$; $b = 69,7333$), červená ($L = 49,9579$; $a = 54,1469$; $b = 36,4030$), modrá ($L = 53,0836$; $a = -13,2292$; $b = -34,3751$), zelená ($L = 67,5745$; $a = -30,6599$; $b = 44,6554$) u nichž se zjišťovala celková frekvence návštěv dle pohlaví a rozdílné preference barev.

Pozorování probíhalo po dobu 30 po sobě jdoucích dnů u soukromého chovatele, u něhož byly pomocí záznamového zařízení pořizovány v 10 minutových intervalech fotografie. Výsledky pak byly rozděleny na skutečnou délku pozorování a dobu od 7 : 00 do 19 : 00 hodin, aby byl eliminován vliv rozdílné délky dne. Získané hodnoty byly vyhodnoceny a testovány pomocí χ^2 – kvadrát testu.

Obr. č. 1 Umístění napáječek ve voliére



VÝSLEDKY A DISKUZE

Jednotlivé využití napáječek podle preference barvy nám vyjadřuje tabulka Tab. 1. Z výsledků celkové frekvence návštěv (348x což je 100%), u celodenního pozorování, je patrná tendence ke zvýšenému využívání žluté napáječky 96x což v přepočtu činilo 27,6 %, dále u červené napáječky je frekvence jen mírně zvýšená 90x což v přepočtu činilo 25,8% . Téměř očekávaná návštěvnost byla u modré napáječky 88x což v přepočtu činilo 25,3% a nejméně pak byla navštěvována napáječka zelená a to 74x což v přepočtu činilo 21,2%. Různé návštěvnosti napáječek však byly statisticky neprůkazné.

Tab 1. Pozorované a očekávané hodnoty návštěv jednotlivých barev za celý den

	Žlutá	Zelená	Červená	Modrá	Σ
Pozorovaná četnost	96	74	90	88	348
Očekávaná četnost	87	87	87	87	348
Pozorovaná frekvence %	27,6	21,2	25,8	25,3	100
Očekávaná frekvence %	25	25	25	25	100
Chí - kvadrát	0,93	1,94	0,10	0,01	2,98

Preference k určité barvě také potvrzují studie TSUJITA, SAKAI a KIKUZAWA (2008), kteří se ve své práci zaměřili na atraktivitu ovoce podle barvy u ptactva. Určitou tendenci k zvýšenému

příjmu ovoce modré barvy také potvrdili (MURRAY et al., 1993). To je, ale v rozporu s našimi výsledky, kde papoušci dávají přednost žluté barvě napáječek, tady tento rozdíl by mohl být zapříčiněn tím, že význam preferencí barev se liší podle druhu ptactva (TSUJITA, SAKAI a KIKUZAWA, 2008).

Hodnoty pozorování od 7 hodin do 19 hodin (328x což je 100%), nám vyjadřuje tabulka Tab. 2. Z výsledků uvedených v této tabulce vyplývá, že byla i v tomto časovém rozmezí nejvíce navštěvována žlutá napáječka 87x což v přepočtu činilo 26,5 %, dále pak modrá napáječka 86x což v přepočtu činilo 26,2 %, červená napáječka 81x což v přepočtu činilo 24,7 % a zelená 74x což v přepočtu činilo 22,6%. Tyto rozdíly k preferenci určité barvy však byly statisticky neprůkazné.

Tab 2. Pozorované a očekávané hodnoty návštěv jednotlivých barev od 7 – 19 hod.

	Žlutá	Zelená	Červená	Modrá	Σ
Pozorovaná četnost	87	74	81	86	328
Očekávaná četnost	82	82	82	82	328
Pozorovaná frekvence %	26,5	22,6	24,7	26,2	100
Očekávaná frekvence %	25	25	25	25	100
Chí - kvadrát	0,30	0,78	0,01	0,20	1,29

Při pozorování papoušků po dobu 12 hodin můžeme z výsledků vyčíst pokles celkových návštěv u napáječek o 20. Dále je z výsledků patrné, že v tomto časovém rozmezí méně navštěvovali červenou napáječku, než tomu bylo u hodnot z celého dne. Tyto výsledky jsou v rozporu s WILLSON, GRAFF a WHELAN (1990), kteří uvádí, že byla malá tendence upřednostňovat červené a černé ovoce, a naopak nízká tendence k preferenci žlutých plodů. Odlišné výsledky by mohli být zapříčiněny rozdílným obsahem cukru v ovoci jak uvádějí TSUJITA, SAKAI a KIKUZAWA (2008), kdežto v našem pokusu byl obsah cukru u všech barevných napáječek stejný.

Dalším záměrem sledování bylo zjistit, zda jsou rozdíly využívání napáječek mezi samci a samicemi. Z tabulky Tab. 3, která vyjadřuje pozorování po dobu celého dne (348x což je 100%), bylo patrné, že více navštěvovali napáječky samci 240x což v přepočtu činilo 69%. Samice jen 108x což v přepočtu činilo 31%. Statisticky však tento vliv byl neprůkazný.

Tab. 3 Pozorované a očekávané rozdíly v návštěvnosti u jednotlivých pohlaví za celou dobu

	Samec	Samice	Σ
Pozorovaná četnost	240	108	348
Očekávaná četnost	230	118	348
Pozorovaná frekvence %	69	31	100
Očekávaná frekvence %	66	34	100
Chí - kvadrát	0,43	0,85	1,28

Z výsledných hodnot je zřejmá tendence vyššího počtu návštěv napáječek samci než je tomu u samic, což by mohlo být kvůli jejich způsobu života, kdy si papoušci v období toku vzájemně probírají peří a samci po tuto dobu krmí samice (SMRČEK a SMRČKOVÁ, 1996). Také TOMIŠKA (2011) uvádí, že Loriové menšího věku potřebují zpravidla více cukru, který jim byl poskytován v podobě medové vody.

Pozorování rozdílů návštěvnosti mezi pohlavími od 7 hodin do 19 hodin (328x což je 100%), vyjadřuje tabulka Tab. 4. Samci navštívili napáječky 226x což v přepočtu činilo 68,9% a samice 102x což v přepočtu činilo 31,1%. Rozdíl ve využití napáječek byl u samců mírně nad očekávaným a u samic zas mírně pod očekávanou návštěvností. Statisticky však nebyl průkazný.

Tab. 4 Pozorované a očekávané rozdíly v návštěvnosti u jednotlivých pohlaví od 7-19 hod

	Samec	Samice	Σ
Pozorovaná četnost	226	102	348
Očekávaná četnost	217	111	348
Pozorovaná frekvence %	68,9	31,1	100
Očekávaná frekvence %	66	34	100
Chí - kvadrát	0,43	0,85	1,28

Ve srovnání z výslednými hodnotami při pozorování z celého dne, můžeme říci, že je téměř srovnatelný počet návštěv u napáječek, jako tomu bylo výše. I zde můžeme vidět určitou tendenci vyššího navštívování napáječek samci než tomu je u samic. Také VAŠÍČEK (2004) uvádí, že samci krmí samice až 4krát denně, což by odpovídalo zvýšené frekvenci návštěv samců.

ZÁVĚR

V našem sledování jsme zjistili určitou tendenci ke zvýšenému navštěvování žluté napáječky oproti ostatním barvám. Nejméně ze všech barev vyhledávali napáječku zelenou a to jak u hodnot celodenního sledování, tak i u sledování od 7 hodin do 19 hodin. Zde byl však rozdíl v pořadí preference modré napáječky, kterou navštěvovali jako druhou, oproti celodennímu sledování kde jako druhou navštěvovali červenou napáječku. Tyto výsledky však nebyli statisticky průkazné ($P > 0,05$).

Co se týče vlivu pohlaví na příjem medové vody v napáječkách, tak z hodnot můžeme vyčíst, že samci navštěvovali více napáječky než samice a to jak u celodenního sledování, tak i u sledování od 7 hodin do 19 hodin. Tato tendence k častějším návštěvám samců však nebyl statisticky průkazná ($P > 0,05$).

LITERATURA

CUTHILL C. I., PARTIDGE C. J., BENNETT T. A., CHURCH C. S., HART S. N., HUNT S. (2000). Ultraviolet vision in birds. *Advances in the Study of Behavior*, 29, 159-214

GOLDSMITH, T. H. Co vidí ptáci. *Scientific American české vydání*. 2008, srpen - září, 60 - 67.

KEVAN, P. G., L. CHITTKA a A. G. DYER. Limits to the salience of ultraviolet: lessons from colour vision in bees and birds. *The Journal of Experimental Biology*. 2001, April, 2571 - 2580.

MURRAY, K. G., K. WINNETT-MURRAY, E. A. CROMIE, M. MINOR a E. MEYERS. The influence of seed packaging and fruit color on feeding preferences of American robins. *Plant Ecology*. 1993, Vol. 107 - 108, No. 1, 217 - 226.

REINSCHMIDT, M. *Atlas papoušků: 353 druhů na fotografiích*. České Budějovice: Dona, 2010, 381 s. ISBN 978-80-7322-142-3.

SMRČEK, M. Papoušci - co by měl vědět každý chovatel (2): Loriovití. *Nová Exota*. 2010, č. 11, 10 - 12 s.

SMRČEK, M. a L. SMRČKOVÁ. *Papoušci celého světa*. Vyd. 1. Praha: Brázda, 1996, 220 s. Naše hobby. ISBN 80-209-0264-3.

TOMIŠKA, L. Výživa loriů. *Nová Exota*. 2011, č. 12, 22 - 24 s.

TSUJITA, K., K. KIKUZAWA a S. SAKAI. Does individual variation in fruit profitability override color differences in avian choice of red or white *Ilex serrata* fruits?. *The Ecological Society of Japan*. 2008, č. 23, 445 - 450.

VAŠÍČEK, M. *Kakaduové a Loriové*. Vyd. 1. Kosmonosy: Barko, 2004, 230 s.

WILLSON, MARY F., DANIEL A. GRAFF a CHRISSTOPHER J. WHELAN. Color Preferences of Frugivorous Birds in Relation to the Colors of Fleshy Fruits. *The Condor: A Journal of Avian Biology*. 1990, Vol. 92, No. 3, 545 - 555

REVEALING THE ROLE OF ZINC(II) IN PROSTATE CANCER PATHOGENESIS

ODHALOVÁNÍ ROLE ZINEČNATÝCH IONTŮ U KARCINOMU PROSTATY

Gumulec J.^{1,2}, Sztalmachová M.¹, Raudenská M.¹, Masařík M.¹, Kizek R.^{2,3}

¹Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: j.gumulec@gmail.com

ABSTRACT

Current diagnostic procedures do not enable us to distinguish between clinically latent forms of prostate cancer from aggressive forms, the most common cancer in males. The key to understand the different behavior of these forms is in its molecular mechanisms. Current literature highlights the role of zinc(II) ions in the development and pathogenesis of this cancer. Our objective was to identify diverse metabolic pathways of these forms of cancer and determine prognostic markers of high-grade form of prostate cancer. We determined genes alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR), caveolin-1 (Cav-1), metallothionein (MT), p53, NF-κB, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 and ZnT-1 on RNA and protein level in the sera of 133 men (82 tumorous and 51 healthy) and in cell lines derived from aggressive form of cancer. The level of these genes was determined and compared to prostatic specific antigen, widely used prostate cancer biomarker. We identified significantly ($p < 0.05$) decreased (> 4 -fold) RNA level of Cav-1 NF-κB, c-FOS a c-JUN and significantly elevated (> 2 -fold) RNA level of MT, AMACR, PSA, Ki-67, MMP-9 and ZIP1 and ZnT-1 (> 25 -fold) in tumorous cell line 22Rv1 in comparison to healthy cell line PNT1A. On the protein level, we identified significant (> 20 -fold) decrease of MT in cell lines. In contrary, serum MT level was significantly 4-fold increased. Furthermore, we identified insignificant changes in serum Cav-1 and AMACR. However, Cav-1 level was significantly increased in high stage TNM T4 patients and positively correlated with grading ($r = 0.29$ at $p = 0.028$). Thus, we may consider the combination of Cav-1 and MT as a high risk prostate cancer biomarker.

Key words: zinc; prostate; cancer; apoptosis; tumor marker

Acknowledgments: Financial support from NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068, Ceitec CZ.1.05/1.1.00/02.0068, and doc Ceitec.02/2012 is highly acknowledged

ÚVOD

Tumory prostaty patří nejčastějším nádorovým onemocněním a přes svůj pomalý růst patří k jedněm z nejčastějších příčin úmrtí na nádorové onemocnění (Bégin a Bismar, 2009, Gumulec, a kol., 2010). Nicméně, je známo, že ve většině případů se tyto nádory chovají neagresivně a nevedou k záhubě pacientů, pouze relativně malý podíl nádorů se chová agresivně. Současné možnosti diagnostiky neumožňují s přesností již v raných stádiích určit, zdali se bude jednat o agresivní, či latentní, tj. níže agresivní formu. Toto rozlišení již v raných fázích je nicméně klíčové, neboť zákrok pouze v této době onemocnění vede k vyléčení pacienta.

Je proto zcela zásadní pochopit molekulární mechanismy, které vedou k odlišnému chování nádorových buněk „latentního“ karcinomu a karcinomu agresivního. S tím souvisí taktéž naše snaha vyvinout metodiku schopnou odlišit tyto dvě formy onemocnění – identifikovat markery onemocnění snadno zjištělné v tělních tekutinách, resp. v biotických vzorcích.

Tato studie se zaměřuje na geny alfa-methylacyl-CoA racemáza (AMACR), Caveolin-1 (Cav-1), metalothionein (MT), p53, NF- κ B, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 a ZnT-1 (Fan a Cherian, 2002, Kury, a kol., 2002, Sfanos, a kol., 2011). Metalothioneiny jsou skupinou proteinů s vysokým obsahem cysteinu o molekulární hmotnosti 6 – 10 kDa. Ty jim (díky thiolovým vazbám mezi cysteiny) propůjčují schopnost vázat řadu kovů. Metalothioneiny proto hrají klíčovou roli v transportu těžkých kovů, jejich detoxikaci a v ochraně buněk před oxidativním stresem (Eckschlager, a kol., 2009). Funkce těchto proteinů zasahují také do regulace apoptózy – zvýšené hladiny metalothioneinu mají antiapoptické působení – metalothionein reguluje hladinu, aktivitu a buněčnou lokalizaci transkripčního faktoru NF- κ B (Formigare, a kol., 2007). NF- κ B zajišťuje ochranu buněk před apoptózou aktivací antiapoptických genů a protoonkogenů Bcl-2, c-myc a TRAF-1. Tuto antiapoptickou kaskádu využívají některé nádory (Krizkova, a kol., 2011). V posledních letech byla popsána souvislost se zvýšením hladin těchto proteinů u řady nádorů (Penkowa, a kol., 2005). AMACR je peroxisomální a mitochondriální enzym účastnící se beta oxidace větvených mastných kyselin a katabolismu žlučových kyselin (Kuefer, a kol., 2002). Bylo identifikováno zvýšení hladin tohoto enzymu u adenokarcinomů a prostatických intraepiteliálních neoplazií (Luo, a kol., 2002). Caveolin-1 je často asociován s nádorovými onemocněními jako potenciální marker. Jedná se o membránový protein, součást tzv. caveol. Ty se účastní endocytózy. Caveolin také hraje významnou roli v degradaci cholesterolu. Nicméně, funguje také jako signální molekula (Thompson, a kol., 2010). ZIP-1 a ZnT1 jsou zinkové transportéry, u nichž byla popsána odchylná exprese u karcinomů.

Cílem práce je popsat hladiny těchto genů na úrovni RNA a proteinu v buněčných liniích (sloužící jako model tkáně tumoru) a v séru pacientů a nalézt souvislosti mezi získanými daty.

MATERIÁL A METODIKA

V této studii byly použity buněčné linie: (a) kontrolní, PNT1A, lidská buněčná linie získaná imortalizací normálních prostatických epiteliálních buněk 35letého muže post mortem, (b) 22Rv1, získaná z primárního tumoru karcinomu prostaty pasážovaného na myším xenograftu. Tyto buněčné linie byly zakoupeny u HPA Culture Collections (Salisbury, UK).

V dalších fázích experimentů byla testována lidská séra, 82 nádorových a 51 kontrolních s bioticky verifikovaným adenokarcinomem prostaty. Testovaná séra byla získána z Urologické kliniky nemocnice U svaté Anny v Brně.

Proteiny z těchto linií a z testovaných vzorků sér byly získávány jednak RIPA pufrem, jednak mechanickou homogenizací a tepelnou lyzací (99°C) buněk. Proti metalothioneinu byla použita polyklonální králičí protilátka (Santa Cruz biotechnology, USA), proti AMACR polyklonální králičí protilátka (Clonestar, CZ), proti PSA monoklonální myší protilátka (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Caveolin byl detekován pomocí ELISA kitu (VersaMax microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Metodika detekce je podrobněji rozepsána v předchozích studiích (Gumulec, a kol., 2012, Gumulec, a kol., 2012, Sztalmachova, a kol., 2012). Je známo, že nádorově změněné buňky mají utlumený mechanismus importu zinečnatých iontů do buněk prostaty. Linie byly proto inkubovány v médiu se zvyšujícím se množstvím těchto iontů; koncentrace tohoto kovu se v médiu pohybovala v rozmezí 0–500 μM/L. V těchto koncentračních řadách (každá linie pěstována současně v pěti vzestupných koncentracích) byla stanovována hladina mRNA a proteinu MT a PSA a hladina intracelulárního zinku volného a vázaného zinku. U linií byla stanovena hladina mRNA metalothioneinů MT1A a MT2A, PSA; AMACR, Cav-1, p53, NF-κB, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 a ZnT-1. Real-time PCR byla vyhotovena komparativní metodou; Hodnoty Ct byly standardizovány vůči beta-aktinu.

Následně byly vzorky elektroforeticky separovány na 10% SDS-PAGE gelech (Bio-Rad, USA) na 10–12% 0.75 mm gelech. Bylo použito napětí 80V po 30 min a 120 V po 90 min. Výsledky barveny, stříbrem, nebo přeblovány (1h, 100 V) na nitrocelulózovou membránu, zablokovaný po dobu 1 h 5% mlékem v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH₂PO₄ a 4,3 mM Na₂HPO₃, pH 8,0) a imunodetekovány. Pro rychlou orientaci byly používány dot-bloty. Byla použita myší protilátka 1:750 v PBS s 5% mlékem, po 4 °C po 12 h a sekundární anti-mouse protilátka značená horseradish peroxidázou, Sigma Aldrich Co., USA, v ředění 1:5000). MT byl souběžně detekován elektrochemicky. Byl použit elektrochemický analyzář (Metrohm AG, Švýcarsko), byl použit analyzář 757 VA Computrace (Metrohm AG, Švýcarsko) ve tříelektrodovém zapojení s visící rtuťovou kapkou (HMDE) jakožto pracovní elektrodou.

Výsledky byly vyhodnocovány v software Statistica 10. Byly prováněny t-testy a korelační matrice. Byla stanovena hladina významnosti p = 0,05. K testu normality byl použit Kolmogorovův-

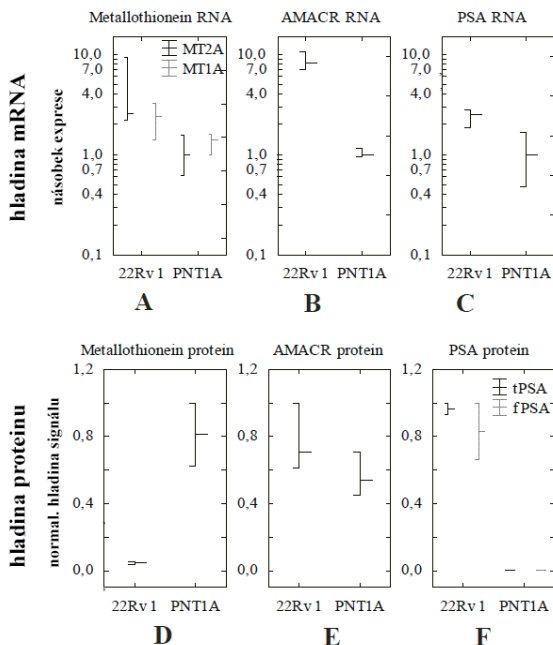
Smimovův test, k rozřazení vzorků do skupin byla použita clusterová analýza (K-means clustering a tree clustering).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Nádorové linie. Model nádorové tkáně je reprezentován buněčnou linií 22Rv1, zdravá tkáň je reprezentována linií PNT1A. Identifikovali jsme signifikantní ($p < 0,05$) snížení hladin RNA Cav-1, NF- κ B, c-FOS a c-JUN a signifikantně zvýšenou hladinu (> 2 násobně) MT, AMACR, PSA, Ki-67, MMP-9 a ZIP1 a ZnT-1 (> 25 násobně) v nádorové buněčné linii, viz **obr. 1** (Gumulec, a kol., 2012, Gumulec, a kol., 2012).

Vedle hladiny RNA byla u linií stanovena také hladina proteinová. Byla zjištěna signifikantně zvýšená hladina AMACR a také kontrolní PSA. Elevace PSA je signifikantní jak v jeho volné, tak celkové frakci. AMACR byla signifikantně zvýšena (1,5 násobně, $p = 0,132$). Nicméně, MT byl signifikantně snížen u nádorové linie.

Obr. 1: Hladiny vybraných genů u buněčných linií. Hladina mRNA (A-C) zobrazena jako relativní násobek exprese vůči nenádorové linii PNT1A. D-F: hladina proteinu těchto genů. tPSA – celková PSA, fPSA – volné PSA

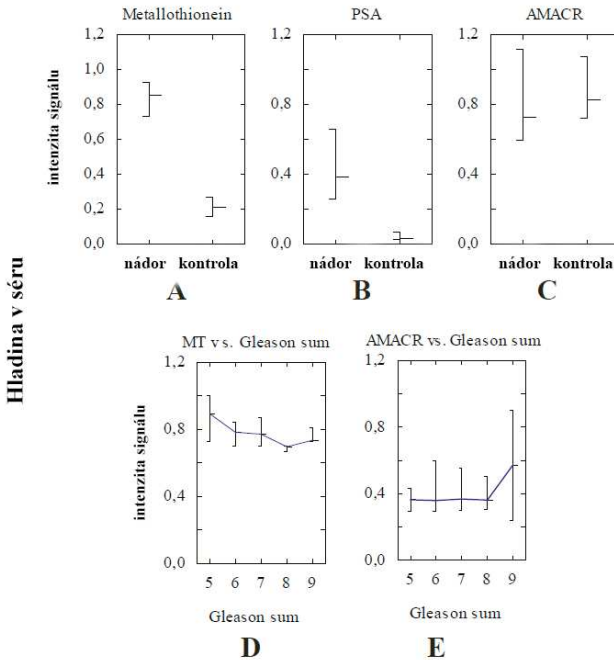


Klinická studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním. V séru jsme sledovali hladinu AMACR, PSA, MT a Cav-1. V dřívějších experimentech jsme prokázali, že MT je elevován u

pacientů s vysokou mírou specifity u pacientů s karcinomem (Křížková, a kol., 2011, Masarik, a kol., 2011).

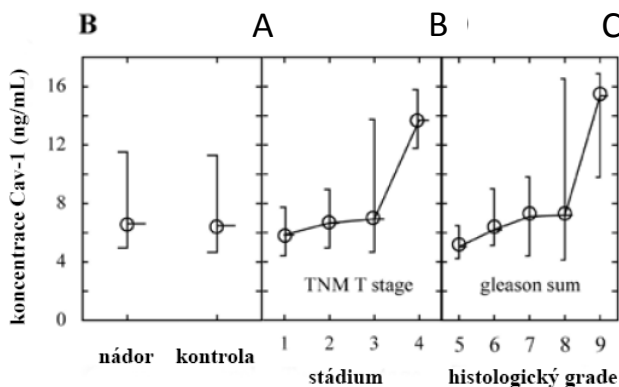
V této studii jsme identifikovali zvýšení hladiny MT a PSA, AMACR v sérové hladině zvýšena nebyla a zůstává tak markerem tkáňovým, což je konzistentní s údaji v literatuře (Luo, a kol., 2002).

Obr. 2: sérová hladina vybraných markerů (A-C) onemocnění a její závislosti na gradingu D-E (stupni histologické diferenciaci)



Sérová hladina caveolinu-1 byla stanovena v rozmezí 1,2–14,2 ng/mL u pacientů a 1,74–14,98 ng/mL u kontrol. Průměrná koncentrace byla stanovena 5,96 ng/mL u pacientů a 5,42 ng/mL u kontrol. Mezi kontrolami a pacienty nebyla nalezena signifikantní změna hladiny. Nicméně, clusterová analýza odhalila signifikantní variaci v hodnotách u pacientů a rozdělila tak tuto skupinu na dvě podskupiny: Skupina s vysokou koncentrací cav-1 a s nízkou koncentrací cav-1. Následně byly tyto skupiny dány do souvislosti s histologickým stagingem (TNM T scale) a gradingem (Gleason sum) onemocnění. Bylo zjištěno následující: nízké hladiny caveolinu-1 byly asociovány s tumory nízkých stupňů malignity (**Obr. 3**)

Obr. 3: Hladina *cav-1* u kontrol a nádorů (A), závislost hladiny *Cav-1* na stagingu (B) a gradingu (C).



Pacienti s šířícím se tumorem (T4) měli signifikantně ($p < 0,004$) zvýšenou hladinu tohoto genu oproti pacientům nižšího stádia. Co se týče gradingu, pacienti s Gleason skóre 9 měli zjevně zvýšenou hladinu oproti pacientům s nižším grade tumoru ($r = 0,29$ při $p = 0,028$).

Dále byly provedeny korelace s věkem pacientů, přidruženými nemocemi (hypertenze, ischemická choroba srdeční, dyslipidémie, diabetes mellitus), přičemž nebyla identifikována změna hladin charakteristická pro žádnou s uvedených chorob. Obdobně, hladina *cav-1* se neliší u kuřáků a nekuřáků.

Tab. 1 Hladina *Cav-1* a PSA u pacientů – seřazeno dle stádia a histologie

	<i>n</i>	PSA (ng/ml)	volné PSA (ng/ml)	Caveolin-1 (ng/ml)
Stádium (TNM)				
T1	1	3.12	0.54	4.19
T2	40	5.41 ± 3.44	0.77 ± 0.44	5.25 ± 2.62
T3	18	5.18 ± 3.96	0.58 ± 0.38	6.60 ± 3.69
T4	3	5.58 ± 4.01	0.57 ± 0.33	14.25 ± 2.19*
Diferenciace tumoru				
dobře	3	4.15 ± 1.40	0.63 ± 0.42	4.13 ± 1.27
středně	23	4.83 ± 3.50	0.66 ± 0.40	5.64 ± 3.02
špatně	28	5.95 ± 4.66	0.72 ± 0.48	6.28 ± 3.32
Grade nádoru (Gleason sum skóre)				
5	5	3.69 ± 1.43	0.46 ± 0.02	3.86 ± 1.11
6	20	5.03 ± 2.56	0.82 ± 0.39	5.11 ± 2.42
7	32	4.85 ± 3.22	0.58 ± 0.37	5.75 ± 2.98
8	3	10.12 ± 8.17	1.02 ± 0.82	6.96 ± 4.83
9	4	6.87 ± 5.03	0.64 ± 0.42	9.99 ± 4.04
10	1	3.9	---	---

ZÁVĚR

V této studii jsme identifikovali významné charakteristiky v hladinách AMACR (zejména na tkáňové úrovni) a caveolinu-1, zejména v séru pacientů s pokročilými tumory. Z modelu buněčných linií a z výsledků koncentrací sér vyplývá, že kombinace uvedených markerů tak může být použita jako zpřesnění diagnostiky a zvýšení pravděpodobnosti záchytu rizikových pacientů ještě v raném stádiu onemocnění.

LITERATURA

- Bégin L. R., Bismar T. A. Prostate Cancer: Pathological Perspective. In: Foulkes, W. D.; Cooney K. A., eds. *Male Reproductive Cancers Epidemiology, Pathology and Genetics*. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer Verlag, 2009.
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and Cancer. *Current Protein & Peptide Science*, 10(4): 360-375.
- Fan L. Z., Cherian M. G. (2002): Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 87(9): 1019-1026.
- Formigare A., Irato P., Santon A. (2007): Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 146(4): 443-459.
- Gumulec J., Masarik M., Hrabec R., Rovny A., Binkova H., Babula P., Adam V., Kizek R. (2010): Zinek a jeho vztah k nádorům prostaty. *Praktický lékař*, 90(8): 455-459.
- Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Hlavna M., Babula P., Hrabec R., Rovny A., Masarikova M., Sochor J., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2012): Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma*, 59(2): 191-200.
- Gumulec J., Sochor J., Hlavna M., Sztalmachova M., Krizkova S., Babula P., Hrabec R., Rovny A., Adam V., Eckschlager T., Kizek R., Masarik M. (2012): Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker. *Oncology Reports*, 27(3): 831-841.
- Krizkova S., Ryvolova M., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Majzlik P., Hubalek J., Provaznik I., Kizek R. (2011): Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis*, 32(15): 1952-1961.
- Kuefer R., Varambally S., Zhou M., Lucas P. C., Loeffler M., Wolter H., Mattfeldt T., Hautmann R. E., Gschwend J. E., Barrette T. R., Dunn R. L., Chinnaiyan A. M., Rubin M. A. (2002): alpha-Methyl acyl-CoA racemase: Expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *American Journal of Pathology*, 161(3): 841-848.

Kury S., Dreno B., Bezieau S., Giraudet S., Kharfi M., Kamoun R., Moisan J. P. (2002): Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nature Genetics*, 31(3): 239-240.

Luo J., Zha S., Gage W. R., Dunn T. A., Hicks J. L., Bennett C. J., Ewing C. N., Platz E. A., Ferdinandusse S., Wanders R. J., Trent J. M., Isaacs W. B., De Marzo A. M. (2002): alpha-Methylacyl-CoA racemase: A new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Research*, 62(8): 2220-2226.

Masarik M., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachova M., Babula P., Adam V., Krizkova S., Hrabec R., Rovny A., Kizek R. (2011): Analysis of tumor markers in prostate carcinoma at RNA and protein level. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(S45-S45).

Penkowa M., Florit S., Giral M., Quintana A., Molinero A., Carrasco J., Hidalgo J. (2005): Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neuro degeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *Journal of Neuroscience Research*, 79(4): 522-534.

Sfanos K. S., Aloia A. L., Hicks J. L., Esopi D. M., Steranka J. P., Shao W., Sanchez-Martinez S., Yegnasubramanian S., Burns K. H., Rein A., De Marzo A. M. (2011): Identification of Replication Competent Murine Gammaretroviruses in Commonly Used Prostate Cancer Cell Lines. *Plos One*, 6(6).

Sztalmachova M., Hlavna M., Gumulec J., Holoubkova M., Babula P., Balvan J., Sochor J., Tanhauserova V., Raudenska M., Krizkova S., Adam V., Eckschlagler T., Kizek R., Masarik M. (2012): Effect of zinc(II) ions on the expression of pro- and anti-apoptotic factors in high-grade prostate carcinoma cells. *Oncology Reports*, in press(

Thompson T. C., Tahir S. A., Li L., Watanabe M., Naruishi K., Yang G., Kadmon D., Logothetis C. J., Troncoso P., Ren C., Goltsov A., Park S. (2010): The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 13(1): 6-11.

QUANTIFIED ANALYSIS OF CORTICAL GRANULE DISTRIBUTION OF PORCINE OOCYTES BEFORE MATURATION

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA DISTRIBUCE KORTIKÁLNÍCH GRANUL U NEZRALÝCH PRASEČÍCH OOCYTŮ

Hanuláková Š.¹, Milakovič I.¹, Jeřeta M.², Hanzalová K.², Knitlová D.², Blahová E.¹, Máchal L.¹

¹Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Genetics and Reproduction, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic

E-mail: sarka.hanulakova@mendelu.cz

ABSTRACT

Polyspermic penetration is one of the major problems influencing in vitro embryo production. Study of the changes in the cortical granule (CG) population in oocytes is indispensable for understanding the mechanism of how oocytes block polyspermic penetration and for developing optimum conditions for in vitro maturation and in vitro embryo production. The effect of follicle size and the effect of estrous cycle phase on the localization of cortical granules in pig oocytes was studied. A total of 185 oocytes collected from small or medium follicles in the early, middle and late luteal and the early follicular phase were used. For cortical granules staining were used fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled PNA (Sigma). The movement of cortical granules were assessed with laser confocal microscope and NIS Elements AR 3.00 software. The index of CG distribution (I_{dkg}) was formed. The Index of CG distribution represents ratio between average signal (FITC) intensity in peripheral part of oocyte and average intensity signal (FITC) in central part of oocyte. Data were related to the follicle size, with regard to the phase. Regardless of the follicle size the index of CG distribution was significantly ($P < 0.01$) higher (2.22 ± 0.49) for the medium follicle – derived oocytes than for the small follicle – derived oocyte (1.48 ± 0.31). With regard to the phase, in the small follicle – derived oocytes, the CG density index increased significantly ($P < 0.01$) from the early luteal (1.2 ± 0.4) to the early follicular (1.7 ± 0.4) phase. With regard to the phase, in the medium follicle – derived oocytes no differences were found. It can be concluded that greater meiotic competence of porcine oocytes influences distribution of cortical granules to the peripheral part of oocytes.

Key words: pig oocytes, cortical granules, PNA, meiotic competence

Acknowledgments: This study was supported by IGA TP 1/2012 and NAZV QH101A166.

ÚVOD

Během folikulogeneze dochází u oocytů k postupnému získávání meiotické a vývojové kompetence. Tato kompetence dává oocytům schopnost zrání a úspěšné fertilizace (Machatkova *et al.*, 2004; 2008). V závislosti na velikosti folikulů a fázi estrálního cyklu se prasečí oocyty s různou meiotickou kompetencí výrazně liší v efektivitě *in vitro* fertilizace (Hulinska *et al.*, 2011). Jedním z největších problémů ovlivňujících *in vitro* produkci embryí je polyspermická penetrace, která ve značné míře ovlivňuje úspěšnou *in vitro* produkci prasečích embryí (Yoshida *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003). Nejvyšší podíl polyspermie vykazují oocyty získané z malých folikulů v časně a střední luteální fázi. Oocyty získané ze středních folikulů, v pozdní luteální a časně folikulární fázi, vykazují pouze malý podíl polyspermie (Hulinska *et al.*, 2011). Důležitou roli v zablokování polyspermické penetrace hrají kortikální granula (Tahara a Tasaka, 2006; Liu, 2011). Kortikální granula jsou membránové sekretorické orgány, které jsou přítomny pouze v nefertilizovaných oocytech, a po vypuštění svého obsahu nejsou nikdy obnoveny (Wang *et al.*, 1997; Liu, 2011). Funkcí kortikálních granul je modifikace zóny pellucidy do formy bariéry neprostopné pro spermie – tzv. zona hardening (Romar *et al.*, 2005; Tahara a Tasaka, 2006; Coy *et al.*, 2008). Tato bariéra zabrání penetraci přebytečných spermií zvýšením rezistence zóny pellucidy proti proteolytickému štěpení. Porozumění mechanismu přesunu kortikálních granul u prasečích oocytů je důležité pro redukci výskytu polyspermicky penetrovaných oocytů, a pro zdokonalení metod *in vitro* produkce prasečích embryí. Cílem tohoto experimentu bylo sledování vlivu folikulogeneze na lokalizaci kortikálních granul v cytoplazmě prasečích oocytů.

MATERIÁL A METODIKA

Izolace oocytů

K experimentu bylo použito 185 oocytů získaných z malých (2 – 4 mm) a středních (5 – 9 mm) folikulů. Prasnice byly poraženy na experimentálních jatkách v časně (1-5 den cyklu), střední (6-10 den cyklu) a pozdní (11-14 den cyklu) luteální fáz a časně (15-16 den cyklu) folikulární fázi. K pokusu byla použita pouze ovária s odpovídajícím morfologickým statutem. Oocyty byly izolovány dvěma způsoby. Nejdříve byly aspirací získány oocyty ze středně velkých folikulů a následně byly totální disekcí korové vrstvy získány oocyty z malých folikulů. Oocyty z velkých folikulů (≥ 10 mm) nebyly do pokusu zahrnuty. K experimentu byly použity pouze oocyty s kompaktním zdravým kumulem čítajícím nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk a tmavou nebo lehce granulovanou cytoplasmou.

Barvení kortikálních granul

K barvení kortikálních granul byla použita metoda popsaná v práci Yoshidy et al. (1993) s několika úpravami dle Wanga et al. (1997). Po odstranění kumulárních buněk, za pomoci vertexu, byly oocyty fixovány 3,7% paraformaldehydem po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po fixaci následovalo promytí v PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma) po dobu 3krát 10 minut. Po promytí byly oocyty permeabilizovány 1% Tritonem X-100 (Sigma) v PBS po dobu 60 minut. Po permeabilizaci byly oocyty promyty v PBS obsahujícím 0,4 % BSA 3krát 10 minut. Po vyjmutí z proplachovacího média byly oocyty barveny pomocí 10 µg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugovaného s peanut aglutininem - PNA (Sigma) v PBS po dobu 30 minut ve tmě. Po obarvení byly oocyty propláchnuty v proplachovacím médiu (PBS + 0,4 % BSA) 3krát 10 minut. Chromatin byl obarven pomocí fluorescenční barvy sytox orange (Invitrogen).

Hodnocení distribuce kortikálních granul

K vizualizaci obarvených kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP 2. Optický řez byl hodnocen za pomoci softwaru NIS Elements AR 3.00. Za pomoci analýzy obrazu bylo vyhodnoceno zastoupení kortikálních granul v centrální a periferní části. Během analýzy byla plocha optického řezu rozdělena na dvě oblasti. První, se nacházela na periférii těsně pod cytoplazmatickou membránou a představovala 20 % plochy. Zbylá část optického řezu byla nazvána jako centrální část a zaujímala 80 % plochy řezu. Podílem průměrné intenzity signálu, získaného z periferní části a signálu získaného z centrální části, byl vypočítán index distribuce kortikálních granul (I_{dkg}), který vypovídá o přesunu kortikálních granul z centrální do periferní části.

$$I_{dkg} = \frac{\text{průměrná intenzita signálu (FITC) v periferní části} \left(\frac{\text{suma intenzity}}{\text{plocha}} \right)}{\text{průměrná intenzita signálu (FITC) v centrální části} \left(\frac{\text{suma intenzity}}{\text{plocha}} \right)}$$

Statistické vyhodnocení

Získané údaje byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistica 9.0. K určení rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla použita jednofaktorová ANOVA pro hladinu významnosti $P < 0,05$ a $P < 0,01$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých a středních folikulů, v časně luteální až časně folikulární fázi estrálního cyklu, vykazovaly rozdíly v lokalizaci kortikálních granulí v cytoplazmě prasečích oocytů. Získané indexy distribuce kortikálních granulí byly porovnány s ohledem na velikost folikulů, ze kterých byly oocyty izolovány, a rovněž s ohledem na fázi estrálního cyklu.

Efekt velikosti folikulu

Velikost indexu distribuce kortikálních granul (I_{dkg}), u oocytů získaných z malých a středních folikulů, bez ohledu na fázi estrálního cyklu, je zobrazena v Tabulce 1. U Oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů, byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl ($P < 0,01$) ve velikosti indexu distribuce kortikálních granul, ve srovnání s oocytů s nižší meiotickou kompetencí získaných z malých folikulů. Jak ukazuje index distribuce kortikálních granul ($1,48 \pm 0,31$), kortikální granula jsou v cytoplazmě oocytů získaných z malých folikulů lokalizovány v centrální části oocytu. Naproti tomu u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí byla zjištěna na periferii více než dvakrát vyšší koncentrace kortikálních granul ($2,22 \pm 0,49$) než v centrální oblasti. Index distribuce kortikálních granul u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů ($2,22 \pm 0,49$)

Tab1: Distribuce kortikálních granul u oocytů získaných z různě velkých folikulů

Velikost folikulů	n	Index distribuce kortikálních granul (I_{dkg})	
		X	S_x
Malé	134	1,48 ^a	0,31
Velké	51	2,22 ^b	0,49

a, b – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$

Efekt velikosti folikulu a fáze estrálního cyklu

Výsledné hodnoty indexu distribuce kortikálních granul, u oocytů získaných z různě velkých folikulů, s ohledem na fázi estrálního cyklu, jsou prezentovány v Tabulce 2. Index distribuce kortikálních granul, byl u oocytů získaných z malých folikulů v časně luteální fázi ($1,2 \pm 0,4$), statisticky průkazně nižší ($P < 0,01$), než u oocytů získaných z malých folikulů v pozdní luteální fázi, a u oocytů získaných ze středních folikulů v pozdní luteální ($2,0 \pm 0,7$) a časně folikulární fázi ($2,4 \pm 0,6$). Oocytů získané z malých folikulů, ve střední luteální fázi, měly statisticky průkazně nižší ($P < 0,01$) hodnotu indexu kortikálních granul ($1,4 \pm 0,5$), než vykázaly oocytů, získané ze středních folikulů v pozdní luteální a časně folikulární fázi. U oocytů získaných z malých folikulů v pozdní luteální fázi, byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,01$) v hodnotě I_{dkg} , ve srovnání s hodnotou indexu u oocytů získaných z malých folikulů v časně luteální fázi ($1,22 \pm 0,4$), a u oocytů získaných ze středních folikulů v časně folikulární fázi ($2,4 \pm 0,6$). Oocytů získané z malých folikulů v časně folikulární fázi, měly statisticky průkazně nižší hodnotu indexu distribuce kortikálních granul ($1,7 \pm 0,4$) pouze ve srovnání s oocytů, získanými ze středních folikulů v časně folikulární fázi ($2,4 \pm 0,6$). Index distribuce kortikálních granul u oocytů izolovaných ze středních folikulů v pozdní luteální fázi ($2,0 \pm 0,7$), vykázal statisticky průkazně vyšší hodnotu ($P < 0,01$) ve srovnání s oocytů izolovanými z malých folikulů v časně a střední luteální fázi. U oocytů izolovaných ze středních folikulů v časně folikulární fázi, byla nalezena statisticky průkazně vyšší

($P < 0,01$) hodnota indexu distribuce kortikálních granul ($2,4 \pm 0,6$), ve srovnání s oocyty izolovanými z malých folikulů v časně, střední a pozdní luteální, a časně folikulární fázi.

Tab 2: Distribuce kortikálních granul u oocytů získaných z různě velkých folikulů s ohledem na fázi estrálního cyklu

Velikost folikulů	Fáze	Stádium	n	Index distribuce kortikálních granul (I_{dkg})	
				X	S_x
Malé	Luteální	časná	51	1,2 ^a	0,4
		střední	36	1,4 ^{ac}	0,5
		pozdní	31	1,8 ^{cd}	0,7
	Folikulární	časná	16	1,7 ^{acd}	0,4
	Luteální	pozdní	22	2,0 ^{bd}	0,7
Střední	Folikulární	časná	29	2,4 ^b	0,6

a,b,c,d – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$

DISKUZE

Migrace kortikálních granul v cytoplazmě, je u savčích oocytů obecně známou skutečností, a to nejen v podmínkách in vivo, ale také v podmínkách in vitro (Coy a Avilés, 2010; Gulyas, 1980). Porozumění mechanismu přesunu kortikálních granul u prasečích oocytů může přispět k redukci výskytu polyspermicky penetrovaných oocytů, a ke zdokonalení metod in vitro produkce prasečích embryí. Hlavním zdrojem prasečích embryí jsou oocyty získané z ovárií prepubertálních prasnic, přestože tyto oocyty vykazují nízkou meiotickou a vývojovou kompetenci (Hyun et al., 2003; Ikeda a Takahashi, 2003; Gupta et al., 2008).

Výsledky tohoto experimentu ukazují změny v distribuci kortikálních granul v cytoplazmě prasečích oocytů v závislosti na fázi estrálního cyklu. Z výsledků je patrné, že u oocytů s nízkou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých folikulů, jsou kortikální granula lokalizována homogenně v celé cytoplazmě oocytu a koncentrace kortikálních granul na periferii je jen nepatrně vyšší, než v ostatních oblastech oocytu. U oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů, jsou kortikální granula lokalizována především v periferní části. Výsledky tedy poukazují na to, že s postupným získáváním meiotické kompetence dochází k migraci kortikálních granul cytoplazmou oocytu směrem k jeho periferní části. Hulinská et al. (2011) ve své práci uvádí, že nejvyšší podíl polyspermie vykazují oocyty s nízkou meiotickou kompetencí, získané z malých folikulů, v časně ($71,8 \pm 4,6$ %) a střední luteální fázi ($60,9 \pm 5,9$ %). Naopak oocyty získané ze středních folikulů, v pozdní luteální ($34,9 \pm 2,9$ %) a časně folikulární fázi ($33,3 \pm 3,4$ %), vykazují pouze malý podíl polyspermie.

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že u nezralých oocytů jsou kortikální granula homogenně rozmístěna v cytoplasmě oocytu a teprve po procesu maturace dojde k přesunu kortikálních granul k periférii a k postupnému vytvoření souvislé vrstvy kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránou (Wang et al., 1997; Sawamukai et al., 1998; Coy et al., 2002). Tyto experimenty byly realizovány bez ohledu na fázi pohlavního cyklu poražených zvířat. Předkládaná studie je první práce zaměřená na lokalizaci kortikálních granul nezralých oocytů izolovaných v různé fázi folikulogeneze. Prezentované výsledky naznačují, že existují rozdíly mezi oocytů izolovanými z různých velikých folikulů v průběhu ovariálního cyklu. Lokalizace kortikálních granul, tak může být jedním z parametrů cytoplazmatické zralosti oocytů. Nedostatečná distribuce kortikálních granul již na počátku meiotického zrání, může významně ovlivnit efektivitu polyspermického bloku a mohla být jednou z příčin vysoké polyspermie při fertilizaci oocytů izolovaných v časně a střední luteální fázi (Hulinská et al., 2011). Efektivní využití této znalosti by mohlo zlepšit metody in vitro fertilizace prasat. Je však zapotřebí, ověřit zjištěné informace pomocí experimentů využívajících in vitro fertilizaci.

ZÁVĚR

Závěry našeho výzkumu ukazují, že se prasečí oocytů s rozdílnou meiotickou kompetencí liší v cytoplazmatické zralosti, a tím i ve schopnosti distribuce kortikálních granul k periferní části oocytu již na počátku meiotického zrání.

LITERATURA

Coy P., Gadea J., Romar R., Matás C., García E. (2002): The effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and in vitro development in the pig. *Reproduction*, 124: 279-288

Coy P., Grullón L., Cánovas S., Romar R., Matás C., Avilés M. (2008): Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, 135: 19-27

Coy P., Avilés M. (2010): What Controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. *Biological Reviews*, 85: 593-605

Hulinska P., Martecikova S., Jeseta M., Machatkova M. (2011): Efficiency of in vitro fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. *Animal Reproduction Science*, 124: 112-117

Gulayas B.J. (1980): Cortical granules of mammalian eggs. *Int Rev Cytol*, 63: 357-392

Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2008): Sexual maturity and reproductive phase of oocyte donor influence the developmental ability and apoptosis of cloned and parthenogenetic porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, 108: 107-121

Hyun SH., Lee GS., Kim DY., Kim HS., Lee SH., Kim S., Lee ES., Lim JM., Kang SK., Lee BC., Hwang WS. (2003): Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59: 1641-1649

Li Y., Ma W., Li M., Hou Y., Jiao L., Wang W. (2003): Reduced Polyspermic Penetration in Porcine Oocytes Inseminated in New In Vitro Fertilization (IVF) System: Straw IVF. *Biology of Reproduction*, 69: 1580-1585

Liu M. (2011): The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Liu Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 149

Machatkova M., Krausova K., Jokesova E., Tomanek M. (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, 61: 329-335

Machatkova M., Hulinska P., Horakova J., Reckova Z., Hanzalova K. (2008): Oestrous cycle stage influences the morphology and maturation of porcine oocytes in vitro. *Vet. Med.*, 53: 70-76

Romar R., Coy P., Gadea J., Rath D. (2005): Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 85: 287-300

Sawamukai K., Suzuki K., Ogawa H., Shimizu H., Mori T. (1998): Distribution of Cortical Granules in Porcine Oocytes Inseminated In Vitro at Various Times of Culture for Maturation In Vitro. *J. Mamm. Ova Res.*, 15: 139-145

Tahara M., Tasaka K. (2006): Mechanism and Control of Mammalian Cortical Granule Exocytosis. *J. Mamm. Ova Res.*, 23: 10-20

Wang W., Sun Q., Hosoe M., Shioya Y., Day BN. (1997): Quantified Analysis of Cortical Granule Distribution and Exocytosis of Porcine Oocytes during Meiotic Maturation and Activation. *Biology of Reproduction*, 56: 1376-1382

Ikeda K., Takahashi Y. (2003): Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil. Dev.*, 15: 215-221

Yoshida M., Cran DG., Pursel VG. (1993): Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 462-468

PROFILE COMPARISON OF ZINC-PROTEINS IN CANCER AND CONTROL PROSTATIC CELLS EXPOSED A ZN(II)

SROVNÁNÍ PROFILU ZINKOVÝCH PROTEINŮ NÁDOROVÝCH A KONTROLNÍCH PROSTATICKÝCH BUNĚK VYSTAVENÝCH ZN^(II)

Jílková E.¹, Křížková S.^{1,3}, Masařík M.^{1,2}, Kenšová R.¹, Adam V.^{1,3}, Kizek R.^{1,3}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: evajil@centrum.cz

ABSTRACT

The aim of this study is compare the profile of zinc-proteins level of potential tumour markers in the cell lines PC-3, LNCaP and PNT1A. Zinc plays an important role in the healthy prostatic tissue. It is necessary for the proliferation, differentiation, regulation and apoptosis of the cells. Prostatic healthy tissue accumulate zinc in the cells of the lateral lobes in the prostate. Cancer prostatic tissue loses this ability. Cell lines PC-3 and LNCaP represent prostate cancer and line PNT1A represent healthy and control prostate tissue. We have developed automatic and fast method of the isolation of zinc-proteins from prostatic cells by magnetic particles modified by specific antibody. Zinc was measured by the electrochemical method - differential pulse voltammetry. We determined 15% decreased level of zinc in prostate cancer patients than in the control healthy prostatic cells.

Key words: prostate cancer, Zn(II), metallothionein, magnetic particles, SDS- PAGE electrophoresis, electrochemistry

Acknowledgments: Support from IGA TP6/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Nádory prostaty patří mezi nejčastější nádorové onemocnění u mužů a také se řadí na druhé místo, co se týká souvislosti národového onemocnění a úmrtí (A.-S., 2011, Gumulec, a kol., 2011). V případě karcinomu prostaty dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk a k nárůstu objemu nádoru, jelikož dochází k selhání buněčné apoptózy (naprogramovaná smrt buněk). Výskyt karcinomu prostaty má mnoho zvláštností. Doposud není zcela objasněn mechanismus vzniku a šíření karcinomu, pravděpodobně má to tom podíl několik vlivů. Podmínkou vzniku karcinomu prostaty je přítomnost androgenů, mužských pohlavních hormonů (Rosenberg, a kol., 2010). V další řadě je to věk muže. U mužů nad 60 let je uváděn nález ložisek karcinomu prostaty až v 80 % a u mužů nad 80 let dokonce 95 %. Dále můžeme uvést genetické dispozice či etnický původ tyto faktory také pravděpodobně přispívají ke vzniku karcinomu prostaty Maligní nádorové onemocnění prostaty, se ve více jak 95 %, týká adenokarcinomu (Humphrey, 2012). Nejčastěji se vyskytující adenokarcinomy metastazují do lymfatického systému a do kostí. V současné době se k diagnostikování karcinomu prostaty používá několik metod vyšetření. Mezi nejčastější vyšetření, která vedou k podezření na karcinom prostaty je vyšetření per rectum a stanovení hladiny specifického antigenu (PSA) v séru (Barry, 2001, Dhanasekaran, a kol., 2001, Shearer, 1991). Dále se provádí histologická vyšetření, která potvrdí diagnózu a to biopsie prostaty a transrektální ultrasonografie (TRUS). Z nových studií, které se zabývaly hledáním nových markerů, které vedou ke včasné diagnostice rakoviny prostaty, bylo opakovaně prokázáno, že rakovinné buňky prostaty mají změněnou schopnost příjmu a akumulace zinkových iontů v porovnání se zdravými prostatickými buňkami (Costello a Franklin, 2000).

Zinek patří k prvkům s výraznou biologickou aktivitou. Tento prvek je důležitou esenciální živinou - je nezbytně nutný pro funkci některých enzymů a v nízkých koncentracích je přítomen ve všech (nebo většině) buněk (Stefanidou, a kol., 2006). Z lidského genomu 10 % kóduje proteiny, které váží ve své struktuře zinek (Andreini, a kol., 2006). Ionty zinku jsou nezbytné katalytické, strukturální a ko-katalytické komponenty mnohých proteinů a jsou také součástí řady enzymů (Auld, 2001, Gumulec, a kol., 2011). Zinek se váže na zinek-dependentní enzymy, nejčastěji se váže na doménu tzv. „zinkové prsty“. Tato doména obsahuje histidin a cystein obsahující repetice His₂Cys₂, každá tato repetice váže jeden zinečnatý ion. Zinkové prsty slouží k udržování terciární a kvarterní struktury těchto bílkovin (Kambe, a kol., 2004, Maret a Li, 2009). Ve zdravé prostatické tkáni hraje zinek důležitou roli v proliferaci, diferenciaci, regulaci a apoptózy buněk (Beyersmann a Haase, 2001). Ve zdravé a nádorové prostatické tkáni je intracelulární zinek chelátován četnými proteiny (nukleoproteiny, metaloenzymy, metaloproteiny, zejména metalothioneinem) (Colvin, a kol., 2010). Zinek se v prostatě vyskytuje v buňkách laterálních laloků. U pacientů s karcinomem

prostaty bylo prokázáno, nižší hladiny zinku v buňkách laterálního laloku, oproti buňkám zdravých jedinců. Bylo zjištěno, že u pacientů s karcinomem prostaty jsou v buňkách laterálního laloku tohoto orgánu hladiny zinku signifikantně nižší oproti normálním hodnotám (Kambe, a kol., 2004). Laterální lalok je také hlavním místem počátku rakovinného bujení a je charakteristický ztrátou akumulace zinku (Costello a Franklin, 2000).

Cílem práce bylo popsat rozdíly mezi zdravou prostatickou tkání a pokročilým nádorem prostaty ke vztahu k obsahu Zn^(II) v proteinech a sledování jejich elektroforetického profilu.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Buněčné linie PNT1A, PC-3, LNCaP byly zakoupeny od HPA, Salisbury, Velká Británie. Linie PC-3 jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastatického místa v kosti a LNCaP jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastatického místa v levé supraklavikulární uzlině. Linie PNT1A byla získána posmrtně ze zdravé prostatické tkáně. Další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Kultivace prostatických buněk

PNT1A buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s přidavkem 10 % FBS, PC-3 a LNCaP buňky v Ham F12 médiu s 7 % FBS. Všechna média byla obohacena o antibiotika, penicilin (100 U ml⁻¹) a streptomycin (0.1 mg . ml⁻¹). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C s 5 % CO₂.

MTT test

Před začátkem experimentů byl u všech linií proveden MTT test. Test je založen na viabilitě buněk v daném prostředí. Dle výsledků z MTT testu bylo určeno pět koncentrací Zn^(II), které byly poté použity při tvorbě buněčných lyzátů. U všech linií byly použity koncentrace 0, 25 a 50 μM. Dle výsledků MTT testů je zřejmé, že při těchto koncentracích buňky ještě rostly. K nakultivovaným

buňkám se tyto koncentrace Zn^(II) přidávají. Po dvou dnech působení byly z buněčných linií izolovány proteiny mechanickou homogenizací, tepelnou denaturací a dle Wisniewski (Wisniewski, a kol., 2009).

Příprava lyzátů

Buňky byly dvakrát propláchnuty 5 ml PBS zchlazeným na 0 °C a obsah byl odsát. K buňkám bylo přidáno PBS a škrabkou se buňky seškrábaly. Suspenze se přepipetovala do centrifugační zkušavky byla centrifugována 2700 ot./min, 4 °C, 7 minut. Poté se odsál supernatant, buňky se resuspendovaly v PBS a byly spočítány v Bürkerově komůrce. Poté se buňky opět centrifugovaly a supernatant se odsál. Buňky se resuspendovaly v 1 ml PBS a tato suspenze se přepipetovala do mikrozkušavky (Eppendorf 5402, Německo) a opět se centrifugovala. Supernatant byl odsát. V našem případě se dělaly tři druhy lyzátů – tepelný lyzát, sonikovaný lyzát a lyzát dle

(Wisniewski, a kol., 2009). V případě tepelného lyzátu se k buňkám přidá 75 μ l PBS a lyzuje se tři minuty. Poté se doplní objem PBS na konečných 200 μ l a zkumavka se vloží do termomixéru (Eppendorf 5430, Německo), ve kterém je 99 °C na 15 minut. Tepelnou úpravou se denaturují termolabilní a vysokomolekulární proteiny. Po tepelné úpravě se centrifuguje při 14 000ot/min., 4 °C, 30 minut. Supernatant (lyzát) se přepipetuje do čisté mikrozukavky. Při přípravě sonikovaného lyzátu se k buňkám přidá 200 μ l PBS a buňky se lyzují pomocí ultrazvukové jehly po dobu 2 minut.

Izolace Zn^(II) proteinů

Zn^(II) proteiny byly izolovány z lyzátu pomocí magnetizovatelných částic Dynabeads@MyOne™ tosylactivated (Invitrogen, Norsko) se specificky navázanou slepičí protilátkou vázající se na zinek. Postup modifikace magnetizovatelných částic slepičími protilátkami byl převzat z článku (Krizkova, a kol., 2012). Pro automatickou izolaci zinkových proteinů byl využit přístroj epMotion 5075 (Eppendorf, Německo).

Elektrochemické stanovení volného a vázaného Zn^(II)

Stanovení zinečnatých iontů bylo provedeno na přístroji 797 VA Stand, přístroj byl připojen k 813 kompaktnímu Autosampleru (Metrohm, Švýcarsko). Analyzátor (797 VA Computrace z Metrohm, Švýcarsko) využívá tradiční tříelektrodové zapojení. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm², referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Diferenční pulsní voltametrické měření byla provedena na základě těchto parametrů: probublávání argonem po dobu 90 s, počáteční potenciál -1,5 V, deposice 360 s, konečný potenciál; 0,75 V; pulzní amplituda 0,025 V, impulzní čas 0,04 s; krok potenciál 5,035 mV, doba kroku potenciál 0,3 s objem vstříkovaného vzorku 100 μ l, objem cely (2 ml) byl doplněn acetátovým pufrům 1900 μ l. Mineralizace vzorku se prováděla v mikrovlnném systému Multiwave 3000 (Anton-Paar GmbH). Do lahvičky MG5 se umístí 15 μ l vzorku s 350 μ l koncentrované kyseliny dusičné a 150 μ l H₂O₂. Takto připravený vzorek se uzavře a umístí do rotoru 64MG5 se zvoleným programem po dobu 50 minut (10 minut – 50W, 30minut – 100W, 10 minut – 0W). Po skončení mineralizace je provedeno stanovení koncentrace zinku postupu jako u vzorku nemineralizovaného.

Elektroforetická separace

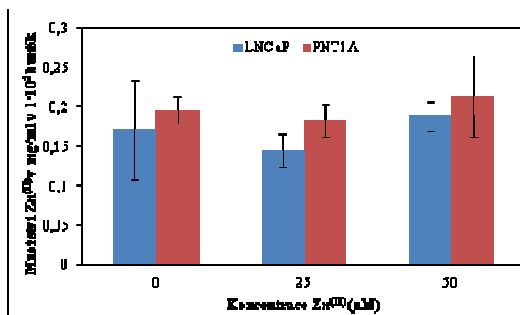
Izolované proteiny byly detekovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Elektroforéza byla provedena na aparatuře Mini Protean Tetra s gelem o rozměrech 8,3 x 7,3 cm (BioRad, USA). Koncentrace dělicího pufru byla 15 % (m/V) a koncentrace zaostřovacího gelu byla 5 % (m/V). Gely byly připraveny z 30% (m/V) zásobního roztoku akrylamidu a 1 % (m/V) bisakrylamidu. Polymerace gelů probíhala při pokojové teplotě po dobu 45 minut (dělicí gel) nebo 30 minut (zaostřovací gel). Před analýzou byly vzorky smíchány s nanášecím pufrům 2:1 a inkubovány při 93 °C po dobu 3 minut. Pro stanovení molekulové hmotnosti byl použit standard „Precision plus protein standards“ (Biorad, USA). Elektroforéza probíhala při 150 V podobu jedné hodiny při teplotě 23 °C (PowerBasicBiorad, USA) v Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-

diol) - glycinovém separačním pufru (0,025 M Trizma-base, 0,19 M glycin a 3,5 mM SDS, pH = 8,3). Poté byly gely obarveny barvivem Coomassie brilantová modř (Wong, a kol., 2000), a následně stříbrem (Krizkova, a kol., 2009) s vynecháním fixačního kroku (1,1 % (v/v) - kyselina octová, 6,4 % (v/v) methanol a 0,37 % (v/v) formaldehydu) a následujících dvou promývacích kroků (50 % (v/v) methanol).

VÝSLEDKY A DISKUZE

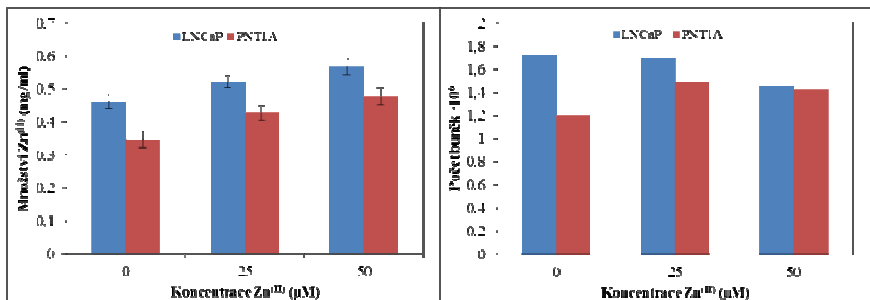
Modelem zdravé tkáně a kontrolní variantou je buněčná linie PNT1A, model tkáně karcinomu prostaty reprezentují buněčné linie PC-3 a LNCaP. U buněk všech linií byly stanoveny hladiny potenciálních markerů – obsah zinku v proteinech a metalothioneinu. Obsah $Zn^{(II)}$ byl stanoven metodou diferenční pulzní voltametrie ve dvou typech buněčných lyzátů – sonikovaném a dle (Wisniewski, a kol., 2009). Bylo zjištěno, že vhodnějším lyzátem pro stanovení množství $Zn^{(II)}$ v prostatických buňkách je použití sonikovaného lyzátu. Při použití lyzátu dle (Wisniewski, a kol., 2009) docházelo k interferenci lyzačních složek lyzačního roztoku především DTT. Obsah zinku byl dále stanoven jen u sonikovaných buněčných lyzátů. Z výsledků vyplývá, že obsah zinku v rakovinných prostatických buňkách byl v průměru o 15 % nižší než u zdravých prostatických buněk.

Obr. 1: Srovnání obsahu $Zn^{(II)}$ v lyzátech prostatických nádorových buněk (LNCaP) a zdravých prostatických buněk (PNT1A).



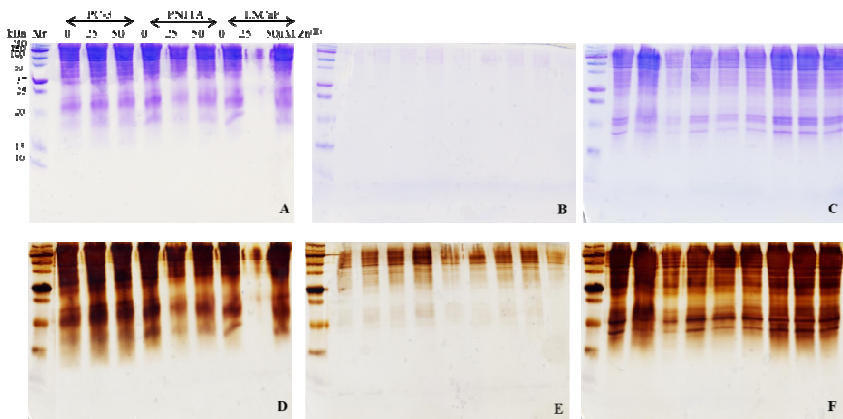
Dále bylo sledováno množství narostlých prostatických buněk při kultivaci v médiu obsahující různé koncentrace zinku. Nádorových prostatických buněk kultivovaných v médiu bez přidavku $Zn^{(II)}$ bylo o 43 % více než u zdravých buněk, při přidavku $Zn^{(II)}$ do kultivačního média byl sledován snižující se trend počtu nádorových prostatických buněk. Při vystavení nejvyšší koncentraci 50 μM $Zn^{(II)}$ byl počet rakovinných prostatických buněk vyšší jen o 2 % k zdravé variantě. V dalším kroku se sledovalo množství $Zn^{(II)}$ v kultivačním médiu po odebrání narostlých buněk. Obsah $Zn^{(II)}$ měl zvyšující se trend v závislosti na zvyšující se koncentraci $Zn^{(II)}$. Při srovnání výsledků obsahu $Zn^{(II)}$, kultivačního média zdravých a rakovinných buněk, lze říci, že zdravé prostatické buňky akumulovaly více $Zn^{(II)}$ z média než rakovinné buňky v průměru o 24 %.

Obr. 2 Srovnání růstu a akumulace $Zn^{(II)}$ prostatických nádorových buněk (LNCaP) a zdravých prostatických buněk (PNT1A). A) Množství $Zn^{(II)}$ v kultivačním médiu po odebrání buněk, B) počet prostatických buněk po kultivaci s $Zn^{(II)}$.



Buněčné lyzáty byly použity pro izolaci proteinů vázajících $Zn^{(II)}$. Tyto proteiny byly izolovány pomocí magnetizovatelných částic (MPs) se specificky navázanou protilátkou rozeznávající $Zn^{(II)}$. Z výsledků vyplývá, že se nám podařilo pomocí MPs izolovat zinek vázající proteiny a množství proteinů v lyzátu, eluátu a retentátu se výrazně nemění, což dokumentuje obr. 3.

Obr. 3 Elektroforetické stanovení Zn-proteinů v prostatických buňkách A-C) gely barveny Coomassie blue A) v lyzátu, B) v izolovaných Zn-proteinech pomocí MPs, C) v lyzátu po izolaci pomocí MPs; D-F) barveno stříbrem D) v lyzátu, E) v izolovaných Zn-proteinech pomocí MPs, F) v lyzátu po izolaci pomocí MPs.



ZÁVĚR

Byla provedena analýza obsahu $Zn^{(II)}$ u třech buněčných linií, kde linie PC-3 a LNCaP reprezentovaly karcinom tkáně a linie PNT1A zdravé prostatické tkáně byla použita jako kontrolní varianta. Byl porovnán obsah $Zn^{(II)}$ v sonikovaném lyzátu a v lyzátu dle (Wisniewski, a kol., 2009) metodou diferenční pulsní voltametrie. Dále byly vyizolovány pomocí magnetizovatelných částic proteiny vázající ve své struktuře zinek a to elektroforetickou separací – SDS-PAGE. Z našich výsledků vyplývá, že proteiny vázající zinek jsou jedním z potenciálních markerů, detekovatelných v prostatických buňkách. Byly porovnány výsledky obsahu $Zn^{(II)}$ v prostatických zdravých a nádorových buňkách. Bylo zjištěno, že s přibývajícím koncentrací $Zn^{(II)}$ přidaného do živného média rakovinných prostatických buněk klesá množství $Zn^{(II)}$ v buňkách oproti zdravým buňkám. Dále byla vyvinuta metoda pro rychlou izolaci proteinů obsahující zinek pomocí magnetizovatelných částic. Výsledky experimentální práce vykazují slibné výsledky, ale je potřeba ještě hodně experimentálních studií, aby se tento rakovinný marker mohl využívat i v běžné praxi.

LITERATURA

A.-S. G. (2011): Cancer de la prostate: les marques biologiques. *Medecine Nucleaire*, 35(373-377).

Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. (2006): Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1): 196-201.

Auld D. S. (2001): Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, 14(3-4): 271-313.

Barry M. J. (2001): Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 344(1373-1377).

Beyersmann D., Haase H. (2001): Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14(3-4): 331-341.

Colvin R. A., Holmes W. R., Fontaine C. P., Maret W. (2010): Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2(5): 306-317.

Costello L. C., Franklin R. B. (2000): The intermediary metabolism of the prostate: A key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, 59(4): 269-282.

Dhanasekaran S. M., Barrette T. R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K. J., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M. (2001): Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412(6849): 822-826.

Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. (2011): Insight to Physiology and Pathology of Zinc(II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry*, 18(33): 5041-5051.

Humphrey P. A. (2012): Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*, 60(1): 59-74.

Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. (2004): Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(1): 49-68.

Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Using of chicken antibodies for metallothionein detection in human blood serum and cadmium-treated tumour cell lines after dot- and electroblotting. *Electrophoresis*, 30(21): 3726-3735.

Krizkova S., Ryvolova M., Hynek D., Eckschlager T., Hodek P., Masarik M., Adam V., Kizek R. (2012): Immunoextraction of zinc proteins from human plasma using chicken yolk antibodies immobilized onto paramagnetic particles and their electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 33(12): 1824-1832.

Maret W., Li Y. (2009): Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 109(10): 4682-4707.

Rosenberg M. T., Froehner M., Albala D., Miner M. M. (2010): Biology and natural history of prostate cancer and the role of chemoprevention. *International Journal of Clinical Practice*, 64(13): 1746-1753.

Shearer R. J. (1991): Prostatic specific antigen. *British Journal of Urology*, 67(1): 1-5.

Stefanidou M., Maravelias C., Dona A., Spiliopoulou C. (2006): Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*, 80(1): 1-9.

Wisniewski J. R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5): 359-U60.

Wong C., Sridhara S., Bardwell J. C. A., Jakob U. (2000): Heating greatly speeds coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*, 28(3): 426-+.

OCCURENCE OF FISH MIGRATION IN THE FISHPASS AT BULHARY ON THE DYJE RIVER

VÝSKYT MIGRACE RYB RYBÍM PŘECHODEM BULHARY NA ŘECE DYJI

Klíma O.¹, Spurný P.¹, Lusk S.², Vítek T.¹

¹Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomic, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic

E-mail: xklima7@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The fishpass at Bulhary is a nature-like bypass channel. In the years 2008 and 2011 it was carried out a research based on 23 control electrofishings in the fishpass. A total of 6 166 individuals belonging to 34 species were found out. A reproductive migration in spring season was revealed in nase, chub, ide, vimba bream, barbel, white bream and bleak. Nase and chub find suitable conditions for spawning in the body of the fishpass. Rare species such as eel, dace, belica, gudgeon, white-finned gudgeon, schneider, zope, white-eye bream and bitterling also migrated via the fishpass. It was recorded downstream migration of fry of those species. The most abundant species was chub, ide, barbel, bleak and white bream. Aquatic invertebrates and also western tubenose goby colonized permanently fishpass as suitable habitat. The fishpass at Bulhary is passable for all species that occur in the Dyje R. under flow velocity up to $70 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Key words: bypass, reproductive migration, habitat, spawning, river continuum.

Acknowledgments: VaV-SPII2d1/9/07 „Biologické a ekologické nároky ryb – určující faktory funkčnosti rybích přechodů“.

ÚVOD

Přírozený charakter a průběh řek byl narušen různými vodohospodářskými úpravami pro potřebu lidské společnosti, např. odběry vody, výroba energie, plavba, regulační úpravy, ochrana proti záplavám aj. Každá z těchto úprav obvykle vyžaduje postavení různých příčných staveb ve vodním toku, jako jsou jízky, jezy, stupně, hráze a přehrady. Tyto stavby znamenají ve většině případů přerušování podélné kontinuity toku a znemožňují obousměrnou migraci vodní fauny, zejména ryb, pro něž jsou migrace nezbytnou podmínkou jejich rozšíření a v různé míře i podmínkou jejich existence. Příčné stavby vytvářejí migrační bariéry, fragmentují podélnou kontinuitu vodních toků, způsobují zánik částí vodních toků (přehradní jezera) a způsobují potamalizaci částí toků nad stupni (jezové zdrže) s následnou změnou původního rybního společenstva (Lusk 1999, Welcomme & Marmulla 2008, Lusk et al. 2011).

Znemožnění migrací v podélném profilu vodních toků je obzvláště příčinou vymizení anadromních druhů, jako je např. losos obecný *Salmo salar* L., který migroval na tření do povodí Labe a Odry. Znemožnění volného pohybu má negativní dopady i na populace sladkovodních druhů ryb. Příkladem může být snížení početnosti populací ostroretky stěhovavé *Chondrostoma nasus* (L.) a podoustve říční *Vimba vimba* (L.), pro něž jsou charakteristické reprodukční migrace na větší vzdálenosti. Migrační bariéry rovněž zabráňují obnově rozšíření původních říčních druhů, jako jsou např. drsek menší *Zingel streber* (Siebold, 1863), drsek větší *Zingel zingel* (L.), ostrucha křivočará *Pelecus cultratus* (L.) a ježdík žlutý *Gymnocephalus schraetser* (L.) v povodí řeky Moravy (Lusk & Holčík 1998). Fragmentace toků může z dlouhodobého hlediska nepříznivě působit na genetickou diverzitu. Narůstající zájem o ochranu biodiverzity způsobil také zvýšený zájem o obnovu migrační propustnosti vodních toků, např. Waidbacher & Haidvogel (1998), Baras & Lucas (2001), Lusk et al. (2011).

V rámci I. Akčního programu výstavby rybích přechodů bylo rozhodnuto o zprůchodnění toku Dyje od soutoku s Moravou až po hráz Novomlýnské nádrže VD Nové mlýny (Běle 1998, Dušek 1999). První dva stupně, Břeclav (ř.km 26,7) a Lednice (ř.km 35,6), byly zprůchodněny přírodním typem rybního přechodu, tzv. migrační rampou (Lusk 2006, Strouhalová 2010). Poslední migrační bariérou v tomto úseku byl pohyblivý jez Bulhary (ř.km 39,87), který byl zprůchodněn přírodním typem rybního přechodu ve formě obtokového koryta, souběžně se stavbou malé vodní elektrárny. Rybní přechod byl uveden do provozu v listopadu 2007.

Cílem práce je zjistit výskyt a migrace ryb rybním přechodem Bulhary na řece Dyji. Zjistit migrační aktivitu ryb v jednotlivých ročních obdobích s důrazem na aspekt tzv. třecích migrací, využití rybního přechodu jednotlivými druhy ryb a v rámci druhu i jednotlivými velikostními skupinami. Zjistit

případný dlouhodobý výskyt ryb v rybím přechodu. Vyhodnotit funkčnost rybího přechodu z hlediska migrační propustnosti v průběhu roku.

MATERIÁL A METODIKA

Rybí přechod (RP) Bulhary byl postaven v pravobřeží u jezu Bulhary za objektem malé vodní elektrárny (MVE) a protipovodňovými hrázemi. Jedná se o přírodě blízký typ rybího přechodu v podobě obtokového koryta (bypass). Do provozu byl uveden v listopadu roku 2007. MVE má dvě turbíny o maximální hltnosti $30,6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. V nátku do MVE jsou nainstalovány elektrické zábrany a hrubé česle. Celková délka RP je 210 m, podélný sklon 1:56 a průtok vody je okolo $2 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. U vstupu a výstupu z RP se nachází stavidla s elektromotorickým pohybovacím mechanismem pro regulaci průtoku RP při kontrole technického stavu a případné uzavření RP při povodňových průtocích. Vstup do RP je situován pod výtokem z MVE a výstup do horní vody je nad nátokem vody na MVE. Přibližně ve $\frac{3}{4}$ délky tělesa RP nad přepážkou č. 19 ústí do trasy přechodu voda z přilehlého ramene řeky Dyje, které bylo před regulacemi částí původního koryta. Těleso RP má tvar kanálu s lichoběžníkovým příčným profilem se šířkou ve dně minimálně 4,0 m a u hladiny přibližně 6,0 m. Břehy přechodu jsou zpevněny kamenným záhozem. V trase RP je 30 příčných přepážek a v přípojce do přilehlého ramene jsou tři. Jednotlivé přepážky jsou tvořeny z velkých balvanů upevněných v betonu, velikost mezer mezi balvany se pohybuje od 0,20 do 0,90 m. Před každou přepážkou a za přepážkou jsou umístěny do betonu středně velké kameny pro rozbití proudu. Vytvořené bazénky mezi přepážkami mají hloubku vody 0,8 m, průtočný profil bazénku je cca $0,8 \times 5,0$ m. Rychlost proudu v bazéncích dosahuje hodnot $0,5 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Rozdíl hladin mezi navazujícími bazénky je 0,10 – 0,20 m. Celkový počet bazének je 27. Dno tělesa RP je pokryto hrubým říčním štěrkem a menšími kameny.

Ichtyologický monitoring probíhal v letech 2008 a 2011 vždy v rámci kontroly provozního stavu stavby a údržby RP.

Kontrola výskytu ryb v RP byla prováděna za pomoci elektrolovu za účasti minimálně tří pracovníků. K elektrolovu byl použit benzinový agregát typu ZB6 české výroby. Před začátkem každého šetření byl snížen průtok vody na cca $0,5 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ za pomoci stavidla u nátku do rybího přechodu. Tímto úkonem bylo zamezeno úniku ryb v jednotlivých bazéncích. Elektrolov byl vždy prováděn proti proudu od spodní části tělesa rybího přechodu po jednotlivých bazéncích. Odlovené ryby byly soustředěny v haltýři, který byl držen v přiměřené hloubce vody a v bezpečné vzdálenosti od působení elektrického proudu.

Po průchodu 1 – 3 bazének byly odlovené ryby určeny dle druhu a stanovena byla rovněž jejich délka (standard length SL v mm). Změřené ryby byly šetrně puštěny zpět do vody v již prolovených bazéncích. Po skončení průzkumu byl vždy obnoven průtok v rybím přechodu zvednutím stavidla na původní cca $2 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Průtoky a teplota vody byly získány od vodoměrné stanice „Nové Mlýny“. Průtoky v přechodu a v mezerách mezi kameny v přepážkách byly měřeny za pomoci digitálního průtokoměru SPEED AR 2000, výroba USA.

Získaná data byla zpracována a analyzována za použití programu Microsoft Office Excel 2003, Canoco for Windows verze 4.5 a Origin 8.0.

VÝSLEDKY

Celkem bylo provedeno 23 terénních sledování: 10 kontrol v roce 2008 a 13 kontrol v roce 2011. Při všech kontrolních šetřeních se ryby vyskytovaly po celé trase RP, nikde nebylo pozorováno větší shromáždění ryb pod přehrádkami z důvodu jejich neprůchodnosti. Vizually byl pozorován výstup ryb z RP do nadjezí. Celkem byla zjištěna přítomnost 6 166 jedinců náležející k 34 druhům ryb. Nejvíce byly zastoupeny druhy plotice obecná *Rutilus rutilus* (L.), jelec tloušť *Squalius cephalus* (L.), jelec jesen *Leuciscus idus* (L.), bolen dravý *Aspius aspius* (L.), ostroretka stěhovavá, parma obecná *Barbus barbus* (L.), ouklej obecná *Alburnus alburnus* (L.), cejnek malý *Blicca bjoerkna* (L.), karas stříbrný *Carassius auratus* (L.), mník jednovoušý *Lota lota* (L.) a okoun říční *Perca fluviatilis* L., které využívaly RP k migraci z podjezí do nadjezí, případně k dočasnému pobytu. Hlavačka mramorovaná *Proterorhinus semilunaris* (Heckel, 1837) našla v přechodu vhodné životní prostředí a proto se zde vyskytovala stabilně po celý rok. Vedle dalších 13 druhů, jako např. štika obecná *Esox lucius* L., sumec velký *Silurus glanis* L. a candát obecný *Sander lucioperca* (L.), byla zjištěna také přítomnost druhů, vyskytujících se v této lokalitě vzácně: úhoř říční *Anguilla anguilla* (L.) (převážně velké exempláře), ouklejka pruhovaná *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782), hrouzek běloploutvý *Romanogobio albipinnatus* (Lukasch, 1933), hrouzek obecný *Gobio gobio* (L.), cejn siný *Ballerus ballerus* (L.), cejn perleťový *Ballerus sapa* (Pallas, 1814), pstruh obecný *Salmo trutta* L., hořavka duhová *Rhodeus amarus* (Bloch, 1782), jelec proudník *Leuciscus leuciscus* (L.) a slunka obecná *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843).

Početnost jednotlivých druhů v RP se měnila v jednotlivých kontrolních odlovech i v jednotlivých letech (součtové údaje). V roce 2008 byly nejpočetněji zastoupeny druhy ouklej obecná, hlavačka mramorovaná, jelec tloušť a parma obecná. V roce 2011 byly nejpočetnějšími druhy jelec jesen, jelec tloušť, cejnek malý a plotice obecná. Průtoky a teplota se v obou letech statisticky nelišily.

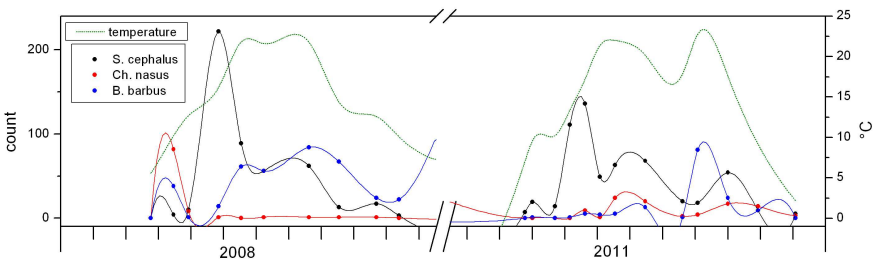
V přechodu se vyskytovaly různé věkové kategorie jednotlivých druhů ryb (tab. 1). Tohoroční se vyskytovali uvnitř přechodu v období pozdního léta a podzimu a roční v jarním období. Pravděpodobně se jednalo o poproudovou migraci, čemuž nasvědčuje hojný výskyt tohoročků při šetření 29. září 2011, jednalo se o jelce tlouště, jelce jesena, parmu obecnou a bolena dravého.

Tab. 1: Počet ulovených ryb v jednotlivých věkových kategoriích u vybraných druhů ryb. Velikostní intervaly věkových kategorií jsou uvedeny v mm SL dle Baruš & Oliva (1995).

Druh	2008			2011		
	roční	juvenilové	adultní	roční	juvenilové	adultní
Jelec tloušť	0	0	476	17 (< 80)	41 (80-130)	511 (>130)
Jelec jesen	4 (< 90)	5 (90-145)	57 (>145)	23	45	582
Bolen dravý	9 (< 85)	43 (85-245)	3 (>245)	36	64	0
Ostroretka stěhovavá	0 (< 80)	2 (80-170)	93 (>175)	0	75	19
Parma obecná	1 (< 70)	3 (70 - 130)	363 (>130)	9	8	127

V době rozmnožování byly ve vysokých počtech loveny ostroretka stěhovavá, parma obecná, jelec jesen, jelec tloušť, podoustev říční, ouklej obecná a cejnek malý. Ostroretka stěhovavá a jelec tloušť se aktivně v přechodu vytírali, což bylo prokázáno nálezem jiker v přechodu (Klíma et al. 2009). Začátek třecích migrací závisí na průběhu teploty vody (obr. 1). V dubnu proběhly migrace ostroretky stěhovavé, jelce jesena, podoustev říční a samců parmy obecné. U jelce tlouště a jelce jesena se třecí migrace vyskytovala v květnu. V červnu proběhla migrace za reprodukci u parmy obecné, oukleje obecné a cejnika malého.

Obr. 1: Migrace druhů jelce tlouště, ostroretky stěhovavé a parmy obecné RP Bulhary v průběhu let 2008 a 2011 v závislosti na teplotě vody (count udává počet ulovených ryb při kontrolním odlovu).



Podzimní snížení teploty vyvolalo u parmy obecné, podoustve říční, okouna říčního, plotice obecné, ostroretky stěhovavé, jelce tlouště, jelce jesena a oukleje obecné migrace do stanoviště pro přezimování.

Negativní dopad na funkčnost RP mají vysoké průtoky (nad $70 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) v korytě řeky Dyje vyskytující se v časných jarních měsících. Za uvedené sledované období vznikl tento stav 25. března v roce 2011. Při těchto zvýšených průtocích dochází ke zvýšení hladiny pod stupněm a ke zpětnému vzduť hladiny i ve spodní části tělesa RP. Důsledkem tohoto stavu je zánik vábíčního proudu, který slouží rybám k nalezení cesty ke vstupu do RP. V tento den bylo uloveno pouze 191 jedinců.

DISKUZE

Rybí přechod Bulhary umožňuje migraci zejména pro reofilní druhy ryb, obohacuje regulovaný tok o nový biotop pro výtěr ryb a pro ostatní vodní faunu. Tyto poznatky jsou v souladu s výsledky dalších autorů zabývajících se podobnými RP přirozeného charakteru, např. Steiner (1998), Gebler (1998), Parasiewicz et al. (1998).

Hlavním činitelem ovlivňující výskyt ryb v RP byla teplota vody (obr. 1). Počet ryb se zvyšoval se stoupající teplotou vody od $7 \text{ }^\circ\text{C}$ v jarním období. Prchalová et al. (2010) uvádí v RP na Labi zvyšování početnosti ryb od $6 \text{ }^\circ\text{C}$. S poklesem teploty vody v podzimním období se snižuje migrační aktivita ryb a tedy i výskyt ryb v RP (Prchalová & Slavík 2004, Lusk 2008).

Třecí migrace probíhaly v RP Bulhary od dubna do počátku června a jsou ve shodě s pozorováním z obdobných poměrů, např. Lelek & Libosvářský (1960) pro oblast Dyje, Prchalová & Slavík (2004) a Prchalová et al. (2010) pro oblast dolní Labe. Na níže ležící části Dyje zjistil Lusk (2006) v přechodě Břeclav reprodukční migrace u cejna velkého *Abramis brama* (L.), cejna siného a karase stříbřitého. V přechodě Bulhary nebyly u těchto druhů tyto migrace pozorovány. Zde je nutné uvést, že tok pod RP v Břeclavi je bez výrazné úpravy. Ostroretka stěhovavá vykonává třecí migrace s nástupem teplot k hodnotě $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lelek & Peňáz 1963, Lusk 1967, Maier 1997, Prignon et al. 1998). U parmy obecné je známé, že samci vykonávají dřívější migrační tah na trdlišť než samice (Baras et al. 1994, Lucas & Batley 1996). Tento poznatek byl na RP Bulhary potvrzen. V dolním toku Dyje dochází k reprodukčním migracím u oukleje obecné v období květen a červen (Lelek & Peňáz 1963, Lusk 2006), v přechodu Bulhary tento druh migroval za třením pouze v červnu.

Zvýšený počet ryb v RP Bulhary v podzimním období (září – říjen) byl pravděpodobně vyvolán potřebou hledání vhodného stanoviště pro přezimování. Obdobnou aktivitu pozorovali Prchalová & Slavík (2004) a Prchalová et al. (2010) na dolním toku Labe v období srpen – říjen. Snížení teploty pod $10 \text{ }^\circ\text{C}$ způsobuje zastavení migrace ryb a snížení počtu ryb v RP Bulhary ve shodě s Prchalová et al. (2010).

ZÁVĚR

Rybí přechod Bulhary splňuje všechny podmínky kladené na RP z hlediska funkčnosti. Je prostupný pro všechny druhy ryb a jejich velikostní kategorie v toku Dyje. Umožňuje vykonávat reprodukční migrace následujícím druhům: ostroretka stěhovavá, parma obecná, jelec jesen, jelec tlušť, podoustev říční, ouklej obecná a cejnek malý. Vytváří vhodné podmínky pro výtěr reofilních druhů ryb uvnitř přechodu a zároveň vhodný biotop pro růst ryb. Vhodné životní prostředí k trvalému životu uvnitř přechodu našla hlavačka mramorovaná. Jedinou nevýhodou je, že při průtocích v toku Dyje nad 70 m³.s⁻¹ dochází k vyrovnání hladin v podjezí se spodním úsekem přechodu a zániku vábíčního proudu sloužící k orientaci ryb ke vstupu do RP.

LITERATURA

Baras E., Lambert H., Philippart J. C. (1994): A comprehensive assessment of the failure of *Barbus barbus* spawning migrations through a fish pass in the canalized River Meuse (Belgium). *Aquat. Living Resour.*, 7: 181-189.

Baras E., Lucas M.C. (2001): Impacts of man's modifications of river hydrology on the migration of freshwater fishes: a mechanic perspective. *Ecohydrology & hydrobiology*, 3: 291-304.

Baruš V., Oliva O. (eds) a kol. (1995): Mihulovci Petromyzontes a Ryby Osteichthyes (2). *Fauna ČR a SR*, Academia, Praha, 698 s.

Běle J. (1998): Návrh Akčního plánu výstavby rybích přechodů pro významné tažné druhy ryb na vybraných vodních tocích v ČR. Ministerstvo životního prostředí, Praha.

Dušek M. (1999): Akční plán stavby rybích přechodů pro významné tažné druhy ryb na vybraných vodních tocích v ČR. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 32 s.

Gebler R. J. (1998): Examples of Near-natural Fish Passes in Germany: Drop Structure Conversions, Fish Ramps and Bypass Channels, s 403-420. In: Jungwirth M., Schmutz S. & Weiss S. (eds.): *Fish migration and fish bypasses*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 438 s.

Klíma O., Lusk S., Lusková V. (2009): První rok provozu rybího přechodu v profilu Bulhary na řece Dyji, s. 59-64. In: Kopp R. (ed.): 60 let výuky rybářské specializace na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně: sborník referátů z konference s mezinárodní účastí konané v Brně 2. a 3. prosince 2009. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, oddělení rybářství a hydrobiologie, Brno, 185 s.

Lelek A., Libosvářský J. (1960): Výskyt ryb v rybím přechodu na řece Dyji při Břeclavi. *Zoologické listy*, 9: 293-308.

Lelek A., Peňáz M. (1963): Tření ostroretky stěhovavé *Chondrostoma nasus* (L.) v Brumovce. *Zool. listy*, 12: 121-134.

Lucas M. C., Batley E. (1996): Seasonal movements and behaviour of adult barbel *Barbus barbus*, a riverine cyprinid fish: implications for river management. *Journal of Applied Ecology*, 33: 1345-1358.

Lusk S. (1967): Population dynamics of *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) in the Rokytná River. *Acta Sc. Nat. Brno*, 1 (12): 473-522.

Lusk S. (1999): Vliv přehrad a údolních nádrží na diverzitu ichtyofauny České republiky. *Bulletin VÚRH Vodňany*, 35: 13-22.

Lusk S. (2006): Zpráva o sledování a vyhodnocení funkčnosti rybího přechodu na jezu Břeclav v ř.km 26,7 řeky Dyje v průběhu roku 2006. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno, 24 s.

Lusk S. (2008): Rybí přechod Bulhary na řece Dyji. Zpráva o technickém stavu a funkčnosti rybího přechodu, Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno, 9 s.

Lusk S., Hartvich P., Lojkásek B., Lusková V. (2011): Migrace ryb a migrační prostupnost vodních toků. *Biodiverzita ichtyofauny ČR*, 8: 5-67.

Lusk S., Holčík J., (1998): Význam bezbariérového spojení říčního systému Moravy a Dyje na území České republiky Dunajem. *Biodiverzita ichtyofauny ČR*, 2: 69-83.

Maier J. K. (1997): On the nase, *Chondrostoma nasus* spawning area situation in Switzerland. *Folia Zool.*, 46 (1): 79-87.

Parasiewicz P., Eberstaller J., Weiss S., Schmutz S., (1998): Conceptual guidelines for nature-like bypass channels, s. 348-362. In: Jungwirth M., Schmutz S. & Weiss S. (eds.): *Fish migration and fish bypasses*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 438 s.

Prchalová M., Horký P., Slavík O., Vetešník L., Halačka K. (2010): Výskyt ryb v rybím přechodu vzhledem k teplotě vody, průtoku, atmosférickému tlaku a počasí, s. 24. In: Vykusová B. & Dvořáková Z. (eds): XII. Česká ichtyologická konference. Vědecká konference s mezinárodní účastí pořádaná v rámci XX. Vodňanských rybářských dnů 19.–20. 5. 2010, Vodňany. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vodňany, 63 s.

Prchalová M., Slavík O. (2004): Testování účinnosti nového rybího přechodu ve Střekově na řece Labi, s. 189-193. In: Vykusová B. (ed.): VII. Česká ichtyologická konference sborník příspěvků z odborné konference s mezinárodní účastí pořádané ve Vodňanech 6.–7. 5. 2004 v rámci XIV. Vodňanských rybářských dnů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Vodňany, 301 s.

Prignon C., Micha J. C., Gillet A. (1998): Biological and Environmental Characteristics of Fish Passage at the Tailfer Dam on the Meuse River, Belgium, s 68-84. In: Jungwirth M., Schmutz S. & Weiss S. (eds.): *Fish migration and fish bypasses*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 438 s.

Steiner H. A. (1998): Fish Passes at Run-of-river Hydropower Plants of the Verbund, s. 420-434. In: Jungwirth M., Schmutz S. & Weiss S. (eds): *Fish Migration and Fish Bypasses*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 438 s.

Strouhalová I. (2010): Rybí přechod pomůže rybám na Dyji s rozmnožováním. Online [cit. 2011-02-24]. Dostupné na: http://brno.idnes.cz/rybi-prechod-pomuze-rybam-na-dyji-s-rozmnozovanim-fsr-/brno-zpravy.aspx?c=A101105_1478262_brno-zpravy_trr.

MENDELNET 2012

Waidbacher H. G., Haidvogel G. (1998): Fish Migration and Fish Passage Facilities in the Danube: Past and Present, s. 85-98. In: Jungwirth M., Schmutz S. & Weiss S. (eds): Fish Migration and Fish Bypasses. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 438 s.

Welcomme R. L., Marmulla G. (2008): Preface. Hydrobiologia, 609: 1-7.

THE IMPACT OF NONYLPHENOL (NP) ON THE SPERMATOZOA MOTILITY *IN VITRO*

VPLYV NONYLPHENOLU (NP) NA POHYBLIVOSŤ SPERMIÍ *IN VITRO*

Lukáčová J., Kňažická Z., Tvrdá E., Lukáč N., Massányi P.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: jana312@gmail.com

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the dose- and time-dependent effect of nonylphenol (NP) (1, 10, 100 and 200 µg/mL) dissolved in 0.1% ethanol (ETOH) on the motility and progressive motility of bovine spermatozoa during several time periods (0 h, 2 h, 4 h and 6 h). The spermatozoa motility was determined by CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system using the Sperm Vision™ program. The results showed a decreased spermatozoa motility in all experimental groups with the addition of NP. Significant differences ($P < 0.001$ and $P < 0.05$) between the control group and the experimental groups were recorded. The lowest spermatozoa motility was found at doses > 100 µg/mL of NP in comparison to the control group. The data obtained from our study indicate that the exposure to high doses of NP has the negative effect on spermatozoa motility.

Key words: endocrine disruptors, 4-*n*-nonylphenol, bovine spermatozoa, CASA system

Acknowledgments: This work was supported by the Scientific Agency of the Slovak Republic VEGA No. 1/0532/11.

INTRODUCTION

Nonylphenol (NP) is a toxic xenobiotic compound classified as an endocrine disruptor capable of interfering with the hormonal system of numerous organisms. It originates principally from the degradation of nonylphenol ethoxylates (Soares *et al.*, 2008).

NP is used in industrial and household detergents, cosmetic products and spermicides (Gong and Han, 2006). NP can interfere with reproduction in fish, reptiles and mammals, and induce the cell death in gonads and changes to other reproductive parameters (Nagao *et al.*, 2001; Cardinali *et al.*, 2004).

NP poses a threat to the health and reproduction of mammalian species through direct intake of NP with various food products. NP is able to act as endocrine disruptor and cause adverse reproductive effects in mammals (Hughes *et al.*, 2000).

NP profoundly impairs testicular function as evidenced by reduced testis size (Chitra *et al.*, 2002), low circulating testosterone, disturbed testicular structure and suppressed spermatogenesis (Nagao *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003; Cardinali *et al.*, 2004).

NP influences an increasing incidence of testicular cancer during the past decades, as well as an increase in occurrence of cryptorchidism and hypospadias (Carlsen *et al.*, 1995; Toppari *et al.*, 1996).

NP can induce apoptosis in rat testicular cells, particularly in Sertoli cells by inhibiting the Ca²⁺ pump in the endoplasmic reticulum. Low micromolar concentration of NP induces testicular oxidative stress and cytotoxicity *in vitro* (Gong *et al.*, 2009).

The objective of this study was to determine the effect of various concentrations of nonylphenol dissolved in 0.1% ethanol (ETOH) during several time periods (0 h, 2 h, 4 h and 6 h) on the motility and progressive motility of bovine spermatozoa.

MATERIAL AND METHODS

Semen samples and *in vitro* culture

Bovine semen samples were obtained from 10 adult breeding bulls (Slovak Biological Services, Nitra, Slovak Republic). The samples had to accomplish the basic criteria given for the corresponding breed. After collecting the samples were stored in the laboratory at room temperature (22-25°C). Each sample was diluted in physiological saline solution (PS) (sodium chloride 0.9% w/v, Bieffe Medital, Grosotto, Italia), using a dilution ratio of 1:40, depending on the original spermatozoa concentration.

Spermatozoa were incubated with various concentrations of nonylphenol (4-*n*-NP; Fluka, Buchs, Switzerland) dissolved in 0.1% ethanol (ETOH, Sigma-Aldrich, Bratislava, Slovak Republic) (group A – 1; B – 10; C – 100; D – 200 µg/mL of NP). The control (Ctrl) group was cultured with physiological saline solution.

Spermatozoa were cultivated in the laboratory at room temperature (22-25°C). The control group (medium without NP) was compared to the experimental groups (exposed to different concentrations of NP).

Computer-assisted semen analysis (CASA)

The motility analysis was carried out using a CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system – SpermVision™ program (MiniTüb, Tiefenbach, Germany) with the Olympus BX 51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at cultivation times 0 h, 2 h, 4 h and 6 h.

Each sample was placed into the Makler Counting Chamber (deph 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Izrael) and the following parameters were evaluated: percentage of motile spermatozoa (motility > 5 µm/s; MOT) and percentage of progressive motile spermatozoa (motility > 20 µm/s; PROG). This study was performed in ten replicates at each concentration (n = 10). At least 1000 spermatozoa were analyzed in each sample.

Statistical analysis

Obtained data were statistically analyzed using PC program GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, California, USA). Descriptive statistical characteristics (mean, minimum, maximum, standard deviation and coefficient of variation) were evaluated. One-way analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett's multiple comparison test were used for statistical evaluations. The level of significance was set at *** ($P < 0.001$); ** ($P < 0.01$) and * ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

NP is one of the most abundant alkylphenolpolyethoxylate derivatives (APE) and can stay biologically active for a longer period of time in the body than endogenous estrogens (Nimrod and Benson, 1996). NP profoundly impairs testicular function as evidenced by reduced testis size (de Jager *et al.*, 1999), disturbed testicular structure and suppressed spermatogenesis (Nagao *et al.*, 2001; Cardinali *et al.*, 2004) and can induce Sertoli cell apoptosis (Gong *et al.*, 2009) and oxidative stress in rats (Gong and Han, 2006).

Evaluation of bovine spermatozoa motility exposed to NP dissolved in 0.1% ETOH

Evaluation of the percentage of spermatozoa motility showed slightly decreased values in all doses of NP dissolved in 0.1% ETOH compared to the control (Ctrl) group during time 0 h of *in vitro* cultivation. The results are shown in the Table 1. In this time, the lowest spermatozoa motility was recorded in the groups B and C ($P < 0.05$) and the group D ($P < 0.001$) with the doses of NP

MENDELNET 2012

(10 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL) in comparison to the control group (89.30%; 87.89% and 87.30% versus 92.26%).

The decreased spermatozoa motility was found in all experimental groups in comparison with the control group after 2 h of cultivation and significant differences ($P<0.05$ and $P<0.001$) were found between the groups C and D and the control group (81.80% and 79.70% versus 87.06%).

After 4 h of cultivation was found, that the spermatozoa motility was also significantly decreased in the groups B ($P<0.05$), C and D ($P<0.001$).

After 6 h of *in vitro* cultivation a decrease of motility in all experimental groups in comparison to the control group was found. A significant decrease of spermatozoa motility ($P<0.05$ and $P<0.001$) was found in the groups C and D.

Tab. 1 Bovine spermatozoa motility (MOT; %) exposed to NP dissolved in 0.1% ETOH in various time periods (Lukáčová et al., 2012)

Groups	Control Ctrl	1 A	10 B	100 C	200 D
µg/mL of NP					
Time 0					
x	92.26	91.91	89.30 ^C	87.89 ^C	87.30 ^A
minimum	88.16	80.82	75.75	66.66	71.24
maximum	97.14	98.26	98.36	97.67	93.39
S.D.	2.50	3.88	5.69	7.66	4.05
CV (%)	2.72	4.23	6.38	8.72	4.64
Time 2					
x	87.06	86.63	83.17	81.80 ^C	79.70 ^A
minimum	75.00	74.41	61.70	65.21	52.63
maximum	95.65	95.00	98.96	95.74	88.88
S.D.	5.79	5.59	8.91	8.84	10.72
CV (%)	6.65	6.45	10.71	10.80	13.45
Time 4					
x	83.37	82.19	76.63 ^C	73.25 ^A	69.18 ^A
minimum	65.38	69.56	55.26	45.00	41.17
maximum	93.75	92.13	93.47	89.41	85.40
S.D.	8.37	5.88	11.60	14.47	13.91
CV (%)	10.04	7.15	15.13	19.75	20.10
Time 6					
x	74.74	72.19	69.23	66.56 ^C	60.76 ^A
minimum	52.94	47.82	42.85	36.66	50.00
maximum	89.04	93.02	83.52	87.27	77.61
S.D.	9.49	11.83	11.14	13.02	8.41
CV (%)	12.70	16.39	16.09	19.56	13.84

Legend: x – mean, SD – standard deviation, CV (%) – coefficient of variation

^A $P<0.001$; ^B $P<0.01$; ^C $P<0.05$

MENDELNET 2012

An identical decrease of spermatozoa motility was determined also for the percentage of progressive motile spermatozoa during all time periods. The results are shown in the Table 2. In 0 h of cultivation, the lowest spermatozoa motility was found in the groups B and C ($P<0.05$) and the group D ($P<0.001$) using the doses of NP (10 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$; 200 $\mu\text{g/mL}$) in comparison with the control group.

The decreased progressive motility was also recorded in all experimental groups in comparison with the control group after 2 h of *in vitro* cultivation and significant difference ($P<0.05$) was found between the group D and the control group (76.83% versus 86.13%).

After 4 h of cultivation was found, that the progressive motility was also significantly decreased in the groups C and D ($P<0.001$).

After 6 h of *in vitro* cultivation a significant decrease of progressive spermatozoa motility ($P<0.05$ and $P<0.001$) was found in the groups C and D.

Tab. 2 Bovine progressive spermatozoa motility (PROG; %) exposed to NP dissolved in 0.1% ETOH in various time periods

Groups	Control Ctrl	1 A	10 B	100 C	200 D
$\mu\text{g/mL}$ of NP					
Time 0					
x	90.31	88.85	86.59 ^C	84.48 ^C	83.21 ^A
minimum	87.28	80.32	52.30	66.66	62.21
maximum	93.46	92.56	97.62	94.76	92.30
S.D.	2.85	3.78	9.26	7.52	8.88
CV (%)	2.75	3.91	9.66	8.26	6.72
Time 2					
x	86.13	84.25	81.31	78.96	76.83 ^C
minimum	72.08	71.21	65.15	52.00	49.35
maximum	96.36	94.90	93.00	93.85	93.12
S.D.	4.70	6.45	6.26	9.31	12.62
CV (%)	11.36	7.86	16.34	29.54	20.47
Time 4					
x	80.73	79.91	73.54	71.25 ^A	67.85 ^A
minimum	55.66	60.20	53.02	48.33	44.21
maximum	93.45	91.04	87.98	91.31	84.94
S.D.	8.31	7.81	11.28	19.31	14.26
CV (%)	6.65	7.29	8.51	11.72	12.28
Time 6					
x	72.62	70.32	67.77	64.32 ^C	57.93 ^A
minimum	65.35	59.47	59.01	49.99	56.21
maximum	83.23	81.02	81.48	88.49	79.06
S.D.	5.75	16.40	14.35	10.43	10.84
CV (%)	7.71	16.79	12.62	13.20	10.76

Legend: x – mean, SD – standard deviation, CV (%) – coefficient of variation

^A $P<0.001$; ^B $P<0.01$; ^C $P<0.05$

The obtained data indicate, that NP has an inhibitory effect on spermatozoa motility. These findings of our experiment confirm the studies of **Uguz *et al.* (2008, 2009)** that examined the effect of NP (1, 10, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on epididymal rat spermatozoa during various time periods (0 h, 1 h, 2 h, 3 h and 4 h) and recorded that exposure to a dose $> 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ of NP has detrimental effect on motility of rat spermatozoa. Our experiment indicates similar results at doses 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nonylphenol on the motility of bovine spermatozoa.

Dakdoky and El-Helal (2007) found that a daily dose of 21.25 mg/kg of NP decreased significantly mouse spermatozoa motility for 35 days.

Chitra *et al.* (2002) demonstrated, that nonylphenol administered at dose $> 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ for 45 days significantly decreased rat epididymal spermatozoa count.

De Jager *et al.* (1999) tested the influence of NP at doses 100, 250 and 400 mg/kg and reported that the dose 250 mg/kg of NP had effect on spermatogenesis, while the dose 400 mg/kg of NP impaired testicular mass and sperm count in adult rats.

CONCLUSION

The data obtained from this *in vitro* study describe the dose- and time-dependent effect of NP on the motility and progressive motility of bovine spermatozoa. Our results support the idea, that higher doses of NP ($>100 \mu\text{g NP}/\text{ml}$) dissolved 0.1% ETOH negatively influence the spermatozoa motility. The data obtained from our study can contribute to better understanding the mechanism of NP action not only on the spermatozoa count and motility but also on the male reproductive system.

REFERENCES

- Cardinali M., Maradonna F., Olivotto I., Bortoluzzi G., Mosconi G., Polzonetti-Magni A. M., Carnevali O. (2004): Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, 18: 597-604.
- Carlsen E., Gliwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E. (1995): Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environmental Health Perspectives*, 103: 137-9.
- de Jager C., Bornman M. S., van der Horst G. (1999): The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia*, 31: 99-106.
- El-Dakdoky M. H., Helal M. A. (2007): Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79: 188-191.

Gong Y., Han X. D. (2006): Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive toxicology*, 22: 623-630.

Gong, Y., Wu, J., Huang, Y., Shen, S., Han, X. D. (2009): Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology Letters*, 186: 84-95.

Hughes P. J., McLellan H., Lowes D. A., Kahn S. Z., Bilmen J. G., Tovey S. C., Godfrey R. E., Michell R. H., Kirk C. J., Michelangeli F. (2000): Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277: 568-574.

Chitra K. C., Latchoumycandane C., Mathur P. P. (2002): Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Archives of toxicology*, 76: 545-51.

Lukáčová J., Kňazická Z., Tvrďá E., Greň A., Lukáč N., Massányi P. (2012): The impact of nonylphenol (NP) on the spermatozoa motility *in vitro*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1: 1551-1560.

Nagao T., Wada K., Marumo H., Yoshimura S., Ono H. 2001. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reproductive toxicology*, 15: 293-315.

Nimrod A. C., Benson W. H. (1996): Environmental Estrogenic Effects of Alkylphenol Ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology*, 26: 335-364.

Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J. N. (2008): Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewater. *Environment International*, 34: 1033-1049.

Tan B.L., Kassim N.M., Mohd M.A. (2003): Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol and nonylphenol. *Toxicology letters*, 143: 261-270.

Toppari J., Larsen J. C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L. J., Jr, Jégou B., Jensen T. K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J. A., Meyer O., Müller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J. S., Skakkebaek N. E. (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives*, 104(4): 741-803.

Uguz C., Varisli O., Agca C., Agca Y. (2008): 229 Effects of nonylphenol on motility, acrosomal integrity and mitochondrial membrane potential of epididymal rat sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 194-194.

Uguz C., Varisli O., Agca C., Agca Y. (2009): Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproductive toxicology*, 28: 542-549.

IDENTIFICATION OF THE LIPID DROPLETS OF IMMATURE PORCINE OOCYTES DURING THE DIFFERENT STAGE OF FOLLICULOGENESIS

Milaković I.¹, Hanuláková Š.¹, Ješeta M.², Knitlová D.², Hanzalová K.², Horský R.¹, Máchal L.¹

¹Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Genetics and Reproduction, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic

E-mail: irena.milakovic@gmail.com

ABSTRACT

The meiotic and growth competence of oocytes originating from larger follicles is greater than of oocytes derived from small follicles. Lipid droplets stored in oocytes have been shown to be accumulated in oocytes during follicular development, and have large influence on quality of oocytes during the process of meiotic maturation, fertilization and preimplantation development.

The principal objective of this research was to investigate the lipid compound of the porcine immature oocytes during the luteal and follicular phases of folliculogenesis. The oocyte subpopulations for this experiment were obtained from small (<5 mm) and medium (6-9 mm) follicles. The oocytes were stained with Nile Red to quantify cytoplasmic lipid droplets as small ($\leq 10\mu\text{m}$ in diameter) and large ($> 10\mu\text{m}$ in diameter). We observed following parameters in immature oocytes: total area covered with lipid droplets (%), total number of lipid droplets per oocyte, number of small lipid droplets and number of large lipid droplets.

The total of area covered with lipid droplets is similar in oocytes derived from small and medium follicles. The total number of all lipid droplets and number of small lipid droplets were significantly higher ($P < 0.05$) in oocytes derived from small than medium follicles. We found that the total number of lipid droplets is significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles, than all stages of luteal phase in oocytes derived from small follicles during the process of folliculogenesis. We also noted that the number of small lipid droplets was significantly higher in oocytes derived from the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles in comparison to oocytes derived from the middle and the late stage of the luteal phase in oocytes derived from small follicles. The number of large lipid droplets was significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles compared to the late luteal and the early follicular phase in the oocytes derived from small follicles. In the early luteal phase in the oocytes derived from small follicles the number of large lipid droplets was significantly higher in comparison to the early follicular phase in oocytes derived from small follicles.

In conclusion, the lipid composition in the immature porcine oocytes varied during the different phases of folliculogenesis. The number of small lipid droplets was higher in oocytes derived from medium follicles than in oocytes derived from small follicles.

Key words: porcine, oocytes, folliculogenesis, lipid droplets, Nile red

Acknowledgments: This research was supported by Grant NAZVQI101A166.

INTRODUCTION

The oocyte is the largest cell in the female mammal, is known to contain substantial endogenous energy stores to use during meiotic maturation, fertilization and preimplantation development (Ambrousi et al., 2009). For successful maturation of the oocytes and progression of early embryos, the amount of cytoplasmic lipids may large influence (Jeong et al., 2009). This is especially manifest in oocytes of domestic mammals, where very high levels of lipids have been described (McEvoy et al., 2000).

The lipids are a structural component of a cell membrane and cytoplasm (Gajda 2009), the majority of them in form of triglycerides and assembled in lipid droplets (LD) a few times surrounded by a phospholipid monolayer (Ostermeyer et al., 2001). The porcine oocytes contains 156 ng of lipids (McEvoy et al., 2000) are categorized by a high level of the lipid content in compared with other animal species (Nagashima et al., 1994). Lipid plays an important role in energy storage, cell structure and in modifying the physical properties and metabolic function of biological membranes (Kim et al., 2001).

In a recent years, a new and reliable method was developed to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. This method can be performed by staining the oocytes with a fluorescent probe Nile Red which is the most specific probe used for identification of intracellular lipid droplets (Genicot et al., 2005).

The amount of emitted fluorescent light correlated with the lipid content. This technique could be used to analyze the lipid content of oocytes from different sized follicles, originating from different donors, or cultured in various conditions.

In the present study, lipid droplets were observed in immature porcine oocytes to examine the changes in the number of their cytoplasmic inclusion. The aim of this research was to compare the lipid content of immature porcine oocytes, derived from small and medium follicles in germinal vesicle stage (GV). In this research the following parameters were examined: total area covered with lipid droplets, total number of the lipid droplets in an individual oocytes and number of small and large lipid droplets.

MATERIAL AND METHODS

The porcine ovaries were obtained from a slaughterhouse are selected according to luteal (early, middle and late) and follicular (early and late) phases of folliculogenesis.

Oocyte staining

The immature (GV) oocytes derived from small and medium follicles by aspiration and cutting of ovarian cortex. Oocytes in germinal vesicle stage were denuded of cumulus cells manually in TCM-199 medium containing 1% NBCS (Newborn calf serum) and 0.1% (w/v) hyaluronidase (Sigma Aldrich). After washing all processed oocytes fixed in a 500 μ l 3.7% paraformaldehyde solution for 60 min at room temperature. They were washed in PBS and permeabilized with 1% TRITON X-100. The lipids of the oocytes were stained in PBS supplemented with 0.04% BSA and 1 μ M Nile red (Sigma Aldrich) for 10 min at room temperature.

After staining oocytes were washed in PBS and mounted on glass slides, without oocyte compression, using Vectashield medium (Vector Lab) containing 1 μ M of DNA dye (TO-PRO 3, Invitrogen) for identification of nuclear stage. The oocytes were stored below 0°C until examined.

Oocyte examination

The oocytes were examined with the use of a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2 AOBS; Leica, Heidelberg, Germany) equipped with Ar and HeNe lasers. The 488 nm excitation band and 570–667 nm detector were used for lipid droplets visualization and 633 nm excitation band and 635–713 nm detector for detection of chromatin. The 40x Leica HCX PL APO CS objective, pinhole, offsets, gain and AOBS were adapted. These parameters were kept throughout the whole experiment. The oocytes were scanned in equatorial optical section, micro photographs were saved and processed using the NIS – Elements AR 3.00 software.

Statistical analysis

All data were subjected to one-way ANOVA, and the significance of difference among means was determined by the Fisher's least significant difference (LSD) test (StatSoft, Inc. 2009. STATISTICA, data analysis software system, version 9.0.). Differences at $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Oocytes from small and medium follicles regardless of the phase

The following parameters: total area covered with lipid droplets and total number of large lipid droplets (LD) were approximately similar between the subpopulation of the oocytes derived from small and medium follicles, regardless of the phase. On the contrary, total number of all lipid droplets and number of small lipid droplets were significantly different ($P < 0.05$) between oocytes derived from small and medium follicles, regardless of the phase (Table 1.).

Table 1. Characteristics of oocytes from small and medium follicles regardless of the phase

<i>Follicle size</i>	<i>n</i>	<i>Area of lipid droplets(%)</i>	<i>Total number of lipid droplets</i>	<i>Small lipid droplets(n)</i>	<i>Large lipid droplets(n)</i>
Small	136	29.16±6.17 ^a	338.93±82.22 ^a	178.70±61.58 ^a	160.24±46.70 ^a
Medium	74	30.25±7.18 ^a	376.32±94.97 ^b	205.72±74.69 ^b	170.61±50.17 ^a

Data with different superscripts within the same column and inside the same group are significantly different (a–b, $P < 0.05$).

Oocytes from small and medium follicles as related to the phase

The subpopulation of oocytes derived from small follicles varied in the total area of oocytes covered with lipid droplets evaluated during the folliculogenesis, from the early luteal to the early follicular phase (Table 2.). The total area of oocytes covered with lipid droplets is lower in the late luteal phase in oocytes derived from the small follicles than in the late luteal phase in oocyte derived from medium follicles. During the early follicular phase area covered with lipid droplets in oocytes derived from medium follicles is higher than in oocytes derived from small follicles. The total area of oocytes covered with lipid droplets did not significantly differ throughout either the luteal or the follicular phase.

Table 2. The total area of oocytes covered with lipid droplets in the luteal and the follicular phase

	<i>n</i>	<i>Phase</i>	<i>Stage</i>	<i>Total area of lipid droplets %</i>
Small	45	Luteal	early	29.28±7.19 ^a
	34		middle	29.16±5.50 ^a
	28		late	29.43±5.85 ^a
	29	Follicular	early	28.69±5.79 ^a
Medium	41	Luteal	late	31.15±6.75 ^a
	33	Follicular	early	29.13±7.65 ^a

The total number of lipid droplets is higher in the early follicular phase in oocyte derived from medium follicles in comparison to oocytes derived from small follicles. In the late luteal phase total number of lipid droplets in oocytes derived from small follicles is lower than in oocytes derived from medium follicles. The total number of lipid droplets is significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles, than in all stages of luteal phase in oocytes derived from small follicles (Table 3.).

Table 3. The total number of lipid droplets in the luteal and the follicular phase

	<i>n</i>	<i>Phase</i>	<i>Stage</i>	<i>Total number of lipid droplets</i>
Small	45	Luteal	early	350.64±83.05 ^a
	34		middle	339.82±87.33 ^a
	28		late	330.93±78.78 ^a
	29	Follicular	early	327.45±79.75 ^a
Medium	41	Luteal	late	387.71±98.84 ^b
	33	Follicular	early	362.18±88.17 ^{a,b}

Data with different superscripts within the same column and inside the same phase are significantly different (a–b, $P < 0.05$).

The number of small lipid droplets is higher in the early follicular and late luteal phases derived in oocytes from medium follicles in comparison to oocytes derived from small follicles. (Table 4.). Correspondingly, small lipid droplets of the cytoplasm area was significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles comparing to the middle and the late luteal phase of folliculogenesis in oocytes derived from small follicles.

Table 4. The number of small and large lipid droplets in the luteal and the follicular phase

	<i>Phase</i>	<i>Stage</i>	<i>n</i>	<i>Total number of small lipid droplets</i>	<i>Total number of large lipid droplets</i>
Small	Luteal	early	45	182.29±59.16 ^{a,b}	168.36±52.38 ^{a,b,c}
		middle	34	172.88±62.21 ^a	166.94±46.42 ^{a,b,c}
		late	28	175.14±66 ^a	155.79±42.64 ^{a,b,d}
	Follicular	early	29	183.38±62.64 ^{a,b}	144.07±38.19 ^d
Medium	Luteal	late	41	209.12±79.15 ^b	178.59±47.34 ^c
	Follicular	early	33	201.48±69.72 ^{a,b}	160.70±52.51 ^{a,b,c,d}

Data with different superscripts within the same column and inside the same phase are significantly different (a–b–c–d, $P < 0.05$).

According to our data, the average number of large lipid droplets is decreased consequently during the luteal phase in oocytes derived from small follicles, and increased in late luteal phase in oocytes derived from medium follicles. The number of large lipid droplets was significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles compared to the late luteal and the early follicular phase in the oocytes derived from small follicles. In the early and the middle luteal phase the number of large lipid droplets was significantly higher in comparison to the early follicular phase in oocytes derived from the small follicles.

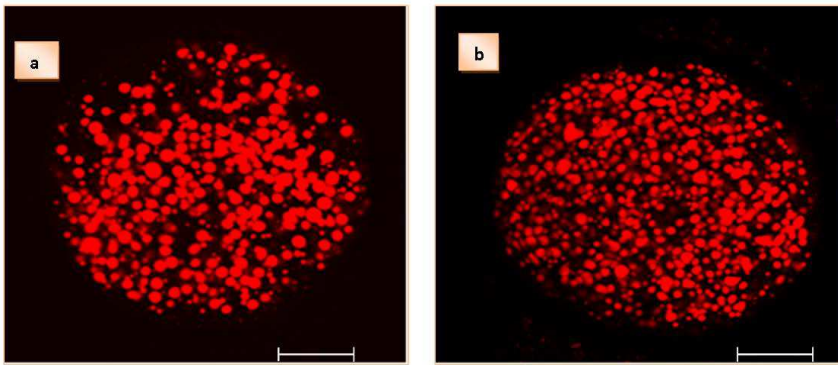


Fig. 1. Representative picture of immature porcine oocytes stained with Nile red: a) oocyte derived from small follicle; b) oocyte derived from medium follicle (scale bar represents 20 μm)

DISCUSSION

The ovarian follicle is the basic structural and functional unit of the mammalian ovary that provides the micro environment necessary for oocyte growth and maturation (Lucci et al., 2007). The size of follicles from which oocytes are derived has a significant effect on the quality of oocytes, their maturation, fertilization and development. Marschal et al. (2002) reported that the developmental competence increases in parallel with follicular size. Lipid droplets are metabolically active organelles that participate in lipid homeostasis, cell signalling, and intracellular vesicle trafficking (Robenek et al., 2006). The lipid composition is an important parameter linked to quality of oocytes. In our research we found out that the total number of lipid droplets was higher in the luteal and the follicular phase in oocytes derived from medium follicles, in comparison to the luteal and the follicular phase in oocytes derived from small follicles (Table 3). The oocytes from small follicles in the late luteal phase positively influences the efficiency of their fertilization as compared to other phases of folliculogenesis (Hulínská et al., 2011).

Lipid rich oocytes were shown to possess greater developmental competence (Jeong et al., 2009). The first detailed lipid analysis of immature porcine oocytes provided Homa et al. (1986). The large amounts of lipid droplets make the development of cryopreservation methods for porcine embryos much more problematic than for many other mammals (Zhou et al., 2009). The lipid environment of porcine oocytes in the immature stage, may be adapted to the highly requirements of the cell, promoting growth and development with a potential role in the regulation of maturation (Homa et al., 1986). Cran et al. (1985) described the presence of the lipid droplets in porcine oocytes and reported the number and size of lipid droplets of immature and matured porcine oocytes. According to Sturmeijer et al. (2006) lipid droplets tended to show peripheral distribution in immature porcine oocytes. The large number of small lipid droplets accumulated in mature porcine oocytes were an energy source for fertilization and early embryo development (Niimura et al., 2002). In the present

investigation, number of small lipid droplets in immature porcine oocytes was constantly higher than number of large lipid droplets, during the luteal and the follicular phase (Table 4).

Several authors have already been used Nile red to evaluate the lipid content in mammalian oocytes and embryos (Genicot et al., 2005, Leroy et al., 2005, Romek et al., 2011). This study demonstrates the utility of Nile Red as a stain to detect intracellular lipid droplets by confocal microscopy using Nile Red staining (Figure 1.). It is also possible to combine, the quantification of lipids and the evaluation of the size and distribution of lipid droplets within oocytes and embryonic cells.

CONCLUSION

In conclusion, the lipid composition in the immature porcine oocytes varied during the different phases of folliculogenesis. The total number of lipid droplets and number of small lipid droplets in oocytes derived from medium follicles is significantly higher in comparison to oocytes derived from small follicles regardless of the phase.

Our findings demonstrate that the total numbers of lipid droplets was significantly higher in the late luteal phase in oocytes derived from medium follicles, than all stages of luteal phase in oocytes derived from small follicles during the process of folliculogenesis. The total area covered with lipid droplets is similar in oocytes derived from small and medium follicles. The number of small and large lipid droplets were greater in oocytes derived from medium follicles than in oocytes derived from small follicles related to the phases of folliculogenesis.

REFERENCES

- Ambrosi B., Lacalandra G.M., Iorga A.I., DeSantis T., Mugnier S., Matarrese R., Goudet G., Dell'Aquila M.E. (2009): Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, 71(7): 1093–1104.
- Cran D.G. (1985): Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74(1): 237-245.
- Gajda B. (2009): Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reproductive Biology*, 9(2): 97-112.
- Genicot G., Leroy J.L., Van Soom A., Donnay I. (2005): The use of a fluorescent dye, Nile Red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, 63(4): 1181–1194.
- Homa S.T., Racowsky C., McGaughey R.W. (1986): Lipid analysis of immature pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2): 425-434.
- Hulinska P., Martecikova S., Jeseta M., Machatkova M. (2011): Efficiency of *in vitro* fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. *Animal Reproduction Science*, 124(1-2): 112-117

- Jeong W.J., Cho S.J., Lee H.S., Deb G.K., Lee Y.S., Kwon T.H., Kong I.K. (2009): Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, 72(4): 584–589.
- Kim JY., Kinoshita M., Ohnishi M., Fukui Y. (2001): Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction*, 122(1): 131–138.
- Leroy J.L., Genicot G., Donnay I., Van Soom A. (2005): Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(1): 76–78.
- Lucci C.M., Schreier L.L., Machado G.M., Amorim C.A., Báo S.N., Dobrinsky J.R. (2007): Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(1): 76–82.
- Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P, 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 57(5): 1523–1532.
- McEvoy T.G., Coull G.D., Broadbent P.J., Hutchinson J.S., Speake B.K. (2000): Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1): 163–70.
- Nagashima H., Kashiwazaki R., Ashman R., Grupen C., Seamark R.F., Nottle M. (1994): Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 41(1): 113–118.
- Niimura S., Takano H., Onishi A., Hosoe M. (2002): Changes in the amount of proteins, glycogen and lipids in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *Animal Science Journal*, 73(5): 327–332.
- Ostermeyer A.G., Paci J.M., Zeng Y., Lublin D.M., Munro S., Brown D.A. (2001): Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *The Journal of Cell Biology*, 152(5): 1071–1078.
- Robenek H., Hofnagel O., Buers I., Robenek M.J., Troyer D., Severs N.J. (2006): Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(20): 4215–4224.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. (2011): New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and preimplantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*, 75(1): 42–54.
- Sturmey R.G., O'Toole P.J., Leese H.J. (2006): Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, 132, 829–837.
- Zhou G.B., Li N. (2009): Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Molecular Human Reproduction*, 15(5): 279–285.

EFFECT OF CHRONIC APPLICATION OF QUERCETIN AND ACUTE DOSE OF T-2 TOXIN ON HAEMATOLOGICAL PARAMETERS OF RABBITS

VPLYV CHRONICKEJ APLIKÁCIE KVERCETÍNU A AKÚTNEJ DÁVKY T-2 TOXÍNU NA HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE KRÁLIKA

Petruška P.¹, Capcarová M.¹

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: petruska.peter85@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine effect of chronic application of quercetin in various doses and acute dose of T-2 toxin on selected haematological parameters of rabbit's blood. Animals were divided into two control groups (C1 and C2) and experimental groups (E1 – E6). Experimental groups received quercetin in injectable form at 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E1 and E2 group, 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E3 and E4 group and 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E5 and E6 group without T-2 toxin for 90 days. T-2 toxin (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria) to C2, E2, E4 and E6 group at dose 0.08mg per kg of body weight 72 hours before slaughter was applied. Significant increase ($P < 0.05$) of MI% (medium-size cell percentage) in E3 (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin), E4 (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin and 0.08 mg.kg^{-1} of body weight) and E5 (1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin) groups in comparison with the control group (C1) was observed. Significant increase of MI% in E2 (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin and 0.08 mg.kg^{-1} of body weight), E3, E4, E5 and E6 (1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin and 0.08 mg.kg^{-1} of body weight) in comparison with E1 (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of quercetin) was observed. Also we observed significant ($P < 0.05$) increase of MI% in E3 group vs. control group (C2).

Higher values in WBC (total white blood cell count), MID (medium-size cell count) and LYM (lymphocytes count) in experimental groups and insignificant decrease of LY% (lymphocyte percentage) and GRA% (granulocytes percentage) in comparison with the control group was found. Other haematological parameters were not influenced by this natural antioxidant and T-2 toxin.

Key words: quercetin, T-2 toxin, haematological parameters, rabbit

Acknowledgments: This work was financially supported by VEGA scientific grant 1/0790/11 and 1/0084/12.

INTRODUCTION

Quercetin is a polyphenolic flavonoid, classified as a flavonol. Flavonoids seem to play an important role in human health and to possess beneficial effects in the prevention of human diseases. The antioxidant capacity of these molecules seems to be responsible for many of their beneficial effects and confers a therapeutic potential in diseases such as cardiovascular diseases, gastric or duodenal ulcers, cancer and hepatic pathologies (González Gallego et al., 2007). Quercetin is highly abundant in food and beverage sources that are part of the human diet such as broccoli, lettuce, apples, tomatoes, onions, tea and coffee (Jellin et al., 2003). Within the flavonoid family, quercetin is the most potent scavenger of ROS (Heijnen et al., 2002) and possesses strong anti-inflammatory capacities as well (Orsolic et al., 2004).

Mycotoxins are natural and very stable toxins, with relatively low-molecular weight secondary metabolites of fungal origin, which can contaminate a large variety of feed mixtures (Labuda et al., 2009; Tančinová and Labuda, 2009) grains and foodstuffs worldwide, a variety of foods and beverages, including both plant-based products and animal products (Schollenberger et al., 2007; Ranzenigo et al., 2008).

Trichotecenemycotoxins are very large family of chemically related toxins produced by various species of *Fusarium*, *Myrotecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporiu*, etc. (Wannemacher and Neufeld, 1991). T-2 toxin is some of the most important and toxic trichotecenemycotoxin occurring in various agriculture products (Iwahashi et al. 2008). Lipophilic nature of T-2 toxin suggests that they are easily absorbed through skin, gut, and pulmonary mucosa (Bunner and Morris, 1988). Trichotecene causes multiorgan effect including emesis, and diarrhea, weight loss, nervous disorders, cardiovascular alterations, immunodepression, hemostatic derangements, skin toxicity, and bone marrow damage (Wannemacher and Neufeld, 1991).

The aim of the present work was to determine effect of chronic application of quercetin in various doses and acute dose of T-2 toxin on selected haematological parameters of rabbit's blood.

MATERIALS AND METHOD

Animals and diet

Adult female rabbits (n = 20) and male rabbits (n = 20) of meat line M91, maternal albinotic line (crossbreed Newzealand white, Buskat rabbit, French silver) and paternal acromalictic line (crossbreed Nitra's rabbit, Californian rabbit, Big light silver) were used in experiment. Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Water was available at any time from automatic drinking troughs. Groups of adult animals were

balanced for age (150 days) and body weight (4 ± 0.5 kg) at the beginning of the experiment. Adult rabbits were fed diet of a 12.35 MJ.kg^{-1} of metabolizable diet (Table 1) composed of a pelleted concentrate.

Animals were divided into two control groups (C1 and C2) and experimental groups (E1 – E6). Experimental groups received quercetin in injectable form at $10 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E1 and E2 group, $100 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E3 and E4 group and $1000 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ in E5 and E6 group without T-2 toxin for 90 days. T-2 toxin (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria) to C2, E2, E4 and E6 group at dose 0.08 mg per kg of body weight 72 hours before slaughter was applied.

In this animal study, institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed, and all experimental procedures involving animals were approved by the State Veterinary and Food Institute of Slovak Republic, no. SK CH 29004.

Table 1 Application of quercetin and T-2 toxin in porcine blood *in vitro*.

Group Quercetin ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) T-2 toxin (mg.kg^{-1} of body weight, 72 hours before slaughter)

C1	0	0
C2	0	0,08
E1	10	0
E2	10	0,08
E3	100	0
E4	100	0,08
E5	1000	0
E6	1000	0,08

C – control group, E1 – E6 – experimental groups with various doses of quercetin alone or in combination with T-2 toxin.

Blood sampling and analyses

Blood samples from *vena auricularis* were taken from all animals by macromethods in morning at the end of experiment.

In whole blood, selected haematological parameters [total white blood cell count (WBC), lymphocytes count (LYM), medium size cell count (MID), granulocytes count (GRA), lymphocyte percentage (LYM%), medium size cell percentage (MID%), granulocytes percentage (GRA%), red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDWc), platelet count (PLT), platelet percentage (PCT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDWc)] were measured using haematology analyzer Abacus junior VET (Diatron[®], Vienna, Austria).

Statistical analyses

The data used for statistical analyses represent means of values obtained in blood collection (end of the experiment). To compare the results, one-way ANOVA test was applied to calculate basic statistic characteristics and to determine significant differences among the experimental and control groups. Statistical software SIGMA PLOT 11.0 (Jandel, Corte Madera, CA, USA) was used. Differences were compared for statistical significance at the level $P < 0.05$.

Table 2 Chemical composition ($g.kg^{-1}$) of the experimental diet.

Component	
Dry matter	926.26
Crude protein	192.06
Fat	36.08
Fibre	135.79
Non-nitrogen compounds	483.56
Ash	78.78
Organic matter	847.49
Calcium	9.73
Phosphorus	6.84
Magnesium	2.77
Sodium	1.81
Potassium	10.94
Metabolizable energy	12.35 MJ.kg ⁻¹

RESULTS AND DISCUSSION

The results are presented in Table 3. Quercetin had no influence on the most observed parameters ($P > 0.05$). Significant increase ($P < 0.05$) of MI% in E3 (100 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin), E4 (100 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin and 0.08 $mg.kg^{-1}$ of body weight) and E5 (1000 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin) groups in comparison with the control group (C1) was observed. Significant increase of MI% in E2 (10 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin and 0.08 $mg.kg^{-1}$ of body weight), E3, E4, E5 and E6 (1000 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin and 0.08 $mg.kg^{-1}$ of body weight) in comparison with E1 (10 $\mu g.kg^{-1}$ of quercetin) was observed. Also we observed significant ($P < 0.05$) increase of MI% in E3 group vs. control group (C2). Quercetin at the lowest dose had no effect on observed parameters and the values from this group were similar to the control. Higher doses of quercetin caused significant increase of MI%. Treatment of T-2 toxin also increased MI%. Parabathina et al. (2011) found the similar results in study with rutin and quercetin on rabbits. Authors observed increase in eosinophils after 28 days of treatment. As eosinophils are part of MI%, thus the increase of MI% in our study could be the result of increase count of eosinophils by quercetin treatment. The mechanism of action is not clear yet.

Slight increase of MI% was found in experiment with pesticide bendiocarbamate applied to rabbits (Capcarova et al., 2010). In our experiment T2 toxin caused also increase of MI% as pesticide. Probably toxic substances provoke some parts of leukocytes as monocytes and eosinophil to respond on the exposure by multiplying of their number.

Application of T-2 toxin insignificantly ($P > 0.05$) increased WBC in E1 and E3 groups in comparison with the control group. Increase of WBC is normal reaction to foreign substances, which alter their normal physiological processes (Adebayo et al. 2010; Atta et al., 2010). On the contrary, Gentry and Cooper (1981) found that intravenous administration of T-2 toxin significantly decreased WBC in rabbits. In another study Capcarova et al. (2010) found significant decrease of WBC after bendiocarbamate additions in rabbits. In this cause it seems that the dose and the length of exposure played the main role of WBC responds. High doses of toxic substances cause decrease of WBC and low doses could raise the WBC parameter. In our study the dose of T2 toxin was low and close to natural exposure of T2 toxin in rabbits feed.

Quercetin/T-2 toxin preparation caused slight increase ($P > 0.05$) in LYM in all experimental groups in comparison with the control group. Daily consumption of 60 mg isoflavones immediate one year did not cause any changes in LYM in women (Soung et al., 2006). Dönmez et al. (2012) found that aflatoxin at doses 250 μg per day significantly ($P < 0.05$) decrease LY% in merino rams. In our experiment T2 toxin decreased LY%, however without significant confirmation ($P > 0.05$).

Pang et al. (1988) found that exposure of T-2 toxin in pigs caused some alterations in lymphocyte and neutrophils counts. The similar results were observed by Nikulin et al. (1997) in study with strains that produce mycotoxins *Stachybotrys atra* on mice. Our results did not confirm alterations in lymphocytes and neutrophils counts after T2 toxin exposure. The discrepancies in the results are due to using of different dose of mycotoxin, different kinds of animal subjects and length of treatment periods.

In this study we observed insignificant ($P > 0.05$) decrease in GRA% in all experimental groups vs. the control group. In another study Capcarova et al. (2011) found the similar results with sumac (*Rhus coriaria*) inclusion to the feed for rabbits.

The values of other haematological parameters (GRA, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDWc, PLT, PCT and MPV) were not influenced ($P > 0.05$) after quercetin/T-2 toxin treatment. We have not found other evidence in literature about the effect of quercetin/T-2 toxin on haematological parameters of rabbits.

Table 3. Hematological parameters of rabbits after quercetin treatment and T-2 toxin application.

Parameter	C	C2	E1	E2	E3	E4	E5	E6
WBC	12.77 ± 2.93	9.85 ± 1.19	9.71 ± 0.73	10.30 ± 1.83	9.65 ± 1.37	10.01 ± 1.06	8.06 ± 0.47	9.64 ± 1.96
LYM	3.99 ± 0.44	4.66 ± 1.80	4.30 ± 1.57	5.66 ± 1.76	4.78 ± 1.04	6.29 ± 0.39	4.16 ± 1.53	5.53 ± 1.44
MID	0.83 ± 0.67	0.50 ± 0.13	0.12 ± 0.13	0.46 ± 0.25	1.14 ± 0.49	0.63 ± 0.31	0.76 ± 0.16	0.69 ± 0.32
GRA	5.99 ± 1.56	6.07 ± 1.65	5.13 ± 0.93	4.87 ± 1.66	4.21 ± 1.44	2.76 ± 0.42	5.05 ± 1.48	5.27 ± 1.00
LY%	43.32 ± 16.61	57.26 ± 24.59	38.90 ± 16.05	48.56 ± 16.43	51.72 ± 10.13	52.03 ± 19.00	50.06 ± 11.99	53.76 ± 14.07
MI%	2.20 ± 1.17 ^a	5.03 ± 1.01 ^b	1.32 ± 1.18 ^c	6.16 ± 1.04 ^d	10.57 ± 2.33 ^{abc}	8.13 ± 1.94 ^c	8.75 ± 1.96 ^c	7.00 ± 2.69 ^c
GR%	59.42 ± 26.53	58.13 ± 11.00	58.52 ± 17.50	47.46 ± 13.90	39.66 ± 12.42	39.80 ± 17.84	53.32 ± 8.42	50.42 ± 20.04
RBC	6.19 ± 0.67	7.00 ± 0.49	6.51 ± 0.54	6.98 ± 0.39	6.35 ± 1.05	6.50 ± 1.01	6.72 ± 0.30	7.08 ± 0.40
HGB	130.00 ± 3.55	132.50 ± 2.64	127.80 ± 9.73	134.40 ± 7.43	130.50 ± 3.78	122.66 ± 17.24	130.83 ± 5.56	132.00 ± 4.76
HCT	37.85 ± 6.05	41.83 ± 2.80	39.89 ± 2.13	41.44 ± 2.15	37.96 ± 6.45	38.12 ± 4.63	40.74 ± 1.13	41.72 ± 1.89
MCV	60.80 ± 4.76	60.00 ± 1.63	61.40 ± 3.20	59.60 ± 3.28	59.60 ± 1.67	59.00 ± 3.00	60.66 ± 1.96	58.75 ± 3.86
MCH	19.76 ± 0.79	19.00 ± 0.94	19.64 ± 0.48	19.26 ± 0.65	19.24 ± 0.52	18.96 ± 1.01	19.43 ± 0.63	18.60 ± 0.71
MCHC	325.60 ± 13.50	318.25 ± 14.15	317.25 ± 10.78	324.40 ± 11.54	322.40 ± 7.30	321.66 ± 7.23	320.83 ± 8.23	316.00 ± 9.41
RDWc	15.96 ± 1.94	15.27 ± 0.78	14.86 ± 0.16	15.24 ± 0.54	16.90 ± 1.96	15.56 ± 1.33	15.60 ± 0.98	16.07 ± 0.75
PLT	379.25 ± 91.41	298.00 ± 84.71	238.20 ± 26.67	248.60 ± 19.32	297.00 ± 28.77	318.00 ± 8.48	282 ± 79.85	333.75 ± 78.52
PCT	0.18 ± 0.08	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.08	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.19 ± 0.06
MPV	5.66 ± 0.27	5.80 ± 0.29	5.70 ± 0.70	5.92 ± 0.37	5.64 ± 0.24	5.95 ± 0.35	5.86 ± 0.23	5.80 ± 0.34
PDWc	30.36 ± 1.11	30.92 ± 1.22	29.66 ± 2.49	31.12 ± 1.27	29.94 ± 1.11	31.70 ± 0.70	30.46 ± 0.78	30.85 ± 1.82

WBC, total white blood cell count (10⁹/l); LYM, lymphocytes count (10⁹/l); MID, medium-size cell count; GRA, granulocytes percentage; MPV, medium-size cell percentage; GRA%, granulocytes percentage; RBC, red blood cell count (10¹²/l); HGB, haemoglobin (g/l); HCT, haematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular haemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration (g/l); RDWc, red cell distribution width (%); PLT, platelet count (10⁹/l); PCT, platelet percentage; MPV, mean platelet volume (fl); PDWc, platelet distribution width (%). C – control group, E1 (10 µg.kg⁻¹), E2 (100 µg.kg⁻¹), E3 (1000 µg.kg⁻¹) – experimental groups. Means with same superscripts within the same row differ significantly (p < 0.05). The values shown are the mean ± SD (standard deviation).

CONCLUSION

In this experiment the chronic intramuscular application of quercetin and acute dose of T-2 toxin 72 hours before slaughter resulted in slight changes in haematological parameters of rabbits. Administration of quercetin three times a week and T-2 toxin before slaughter significantly increased the level of MI% in E3, E4 and E5 group in comparison with control group (E1). We found significant increase of MI% between E3 vs. control group (C2). Also we found significant increase of MI% in E2, E3, E4, E5 and E6 in comparison with E1. Increase of MID% could be result of the higher doses quercetin treatment and T-2 toxin exposure. Also we found increase in MID, however without significant differences. We observed insignificant decrease in LY% in all experimental groups in comparison with the control group. Quercetin/T-2 toxin preparation caused increase in LYM in all experimental groups, but differences among the groups remained insignificant. Application of T-2 toxin insignificantly increased WBC in E1 and E3 groups in comparison with the control group.

Further investigation with different doses of quercetin will be worthy of further investigation.

REFERENCES

- Adebayo A. H., Guang-Zhi Zeng, Jun-Ting Fan, Chang-Jiu Ji, Wen-Jun He, Jun-Ju Xu, Zu-Mei Zhang, Akindahunsi A. A., Kela R., Ning-Hua Tan. (2010): Biochemical, haematological and histopathological studies of extract of *Ageratum conyzoides* L. in Sprague Dawley rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 2264-2272, ISSN 1969-0875.
- Atta A. H., Elkoly T. A., Mouneir S. M., Geham K., Alwabel N. A., Zaher S. (2010): Hepatoprotective effect of methanol extracts of *Zingiber officinale* and *Cichorium intybus*. *Indian Journal of Pharmacology Sciences*, 72: 564-570.
- Bunner D. L., Morris E.R. (1998): Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin, an important mechanism of action. *Toxicology and Applied Microbiology*, 92: 113-121.
- Capcarova M., Petrovova E., Flesarova S., Dankova M., Massanyi P., Danko J. (2010): Bendiocabamate induced alterations in selected parameters of rabbit homeostasis after experimental peroral administration. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98: 213-218.
- Capcarova M., Slamecka J., Abbas K., Kolesarova A., Kalafova A., Valent M., Filipejova T., Chrastinova L., Ondruska L., Massanyi P. (2012): Effect of dietary inclusion of *Rhus coriaria* on internal milieu of rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96: 459-465.
- Dönmez N., Dönmez H. H., Keskin E., Kisadere I. 2012. Effect of aflatoxin on some haematological parameters and protective effectiveness of esterified glucomannan in Merino rams. *The Scientific World Journal*, 2012: 4 p. article ID 342468, doi: 10.1100/2012/342468.
- Gentry P.A., and Cooper M.L. (1981): Effect of Fusarium T-2 toxin on hematological and biochemical parameters in the rabbit. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 45: 400-405.

González-Gallego J., Sánchez-Campos S., Tuñón M. J. (2007): Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *NutricionHospitalaria*, 22: 287–293.

Heijnen C. G., Haenen G. R. M. M., Oostveen R. M., Stalpers E. M., Bast A. (2002): Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*, 36: 575–581.

Iwahashi Y., Kitagawa E., Iwahashi H. (2008): Analysis of mechanisms of T-2 toxin toxicity using yeast DNA Microarrays. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12): 2585-2600.

Jellin J. M., Batz F., Hitchens K. (2003): Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. *Natural Medicines Comprehensive, Database Therapeutic Research Faculty, Stockton, CA 1100–1101.*

Labuda R., Parich A., Vekiru E., Tančinová D. (2009): Incident of fumonisins, moniliformin and fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12: 81-86.

Nikulin M., Rejjula K., Jarvis B. B., Veijalainen P., HintikkaEeva-Liisa. (1997): Effect of intranasal exposure to spores of *Stachybotrysatra* in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 35: 182-188.

Orsolic N., Knezevic A. H., Sver L., Terzic S., Basic I. (2004): Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 307–315.

Pang V. F., Lambert R. L., Felsburg P. J., Beasley V. R., Buck W. B., Haschek W. M. (1988): Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: Clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry, and immune response. *Fundamental and Applied Toxicology*, 11: 100-109.

Ranzenigo G., Caloni F., Cremonesi F., Aad P.Y., Spicer L.J. (2008): Effect of Fusariummycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Animal Reproduction Sciences*, 107: 115-130.

Schollenberger M., Muller H.M., Ruffle M., Terry-Jara H., Suchy S., Plank S., Drochner W. (2007): Natural occurrence of Fusarium toxins in soy food marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 142-146.

Soung D. Y., Patende A., Khalil D. A., Lucas E. A., Devareddy L., Greaves K. A., Armjmandi H. B. (2006): Soy protein supplementation does not cause lymphocytopenia in postmenopausal women. *Nutrition Journal*, 5: 6 p. doi: 10.1186/1475-2891-5-12.

Tančinová D., Labuda R. (2009): Fungi on wheat bran and their toxinogenicity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16: 325-331.

Wannemacher R.W. Jr., Bunner D.L., Neufeld H.A. (1991): Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals, Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Raton, Fla: CRC Press 499–552.

FEEDING EFFECT ON THE STERLET *ACIPENSER RUTHENUS* SWIM BLADDER GIGANTISM

Rybníkář J., Mareš J.

Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xrybnika@node.mendelu.cz, mares@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective was to determine the number of swim bladder gigantism under different types of feeding and find a suitable type for further use in breeding. Experiment started at fish age 63 days and ended after 50 days. Three feeding variants were set. During the experiment fish were weekly measured: total length (TL) with weight (w) and number of fish gigantism counted. Results show that irregular feeding causes sterlet swim bladder gigantism.

Key words: recirculation system, air swallowing, swim bladder

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency Individual Project IP 4/2012, and Research plan No. MSM6215648905 “Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change”, which is financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

ÚVOD

Jesetery sú jednou z najstarších skupín rýb vyskytujúcich sa v severnej hemisfére, Eurázii a Severnej Amerike (Birstein, 1993). Všetky druhy jeseterov sú ohrozené nadmerným rybolovom, znečisťovaním vôd, budovaním priehrad, reguláciami, prehlbovaním a zosilňovaním riečnych brehov. (Dettlaff et al 1993; Birstein 2002; Bloesch 2006; Hochleitner a Gessner 2001). Akvakultúra jeseterov môže pomôcť v zachovaní klesajúcich voľne žijúcich populácií stálym vysadzovaním bez využívania prirodzeného výteru. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) bol úspešne reprodukován a technológia odchovu bola stanovená v Sovietskom Zväze v sedemdesiatych rokoch a neskôr exportovaná do ostatných zemí (Chebanov a Billard, 2001). Recirkulačné systémy v akvakultúre poskytujú možnosti zníženia potreby vody, zlepšenie recyklácie živín a získanie biomasy rýb s vysokou úrovňou prežitia pri dodržaní kvalitného kŕmenia s ľahkou stráviteľnosťou a poskytnutím všetkých živín (Bura a Szelei 2009; Hamlin et al 2006; Martins et al 2010; Oprea a Oprea 2009) Vo voľnej vode a v jeseterích chovoch bolo zistené množstvo anomálií vo vývoji a fungovaní reprodukčného systému matičných rýb a vo vývoji lariev a plôdiku (Faleeva, 1987; Romanov, Shevel-eva, 1993; Akimova, Ruban, 1996; Shagayeva et al., 1993; Goryunova et al., 2004). Mnoho týchto abnormalít výrazne ovplyvňuje životaschopnosť potomstva, niektoré sú letálne a znižujú efektívnosť odchovu jeseterov. (Ruban et al 2006). Cieľom tejto štúdie bolo identifikovať extrémnu plynatosť tzv. gigantizmus plynového mechúra v recirkulačnom systéme pri porovnaní rôznych typov kŕmenia.

MATERIÁL A METODIKA

Pokus začal na rybách z liahne Rybárstva Pohořelice a.s. vo veku 63 dní. Ryby boli nasadené do šiestich žľabov po predošlom pokuse s podobnými variantmi, neboli vytriedené pre zachovanie všetkých hmotnostných kategórií aby nemohla byť ovplyvnená početnosť rýb s extrémnou plynatosťou po I – 127 ks, II – 148 ks, III – 119 ks, IV – 122 ks, V – 158 ks, VI – 156 ks na žľab, na Ústave zoologie, rybárství, hydrobiologie a včelařství Agronomické fakulty v Brně. Žľaby boli zapojené na systém recirkulácie. Každý deň bola meraná teplota vody a percentuálne nasýtenie vody kyslíkom spolu s hodnotami pH. Straty v jednotlivých žľaboch boli taktiež evidované každý deň. Kyslík zabezpečoval membránový okysličovač pomocou vzduchovacích kameňov. Teplota sa pohybovala 20°C v deň nasadenia $\pm 1^\circ\text{C}$ počas pokusu. Obsah kyslíku sa pohyboval od 62% do 95% počas celého sledovania. Minimálne hodnoty pH boli 7 s maximom 7,9 bez vysokého kolísania. Jesetery boli kŕmené komerčne vyrábaným krmivom INICIO PLUS o veľkosti 0,8 mm a s obsahom proteínov 56%, tukov 18% a hrubou energiou 22,0 MJ/KCal. Kŕmna dávka bola stanovená na 3 % hmotnosti obsádky. Kŕmne varianty boli tri s opakovaním. Prvý variant, žľab I a II bol kŕmený iba krmivom INICIO samokrmítkami, variant s kontinuálnym predkladením krmiva. Druhý variant, žľab III a IV bol kŕmený len dva krát denne 8:00 a 18:00 ako variant

s nepravidelným kŕmením. Tretí variant, žľab V a VI bol kŕmený kŕmivom INICIO samokŕmíkami, variant s kontinuálnym predkŕmaním kŕmiva a prídavkom živej mrazenej potravy v množstve 2% z kŕmnej dávky. Živú mrazenú potravu tvorili larvy pakomárov. Pri jednotlivých kontrolných meraniach a váženiach každý týždeň od 26.6.2012 do 14.8.2012 boli vždy zisťované tieto hodnoty: celková dĺžka tela (TL v mm) a hmotnosť tela (w v g). Meranie prebiehalo podľa metodiky Holčíka (1989). Ďalej boli vždy odobrané a spočítané ryby s extrémnou plynatosťou ktorá im nedovoľovala ponorenie sa za potravou. Tieto boli umiestnené zvlášť do žľabu.

VÝSLEDKY A DISKUSIE

Počas sledovania kŕmneho testu sme na základe dát u jednotlivých odberov (Tab. 1) a (Tab. 2) v porovnaní s ostatnými variantmi dospeli k výsledkom, ktoré prispeli k podrobnejšiemu poznaniu vplyvu kŕmenia na plynatosť jeseterov. Počas experimentu bolo pozorované veľmi časté plávanie rýb u hladiny. Ryby hltali vzduch vo vertikálnej i horizontálnej (s bruchom k hladine) polohe pri kŕmení aj mimo kŕmenia a to s väčšou frekvenciou počas kŕmenia hlavne u druhého variantu. Ryby hlcú vzduch zámerne pre udržiavanie vztlaku. U niektorých jedincov dochádzalo k preplneniu týmto vzduchom a neschopnosti sa ponoriť. Prvý variant sa spolu s tretím vyznačovali rovnomerným rastom a malými rozdielmi v individuálnej hmotnosti oproti druhému variantu. Nepravidelné kŕmenie u druhého variantu spôsobilo väčšie individuálne rozdiely v hmotnosti a tým dovolil väčším rybám lepší prístup k potrave, tieto sa presadili natoľko, že sa menšie ryby nedokázali pri nakŕmení naplno uplatniť a individuálny rozdiel sa ešte viac prehlboval. Ryby nedostatočne prijímajúce kŕmivo časom strácali na kondícii a v konečnom dôsledku nastával úhyn. Medzi jednotlivými variantmi sa štatisticky porovnávalo percentuálne množstvo rýb postihnutých extrémnou plynatosťou počas experimentu. Medzi prvým a druhým variantom bol preukázaný štatisticky významný rozdiel (ANOVA; $p < 0,05$). Medzi prvým a tretím variantom nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel (ANOVA; $p > 0,05$). Medzi druhým a tretím variantom bol preukázaný štatisticky významný rozdiel (ANOVA; $p < 0,05$). Z výsledkov vyplýva, že najviac postihnutých rýb extrémnou plynatosťou bolo v druhom variante ktorý sa od ostatných dvoch variantov významne odlišoval. Z toho vidieť, že najväčší vplyv má pravidelnosť kŕmenia a prídavok živej potravy významne početnosť výskytu neovplyvnil.

Tab. 1 Počet rýb s extrémnu plynatosťou v priebehu pokusu vyjadrené v percentách

Žľab	I	II	III	IV	V	VI
3.7.2012	5,7	4,3	3,5	1,7	4,7	3,4
10.7.2012	2,6	4,6	5,6	4,5	0	0,7
17.7.2012	2,7	1,6	4,1	6,9	2,1	1,5
24.7.2012	3,7	3,3	9,0	9,1	2,2	4,0
31.7.2012	4,9	3,4	9,8	11,9	3,1	5,0
7.8.2012	1,9	2,6	2,5	4,7	1,5	2,7
14.8.2012	0,9	0,8	3,8	2,3	2,4	3,6
SUMA	22,4	20,6	38,3	41,4	16	20,9

Tab. 2 Počiatočné a konečné parametre hmotnosti, počet kusov a priemerná hmotnosť

začiatok testu - 26.6.2012				koniec testu - 14.8.2012		
žľab	m(g)	počet(ks)	priemerná hmotnosť	m(g)	počet(ks)	priemerná hmotnosť
I	326	127	2,56	1669	101	16,52
II	354	148	2,39	1645	114	14,42
III	230	119	1,93	1076	77	13,97
IV	241	122	1,97	1180	84	14,04
V	349	158	2,20	1688	126	13,39
VI	311	156	1,99	1483	113	13,12

ZÁVER

Zo zistených dát bolo potvrdené, že na extrémnu plynatosť u jesetera malého má z troch skúmaných variant najväčší vplyv nepravidelné kŕmenie. Toto je dosť pravdepodobná situácia v prevádzkových podmienkach na rybárstvach kde sa nepoužívajú krmítka. Tretí variant s prilepšením živou mrazenou potravou sa neodlišoval od bežne používaného prvého variantu a tým je časovo a ekonomicky náročnejší čo sa živej mrazenej potravy týka. Z toho vyplýva, že optimalizácia odchovu by sa mala uberať smerom k čo najpravideľnejšiemu kŕmeniu s vysokou frekvenciou pre čo najvyššie prežitie a odchov kvalitného potomstva rýb.

LITERATÚRA

Akimova, N. V.; Ruban G. I. (1996) Systematization of reproduction abnormalities for sturgeons (Acipenseridae) under anthropogenic impact. *Voprosi Ikhtiologii*: 36(1). pp. 65-80. (in Russian).

Birstein, V.J. (1993): Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conserv. Biol.* . 7:773-787.

Birstein, V.J. (2002): Sturgeon biodiversity and conservation. Ed. Kluwer Academic, Netherlands, pp. 157-163.

Bloesch J. (2006) Action plan for the conservation of sturgeons in the Danube River basin. Council of Europe, pp. 5-15.

Bura M., Szelei Z.T. (2009) Research regarding the evolution of corporal masses and feed conversion on sterlet (*Acipenser ruthenus*) juvenile raised in recirculating system. *AACL Bioflux* 2(2):223-228.

Dettlaff T. A., Ginsburg A. S., Schmalhausen O. I. (1993) Sturgeon fishes, Developmental biology and aquaculture. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 299 p.

Faleeva, T. I. (1987) Abnormalities in maturation of reared Stellate sturgeon oocytes. Proceedings of the State Research Institute of lake and river fisheries. Leningrad. GOSNIORKH Publishing. No. 259, 121-133. (in Russian).

Goriounova V. B.; Shagayeva, V. G.; Nikol'skaya, M. P., 2004: Reviewing the problem of quality of sturgeon fry reared at hatcheries in the Volga delta. pp. 168-171 in: Sturgeon Farm-ing: Achievements and Prospects for Development. Proceedings of the 3 rd International Symp. Astrakhan. March 22-25, 2004. (in Russian)

Hamlin H.J., Michaels J.T., Beaulaton C. M., Main K.L. (2006) Refining feeding practices for hatchery production of siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *Journal of the World Aquaculture Society* 37(2): 224-230.

Hochleitner M., Gessner J. (2001) The sturgeons and paddlefishes of the world. Aqua Tech Publications, 207 p.

Holčík J. (ed.) 1989: The freshwater fishes of Europe. General introduction to fishes. Acipenseriformes. Vol. 1, Part II, AULA – Verlag Wiesbaden, 469 pp.

Chebanov, M. a Billard, R. (2001) the culture of sturgeon in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquat. Living Resour.* 14: 375-381.

Martins C.I.M., Eding E.H., Verdegem M.C.J., Heinsbroek L. T. N., Schneider O., Blancheton J.P., Roque E., Verreth J.A.J. (2010) New developments in recirculating aquaculture systems in europe: a perspective on environmental sustainability aquacultural Engineering 43(3):83-93.

Oprea D., Oprea L. (2009) Researches considering the effect of gradually insertion of fodder in alimentation for the growth rhythm of siberian sturgeon larvae (*Acipenser baeri* Brandt, 1869) reared in superintensive system. U.D.J. Galati, International Symposium Euro-Aliment.

Romanov, A. A., Sheveleva, N.N. (1993) Abnormalities in mor-phogenesis of the Caspian sturgeons. *Rybnoe khozyaistvo* (4) 27-28. (in Russian).

Ruban G.I., Akimova N.V., Goriounova V.B., Mikodina E.V., Nikolskaya M.P., Shagayeva V.G., Shatunovsky M.I. and Sokolova S.A. (2006) Abnormalities in Sturgeon gametogenesis and postembryonal ontogeny // *J. Appl. Ichthyol.* V. 22. Suppl. 1. P. 213-220.

Shagayeva, V. G.; Nikol'skaya, M. P.; Akimova, N. V.; Markov, K. P.; Nikol'skaya, N. G., 1993: Studies of early ontogenesis of sturgeons (Acipenseridae) from the Volga River under 220 G. I. Ruban et al. anthropogenic impact. *Voprosy Ikhtiologii* 33(2), 230-240. (in Russian)

THE EFFECT OF FRUCTOSE ON TURKEY SPERMATOZOA MOTILITY *IN VITRO*

VPLYV FRUKTÓZY NA POHYBLIVOSŤ SPERMIÍ MORIAKOV *IN VITRO*

Slanina T.¹, Miškeje M.², Petrovičová I.², Massányi P.¹

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

²Department of Zoology and Anthropology, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University in Nitra, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra, Slovak Republic

E-mail: slaninatomas@atlas.sk

ABSTRACT

The aim of our study was to analyse the effect of different fructose concentrations: 20 mg.ml⁻¹ – M20; 15 mg.ml⁻¹ – M15; 10 mg.ml⁻¹ – M10; 5 mg.ml⁻¹ – M5 on the turkey spermatozoa motility parameters after an *in vitro* cultivation at 5°C. Semen samples diluted with physiological solution were used as the control. Individual motility parameters were recorded at five time periods: 0, 1, 2, 3, 4 hours. Each sample was evaluated using the Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system. The highest spermatozoa motility of 60.76% was recorded at the time 0 in the control. At the time 0 significantly higher values of motility were observed in the control sample than in the M20 (p<0.05) and M15, M5 (p<0.001) samples. A significantly lower motility (p<0.05) was recorded in the sample M10 in comparison with the control at the time 1 and 4 hours. The samples M15 and M5 showed a significantly lower motility also at the time 2, 3 and 4 hours. A significantly lower progressive motility (p<0.01; p<0.001) was observed after 0 hours of culture in all samples in comparison with the control. Subsequently, similar values in all samples were detected at the next time of cultivation. . Very balanced values of velocity curved line and amplitude of lateral head displacement were detected in all samples. Analysing the beat cross frequency no significant differences were detected. Results of our experimental work suggest that fructose does not have positive effects on the turkey spermatozoa motility parameters when cultured under *in vitro* conditions.

Key words: fructose, turkey, spermatozoa, motility, CASA

Acknowledgments: This work was supported by a VEGA project No. 1/0532/11.

INTRODUCTION

In vitro liquid storage of semen is of practical interest in the management of male turkeys. However, turkey spermatozoa rapidly lose viability and fertilizing capacity when stored either undiluted or diluted at physiological temperatures. In order to maintain the fertilizing ability of *in vitro*-stored spermatozoa, sperm must be pre-cooled to 2–8 °C and diluted in an appropriate extender (Douard et al., 2004). Extenders also provide energy substrates. Therefore, extenders used for avian semen are enriched with carbohydrates (glucose or fructose) and other components likely to provide energy (citrate, glutamate, acetate) (Graham et al., 1982; Christensen, 1995; Thurston, 1995).

In addition, turkey spermatozoa differ from fowl spermatozoa in many aspects of their metabolism and resistance to cooled storage. The metabolism of glucose and acetate are lower in avian than mammalian spermatozoa (Scott et al., 1962). Fructose is formed by turkey spermatozoa from glucose and accumulated in the medium under aerobic conditions (Amir et al., 1985). Most of the extenders provide the requirements for both energy metabolism and buffering capacity. The exogenous substrates added to extenders for turkey semen may not be sufficient or appropriate for the energy needs of gametes during *in vitro* storage (Akçay et al., 2006).

The aim of this study was to analyse the influence of different fructose concentrations on the turkey spermatozoa motility parameters during short *in vitro* cultivation.

MATERIAL AND METHODS

Biological material

In this study semen was obtained by penial massaging of the turkeys of the line Big 6 (BUT – British United Turkeys Ltd., Chester, United Kingdom) aged from 35 to 42 weeks. Semen samples were a mixture of several groups of identical individual turkeys.

Sample preparation

Semen was diluted in a ratio of 1 part of semen and 200 parts of physiological solution (Sodium chloride 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) – Control sample K. At the same ratio the semen was diluted with four different concentrations of fructose solution: 20 mg.ml⁻¹ – M20; 15 mg.ml⁻¹ – M15; 10 mg.ml⁻¹ – M10; 5 mg.ml⁻¹ – M5 diluted in the physiological solution. Samples were cultured at 5°C and recorded at five time periods: 0, 1, 2, 3, 4 hours. The experiment was realized in 6 replicates.

Analytical method

Each of thus prepared samples was evaluated using a Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system – Sperm Vision (Minitub, Tiefenbach, Germany) equipped with a microscope (Olympus BX 51, Japan) to assess the spermatozoa motility. Each sample was placed into Makler Counting Chamber (depth 10 μm , Sefi–Medical Instruments, Germany). Using the turkey specific set up the following parameters were evaluated – total motile spermatozoa (MOT), progressively motile spermatozoa (PRO), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat cross frequency (BCF) in different time periods.

Statistical analysis

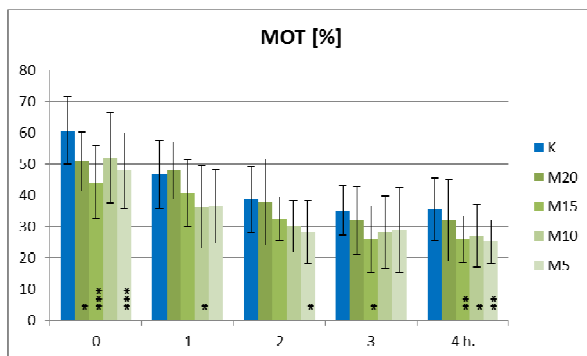
Obtained data were statistically analyzed using PC program Excel and a statistics package SAS 9.1 (SAS Institute Inc., USA) using Student's t-test and Scheffe's test. Statistical significance was indicated by p values of less than 0.05; 0.01 and 0.001.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the spermatozoa motility are shown in *Tab. 1*. The highest motility of 60.76 % was recorded at the time 0 h. in the control sample – K. This value was significantly higher than in the samples M20 ($p < 0.05$) and M15, M5 ($p < 0.001$). With increasing time of cultivation a gradual decline in all samples was observed. A significantly lower motility ($p < 0.05$) was recorded in the sample M10 when compared to the control at the time 1 and 4 h. The samples M15 and M5 showed a significantly lower motility ($p < 0.05$; $p < 0.01$) also at the time of 2, 3 and 4 hours.

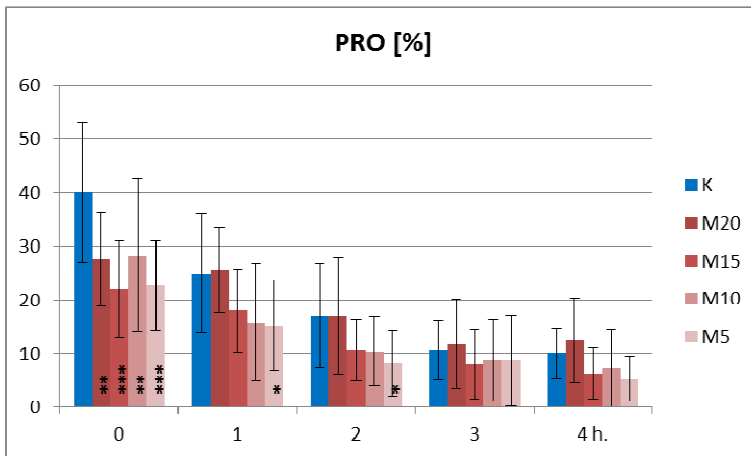
These results are in accordance with results of Amir et al. (1985), who obtained no consistent results as to the effect of fructose on the motility of turkey spermatozoa. . On the other hand, an adverse effect was obtained when the spermatozoa were suspended in a medium containing fructose. The sperm motility was not affected when the fructose in the medium was formed from glucose.

*Tab. 1 Spermatozoa motility (in %) in groups with different concentrations of fructose and time periods [hours]. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.*



The highest progressive spermatozoa motility (39.96 %) was detected in the sample K at the beginning of cultivation (*Tab. 2*). When compared the experimental groups to the control sample, significantly lower values ($p<0.01$; $p<0.001$) were observed after 0 hours of culture in all samples. Significantly ($p<0.05$) decreased values were observed in the sample M5 when compared to the control sample at the time of 1 and 2 hours.

*Tab. 2 Spermatozoa progressive motility (in %) in groups with different concentrations of fructose and time periods [hours]. Significant differences * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.*

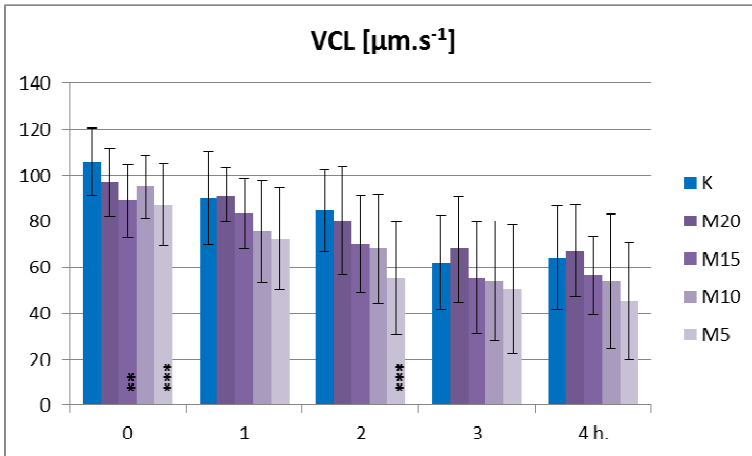


Analysis of velocity curved line (VCL) between samples M20, M10 and control revealed no significant differences (*Tab. 3*). Non-significant differences were found also for other fructose groups after 1, 3 and 4 hours of cultivation. Significantly lower values ($p<0.001$) were observed in the sample M5 when compared to the control at the time of 0 and 1 h. VCL was significantly lower ($p<0.01$) in the M5 sample at the time 2 h.

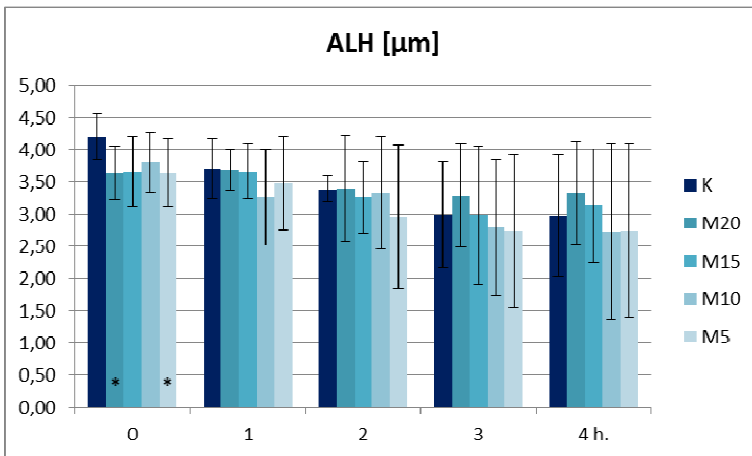
Very balanced values of amplitude of lateral head displacement (ALH) were detected in all samples (*Tab. 4*). Significantly ($p<0.05$) lower values were detected only at the time 0 hours in samples M20 and M5.

Analysing the beat cross frequency (BCF, *Tab. 5*) significant differences were not detected. Very equal values were observed in all tested samples.

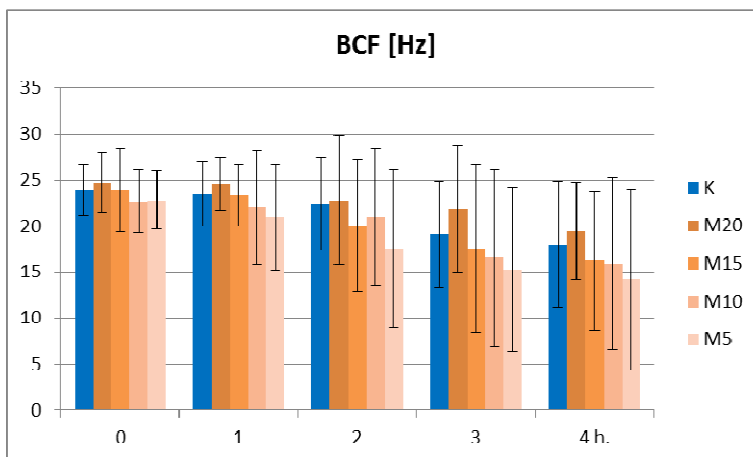
Tab. 3 Velocity curved line (in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) in groups with different concentrations of fructose and time periods [hours]. Significant differences * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.



Tab. 4 Amplitude of lateral head displacement (in μm) in groups with different concentrations of fructose and time periods [hours]. Significant differences * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.



Tab. 5 Beat cross frequency (in Hz) in groups with different concentration of fructose and time periods [hours]. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



A similar tendency was detected also in other species. Sarıözkan et al. (2012) evaluated the effects of different sugar supplementations on the rat spermatozoa motility at 0 and 12 h after chilling. No significant difference was observed in any of the parameters evaluated at 0 h, before storage ($p > 0.05$). After 12 h of storage, all sugar additives led to statistically higher motility in comparison to the control group. In conclusion, raffinose, trehalose and fructose provided a better protection of sperm functional parameters against chilling injury, in comparison to the control group.

In the study of Rigau et al., (2001) total motility of canine fresh ejaculates was 70%, and progressively decreased to 35% after incubation for 60 min in a medium without sugars. Similar results were observed when the cells were incubated in the presence of 10 mM glucose or 10 mM fructose, although fructose slightly increased the total motility to about 45% at 60 min. A progressive increase of BCF was observed in spermatozoa incubated without hexoses. The addition of 10 mM fructose, but not 10 mM glucose, prevented this increase for at least 60 min. This difference was maintained when spermatozoa were incubated in increasing concentrations of monosaccharides.

Analysis of the influence of different energetic substrates used in culture media on the bovine spermatozoa motility was the aim of Kňačická et al. (2010). In the medium with the addition of fructose the spermatozoa motility significantly increased ($p < 0.001$) after immediate dilution of the sample. With increasing time of cultivation this difference began to be reduced ($p < 0.01$). After 24 h cultivation no significant differences were recorded. Progressive motility copied the tendency of spermatozoa motility as the medium with the addition of fructose reached significantly ($p < 0.001$) higher values at time 0 and 1h, but after 24 hours of cultivation the progressive motility was significantly ($p < 0.05$) higher in the control sample.

CONCLUSION

The selected spermatozoa mobility parameters (MOT, PRO, VCL, ALH, BCF) were found to be balanced or significantly lower in all tested samples. Results of our experimental work suggest that fructose does not have positive effects on turkey spermatozoa motility parameters when cultured under *in vitro* conditions in comparison to the control diluted with physiological solution.

REFERENCES

- Akçay E., Varisli Ö., Tekin N. (2006): Fertilizing ability of turkey semen diluted with simple sugar-based extenders after cooled storage. EPC 2006 - XII European Poultry Conference. Verona: World Poultry Science Association.
- Amir D., Pinto O., Schindler H., Hurwitz S. (1985): Metabolism and motility of turkey (Meleagris gallopavo) spermatozoa in the presence or absence of oxygen, glucose and fructose. Comparative biochemistry and physiology, 80(3): 325-327.
- Christensen V. (1995): Diluent, dilution, and storage of poultry semen for six hours. Proceedings of the First International Symposium on Artificial Insemination of Poultry, Illinois: Savoy, 1995, p. 90-106. ISBN 0-9649811-0-6.
- Douard V., Hermier D., Magistini M., Labbé C., Blesbios E. (2004): Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61(1): 1-13.
- Graham E.F., Nelson D.S., Schmehl M.K. (1982): Development of extender and techniques for frozen turkey semen. 1. Development. Poultry Science, 61(3): 550-557.
- Kňazická Z., Tvrďá E., Kerti A., Bulla J., Massányi P., Lukáč N. (2010): Influence of energy components to culture media on the bovine sperm motility parameters *in vitro*. Acta fytotechnica et zootechnica, 13(1): 1-6.
- Rigau T., Farré M., Ballester J., Mogas T., Peña A., Rodríguez-Gil J. E. (2001): Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology, 56(5): 801-8015.
- Sarıözkan S., Bucak M. N., Canturk F., Özdamar S., Yay A., Tuncer P. B., Özcan S., Sorgucu N., Caner Y. (2012). The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 °C. Cryobiology, 65(2): 93-97.
- Scott T. W., White I. G., Annison E. F. (1962): Glucose and acetate metabolism by ram, bull, dog and fowl spermatozoa. Biochemical Journal, 83(2): 398-404.
- Thurston R. (1995): Storage of poultry semen above freezing for twenty-four to forty-eight hours. Proceedings of the First International Symposium on Artificial Insemination of Poultry. Illinois: Savoy, 1995, p. 107-122. ISBN 09-649-81106.

FACTORS INFLUENCING CANINE SOCIAL INTERACTIONS

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SOCIÁLNÍ INTERAKCE PSŮ

Šedivá M., Řezáč P.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: sediva-michaela@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of the study was to examine the effect of factors on social interactions of dogs. Observations included 206 pairs of dogs kept on a leash and 206 pairs of dogs kept off a leash. Dogs were different breeds, sizes and degree of training. The gender of the dog had an effect not only on sniffing and marking, but also on play. The influence of a leash on play and sniffing was also found. Play and sniffing were observed more frequently in dogs off a leash than in dogs on a leash. These findings can help to predict behavior of randomly met dogs and to provide a base for future research in the area.

Key words: dog, behavior, communication

Acknowledgments: This work was supported by the grant of the Czech Ministry of Education No. MSM 6215648905.

ÚVOD

V dnešní době jsou psi nedílnou součástí lidské společnosti. Nebereme je jen jako pomocníky při lovu zvěře nebo ochraně majetku, ale také jako společníky. Doprovázejí nás na procházkách, které jsou ze zdravotního hlediska důležité nejenom pro psa, ale také pro majitele. Pes potřebuje pohyb k posílení svalového aparátu, vydání nadbytečné energie, využití vrozených vlastností a kontaktu s ostatními příslušníky svého druhu. Na veřejných prostranstvích pak dochází k setkání cizích psů, kteří mezi sebou různým způsobem komunikují. Jelikož je pes smečkové zvíře, vyvinul se u něho široký repertoár signálů, který slouží k vyjádření toho, co chce sdělit. Konkrétně jde o zvukové projevy, výraz tváře a postoj těla. Protože ne všichni majitelé psů rozumí signálům, které jejich psi vysílají, může v některých případech dojít k napadení druhého psa či dokonce člověka.

Poznatky v oblasti komunikace psů nám mohou pomoci při předvídání chování u náhodně se potkávajících psů a mohou být i podkladem pro další výzkum v této oblasti. Zároveň jestliže budeme schopni tyto poznatky předat široké veřejnosti, může to vést ke zlepšení vztahu mezi majitelem a psem, kterému pak nebudeme nevědomky způsobovat stres z nepochopení jeho chování.

MATERIÁL A METODIKA

Pozorování interakcí psů a zjišťování faktorů, které je ovlivňují, bylo prováděno pomocí dvou experimentů. Předběžná studie sloužila k určení faktorů a jejich vlivu na vzájemné interakce psů. Probíhala ve městě Náchodě, kde byly vhodné podmínky pro pozorování. Sledováno bylo 40 dvojic psů. Pro dostatečné posouzení chování psů bylo vše natáčeno na video a následně vyhodnoceno.

Hlavní experiment probíhal od října 2010 do prosince 2011 v Brně. Pozorováno bylo 412 dvojic psů, z nichž polovina byla vedena na vodítku a druhá polovina na volno. Sledování probíhalo na místech s vyšší frekvencí výskytu psů. Vzájemné interakce psů byly pozorovány od chvíle, kdy si jeden pes všiml druhého. Sledování bylo přerušeno ve chvíli, kdy majitel nebo pes, ukončil komunikaci. Bylo sledováno vzájemné očíhávání, značení a hra. Pozorovatel žádným způsobem neovlivňoval chování psa ani chování majitele. U pozorovaných dvojic byl sledován vliv následujících faktorů: způsob vedení psa (na vodítku/na volno), pohlaví psa (pes/fena), pohlaví majitele (muž/žena), velikost psa (malý/střední/velký) a věk psa (starý/dospělý/štěně). Statistické vyhodnocení vlivu faktorů na jednotlivé druhy chování bylo provedeno chí-kvadrát testem v rámci statistického programu SAS. Za průkazné rozdílly byly brány výsledky s $P < 0,05$.

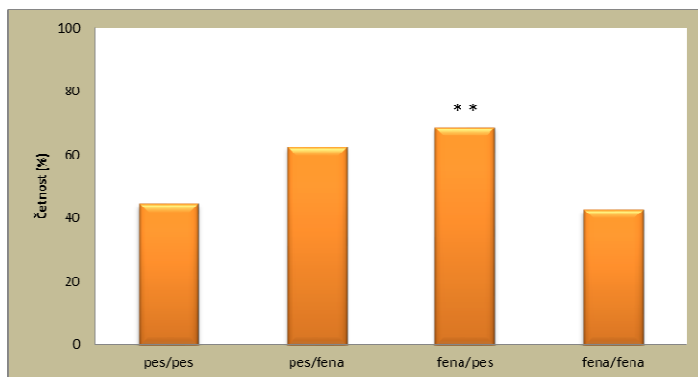
VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo sledováno 412 psů vedených na volno a 412 psů vedených na vodítku, kde početní zastoupení psů při sledování jednotlivých faktorů je zachyceno v tabulce 1.

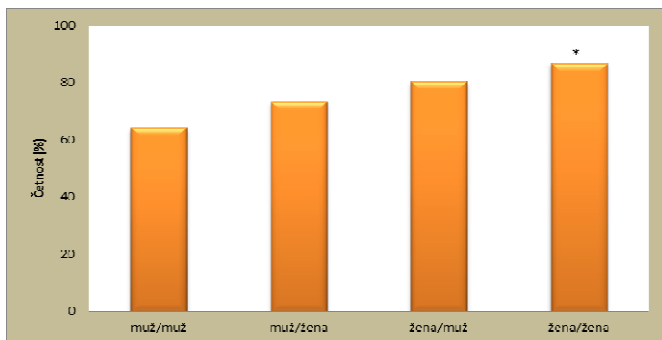
Tab. 1 Celkové počty psů rozděleny podle sledovaných faktorů

	Pohlaví psa		Věk			velikost			pohlaví majitele	
	Pes	fena	štěně	dospělý	starý	malý	střední	velký	muž	žena
Na volno	177	235	55	311	46	112	98	202	177	235
	42,7%	57,3%	13,4%	75,5%	11,1%	27,2%	23,8%	49,0%	43,0%	57,0%
Celkem	412 (100%)		412 (100%)			412 (100%)			412 (100%)	
Na vodítku	175	237	41	305	66	131	123	158	157	255
	42,5%	57,5%	10,0%	74,0%	16,0%	31,8%	29,9%	38,3%	38,1%	61,9%
Celkem	412 (100%)		412 (100%)			412 (100%)			412 (100%)	

Psi mají výborně vyvinutý čich a pachové signály jsou pro ně velice důležité. Očicháváním moče a výkalů totiž dokáží získat mnoho informací o jedinci, který značku zanechal (Bailey, 2003). Exkrementy v sobě obsahují pachovou informaci charakteristickou pro daného jedince, poukazují na to, v jakém reprodukčním stádiu se daný jedinec nachází a zda se jedná o fenu či psa. Dále jsou ukazatelem zdravotního stavu a dokonce vyjadřují dominantní postavení psa (Arakawa et al., 2008). Vzájemné očichávání můžeme pozorovat takřka při každém setkání psů. Z výsledků vyplývá, že k očichávání docházelo častěji mezi psy různého pohlaví (obr. 1). To je v souladu se zjištěním Řezáče et al. (2011).

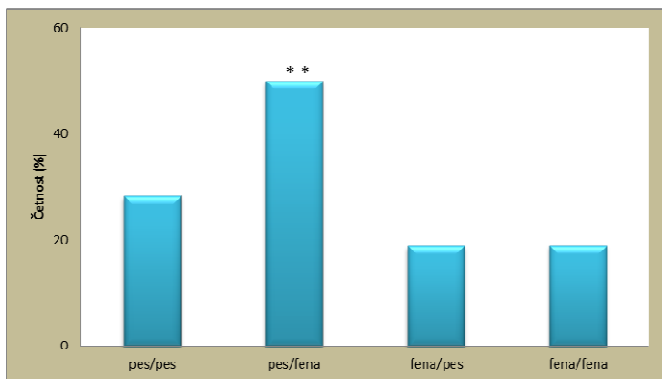
Obr.1 Vliv pohlaví na očichávání psů při vedení na vodítku (** $P < 0,012$)

Dalším faktorem, který ovlivňuje očichávání psů je pohlaví majitele. Bylo zjištěno, že průkazně častěji docházelo k očichávání u psů v přítomnosti ženy (obr. 2). Tento jev by se dal vyložit tím, že ženy jsou komunikativnější než muži, často se na procházkách zapovídají a dávají tak prostor pro interakce psů.

Obr. 2 Vliv pohlaví majitele na očichávání psů při vedení na volno (** $P < 0,02$)

Posledním, námi zjištěným faktorem, který ovlivňoval očichávání psů, byl způsob jejich vedení. U psů vedených na volno bylo pozorováno očichávání v 39% případech a u psů vedených na vodítku v 27% případech ($P < 0,001$). Majitelé, při vedení psů na vodítku, často očichávání psů zamezují, protože jim např. očichávání genitálií přijde neslušné. Z našich výsledků vyplývá, že očichávání je nedílnou součástí komunikace psů, které bychom neměli zamezovat. Jak uvádí Abrantes (1999), očichávání je základní rituál při setkání dvou psů.

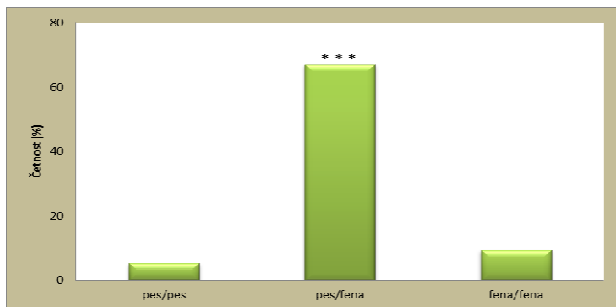
Na značení u psů mělo vliv jejich pohlaví (obr. 3), kdy psi značili významně častěji, než feny, přičemž četnost jejich značení se zvyšovala v přítomnosti fen. Pal (2002), který prováděl sledování u divoce žijících psů, uvádí, že četnost značení je ovlivněna přítomností jiných psů, což je v souladu s naším zjištěním.

Obr. 3 Vliv pohlaví na značení psů při vedení na vodítku (** $P < 0,008$)

Hra je vážná činnost, kdy štěněta odhalují slabé a silné stránky svých sourozenců, zlepšují si koordinaci pohybů a osvojují si lovecké dovednosti (Bower, 1998). Před začátkem hry se jeden ze

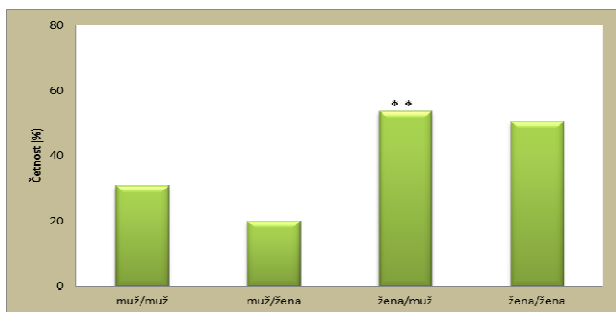
dvojice psů snaží nejprve získat vizuální pozornost druhého psa a poté následuje chování, které značí výzvu ke hře (Horowitz, 2008). Prostřednictvím hry zažívají psi konflikty, které by měly katastrofální následky, kdyby byly brány vážně. Výsledkem toho všeho je, že štěně získává důležité poznatky samo o sobě a o svém okolí (Bauer a Smuts, 2006). Pro vývoj sociálního chování, je hra velice důležitá. Stabilizuje sociální postavení zvířat a díky ní vzniká náklonnost, která ustaluje strukturu smečky (Mikulica, 1991). V našem sledování bylo logicky zjištěno, že na výskyt hry má vliv věk psa, kdy štěňata si hrála mnohem častěji než ostatní věkové kategorie psů. Dále pak bylo zjištěno, že hru také ovlivňuje pohlaví psů, kdy jedinci opačného pohlaví si hráli průkazně častěji než jedinci stejného pohlaví (obr. 4).

Obr. 4 Vliv pohlaví na hru psů při vedení na vodítku (** $P < 0,001$)



Pohlaví majitele bylo dalším faktorem, který ovlivňoval hru psů. Při setkání dvojic, kde byly přítomny ženy, se hra vyskytovala v mnohem větší míře, než když byli přítomni jen muži (obr. 5).

Obr. 5 Vliv pohlaví majitele na hru psů při vedení na volno (** $P < 0,005$)



Výskyt hry u psů je také ovlivněn způsobem vedení. V pokusu bylo zjištěno, že z celkového počtu 30% hrajících si psů bylo 21% vedeno na volno a 9% vedeno na vodítku. Psi pohybující se na volno si tedy hráli průkazně častěji ($P < 0,001$) než psi vedení na vodítku. Toto zjištění podporuje i Pal (2008).

ZÁVĚR

Dosud bylo uveřejněno jen málo studií založených na pozorování interakcí psů na veřejných prostranstvích. S narůstajícím počtem chovatelů psů a tedy i se zvyšujícím se počtem jejich náhodných setkání na veřejných prostranstvích, je důležité prohlubovat znalosti o chování psů, aby se jejich jednání dalo předvídat a díky tomu se mohly eliminovat nežádoucí střety mezi psy. Naše výsledky prokázaly, že vzájemné interakce mezi psy ovlivňuje řada faktorů. Na očichávání mělo vliv pohlaví psů, pohlaví majitele a způsob vedení. Na značení mělo vliv pohlaví psů. Výskyt hry byl ovlivněn věkem a pohlavím psa, pohlavím majitele a způsobem vedení.

LITERATURA

- Abrantes R., 1999: *Řeč psů: Encyklopedie psího chování*. Dona, České Budějovice, 230 s.
- Arakawa H., Blanchard D. C., Arakawa K., Dunlap C. H., Blanchard R. J., 2008: Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neuroscience&Biobehavioral Reviews*, 32: 1236–1248.
- Bailey G., 2003: *Pes a jeho řeč*. Ottovo nakladatelství, Praha, 96 s.
- Bauer E. B., Smust B. B., 2006: Cooperation and competition during dyadic play in domestic dogs, *Canis familiaris*. *Animal Behaviour*, 73: 489–499.
- Bower J., Bower C., 1998: *Psi: Praktický rádce chovatele psů*. Columbus, Praha, 208 s.
- Horowitz A., 2008. *Attention to attention in domestic dog (Canis familiaris) dyadic play*. Springer-Verlag, 118 s.
- Mikulica V., 1991: *Poznej svého psa: Etologie a psychologie psa*. Dialog, Liberec, 312 s.
- Pal S. K., 2002: Urine marking by free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to sex, season, place and posture. *Applied Animal Behaviour Science*, 80: 45–59.
- Pal S. K. 2008. Maturation and development of social behaviour during early ontogeny in free-ranging dog puppies in WestBengal, India. *Applied Animal Behaviour Science*, 111: 95-107.
- Řezáč P., Viziová P., Dobešová M., Havlíček Z., Pospíšilová D., 2011: Factors affecting dog–dog interactions on walks with their owners. *Applied Animal Behaviour Science*, 134: 170-176.

THE FOOD PREFERENCES OF ASIAN LADY BEETLE *HARMONIA AXYRIDIS*

POTRAVNÍ PREFERENCE SLUNÉČKA VÝCHODNÍHO *HARMONIA AXYRIDIS*

Šenkeříková P.¹, Nedvěd O.^{2,3}

¹Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

³Institute of Entomology, Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

E-mail: xsenkeri@node.mendelu.cz, nedved@prf.jcu.cz

ABSTRACT

Survey of food preferences of Asian ladybird *Harmonia axyridis* included two-choice and no-choice tests. Wingless females of aphids *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae cirsiacanthoidis* and *Aphis sambuci* were offered to twenty-four hours starving ladybirds. No-choice tests we conducted only with adults. We gave them 20 individuals of one aphid species and we found that ladybirds fed most number of *A. pisum*. In two-choice test, we combined pairs of studied species: *A. f. cirsiacanthoidis* × *A. pisum*, *A. pisum* × *A. sambuci*, *A. sambuci* × *A. f. cirsiacanthoidis*. We put 10 aphids of each of the two species combined into a plastic Petri dish and then we introduced one ladybird adult or larva. We made 20 replicates with adults. We found that there was statistical difference only in the combination *A. sambuci* vs. *A. f. cirsiacanthoidis*, where males consumed more individuals of the toxic aphid *A. sambuci*. For this combination, we then made 20 replicates with larvae who preyed in contrast with males more of the suitable food *A. f. cirsiacanthoidis* than toxic *A. sambuci*. We also studied the influence of contrasting background on food choice in adults. We used both tests and all combinations. We found that females did not prefer any aphid species, except for the black *A. f. cirsiacanthoidis* being consumed more often than the green *A. pisum* on black background. Because they consumed much more *A. pisum* in no-choice experiment on both backgrounds, the difference in choice experiment is very strong and its polarity surprising.

Key words: ladybird, Coccinellidae, *Harmonia axyridis*, prey, aphid

Acknowledgments: The study was supported by grant No. QH82047 from the Ministry of Agriculture.

ÚVOD

Harmonia axyridis Pallas, 1773 je slunéčko náležící k tribu Coccinellini z čeledi Coccinellidae. Oblastí jeho původu je Asie s pravděpodobným rozšířením od pohoří Altaj na západě k pobřeží Tichého oceánu na východě a od jihu Sibíře na severu až po jižní Čínu na jihu (Koch 2003). Mezi lety 1916 až 2003 se pro svou vysokou žravost a plodnost stalo hojně vyhledávaným predátorem využívaným v biologické ochraně rostlin (Brown et al. 2008, Vondrášková 2009). Za účelem regulace mšic a červců bylo záměrně introdukováno v Severní Americe i Evropě. Komerčně využívaní jedinci pocházeli z laboratorních chovů, proto se nepředpokládalo jejich okamžité přizpůsobení vnějším podmínkám. V průběhu několika let se však začala *H. axyridis* usazovat ve volné přírodě a následně se migrací rozptylovat do nových zemí. Ke zvýšení hodnoty fitness, lepší lokální adaptaci a rychlejšímu tempu růstu populace přispěli přeživší jedinci, u nichž došlo k postupnému odstranění škodlivých recesivních alel. Po dosažení nosné kapacity prostředí se zvýšila míra rozptylu a došlo k disperzi jedinců za novými zdroji (Brown et al. 2008). Studie tohoto druhu ukázaly, že kromě schopnosti slunéčka rychle osidlovat velké plochy se také často stává dominantním druhem v mšičožravém cechu (Adriaens 2003).

Potravní spektrum *Harmonia axyridis* je velmi široké, živí se zástupci hmyzích skupin Aphididae, Psyllidae, Coccoidea, Tetranychidae, nedospělými stadii Chrysomelidae, Curculionidae, Lepidoptera, popřípadě pylem, nektarem a zralými plody ovoce (Koch 2003). Laboratorně prováděnými pokusy a pozorováními ve volné přírodě bylo zjištěno, že jsou slunéčka schopna reagovat na pach zdravých i mšicemi napadených listů. Čichové podněty jim pomáhají vybírat místa s pravděpodobným výskytem mšic. Zaznamenána byla také schopnost *H. axyridis* používat vizuální podněty, jako je pohled na zelené listy (Obata 1997). Nicméně toto se v dalších pokusech nepotvrdilo. Harmon et al. (1998) použili pro výzkum vnímání barev růžové a zelené morfotypy mšice *Acyrtosiphon pisum* v kombinaci s bílým, červeným a zeleným pozadím. Výsledky jejich pokusů ukazují, že spotřeba mšic obou barev slunéčkem *H. axyridis* nezávisela na barvě pozadí. Ve všech případech pozřelo více růžových mšic, což napovídá tomu, že se spíše než zrakovými podněty řídí jinými smysly.

Smyslové vnímání kořisti *H. axyridis* má také vliv na pářící chování a kladení vajíček. Páření schopní samci míjejí často kolonie mšic bez povšimnutí a pravděpodobně je využívají jako signalizaci přítomnosti samic. Za nepříznivých potravních podmínek odmítají samičky *H. axyridis* kopulaci daleko častěji než samice, které mají potravy nadbytek. Vysvětlením může být snaha zachování energie a času při vyhledávání další potravy (Obata 1997), ale i fakt, že pokud by byly samičky oplozeny a kladly vajíčka v blízkosti slábnoucí populace mšic, vylíhlé larvy by

v důsledku vyhladování nepřežily (Koch 2003). Larvy *H. axyridis* mohou za celý svůj vývoj pozřít 600 až 1 000 mšic. Dospělci konzumují v průměru 70 až 90 mšic za den (Andrýsová 2008). Nicméně v těchto údajích se jednotliví autoři liší, např. podle Vondráškové (2009) může dospělec zkonsumovat 90 až 270 mšic za den, Koch (2003) zase uvádí hodnoty pro dospělé od 15 do 65 mšic s tím, že samice zkonsumují více potravy než samci, přičemž záleží na druhu kořisti. Přesto, že je *H. axyridis* polyfág, byly pro něj některé druhy kořisti shledány rovněž jako toxické, např. mšice *Aulacorthum magnoliae* Essig a Kuwana, 1918; *Aphis sambuci* Linnaeus, 1758 nebo *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hodek, Evans 2012).

Naše studie, v rámci kterých jsme sledovali míru potravní preference sluněčka *Harmonia axyridis* pro tři druhy mšic s rozdílnou nutriční hodnotou, probíhaly od 26.5.2011 do 17.6.2011 formou laboratorních pokusů. Výzkumy byly prováděny na Katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

MATERIÁL A METODIKA

Pro realizaci pokusů jsme použili:

- Dospělce *Harmonia axyridis*, které jsme sbírali na keřích v okolí Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Chycené jedince jsme shromažďovali ve sklenici o objemu 0,5 l a poskytovali jim buničinu s vodou a potravu. Sklenici jsme umístili do inkubátoru s nastavenou teplotou $25 \pm 0,5$ °C a fotoperiodou 18L:6D. Před zahájením pokusu jsme odebrali stejný počet samců i samic a umístili je zvlášť do velkých Petriho misek. Takto oddělené jedince jsme nechali 24 hodin hladovět, aby se maximalizovala jejich motivace shánět si potravu.
- Larvy *Harmonia axyridis* ve čtvrtém instaru, které pocházely z laboratorních chovů udržovaných na mšici *Acyrtosiphon pisum*. Abychom měli jistotu, že jsou všechny larvy zahrnuté do pokusů stejně staré, odebrali jsme z chovu larvy třetího instaru a umístili je zvlášť do malých Petriho misek. Larvy jsme pravidelně kontrolovali a po dobu, než se svlékly do instaru čtvrtého, jsme je krmili běžnou stravou. Čerstvě svlečené jedince jsme nechali 24 hodin hladovět.
- Bezkrídle samice tří druhů mšic: kyjatka hrachová *Acyrtosiphon pisum*, mšice pustorylová *Aphis fabae cirsiacanthoidis* náležící k široce variabilnímu druhu *Aphis fabae*, mšice bezová *Aphis sambuci*

Pro výzkum potravní preference jsme zvolili dvouvýběrový a nevýběrový test. Dvouvýběrový test jsme využili k určení míry preference, jakou vykazují dospělci a larvy *H. axyridis* pro jednotlivé druhy kořisti. V rámci tohoto testu jsme vytvořili dvojice zkoumaných druhů: *A. f. cirsiacanthoidis* × *A. pisum*, *A. pisum* × *A. sambuci*, *A. sambuci* × *A. f. cirsiacanthoidis*. Do středně velkých (9 cm) plastových Petriho misek jsme od každého druhu mšice z testované dvojice vložili 10 jedinců

(dohromady 20 mšic) a k nim přidali po jednom dospělci nebo larvě sluněčka. S dospělci jsme pro každou dvojici vytvořili 20 opakování, tzn. 10 opakování se samicemi a 10 opakování se samci (ve všech opakováních bylo souhrnně použito 60 dospělců). Larvy jsme pozorovali pouze v kombinaci *A. f. cirsiacanthoidis* × *A. sambuci* a vytvořili jsme s nimi 20 opakování.

Nevýběrový test jsme zakládali současně s výběrovým testem. Sloužil nám k ověření množství zkonzumované potravy. Použity byly stejné postupy jako u dvouvýběrového testu až na to, že jsme každému dospělci poskytli 20 samic od jednoho druhu mšice. Nevýběrový test jsme uskutečnili pouze s dospělci. Kromě pokusů prováděných bez podkladu (průhledné dno Petriho misek) jsme vytvořili také opakování s černou a zelenou podložkou. Vliv kontrastního prostředí na výběr potravy jsme sledovali jen u dospělců. Využili jsme oba testy a všechny kombinace.

Dvouvýběrový i nevýběrový test probíhal v inkubátoru při 25 °C, osvětlení a po dobu 6 hodin. Zkonzumované mšice nebyly během pokusu doplňovány novými. Po uplynutí stanoveného času jsme nejprve ze všech misek odebrali predátory a následně spočítali množství zkonzumované kořisti. Spočítali jsme počet mšic každého druhu, které byly zkonzumovány částečně, počet mšic, které byly vysáty, přičemž kutikulu sluněčko nekonzumovalo, a počet netknutých mšic. Počet mšic zcela zkonzumovaných byl vypočten jako rozdíl počtu mšic do pokusu vcházejících a počtů jednotlivých výše spočítaných kategorií na konec pokusu. Navíc jsme spočítali počet tzv. ekvivalentních zkonzumovaných mšic, což byl počet mšic zcela zkonzumovaných plus polovina počtu mšic zkonzumovaných částečně plus polovina mšic vysátých.

VÝSLEDKY

V nevýběrovém testu zkonzumovali samci přibližně stejné množství potravy jako samice (4,3 ekvivalentní mšice, $Z < 0,01$; $p > 0,99$) s tím rozdílem, že samice měly tendenci požírat mšice celé, zatímco samci je ve většině případů jen vysávali, takže kutikula mšic zůstávala obvykle nedotčená (4,4 mšice na samce, 1,6 mšice na samici, $Z = 3,31$; $p = 0,0009$). V nevýběrovém experimentu požírali dospělci nejvíce mšice *Acyrtosiphon pisum* (6,6 ekvivalentní mšice), následovala mšice *Aphis fabae cirsiacanthoidis* (3,7 ekvivalentní mšice) a nejméně konzumovali mírně toxickou mšici *Aphis sambuci* (2,8 ekvivalentní mšice, Graf 1). Rozdíly mezi druhy mšic byly velmi významné ($H(2, N = 60) = 24,3$; $p < 10^{-4}$). Z celkového počtu zabitých mšic dospělci vysáli v průměru 58 % jedinců mšice *A. pisum*, 26 % *A. f. cirsiacanthoidis* a 48 % *A. sambuci*.

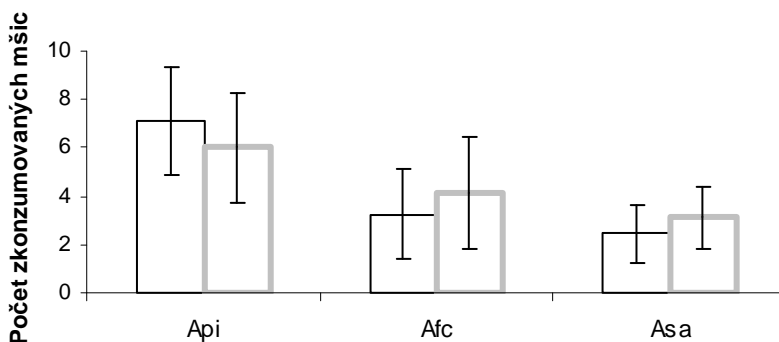
Ve dvouvýběrových testech jsme zaznamenali významný rozdíl pouze u kombinace *Aphis sambuci* vs. *Aphis fabae cirsiacanthoidis*, kde samci konzumovali více toxické mšice *A. sambuci* než *A. f. cirsiacanthoidis* (1,7 vs. 0,7 ekvivalentní mšice, $Z = 2,01$; $p = 0,04$). Ve zbylých kombinacích nepreferovali dospělci žádnou z přítomných mšic (Graf 2). Kombinaci *A. sambuci* vs. *A. f. cirsiacanthoidis* jsme použili také pro larvy, které požíraly narozdíl od dospělců podstatně více *A. f. cirsiacanthoidis* než *A. sambuci* (1,9 vs. 0,8 ekvivalentní mšice, $Z = 2,71$; $p = 0,0066$). Larvy konzumovaly většinou celé mšice.

Při porovnání jednovýběrových a dvouvýběrových testů jsme zjistili, že celkové množství zkonzumovaných mšic v rámci kombinací dvouvýběrových testů bylo přibližně stejné jako průměry obou mšic v nevýběrových testech (5,0 ekvivalentní mšice u *A. pisum* + *A. f. cirsiacanthoidis*, 4,4 ekvivalentní mšice u *A. pisum* + *A. sambuci* a 2,9 ekvivalentní mšice u *A. f. cirsiacanthoidis* + *A. sambuci*). Sání jako způsob konzumace bylo opět méně časté u *A. f. cirsiacanthoidis* než u dalších dvou druhů.

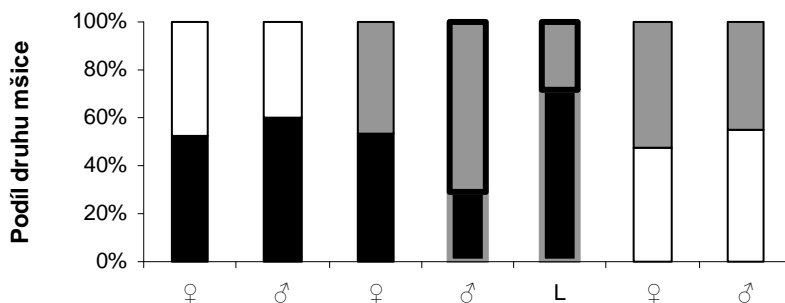
V nevýběrových testech, které jsme pro slunéčko *Harmonia axyridis* vytvořili s barevnými podložkami, se od sebe počty ekvivalentních mšic zkonzumovaných samicemi příliš nelišily: 7,9 (zelená) a 7,3 (černá) u mšice *A. pisum*, 4,3 a 4,5 u mšice *A. f. cirsiacanthoidis* a 3,3 a 2,7 u mšice *A. sambuci*. Stejně tomu bylo při porovnání nevýběrových testů s barevnými podklady a bez nich.

Ve dvouvýběrových testech, kde jsme použili barevné podklady, nevykazovaly samice *H. axyridis* preferenci pro žádné druhy mšic podobně jako u dvouvýběrových testů bez barevných podkladů. Výjimku tvořila černá mšice *A. f. cirsiacanthoidis*, která byla na černém podkladu konzumována daleko častěji než zelená mšice *A. pisum* (5,6 ekvivalentní mšice a 2,9 ekvivalentní mšice, $Z = 3,20$; $p = 0,0014$, Graf 3). Podobně jako v předchozím experimentu vykazovala slunéčka stejný poměr vysátých a zcela zkonzumovaných mšic.

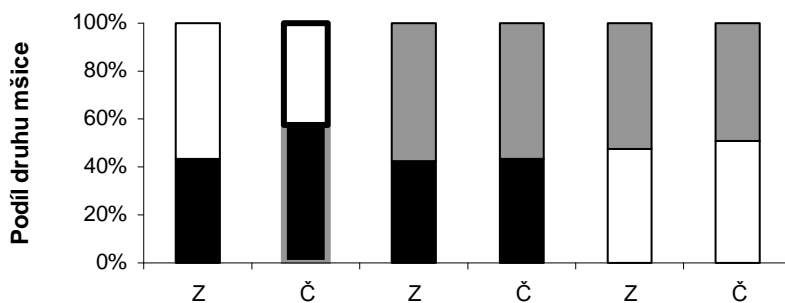
Graf 1 Průměrný počet ($\pm SD$) mšic Acyrthosiphon pisum (Api), A. f. cirsiacanthoidis (Afc), Aphis sambuci (Asa) konzumovaných samci (vlevo) a samicemi (vpravo, šedý sloupec) slunéčka Harmonia axyridis v nevýběrových testech, během 6 hodin (upraveno podle Šenkeříková a Nedvěd, 2012).



Graf 2 Poměr mšic *Acyrtosiphon pisum* (bílá), *A. f. cirsiacanthoidis* (černá), *Aphis sambuci* (šedá) zkonsumovaných samicemi (♀), samci (♂) a larvami (L) sluněčka *Harmonia axyridis* ve dvouvýběrových testech, během 6 hodin. Kombinace s významnými odchylkami do 50 % jsou orámované (upraveno podle Šenkeříková a Nedvěď, 2012).



Graf 3 Poměr mšic *Acyrtosiphon pisum* (bílá), *A. f. cirsiacanthoidis* (černá), *Aphis sambuci* (šedá) zkonsumovaných samicemi sluněčka *Harmonia axyridis* ve dvouvýběrových testech se zelenými (Z) a černými (Č) podklady, během 6 hodin. Kombinace s významnou odchylkou do 50 % je orámovaná (upraveno podle Šenkeříková a Nedvěď, 2012).



ZÁVĚR

Množství mšic jednotlivých druhů (*Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae cirsiacanthoidis* a *Aphis sambuci*), zkonzumovaných sluněčky *Harmonia axyridis* během nevyběrového testu, bylo výrazně odlišné což by mohlo poukazovat na jejich různou vhodnost či oblíbenost. Sluněčka upřednostňovala především mšici *A. pisum*, nicméně v nevyběrových testech, kde jsme použili barevné podklady, byla černá mšice *A. f. cirsiacanthoidis* na černém podkladu konzumována překvapivě častěji než zelená mšice *A. pisum*. V souladu s našimi předpoklady byla toxická mšice bezová (*A. sambuci*) konzumována nejméně. Dále z výsledků vyplývá, že samci zkonzumovali přibližně stejné množství potravy jako samice s tím rozdílem, že samice měly tendenci požírat mšice celé, zatímco samci je ve většině případů jen vysávali.

Ve dvouvýběrových testech většinou nevyšel rozdíl mezi mírou konzumace různých druhů mšic. Sluněčka nebyla schopná rozpoznat jejich vhodnost a nekopírovala množství zkonzumované v nevyběrovém testu. Statisticky významný byl jediný rozdíl, kdy samci konzumovali více toxické mšice *A. sambuci* než *A. f. cirsiacanthoidis*, zatímco larvy naopak méně. Vysvětlujeme si to tak, že samcům stačí k přežití i méně vhodná potrava, zatímco larvy k vývoji musejí mít potravu kvalitní. Vyšší konzumace toxické mšice *A. sambuci* byla zaznamenána také při studiu potravní preference sluněčka sedmitečného *Coccinella septempunctata* (Nedvěd a Salvucci 2008). Je možné, že tato mšice spoléhá na svou toxicitu a má méně vyvinuté další obranné mechanismy, takže v krátkém pokusu, než se toxicita projeví fyziologicky, je snadněji lovena. Význam má zřejmě v první řadě obranná reakce a mobilita kořisti, energetické náklady a rizika, která souvisí s ulovením kořisti (Provost et al. 2006) a až poté chuť spolu s výživovou hodnotou (Hodek 1993).

LITERATURA

- Adriaens T., Branquart E., Maes D., 2003: The multicoloured asian ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium?. Belg. J. Zool., 133 (2): 201–87.
- Andrýsová K., 2008: Asijské sluněčko *Harmonia axyridis* – pomocník, nebo vetřelec?. Databáze online [cit. 2009-09-18]. Dostupné na: <<http://jarojaromer.cz/invaze/akce/soutez08/13.doc>>
- Brown P.M.J., Adriaens T., Bathon H., Cuppen J., Goldarazena A., Hägg T., Kenis M., Klausnitzer B.E.M., Kovář I., Loomans A.J.M., Majerus M.E.N., Nedvěd O., Pedersen J., Rabitsch W., Roy H.E., Ternois V., Zakharov I.A., Roy D.B., 2008: *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. BioControl, 53: 5–21.
- Harmon P.J., Losey E.J., Ives A.R., 1998: The role of vision and color in the close proximity foraging behavior of four coccinellid species. Oecologia, 115: 287–292.
- Hodek I., 1993: Habitat and food specificity in aphidophagous predators. Biocontrol Science and Technology, 3: 91–100.

Hodek I., Evans E.W., 2012: Food relationships. In: Hodek I., van Emden H.F., Honěk A. (eds.), Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae), Wiley–Blackwell, 141–274.

Koch R.L., 2003: The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological kontrol, and non-target impacts. Journal of Insect Science, 32 (3): 1–16.

Nedvěd O., Salvucci S., 2008: Ladybird *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) prefers toxic prey in laboratory choice experiment. Eur. J. Entomol, 105: 431–436.

Obata S., 1997: The influence of aphids on the behaviour of adults of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Col.: Coccinellidae). Entomophaga, 42 (1/2): 103–106.

Provost C., Lucas É., Coderre D., Chouinard G., 2006: Prey selection by the lady beetle *Harmonia axyridis*: the influence of prey mobility and prey species. Journal of Insect Behavior, 19 (2): 265–277.

Šenkeříková P., Nedvěd O., 2012: Preference among three aphid species by predatory ladybird beetle *Harmonia axyridis* in laboratory. IOBC Bulletin 81:

Vondrášková Š., 2009: Využití dravého hmyzu v biologické ochraně rostlin. Databáze online [cit. 2009-08-24]. Dostupné na:

<<http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Vyuit%20dravho%20hmyzu%20v%20biologick%20ochran%20rostlin.pdf>>

FEMTOGRAM ELECTROCHEMICAL SENSING OF PRION PROTEINS USING QUANTUM DOTS

FEMTOGRAMOVÉ ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ PRIONOVÝCH PROTEINŮ POMOCÍ KVANTOVÝCH TEČEK

Šobrová P.¹, Zítka O.^{1,2}, Ryvolová M.^{1,2}, Janů L.¹, Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: pavlina.sobrova@seznam.cz

ABSTRACT

The prion protein (PrP) is involved in neurodegeneration via its conversion from the normal cellular form, PrP^C, to the infectious form, PrP^{Sc}, which is the causative agent of the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). In spite of great effort in this field, diagnostics of prion protein caused diseases represents a sort of challenge. In this study, we aimed our attention on studying of prion protein interaction with CdTe quantum dots (QDs) by voltammetry as a new and extremely sensitive tool for sensing of these proteins. Primarily, we characterized fluorescent and electrochemical properties of QDs. Further, electrochemical study of their interactions was carried out to find the most suitable conditions for sensitive detection of prion proteins. Detection limit (3 S/N) was estimated as 1 fg in 5 μ l. This makes labelling of proteins with QDs of great importance due to easy applicability and possibility to use in miniaturized devices, which can be used *in situ*. In addition, we also tested stability of the dots *in vitro* and *in vivo* using our ultrasensitive and optimized electrochemical method.

Key words: Quantum Dot; Prion; Electrochemistry; Differential Pulse Voltammetry

Acknowledgments: The financial support from the following project IGA FA MENDELU IP 5/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Infekční prionový označovaný jako PrP^{Sc} je pozměněnou formou přirozeně se vyskytujícího prionu (PrP^C), který se vyskytuje v savčích buňkách. Infekčnost tohoto proteinu je dána konformační změnou jeho struktury z α -helixu u PrP^C na konformaci β -skládaného listu PrP^{Sc}. Výsledkem této změny je mimořádná odolnost vůči různým fyzikálním vlivům, vysoká odolnost proti enzymům štěpícím protein a schopnost navazovat se na zdravé formy prionových proteinů a konvertovat je infekční formu. Patofyziologické funkce PrP^{Sc} a jejich role v procesech vedoucích k degeneraci mozku u pacientů trpících přenosnými spongiformními encefalopatiemi dosud nebyly dostatečně objasněny (Damberger, a kol., 2011, Schreuder, a kol., 1996). Mezi nejvýznamnější prionové onemocnění patří Creutzfeldt–Jacobova nemoc (CJD), Gerstmann–Straussler–Scheinker syndrom a kuru u lidí stejně jako scrapie u ovcí a bovinní spongiformní encefalopatie u krav (nemoc šílených krav). Všechny tyto nevy léčitelné nemoci jsou způsobeny nevratnými změnami v mozkové tkáni s následnou tvorbou amyloidních plaků (Prusiner, 2012).

Obtížnost diagnostiky těchto onemocnění vyplývá v první řadě z dlouhé inkubační doby, tedy období, kdy nejsou patrné žádné příznaky, která může trvat od několika měsíců až po celá desetiletí. Ke klinickým příznakům TSE, které se ovšem objevují v pokročilých stádiích onemocnění, patří demence a ztráta pohybu a koordinace. Neuropatologické vyšetření obvykle odhalí hluboké astrocytické gliosy a spongiformní změny, které bývají někdy doprovázené vznikem amyloidních plaků. Na rozdíl od jiných infekčních onemocnění způsobených viry nebo bakteriemi je obtížné prionové onemocnění diagnostikovat pomocí konvenčních metod, jako jsou PCR, sérologie nebo testy buněčných kultur. Laboratorní diagnostika TSE je dále komplikována nerovnoměrným rozdělením původců TSE v tělních tkáních, kdy nejvyšší koncentrace se nachází v tkáních nervového systému a velmi nízké koncentrace ve snadno přístupných tělních tekutinách, jako jsou krev nebo moč (Bannach, a kol., 2012, Dagdanova, a kol., 2010). Prionové onemocnění jsou obvykle diagnostikovány klinicky a následně potvrzeny histopatologickým vyšetřením mozkové tkáně prováděným post-mortem. Jediný spolehlivý molekulární marker pro prionové onemocnění je přítomnost abnormální formy PrP^{Sc}, patologicky konformačně pozměněné, která se hromadí v centrálním nervovém systému a v menší míře i v lymforetikulární tkáni. V případech BSE je k dispozici několik komerčních diagnostických souprav, které jsou založeny na imunochemické detekci přítomnosti PrP^{Sc} v mozkové tkáni post-mortem. V současné době neexistuje žádný diagnostický test pro rychlou a spolehlivou detekci prionových chorob u zvířat nebo lidí z tělních tekutin. Nové diagnostické techniky zaměřené na zvýšení citlivosti a specifčnosti PrP^{Sc} detekce a na identifikaci nových náhradních ukazatelů jsou nyní intenzivněji vyvíjeny (Kubler, a kol., 2003, Sobrova, a kol., 2012, Sobrova, a kol., 2012). Jedním ze směrů

současného výzkumu je další zvyšování citlivosti dosud dostupných testů natolik, abychom byli schopni stanovit i nepatrná množství prionu, která se vyskytují v tělních tekutinách. Další cestou je nalézt způsob, jak vyhledat a identifikovat molekuly, které se objeví v krvi ve chvíli, kdy dojde k infekci. Nejedná se tedy jen o detekci samotných prionů, ale i fyziologických známek jejich přítomnosti v organismu (Foster, 2000). Z pohledu toho, že koncentrace pozměněných prionových proteinů v tělních tekutinách je velmi nízká, je třeba hledat způsoby, jak zvýšit citlivost jejich stanovení. V posledních letech se ukazuje, že různé způsoby značení biomolekul pomocí fluorescenčních či jiných značek, je velmi výhodné pro detekci biomolekul s možností snížit detekční limity o několik řádů. Kvantové tečky, polovodičové materiály o velikosti jednotek až desítek nanometrů, představují jednu skupinu těchto značek. Proto jsme se v naší práci zaměřili na možnosti značení prionových proteinů pomocí kvantových teček a následnou detekci tohoto komplexu nejen fluorescenčními metodami, ale především elektrochemickými, protože kvantové tečky obsahují těžké kovy, které je možné velmi citlivě detekovat pomocí elektrochemických metod.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Prionový protein a další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). K přípravě pufrů a standardních roztoků prionů byla použita voda ACS čistoty od Sigma Aldrich. Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), řízeného počítačem se softwarem (MultiLab Pilot, Weilheim, Německo).

Příprava kvantových teček

Pro syntézu kvantových teček bylo použito: 2 ml CdCl_2 ($0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a naředěno do 42 ml. Dále byl přidán trisodium citrát dihydrát (100 mg), Na_2TeO_3 (0.01 M, 4 ml), MPA (119 mg) a NaBH_4 (50 mg). Molární poměr $\text{Cd}^{2+}/\text{MPA}/\text{Te}$ byl 1:7:0.25. Roztok byl v uzavřené skleněné reakční nádobce umístěn do mikrovlnného reaktoru. Parametry syntézy byly: 180 °C, 800 W a 20 minut. Po dokončení byly vzorky ochlazeny na 50 °C a odstředěny při 25000 RCF po dobu pěti minut.

Elektrochemické měření

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodevém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0.4 mm^2 ; referenční elektrodou byla $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ a pomocnou grafitová elektroda.

Adsorptivní přenosová technika (AdTS)

Adsorptivní přenosová technika je metoda, při níž je stanovovaná látka na pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodu danou dobu akumulována z kapky vzorku, poté je přebytek vzorku omyt

a zahájeno měření pomocí vybrané elektrochemické techniky v klasickém tříelektrodovém zapojení (Adam, a kol., 2005). Díky této technice je umožněna elektrochemická analýza z velmi malého objemu vzorku (3 až 10 μl).

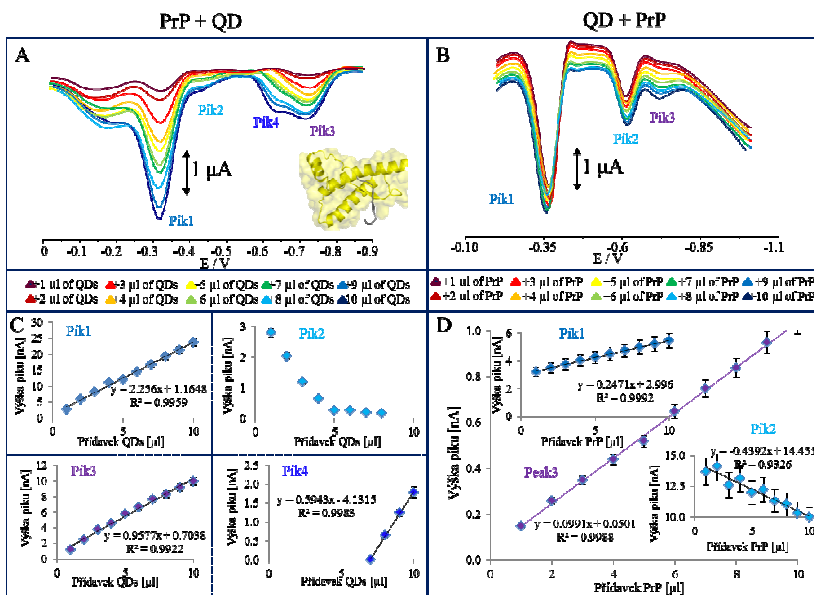
Diferenční pulzní voltmetrie (DPV)

Množství prionových proteinů jsme zjišťovali pomocí DPV. Základní elektrolyt byl: 0.5 M fosfátový pufr o pH škále od 5.59 do 8.04, borátový pufr v pH rozpětí od 7.09 do 9.11 a acetátový pufr o pH škále od 3.8 do 5.6. AdTS DPV parametry jsou následující: počáteční potenciál $-0,2$ V, konečný potenciál $-0,8$ V, modulovací čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, krok potenciálu 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0$ V. Veškeré experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě (22–24 °C). Standardy prionů byly před vlastním měřením probublávány argonem (99,999%) po dobu 120 s.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci jsme se zaměřili na studování proteinů, což jsou biomolekuly přirozeně se vyskytující v živočišných buňkách. Pro tyto účely jsme využili QD, které mají díky merkaptopropionové kyselině na svém povrchu vysokou afinitu vůči proteinům. Smíchali jsme prionové proteiny v poměru 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9 a 1:10 a nechali interagovat 24 hodin ve tmě při 35 °C. Tato směs byla následně analyzována za pomoci adsorptivní přenosové techniky (AdTs) ve spojení s diferenční pulzní voltmetrií. Při konstantní koncentraci prionových proteinů a zvyšující se koncentrací kvantových teček nám voltamogram poskytoval 3 píky (obr. 1A). Při zvyšování koncentrace QD docházelo k nárůstu všech píků a začátku tvorby píku 4. Z výsledků je zřejmé, že píky 1, 3, 4 jsou přímo úměrné koncentraci, což je důležitá charakteristika pro posuzování koncentrace prionových proteinů (obr. 1B). Při posuzování komplexu QD-prion z pohledu konstantní koncentrace QD a zvyšující se koncentrace prionového proteinu je zřejmé, že u všech koncentrací jsou znatelné pouze 3 píky (Pík 1, 2, 3). Pík 4 se již nevyskytuje (obr. 1B). Pík 1 a 3 rostou lineárně s rostoucí koncentrací prionu, což dokazuje závislost na koncentraci prionového proteinu (obr. 1D). Pík 2 se snižuje s rostoucí koncentrací prionu. Z výšky píků jasně vyplývá, že Pík 1 je nejcitlivější pro posuzování koncentrace komplexu QD-prion. Proto jsme se zaměřili svou pozornost najít detekční limit. Detekční limit byl dle kalibrační závislosti, která byla měřena v rozpětí od $1 \cdot 10^{-5}$ do 4 $\mu\text{g/ml}$ (75 fg/5 μl do 20 $\mu\text{g/ml}$). Získaná závislost byla logaritmická, což může být způsobeno přítomností dalších elektroaktivních částic. Striktně lineární části byla nalezena v intervalu od 0,05 ng/ml do 4 ng/ml. Mez detekce (3 S/N) byla stanovena 1 fg v 5 ul. Značení proteinů za pomoci QD má velký význam z hlediska snadné použitelnosti a možnost využití v miniaturních zařízeních.

Obr. 1 Závislost signálu na koncentraci komplexu QD-prion. A) při konstantní koncentraci prionu a vzrůstající koncentraci QD B) při konstantní koncentraci QD a zvyšující se koncentrace prionového proteinu. C, D) závislosti jednotlivých píků na výšce signálu.



ZÁVĚR

QD, miniaturní, světlo emitující krystalky se jeví jako slibná fluorescenční značka pro buněčné a biomolekulární značení. Ve srovnání s organickými barvivy a fluorescenčními proteiny, mají QD unikátní optické a elektronické. V této práci jsme zjistili, že kvantové tečky mají rovněž výborné elektrochemické vlastnosti, díky nimž mohou být použity jako excelentní elektroaktivní značka pro stanovení prionových proteinů. Komplex QD-protein je vysoce stabilní a může být kvantifikován ve velmi malých objemech. Tento objev může otevřít nové možnosti stanovení těchto proteinů a to nejen u živočišných tkání, ale i rezidua na chirurgických nástrojích a dalších typech takto potenciálně kontaminovaných materiálů.

LITERATURA

Adam V., Petrlova J., Potesil D., Zehnalek J., Sures B., Trnkova L., Jelen F., Kizek R. (2005): Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor. *Electroanalysis*, 17(18): 1649-1657.

Bannach O., Birkmann E., Reinartz E., Jaeger K. E., Langeveld J. P. M., Rohwer R. G., Gregori L., Terry L. A., Willbold D., Riesner D. (2012): Detection of Prion Protein Particles in Blood Plasma of Scrapie Infected Sheep. *Plos One*, 7(5).

Dagdanova A., Ilchenko S., Notari S., Yang Q. W., Obrenovich M. E., Hatcher K., Mcanulty P., Huang L. Q., Zou W. Q., Kong Q. Z., Gambetti P., Chen S. G. (2010): Characterization of the Prion Protein in Human Urine. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40): 30489-30495.

Damberger F. F., Christen B., Perez D. R., Hornemann S., Wuthrich K. (2011): Cellular prion protein conformation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42): 17308-17313.

Foster P. R. (2000): Prions and blood products. *Annals of Medicine*, 32(7): 501-513.

Kubler E., Oesch B., Alex J. R. (2003): Diagnosis of prion diseases. *British Medical Bulletin*, 66(267-279).

Prusiner S. B. (2012): A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. *Science*, 336(6088): 1511-1513.

Schreuder B. E. C., Vankeulen L. J. M., Vromans M. E. W., Langeveld J. P. M., Smits M. A. (1996): Preclinical test for prion diseases. *Nature*, 381(6583): 563-563.

Sobrova P., Ryvolova M., Adam V., Kizek R. (2012): Capillary electromigration based techniques in diagnostics of prion protein caused diseases. *Electrophoresis*, in press(

Sobrova P., Ryvolova M., Hynek D., Adam V., Hubalek J., Kizek R. (2012): Electrochemical behaviour of native and denatured β -sheet breaker prion protein. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7(2): 928-942.

EFFECT OF GLUTATHIONE ON SELECTED MOTION PARAMETERS OF RAM COOLING-STORED SPERMATOZOA

EFEKT GLUTATIÓNU NA VYBRANÉ PARAMETRE POHYBLIVOSTI BARANÍCH SPERMÍÍ UCHOVÁVANÝCH V SCHLADENOM STAVE

Špaleková E.¹, Makarevich A.V.²

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

²Institute of Animal Genetics and Reproduction, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic

E-mail: spalekova.eliska@gmail.com

ABSTRACT

The goal of this study was to examine the effect of glutathione (GSH) on selected motion parameters of cooling-stored ram sperm. Fresh ram ejaculates were diluted in Triladyl extender, pooled and glutathione was added at concentrations 0; 0.5; 1.5 and 5mmol.l⁻¹. Samples were incubated at 4°C for three days. Sperm motility parameters were measured by CASA system. Glutathione improved average value of total motility and progressive movement (PM) after incubation in cooling condition. Glutathione maintained sperm motility and PM at high level after 24h of cooling-storage, the best results were observed at 1.5 and 5 mmol.l⁻¹ of glutathione. Significant increase in curvilinear velocity (VLC), straight line velocity (VCL), average path velocity (VAP) and distance average path (DAP) were confirmed after 24h of cooling-storage at 1.5 mmol.l⁻¹. After 48h storage GSH maintained sperm motility and PM at higher level in compared with control group. These data indicate that glutathione can maintain good quality of movement of ram sperm during long-term cooling-storage.

Key words: ram sperm, glutathione, motion parameters

Acknowledgments: This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0514-07.

INTRODUCTION

Glutathione (GSH), antioxidant, has elicited beneficial effects in many facets of in vitro production: increasing the IVF success rate (Abeydeera, 2002; Jiang et al., 2007), acting as a cryoprotectant during semen freezing (Munsiet al., 2007), and assisting in antioxidant defense mechanisms during semen thawing (Gadea et al., 2005). Sperm DNA is vulnerable to damage induced by reactive oxygen species (ROS) (Steenken, 1989). Reduced glutathione is present in many organs and tissues of body and has many antioxidant properties (Meister, 1992). High levels of GSH were found in testis of rat (Vina et al., 1992) and in reproductive tract and epididymal sperm of bulls (Agrawal and Vahna-Perttula, 1988). In the semen chilling process, the problem commonly encountered is the damage of spermatozoa plasma membranes due to the formation of lipid peroxidation. This condition occurs as the spermatozoa membranes contain a lot of unsaturated fatty acids which are very susceptible to peroxidation damage (Maxwell and Watson 1996). Furthermore, Sikka (1996) stated that mammalian spermatozoa are rich of unsaturated fatty acids and are very easily subjected to reactive oxygen species (ROS) that can decrease spermatozoa mortality and increase the morphological damage influencing the sperm capacity and acrosome reaction.

The aim of this study is to examine the effect of glutathione on selected sperm motion parameters of cooling-stored ram sperm.

MATERIAL AND METHODS

All the experiments were carried out with fresh ram spermatozoa, collected from one East-Friesian (EF) and three Lacaune (Lc) rams using artificial vagina. The rams were kept at the Institute of Sheep Breeding (Trenčianska Teplá) under uniform nutritional conditions. Volume, concentration and activity were assessed shortly after collection. The ejaculates from all rams (n=4) were pooled together to make a heterospermia in order to avoid individual variability of ram and were used for the experiment. The ejaculates were diluted in a Triladyl extender (Minitüb, Tiefenbach, Germany). Semen was cooled down to 4 °C and transported to the laboratory, where the samples were divided into four groups, at 1 ml of ejaculate per tube. Then glutathione (Sigma – Aldrich, Germany) was added to marked tubes at concentrations of 0.5; 1.5 or 5 mmol.l⁻¹, control group did not contain glutathione (0 mmol.l⁻¹). The semen samples were kept in a fridge for three days. Analyses of motility parameters were done at 0, 24 and 48 hours of sperm cooling-storage, using computer assisted semen analysis (CASA) - Hamilton Thorn motility analyser (version 7). Each sample was analysed at the time intervals of 0, 0.5h or 2h. Between these time points the sample were incubated at 37 °C. We analysed effect of various concentrations of glutathione on ram sperm total motility

and progressive movement (PM) and on selected movement parameters – curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), amplitude of lateral head displacement (ALH), distance average path (DAP).

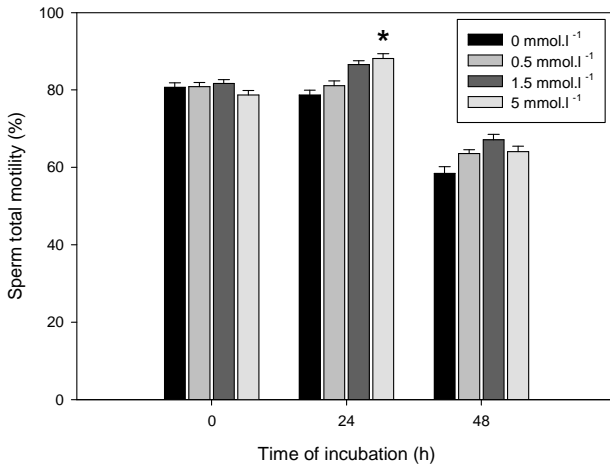
The experiments have been done in two replications. In each experimental group 7 view fields were evaluated, so that at least 350 sperm cells per one experiment were counted. Average values were calculated from three measurements during the day. The results were statistically evaluated by t-test and graphically processed using SigmaPlot graphic software (version 9.0 for windows).

RESULTS

Average values of ram sperm total motility and progressive movement following 3 days of cooling-storage were evaluated. It was not visible effect of glutathione on sperm motility parameters at day 0 of storage. Effect of glutathione after 24 h was more expressed. Higher concentrations 1.5 and 5 mmol.l⁻¹ had considerable effect on sperm total motility. Significant increase in total motility was noted at the highest concentration of GSH (5 mmol.l⁻¹), where total motility increased from 78.73% (control group) to 88.14% (Fig 1). Similar tendencies were observed for sperm progressive movement. Glutathione at highest concentration significantly improved proportion of progressively moved sperm from 71.61% (control group) to 82.24%. Furthermore, positive effect of GSH at 1.5 mmol.l⁻¹ was visible, where proportion of progressive moved sperm was 80.32%, but this increase was not significant (Fig 2). Glutathione at 0.5 mmol.l⁻¹ did not affect sperm total motility and PM, what can demonstrate dose-depend manner of glutathione effect.

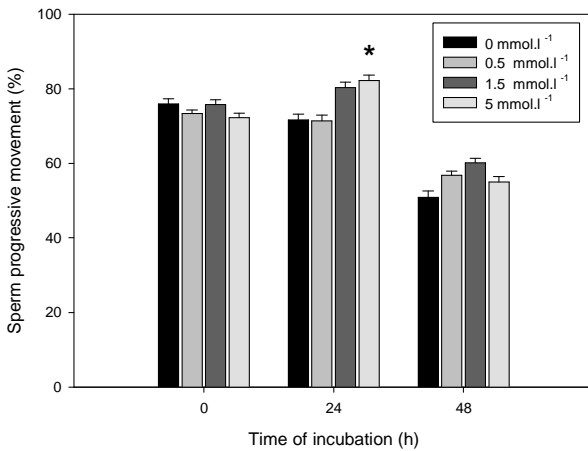
This positive effect of GSH persisted following 48 h of cooling-storage, when all tested concentrations increased sperm total motility and PM. Similarly, the highest effect was visible at concentration 1.5 and 5 mmol.l⁻¹.

Figure 1: Effect of glutathione on sperm total motility after long-term cooling-storage



* Significant difference compared to control: P < 0.05

Figure 2: Effect of glutathione on sperm progressive movement after long-term cooling-storage



* Significant difference compared to control: P < 0.05

Determination of movement characteristics is important for good prediction of sperm fertilization ability. Glutathione at all tested concentration positively improved motion parameters of ram sperm after 24h of cooling storage (Tab 1). Glutathione positively affected sperm velocity parameters - curvilinear velocity, straight line velocity and average path velocity. Furthermore distance average path and amplitude of lateral head displacement were increased by all tested concentration in compare with control group. The most marked effect on velocity parameters was at 1.5 mmol.l⁻¹, where VAP, VCL and VSL were significantly increased (P< 0.05). These results indicate that glutathione may improve quality of movement of cooling storage sperm.

Table 1: Effect of different glutathione concentrations on selected motility characteristics after 24 h of cooling storage

Parameter	Mean ± SE			
	0mmol.l ⁻¹	0.5mmol.l ⁻¹	1.5mmol.l ⁻¹	5mmol.l ⁻¹
Motility (%)	78.73± 1.20	81.07 ± 1.28	86.51 ± 1.03	88.14 ± 1.21*
PM (%)	71.61 ± 1.58	71.38 ± 1.51	80.32 ± 1.46	82.24 ± 1.44*
ALH (µm)	4.53 ± 0.18	5.19 ± 0.46	5.25 ± 0.47	5.14 ± 0.37
DAP(µm)	34.94 ± 0.97	39.44 ± 2.49	42.69 ± 1.35*	39.47 ± 3.28
VCL (µm/s)	145.41 ± 5.35	165.93 ± 13.67	171.97 ± 9.47*	156.13 ± 11.83
VSL (µm/s)	63.71± 2.32	74.09 ± 5.00	81.97 ± 3.45*	74.27 ± 7.09
VAP (µm/s)	77.71± 2.19	90.00 ± 5.98	97.68 ± 3.89*	90.15 ± 7.37

* Significant difference compared to control: P < 0.05

VCL – curvilinear velocity – velocity over the total distance moved, i.e. including all deviations of sperm head movement (µm.sec⁻¹)

VAP – average path velocity – the average velocity of sperm movement (µm.sec⁻¹)

VSL – straight line velocity - velocity calculated using the straight line distance between the beginning and end of the sperm track (µm.sec⁻¹)

ALH – amplitude of lateral head displacement – the mean width of sperm head oscillation (µm)

DAP - distance average path - distance that the sperm head travelled along its average trajectory (µm)

DISCUSSION

The processing and storage of ram semen reduce the motility and may cause disruption the membrane integrity of spermatozoa. It is generally assumed that these changes are detrimental and are associated with a loss of fertilising capacity. Fertility of stored sperm is generally lower after cervical insemination than fertility of fresh ram semen (Maxwell and Watson, 1996). Glutathione is a significant component of the collective antioxidant defences, and a highly potent antioxidant and antitoxin in its own right. GSH is essential both to the functionality and to the structural integrity of cells, the tissues and organ systems. Superoxide, peroxide, hydroloxy radical and other free radicals derived from oxygen are highly reactive and therefore threatening to the integrity of essential biomolecules such as DNA and RNA, enzymes and other proteins, and the phospholipids responsible for membrane integrity (Kidd, 1997). Oxidative damage to ram sperm resulting from reactive oxygen species generated by the cellular components of semen during liquid storage is possibly one of the main causes for the decline in motility and fertility during storage (Bucak and Tekin, 2007).

There are reports about positive effects of glutathione on sperm. Addition of 0.5 mmol.l⁻¹ of GSH to diluents is sufficiently effective to protect the plasma membranes and maintain the percentage of spermatozoa motility stored at 5 °C (Triwulanningsih et al., 2008). Sinha et al. (1996) reported that addition of 2 or 5 mmol.l⁻¹ of GSH to goat semen diluents increased the motility and reduced proportion of acrosome abnormality of goat spermatozoa after being chilled. The anti-oxidant treatments GSH 5–10 mmol.l⁻¹ and taurineat 50 mmol.l⁻¹ provided a significant improvement in ram sperm survival during the 6 h of liquid storage at 5 °C (Bucak and Tekin, 2007). Our results indicate the highest effect of GSH after 24h of cooling-storage where GSH at 1.5 mmol.l⁻¹ and at 5 mmol.l⁻¹ (P<0.05) increased average value of total sperm motility and sperm progressive movement. Positive effect of GSH was visible after 48h too, where all concentrations increased sperm total motility and PM. Similar results were obtained with bull's semen. Sperm motility of chilled bull semen was significantly higher in semen treated with 0.5 mmol.l⁻¹ of glutathione. The optimum sperm motility (≥50%) for AI was retained for 3 days at 0.5 – 2.0 mmol.l⁻¹ of glutathione (Munsi et al., 2007).

The addition of 0.5 mmol.l⁻¹ GSH to diluents is sufficiently effective in improving the condition of plasma membranes of chilled semen stored at 5 °C, thus it can increase percentage of bull sperm motility (Triwulanningsih et al., 2008). Munsi et al. (2007) reported that GSH at 3.0 mmol.l⁻¹ did not retain bull sperm motility over 50% for 3 days. Similarly, El-kon and Darwish (2011) reported that the decline rate in the motility percentage was higher in buffalo semen samples treated with 2.00 or 3.00 mmol.l⁻¹ of GSH. Our results indicate, that higher concentration of GSH (1.5 and 5 mmol.l⁻¹) had more beneficial effect on ram sperm movement parameters than lower (0.5 mmol.l⁻¹). Glutathione addition positively affected sperm velocity parameters (VCL, VSL, VAP). Significantly increase was noted at 1.5 mmol.l⁻¹. These results can indicate that GSH at 1.5 mmol.l⁻¹

may have positive impact on quality of movement of cooling-storage ram sperm. Results of El-kon and Darwish (2011) indicate, that addition of 0.50 or 1.00 mmol.l⁻¹ of GSH to semen diluent improves quality of liquid semen up to 120 hours, reduces DNA damage and improves the fertility of frozen-thawed buffalo semen. Different effect of GSH on another species was reported. No effect of glutathione at 5 mmol.l⁻¹ on progressive movement of post-thawed boars sperm (Whitaker et al., 2008) and on human sperm PM and other CASA movement parameters (VSL, VAP, VCL, ALH) over a 4h period was reported (Donnelly et al., 2000). Similarly, no significant effect on motion parameters (VCL, VSL, VAP, ALH) of boar sperm was found after addition of GSH to the thawing medium (Gadea et al., 2005).

CONCLUSION

Our results indicate that addition of glutathione can maintain the quality of cooling storage ram sperm. Glutathione at 1.5 and 5 mmol.l⁻¹ had beneficial impact of total sperm motility and progressive movement and significantly increased sperm movement characteristics (VAP, VCL, VSL and DAP).

REFERENCES

- Abeydeera L.R. (2002): In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57:257-273.
- Agrawal Y.P., Vanha-Perttula T. (1988): Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyltranspeptidase in the bull reproductive tissues. *International Journal of Andrology* 11(2):123-131.
- Bucak M.N., Tekin N. (2007): Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1):103-108.
- Donnelly T.E., McClure N., Lewis S.E.M. (2000): Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 15(1):61-68.
- El-kon I.I., Darwish S.A. (2011): Effect of glutathione (GSH) on microscopic parameters and DNA integrity in egyptian buffalo semen during liquid and frozen storage. *Journal of Reproduction and Infertility* 2(3): 32-40.
- Gadea J., Gumbao D., Mata's C., Romar R. (2005): Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology*, 26(6): 749-756.
- Jiang Z.L., Li Q.W., Li W.Y., Hu J.H., Zhao H.W., Zhang S.S. (2007): Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4):401-407.

Kidd M.K. (1998): Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. [www.thurne.com/altmedrev/ full text/glut.html](http://www.thurne.com/altmedrev/full_text/glut.html).

Maxwell W. M. C., Watson P.F. (1996): Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1):55-65.

Meister A. (1992): On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochemical Pharmacology*, 44:1905-1915.

MunsiBhuiyan M.M.U., Majumder S., Alam M.G.S. (2007): Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4): 358–362.

Sikka S.C. (1996): Oxidative stress and role of antioxidant in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1:78-86.

Sinha M.P., Singha A.K., Prasad R.L. (1996): The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, 41(3):237-243.

Steenken S. (1989): Purinebases, nucleosides and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chemical Reviews*, 89(3):503–520.

Triwulanningsih E., Situmorang P., Sugiarti T., Sianturi R.G., Kusumaningrum D.A. (2008): The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. *Indonesian Journal of Agriculture*, 1(1):64-69.

Vina J., Sastre J., Anton V., Bruseghini L., Estras A., Asensi M. (1992): Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Experientia*, 62(27):136-144.

Whitaker B.D., Carle B., Mukai T., Simpson A., Vu L., Knight J.W. (2008): Effect of exogenous glutathione supplementation on motility, viability, and DNA integrity of frozen-thawed boar semen. *Animal Reproduction*, 5(3/4):127-131.

RISK ELEMENTS IN BOTTOM SEDIMENTS AND FISH FROM THE SMALL WATER RESERVOIR

RIZIKOVÉ PRVKY V DNOVÝCH SEDIMENTOCH A RYBÁCH Z MALEJ VODNEJ NÁDRŽE

Tóth J., Tóth T., Lazor P., Slávik M.

Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: JurecLBF@centrum.sk

ABSTRACT

The aim of our work was to determined content of the heavy metals in bottom sediments and anatomical parts of (*Cyprinus carpio* L.) in water reservoir Kolíňany. Bottom sediments can be significant sources of pollution because they can accumulate pollutants (heavy metals and organic substances). The obtained samples analysis were performed to determine the concentration of heavy metals (Cd, Pb, Zn and Cu) mineralization after „wet“ microwave digestion device for MARS X-press, analytical extencion was atomic absorption spectrometry on the device VARIAN AA 240 FS. The obtained results of the content of heavy metals in the fish (Cd 0.07 ± 0.08 mg.kg⁻¹), (Pb 0.12 ± 0.25 mg.kg⁻¹), (Zn 39.98 ± 32.24 mg.kg⁻¹) and (Cu 0.57 ± 0.26 mg.kg⁻¹) which were compared to the maximum limits given by the legilation Codex Alimentarius SR. The obtained results of content of heavy metals in bottom sediments (Cd 1.36 ± 0.23 mg.kg⁻¹), (Pb 14.20 ± 2.16 mg.kg⁻¹), (Zn 41.0 ± 13.0 mg.kg⁻¹) and (Cu 18.0 ± 4.86 mg.kg⁻¹) were compared with the limit given by the relevant legislation (Act no. 188/2003 Coll. Z.). The measured content values of heavy metals in all samples of bottom sediments were lower than limit given by legislation.

Key words: heavy metals, bottom sediment, fish, AAS

ÚVOD

Vodné nádrže plnia významnú funkciu v krajinnom prostredí a sú dôležitým prvkom vodohospodárskej sústavy. Proces zanášania nádrží ovplyvňuje nielen kapacitu a životnosť vodohospodárskych objektov, ale aj spôsob ich využívania a prináša celý rad problémov, napr. zhoršenie kvality akumulovanej vody a jej kyslíkovej bilancie v dôsledku rozpadu organického podielu usadenín, čo má celý rad negatívnych dôsledkov (Fulajtár a Jánsky, 2001).

Ťažké kovy sa vyskytujú vo vodách v nízkych koncentráciách, prechádzajú do sedimentov a tu prostredníctvom niektorých mikroorganizmov sa tvoria organické deriváty. Tie prechádzajú do potravinového reťazca a do konečného článku – rýb, ktorých hygienickú kvalitu negatívne ovplyvňujú (Cibulka, 1991).

Medzi toxické kovy vyskytujúce sa vo vodách patrí predovšetkým olovo, kadmium a ortuť. Jednou z významných negatívnych vlastností týchto kovov je ich značná schopnosť akumulovať sa v sedimentoch. Predovšetkým ortuť má veľkú schopnosť kumulovať sa vo vodných organizmoch. Ortuť prestupuje z vody do sedimentov dna tečúcich vôd a nádrží, kde sa hromadí väčšinou vo forme sulfidu. Obsah ortuti v sedimentoch dna je závislý na stupni zaťaženia danej lokality, ale i na charaktere sedimentu. Sedimenty dna sa ukázali ako vhodný indikátor zaťaženia povrchových vôd olovom a kadmium. Podobne ako u ortuti sa je však i tu celý rad problémov. Jedným z nich je veľmi obtiažny odber reprezentatívnych vzoriek na lokalitách tečúcich vôd. Vzorky sedimentu s prevahou bahna a organických súčastí majú vo väčšine prípadov vyšší obsah ortuti v porovnaní so vzorkou piesočnatého charakteru (Cibulka 1991).

Najčastejšími zdravotnými problémami, ktoré zapríčiňujú ťažké kovy sú alergie, problémy s vysokým krvným tlakom, choroby kostí a chrbtice (Bystrická et al., 2009).

Cieľom práce bolo stanoviť obsah ťažkých kovov (Cd, Pb, Zn a Cu) v dnových sedimentoch a v anatomických častiach kapra obyčajného (*Cyprinus carpio* L.) vo Vodnej nádrži Kolíňany.

MATERIÁL A METODIKA

Za účelom zistenia stavu kontaminácie rýb a dnových sedimentov ťažkými kovmi sme vo vodnej nádrži Kolíňany v novembri 2011 náhodne vybrali ryby (4 kusy) a dnový sediment (5 vzoriek) v presne určenom termíne pri výlove rýb. Z každej ryby sme odobrali vzorky jednotlivých anatomických častí (sval, pečeň, oblička, gonády a koža) v množstve 3-5 g na stanovenie obsahu ťažkých kovov Cd, Pb, Zn a Cu. Dnové sedimenty sme odobrali z hĺbky 0,0 – 0,1 m v množstve 0,9 – 1,0 kg z piatich presných odberných miest rybníka v zmysle a podľa usmernenia uvedeného v zákone č. 188/2004 Z.z. O aplikácii čistiarenskeho kalu a dnových sedimentov do pôdy a doplnení zákona č. 223/2001 Z. z. O odpadoch. Odobrané vzorky dnového sedimentu a rýb sme analyzovali na Katedre chémie FBP SPU v Nitre. Každá vzorka bola vysušená pri teplote 105 °C, pomletá a preosiata cez sito s priemerom ôk 2 mm. Vzorky v návážkach od 1 – 2 g boli mineralizované za pomoci prístroja Mars X-press vo výluhu kyseliny dusičnej v pomere (1:1)

HNO₃ a H₂O. Dnové sedimenty sme analyzovali pomocou roztoku lúčavky kráľovskej. Samotné stanovenia obsahov jednotlivých ťažkých kovov boli vykonané metódou AAS (atómová absorpčná spektrometria) za pomoci prístroja Varian DUO FS240Z a AA280Z v mg.kg⁻¹ čerstvej hmoty.

Charakteristika vodnej nádrže (VN) Kolíňany

Zájumová plocha je situovaná východne od obce Kolíňany. Územie má východo-západný sklon s nadmorskou výškou v rozpätí 160 – 180 m n. m. Z hľadiska regionálno-geologického sa vodná nádrž nachádza v oblasti geologického rozhrania kryštálicko-druhohorného masívu Tríbeča a Žitavskej pahorkatiny. Substrát je tvorený prevažne eluviálno-deluviálnymi sedimentmi pohoria Tríbeč pleistocénno-holocénneho veku. Tieto sa v určitých lokálnych enklávach miešajú so sprašovými sedimentmi Žitavskej pahorkatiny. Podložné neogénne súvrstvia vystupujú na povrch iba lokálne v dôsledku neprítomnosti kvartérneho pokryvu (Čurlík a Ševčík, 1999).



Povodie	Plocha povodia (km ²)
Nitra	17
Plocha nádrže (ha)	Objem VN (10 m ³)
13	106
Odlesnená časť povodia (km ²) – 15,3	

Obr. 1 Lokalizácia piatich odberných miest sedimentov z VN Kolíňany

Dnové sedimenty

Namerané obsahy sledovaných rizikových prvkov v dnovom sedimente sme hodnotili v zmysle zákona č. 188/2003 Z.z. O aplikácii čistiarenskeho kalu a dnových sedimentov do pôdy a doplnení zákona č. 223/2001 Z.z. O odpadoch. V Prílohe č. 3 uvedeného zákona sú uvedené medzné hodnoty pre obsah rizikových prvkov v dnovom sedimente (tabuľka 1).

Tab. 1 Limitná hodnota ťažkých kovov dnových sedimentoch (zákon č.188/2003 Z.z.) v mg.kg⁻¹

Sledované ťažké kovy	Cd	Pb	Zn	Cu
Limit v (mg.kg ⁻¹) čerstvej hmoty	10	750	2500	1000

Cd – kadmium, Pb – olovo, Zn – zinok, Cu – meď

Ryby

Obsahy cudzorodých látok Cd, Pb, Zn a Cu v rôznych častiach rýb sme porovnávali s potravinovým kódexom SR, Druhá časť, IX hlava – kontaminanty v potravinách. Najvyššie prípustné množstvo pre sledované rizikové prvky v rybách (tabuľka č.2).

Tab. 2 Limitná hodnota ťažkých kovov v rybách (zákon 152/1995Z.z.) v mg.kg⁻¹

Sledované ťažké kovy	Cd	Pb	Zn	Cu
Limit v (mg.kg ⁻¹) čerstvej hmoty	0,1	1,0	n.d*	10

* not definition – najvyššie prípustné množstvo nie je stanovené

VÝSLEDKY A DISKUSIA**Hodnotenie ťažkých kovov v dnových sedimentoch**

V sledovaných sedimentoch sa obsah ťažkých kovov hromadil v nasledujúcich koncentráciách: Cd minimálna a maximálna hodnota bola od 0,94-1,60 mg.kg⁻¹, stredná hodnota tohto sledovaného prvku bola 1,36±0,23 mg.kg⁻¹, Pb hodnota minima a maxima bola od 11,6-17,6 mg.kg⁻¹ a median bol 14,2±2,16 mg.kg⁻¹, Zn množstvo sa kumulovalo od 40,2-73,4 mg.kg⁻¹ a so strednou hodnotou 41,0±13,0 mg.kg⁻¹, Cu interval minima a maxima bol 14,8-28,2 mg.kg⁻¹ a jej median bol 18±4,7 mg.kg⁻¹.

Tab. 3 Obsah ťažkých kovov v porovnaní s limitnými hodnotami (zákon č.188/2003 Z.z.) v mg.kg⁻¹

Sedimenty odberné miesta	Ťažké kovy			
	Cd	Pb	Zn	Cu
1.	1,36	17,6	73,4	28,2
2.	0,94	12,8	40,2	18,2
3.	1,14	11,6	40,8	18,0
4.	1,44	14,2	41,0	15,2
5.	1,60	16,0	41,2	14,8
Limitné hodnoty	10	750	2500	1000

V tabuľke č. 3 sú uvedené obsahy sledovaných ťažkých kovov v dnovom sedimente z VN Kolíňany v porovnaní k legislatíve. Výsledky našich analýz poukazujú na skutočnosť, že ani v jednom prípade nedošlo k prekročeniu limitnej hodnoty obsahu Cd, Pb, Zn a Cu v sledovaných stanovištiach.

Hodnotenie obsahu ťažkých kovov v rybách

V svalovine sa ťažké kovy kumulovali v nasledujúcich koncentráciách: Cd od 0,02-0,06 mg.kg⁻¹ so strednou hodnotou 0,03±0,02 mg.kg⁻¹. Pb od 0-0,16 mg.kg⁻¹ a so strednou hodnotou 0,07±0,05 mg.kg⁻¹, Zn sa pohyboval od 3,9-7,3 mg.kg⁻¹ so strednou hodnotou 5,9±1,43 mg.kg⁻¹, Cu od 0,26-0,51 mg.kg⁻¹ a so strednou hodnotou 0,42±0,09 mg.kg⁻¹.

V pečeni sa obsah ťažkých kovov pohyboval v nasledujúcich intervaloch: Cd od 0 do 0,10 mg.kg⁻¹ a hodnota medianu bola 0,03±0,04 mg.kg⁻¹, Pb od 0 do 0,39 mg.kg⁻¹ a stredná hodnota bola 0,07±0,16 mg.kg⁻¹, Zn od 5,9 do 89,2 mg.kg⁻¹ a hodnota medianu bola 58,9±13,8 mg.kg⁻¹, Cu od 1,55 do 2,27 mg.kg⁻¹ a stredná hodnota bola 1,75±0,27 mg.kg⁻¹.

V obličkách sme zistili nasledovné obsahy ťažkých kovov: Obsah Cd sa pohyboval v intervale od 0,16-0,22 mg.kg⁻¹ so strednou hodnotou 0,21±0,02 mg.kg⁻¹, obsah Pb bol v intervale od 0 - 0,21 mg.kg⁻¹ so strednou hodnotou 0,09±0,08 mg.kg⁻¹, Zn v intervale od 73,5-93,3 mg.kg⁻¹ a medianom 86,3±7,71 mg.kg⁻¹, Cu obsah sa pohyboval v rozmedzí od 1,57-1,76 mg.kg⁻¹ s medianovou hodnotou 1,69±0,07 mg.kg⁻¹

MENDELNET 2012

V gonádach sme namerali množstvá ťažkých kovov v intervaloch: Cd od 0,12 do 0,21 mg.kg⁻¹ a median 0,14±0,04 mg.kg⁻¹, Pb od 0,08 do 0,27 mg.kg⁻¹ a median 0,14±0,08 mg.kg⁻¹, Zn

od 7,77 do 40,03 mg.kg⁻¹ a median 8,89±13,66 mg.kg⁻¹, Cu od 0,43 do 1,09 mg.kg⁻¹ a median 0,55±0,26 mg.kg⁻¹.

V koži sme analýzami získali nasledovné obsahy ťažkých kovov: Cd od 0 -0,08 mg.kg⁻¹ a jeho median bol 0,14±0,04 mg.kg⁻¹. Obsah Pb bol od 0,59-0,84 mg.kg⁻¹ a jeho stredná hodnota 0,66±0,09 mg.kg⁻¹, Zn od 4,5-53,7mg.kg⁻¹ a medianom 38,1±18,02 mg.kg⁻¹, Cu od 0,29-0,55 mg.kg⁻¹ a medianom 0,40±0,10 mg.kg⁻¹.

Tab. 4 Obsah ťažkých kovov v anatomických častiach rýb v porovnaní s limitnými hodnotami (podľa zákona 152/1995Z.z.) v mg.kg⁻¹

Časti	Ť.k.	vz. č.	vz. č.	vz. č.	vz. č.	limit	min-max	med±STDEV	priemer
Sval	Cd	0,027	0,023	0,019	0,064	0,1	0,02-0,06	0,03±0,02	0,0333
	Pb	0,068	0	0,162	0,085	1	0 -0,16	0,07±0,05	0,0788
	Zn	3,9	4,857	7,325	6,957	n.d	3,9-3,3	5,9±1,43	5,7598
	Cu	0,513	0,358	0,260	0,472	10	0,26-0,51	0,42±0,09	0,4008
Pečeň	Cd	0,038	0,029	0	0,103	0,1	0 -0,10	0,03±0,04	0,0425
	Pb	0	0,149	0,387	0	1	0-0,39	0,07±0,16	0,134
	Zn	56,102	61,711	89,204	55,874	n.d	55,9-89,2	58,9±13,8	65,723
	Cu	1,678	1,828	1,551	2,270	10	1,55-2,27	1,75±0,27	1,8318
Oblíčky	Cd	0,201	0,227	0,163	0,226	0,1	0,16-0,22	0,21±0,02	0,2043
	Pb	0	0,086	0,106	0,212	1	0-0,21	0,09±0,08	0,101
	Zn	90,436	82,139	73,544	93,293	n.d	73,5-93,3	86,3±7,71	84,853
	Cu	1,570	1,7632	1,707	1,665	10	1,57-1,76	1,69±0,07	1,6763
Gonády	Cd	0,145	0,118	0,136	0,213	0,1	0,12-0,21	0,14±0,04	0,153
	Pb	0,196	0,266	0,09	0,074	1	0,08-0,27	0,14±0,08	0,1565
	Zn	9,426	7,777	40,03	8,358	n.d	7,77-40,03	8,89±13,66	16,398
	Cu	0,432	0,495	1,089	0,599	10	0,43-1,09	0,55±0,26	0,6538
Koža	Cd	0	0,084	0,037	0,019	0,1	0-0,08	0,02±0,03	0,035
	Pb	0,592	0,841	0,629	0,699	1	0,59-0,84	0,66±0,09	0,6903
	Zn	36,285	4,488	39,944	53,724	n.d	4,5-53,7	38,1±18,02	33,61
	Cu	0,345	0,448	0,293	0,549	10	0,29-0,55	0,40±0,10	0,4088

* not definition – najvyššie prípustné množstvo nie je stanovené, Ť.k. – ťažký kov, vz. – vzorka

Z tabuľky 4 vyplýva, že v jednotlivých anatomických častiach všetkých štyroch sledovaných vzorkách rýb neboli prekročené najvyššie prípustné hodnoty Cu (PKSR:10 mg.kg⁻¹) Pb a Zn určené platnou legislatívou. Obsah Cd bol vo dvoch vzorkách vyšší ako udáva platná legislatíva. Najvyššie prekročenie obsahu Cd sme zistili v obličkách vo vzorke. č. 2 (0,227 mg.kg⁻¹), viac ako 2-násobné prekročenie limitnej hodnoty Cd sme zaznamenali v obličkách vo vzorke. č.1,2 a 4 a v gonádach vo vzorke č.4.

V sledovaných častiach rýb môžeme zostaviť nasledujúce poradie priemerného obsahu ťažkých kovov: Cd - obličky > gonády > pečeň > koža > sval, Pb - koža > gonády > pečeň > obličky > sval, Zn - obličky > pečeň > koža > gonády > sval, Cu - pečeň > obličky > gonády > koža > sval. Najvyššiu kumuláciu mali obličky (Cd, Zn). Na druhej strane sme najnižšie množstvá Cd, Pb, Zn a Cu zaznamenali vo svaloch všetkých sledovaných vzorkách rýb.

ZÁVER

Medzi toxické kovy vyskytujúce sa vo vodách patrí predovšetkým olovo, kadmium a ortuť. Jednou z negatívnych vlastností týchto kovov je ich značná schopnosť akumulovať sa v sedimentoch. Tie vstupujú do potravinového reťazca a do konečného článku – rýb, ktorých hygienickú kvalitu negatívne ovplyvňujú. V našich analyzovaných vzorkách dnových sedimentov neboli prekročené limitné hodnoty ani pre jeden sledovaný prvok. Vo vzorkách anatomických častí tiel rýb sme zaznamenali prekročenie najvyššej prípustnej hodnoty obsahu Cd a to v obličkách a gonádach vo viacerých vzorkách takmer dvojnásobne ako udáva platná legislatíva. Monitoring obsahov cudzorodých látok je potrebný jednak z hľadiska hygienicko-zdravotníckeho, ktoré sa viaže na konzum rýb ako potravín a tiež z hľadiska bioindikácie, ktoré vyplýva z postavenia a začlenenia rýb do trofického reťazca vo vodnom ekosystéme.

LITERATÚRA

- ANDREJI, J. - STRÁŇAI, I. - MASSÁNYI, P. - VALENT, M. 2005. Concentration of selected metals in muscle of various fish species. In *Journal of Environment Science and Health - New York*; Philadelphia : Marcel Dekker Journals : Taylor & Francis. 2005, No. 40/4, p. 899-912. ISSN 1093-4529
- ANDREJI, J. - STRÁŇAI, I. - MASSÁNYI, P. - KAČÁNIOVÁ, M. - VALENT, M. 2006. Heavy metals content and microbiological quality of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle from two Southwestern Slovak fish farms. In *Journal of Environment Science and Health - New York* ; Philadelphia : Marcel Dekker Journals : Taylor & Francis. 2006, No. 41/6, p. 1071-1088. ISSN 1093-4529
- ANDREJI, J. - STRÁŇAI, I. - MASSÁNYI, P. - VALENT, M. 2006. Accumulation of some metals in muscles of five fish species from lower Nitra river. In *Journal of Environment Science and Health - New York*; Philadelphia : Dekker Journals : Taylor & Francis. 2006, No. 41/6, p. 2607-2622. ISSN 1093-4529
- BYSTRICKÁ, J. - TOMÁŠ, J. - ÁRVAY, J. - TIMORACKÁ, M. 2009. Inhibičný vplyv katiónov rizikových prvkov na úrodu sóje. In *Potravinárstvo*, roč. 3, 2009, č. 2, s. 12-15. ISSN 1337-0960
- CIBULKA, J. - DOMAŽLICKÁ, E. - KOZÁK, J. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosfére. Praha : Academia, 1991, s. 427. ISBN 80-200-0401-7
- ČURLÍK, J. - ŠEVČÍK, P. - JAMBOR, P. 1999. *Geochemický atlas Slovenskej republiky*. Bratislava : MŽPSR, 1999, s. 99. ISBN 80-88833-14-0
- FULAJTÁR, E. - JANSKÝ, L. 2001. *Vodná erózia pôdy a protierózna ochrana*. Bratislava : VÚPOP, 2001, s. 310, ISBN 80-85361-85-X
- STRÁŇAI, I. - ANDREJI, J. 2003. Vybrané ťažké kovy vo svalovine rýb rieky Nitry v oblasti Partizánskeho. In *Rizikové faktory potravinového reťazca III*. Nitra : SPU, 2003, s. 140-142.

STIMULATING AND PROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL ON BOVINE SPERMATOZOA

Tvrda E., Kňazická Z., Lukáčová L., Lukáč N.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

E-mail: evina.tvrda@gmail.com

ABSTRACT

As spermatozoa are particularly sensitive towards oxidative damage, the search for a potential antioxidant substance to preserve and protect them under *in vitro* conditions has recently attracted the attention of the scientific community. The aim of this study was to assess the dose- and time-dependent *in vitro* effects of resveratrol, a natural phenol and phytoalexin with potential antiviral, anti-inflammatory and antioxidant properties on bovine spermatozoa during three different time periods (Time 0 h, 12 h and 24 h). Semen samples were collected from 15 adult breeding bulls, and diluted in physiological saline solution containing 0.5% DMSO together with 0, 1, 5, 10, 50, 100 and 200 μM of resveratrol. Spermatozoa motility was determined using the Sperm VisionTM and CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system. Cell viability was measured using the metabolic activity MTT assay, the nitroblue-tetrazolium (NBT) test was used to assess the intracellular superoxide formation. Spermatozoa motility difference between the control and group A was the only one significant ($P < 0.001$) at 0 h, however, significantly ($P < 0.001$) increased motility parameters were observed in group D after 12 h and in groups C, D, E and F after 24 h when compared to the control. The MTT assay indicated that none of the resveratrol concentrations had a negative or cytotoxic effect on the spermatozoa mitochondrial activity and furthermore showed a significantly ($P < 0.001$) improved cell viability in groups B, C, D, E and F at 24 h. The NBT test showed that the addition of 10 μM resveratrol had an instant positive effect on the spermatozoa protection against free radical production. This protection remained present with a significant impact at 12 h ($P < 0.001$) as well as 24 h ($P < 0.001$). Furthermore, resveratrol concentrations from 50 to 5 μM exhibited significant ($P < 0.05$; $P < 0.001$) protective effects on the spermatozoa free radical formation. The results indicate that the addition of resveratrol, especially in concentrations of 50 μM to 5 μM to the culture medium could be beneficial for the overall stimulation of spermatozoa activity and protection against possible *in vitro* oxidative stress development.

Key words: resveratrol, spermatozoa, bulls, motility, CASA, MTT assay, NBT test

Acknowledgments: This work was supported by the Scientific Agency of the Slovak Republic VEGA No. 1/0532/11 and by the Cultural and Educational Grant Agency of the Slovak Republic KEGA No. 101-001 SPU-4/2010

INTRODUCTION

Uncontrolled overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the resulting oxidative stress (OS) development has become a serious problem in matters related to male fertility (Agarwal et al., 2003). ROS attacks usually result in a decrease in sperm motility, presumably by a rapid loss of ATP, causing axonemal damage (de Lamirande and Gagnon, 1992), a decrease in sperm viability and an increase in middle piece morphology defects, with deleterious effects on sperm capacitation and acrosome reaction, ultimately leading to infertility.

Studies have shown that antioxidants protect spermatozoa from ROS produced by leukocytes, prevent DNA fragmentation, improve semen quality, reduce cryodamage to spermatozoa, block premature sperm maturation and provide an overall stimulation to the sperm cells (Agarwal et al., 2007). However, the majority of them are still uncontrolled, focus on healthy individuals or have indirect end-points of success. Several other studies are noted due to the quality of their study design, and demonstrate compelling evidence regarding efficacy of antioxidants towards improving semen parameters (Kefer et al., 2009).

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene; RES) is a naturally occurring polyphenol synthesized by a variety of plant species in response to injury, UV irradiation and fungal attack. It is present in grapes, berries, peanuts, as well as in red wine (Savouret and Quesne, 2002). Besides known cardio protective effects, RES exhibits anticancer properties: it suppress cell proliferation, has a growth inhibitory effect, potentiates apoptotic effects of cytokines, chemotherapeutic agents and ionizing radiation as reviewed by Aggarwal et al. (2004). In addition of being an antioxidant and a vasorelaxing agent, it modulates lipoprotein metabolism, inhibits platelet aggregation, and exerts a therapeutic activity. Given the structural similarities of RES to diethylstilbestrol (DES) and estradiol, and its activity as a modulator of the estrogen-response systems, it has been classified as a phytoestrogen (Levenson et al., 2003; Aggarwal et al., 2004).

Regarding male fertility, recent *in vivo* studies in animal models demonstrated that RES administration enhances sperm production in rats by stimulating the hypothalamic–pituitary–gonadal axis without inducing adverse effects (Juan et al., 2003). RES may have a positive effect by triggering penile erection and by enhancing blood testosterone levels, testicular sperm count and epididymal sperm motility, as demonstrated in rabbits (Shin et al., 2008). A protective effect of RES against oxidative damage but not against the loss of motility induced by the cryopreservation of human semen has recently been observed as well (Garcez et al., 2010).

This study was designed to evaluate the dose- and time-dependent effects of resveratrol on bovine spermatozoa activity, viability and free radical formation during a 24 hour *in vitro* cultivation.

MATERIAL AND METHODS

Bovine semen samples were obtained from 15 adult breeding bulls (Slovak Biological Services, Nitra, Slovak Republic). The samples had to accomplish the basic criteria given for the corresponding breed. The samples were obtained on a regular collection schedule using an artificial vagina. After collecting the samples were stored in the laboratory at room temperature (22–25°C). Each sample was diluted in physiological saline solution (PS; sodium chloride 0.9 % w/v; Bieffe Medital, Italia) containing 0.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), with various concentrations of RES (trans-resveratrol; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; A – 200; B – 100; C – 50; D – 10; E – 5; F – 1 µM/L) using a dilution ratio of 1:40. The samples were cultivated at room temperature (22–25°C). We compared the control (K) group (medium without RES) with the experimental groups (exposed to different concentrations of RES).

Motility analysis was carried out using the CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system equipped with the SpermVision™ program (MiniTub, Tiefenbach, Germany) and the Olympus BX 51 microscope (Olympus, Japan) at cultivation Times 0 h, 12 h and 24 h. Each sample was placed into the Makler Counting Chamber (depth 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Israel) and the percentage of motile spermatozoa (motility > 5 µm/s; MOT) was evaluated. 1000–1500 cells were assessed in each analysis (Massányi et al., 2008).

Viability of the cells exposed to RES *in vitro* was evaluated by the metabolic activity (MTT) assay (Mosmann, 1983; Knazicka et al., 2012). This colorimetric assay measures the conversion of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, USA) to purple formazan particles by mitochondrial succinate dehydrogenase of intact mitochondria of living cells. Formazan can then be measured spectrophotometrically at a measuring wavelength of 570 nm against 620 nm as reference by a microplate ELISA reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, Finland). The data were expressed in percentage of control (i.e. optical density of formazan from cells not exposed to RES). Results from the analysis were collected during two repeated experiments at each concentration.

The nitroblue-tetrazolium (NBT) test was used to assess the intracellular formation of superoxide radical (Esfandiari et al., 2003). This assay is conducted by counting the cells containing blue NBT formazan deposits, which are formed by reduction of the membrane permeable, water-soluble, yellow-colored, nitroblue tetrazolium chloride (2,2'-bis(4-Nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene)ditetrazolium chloride; Sigma, St. Louis, USA) and superoxide radical. Formazan can be measured spectrophotometrically at a measuring wavelength of 620 nm against 570 nm as reference by a microplate ELISA reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, Finland). The data were expressed in percentage of control (i.e. optical density of formazan from cells not exposed to RES). Results from the analysis were collected during two repeated experiments at each concentration.

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism program (version 3.02 for Windows; GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Descriptive statistical

characteristics (mean, standard error) were evaluated at first. One-way ANOVA with Dunnett's post test was used for statistical evaluations. The level of significance was set at *** ($P<0.001$); ** ($P<0.01$); * ($P<0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

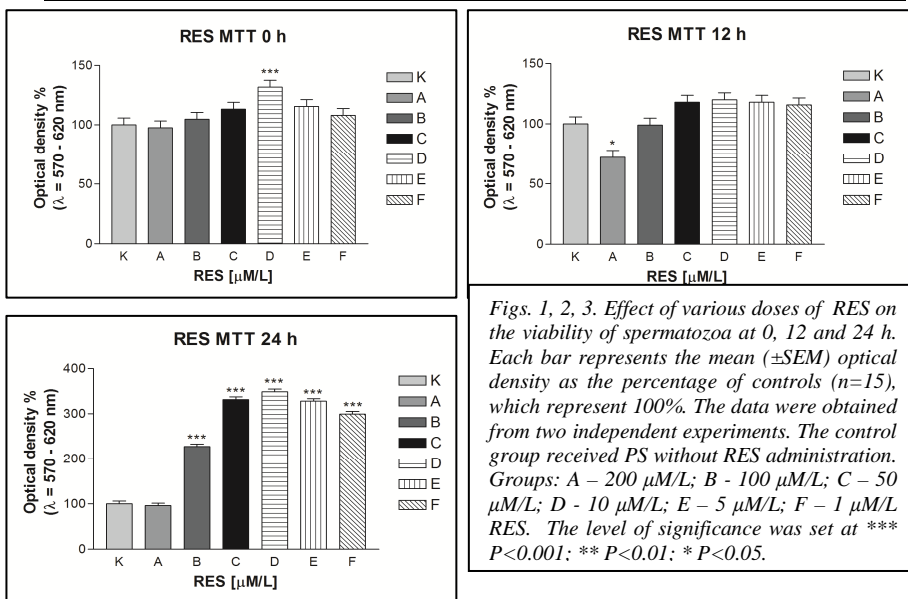
Evaluation of the percentage of motile spermatozoa showed decreased values in all groups cultured for 24 hours (Table 1). Initial (time 0 h) spermatozoa motility was significantly ($P<0.001$) low in group A cultured with 200 μM RES ($54.84\pm 1.01\%$), when compared to the control group K, cultured without any RES addition ($68.07\pm 2.23\%$). After 12 h, significantly ($P<0.001$) lower spermatozoa motility values were detected in group A ($18.53\pm 2.88\%$) together with group B (100 μM ; $39.52\pm 2.16\%$), but a significantly higher spermatozoa motility was observed in group D (10 μM ; $67.91\pm 3.49\%$) in comparison with the control ($53.09\pm 1.62\%$). The highest inhibitory effect of the spermatozoa motility after 24 hours was detected in group A ($2.25\pm 0.51\%$), which was significant when compared to the K group ($40.69\pm 3.07\%$). A significant ($P<0.001$) motility stimulation was found in groups C (50 μM RES; $52.99\pm 2.84\%$), D ($57.17\pm 1.79\%$), E (5 μM RES; $56.19\pm 2.58\%$) and F (1 μM RES; $52.79\pm 3.49\%$).

Tab. 1 Spermatozoa motility (MOT; %) in the presence of resveratrol in PS during different time periods (Mean \pm SEM; n=15)

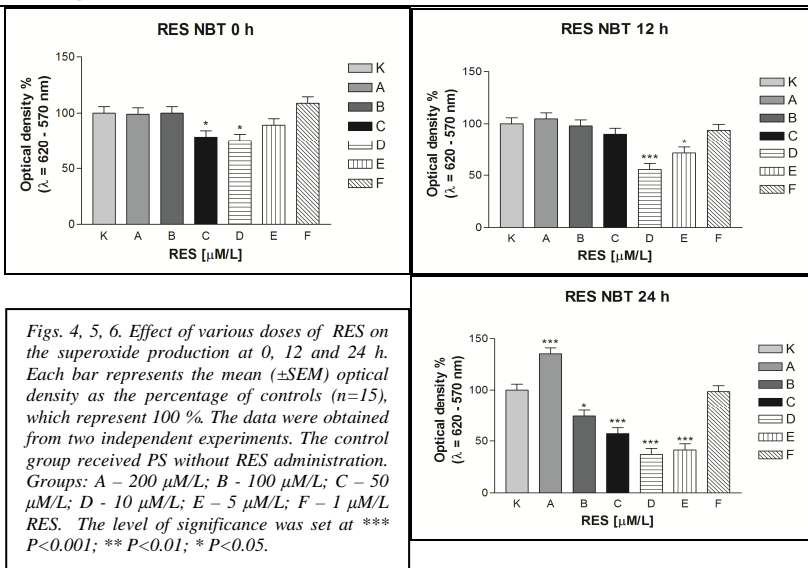
K	A	B	C	D	E	F
0 h						
68.07 \pm 2.2 3	54.84 \pm 1.01** *	64.80 \pm 1.73	72.75 \pm 2.39	72.64 \pm 3.73	73.46 \pm 1.59	65.23 \pm 4.57
12 h						
53.09 \pm 1.6 2	18.53 \pm 2.88** *	39.52 \pm 2.16** *	59.38 \pm 2.22	67.91 \pm 3.49** *	57.14 \pm 1.45	57.09 \pm 3.15
24 h						
40.69 \pm 3.0 7	2.25 \pm 0.51***	24.82 \pm 2.73** *	52.99 \pm 2.84** *	57.17 \pm 1.79** *	56.19 \pm 2.58** *	52.79 \pm 3.49** *

*** ($P<0.001$); ** ($P<0.01$); * ($P<0.05$)

The MTT assay revealed a similar cell viability in all of the experimental groups with a significant ($P<0.001$) increase in the D group ($131.6\pm 4.04\%$) when compared to the control ($100\pm 2.48\%$; Figure 1). After 12 h the spermatozoa viability increased in all experimental groups. The lowest spermatozoa viability was observed in the A group ($P<0.05$; $71.95\pm 4.49\%$; Figure 2). Spermatozoa viability increased significantly ($P<0.001$) in all of the experimental groups after 24 h, with the exception of the A group, which was however similar to the cell viability of the control group ($95.76\pm 5.47\%$ and $100\pm 3.82\%$, respectively; Figure 3).



The NBT test revealed that 50 and 10 μ M of RES had an instant and significant ($P<0.05$) protective effect against superoxide production in the sperm cells (Figure 4). The positive effect of the D group remained persistent and significant ($P<0.001$) over the course 12 h and was subsequently joined by the E group (5 μ M; $P<0.05$; Figure 5). After 24 h, experimental groups with the addition of 100 to 5 μ M of RES exhibited a long-term and significant ($P<0.05$; $P<0.001$) antioxidant protection of the sperm cells and prevention of the escalating intracellular superoxide production, with a special positive effect in case of the groups D ($37.02\pm 3.02\%$) and E ($41.37\pm 3.70\%$) when compared to the control group ($100\pm 1.01\%$). The highest concentration of RES proved to be significantly ($P<0.001$) stimulating towards superoxide formation and hereby causing a higher risk of oxidative stress development ($135.20\pm 2.05\%$; Figure 6).



Resveratrol has emerged as an agent with very complex biological activity. Due to its remarkably broad range of effects, especially with respect to cardiovascular, anticancer, antiinflammatory protection, and longevity, RES has attracted numerous researchers and widespread consumer interest (Calabrese, 2010).

According to numerous *in vivo* studies, RES, if supplemented, is well absorbed, rapidly metabolized, mainly into sulfo and glucuronides conjugates which are eliminated in urine. RES seems to be well tolerated and no marked toxicity was reported (Cottart et al., 2010).

However, substantial *in vitro* studies show, that RES has a dose-dependent diverse activity on the cultivated cells. This compound displays an important dichotomy: low doses improve cell survival, as in cardio-and neuro-protection, yet high doses increase cell death, as in cancer treatment (Brown et al., 2009).

The results of Szende et al. (2000) show a dose-dependent effect of RES on cultivated normal endothelial cell. The cell number in culture decreased drastically at 10 and maroly 100 mg/mL concentration of RES for 24 to 48 h. One mg/mL of RES exerted a slight antiproliferative effect. However, a significant, well-measurable proliferation promoting effect on cells in culture for 24 to 48 h was detected if the amount of RES applied was very small. Mitotic index was practically zero at high doses of RES and at the small dose (0.1 mg/mL) the mitotic index exceeded the control value for 24 to 48 h. The apoptotic index decreased with the decrease of the concentration of RES and this change was near to zero at the 0.1 mg/mL dose. The authors suggest that RES may be a natural concentration-dependent formaldehyde-capturing molecule. It seems that RES facilitated the elimination (collection) of uncontrolled formaldehyde from tissues. The first step in this

elimination could lead to the formation of reaction products (hydroxymethyl derivatives), which may promote apoptotic activity.

Holian and Walter (2001) evaluated the viability and proliferation of cultured normal human keratinocytes exposed to RES. They found that RES, even at submicromolar concentrations, inhibited the proliferation of these cells *in vitro* and, at higher concentrations, was cytotoxic to them.

Zou et al. (1999) investigated the effects of RES on proliferation and cell-cycle control of cultured smooth muscle cells. RES reduced their proliferation in a dose-dependent manner, with concentrations of 50-100 μM RES resulting in 70-90% reduction of the cell proliferation. In this case, the authors assumed, that the antimitogenic effects of RES were not mediated by the induction of apoptosis, but appeared to relate to a G1/S phase block in cell cycle.

Regarding the male reproductive system, Forgacs et al. (2005) examined the effect of various RES concentrations on the viability and activity of the 48 h mouse Leydig cells culture. RES cytotoxicity appeared only at the 200 μM concentration. The basal testosterone level showed a mild (2.5 times), but significant increase in the presence of 12.5-50 μM of RES. Interestingly, RES caused a biphasic effect on the human chorionic gonadotropin (hCG) simulated testosterone production. Their results showed that RES had a small additive effect at lower concentrations (3 μM) whereas at higher concentrations (>25 μM) it turned to be an inhibitor of the testosterone production. Similar effects were observed by Juan et al. (2005) in his *in vivo* experiments, where RES increased the serum testosterone. Based on the presumptions of the authors, one possible way could be through the LH (luteinizing hormone) receptor. Since RES is an estrogen-like molecule, and its effect on estrogen receptor has been proven, there is another possibility that RES modify the hCG-LH response through estrogen receptors (Levenson et al., 2003; Aggarwal et al., 2004). The authors state, that RES has an additive effect (at low concentration) to hCG stimulated testosterone production and suggest that RES had an alternative route to the LH-receptor mediated way, which could be the mentioned receptor-cross-talking or an LH-receptor independent increasing of cAMP-level.

The aim of our study was to analyze the effects of resveratrol on the bovine spermatozoa viability and free radical production *in vitro*. Our results agree with those presented by Collodel et al. (2010) who evaluated the effects of RES on human spermatozoa and rat germinal cells. According to the authors, RES at 100 μM exerted cytotoxic activity against both cell models and it acted in a dose-dependent manner. The LD50 for both models was 50 μM , whereas spermatocytes were more sensitive to the harmful effect of RES with a LD50 was between 50 and 30 μM . In addition to the viability, the authors examined the effects of RES on the motility of swim-up selected sperm. At RES of 100 μM , the motility was absent in all analyzed samples. Progressive motility reached high values at 6 and 15 μM of RES.

In our case, RES concentrations of 200 and 100 μM primarily did not have lethal effects on the spermatozoa viability, however, its effects suppressed the spermatozoa activity parameters. This

observation was apparent especially when analyzing the NBT parameters. 200 μM of RES induced a significant decrease of the motility together with a significant increase of the superoxide formation. 100 μM of RES had similar effects, even though less radical. Although the exact mechanism of RES toxicity has not been defined yet, elevated concentrations of RES were shown to inhibit the F1 complex of the F0/F1-ATPase proton pump of the mitochondrial inner membrane, responsible for the synthesis of ATP from ADP in the oxidative phosphorylation pathway (Zheng and Ramirez, 2000). Since mitochondria are recognized organelles for aerobic production of energy and bear a central role in cellular metabolism, especially in cells and tissues with high metabolic activity (Lagouge et al., 2006), it is not surprising that their dysfunction leads to a decrease of spermatozoa viability. Also, the ability of RES to interfere with the machinery of mitochondrial electron transport could be partially responsible for the depolarization of the mitochondrial membranes and a subsequent cell apoptosis (Shaman et al., 2006). The most probable apoptotic path activated in this case could be the type II pathway associated with the activation of caspase-9 independently of Fas signaling (Dorrie et al., 2001) or via a novel mitochondrial mechanism controlled by Bcl-2 (Tinhofer et al., 2001).

Interesting results were obtained, when the RES concentration was 200 μM . All of the viability markers of the bovine spermatozoa decreased significantly immediately after the semen samples were diluted in the medium. In this case, it is obvious that the RES toxicity can not be explained by a molecular mechanism, since the time for interactions between RES and the cellular structures was too short. However, we did observe that the spermatozoa cultivated in the medium containing 200 μM of RES, had coiled tails, which, together with a severely impaired viability, are signs of the spermal osmotic shock (Khan and Ijaz, 2008). Based on this observations we may assume that a RES concentration of 200 μM , apart from being toxic, changes the osmotic pressure of the medium, which subsequently leads to an altered plasma membrane integrity and a decreased viability of spermatozoa.

Apart from the cytotoxic effects of high RES concentrations, our results show a significant stimulation of all the spermatozoa viability parameters when the concentrations of RES were between 50 and 5 μM . Based on these results we conclude that lower concentrations of RES have beneficial effects on the overall spermatozoa viability and antioxidant status. This conclusion is supported by a large body of evidence from *in vitro* and *in vivo* studies indicating that RES may be favorable to many health aspects. One of the biological activities of RES is its antioxidant potential, since RES is able to reach peroxidized rigid membranes and increase membrane fluidity in order to interact more efficiently with radicals in the altered lipid bilayer (Brittes et al., 2010). Therefore, RES exhibits a protective effect against lipid peroxidation in cell membranes and DNA damage caused by ROS (Frémont, 2000). Also, Lagouge et al. (2006) proved that the effects of small concentrations of RES were associated in with an induction of genes for oxidative phosphorylation and mitochondrial biogenesis, therefore stimulating mitochondrial functions of the cell, from what we may conclude that small concentrations of RES, apart from being antioxidant, could mobilize the spermatozoa energetic metabolism and therefore improve spermatozoa viability.

CONCLUSIONS

Our results, even though being preliminary, support evidence of the dose-dependent activity *in vitro* and the scavenger potential of low concentrations RES against oxidative stress induced in bovine spermatozoa. The development of new spermatozoa culture media that can better protect sperm from the ROS damage and improve their energy requirements is absolutely required. RES, in small concentrations, could be used as a ROS scavenging and a metabolic promoting supplement, especially in techniques such as IVF-ICSI or cryopreservation of semen (Tremellen, 2008; Garcez et al., 2010). These results obviously cannot foresee an *in vivo* outcome, since the effect of RES supplementation on male infertility has not yet been explored. To translate this findings into clinical reality, studies on the potential toxicity, pharmacokinetics and bioavailability of RES in the organism, followed by clinical trials, are definitely needed.

REFERENCES

- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility Sterility*, 79: 829-843.
- Agarwal A., Prabakaran S.A., Sikka S.C. (2007): Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series*, 26: 1-12.
- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. (2004): Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24: 2783-2840.
- Brittes J., Lúcio M., Nunes C., Lima J.L., Reis S. (2010): Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(8): 747-754.
- Brown L., Kroon P.A., Das D.K., Das S., Tosaki A., Chan V. (2009): The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 33: 1513-23.
- Calabrese E.J., Mattson M.P., Calabrese V. (2010): Dose response biology: the case of resveratrol. *Human Experimental Toxicology*, 29(12): 1034-1037.
- Collodel G., Federico M.G., Geminiani M., Martini S., Bonechi C., Rossi C., Figura N., Moretti E. (2010): Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology*, Article in press. doi:10.1016/j.reprotox.2010.11.010.
- Cottard Ch.-H., Antoine V. N., Laguillier-Morizot Ch., Beaudoux J. L. (2010): Resveratrol bioavailability and toxicity in human. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 7-16.
- De Lamirande E., Gagnon C. (1992): Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, 13: 379-386.

Dorrie J., Gerauer H., Wachter Y., Zunino S.J. (2001): Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Research*, 61: 4731-4739.

Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RS, Thomas Jr. AJ, Agarwal A. (2003): Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(6): 862-870.

Forgacs Zs., Somosy Z., Telbisz A., Massanyi P., Lukac N. (2005): Effect of resveratrol on the testosterone production of mouse primary leydig cell culture. *Celoslovensky Seminar z Fyzologie Zivocichov* (June 8-9, 2005) Nitra, Slovak Republic. pp. 18-24. http://www.slpk.sk/eldo/2005/002_05/forgacs.pdf

Frèmont L. (2000): Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66: 663–73.

Garcez M.E., Branco C.D., Lara L.V., Pasqualotto F.F., Salvador M. (2010): Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility Sterility*, 94(6): 2118-2121.

Holian O. and Walter R.J. (2001): Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry - Supplement*, 36: 55-62.

Juan E., Gonzàles-Pons, E., Munuera T., Ballester J., Rodríguez-Gil J. E., Planas J. M. (2005): Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Journal of Nutrition*, 135: 757-760.

Kefer J.C., Agarwal A., Sabanegh E. (2009): Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16: 449-457.

Khan M.I.R., Ijaz A. (2008): Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Animal* 2(4): 548-553.

Knazicka Z, Tvrda E, Bardos L, Lukac N. (2012): Dose- and time-dependent effect of copper ions on the viability of bull spermatozoa in different media. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 47: 1294-1300.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin D., Messadeq D., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., Auwerx J. (2006): Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127(6): 1109-1122.

Levenson A.S., Gehm B.D., Pearce S.T., Horiguchi J., Simons L.A., Ward J.E., Jameson J.L., Jordan V.C. (2003): Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *International Journal of Cancer*, 104: 587-596.

Massányi, P., Chrenek, P., Lukáč, N., Makarevich, A.V., Ostro, A., Živčák, J., Bulla, J. (2008): Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility using CASA system. In *Slovak Journal of Animal Science*, 41(2): 60-66.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.

Savouret J. F. and Quesne M. (2002): Resveratrol and cancer: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(2): 84-87.

Shaman J.A., Yamauchi Y., Ward W.S. (2006): Sperm DNA fragmentation: awakening the sleeping genome. *Biochemical Society Transactions*, 35: 626-628.

Shin S., Jeon J.H., Park D., Jang M.J., Choi J.H., Choi B.H. (2008): Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research*, 31: 83–87.

Szende B., Tyihak E., Kiraly-Veghely, Z. (2000): Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Experimental Molecular Medicine*, 32: 88-92.

Tinhofer I., Bernhard D., Senfter M., Anether G., Loeffler M., Kroemer G., Kofler R., Csordas A., Greil, R. (2001): Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *The FASEB Journal*, 15: 1613-1615.

Tremellen K.(2008): Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14: 243–258.

Zheng, J., and Ramirez, V. D. (2000): Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 130(5): 1115–1123.

Zou J., Huang Y., Chen Q., Wang N., Cao K., Hsieh T.C. and Wu J.M. (1999): Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. *International Journal of Oncology*, 15: 647-651.

Section – Techniques and Technology

INOVATIVE FILTRATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION WATER USING NANOTEXTILE

Došek M., Lev J., Černý M., Kalhotka L.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xdosek1@node.mendelu.cz, michalc@mendelu.cz

ABSTRACT

This paper describes experiments performed to remove microbial pollution from contaminated water by nanotextiles. The main objective of the experiment was to verify effectivity and filtering capabilities of the new developed nanotextile.

High nanotextile porosity with pore sizes of tens of nanometers, is a prerequisite for using nanotextiles in filtration, because size of the bacteria is greater than size of the nanopores and the bacteria are simply captured in nanotextile network.

During the experiment has been tried out two new types of non-woven material nanotextiles, which were supposed to be high efficiency. Microbional contamination was simulated using the bacterium *Escherichia coli*.

Contaminated water was filtered under pressure. After filtration was performed microbional analysis of the filtrate and filtration material. The measured results were compared to the original, known contamination of the filtered sample. During the experiment was confirmed the assumption of relatively high efficiency of certain nanotextiles and their suitability for filtration of wastewater.

Key words: bacteria, nanotextile, filtration

Acknowledgments: This study was supported and financed by the Technology Agency of the Czech Republic n. TA01010356.

ÚVOD

Nanomateriály (NM) a nanotechnologie se v posledních dvaceti letech dostaly do popředí vědeckého zájmu a nacházejí uplatnění v mnoha oborech lidské činnosti. Počet výrobků využívajících nanomateriály stále roste. Roční produkce NM je odhadována na stovky až tisíce tun a bude nadále stoupat.[1] Obecně jsou nanomateriály považovány za materiál budoucnosti, objevuje se však řada studií které popisují možné škodlivé účinky některých nanomateriálů na lidské zdraví a životní prostředí. Například při výrobě uhlíkatých nanotrubic byl prokázán vznik řady toxických či rakovinotvorných zplodin (CNTs).[2] Reálný toxický účinek nanočástic z hlediska jejich současných aplikací a používání spočívá spíše v chronické toxicitě nebo v opožděné toxicitě než v toxicitě akutní.

Nanomateriály se používají v elektronice, automobilovém a technickém průmyslu, jako přísady do barev a lepidel. Uplatnění nacházejí v předmětech denní potřeby (opalovací kosmetika, pasty, vysavače...).[3] Doba nanotechnologií a nanomateriálů skýtá řadu možností, jak zvýšit efektivitu doposud používaných technologií a zároveň chránit a šetřit cenné přírodní zdroje, důležité pro budoucnost lidské populace. Jedním z příkladů může být například voda, která je základním stavebním prvkem všech organismů a přístup k pitné vodě je pro člověka nezbytný. Voda je základní podmínkou života, nejen že život ve vodě vzniknul, ale bez ní by žádný organismus nemohl dlouho přežít. Je to rozpouštědlo, ve kterém se odehrávají všechny chemické procesy v organismu. Počet lidí mající přístup k nezávadné vodě se sice zvyšuje, ale stále pětina lidí na světě je tato možnost odepřena. [4]

Pomineme-li znečištění fyzikálního a chemického původu, představuje závažný problém mikrobionální kontaminace vody. Díky tomu umírá celosvětově mnoho lidí na následky způsobené požitím takto kontaminované vody, která může způsobit závažné žaludeční a střevní potíže, které mnohdy končí i smrtí. V případě mikrobiální kontaminace vody se však naskýtá možnost elegantního řešení toho problému. Díky miniaturním pórům nanotextilie se předpokládá vysoká účinnost zachycení mikrobionálního polutantu v síťovité struktuře nanotextilie, jelikož bakterie, jejichž rozměry se pohybují v jednotkách mikrometrů, nemohou projít miniaturními nanopóry. Díky vysoké porositě má nanotextilie mnohem menší tlakový odpor, oproti současným materiálům. Pokud by se tedy podařilo z těchto struktur vyvinout filtrační materiál a aplikovat jej v

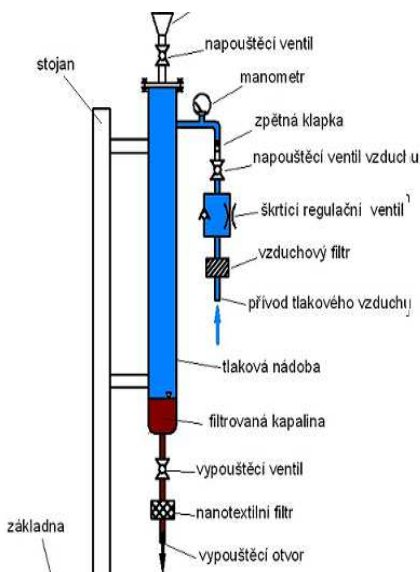
praxi, znamenalo by to značný přínos nejen pro lidstvo, ale i pro životní prostředí, jelikož by se omezilo použití chemických látek pro odstranění mikrobiální kontaminace a snížily by se energetické nároky.

MATERIÁL

Zkušební zařízení:

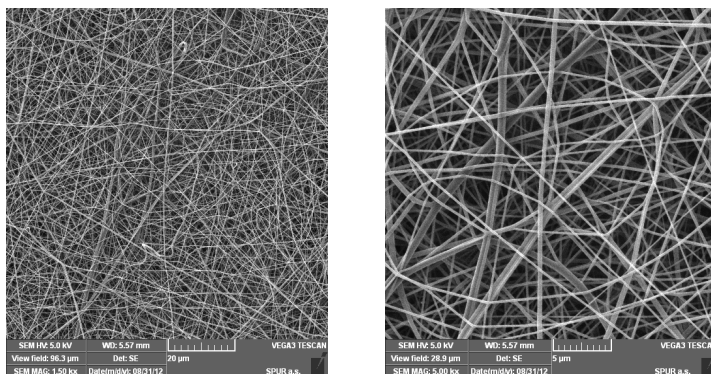
Pro účely pokusu bylo navrženo a sestrojeno speciální filtrační zařízení. Základem filtračního zařízení je tlaková nádrž o průměru 80 mm, která je mechanicky připevněna do robustního držáku. Ve vrchní části nádrže je umístěna příruba s nálevkou o průměru 20 mm a kulovým ventilem. Příruba je připevněna k nádrži osmi šrouby, které zaručují dostatečný svorný tlak na gumové těsnění a umožňují snadnou demontáž při čištění zařízení. Z boční strany je přivedeno potrubí tlakového vzduchu o průměru 15 mm. Přívod tlakového vzduchu je opatřen snímačem tlaku, zpětnou klapkou, regulačním ventilem, filtrem vzduchu a koncovkou rychlospojky. Ve spodní části zařízení se nachází vypouštěcí potrubí, přípojka na snímač tlaku vypouštěcí ventil, a držák filtračního materiálu.

Obr. č. 1: Filtrační zařízení



Pro samotný experiment byly použity jako filtrační materiál polyuretanové nanotextilie s označením 3PI 925 Ce 15 PP50 s plošnou hmotností $3,3 \text{ g/m}^2$ a MŘ 12. Plošná hmotnost materiálu MŘ 12 byla $2,45 \text{ g/m}^2$. Jako nosný materiál pro nanovlákná byla použita polypropylenová podložka.

Obr. č. 2: SEM nanovláken, použitých k přípravě membrány 3xPL925 CE15 PP50, zvětšení 1500x, 5000 x.



METODIKA

Napouštěcím ventilem tlakového vzduchu byl přiveden tlakový vzduch, pomocí regulačního ventilu byl nastaven na manometru tlak 10^5 Pa. Nanotextilní materiál na nosném médiu byl upnut do držáku. Vypouštěcím ventilem ve spodní části zařízení byla kapalina přivedena na filtr a po filtraci zvoleného objemu filtrátu byl vypouštěcí ventil uzavřen. Pro orientační výpočet průtoku přes filtr byl zaznamenáván čas filtrace.

Jako mikrobionální polutant byla zvolena bakterie *Escherichia coli* o rozměrech: 1,1 - 1,5 x 2 – 6 µm. Tyto bakterie často slouží jako jeden z hlavních indikátorů znečištění vody.

Filtrace *E. coli* metodika mikrobiologické analýzy:

E. coli CCM 2024 byla kultivována 24 h v 250 ml TSB (Biokar Diagnostics, France), po 24 h byla bakteriální suspenze zcentrifugována 20 min při 3000 rpm. Po slítí roztoku živného média byla usazenina resuspendována ve sterilním fyziologickém roztoku a opětovně zcentrifugována a resuspendována. Z takto promyté kultury *E. coli* o koncentraci cca 10^8 buněk v 1 ml bylo následně desetinným ředěním připraveno potřebné množství fyziologického roztoku s *E. coli* o teoretické koncentraci 10^6 buněk v 1 ml. Takto připravený roztok byl použit pro experiment.

Po provedení experimentálních filtrací byly vybrané filtry vytřepány 3 min v 50 ml sterilního fyziologického roztoku na homogenizátoru typu STOMACHER. V získaných filtrátech, původních roztocích s *E. coli* a výtřepech z filtrů byly stanoveny počty *E. coli* plotnovou metodou. Petriho misky byly inokulovány 1 ml vzorku nebo jeho desetinného ředění a kultivovány na VRBL agar (Biokar Diagnostics, France) 24 h při 37°C. Po uplynutí doby kultivace byly na miskách odečteny narostlé kolonie a výsledek byl vykázan jako KTJ/ml resp. 50 ml vzorku.

VÝSLEDKY

Přefiltrované i nepřefiltrované médium bylo podrobeno mikrobiologickému rozboru na přítomnost *E. coli*. Po uplynutí doby kultivace byly na miskách odečteny narostlé kolonie *E. coli* a stanoven počet bakterií v KTI/ml. Při experimentech byly naměřeny následující hodnoty (viz. tabulka a graf)

Tab. č. 1: Výsledky rozborů a účinnost filtrace

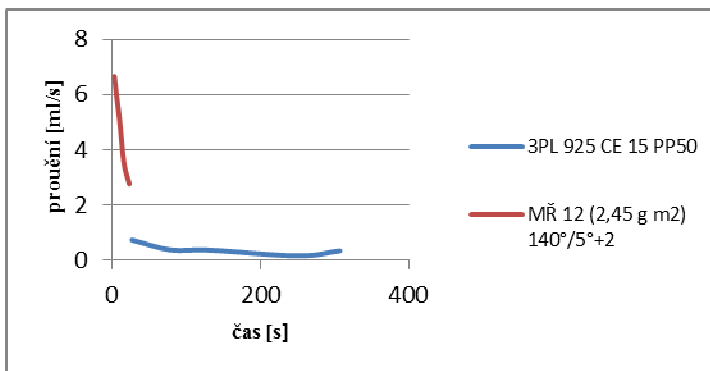
Číslo vzorku	Označení mat.	Čas filtrace [sec.]	Počet po filtraci [KTI/ml]	Objem [ml]	Osvětlení	Účinnost [%]
1	3PL 925 CE 15 PP50	307	24500	100	ne	98,17
2	MŘ 12 (245 g m ²) 140°/5°+2	1413	677350	100	ne	99,95
3	3PL 925 CE 15 PP50	600	610550	200	ne	99,95
4	MŘ 12 (245 g m ²) 140°/5°+2	10	454550	100	ano	96,61
5	3PL 925 CE 15 PP50	600	90400	250	ano	99,32
6	MŘ 12 (245 g m ²) 140°/5°+2	953	521500	500	ano	99,96
7	3PL 925 CE 15 PP50	153	63200	100	ne	99,53
8	3PL 925 CE 15 PP50	141	53600	100	ano	99,60

Pozn: Vstupní koncentrace bakterie *E. Coli* ve filtrované suspenzi byla $1,3 \cdot 10^7$

Průměrná účinnost materiálu 3PL: 99,314 %

Průměrná účinnost materiálu MŘ: 98,84 %

Graf. 1: Rychlost proudění pro objem 100 ml



DISKUZE

Během experimentu byl potvrzen předpoklad relativně vysoké účinnosti nového typu nanotextilních materiálů pro odstranění bakteriální kontaminace z vody.

Oba testované materiály vykazovaly vysokou filtrační účinnost. Materiál označený jako MŘ 12 ($2,45\text{g/m}^2$) $140^\circ/5^\circ+2$, se vyznačoval prakticky stejnou účinností jako 3PL 925 CE 15 PP50.

U nanotextilie s označením MŘ, byla naměřena větší rychlost proudění. Pravděpodobně to bylo způsobeno strukturou tohoto materiálu, který se vyznačuje menší gramáží na jednotku plochy. Díky menší gramáži materiálu může docházet eventuelně ke snížení filtrační účinnosti. V tomto případě byl však rozdíl mezi materiály velmi malý a vzhledem k počtu měření neprůkazný.

Naše výsledky (99,31 % a 98,84 %) jsou srovnatelné se studií provedenou Gomezem (2006) [5], která se zabývá odstraněním *E. coli* z odpadní vody pomocí komerčně užívaných membrán. V tomto případě se pohybovala účinnost 99,9% and 100%.

Během tohoto experimentu jsme dosáhli rovněž srovnatelných podobných výsledků jaké udává ve své studii Bjorge (2009) [6]. V této studii bylo zkoumáno odstranění *E.coli* z nemocničních odpadních vod. Bjorge (2009) dosáhl při odstraňování mikrobiální kontaminace log. hodnoty v rozmezí 1,7 až 2,1, avšak v tomto případě byl efekt podpořen funkcionalizací nanovláken stříbrem.

I přes vysokou účinnost bychom chtěli výsledky ještě vylepšit a optimalizovat filtrační materiál. Pro další experimenty se plánuje vyzkoušet nanotextilie s aditivou s FTC pro zvýšení biocidních účinků. Bude se rovněž testovat mechanická odolnost a rovněž budou také provedeny experimenty s reálnou vodou z ČOV.

U některých experimentů, které nejsou zpracovány z časových důvodů do tohoto článku, se používá fotoaktivních, antibakteriálních látek jako ftalocianiny nebo TiO_2 . Prokázalo se, že osvětlení samo o sobě nemá na snížení počtu bakterií při filtraci vliv.

ZÁVĚR

V oblasti filtrace vody se jeví nanotextilie jako velice perspektivní směr, ve kterém se může čištění odpadních a mikrobiálně kontaminovaných vod ubírat. Vhodnost nanotextilí pro odstranění mikrobiologického znečištění vody se podařilo prokázat experimentálně s relativně vysokou účinností okolo 99 %. Pomocí těchto a dalších plánovaných testů zaměřených na filtraci těchto vod přes klasické nanotextilie a nově přes nanotextilie, do jejichž vláken jsou navázány antibakteriální látky, které se při filtraci neuvolňují, se jeví jako velmi perspektivní, účinná a hlavně ekonomicky a environmentálně výhodná metoda. Z výsledků rovněž vyplývá, že nanotextilie je možné využít i při filtraci pevných částic o velikosti 1-6 μm . Tato technologie by se mohla uplatnit i v terciálním dočištění odpadní vody na ČOV či v úpravě pitné vody.

V současnosti je naplánovaná celá řada filtračních experimentů, za účelem nalezení materiálu vhodného pro poloprovodní a provozní podmínky. Výzkum bude nadále pokračovat v rámci výzkumu pro využití nanotextilií v oblasti čištění vody, který je podpořený grantem TAČR.

LITERATURA

1. Navarro E., Baun A., Behra R., Hartman N., Filser J., Miano A.-J., Quigg A., Santschi P., Sigg L., *Ecotoxicology* 17, 372 (2008)
2. Craig S. Byrnes, "Nanotechnology and the Regulation of New Technologies." , <http://digitaljournal.com/article/220456> (accessed October 14, 2012).
3. Handy R. D., Shaw b. J.: *Integr. Environ. Assess Manage.* 3, 457 (2007)
4. Mgr. Jana Šejnohová, . *Country numerical population growth as a global problem*. Brno: MASARYK UNIVERSITY, 2012.
http://is.muni.cz/th/80461/pedf_c/Pocetni_rust_obyvatelstva_Zeme_jako_globalni_problem.txt
(accessed October 14, 2012).
5. Gómez M., de la RUA A., Garralón G., Plaza F., Hontoria E., and Gómez M.A.,(2006) Urban wastewater disinfection by filtration technologies, *Desalination*, 190, 16 – 28.
6. Bjorge D., Daels N., De Vrieze S., Dejans P., Van Camp T., Audenaert W., Hogie J., Westbroek P., De Clerck K., Van Hulle W.H.S., (2009), Performance assessment of electrospun nanofibers for filter applications, *Desalination* 249, 942–948.

INLUENCE OF CHANGES IN MUNICIPAL WASTE COLLECTION SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF RECOVERABLE AND NON-RECOVERABLE COMPONENTS

VLIV ZMĚNY SYSTÉMU SVOZU KOMUNÁLNÍHO ODPADU NA PRODUKCI JEHO VYUŽITELNÝCH A NEVYUŽITELNÝCH SLOŽEK

Hlavenka T.

Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: tomas.hlavenka@tiscali.cz

ABSTRACT

In May 2011, at 20 thousand inhabitants in 17 municipalities was implemented a system of separate collection of biodegradable waste. Based on the experience of the operation of the system in selected municipalities were gradually changed haul systems separation of packaging waste at rounds men. The paper presents data from 18 months of operation altered municipal waste collection system, its basic analysis and recommendations for improvement.

Key words: municipal waste, biodegradable waste, material recycling, packaging waste

ÚVOD

V květnu 2011 byl u 20 tis obyvatel v 17 obcích zaveden systém separovaného sběru a svozu biologicky rozložitelného odpadu. Na základě zkušeností z provozu systému byly ve vybraných obcích postupně měněny odvozní systémy separace obalových odpadů na donáškové. Příspěvek přináší data z 18 měsíců provozu měněného systému svozu komunálního odpadu[1], jeho základní analýzy a doporučení pro zlepšení.

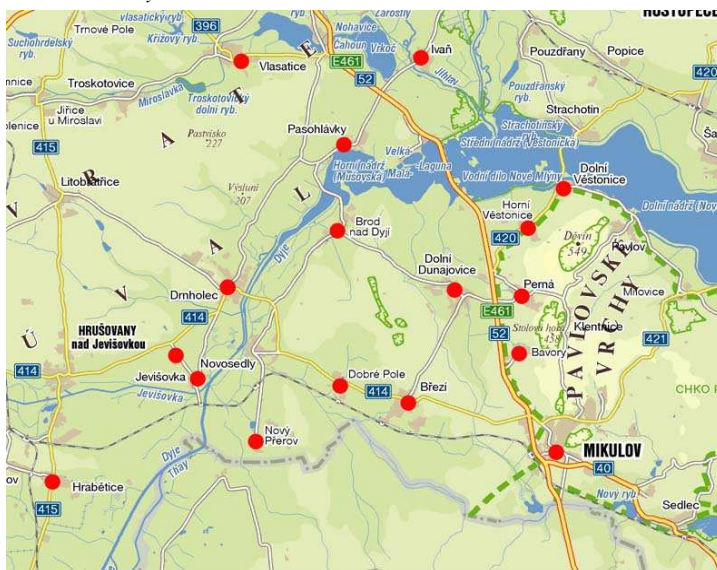
Analýza dat nastoluje formulování dvou výchozích hypotéz:

- 1.) Produkce jednotlivých složek komunálních odpadů je zásadně ovlivněna systémem svozu komunálních odpadů
- 2.) Vhodně nastavený systém separovaného sběru a svozu bioodpadu vede ke snížení produkce směšného komunálního odpadu (TKO) bez navýšení celkové produkce odpadů.

MATERIÁL A METODIKA

V Svozové území s 20 tisíci obyvatel v 17 obcích, systém svozu komunálních odpadů.

Obrázek 1: Analyzované svozové území



V dubnu 2011 bylo rozmístěno 4 136 nádob o objemu 120l a 55 nádob o objemu 1100l na separovaný sběr biologicky rozložitelného odpadu.

Svoz bioodpadu začal ve 20 týdnu 2011 (od 16. do 22. května 2011).

Systém je v obcích Mikulov, Drnholec, Březí, Dobré Pole, Brod nad Dyjí, Jevišovka, Vlasatice, Horní Věstonice, Dolní Věstonice, Klentnice, Hrabětice, Nový Přerov a Bavory provozován odvozným způsobem s tím, že nádoba na bioodpad je takřka ve všech rodinách.

V obci Novosedly je zaveden odvozný systém. Nádoby na bioodpad má významně nižší procento rodin.

V obcích Pasohlávky, Perná a Ivaň je zaveden donáškový způsob separace bioodpadu.

Všechny obce jsou plynofikované vyjma obcí Bavory, Ivaň a Pasohlávky.

Se startem systému přistoupila drtivá většina obcí na čtrnáctidenní svoz bioodpadu a čtrnáctidenní svoz komunálního odpadu. Výjimku tvoří obec Novosedly a Mikulov. Město Mikulov přistoupilo na čtrnáctidenní svoz komunálního odpadu od prvního července 2011, tedy právě s koncem 2. kvartálu.

V obci Vlasatice byl sezónně pozastaven svoz bioodpadu od 1. 11. 2011 do 29. 2. 2012 a byl zaveden týdenní svoz TKO, v obci Pasohlávky od 2. 12. do 16. 2. 2012 (zde běží svoz bioodpadu kontejnery) a od 18. 5. 2012 zde začal odvozný systém separace obalových dopadů (ODVOZ), v obci Hrabětice byl pozastaven svoz bioodpadu od 5. 12. 2011 do 29. 2. 2012 a ODVOZ začal 19. 3. 2012 (pouze plast) TKO bylo sváženo jednou týdně. V obci Jevišovka byl pozastaven svoz bioodpadu od 1. 1. 2012 do 1. 4. 2012, v obci Horní Věstonice od 17. 1. 2011 do odvolání, odvoz začal 29. 6. 2012. V Březí a Drnholci začal úplný a částečný odvoz v říjnu 2011. V obci Ivaň byl přes zimu zaveden týdenní svoz komunálního odpadu. Odvoz dále začal: V obci Bavory od 12. 6. 2012, v obci Novosedly od 3. 5. 2012 (týdenní svoz TKO), v obci Nový Přerov od 19. 4. 2012, v obci Dolní Věstonice od 4. 5. 2012, v obci Brod nad Dyjí od 22. 3. 2012 a v obci Dobré pole od 30. 4. 2012.

Ve 4Q roku 2011 byla velmi mírná zima a mrzlo jen řádově jednotky dní.

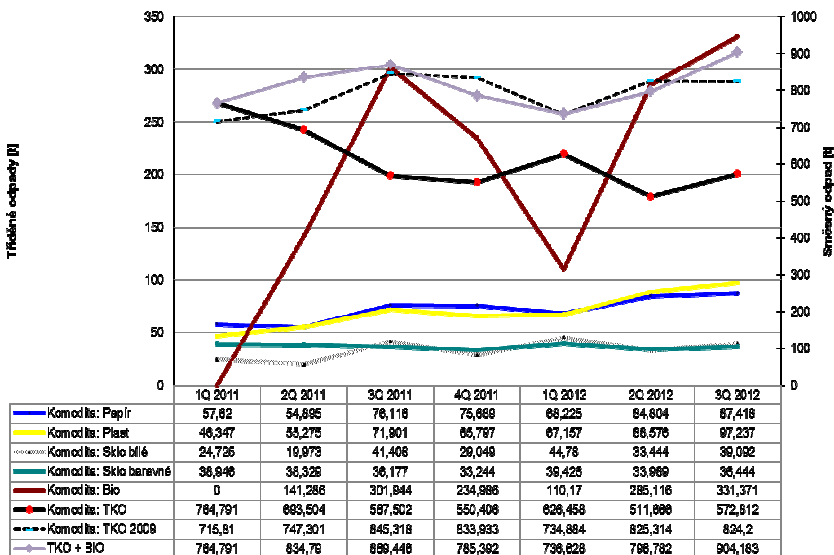
V 1Q roku 2012 byla v lednu a únoru velmi tuhá zima.

Souhrnná analýza produkce odpadů

Z obrázku číslo 2 je patrný razantní pokles produkce smíšeného komunálního odpadu a nárůst produkce biologicky rozložitelného odpadu. Součet produkce biologicky rozložitelného odpadu a smíšeného komunálního odpadu se v rámci variability produkce v zásadě shoduje s daty posunutými o dva roky zpět (TKO 2009). Potvrzuje se tedy výchozí hypotéza číslo 2, že vhodně nastavený systém separovaného sběru a svozu biologicky rozložitelného odpadu vede ke snížení produkce smíšeného komunálního odpadu bez navýšení celkové produkce odpadů.

Z obrázku číslo 2 je dále zřejmé, že v letních čtvrtletích může být pomocí odvozného systému sběru a svozu biologicky rozložitelného odpadu dosaženo až třiceti tří procentního poklesu produkce smíšeného komunálního odpadu, přičemž v zimních čtvrtletích i s podílem mrazivých měsíců dosahuje tento pokles přibližně 15 procent. Oba údaje platí pro porovnání s daty za stejná období posunutá o dva roky zpět. Tedy před započítáním zavádění veškerých inovací systému sběru a svozu komunálních odpadů.

Obrázek 2 Vývoj produkce složek komunálních odpadů



Analýza produkce odpadů pro odvozný systém separace obalových odpadů

Protože byl odvozný systém separace obalových odpadů zaváděn postupně a dosud běží v obcích, ve kterých žije přibližně polovina obyvatel, bude analýza dat tohoto systému provedena na sídle, ve kterém byl zaveden nejdříve, tedy se začátkem třetího čtvrtletí roku 2011.

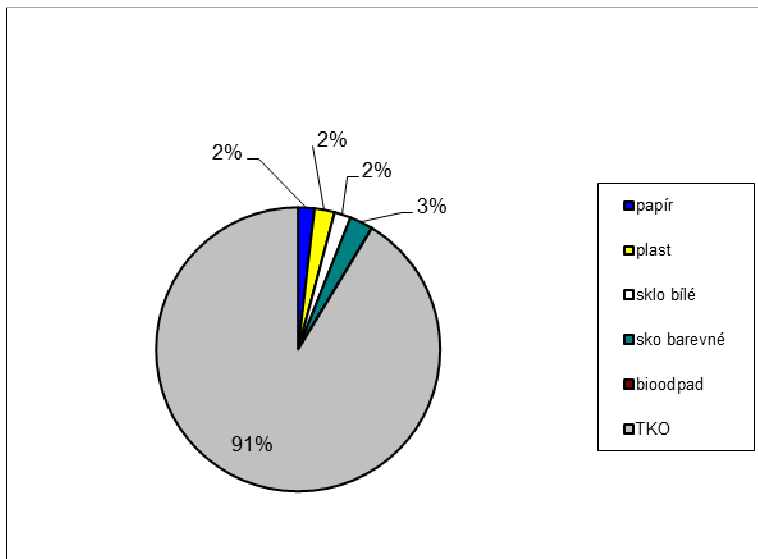
Obrázek číslo 10 prezentuje vývoj produkce složek komunálního odpadu v obci Břeží. Se zavedením systému separovaného sběru a svozu bioodpadu došlo k jevům popsaným výše obdobně. Se zavedením odvozného systému separace obalových odpadů došlo k dalšímu poklesu produkce smíšeného komunálního odpadu a k přesunu tohoto hmotnostního toku do materiálově využitelných složek komunálního odpadu (papír a plast).

Z obrázku číslo 10 je patrné, že vlivem změny systému sběru a svozu obalových odpadů a zavedením separovaného sběru a svozu bioodpadu může dojít k poklesu produkce smíšeného komunálního odpadu až na 41 % v porovnání s produkcí před dvěma lety a zároveň ke zvýšení produkce obalových odpadů ze 4 % na 16 až 17 % komunálních odpadů.

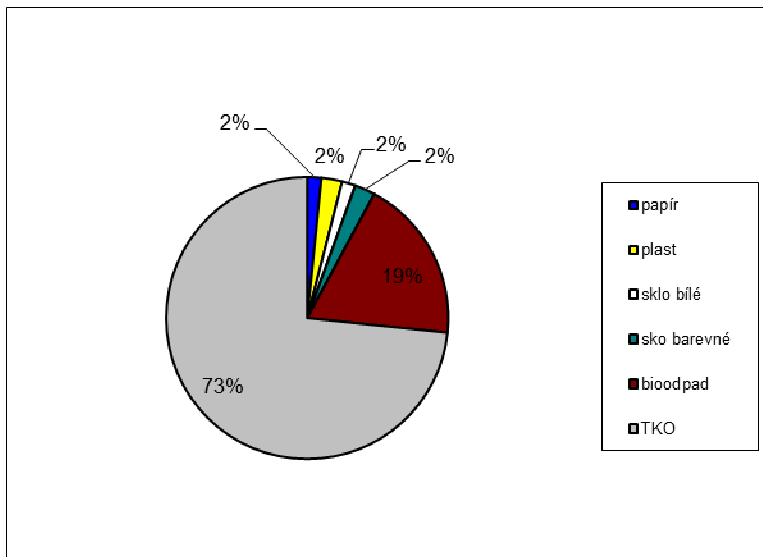
Tyto výsledky naznačují potvrzení výchozí hypotézy číslo 1, že produkce jednotlivých složek komunálních odpadů je zásadně ovlivněna systémem svozu komunálních odpadů.

Změny v procentuálním zastoupení složek komunálních odpadů prezentují obrázky 3 až 9.

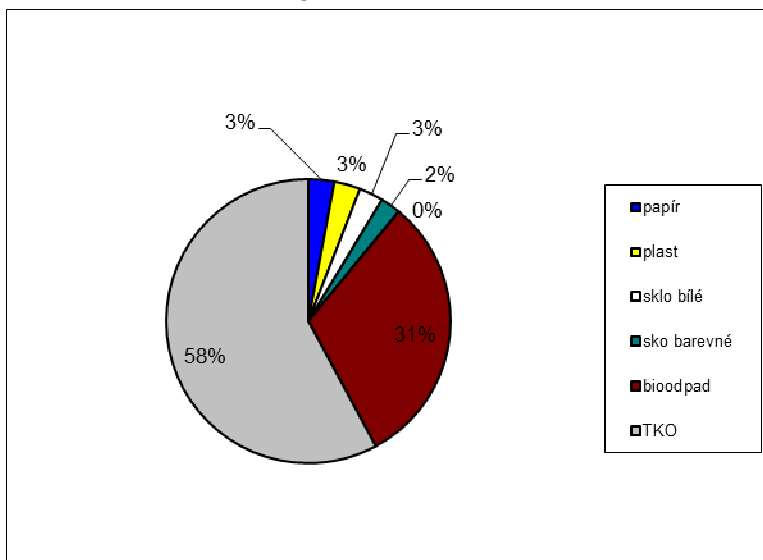
Obrázek 3 Složení komunálních odpadů v Březi 1Q 2011



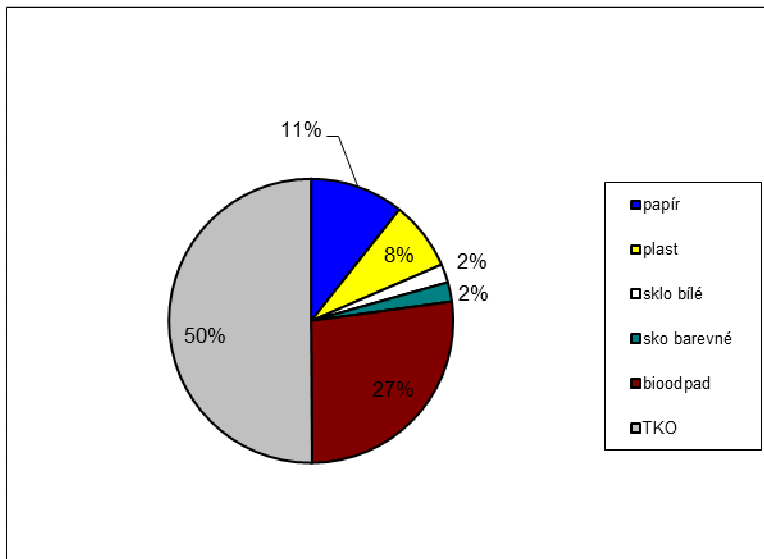
Obrázek 4 Složení komunálních odpadů v Březi 2Q 2011



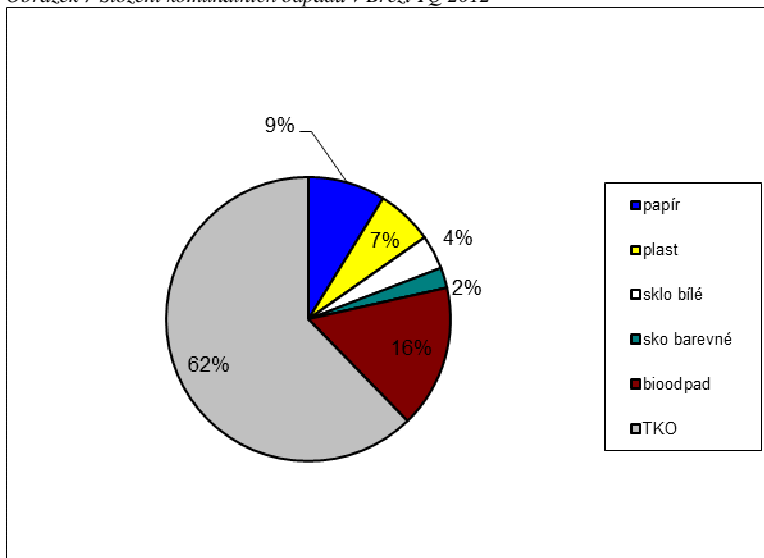
Obrázek 5 Složení komunálních odpadů v Březi 3Q 2011



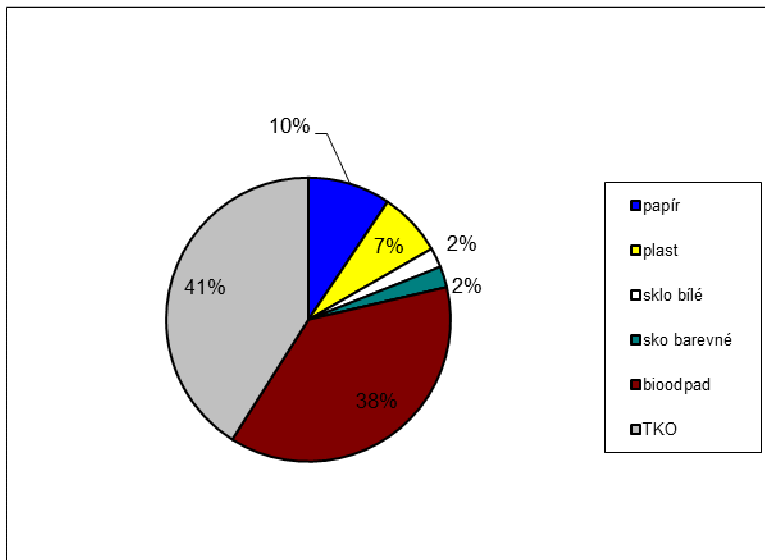
Obrázek 6 Složení komunálních odpadů v Březí 4Q 2011



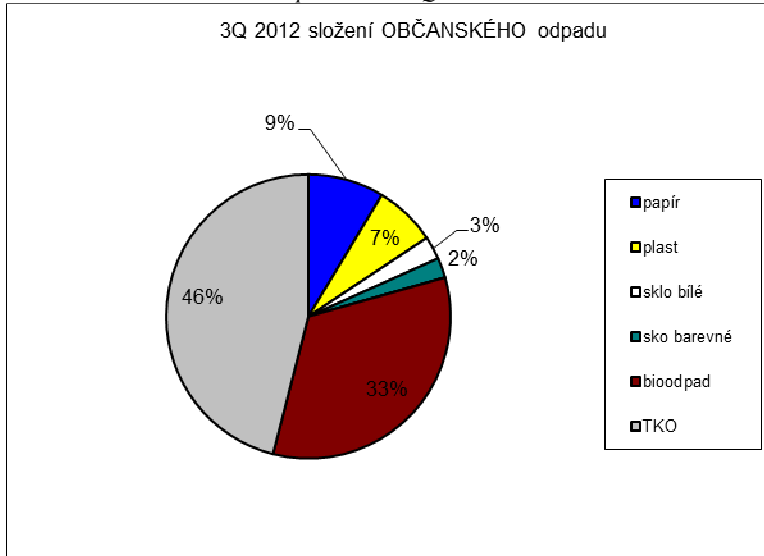
Obrázek 7 Složení komunálních odpadů v Březí 1Q 2012



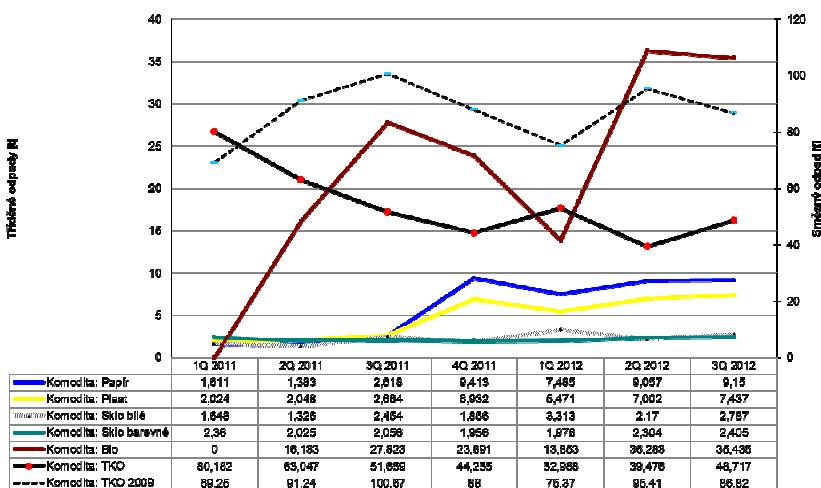
Obrázek 8 Složení komunálních odpadů v Březí 2Q 2012



Obrázek 9 Složení komunálních odpadů v Březí 3Q 2012



Obrázek 10 Vývoj produkce složek komunálních odpadů v obci Břežč



ZÁVĚR

Základní analýza dat z provozu systému separovaného sběru a svozu biologicky rozložitelné složky komunálního odpadu a odvozného systému sběru a svozu obalových odpadů naznačila potvrzení výchozích hypotéz, tedy že produkce jednotlivých složek komunálních odpadů je zásadně ovlivněna systémem svozu komunálních odpadů a že vhodně nastavený systém separovaného sběru a svozu bioodpadu vede ke snížení produkce směšného komunálního odpadu (TKO) bez navýšení celkové produkce odpadů. Vliv změny systému může přinést pokles produkce směšného komunálního odpadu až na 41 % v porovnání s produkcí před dvěma lety. Zároveň dojde ke zvýšení produkce obalových odpadů ze 4 % na 16 až 17 % a k vyprodukování 16 % až 38 % biologicky rozložitelné složky komunálních odpadů.

Všechny systémy byly refinancovány na základě výběru místního poplatku[2] [3]. Pro zlepšení motivace využívat plně rozvinutý systém separace odpadů se nabízí zvýšení míry pozitivní finanční motivace uživatelů systému.

LITERATURA

[1] STKO spol. s r.o.: Průběžná zpráva o vývoji separovaného sběru a svozu bioodpadu, STKO spol. s r.o., Mikulov 2012

[2] Webová prezentace portálu veřejné správy [online]. Zákon o odpadech a o změně některých dalších zákonů [cit. 2012-10-04]. Dostupné
<<http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=51365&fulltext=&nr=185~2F2001&part=&name=&rpp=15#local-content>>

[3] Webová prezentace portálu veřejné správy [online]. Zákon o místních poplatcích [cit. 2012-10-04]. Dostupné
<<http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=38937&fulltext=&nr=565~2F1990&part=&name=&rpp=15#local-content>>

THE EFFECT OF THE LOAD OF TRACTOR ENGINE ON IT'S FUEL CONSUMPTION

VLIV REŽIMU PRÁCE MOTORU NA EKONOMIKU TRAKTOROVÉ SOUPRAVY

Katrenčík J., Bauer F.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jakub.katrencik@mendelu.cz

ABSTRACT

The paper deals with the influence of mode of engine performance and fuel consumption of the tractor John Deere 7530 and Kverneland plow PX 115. Measurements were divided into 2 parts. The first measurement was performed on engine speed 1900 min^{-1} in the zone of maximum performance, the second measurement was performed on engine speed from 1650 to 1850 min^{-1} in the zone of maximum torque. During the measurements were recording data of fuel consumption, performance, working width and depth. The measurement results showed a reduction of fuel consumption and increase of efficiency when the engine revolutions were in the area of maximum torque.

Key words: fuel consumption, maximum torque, maximum power, efficiency

Acknowledgments: This study was supported by the project of Internal Grant Agency of Mendel University in Brno, TP2/2012 "Implementation of network protocol based on SAE J1939 recommendation into agricultural tractor". This work was part of the project DOPSIT Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0226 funded under the Operational Program Education for Competitiveness.

ÚVOD

Traktorové motory prošly během posledních desetiletí značným technickým vývojem, který byl způsoben změnou požadavků jak ze strany provozovatelů, tak ze strany emisních norem. Moderní motory disponují vysokým převýšením točivého momentu, vrovnaným průběhem výkonu v širokém rozmezí otáček a relativně nízkou měrnou spotřebou paliva. Při tom splňují stále zpřísnující se emisní normy. Aby spalovací motory dosáhly dnešní technické úrovně, bylo potřeba implementovat moderní technologická řešení, například vysokotlaké vstřikování paliva Common - Rail, diferencované přeplňování atd. Právě vysokotlaké vstřikování a diferencované přeplňování umožňují dosáhnout vysokého převýšení točivého momentu, které je velmi důležité pro efektivní provoz traktoru. Provoz, kdy motor pracuje v oblasti nejvyššího točivého momentu, je považován za neekonomičtější, protože v oblasti nejvyššího točivého momentu bývá zpravidla nejvyšší měrná spotřeba paliva. Využití této oblasti je však poměrně složité a je důležité zvolit optimální převodovku, která dokáže využít potenciál spalovacího motoru. Za optimální agregaci traktoru a nářadí lze považovat zmíněný provozní bod motoru v oblasti maximálního točivého momentu, přičemž jeho poloha by měla být neměnná i při změnách podmínek determinující tahovou sílu. Schopnost stability na hodnotě maximálního výkonu je možná pouze v případě sofistikovaných konstrukčních řešení převodových ústrojí. Ze současných konstrukcí se ideálním vlastnostem blíží elektronicky regulované hydromechanické převodovky. V součinnosti s precizním řízením vznětového motoru je tato soustava schopna udržovat konstantní otáčky motoru v definovaném bodě, zejména v oblasti nejnižší měrné spotřeby. U mechanických převodovek vyžaduje udržení určitého rozsahu otáček častou změnu převodového poměru, která vyvolá signifikantní změnu otáček a podle charakteristiky momentu motoru může dojít k přesunu pracovního bodu na labilní větve charakteristiky, to má za následek opět nutnou změnu převodového poměru, vše ovšem znamená velmi dynamické změny v rotujících částech převodovky i motoru a bohužel i disipací energie. Právě vyšší rozptyl otáček motoru snižuje velikost úspory, které by bylo možné dosáhnout. Každý provozovatel si musí dostatečně spočítat, kolik hodin a při jaké práci bude jeho traktor nasazen a adekvátně zvolit výbavu tak, aby dosáhl co možná nejvyšší návratnosti investic na pořízení nového stroje [1].

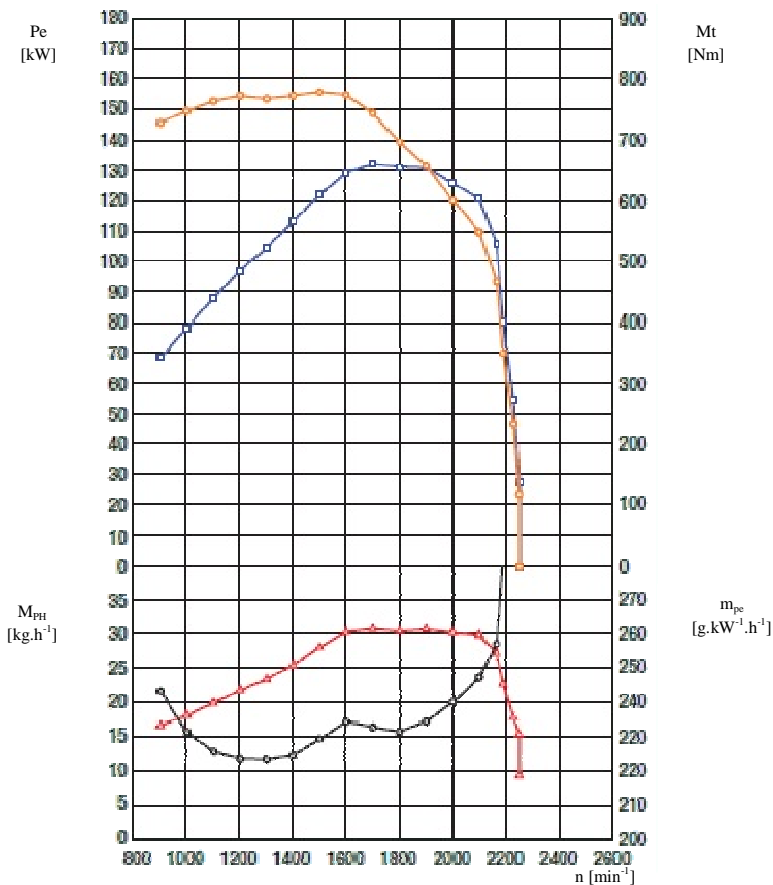
MATERIÁL A METODIKA

Měření vlivu režimu práce motoru na ekonomiku traktorové soupravy proběhlo ve školním statku Chrudim, na pozemku zvaném „U Panelovky“ v katastru obce Chrudim. Na pozemku byl předplodinou jarní ječmen, po sklizni byla provedena podmítka. Druh půdy na pozemku byla hnědozem. Měření bylo rozděleno do dvou skupin podle nastavených otáček motoru. První měření bylo provedeno při otáčkách $1900 - 2000 \text{ min}^{-1}$ v režimu maximálního výkonu. V převodovce byl zařazen převodový stupeň C1. Druhé měření bylo provedeno v rozsahu otáček $1500 - 1800 \text{ min}^{-1}$ v oblasti maximálního točivého momentu. V převodovce docházelo k řazení převodových stupňů od C2 po C4. Měření bylo provedeno se soupravou traktoru John Deere 7530 a pluhu Kverneland PX 115.

Specifikace měřeného traktoru John Deere 7530:

Výrobce: John Deere, Evropa, typ: 7530, pohon 4K4. Motor: John Deere PowerTech, vysokotlaké vstřikování paliva Common - Rail, přeplňování turbodmychadlem s proměnnou geometrií lopatek. Zdvihový objem motoru: $6\,800 \text{ cm}^3$. Jmenovitý výkon motoru: 129 kW při otáčkách 2100 min^{-1} . Maximální výkon bez navýšení: 138 kW při otáčkách 1700 min^{-1} , maximální výkon s navýšením 143 kW při otáčkách 1850 min^{-1} . Maximální točivý moment: 828 Nm při otáčkách 1600 min^{-1} . Převýšení točivého momentu: 38 % při poklesu otáček o 29 %, viz charakteristika obr. 2. Objem palivové nádrže 385 litrů.

Obr. 1 Jmenovitá charakteristika traktoru John Deere 7530 měřena přes zadní PTO zkušebníou DLG



Převodovka: Skupinová s násobičem točivého momentu PowerQuad Plus 24/24, 2,5 - 40 km.h⁻¹.
 Pneumatiky přední: Michelin CargoXBib 540/65 R30. Pneumatiky zadní: Michelin CargoXBib 650/65 R45. Přípustné zatížení přední nápravy: 5 500 kg. Přípustné zatížení zadní nápravy: 7 100 kg. Celkové přípustné zatížení traktoru: 12 600 kg.

Obr. 2 Zkoušený traktor John Deere 7530*Obr. 3 Zkoušený pluh Kverneland PG 115*

Na zkušebním pozemku byly vyměřeny dvě zkušební parcely o délce 600 metrů a šířce 20 metrů, označeny byly pomocí výtyček. Do palivové nádrže traktoru byla doplněna nafta až po okraj nalévacího hrdla. Traktor poté absolvoval 4 jízdy, při kterých byl měřen prokluz, celkový čas jízdy, čas na otáčení na úvratí, hloubka orby a záběr pluhu. Po skončení zkušebních jízd bylo do traktoru doplněno palivo pomocí odměrného válce pro zjištění přesného úbytku (spotřeby) paliva.

Vlhkost půdy

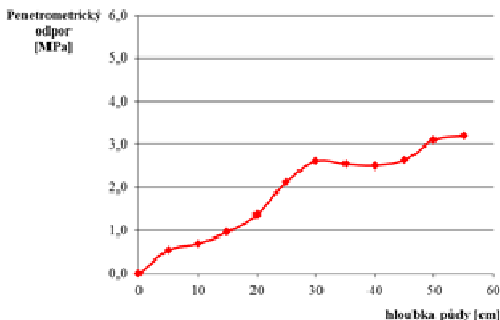
Vlhkost půdy se zjišťovala odebráním vzorků, které byly zváženy a vloženy do pece, kde se udržovala teplota 105 °C až do okamžiku, kdy se přestala měnit hmotnost vzorků. Vlhkost byla vypočtena ze vztahu:

$$W^* = \frac{m_v}{m_z} \cdot 100 [\%]$$

kde:

m_v - hmotnost vody [g], m_z - hmotnost vzorku po vysušení [g]. Průměrná vlhkost půdy byla 21 %. Dále bylo provedeno měření penetrometrického odporu, průměrné hodnoty penetrometrického odporu jsou vyneseny v grafu 1.

Obr. 4 Průměrný penetrometrický odpor



Výpočet prokluzu

Pro výpočet prokluzu byl použit vztah:

$$\delta = \frac{l_0 - l_1}{l_0} \cdot 100 [\%],$$

kde l_0 je dráha ujetá nezatíženým kolem po 10 otáčkách kola, l_1 je dráha ujetá zatíženým kolem po 10 otáčkách kola.

Měření celkového času jízdy a času na otočku na úvrati

Celkový čas na ujetí 4 jízd byl měřen stopkami, od celkového času byl odečten průměrný čas potřebný k vykonání všech otočení na úvrati.

$$T = T_1 - T_{02},$$

kde T je čas práce traktoru, T_1 je celkový čas na ujetí dráhy, T_{02} je průměrný čas na otočení stroje na úvratí.

Měření hloubky orby

Po každé jízdě bylo provedeno měření hloubky orby. Po vykonání celé zkoušky se vypočetla průměrná hloubka orby ze všech jednotlivých jízd.

$$\varnothing h = \frac{\sum_{i=1}^n h_i}{n} [m],$$

kde h_i je suma všech naměřených hloubek a n je počet měření.

Měření šířky záběru

Průměrná šířka záběru byla vypočtena tak, že z vyměřeného úseku o šířce 20 metrů byla odečtena šířka nezoraného strniště po ukončení zkoušky. Výsledná šířka byla podělena počtem jízd vykonaných při zkoušce.

$$\varnothing b = \frac{b_1 - b_2}{n_j} [m],$$

kde $\varnothing b$ je průměrná šířka záběru, b_1 je vytyčený úsek 20 metrů, b_2 je nezoraná část vytyčeného prostoru po provedení zkoušky.

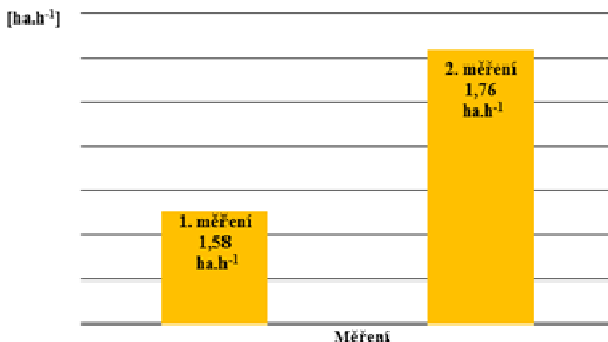
Měření spotřeby paliva

Spotřeba paliva byla měřena pomocí odměrného válce, přes který se dolévalo palivo po každé provedené zkoušce.

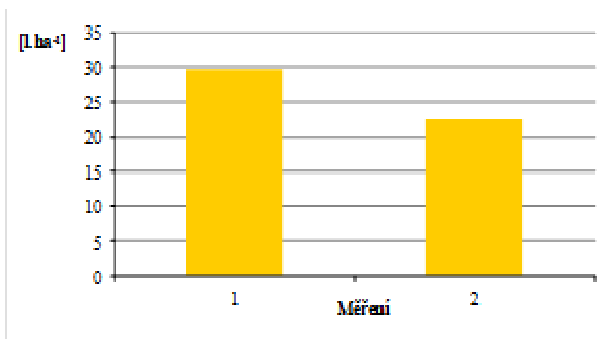
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky měření soupravy traktoru John Deere 7530 s pluhem Kverneland PG 115 jsou uvedeny v grafech na obr. 5 a 6. Z naměřených hodnot je patrné, že změna režimu práce motoru má vliv na spotřebu paliva a na výkonnost soupravy.

Obr. 5 Porovnání výkonností zkoušené soupravy při různých režimech práce motoru



Obr. 6 Porovnání hektarových spotřeb zkoušené soupravy při různých režimech práce motoru



Z obr. 5 je patrné, že při prvním měření byla hektarová spotřeba při provozu motoru v oblasti maximálního výkonu při otáčkách 1900 min^{-1} $29,56 \text{ l.ha}^{-1}$. Výkonnost měřené soupravy dosáhla hodnoty $1,58 \text{ ha.h}^{-1}$ viz obr. 6. Během prvního měření nedocházelo ke změně převodového stupně. Při druhém měření, kdy byl motor provozován v oblasti maximálního točivého momentu, byla hektarová spotřeba $22,5 \text{ l.ha}^{-1}$ viz obr. 5. Výkonnost měřené soupravy dosáhla hodnoty $1,76 \text{ ha.h}^{-1}$ viz obr. 4. Hektarová spotřeba se při provozu motoru v oblasti maximálního točivého momentu snížila o $7,06 \text{ l.ha}^{-1}$, což je snížení o 23,9 %, zároveň došlo ke zvýšení výkonnosti o $0,18 \text{ ha.h}^{-1}$, což je zvýšení o 11,5 %.

ZÁVĚR

Měřením bylo prokázáno, že změna režimu provozu motoru má významný vliv na výstupní ekonomické a výkonnostní parametry traktorové soupravy. Z výsledků měření plyne, že provozem motoru v oblasti nejvyššího točivého momentu se sníží hektarová spotřeba a zvýší se výkonnost soupravy, stejné výsledky naměřil Vojáček [2] a Kichler [3]. Jak snížení spotřeby paliva, tak zvýšení výkonnosti se kladně projeví snížením nákladů na zpracování jednoho hektaru. V případě nasazení měřené soupravy do orby 500 hektarů ročně, by úspora paliva dosáhla 123 550 Kč za rok, při ceně nafty 35 Kč.l⁻¹. Zvýšení výkonnosti se projeví snížením času, který je potřebný pro provedení dané pracovní operace v agrotechnickém termínu.

LITERATURA

Bauer, F., Sedlák, P., Šmerda, T.: Traktory. Praha: Profi Press, 2006. 192 s.
ISBN 80-86726-15-0.

Kichler C.M. et al. Soil and Tillage Research. Volume 113, Issue 2, 2011, 105-111.

Vojáček M. et al. Acta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Brno: Ediční středisko MZLU v Brně, 2009, 155-165. ISBN 1211-8516.

PERMEABILITY FLUIDS OF NANOTEXTILES

PROPUSTNOST KAPALIN U NANOTEXTILÍ

Kolářek S., Černý M.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: tornados@centrum.cz, michalc@mendelu.cz

ABSTRACT

Nanotextiles are known for more than 90 years, but recently experienced a huge boom. Today nanotextiles produced almost exclusively Nanospider technology. This allows the production of 1-6 g.min⁻¹.m⁻¹. Estimated applications include are wide. Very fine filters for machine and automotive industry are extended service intervals, smart bandages with antibacterial silver in medicine accelerate wound healing and protects against non-sterile environment. Airy, but still sealed packaging keeps food fresh.

Nanotextiles due to its large voids are particularly suitable for the filtration of liquids. An important indicator for the evaluation and use of the permeability fluid. It is measured in a special laboratory equipment. This device allows you to adjust the height of the water column in five levels 200, 400, 600, 800 and 1000 mm. Into the equipment flows demineralized water. Measured values of each sample are evaluated and inserted into the graph.

Key words: nanotextiles, permeability fluid, filtration

ÚVOD

Velká pozornost je v poslední době věnována zejména nanovláknům i přestože je známe více než 90 let. Technologii výroby vláken formou „Nanospider“, lze velmi rychle vyrobit $1\text{--}6\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ nanovrstvy. Využití vláken se tak zrychleně prosadilo do mnoha oborů především k filtraci kapalin a vzduchu, výrobě vzduchově prodyšných látek, voděodolných nesmáčivých povrchů, obalových nebo protihlukových materiálů apod. Za celým tajemstvím těchto super vlastností se skrývá jemná struktura s náhodně přes sebe uspořádanými vlákny o rozměrech menších, jak 1 mikrometr. Jedná se tedy o netkanou textilii, která má enormně velký měrný povrch s vysokou pórovitostí, který zajišťuje vynikající propustnost kapalin. Mezi další neopomenutelné výhody patří nízká výrobní cena za m^2 , dostatečná mechanická soudržnost při zachování nízké hmotnosti.

Existuje obrovské množství organických, anorganických a biopolymerních materiálů, které lze k výrobě nanovláken upotřebit. Dnes je možné vlákna vyrábět buď tradičně přímo z roztoků, anebo i z tavenin. U výroby z tavenin je výhodou, že nedochází k uvolňování škodlivých látek a tím k poškozování životního prostředí. Kombinací jednotlivých přísad se velmi snadno ovlivňuje filtrační oblast nebo prostředí pro použití takto vyrobené textilie. Vlákna v poslední době našla využití i pro jiné než původně zamýšlené účely a to v oblasti lékařství a biomedicíny. Obvazové materiály s vynikající prodyšností a pevnou bariérou proti bakteriím a virům zajišťují dokonalou izolaci od okolního nesterilního prostředí. Obvazový materiál navíc doplněn o přídavek antibakteriálního stříbra vůči běžnému konvenčnímu materiálu ještě více urychluje hojení ran. Byly již otestovány i první pokusy v tkáňovém inženýrství pro rekonstrukci kůže, kostí, nervů i cév. Vzhledem k tomu, že nanotextilie mají velký plošný povrch, nachází se další uplatnění pro řízené podávání léků, které se samy postupně uvolňují jen v požadovaných místech.

MATERIÁL A METODIKA

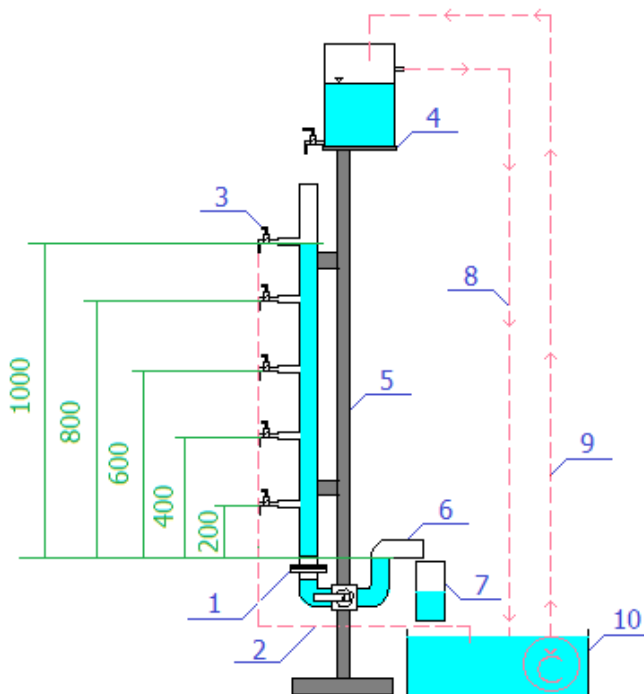
Zkouška propustnosti slouží ke zjištění hodnoty propustnosti a porovnání rychlosti proudění kapaliny nanotextilní membrány. V zařízení je nezatížená vrstva nanotextilie vystavena jednosměrnému proudění kapaliny – nejčastěji vody ve směru kolmém k rovině při řadě konstantních hodnot sloupce hydrostatické výšky.

Vybrané experimentální vzorky byly vyraženy do kruhového průřezu (průměru 80 mm). Vzorky se nesmějí připravovat z pomačkaných, ani přehnutých textilií. Vzorky nesmí být před experimentem zatíženy, nesmí se přehýbat a musí být udržovány v poloze naplocho bez zatížení. Z každého materiálu se odebralo 5 zkušebních vzorků.

Přístroj umožňuje nastavení poklesu hydrostatické výšky v hodnotách 1000; 800; 600; 400; 200 mm, a udržení konstantní hydrostatické výšky v průběhu každé zkoušky. Pokud je zkoušený

materiál velmi tenký a je nutné zabránit jakékoliv viditelné deformaci, uloží se kvůli podepření zkušebního vzorku během zkoušky pod jeho odtokovou stranu mřížka z drátu o průměru 1mm a o velikosti ok $10\pm 1\text{mm}$. Teplota vody musí být mezi $18\text{-}22^\circ\text{C}$. Při experimentu byla použita demineralizovaná voda.

Obr. 1 Schéma zařízení na měření propustnosti kapalin nanotextilií



1.držák membrány, 2.kohout výtoku na odchyt vody, 3. 5ks kohoutů vodního sloupce, 4. vyrovnávací nádoba vodního sloupce, 5.nosná kostra zařízení, 6.ústí výtoku měřené vody, 7.odchytná/odměrná nádoba, 8.přepad vyrovnávací nádoby, 9.přtok z čerpadla do vyrovnávací nádoby, 10.čerpadlo vody

Postup zkoušky:

Zkušební vzorek se při teplotě místnosti vloží do vody (obsahující smáčecí prostředek – aryl-alkyl sulfonát sodný v objemové koncentraci 0,1%), mírně promíchá s cílem odstranění vzduchových bublin, a ponechá smáčet minimálně 12hod.

Zkušební vzorek se vloží do přístroje a zajistí se, aby všechny spoje byly vodotěsné. Poté se přístroj naplní vodou do dosažení rozdílu hydrostatické vody 50 mm přes zkušební vzorek. Přívod vody se uzavře, a jestliže se hydrostatické výšky nevyrovnejí na obou stranách zkušební vzorku do 5min. prošetří se možnost jakéhokoliv zachycení vzduchu uvnitř přístroje a postup se opakuje.

Proudění vody se nastaví tak, aby byl dosažen pokles hydrostatické výšky o 1000 mm. Když se hydrostatická výška ustálí, minimálně na 30s, odebírá se voda procházející systémem do odměrné nádoby po stanovenou vodu a objem shromážděné vody se zaznamená se zaokrouhlením 10cm³, a doba se zaokrouhlením na 1s. Objem odebrané vody by měl být minimálně 1000cm³ a doba odebírání by měla být minimálně 30s.

Pokud se proudění vody zjišťuje na základě objemu, pak objem odměrné nádoby nesmí být více jak dvakrát větší než objem odebrané vody.

Opakuje se postup se čtyřmi hodnotami nižšího poklesu hydrostatické výšky, přibližně 0,8, 0,6, 0,4 a 0,2 násobkem maximálního poklesu hydrostatické výšky, začíná se nejvyšší rychlostí a končí nejnižší.

Teplota vody se zaznamenává se zaokrouhlením na 0,5°C. Postup se opakuje pro každý zkušební vzorek. Výpočet a vyjádření výsledků:

Rychlost proudění v_{20} v metrech za sekundu při 20 °C se vypočítá podle vzorce:

$$v_{20} = \frac{VR_T}{At}$$

V – změřený objem vody v metrech krychlových

A – exponovaná plocha zkušební vzorku v metrech čtverečních

RT – korekční faktor na teplotu vody 20°C

t – doba naměřená do dosažení objemu V v sekundách

T – teplota vody ve °C

Rychlosti proudění v_{20} se vypočítají při každém poklesu hydrostatické výšky H , u každého z pěti zkušebních vzorků. Do grafu se vynesou hodnoty poklesu hydrostatické výšky H , proti rychlosti v_{20} a pro každý zkušební vzorek se zvolí nejvhodnější křivka procházející počátkem a to výpočtem nebo graficky. Křivky všech pěti zkušebních vzorků se vynesou do jednoho grafu.

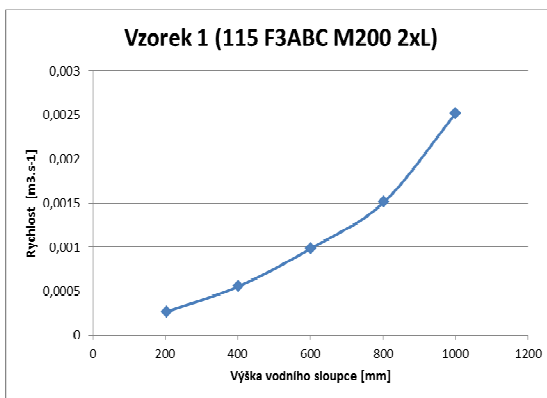
VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro sledování průtoku nanotextilí byla, jako nejvhodnější kapalina zvolena demineralizovaná voda. Pokus se vzorky tvořilo 9 typů membrán vyrobených z nanotextilí a pro srovnání bylo ještě zahrnuto 2 konkurenčních vzorků. Celkem tedy bylo připraveno k testu 11 typů vzorků membrán. Přehled všech použitých materiálů představuje následující tabulka.

Tab. 1. Seznam použitých typů membrán

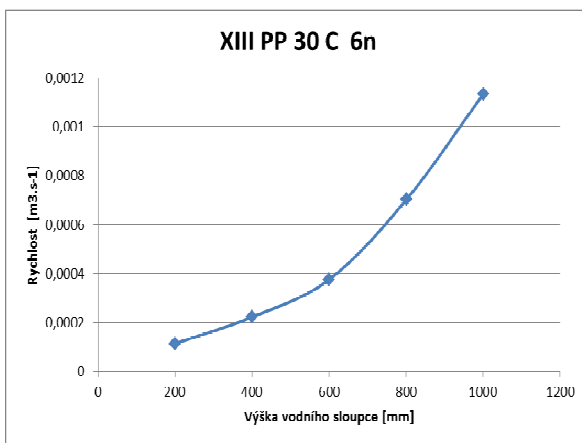
Vzorek 1	115 F3ABC M200 2xL
Vzorek 2	XIII PP 30 C 6n
Vzorek 3	XXII PP 30 C
Vzorek 4	XXIV PP 30 C
Vzorek 5	XXV PP 30 C 2n
Vzorek 6	MV020
Vzorek 7	UP150P
Vzorek 8	3xPL 925 CE 15 PP50
Vzorek 9	MŘ 12 (24g/m ²) 140°5"+2xPL 926+PL 890 (1,38g/m ²)
Vzorek 10	MŘ 11 (24g/m ²) 130°5"+2xPL 926+PL 890 (1,38g/m ²)
Vzorek 11	SPURCO 0,8 130°5"+2xPL 926+PL 890 + PL734 (1,38g/m ²)

Graf 1. Vzorek 1: 115 F3ABC M200 2xL



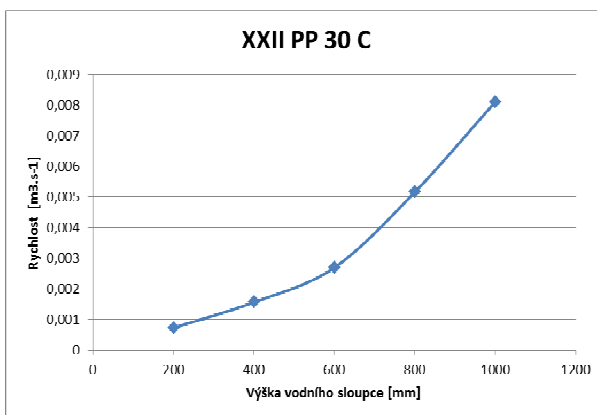
Naměřené hodnoty rychlosti průtoku u vzorku 1. 115 F3ABC M200 2xL se pohybují při výšce vodního sloupce 200 mm s rychlostí toku 0,000268 m³·s⁻¹ a při výšce 1000 mm vodního sloupce 0,002521 m³·s⁻¹.

Graf 2. Vzorek 2: XIII PP 30 C 6n



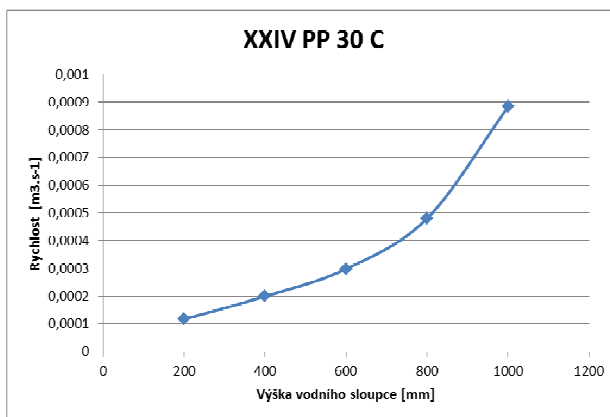
Vzorek 2. při nejnižší výšce 200 mm dosahuje průměrné rychlosti toku $0,000114 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Výšce 1000 mm odpovídá rychlost toku vody membránou $0,001135 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Graf 3. Vzorek 3: XXII PP 30 C



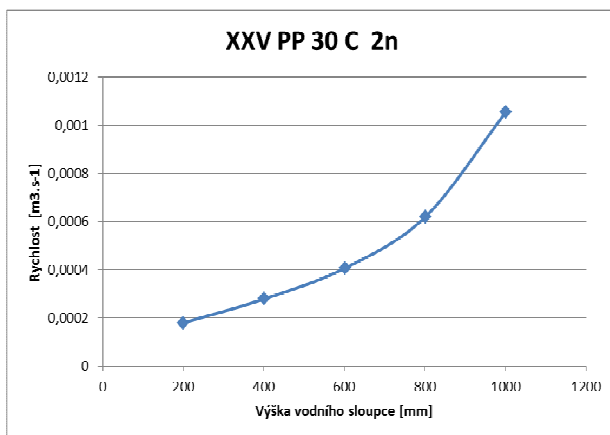
U vzorku 3. byly naměřeny hodnoty při výšce vodního sloupce 200 mm $0,000736 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ a u vodního sloupce 1000 mm $0,008107 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Graf 4. Vzorek 4: XXIV PP 30 C



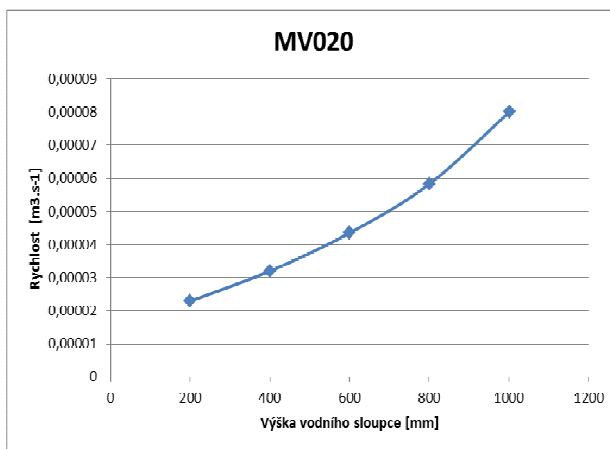
Hodnota rychlosti u vzorku 4 odpovídající výšce sloupce vody 200mm je $0,000117 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. U nejvyššího sloupce 1000 mm se rychlost pohybuje $0,000885 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Graf 5. Vzorek 5: XXV PP 30 C 2n



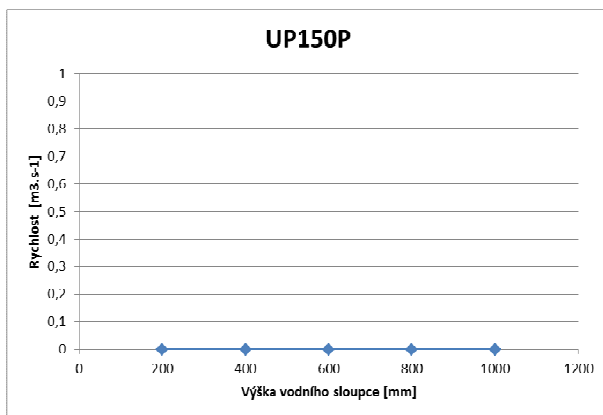
Vzorek má rychlost $0,000180 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ při výšce sloupce 200 mm. $0,001055 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ je dosaženo při 1000 mm vodního sloupce.

Graf 6. Vzorek 6: MV020



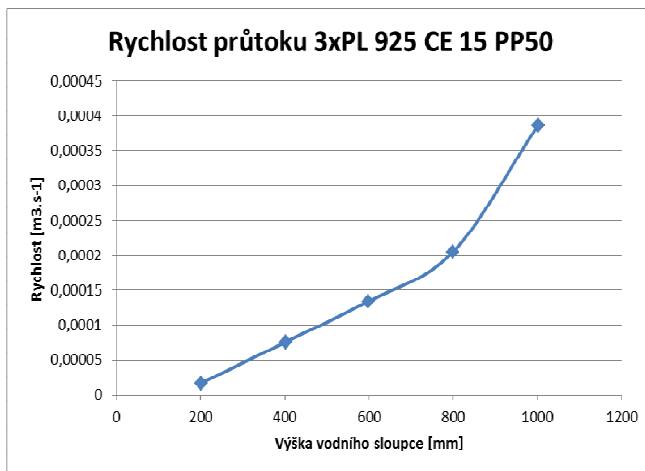
U vzorku 6, který není vyroben z nanomateriálu byla naměřena při 200 mm sloupce rychlost $0,000023 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Výšce sloupce 1000 $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ odpovídá rychlost toku $0,000080 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Graf 7. Vzorek 7: UP150P

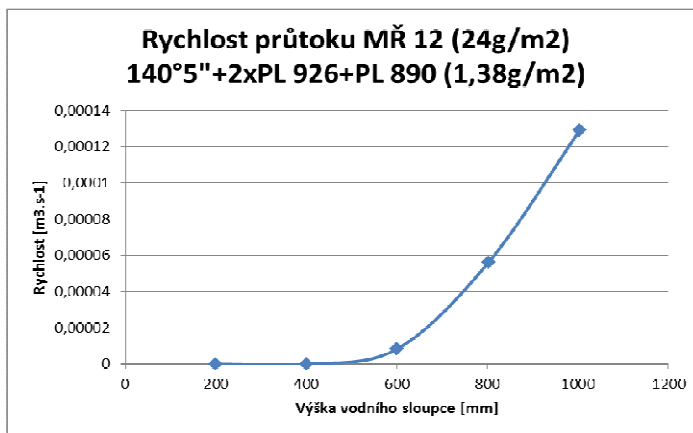


Další vzorek 7 vyroben ze zcela odlišného materiálu se choval naprosto nepropustně. U všech 5-ti nastavitelných vodních výšek nebylo možno zachytit žádnou kapalinu. Při ponechání vody v zařízení a nastavením kohoutu na nejvyšší sloupec po dobu 24h bylo zachyceno pouze 400ml.

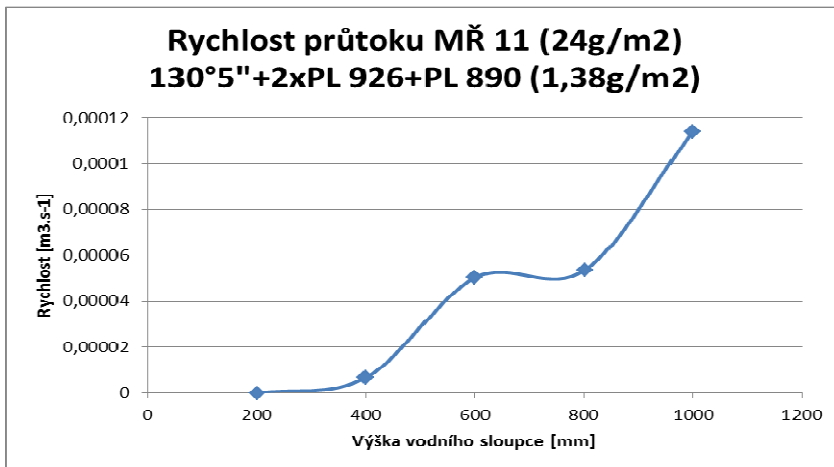
Graf 8. Vzorek 8: 3xPL 925 CE 15 PP50



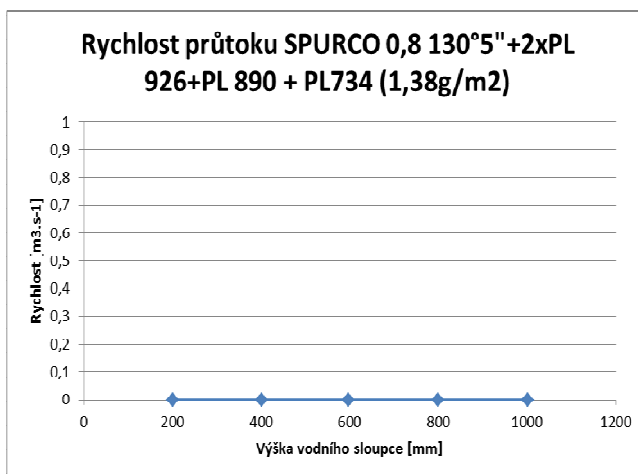
Vzorek u nanotextilie číslo 8 dosahoval při sloupci 200 mm průtoku $0,000017 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. U výšky 1000 mm to bylo $0,000387 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Graf 9. Vzorek 9: MŘ 12 (24g/m²) 140°5''+2xPL 926+PL 890 (1,38g/m²)

U vzorku 9 při výšce sloupce 1000 mm docházelo k průtoku o velikosti $0,000129 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Postupně od výšky vodního sloupce 500 mm se rychlost zastavila na $0 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ a dále se už nezvyšovala.

Graf 10. Vzorek 10: MŘ 11 (24g/m²) 130°5" +2xPL 926+PL 890 (1,38g/m²)

Vzorek 10 se z počátku při 1000 mm pohyboval na rychlosti 0,000114 m³·s⁻¹. a v průběhu od výšky 300 mm stagnoval na 0 m³·s⁻¹.

Graf 11. Vzorek 11: SPURCO 0,8 130°5" +2xPL 926+PL 890 + PL734 (1,38g/m²)

Vzorek SPURCO dopadl ze všech testovaných nanotextilií nejhůře. Nebylo možno žádné z výšek vodního sloupce naměřit rychlost průtoku. Po celé době měření se vzorek choval jako nepropustný.

Z dosažených výsledků lze vyhodnotit, jako nejvýznamnější membránu ze vzorku č. 3, který dosahoval rychlosti $0,008107 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ při vodním sloupci 1000 mm byla ze všech testovaných nejvyšší. Naopak u nanotextilie SPURCO č. 11, kde nebylo dosaženo žádného průtoku, je zřejmě příčinou technologie výroby. Ta se od jednotlivých značně liší a to tím, že nanovrstva u tohoto vzorku je na podklad přilepena lepidlem. Lepidlo by mohlo zalepenými póry membráně bránit v průtoku vody. Možná by bylo v budoucnu dobré zkoušku zopakovat s přetlakem třeba o velikosti 1 Bar. Konkurenční vzorek č. 7 UP150P by bylo potřeba měřit jen za přetlaku vody a to nejhodněji s vyšším, jak 1 Bar. Možným faktorem, který by mohl určitým způsobem ovlivnit a snížit u některých vzorků propustnost vody membránou je přítomnost kyslíku v kapalině. Ten může u velmi malých pórů jednotlivé kanálky vyplňovat a snížit propustnost membránou. U vzorků nanotextilí č. 9 a 10 s PP mřížkou stojí za zmínku lepší mechanická odolnost a soudržnost nanovrstvy na nosném podkladu v porovnání s dosud testovanými membránami.

ZÁVĚR

Cílem bylo u všech připravených vzorků ověřit propustnost vody na laboratorním zařízení. Z naměřených výsledků lze některé membrány více doporučit k filtraci vody díky velmi nízkému odporu v toku, jak tomu bylo u membrány č. 7. Vzorek SPURCO č. 11 nelze vůbec doporučit k filtraci a bude zřejmě nutné ještě zlepšit technologii výroby tohoto materiálu. Je důležité si uvědomit, že na propustnost nanotextilie nemá vliv jenom samotná nanovrstva, ale také způsob připevnění k podkladu a materiál samotného podkladu. Ten může být různého původu od viskózy přes netkanou textilií až po polypropylenovou mřížku. Existuje a zbývá ještě mnoho kombinací nanomembrán, které je potřeba odzkoušet předtím, než je budeme moci aplikovat nebo zařadit pro vhodný druh činnosti.

LITERATURA

- [1] ČSN EN ISO 11058, Geotextilie a výrobky podobné geotextiliím – Zjišťování charakteristik propustnosti pro vodu kolmo k rovině, bez zatížení, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2010, 20 s.
- [2] KUBÍNEK, R.; STRÁNSKÁ, V. Úvod do problematiky nanotechnologií, Dostupné na: <<http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>>
- [3] ELMARCO, Oblasti aplikací nanotextilí, 2011, Dostupné na: <http://www.elmarco.com/application-areas/oblasti-aplikaci/>
- [4] KUBÁTOVÁ, J. Nanotechnologie v zemědělství a potravinářství – zpráva www.nanoforum.org, 2007, Dostupné na: <http://www.nanotechnologie.cz/view.php?cislocianku=2007080013>
- [5] www.nanospider.cz

QUANTI-QUALITATIVE ANALYSIS OF ANAEROBIC FERMENTATION OF FOOD WASTE

KVANTI-KVALITATIVNÍ ANALÝZA ANAEROBNÍ FERMENTACE GASTRONOMICKÝCH ODPADŮ

Koutný T., Vítěz T., Szabó T.

Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of
Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00, Czech Republic

E-mail: xkoutny@node.mendelu.cz

ABSTRACT

This work deals with the anaerobic treatment of food waste. The dry matter and organic dry matter were quantified. The samples subjected to the process of mesophilic anaerobic co-fermentation over the course of twenty-three days. Substrate from biogas plant was used as an inoculation substrate. Biogas production and methane abundance were monitored during the test. Tests carried out under mesophilic anaerobic fermentation for 23 days. Was compared to biogas production and the biogas quality.

Key words: food waste, anaerobic fermentation, biogas, methane

Acknowledgments: Acknowledgement: This project was made with support of Internal Grant Agency of The Faculty of Agronomy Mendel University in Brno, TP 7/2012.

This paper was supported by project CZ.1.02/5.1.00/10.06433 Acquisition of Instrumentation for BAT Centre at MENDELU for Categories of Food Processing Activities and Categories of Facilities for Disposal or Destruction of Animal Bodies and Animal Waste.

ÚVOD

V současné době došlo díky legislativní podpoře energie z obnovitelných zdrojů k prudkému rozvoji výroby bioplynu a jeho transformaci na elektrickou energii. Vyhláška 482/2005 Sb. stanovuje druhy, způsoby využití a parametry biomasy při podpoře výroby elektřiny. Klasifikuje bioplynové stanice do dvou skupin, podle kterých se určuje výkupní cena vyrobené energie. První skupinu AF1 tvoří bioplynové stanice, ve kterých je zpracovávána cíleně pěstovaná biomasa. Do druhé kategorie AF2 pak patří stanice s využitím odpadů jako vstupního substrátu [2].

Většina dnes provozovaných bioplynových stanic spadá do kategorie AF1, tedy takzvaných zemědělských BPS, které jsou více podporovány než zařízení využívající pro výrobu energie odpady. S výhledem do budoucna je však téměř jisté, že se tento trend obrátí a pro provozovatele bude výhodnější využívat mimo kukuřičné siláže také organické odpady. V České Republice se již dnes upravují některé bioplynové stanice tak, aby mohly zpracovávat také různé typy odpadů, například ze stravoven.

Při plánování a projektování zařízení na zpracování a využití odpadu je nutné vycházet z množství a kvality potenciálního materiálu. V současné době však nejsou vytvořeny databáze, které by uváděly průměrná množství a složení odpadů produkovaných z gastronomických zařízení. Také nejsou v České republice praktické zkušenosti s využitím těchto odpadů v bioplynových stanicích. Cílem práce tedy bylo provést testy anaerobní fermentace gastronomických odpadů a zjistit, jaké množství bioplynu a metanu bude tento materiál produkovat.

MATERIÁL A METODIKA

Testy byly provedeny v Republikové referenční laboratoři bioplynových transformací na Mendelově univerzitě v Brně. Tato laboratoř je vybavena šesti reaktory o objemu 0,12 m³. Reaktory jsou vybaveny samostatným teplovodním okruhem pro ohřev substrátu přes mezistěnu, měřením množství vznikajícího bioplynu, sondou pro aplikaci přídavných látek, měřením teplot substrátu, prostupy pro odběr vzorků substrátu a bioplynu. Dále jsou reaktory vybaveny automatickým míchacím zařízením a sondou na kontinuální měření pH. Všechny výše jmenované zařízení byly na reaktoru instalovány tak, aby bylo zamezeno vniknutí vzduchu do reaktoru.

Pro testování byl použit inokulační substrát z reaktoru zemědělské bioplynové stanice v Čejčci. Jedná se o stanici zpracovávající směs kukuřičné siláže a kejdy. Substrát byl odebrán v množství dostatečném pro všechny reaktory, aby byly zajištěny stejné výchozí podmínky pro všechny reaktory. Do zkušebních reaktorů byl substrát umístěn bezprostředně po transportu, aby došlo k co nejmenším změnám jeho vlastností.

Do jednotlivých reaktorů byl nadávkován inokulační substrát. V každém testu sloužily dva reaktory jako kontrolní, tedy obsahovaly pouze inokulum bez přídavku testovaného materiálu. Do ostatních reaktorů byla přidána směs odpadu odebraného z kontejneru na biologicky rozložitelný odpad

umístěný v kantýně MENDELU. Testy probíhaly za podmínek tekuté mezofilní (40°C) anaerobní fermentace, jež je charakterizována obsahem sušiny do 10% [3] po dobu 23dní.

Před zahájením testů byla změřena sušina a organická sušina inokulačního substrátu z bioplynové stanice a testované směsi odpadu.

Během testů byly každý den měřeny tyto parametry:

- celkové množství vzniklého bioplynu pomocí plynoměru PREMGAS BK G4
- objemové zastoupení vybraných plynů v bioplynu (CH_4 , CO_2 , O_2 a H_2S) pomocí přístroje KOMBIGASS

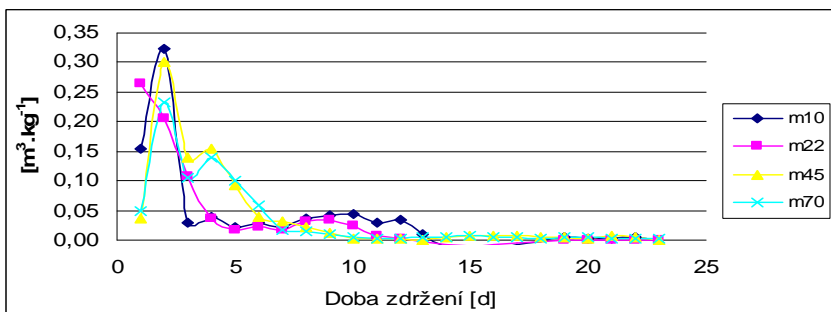
VÝSLEDKY A DISKUZE

Od celkových produkcí bioplynu jednotlivých reaktorů byla odečtena průměrná produkce bioplynu v kontrolních reaktorech. Tím bylo zjištěno skutečné množství bioplynu a metanu vyprodukovaného z přidaného materiálu.

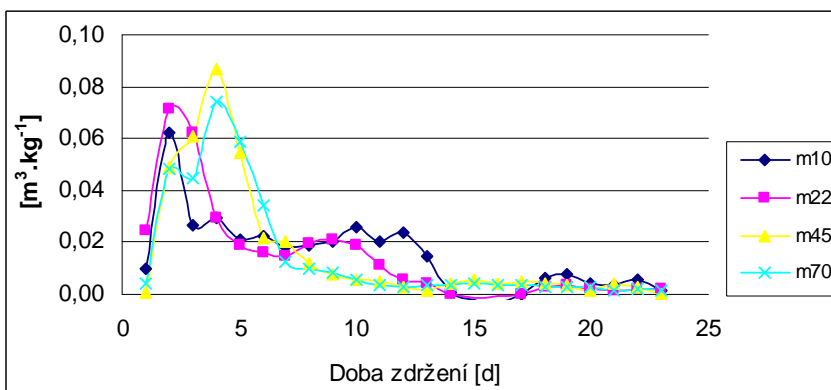
Celkové množství vyprodukovaného bioplynu za dobu 23 dní bylo nejvyšší u dávky 45 g a to $0,887 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$, nejmenší produkce pak byla u dávky 22 g $0,737 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$. Z pohledu produkce bioplynu se tedy jedná o vynikající materiál, který svou produkcí dokonce překonává speciálně šlechtěné energetické odrůdy kukuřice. Michal Dohányos [1] uvádí produkci bioplynu z kukuřičné siláže $0,50 - 0,55 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$.

Je nutné ovšem zohlednit, že pro energetické účely není rozhodující množství bioplynu ale množství metanu, jako majoritního nositele energetického potenciálu. Bioplyn produkovaný kukuřičnou siláží má totiž výrazně vyšší obsah metanu. Pro objektivní posouzení je tedy vhodnější provést přepočítání produkce bioplynu na produkci metanu (Obr.2). Nejvyšší produkce metanu byla naměřena u dávky 45 g a to $0,363 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$. Ruihong Zhang [4] uvádí, že jím testovaná směs gastronomických odpadů ze San Franciska vyprodukovala za 26 dní $0,425 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$. Tato hodnoty jsou velmi podobné, jako u kukuřičné siláže, tedy produkované množství metanu je velmi dobré, ovšem nízká koncentrace metanu představuje technologický problém využití bioplynu. Pro správný chod kogenerační jednotky je vhodný bioplyn s obsahem metanu vyšším než 50%. Tak vysoké průměrné hodnoty nebylo dosaženo u žádné dávky materiálu.

Obr. 1 Graf denní měrné produkce bioplynu

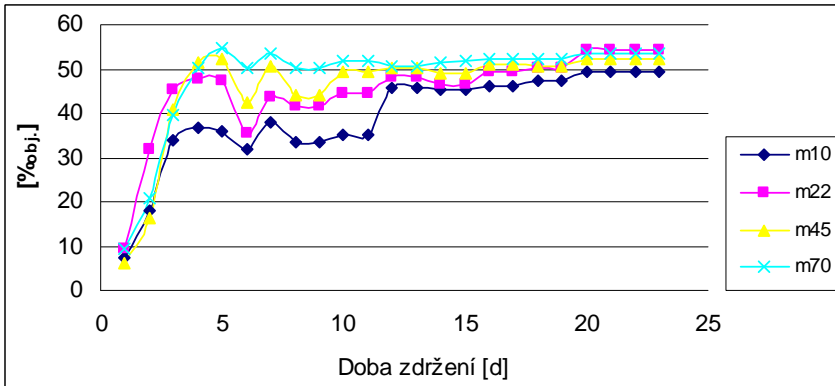


Obr. 2 Graf denní měrná produkce metanu

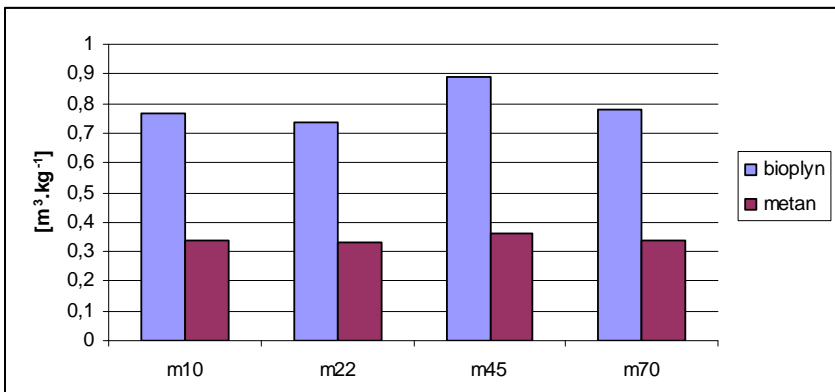


Obsah metanu v bioplynu byl u jednotlivých dávek testovaného substrátu výrazně odlišný. Nejnižší obsah metanu byl naměřen u dávky 10g. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že absolutní množství vznikajícího bioplynu je výrazně menší a proto trvá déle, než se koncentrace metanu v celém měřicím systému – reaktor, potrubí, odměrný váleček – zvýší na odpovídající hodnotu. Na závěr testu již byly hodnoty koncentrace metanu velmi vyrovnané ve všech reaktorech. U jednotlivých dávek materiálu se v průběhu testu pohybovala koncentrace v rozmezí od 40% do 60%. Pouze na začátku testu byl obsah metanu nižší a postupně narůstal. (Obr.3) To je způsobeno obsahem kyslíku bezprostředně po uzavření reaktoru. Nejprve tedy dochází k aerobnímu rozkladu, což se projevuje nižším obsahem metanu a naopak zvýšeným obsahem oxidu uhličitého. Po úvodních dnech se však hodnoty obsahu těchto plynů ustálily.

Obr. 3 Graf obsahu metanu v bioplynu



Obr. 4 Graf celkové produkce bioplynu a metanu



ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit produkci bioplynu a metanu biologicky rozložitelného odpadu ze stravovny. Jako testovaný substrát byl použit odpad ze sběrné nádoby umístěné v kantýně pro zaměstnance v areálu MENDELU. Testovaný odpad obsahoval 22,96% sušiny, z toho bylo 95,32% organických látek.

Byly provedeny testy anaerobní fermentace, která probíhala po dobu 23 dní za mezofilních podmínek. Jako inokulační substrát byl použit materiál z reaktoru BPS Čejčej. Největší produkce bioplynu byla zjištěna při dávce 45 a to 0,887 m³.kg⁻¹. Jedná se o velmi vysokou hodnotu, ovšem z hlediska energetické využití je důležitější produkce metanu, která v tomto případě činila 0,363 m³.kg⁻¹. Průměrný obsah metanu v bioplynu byl tedy 40,9 %, což je velmi nízká hodnota.

Takto nízký obsah metanu již způsobuje problémy s přímým spalováním bioplynu. Z výsledků tedy vyplývá, že se jako výhodná forma zpracování gastronomických odpadů na bioplynové stanici jeví kofermentace s materiálem, který produkuje bioplyn s vysokým obsahem metanu. Mezi tyto materiály patří například kukuřičná siláž nebo některé specifické odpady jako například lecitin, kde se obsah metanu pohybuje v rozmezí 60% - 75 %.

LITERATURA

- [1] Dohányos M., Procházka J., Kajan M., Diviš J. (2010): Produkce bioplynu z kukuřice, dostupné na: <http://www.czba.cz/index.php?art=page&parent=veda-a-vyzkum&nid=produkce-bioplynu-z-kukurice>
- [2] Koutný T. (2010): Anaerobní zpracování biologicky rozložitelných materiálů, diplomová práce
- [3] Schulz H., Eder B. (2004): Bioplyn v praxi : teorie, projektování, stavba zařízení, příklady. ISBN: 80-86167-21-6.
- [4] Zhang R., El.Mashad, Hartman K., Wang F., Liu G., Choate Ch., Gamble P. (2007): Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion, *Bioresource Technology* 98 (2007) 929–935

DRIVER'S INFLUENCE ON KINEMATICS OF ARTICULATED BUS

VLIV ŘIDIČE NA KINEMATIKU KLOUBOVÉHO AUTOBUSU

Krumpholc T., Bartoň S.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkrumpho@mendelu.cz

ABSTRACT

This thesis studies kinematic properties of the particle bus as a function of driver's activities. Driver controls bus by the gas and brake pedals – by speed change $v(t)$ and by steering wheel – by curvature of the trajectory change $k(t)$. Article is divided into four main parts. At first part is computed trajectory of the midpoint of the middle axle as a function of the absolute value of the velocity $v(t)$ and of the curvature of the trajectory $k(t)$. At second part is computed position of the centre of the joint of the bus. At the third part is derived system of the differential equations describing relations between positions of the joint's centre and the midpoint of the rear axle. At the final part is shown how to solve these equations and how to find trajectory of the wheels and cranking angle of the bus. Programme of the computer algebra system Maple is used for all necessary computations.

Key words: Trajectory, velocity, acceleration, curvature, differential equation, Runge-Kutta method, Maple

ÚVOD

Klasický problém kinematiky

Pro zkrácení výpisu matematických vztahů použijeme následující substitute:

$$\frac{d^2}{dt^2} X(t) = X_{tt}, \quad \frac{d}{dt} X(t) = X_t, \quad X(t) = X, \quad (1)$$

podobné substitute budou použity i pro další proměnné $Y(t)$, $x(t)$ a $y(t)$. Klasickým problémem kinematiky je určení vektorů rychlosti $\vec{V}(t)$ a zrychlení tělesa $\vec{A}(t)$ v závislosti na čase, pokud je známa závislost polohového vektoru tělesa na čase, $\vec{P}(t) = [X(t), Y(t)]$, kde $X(t)$ a $Y(t)$ jsou známé závislosti souřadnic x a y na čase. Dále se stanovuje tečné zrychlení $A_t(t)$, které mění velikost rychlosti a normálové zrychlení $A_n(t)$, které mění směr rychlosti tělesa. Závěrem se odvozují vztahy pro polohu středu oskulační kružnice trajektorie $\vec{C}(t)$ a pro její poloměr $R(t)$. Tyto vztahy lze nalézt např. v [7] a [8].

Vliv řidiče

Řidič ovládá autobus pomocí brzdy a plynového pedálu - určuje absolutní velikost rychlosti autobusu $|\vec{V}(t)|$. Dále pomocí volantu určuje poloměr oskulační kružnice $R(t)$, po které se autobus aktuálně pohybuje. Z hlediska dalších výpočtů je však vhodné použít převrácenou hodnotu poloměru oskulační kružnice – křivost trajektorie, $k(t) = 1/R(t)$. Vhodnou kombinací těchto ovládacích prvků tak udržuje autobus v plynulém pohybu po vozovce.

MATERIÁL A METODIKA

Inverzní problém

Předpokládejme, že známe časový průběh činností řidiče, tedy známe průběh absolutní velikosti rychlosti $|\vec{V}(t)| = v(t)$ a křivosti trajektorie $k(t)$ na čase. Problémem pak je určení trajektorie, po které se autobus pohybuje a dalších kinematických veličin. Z matematického hlediska tedy jde o řešení nelineárního systému dvou obyčejných diferenciálních rovnic druhého a prvního řádu, detailní postup řešení je uveden v [2] a [3]:

$$\sqrt{X_t^2 + Y_t^2} = v(t), \quad \frac{Y_{tt}X_t - X_{tt}Y_t}{(X_t^2 + Y_t^2)^{3/2}} = k(t). \quad (2)$$

Po několika úpravách je možné rovnice (2) převést na explicitní systém dvou diferenciálních rovnic druhého řádu:

$$X_{tt} = -\frac{Y_t k(t) v(t)^2 - \left(\frac{d}{dt} v(t)\right) X_t}{v(t)}, \quad Y_{tt} = \frac{\left(\frac{d}{dt} v(t)\right) Y_t + k(t) v(t)^2 X_t}{v(t)}. \quad (3)$$

Pokud budeme předpokládat polohu autobusu v čase $t=0$, $X(0)=x_0$ a $Y(0)=y_0$ a vektor počáteční rychlosti autobusu $\vec{V}(0)=[V_x, V_y, 0] = v(0)[\cos(\phi_0), \sin(\phi_0)]$, kde ϕ_0 je směr jednotkového vektoru odpovídající vektoru rychlosti v čase $t=0$ a $v(0)=|\vec{V}(0)|$, je možné nalézt řešení (3) ve tvaru, viz [4,5].

$$X = \int_0^t v(\tau) \cos(f) d\tau + x_0, \quad Y = \int_0^t v(\tau) \sin(f) d\tau + y_0, \quad (4)$$

kde $f = \phi_0 + \int_0^\tau k(\tau) d\tau$. Obecně jde o analytické řešení, nicméně integrály v obou rovnicích nebudou analyticky řešitelné ani pro jednoduché závislosti $v(t)$ a $k(t)$. Značnou výhodou tohoto výsledku je, že umožňuje numericky přesnou integraci pro libovolný čas t a nedochází proto ke

kumulaci nepřesností, jako při řešení systému (4) numerickými metodami, např. metodou Runge-Kutta.

Zobecněná tratrix jako matematický model trajektorie zadní nápravy

Kloub autobusu je umístěn ve vzdálenosti $d1$ od středu prostřední nápravy kloubového autobusu. Trajektorie kloubu je pak dána vztahem

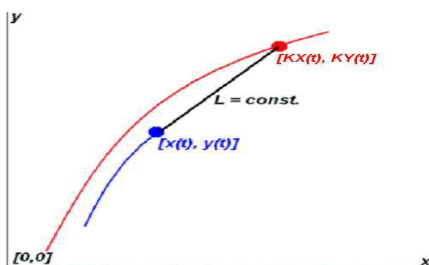
$$KX(t) = X - d1 \frac{X_t}{v(t)}, \quad KY(t) = Y - d1 \frac{Y_t}{v(t)}, \quad (5)$$

Střed zadní nápravy kloubového autobusu - vlečené nápravy má prozatím neznámou polohu $[x(t), y(t)]$. Střed obou náprav musí mít konstantní vzdálenost L a vektor rychlosti středu vlečené nápravy musí procházet kloubem $[KX(t), KY(t)]$, viz obrázek 1. Z těchto podmínek lze v souladu s [1] nebo [9] odvodit závislost mezi $[KX(t), KY(t)]$ a $[x(t), y(t)]$.

$$x_t = \frac{(\Delta X X_t + \Delta Y Y_t) \Delta X}{L^2}, \quad y_t = \frac{(\Delta X + \Delta Y Y_t) \Delta Y}{L^2}, \quad (6)$$

kde $\Delta X = x - KX$, $\Delta Y = y - KY$. Jde o systém dvou nelineárních diferenciálních rovnic prvního řádu, který je možné pro jednoduché funkce $KX(t)$ a $KY(t)$ poměrně snadno řešit. Pokud se ale za $KX(t)$ a $KY(t)$ dosadí (4) a (5) dostaneme velmi komplikovaný systém diferenciálních rovnic, ve kterých je nutné nejprve řešit numerickou integraci $X(t)$ a $Y(t)$. V tomto okamžiku selhávají prostředky computerové algebry, např. není možné použít přímé numerické řešení systému pomocí příkazu **dsolve** s parametrem **numeric** z programu Maple.

Obrázek 1. Odvození pohybové rovnice vlečené nápravy



Numerická integrace pohybové rovnice

Systém rovnic (6) s ohledem na (4) a (5) je možné řešit pomocí přímého použití metody Runge-Kutta, [10]. Nicméně je nutné pro tuto metodu vytvořit speciální proceduru v Maple, která přesně odpovídá uvedenému postupu. V každém kroku procedury je tak možné provést numerickou integraci $X(t)$ a $Y(t)$.

Tato procedura, nazvaná **RK45**, spočítá polohu a rychlost středu vlečené nápravy v čase $t + Dt$. Další procedura s názvem **STEP**, viz (7), určuje velikost časového kroku Dt metodou půlení časového kroku. Pro první iteraci se zvolí libovolná velikost časového kroku, např. $Dt = 1$ a provede se výpočet polohy pro čas $t + Dt$. Podobně se provede výpočet polohy stejnou procedurou, ale ve dvou krocích s poloviční velikostí Dt . Pokud bude rozdíl poloh získaných v prvním a druhém výpočtu menší než požadovaná přesnost 10^{-6} přidá se vypočtená poloha do vektoru Λ , obsahujícího časový krok a souřadnice polohy středu vlečené nápravy. V případě, že je rozdíl poloh větší, sníží se velikost časového kroku na polovinu a celý postup se zopakuje.

```
STEP := proc(U) local l, R2; global R1, Λ, Dt, t;
  l := U[ ]; R2 := [RK45(RK45(l, Dt/2), Dt/2)]; R1 := [RK45(l, Dt)];
  if sqrt(add(u2, u = R1 - R2)) ≤ 10-6 then Λ := [Λ[ ], R1]; t := t + Dt;
  else Dt := Dt/2 end if
end proc
```

(7)

VÝSLEDKY A DISKUZE

Praktická aplikace

Předpokládejme rovnoměrně zpomalený průjezd pravouhloú zatáčkou. Pro tento případ je možné zvolit

$$v(t) = V_0 - a t, \quad k(t) = \frac{4t(T_f - t)}{T_f^2 \rho}, \quad (8)$$

kde V_0 je počáteční rychlost, a je zpomalení, T_f je doba průjezdu zatáčkou a ρ je nejmenší poloměr projížděné zatáčky.

Určení času pro průjezd zatáčkou

Pokud se zvolí směr rychlosti v čase $t=0$ rovnoběžný s osou x , tedy $\phi_0=0$, bude zatáčka ukončena v okamžiku, kdy vektor okamžité rychlosti $[X_t, Y_t]$ bude rovnoběžný s osou y . Musí tedy platit $X_t = 0$. Z této podmínky pak je zřejmé, že s ohledem na (4) musí být splněno

$$T_f = \frac{1}{2} \frac{2V_0 - \sqrt{4V_0^2 - 6a\pi\rho}}{a}. \quad (9)$$

Numerický příklad - iterace

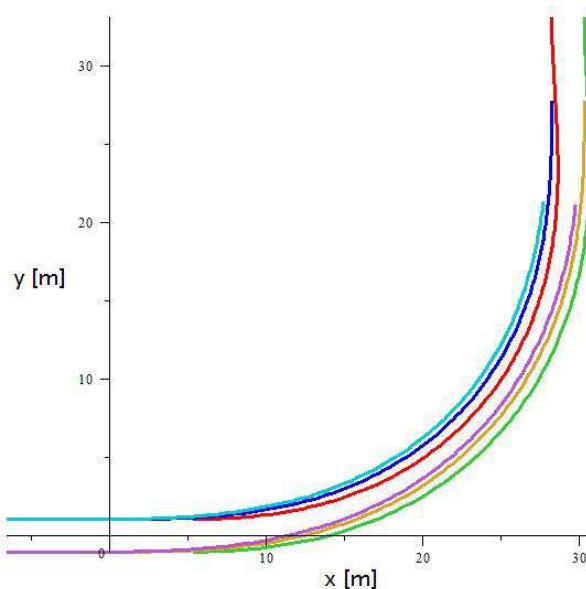
Jako konkrétní hodnoty je možné zvolit $V_0 = 10 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, $a = 0.5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$, $\rho = 20 \text{ m}$, $x_0 = 0 \text{ m}$, $y_0 = 0 \text{ m}$, $d_1 = 1.95 \text{ m}$ a $L = 4.625 \text{ m}$. Pro tyto hodnoty vychází čas nutný pro průjezd zatáčkou $T_f = 5.45680775 \text{ s}$. Počáteční čas je $t=0$ a počáteční časový krok $Dt = T_f = 5.45680775 \text{ s}$. Nyní je nutné vytvořit vektor Λ , jeho první prvek bude $[t, -L - d_1, 0]$, tedy $\Lambda := [[0, -6.575, 0]]$. Procedura **STEP** nejprve určí velikost časového kroku na $Dt = T_f / 128 = 0.04263131055 \text{ s}$ a poté provede 128 iteračních kroků. Pro jednotlivé iterační časy je možné dopočítat podle vztahu (4) polohu středního bodu a podle vztahu (5) spojovacího kloubu. Podle obrázku 2. a následujícího vztahu (10) je dále možné dopočítat polohu kol přední, střední a zadní vlečené nápravy a také polohu libovolného bodu obrysu autobusu.

ZÁVĚR

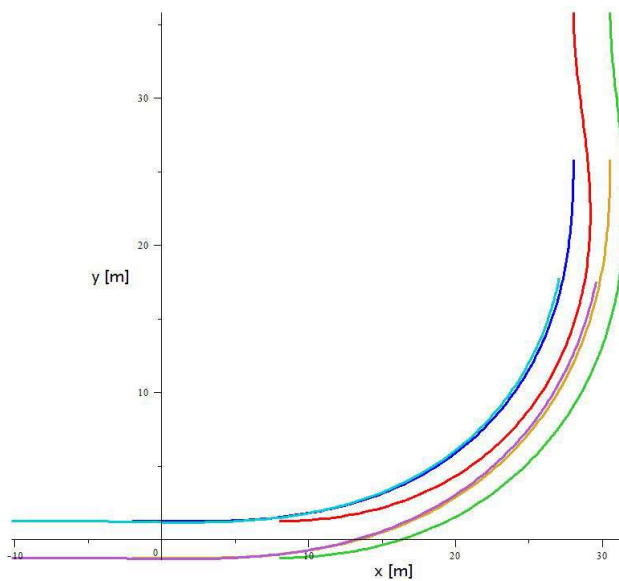
Vhodnou volbou průběhu rychlosti $v(t)$ a křivosti trajektorie $k(t)$ lze výše uvedeným postupem modelovat průběh všech významných kinematických veličin a to pro libovolný bod uvnitř autobusu - stačí pouze zvolit vhodné hodnoty proměnných, d a r odpovídajících obrázku 2. a rovnici (10). Dále je možné provést výpočty zrychlení libovolného bodu, tedy i bodů, které odpovídají bodům styku jednotlivých kol s vozovkou. Znalosti zrychlení mohou být využity pro stanovení mezních hodnot adheze. Tento postup je možné využít i obráceně. Z okamžiku, kdy došlo ke ztrátě adheze - ke smyku je možné pokusně nalézt takové průběhy rychlosti a křivosti trajektorie, které ji způsobily. Je tak možné z průběhu trajektorie - brzdné dráhy odhadnout činnosti řidiče, které této události předcházely.

Ze znalosti průběhu zrychlení uvnitř autobusu je možné provést výpočty celkové síly, která působí na celý autobus nebo na jednotlivé cestující. Znalost celkové síly je důležitým faktorem ovlivňujícím jeho stabilitu. Síla, která působí na jednotlivé cestující je rozhodujícím faktorem, který určuje jejich bezpečnost. Výše uvedená metoda tak umožňuje modelovat chování řidiče na bezpečnost cestujících v závislosti na jejich poloze uvnitř autobusu.

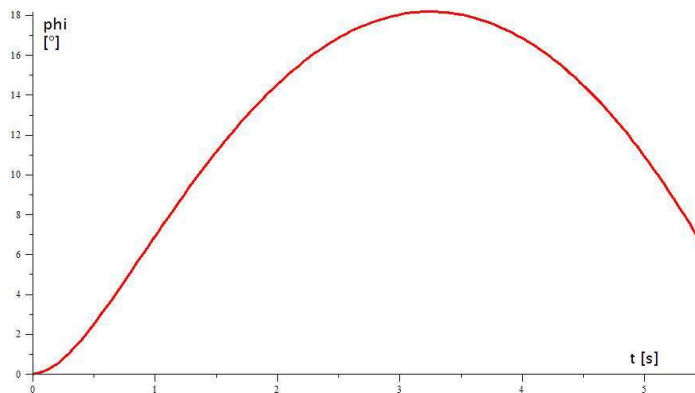
Obrázek 3. Trajektorie jednotlivých kol autobusu



Obrázek 4. Obrysová trajektorie



Obrázek 5. Úhel zalomení kloubu autobusu



LITERATURA

1. Gander, W., Hřebíček, J.: The tractrix and similar curves. In: GANDER, W. -- HŘEBÍČEK, J. Solving problems in Scientific Computing using Maple and Matlab. 4. ed., Heidelberg: Springer, 2004. s. 1--26. ISBN 3-540-21127-6.
2. Krumpholc, T. Bartoň, S.: Matematický model řízení zatáčky autobusu. [CD-ROM]. In Recent Advances in Agriculture, Mechanical Engineering and Waste. s. 120--125. SPU Nitra, 2012, ISBN 978-80-552-0781-0.
3. Bartoň, S., Krumpholc, T.: Stanovení trajektorie vozidla -- inverzní problém kinematiky. [CD-ROM]. In SCO 2011 Workshop Maple. s. 1--8.
4. Krumpholc, T., Bartoň, S.: Stanovení trajektorie vozidla po zásahu řidiče do řízení. [CD-ROM]. In Kvalita a spolehlivost' technických systémů - Zborník vedeckých prác. s. 186--191. SPU Nitra, 2011, ISBN 978-80-552-0595-3.
5. Krumpholc, T., Bartoň, S.: Studie trajektorie autobusu při brzděném průjezdu zatáčkou. [CD-ROM]. In MendelNet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference. s. 879--904. ISBN 978-80-7375-563-8.
6. Brand, L.: Vector and Tensor Analysis. John Wiley, New York, 1947, s 121--124
7. McCarthy, J., M.: Introduction to Theoretical Kinematics. The Mit Press, 1990, ISBN 978-0262132527
8. http://webfyzika.fsv.cvut.cz/PDF/webFyzika_vztahy_mechanika.pdf
9. Spallek, K.: Kurven und Karten. Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, 1980, ISBN 3-411-01593-4
10. Ralston, A.: Základy numerické matematiky, Academia Praha, 1978.

CONTROLS OPERATIONS OF THE VAKUUM PUMP OF THE MILKING MACHINE BY FREQUENCY CONVERTER

ŘÍZENÍ ČINNOSTI VÝVĚVY DOJÍCÍHO STROJE FREKVENČNÍM MĚNIČEM

Kudělka J., Fryč J., Kukla R., Konrád Z., Ševčík J.

Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jan.kudelka@mendelu.cz.

ABSTRACT

To achieve the necessary vacuum in the milking systems are currently used mainly rotary pumps which are driven by an asynchronous motor with a constant power. Constant vacuum ensures control valve which directs excess vacuum by intaking of atmospheric air and environment. In its own milking process is therefore spent a lot of energy, because asynchronous motor with pump working continuously. The aim of the project is to design and describe by the existing milking equipment, control system to regulate the activity of the asynchronous motor, so that the performance of the pump was the same as the amount of air sucked by milking machine.

Technical energy saving solutions represent the drives that regulate the speed of induction motor. The task is to find and properly adjust drive parameters so that the underpressure in the system could be at the optimum during minimum electric power. For the examination of the problem is used experimental laboratory for milking process modeling, which is located on the premises of Mendel University and subsequently at farm in Telc, where the drive is connected.

Key words: Vacuum, vacuum pump, vacuum control, milking equipment, frequency converter, asynchronous motor, vacuum sensor

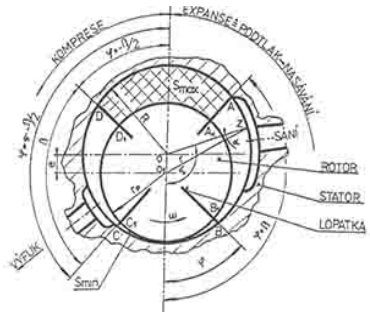
Acknowledgments: This project was made with support of Internal Grant Agency of The Faculty of Agronomy Mendel University, TP7/2012.

ÚVOD

Vývěva, jako základní strojní prvek dojícího zařízení zajišťuje podtlak pro dojení, pro dopravu mléka a pro činnost dalších zařízení. Pohon vývěvy je zprostředkován asynchronním elektromotorem s kotvou na krátko. V současnosti se nečastěji k tvorbě podtlaku používá rotační lopatková vývěva Obrázek 1. [1]

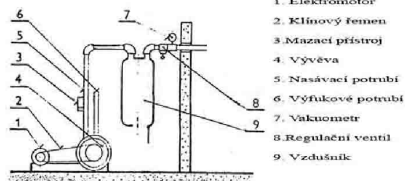
Obr. 1 Schéma činnosti rotační lopatkové vývěvy

Vývěva je tvořena válcovým rotorem s hlubokými zářezy, ve kterém jsou posuvně uloženy lopatky. [2] Rotor je výstředně uložen vzhledem k válci, v němž se otáčí. Rotací vyvolané normálové zrychlení vysouvá lopatky k vnitřní ploše statoru. Srpovitý prostor mezi válcem, rotorem a dvěma sousedními lopatkami se v průběhu otáčení mění. Při otáčení rotoru se objem komůrky zvětšuje a nasává plyn ze vzduchového potrubí. Ve vzduchovém potrubí dojícího zařízení vzniká podtlak. Přjetím lopatek přes hranu výřezu se přeruší spojení se sáním, objem komůrky se začne zmenšovat a tlak plynu stoupá. Komprese končí, když přední lopatka přejede přes hranu výtlačného otvoru a komůrka se spojí s výtlačným prostorem. [4]



Vývěva musí být schopna pokrýt provozní požadavky (dojení, čištění) dojícího zařízení, které jsou v činnosti stále nebo přerušovaně. Hodnoty potřebného podtlaku (40 - 50 kPa) v dojícím zařízení a potřebnou výkonnost vývěv udává norma ČSN ISO 5707. Regulaci podtlaku na konstantní hodnoty zajišťuje regulační ventil. Ten pracuje tak, že do podtlakového potrubí přisává atmosférický vzduch z okolního prostředí. Asynchronní motor, který pohání rotační lopatkovou vývěvu, ale pracuje s plným příkonem. Ve vlastním procesu dojení se proto vynaloží velké množství energie. Schéma dojícího zařízení s rotační vývěvou je znázorněno na obrázku 2.

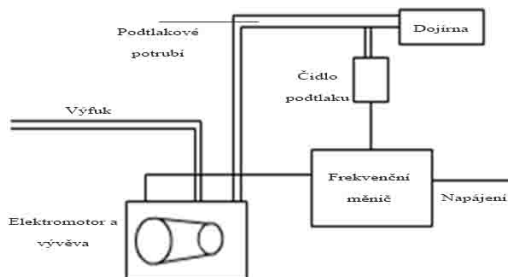
Obr. 2 Schéma soustrojí vývěvy



Z technického hlediska je nutné v soustavě zajistit stálý podtlak, při optimálních provozních parametrech asynchronního motoru (otáčky motoru, točivý moment, spotřeba elektrické energie). K tomuto účelu je možno využít principu frekvenčního měniče. Frekvenční měnič umožní regulaci otáček na potřebné hodnoty. Tím klesne celková spotřeba elektrické energie. Úkolem práce je zjistit a správně nastavit parametry frekvenčního měniče, tak

aby byla udržena stabilita podtlaku v soustavě při minimálním příkonu elektromotoru vývěvy. Schématické zapojení frekvenčního měniče v dojícím zařízení je znázorněno na obrázku 3.

Obr. 3 Schéma dojícího zařízení doplněného o frekvenční měnič



MATERIÁL A METODIKA

K projektu bylo využito experimentální laboratoře dojící techniky, a dojícího zařízení v ZD Telč. Měření parametrů dojícího zařízení při zapojení s frekvenčním měničem bylo nejprve vyzkoušeno v experimentální laboratoři dojící techniky na Mendelově univerzitě v Brně, kde byla prověřena funkčnost podtlakového čidla OMEGA PX541. Potvrzení správné činnosti podtlakového čidla umožnilo instalaci frekvenčního měniče (Siemens Sinamics G120P BT s výkonnou jednotkou SINAMICS PM230) do dojícího zařízení v zemědělském družstvu v Telči

Obr 4 Frekvenční měnič v ZD Telč



V podniku ZD TELČ je situovaná dvacetimístná (2x10 míst) rybinová dojírna. Soustrojí vývěv se skládá ze dvou rotačních lopatkových vývěv (označených DVL 211 AMB) o teoretické výkonosti $1450 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, které jsou poháněny dvěma asynchronními motory s kotvou na krátko o výkonu $2 \times 4 \text{ kW}$. Objem vzduchového potrubí dojícího zařízení se vzdušníky, ve kterém se musí vytvořit průměrný podtlak 42 kPa činí $0,3613 \text{ m}^3$. Objem mléčného potrubí spolu s mléčným vzdušníkem tvoří $0,1819 \text{ m}^3$. Celkový objem mléčného a vzdušného potrubí je tedy roven $0,54156 \text{ m}^3$.



Nejprve proběhlo dlouhodobé měření spotřeby elektrické energie v průběhu měsíce pomocí měřiče energie SENTRON PAC 4200 před zapojením frekvenčního měniče. Následně byla měřena stabilita podtlaku v systému pomocí Pulsatorstesteru PT- IV (obrázek 5)

Obrázek 5 Pulsatorstester PT IV

při plném přikou motoru, kdy podtlak v podtrubí byl regulován pouze regulačním ventilem. Po naměření potřebných hodnot byl do dojíčho zařízení zapojen zmiňovaný vektorový frekvenční měnič (obrázek 4). Proběhlo totožné měření dlouhodobé spotřeby elektrické energie a podtlaku. Záznam proběhl při procesu dojení, proplachu a při připojení zařízení (cyklovače), které přisávalo v intervalech 5 sekund 285 l min⁻¹ vzduchu do podtlakového podtrubí.

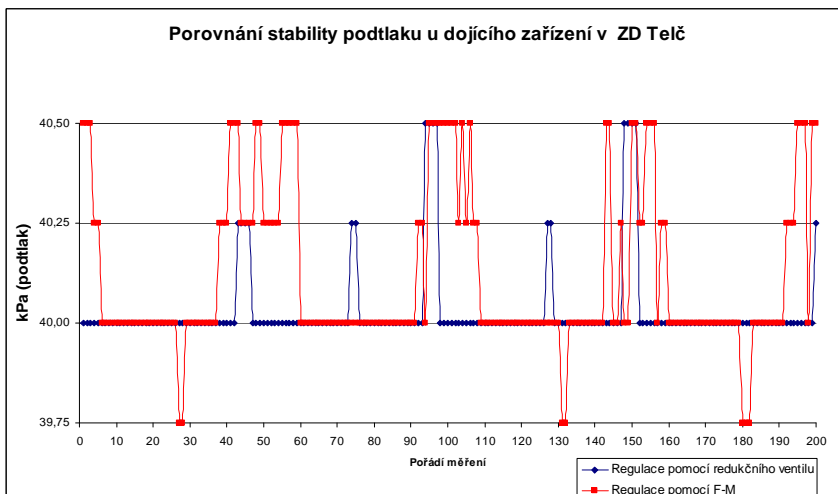
VÝSLEDKY A DISKUZE

Před samotným měřením stability podtlaku byla zjištěna skutečná výkonnost vývěv, která činí u levé 1380 l min⁻¹ a u pravé vývěvy 1300 l min⁻¹ (při vytvořeném podtlaku 50 kPa). Vyhodnocení stability podtlaku proběhlo při přesně definovaném tlaku vzduchu a průtoku vzduchu nasávaného ventilem, jehož hodnota činila (285 l min⁻¹) v pětivteřinovém cyklování.

Pulsatortester PT IV zaznamenával každých 0,15 sekund hodnotu podtlaku po dobu 30 sekund. Celkově bylo tedy klasifikováno 200 číselných hodnot při měření bez frekvenčního měniče a 200 údajů při zapojení s frekvenčním měničem. Data charakterizující podtlak (včetně statistického vyhodnocení) jsou zobrazena v tabulce 1. Graf 1 znázorňuje průběh podtlaku během měření bez a s frekvenčním měničem.

Tab. 1 Měření podtlaku v dojíčím zařízení

PODTLAK VE VZDUCHOVÉM PODTRUBÍ VYTVOŘENÝ ROTAČNÍ LOPATKOVOU VÝVĚVOU			
ŘÍZENÍ PODTLAKU POMOCÍ FREKVENČNÍHO MĚNIČE		ŘÍZENÍ PODTLAKU KLASICKOU REGULACÍ	
	kPa		kPa
1.	40,50	1.	40,00
2	40,50	2	40,00
3	40,50	3	40,00
4	40,25	4	40,00
5	40,25	5	40,00
6	40,00	6	40,00
7	40,00	7	40,00
8	40,00	8	40,00
9	40,00	9	40,00
10	10	...
\bar{x}	40,11	\bar{x}	40,03
s_x	0,20 kPa	s_x	0,11 kPa
v_x	0,51 %	v_x	0,27 %
$\Delta \bar{x}$	0,0825 kPa		



Dále jsme sledovali, jak se snížila spotřeba elektrické energie a jaká byla návratnost investice při zapojení frekvenčního měniče do soustavy, jehož pořizovací náklady celkově tvořili 32059 Kč. (Tabulka 2)

Tab. 2 Pořizovací cená komponentů

<i>Použitý komponent</i>	<i>Cena Kč</i>
Frekvenční měnič SINAMICS	26059
Čidlo podtlaku OMEGA	5000
Instalační materiál	1000
Celkem:	32 059

Proběhlo měření elektrické energie za pomoci měřiče energie SENTRON PACD 4200 v průběhu průměrného měsíce (30,5 dnů), před samotnou instalací frekvenčního měniče.

Průměrný odebraný výkon činil 8,3 kW. Při denním vytížení zařízení (11,5 hodin), elektromotor bez regulace spotřeboval 95,55 kWh a průměrné denní náklady na provoz soustavy, při ceně 3 Kč/kWh činili 286,62 Kč. Měsíční provoz soustavy vývěv stál 8742 Kč.

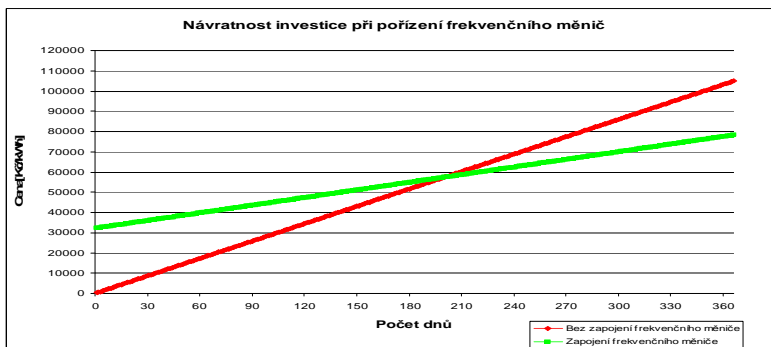
Po zapojení frekvenčního měniče se průměrný odebraný výkon snížil na 3,65 kW. Denní spotřeba elektrické energie klesla na 42 kWh. Náklady na spotřebu se snížili měsíčně na 3843 Kč. Měsíční

úspora elektrické energie byla rovna 4898,4 Kč. Návrstnost investice byla přibližně 200 dnů. Zobrazuje ji tabulka číslo 3 a graf číslo 2.

Tab. 3 Spotřeba el. energie a návratnost investice při pořízení frekvenčního měniče

Čas	Spotřeba bez F-M	Cena	Spotřeba s F-M	Cena	Rozdíl	Návratnost investice
Den	kWh	Kč	kWh	Kč	Kč	Kč
1.	95,55	286,65	42	126	160,65	-31898,35
2.	191,1	573,3	84	252	321,3	-31737,7
3.	286,65	859,95	126	378	481,95	-31577,05
4.	382,2	1146,6	168	504	642,6	-31416,4
198.	18918,9	56756,7	8316	24948	31808,7	-250,3
199.	19014,45	57043,35	8358	25074	31969,35	-89,65
200.	19110	57330	8400	25200	32130	71
201.	19205,55	57616,65	8442	25326	32290,65	231,65
202.	19301,1	57903,3	8484	25452	32451,3	392,3
203.	19396,65	58189,95	8526	25578	32611,95	552,95

Graf 2 Návratnost investice při pořízení frekvenčního měniče v ZD Telč



ZÁVĚR

Statistickým vyhodnocením naměřených hodnot u stability podtlaku v dojčícím zařízení bylo zjištěno, že při řízení frekvenčním měničem je směrodatná odchylka rovna 0,2kPa, variační koeficient je roven 0,51%. Rozdíl aritmetických průměru mezi oběma regulacemi činí 0,0825kPa. Lze tedy konstatovat, že regulace podtlaku frekvenčním měničem u dojčícího zařízení v ZD Telč negativně neovlivňuje proces strojného dojení.

Z ekonomického hlediska náklady na pořízení, instalaci frekvenčního měniče a komponentů k němu určených tvořili 32059Kč. Bylo vypočítáno, že při průměrné ceně elektrické energie 3 Kč/kWh a průměrné spotřebě 42kWh za den se investorovi vrátí pořizovací náklady do 200 dnů, kdy frekvenční měnič používá.

LITERATURA

- [1] DOLEŽAL, Oldřich. Mléko, dojení, dojírny. Praha : Agrospoj, 2000. 241 s.
- [2] PŘÍKRYL, Miroslav a kol. Technologie zařízení staveb živočišné výroby. 1. vydání. Praha: TEMPO PRESS II, 1997, s. 87-90. ISBN 80-901052-0-3.
- [3] ČSN ISO 5707. Dojící zařízení: Konstrukce a provedení. 2. dopl. vydání. Praha: Technické normy ČSN, 1998.
- [4] FRYČ, Jiří. Regulace podtlaku a energetická náročnost soustrojí vývěv dojčících strojů. Brno, 2000. Habilitační práce. Mendelova univerzita v Brně.

THE PREDICTION PHYSICAL AND MECHANICAL BEHAVIOR OF FLOWING LIQUID IN THE TECHNICAL ELEMENT

PREDIKCE FYZIKÁLNĚ-MECHANICKÝCH POMĚRŮ PROUDÍCÍ KAPALINY V TECHNICKÉM ELEMENTU

Kumbár V., Bartoň S., Křivánek I.

Department of technology and Automobile Transport, Faculty of Agriculture, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: vojtech.kumbar@mendelu.cz

ABSTRACT

This paper describes the prediction of physical and mechanical behavior of flowing liquid in the technical element using numerical modeling. Flowing liquid were variously viscous motor oil. Technical element was supply pipe to the turbocharger engine oil in engines Zetor. First they were measured the temperature dependence dynamic viscosity and density. Modern measuring devices were used. These values were then smoothed by regression curves appropriately. They were chose in order to achieve continuity of dependence. With the ANSYS program were developed numerical models of average values of the mass flow, velocity and pressure of engine oil in the six selected sections at medium temperatures 0 °C, 20 °C and 70 °C.

Key words: prediction, modeling, engine oil, temperature.

Acknowledgments: The research has been supported by the project IP 22/2012 “Monitoring of wear particles and chemical elements in the oils used in agricultural technology“, financed by IGA AF MENDELU.

ÚVOD

Velká spousta podniků, konstruktérů a výzkumníků se v současné době se zabývá tím, jak ušetřit peníze za výrobu určitých výrobků. Je tomu tak i ve strojírenství, kdy snížením množství materiálů na výrobu, může podniku ušetřit nemalé peníze. Vystupuje zde ale otázka, jak ušetřit materiál, ale zároveň nesnížit kvalitu, popř. bezpečnost vyráběného zboží? Náklady na experimentální pokusy mohou ale někdy převýšit i úsporu samotnou. V těchto případech se může velice dobře osvědčit numerické modelování. Jsou-li kvalitní vstupní data, může být pomocí vhodně zvolených modelovacích metod výsledek velmi přesný. Takto získané modely pomohou konstruktérům navrhovat takové součásti, které nejsou zbytečně předimenzované, ale zároveň bezpečné a v souladu s požadovanými normami. Dále se mohou modelovat ideální tvary součástí, ať už z pohledu statistického nebo dynamického – pružnost, pevnost, hydrodynamika, aerodynamika, termodynamika atd.

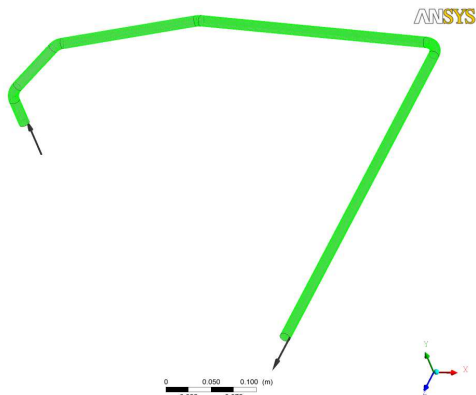
V tomto článku jsou prezentovány výsledky výzkumu, který si klade za cíl numericky modelovat fyzikálně-mechanické stavy proudících kapalin v reálném technickém prvku. Ke studiu této problematiky byly použity publikace Kozubková (2008) a Stevar (2012).

Konkrétně se v této práci jedná o stanovení tlakových a rychlostních poměrů podél geometrie modelu ve zvolených místech pro tři různé teplotně závislé materiály (motorové oleje různých viskozitních tříd) při třech různých teplotách proudícího média (0 °C, 20 °C a 70 °C). Sledována jsou především místa za zakřivením geometrie (celkem 6 pozic), která jsou z hlediska tokových a mechanických vlastností nejzajímavější.

MATERIÁL A METODIKA

Reálným technickým prvkem bylo přírodní potrubí motorového oleje k turbodmychadlu, které se používá u motorů traktorů Zetor. Jeho tvar, rozměry a sledovaná místa za zakřivením geometrie jsou vyobrazeny na Obrázku 1.

Obr. 1 Reálný technický prvek



K numerickému modelování bylo nejprve třeba získat kvalitní vstupní hodnoty. Tři různě teplotně závislé materiály – kapaliny, byly zvoleny komerčně prodávané automobilové motorové oleje různých viskozitních tříd. Jednalo se o motorové oleje viskozitní třídy 5W-30, 10W-40 a 15W-40. U těchto motorových olejů byla měřena teplotní závislost dynamické viskozity a teplotní závislost měrné hmotnosti (hustoty), pomocí moderních přístrojů.

Teplotní závislost dynamické viskozity byla měřena pomocí rotačního viskozimetru Anton Paar DV-3P s teplotním čidlem Pt100. Bylo použito standardizované vřeteno R3, které je nevíce vhodné pro měření kapalin podobných viskozit. Teplotní rozsah měření byl zvolen od -10°C do 100°C , podobně jako uvádí Maggi (2006) a Severa a kol. (2010).

Teplotní závislost měrné hmotnosti (hustoty) byla měřena pomocí digitálního hustoměru Densito PX30 se stupnicí API pro měření ropných produktů. Teplotní rozsah měření byl zvolen od -10°C do 60°C .

Numerické modelování bylo prováděno v programu ANSYS.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Teplotní závislost dynamické viskozity a měrné hmotnosti (hustoty)

Pomocí výše popsaných metod jsme dosáhli výsledků, které jsou zobrazeny v Tabulce 1 a v Tabulce 2.

Tab. 1 Teplotní závislost dynamické viskozity

Teplota, °C	Termodynamická teplota, K	Dynamická viskozita, mPa.s		
		Shell 5W- 30	Shell 10W- 40	Mogul 15W- 40
-9,65	263,5	1,433	2,415	5,298
0,35	273,5	0,828	1,108	2,667
10,35	283,5	0,374	0,607	0,739
20,35	293,5	0,227	0,306	0,412
30,35	303,5	0,144	0,180	0,225
40,35	313,5	0,089	0,115	0,144
50,35	323,5	0,067	0,085	0,098
60,35	333,5	0,057	0,070	0,074
70,35	343,5	0,049	0,059	0,063
80,35	353,5	0,042	0,053	0,056
90,35	363,5	0,040	0,047	0,052
100,35	373,5	0,038	0,045	0,050

Tab. 2 Teplotní závislost měrné hmotnosti (hustoty)

Teplota, °C	Termodynamická teplota, K	Hustota, kg.m ⁻³		
		Shell 5W-30	Shell 10W-40	Mogul 15W-40
-9,65	263,5	859	867	881
0,35	273,5	856	863	878
10,35	283,5	852	862	876
20,35	293,5	848	860	873
30,35	303,5	845	856	870
40,35	313,5	838	854	867
50,35	323,5	835	852	862
60,35	333,5	834	848	858

Dále bylo nutné pro potřeby numerického modelování vytvořit spojité funkce z naměřených hodnot dynamické viskozity i měrné hmotnosti (hustoty). Podobně postupoval ve své práci i Severa a kol (2009).

Nejvhodnější funkce sloužící k proložení výsledků naměřených hodnot dynamické viskozity byla i v souladu s publikací Šedivý (2002) zvolena nelineární lomená funkce, dle obecného tvaru:

$$y(x) = \frac{a_1 \cdot (x + a_2)}{x^2 + b_1 \cdot x + b_0} + c, \quad (1)$$

po dosazení platí:

$$\eta(T) = \frac{a_1 \cdot (T + a_0)}{T^2 + b_1 \cdot T + b_0} + c, [Pa \cdot s; K], \quad (2)$$

kde η je dynamická viskozita a T je termodynamická teplota.

Nejvhodnější funkce sloužící k proložení výsledků naměřených hodnot měrné hmotnosti (hustoty) byla i v souladu s publikací Kumbár a kol. (2012) zvolena lineární funkce, dle obecného tvaru:

$$y(x) = a_1 \cdot x + a_0, \quad (3)$$

po dosažení platí:

$$\rho(T) = a_1 \cdot T + a_0, \quad (4)$$

kde ρ je měrná hmotnost (hustota) a T je termodynamická teplota.

Hodnoty vypočítaných parametrů pro (a_0 , b_0 , c , d_0) pro všechny tři vzorky motorových olejů jsou uvedeny v Tabulce 3.

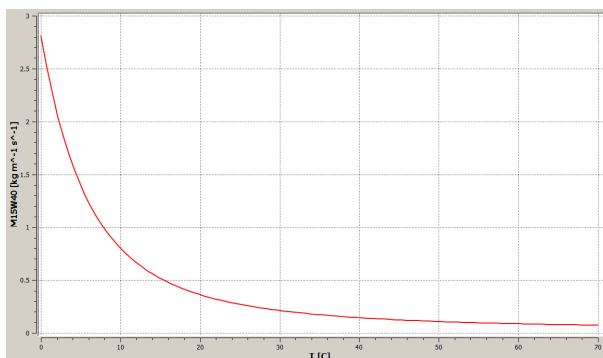
Tab. 3 Hodnoty parametrů rovnic (2) a (4)

koeficient	Shell 5W-30	Shell 10W-40	Mogul 15W-40
a_0	1,15E+04	3,39E+02	1,92E+05
a_1	4,25E-01	-6,86E+00	1,35E-03
b_0	-6,25E+02	6,79E+04	7,08E+04
b_1	-2,49E+02	-5,20E+02	-5,32E+02
c	-1,23E-01	6,31E-02	2,97E-02
d_0	9,61E+02	9,35E+02	9,67E+02
d_1	-3,87E-01	-2,57E-01	-3,23E-01

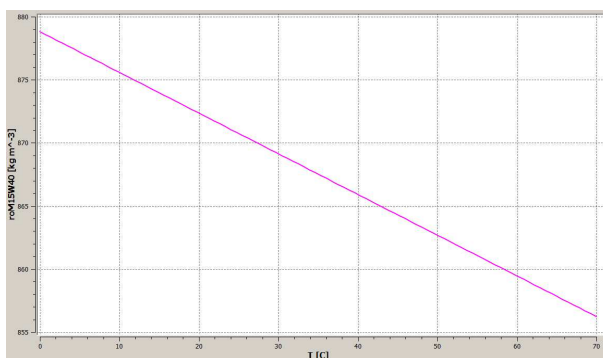
Na Obrázku 2 je zobrazen průběh nelineární lomené funkce prokládající naměřené hodnoty dynamické viskozity. Pro názornost byl vybrán motorový olej s viskozitní třídou 15W-40. Na Obrázku 3 je zobrazen průběh lineární funkce prokládající naměřené hodnoty měrné hmotnosti (hustoty). Pro názornost byl vybrán motorový olej s viskozitní třídou 15W-40.

Vysoké hodnoty koeficientu determinace $R^2=0,98$ (pro nelineární lomenou funkci) a koeficientu korelace $R=0,97$ (pro funkci lineární) dokazují vhodnost zvolených regresních funkcí.

Obr. 2 Průběh dynamické viskozity v závislosti na teplotě



Obr. 3 Průběh měrné hmotnosti (hustoty) v závislosti na teplotě



3.2 Modelování hmotnostního toku, rychlosti proudění a tlaků

Modelování bylo provedeno pro tři zvolené různě viskózní motorové oleje (5W-30, 10W-40 a 15W40). Pro názornost byl v tomto článku vybrán motorový olej s viskozitní třídou 10W-40.

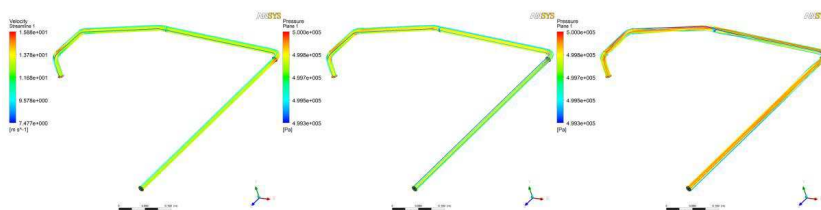
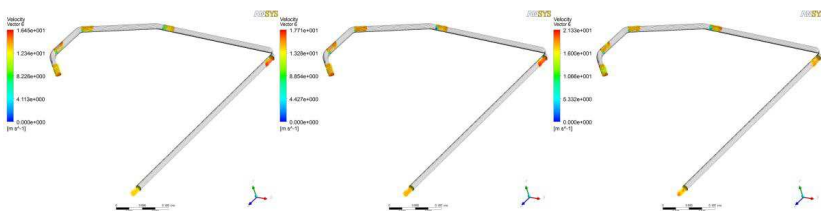
Průměrné hodnoty tlaku, hmotnostního toku a rychlosti oleje při teplotách média 0°C, 20°C a 70°C jsou uvedeny v Tabulce 4, a to pro všech šest zvolených průřezů. Velmi nízké záporné hodnoty tlaku v posledním průřezu znázorňují nulový tlak. Dále je možné z hodnot vysledovat stoupající rychlost proudění motorového oleje při zvýšení teploty, resp. snížení dynamické viskozity.

Tab. 4 Hodnoty tlaku, hmotnostního toku a rychlosti proudění

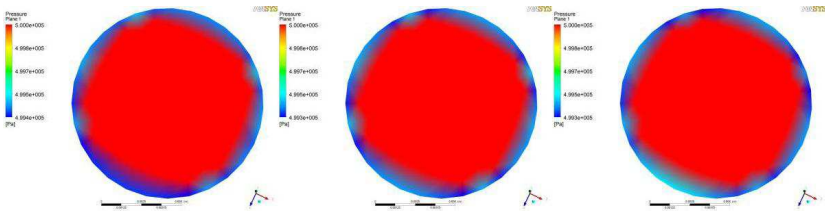
Shell 10W40								
0 °C			20 °C			70 °C		
ϕ tlak [Pa]	ϕ tok [kg.s ⁻¹]	ϕ rychlost [m.s ⁻¹]	ϕ tlak [MPa]	ϕ tok [kg.s ⁻¹]	ϕ rychlost [m.s ⁻¹]	ϕ tlak [MPa]	ϕ tok	ϕ rychlost
0.4998	-0.01461	13.12	0.4999	-0.01637	14.73	0.4999	-0.01892	16.62
0.468	-0.01507	13.21	0.4714	-0.01678	14.86	0.4682	-0.01948	16.99
0.4195	-0.01469	13.17	0.428	-0.01655	14.79	0.4332	-0.01878	16.74
0.3176	-0.01455	13.14	0.3367	-0.01641	14.74	0.3485	-0.01897	16.66
0.1766	-0.01458	13.14	0.1914	-0.01636	14.75	0.2031	-0.01857	16.85
-0.00000211	-0.01461	13.14	-0.000004521	-0.0164	14.74	-0.00001236	-0.01925	16.64

Na Obrázku 4 jsou zobrazeny proudnice rychlostí ve zvolených průřezech 1 až 6 při teplotě 0°C, 20°C a 70°C. Obrázek 5 zobrazuje vektory rychlostí oleje ve stejných průřezech, za stejných teplot.

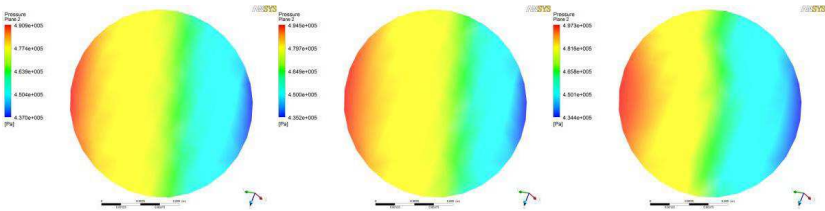
Na Obrázcích 7 až 12 jsou modelovány a znázorněny graficky tlaky ve zvolených průřezech 1 až 6, při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C. Při vytváření numerických modelů tlaků v průřezech byla zvolena nejjemnější zobrazovací síť, tudíž jsou Obrázky 7 až 12 velmi přesné. Dále je možné sledovat stoupající hodnoty tlaku s narůstající teplotou oleje v průřezech, a to především v zakřivení geometrie potrubí.

Obr. 4 Proudnice rychlostí při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C

Obr. 5 Vektory rychlostí oleje při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C


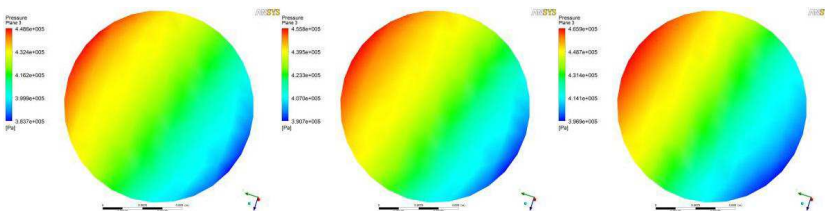
Obr. 7 Tlak v průřezu 1 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



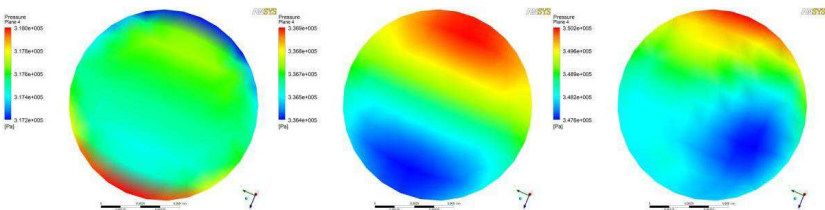
Obr. 8 Tlak v průřezu 2 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



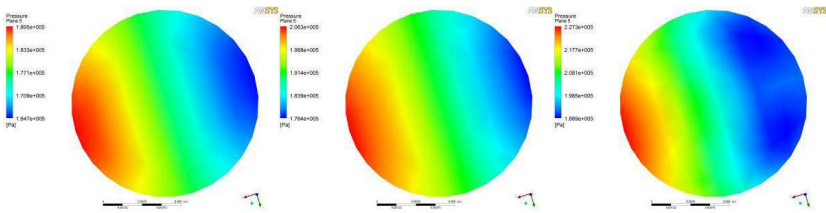
Obr. 9 Tlak v průřezu 3 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



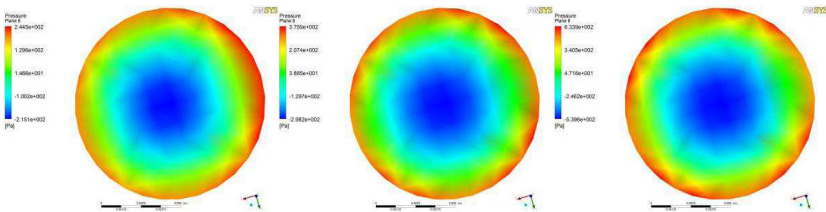
Obr. 10 Tlak v průřezu 4 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



Obr. 11 Tlak v průřezu 5 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



Obr. 12 Tlak v průřezu 6 při teplotě média 0°C, 20°C a 70°C



ZÁVĚR

V tomto článku bylo provedeno numerické modelování fyzikálně-mechanických stavů proudícího motorového oleje v reálném prostředí technického prvku – přívodního potrubí motorového oleje k turbodmychadlu používaného v motorech Zetor.

Nejprve byly změřeny teplotní závislosti dynamické viskozity a měrné hmotnosti (hustoty) pomocí moderních měřicích zařízení. Tyto hodnoty byly dále proloženy vhodně zvolenými regresními křivkami, aby bylo dosaženo spojitosti závislosti.

Dále byly pomocí programu ANSYS vytvořeny numerické modely průměrných hodnot hmotnostního toku, rychlosti proudění a tlaků motorového oleje v šesti zvolených průřezích. Tyto průřezy byly logicky vybrány – vstup, výstup a zakřivení geometrie přívodního potrubí.

Numerické modelování bylo provedeno pro tři zvolené různě viskózní motorové oleje (5W-30, 10W-40 a 15W40) při teplotách média 0°C, 20°C a 70°C. Pro názornost byly v tomto článku ilustrovány především výsledky numerického modelování motorového oleje s viskozitní třídou 10W-40, ovšem výsledky modelování měly obdobné trendy pro všechny tři vzorky motorových olejů.

Z výsledků průměrných hodnot tlaku, hmotnostního toku a rychlosti proudění oleje při třech zvolených teplotách je možné vysledovat stoupající rychlost proudění motorového oleje při zvýšení teploty, resp. snížení dynamické viskozity. Tím pádem stouply i hodnoty hmotnostního toku oleje.

Při vytváření numerických modelů tlaků v průřezech byla zvolena nejjemnější zobrazovací síť, tudíž jsou barevně zobrazené hodnoty tlaků v průřezech velmi přesné. Hodnoty tlaků oleje v průřezech stoupaly s teplotou, což lze vysvětlit zvýšením rychlosti proudění oleje při rostoucí teplotě.

Výsledky v tomto článku mohou sloužit nejen strojním konstruktérům k predikci fyzikálně-mechanických stavů proudění motorového oleje (nebo podobně viskózních kapalin) v potrubí podobného průměru a geometrie.

LITERATURA

KOZUBKOVÁ, M., 2008: *Modelování proudění tekutin*. 1. Vydání, Ostrava, 153 s.

KUMBÁR, V., ČUPERA, J., HAVLÍČEK, M., BUCHAR, J., 2012: Modelování teplotních závislostí vybraných fyzikálních vlastností směsí nového a upotřebeného motorového oleje. *Technická diagnostika*. 21, 1: 124—133. ISSN 1210-311X.

MAGGI, C., P., 2006: Advantages of Kinematic Viscosity Measurement in Used Oil Analysis. *Practicing Oil Analysis Magazine* 5, s. 38-52. ISSN 1536-3937.

SEVERA, L., HAVLÍČEK, M., ČUPERA, J., 2010: Changes of engine oil flow properties during its life cycle. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*. 58, 4: 203--208. ISSN 1211-8516.

SEVERA, L., HAVLÍČEK, M., KUMBÁR, V., 2009: Temperature dependent kinematic viscosity of different types of engine oil. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*. 57, 4: 95--102. ISSN 1211-8516.

STEVAR, M., S., P., VOROBEV A., 2012: Shapes and dynamics of miscible liquid/liquid interfaces in horizontal capillary tubes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 383: 184—197. ISSN 0021-9797.

ŠEDIVÝ, P., 2002: Teplotní závislosti fyzikálních veličin. Knihovnička fyzikální olympiády č.51. MAFY. Hradec Králové.

ACOUSTIC EMISSION DURING TENSILE TESTING OF ALUMINIUM ALLOY SPECIMENS

AKUSTICKÁ EMISE PŘI ZKOUŠCE TAHEM U VZORKŮ AL SLITIN

Lukůvka R., Filípek J., Varner D.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xLukuvka@mendelu.cz

ABSTRACT

The paper describes production, preparation and tensile testing of aluminium-based AlSi specimens. Total of 10 samples were tested with one half featuring previous exposition to intense corrosive environments. During the tensile test, loading force and acoustic emission (AE) signal were recorded. Experimental results indicate a significant influence on the corrosion degradation on the mechanical properties of the samples. Acoustic emission records show increased levels of internal damage processes in samples exposed to corrosive environments.

Key words: aluminium, acoustic emission, tensile test

ÚVOD

Slévárenské slitiny hliníku typu AlSi jsou pro odlitky jedny z nejpoužívanějších. Existuje mnoho konkrétních typů, které se liší obsahem chemických prvků [1]. Dominujícím prvkem u slitin typu AlSi (siluminy) je křemík. Tento prvek dává slitině charakteristické vlastnosti. Mezi největší se řadí jednoznačně vynikající slévárenské vlastnosti, dále také mechanická pevnost materiálu a také velmi dobrá korozivzdornost. Pokud je slitina legována dalšími prvky jako Mg, je možno u odlitků používat následně tepelné zpracování, což je vytvrzování precipitací. Vliv na tento proces má obsah Mg, mezi universální slitiny z praktického hlediska patří jednoznačně typ AlSi7Mg0,3. Se vzrůstajícím obsahem křemíku u slitin AlSi však dochází k poklesu tažnosti [2]. Výrobky ze slitin s vysokým obsahem křemíku můžou překvapit křehkostí. Na výsledné mechanické vlastnosti dané slitiny má vliv i další spektrum činitelů jako například zpracování a ošetření taveniny během tavení a odlévání, celkové naplynění, rafinace taveniny, materiál licích forem, velikost odlitku, rychlost chladnutí, atd.

Akustická emise je fyzikální jev, při kterém plastickou deformačí kovů doprovází akustické popraskávání či akustický šum emitovaný uvnitř materiálu. Dle názvosloví normy CSN EN 1330-9 akustickou emisí nazýváme elastické napětěvé vlny generované dynamickým uvolněním mechanického napětí uvnitř materiálu nebo procesem působícím vznik elastických napětěvých vln na povrchu tělesa. Metodou akustické emise pak nazýváme metodu detekce akustické emise, následně elektronické zpracování detekovaného signálu akustické emise a konečně též vyhodnocení parametrů detekovaného signálu akustické emise. První systematické práce jsou datovány do 50. let 20. století. Celý proces vzniku a detekce akustické emise zahrnuje několik fází: událost zdroje akustické emise, šíření napětěvých vln od zdroje ke snímači, detekce napětěvých vln snímačem a převod na elektrický signál a konečně vyhodnocení výsledného elektrického signálu akustické emise měřicím systémem [3].

V technické diagnostice je metoda akustické emise používána především při diagnostice rotačních objektů (tření a kavitace u ložisek, převodovek aj.), při detekci a lokalizaci vznikajících mikrotrhlin a jejich šíření, rozevírání a svírání ve stěnách tlakových nádob a potrubních systémů, u leteckých konstrukcí, mostů apod. Metoda akustické emise se také využívá při únavových materiálových zkouškách nebo destrukčních testech. Výhodou akustické emise oproti jiným defektoskopickým metodám je kontinuální monitorování objektu a úspora času v porovnání s postupným testováním jinými metodami. Nevýhodou této metody je, že příčinu vzniku akustické vlny přesně neznáme, neboť uvolněná energie je ovlivňována řadou faktorů jako je tvar a povrch tělesa, přenosová cesta vlny daná strukturou a homogenitou materiálu apod. [4][7].

MATERIÁL A METODY

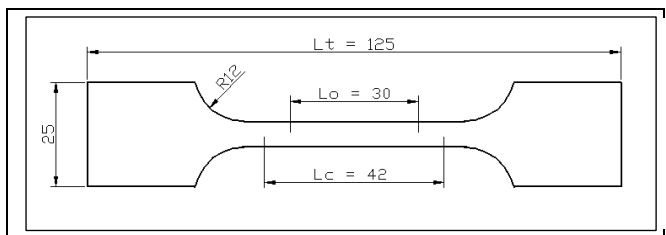
Pro zkušební soubor vzorků trhacích tyčí byl navrhnut tvar a rozměr dle aktuální normy [5], která určuje podmínky a rozměry zkušebních těles pro zkoušku tahem. Tyče mají plochý průřez o počátečním rozměru 6x5 mm, viz nákres na obrázku č. 1. Materiál pro výrobu byla slitina na bázi AlSi o obsahu křemíku do 10 %. Jsou odlévané metodou vytavitelného modelu do keramické skořepiny. Testovací soubor vzorků pro ověření rozměrů, měřicí charakteristiky a vyzkoušení vybrané metodiky byl vyroben na základě strojově obrobeneho modelu, z něhož byla vyrobena duplikační forma pro výrobu voskových modelů. Materiál formy je použit běžně dostupný kaučuk Lukopren N1522 [6]. Forma s předlohou a hotovým voskovým modelem je zobrazena na obrázku č. 2. Skořepina byla vyráběna konvenčně, obalovací břečka na vodní bázi, ostřívo v břečce mletý křemen, celkem aplikováno 5 vrstev, schnutí vždy 24 hodin mezi další aplikací. Po vytavení vosku žháná v peci na cca. 750-800 °C, při lité teplota skořepiny cca 550-600 °C. Tavenina byla ošetřena během tavby rafinační solí, po navázání strusky a její extrakci byla před litím odplyněna probubláváním dusíku. Lící teplota cca 740-750 °C. Tavenina nebyla modifikována, ani očkována.

Výsledné odlitky po odstranění keramiky viz obrázek č. 3. Je na místě zdůraznit, že odlitky mají kvalitní povrch, drsnost povrchu je velmi nízká, což potvrzuje všeobecný fakt, že při použití přijatelné kvalitních surovin a dodržení postupu výroby skořepiny dosahuje lití na vytavitelný model velmi kvalitních povrchů. Zkušební tyče nebyly nijak opracovány, pouze byly odřezány z licího stromečku. Při výběru tvaru byl upřednostněn plochý tvar, zejména pro snadnější uchycení snímače akustické emise (AE) a následně spolehlivému kontaktu mezi snímačem a zkušebním vzorkem. Ze souboru bylo vybráno 5 ks vzorků, které byly podrobeny působení korozního prostředí, viz tabulka č. 1. Jako etalon bylo 5 ks vzorků ponecháno vlivu okolní – běžné atmosféry při pokojové teplotě. Teplota v korozní komoře se pohybuje na hodnotě cca. 35 °C. Zkušební tyče byly namáhány tahem na zkušebním stroji, viz obrázek č. 4. Pro každé měření na vzorek byl uchycen piezoelektrický snímač akustické emise, viz obrázek č. 5.

Tab. 1 - Charakteristika a parametry vzorků

Vzorek	Typ prostředí	Doba působení [dny]
1	běžná atmosféra	90
2	běžná atmosféra	90
3	běžná atmosféra	90
4	běžná atmosféra	90
5	běžná atmosféra	90
06k	solná mlha	90
07k	solná mlha	90
08k	solná mlha	90
09k	solná mlha	90
10k	solná mlha	90

Obr. 1 - Nákres s rozměry zkušební tyče



Obr. 2 - Forma pro výrobu voskových modelů, mateřský model a hotový voskový model (foto R. Lukůvka)

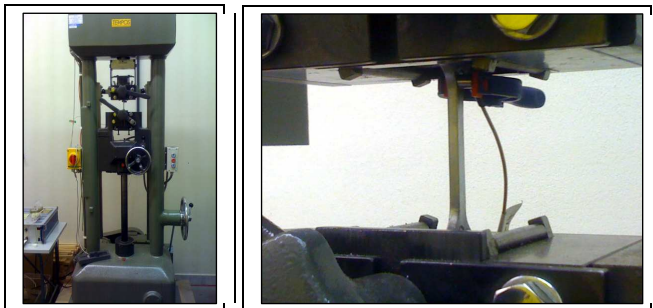


Obr. 3 - Hotové zkušební lité tyče ze slitiny AlSi (foto R. Lukůvka)



Obr. 4 – Zkušební stroj ZDM 5/51 pro namáhání tahem (vlevo, foto D. Varner)

Obr. 5 - Uchycení snímače AE během zkoušky tahem (vpravo, foto D. Varner)



Signály akustické emise byly při tahové zkoušce snímány jedním piezoelektrickým snímačem Dakel fixovaným v horní části vzorků pomocí svorky s pružinou. Kontaktní plocha snímače byla lehce potřena silikonovou pastou. U korodovaných vzorků byla v místě uchycení snímače brusným papírem odstraněna zoxidovaná vrstva. Měření akustické emise bylo provedeno pomocí aparatury Dakel XEDO. Konfigurace měřicí aparatury je uvedena v tabulce č. 2.

Tab. 2 - Konfigurace měřicí aparatury XEDO

Parametr AE	Hodnota
Vzorkovací frekvence	2 MHz
Zisk (aparatura)	30 dB
Zisk (předzesilovač)	0 dB
Rozsah hodnot	± 2000 mV

Bylo sledováno RMS signálu akustické emise (z anglického Root Mean Square). Tento parametr označuje tzv. efektivní hodnotu signálu. U střídavého napětí je RMS rovno hodnotě stejnosměrného napětí, které by při přiložení na odporovou zátěž dávalo stejný průměrný výkon. Jednotkou RMS je mV. Tato hodnota odpovídá o kvantitativní charakteristice naměřených událostí akustické emise (množství energie).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pokud porovnáme oba soubory z pohledu provedeného namáhání tahem, zjistíme, že se výsledky liší. V grafu č. 1 jsou uvedeny hodnoty z průběhu měření pevnosti u nekorodovaných vzorků. Z průběhu jednotlivých křivek lze usuzovat, že jde celkově o materiál s nižší tažností. V grafech se nalézá náznak meze kluzu R_e , v rozmezí zatížení 1,2-1,3 kN, což odpovídá napětí v tahu přibližně 43 MPa. Tento pokles je relativně pravidelný u všech vzorků a vyskytuje se v určitém rozmezí síly.

Proto bylo usouzeno, že se nejedná o mechanický vliv přístroje, např. zploštění konců tyčí v čelistech během nárůstu zatěžovací síly, atp. Konce tyčí vykazují relativně slabý otisk samosvorných čelistí. Křivky mají poměrně strmou charakteristiku a nevykazují typický znak pro měkký materiál. Maximální dosažené síly pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Co se týká vzorků podrobených korozi, data jsou zpracována a vynesena do grafu č. 2. Maximální dosažené síly jsou opět v tabulce č. 3. Pokud srovnáme grafy s hodnotami ze zkoušky nekorodovaných a korodovaných vzorků, je patrné, že je mezi nimi patrný rozdíl.

V grafu. č. 3 lze vidět celkové dosažené síly pro jednotlivé skupiny vzorků. Jsou vyneseny v podobě jednotlivých bodů. Oblasti maximálních sil jsou zvýrazněny. U vzorků podrobených koroznímu prostředí jsou dosaženy menší maximální síly a oblast vrcholů je posunuta na ose vlevo. Což by mohlo pravděpodobně indikovat, že koroze ovlivnila mechanické vlastnosti materiálů.

Pokud se zaměříme na průměrné hodnoty nárůstu síly během zatěžování v grafu č. 4, zjistíme, že korodované vzorky vykazují strmější nárůst síly již krátce po začátku zatěžování. Průměrná maximální síla, čili mez pevnosti materiálu R_m při porušení nekorodovaných vzorků osciluje na hodnotě 5166,31 N, což odpovídá napětí v tahu 172,2 MPa. Kdežto u korozi degradovaných vzorků dosahuje průměrná síla hodnoty 4614,54 N, což odpovídá napětí v tahu 153,8 MPa.

Další grafy ukazují výsledky měření akustické emise u nekorodovaných a korodovaných vzorků, průměrné křivky u obou sad jsou přehledně uvedeny v grafu č. 7. Pilotní experiment jednoznačně prokázal, že navržená metodika měření nevykazuje závažné nedostatky a je použitelná pro pozdější výzkum zahrnující větší soubor namáhaných vzorků. Snímač AE byl fixován jednoduchým a přitom účinným způsobem. Konfigurace měřicího řetězce byla zvolena správně s ohledem na očekávanou charakteristiku signálu AE. Byly eliminovány možné vlivy externích zdrojů AE (zatěžovací stroj, uchycení vzorků). U všech vzorků byl spolehlivě zachycen signál AE vyvolaný porušováním namáhaných vzorků.

Na prvním místě je jistě třeba pochopit vliv korozivního procesu na samotný jev vzniku akustické emise a jeho měření. Jelikož můžeme předpokládat, že degradační procesy v solné komoře působily především na povrchu sledovaných vzorků (do určité hloubky), jsou výraznější změny ve vnitřním uspořádání struktury vzorků nepravděpodobné. Skutečné vnitřní zdroje akustické emise tedy lze považovat za identické v obou sadách vzorků. Rozdíly v povaze signálů AE je možné vyvodit z odlišných podmínek na trase emitované vlny k povrchu materiálu a při jejím pohybu ve formě povrchové vlny směrem ke snímači. Zde by se již mohl uplatnit vliv degradované vrstvy.

To, že bezprostřední okolí snímače bylo ošetřeno broušením a „zbaveno“ korodované vrstvy, nemá pravděpodobně na mechanismus propagace vln uvnitř a na povrchu vzorku větší význam.

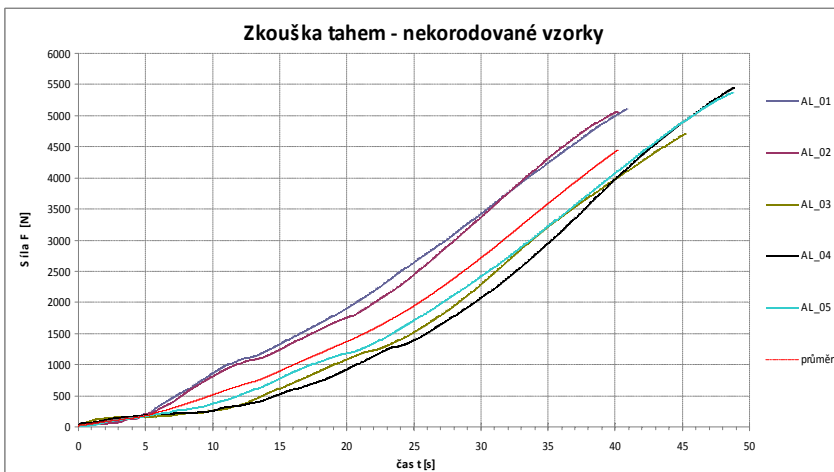
Předběžné výsledky naznačují (viz grafy č. 5, 6 a 7) rozdílné chování nekorodovaných a korodovaných vzorků. Na všech grafech je dobře viditelný extrém na začátku záznamu, který představuje pravděpodobně jediný parazitický signál během měření a odpovídá impulzu sepnutí pohonu zkušebního stroje. Je zřejmé, že selhání korodovaných vzorků provázela slabší emisní

aktivita zdrojů AE a současně došlo k selhání vzorků v kratším časovém úseku. Tato situace je dobře dokumentována v grafu č. 7, kde finální nárůst RMS signálu akustické emise nastal dříve a k selhání vzorků došlo za podstatně slabší úrovně RMS. Selhání vzorku odpovídá ukončení křivky RMS, které indikuje zastavení měřicího stroje při dosažení maximální zatěžovací síly. Na druhé straně vzorky nekorodované selhaly později a za mnohem vyšších hodnot RMS signálu AE.

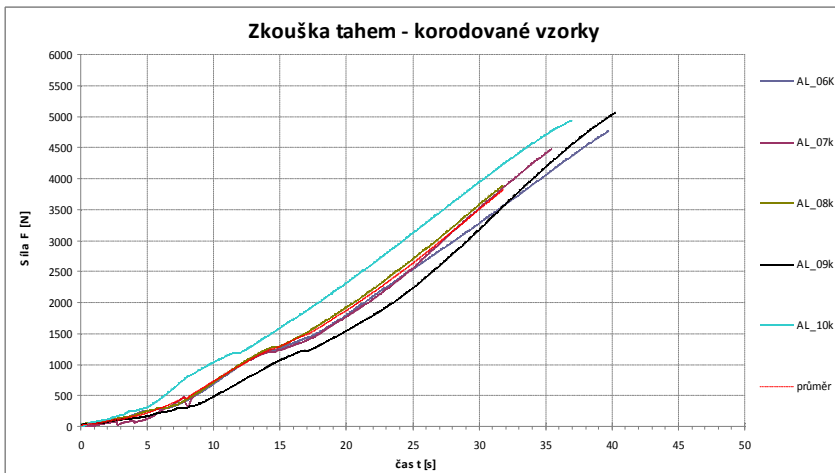
Dalším jevem, který si jistě zaslouží pozornost při dalším pokračování tohoto zajímavého experimentu, je vlastní průběh RMS během zkoušky tahem. Na několika místech totiž dochází k lokálnímu snížení úrovně RMS, které indikuje změnu v jinak globálně stoupajícím trendu aktivity AE. Je možné, že v těchto okamžicích docházelo v namáhaném materiálu ke změně fyzikálních vlastností (zpevnování, změny krystalografického charakteru, variabilní rychlost posunu kluzných pásů apod.), které by žádnou jinou metodou nebyly zjistitelné.

Jako u řady jiných aplikací metody akustické emise platí tedy i zde, že nedestruktivní měření akustické emise poskytuje neocenitelné informace o dějích uvnitř zkoumaného materiálu a zároveň staví před řešitele nelehký úkol interpretace těchto ne vždy zcela jasných indicií.

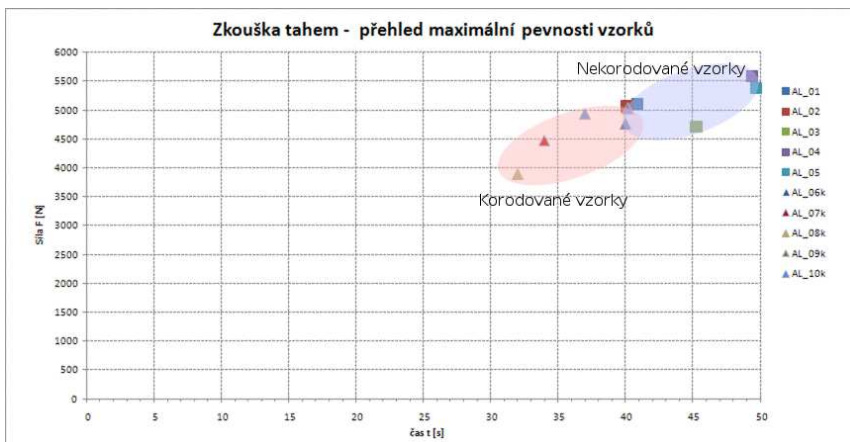
Graf. 1: Výsledky zkoušky tahem - nekorodované vzorky



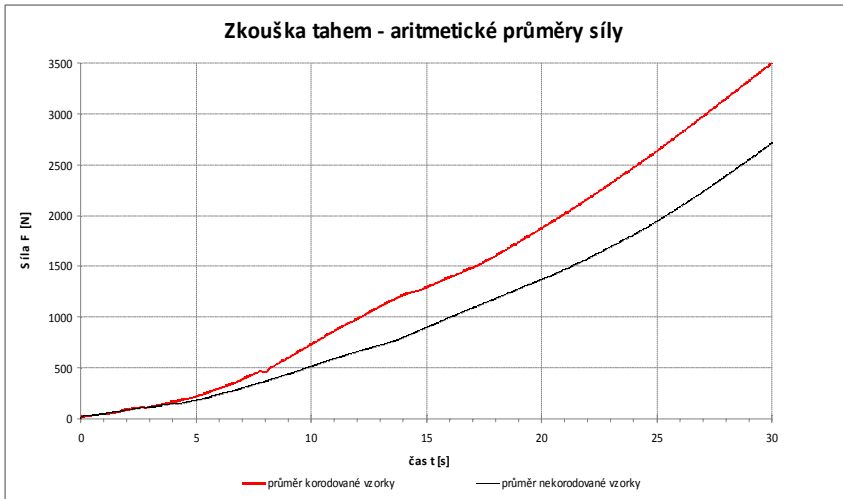
Graf. 2: Výsledky zkoušky tahem - korodované vzorky



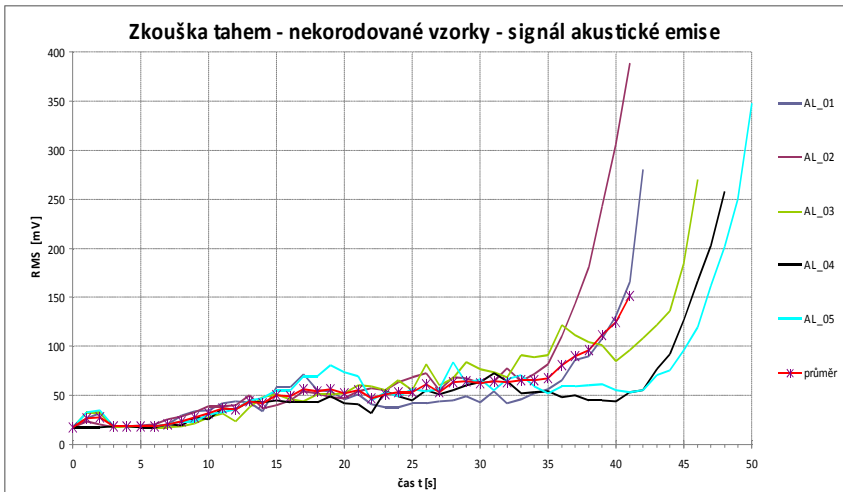
Graf. 3: Výsledky zkoušky tahem - přehled maximální pevnosti vzorků



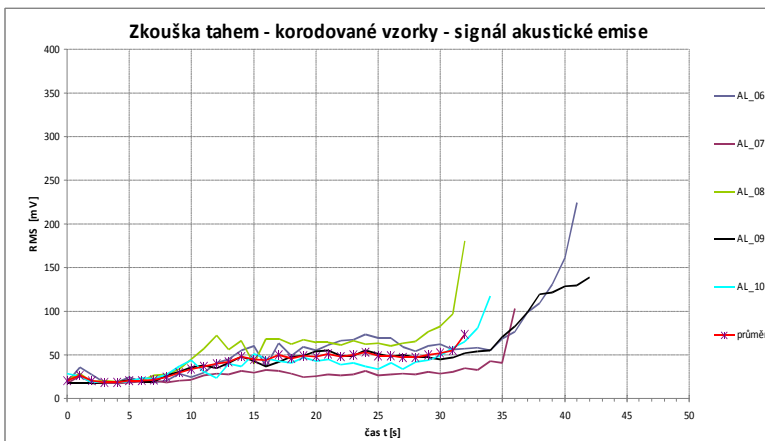
Graf. 4: Výsledky zkoušky tahem - průměrné síly



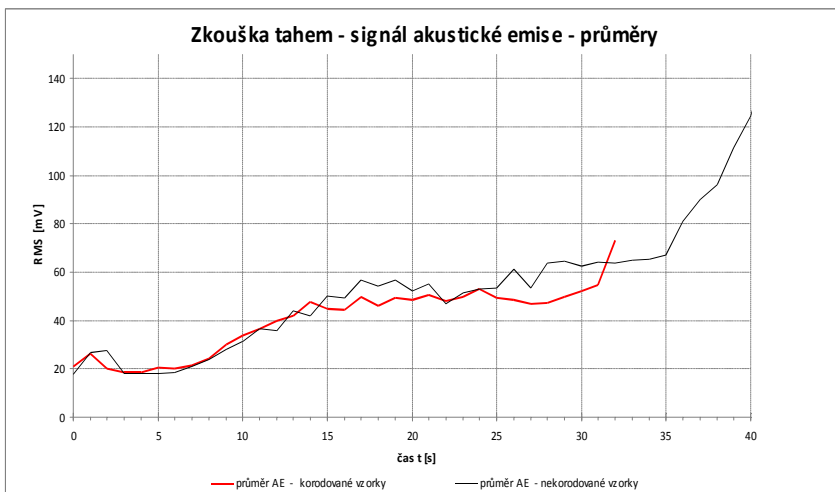
Graf. 5: Výsledky zkoušky tahem - akustická emise, nekorodované vzorky



Graf. 6: Výsledky zkoušky tahem - akustická emise, korodované vzorky



Graf. 7: Výsledky zkoušky tahem - akustická emise, průměry hodnot



Tab. 3 - Výsledky zkoušky tahem – dosažená maximální síla

Vzorek	maximální dosažená síla [N]	Typ prostředí	Doba působení [dny]
1	5103,1	běžná atmosféra	90
2	5061,2	běžná atmosféra	90
3	4708,35	běžná atmosféra	90
4	5586,3	běžná atmosféra	90
5	5372,6	běžná atmosféra	90
06k	4761,7	solná mlha	90
07k	4468,1	solná mlha	90
08k	3883,7	solná mlha	90
09k	5023,75	solná mlha	90
10k	4935,45	solná mlha	90

ZÁVĚR

Z pilotního experimentu vyplývá řada nových poznatků. Bylo zjištěno, že tvar vzorků vyhovuje jak po stránce maximální síly, se kterou bylo při návrhu kalkulováno, aby nebyl stroj zbytečně namáhán, tak po stránce uchycení snímače AE a jejího následného měření.

Vzorky během namáhání vykazují zřejmé odchylky hodnot, pro potřeby zjištění statistické průkaznosti by bylo potřeba počet navýšit aspoň na dvojnásobek. Rozměrová přesnost odliťků získaných poměrně snadným způsobem byla vyhodnocena jako přijatelná. Tento parametr je velmi důležitý, protože každá změna průřezu vzorku před zahájením namáhání ovlivní negativně celkový výsledek.

Na výsledné hodnoty pevnosti materiálu mají vliv i další faktory. V odliťku se může vyskytnout naplynění, při špatné rafinaci taveniny se můžou vyskytnout vměstky, atp. Všechny tyto vlivy mají dopad na výsledné hodnoty a jsou krajně nežádané u jakéhokoliv odliťku, dvojnásob platí v vysoce namáhaných odliťkách. Z výsledků vyplynulo, že koroze má do jisté míry přímý vliv na mechanické vlastnosti materiálu.

Měření akustické emise prokázalo použitelnost navržené metodiky a poskytlo zajímavý náhled na chování zdrojů AE uvnitř materiálu během zkoušky tahem. Je zřejmé, že degradace povrchu vzorků v solné komoře neovlivnila samotné zdroje akustické emise uvnitř vzorku, ale modifikovala mechanismus propagace vln během porušování. Z tohoto předpokladu bude vycházet i další použití této moderní nedestruktivní diagnostické metody v průběhu navazujícího výzkumu vlastností slévarenských slitin hliníku typu AlSi.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují společnosti Dakel ZD Rpety za podporu při instrumentaci měření akustické emise.

LITERATURA

- [1]VOJTĚCH, D. Kovové materiály. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 185 s. ISBN 80-7080-600-1.
- [2]JOSEPH R., DAVIS. Aluminum and Aluminum Alloys . Vyd. 5. J. R. Davis & Associates, ASM International. Handbook Committee. ASM International, 1993. ISBN 087170496X
- [3]KOPEC, B. Nedestruktivní zkoušení materiálů a konstrukcí: Nauka o materiálu IV. 1. vyd. Brno : Akademické nakladatelství CERM, s. r. o., 2008. 571 s. ISBN 978-80-7204-591-4.
- [4]KREIDL, M.; ŠMÍD, R. Technická diagnostika. 1. vyd. Praha : Nakladatelství BEN - technická literatura, 2006. 406 s. ISBN 80-7300-158-6
- [5]ČSN EN ISO 6892-1, kovové materiály – zkoušení tahem. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Praha 2010. 64 stran.
- [6]LUKŮVKA, R. -- FILÍPEK, J. -- VOTAVA, J. Kaučukové formy při malosériové výrobě voskových modelů. In Kvalita a spolehlivost' technických systémov - Zborník vedeckých prác. ISBN 978-80-552-0595-3.
- [7]BARÁK, J.; BROUZDAL, P. Proč se to nepovedlo tak, jak jsme doufali. Plant, Soil and Environment, 2004. 40(8): 253-256.

INFLUENCE OF THE ENVIRONMENTAL LEGISLATION ON THE VALUE OF THE ENTERPRISE TECHNICAL EQUIPMENT

VLIV ENVIRONMENTÁLNÍ LEGISLATIVY NA HODNOTU TECHNICKÝCH ZAŘÍZENÍ PODNIKU

Paseka P., Mareček J.

Department of Agriculture, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: petr.paseka@seznam.cz

ABSTRACT

Based on expert analysis methods there are defined technical economic contexts and influences of introduced legal regulations concerning the equipment of factory farming of pigs affected by these regulations. For assessing of the magnitude of effect on the change of the business environment in the Czech Republic or the magnitude of effect of the environmental legislation on the value of technical equipment of a company, the level of acquisition costs at the time of installation (purchase) of equipment in question was ascertained. Individual acquisition prices of equipment in question were recalculated according to the methodology of pricing of machinery and equipment to get the general price in 2007 and the same procedure was applied to calculate the general price in 2008. The effect of the change of appropriate legislative laws on the technical economic parameters of six equipment for factory farming of pigs was analyzed according to the methodology for pricing of the machinery and machine equipment. Three out of the six equipment falls under concerned equipment and the other three does not fall under criteria of the law no. 76/2002 Coll. relating to integrated prevention. From the calculated results, it was proven that the general price of the concerned equipment for the factory farming of pigs lost more than c. 50% of its original value on the determining date of 30. 10. 2007. After determining date, when comparing equipment affected by the law, with equipment unaffected by the law related to integrated prevention, the general price reduced up to ten per cent and the general price of older equipment has even increased. Based on proven correlative technical economic facts it can be expected similar unstableness of the market environment in the area of commodities of machinery and machine equipment having use in equipment technologies of factory farming of cattle, to which the operators of these equipment should react in advance with appropriate investment policy so that these equipment could meet the requirements for the application of the best available techniques.

Key words: environmental legislation, integrated prevention, factory farming of pigs

ÚVOD

Vývoj environmentálního práva je po přistoupení České republiky ke státům Evropské unie rychleji a intenzivněji promítán do změn národních právních předpisů České republiky. V současné době je subsystém environmentálního práva jedním z vůbec nejdynamičtěji se vyvíjejících odvětví práva mezinárodního. Četnost změn environmentálního národního práva České republiky a jeho jednotlivých legislativních předpisů je potom ještě vyšší. Tyto změny pak přímo či nepřímo ovlivňují vývoj jiných právních odvětví a v důsledku toho chování právních subjektů [1]. Směrnice rady Evropského společenství 96/61 EC Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) vstoupila v účinnost v roce 1999, podle ní jsou posuzována nová zařízení a na existující zařízení byl vztažen osmiletý odklad [1,2,3]. Implementací Směrnice do českého národního práva v procesu negociace unijní environmentální legislativy je zákon č. 76/2002 Sb. o integrované prevenci a omezení znečištění, o integrovaném registru znečišťování a o změně některých zákonů (účinnost od 1. 1. 2003) [1,3,4]. Přijetím tohoto zákona došlo v České republice ke změně podnikatelského prostředí. Dotčená zařízení (potenciálně velcí znečišťovatelé životního prostředí) musela mít ke dni 30. 10. 2007 platné tzv. integrované povolení [1]. Integrované povolení je vydáváno na základě kladného výsledku správního řízení zahájeného ve smyslu prováděcí vyhlášky č. 554/2002 Sb., kterou se stanoví vzor žádosti o vydání integrovaného povolení, rozsah a způsob jejího vyplnění [1,5]. Integrované povolení může být vydáno na zařízení, která splňují kritéria tzv. Best Available Techniques (BAT) [1].

MATERIÁL A METODIKA

K posouzení velikosti vlivu na změnu podnikatelského prostředí v ČR respektive velikosti vlivu environmentální legislativy na hodnotu technických zařízení podniku, v tomto případě u velkochovu prasat, byla zjištěna výše pořizovacích nákladů v době instalace (pořízení) předmětných zařízení. Pod předmětná zařízení patří zemědělské stroje a zařízení, soustrojí zdrojová a elektrické pohonné soustavy a zařízení transportní pro přepravu sypkých materiálů se zařízeními pro ložní operace. Jednotlivé pořizovací ceny předmětných zařízení byly přepočítány dle metodiky oceňování strojů a zařízení na cenu obecnou v roce 2007 a stejný postup byl aplikován pro výpočet ceny obecné v roce 2008. Obecná cena je cena stroje a strojních zařízení (SaSZ), za kterou by bylo možno oceňovaný stroj v rozhodné době a místě koupit nebo prodat na otevřeném trhu [6]. Obecná cena je rozhodující veličinou především při sjednávání pojištění majetku podniku, při posuzování škodních událostí, při likvidaci pojistných událostí a při jeho případném prodeji na volném trhu.

Stanovení technické hodnoty SaSZ [6]:

$$TH = \frac{VTH \cdot (100 - ZA) \cdot (100 + / - PS)}{10^4} \quad [\%] \quad (1)$$

kde: VTH – výchozí technická hodnota [%]

ZA – základní amortizace (Amortizační křivky a stupnice) [%]

PS – přírážka (+) nebo srážka (-) dle zjištěného technického stavu při prohlídce [%]

Algoritmus cenového přepočtu výchozí ceny z ceny pořizovací [6]:

$$VC = PC \cdot C \cdot PK = PC \cdot C \cdot (K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_{n-1} \cdot K_n) \quad [Kč] \quad (2)$$

kde: VC – výchozí cena stroje pro stávající rok [Kč]

PC – pořizovací cena stroje v roce pořízení [Kč]

C – výsledný cenový index (aritmetický průměr) cenového růstu třídy oboru příslušného stroje a zařízení dle Strukturního přepočtu č. 226/91 v návaznosti na Vyhl. č. 586/90 Sb. FMF o odpisování základních prostředků (tj. r. 1989 – 1991) [-]

K_i – indexy růstu cen dle ČSÚ pro příslušný kalendářní rok [%] [6,7]

Výpočet časové ceny (ČC) [6]:

$$\check{C}C = \frac{VC \cdot TH}{100} \quad [Kč] \quad (3)$$

Stanovení koeficientu prodejnosti [6]:

$$K_p = \frac{\sum_{i=1}^n CP_i}{\frac{\sum_{i=1}^n \check{C}C_i}{n}} \quad [-] \quad (4)$$

kde: CP – průměrná cena prodejní [Kč]

ČC – průměrná cena časová [Kč]

n – počet zjištěných prodejních případů a koeficienty prodejnosti jednotlivých strojů jsou poměry cen prodejních a časových [-]

Výpočet obecné ceny (OC) [6]:

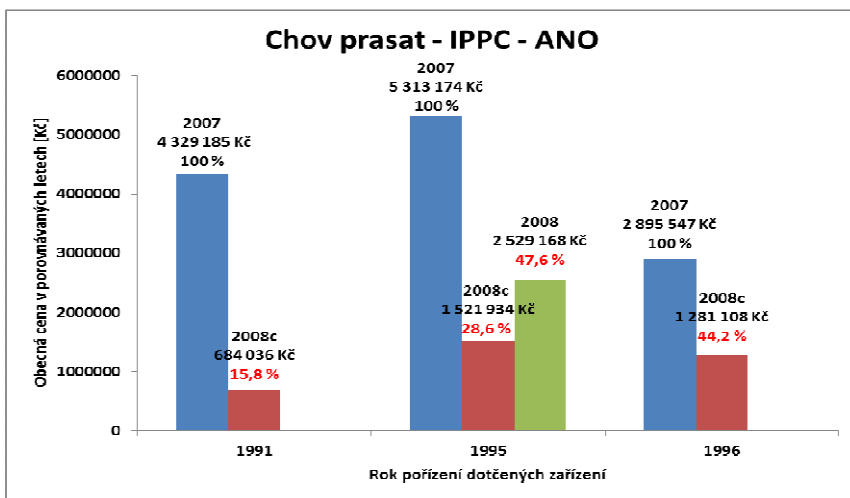
$$OC = \check{C}C \cdot K_p \quad [Kč] \quad (5)$$

Dle metodiky pro oceňování strojů a strojních zařízení byl analyzován vliv změny příslušných legislativních předpisů na technicko-ekonomické parametry šesti zařízení pro velkochov prasat. Tři zařízení z nich spadají pod dotčená zařízení a tři pod kritéria zákona o integrované prevenci nespádají.

VÝSLEDKY A DISKUZE

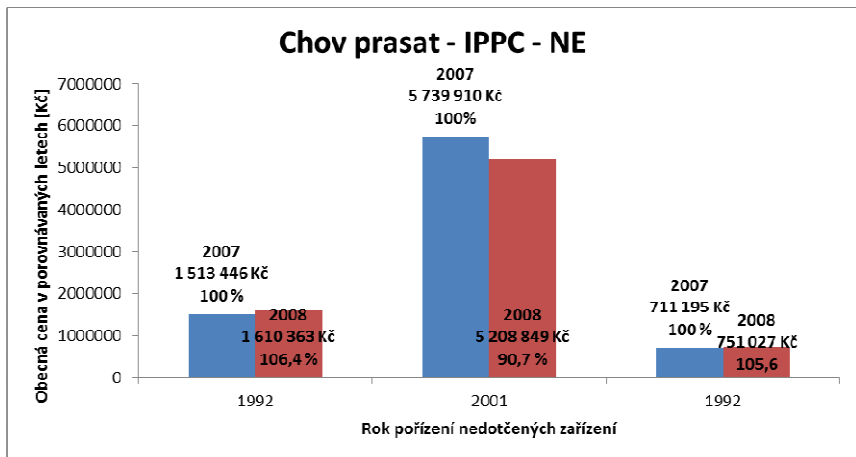
Cena obecná u dotčených zařízení pro velkochovy prasat ztratila k rozhodnému datu 30. 10. 2007, z vypočtených výsledků, o více než cca 50 % své původní hodnoty, která byla stanovena před tímto datem, viz níže popis obr. 1. Při porovnání zákonem dotčených zařízení, po rozhodném datu, se zařízeními zákonem o integrované prevenci nedotčených, se cena obecná snížila do deseti procent a u starších zařízení se cena obecná dokonce zvýšila, viz níže popis obr. 2. Porovnávání dopadu zákona o integrované prevenci na zemědělskou oblast, v tomto případě chov prasat, a na další oblasti uvedené na www.ippc.cz v dokumentech BREF (např. chemický průmysl, ...), je zavádějící, protože každá oblast má své specifické problémy a každá z nich má tedy jiný potenciál získávat prostředky na finanční rezervy a následně investice do zařízení.

Obr. 1 Vliv příslušných legislativních předpisů na cenu obecnou dotčených zařízení



Na obr. 1 Chov prasat – IPPC – ANO je znázorněna změna ceny obecné v období let 2007 – 2008 u tří zařízení, které spadají pod zákon o integrované prevenci. Na tomto obrázku je zřejmé, že cena obecná u zařízení pořízeného v roce 1991 klesla z původní hodnoty 4 329 185 Kč (100 %) na hodnotu 684 036 Kč, která představuje nižší výnos z prodeje o 84,2 %. Zařízení vyrobené v roce 1995 se prodalo po částech, tím došlo ke zvýšení výnosu z prodeje o další cca 1 milion Kč z ceny obecné jednotlivých částí a z možných 5 313 174 Kč v roce 2007 se získalo prodejem jednotlivých zařízení 2 529 168 Kč, což stále představuje ztrátu o 52,4 %. U zařízení pořízeného v roce 1996 se snížil výnos z prodeje o 55,8 %.

Obr. 2 Vliv příslušných legislativních předpisů na cenu obecnou nedotčených zařízení



Na obr. 2 Chov prasat – IPPC – NE je znázorněn vývoj ceny obecné u zařízení nedotčených zákonem o integrované prevenci. U těchto zařízení je zřejmé, že vliv příslušných legislativních předpisů se přímo neprojevil na cenu obecnou, ale jako důsledek změny poměrů na trhu s dotčenými zařízeními. To způsobilo, že z prodeje zařízení vyrobených v roce 1992 se získalo v obou případech vyšší finanční obnos, než činila obecná cena v předcházejícím roce, tedy v roce 2007 = důsledek zvýšeného zájmu o zařízení, která nejsou dotčena legislativními předpisy. U zařízení vyrobeného v roce 2001 klesla obecná cena o 9,3 %, kterou ovlivnila nabídka zařízení sice starších, ale finančně dostupnějších.

ZÁVĚR

Získané výsledky potvrzují, že zákon o integrované prevenci cenově znehodnotil předmětná zařízení k rozhodnému datu 30. 10. 2007 a snížil cenu obecnou zařízení o více než cca padesát procent. Tato změna vedla k nesprávně stanoveným hodnotám v souvislosti s úhradou pojistného plnění pojistitelem v případě nastalých pojistných událostí, která znamenala fatální důsledky pro pojištěného či pojistitele. Toto znehodnocení vedlo k pokusům o pojistný podvod. V nejbližší době je očekávána úprava příslušných právních předpisů, která se dotkne velkokapacitních zařízení chovu skotu a sladkovodních ryb, která zřejmě opět povede k situaci let 2007 – 2008, kterou byla postižena zařízení velkochovů prasat a drůbeže. Na základě prokázaných vztahových technicko-ekonomických skutečností lze očekávat obdobné rozkolísání tržního prostředí v komoditě strojů a strojních zařízení uplatněných v technologiích velkokapacitních zařízení chovu skotu, na což by měli provozovatelé těchto zařízení v předstihu reagovat investiční politikou tak, aby tato zařízení splňovala požadavky na uplatnění nejlepších dostupných technik.

LITERATURA

- [1] MAREČEK, Jan. *Nástroje a procedury integrované prevence a integrovaného managementu - IPPC*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2008.
- [2] COUNCIL DIRECTIVE OF 24 SEPTEMBER 1996 concerning integrated pollution prevention and control (96/61/EC)
- [3] INFORMAČNÍ PORTÁL MINISTERSTVA PRŮMYSLU A OBCHODU: Integrovaná prevence a omezování znečištění, Integrated Pollution Prevention and Control [online]. Dostupné z: www.ippc.cz
- [4] ZÁKON č. 76/2002 Sb. ze dne 5. února 2002 o integrované prevenci a omezování znečištění, o integrovaném registru znečišťování a o změně některých zákonů (zákon o integrované prevenci)
- [5] VYHLÁŠKA č. 554/2002: vzor žádosti o vydání integrovaného povolení, rozsah a způsob jejího vyplnění a její novela vyhláškou č. 363/2010 Sb. In: *363/2010*. 2010. Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/vyhlaska_554_2002
- [6] KNOFLÍČEK, Radek. *Metodická pomůcka: Oceňování strojů a strojního zařízení pro účely Technického znaleství*. 2. opravené vydání. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 1997.
- [7] ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD [online]. 2012. Dostupné z: <http://www.czso.cz/>

REDUCTION OF NO_x EMISSIONS USING THE SELECTIVE CATALYTIC REDUCTION SYSTEM

SNÍŽENÍ EMISÍ NO_x POMOCÍ SCR SYSTÉMU

Skřivánek A., Polcar A., Sedlák P.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xskrivan@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The article deals with the reduction of NO_x exhaust emissions using SCR system. Measurements were performed with the tractor Case Puma CVX 185 in the laboratories of the Department of Engineering and Automobile Transport at the Mendel University in Brno. The tractor was loaded through the PTO by eddy current dynamometer. Output parameters (for example fuel consumption, AdBlue consumption, temperature SCR and NO_x production) were recorded. This article shows effect of injection of AdBlue for NO_x emissions. The results of measurements show that SCR function depends not only on the quantity of injected AdBlue but also on the temperature of SCR catalytic converter. The temperature of SCR catalytic converter is influenced by the work mode of the engine.

Key words: Selective catalytic reduction SCR, Nitrogen oxides NO_x

Acknowledgments: This study was supported by the project of Internal Grant Agency of FA Mendel University in Brno, TP2/2012 Implementation of network protocol based on SAE J1939 recommendation into agricultural tractor. This work was part of the project DOPSIT Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0226 funded under the Operational Program Education for Competitiveness.

ÚVOD

Činnost spalovacího motoru je založena na spalování směsi paliva se vzduchem tj. oxidace hořlavých složek paliva s kyslíkem obsaženým ve vzduchu v podmínkách spalovacího prostoru za rychle se měnících teplot a tlaků. Během hoření dochází ke vzájemným reakcím jednotlivých složek za vysokých teplot a tlaků při uvolňování tepelné a tlakové energie. Následkem těchto reakcí dochází k tvorbě složek emisí ve všech skupenstvích vystupujících ze spalovacího prostoru a některé složky reagují a vznikají až při průchodu výfukovým potrubím. Na průběh spalování mají vliv tepelné, tvarové a vírové vlastnosti spalovacího prostoru a především způsob a kvalita vstřikování paliva. [1]

Jedním s významných polutantů, které vznikají při spalování paliva ve spalovacím motoru jsou oxidy dusíku NO_x . Oxidy dusíku vznikají oxidací dusíku dopraveného do spalovacího prostoru v nasávaném vzduchu společně s kyslíkem určeným pro oxidaci paliva nebo kyslíkem obsaženým v palivu. Oxidy dusíku obsahují nejčastěji NO – oxid dusnatý, N_2O oxid dusný a NO_2 – oxid dusičitý. Oxidy dusíku vznikají při vysokých teplotách (nutná velká aktivační energie pro zahájení reakcí) a tlacích ve spalovacím prostoru a jejich tvorba je tedy závislá na bohatosti směsi a koncentraci kyslíku. Největší zastoupený má oxid dusnatý z 95 %, který je také toxický. [1]

Při homologaci dnešních motorů musí výrobci splnit velice přísné emisní limity, proto byli nuceni vyvinout systémy pro snižování škodliviny výfukových plynů. Jeden ze systému pro snížení NO_x , který je dnes nejrozšířenější, je selektivní katalycká redukce označována jako SCR. Aby probíhala redukce NO_x na N_2 a H_2O je zapotřebí činidlo. Toto činidlo je označováno nejčastěji obchodním názvem AdBlue a je složeno ze 32,5% chemicky čisté močoviny a demineralizované vody. Měření proběhlo na traktorovém motoru, který byl vybaven systémem SCR. Motor traktoru byl zatěžován přes zadní vývodový hřídel.

MATERIÁL A METODIKA

Pro měření byl použit traktor Case Puma 185 CVX (Obr. 1). Měření probíhalo v laboratořích Ústavu techniky a automobilové dopravy na Mendelově univerzitě v Brně podle metodiky OECD, při dodržení dovolených mezních úchylek předepsaných normou ČSN ISO 789-1.

Technické parametry traktoru Case Puma 185CVX:

Výrobce traktoru: Case IH, model: Puma 185 CVX, číslo traktoru: ZCBS 54788, číslo motu: 0011004526, rok výroby: 2012, aktuální stav motohodin: 8. Motor: řadový přeplňovaný 6-ti válec, vodou chlazený, s palivovým systémem Common Rail, přeplňování turbodmychadlem

MENDELNET 2012

s mezichladičem. Objem motoru 6724 cm³. Jmenovitý výkon ECE R120 136 kW, s Power Managementem 162 kW, maximální točivý moment 862 [N.m], s Power Managementem 1019 [N.m].

Převodovka: plynulá bezstupňová převodovka CVX.

Obr. 1 Traktor Case Puma 185 CVX

Popis měřicího zařízení

Pro měření byl použit **vířivý dynamometr V 500**, který byl k traktoru připojen přes zadní vývodový hřídel. Technické údaje dynamometru: výrobce: VÚES Brno, typ dynamometru: V 500, max. otáčky: 3000 min⁻¹, max. výkon: 500 kW, točivý moment 1592 [N.m]

Obr. 2 Připojení traktoru k vířivému dynamometru



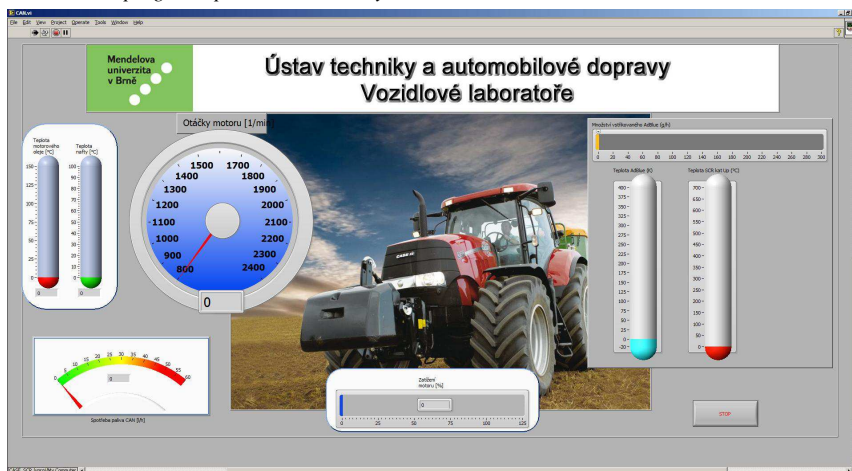
MENDELNET 2012

Pro měření škodlivin ve výfukových plynech byl použit analyzátor Bosch ESA. Analyzovány byly složky HC, CO, CO₂, O₂, NO_x. Data z analyzátoru byla dále distribuována prostřednictvím ethernet sítě do řídicího počítače zkušebny.

Mezi další snímané a zaznamenávané hodnoty patří např. hodinová spotřeba, spotřeba AdBlue, teplota AdBlue, teplota SCR katalyzátoru, teplota paliva. Tyto hodnoty byly získávány ze sítě CANBus. Zpracování výstupních údajů CANBus bylo realizováno vlastními nástroji. Data byla zpracována na externím PC v prostředí LabVIEW od společnosti National Instrument a dále distribuována ethernetovou sítí do řídicího počítače zkušebny. (Obr. 3)

Všechny hodnoty byly zaznamenávány s frekvencí 18 Hz.

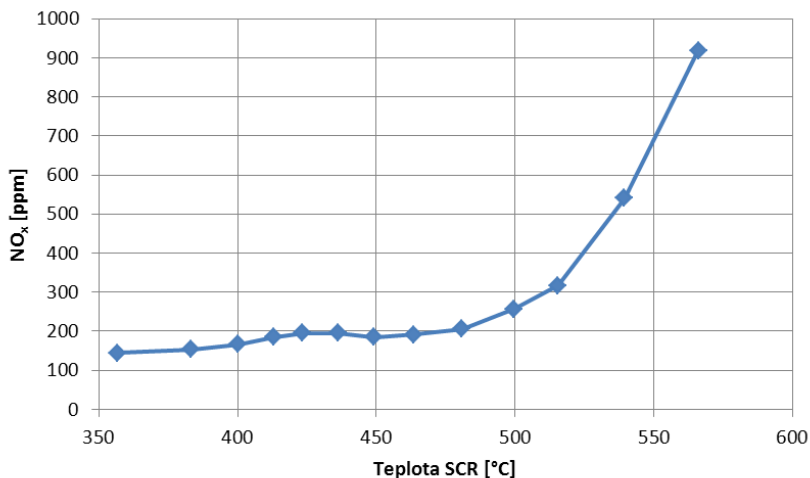
Obr.3 Maska programu pro snímání měřených hodnot CANBus



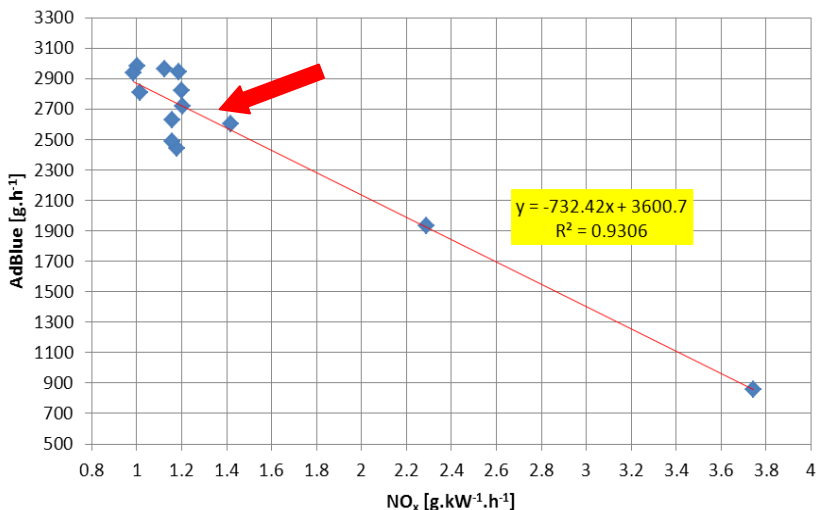
Měření probíhalo při ustálených režimech motoru. Byla naměřena jmenovitá charakteristika a to v rozsahu otáček 950 až 2100 min⁻¹. Jednotlivé body byly měněny po otáčkách 100 min⁻¹. V každém bodě byl motor zatížen dynamometrem, vždy po 30s ustálení, probíhalo 90s vlastní měření. Celé měření probíhalo zcela automaticky.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo v úvodu zmíněno, příčinnou výskytu emisí oxidů dusíku ve výfukových plynech je vysoká teplota spalování a vysoký tlak při spalování za přebytku kyslíku. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4 až 6. Na obr. 4 je vidět grafická závislost mezi množstvím vyprodukovaných emisí NO_x a teplotou SCR katalyzátoru. Teplota výfukových plynů se během měření pohybovala v rozmezí 356 – 566 °C. Procentuální množství emisí se pohybovalo od 145 do 919 ppm.

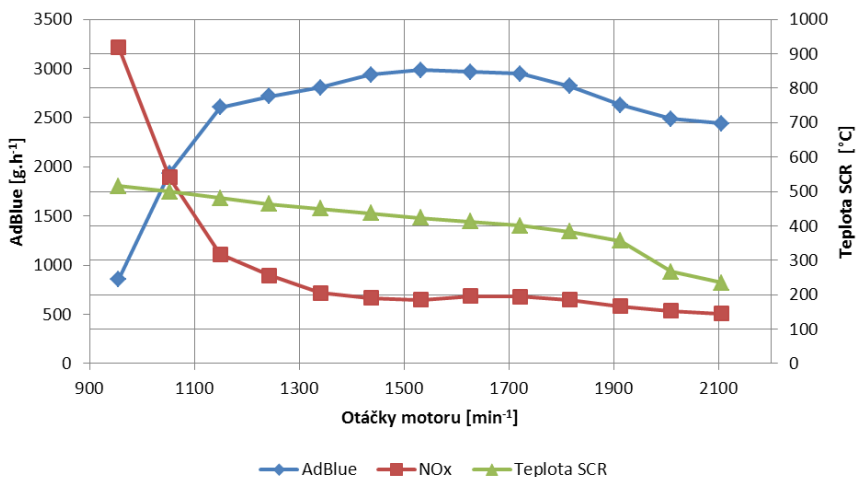
Obr. 4 Závislost vyprodukovaných NO_x na teplotě SCR katalyzátoru

Závislost mezi množstvím vstřikované dávky AdBlue a produkcí NO_x je znázorněna na (obr. 5). Naměřené hodnoty byly proloženy přímkou, jejíž průběh popisuje vyjádřená rovnice přímky. Jak z grafu vyplývá, dochází při velkém množství vstřikované dávky AdBlue k výraznému snížení množství produkovaných emisí vyjádřených v $\text{g.kW}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Velký rozptyl v množství vstřikované dávky AdBlue (zvýrazněn šipkou) je způsoben rozdílným zatížením motoru a tedy rozdílnou teplotou spalování a tlakem. Množství vstřikované dávky je tak optimálně přizpůsobeno množství produkovaných emisí zjištěných snímačem NO_x jímž je traktor opatřen, pro jejich udržení v optimálním rozsahu. Snímač NO_x pro řízení SCR systému je umístěn za SCR katalyzátorem, takže jeho funkce je zpětnovazební.

Obr. 5 Závislost vstřikovaného množství AdBlue na produkci emisí NO_x 

Vyšší nárůst produkce emisí NO_x (viz obr. 5) je způsoben menší vstřikovanou dávkou AdBlue. Jak je znázorněno na (obr. 6), dochází při nízkých otáčkách motoru, při velkém zatížení, k vysokému nárůstu teploty katalyzátoru. Provozní teplota katalyzátoru je v rozsahu teplot 200 – 450 °C Pokud katalyzátor pracuje mimo tuto provozní teplotu významně se snižuje jeho konverzní účinnost [2]. Při vyšší teplotě katalyzátoru SCR klesá prudce jeho účinnost, vyskytují se paralelní reakce s nedokonalou reakcí čpavku NH_3 s oxidy dusíku NO_x . Při vysoké dávce močoviny by tak docházelo k úniku volného čpavku do ovzduší a také vznik nebezpečných sloučenin, které mohou mít schopnost zanášet aktivní plochy katalyzátoru a snižovat tak jeho účinnost.[3] [4] Snižování vstřikované dávky není tedy pouze z ryze ekonomických důvodů, ale i z důvodů technologických.

Obr. 6 Závislost vstřikovaného množství AdBlue a teploty SCR na otáčkách motoru (plná dávka paliva)



Výsledky uvedených měření jsou srovnatelné s výsledky které uvádí Motonobu et al. zabývající se problematikou účinnosti katalyzátorů SCR při různých pracovních teplotách.

ZÁVĚR

Měření potvrdilo funkci SCR, v určitých režimech motoru. Pokud motor provozujeme při velkém zatížení a velmi nízkých otáčkách (950 – 1100 [min⁻¹]), tak významně klesne účinnost SCR systému. Pokles účinnosti je způsoben vysokou teplotou SCR katalyzátoru. Pokud posuzujeme motor dle směrnice 2000/25/EC s novelou 2005/13/EC, o opatřeních proti plynným emisím, znečišťujících látek a částic z motorů, používaných k pohonu zemědělských a lesnických traktorů, tak motor splňuje limitní hodnotu Stage IIb ve vztahu k NO_x, téměř v celém rozsahu měřené jmenovité charakteristiky, dle roku výroby a daného výkonu. Pouze v posledních dvou bodech (950 a 1100 [min⁻¹]) charakteristiky jsou naměřené hodnoty vyšší, než povoluje norma. [6] Tyto nadlimitní hodnoty se vyskytují ve velmi nízkých otáčkách a vysokém zatížení, ve kterých se motor standardně neprovozuje.

LITERATURA

- [1] Emise vznětového motoru a systém SCR - AGRIC CS. In: *Agric CS a.s.* [online]. 2011 [cit. 2012-10-03]. Dostupné z: <http://www.agrics.cz/obrazky-soubory/emise-vznetoveho-motoru-a-system-scr-4107d3.pdf?redir>
- [2] *AutoExpert: časopis profesionálů v autoopravárenství : technika - autodílna - obchod.* Praha: Autopress, s.r.o., 2009, roč. 2009, č. 11. ISSN 1211-2380.
- [3] Javed, M.T., Irfam, N., Gibbs, B.M.: Control of combustion-generated nitrogen oxides by selective non-catalytic reduction. *Journal of environmental management*, 2006, no. 83, pp. 251-289. Zveřejněno dne: 13.7.2006. [cit. 12. dubna 2009]. Dostupné z <http://www.sciencedirect.com>.
- [4] Radivojevic, M.: Reduction of nitrogen oxides in flue gases. *Environmental pollution*, 1998, no. 102, pp. 685-689. Zveřejněno dne: 9.9.1998. [cit. 14. dubna 2009]. Dostupné z <http://www.sciencedirect.com>.
- [5] Motonobu, K, et al, 2007: WO₃-TiO₂monolithiccatalysts for high temperature SCR of NO by NH₃: Influence of preparation method on structural and physico-chemical properties, activity and durability. Applied Catalysis B: Environmental, Volume 72, Issues 3-4, 30 March 2007, Pages 253-261
- [6] Směrnice evropského parlamentu a rady 2004/26/ES

INFLUENCE OF TRACTOR AND SEEDING MACHINE WEIGHT AND TIRE PRESSURE ON SOIL CHARACTERISTICS

VLIV HMOTNOSTI TRAKTORU A SECÍHO STROJE A TLAKU V PNEUMATIKÁCH NA PŮDNÍ VLASTNOSTI

Svoboda M., Červinka J.

Department of Agricultural, Food and Environmental Engineering, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xsvobo66@mendelu.cz, MarFreedom@seznam.cz

ABSTRACT

The target was to verify hypothesis that different types of seeding machines, tires and tire pressure affect density and reduced bulk density.

Monitoring factors: type of seeding machine, type of chassis and tire pressure

Levels of factor: two different types of seeding machines, two types of chassis (normal tire, twin tire) and three levels of tire pressure.

The tractor with attachment rode given distance with normal tires and twin tires with different pressurizing. Unbroken soil sample were collected from the tire traces by Kopecky roller from depths of 0.15, 0.30 and 0.45 m in three repetitions.

Reduced bulk density and soil density were determined from the soil samples. All variants were subsequently compered.

The results show that with normal tires the reduced bulk density gradually increases. The different trend was shown by variants with Horsch under pressure, Horsch standard pressure and Kverneland over pressure. The seed machine Kverneland with twin tires showed decrease of reduced bulk density. This relation was not confirmed for tractor with twin tires and seeding machine Horsch, where the reduced bulk density was increased, maybe because of abnormal harden soil at testing area.

Key words: tire, twin tire, reduced bulk density, density of soil

ÚVOD

Rozšířeným fenoménem fyzikálního poškození půdy, především zemědělské, je pedokompakce (zhuštění) půdy v důsledku těžké mechanizace s vysokým měrným tlakem, kde velkou roli hraje vlhkost a druh půdy.

Důsledkem utužení je zvyšování objemové hmotnosti půdy, což způsobuje nepříznivé podmínky pro růst rostlin. Dochází k degradaci půdní struktury, která s sebou nese potenciální ohrožení dalších půdních funkcí. Půda má sníženou pórovitost a biologickou aktivitu. Zhuštělé půdy mají sníženou retenční schopnost pro vodu. Urychluje se tak povrchový odtok a zvyšuje se riziko vzniku vodní eroze, záplav a také vysušování půdy. Na zemědělských půdách dochází ke snížení rostlinné produkce o 10 – 20 %. Degradace se ruší přirozeně hlubokým promrznutím alespoň do hloubky 50 – 60 cm. Zhuštění hlubších vrstev půdy je obtížně vratný proces.

Utužení se vyskytuje tam, kde půda podléhá mechanickému tlaku používáním těžké techniky hlavně ve vlhkých podmínkách. Výsledkem utužení půdy je redukce hrubého prostoru porů mezi půdními částicemi, čímž se zvyšuje objemová hmotnost a tím, že půdy částečně nebo úplně ztrácí schopnost absorbovat vodu. Výskyt utužení je nejčastější v povrchovém horizontu, ale postihuje i podpovrchové vrstvy (Sobocká, 2007)

Každý pohyb traktoru vyvolává v půdě napětí způsobující negativní změny především pórovitosti a měrné hmotnosti půdy, která se projeví změnami vodního režimu. Sledováním jevů, které vznikají vzájemným působením pojezdového ústrojí s půdou, se zabývá teramechanika, formulovaná v 50. letech 20. století M. G. Bekkerem v Kanadě a USA. Zabývá se například vytvářením stopy, jízdními odpory, stlačováním půdy, přenosem obvodových sil atd. (Bauer, 2006).

MATERIÁL A METODIKA

V rámci měření byly sledovány změny vlastností půdy u souprav traktor + secí stroj (Horsch záběr 6 m polonesený a Kverneland záběr 4 m nesený). Měření pokus probíhalo 5. dubna 2012. Typ půdy, na kterém měření probíhalo, byl hnědá půda a půdní druh byl střední půda písčitohlinitá. Půdní vlhkost se pohybovala varianty s neseným secím strojem v rozmezí 81 – 84 % relativní vlhkosti půdy a u varianty s poloneseným secím strojem v rozmezí 77 – 79 % relativní vlhkosti půdy. Průměrná teplota v měsíci byla 7,0°C a průměrná hodnota srážek za daný měsíc 42 mm. Oba secí stroje měly v zásobníku osivo o hmotnosti 1000 kg. Pro každou secí mašinu bylo použito na traktoru klasických pneumatik a dále pak pro každou secí mašinu byly použity dvoumontáže na zadní nápravě traktoru. Byly stanoveny tři varianty tlaku v pneumatikách na každý typ pneumatiky (dvoumontáž). Příslušná souprava se pohybovala po dráze 25 m. Ze stop, které souprava vytvořila, byly odebrány Kopeckého válečky z hloubek 0,15 m, 0,30 m a 0,45 m, vždy po třech vzorcích.

Následně byl laboratoří proveden rozbor neporušeného půdního vzorku, kde byla zjištěna objemová hmotnost redukovaná a měrná hmotnost. Uvedené varianty a parametry souprav jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Zadané hodnoty pro různé varianty sledování

Varianty	Typ podvozku	Rozměr Přední pneumatiky	Rozměr Zadní pneumatiky	Varianta tlaku	Tlak v Přední Pneum. (bar)	Tlak v Zadní Pneum. (bar)	Hmotnost Soupravy (kg)	
							4 m	6 m
Var. 1 4m / 6m	Klasická pneumat.	540/65 R30	650/65 R42	Přetlak	2,2	2,0	14300	17950
Var. 2 4m / 6m	Klasická pneumat.	540/65 R30	650/65 R42	Standardní	1,7	1,7	14300	17950
Var. 3 4m / 6m	Klasická pneumat.	540/65 R30	650/65 R42	Podtlak	1,4	1,4	14300	17950
Var. 4 4m / 6m	Dvoum ntáž z. n.	540/65 R30	650/65 R42	Přetlak	2,2	2,0	14680	18330
Var. 5 4m / 6m	Dvoum ntáž z. n.	540/65 R30	650/65 R42	Standardní	1,7	1,7	14680	18330
Var. 6 4m / 6m	Dvoum ntáž z. n.	540/65 R30	650/65 R42	Podtlak	1,4	1,4	14680	18330

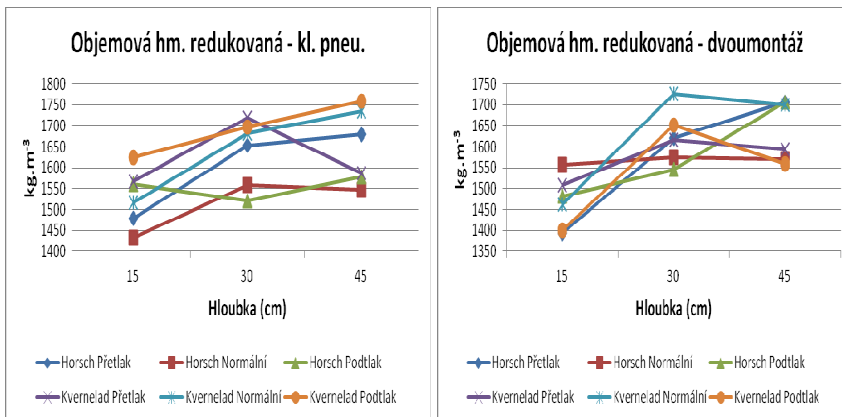
VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování jsme získali tyto výsledky:

V grafu 1 a 2 je sledována objemová hmotnost redukovaná, jak se mění se změnou pneumatik a tlaku v nich. Je zde porovnávána souprava traktoru s 6 m taženým secím strojem a souprava traktoru se 4 m neseným secím strojem, kde v grafu 1 je použito klasických pneumatik a v grafu 2 je použita dvojmontáž na zadní nápravě traktoru. Hodnoty objemová hmotnosti redukované se pohybují ve svrchních půdních vrstvách nejčastěji mezi hodnotami 1200 – 1500 kg.m⁻³. Ve spodních vrstvách tyto hodnoty vzrůstají až na hodnoty 1600 – 1800 kg. m⁻³. Objemová hmotnost suché půdy indikuje kyprost nebo ulehlost půdy a je potřebná pro výpočet pórovitosti. V grafu 1, kde bylo u souprav použito klasických pneumatik byla objemová hmotnost redukovaná v 0,15 m hloubky nejnižší u varianty s 6m taženým secím strojem (Horsch) a standardním (normálním) tlakem v pneumatikách. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u varianty s neseným secím strojem (Kverneland) a podtlakem v pneumatice. Ve hloubce 0,30 m je nejnižších hodnot dosaženo u varianty Horsch podtlak a nejvyšších hodnot u varianty Kverneland přetlak. Ve hloubce 0,45 m nám celková objemová hmotnost redukovaná roste a nejnižších hodnot dosahuje varianta Horsch se standardním tlakem a nejvyšších hodnot varianta Kverneland s podtlakem v pneumatikách. V grafu 2, kde bylo u souprav použito na zadní nápravě traktoru dvojmontáže, bylo v hloubce 0,15 m nejnižších hodnot dosaženo u variant Kverneland s podtlakem v pneumatice a Horsch s přetlakem v pneumatice. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u varianty Horsch se standardním tlakem. V hloubce 0,30 m bylo nejnižších hodnot dosaženo ve variantě Horsch s pod

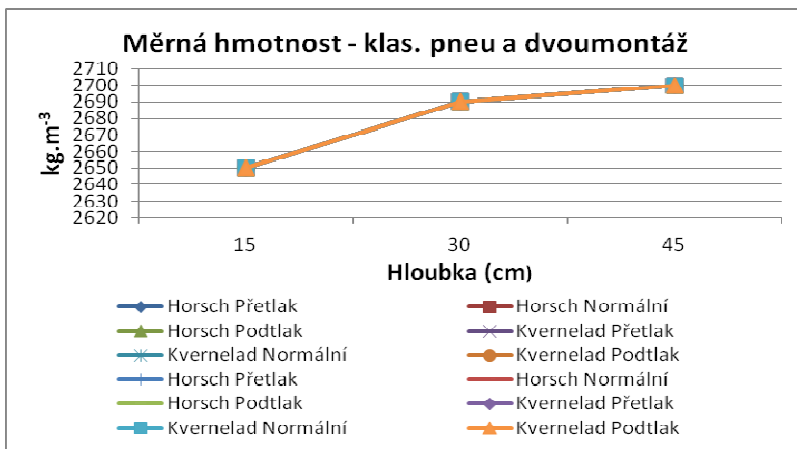
tlakem a nejvyšších hodnot dosáhla varianta Kverneland tlakem normálním v pneumatikách. Ve hloubce 0,45 m byly nižší hodnoty u variant Kverneland podtlak, Kverneland přetlak a Horsch normální tlak. Vyšší hodnoty byly u variant Horsch podtlak, Horsch přetlak a Kverneland standardní tlak v pneumatikách.

Graf. 1 Objemová hm. redukovaná – kl. pneu. Graf. 2 Objemová hm. redukovaná – dvoumontáž



V grafu 3 jsou hodnoty měrné hmotnosti pro jednotlivé hloubky. Měrná hmotnost byla stanovena z průměrného vzorku z jednotlivých stop traktoru z jednotlivých hloubek. Měrná hmotnost byla stanovena laboratorně pomocí pykrometru. Průměrná měrná hmotnost půdy je $2650 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Tuto hodnotu snižuje větší obsah humusu a naopak zvyšuje obsah těžkých minerálů. V tomto pokusu je měrná hmotnost půdy v 0,15 m stejná jako průměr. V ostatních hloubkách dochází ke zvýšení měrné hmotnosti, které ukazuje na přítomnost většího množství těžkých minerálů v dané půdě.

Graf. 3 Měrná hmotnost – klas. pneu. a dvoumontáž



V ČR je zhutněním ohroženo kolem 40 – 45 % všech zemědělských půd. Z toho tzv. genetickým zhutněním přibližně 30 % všech půd a tzv. technologickým zhutněním až 45 %. Příčina technologického zhutnění je výhradně antropogenního charakteru. Dochází k němu tehdy, jestliže zatížení přenášené podvozkem traktoru nebo stroje překračuje okamžitou únosnost půdy. Může postihnout půdy každého zrnitostního složení, ovšem těžké a středně těžké půdy jsou k zhutňování náchylnější (Bauer, 2011).

Dále prof. Bauer (2011) uvádí, jaké jsou technologické možnosti, kterými lze snižovat negativní zhutňování půdy. Je jich několik:

- snížení tlaku vzduchu v pneumatice,
- snížení zatížení přenášené kolem,
- dvoumontáž obou náprav,
- používání flotačních či nízkotlakých pneumatik,
- zvýšení šířky a vnějšího průměru pneumatik,
- zvolení pásového podvozku.

ZÁVĚR

Uvedené měření ukázalo vliv změny huštění pneumatiky na změny objemové hmotnosti redukované. Potvrdilo význam zvyšování kontaktní plochy (klasická pneumatika, dvoumotáž) a vliv snížení tlaku v pneumatikách. Zdaných výsledků vyplývá, že u varianty, kde byla použita klasická pneumatika, dochází k postupnému nárůstu objemové hmotnosti redukované. Výjimku tvoří pouze varianty s Horsch podtlak, Horsch standardní tlak a Kverneland přetlak. Při použití dvoumotáže na zadní nápravě traktoru dochází opět k postupnému nárůstu objemové hmotnosti do spodních vrstev půdy. Výjimku tvoří varianty s použitím neseného secího stoje (Kverneland) se všemi variantami tlaku v pneumatikách.

Dané výsledky by měly dokazovat, že čím je tlak v pneumatice nižší, tím je větší kontaktní plocha pneumatiky a tím by měla být nižší objemová hmotnost redukovaná. Při použití dvoumotáží by měla být objemová hmotnost redukované ještě nižší, alespoň ve svrchní vrstvě, než při použití klasických kol na daném traktoru. Pokud tomu výsledky nenasvědčují, mohlo dojít k chybnému měření nebo mohlo být dané místo, kde pokus probíhal nadměrně utuženo přejezdem těžké mechanizace v dřívějších letech.

Měrná hmotnost půdy vykazuje v daném měření průměrné hodnoty (0,15 m) a nižších vrstvách půdy dochází k mírnému zvýšení hodnot, což je asi následkem většího obsahu těžkých minerálů v dané půdě.

Nové technologie zakládání porostů dbají na to, aby se především snižovalo nežádoucí zhutnění půdy, omezovaly přejezdy traktorů a dalších strojů po poli, a to hlavně na jaře, kdy je půda na zhutnění velmi citlivá. Také časté a nadměrné obdělávání půdy působí destruktivně na strukturní výstavbu půdy, které vede k jejímu rozbití a následnému přesychání (Kumhála,2007).

LITERATURA

Sobocká J. (2007): Citlivost' a zranitelnost' poľnohospodárskych pôd SR vo vzťahu ku klimatickej zmene. VUPOP Bratislava, 28s.

Bauer, F., Sedlák, P., Šmerda, T.: Traktory. Knihu vydal Profi Press, 2011, Praha, 192 s. ISBN 80-86726-15-0

Kumhála F. a kol.: Zemědělská technika, Knihu vydala Česká zemědělská univerzita v Praze, 2007, 438 s., ISBN 978-80-213-1701-7

MONITORING OF HONEY BEE (*APIS MELLIFERA*) COLONY BEHAVIOR USING ACOUSTIC EMISSION METHOD

MONITOROVÁNÍ CHOVÁNÍ VČELSTEV (*APIS MELLIFERA*)
METODOU AKUSTICKÉ EMISE

Tlačbaba J., Černý M., Varner D.

Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xtlacbab@node.mendelu.cz, michalc@mendelu.cz

ABSTRACT

Presented paper deals with a continuous monitoring of honey bee colony depending on the activity, hive space and application of medicaments in the hive. Overall colony activity was monitored using acoustic emission (AE) method. Data was recorded to describe development of the bee colony. The information gained will be used to represent a more comprehensive view on the life-cycle and behavior of honey bees (*Apis mellifera*).

Key words: honey bee, acoustic emission

Acknowledgments: The Dakel ZD Rpety for acoustic emission equipment support.

Ing. Antonín Přidal, Ph.D. and Ing. Jiří Svoboda, Ph.D. for useful advice and innovative ideas concerning the hive monitoring and project elaboration.

This study was supported and financed by the Internal Grant Agency of the Faculty of Agronomy Mendel University in Brno No. IP 1/2012.

INTRODUCTION

Presented research project describes life activity of honey bee colonies in the course of the year. Colony members are able to carry vital information using pheromones and vibrations. The project focuses on vibrations/ultra-sound signals measured using of acoustic emission method, which helps to detect individual biological processes of bee colonies.

Honey Bee Colonies

Honey bees live in communities called colonies. The colony is considered a family made up of fertilization-capable mother and her off springs including worker bees and drones. The colony as a social entity did not evolve by chance. It results from long adaptation of honey bees to acceptable living conditions (probably as long as 80 million years). There have been as much 16 328 species, as indicated by prof. Michener. Each species, genus or family seems to be at different stage of development. Honey bee that lives in colonies represent top of the development tree. By living together, honey bees gain a lot of interesting features and characteristics. This is why a colony acts as an organized system unit. [1]

Breeding efforts should be directed towards achieving fit-and-productive condition of all colonies. Since bees are dependent on natural resources for food and thus the vegetation and weather conditions, colony treatment depends on life cycle of bees and nature during the year.

Individual interventions into colony life should be scheduled according to phenological calendar, current nature status and biological patterns. Such a complex background calendar and biological patterns produces breeding calendar, often referred to as beekeeper's year (BY). As a result, the BY features specific beginning and end terms. [2]

It is desirable to treat bees with respect to their natural habitus including species characteristics, and inter-ecosystem relationships. That is why the beekeeper should always judge his interventions using a critical approach. [3]

Acoustic Emission Method

Acoustic emissions are the stress waves produced by the sudden internal stress redistribution of the materials caused by the changes in the internal structure. Possible causes of the internal-structure changes are crack initiation and growth, crack opening and closure, dislocation movement, twinning, and phase transformation in monolithic materials and fiber breakage and fiber-matrix debonding in composites. Most of the sources of AEs are damage-related; thus, the detection and monitoring of these emissions are commonly used to predict material failure. In technical

diagnostics, AE method has been used to monitor rotational part status (friction and cavitation of bearings/gears), detection of micro-cracks, pressure vessel defects, tubing system defects, aircraft structure evaluation/testing, and bridge status diagnostics. Major advantages of AE include continuous monitoring of the object, time savings, and forecast abilities of the concept. On the other hand, AE wave source is not always obvious, as the emitted energy may result from several phenomena inside of the part. Further variable factors include shape of the object, surface area, material structure, and homogeneity level. [4] .

Recently, the AE method was used to monitor activity of termites and other pests in various materials as well as biotechnological processes (e.g. beer fermentation).

METHODS AND MATERIALS

For the pilot measurement, a small-size bee-hive was chosen (designation Q04/11). The hive contained five frames with dimensions of 37 x 15 cm. Two identical sensors (designated Slot01 and Slot02, manufactured by Dakel Company) were placed in the hive: Slot01 and Slot02. This naming scheme corresponds to individual channels (slots) of the Dakel XEDO analyzer.

Figure 1: Row of small hives used in the experiment. Photo by authors



The Slot01 sensor was placed on a sheet metal plate with dimensions of 3 x 10 cm. The sensor was coupled with a 35 dB preamplifier. Contact area was treated with acoustic paste for improved acoustic coupling. The actual sensor was fixed in place using a rubber band and the entire plate was hung into the hive between the frames. To have enough space, one frame was necessary to be removed from the hive.

Figure 2: Slot01 sensor on the sheet metal plate in the hive interior. Photo by authors.



The Slot02 sensor was placed on a glass plate inserted in the inlet port of the hive. The sensor was connected to a 35 dB preamplifier. The glass plate covered the entire area of the inlet port and captured both the flight activity and cleansing/ventilation movements. The sensor was attached to the glass plate using a clamp.

Figure 3: Slot02 sensor on the glass plate in the inlet port. Photo by authors.



The signals from both sensors were pre-amplified and later processed by the Dakel XEDO AE analyzer. An Ethernet-connected laptop PC with Dakel DaeMon software was used for continuous viewing and storage of the AE data. The data from AE monitoring has been evaluated using Dakel DaeShow software to provide visual representation and statistics. The AE was monitored continuously for a week.

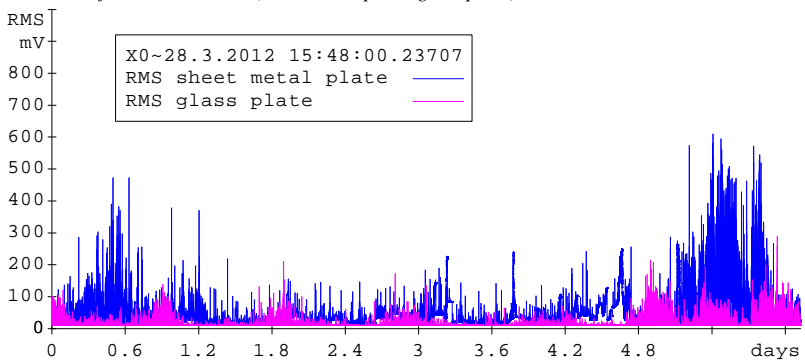
Figure 4: Dakel XEDO AE analyzer used in the experiment. Photo by authors.



RESULTS AND DISCUSSION

Start of the AE monitoring run was scheduled on the 28th of March 2012 at 3:47:59 p.m. (see Figure 5). This way, we monitor the actual activity of the bee colony at different stages of the day. The chart shows RMS of AE signal for both sensors.

Figure 5: RMS for both channels (sheet metal plate, glass plate).



It is clear that the colony activity corresponds to variable temperature. When the temperature was relatively high, there was an increased flight activity of the bees. Later, there was a rapid decrease of the temperature during the day and at night. On the 1st of April, when there was a snowfall, the bees were not leaving the hive at all with an exception of water supply-related flights. To confirm this behavior, bee activity rose stronger as the air got warmer on the following day. Thus, experiment showed a close relationship between temperature and the activity of bees.

Sheet Metal Plate Sensor

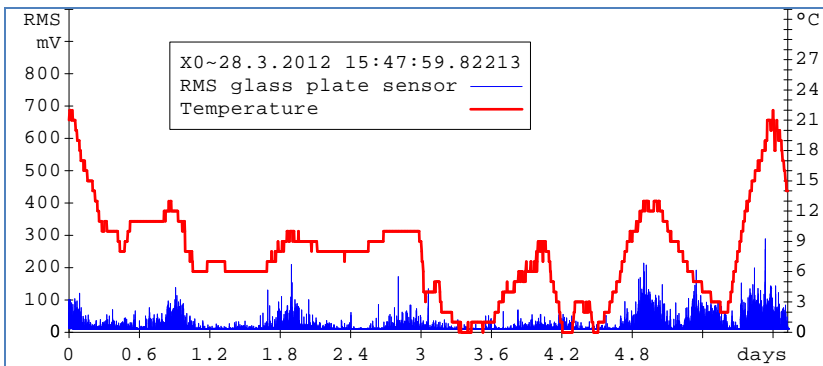
Acoustic emission sensor on the sheet plate was not affected by outside temperature (see Figure 3), because the bees in the hive were able to generate sufficient heat for their thermal comfort.

However, the sensor was influenced by its location, as it was placed on the penultimate frame where a large accumulation of bees does not usually happen. When it got cold outside, the bees stuck together and left the area where the sensor was located. In the first phase, the sensor was accepted by the bees although it was a stranger object. In later phases of the measurement, the colony concentrated into a tight formation to reduce heat losses. Thus, the overall activity decreased. As the outside temperature rose, the cluster was loosened and extended in multiple inter-frame gaps including the one with the sensor plate. The last phase of the measurement shows high activity of the colony. This was when the bee individuals filled the entire inner space of the hive space.

Glass Plate Sensor

The glass plate sensor showed live activity when there was a temperature rise. This can be explained by simple fact that bees performing tasks outside the hive were flying and landing heavily. The time frame of this activity a few hours, when there was a suitable temperature in the course of the day. Bees flew at lower temperatures as well, but many of them did not survive such hostile environment changes. Night activity probably corresponded to cleaning procedures, when the space was cleaned and dead bee corpses were pushed out of the hive space.

Figure 6: RMS and temperature curves for glass plate sensor.



CONCLUSIONS

The acoustic emission (AE) method was used to remotely monitor bee colony responsiveness to various stimuli. This method describes the measurement of online flight activity and intensity of flying bees that provide water and pollen. The method can be used with colonies located at remote sites or for the beekeepers which are too busy to perform separate inspections. The results indicate rather surprising fact: the bee activity never seized completely, not even during the night. This might be due to ongoing cleaning and/or hive ventilation effort of the bees. At the end of the measurement it can be seen that the RMS curves nearly overlap due to high temperature values (see Figure 5). The colony is actively involved in its predetermined development. Temperature seems to

be the limiting factor controlling the hive organism life cycle. High temperatures allow the colony for active cleaning, picking water and flying off the hive.

REFERENCES

- [1] VESELÝ, Vladimír. *Včelařství*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Brázda, 2003, 270 s. ISBN 80-209-0320-8.
- [2] PŘIDAL, Antonín. Včelařský rok a bioklimatické včelařské oblasti. *Vcelarskenoviny* [online]. 2005 ISSN 1214-5734. Available from www: <http://www.vcelarskenoviny.cz>
- [3] BENTZIEN, Claudia. *Ekologický chov včel: včelaření podle pravidel přírody*. Praha: Víkend, 2008, 119 s. ISBN 978-80-86891-86-6.
- [4] KREIDL, Marcel, ŠMÍD, Radislav. *Technická diagnostika*. 1. vyd. Praha : Nakladatelství BEN, 2006

Section – Applied Chemistry and Biochemistry

EFFECT OF ZINC(II) IONS ON THE EXPRESSION OF PRO- AND ANTI-APOPTOTIC FACTORS IN HIGH-GRADE PROSTATE CARCINOMA CELLS

EFEKT ZINEČNATÝCH IONTŮ NA EXPRESI PRO- A ANTI-APOPTOTICKÝCH FAKTORŮ V PROSTATICKEJCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Balvan J.¹, Holubová M.¹, Gumulec J.^{1, 3}, Sztalmachová M.^{1, 2}, Raudenská M.¹, Adam V.^{2, 3}, Kizek R.^{2, 3}, Masařík M.^{1, 2, 3}

¹Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

²Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

Email: 141792@mail.muni.cz

ABSTRACT

Several typical characteristics of prostate tissue have been identified including the ability to accumulate zinc(II). However, this feature of prostate cells is lost during carcinogenesis and, thus, prostate cells are unable to accumulate zinc(II) ions in high levels. Therefore, we can expect that zinc(II) ions can significantly contribute to the progression of tumour disease and to the ability of prostate cell lines to metastasize. In this study, we aimed our attention on determining the expression of Bcl-2, c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF-κB and p53 genes in two prostate cell lines, as the 22Rv1 cell line, a model of aggressive partially androgen-sensitive prostate cancer and the PNT1A cell line, a

normal prostate cell line model. Moreover, we were interested in the mechanisms through which exposure of these cell lines to zinc(II) ions could influence expression of the above-mentioned genes. We found that zinc(II) ions caused elevated expression of

Ki-67, a marker of proliferation, extremely low expression of p53, high expression of Bcl-2 and no changes in the expression of p53. Our experimental data show different effect of zinc(II) ions on expression of the above-mentioned regulatory genes, which may give us more information on their impact on cancer development and progression with possible using for cancer therapy.

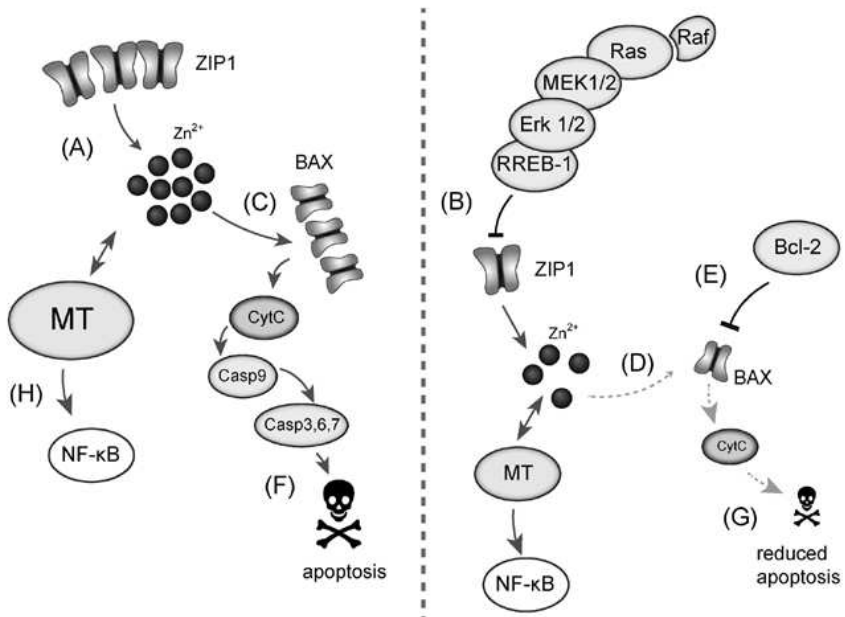
Key words: apoptosis, prostate cancer, prognostic marker, Bcl-2, p53, polymerase chain reaction, thiol group, fluorescence microscopy

Acknowledgments: Financial support from CYTORES P301/10/0356, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and LPR 2011 is greatly acknowledged.

ÚVOD

Rakovina prostaty je druhým nejčastěji diagnostikovaným rakovinným onemocněním a šestou nejčastější příčinou smrti v mužské populaci. Díky mortalitě a incidenci s ní spojenou, jsou časná diagnóza, identifikace vysoce agresivních klinicky skrytých forem a porozumění patogenезi onemocnění, i s jeho metabolickými odlišnostmi, nezbytnými faktory pro vývoj specificky zaměřené terapie. Zaměříme-li se na tyto faktory, je nutné porozumět biochemii normálních i nádorových prostatických buněk. Na základě tohoto výzkumu byly stanoveny různé typické charakteristiky prostatické tkáně, mezi něž patří i schopnost prostaty akumulovat zinečnaté ionty, viz obr. 1.

Obr. 1 Rozdíly v mechanismech zprostředkovaných zinečnatými ionty ve zdravé a v nádorové tkáni.



(A) Ve zdravé prostatické tkáni jsou přítomny vysoké hladiny Zn^{2+} v porovnání s (B) nádorovou tkáni, kde jsou zinkové transportéry ZIP1 inhibovány nadměrně stimulovanou kaskádou Ras-Raf-Mek-Erk. (C) Zinečnaté ionty zvyšují tvorbu pórů BAX v mitochondriální membráně a (F) indukují cytochromem c (CytC)/kaspázou(Casp)-zprostředkovanou apoptózu. Naopak v rakovinné

prostatické tkáni je tvorba BAX inhibována pomocí (E) Bcl-2 a (D) nízkými intracelulárními hladinami Zn^{2+} , což se projeví nižším proapoptotickým efektem (G). Odlišné hladiny Zn^{2+} ve zdravých a v nádorových buňkách interagují s metalothioneinem (MT), který rozdílně zvyšuje expresi NF- κ B.

Intracelulární koncentrace Zn^{2+} v prostatické tkáni převyšuje koncentraci detekovanou v ostatních typech buněk zhruba desetkrát. Tato vlastnost prostatických buněk se však ztrácí během karcinogeneze, a proto jsou nádorové buňky neschopné akumulace vysokých hladin Zn^{2+} . Lze proto očekávat, že zinečnaté ionty výrazně přispívají k progresi nádorového onemocnění a ke schopnosti prostatických buněčných linií metastázovat.

Početné studie na buněčných liniích i na pacientech s nádorovým onemocněním prostaty prokázaly existenci různých proteinů spojených s vznikem nádorů prostaty včetně Bcl-2. Jedná se o intracelulární protein patřící do velké skupiny proteinů rodiny Bcl-2, působí jako inhibitor apoptózy. Předchází jak apoptóze závislé na kaspázách, tak i oxidativní nekróze. Za normálních podmínek je Bcl-2 zakotven ve vnější mitochondriální membráně. Část jeho molekuly vyčnívá do cytozolu, což mu dává možnost interagovat s ostatními proteiny. Tyto interakce jsou důležité pro udržování správné funkce a integrity mitochondriální membrány. Vazbou na pro-apoptotické členy rodiny Bcl-2 předchází aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy založené na narušení propustnosti mitochondriální membrány. Zvýšená exprese onkoproteinu Bcl-2 v lidských nádorových buňkách přispívá k rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii-indukované apoptóze a je spojena s nepříznivou prognózou. Většina lidských nádorů prostaty exprimuje Bcl-2 ve zvýšené míře, což způsobuje rezistenci nádorů k chemoterapii a radioterapii. Expresce Bcl-2 je spojena s progresí nádorů, nepříznivou prognózou u pacientů s rakovinou prostaty a vývojem androgen-nezávislého karcinomu prostaty. Bcl-2 pravděpodobně interaguje i s jinými proteiny zapojenými v nádorových procesech, příkladem mohou být c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF- κ B a p53.

Tato studie je zaměřena na analýzu vlivu zinečnatých iontů na expresi genů Bcl-2, c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF- κ B a p53 v nádorové linii odvozené z primárního nádoru prostaty.

MATERIÁL A METODIKA

Buněčné linie. V této studii byly použity dvě lidské prostatické buněčné linie: a) PNT1A lidská buněčná linie vzniklá immortalizací normálních dospělých prostatických epiteliálních buněk transfekcí plazmidem obsahujícím SV40 genom s poškozeným počátkem replikace. Primární kultura byla získána z normální prostatické tkáně 35 let starého muže *post mortem*. b) 22Rv1 linie lidských buněk odvozených z primárního nádoru prostaty.

MENDELNET 2012

Kultivace buněk. Buňky PNT1A byly kultivovány v médiu RPMI-1640 doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS). Buňky 22Rv1 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 bez fenolové červeně s 10% FBS. Média byla doplněna penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (0,1 mg/ml). Buňky byly udržovány v prostředí inkubátoru o teplotě 37 °C, s vlhkostí 60% s 5% CO₂.

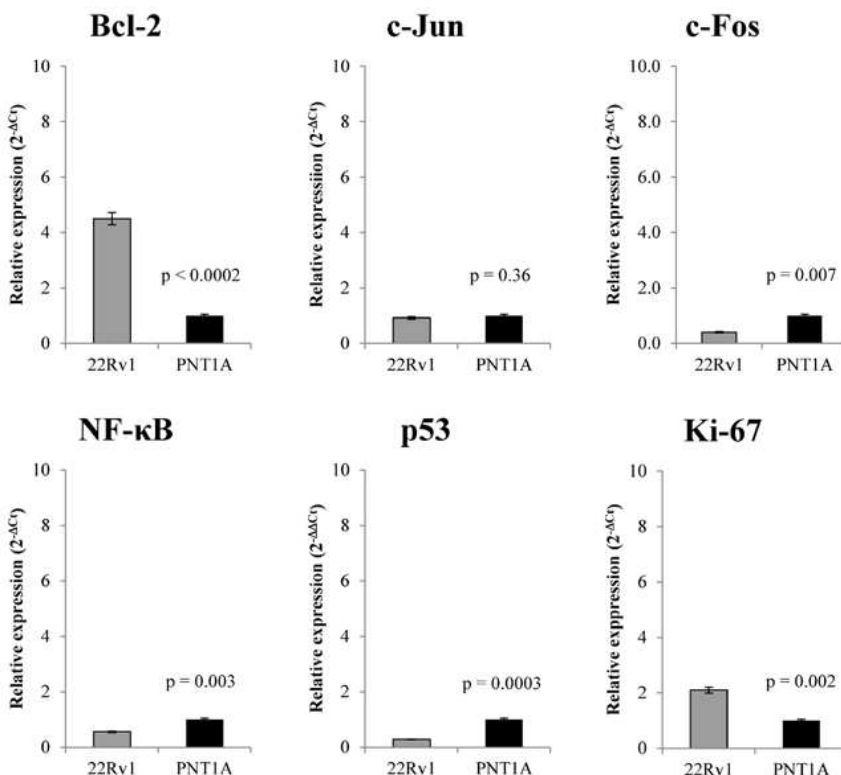
Působení Zn²⁺ na buněčné kultury. Okamžitě po dosažení 50-60% konfluency buněčného růstu byly buňky přemístěny do čerstvého média pro synchronizaci jejich růstu. Za těchto podmínek byly buňky kultivovány 24 h a následně vystaveny působení ZnSO₄ (0-100 μM pro obě buněčné linie) rozpuštěném v čerstvém médiu po dobu 48 hodin.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (*RT-PCR*). RT-PCR byla prováděna v triplikátech za použití genové expresní analýzy TaqMan s pomocí real-time PCR systému 7500 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). Amplifikovaná cDNA byla analyzována Ct srovnávací metodou za použití β-aktinu jako endogenní kontroly. Real-time PCR byla prováděna za následujících podmínek: celkový objem 20 μl, iniciační denaturace 95 °C/10 min, poté 40 cyklů 95 °C/15 s, 60 °C/1 min.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Porovnání exprese genu Bcl-2 a dalších regulačních genů po působení iontů Zn^{2+} . Zaměřili jsme se na pozorování rozdílů v úrovních exprese a změnách v transkripci genů Bcl-2, c-Fos, c-Jun, NF- κ B, Ki-67 a p53 v prostatických buněčných liniích ovlivněných působením zinečnatých iontů. Základní míra transkripce a efekt Zn^{2+} na míru transkripce vybraných genů byly monitorovány pomocí RT-PCR. Obrázek 2 ukazuje, že buňky linie 22Rv1 vykazují rozdílné trendy exprese sledovaných genů v porovnání s buněčnou linií PNT1A.

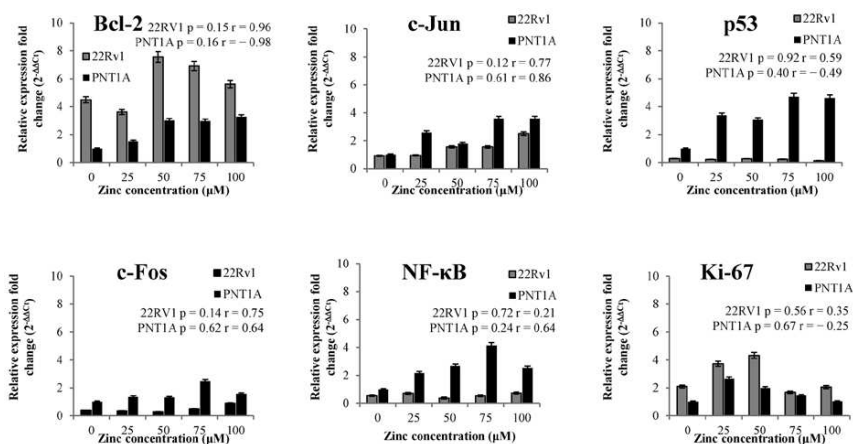
Obr. 2 Porovnání základní úrovně exprese genů c-Fos, c-Jun, NF- κ B, Ki-67 a p53 na úrovni RNA. Měření úrovně transkripce bylo prováděno pomocí RT-PCR.



Buňky 22Rv1 vykazují 4,5x vyšší úroveň exprese anti-apoptotického genu Bcl-2. V expresi genu c-Jun jsme nenašli mezi oběma liniemi výrazné rozdíly. Gen c-Fos, který společně s c-Jun formuje důležitou část transkripčního faktoru AP-1, je v buňkách 22RV1 exprimován 2,5x méně než v linii PNT1A. Ki-67, jaderný protein spojený s buněčnou proliferací, je v buňkách linie 22Rv1 přítomen ve 2x vyšší koncentraci než v buňkách linie PNT1A. Navíc NF- κ B je v buňkách 22Rv1,

v porovnání s buňkami PNT1A, přítomen v poloviční koncentraci a protein p53, klíčový regulátor apoptózy, vykazuje 3,5 násobné snížení hladiny v linii 22RV1 v porovnání s linií PNT1A. Po základní charakterizaci exprese vybraných markerů ve zkoumaných buněčných liniích jsme se zaměřili na efekt způsobený působením iontů Zn^{2+} na změny v expresi sledovaných regulačních genů (Obr. 3).

Obr. 3 Efekt působení iontů Zn^{2+} na změny v expresi genů *c-Fos*, *c-Jun*, *NF-κB*, *Ki-67* a *p53* na úrovni RNA. Buňky 22Rv1 vykazují nejen rozdílnou úroveň exprese těchto genů v porovnání s buňkami PNT1A, ale i rozdílný efekt zinečnatých iontů na úroveň transkripce v obou buněčných liniích.



Zjistili jsme, že zinečnaté ionty pozitivně ovlivňují expresi Bcl-2 v obou zkoumaných buněčných liniích, více však v linii PNT1A (3,2x zvýšení exprese v případě působení 100 μM koncentrace Zn^{2+}). U buněčné linie 22RV1 jsme po působení Zn^{2+} nezaznamenali výrazné změny exprese p53, což kontrastuje s linií PNT1A, kde došlo k 3 až 4,7 násobnému nárůstu exprese tohoto genu. Gen Ki-67 vykazuje po působení Zn^{2+} podobný trend u obou buněčných linií. Není překvapující, že buňky linie 22RV1, charakterizované vysokou proliferační rychlostí, exprimují Ki-67, účastníci se proliferačních procesů, ve vyšších hladinách. Buněčná linie PNT1A zase v porovnání s linií 22RV1 exprimovala ve vyšší míře gen c-Jun, i když zinečnaté ionty zvyšovaly expresi tohoto genu v obou liniích. V expresi genů c-Jun a c-Fos po působení Zn^{2+} nebyly zaznamenány žádné souvislosti, avšak v expresním profilu c-Fos jsme po působení Zn^{2+} pozorovali statisticky významnou pozitivní korelaci s NF-κB. Oba geny byly v linii PNT1A exprimovány ve vysokých koncentracích jak v základním expresním profilu, tak i po působení zinečnatých iontů.

ZÁVĚR

Zinek hraje roli v energetickém metabolismu, proliferaci a apoptóze buněk prostatické tkáně, můžeme tedy předpokládat, jeho důležitou roli v patogenezi rakoviny prostaty. Naše výsledky odhalily, že základní úroveň exprese anti-apoptického genu Bcl-2 je 4,5x vyšší v buňkách linie 22Rv1 než v buňkách linie PNT1A. Tento výsledek je v souladu s dříve publikovanými studiemi, ve kterých byla v nádorech prostaty zaznamenána zvýšená úroveň exprese Bcl-2. Navíc bylo toto zvýšení exprese spojováno s vývojem na androgenech nezávislého karcinomu prostaty a také s rezistencí vůči chemoterapii a radioterapii. Je zajímavé, že po působení zinečnatých iontů jsme pozorovali zvýšení exprese Bcl-2 jak v buněčné linii 22Rv1, tak i v linii PNT1A, i když v případě linie 22Rv1 bylo zvýšení exprese 7,5x vyšší než u linie PNT1A. Přestože přesný mechanismus progresu karcinomu prostaty zůstává nejasný, potvrdily naše poznatky domněnku, že vysoké koncentrace Zn^{2+} mohou přispívat k terapii rezistentních nádorů prostaty se zvýšenou expresí Bcl-2.

LITERATURA

Adam V., Fabrik I., Eckschlager T., Stiborova M., Trnkova L., Kizek R. (2010): Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TRAC-Trends Anal. Chem.*, 29(5): 409-418.

Babula P., Kohoutkova V., Opatrilova R., Dankova I., Masarik M., Kizek R. (2010): Pharmaceutical importance of zinc and metallothionein in cell signalling. *Chim. Oggi-Chem. Today*, 28(6): 18-21.

Bohuslav J., Chen L. F., Kwon H., Mu Y. J., Greene W. C. (2004): p53 induces NF-kappa B activation by an I kappa B kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.*, 279(25): 26115-26125.

Bragado P., Armesilla A., Silva A., Porras A. (2007): Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*, 12(9): 1733-1742.

Costello L. C., Franklin R. B. (2000): The intermediary metabolism of the prostate: A key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, 59(4): 269-282.

Costello L. C., Franklin R. B. (2011): Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16(1): 3-8.

Costello L. C., Liu Y. Y., Franklin R. B., Kennedy M. C. (1997): Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 272(46): 28875-28881.

Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 10(4): 360-375.

Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. (2011): Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr. Med. Chem.*, 18(33): 5041-5051.

Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl. Med. J.-Bratisl. Lek. Listy*, 110(2): 93-97.

Krizkova S., Masarik M., Eckschlager T., Adam V., Kizek R. (2010): Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1217(51): 7966-7971.

Krizkova S., Ryvolova M., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Majzlik P., Hubalek J., Provaznik I., Kizek R. (2011): Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis*, 32(15): 1952-1961.

Masarik M., Gumulec J., Sztalmachova M., Hlavna M., Babula P., Krizkova S., Ryvolova M., Jurajda M., Sochor J., Adam V., Kizek R. (2011): Isolation of metallothionein from cells derived from aggressive form of high-grade prostate carcinoma using paramagnetic antibody-modified microbeads off-line coupled with electrochemical and electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 32(24): 3576–3588.

Scott S. L., Higdon R., Beckett L., Shi X. B., White R. W. D., Earle J. D., Gumerlock P. H. (2002): BCL2 antisense reduces prostate cancer cell survival following irradiation. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 17(6): 647-656.

Zaichick V. Y., Sviridova T. V., Zaichick S. V. (1997): Zinc in human prostate gland: Normal, hyperplastic and cancerous. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 217(2): 157-161.

ASSAY OF NATURAL ANTIOXIDANTS POTENCY USING PIPETING ROBOT AND SPEKTROFOTOMETRY

STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ AUTOMATICKÉHO ROBOTY A SPEKTROFOTOMETRU

Dobeš J.¹, Sochor J.¹, Ruttkay-Nedecký B.¹, Adam V.¹, Kizek R.^{1,2}, Klejdus B.¹

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: sochor.jirik@seznam.cz

ABSTRACT

This work deals with the comparing antioxidant activity standards gallic acid, ferulic acid, quercitrin and rutin with oxidative status model cell lines. The assay was carried out by methods DPPH', ABTS', DMPD', FRAP' and free radicals. Antioxidant activity was determined individual standards in relation to time, concentration and temperature, compared the characteristics of each set of radicals and their antioxidant capacity. We decided to introduce fully automated assay of antioxidants using not only automated sample measurement but also processing of samples and application of reagents. Automated pipetting system epMotion 5075 and the automated spectrophotometer BS 400 were chosen for the assay purposes. All of the tested methods were found suitable for implementation in the automated assay. Owing to the capacity of the method, approximately 240 samples per hour (one sample per 15 seconds) can be assayed using the automated protocol.

Key words: antioxidant activity, antioxidant, oxidative stress, automatization

Acknowledgments: This work was supported by project „Postdoc CZ.1.07/2.3.00/30.0017“ and SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

ÚVOD

Udržování vnitřních podmínek v organismu je prvořadým úkolem biochemických procesů. Fyziologickou funkcí antioxidantů je rovnováha mezi výrobou reaktivního kyslíku a dusíku. Když jsou antioxidanty v nedostatku, dochází k oxidačnímu stresu. Mnohé patologické procesy jsou důsledkem produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů, např. Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, nebo se účastní patologických procesů, kde má oxidační stres klíčovou úlohu. Podávání antioxidantů je považováno za způsob jak zabránit patologickým důsledkům oxidačního stresu. Zejména rostlinné extrakty jsou vhodné a snadno dostupné produkty pro prevenci patologických jevů (Bouayed, a kol., 2011, Esmaili a Sonboli, 2010, Kaviarasan, a kol., 2007, Kuo, a kol., 2009, Re, a kol., 1999, Reckziegel, a kol., 2011, Uysal, a kol., 1989). Výzkum antioxidační aktivity není stále standardizovaný a výsledky tak mohou být ovlivněny v důsledku metodické chyby nebo i lidským faktorem (Mariod, a kol., 2010, Müller, a kol., 2011, Parejo, a kol., 2000, Stiborová, a kol., 2011). Implementace standardních protokolů s automatizovaným postupem stanovení je vhodná nejen pro zjednodušení a úsporu nákladů, ale je rovněž nezbytná pro snížení testu nejistoty. Tento experiment je zaměřen na plně automatizovaný postup, vhodný pro rychlé a spolehlivé stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v biologických vzorcích. Využívá plně automatizované manipulace se vzorky a činidly za účelem získání výsledků s eliminací lidských chyb a s úsporou nákladů.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Deionizovaná voda, rutin, kvercetin, kyselina ferulová a gallová, 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxid (DMSO), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS), peroxidisíran draselný, 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ), kyselina chlorovodíková, hexahydrát chloridu železitého, trihydrát octanu sodného, N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen (DMPD), kyselina octová. Chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Reakční pufr, koncentrát, chlorofylin a jeho katalyzátor byly zakoupeny od SEDIUM R & D (Česká republika).

Standardy

Byly použity standardy rutinu, kvercetin, kyseliny ferulové a gallové v koncentracích 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 a 1000 mg/ml. Standardní kalibrační roztoky byly vytvořeny automatizovaným ředěním roztoků 1000, 100 a 10 mg/ml pomocí deionizované vody.

Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Principem DPPH testu je schopnost stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH• vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem (R•) roztok odbarví dle následující reakce: $\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH H} + \text{A}\cdot$, $\text{DPPH}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{DPPH-R}$.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagentie R1 (0,095 mM 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl-DPPH•), následně bylo přidáno 15 μl měřeného vzorku. DPPH• test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH• vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 505 \text{ nm}$.

Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

ABTS metoda je jedním z nejvíce používaných testů na stanovení koncentrace volných radikálů. Princip stanovení je založen na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jedno elektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS• (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS• – e- ABTS•+. Tato reakce je monitorována spektrofotometricky, měří se změna absorbance.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagentie R1 (7 mM ABTS• (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina a 4,95 mM peroxodisíran draselný), následně bylo přidáno 3 μl vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda = 660 \text{ nm}$ po dobu 12 minut.

Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukcí železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl_3), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukcí tvoří modře zbarvený železnatý komplex. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3.6) a nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly.

Příprava reagentie: 1. 10 mM roztok TPTZ, doplnit po rysku 40 mM kyselinou chlorovodíkovou (HCl); 2. roztok 20 mM FeCl_3 ; 3. acetátový pufr 20 mM, pH 3,6; tyto tři roztoky se smíchají v poměru TPTZ: FeCl_3 : acetátový pufr – 1:1:10. Reagentie je použitelná týden při uskladnění v temném prostředí a teplotě 4 °C. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagentie a následně bylo přidáno 3 μl vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 605 \text{ nm}$.

Stanovení antioxidační aktivity metodou DMPD

Sloučenina DMPD (N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen) je působením železité soli v roztoku převedena na relativně stabilní a barevnou radikálovou formu DMPD•+. Sloučeniny s antioxidační aktivitou jsou schopny DMPD•+ radikály zhaset a tím dochází k odbarvení roztoku a poklesu absorbance.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 160 μ l reagenie R1 (200 mM N, N-dimethyl-p-fenyldiamin-DMPD, 0,05 M FeCl₃, 0,1 M acetátový pufr pH 5,25), následně bylo přidáno 4 μ l měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 505$ nm.

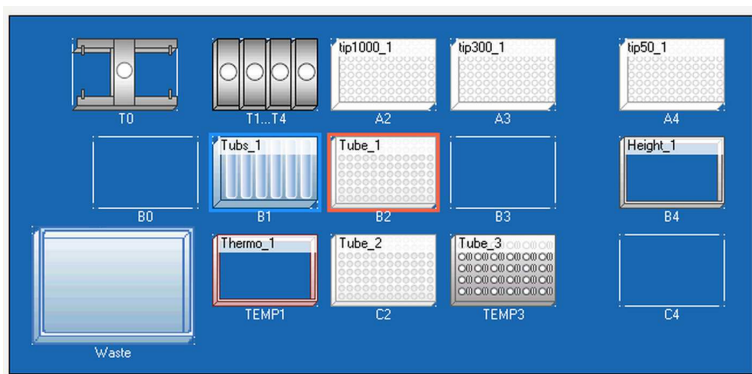
Stanovení antioxidační aktivity metodou Free radicals

U této metody je využíváno schopnosti chlorofylinu (sodno-mědnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento děj je podmíněn alkalickým prostředím a přidávkem katalyzátoru. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μ l reagenie R1 (0,1 M HCl, extrakt chlorofylinu, reakční pufr, katalyzátor) a následně bylo přidáno 6 μ l vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 450$ nm

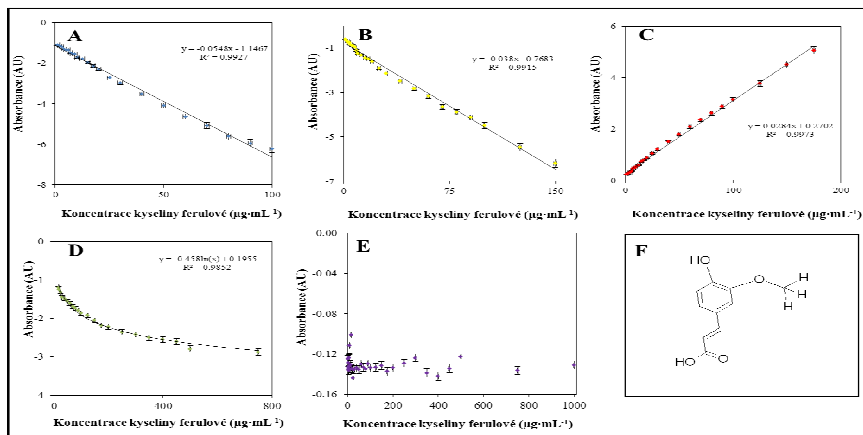
VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro testovací účely bylo použito pět metod popsáných v experimentální části. Byl vybrán rutin, kvercetin, kyselina ferulová a gallová pro automatizované stanovení antioxidační aktivity. Nejprve byla testována kyselina ferulová (obr. 2). Závislost absorbance na koncentraci kyseliny ferulové byla měřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR (obr. 2 A, B, C, D a E). Kyselina ferulová je znázorněna na obr. 2 F. Stejně výsledky byly získány pro kvercetin (obr. 3), rutin (obr. 4) a kyselinu gallovou (obr. 5). Kalibrační křivky jednotlivých metod jsou uvedeny na obr. 2 až 5. Byly nalezeny koeficienty stanovení v rozmezí 0,9927 až 0,9992 pro metodu DPPH, 0,9915 až 0,9982 pro metodu ABTS, 0,9973 až 0,9996 pro metodu FRAP, 0,9852 až 0,9982 pro metodu DMPD a 0,9991 až 0,9996 pro metodu FR.

Obr.1: Automatický pipetovací stroj epMotion 5075. Pohled z přední části.

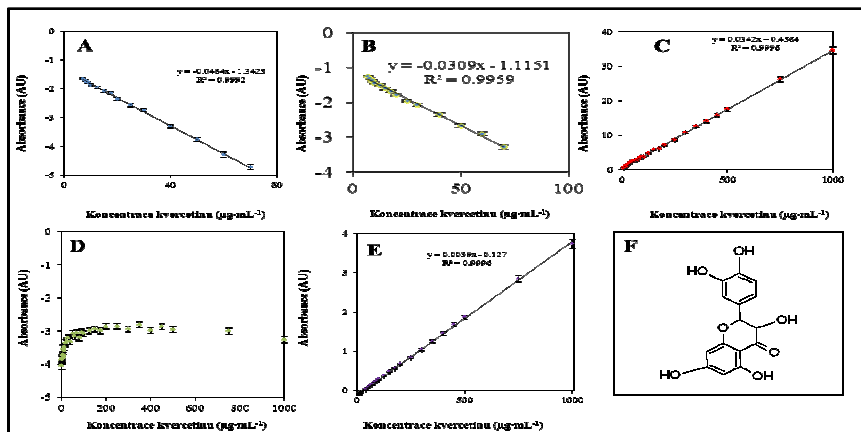


Obr. 2: Stanovení obsahu kyseliny ferulové pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B) FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kyseliny ferulové (F).



Závislost absorbance na koncentraci kyseliny ferulové byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9927 pro metodu DPPH, 0,9915 pro metodu ABTS, 0,9973 pro metodu FRAP, 0,9852 pro metodu DMPD. Metodou FR se kyselinu ferulovou změřit nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

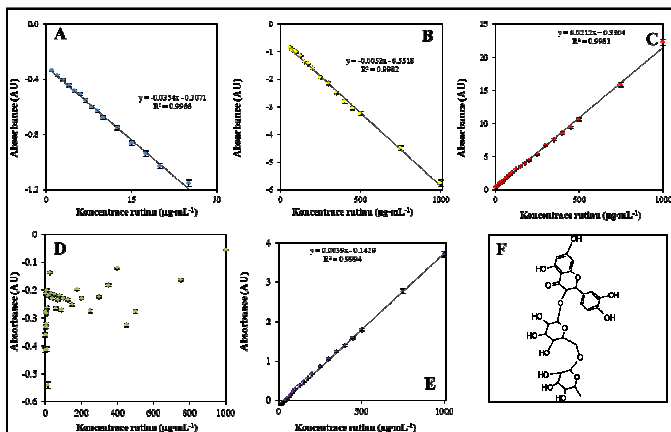
Obr. 3: Stanovení kvercetinů pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kvercetinů (F).



Závislost absorbance na koncentraci kvercetinů byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9992 pro metodu DPPH, 0,9959 pro metodu

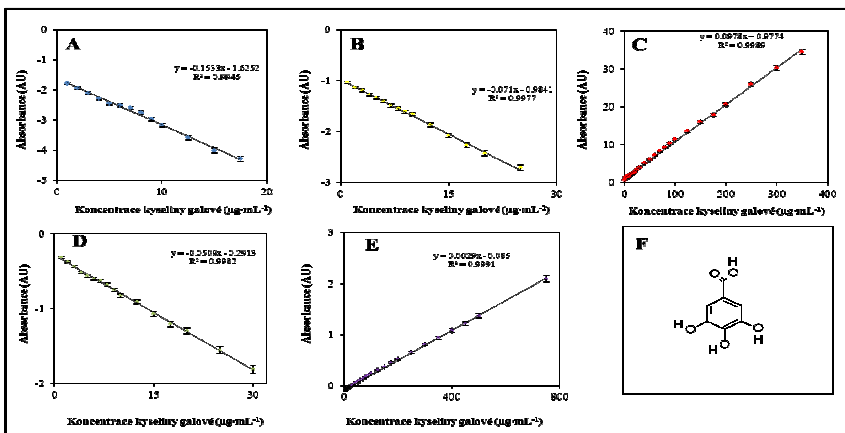
ABTS, 0,9996 pro metodu FRAP, 0,9852 pro metodu DMPD a pro metodu FR 0,9991. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

Obr. 4: Obsah rutinu pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura rutinu (F).



Závislost absorbance na koncentraci rutinu byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9966 pro metodu DPPH, 0,9982 pro metodu ABTS, 0,9983 pro metodu FRAP a pro metodu FR 0,9994. Metodou DMPD se měření nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FR.

Obr. 5: Stanovení kyseliny gallové pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kyseliny gallové (F).



Závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9945 pro metodu DPPH, 0,9970 pro metodu ABTS, 0,9989 pro metodu FRAP a pro metodu FR 0,9852. Metodou DMPD se měření nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

Automatizace a robotizace preanalytické fáze přináší pro laboratoř řadu výhod. Dochází ke snížení počtu chyb, zkrácení časové odezvy, zvýšení produktivity práce a s tím spojené finanční úspore a omezení styku personálu s biologickým materiálem (Sochor, a kol., 2010). Technický rozvoj způsobuje tendenci nárůstu počtu analýz a zrychlení analytického procesu. Díky automatizaci se snižuje riziko záměny vzorků, celý proces je mnohem rychlejší, je snížena spotřeba reagensů, personální úspora (Pohanka, a kol., 2012, Sochor, a kol., 2010).

ZÁVĚR

Byly vyvinuty automatizovaná metody pro rychlé a spolehlivé stanovení antioxidantů. Tyto metody byly shledány jako vhodné pro stanovení oxidační aktivity v biologických vzorcích. Jako nejvhodnější pro automatizované stanovení se jevila metoda FRAP. Největší lineární rozsah měla metoda FRAP a FR, a to až 1 g/l. Lineární rozsah metody DPPH byl 100 mg/ml pro kyselinu ferulovou a 20 mg/ml pro kyselinu gallovou. U stanovení rutinu metodou DMPD a stanovení kyseliny ferulové metodou FR nebylo stanovení přesné z důvodu jejich nízké afinity k radikálům DMPD a FR.

LITERATURA

- Bouayed J., Hoffmann L., Bohn T. (2011): Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1): 14-21.
- Esmaili M. A., Sonboli A. (2010): Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3): 846-853.
- Kaviarasan S., Naik G. H., Gangabhairathi R., Anuradha C. V., Priyadarsini K. I. (2007): In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103(1): 31-37.
- Kuo W.-W., Huang C.-Y., Chung J.-G., Yang S.-F., Tsai K.-L., Chiu T.-H., Lee S.-D., Ou H.-C. (2009): Crude extracts of *Solanum lyratum* protect endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. *Journal of Vascular Surgery*, 50(4): 849-860.
- Mariod A. A., Ibrahim R. M., Ismail M., Ismail N. (2010): Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118(1): 120-127.

Müller L., Fröhlich K., Böhm V. (2011): Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1): 139-148.

Parejo I., Codina C., Petrakis C., Kefalas P. (2000): Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(3): 507-512.

Pohanka M., Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Cernei N., Adam V., Hubalek J., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R. (2012): Automated assay of the potency of natural antioxidants using pipetting robot and spectrophotometry. *Journal of Applied Biomedicine*, 10(3): 155-167.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.

Reckziegel P., Bouffleur N., Barcelos R. C. S., Benvegnú D. M., Pase C. S., Muller L. G., Teixeira A. M., Zanella R., Prado A. C. P., Fett R., Block J. M., Burger M. E. (2011): Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6): 1770-1778.

Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R. (2010): Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*, 15(12): 8618-8640.

Sochor J., Salas P., Zehnalek J., Krska B., Adam V., Havel L., Kizek R. (2010): An assay for spectrometric determination of antioxidant activity of a biological extract. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 126(11): 416-417.

Stiborová M., Rupertová M., Frei E. (2011): Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(1): 175-185.

Uysal M., Kutalp G., Özdemirler G., Aykaç G. (1989): Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. *Drug and Alcohol Dependence*, 23(3): 227-230.

AUTOMATED ZINC PROTEINS EXTRACTION FROM PROSTATIC CANCER CELLS USING MAGNETIC PARTICLES

AUTOMATIZOVANÁ EXTRAKCE ZINKOVÝCH PROTEINŮ Z PROSTATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK ZA POUŽITÍ MAGNETIZOVATELNÝCH ČÁSTIC

Dostálová S.¹, Jílková E.¹, Křížková S.^{1, 3}, Masařík M.^{1, 2}, Šmerková K.¹, Hýnek D.^{1, 3}, Ruttkay-Nedecký B.^{1, 3}, Krejčová L.¹, Adam V.^{1, 3}, Kizek R.^{1, 3}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Prostate cancer is a huge problem in modern world, mainly in the developed countries. It is important to diagnose this disease as soon as possible due to its high mortality. Prostate tissue has a unique ability to accumulate zinc ions. However cancer prostate tissue loses this ability. It is therefore possible to help the diagnosis of the prostate cancer via the isolation of zinc proteins contained in prostatic tissue. This isolation can be carried out using magnetic particles modified with anti-Zn^{II}-antibodies.

Our objective was to create a procedure for isolation of zinc proteins from prostatic cells using magnetic particles and automated pipetting station. Cell lines PNT1A and LNCaP were used for experiments. Cell line PNT1A represents healthy prostate tissue, line LNCaP represent cancer tissue. There was decreasing level (10%) of Zn^{II} ions observed in the cancer prostatic cell lines for the 25 and 50 μM concentrations of zinc.

Key words: electrochemistry, magnetic particles, prostate cancer, Zn^{II}

Acknowledgments: Support from IGA TP6/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Magnetizovatelné částice (MPs) jsou struktury o rozměrech řádově nanometrů až několika mikrometrů, které mají paramagnetické nebo superparamagnetické vlastnosti. To umožňuje částicím změnu chování v závislosti na aplikaci vnějšího magnetického pole (Hsing, a kol., 2007). Je tak možné je snadno shlukovat nebo rozptylovat v nějakém roztoku. Částice jsou většinou vyrobeny z kompozitních materiálů, složených z feromagnetické nebo ferimagnetické a diamagnetické složky. Feromagnetická nebo ferimagnetická složka je nutná pro interakci s vnějším magnetickým polem a diamagnetická složka zajišťuje specifickou interakci s analytem (Safarik a Safarikova, 2009).

Povrch částic je také možné modifikovat širokou škálou specifických látek a mohou tak sloužit jako vhodný nástroj pro specifickou izolaci různých látek (Hsing, a kol., 2007), pro cílený transport genů (Scherer, a kol., 2002) nebo léčiv, opravu tkání, detoxikaci biologických tekutin (Gupta a Gupta, 2005) nebo zobrazování pomocí nukleární magnetické rezonance (Yezhelyev, a kol., 2006). Neprovádí se jen modifikace částic pro jejich specifickou afinitu, ale také pro stabilizaci částic *in vivo* a *in vitro* (Gupta a Gupta, 2005). Pro separaci látek jsou částice velmi vhodné, a to vzhledem ke svým unikátním magnetickým vlastnostem, nízké ceně syntézy, snadnému postupu izolace, eliminaci nespecifické adsorpce biomolekul, zkrácení času izolace a možnosti miniaturizace a automatizace (Hsing, a kol., 2007, Huska, a kol., 2011).

Pomocí magnetizovatelných částic je možné izolovat nukleové kyseliny (Broutian, a kol., 2011), proteiny a peptidy (Safarik a Safarikova, 2004) nebo celé buňky (Dincman, a kol., 2012). Pro izolaci proteinů je možné provést imunomagnetickou separaci, kdy jsou protilátky proti těmto proteinům navázány na povrch částic (Tu, a kol., 2011). Tuto vazbu je možné provést několika způsoby. Jeden z nich je modifikovat povrch částic tosylací, kdy se protilátky na povrch částic vážou na základě kovalentní vazby, pokud obsahují thiolovou nebo aminoskupinu (Krizkova, a kol., 2012, Rastogi, a kol., 2009). Další možností je modifikace povrchu částic streptavidinem, kdy je ale nutná biotinylace protilátek (Tu, a kol., 2011).

MATERIÁL A METODIKA

Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (USA).

Modifikace magnetizovatelných částic

Slepíčí protilátky byly připraveny na zakázku firmou HENA, s. r. o. (Česká republika) tak, že dvě slepice byly imunizovány Zn-KLH komplexem a IgY frakce, která je k tomuto komplexu reaktivní

byla získána z vaječného žloutku. Protilátky byly stabilizovány v 0,1% azidu sodném ve fosfátovém pufru (PBS), přičemž koncentrace proteinu byla 39,6 mg/ml v imunoglobulinové frakci.

Pro kovalentní imobilizaci protilátek byly použity superparamagnetické polystyrenové částice Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated od firmy Invitrogen (Norsko), jejichž povrch je modifikován polyurethanovou vrstvou. S použitím filtrů Amicon Ultra 0,5 s membránou 50 K od firmy Millipore (USA) byl odstraněn azid sodný a protilátky byly pomocí HCl okyseleny na pH 2,5. Po 15 minutách pak byl k protilátkám přidán fosfátový pufr (PBS). Imobilizační protokol byl podle (Krizkova, a kol., 2012), pro imobilizaci byl použit 1 mg protilátek na 25 mg částic. Imobilizace probíhala v celkovém objemu 625 µl v 0,1 M borátovém pufru (pH 9,5) a 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 24 hodin za mírné rotace (30 rpm; 90°) pomocí Multi RS-60 od firmy Biosan (Lotyšsko). Poté byl 0,5% hovězím sérovým albuminem (BSA) v PBS s 0,05% Tween-20 blokováno volný povrch částic po dobu 10 hodin. Následně byly částice třikrát promyty v 1 ml 0,1% BSA v PBS s 0,05% Tween-20 a resuspendovány v 625 µl promývacího pufru s 0,02 % azidem sodným.

Kultivace a lýza prostatických buněk

Buněčné linie LNCaP a PNT1A byly zakoupeny od firmy HPA (Velká Británie). Linie LNCaP jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastázy v levé supraklavikulární uzlině a linie PNT1A je srovnávacím případem zdravé prostatické tkáně. Linie LNCaP byla kultivována v inkubátoru při 37 °C (5% CO₂) v HAM F12 médiu s přidavkem 7% fetálního bovinního séra (FBS), linie PNT1A v médiu RPMI-1640 s přidavkem 10% FBS za stejných podmínek jako předchozí linie. Do médií byla vždy přidána antibiotika penicilin (o koncentraci 100 U/ml) a streptomycin (o koncentraci 0,1 mg/ml). Buněčné linie byly následně obohaceny zinkem (Zn^{II}), jehož koncentrace byly na základě výsledků MTT testu zvoleny jako 0, 25 a 50 µM.

Buňky byly vždy dvakrát promyty 5 ml PBS (zchlazen na 0 °C). Poté byly zality PBS, setřeny kličkou, suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována 7 minut při 27000 ot./min a 4 °C. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v PBS a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Následovala znovu centrifugace, odsátí supernatantu a resuspendování v 1 ml PBS. Suspenze byla přepipetována do mikrozkušavky a znovu centrifugována. Lýza se prováděla tepelnou denaturací, sonikací a podle Wisniewského (Wisniewski, a kol., 2009). V případě tepelné denaturace bylo k buňkám přidáno 75 µl PBS a lyzovaly se 3 minuty při 20 °C. Poté bylo přidáno 125 µl PBS a lýza probíhala na přístroji Thermomixer comfort od firmy Eppendorf (Německo) 15 minut při 99 °C. Následuje centrifugace 30 minut při 14 000 ot./min a 4 °C a lýzát byl odsát do čisté mikrozkušavky.

Imunoextrakce zinkových proteinů

Pro izolaci Zn^{II} proteinů byly použity magnetizovatelné částice Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated od firmy Invitrogen (Norsko) s navázanou slepičí protilátkou podle výše uvedeného postupu. V této práci byl vyvinut postup této imunoextrakce. Pro jeho zautomatizování byla použita automatická pipetovací stanice epMotion 5075 od firmy Eppendorf (Německo), kde byly

experimenty vykonány v destičkách Deepwell plate 96/1200 μ l Protein LoBind, jejichž povrch je upraven pro snížení navázání proteinů na něj. Magnetický stojánek byl pořízen od firmy Promega.

Elektrochemické měření zinku

Stanovení množství volných zinečnatých iontů ve vzorku bylo provedeno metodou diferenční pulzní voltametrie na analyzátoru Autosampler 813 Compact (Metrohm, Švýcarsko) propojeném s VA Stand 797 (Metrohm, Švýcarsko). Pro měření bylo použito standardní tříelektrodové zapojení, kdy pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), referenční argentchloridová a pomocná byla platinová elektroda. Parametry měření: počáteční potenciál -1,5 V; konečný potenciál 0,75 V; krok 5,035 mV; doba kroku 0,3 s; depozice 360 s; probublávání argonem 90 s; pulzní amplituda 0,025 V; impulzní čas 0,04 s; objem vstříkovaného vzorku 100 μ l, cela o celkovém objemu 2 ml byla doplněna 1900 μ l acetátového pufru.

Pro stanovení množství vázaných zinečnatých iontů bylo potřeba vzorek nejdříve zmineralizovat pomocí mikrovlnného systému Multiwave 3000 od firmy Anton-Paar GmbH (Rakousko). 15 μ l vzorku, 350 μ l koncentrované kyseliny dusičné a 150 μ l H₂O₂ bylo napipetováno do lahvičky MG5. Vzorek byl uzavřen a umístěn do rotoru 64MG5 po dobu 50 minut s následujícím programem: 10 minut 50 W, 30 minut 100 W a 10 minut 0 W. Vázané zinečnaté ionty byly poté stanoveny stejnou metodou jako volné.

Elektroforetická separace zinkových proteinů

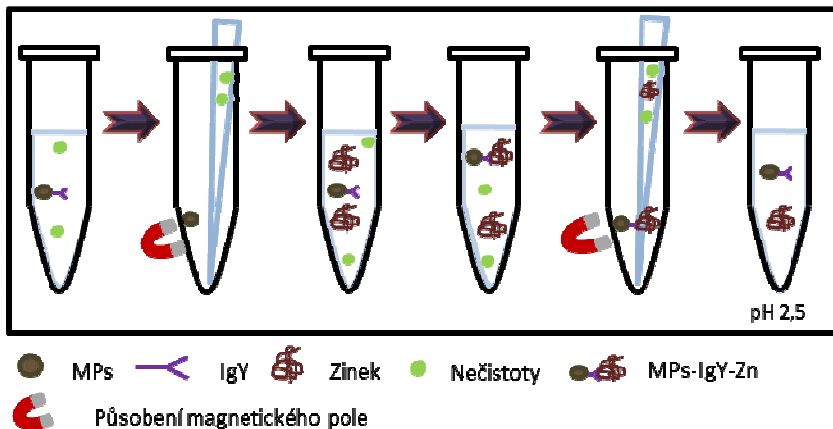
Kromě elektrochemické detekce, byly izolované proteiny detekovány také pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Ta byla provedena na přístroji Mini Protean Tetra od firmy Biorad (USA) a gel měl rozměry 8,3 \times 7,3 cm. Dělicí pufr byl 15%, zaostřovací gel byl 5%. Gely byly vyrobeny z 30% akrylamidu a 1% bisakrylamidu. Polymerace gelů probíhala 45 minut při 20 °C v případě dělicího gelu a 30 minut při 20 °C u zaostřovacího gelu. Vzorky byly vždy smíchány s nanášecím pufrem v poměru 2:1 a inkubovány 3 minuty při 93 °C. Pro stanovení molekulové hmotnosti byl použit standard Precision plus protein standards od firmy Biorad (USA). Samotná elektroforéza probíhala za následujících podmínek: 1 hodina, 150 V, 23 °C na přístroji PowerBasic od firmy Biorad (USA) v Tris (2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) – glycinovém separačním pufru (0,025M Trizma base; 0,19M glycin; 3,5 mM SDS pH 8,3). Barvení probíhalo barvivem coomassie blue a stříbrem.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo navrhnout metodu izolace zinkových proteinů z reálných vzorků prostatických buněk. Nejdříve je do každé jamky nebo mikrozkušavky napipetováno 10 μ l magnetizovatelných částic s navázanou slepičí protilátkou proti zinkovým proteinům. Poté je potřeba částice promýt pro odstranění kontaminantů, je k nim tedy přidáno 300 μ l PBS pH 7,5, částice jsou v něm resuspendovány, destička nebo mikrozkušavka je umístěna na magnetický stojánek a promývací roztok je odstraněn. Toto promytí částic se poté ještě 2 \times opakuje. Následně se přidá 150 μ l buněčného lyzátu a imobilizace probíhá 30 minut při 20 °C, přičemž jsou částice se vzorkem vždy po 15 minutách promíchány pipetou. Destička nebo zkušavka se poté opět přemísť

na magnetický stojánek, přebytečný roztok je odstraněn a částice s navázanými zinkovými proteiny jsou promyty 500 μ l PBS pH 7,5. Eluce proteinů poté probíhá 35 minut do 30 μ l 0,1 M citrátu pH 2,5 a vždy po 5 minutách je vzorek promíchán. Schéma postupu je možné vidět na Obr. 1.

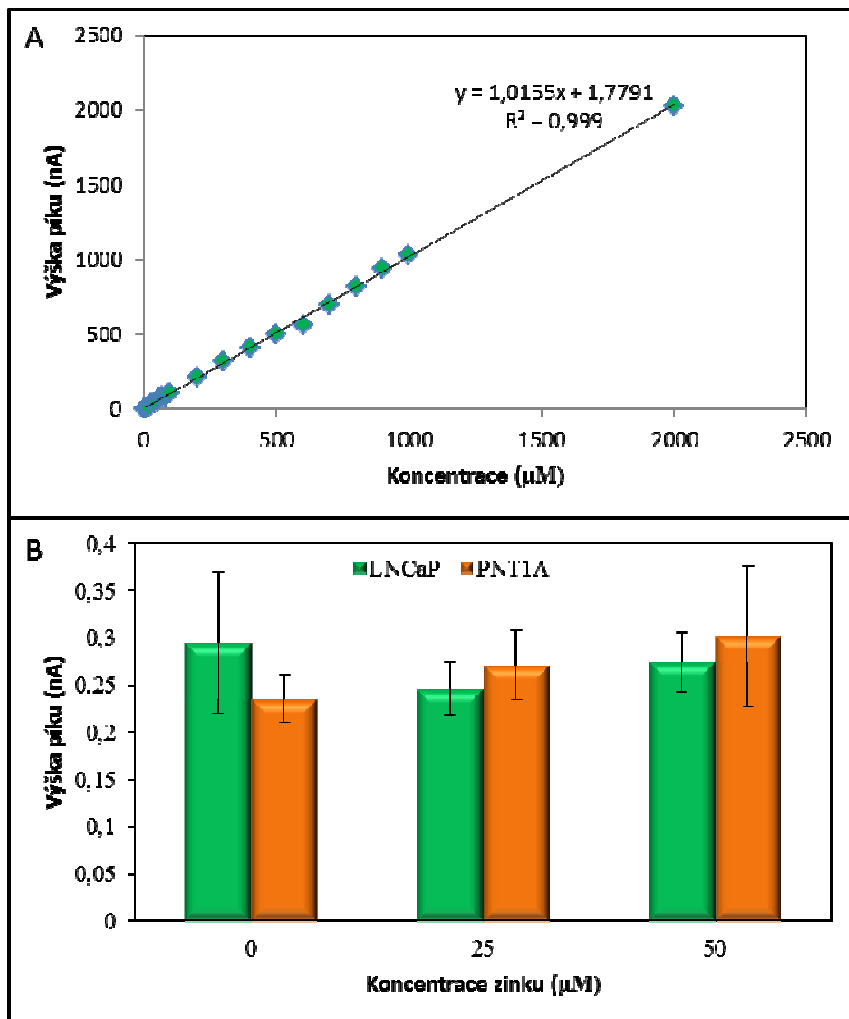
Obrázek 1 Schéma izolace zinkových proteinů pomocí magnetizovatelných částic.



Pro elektrochemická měření byla vytvořena lineární kalibrační závislost naměřené výšky píku na koncentraci Zn^{II} ve vzorku (Obr. 2A). Podle rovnice regrese zjištěné z této kalibrační křivky byly následně vypočteny koncentrace Zn^{II} v reálných vzorcích podle výšky naměřeného píku.

Z naměřených výsledků (Obr. 2B) je patrné, že je rozdíl mezi množstvím izolovaných zinkových proteinů mezi jednotlivými liniemi. Zatímco při koncentraci Zn^{II} 0 μ M byl obsah zinku v nádorové linii LNCaP o 20 % vyšší, než u kontrolní linie PNT1A, u koncentrací 25 a 50 μ M byl obsah Zn^{II} v kontrolní linii o 10 % vyšší ve srovnání s nádorovou linií LNCaP.

Obrázek 2 A) Kalibrační křivka zinku; B) Obsah Zn^{II} v lyzátu u nádorové a kontrolní linie karcinomu prostaty.



ZÁVĚR

Magnetizovatelné částice mohou sloužit jako nástroj pro izolaci velké řady specifických látek díky svým unikátním vlastnostem a možnostem modifikace jejich povrchu, automatizace a miniaturizace. Jako možnost aplikace pro širokou veřejnost se jeví využití těchto částic při studiu exprese zinkových proteinů v buněčných liniích karcinomu prostaty. Prostatická tkáň má totiž zvýšenou schopnost akumulace zinečnatých iontů, ale v případě rakovinného onemocnění tuto schopnost ztrácí.

Částice je možné modifikovat protilátkami proti zinku, izolovat tak zinkové proteiny z prostatické tkáně a porovnáním se zdravými prostatickými buňkami studovat rozdíly v expresi zinkových proteinů mezi zdravou a nádorovou tkání.

V práci byla vyvinuta rychlá metoda pro izolaci zinkových proteinů z prostatických buněk využívající magnetizovatelné částice, na které jsou navázány protilátky proti zinku. Tato metoda byla implementována na automatickou pipetovací stanici epMotion 5075 pro eliminaci chyb vzniklých lidským faktorem.

LITERATURA

Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. (2006): Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1): 196-201.

Broutian T. R., He X., Gillison M. L. (2011): Automated high throughput DNA isolation for detection of human papillomavirus in oral rinse samples. *Journal of Clinical Virology*, 50(4): 270-275.

Costello L. C., Franklin R. B. (2000): The intermediary metabolism of the prostate: A key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, 59(4): 269-282.

Dincman T. A., Beare J. E., Ohri S. S., Whittemore S. R. (2012): Isolation of cortical mouse oligodendrocyte precursor cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 209(1): 219-226.

Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. (2011): Insight to Physiology and Pathology of Zinc(II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry*, 18(33): 5041-5051.

Gupta A. K., Gupta M. (2005): Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18): 3995-4021.

Habib F. K. (1980): Evaluation of androgen metabolism studies in human-prostate cancer-correlation with zinc levels. *Preventive Medicine*, 9(5): 650-656.

Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T. (2007): Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, 19(7-8): 755-768.

Huska D., Adam V., Babula P., Trnkova L., Hubalek J., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. (2011): Microfluidic robotic device coupled with electrochemical sensor field for handling of paramagnetic micro-particles as a tool for determination of plant mRNA. *Microchim. Acta*, 173(1-2): 189-197.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y. P., Xu J. Q., Murray T., Thun M. J. (2008): Cancer statistics, 2008. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 58(2): 71-96.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y. P., Xu J. Q., Thun M. J. (2009): Cancer Statistics, 2009. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 59(4): 225-249.

Jemal A., Siegel R., Xu J. Q., Ward E. (2010): Cancer Statistics, 2010. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 60(5): 277-300.

Jep Č. Č. Ceska republika a rakovina v cislech: Ceska onkologicka spolecnost Ceske lekarske spolecnosti Jana Evangelisty Purkyne, 2011.

Krizkova S., Jilkova E., Krejцова L., Cernei N., Hynek D., Ruttkay-Nedecky B., Sochor J., Kynicky J., Adam V., Kizek R. (2012): An assay for isolation of zinc(II)-containing bacterial proteins using microfluidic coupled with paramagnetic particles. *Electrophoresis*, in press(

Krizkova S., Ryvolova M., Hynek D., Eckschlagler T., Hodek P., Masarik M., Adam V., Kizek R. (2012): Immunoextraction of zinc proteins from human plasma using chicken yolk antibodies immobilized onto paramagnetic particles and their electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 33(12): 1824-1832.

Maret W., Li Y. (2009): Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 109(10): 4682-4707.

Rastogi S. K., Gibbon S., Branan J. R., Branan A. L. Amperometric Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in milk using Magnetic Bead-Based Immunoassay on Disposable Screen Printed Carbon Electrode Strip. In: LAUDON, M.; ROMANOWICZ B., eds. *Nanotech Conference & Expo 2009, Vol 1, Technical Proceedings*. Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group, 2009.

Safarik I., Safarikova M. (2004): Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2(7): 17.

Safarik I., Safarikova M. *Magnetically Responsive Nanocomposite Materials for Bioapplications*. In: KNY, E., ed. *Nanocomposite Materials*. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd, 2009 (vol 151).

Sanna V., Sechi M. (2012): Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(31-36).

Sarada N. C., Thamaraiselvi K., Vijayalakshmi M. A. (2008): Anti Zn antibodies: Cross reactivity and competitive binding with heavy metals. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 861(2): 236-239.

Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henkel J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B., Plank C. (2002): Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 9(2): 102-109.

MENDELNET 2012

Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012): Cancer Statistics, 2012. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 62(1): 10-29.

Tu S. I., Reed S., Gehring A., He Y. P. (2011): Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium: The Use of Magnetic Beads Conjugated with Multiple Capture Antibodies. *Food Analytical Methods*, 4(3): 357-364.

Wisniewski J. R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5): 359-U60.

Yezhelyev M. V., Gao X., Xing Y., Al-Hajj A., Nie S. M., O'regan R. M. (2006): Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7(8): 657-667.

2D MAPPING OF OTOLITHS BY LA-ICP-MS

2D MAPOVÁNÍ OTOLITŮ METODOU LA-ICP-MS

Grulichová E.¹, Kanický V.^{1, 2}, Holá M.², Vaculovič T.^{1, 2}, Kalvoda J.³, Brzobohatý R.³

¹Laboratory of Atomic Spectrochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

² Central European Institute of Technology, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³Department of Geological Sciences, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: grulichova.eva@gmail.com

ABSTRACT

Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) was applied to the study of otoliths. Otoliths are small earstones of fish. The otolith is one of the most important tools for understanding the life of fish and fish population. Samples were taken from marine fish *Sebastes pinniger* (tribe Scorpaenidae) and *Trisopterus luscus* (tribe Gadidae). The goal of this work was to find out representation of individual elements in otoliths and their concentration. 2D maps concentrations of individual elements and their ratios were created.

Matrix elements (Ca, Mg, P, K) and trace elements (Na, Mn, Fe, Sr, Ba, Zn) were monitored. Maps of ratios Ba/Ca and Sr/Ca make us possible to follow distribution of these elements which indicated to change of different salinity conditions. Manganese is regarded for element which determined core of otolith. Manganese has increased concentration in core of otolith compared to strontium. Based on created maps we can obtain informations about life of the fish and also age of fish.

Key words: otolith, LA-ICP-MS, trace element, Ba/Ca, Sr/Ca, Mg

Acknowledgments: The authors acknowledge support from the European Regional Development Fund project CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ÚVOD

Otolity nazývané také ušní kamínky jsou komplexy polykrystalického složení, které se vyvinuly ve středním uchu u kostnatých ryb. Struktury vnitřního ucha jsou různé, záleží na druhu ryb. Obvykle se v něm vyskytují tři páry váčků (saculus, utriculus, lagena), z nichž každý obsahuje otolit - sagitta, lapillus, asteriscus a tekutinu endolymfu. Otolity se navzájem liší funkcí, velikostí, tvarem i strukturou. V průběhu života dochází k narůstání otolitů tak, že se tvoří prstence podobné letokruhům na pařezech stromů. Otolity se skládají ze soustředných prstenců. Tyto prstence jsou tvořeny organickými a anorganickými materiály, střídají se průsvitné a neprůsvitné zóny. Otolit obsahuje převážně uhličitán vápenatý, zbytek tvoří organická hmota (fibrózní protein - otolin) a stopové prvky. Otolity patří mezi nebuněčné útvary a jsou metabolicky inertní. To znamená, že prvky, které jsou začleněny do jejich povrchu během růstu, jsou v nich natrvalo zachované.

Otolity jsou zodpovědné za rovnováhu a přijímání zvukových impulsů. Patří mezi nejdůležitější prostředky, které nám umožňují porozumět rybímu životu a jejich populacím. Představují záznam vnějších vlivů během celého individuálního života ryby, který můžeme chemickými a elementárními zkouškami zjišťovat a ověřovat např. migrace, rozlišení populací žijících v poněkud odlišných prostředích, teplotu vody, znečištění vody, určení fyziologických indikátorů nebo určení zastoupení prvků. Z otolitů rovněž můžeme získat informace o stáří ryb.

MATERIÁL A METODIKA

Pro měření bylo využito vzorků získaných z mořských ryb *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758), které se pohybovaly v Severním moři při ústí řeky Temže, s odchylem přibližně před 20 lety. Český název pro *Trisopterus luscus* je treska přičnopruhá, patří do čeledi treskovitých ryb. Treska přičnopruhá žije v mořích a oceánech, obývá především brakické vody, což jsou vody vznikající mísením mořské a sladké vody u ústí řek vlévajících se do moře nebo oceánu. Vzorky byly zataveny do epoxidových pryskyřicových tablet, které byly následně upraveny broušením, a to přibližně na střed otolitu tak, aby byly odkryty viditelné přírůstkové zóny i jádro otolitu.

Pro měření otolitů byl použit laserový ablační systém UP 213 (New Wave, USA) s Nd:YAG laserem a ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce (Agilent, Japonsko). Spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem je vybaven kolizně-reakční celou pro minimalizaci spektrálních polyatomických interferencí. Pracovní podmínky LA-ICP-MS jsou shrnuty v Tab. 1. Dále byla pro měření otolitů použita elektronová mikrosonda SX-100 (CAMECA, Francie), která sloužila jako srovnávací metoda a porovnávacím prvkem byl zvolen vápník, pro své relativně homogenní zastoupení v otolitech.

Mapování vzorků proběhlo za podmínek uvedených v Tab. 2. Za stejných podmínek proběhlo měření i standardního referenčního materiálu NIST 1486 - kostní moučka, který pomohl naměřené

intenzity vzorků přepočítat na obsahy. Metodou LA-ICP-MS byla získána závislost intenzity signálu na čase. Změřené intenzity byly dále zpracovány tak, že nejprve bylo odečteno od každé linie pozadí. Dále hodnoty intenzit jednotlivých izotopů byly poděleny hodnotou intenzity ^{43}Ca . Tyto hodnoty se vynásobily obsahem vápníku získaným při měření na elektronové mikrosondě ($398\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Tímto krokem byla získána korigovaná intenzita příslušného izotopu (I_{corr}). Obsah izotopů byl vypočítán podle vzorce:

$$C_{\text{vz}} = \frac{I_{\text{corr}} \times C_{\text{NIST1486}}}{I_{\text{NIST1486}}},$$

kde C_{NIST1486} je obsah izotopu deklarovaný výrobcem a I_{NIST1486} intenzita referenčního materiálu.

Tab. 1: Používané podmínky LA-ICP-MS

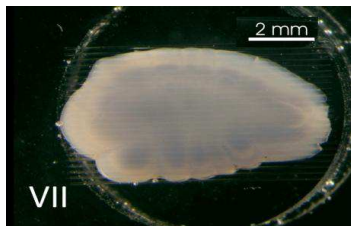
výkon generátoru	1500 W
vnější plazmový plyn (Ar)	15 l·min ⁻¹
střední plazmový plyn (Ar)	1 l·min ⁻¹
nosný plyn (He)	1 l·min ⁻¹
pomocný plyn (Ar)	0,6 l·min ⁻¹
vzdálenost cívký od vstupu do MS	8 mm

Tab. 2: Parametry měření LA-ICP-MS

režim	sken
frekvence pulsu	10 Hz
rychlost posunu	15 μm·s ⁻¹
průměr laser. paprsku	80 μm
vzdálenost linií	0,2 mm
hustota energie	6 J·cm ⁻²

VÝSLEDKY A DISKUZE

Mapy obsahů jednotlivých prvků i jejich poměrů byly vytvořeny v programu GRAMS. Z těchto map můžeme získat potřebné informace o rozložení prvků v otolitech. U všech map je v levé části zobrazena barevná stupnice obsahu v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. K mapování bylo vybráno osm vzorků otolitů. Bohužel ne všechny vzorky se podařilo zbrousit přesně na jádro otolitu, proto u některých map jsou zřetelné pouze náznaky přírůstků. Vzorek číslo VII. představuje nejlépe zbroušený otolitu, proto výsledky budou prezentovány právě na tomto otolitu.



Ve všech otolitech byl obsah železa stejně jako vápníku rovnoměrný, obr. 2. Na obr. 3 je viditelný nižší obsah stroncia ve střední části stejně je tomu tak i v jedné z přírůstkových zón. Mangan je považován za prvek, který určuje jádro otolitu. Na mapě manganu (obr. 4) je zobrazen střed otolitu i přírůstková zóna, které jsou totožné s nízkou koncentrací u stroncia.

Z vypočítaných obsahů prvků můžeme dále vytvořit poměry mezi libovolnými prvky, důležité jsou zejména Ba/Ca a Sr/Ca, které jsou považovány za indikátory pohybu. Z mapy poměru Ba/Ca (obr. 5) lze vyčíst, že v určitém období je možné zaznamenat zvýšenou hodnotu poměru Ba/Ca. Jeden tmavý prstenec, který je vidět na obr. 1, odpovídá červené až žluté barvě znázorněné na obr. 5. Předpokládáme tedy, že se ryba v určitém časovém období pohybovala ve sladkovodním prostředí, tj. ve vodách kolem ústí řeky Temže. Tuto teorii nám potvrzuje i další mapa Sr/Ca (obr. 6), kde je ve stejném období ukládání obsah Sr/Ca naopak nižší – růžová až zelená barva. I to podle dosavadních studií znamená, že se ryba pohybovala ve sladkých vodách.

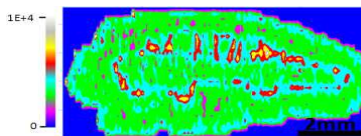
Soustředné prstence u otolitů narůstají v různých ročních obdobích. Střídají se tmavé neprůsvitné zóny se světlejšími průsvitnými zónami. Průsvitné prstence se obvykle tvoří v teplejších měsících a neprůsvitné v chladnějších měsících. Z toho můžeme usoudit, že tato ryba v chladnějších měsících žila ve vodách s nižší salinitou a v teplejších měsících ve vodách s vyšší salinitou.

Ryba v době v odchytu byla stará 2 roky, což dokazuje počet zelených prstenců na obr. 5.

Obr. 2: Mapa obsahu železa



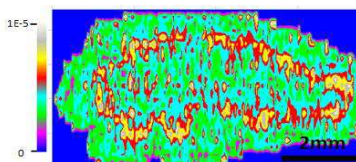
Obr. 3: Mapa obsahu stroncia



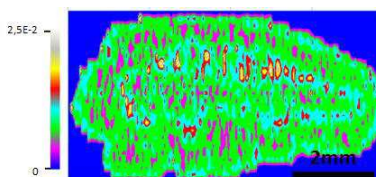
Obr. 4: Mapa obsahu manganu



Obr. 5: Mapa poměru Ba/C



Obr. 6: Mapa poměru Sr/Ca



ZÁVĚR

Z výsledků vyplývá, že metoda LA-ICP-MS je vhodná pro měření majoritních prvků tak i stopových prvků v otolitech. Ve všech zkoumaných otolitech byl prokázán homogenní obsah vápníku a železa. Podařilo se určit jádro otolitů pomocí manganu, který je považován za prvek určující střed otolitu. Poměry Ba/Ca a Sr/Ca umožňují sledovat rozložení těchto prvků indikující střídání různých salinitních podmínek. Tyto salinitní změny u otolitů jsou ovlivněny několika faktory a to fyziologickými procesy, teplotou vody, potravou, rychlostí růstu, ontogenezí, migrací nebo procesy, které souvisí s krystalizací otolitů. Včleňování studovaných prvků z prostředí vody nebo potravy do otolitů neprobíhá stejně rychle, což způsobuje ovlivnění poměrů Ba/Ca a Sr/Ca. Frekvence migrace ryb mezi prostředími s různou salinitou ovlivňuje ukládání těchto prvků v otolitech. A také rozdíly v obsahu zkoumaných prvků mizí, pokud dochází k častější migraci. Stejně tak potrava ryb ovlivňuje přítomnost uváděných prvků. Pokud je v potravě zaznamenána přítomnost bentózních organismů žijících v blízkosti řeky Temže, je zřejmé, že v pobřežních vodách se vyskytují vyšší obsahy těžkých kovů. Na základě zpracovaných map potom můžeme vyčíst další informace o průběhu života ryby, například stáří, v jakých vodách žila nebo ve kterých obdobích se v nich pohybovala.

LITERATURA

- Bath G.E., Thorrold S.R., Jones C.M., Campana S.E., McLaren J.W., Lam J.W.H.(2000): Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 1705 –1714.
- Brophy D, Jeffries T.E., Danilowicz B.S.(2004): Elevated manganese concentrations at the cores of clupeid otoliths: possible environmental, physiological, or structural origins. *Mar Biol.*, 144:779–786.
- Campana S.E., Neilson J.D. (1985): Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42:1014-1032.
- Campana S.E.(1999): Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188:263-297.
- Campana S.E.(2004): Photographic atlas of fish otoliths of the Northwest Atlantic Ocean.

Farrell J., Campana S.E.(1996): Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A:103-109.

Hieftje G.M., Norman L.A.(1992): Plasma source mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 519:118 – 119.

Jacquet S. H. Dehairs M.F., Cardinal D., Navez J., Delille B.(2005): Barium distribution across the Southern Ocean frontal system in the Crozet–Kerguelen Basin. *Marine Chemistry*, 95: 149-162.

Kalish J.M.(1989): Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132:151-178.

Kalish J.M.(1991): Determinant of otolith chemistry:seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 74:137-159.

Kennedy B.P., Blum J.D., Folt C.L., Nislow K.H.(2000): Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application. *Can J Fish Aquat Sci*, 57:2280-2292.

Leakey C.D.B., Attrill M.J., Fitzsimons M.F.(2009): Multi-element otolith chemistry of juvenile sole (*Solea solea*), whiting (*Merlangius merlangus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the Thames Estuary and adjacent coastal regions. *J Sea Res*, 61: 268-274.

Lenaz D., Miletic M., Pizzul E., Vanzo S., Adami G. (2006): Mineralogy and geochemistry of otoliths in freshwater fish from Northern Italy. *European Journal of Mineralogy*, 18: 143-148.

Limburg K.E., Landergren P., Westin L., Elfman M., Kristiansson P.(2001): Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: making the most of marginal spawning streams. *J. Fish Biol.*, 59: 682–695.

Macdonald J.L., Crook D.A.(2010): Variability in Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water and fish otoliths across an estuarine salinity gradient. *Mar Ecol Prog Ser*, 413: 147-161.

Martin G.B. Thorrold S.R.(2005): Temperature and salinity effects on magnesium, manganese and barium incorporation in otoliths of larval and early juvenile spot *Leiostomus xanthurus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 293:223-232.

Melancon S., Fryer B.J., Gagnon J.E., Ludsins S.A.(2008): Mineralogical approaches to the study of biomineralization in fish otoliths. *Mineralogical Magazine*, 72(2): 627-637.

Murayama E., Takagi Y., Nagasawa H.(2004): Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts. *Histochem Cell Biol.*, 121:155–166.

Nolf D. (1985): *Otolithi piscium*, Handbook of Paleichthyology, Volume 10.

de Pontual H., Largadere F., Amara R., Bohn M., Ogor A.(2003): Influence of ontogenetic and environmental changes in the otolith microchemistry of juvenile sole (*Solea solea*). *J Sea Res*, 50:199-210.

Radtke R.L., Svenning M., Malone D., Klements A., Ruzicka, J., Fey D.(1996): Migrations in an extreme northern population of Arctic charr *Salvelinus alpinus*: insights from otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 136: 13–23.

Ruttenberg B.I., Hamilton S.L., Hickford M.J.H., Paradis G.L.P., Sheehy M.S., Standish J.D., Ben-Tzvi O., Warner R.R.(2005): Elevated levels of trace elements in cores of otoliths and their potential for use as natural tags. *Marine Ecology Progress Series.*, 297:273-281.

Sadovy Y., Severin K.(1994): Elemental patterns in red hind (*epinephalus guttatus*) otoliths from Bermuda and Puerto Rico reflect growth rate not temperature. *Can J Fish Aquat Sci*, 51:133-141.

Surge D., Lohmann K.C.(2002): Temporal and spatial differences in salinity and water chemistry in SW Florida estuaries: effects of human-impacted watersheds. *Estuaries*, 25: 393-408.

Zhang Z., Runham N.W.(1992): Initial development of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae) otoliths. *J Zool (Lond)*, 227:465–478.

Zimmerman C.E., Stonecypher R.W., Hayes M.C.(2003): Migration of precocious male hatchery chinook salmon in the Umatilla River, Oregon. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 23: 1007–1015.

SYNTHETIC PEPTIDE MEDIATED IMMUNOCONJUGATION OF QUANTUM DOTS

PŘÍPRAVA KVANTOVÝCH TEČEK MODIFIKOVANÝCH PROTLÁTKAMI POMOCÍ SYNTETICKÉHO PEPTIDU

Janů L.¹, Stanisavljevic M.¹, Ryvolová M.^{1,2}, Hubálek J.², Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are nanoparticles with the dimensions in the range of 2–10 nm. They are used as a fluorescent label in a variety of biological investigations. QDs have a broad absorption with narrow photoluminescence spectra, high resistance to photobleaching and high resistance to photo- and chemical degradation. Nowadays, they are usually made of semiconductor core capped with any organic derivative making the quantum dot water soluble. This organic compound covering the metal core also serves as a linker for further conjugation.

Up to now, many efforts have been made to utilize quantum dots as immunochemical sensor. One of the possible ways is to conjugate the quantum dot with antibody. There are several methods of immuno-quantum dot preparation. The conjugation of antibodies or proteins to quantum dots using standard linking chemistry can be related to potential difficulties of working with nanoparticles. We have investigated an alternative approach of self-assembled immuno-quantum dot preparation using a peptide as a linker.

Key words: quantum dots, immuno-quantum dots, human IgG.

Acknowledgments: The financial support from the following project IGA AF Mendelu IP 10/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Imunochemické metody využívají vazbu mezi protilátkou a antigenem. Pomocí specifické vazby na značenou protilátku lze tímto způsobem stanovit celou řadu analytů. S rozvojem nanotechnologie se ke značení protilátek začaly využívat také kvantové tečky. Kvantové tečky (quantum dots, QD) jsou nejčastěji polovodičové částice o rozměrech 2-10 nm. Struktura kvantových teček se zpravidla skládá z anorganického jádra (CdTe, CdSe, CdS, ZnS a mnohé další) a svrchní, nejčastěji organické vrstvy, tvořené merkaptopropionovou kyselinou (MPA), glutathionem (GSH), polyetylen glykolem (PEG) a podobně (Drbohlavova, a kol., 2012, Duan, a kol., 2009, Jin, a kol., 2005, Molaei, a kol., 2011). Takto upravené vykazují vynikající fluorescenční vlastnosti. V porovnání s klasickými organickými barvivy mají kvantové tečky delší životnost, úzké emisní spektrum a široké absorpční spektrum (Baumle, a kol., 2004, Duan, a kol., 2009). Několik posledních studií se ale také zabývá jejich nevýhodami a omezeními, které jsou spjaty především s konjugací s proteiny, protilátkami a dalšími organickými molekulami. Ukázalo se, že jejich stabilita a fluorescenční vlastnosti mohou být negativně ovlivněny pH, teplotou nebo koncentrací solí v roztoku (Drbohlavova, a kol., 2009). CdTe kvantové tečky pokryté MPA, které jsou hojně používány pro své výborné spektroskopické vlastnosti a snadnou přípravu, jsou v kyselém prostředí (při pH nižším jak 3) velmi nestálé a během krátké doby ztrácejí svoji luminiscenci. Tento efekt není úplně vysvětlen, ale má se za to, že vlivem vysoké koncentrace vodíkových iontů, ztrácí povrch kvantových teček záporný náboj, dochází k následnému pronikání vodíkových kationtů hlouběji k anorganickému jádru nanočástice, kde reagují s thiolovou skupinou MPA. Následně dochází k desorpci molekuly MPA od povrchu částice, ta ztrácí svoji rozpustnost, dochází k aglomeraci a kompletní ztrátě fotoluminiscence. Pravděpodobně velmi podobným nebo shodným mechanismem působí také vysoká koncentrace iontů, např. Na⁺ (Kulvietis, a kol., 2011). Při standardním použití konjugačních činidel (sulfo-SMCC, sulfo-MBS, EDC) jsou hodnoty pH důležité z hlediska účinnosti a specifity reakce. Tudíž v dosavadních protokolech konjugace kvantových teček s proteiny je nezbytné použít tlumivých roztoků (PBS atd.), které obsahují poměrně vysokou koncentraci iontů. Druhým faktem je, že klasická konjugační činidla spojují například karboxylové skupiny (EDC) nebo thiolové skupiny proteinu (sulfo-SMCC, sulfo-MBS) a amino-skupiny kvantových teček. Na proteinu (protilátce) tedy může dojít k této reakci na kterékoliv dostupné skupině. Během reakcí může také docházet ke vzniku polymerů, které se následně mohou vysrážet z roztoku (Clapp, a kol., 2006).

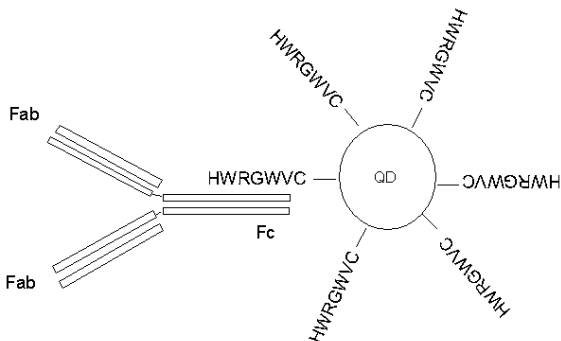
Výše uvedené důvody vedly k vývoji metodik založených na více či méně odlišných postupech konjugace. Kvantové tečky, jejichž povrch je modifikovaný MPA, TGA (thioglycolic acid) nebo DHLA (dihydrolipoic acid) na svém povrchu nesou karboxylové skupiny. Záporný náboj karboxylových skupin zajišťuje vzájemnou repulzi (Kulvietis, a kol., 2011). Bylo prokázáno, že

jsou-li kvantové tečky v roztoku o pH nižším než je pI proteinu (protilátky), potom může docházet k samovolnému navázání kvantových teček na povrch proteinu pomocí elektrostatických sil. Záporně nabitě tečky se vážou na povrch proteinu, který má při daném pH celkový kladný náboj (Na, a kol., 2010). Jiný přístup spočívá ve využití afinity polyhistidinového řetězce ke kovovému povrchu – tedy povrchu kvantových teček. Na C-nebo N-konec proteinu je navázána sekvence obvykle minimálně pěti histidinů, která zajišťuje rychlou a snadnou konjugaci proteinu na kvantové tečky.

Byly také provedeny zajímavé práce, které se snaží napodobit přirozenou biologickou syntézu nanočástic. Tvorba anorganické hmoty v tělech živých organismů je řízena proteiny. Příkladem mohou být kosti, zuby, ulity, ostny nebo superparamagnetické částice v magnetotaktických bakteriích (Tamerler a Sarikaya, 2009). Pomocí technik jako je phage display, byla zjištěna celá řada peptidových sekvencí, které mají vysokou afinitu k různým druhům kovů nebo jejich sloučeninám a jsou schopny regulovat růst nanočástic. Stejně tak některé proteiny jsou schopny se specificky vázat na jiné proteiny nebo organické molekuly (avidin-biotin, *Staphylococcus aureus*, Protein A – lidský imunoglobulin (HIgG) a jiné). Výhodou těchto procesů je, že probíhají ve vodném prostředí, nevyžadují zvýšenou teplotu reakce ani žádné další chemikálie. Tyto poznatky byly nedávno využity k syntéze kvantových teček, kdy do proteinu A byl zakomponován peptid s vysokou afinitou k ZnS. Jednoduchým smícháním teček modifikovaných proteinem A s HIgG vznikl komplex kvantová tečka-HIgG. Jak bylo uvedeno, proces nepotřebuje žádnou další chemickou ani teplotní aktivaci, avšak vyžaduje modifikaci proteinu a navíc, výsledný produkt je poměrně velký (spojení proteinu A a HIgG) (Zhou, a kol., 2010).

V naší práci jsme využili poznatku, že hexamer HWRGWV, jehož selektivní vazba je srovnatelná s proteinem A, se specificky váže na Fc fragment HIgG (Yang, a kol., 2005). Provedli jsme syntézu CdTe kvantových teček modifikovaných tímto peptidem a po následném jednoduchém smíchání s lidským imunoglobulinem (HIgG) se podařilo identifikovat komplex kvantová tečka – HIgG (Obr.1).

Obr. 1: idealizované schéma vazby lidského imunoglobulinu na kvantovou tečku modifikovanou peptidem HWRGWVC.



MATERIÁL A METODIKA

Resiny pro přípravu syntetických peptidů byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA), aminokyseliny pro syntézu na pevné fázi byly zakoupeny od firmy Merck (USA) a Sigma Aldrich (USA). Rozpouštědla pro syntézu peptidů byla zakoupena od firmy Biosolve (Holandsko) a Sigma Aldrich (USA). Chemikálie potřebné na přípravu kvantových teček byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Lidský imunoglobulin byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich (USA).

K syntéze peptidů na pevné fázi byl použit automatický syntetizátor peptidů Prelude (Protein technologies, USA). Analýza čistoty peptidů byla provedena na HPLC od firmy Shimadzu (USA). K analýze byly použity následující mobilní fáze: A = 0,1% TFA, B = 80% acetonitril, 20% voda a 0,08% TFA. Gradient byl od 2%B do 100% B, 15 minut. Analýzy MS byly provedeny na přístroji Ultraflex III instrument (Bruker Daltonik, Germany). 0,6 μ l vzorku bylo smícháno s 2,4 μ l roztoku matrix (nasyčený roztok alfa-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny směsí voda/acetonitril 1:1, v/v). Elektroforéza byla provedena na přístroji CE (Beckman Coulter, PACE 5500).

Syntéza kvantových teček modifikovaných peptidem byla provedena na mikrovlnném systému Anton Paar (Rakousko).

Měření kapilární elektroforézou bylo provedeno na systému Beckman P/ACE™ MDQ s absorbančním detektorem (214 nm) a křemennou kapilárou (délka 47 cm, efektivní délka 40 cm, vnitřní průměr 75 μ m). 20 mM borátový pufr byl použit jako separační elektrolyt. Separace byla provedena při 20kV a vzorek byl injektován 20 s při 3,4 kPa.

Fluorescenční spektra byla měřena na přístroji Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Switzerland). K analýze bylo použito 50 μ l vzorku.

Syntéza peptidu HWRGWVC

Hexamer HWRGWV vykazuje vysokou afinitu k proteinu A (Yang, a kol., 2005). K jeho napojení na CdTe kvantové tečky jsme zvolili vazbu přes SH skupinu cysteinu. Cystein jsme umístili na C-konec peptidu, který se zdá být vhodný, protože podle dostupných informací je pro vazbu na HgG klíčový histidin na N-konci peptidu, který by z tohoto důvodu měl zůstat volný. Peptid byl připraven pomocí syntézy na pevné fázi, klasickým postupným napojování aminokyselin od C-konce peptidu po jeho N-konec.

Úvodní krok syntézy byl proveden s Rink amide resinem. Další tvorba peptidových vazeb probíhala následovně: Fmoc skupina byla odstraněna 20% roztokem piperidinu v dimethylformamidu (DMF) po dobu 2 x 2,5 minuty. Aktivace příchodí aminokyseliny probíhala pomocí 0,05 M roztoku N,N-diisopropylethylaminu (DIPEA) v DMF; 0,15 g O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-fosfát (HBTU) a 0,03 g Hydroxybenzotriazol (HOBt). Molární poměr aminokyseliny (AK) a aktivátorů byl:

AK : HBTU : HOBt : DIPEA = 1 : 1 : 0,5 : 2.

Reakční doba byla 30 minut. Byl použit čtyřnásobný molární přebytek aminokyselin vzhledem k navázce resinu. Měřítka reakce bylo 0,1 mmol.

Závěrečná úprava peptidu zahrnovala štěpení sekvence od resinu, štěpení chránících skupin postranních řetězců aminokyselin, precipitaci peptidu dietyléterem a lyofilizaci. Štěpení peptidu probíhalo v koncentrované TFA. K potlačení vedlejších reakcí během štěpení byly zvoleny následující přísady: voda (HPLC grade), fenol, triisopropylsilan a 3,6-dioxa-1,8-oktandithiol (89:2:5:2:2). Tyto chemikálie mají za úkol eliminovat uvolněné zbytky chránících skupin, které mohou být velmi reaktivní a modifikovat vedlejší řetězce aminokyselin a tím způsobovat tvorbu nežádoucích vedlejších produktů. Doba štěpení byla vzhledem k přítomnosti cysteinu 2 hodiny. Poté byl peptid vysrážen dietyléterem přímo z roztoku TFA. Identifikace peptidu a vedlejších produktů byla provedena na MALDI-TOF MS. Kvantifikace byla provedena na HPLC.

Syntéza kvantových teček

Pro syntézu kvantových teček modifikovaných peptidem bylo zavedeno menší měřítka syntézy (0,5 ml roztoku). To nám umožňovalo větší počet opakování pokusů s nižšími navážkami peptidu a tím pádem menšími ekonomickými náklady. Příprava kvantových teček probíhala následovně:

2 ml CdCl₂ (0,04 mol.l⁻¹) bylo naředěno do 21 ml. Za stálého míchání bylo postupně přidáno 50 mg citrátu sodného 2 ml Na₂TeO₃ (0,01 mol.l⁻¹). Z tohoto roztoku bylo následně odebráno 0,5 ml. Do těchto 0,5 ml byly přidány 2 mg peptidu v DMF a přebytek NaBH₄ (2,0 mg). Roztok v uzavřené skleněné reakční nádobce byl umístěn do mikrovlnného reaktoru. Parametry syntézy byly: 180°C, 800W a 20 minut. Po dokončení byly vzorky ochlazeny na 50 °C a odstředěny při 25000 RCF po dobu pěti minut. Supernatant byl podroben analýzám.

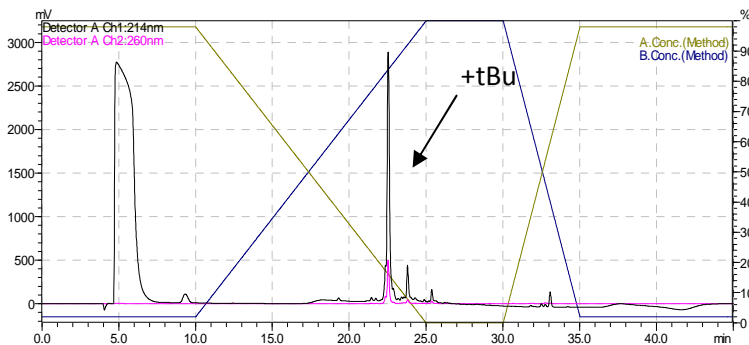
Příprava kvantových teček modifikovaných lidským imunoglobulinem

Navázání na HIgG proběhlo jednoduchým přidáním 13 μ l HIgG do 100 μ l kvantových teček a následným třepáním po dobu dvou hodin.

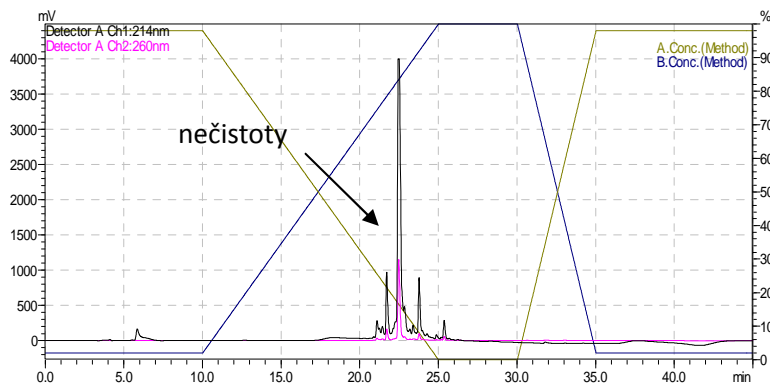
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledná čistota surového peptidu byla 70% (obr. 2). Vedlejší produkt byl identifikován jako peptid s neodstraněnou chránící skupinou tBu. K odstranění této skupiny bylo zapotřebí prodloužené doby štípání v TFA. Tento krok se ale ukázal jako kontraproduktivní, protože při delším kontaktu s TFA byla už atakována samotná sekvence peptidu a docházelo k vedlejším reakcím, pravděpodobně na cysteinu (obr. 3). Z těchto důvodů bylo přistoupeno k pokusům s původním peptidem. Struktura peptidu (hmotnostní spektrum na obr. 4) byla navržena následovně: sekvence HWRGWV má podle dostupných údajů vykazovat vysokou afinitu k Fc fragmentu HIgG. Důležitý z tohoto hlediska je N-konec sekvence s histidinem. Proto byl cystein přidán na C-konec peptidu. Cystein, stejně jako u MPA, TGA nebo DHLA, zajišťuje vazbu peptidu na kvantovou tečku. Jako organická molekula-modifikátor také určuje růst (velikost) kvantových teček.

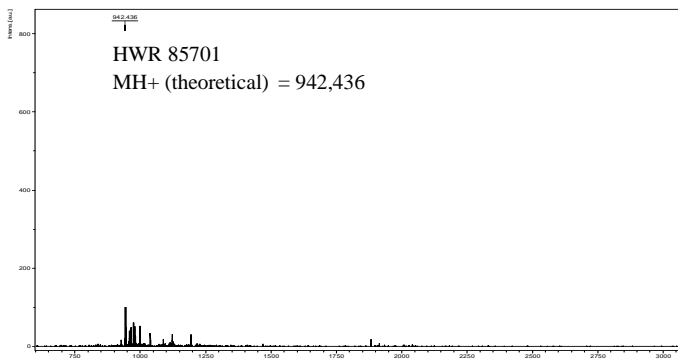
Obr. 2: HPLC chromatogram surového peptidu HWRGWVC. V retenčním čase 4-8 minut je pík DMF.



Obr. 3: HPLC chromatogram peptidu HWRGWVC po prodlouženém štěpení chránících skupin. Před samotným peptidem jsou vidět nečistoty vzniklé prodlouženou dobou štípaní chránících skupin

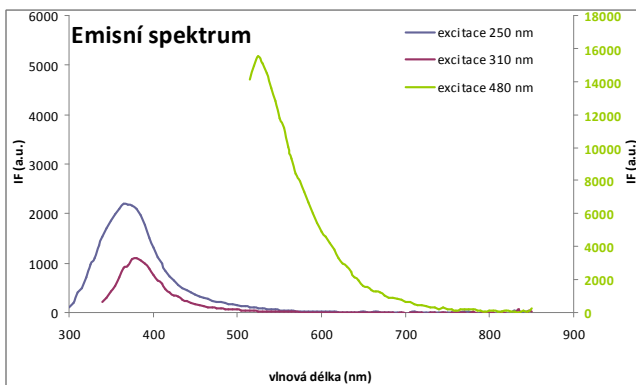


Obr. 4: MALDI TOF-MS surového peptidu HWRGWVC.



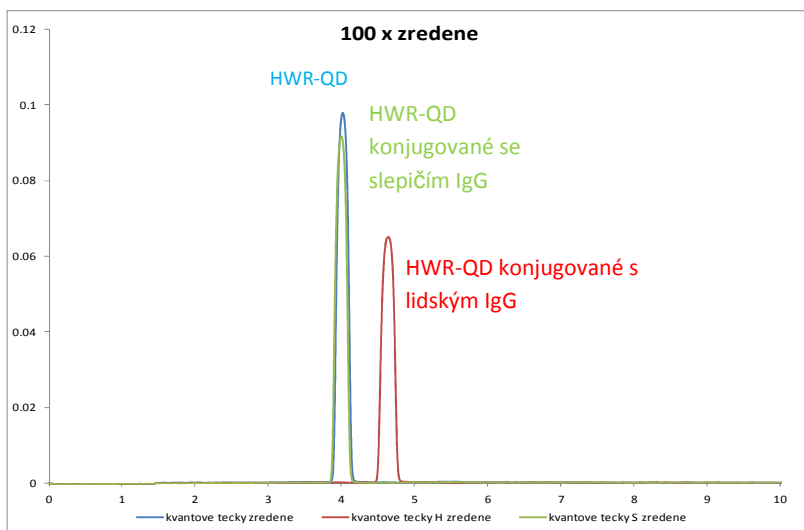
Navržený peptid je dobře rozpustný v čisté vodě (HPLC grade) nebo dimethylformamidu (DMF), ovšem v roztoku reaktantů kvantových teček je jeho rozpustnost omezená. Proto byl nejprve rozpuštěn ve 100 μ l DMF a poté přidán do reakční směsi. I tak ale došlo k jeho částečnému zpětnému vysrážení, což zřejmě omezilo konečné rozměry a luminiscenční vlastnosti teček. Při excitaci 480 nm bylo emisní maximum 525 nm (obr. 5). Následné pokusy posunout vlnovou délku emise k vyšším hodnotám pomocí vyšších návážek peptidu, prodloužení doby nebo zvýšením teploty reakce byly jen málo úspěšné. Omezená rozpustnost peptidu v reakční směsi zřejmě neumožňuje větší růst kvantových teček, přičemž část z nich se spolu s peptidem vysrážela z roztoku. Tyto přebytky byly odstraněny centrifugací (25000 rcf, 5 minut). Omezená rozpustnost peptidu může být zapříčiněna vysokou koncentrací iontů v roztoku nebo izoelektrickým bodem peptidu (8,26), který je velmi blízký pH reakční směsi (8-9).

Obr. 5: Emise kvantových teček modifikovaných peptidem HWRGWVC v závislosti na vlnové délce excitace.



Naším cílem bylo vytvořit metodiku pro syntézu imuno-kvantových teček, která by spočívala v maximální jednoduchosti a maximální specifitě reakce. V prvním kroku jsme provedli syntézu kvantových teček, jejichž povrch byl modifikovaný peptidem HWRGWVC. Peptid se na povrch kvantových teček váže thiolovou skupinou cysteinu. Samotná syntéza kvantových teček probíhala pomocí mikrovlnného záření. Tato aktivace je oproti klasickému ohřevu v baňce rychlejší a zajišťuje rovnoměrný ohřev vzorku. Tím je omezena tvorba povrchových defektů během reakce. Výsledkem jsou kvantové tečky nesoucí na svém povrchu peptid, který je schopen vázat se na Fc fragment lidského imunoglobulinu. Výhodou je, že Fab fragment, který je zodpovědný za vazbu na antigen, by měl zůstat volný, tedy aktivní. Při konjugaci byl jako negativní kontrola použit slepičí IgG (obr.6).

Obr. 6: Elektroforeogram surového produktu QD-HWR-IgG



ZÁVĚR

Podařilo se připravit protilátkou modifikované kvantové tečky. Příprava spočívala v jednoduchém smíchání lidského imunoglobulinu s kvantovými tečkami. Princip reakce je založen na využití peptidu HWRGWVC, který má afinitu k Fc fragmentu HIgG. V prvním kroku byly připraveny kvantové tečky modifikované tímto peptidem. Peptid byl na jejich povrch napojen přes thiolovou skupinu cysteinu umístěného na C-konci peptidu. V druhém kroku bylo smícháno 13 μ l HIgG a 100 μ l kvantových teček. Výhodou této metodiky je snadná finální příprava imuno-kvantových teček, specifická vazba teček na Fc fragment HIgG a relativně malá velikost výsledného komplexu. Nevýhodou, která by měla být předmětem dalšího výzkumu, je omezená rozpustnost peptidu, která pravděpodobně limituje velikost a vlastnosti kvantových teček.

LITERATURA

Baumle M., Stamou D., Segura J. M., Hovius R., Vogel H. (2004): Highly fluorescent streptavidin-coated CdSe nanoparticles: Preparation in water, characterization, and micropatterning. *Langmuir*, 20(10): 3828-3831.

Clapp A. R., Goldman E. R., Mattoussi H. (2006): Capping of CdSe-ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins. *Nature Protocols*, 1(3): 1258-1266.

Drbohlovova J., Adam V., Kizek R., Hubalek J. (2009): Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2): 656-673.

Drbohlovova J., Chomoucka J., Hrdy R., Prasek J., Janu L., Ryvolova M., Adam V., Kizek R., Halasova T., Hubalek J. (2012): Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO₂ Quantum Dots. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(2): 1424-1432.

Duan J. L., Song L. X., Zhan J. H. (2009): One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *Nano Research*, 2(1): 61-68.

Jin W. J., Fernandez-Arguelles M. T., Costa-Fernandez J. M., Pereiro R., Sanz-Medel A. (2005): Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions. *Chemical Communications*, 7): 883-885.

Kulvietis V., Streckytė G., Rotomskis R. (2011): Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media. *Lithuanian Journal of Physics*, 51(2): 163-171.

Molaei M., Iranizad E. S., Marandi M., Taghavinia N., Amrollahi R. (2011): Synthesis of CdS nanocrystals by a microwave activated method and investigation of the photoluminescence and electroluminescence properties. *Applied Surface Science*, 257(23): 9796-9801.

Na N., Liu L., Taes Y. E. C., Zhang C. L., Huang B. R., Liu Y. L., Ma L., Ouyang J. (2010): Direct CdTe Quantum-Dot-Based Fluorescence Imaging of Human Serum Proteins. *Small*, 6(15): 1589-1592.

Tamerler C., Sarikaya M. (2009): Molecular biomimetics: nanotechnology and bionanotechnology using genetically engineered peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society A - Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 367(1894): 1705-1726.

Yang H., Gurgel P. V., Carbonell R. G. (2005): Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. *Journal of Peptide Research*, 66(120-137).

Zhou W., Schwartz D. T., Baneyx F. (2010): Single-Pot Biofabrication of Zinc Sulfide Immuno-Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13): 4731-4738.

OPTIMALIZATION OF METHODS SUITABLE FOR ASSESSMENT OF VOLATILES IN BEER

OPTIMALIZACE METOD VHODNÝCH PRO STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK V PIVU

Kleinová J., Klejdus B.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kleinovaja@seznam.cz

ABSTRACT

The name of this thesis “Optimalization of methods suitable for assessment of volatiles in beer“ expresses the methods and the aims of research. In great detail it determines the optimal method of chromatographic analysis and the most suitable way of preparing sample for analysis by gas chromatography. For assessment of the most suitable stationary phase of gas chromatography was tested column DB WAX and DB5. Next was to determined the most suitable temperature program for effective separation of analysed substance. Detection of analyses was made on flame ionized detector and mass spectrometer. For separation volatiles from matrix and for their preconcentration was tested liquid extraction and headspace solid phase microextraction (SPME), which was also compared with analysis of gaseous phase without using extraction. SPME, which was showed as the most useful, had more attention. Volatiles were isolated with different combination of sorbents, sorption was at various temperatures, they were also examined with the addition of salt in the sample and using ultrasonic bath.

Key words: beer, volatiles, solid phase microextraction, gas chromatography,

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency, AF MENDELU, IP 15/2011.

ÚVOD

Těkavé látky v pivu jsou sloučeniny, které se významně podílí na organoleptických vlastnostech nápoje a kvalitu výrobku tak ovlivňují jak v kladném, tak záporném smyslu. Mezi nejpočetnější skupinu látek s nízkým bodem varu v pivu patří alkoholy, kterých je v pivu stanoveno přibližně 80. Z vedlejších produktů kvašení vznikají v nejvyšších koncentracích. V menším množství jsou v pivu obsaženy estery, které se z alkoholů tvoří. V pivu se jich nachází zhruba 150 a jsou senzoričky aktivnější. Organických kyselin je v pivu obsaženo přibližně 200 a na rozdíl od alkoholů a esterů je řada zejména mastných kyselin přítomna již v mladině před počátkem kvašení. Jejich vyšší koncentrace nejsou vzhledem k jejich nepřijemné chuti a vůni v pivu žádoucí. Mezi další skupinu těkavých látek v pivu, které jsou v současnosti zkoumány, patří aldehydy, ketony, étery, acetal, sírné sloučeniny a další (ŠTĚRBA et al., 2011; SILVA et al., 2008).

Nejvhodnější technikou pro stanovení těkavých látek v pivu je plynová chromatografie. Vzhledem ke komplexní matici piva a velkému koncentračnímu rozpětí mezi stanovovanými látkami však není možné provést přímý nástřik do chromatografické kolony. Stanovované látky se nejprve izolují, případně zakoncentrují. Na přípravu vzorků je možné využít řadu postupů, jako je kapalinová extrakce, destilace, superkritická fluidní extrakce, extrakce tuhou fází, sorpční extrakce na míchací tyčince či headspace techniky. Přívlástek headspace je synonymem pro plynnou fázi nad vzorkem, kdy se využívá těkavosti analyzovaných látek. V uzavřeném prostoru je po čase vytvořena rovnováha mezi fázemi a analyty je možné odebírat nad vzorkem. Pokud je do headspace přiváděn pro zvýšení účinnosti inertní plyn, jedná se o dynamickou headspace. Pokud inertní plyn probublává vzorkem, jedná se o purge and trap analýzu. Těkavé analyty je možné sorbovat na sorbent v termodesorpční trubici, která je po stripovací fázi umístěna do termodesorpčního systému (CAJKA, 2010; KOLB, 1999).

Často využívanou technikou statické headspace je mikroextrakce na pevnou fázi (SPME), která má výhodu především v jednoduché instrumentaci. Při SPME se analyty sorbují malým množstvím extrakční fáze, kterou je potažen povrch křemenného vlákna. Sorpce probíhá do dosažení rovnovážného stavu. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu analyt – vlákno. Křemenné vlákno je umístěno v duté ocelové jehle, která umožňuje jeho ochranu při manipulaci. Při sorpci je vlákno vysunuto přímo do vzorku nebo do plynné fáze nad vzorkem (headspace), což je pro analýzu těkavých látek v pivu vhodnější. Pokud je vzorek zahříván, je zajištěn dostatečný přestup těkavých látek na vlákno a při headspace nedochází ke znečišťování vlákna (WARDECKI et al., 2003; PAWLISZYN, 2000).

Cílem práce je optimalizovat zvolené metody přípravy vzorků. Vývoj metod umožní stanovit fingerprint těkavých látek v pivu, a tak rozlišit piva jednotlivých druhů a značek. Pomocí obsahu těkavých látek v pivu bude možné objektivně posoudit jeho kvalitu.

MATERIÁL A METODIKA

Pro optimalizaci metody stanovení těkavých látek v pivu bylo použito lahvované pivo značky Starobrno s označením Starobrno Tradiční. Jedná se o světlé výčepní pivo plzeňského typu o obsahu alkoholu 4 % obj. Pokud není uvedeno jinak, byly vzorky pro analýzu připraveny z 5 ml piva a 2 g soli ve vialkách o objemu 15 ml. Poté se vzorky zahřívaly na topné desce (Labicom, Česká republika) na teplotu 50 °C po dobu 10 min a pak následovala 20 min headspace mikroextrakce na vlákno s 85 µm polydimethylsiloxanu (Supelco, USA). Chromatografická analýza probíhala na plynovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickým detektorem HP-6890 (Hewlett Packard, Německo). Těkavé látky se separovaly při průtoku helia 1 ml/min, teplotě nástřiku 250 °C a teplotním programem: $T_1 = 40\text{ °C}$, $t_1 = 5\text{ min}$, 20 °C/min na $T_2 = 250\text{ °C}$, $t_2 = 5\text{ min}$. Množství analyzovaného vzorku se neregulovalo děličem toku. Byla použita kolona HP-5MS (5 % difenyl - 95 % dimethylpolysiloxan, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm) od Agilentu (USA). Každý vzorek byl vyhotoven a změřen třikrát. Identifikace látek probíhala pomocí knihovny spekter hmotnostního spektrometru.

Pro porovnání různých detektorů se vzorky dále analyzovaly na plynovém chromatografu HP-4890D s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) od stejné firmy. Teplota detektoru byla nastavena na 240 °C. Na chromatografu GC-MS byly testovány další dvě kolony, a to DB WAX (polyethylenglykol, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm) a HP-5MS s délkou 60 m (Agilent, USA).

V rámci optimalizace metody byly zkoumány teplotní režimy s pozvolnějším nárůstem teploty. Druhý teplotní program: $T_1 = 40\text{ °C}$, $t_1 = 5\text{ min}$, 10 °C/min na $T_2 = 270\text{ °C}$, $t_2 = 5\text{ min}$ a třetí: $T_1 = 40\text{ °C}$, $t_1 = 5\text{ min}$, 5 °C/min na $T_2 = 200\text{ °C}$, $t_2 = 5\text{ min}$, 15 °C/min na $T_3 = 250\text{ °C}$, $t_3 = 1\text{ min}$.

Ze separačních metod přípravy vzorku se testovala kapalinová extrakce s použitím rozpouštědel hexanu, ethylacetátu a dichlormethanu. Vzorky byly připraveny v 40 ml vialkách a obsahovaly vždy 30 ml piva a 10 ml rozpouštědla. Následovala extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Extrakt ve zkumavkách byl následně 5 min. centrifugován při 18000 ot/min, přičemž došlo k oddělení rozpouštědla od zbytku směsi.

Dále byla analyzována plynná fáze odebraná nad vzorkem bez použití SPME. Vzorek byl nejprve 30 min zahříván a pak bylo odebráno mikrostřičkačkou Hamilton 25 µl plynné fáze, která byla okamžitě nástřiknuta do chromatografu.

U mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) byly testovány sorbenty divinylbenzen (DVB), carboxen (CAR) a polydimethylsiloxan (PDMS) a to v kombinaci 85 µm DVB/CAR/PDMS, 85 µm PDMS/DVB a 85 µm CAR/PDMS (Supelco, USA).

MENDELNET 2012

Při testování vlivu přídavku soli na mikroextrakci byl do vzorku o objemu 5 ml přidán chlorid sodný v množství 1, 2, 3, 4 a 5 g a vzorky se před analýzou ponechaly 24 hod v ledničce. Dále byl měřen vliv délky extrakce na zakoncentrování těkavých látek na SPME vlákno. Vzorky se vždy 10 min vyhřívaly a pak následovala 10, 20, 30, 40, 60, 90 a 120 min extrakce. Při zjišťování, jaký je nevhodnější objem vzorku, bylo do vialek o objemu 15 ml nalito 2,5; 5; 7,5; a 10 ml piva a analýza probíhala bez přídavku soli.

Pro optimalizaci použité teploty na extrakci těkavých látek byly vzorky zahřívány na topné desce a teplota vzorků byla měřena elektronickým kontaktním teploměrem. Teplota topné desky byla nastavena na 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 a 130 °C.

Pro určení nevhodnějšího objemu vialky byly použity vialky o objemu 15 (průměr 20 mm), 20 a 40 ml (průměr 23 mm). Do vialky o objemu 15 ml bylo odměřeno 5 a 10 ml piva, do 20 ml vialky 10 a 15 ml piva a do 40 ml vialky 20 a 30 ml piva. SPME sorpce probíhala při 70, 80 a 100 °C. Elektronickým kontaktním teploměrem byla měřena skutečná teplota vzorku a její změny způsobené změnou objemu vzorku.

V rámci optimalizace metody bylo hodnoceno zlepšení SPME sorpce při použití magnetického míchadla, kdy se vzorek promíchával během extrakce při zahřívání na topné desce při 100 ot/min. Dále bylo také testováno, zda se těkavé látky extrahují více po odplynění vzorků pomocí ultrazvukové lázně (Kraintek, Česká republika), a za stejným účelem se použil filtrační papír typu 388 a 390 (Filtrak, Německo).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Prvním krokem při optimalizaci metody stanovení těkavých látek v pivu bylo určit vhodný přístroj k měření těkavých látek v pivu. K dispozici byly GC-MS a GC-FID. Ačkoliv plamenově ionizační detektor zajišťoval souměrné nerozmyté píky analyzovaných látek, pro analýzu byl určen jako vhodnější hmotnostně spektrometrický detektor, který má nižší detekční limit, což umožnilo stanovit více těkavých látek. Další výhodou GC-MS je, že pomocí hmotnostních spekter lze identifikovat jednotlivé těkavé látky.

Při stanovení nevhodnějšího teplotního programu chromatografické analýzy je třeba brát zřetel, na jaké účely bude analýza těkavých látek použita. Pokud je třeba separovat maximální množství těkavých látek, aby je bylo možné kvalitativně i kvantitativně stanovit, je vhodné použít teplotní program s nejpomalejším nárůstem teplot. Pro optimalizaci metod použitých pro přípravu vzorku stačí aplikovat zkrácený teplotní program, který zajišťuje dostatečnou separaci základních těkavých složek.

Z metod přípravy vzorku se ukázala kapalinová extrakce oproti SPME jako zcela nevyhovující. V dichlormethanu se extrahovalo jen 8 těkavých látek, v hexanu 10 a v ethylacetátu 13, což je méně jak třetina těkavých látek extrahovaných pomocí SPME.

MENDELNET 2012

Vzhledem k tomu, že SPME slouží k zakoncentrování analytů, nelze předpokládat, že přímý nástřík plynné fáze odebrané nad vzorkem bude při porovnání s SPME vyhovující. U SPME je však detekce analytů závislá na afinitě k sorbentu, takže není možné zajistit přenos veškerých přítomných látek na chromatografickou kolonu. Proto byl testován přímý nástřík na kolonu, ale výsledky prokázaly, že koncentrace těkavých látek v plynné fázi je příliš malá, aby bylo možné zjistit, které látky se při SPME neextrahují. Při detekci těkavých látek extrahovaných pomocí SPME nechyběla žádná z detekovaných po přímém nástříku.

Během studie byly testovány sorbenty, které tvoří stacionární fázi plynové chromatografie a separují se přes ně těkavé látky a SPME sorbenty, které slouží k extrakci a zakoncentrování analytů před chromatografickou analýzou. V tab. 1 je srovnání jejich účinnosti podle identifikovaných látek. Z tab. 1 je zřejmé, že nejvhodnější je kolona DB5 s délkou 60 m a SPME vlákno se sorbentem divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan, protože při jejich použití je identifikováno nejvíce látek.

Tab. 1 Srovnání GC kolon a SPME vláken dle identifikovaných těkavých látek

těkavé látky	GC kolony			SPME vlákna		
	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethanol	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethyl Acetate	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 3-methyl-	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 2-methyl-	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, butyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
1-Pentanol	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Butanoic acid, ethyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Butanol, 2-methyl-, acetate	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Myrcene	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Hexanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, octyl ester	DB WAX	-	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Acetic acid, hexyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
2,3-Butanediol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
1-Octanol	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Heptanoic acid, ethyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Linalool	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Acetic acid, heptyl ester	-	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Decanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Humulene	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Ethyl 9-decenoate	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P

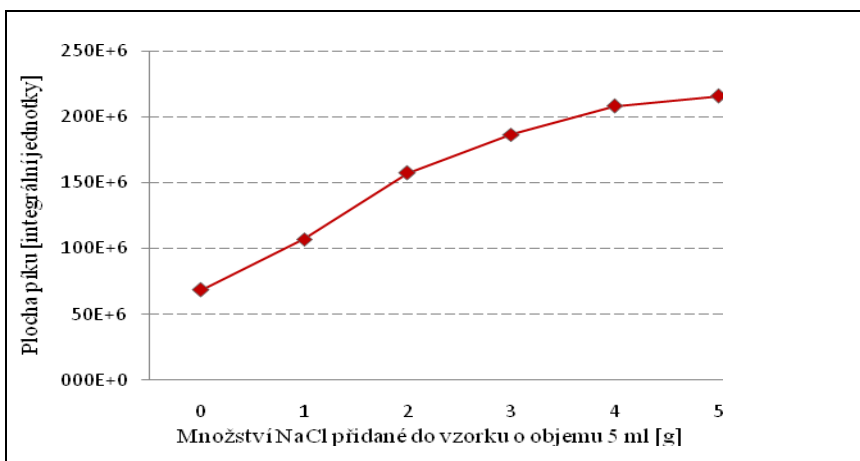
MENDELNET 2012

1-Decanol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Nonanoic acid, ethyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Dodecanoic acid, ethyl ester	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	-
Phenylethyl Alcohol	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
1-Undecanol	DB WAX	-	-	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid	DB WAX	DB5(30)	DB5(60)	D/C/P	-	C/P
Decanoic acid	DB WAX	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Acetic acid, decyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P
Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	-	-	DB5(60)	D/C/P	P/D	C/P

D/C/P - divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan; P/D – polydimethylsiloxan/divinylbenzen;
C/P - carboxen/polydimethylsiloxan

Vzhledem k tomu, že se ze zkoumaných metod prokázala jako neúčinnější mikroextrakce na pevnou fázi, byla snaha o maximální optimalizaci podmínek v rámci této metody. Např. byl posuzován vliv přidavku soli do vzorku na zakonzentrování těkavých látek na SPME sorbent, který byl vyhodnocen dle nárůstu plochy píků jednotlivých látek. Vzhledem k tomu, že u všech analyzovaných látek narůstala plocha píku úměrně přidávku soli, bylo možné sestavit graf 1 sečtením jednotlivých ploch. Dle výsledků lze doporučit přidávat do vzorku stejné množství soli, jaký je objem vzorku. Ačkoliv větší přidavky soli nebyly zkoumány, dle průběhu funkce lze vyvodit, že další zvyšování koncentrace soli bude mít minimální vliv na extrakci.

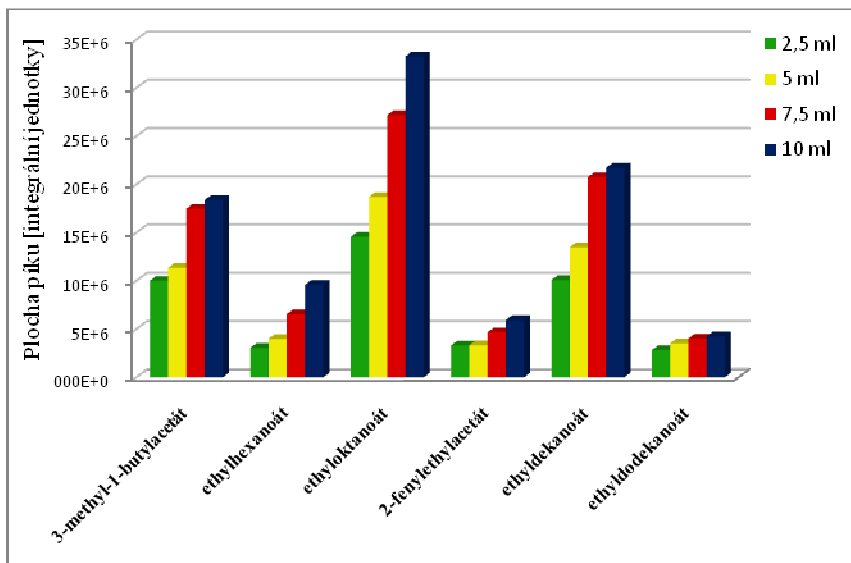
Graf 1 Vliv přidavku soli do vzorku na účinnost SPME



MENDELNET 2012

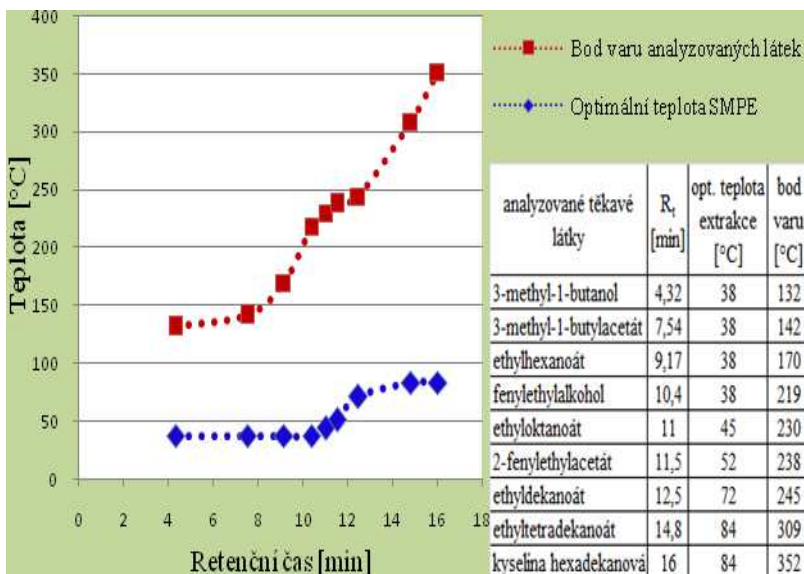
Při analýze vlivu objemu vzorku na extrakci látek na SPME vlákno v 15 ml vialkách bylo prokázáno, že se zvyšujícím se objemem vzorku se zvyšuje účinnost extrakce. Z grafu 2 je tento trend patrný a lze tedy doporučit plnit vialky až do maximálního objemu, který umožňuje extrakci těkavých látek z headspace na SPME vlákno. Zvětšující se objem vialkem však nevede k lepšímu zakoncentrování těkavých látek při SPME sorpci. Sorpci při vyšších objemech zřejmě zhoršuje obsah ethanolu a oxidu uhličitého. Teplota v tomto případě nemůže hrát roli, protože sorpce probíhala při různých teplotách a i při nevhodné teplotě se prokázala sorpce z menších objemů účinnější, jak sorpce z 40 ml vialky při ideální teplotě. Z analýzy vyplývá, že pro SPME sorpci jsou vzorky o objemu 20 a 30 ml v 40 ml vialce nevhodné. Dle experimentu je zřejmé, že na SPME sorpci z vialek má také vliv jejich průměr. Ačkoliv byl do vialek o objemu 15 a 20 ml připraven stejný objem piva - 10 ml a byly porovnávány sorpce při stejných teplotách, pro některé látky se prokázala jako vhodnější vialka o objemu 15, pro jiné o objemu 20 ml. U vzorku 10 ml v 20ml vialce je větší objem headspace, takže by měla na jednotku objemu obsahovat méně odpařených látek. Hladina piva ale tvoří větší plochu, což usnadňuje přestup těkavých látek do plynné fáze.

Graf 2 Vliv objemu vzorku v 15 ml vialce na účinnost SPME



Optimální teplotu SPME sorpce pro jednotlivé těkavé látky v pivu lze vyčíst z grafu 3, ze kterého je také patrné zvyšování bodu varu analytu s prodlužujícím se retenčním časem.

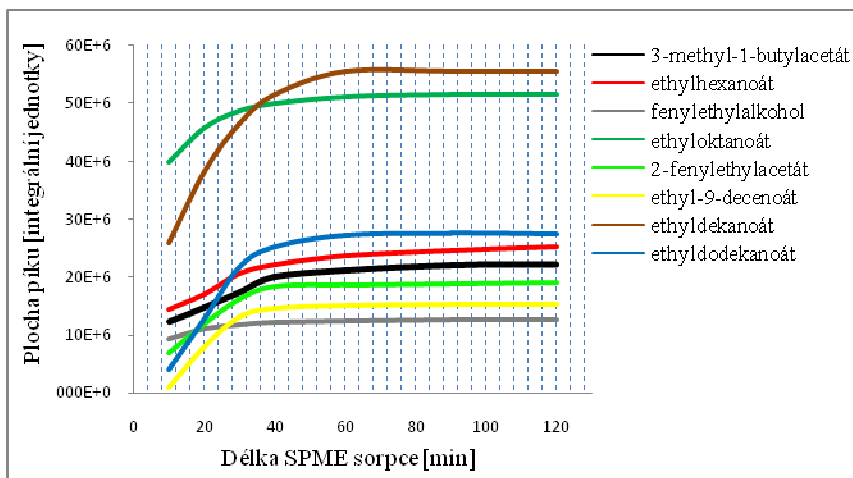
Graf 3 Optimální teplota SPME pro jednotlivé těkavé látky v pivu



Ke stanovení optimální teploty pro SPME extrakci lze dle ploch píku jednotlivých látek říci, že s rostoucím retenčním časem analýzy roste i teplota optimální pro SPME extrakci. Je to dáno tím, že dle teplotního programu jsou z kolony vymývány nejprve látky s nižším bodem varu a látky méně těkavé následují. Z grafu 3 je patrné, že počáteční zkoušená teplota 32 °C není vhodná pro žádnou analyzovanou látku. Při 38 °C se nejlépe sorbují látky, které vycházejí z kolony při daném teplotním programu do 10,39 min. V tomto čase se z kolony eluoval fenylethylalkohol, takže jde o nejtěkavější látku, pro kterou je vhodné použít 38 °C. Poté se optimální teplota zvyšuje až na 84 °C.

Optimální délka SPME je dle naměřených dat 60 min. Delší doba sorpce těkavých látek není nutná, protože plochy píků už se příliš nezvětšují. Pro těkavé látky s vyšším bodem varu jsou rozdíly při různé době SPME významnější. Závislost extrakce na čase je znázorněna v grafu 4, kdy v pravé části jsou těkavé látky seřazeny od nejvíce těkavých po sloučeniny s vyšším bodem varu.

Graf 4 Vliv doby SPME na účinnost metody



Po použití ultrazvukové lázně na odstranění oxidu uhličitého ze vzorku se chromatografická analýza většiny analytů nezlepšila. Působením ultrazvuku dochází zřejmě i k vytěsnění těkavých látek ze vzorku. Oproti tomu po filtraci byla SPME účinnější a je možné použít oba typy filtračních papírů, typ 388 s širšími póry či typ 390 s jemnějšími póry. Typ 388 je vhodnější pro více těkavé látky, které mají zpravidla i menší molekulovou hmotnost, a typ 390 pro analyty s vyšším bodem varu. Mezním analytem je ethyloktanoát, pro jehož analýzu je ještě účinnější použít typ 388.

ZÁVĚR

Pro stanovení těkavých látek v pivo se osvědčila jako neúčinnější metoda přípravy vzorku mikroextrakce na pevnou fázi. Extrakci lze zvýšit přidávkem soli do vzorku, zvýšením objemu vzorku ve vialce či prodloužením doby sorpce. Při určování optimální teploty sorpce nelze stanovit univerzální hodnotu, protože těkavé látky mají jiná optima extrakčních teplot dle jejich bodu varu. Použití ultrazvuku k odstranění oxidu uhličitého se prokázalo jako nevhodné. Oproti tomu filtrace přinesla uspokojivější výsledky.

Výzkumem bylo prokázáno, že pro stanovení těkavých látek v pivo o nízkých koncentracích nelze aplikovat jednu konkrétní metodiku, protože pro různé látky jsou vhodné různé podmínky analýzy. Tak lze posunout limity chromatografické analýzy i pro těkavé látky, které mají ve vzorku nízký obsah, ale vzhledem k nízkému prahu senzorického vnímání mají význam pro kvalitu výrobku a je třeba jim věnovat pozornost.

LITERATURA

Cajka, T., et al. (2010): Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. *Journal of Chromatography A*, 1217: 4195-4203.

Kolb, B. (1999): Headspace sampling gas analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842: 163-205.

Pawliszyn, J. (2000): Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880: 35-62.

Silva, G. A., Augusto, F., Poppi, R. J. (2008): Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food chemistry*, 111: 1057-1063.

Štěrba, K., Dostálek, P., Karabín, M. (2011): Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*, 105: 603-610.

Wardecki, W., Sowinski, P., Curylo, J. (2003): Evaluation of headspace SPME for the analysis of volatile carbonyl compound in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 984: 89-96.

PREPARING, ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT PROTEINS OF β -GLUKOSIDASE ZM-P60.1

PŘÍPRAVA, IZOLACE A ČÁSTEČNÁ CHARAKTERIZACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ β -GLUKOSIDASY ZM-P60.1

Klimeš P.^{1,2}, Mazura P.¹, Filipi T.¹, Brzobohatý B.¹

¹Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i. and Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech republic

E-mail: pavel.klimes@seznam.cz

ABSTRACT

The maize β -glucosidase (EC 3.2.1.21) Zm-p60.1 is an enzyme catalyzing the hydrolysis of trans-zeatin-O-glucopyranoside to glucose and trans-zeatin.

This thesis is focused on the production, purification and partial characterization of the mutants SB1 and SB2 of Zm-p60.1. The thesis includes a theoretical part devoted to a review of the literature on purification of recombinant proteins involved in cytokinin metabolism of plant. The practical part contains part of the study of two obtained mutant forms of Zm-p60.1. The Zm-p60.1 mutants SB1 and SB2 were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-T1^R and purified by affinity chromatography on a 5 ml HisTrap HP column followed by gel filtration on a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade column to purities of > 95%.

Enzyme kinetics was measured at 30 °C with the artificial substrate pNPG: the values for the SB1 mutant were $K_m = 0.48 \pm 0.02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $k_{cat} = 12.94 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$. For SB2 the values were $K_m = 0.50 \pm 0.02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $k_{cat} = 19.12 \pm 0.20 \text{ s}^{-1}$.

Hydrolytic efficiency of SB2 is about 30% higher than SB1 and is equal to approximately 60% of WT. These mutants of Zm-p60.1 can be a tool for subtle changes in cytokinin metabolism in plants. These and other mutated forms of Zm-p60.1 will be mobilized into transgenic plants as part of future research into the regulation of cytokinin homeostasis.

Key words: β -glucosidase, purification, recombinant protein

Acknowledgments: This project was supported by grant P305/11/P768 from the Czech Science Foundation and the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the ERDF.

ÚVOD

Cílem této práce byla exprese, purifikace a částečná charakterizace rekombinantních mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Součástí byla taktéž literární rešerše rešerše purifikačních postupů využívaných při izolaci enzymů zapojených do cytokininového metabolismu rostlin exprimovaných jako rekombinantní proteiny.

Rekombinantní proteiny jsou takové proteiny, které jsou získávány expresí rekombinantní DNA v heterologních expresních systémech, jako jsou bakterie, kvasinky, hmyzí, či savčí buňky a transgenní rostliny.

Expresí rekombinantních proteinů je využívána převážně v případech, kdy je obtížné studovaný protein z přirozeného zdroje izolovat, nebo je-li míra exprese studovaného proteinu v daném organismu nízká [1].

Námi studovaný enzym, β -glukosidasa (EC 3.2.1.21) uvolňuje biologicky aktivní cytokininy z *O*-glukosidů, které jsou hydrolyticky štěpeny na monosacharid a aglykon [2,3].

MATERIÁL A METODIKA

Transformace bakterií

Každý z konstruktů mutant SB1 a SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 byl sterilně transformován do *E. coli* BL21(DE3)pLysS-T1R. Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo napipetováno 20 μ l KCM (5x koncentrovaný) a přidáno 80 μ l roztoku obsahujícího konstrukt pRSET A::Zm.p60.r (1 μ l konstruktů v 79 μ l ddH₂O). K roztoku bylo přidáno 100 μ l kompetentních buněk a mikrozkušavka byla dána na 20 minut do ledu. Po této době byl proveden teplotní šok (30 s, 42 °C) následovaný pětiminutovou temperancí na ledu. K tomuto roztoku bylo přidáno 1 ml SOC média a výsledná směs byla následně inkubována při teplotě 37 °C a 550 rpm po dobu 1 hodiny. Výsev byl proveden v množstvích 50 a 150 μ l na Petriho misky obsahující LB médium s ampicilinem (100 mg·ml⁻¹) a XGlcP (40 μ g·ml⁻¹). Bakterie byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Mikroexpresní analýza

Ze zatransformovaných buněk na Petriho miskách bylo vybráno 8 kolonií lišící se intenzitou modrozeleného zbarvení. Pro vytvoření nočních kultur bylo napipetováno do sterilních zkumavek 5 ml obohaceného LB média a sterilní špičkou, nebo párátkem byl přenesen střed kolonie do zkumavky s médiem. Zkumavky byly třepány při teplotě 37 °C a 300 rpm přes noc.

Z každé noční kultury bylo do mikrozkušavky odebráno 1,3 ml bakteriální suspenze, která byla následně centrifugována při 4 °C a 6000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit a pelet jemně

resuspendován ve 100 μ l sterilního glycerolu (10 % m/m). Tyto roztoky byly šokově zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.

Do každé Erlenmayerovy baňky (250 ml) bylo převedeno 50 ml obohaceného LB média a následně 1 ml noční kultury. Následná kultivace probíhala při 37 °C a 200 rpm 3,5 hodiny do doby než zákal roztoku měřený při vlnové délce 600 nm dosahoval absorbance v rozmezí 0,45 – 0,65 proti blanku (obohacené LB médium). Expres rekombinantního proteinu byla zahájena přidávkem 5 μ l IPTG a roztoky s bakteriemi byly dále kultivovány při 22,5 °C a 200 rpm po dobu 3 hodin. Bakterie byly centrifugovány při 4 °C a 6000 rpm po 10 minut, supernatant byl odlit, pelet resuspendován v 2,5 ml sonikačním pufru zamražen na -20 °C.

Zkumavky s resuspendovanými buňkami byly další den rozmrazeny na ledu a následně čtyřikrát desintegrovány 20 sekund. Centrifugací při 4 °C a 30000 g po dobu 30 minut byl oddělen supernatant od peletu. Supernatant s rekombinantním proteinem byl převeden do mikrozkušavky a umístěna na led. Koncentrace proteinů v roztocích byla zjištěna fotometricky dle Bradfordovy.

Míra exprese mutant SB1 a SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 byla zjištěna denzitometrickou analysou SDS gelu, NATIV gelu a zymogramu obsahující vzorky lysátů.

Příprava bakteriálních lysátů

Do dvou Erlenmaerových baněk (3000 ml) bylo nalito 1000 ml obohaceného LB média a přidáno 0,5 ml bakteriální konzervy. Následná kultivace při 37 °C a 200 rpm probíhala do doby než zákal roztoku měřený při vlnové délce 600 nm dosahoval absorbance v rozmezí 0,45 – 0,65 proti blanku (obohacené LB médium). Expres rekombinantního proteinu byla zahájena přidávkem 100 μ l sterilního IPTG (1 mol·l⁻¹). Další kultivace probíhala 3 hod při 22,5 °C a 200 rpm.

Kultury byly centrifugovány 10 min při 6000 rpm a pelet byl resuspendován v 100 ml sonikačního pufru. Takto připravený roztok byl skladován při -20 °C.

Purifikace rekombinantních proteinů

Kultury v příslušném pufru byly desintegrovány v čtyřech cyklech po dobu 1 min při 50 % výkonu desintegrátoru. Roztok byl centrifugován 30 min při 30000 g a supernatant byl filtrován přes filtr Minisart 0,20 μ m.

Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie. Kolona HisTrap HP (5 ml) byla ekvilibrována 25 ml roztoku 50 mmol·l⁻¹ NiSO₄ a následně promyta 25 ml ddH₂O. Následná ekvibrace kolony byla provedena 25 ml směsí roztoků A1 a B s výslednou koncentrací imidazolu 20 mmol·l⁻¹. Filtrovaný roztok s rekombinantním proteinem byl na kolonu nanesen rychlostí 3 ml·min⁻¹. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 5 ml směsí pufru A1 a B obsahující 20 mmol·l⁻¹ imidazol a 15 ml směsí pufru A1 a B při použití lineárního gradientu imidazol 20 – 50 mmol·l⁻¹. Eluce proteinu probíhala 30 ml pufru A2.

Frakce obsahující rekombinantní protein byly spojeny a zkoncentrovány ultracentrifugací přes Amicon ultra 30 k MWCO (Millipore) a naneseny na gelovou kolonu HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade ekvilibrovanou pufrům o složení 50 mmol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ NaCl (pH 7,0). Eluce probíhala přes noc stejným pufrům rychlostí 1 ml·min⁻¹. Druhý den byly frakce s dimerní složkou enzymu zkoncentrovány ultracentrifugací přes Amicon ultra 10 k MWCO (Millipore), byla zjištěna koncentrace rekombinantního proteinu a provedena SDS-PAGE, Nativ-PAGE a zymogram.

Enzymová kinetika

Bylo připraveno 100 ml 0,2 mol·l⁻¹ Na₂CO₃.

Kalibrační koncentrace *p*-nitrofenolu v 50 mmol·l⁻¹ citrát-fosfátovém pufru (pH 5,5): 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 mmol·l⁻¹

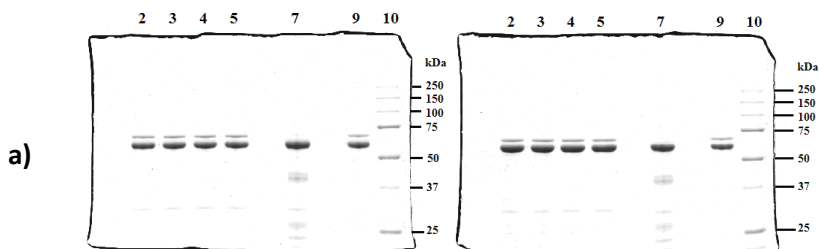
Kalibrační roztok: 120 μl roztoku Na₂CO₃ + 80 μl kalibračního roztoku *p*-nitrofenolu

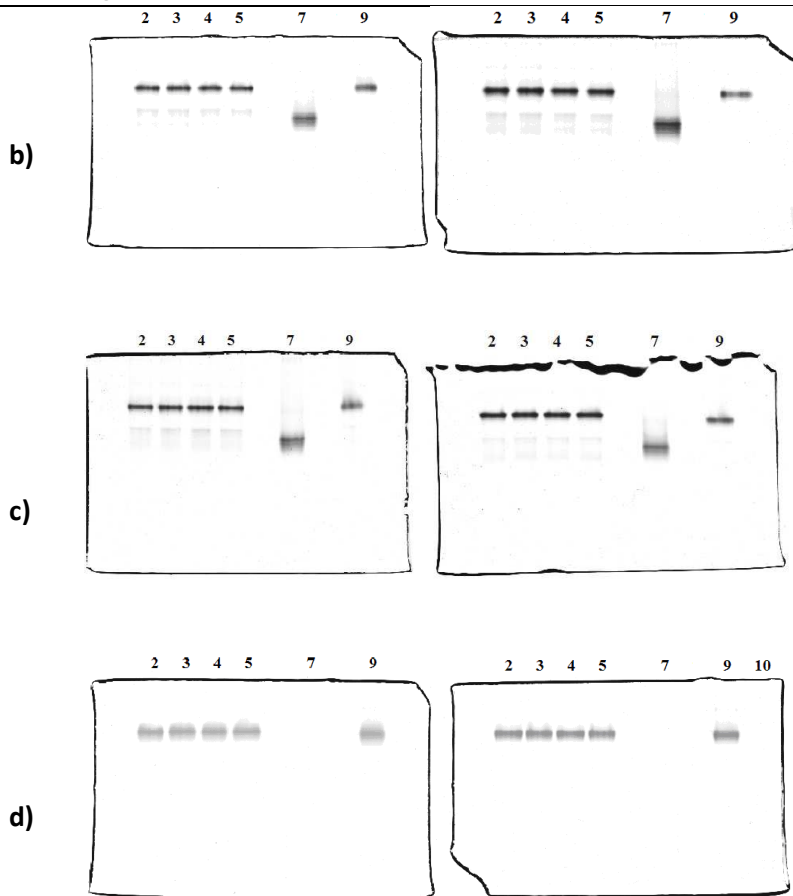
Blank: 120 μl roztoku Na₂CO₃ + 80 μl citrát-fosfátového pufru

Enzymová kinetika probíhala na umělém substrátu pNPG (při teplotě 30 °C) v koncentracích 0,25; 0,50; 1,0; 1,25; 1,5; 3,0; 10,0; 20,0 a 40,0 mmol·l⁻¹. Po smíchání enzymu s roztokem substrátu bylo v pravidelných časových intervalech odebráno 80 μl reakční směsi, která byla napipetována do 120 μl roztoku Na₂CO₃. Následně byla měřena absorbance roztoku při 405 nm na fotometru Tecan Rainbow. Každé stanovení bylo provedeno minimálně ve třech opakování a z naměřených absorbancí byly dle kalibrační přímky odvozeny počáteční rychlosti reakce, ze kterých byly vypočteny kinetické parametry *K_m* a *k_{cat}* daného enzymu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

SDS-PAGE, nativ-PAGE a zymogram purifikovaných mutantů



**Obrázek 1: SB1**

a) SDS-PAGE: : 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru); 10: marker molární hmotností proteinů

b) nativ-PAGE hned po purifikaci: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

c) nativ-PAGE v den enzymové kinetiky: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

d) zymogram: 2 – 5: purifikovaný enzym SB1; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru) (barveno 3 min 40 s)

SB2

a) SDS-PAGE: : 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT; 10: marker molární hmotností proteinů

b) nativ-PAGE hned po purifikaci: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

c) nativ-PAGE v den enzymové kinetiky: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru)

d) zymogram: 2 – 5: purifikovaný enzym SB2; 7: E401D (marker monomeru); 9: WT (marker dimeru) (barveno 4 min)

Enzymová kinetika mutant SB1 a SB2

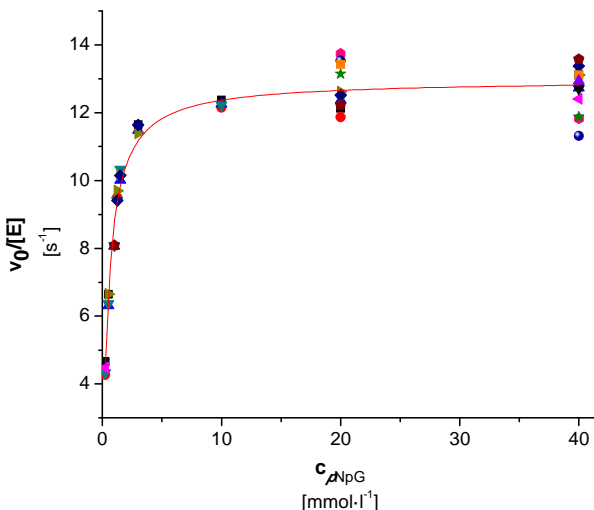
Určení kinetických parametrů obou mutant bylo provedeno na umělém substrátu pNPG při 30 °C den po purifikaci. Substrát je používán pro měření kinetických parametrů in vitro a po enzymové reakci poskytuje barevný produkt *p*-nitrofenol.

Pro vyhodnocení byla použita kinetická rovnice Michaelis-Mentenové.

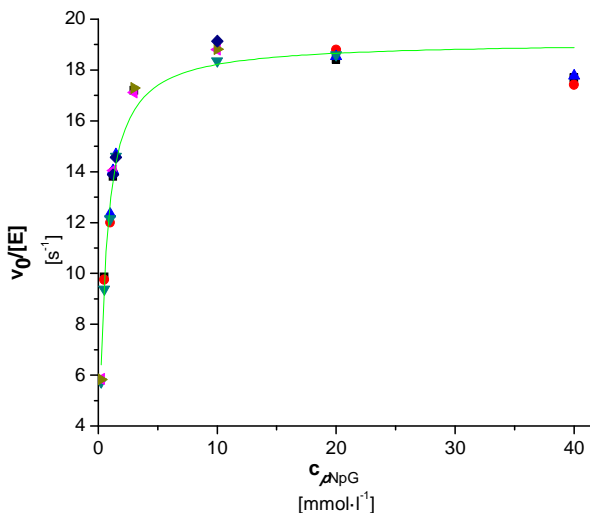
Rovnice závislosti:
$$y = \frac{k_{cat} \cdot x}{K_m + x}$$

Z naměřených dat vyplývá, že obě mutanty sice vykazují nižší rychlost hydrolysy umělého substrátu pNPG než WT, avšak mají k němu vyšší afinitu. Zatímco mutanta SB1 vykazuje 3,3 krát menší k_{cat} než WT, rychlost mutanta SB2 byla snížena jen 2,2 krát. Afinita obou mutant vůči substrátu byla téměř shodná a oproti WT vzrostla asi 1,4 krát. Z porovnání hydrolytických eficientí vyplývá, že mutanta SB2 hydrolyzuje pNPG asi o 30 % efektivněji, než mutanta SB1 a dosahuje 60 % hydrolytické eficientie WT.

Obrázek 2: Závislost počáteční rychlosti reakce mutanty SB1 β -glukosidasy Zm-p60.1 na koncentraci substrátu pNPG (Výstup programu Origin Pro 8.0 dle kinetické rovnice Michaelis-Mentenové)



Obrázek 3: Závislost počáteční rychlosti reakce mutanty SB2 β -glukosidasy Zm-p60.1 na koncentraci substrátu pNPG (Výstup programu Origin Pro 8.0 dle kinetické rovnice Michaelis-Mentenové)



Tab. 1: Kinetické parametry mutant SB1, SB1 β -glukosidasy Zm-p60.1 a β -glukosidasy Zm-p60.1-wild-type získané z kinetické analýzy hydrolýzy substrátu pNPG[4]

Enzym	K_m (mmol.l ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m	Relativní eficience
WT	0,68 ± 0,03	42,8 ± 0,1	62,94	100,00
SB1	0,48 ± 0,02	12,9 ± 0,1	26,96	42,83
SB2	0,50 ± 0,02	19,1 ± 0,2	38,24	60,76

Relativní eficience: $(k_{cat}/K_m)_{mutant}/(k_{cat}/K_m)_{WT} \times 100$ (Výstup programu Origin Pro)

ZÁVĚR

Práce řeší problematiku produkce, izolace a charakterizace mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1.

Teoretická část práce je věnována literární rešerši purifikace rekombinantních proteinů zapojených do cytokininového metabolismu rostlin obsahující 14 článků. Nejčastěji používanou technikou pro purifikaci rekombinantních proteinů cytokininového metabolismu rostlin byla kombinace afinitní

chromatografie s gelovou filtrací, iontově výměnnou chromatografií nebo chromatografií s hydrofobními interakcemi. Chromatofokasace byla využita pouze ve dvou případech. Nejpoužívanějším expresním systémem byly bakterie *Escherichia coli*. Ve dvou případech byly použity kvasinky *Pichia pastoris* a v jednom případě *Saccharomyces cerevisiae*.

Praktická část práce je zaměřena na produkci, purifikaci a enzymovou kinetiku mutant SB1 a SB2 kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Exprese proteinů probíhala v bakteriích *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-T1R. Částečná purifikace byla realizována afinitní chromatografií za použití kolony HisTrap HP (5 ml). Vysoké homogenity proteinů (> 95 %) bylo docíleno purifikací gelovou filtrací na koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade.

Kinetické parametry obou mutantů byly získány hydrolyzou umělého substrátu p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu: u mutantů SB1 byly zjištěny hodnoty $K_m = 0,48 \pm 0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $k_{cat} = 12,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$; u mutantů SB2 byly hodnoty zjištěny vyšší, a to $K_m = 0,50 \pm 0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $k_{cat} = 19,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$. Obě mutace mají sice nižší rychlost hydrolyzy substrátu než WT, ale vyšší afinitu k tomuto substrátu. Hydrolytická eficeience mutantů SB2 je asi o 30 % vyšší než u mutantů SB1 a představuje 60 % hydrolytické eficeience WT.

U mutantů SB1 a SB2 nebyl zaznamenán téměř žádný rozpad dimeru na monomerní jednotky enzymu. Lze proto očekávat, že zavedené mutace nemají výraznější vliv na stabilitu kvarterní struktury enzymu.

LITERATURA

- [1] Watson J. D., Tooze J., Kurtz D. T. (1988): Rekombinantní DNA, Krátký kurz. Academica Praha, 296 s.
- [2] Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of Active Cytokinin by a β -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science* 262, 1051 – 1054
- [3] Cairns J. R. K., Esen A. (2010): β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Science* 67, 3389 – 3405
- [4] Dopitová R. (2009): Funkční architektura aktivního místa kukuřičné β -glukosidasy Zm-p60.1. Brno, 84 s. Disertační práce. Masarykova univerzita.

DEVELOPMENT OF METHODIC OF TOTAL GLUTATHIONE AMOUNT DETERMINATION

VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ CELKOVÉHO GLUTATHIONU

Komínková M.¹, Zítka O.^{1, 3}, Merlos Rodrigo M.A.³, Zehnálek J.³, Havel L.², Adam V.^{1, 3}, Kizek R.^{1, 3}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kominkova.marketa@gmail.com

ABSTRACT

Glutathione plays important role in biochemical processes associated with oxidative stress in bacterial, plant and animals cells. Glutathione is occurring in the reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) in the organism. The ratio between GSH and GSSG is considered as a marker of oxidative stress. During the sample preparation the destabilization of the GSH and GSSG forms is occurring which might be a problem for subsequent analysis. Aim of this study was the optimization and of quantitative reduction GSSG to GSH for HPLC-ED determination using tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The efficiency of reduction of GSSG was analyzed using high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). For GSH and GSSG determination we used gradient elution with methanol on reversed-phase column and coulometric detection. Limit of detection for GSH and GSSG was determined as 30 nM and 200 nM respectively. For qualitative reduction of GSSG to GSH we optimized the concentration of reducing agent (1, 2, 4, 6 mM), time of reaction (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60 minutes) and pH range of tested buffers (Britton-Robinson, Borate buffer, Phosphate buffer and Acetate buffer). The influence of addition of EDTA was also tested. We determined the optimal condition of the reducing reaction as 2 mM TCEP in Borate buffer (pH 9) and reaction time 15 minutes. No influence of EDTA addition on the reducing reaction was observed. The usage of the method was estimated for concentration range 60 nM – 200 µM of GSSG.

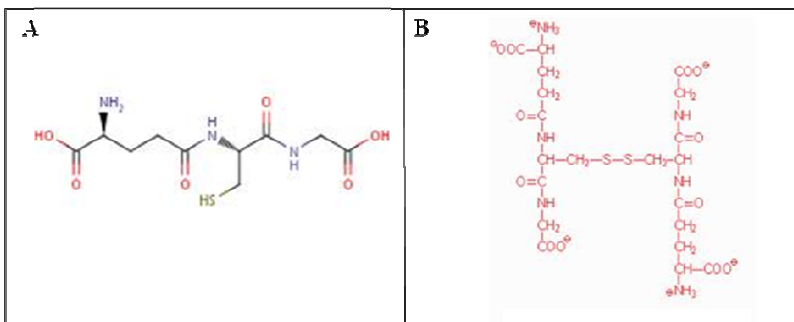
Key words: Total GSH determination; Oxidized glutathione (GSSG); Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA);

Acknowledgments: This work was supported by project NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068, IGA TP6/2012, and CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

ÚVOD

Glutathion je ve většině organismů vyskytující se tripeptid, který byl objeven v roce 1921 F. G. Hopkinsem (Hopkins, 1921). Jeho systematickým názvem je L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine. Ve své molekule obsahuje –SH skupinu, která je velice reaktivní (Kizek, a kol., 2004). V živých organismech se vyskytuje v redukované (GSH) a oxidované formě (GSSG) (Obr.1) (Meister a Anderson, 1983).

Obr. 1 Strukturální vzorec (A) redukovaného a (B) oxidovaného glutathionu.



Při působení stresových faktorů dojde k celkové buněčné odpovědi. (Cullinan, a kol., 2003) Důsledkem této aktivace stresovým faktorem dojde ke snížení syntézy bílkovin a zvýšení syntézy glutathionu. Ten má hlavní roli pro umožnění tvorby přirozených disulfidových vazeb, ale také vyrovnává redoxní reakce, a tím chrání buňky před oxidativním stresem. Je tedy považován za jeho marker oxidativního stresu (Chakravarthi, a kol., 2006). Pro kvantifikaci thiolových sloučenin je nezbytná efektivní redukce disulfidických vazeb (Hansen, a kol., 2007). Mezi v současné době nejpoužívanější redukční činidla se řadí ditiotritol (DTT) (Han a Han, 1994), sodium borohydrid (Hansen, a kol., 2007) a zejména tris-(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP). TCEP je činidlo redukující –SH skupiny (Visser, a kol., 2004) a jako takové má pro tento účel mnoho výhod. Jeho redukční vlastnosti lze využít pro vzorky v širokém rozmezí pH, a to od 1,5 do 11,1 pH. Je vysoce rozpustný ve vodných roztocích, netěkavý a vykazuje lepší reprodukovatelnost než další podobná redukční činidla patřící do této skupiny (Krijt, a kol., 2001), jako jsou tributylfosfin (TBP) a trifenyfosfin (TPP) (Alwael, a kol., 2010). Pro stabilizaci tiolových sloučenin a tím pádem kvantitativní detekci se také využívá přidavek kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA) v různých koncentracích (Guo, a kol., 2009, Visser, a kol., 2004). Jedná se o polyaminokarboxylovou kyselinu obsahující čtyři

karboxylové skupiny a dvě aminoskupiny. Vyznačuje se chelatačními vlastnostmi, kdy sice ionty kovů zůstávají v roztoku, ale vykazují nižší reaktivitu (Banfi, a kol., 2007) a tudíž je potlačeno přispění kovů ke katalýze oxidace GSH na GSSG. Tato práce je zaměřena na optimalizaci redukce GSSG na GSH za použití redukčního činidla TCEP a chelatačního činidla EDTA. Pro stanovení celkového glutathionu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Standard oxidovaného a redukováného glutathionu, cystein i standardy redukčních činidel byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Standardy fytochelatinů (PC₂, PC₃, PC₄ a PC₅) byly zakoupeny od firmy Clonostar (Brno, Česká republika) K přípravě standardních roztoků byla použita voda ACS čistoty (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje InoLab pH 730 WTW (Weilheim, Germany).

Podmínky HPLC-ED analýzy

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001-9,999 ml min⁻¹) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 × 4.6; 3,5 μm velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen ze dvou průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA). Každá komůrka obsahuje čtyři analytické cely. Jedna analytická cela obsahuje dvě referentní (hydrogen paladiové), dvě pomocné a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor je uložen v řídicím modulu, jehož celý prostor je termostatován. Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8 °C. Kolona byla termostatována na 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml·min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny trifluoroctové (80 mM) a B: 100% Met-OH. Látky byly eluovány následujícím lineárně vzestupným gradientem:

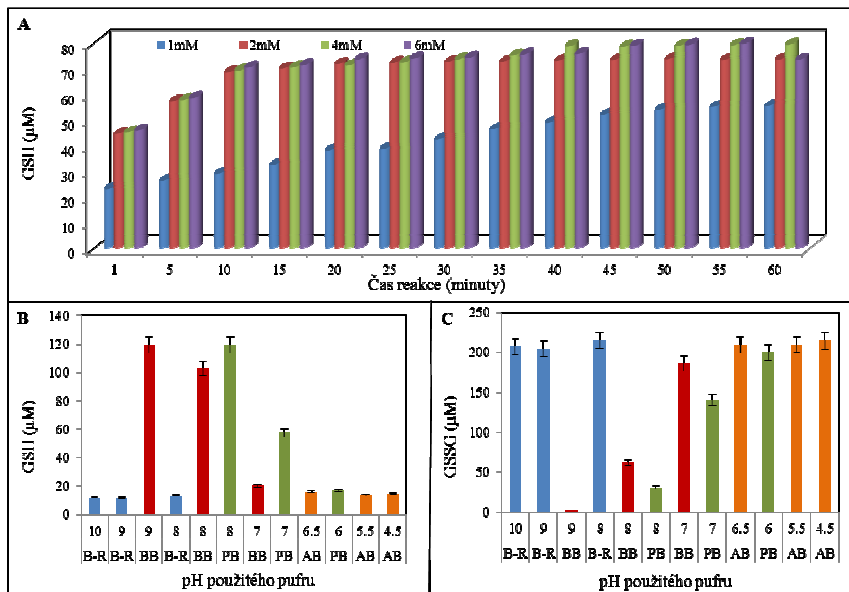
Gradient pro stanovení GSH a GSSG: 0 - 1 min (3 % B), 1 → 2 min (10 % B), 2 → 5 min (30 % B), 5 → 6 min (98 % B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900 mV. Doba jedné analýzy byla 20 minut.

Gradient pro stanovení thiolů: 0 - 7 min (3 % B), 8 → 15 min (15 % B), 25 min (30 % B), 28 → 33 min (98 % B), 37 → 45 min (3 % B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900 mV. Doba jedné analýzy byla 45 minut (Diopan, a kol., 2010).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V prvním kroku optimalizace jsme zaměřili pozornost na dobu působení redukčního činidla na 100 μM standard GSSG a současně na koncentraci TCEP, jež bylo rozpuštěno v borátovém pufru o pH 9. Podmínka borátového pufru byla odvozena z literatury (Kizek, a kol., 2004). Hodnocení výtěžnosti reakce probíhalo tak, že přidaná známá koncentrace GSSG byla při variantních podmínkách redukována na GSH jehož výsledná hodnota byla chromatograficky analyzována stejně jako koncentrace zbytkového GSSG. Z výsledků uvedených na Obr. 2A je patrné, že vhodných podmínek je docíleno již v koncentraci TCEP 2 mM při době reakce 15 minut. Při těchto nevhodnějších podmínkách byl v dalším kroku optimalizace porovnáván vlivů jednotlivých pufrů. Mezi testované pufrы byly pufrы zvoleny tak, aby byla pokryta celá pracovní škála pH daného pufru a to zejména pokud to bylo možné, v bazické oblasti. Byly tedy použity pufr Britton-Robinson (pH 10, 9 a 8), borátový pufr (pH 9, 8 a 7), fosfátový pufr (pH 9, 8 a 7) a acetátový pufr (pH 6,5; 5,5 a 4,5). Po analýze všech těchto variant bylo patrné, že obsah GSH uvedený na Obr. 2B je nejvyšší při použití borátového pufru pH 9, a také u fosfátového pufru pH 8. Je zde patrný i fakt, že pH pufru není jedinou rozhodující vlastností, která má vliv na redukci, jelikož u pufru Britton-Robinson, který byl použit v stejných pH, jako dva nevhodnější pufrы došlo jen k nepatrné redukci. Na Obr. 2C je uvedena zbytková koncentrace GSSG po redukci. Díky těmto hodnotám byl jako nevhodnější zvolen borátový pufr pH 9, jelikož obsah GSSG po redukci byl zanedbatelný. Z výsledků vyplývá, že borátový i fosfátový pufr o nižších pH neposkytuje vhodné podmínky pro redukci, stejně jako pufrы Britton-Robinson a acetátový pufr, které mají ve svých pH téměř srovnatelné výsledky, které ukazují na nevhodnost jejich použití.

Obr. 2 (A) Vliv doby reakce na redukci GSSG (100 μ M) na GSH, při každé době použity různé koncentrace TCEP v borátovém pufru pH 9. (B) Vliv pufrů Britton-Robinson (B-R), Boratový pufr (BB), Fosfátový pufr (PB) a Acetátový pufr (AB) o různých pH na koncentraci GSH, které je redukováno z GSSG. Jako redukční činidlo bylo použito 2 mM TCEP a koncentrace GSSG byla 200 μ M. (C) Zůstatek GSSG po redukci 2 mM TCEP z 200 μ M GSSG v prostředí různých pufrů.



Dále byl testován i přidavek chelatačního činidla EDTA (aplikované koncentrace 2; 1; 0,5 a 0,1 mM), která je v literatuře uváděna jako vhodné chelatační činidlo (Guo, a kol., 2009, Visser, a kol., 2004). Podle našich stanovení nevykazovalo téměř žádný vliv na kvalitu redukce u použitých standardů. Lze však předpokládat, že vliv EDTA při použití redukce u reálných vzorků bude patrný. Při získaných optimálních podmínkách byla měřena kalibrační řada a sestrojena kalibrační křivka. Redukční kalibrační křivka je lineární v rozsahu 0,4 – 200 μ M GSSG, hodnoceno dle redukovaného GSH. Dále byla provedena analýza směšného standardu thiolových sloučenin podle naší předchozí publikace (Diopan, a kol., 2010) při optimálních podmínkách a následovalo jejich porovnání s analýzou v původních neoptimalizovaných podmínkách. Z porovnání vyplývá, že hodnoty thiolových sloučenin jsou při použití optimalizovaných podmínek redukce srovnatelné, nebo vyšší, nežli při použití původních podmínek. Dalším rozdílem je, že GSSG není na chromatogramu patrné vůbec, tzn., že došlo k celkové redukci GSSG na GSH.

ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo optimalizovat podmínky pro redukci GSSG na GSH. Účinnost redukce byla hodnocena pomocí HPLC-ED, kdy bylo po provedení redukce analyzováno množství GSH a zbytkové GSSG. Při použití optimalizovaných podmínek, kterými bylo použité redukční činidlo TCEP o koncentraci 2 mM v prostředí borátového pufru o pH 9, doba inkubace vzorku 15 minut, dochází k téměř úplné redukci GSSG na GSH. Limit detekce vstupního GSSG je 60 nM a maximální koncentrace GSSG, které je možné při těchto podmínkách redukovat na 200 μ M, což je pro další použití v reálných vzorcích dostatečné. Dále jsme zjistili, že optimalizované podmínky nemají negativní vliv na detekci dalších thiolových sloučenin.

LITERATURA

Alwael H., Connolly D., Barron L., Paull B. (2010): Development of a rapid and sensitive method for determination of cysteine/cystine ratio in chemically defined media. *Journal of Chromatography A*, 1217(24): 3863-3870.

Banfi G., Salvagno G. L., Lippi G. (2007): The role of ethylenedimine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(5): 565-576.

Cullinan S. B., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R. J., Diehl J. A. (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20): 7198-7209.

Diopan V., Shestivska V., Zitka O., Galiova M., Adam V., Kaiser J., Horna A., Novotny K., Liska M., Havel L., Zehnalek J., Kizek R. (2010): Determination of Plant Thiols by Liquid Chromatography Coupled with Coulometric and Amperometric Detection in Lettuce Treated by Lead(II) Ions. *Electroanalysis*, 22(11): 1248-1259.

Guo X. F., Wang H., Guo Y. H., Zhang Z. X., Zhang H. S. (2009): Simultaneous analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a new probe, 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamido)difluoroboradiazas-indace ne. *Journal of Chromatography A*, 1216(18): 3874-3880.

Han J. C., Han G. Y. (1994): A procedure for quantitative-determination of tris (2-carboxyethyl) phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol *Analytical Biochemistry*, 220(1): 5-10.

Hansen R. E., Ostergaard H., Norgaard P., Winther J. R. (2007): Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical Biochemistry*, 363(1): 77-82.

Hopkins F. G. (1921): On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem J*, 15(2): 286-305.

Chakravarthi S., Jessop C. E., Bulleid N. J. (2006): The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *Embo Reports*, 7(3): 271-275.

Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Jelen F. (2004): Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Bioelectrochemistry*, 63(1-2): 19-24.

Krijt J., Vackova M., Kozich V. (2001): Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: Advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*, 47(10): 1821-1828.

Meister A., Anderson M. E. (1983): Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52(711-760).

Visser C. C., Voorwinden L. H., Harders L. R., Eloualid M., Van Bloois L., Crommelin D. J. A., Danhof M., De Boer A. G. (2004): Coupling of metal containing homing devices to liposomes via a maleimide linker: Use of TCEP to stabilize thiol-groups without scavenging metals. *Journal of Drug Targeting*, 12(9-10): 569-573.

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANTS IN SERUM SAMPLES

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ HLADINY NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ANTIOXIDANTŮ V SÉRU

Kračmarová A.¹, Sochor J.^{2,3}, Adam V.^{2,3}, Kizek R.^{2,3}, Pohanka M.^{1,2}

¹Centre of Advanced Studies and Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kracmarova@pmfhk.cz; miroslav.pohanka@gmail.com

ABSTRACT

The objective of the experiment was to establish and optimize an electrochemical method of low molecular weight antioxidants` assay using square wave voltammetry performed on screen printed sensors with carbon working electrodes. The potential range of square wave voltammetry was 0 - 1.1 V. The optimal values for the assay, potential step 5 mV, amplitude 5 mV, frequency 1 Hz and volume of sample 20 µl, were found. The linearity and sensitivity of the method were verified by standard antioxidants - ascorbic acid, trolox, N-acetylcysteine and melatonin. The suitability for low molecular weight antioxidants` assay in human serum samples was confirmed by standard ferric reducing antioxidant power test (FRAP). Limits of detection were 0.3 mmol/l for ascorbic acid, 0.04 mmol/l for melatonin, 0.03 mmol/l for trolox, and 0.07 mmol/l for N-acetylcysteine. There was apparent a strong correlation between square wave voltammetry and the FRAP value as the correlation coefficient was 0.9778.

Key words: electrochemistry; antioxidant; screen printed sensor; ascorbic acid.

Acknowledgments: SV/201203

ÚVOD

Cílem práce bylo zavést a optimalizovat jednoduchou metodu stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru pomocí elektrochemické metody – tzv. SW voltametrie (z angl. square-wave). Tato metoda byla později použita pro stanovení hladiny nízkomolekulárních antioxidantů ve vzorcích séra ve studii zabývající se mimo jiné hodnocením oxidační rovnováhy onkologických pacientů.

Nízkomolekulární antioxidanty jsou sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které mají schopnost snadno se oxidovat. Přirozeně se vyskytují v organizmech, kde je jejich úkolem vycíhat a následně zneškodňovat vznikající volné radikály. Spolu s některými enzymy, jako je glutathionreduktasa nebo superoxid dismutasa tak tvoří antioxidační systém organismu. Mezi nejvýznamnější nízkomolekulární antioxidanty patří např. tokoferol, retinol, kyselina askorbová, glutathion, cystein, kyselina močová (Finaud *et al.* 2006; Kohen *et al.* 2004; Szarka *et al.* 2012).

Změna koncentrace nízkomolekulárních antioxidantů svědčí o aktivaci antioxidační obrany organismu. Je-li organismus vystaven oxidačnímu stresu, antioxidační systém se aktivuje a hladina nízkomolekulárních antioxidantů se zvýší. Pokud míra oxidačního stresu vyčerpá kapacitu antioxidačního systému, dojde naopak ke snížení hladiny antioxidantů. V takovém případě je oxidační homeostáza v organismu narušená a může dojít k oxidativnímu poškození citlivých tkání (Vovk *et al.* 2005). Stanovení celkové hladiny nízkomolekulárních antioxidantů nám tudíž může poskytnout cenné informace o stavu oxidační rovnováhy organismu a kapacitě antioxidačního systému v situacích, kdy se předpokládá, že došlo k oxidačnímu stresu (Pohanka *et al.* 2010). Mezi takové situace patří např. expozice některým lékům či otravným látkám nebo některá onemocnění (např. kardiovaskulární, neurodegenerativní, nádorová onemocnění) (Tsakanova *et al.* 2011; Vostálová *et al.* 2012).

Elektrochemické techniky stanovení antioxidační aktivity tvoří atraktivní alternativu k zavedeným spektrofotometrickým metodám (Sochor *et al.* 2010, 2011). SW voltametrie je jedna z nejcitlivějších elektrochemických analytických technik používaných pro přímé stanovení řady redoxně aktivních látek (Dogan-Topal *et al.* 2010; Masarik *et al.* 2011). Byla použita např. pro stanovení kyseliny askorbové (Kumar, Vicente-Beckett 2012), současné stanovení kyseliny askorbové, dopaminu a kyseliny močové v moči (Tian *et al.* 2012), současné stanovení kyseliny listové a *N*-acetylcysteinu (Salmanipour *et al.* 2012), při vývoji biosenzoru pro stanovení měďnatých iontů (Lin *et al.* 2012), senzoru pro stanovení pentachlorofenolu ve vodě (Remes *et al.* 2012), pro stanovení dopaminu v lidském séru (Rattanarat *et al.* 2012), při stanovení antioxidačního potenciálu různých druhů ovoce (Komorsky-Lovrić, Novak 2011), nebo pro určení antioxidační síly biomasy tvořené mikroskopickými řasami (Goiris *et al.* 2012). SW voltametrie sleduje, podobně jako jiné voltametrické techniky, závislost procházejícího proudu na vkládaném proměnlivém potenciálu. Oxidace stanovovaných látek se na křivce, jež tuto závislost vyjadřuje, projeví vznikem tzv. anodické vlny. Specifický potenciál, při němž anodická vlna vzniká, poskytuje kvalitativní informaci, plocha anodické vlny informuje o kvantitě analytu. Mezi hlavní výhody

měření pomocí SW voltametrie na sítotiskových senzorech patří rychlé a jednoduché provedení, které nevyžaduje předchozí úpravu biologického vzorku a rovněž nízká spotřeba vzorku. Na druhou stranu je metoda zatížená nižší reprodukovatelností a obtížnější interpretací výsledků.

MATERIÁL A METODIKA

Práce byla provedena na elektrochemickém analyzátoru PalmSens (Elmstat, Houston, Nizozemsko) se softwarem PSLite (PalmSens) a sítotiskových senzorech s uhlíkovou pracovní a pomocnou elektrodou a stříbrnou srovnávací elektrodou nanesených na keramické platformě (Metrohm, Herisau, Švýcarsko).

Na vodorovně upevněný senzor bylo pipetováno 20 μl (resp. 30 μl a 40 μl) vzorku tak, aby se všechny elektrody spojily. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů 0 - 1,1 V. Potenciálový skok byl postupně nastavován na 1, 3, 5, 10 mV, amplituda na 5, 10, 20, 30, 50, 100 mV a frekvence na 1, 2 a 4 Hz. Po změření standardů bylo vybráno nastavení analyzátoru s nejlepší odezvou. Toto nastavení bylo po té použito pro analýzu vzorků séra, které byly nanášeny přímo na senzor bez předchozí úpravy.

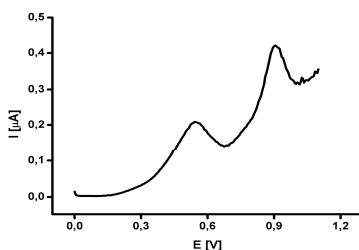
Kalibrační křivky (závislost plochy anodické vlny na koncentraci standardu) byly získány změřením roztoků zvolených standardních antioxidantů kyseliny askorbové (Penta, Praha), (S)-trolox metyletheru, melatoninu a *N*-acetyl-L-cysteinu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Standardní roztoky v rozsahu koncentrací od 0,010 do 10 mmol/l byly připraveny rozpuštěním kyseliny askorbové a *N*-acetyl-L-cysteinu v 0,1 mol/l fosfátovém pufru v koncentracích 0,010 – 10,00 mmol/l. (S)-trolox metylether a melatonin byly nejprve rozpuštěny v 1 ml etanolu (96% w/w) a následně naředěny 0,1 mol/l fosfátovým pufrům v rozmezí koncentrací 0,01 – 10,00 mmol/l. Získané kalibrační křivky byly vytvořeny a zpracovány pomocí lineární regrese za použití statistického softwaru Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Z kalibrační křivky byl metodou podle Hubauxe a Vose určen limit detekce pro jednotlivé antioxidanty (Hubaux, Vos 1970; O'Neill *et al.* 2002).

Zda je metoda vhodná pro stanovení antioxidantů ve vzorcích séra, bylo ověřeno porovnáním se standardní spektrofotometrickou metodou FRAP (z angl. ferric reducing antioxidant power) založenou na schopnosti antioxidantů redukovat železité ionty na železnaté. Stanovení FRAP bylo provedeno postupem zavedeným na našem pracovišti, který byl již dříve publikován (Benzie, Strain 1996; Pohanka *et al.* 2010). Tytéž vzorky vzniklé přidávkem 5 μl standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 0,10 - 0,50 - 1,0 - 5,0 a 10 mmol/l do 50 μl séra byly analyzovány pomocí SW voltametrie i FRAP. Ve statistickém softwaru byl vytvořen graf vyjadřující závislost příslušných ploch anodických vln na absorbancích naměřených metodou FRAP a vypočítán korelační koeficient *r*.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro měření na senzoru s uhlíkovou pracovní elektrodou bylo zvoleno nastavení analyzátoru s potenciálovým skokem a amplitudou 5 mV při frekvenci 1 Hz. Nebylo zaznamenáno ovlivnění stanovení objemem naneseného vzorku, na senzor bylo tedy z důvodu úspory séra nanášeno 20 μl . Jak je patrné na obrázku číslo 1, který představuje příklad voltamogramu lidského séra, nízkomolekulární antioxidanty vyskytující se v séru a plazmě se projevují vznikem dvou anodických vln při dvou různých specifických potenciálech, což odpovídá dříve publikovaným pozorováním (Komorsky-Lovrić, Novak 2011; Pohanka *et al.* 2010).

Obr. 1 Voltamogram získaný měřením vzorku lidského séra



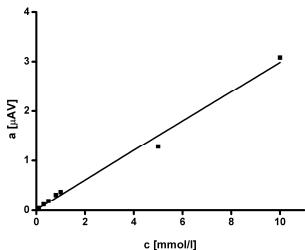
V tabulce číslo 1 se nachází korelační koeficienty r kalibračních křivek a vypočítané limity detekce pro jednotlivé použité standardní antioxidanty. Kalibrační křivka pro kyselinu askorbovou, melatonin a trolox byla lineární v rozsahu koncentrací od 0,010 mmol/l do 10 mmol/l s korelačním koeficientem přesahujícím 0,9861 (melatonin). Kalibrační závislost pro *N*-acetylcystein se podařilo změřit pouze v koncentracích od 0,010 mmol/l do 1,0 mmol/l, protože při vyšších koncentracích docházelo k přílišné polarizaci elektrody. Závislost byla rovněž lineární s korelačním koeficientem 0,9954. Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů naměřené v lidském séru tento koncentrační rozsah nepřesahovaly. Limity detekce standardních antioxidantů se pohybovaly v rozmezí 0,03 mmol/l (trolox) - 0,3 mmol/l (kyselina askorbová).

Tab. 1 Korelační koeficienty (r) kalibračních křivek a limity detekce (LOD) pro jednotlivé standardní látky

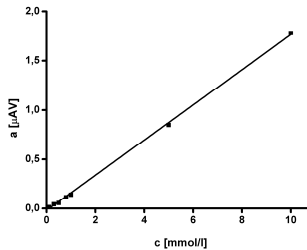
Standardní antioxidant	r	LOD [mmol/l]
Kyselina askorbová	0,9995	0,3
Trolox	0,9861	0,03
Melatonin	0,9953	0,04
<i>N</i> -acetylcystein	0,9954	0,07

Obr. 2 Kalibrační křivky pro vybrané antioxidanty, a = plocha anodické vlny, c = koncentrace standardu

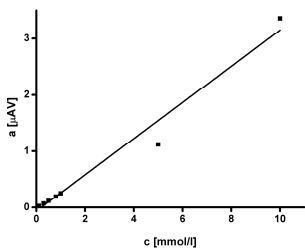
Trolox



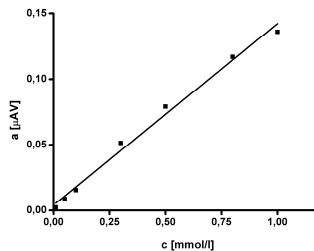
Kyselina askorbová



Melatonin

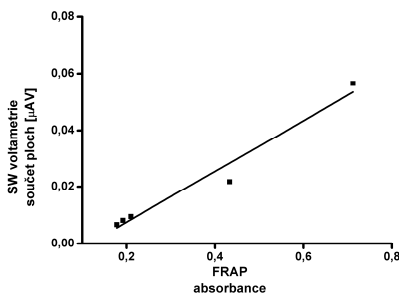


N-acetylcystein



Použitá voltametrická metoda dobře korelovala (korelační koeficient $r=0,9778$) se standardní metodou FRAP, jak je vyjádřeno na obrázku 3. Rovněž jiné práce zabývající se stanovením nízkomolekulárních antioxidantů pomocí SW voltametrie uvádějí dobrou korelaci mezi těmito metodami (Goiris *et al.* 2012).

Obr. 3 Korelace SW voltametrie a metody FRAP – na ose x absorbance naměřená metodou FRAP, na ose y součet ploch anodických vln získaných SW voltametrií



ZÁVĚR

Byla zavedena a optimalizována elektrochemická technika stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v lidském séru s použitím SW voltametrie na síťotiskových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou. Pomocí několika zástupců nízkomolekulárních antioxidantů, které se obvykle vyskytují v organismu (kyselina askorbová, *N*-acetylcystein, melatonin) nebo jejich ekvivalentů (trolox), byla ověřena citlivost metody a její lineární odpověď v dostatečném koncentračním rozsahu. Zda je metoda vhodná pro stanovení antioxidantů v séru, bylo ověřeno pomocí standardní metody FRAP, s níž byla prokázána dobrá korelace. Popsaná metoda představuje alternativu dříve optimalizovaným postupům založeným na spektrofotometrii.

LITERATURA

- Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70–76.
- Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. (2010): The analytical applications of square wave voltammetry on pharmaceutical analysis. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, 3: 56-73.
- Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006): Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N. Z.)*, 36(4): 327-358.
- Goiris K., De Vreese P., De Cooman L., Muylaert K. (2012): Rapid screening and guided extraction of antioxidants from microalgae using voltammetric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, Jul 17. [Epub ahead of print].
- Hubaux A., Vos G. (1970): Decision and detection limits for linear calibration curves. *Analytical Chemistry*, 42: 849-855.

Kohen R., Oron M., Zekowicz A., Kanevsky E., Farfour S., Wormser U. (2004): Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: an age dependent phenomenon in the rat. *Experimental Gerontology*, 39: 67–72.

Komorsky-Lovrić Š., Novak I. (2011): Abrasive stripping square-wave voltammetry of blackberry, raspberry, strawberry, pomegranate, and sweet and blue potatoes. *Journal of food science*, 76(6): doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02256.x. [Epub ahead of print].

Kumar S., Vicente-Beckett V. (2012): Glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes for the determination of ascorbic acid by square-wave voltammetry. *Beilstein journal of nanotechnology*, 3: 388–396.

Lin M., Hu X., Ma Z., Chen L. (2012): Functionalized polypyrrole nanotube arrays as electrochemical biosensor for the determination of copper ions. *Analytica Chimica Acta*, 746: 63–69.

Masarik M., Gumulec J., Sztalmachova M., Hlavna M., Babula P., Krizkova S., Ryvolova M., Jurajda M., Sochor J., Adam V., Kizek R. (2011): Isolation of metallothionein from cells derived from aggressive form of high-grade prostate carcinoma using paramagnetic antibody-modified microbeads off-line coupled with electrochemical and electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 32 (24): 3576-3588.

O'Neill D. T., Rochette E. A., Ramsey P. J. (2002): Method detection limit determination and application of a convenient headspace analysis method for methyl tert-butyl ether in water. *Analytical chemistry*, 74(22): 5907-5911.

Pohanka M., Band'ouchová H., Vlčková K., Žďárová Karasová J., Kuča K., Damková V., Pecková L., Vitula F., Pikula J. (2010): Square wave voltammetry on screen printed electrodes: comparison to ferric reducing antioxidant power in plasma from model laboratory animal (Grey Partridge) and comparison to standard antioxidants. *Journal of applied biomedicine*, 9: 103–109.

Rattanarat P., Dungchai W., Siangproh W., Chailapakul O., Henry C. S. (2012): Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Analytica Chimica Acta* 744: 1– 7.

Remes A., Pop A., Manea F., Baciu A., Picken S. J., Schoonman J. (2012): Electrochemical determination of pentachlorophenol in water on a multi-wall carbon nanotubes-epoxy composite electrode. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(6): 7033-7046.

Salmanipour A., Taher M. A., Beitollahi H., Hosseinzadeh R. (2012): New voltammetric strategy for simultaneous determination of N-acetylcysteine and folic acid using a carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102: 385– 390.

Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R. (2010): Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules*, 15: 8618-8640.

Sochor J., Skutkova H., Babula P., Zitka O., Cernei N., Rop O., Krska B., Adam V., Provaznik I., Kizek R. (2011): Mathematical evaluation of the amino acid and polyphenol content and antioxidant activities of fruits from different apricot cultivars. *Molecules*, 16: 7428-7457.

Szarka A., Tomasskovic B., Bánhegyi G. (2012): The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *International journal of molecular sciences*, 13(4): 4458-4483.

Tian X., Cheng C., Yuan H., Du J., Xiao D., Xie S., Choi M. M. F. (2012): Simultaneous determination of l-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles- β -cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry. *Talanta*, 93: 79– 85.

Tsakanova G. V., Ayvazyan V. A., Boyajyan A. S., Arakelova E. A., Grigoryan G. S., Guevorkyan A. A., Mamikonyan A. A. (2011): A comparative study of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke aggravated and not aggravated by type 2 diabetes mellitus. *Bulletine of experimental biology and medicine*, 151(5): 564-566.

Vostálová J., Galandáková A., Strebl P., Zdražil J. (2012): Oxidative stress in patients on regular hemodialysis and peritoneal dialysis. *Vnitřní lékařství*, 58(6): 466-472.

Vovk T., Bogataj M., Roškar R., Kmetec V., Mrhar A. (2005): Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector. *International Journal of Pharmaceutics*, 291: 161–169.

ELECTROCHEMICAL DETECTION OF QUANTUM DOTS USED AS A TOOL FOR LABELLING INFLUENZA DERIVED OLIGONUCLEOTIDE

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE KVANTOVÝCH TEČEK POUŽITÝCH JAKO NÁSTROJ PRO ZNAČENÍ SPECIFICKÉHO CHRÍPKOVÉHO OLIGONUKLEOTIDU

Krejčová L.¹, Hynek D.^{1,2}, Kopel P.^{1,2}, Adam V.^{1,2}, Hubálek J.^{2,3}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Microelectronics, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: lidakrejцова@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this study was designed hybridization assay consisting of probe modified magnetic particles (MPs) and specific oligonucleotide labeled by quantum dots (QDs), and their application in the detection of avian influenza virus (H5N1) respectively influenza derived oligonucleotide (ODN). There were two basic steps used in the assay: (i) isolation of specific oligonucleotide (target) by anti-sense bounded MPs and (ii) target detection by QDs marker. It was optimized the efficiency of hybridization temperatures between anti senses and target influenza oligonucleotide. QDs labeled target was detected by electrochemical analysis. Our results show that MPs based automatic isolation together with electrochemical detection is available tool for influenza detection.

Key words: voltammetry, quantum dots, influenza, oligonucleotide, nanoparticles, automatic isolation hybridization assay, electrochemistry

Acknowledgments: Financial support from the projects NANIMEL GA CR 102/08/1546 IGA TP 6/2012 and CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 is gratefully acknowledged.

ÚVOD

Chřipka je infekční onemocnění způsobené RNA viry z čeledi Orthomyxoviridae. Chřipkové viry způsobují akutní infekční onemocnění horních cest dýchacích (Osterholm a Henderson, 2012, Peiris, a kol., 2012) a šíří se kapénkovou infekcí v sezónních epidemiích. Vakcína proti chřipce existuje, ale nechrání očkovaného jedince po celý život, je účinná pouze jeden rok a to díky mutačním změnám, které změně strukturu viru během jednoho roku tak, že použití stejné vakcíny i následující rok by bylo neúčinné (Feng, a kol., 2011, Ghendon, 1994). Chřipkové viry (respektive jejich povrchové antigeny) velmi snadno podléhají mutačním změnám prostřednictvím antigenního driftu a shiftu. Díky těmto změnám může snadno dojít k vytvoření nového chřipkového subtypu jako v případě varianty H5N1 (HPAI - highly pathogenic avian influenza). Extrémně nakažlivá a nebezpečná onemocnění, mezi které HPAI bezpochyby patří, vyžadují neustálý vývoj rychlejších a spolehlivějších metod detekce (Fouchier, a kol., 2012, Karlas, a kol., 2010, Peiris, a kol., 2012).

Pro izolaci cílové DNA jsou často využívány hybridizační testy (založené na hybridizaci sonda + cílová molekula DNA), které pro izolaci DNA používají sondou modifikované magnetické částice (MPs) (Elghanian, a kol., 1997, Katz a Willner, 2004). MPs jsou považované za vhodný nástroj pro izolaci cílové DNA (Ahmed, a kol., 1992, Ossendorp, a kol., 1989, Xu, a kol., 2003). Výhodou magnetické izolace je možnost modifikovat povrch MPs a tím snížit adsorbenci interferujících látek z matrice vzorku (Drbohlavova, a kol., 2009, Hsing, a kol., 2007).

Pro detekci DNA se často využívá vazby dvou afinitních látek, např.: biotin-avidin, protein (substrát)-enzyme, antigen-protilátka. Další možností detekce je použití fluorescenční značky nebo jiných opticky aktivních látek jako jsou kvantové tečky (QDs) (Hicks, 1984, Lim, a kol., 2009). QDs jsou stále častěji využívány jako fluorescenční značky k detekci cílových molekul a to díky svým unikátním optickým vlastnostem a širokému spektru použití (Agrawal, a kol., 2007, Bakalova, a kol., 2005, Peterson, a kol., 2001, Ryvolova, a kol., 2011, Steel, a kol., 2000). Pro naši aplikaci nebyly důležité optické vlastnosti QDs, ale elektroaktivita jejich kovové části. Elektroaktivitu nevykazují pouze kovy, ale i některé látky biologického původu, mezi tyto látky patří i DNA. K detekci cílové molekuly (QDs značeného chřipkového oligonukleotidu) byla vybrána elektrochemická analýza. Byly použity dvě voltametrické metody. Pro stanovení kovové části QDs byla vybrána metoda diferenční pulsní voltametrie (DPV) (Bruland, 1992, Manivannan, a kol., 2004). Pro stanovení chřipkového oligonukleotidu byla vybrána metoda square wave voltametrie (SWV).

Detekce DNA je důležitou součástí diagnostiky virových, bakteriálních a geneticky vázaných onemocnění (Wang, a kol., 2003). V současné době je právě elektrochemie považována za jednu z

nejcitlivějších metod pro detekci nukleových kyselin. Přímá detekce DNA je mnohem méně efektivnější než detekce DNA značené pomocí QDs (Drbohlavova, a kol., 2009). Využití elektrochemického značení pro citlivější detekci otevírá nové možnosti pro diagnostiku DNA a pro bioanalýzu obecně (Wang, a kol., 2003).

Cílem naší studie byla izolace a detekce SH značeného specifického chřipkového oligonukleotidu pomocí CdS kvantových teček.

MATERIÁL A METODIKA

1. Příprava CdS kvantových teček

Chemikálie a oligonukleotidy, které jsou popsány ve studii byly objednány od firmy Sigma – Aldrich (St.Louis, USA). CdS QDs byly připraveny podle modifikované metody (Li, a kol., 2007). Dusičnan kademnatý $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03085 g, 0.1 mM) byl rozpuštěn v ACS vodě (25 ml). 3-merkaptopropionová kyselina (35 μl , 0,4 mM) byla za stálého míchání postupně přidávána do roztoku. Poté bylo pH upraveno na 9.11 pomocí 1M NH_3 (1.5 ml). Sulfid sodný $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,02402 g, 0,1 mM) byl rozpuštěn ve 23 ml ACS vody a potom byl přiléván do prvního roztoku za stálého míchání. Získaly jsme žlutý roztok CdS QDs, který byl skladován v temnu při teplotě 4 °C.

2. Příprava CdS značeného chřipkového oligonukleotidu (ODN-SH-Cd)

ODN-SH H5N1 5'-Th CTTCTTCTCTCTCCTTGAGG -3' (100 μl , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) byl smíchán s roztokem CdS QDs (100 μl). Směs obou roztoků byla míchána po dobu 24 h při pokojové teplotě (Vortex Genie2 (Scientific Industries, USA)). Následně byl roztok dialyzován proti 2000 ml milíQ vody (24 h, 4 °C) na membránovém filtru Millipore 0.025 μm VSWP. Během dialýzy byl roztok zředěn na objem 800 μl . Zředěný roztok byl následně zakoncentrován na 500 μl finálního objemu s využitím odstředivého filtračního zařízení Amicon Ultra 3k (Millipore). Nakonec byl vzorek centrifugován (5417R (Eppendorf, Německo)) s následujícími podmínkami 15 min, 4500 rpm, 15 °C.

3. Automatická izolace ODN-SH-Cd

Pro izolaci chřipkového oligonukleotidu byla použita automatická pipetovací stanice EP motion 5075 (Eppendorf, Německo) s originálním vybavením.

V izolačním procesu byly použity tyto pufrы: fosfátový pufr I: 0,1 M NaCl + 0,05 M Na_2HPO_4 + 0,05 M NaH_2PO_4 ; fosfátový pufr II: 0,2 M NaCl + 0,1 M Na_2HPO_4 + 0,1 M NaH_2PO_4 ; hybridizační roztok: 100 mM Na_2HPO_4 + 100 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 0,6 M Guanidium thiocyanát, 0,15 M Trizma. pH tohoto roztoku bylo upravené pomocí HCl na hodnotu 7,5.

Postup izolace byl následující: 10 μl magnetických částic Dynabeads Oligo dT₂₅ (Invitrogen, Norsko) bylo napipetováno do jamek v mikrodestičce (PCR 96, Eppendorf, Německo). Destička byla přenesena na magnet a byl odpipetován uchovávácí roztok z částic. Poté byly částice třikrát promyty 20 μl fosfátového pufru I. Po promytí částic následovala první hybridizace. 10 μl poly A

modifikovaného anti sense H5N1 oligonucleotidu a 10 μ l hybridizačního pufru bylo napipetováno do jamek v destičce a směs byla inkubována (15 min, 25 °C, pipetování). Následovalo trojitě promytí 20 μ l fosfátovým pufrům I a potom druhá hybridizace: 10 μ l kadmíem značeného H5N1 oligonukleotidu a 10 μ l hybridizačního pufru bylo přidáno do jamek a směs byla opět inkubována (15 min, 25 °C, pipetting), následovalo trojnásobné promytí 20 μ l fosfátového pufru I. V posledním kroku bylo do jamek přidáno 30 μ l elučního roztoku (fosfátový pufr II) a směs byla inkubována (5 min, 85 °C). Po eluci (uvolnění cílové molekuly od magnetických částic) byla destička přenesena na magnet a eluční produkt z každé jamky byl přenesen do nové jamky. Tento postup byl navržen v souladu s našimi předchozími publikacemi (Adam, a kol., 2010, Huska, a kol., 2009, Janicek, a kol., 2010).

4. Metody pro detekci CA a Cd píku (ODN-SH-Cd)

Všechna měření byla provedena v elektrochemické cele ve standardním tříelektrodeovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita rtuťová (HMDE) elektroda, jako referenční argentchloridová (Ag/AgCl/3M KCl) elektroda a jako pomocná uhlíková elektroda. Měření probíhalo v prostředí acetátového pufru (0,2 M CH_3COOH + 0,2 M CH_3COONa (pH 5.0)) a při teplotě 25 °C. Před každým měřením byly vzorky probublány pomocí argonu (99,99%, 120 s). K elektrochemické detekci byla použita následující zařízení: 663 VA Stand, 800 Dosino, 846 Dosing Interface (Metrohm, Švýcarsko) a výsledky byly zpracovány pomocí softwaru GPES.

K detekci CA píku byla použita metoda square wave voltametrie (SWV) s následujícími parametry: počáteční potenciál 0 V; koncový potenciál -1,85 V; frekvence 10 Hz; potenciálový krok 0,005 V; amplituda 0,025 V.

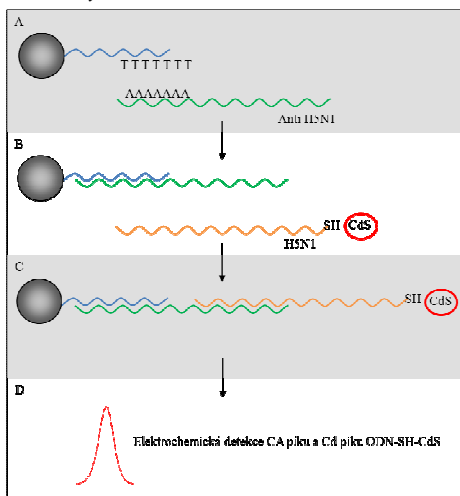
Pro elektrochemickou detekci Cd píku byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV). Parametry detekce byly následující: počáteční potenciál -0,9 V; koncový potenciál -0,45 V; depoziční potenciál -0,9 V; délka depozice 240 s; equilibrační čas 5 s; modulační čas 0,06; časový interval 0,2 s; potenciálový krok 0,002 V; modulační amplituda 0,025.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla navržena a popsána metoda založená na izolaci a detekci specifické DNA značené kvantovými tečkami (CdS). K izolaci DNA byly použity magnetické částice, jejichž povrch byl modifikován sondou (anti sense řetězec). Tato metoda byla aplikována pro izolaci a detekci subtypu ptačí chřipky (H5N1 chřipkového oligonukleotidu). Hybridizační komplex se skládal ze čtyř kroků: (i) vazba poly T modifikovaných MPs s poly A modifikovanou sondou (anti-sense oligonukleotid), vazba mezi MPs a sondou byla vytvořena díky komplementaritě T a A bází, (ii) CdS QDs značení cílového oligonukleotidu, (iii) zachycení CdS značeného chřipkového oligonukleotidu, a (iiii) elektrochemické detekce kovové části QDs pomocí DPV a elektrochemická detekce chřipkového oligonukleotidu (Obr. 1).

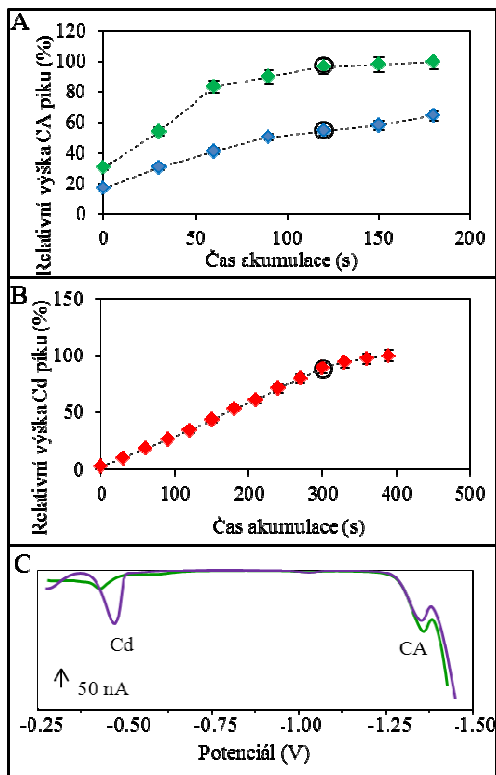
Příprava CdS kvantových teček (Cd QDs) byla prvním krokem experimentální části. Dalším krokem bylo označení chřípkového oligonukleotidu pomocí QDs (CdS). Posledním krokem byla plně automatizovaná metoda izolace spojená s elektrochemickou detekcí chřípkového oligonukleotidu (ODN-SH-Cd).

Obrázek č.1: Schéma izolace a detekce H5N1 oligonukleotidu (ODN-SH-CdS). A – vazba Anti H5N1 řetězce (sonda) na magnetické částice díky A-T komplementaritě, B + C – vazba ODN-SH-Cd na magnetické částice na které byl navázán Anti H5N1, D – elektrochemická detekce ODN a Cd.

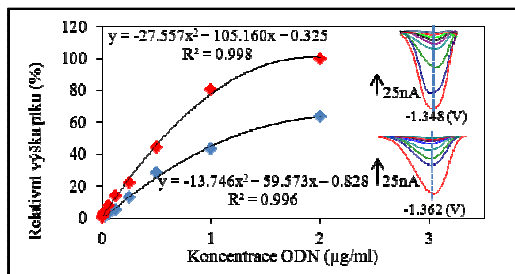


Pro detekci ODN-SH-Cd byla vybrána elektrochemická analýza. Pro studium tohoto komplexu byly použity dvě voltametrické metody. Pro kadmium (Cd pík) byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) a pro detekci oligonukleotidu square wave voltametrie (SWV). Pro obě metody byl optimalizován čas akumulace (CA pík 120s, Cd pík 300s) (Obrázek č.2). Následovalo stanovení limitu detekce pro CA pík (0.0019 $\mu\text{g/ml}$ ODN-SH-Cd) (Obrázek č.3) a Cd pík (0.0157 $\mu\text{g/ml}$ ODN-SH-Cd) (Obrázek č.4).

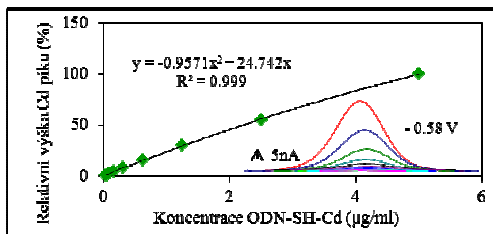
Obrázek č.2: Část A: Optimalizace času akumulace (s) pro CA pík ODN-SH (♦) a ODN-SH-Cd (♦). Část B: Optimalizace času akumulace (s) pro Cd pík ODN-SH-Cd (♦); koncentrace obou ODN byla 2µg/ml. Pro detekci CA píku byla použita metoda SWV, pro detekci Cd píku DPV. Část C: Porovnání reálných voltamogramů ODN-SH (-) a ODN-SH-Cd (-).



Obrázek č.3: Limit detekce pro CA pík (♦) ODN-SH a (◆) ODN-SH-Cd. Počáteční koncentrace obou ODN byla 2μg/ml.



Obrázek č.4: Limit detekce pro Cd pík (◆)ODN-SH-Cd. Počáteční koncentrace ODN byla 2μg/ml.

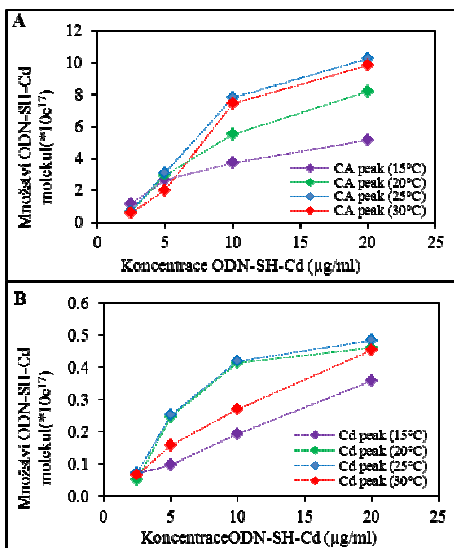


Electrochemická charakterizace oligonukleotidu (ODN-SH) a značeného oligonukleotidu (ODN-SH-Cd) (Obrázek č.2, Část C) prokázala značné rozdíly mezi voltamogramy. Na ODN-SH voltamogramu můžeme pozorovat jen jeden pík - CA pík (potenciál: -1.348 ± 0.002 V). Na ODN-SH-Cd voltamogramu můžeme pozorovat dva píky. První pík odpovídá kadmii (Cd pík - potenciál: -0.58 ± 0.005 V) a druhý, odpovídající nukleové kyselině - CA pík (potenciál: -1.362 ± 0.002 V). Byl pozorován rozdíl mezi CA píkem značeného i neznačeného oligonukleotidu. ODN bez QDs vykazuje větší a užší CA pík, než je tomu u značeného ODN. Také pozice CA píku se lišila (QDs značený ODN: -1.362 V, neznačený ODN: -1.348 V) (Obrázek č.3). Jediný rozdíl mezi oligonukleotidy spočíval ve vazbě CdS na 5' SH značený konec ODN. Z toho vyplývá, že změna signálu CA píku musí být způsobena vazbou CdS, ale tento jev zatím není zcela vysvětlen.

Hybridizační proces je ovlivněn řadou podmínek, jako teplota, čas, míchání, pH a složení hybridizačního pufru. Naším cílem byla optimalizace teploty hybridizační reakce. Hybridizační reakce byla celkem čtyřikrát opakována a to při těchto teplotách: 15 °C; 20 °C; 25 °C and 30 °C (Obrázek č. 5). Jako nejefektivnější byla vybrána teplota 25 °C. Tato teplota byla mnohem

efektivnější, než teplota 30 °C, a to z důvodu toho, že teplota tání (T_m) chřípkového oligonukleotidu byla 28°C.

Obrázek č.5: Část A: Detekce množství ODN-SH-Cd molekul ($*10e^{17}$) jako funkce počáteční koncentrace ODN-SH-Cd ($\mu\text{g/ml}$) před hybridizací vztahené k CA píku. Část B: Množství ODN-SH-Cd molekul ($*10e^{17}$) jako funkce koncentrace ODN-SH-Cd ($\mu\text{g/ml}$) vztahené k Cd píku.



Sledovaným parametrem a indikátorem této optimalizace byly výška CA a Cd píku. Se stoupající teplotou (do 25 °C) roste účinnost hybridizace cílové molekuly (ODN-SH-Cd) a díky tomu i výška CA a Cd píku. Větší citlivost na teplotní změny během hybridizace vykazuje detekované kadmium z QDs značky než samotný oligonukleotid. Značení cílových molekul pomocí kvantových teček ve spojení s izolací pomocí MPs představuje unikátní a citlivý analytický nástroj.

ZÁVĚR

Byla navržena a optimalizována metoda pro izolaci kadmíem značeného chřípkového oligonukleotidu s využitím automatické pipetovací stanice. Byl pozorován účinek hybridizační teploty (druhá hybridizace) na výšku detekovaného CA a Cd píku. S rostoucí teplotou se zvyšovala účinnost hybridizace a tím i výška CA a Cd píku. Nárůst výšek obou píků byl pozorován pouze do teploty tání hybridizovaného oligonukleotidu, jejíž hodnota byla v našem případě 28°C. Navržený a optimalizovaný postup, založený na izolaci sondou modifikovaných MPs, by mohl být použit jako miniaturizovaný elektroanalytický nástroj pro rychlou detekci cílového oligonukleotidu.

LITERATURA

Adam V., Huska D., Hubalek J., Kizek R. (2010): Easy to use and rapid isolation and detection of a viral nucleic acid by using paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed electrodes. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(3): 329-339.

Agrawal A., Sathe T., Nie S. M. (2007): Single-bead immunoassays using magnetic microparticles and spectral-shifting quantum dots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10): 3778-3782.

Ahmed A. R. H., Olivier G. W. J., Adams G., Erskine M. E., Kinsman R. G., Branch S. K., Moss S. H., Notarianni L. J., Pouton C. W. (1992): Isolation and partial-purification of a melanocyte-stimulating hormone receptor from B 16 murine melanoma-cells-a novel-approach using a cleavable biotinylated photoactivated ligand and streptavidin- coated magnetic beads. *Biochemical Journal*, 286(377-382).

Bakalova R., Zhelev Z., Ohba H., Baba Y. (2005): Quantum dot-conjugated hybridization probes for preliminary screening of siRNA sequences. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32): 11328-11335.

Bruland K. W. (1992): Complexation of cadmium by natural organic ligands in the central north pacific. *Limnology and Oceanography*, 37(5): 1008-1017.

Drbohlavova J., Adam V., Kizek R., Hubalek J. (2009): Quantum dots - Characterization, preparation and usage in biological systems. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(2): 656-673.

Drbohlavova J., Hrdy R., Adam V., Kizek R., Schneeweiss O., Hubalek J. (2009): Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. *Sensors*, 9(3): 2352-2362.

Elghanian R., Storhoff J. J., Mucic R. C., Letsinger R. L., Mirkin C. A. (1997): Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329): 1078-1081.

Feng Z. L., Towers S., Yang Y. D. (2011): Modeling the Effects of Vaccination and Treatment on Pandemic Influenza. *Aaps Journal*, 13(3): 427-437.

Fouchier R. a. M., Herfst S., Osterhaus A. (2012): Restricted Data on Influenza H5N1 Virus Transmission. *Science*, 335(6069): 662-663.

Ghendon Y. (1994): Introduction to pandemic influenza through history. *European Journal of Epidemiology*, 10(4): 451-453.

Hicks J. M. (1984): Fluorescence immunoassay. *Human Pathology*, 15(2): 112-116.

Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T. (2007): Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, 19(7-8): 755-768.

Huska D., Hubalek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnkova L., Havel L., Kizek R. (2009): Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection. *Talanta*, 79(2): 402-411.

- Janicek Z., Huska D., Trnkova L., Provaznik I., Hubalek J., Kizek R. (2010): Isolation of DNA by the help of robotized detection on paramagnetic particles. *J. Biochem. Technol.*, 2(5): S87-S88.
- Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K. P., Artarini A., Heuer D., Becker D., Khalil H., Ogilvie L. A., Hess S., Maurer A. P., Muller E., Wolff T., Rudel T., Meyer T. F. (2010): Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 463(7282): 818-U132.
- Katz E., Willner I. (2004): Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(45): 6042-6108.
- Li H., Shih W. Y., Shih W. H. (2007): Synthesis and characterization of aqueous carboxyl-capped CdS quantum dots for bioapplications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(7): 2013-2019.
- Lim S. H., Bestvater F., Buchy P., Mardy S., Yu A. D. C. (2009): Quantitative Analysis of Nucleic Acid Hybridization on Magnetic Particles and Quantum Dot-Based Probes. *Sensors*, 9(7): 5590-5599.
- Manivannan A., Kawasaki R., Tryk D. A., Fujishima A. (2004): Interaction of Pb and Cd during anodic stripping voltammetric analysis at boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta*, 49(20): 3313-3318.
- Ossendorp F. A., Bruning P. F., Vandenbrink J. a. M., Deboer M. (1989): Efficient selection of high-affinity B-cell hybridomas using antigen- coated magnetic beads. *Journal of Immunological Methods*, 120(2): 191-200.
- Osterholm M. T., Henderson D. A. (2012): Life Sciences at a Crossroads: Respiratory Transmissible H5N1. *Science*, 335(6070): 801-802.
- Peiris J. S. M., Poon L. L. M., Guan Y. (2012): Surveillance of Animal Influenza for Pandemic Preparedness. *Science*, 335(6073): 1173-1174.
- Peterson A. W., Heaton R. J., Georgiadis R. M. (2001): The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Research*, 29(24): 5163-5168.
- Ryvolova M., Chomoucka J., Janu L., Drbohlavova J., Adam V., Hubalek J., Kizek R. (2011): Biotin-modified glutathione as a functionalized coating for bioconjugation of CdTe based quantum dots. *Electrophoresis*, 32(13): 1619-1622.
- Steel A. B., Levicky R. L., Herne T. M., Tarlov M. J. (2000): Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophysical Journal*, 79(2): 975-981.
- Wang J., Liu G. D., Merkoci A. (2003): Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, 125(11): 3214-3215.
- Xu H. X., Sha M. Y., Wong E. Y., Uphoff J., Xu Y. H., Treadway J. A., Truong A., O'brien E., Asquith S., Stubbins M., Spurr N. K., Lai E. H., Mahoney W. (2003): Multiplexed SNP genotyping

using the Qbead (TM) system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Research*, 31(8).

STUDY COVALENT INTERACTIONS FRAGMENT Λ DNA WITH CISPLATIN

STUDIUM KOVALENTNÍCH INTERAKCÍ FRAGMENTU Λ DNA S CISPLATINOU

Nejdl L.¹, Sochor J.^{1, 2}, Jílková E.¹, Šmerková K.¹, Ryvolová M.^{1, 2}, Adam V.^{1, 2}, Kizek R.^{1, 2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: LukasNejd@gmail.com

ABSTRACT

This work was focused on monitoring of covalent cisplatin bonding with lambda DNA fragment. The PCR fragment with a length of 498 bp and 100 μ M cisplatin infusion solution was used. Interactions of DNA fragment were observed electrophoretically and spectrophotometrically. Experiments show, that during denaturation, cisplatin significantly reduces the melting temperature of DNA fragment. The average melting temperature was determined to 71 °C. After addition of cisplatin (100 μ M), temperature decreased by 15 °C on average.

Key words: DNA, cytostatic drugs, cisplatin, temperature melting, spectrophotometry, electrophoresis, electrochemistry

Acknowledgments: This work was supported by NanoBioTECell Czech Science Foundation P102/11/1068, IGA TP 6/2012 and CYTORES Czech Science Foundation P301/10/1068.

ÚVOD

Cisplatinu je jedním z nejběžnějších cytostatik využívaných při chemoterapii především nádorových onemocnění (Wang a Lippard, 2005). Úspěšnost komplexů platiny v protinádorové terapii je dána jejich schopností vázat se koordinační vazbou k bázím DNA za tvorby různých typů kovalentních vazeb (Chang, a kol., 2012). Právě vznik těchto vazeb má za následek ovlivnění sekundární struktury DNA a tím blokadu důležitých buněčných procesů jako je replikace či transkripce (Theile, a kol., 2012). Nejčastěji se vyskytující vazbou, která se v DNA vytváří, je vazba spojující dvě bezprostředně sousedící báze v jednom řetězci DNA, přednostně zbytky guaninu (Pierceall, a kol., 2012). Tyto změny vedou k nemožnosti dělení buněk. Další změny jsou pak rozpoznávány vazbou proteinů k DNA, která je modifikována cisplatinou, a tak zprostředkovávají protinádorový efekt tohoto léčiva (Davidson, a kol., 2012, Farnebo, a kol., 2009). Vstup cisplatinu do buňky je umožněn zejména pasivní difúzí, ale existují i důkazy, že z části může být přenesena také aktivním transportem pomocí transportního systému Ctr1, který kontroluje homeostázi mědi (Mitchell, a kol., 2007, Oehlsen, a kol., 2005, Summa, a kol., 2007, Williams, a kol., 2007). Přestože v souvislosti s tímto protinádorovým léčivem bylo již vypracováno mnoho studií (Dospivova, a kol., 2012, Krizkova, a kol., 2007, Kukacka, a kol., 2008, Stejskal, a kol., 2007), stále není znám přesný mechanismus účinku tohoto léčiva.

Cílem našeho experimentu bylo studovat interakce cisplatinu s DNA, naší snahou bylo určit, jakým způsobem je vlivem různých koncentrací cisplatinu ovlivněna teplota tání DNA.

MATERIÁL A METODIKA

Amplifikace a izolace DNA fragmentu

Při amplifikaci byl použit Taq PCR kit a DNA (New England BioLabs, USA). Sekvence přímého primeru byla 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' a sekvence zpětného primeru byla 5'-TCCGGATAAAAACGTCGATGACATTTGC-3' (Sigma-Aldrich, USA). PCR probíhala za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C/120 s; 25 cyklů denaturace při 95 °C/15 s, annealing při 64 °C/15 s, extenze při 72 °C/45 s a závěrečná extenze při 72 °C /5 min. Vzniklý fragment o délce 498 bp byl purifikován od zbytku PCR směsi pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany). Koncentrace DNA byla zjištěna spektrofotometricky (Specord 210, Analytic Jena, Německo).

Příprava vzorku (PCR-DNA s cisplatinou)

Fragment DNA o koncentraci 5 μM byl smíchán s cisplatinou 100 μM, poté se odstranila kovalentně nenavázaná cisplatinu pomocí kolonky (Amicon Ultra – 0,5 ml 3K) a centrifugy (5417R, Ependorf) při 14000 RPM po dobu 10 min. Následně byl vzorek doplněn ACS vodou do

původního objemu (200 μ l) před centrifugací. Takto připravený vzorek byl zkoumán pomocí gelové elektroforézy a spektrofotometrie.

Agarózová gelová elektroforéza

Byl připraven 1% agarozový gel (Mercury, USA), který byl nařezán na úzké proužky, jež obsahovaly 3 jamky, následně byl přenesen do elektroforetické vany, která obsahovala TAE pufr. Vzorky byly připraveny s 5% (v/v) bromfenolovou modří a 3% glycerolem. Vzorky byly napípetovány v 5 μ l alikvotech do gelu. DNA žebříček (New England BioLabs, USA) byl veliký od 0.1-1.5 kbp a byl použit pro pozorování velikosti analyzovaného DNA fragmentu. Elektroforéza (Bio-rad, USA) probíhala při 100 V a 6 °C po dobu 60 minut. Po separaci byl gel barven roztokem gel greenem (5 μ l na 100 ml gelu). Proužky byly vizualizovány pomocí gelového projektoru při vlnové délce 312 nm (Vilber-Lourmant, France).

Spektrofotometrické stanovení

Interakce PCR-DNA s cisplatinou (100 μ M) byla sledována za pomoci spektrofotometru (SPECORD S600, Analytic Jena, Německo) s detektorem z diodového pole. Nejprve byl proveden sken DNA a DNA s přidanou cisplatinou (100 μ M) v rozsahu $\lambda = 200 - 400$ nm, poté se vzorky denaturovaly. Denaturace probíhala v plně automatizovaném systému, který se skládal ze spektrofotometru (SPECORD S600, Analytic Jena, Německo), termostatu Peltier (Analytic Jena, Německo) řízeném počítačem a křemenných kyvet o optické dráze 1 cm. Při denuraci byla zaznamenávána absorbance při 260 nm každých 180 sekund v rozmezí teplot 23-89 °C (23, 26, 29, 32, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87 a 89 °C).

VÝSLEDKY A DISKUZE

DNA fragment (498 bp) byl smíchán s roztokem cisplatiny (Ebwe) o koncentraci 100 μ M. Poté byl napípetován do kolony (Amicon Ultra – 0,5 ml 3K) a odstředěn centrifugou (5417R, Eppendorf). Takto pročištěný vzorek byl podroben spektrofotometrickému a elektroforetickému zkoumání. Fragments DNA a DNA-cis-Pt byly elektroforeticky separovány na 1% agarosovém gelu. Kontrolní fragment DNA měl velikost 498 párů bazí. Komplex DNA s navázanou cis-Pt způsobil zpomalení separace fragmentu. Z tohoto důvodu se objevuje v oblasti, ve které je DNA o velikosti 600 párů bazí (obr. C). Interakci fragmentu DNA s cisplatinou dokazuje také spektrofotometrický záznam (obr. B), kde došlo k poklesu signálu (b), z důvodu navázání cisplatin (13,3 μ g/ml) na fragment DNA. Koncentrace navázané platiny byla zjištěna elektrochemicky. Dále bylo prokázáno, že cisplatinou významným způsobem snižuje teplotu tání při denuraci fragmentu DNA. Oddělení vodíkových vazeb (denaturace DNA) bylo sledováno pomocí hyperchromního efektu. Vlivem interakce elektronů v párových bazích roztoky dsDNA absorbují UV světlo (při 260 nm) méně, než stejná koncentrace bazí v mononukleotidech nebo v jednořetězcové DNA. Při zahřívání roztoku dsDNA, pak při určité teplotě absorbance náhle stoupne. Teplota, při které vzestup absorbance dosáhne své poloviny, se nazývá bod tání DNA (T_m). Absorbance jednotlivých teplot při

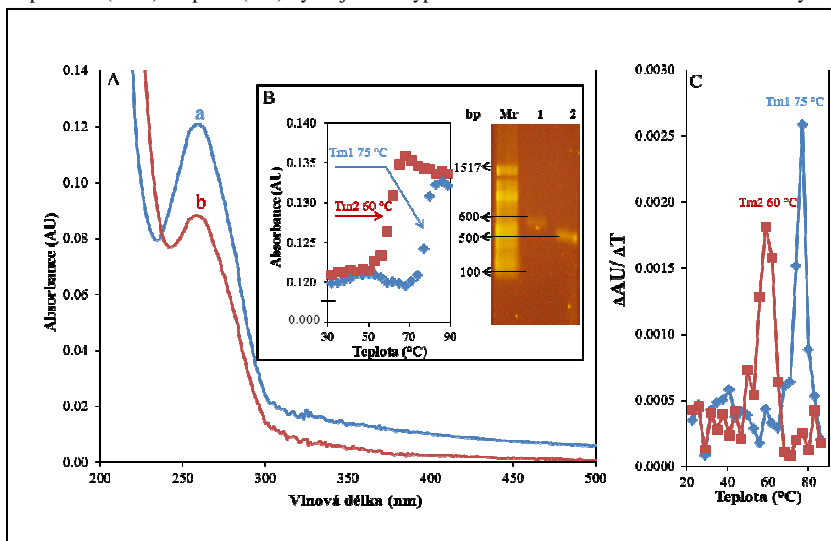
denaturaci byly zaneseny do grafu (obr. D), kde vytvořily typickou esovitou křivku, po derivaci hodnot jsme získali inflexní body (obr. C), které odpovídají T_m zkoumané DNA.

Průměrná teplota tání fragmentu DNA byla stanovena na 73 °C, po přidání cisplatiny (100 μM) teplota klesla v průměru o 15 °C, jak je vidět na obrázku 1B a 1C. Vliv délky interakce (0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min.) cisplatiny (100 μM) na změnu denaturační teploty (T_m) fragmentu DNA nebyl prokázán, ale se zvyšující se koncentrací cisplatiny došlo k poklesu T_m . (Obr. 2). Se zvyšující se aplikovanou dávkou cisplatiny se zvyšovalo navázané množství cisplatiny na fragment DNA. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1.

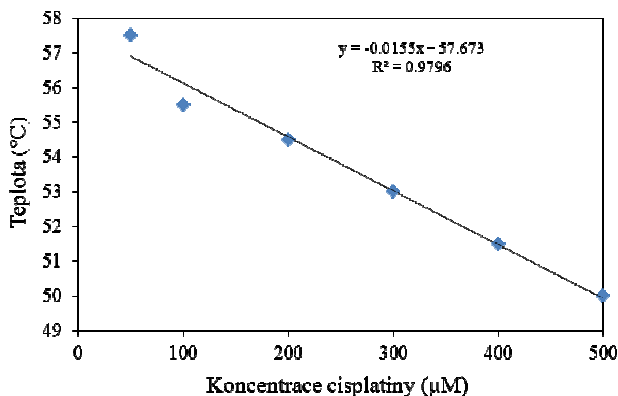
Tab. 1. Aplikovaná a navázaná cisplatina na fragment DNA

aplikovaná cisplatina (mM)	50	100	200	300	400	500
navázaná cisplatina (mM)	7,8	22,1	44,6	67,8	93,4	102,2

Obr. A) Spektrofotometrický záznam fragmentu DNA (a) a fragmentu DNA s cisplatinou (b) v rozsahu vlnových délek $\lambda = 200 - 500$ nm. B) Denaturace fragmentu DNA s vyznačenou teplotou tání fragmentu DNA ($T_{m1} = 75$ °C) a fragmentu DNA s cisplatinou ($T_{m2} = 60$ °C), dále elektroforetická separace DNA s cis-Pt (1 = 600 bp) a fragmentu DNA (2 = 500 bp) na 1% agarosovém gelu. C) Grafické znázornění teploty tání fragmentu DNA (T_{m1}) a fragmentu DNA s cisplatinou (T_{m2}). Teplota (T_m) byla zjištěna výpočtem inflexního bodu z denaturační křivky



Obr. 2. Závislost teploty denaturace (T_m) fragmentu DNA na koncentraci cisplatinu. Teplota klesá v průměru o 1,5 °C v závislosti na aplikované koncentraci cisplatinu (50, 100, 200, 300, 400 a 500 μM).



ZÁVĚR

Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritická a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. V našem experimentu bylo prokázáno, že cisplatin ovlivňuje teplotu tání bez ohledu na délku interakce s fragmentem DNA. Se zvyšující se koncentrací cisplatinu byla u DNA zaznamenána snižující se teplota tání.

LITERATURA

Davidson D., Grenier J., Martinez-Marignac V., Amrein L., Shawi M., Tokars M., Aloyz R., Panasci L. (2012): Effects of the novel DNA dependent protein kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage response to doxorubicin and cisplatin in breast cancer cells. *Investigational New Drugs*, 30(4): 1736-1742.

Dospivova D., Smerkova K., Ryvolova M., Hynek D., Adam V., Kopel P., Stiborova M., Eckschlager T., Hubalek J., Kizek R. (2012): Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(4): 3072-3088.

Farnebo L., Jedlinski A., Ansell A., Vainikka L., Thunell L. K., Grenman R., Johansson A. C., Roberg K. (2009): Proteins and single nucleotide polymorphisms involved in apoptosis, growth control, and DNA repair predict cisplatin sensitivity in head and neck cancer cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 24(4): 549-556.

Chang C. L., Lando D. Y., Fridman A. S., Hu C. K. (2012): Thermal stability of DNA with interstrand crosslinks. *Biopolymers*, 97(10): 807-817.

Krizkova S., Adam V., Petrova J., Zitka O., Stejskal K., Zehnalek J., Sures B., Trnkova L., Beklova M., Kizek R. (2007): A suggestion of electrochemical biosensor for study of platinum(II)-DNA interactions. *Electroanalysis*, 19(2-3): 331-338.

Kukacka J., Vajtr D., Fabrik I., Adam V., Prusa R., Kizek R. (2008): Effect of Cisplatin on Metallothionein Level in Rats. *Tumor Biology*, 29(60-60).

Mitchell C., Kabolizadeh P., Ryan J., Roberts J. D., Yacoub A., Curiel D. T., Fisher P. B., Hagan M. P., Farrell N. P., Grant S., Dent P. (2007): Low-dose BBR3610 toxicity in colon cancer cells is p53-independent and enhanced by inhibition of epidermal growth factor receptor (ERBB1)-Phosphatidylinositol 3 kinase signaling. *Molecular Pharmacology*, 72(3): 704-714.

Oehlsen M. E., Hegmans A., Qu Y., Farrell N. (2005): Effects of geometric isomerism in dinuclear antitumor platinum complexes on their interactions with N-acetyl-L-methionine. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(5): 433-442.

Pierceall W. E., Olausson K. A., Rousseau V., Brambilla E., Sprott K. M., Andre F., Pignon J. P., Le Chevalier T., Pirker R., Jiang C., Filipits M., Chen Y., Kutok J. L., Weaver D. T., Ward B. E., Soria J. C. (2012): Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. *Annals of Oncology*, 23(9): 2245-2252.

Stejskal K., Diopan V., Adam V., Beklova M., Havel L., Kizek R. (2007): Affecting of various plant models by cisplatin. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 123(9-10): 328-329.

Summa N., Maigut J., Puchta R., Van Eldik R. (2007): Possible biotransformation reactions of polynuclear Pt(II) complexes. *Inorganic Chemistry*, 46(6): 2094-2104.

Theile D., Detering J. C., Herold-Mende C., Dyckhoff G., Haefeli W. E., Weiss J., Burhenne J. (2012): Cellular Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship of Platinum Cytostatics in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Evaluated by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1): 51-58.

Wang D., Lippard S. J. (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4): 307-320.

Williams J. W., Qu Y., Bulluss G. H., Alvarado E., Farrell N. P. (2007): Dinuclear platinum complexes with biological relevance based on the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand. *Inorganic Chemistry*, 46(15): 5820-5822.

ISOLATION AND DETERMINATION OF LACTOFERRINE FROM HUMAN SALIVA USING PARAMAGNETIC PARTICLES

IZOLACE A STANOVENÍ LAKTOFERINU Z LIDSKÝCH SLIN POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC

Skaličková S.¹, Zítka O.¹, Křížková S.^{1,2}, Vlková M.³, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital, Pekařská 53, 656 91 Brno, Czech Republic

E-mail: sylvie.skalickova@gmail.com

ABSTRACT

Saliva is a watery substance produced in the mouths of human and most animals. The important compound of saliva is lactoferrin. It is involved in binding and transport of metal ions such as Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺. Because of these functions it has an antibacterial, anticarcinogenic and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to design a method based on isolation of lactoferrin from human saliva using paramagnetic particles to prepare bead-based complex with lactoferrin. This complex was subsequently determined by SFIA. Our results were correlated with ELISA using spectrophotometric detection. The limit of detection for lactoferrin was 0.4 µg.ml⁻¹. This method has the potential as a biosensor analysis.

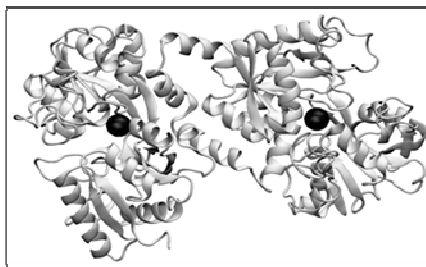
Key words: lactoferrin, ELISA, SFIA, biosensor

Acknowledgments: The work has been supported by CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and IGA FA MENDELU TP 6/2012.

ÚVOD

Sliny jsou směsí biologicky významných glykoproteinů, proteinů, enzymů, hormonů, minerálů, elektrolytů rozpuštěných ve vodě. Obsah vody a v ní rozpuštěných látek kolísá v závislosti na momentálním fyziologickém stavu organismu, přičemž tyto procesy jsou řízené vegetativním nervovým systémem na základě podmíněných a nepodmíněných reflexů (Humphrey a Williamson, 2001). Sliny se podílejí na trávení potravy, přenosu chuti k chuťovým pohárkům, zvlhčují dutinu ústní, mají antimikrobní, desinfekční a ochranné účinky (Amerongen a Veerman, 2002). Jednou z významných složek slin je laktoferin. Tento glykosylovaný protein, o molekulové hmotnosti 80 kD je složený z 692 aminokyselin (Rey, a kol., 1990) a jeho isoelektrický bod (pI) byl stanoven na 8 – 8,5 (Levay a Viljoen, 1995)(Lonnerdal a Iyer, 1995). Struktura laktoferinu je uspořádána do jednoduchého polypeptidového řetězce strukturovaného do dvou domén (Obr. 1). Ty jsou pak schopny vázat ionty kovů, nejčastěji Fe^{2+} nebo Fe^{3+} , ale také i ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+} (Levay a Viljoen, 1995),(Lonnerdal a Iyer, 1995). Výskyt tohoto proteinu byl zaznamenán u několika sekretů sliznic, (v mateřském mléce, slzách, krevní plazmě, slinách, potu spermatu či vaginálním výtoku) (Levay a Viljoen, 1995). V organismu plní důležitou funkci v nespecifickém imunitním systému díky jeho antimikrobní, antifungicidní a antivirulentní aktivitě, která je podmíněná schopností vázat kovové ionty, které většina bakterií vyžaduje pro svůj růst (Arslan, a kol., 2009). Zvýšení hladiny laktoferinu v krvi je často spojené se zánětlivými procesy probíhajícími v organismu (Sukharev, a kol., 2009).

Obr. 1: Struktura laktoferinu, která je uspořádána do jednoduchého polypeptidového řetězce strukturovaného do dvou domén.



Z biologického vzorku lze laktoferin izolovat díky podstatně odlišnému pI od pI proteinů ostatní matrice vzorku pomocí iontově výměnná chromatografie (Recio a Visser, 1999), (Uchida, a kol., 2003). Další využívané metody pro izolaci a purifikaci laktoferinu jsou enzymově značená imuno-analýza (Hutchens, a kol., 1989), afinitní membránová chromatografie (Wolman, a kol., 2007) či nověji pseudoafinitní chromatografie (Ng a Yoshitake, 2010). Kvantitativní stanovení se

nejčastěji provádí imunoseparačními metodami jako je ELISA (enzymově značená sorbent analýza), (Sato, a kol., 2000),(Shinmoto, a kol., 1997),(Yoshise, a kol., 2007), RIA (radioimunoanalýza), (Sykes, a kol., 1982)(Boxer, a kol., 1982) či LSA (luminiscenčně založená imunoanalýza) (Maacks, a kol., 1989). Pro tyto metody se limity detekce pohybují v rozmezí 10 ng.ml^{-1} – $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$. Literatura se však také zmiňuje o stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s limitem detekce $4,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Drackova, a kol., 2009), elektrochemicky s amperometrickou detekcí s limitem detekce 35 nM (Campanella, a kol., 2009), pomocí čipové elektroforézy nebo elektrochemie s modifikovanou skleněnou uhlíkovou elektrodou ($L_D = 1,3 \text{ nM}$) (Campanella, a kol., 2009).

Biomolekuly, jako je laktoferin lze izolovat pomocí paramagnetických částic, které v současné době nachází stále více využití v imunoanalytických metodách. Jejich výhodou oproti jiným značkám používaných v immunoassays je jejich velikost, která předurčuje stabilitu, nerozpadají se, nedegradují a jsou odolné vůči denaturaci a neutralizaci [17].

V této práci byla vyvinuta metoda pro izolaci proteinu laktoferinu z biologického vzorku za využití protilátkou modifikovaných paramagnetických částic. Účinnost jednotlivých izolačních kroků byla sledována s využitím spektrofotometrických a elektrochemických technik. Po provedení izolace byla konečná koncentrace izolovaného laktoferinu stanovena mikrofluidním elektrochemickým zařízením SFIA [18] jehož parametry byly také optimalizovány.

MATERIÁL A METODIKA

TMB, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , lidský IgG, NaCl, Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 a ostatní chemikálie v ACS kvalitě byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA), pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky laktoferinu (1 mg.ml^{-1}) byly připraveny v ACS vodě a uchovány ve tmě při -20°C . Polyklonální koží protilátka, monoklonální myší protilátka a kuřecí – HPR konjugát byl zakoupen z firmy SantaCruz Biotechnology (USA). Polyklonální králičí a myší konjugát s alkalickou fosfatázou byl zakoupen od firmy Dako (Německo). Magnetické mikročástice Dynabeads Protein G byly zakoupeny od Invitrogen (Norsko).

Příprava protilátek a jejich imobilizace na paramagnetické částice byla provedena dle manuálu výrobce (Invitrogen, Norsko). Magnetické částice s proteinem G (DB-G) ($25 \text{ } \mu\text{l}$) byly 2x promyty $100 \text{ } \mu\text{l}$ PBS puřem. Koží protilátka proti laktoferinu ($10 \text{ } \mu\text{g}$ in $100 \text{ } \mu\text{L}$ of PBS) byla inkubována s magnetickými částicemi 30 minut při laboratorní teplotě na multi-spin centrifuze MSC-3000 (Biosan, Litva). Poté za pomoci magnetu, který zadržel paramagnetické částice s navázaným komplexem, byl odstraněn supernatant. Částice byly opět promyty $100 \text{ } \mu\text{l}$ of PBS a zablokovány $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ nespecifickým lidským IgG 30 min na centrifuze. Po promytí paramagnetických částic byly resuspendovány ve $100 \text{ } \mu\text{l}$ PBS s $0,01 \text{ } \%$ Tween-20 a uchovány pro pozdější použití při 4°C .

SDS-PAGE byla provedena na Mini Protean Tetra elektroforetické vaně (Bio-Rad, USA). Gely byly připraveny z 30 % (*m/V*) akrylamidového zásobního roztoku s 1 % (*m/V*) bisakrylamidu. Před analýzou byly vzorky smíchány s neredukčním pufrům v poměru 2:1 a inkubovány při 93°C 3 min. Takto připravené vzorky byly nadávkovány přímo do gelu. K detekci molekulové hmotnosti vzorků byl použit proteinový ladder “Precision plus protein standards” (Biorad, USA). Elektroforéza probíhala při 150 V 1 h při laboratorní teplotě 23 °C (Power Basic, Biorad USA) v tris-glycinovém puru (0,025 M Trizma-base, 0,19 M glycin and 3,5 mM SDS, pH = 8,3). Následně byly gely obarveny stříbrem dle Krizkova et al. (Krizkova, a kol., 2009).

Pro elektrochemickou detekci HPR bylo použito miniaturizované mikrofluidní zařízení SFIA (Zitka, a kol., 2011). Systém byl složen z programovatelné nástřikové pumpy (Model eVol, SGE Analytical Science Pty Ltd, Austrálie), 3 cestného 2-pozičního ventilu (vytvořený z 6-cestného ventilu) (Valco, Instruments Co. Inc, USA), který pomocí dávkovací kapiláry dopravoval vzorek do elektrochemické průtokové cely, které byla složena z pracovní skelno uhlíkové elektrody, platinové pomocné elektrody a Ag/AgCl 3M KCl referenční elektrody (CH Instruments, Inc., USA) a z prototypu miniaturizovanéo mikropotenciostatu (910 PSTAT mini (Metrohm, Švýcarsko).

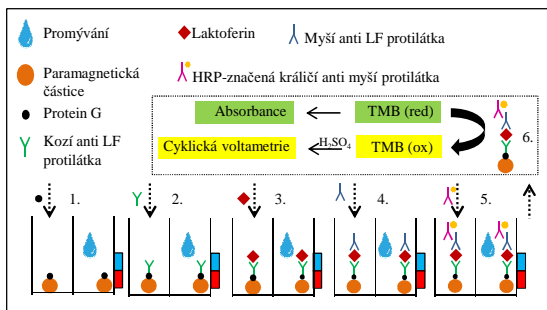
Vzorek o objemu 10 µl byl do systému injektován automatickou pipetou (SGE Analytical Science, Austrálie). Mezi jednotlivými analýzami byla elektrochemická cela promyta 200 µl vodným roztokem etanolu (75% *v/v*), a následně 200 µl 100% metanolu a stabilizována 200 µl elektrolytem (0,05 M uhličitánový pufr pH = 9,6). K analýze byla využita cyklická voltmetrie: cyklický sken od 0 mV do +1000 mV a zpět do 0 mV, rychlost skenu 20 mV/s.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Příprava komplexu protilátek s paramagnetickými částicemi

Základní experimentální schéma imunoseparace laktoferinu využívalo magnetickou separaci, kde byly magnetické částice modifikovány pomocí sandwich ELISA. Schéma komplexu protilátek s paramagnetickými částicemi pro izolaci laktoferinu je ukázáno na obrázku (Obr. 2). Na paramagnetické částice byl navázán protein G, na který byla poté navázána kozí protilátka. Následně byl do mikrotitrační destičky přidán laktoferin, který je afinitní ke kozí protilátce. V dalším kroku byla navázána myší protilátka. Ke vzniklému komplexu byla nakonec navázána křenová peroxidáza, která redukuje TMB. Výsledný produkt této reakce byl následně spektrofotometricky analyzován. Mezi jednotlivými kroky byl vznikající komplex promýván PBS aby byly odstraněny veškeré nenavázané molekuly.

Obr. 2: Schéma komplexu paramagnetické částice-laktoferin-protilátky. Na povrch paramagnetických částic pokrytých proteinem G byly imobilizovány polyklonální koží protilátky proti laktoferinu. Po vazbě laktoferinu byla pro jeho detekci použita monoklonální myší protilátka proti laktoferinu ve spojení s králičím konjugátem s HRP.

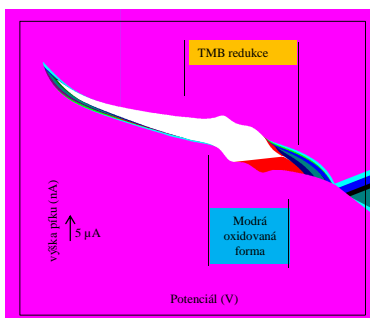


Pomocí SDS-PAGE byla ověřena použitelnost protilátek pro imunoextrakci standardů laktoferinu. V případě imunoextrakce analytu je nezbytné nejen to, aby se protilátka vážala na antigen, ale také, aby se na něj vážala dostatečně silně.

SFIA analýza TMB

Pro elektrochemickou analýzu TMB byla použita SFIA v uspořádání jak popisuje Zitka et al (Zitka, a kol., 2011) Charakterizace konverze 0,92 mM TMB v čase od 5 po 60 minutách byla provedena cyklickou voltametrií. Při proložení získaných votamogramů (Obr. 3) jsou vidět redukční píky v 0,250 V a 0,70 V. Jejich výška se postupně snižuje, k poklesu dochází již od 5 minuty reakce. Výška oxidačních píků v potenciálech 0,260 V a 0,280 V se mírně zvyšuje s delším časem reakce a to až do 20 min, kdy dochází k mírnému poklesu signálu. Je tedy zřejmé, že reakce je reverzibilní a s delší dobrou reakce dochází k poklesu signálu u oxidačních i redukčních píků. Pro analýzu 0,92 μM TMB byla provedena optimalizace akumulace pomocí DPV voltametrie. Z výsledků je patrné, že po 30 sekundách doby akumulace dochází k výraznému navýšení elektrochemického signálu. S delším časem akumulace (60 a 90 s) se již signál výrazně nemění, v 60 s mírně klesá a v 90 s je pozorováno opět navýšení. Naše snaha byla vyvinout senzitivní elektrochemickou detekci TMB, která bude zároveň časově méně náročná, proto byla vybrána doba akumulace 30 s. Následně byla sestrojena kalibrace redukčního signálu TMB v rozmezí 0,195 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která vykazovala polynomický trend $y = -0,1368x^2 + 45,825x + 101,33$, $R^2 = 0,9951$ a RSD = 6,7 % (n = 5). Limit detekce byl stanoven (3 S/N) 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro nástřik 5 μl .

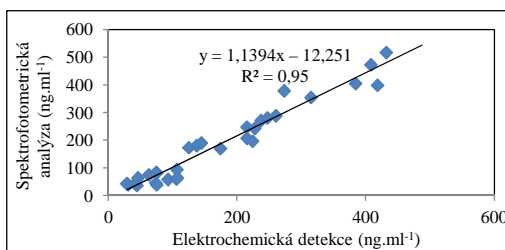
Obr. 3: Časová závislost konverze TMB ($0,16 \mu\text{M}$) v přítomnosti 30 % H_2O_2 , která je katalyzována HRP na TMB.



Korelace elektrochemické a spektrofotometrické detekce TMB

Korelace mezi koncentracemi laktoferinu ve standardech laktoferinu a lidských slinách zjištěnými pomocí spektrofotometrické a elektrochemické detekce standardu 1 a 3 byla určena metodou nejmenších čtverců s korelačním koeficientem $R^2 = 0,94$, což ukazuje na velmi dobrou shodu získaných výsledků. Srovnání spektrofotometrické a elektrochemické detekce je vyjádřeno následující rovnicí: spektrofotometrická detekce = $1,1394x$ elektrochemická detekce – 12,251. Z těchto výsledků vyplývá dobrá korelace mezi oběma metodami detekce na základě hodnoty $R^2 = 0,95$ (Obr. 4)

Obr. 4: Korelace mezi koncentracemi laktoferinu analyzovaných pomocí spektrofotometrie a SFIA



ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo vyvinout immunosensor pro detekci laktoferinu pomocí mikrofluidního zařízení SFIA s amperometrickou detekcí pro laktoferin, který byl testován na třech různých standardech (Sigma, Biopole a námi izolovaný laktoferin z lidských slin). Tato metoda vykazuje dobrou korelaci s dosud nejvyužívanější metodou pro stanovení laktoferinu v nízkých koncentracích – ELISOU.

LITERATURA

- Amerongen A. V. N., Veerman E. C. I. (2002): Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1): 12-22.
- Arslan S. Y., Leung K. P., Wu C. D. (2009): The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5): 411-416.
- Boxer L. A., Coates T. D., Haak R. A., Wolach J. B., Hoffstein S., Baehner R. L. (1982): Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function. *New England Journal of Medicine*, 307(7): 404-410.
- Campanella L., Martini E., Pintore M., Tomassetti M. (2009): Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors*, 9(3): 2202-2221.
- Drackova M., Borkovcova I., Janstova B., Naiserova M., Pridalova H., Navratilova P., Vorlova L. (2009): Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(S102-S104).
- Humphrey S. P., Williamson R. T. (2001): A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2): 162-169.
- Hutchens T. W., Henry J. F., Yip T. T. (1989): Purification and characterization of intact lactoferrin found in the urine of human milk-fed preterm infants. *Clinical Chemistry*, 35(9): 1928-1933.
- Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Using of chicken antibodies for metallothionein detection in human blood serum and cadmium-treated tumour cell lines after dot- and electroblotting. *Electrophoresis*, 30(21): 3726-3735.
- Levay P. F., Viljoen M. (1995): Lactoferrin - a general-review. *Haematologica*, 80(3): 252-267.
- Lonnerdal B., Iyer S. (1995): Lactoferrin - molecular-structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, 15(93-110).
- Maacks S., Yuan H. Z., Wood W. G. (1989): Development and evaluation of luminescence-based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial-infections in pediatric medicine. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 3(4): 221-226.
- Ng P. K., Yoshitake T. (2010): Purification of lactoferrin using hydroxyapatite. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(13-14): 976-980.

Recio I., Visser S. (1999): Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin - In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831(2): 191-201.

Rey M. W., Woloshuk S. L., Deboer H. A., Pieper F. R. (1990): Complete nucleotide-sequence of human mammary-gland lactoferrin. *Nucleic Acids Research*, 18(17): 5288-5288.

Sato R., Ohki K., Syuto B., Sato J., Naito Y. Plasma lactoferrin concentration measured by ELISA in healthy and diseased cows. *International Congress Series; Lactoferrin: Structure, function and applications*, 2000 (vol 1195).

Shinmoto H., Kobori M., Tsushida T., Shinohara K. (1997): Competitive ELISA of bovine lactoferrin with bispecific monoclonal antibodies. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61(6): 1044-1046.

Sukharev A. Y., Yermolayeva T. N., Beda N. A., Krylov G. F. (2009): Immunochemical studies of salivary lactoferrin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 4): 38-39.

Sykes J. a. C., Thomas M. J., Goldie D. J., Turner G. M. (1982): Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic-fibrosis. *Clinica Chimica Acta*, 122(3): 385-393.

Uchida T., Dosako S., Sato K., Kawakami H. (2003): Sequential separation of lactoferrin, lactoperoxidase, and secretory component by sulfate-linked ion-exchange chromatography. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 58(9-10): 482-486.

Wolman F. J., Gonzalez Maglio D., Grasselli A., Cascone O. (2007): One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, 288(1-2): 132-138.

Yoshise R. E., Matsumoto M., Chiji H., Kuwata H., Shin K., Yamauchi K., Tamura Y., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K. (2007): Profiles of bovine lactoferrin in the gastrointestinal tracts of rats as observed by ELISA, Western blotting and SELDI-affinity MS. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 62(4): 446-450.

Zitka O., Krizkova S., Krejcová L., Hynek D., Gumulec J., Masarik M., Sochor J., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kizek R. (2011): Microfluidic tool based on the antibody-modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients. *Electrophoresis*, 32(22): 3207-3220.

INVESTIGATION OF INTERACTION OF PLATINUM-BASED CYTOSTATIC DRUGS WITH DNA BY SANGER SEQUENCING

SLEDOVÁNÍ INTERAKCE PLATINOVÝCH LÉČIV S DNA POMOCÍ SANGEROVA SEKVENOVÁNÍ

Šmerková K.¹, Ryvolová M.^{1,2}, Krejčová L.¹, Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: k.smerkova@centrum.cz

ABSTRACT

Platinum-based cytostatic drugs such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin play an important role in the battle with cancer. The mechanism of their activity is widely studied and the quantification of the drug incorporated in the DNA structure is in the center of attention. In this study we investigated the behavior of the platinum-based cytostatic drug and DNA adducts during the well established Sanger sequencing method involving capillary electrophoretic (CE) separation. Three selected platinum-based cytostatic drugs (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin) were incubated with the DNA fragment (498 bp) to create adducts and subsequently sequenced. It was found that the fluorescence signal provided by fluorescently labeled DNA fragments decreased significantly depending on concentration of the drug. Moreover, even though four types of fluorescently labeled fragments are created during the sequencing reaction prior to the CE separation; similar decrease of the signal was observed in all of the fragment types. This suggests that cytostatic drugs do not influence the CE separation itself but the labeling sequencing reaction. Finally, the difference between three types of the cytostatic drugs was found. It follows from the results that to reach the signal decrease of 75% compared to the control DNA sample only 0.3 µg/ml of cisplatin is required. On the other hand, 7 and 75 µg/ml of oxaliplatin and carboplatin, respectively are required to reach the same effect. Our hypothesis was verified by electrochemical analysis and the highest amount of platinum was determined in the cisplatinated DNA sample followed by oxaliplatinated and carboplatinated DNA.

Key words: DNA, cytostatic drugs, cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, DNA sequencing

Acknowledgments: The work has been supported by IGA FA MENDELU IP 19/2012.

ÚVOD

Rakovina je hlavní příčinou zdravotních problémů ve vyspělých zemích, kde je každé čtvrté úmrtí způsobeno nádorovým onemocněním (Siegel, a kol., 2012). Při léčbě nádorů se velmi často využívají jako chemoterapeutika i platinová léčiva, mezi která patří cisplatina, oxaliplatin a karboplatina (Wang a Lippard, 2005). V roce 1965 objevil Rosenberg biologické působení prvního platinového cytostatika pojmenovaného cisplatina (*cis*-Diamminedichloroplatinum(II)) (Rosenberg, a kol., 1965), která je stále jednou z nejčastěji používaných cytotoxických látek. “Druhá generace” platinových léčiv - karboplatina (*cisdiammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate*) byla vyvinuta v 80. letech 20. století jako méně toxická alternativa cisplatin, slibující méně vážné vedlejší účinky (Go a Adjei, 1999). Cisplatina a karboplatina jsou velmi využívaná chemoterapeutika, která jsou zvláště účinná při léčbě rakoviny varlat, vaječníků, mozku, krku a plic. Nicméně cisplatina i karboplatina mají významné toxické a mutagenní účinky v buněčných kulturách a zvířecích modelových systémech (Adams, a kol., 1989, Holland, a kol., 1996). *In vivo* tvoří obě léčiva stejné Pt-DNA adukty a obecně je možné říci, že cisplatina není účinná ani na buněčné linie nebo nádory, které mají vyvinutou rezistenci ke karboplatině a naopak. Proto byla v 90. letech vyvinuta “třetí generace” – oxaliplatin (*(trans-R,R)*1,2-Diaminocyclohexaneoxalatoplatinum(II)), která nejen že umožňuje překonání rezistence k cisplatině a karboplatině (Grothey a Goldberg, 2004), ale navíc se zdá být méně mutagenní (Silva, a kol., 2005).

Již 35 let uplynulo od objevení elektroforetické metody sekvenování DNA využívající dideoxynukleotidy (Sanger, a kol., 1977). Sangerova technika sekvenování je založena na enzymatické syntéze řetězců DNA o různých délkách (Shendure, a kol., 2004). Replikace DNA probíhá až do místa inkorporace dideoxynukleotidu polymerázou, což ukončí syntézu kopií DNA (Eid, a kol., 2009). Tyto DNA produkty jsou pak elektroforeticky separovány a mohou být fluorescenčně detekovány. Sangerova metoda sekvenování je díky své přesnosti a efektivitě stále zlatým standardem ve výzkumu genomu (Guo, a kol., 2008). Analýzy Pt-DNA aduktů se běžně provádí pomocí elektrochemických metod (Dospivova, a kol., 2012, Krizkova, a kol., 2007), ale využití sekvenační reakce spojenou s gelovou kapilární elektroforézou znamená další možnost kvantifikace platinového cytostatika interkalovaného do DNA.

MATERIÁL A METODIKA

Amplifikace a izolace DNA fragmentu

Při amplifikaci byl použit *Taq* PCR kit a DNA izolovaná z bakteriofágu λ (New England BioLabs, USA). Sekvence přímého primeru byla 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' a sekvence zpětného primeru byla 5'-TCCGGATAAAAACGTGCGATGACATTTGC-3' (Sigma-Aldrich, USA). PCR probíhala za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C/120 s; 25 cyklů denaturace při 95 °C/15 s, annealing při 64 °C/15 s, extenze při 72 °C/45 s a závěrečná extenze při 72 °C /5 min. Vzniklý fragment o délce 498 bp byl purifikován od zbytku PCR směsi pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany). Koncentrace DNA byla zjištěna spektrofotometricky (Specord 210, Analytic Jena, Německo).

Interakce DNA s cytostatiky

Roztok fragmentu DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) byl smíchán s platinovými cytostatickými léčivy o různých koncentracích v poměru 1:1 (v/v) v prostředí 10 mM NaClO_4 . Byla použita tato léčiva: cisplatina (0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 4 $\mu\text{g/ml}$), oxaliplatin (10 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$; 30 $\mu\text{g/ml}$) a karboplatina (100 $\mu\text{g/ml}$; 150 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 300 $\mu\text{g/ml}$). Směs DNA s cytostatiky byla inkubována při 37°C po dobu 24 hodin (Thermomixer 5355, Eppendorf, Německo). Pro odstranění nenavázaného platinového léčiva byla následně u roztoku provedena dialýza oproti destilované vodě za použití 0,025 μm membrány (VSWP, Millipore, Irsko) po dobu 24 hodin při 6 °C.

Sekvenování platinované DNA

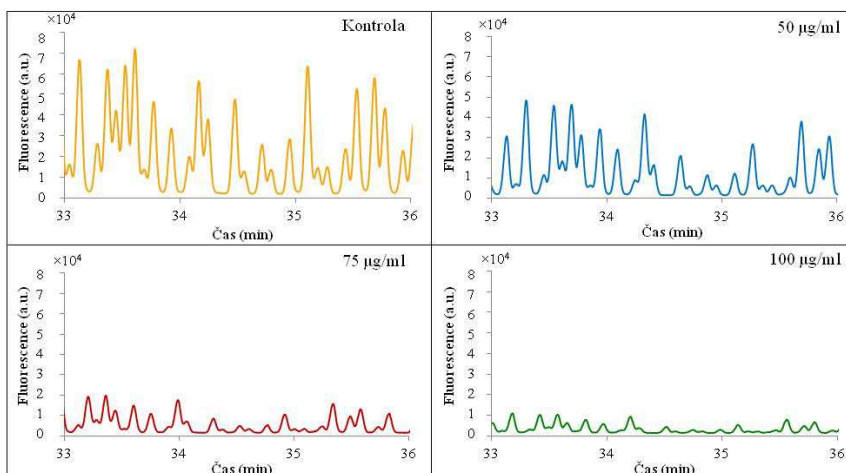
Pro přípravu sekvenační směsi byl použit DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA). Sekvenační reakce o 30 cyklech probíhala v cykleru (Eppendorf, Německo). Podmínky reakce byly následující: 96 °C/20 s; 50 °C/20 s a 60 °C/4 minuty. Fluorescenčně značené DNA fragmenty byly purifikovány pomocí magnetizovatelných částic CleanSEQ (Beckman Coulter, USA). Sekvenování purifikovaných vzorků proběhlo na přístroji Genetic Analysis System CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA). Po denuraci (90 °C/2 min) byly fluorescenčně značené DNA fragmenty separovány v 33 cm dlouhé kapiláře o vnitřním průměru 75 μm . Kapilára byla naplněna polyakrylamidovým denaturačním gelem. Separace probíhala 85 minut při teplotě 50 °C a napětí 4,2 kV.

VÝSLEDKY A DISKUZE

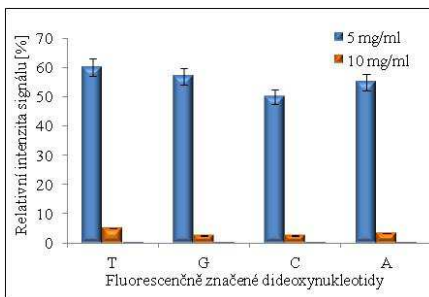
DNA fragment (498 bp) byl amplifikován pomocí reakce PCR a po dosažení požadované koncentrace byl inkubován s vybranými cytostatiky – cisplatinou, karboplatinou a oxaliplatinou o různých koncentracích. Takto vytvořené adukty byly podrobeny sekvenační reakci, která umožňuje fluorescenční značení DNA, a následně byly separovány pomocí kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF). V porovnání s kontrolní DNA (bez navázaného cytostatika) byl pozorován výrazný pokles signálu guaninu v závislosti na koncentraci použitého cytostatika. Jak je vidět na příkladu karboplatiny (Obr. 1) při aplikaci 50 $\mu\text{g/ml}$ karboplatiny klesl průměrný signál guaninu o 50 % a při aplikaci 100 $\mu\text{g/ml}$ byl pokles signálu až o 80 %.

Bylo zjištěno, že cytostatika vázaná do DNA mají stejný vliv na CE-LIF signály všech DNA amplikonů nezávisle na druhu jejich fluorescenčního značení. Jinými slovy, nezáleží na typu fluorescenčně značeného dideoxynukleotidu, který ukončuje příslušný amplikon (Obr. 2). Takto získaná data naznačují, že začlenění platinového cytostatika nemá vliv na samotnou separaci pomocí CE-LIF, ale spíše na sekvenční reakci. S největší pravděpodobností dochází díky přítomnosti cytostatika ve struktuře DNA k omezení funkce polymerázy a tím ke vzniku nižšího počtu všech typů fluorescenčně značených amplikonů což odpovídá následnému snížení CE-LIF signálu.

Obr. 1: Výřez CE-LIF elektroferogramu DNA modifikované karboplatinou. Pokles fluorescenčního signálu guaninu po aplikaci různých koncentrací karboplatiny.



Obr 2: Relativní intenzita signálu fluorescenčně značených fragmentů s migračním čase 33-36 minut ukončených různými dideoxynukleotidy po aplikaci různého množství oxaliplatin (15 $\mu\text{g/ml}$ oxaliplatinu vykazuje intenzitu signálu 0,1 %).



Pro zjištění vlivu jednotlivých druhů cytostatik, byly vytvořeny DNA adukty s cisplatinou, oxaliplatinou a karboplatinou. Z výsledků vyplývá, že koncentrace aplikovaných cytostatik potřebných k dosažení stejného vlivu na inhibici sekvenační reakce se výrazně liší. Pro snížení průměrné intenzity fluorescence o 75 % oproti kontrolnímu vzorku neplatinované DNA bylo potřeba použít karboplatinu o koncentraci 75 $\mu\text{g/ml}$, oxaliplatinu o koncentraci 7 $\mu\text{g/ml}$ a cisplatinu o koncentraci pouhých 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Z toho lze jasně vidět schopnost jednotlivých platinových cytostatik tvořit adukty s DNA. Tyto závěry byly potvrzeny i pomocí elektrochemické analýzy použité pro stanovení platiny ve vzorcích DNA. Bylo ověřeno, že největší množství platiny bylo nalezeno ve vzorku cisplatinované DNA a nejmenší množství bylo stanoveno v karboplatinované DNA.

ZÁVĚR

S použitím metody Sangerova sekvenování byl pozorován vliv platinových cytostatik na DNA. Bylo zjištěno, že intenzita signálu klesá se vzrůstajícím obsahem cytostatika a že tento vliv je patrný stejnou měrou pro všechny typy fluorescenčně značených ampliconů. Z toho lze usuzovat, že dochází k inhibici sekvenační reakce. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že metodu Sangerova sekvenování spojenou s CE-LIF analýzou lze použít pro kvantifikaci platinového cytostatika interkalovaného do struktury DNA.

LITERATURA

- Adams M., Kerby I. J., Rucker I., Evans A., Johansen K., Franks C. R. (1989): A comparison of the toxicity and efficacy of cisplatin and carboplatin advanced ovarian-cancer *Acta Oncologica*, 28(1): 57-60.
- Dospivova D., Smerkova K., Ryvolova M., Hynek D., Adam V., Kopel P., Stiborova M., Eckschlager T., Hubalek J., Kizek R. (2012): Catalytic electrochemical analysis of platinum in Pt-DNA adducts. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7(4): 3072-3088.
- Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X. X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C. C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korlach J., Turner S. (2009): Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*, 323(5910): 133-138.
- Go R. S., Adjei A. A. (1999): Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.*, 17(1): 409-422.
- Grothey A., Goldberg R. M. (2004): A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin. Pharmacol.*, 5(10): 2159-2170.
- Guo J., Xu N., Li Z. M., Zhang S. L., Wu J., Kim D. H., Marma M. S., Meng Q. L., Cao H. Y., Li X. X., Shi S. D., Yu L., Kalachikov S., Russo J. J., Turro N. J., Ju J. Y. (2008): Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27): 9145-9150.
- Holland H. K., Dix S. P., Geller R. B., Devine S. M., Heffner L. T., Connaghan D. G., Hillyer C. D., Hughes L. L., Miller R. L., Moore M. R., Winton E. F., Wingard J. R. (1996): Minimal toxicity and mortality in high-risk breast cancer patients receiving high-dose cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin plus autologous marrow stem-cell transplantation and comprehensive supportive care. *Journal of Clinical Oncology*, 14(4): 1156-1164.
- Krizkova S., Adam V., Petrlova J., Zitka O., Stejskal K., Zehnalek J., Sures B., Trnkova L., Beklova M., Kizek R. (2007): A suggestion of electrochemical biosensor for study of platinum(II)-DNA interactions. *Electroanalysis*, 19(2-3): 331-338.
- Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(698-699).
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5463-5467.

MENDELNET 2012

Shendure J., Mitra R. D., Varma C., Church G. M. (2004): Advanced sequencing technologies: Methods and goals. *Nature Reviews Genetics*, 5(5): 335-344.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012): *Cancer Statistics, 2012*. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 62(1): 10-29.

Silva M. J., Costa P., Dias A., Valente M., Louro H., Boavida M. G. (2005): Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46(2): 104-115.

Wang D., Lippard S. J. (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4): 307-320.

STUDY OF COMPLEXES OF ANIMAL METAL-BINDING PROTEIN WITH PLATINUM CYTOSTATICS

STUDIUM KOMPLEXŮ ŽIVOČIŠNÝCH KOV-VAZNÝCH PROTEINŮ S PLATINOVÝMI CYTOSTATIKY

Šobrová P.¹, Zítka O.¹, Komínková M.¹, Skaličková S.¹, Škutková Š.³, Adam V.¹, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Kolejní 4, 612 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Papaya1@seznam.cz

ABSTRACT

The suggestion of interactions between heavy metals and biologic active molecules haven't been exactly estimated yet. However cadmium, lead or mercury are significant environment pollutants and platinum and arsenic are used as oncologic medicament, they have common characteristic. In organism these compounds are not volatile but they are bounded to other molecules. Interactions between heavy metals and proteins are important for range of physiologic processes like transpiration, photosynthesis or detoxification of organisms. In our experiment an electrochemical profile of interactions between 23 metallothionein fragments and cisplatin was studied. At first 23 MT fragments (decapeptides) were selected given by differences in aminoacids ordering. For the experiment amperometric detection implemented to flow injection analysis system (FIA-ED) was used. However a lot of results were estimated, we focused on complex formation between cisplatin and 23 MT fragments analyzed in various conditions. All the 23 MT fragments interacted with cisplatin, in the optional conditions as equimolar ratio, in physiological conditions of phosphate buffer (pH 7.5) in temperature of 37°C. Based on results obtained we determined an interaction constant which defines an ability of each peptide to make an interaction with cisplatin. The highest IC was found by fragments 18 and 22 and the lowest IC by 1, 15, 12 and 19. We found that the major influence of interaction was done not by the change of near neighbouring aminoacids with the conservative cysteines but these which were about 2 or 3 of positions far away from cysteiene.

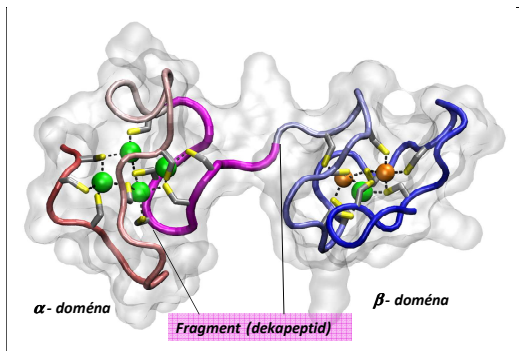
Key words: Metallothionein, cisplatin, FIA, electrochemical detection

Acknowledgments: The work has been supported by IGA FA MENDELU IP 23/2012.

ÚVOD

Problematika rezistence nádorových buněk na nádorová léčiva je velkým problémem v léčbě (Boehm, a kol., 1997) a není dodnes uspokojivě vysvětlena (Sakai, a kol., 2008). Její podstatou je mimo jiné i interakce cytostatik s biomolekulami syntetizovanými nádorovými buňkami (Higgins, 2007). Jeden z obecně uznávaných mechanismů rezistence je overexprese proteinu metalothioneinu (MT) v nádorových buňkách (Eckschlager, a kol., 2009). Ze strukturního hlediska je metalothionein (Obr. 1) nízkomolekulární protein o velikosti (6-7 kDa) který je velmi bohatý na aminokyselinu cystein, která jej předurčuje pro jeho kov vazné vlastnosti. Terciární struktura je rozdělena na dvě domény, tvořící cysteinové clustery, kde do domény alfa se mohou vázat až 4 ionty dvojmocných kovů a do domény beta tři ionty dvojmocných kovů (Bell a Vallee, 2009), (Coyle, a kol., 2002). Vzhledem k četnému rozmístění cysteinů ve struktuře MT lze označit hned několik úseků řetězce, které významně přispívají k interakci s kovem. Pro účely studia interakcí *in vitro* jsme na základě vyhodnocení z databáze Expasy vybrali fragment proteinu metalothioneinu elektrochemickou detekcí. Vhodnost elektrochemické metody pro studium tvorby komplexu MT s kovem byla prokázána metodami katodické rozpouštěcí voltametrie (Sestakova a Mader, 2000), square wave voltametrie (Nieto a Rodriguez, 1996) nebo cyklické voltametrie (Harlyk, a kol., 1997, Marshall, a kol., 2009). Metoda FIA-ED byla zvolena právě díky zkušenosti z předchozího studia interakcí mezi thiolovou skupinou peptidu a cisplatiny (Zitka, a kol., 2007), (Zitka, submitted 2012). Cílem této práce bylo studium komplexů uměle nasyntetizovaných peptidových fragmentů proteinu MT s platinovými cytostatiky. Získané fragmenty pocházejí z různých živočišných organismů a liší se sekvencí aminokyselin při zachování konzervativních pozic s aminokyselinou cystein. Vzhledem k výrazné elektroaktivitě aminokyseliny cysteinu byla pro účely studia optimalizována metoda průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED).

Obr. 1: Struktura proteinu metalothioneinu, α - doména metalothioneinu obsahující čtyři atomy kadmia (zeleně), β - doména metalothioneinu obsahující dva atomy zinku (oranžově) a jeden atom kadmia. Růžově je vyznačen fragment metalothioneinu, který byl nasyntetizován pro následné *in vitro* studium interakce (Zdroj: www.expasy.org).



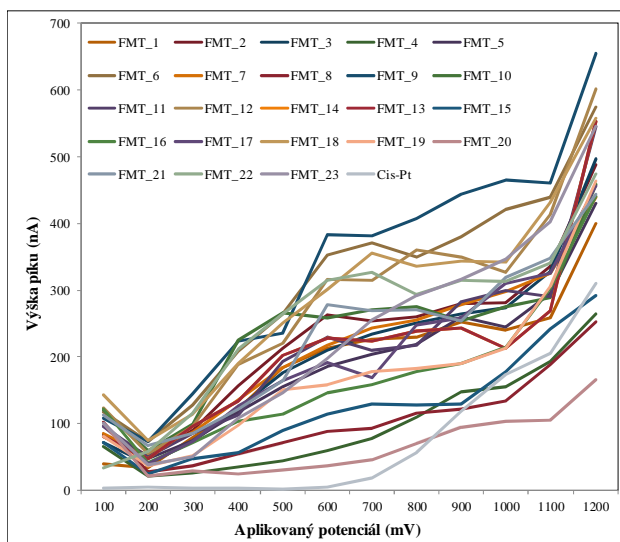
MATERIÁL A METODIKA

Uměle nasyntetizované peptidy FMT byly zakoupeny od firmy Clonestar (Česká republika). Veškeré chemikálie potřebné pro provedení analýz byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA). Dále byl zakoupen argon pro provoz HPLC od firmy Siad (Česká Republika) a také spotřební materiál pro HPLC od firmy Labicom (Česká Republika). Komplexy fragmentu metalothioneinu s cisplatinou byly připraveny v molárních poměrech Cis-Pt 100 μM : FMT 50, 100 a 150 μM v prostředí fosfátového pufru pH 7,5 (20 mM). Inkubace komplexů byla prováděna v celkovém objemu 400 μl směsi, která byla během inkubace neustále vortexována na termobloku při 400 rpm. FIA-ED systém byl složen z jedné chromatografické pumpy Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001-9,999 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) reakční smyčky (1 m) napojené na elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, USA) s amperometrickou průtokovou detekční celou (Model 5040, ESA, USA). Průtočná cela obsahuje planární elektrodu ze skelného uhlíku, hydrogen-paládiovou jako referenční a uhlíkovou jako pomocnou elektrodu. Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8 $^{\circ}\text{C}$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí FIA-ED systému byly nejprve analyzovány závislosti proudové odezvy na aplikovaném signálu – hydrodynamické voltamogramy (HDV). Ty charakterizují redoxní profil každé studované látky. Provedli jsme tedy analýzu všech 23 fragmentů metalothioneinu i samotných platinových cytostatik cisplatinu, oxaliplatinu a karboplatinu (Obr. 2). Z obrázků je patrné, že elektrochemické profily se pro jednotlivé FMT i platinová cytostatika poměrně liší. To vyplývá z odlišného chemického složení aminokyselin (v rámci FMT) a odlišné struktury cytostatika. Vzhledem k vysokému množství dat, která byla při studiu získána, jsme se s ohledem na detaily zaměřili pouze na studium tvorby komplexu mezi všemi 23 FMT a cisplatinou při variantních podmínkách které byly dále hodnoceny. Komplexy fragmentu metalothioneinu s cisplatinou byly připraveny v molárních poměrech Cis-Pt 100 μM : FMT 50, 100 a 150 μM v prostředí fosfátového pufru pH 7,5 (20 mM). Pro studium interakce byly takto připravené komplexy inkubovány při různých teplotách a časech. Tyto parametry byly zvoleny jako faktory, které nejvíce ovlivní interakci FMT a Cis-Pt *in vitro*. Inkubace komplexů byla prováděna v celkovém objemu 400 μl směsi, která byla během inkubace neustále vortexována na termobloku při 400 rpm. Pro každou z kombinací byl získán hydrodynamický voltamogram (HDV) v rozsahu potenciálu 100 - 1200 mV (n = 3) (RSD < 15 %).

Obr. 2: Hydrodynamické voltamogramy fragmentů FMT 1-23.

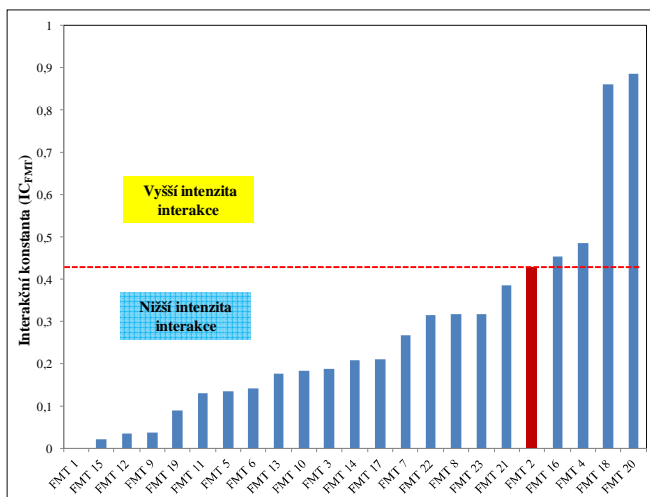


Nejprve byl studován vliv teploty 10, 15, 25, 35 a 45 °C. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při koncentraci FMT 100 µM a Cis-Pt 100 µM. Ihned po inkubaci proběhla analýza pomocí FIA-ED. Zjistili jsme, že nejvhodnější teplota byla 45 °C pro všechny studované FMT. Následně jsme testovali koncentraci přídatku Cis-Pt (50, 100 and 200 µM) k FMT (100 µM). Inkubace vzorků proběhla 1 hodinu při 45 °C. Po analýze všech variant jsme zjistili, že se jako nejvhodnější ukázal ekvimolární poměr čili koncentrace Cis-Pt 100 µM. Poslední testovaný parametr byla doba interakce. Zde jsme na základě zkušeností z předchozí práce testovali delší časové rozmezí tedy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 hodin při nejvhodnějších výše zmíněných podmínkách. Zjistili jsme, že jednohodinová inkubace je plně dostačující, a že při vyšších časech se již hodnoty směrnice nemění. Po analýze všech variant byl tedy nejvhodnější ekvimolární poměr FMT 100 µM a Cis-Pt 100 µM (1 h při 45 °C).

Pro vyhodnocení byly navrženy interakční konstanty (IC) (Obr. 3). Bylo zjištěno, že k maximálnímu zvýšení interakce (až o 106 % oproti průměru) došlo při záměně konzervativních aminokyselin nejčastěji o více než jednu pozici mimo cysteinový cluster. Naopak záměny aminokyselin v rámci cysteinových clusterů vedly ke snížení interakční konstanty (až o 10 - 100 % oproti průměru). Nejvyšší hodnoty IC byly zaznamenány u FMT 18 a 20, kde je zároveň patrná změna v aminokyselinách nesousedících přímo s cysteiny. U FMT 18 se jednalo o výskyt P na pozici č 10 a u FMT 20 byla pozice 10 obsazena V a navíc velmi silně konzervativní pozice 1 obsahovala T místo K. Hodnoty IC pro oba FMT byly tak o více než 100 % zvýšené. Na druhou stranu u fragmentů FMT 2, 4, 16 byla schopnost interakce nižší i přes to, že vedle cysteinů byly stále konzervativní aminokyseliny S, S, P. Pouze v případě FMT 4 byly konzervativní cysteinové clustery obklopeny P místo S ale současně byl konce peptidu výrazně odlišován záměnou N-terminálního D za G, což mělo za následek celkové zvýšení IC o 14 %. Dále bylo zaznamenáno zvýšení IC u FMT 16 a to o 6 %, které bylo způsobeno pouze záměnou M za S na pozici 10.

Z dosažených výsledků jasně vyplývá, že záměna aminokyselin v rámci peptidového řetězce velmi významně ovlivňuje možnosti interakce. Dále bylo ukázáno, že elektrochemická metoda FIA-ED je pro takovýto typ studia velmi přínosná.

Fig. 3: Hodnoty IC všech 23 studovaných fragmentů metalothioneinu vycházející z výpočtu vzhledem k testovaným parametrům (teplota, molární koncentrace, doba interakce). Hodnota ICFMT 2 (0,43) je červeně zvýrazněna.



ZÁVĚR

V tomto experimentu byl za pomoci zautomatizované metody FIA-ED studován vliv sekvence primární aminokyselinové struktury peptidového fragmentu pocházejícího z kov-vazného proteinu metalothioneinu na tvorbu interakce s cisplatinou. Zde byly získány vysoce unikátní a originální výsledky, které ukazují, že záměna aminokyselinové sekvence nerovnoměrně a velmi účinně ovlivňuje tvorbu interakce. Z dosažených výsledků vyplývá, že největší vliv na interakci FMT s Cis-Pt mají změny aminokyselin na pozici 1 a 10, které jsou vzdálené o více než jednu pozici od cysteinových clusterů, kde v rámci FMT 20 a 18 poměrně výrazně ovlivňuje celkovou interakci umístění aminokyselin P, T a V. V porovnání s těmito aminokyselinami pak s velkým odstupem ovlivňovaly interakci změny aminokyselin P a D na pozicích 6 a 11 u FMT 4 a následované záměnou M na pozici 10 u FMT 16.

LITERATURA

- Bell S. G., Vallee B. L. (2009): The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. *Chembiochem*, 10(1): 55-62.
- Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M. S. (1997): Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658): 404-407.
- Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M. (2002): Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4): 627-647.
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 10(4): 360-375.
- Harlyk C., Bordin G., Nieto O., Rodriguez A. R. (1997): Cyclic voltammetry study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I in the presence of cadmium. *Electroanalysis*, 9(8): 608-613.
- Higgins C. F. (2007): Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137): 749-757.
- Marshall N. M., Garner D. K., Wilson T. D., Gao Y. G., Robinson H., Nilges M. J., Lu Y. (2009): Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range. *Nature*, 462(7269): 113-U127.
- Nieto O., Rodriguez A. R. (1996): Complexation properties of the metallothionein fragment Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I with zinc using square wave voltammetry. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40(2): 215-222.
- Sakai W., Swisher E. M., Karlan B. Y., Agarwal M. K., Higgins J., Friedman C., Villegas E., Jacquemont C., Farrugia D. J., Couch F. J., Urban N., Taniguchi T. (2008): Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182): 1116-U9.
- Sestakova I., Mader P. (2000): Voltammetry on mercury and carbon electrodes as a tool for studies of metallothionein interactions with metal ions. *Cellular and Molecular Biology*, 46(2): 257-267.
- Zitka O., Huska D., Krizkova S., Adam V., Chavis G. J., Trnkova L., Horna A., Hubalek J., Kizek R. (2007): An investigation of glutathione-platinum(II) interactions by means of the flow injection analysis using glassy carbon electrode. *Sensors*, 7(7): 1256-1270.
- Zitka O. K., M.; Skalickova, S.; Skutkova, H.; Provaznik, I.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Trnkova, L.; Adam, V.; Kizek, R. (submitted 2012): Changes of Single Amino Acid in Metal-Binding Cluster of Metallothionein Significantly Influences its Interaction with Cisplatin. *Scientific Reports*.

X-RAY MICROTOMOGRAPHY AS A TECHNIQUE FOR MINERALOGICAL ANALYSIS OF URINARY CALCULI

RENTGENOVÁ MIKROTOMOGRAFIE V MINERALOGICKÉ ANALÝZE MOČOVÝCH KAMENŮ

Štěpánková K.¹, Novotný K.^{1, 2}, Kaiser J.³, Procházková K.³, Kanický V.^{1, 2}, Mancini L.⁴

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

²CEITEC - Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³X-ray Micro CT and Nano CT Research Group, CEITEC - Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Czech Republic

⁴Sincrotrone Trieste S.C.p.A., Strada Statale 14, km 163.5 in AREA Science Park, Basovizza, 34149 Trieste, Italy

E-mail: Katerina.Proksova@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this study is to present synchrotron radiation X-ray microtomography (SR- μ CT) as the technique for investigation of the mineralogical composition of urinary calculi fragments in the non-destructive manner at very high resolution. SR- μ CT is proved to be an effective technique for determination of texture, 3D microstructure and composition of kidney stones. Since this technique is non-destructive, traditional analytical methods can also be performed. The comparison of the results obtained by SR- μ CT analysis with those derived from current standard analytical approaches are in a good agreement. As the comparative method was used laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry.

Key words: Synchrotron radiation, X-Ray microtomography, urinary calculi

Acknowledgments: We acknowledge the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic for supporting the research projects ME08002, ME10061 and the Czech Science Foundation for the project GA203/09/1394. This work was also supported by “CEITEC – Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) project from the European Regional Development Fund.

ÚVOD

Počítačová mikrotomografie (μ CT) využívá rentgenové záření k získání trojrozměrné informace o vnitřní struktuře močových kamenů ve vysokém rozlišení [1]. Často se používá rentgenové synchrotronové záření (SR- μ CT) díky svým výjimečným vlastnostem. Synchrotronový zdroj poskytuje úzký svazek záření o velmi vysoké intenzitě s širokým rozsahem volitelné vlnové délky, což umožňuje zachytit velmi jemné detaily ve struktuře materiálu [2]. Cleveland et al. poprvé aplikovali μ CT na močové kameny pro stanovení destrukce pomocí rázové vlny [3]. Brzy nato bylo zaznamenáno, že různé minerální látky mohou být rozlišeny pomocí μ CT, což popsal ve svých studiích Zarse et al. [4,5]. Od té doby použilo několik autorů μ CT pro nedestruktivní analýzu močových kamenů [6-11].

Nedestruktivní 3D vizualizace vzorku s vysokým rozlišením je důležitá pro následné využití analytických metod, které nám mohou poskytnout údaje o koncentraci prvků na příslušném řezu močového kamene. Těmito metodami jsou například spektrometrie laserem buzeného mikroplazmatu (LIBS) [12,13] a laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem s hmotnostní nebo optickou emisní detekcí (LA-ICP-MS/OES) [14,15]. Analýza mineralogické struktury vzorku močového kamene je důležitá proto, aby mohly být tyto metody efektivně využity, a to hlavně pro výběr optimálních parametrů laserové ablace, např. průměru laserového paprsku nebo volby techniky prvkového mapování (liniový sken, řada nebo rastr bodů) [16].

Cílem této studie bylo pomocí SR- μ CT zachytit malé odchylky v chemickém složení vzorku a lokalizaci zřetelné koncentrické textury uvnitř močového kamene, v tomto zájmovém místě vzorku močového kamene následně provést řez a pomocí metody LA-ICP-MS provést prvkové mapování a ověřit mineralogické složení.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky močových kamenů

Všechny vzorky močových kamenů byly z těla pacienta vyjmuty chirurgicky. Po vyjmutí byl kámen opláchnut v destilované vodě a vysušen. Z povrchu byla odebrána reprezentativní část vzorku pro infračervenou analýzu. Pomocí infračervené spektroskopie byly určeny hlavní složky močového kamene. Výsledky byly zaneseny do databáze a poslány i s evidenčním číslem na univerzitu. Všechny vzorky pochází ze sbírky Prof. Ing. Petra Martince, CSc. z Ústavu geoniky AV ČR v Ostravě.

SR- μ CT vzorků

SR- μ CT měření na vzorcích močových kamenů byla prováděna na SYRMEP beamline synchrotronu Elettra Light Laboratory, Trieste (Itálie). Rentgenové záření bylo získáváno pomocí ohnutého magnetu ve vzdálenosti asi 23 m od zdroje. Získalo se tak monochromatické rentgenové záření s laminárním průřezem s maximální plochou $160 \times 5 \text{ mm}^2$ při 20 keV.

Pro SR- μ CT měření byly vzorky připevněny na otáčivý držák s vysokým rozlišením a osvětlovány monochromatickým zářením. Jako detektor byla použita vodou chlazená 16bitová CCD kamera (Photonic Science Hystar) ve vzdálenosti 50 cm od vzorku. Vzdálenost mezi vzorkem a detektorem byla zvolena tak, aby se dalo pracovat v režimu fázového kontrastu pro μ CT [17]. Pro každý vzorek bylo pořízeno 1440 projekcí vždy tak, že vzorkem bylo otočeno o 180° a jednotlivé úhly byly rovnoměrně rozloženy.

Laserový ablační systém

Laserová ablace vzorků byla prováděna s ablačním systémem UP 213 (New Wave, USA) vybaveným ablační komorou SUPERCELL o objemu 18 cm^3 . Vestavěné posuvy umožňují pohyb komory v osách x, y, z a povrch vzorku je snímán CCD kamerou. Součástí zařízení je nanosekundový Nd:YAG laser emitující záření 213 nm na páté harmonické frekvenci. Délka laserového pulzu je 4,2 ns.

Průtok nosného plynu (helia) proudícího ablační komorou byl nastaven na $1,0 \text{ l min}^{-1}$ a byl řízen průtokoměrem Brooks. ICP-MS je spojeno s ablačním systémem pomocí polyurethanových hadiček od firmy LEGRIS. Ablatovaný materiál s heliem je před vstupem do ICP-MS smíchan s argonem o průtoku $0,6 \text{ l min}^{-1}$.

ICP-MS

Ablatovaný materiál byl analyzován pomocí ICP-MS spektrometru Agilent 7500ce (Agilent, Japonsko), (znázorněno na Obr. 16.). Uspořádání spektrometru je horizontální s kolizně-reakční celou, kvadrupólovým analyzátozem a elektronovým násobičem. U přístroje Agilent 7500ce je kolizně-reakční cela tvořena oktapólovým reakčním systémem (ORS). K odstranění polyatomických interferencí bylo využito heliového i vodíkového módu s průtoky $2,0 \text{ ml min}^{-1}$ He a $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ H₂.

Podmínky měření pro laserovou ablaci

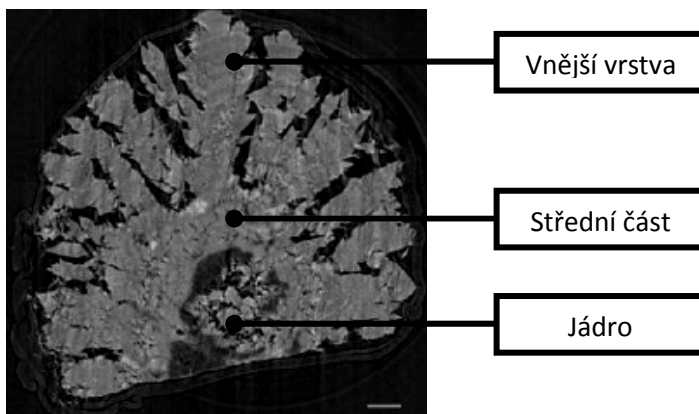
V případě liniových skenů byla zvolena frekvence laseru 5 Hz s hustotou zářivé energie 7 J cm^{-2} . Vzorek byl posouván rychlostí $40 \mu\text{m s}^{-1}$. Mapování bylo provedeno s průměrem laserového paprsku $65 \mu\text{m}$ a jednotlivé linie byly umístěny ve vzdálenosti $100 \mu\text{m}$. Mapování vzorků močových kamenů pomocí rastru bodů bylo provedeno s frekvencí laseru 10 Hz a průměrem laserového paprsku $65 \mu\text{m}$. Ablace do daného bodu probíhala po dobu 6 s a mezi body byla zvolena časová prodleva 8 s pro vypláchnutí ablační cely a dostatečný pokles signálu. Vzdálenost mezi krátery v ose x i y byla $65 \mu\text{m}$. Hustota zářivé energie byla nastavena na stejnou hodnotu jako

v případě liniových skenů. Matriční prvky byly měřeny s použitím kratšího integračního času (~0,01 s). Pro stopové prvky byl použit delší integrační čas (~0,1 s), pro získání vyšší hodnoty intenzity signálu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Mineralogické složení vzorku močového kamene s číslem 11684 bylo následující: 40 % weddellit ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 30 % whewellit ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 20 % apatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$) a 10 % kyselina močová ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$).

Obr. 1. Rekonstruovaný řez vzorku 11684 z SR- μ CT měření.

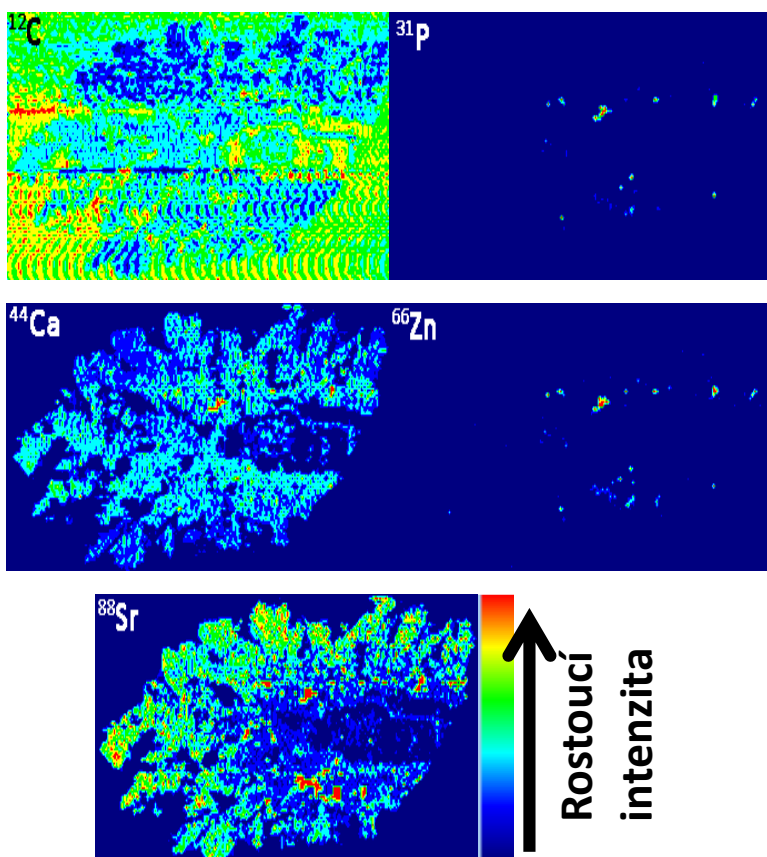


Na Obr. 1. můžeme vidět řez 050 vzorku 11684 získaný pomocí SR- μ CT měření. Vzorek je rozdělen na tři části, a to jádro, střední část a vnější vrstvu. Ve vnější vrstvě můžeme pozorovat světle šedou barvu, která reprezentuje krystaly whewellitu nebo weddellitu. Ve střední části jsou zřetelně viditelné bílé tečky, které patří minerálu apatitu. V jádře můžeme pozorovat všechny minerály obsažené v tomto vzorku močového kamene. Tmavě šedá barva náleží kyselině močové, světle šedá barva whewellitu nebo weddellitu a bílé tečky apatitu.

Obr. 2. Fotografie vzorku močového kamene 11684 po ablaci



Obr. 3. 2D distribuční mapy pro vzorek močového kamene 11684.



Na Obr. 2. je fotografie vzorku močového kamene s viditelnými ablačními liniemi. Analyzován byl celý vzorek, což nám umožňuje zobrazit prostorovou distribuci prvků v celém řezu. Z vytvořených 2D intenzitních map lze odvodit korelace mezi prvky, které nám poskytnou informaci o mineralogickém složení. V jádře vzorku je vysoká intenzita uhlíku, což naznačuje přítomnost kyseliny močové. Ve vnější vrstvě a centrální části je intenzita uhlíku nižší oproti jádru, což je vysvětleno procentuálním zastoupením uhlíku ve whewellitu a weddellitu nebo v kyselině močové. 2D intenzitní mapa pro fosfor ukazuje výskyt apatitu. V intenzitní 2D mapě pro vápník jsou viditelné oblasti se zvýšenou intenzitou, což dokazuje přítomnost apatitu. Podle distribuční mapy pro zinek je jasně patrné, že tento prvek se vyskytuje v návaznosti apatitu. V 2D intenzitní mapě pro stroncium jsou taktéž patrné oblasti se zvýšenou intenzitou, které jsou v korelaci s apatitem, oblasti se sníženou intenzitou (v jádře) naznačují obsah kyseliny močové a okrajová vrstva naznačuje obsah whewellitu nebo weddellitu.

ZÁVĚR

SR- μ CT je metoda s vysokým prostorovým rozlišením. Tato technika umožňuje nedestruktivní analýzu močových kamenů a zároveň nám pomůže bez narušení struktury kamene určit rovinu řezu, kde má být provedena následná chemická analýza. Z výsledků vyplývá, že výsledky mineralogického složení z SR- μ CT jsou ve shodě s přímou analytickou metodou laserové ablace s hmotnostní spektrometrií v indukčně vázaném plazmatu.

LITERATURA

1. Ruegsegger P., Koller B., Muller R. (1996): A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif. Tissue. Int.*, 58(1): 24-29.
2. Hrdý J. (1992): Synchrotronové záření. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*, 37(3): 140-150.
3. Cleveland R. O., McAteer J. A., Müller R. (2001): Time-lapse nondestructive assessment of shock wave damage to kidney stones in vitro using micro-computed tomography. *J. Acoust. Soc. Am.*, 110(4): 1733-1736.
4. Zarse C. A., McAteer J. A., Sommer A. J., Kim S. C., Hatt E. K., Lingeman J. E., Evan A. P., Williams J. C. Jr. (2004): Nondestructive analysis of urinary calculi using micro computed tomography. *BMC Urol.*, 4, doi:10.1186/1471-2490-4-15
5. Zarse C. A., McAteer J. A., Tann M., Sommer A. J., Kim S. C., Paterson R. F., Hatt E. K., Lingeman J. E., Evan A. P., Williams J. C. Jr. (2004): Helical CT accurately reports urinary stone composition using attenuation values: In vitro verification using high resolution micro CT calibrated to FT-IR microspectroscopy. *Urology* 63(5): 828-833.
6. Miller N. L., Gillen D. L., Williams J. C. Jr, Evan A. P., Bledsoe S. B., Coe F. L., Worcester E. M., Matlaga B. R., Munch L. C., Lingeman J. E. (2009): A formal test of the hypothesis that idiopathic calcium oxalate stones grow on Randall's plaque. *BJU Int.* 103(7): 966-971.

7. Pramanik R., Asplin J. R., Jackson M. E., Williams J. C. Jr (2008): Protein content of human apatite and brushite kidney stones: significant correlation with morphologic measures. *Urol. Res.* 36(5): 251-258.
8. Primak A. N., Fletcher J. G., Vrtiska T. J., Dzyubak O. P., Lieske J. C., Jackson M. E., Williams J. C. Jr, McCollough CH. (2007): Non-invasive differentiation of uric acid versus non-uric acid kidney stones using dual-energy CT. *Acad. Radiol.* 14(12): 1441-1447.
9. Williams J. C. Jr, Matlaga B. R., Kim S. C., Jackson M. E., Sommer A. J., McAteer J. A., Lingeman J. E., Evan A. P. (2006): Calcium oxalate calculi found attached to the renal papilla: Preliminary evidence for early mechanisms in stone formation. *J. Endourol.* 20(11): 885-890.
10. Williams J. C. Jr, Zarse C. A., Jackson M. E., Witzmann F. A., McAteer J. A. (2006): Variability of protein content in calcium oxalate monohydrate stones. *J. Endourol.* 20(8): 560-564.
11. Kaiser J., Holá M., Galiova M., Novotný K., Kanický V., Martinec P., Ščučka J., Brun F., Sodin N., Tromba G., Mancini L., Kořistková T. (2010): Investigation of the microstructure and mineralogical composition of urinary calculi fragments by synchrotron radiation X-ray microtomography – a feasibility study. *Urolog. Res.* 39(4): 259-267.
12. Galiova M., Kaiser J., Novotny K., Samek O., Reale L., Malina R., Palenikova K., Liska M., Cudek V., Kanicky V., Otruba V., Poma A., Tucci A. (2007): Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. *Spectrochim. Acta B* 62(12): 1597–1605
13. Kaiser J., Samek O., Reale L., Liska M., Malina R., Ritucci A., Poma A., Tucci A., Flora F., Lai A., Mancini L., Tromba G., Zanini F., Faenov A., Pikuz T., Cinque G. (2007): Monitoring of the heavymetal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. *Microsc. Res. Tech.* 70(2): 147–153.
14. Farrell A. P., Hodaly A. H., Wang S. (2000): Metal analysis of scales taken from arctic grayling. *Arch. Environ. Toxicol.* 39(4): 515–522.
15. Flem B., Moen V., Grimstvedt A. (2005): Trace element analysis of scales from four populations of Norwegian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) for stock identification using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 59(2): 245–251.
16. Proksova K., Novotny K., Galiova M., Vaculovic T., Kuta J., Novackova M., Kanicky V. (2012): Study of Elemental Distribution in Urinary Stones by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Chem. listy* 106(3): 229-235.
17. Cloetens P., Pateyron-Salome M., Buffiere J. Y., Peix G., Baruchel J., Peyrin F., Schlenker M. (1997): Observation of microstructure and damage in materials by phase sensitive radiography and tomography. *J. Appl. Phys.* 81(9): 5878–5886.

DESIGN, CREATING AND SCREENING OF MUTANT LIBRARY OF CORN ENZYME β -GLUCOSIDASE Zm-p60.1

NÁVRH, TVORBA A SCREENING MUTANTÍ KNIHOVNY KUKŘIČNÉHO ENZYMU B-GLUKOSIDÁSY ZM-P60.1

Turek D., Mazura P., Brzobohatý B.

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: dusanturek@seznam.cz

ABSTRACT

This work deals with the study of a particular enzyme, β -glucosidase Zm-p60.1 coming from corn. Zm-p60.1 is an enzyme that is part of cytokinin metabolism and can convert the inactive glycosylated form of cytokinin to its active form. Zm-p60.1 is one component that regulates the level of active hormones. Altered activity or specificity of this enzyme provides a tool which would be possible to use for fine modulation of the cytokinin level in the plant and thereby affect individual processes such as cell division, differentiation, root growth, sprout growth and other processes. Protein engineering offers a means to change substrate specificity of this enzyme.

Substrate specificity of the enzyme Zm-p60.1 is determined by amino acid composition in the vicinity of active center. The tryptophan 373 position in Zm-p60.1 is involved in stacking interaction with aromatic system on the substrate. By structural folding of 33 glycosidases from GH1 family was found that the position of W373 is highly preserved. Likewise, by the multiple sequence comparison of characterized enzymes from GH1 family, it was found that the W373 is sequentially preserved with a few exceptions where in this position occur other amino acids. By saturation mutagenesis was created a library containing 20-mutants at position W373. On artificial substrates was carried out preliminary test studying the effects of mutations on the activity of mutant enzymes. None of the mutants had higher activity than the original wild enzyme form of Zm-p60.1 (W373W). As the second most active appears W373H followed by group of 4 mutants W373F, W373G, W373T and W373Y with significantly lower activity. Other mutants had little or no activity. New variants of functional β -glucosidase Zm-p60.1 will be further studied to determine changes in substrate specificity towards cytokinin conjugates. If such a change will be found, a new glucosidases could serve as a tool for studying the hormonal system of plants.

Key words: β -glucosidase, screening, mutant library

Acknowledgments: This work was supported by grant P305/11/P768 from the Czech Science Foundation.

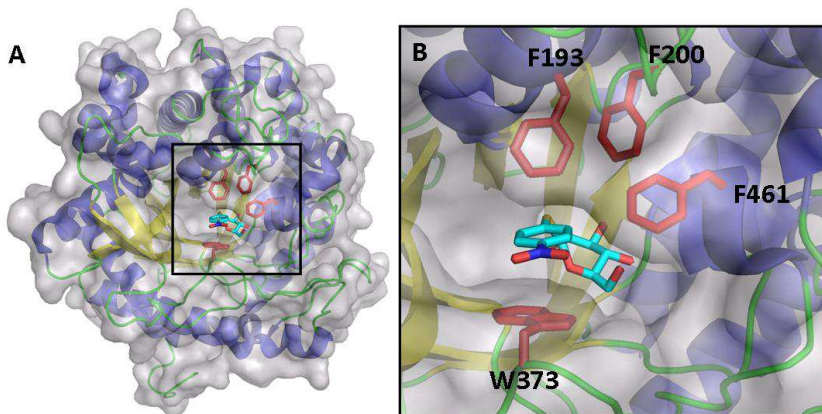
ÚVOD

Život rostliny je omezen na jednu lokalitu. Její vývoj a růst je ovlivňován vnějšími faktory, jakými jsou počasí nebo kvalita půdy. Rostlina dokáže částečně kompenzovat vlivy z vnějšího prostředí tak, že mění hladinu aktivních rostlinných hormonů, čímž dojde ke změně fyziologických parametrů v těle rostliny. Množství fytohormonů je dynamicky řízeno řadou komplexních procesů, ve kterých se všechny dílčí kroky (biosyntéza, aktivace a degradace fytohormonu) neobejdou bez přítomnosti rostlinných enzymů. Jedním z enzymů, který dokáže přetvářet fytohormony z neaktivní (glykosylované) formy do aktivní formy, je enzym z kukuřice (*Zea mays*) β -glukosidáza (Zm-p60.1). Různé mutantní varianty enzymu Zm-p60.1 mají odlišnou substrátovou specifitu vůči přírodním (*trans*-zeatin-O- β -D-glukopyranosid, *cis*-O- β -D-glukopyranosid) či umělým (*para*-nitrophenol- β -D-glukopyranosid, *p*NPG) substrátům. A právě tyto mutantní varianty mohou na molekulární úrovni fungovat jako nástroje jemně měnící hladinu aktivních hormonů v těle rostliny.

Okolí aktivního centra β -glukosidázy obsahuje určité uspořádání aminokyselin (klastř), o kterých se uvažuje, že jsou zodpovědné za specifické rozpoznávací interakce s aglykonem substrátu. Klastř se skládá z aminokyselin F193, F200, W373 a F461 (Dopitová et al, 2008) (*Obr. 1*). Strukturální uspořádání klastřu bylo porovnáno s dalšími podobnými rostlinnými enzymy přístupnými v databázi Carbohydrate-Active enZymes Database (zkráceně CAZY) (Henrisat et al., 1997). Na základě již dříve charakterizovaného mutantu W373K a provedené strukturální analýzy byla vytvořena kombinatorická mutagenese enzymu Zm-p60.1 v pozici W373. Naším cílem je tedy vytvořit mutantní knihovnu a následně charakterizovat mutanty vykazující aktivitu.

Obr. 1 – A) Monomerní podjednotka enzymu Zm-p60.1 (barevně jsou značeny sekundární struktury, šedá barva značí povrch enzymu).

B) Detailní pohled do okolí aktivního centra enzymu Zm-p60.1. Červeně je vyznačen klaster aminokyselin zprostředkovávající stacking interakce a Van der Waalsovy interakce s aglykonem substrátu pNPG (PDB ID: 1E1F). Pro pozici W373 byla zjišťována aminokyselinová variabilita.



MATERIÁL A METODIKA

Bioinformatická analýza byla provedena vyhledáním všech dostupných struktur rostlinných enzymů podobných Zm-p60.1. Enzymy byly vyhledány v Glycoside Hydrolase family 1 (GH1) v databázi CAZy (www.cazy.org). Strukturální porovnání těchto enzymů bylo provedeno programem PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.).

Výchozím bodem pro získání proteinových sekvencí byla databáze CAZy (www.cazy.org). V rodině GH1 bylo vybráno 240 proteinů ze sloupce *Characterized*. Identické záznamy (celkem 9) byly z výběru vymazány. UniProt identifikátory posloužily k získání aminokyselinových sekvencí. Pro kvalitnější přeložení byly z této skupiny vyřazeny sekvence kratší než 400 aminokyselin, delší než 1000 aminokyselin a fragmenty sekvencí. Konečná skupina obsahovala 184 sekvencí, které byly základem mnohonásobného sekvenčního zarovnání. Přes webové rozhraní byly sekvence vloženy na server ebi.ac.uk, kde byl k zarovnání použit program T-coffee verze 8.93 (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000) (parametry v původním nastavení).

Vlastní mutagenese byla provedena pomocí kitu QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. V původní DNA sekvenci pro Zm-p60.1 byl posunut čtecí rámec v pozici 373 (primer: 3'-ggaggataacccttttagtctagatgtacatgggactcccg-5'). Takto vytvořený templát byl ověřen sekvenováním. Templát byl mutován na pozici 373. Knihovna mutantů byla vytvořena jedním primerem o sekvenci 3'-ggaggataacccttttagtNNMtagatgtacatgggactcccg-5', kde *N* značí jakoukoliv

z bázi A, T, G, C a *M* jsou báze A, G. Po PCR reakci byla ve směsi specificky rozštěpena methylovaná templátová DNA. Tato směs se použila na transformaci do XJb *E. coli*. Kolonie byly selektovány na agarových miskách s antibiotikem ampicilinem a substrátem 5-bromo-4-chloro-*idolyl*- β -D-glukopyranosidem (X-Glu).

Velikost knihovny pro skríníng určuje počet variant, které chceme zachytit. Chceme-li zachytit 95% variant, lze na základě Poissonova rozdělení vypočítat velikost knihovny (Patrick, Firth, &

Blackburn, 2003). Výpočet je dán vztahem: $L = V \cdot \ln\left(\frac{1}{1-p}\right)$, kde L – je velikost knihovny, V –

počet variant, p – úplnost knihovny. Pro knihovnu W373X jsou parametry následující: $V = 32$, $p = 0,95 \rightarrow L = 95,9 \sim 96$. Pokud knihovna bude mít 96 kolonií, je 32 variant pokryto z 95%. Knihovna není ale úplná – obsahuje pouze 95% všech variant.

Pokud chceme zachytit všechny varianty s 95%-ní jistotou, výpočet velikosti knihovny

je dán vztahem: $L = -V \cdot \ln\left(-\frac{\ln P_s}{V}\right)$, L – je velikost knihovny, V – počet variant,

P_s – pravděpodobnost výskytu každé varianty. Pro knihovnu W373X je opět $V = 32$, $P_s = 0,95 \rightarrow L = 205,6 \sim 206$. Pokud knihovna bude mít 206 kolonií, můžeme si být z 95% jisti, že obsahuje všechny varianty. Tato velikost knihovny byla pro náš experiment vybrána jako optimální. Výpočet knihovny je dostupný z webu na adrese: <http://guinevere.otago.ac.nz/cgi-bin/ae/f/glue.pl>. Po transformaci knihovny mutantů do kompetentních XJb *E. coli* a jejich vysetí na Petriho misky, byly kolonie selektovány na antibiotiku ampicilin. Růst kolonií trval 24 hodin při 37 °C a pak dále 24 hodin při laboratorní teplotě. Princip skríníngu je založen na tom, že během kultivace kolonií na miskách dochází k neindukované expresi proteinu Zm-p60.1, který hydrolyzuje substrát X-Glu za zniku modrého barviva.

Kolonie jednotlivých mutantů z misky na Obr. 3 byly přeneseny do 200 μ l LB média na MTP 96 desce (Iwaki). Kultivace desky probíhala při 37 °C, 700 rpm, poloměr 3 mm, po dobu 24 hodin (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Druhý den ráno byla změřena optická densita narostlých kultur ($OD_{600} = 2,500 \pm 0,100$, $n = 20$). Pipetou bylo z každé noční kultury přepipetováno 5 μ l do 200 μ l aLB obsahujícího navíc 2,5 mM koncentraci substrátu pNPG. Na desce byly vyhrazeny 4 jamky pro každého mutantu. Celá deska byla kultivována 17hod při 30 °C, 700 rpm. Během kultivace probíhala pouze neindukovaná exprese mutantních forem Zm-p60.1. Na konci růstu byla změřena optická densita všech jamek (Spectra Rainbow, Tecan). Deska byla centrifugována 20 minut, 3200 rpm, 4 °C. Z každé jamky bylo přepipetováno 20 μ l supernatantu do 180 μ l 0,2 M Na_2CO_3 . Dle kalibrační přímky bylo dopočítáno množství uvolněného *para*-nitrofenolu (pNP) (absorbance měřena při 405 nm). Protože kultury nerostly stejně, kdy průměrná OD_{600} byla po 24

hodinách $2,000 \pm 0,110$ $n = 80$, musela být výsledná koncentrace *p*NP vztažena (vydělením OD600) pro danou densitu jamky.

Kultivace kolonií W373X na substrátech X-Glu (1 mM) a MUG (4-metylmberliferyl- β -D-glukopyranosid) (1 mM) probíhala stejným způsobem jako na substrátu *p*PNG. Po 24 hodinách byla deska s X-Glu vyfocena. Deska se substrátem MUG byla vyfocena na transluminátoru (zdroj $\lambda = 312$ nm). Množství vzniklého produktu bylo staveno pouze pro jeden substrát - *p*NPG.

VÝSLEDKY A DISKUZE

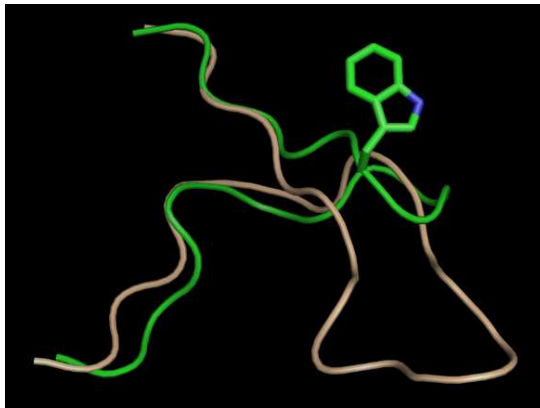
Návrh mutantní knihovny

V rodině GH1 (databáze CAZY) je celkem 33 enzymů, včetně Zm-p60.1, jež mají vyřešenou 3D strukturu. Tento soubor 33 enzymů byl základem strukturálního porovnání. Všechny struktury byly zarovnané k enzymu Zm-p60.1 v programu PyMOL 1.3 (Molecular Graphic System; Schrödinger, LLC). Z 3D zarovnání se určila aminokyselinová variabilita, která pozičně odpovídá W373 v Zm-p60.1 (*Obr. č. 1 B*). U 30 enzymů se na této pozici nachází tryptofan. V jednom případě (enzym myrosinasa 1 pocházející z mšice zelné - *Brevicoryne brassicae*) byl k této pozici přiřazen tyrosin. Ve druhém případě (enzym MA1 pocházející z hořčice bílé - *Sinapis alba*) nelze jednoznačně určit, jaká aminokyselina strukturálně odpovídá pozici W373, protože 3D struktura enzymu MA1 je v oblasti smyčky výrazně prodloužena vzhledem k Zm-p60.1 (*Obr. 2*). Relativní zastoupení nalezených aminokyselin ze strukturální analýzy je zobrazeno v *Grafu 1*.

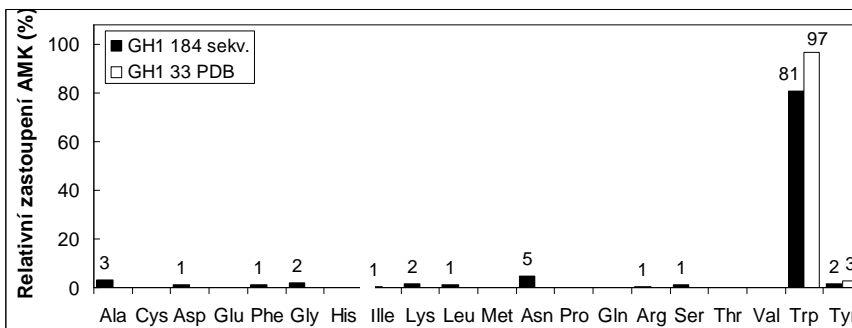
Abychom získali přehled o tom, jak je sekvenčně zachován tryptofan napříč skupinou enzymů podobných Zm-p60.1, byla databáze CAZY využita jako výchozí bod pro bioinformatickou analýzu. Námi studovaný enzym je zařazen do rodiny GH1 čítající 5 200 zástupců (ke dni 20.4.2012). Malá část je charakterizována (235 enzymů) a z této skupiny byl udělán výběr pro mnohonásobné sekvenční zarovnání. K zarovnání byl použit program T-coffee (Notredame et al., 2000).

Z výsledného zarovnání vyplývá, že pozice W373 je málo variabilní. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou je tryptofan (153 výskytů, 81%), druhou je asparagin (9 výskytů, 4%) a ostatní leží v intervalu <0 - 6> výskytů (<0 - 3%>) (*Graf č. 1*). V rámci vybrané skupiny sekvencí se tryptofan jeví jako sekvenčně zachovalý. Obecně existuje několik důvodů, proč je daná aminokyselina konzervována. Prvním z nich je, že aminokyselina je důležitá pro správné strukturální uspořádání proteinu nebo se účastní katalytické reakce, vazby ligandu nebo je v oblasti, která zodpovídá za interakce mezi proteiny (Mayrose, Graur, Ben-Tal, & Pupko, 2004). Význam W373 spočívá v rozeznávání ligandu pomocí stacking interakce (Zouhar et al., 2001).

Obr. 2 - Strukturální zarovnání enzymů Zm-p60.1 (PDB 1XHJ, zelená barva) a myrosinasy MAI (PDB 1E4M, béžová barva) ze *Sinapis alba*. Smyčky obou enzymů mají odlišnou délku a uspořádání v prostoru. V tomto případě nelze strukturálně přiřadit aminokyselinu odpovídající pozici W373.



Graf 1 - Relativní aminokyselinová variabilita pozice W373 enzymu Zm-p60.1. Srovnání výstupů sekvenčních zarovnání ze zarovnání 184 sekvencí a 33 sekvencí ze struktur. Data shodně ukazují, že W373 je konzervován. Obě dvě skupiny dat pochází z GH1 rodiny (www.cazy.org).



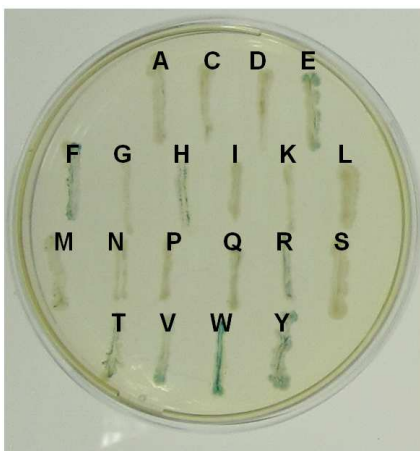
Závěr bioinformatické analýzy je, že v pozici odpovídající W373 v Zm-p60.1 je konzervován tryptofan. Zachovalost této pozice indikuje, že W373 hraje důležitou roli v rozpoznávání substrátu pro β -glukosidasy z rodiny GH1 (Czjzek et al., 2000). V rámci 184 sekvencí rodiny GH1 se ale v dané pozici vyskytují i další aminokyseliny. Není jasné, jestli jiné aminokyseliny, které v této pozici vidíme na sekvenčním zarovnání jsou funkční jen v rámci konkrétních glykosidas, nebo jsou to možnosti pro záměnu. Otázka, která vzešla z bioinformatické analýzy je, jak variabilita

aminokyseliny W373 získaná ze zarovnání sekvencí souvisí s mutabilitou této pozice v β -glukosidase Zm-p60.1.

Tvorba a screening mutanční knihovny W373X

Kombinatorická knihovna enzymu Zm-p60.1 byla připravena místně řízenou mutagenézí (QuikChange, Agilent). Jako templát posloužila DNA pRSET:::(His)₆Zm-p60.r. - W373_DEL. K mutaci byla použita směs 32 různých primerů. Po mutagenézní reakci, kdy vznikla mutanční knihovna, byla směs inkubována s enzymem *Dpn I* a transformována do chemokompetentních *XJb E. coli*. Kvůli nízkému počtu získaných kolonií po transformaci byla reakce kitem Quik Change prováděna 3x. Celkový počet kolonií, který se podařilo zachytit, byl překvapivě nízký – 20 kolonií namísto potřebných 206 pro pokrytí variability v knihovně. Ze všech kolonií byla postupně izolována plasmidová DNA. Úspěšně osekvenovat se podařilo 8 různých mutantů z 20 kolonií. Z ekonomických důvodů, kdy by bylo celý proces izolace a sekvenace opakovat, a statistických důvodů nebylo zbylých 12 kolonií sekvenováno. Náhodné vybírání klonů z kombinatorické knihovny má svá úskalí. Obecně, v průběhu sekvenování mutanční knihovny může nastat situace, kdy se zvyšujícím se počtem osekvenovaných mutantů je stále náročnější najít nové mutanty. Z tohoto důvodu, bylo jednodušší ukončit prohledávání knihovny a vytvořit zbývajících 12 mutantů jednotlivě. Pro jednotlivé mutanty byly navrženy samostatné primery a provedena mutagenézní reakce kitem QuikChange. Tímto způsobem bylo postupně získáno zbylých 12 variant. Úplná knihovna obsahovala 20 mutantů enzymu Zm-p60.1 v pozici W373. Všechny kolonie nesoucí mutace byly přečárkovány na Petriho misky (s agarem, ampicilinem a substrátem X-Glu) (Obr. 3).

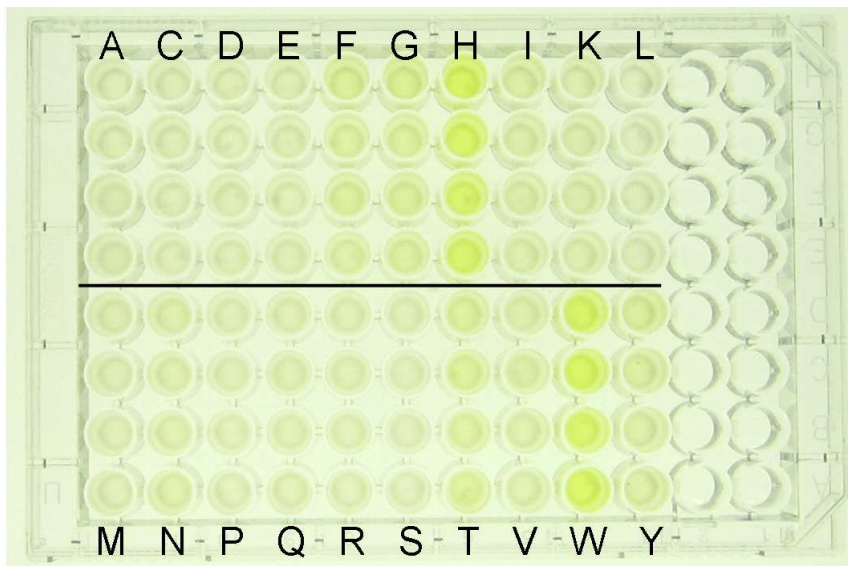
Obr. 3 - Petriho miska (s agarem a substrátem X-Glu) se všemi W373X varianty enzymu Zm-p60.1. Jednotliví mutantí vykazují různou aktivitu vůči umělému substrátu X-Glu.



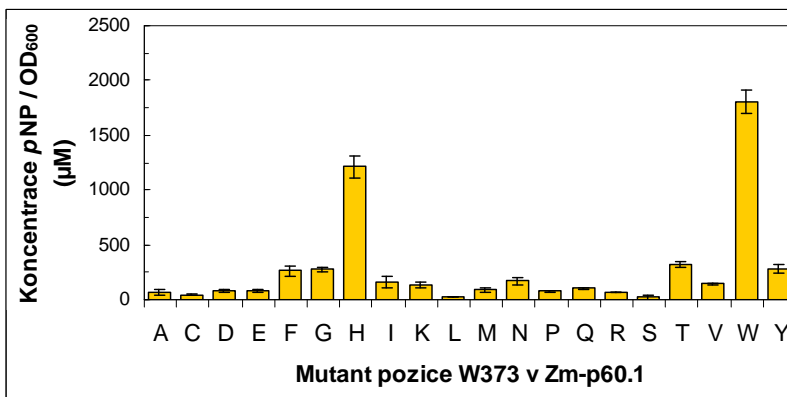
Základní porovnání aktivit na agarových miskách se substrátem je vhodné k získání přehledu. Nicméně, není použitelné pro přesnější porovnání aktivit v rámci knihovny W373X. Deska o 96-ti jamkách poskytuje vhodný prostor pro kultivaci mutantní knihovny v XJb E. coli v médiu obsahující substrát.

Celá knihovna W373X byla kultivována v médiu se substrátem pNPG (2,5 mM) (Obr. 4), X-Glu (1 mM) a MUG (1 mM) (viz Metody). Cílem kultivace na substrátech je především předběžné porovnání aktivit. Přesná kvantifikace byla možná pouze pro *para*-nitrofenol uvolněný z pNPG. Na pNPG je jednoznačně neaktivnější WT (W373) a druhým v pořadí je W373H. Na základě měření bylo zjištěno, že na tomto substrátu vytvářejí 4 mutanti (W373F, W373G, W373T a W373Y) skupinku s podobnou aktivitou (Graf 2).

Obr. 4 - Vzhled MTP96 desky obsahující LB médium se substrátem pNPG (2,5 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Čára uprostřed dělí horní a dolní sekci mutantů.



Graf 2 - Měření množství uvolněného pNP za 24 hodin kultivace knihovny W373X. Směrodatná odchylka byla určena pro $n = 4$.

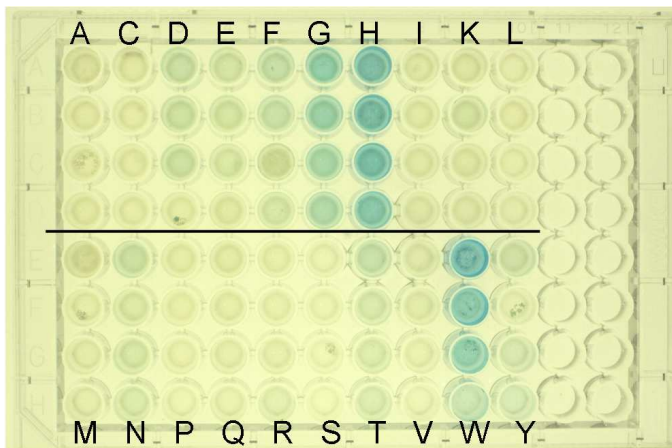


Boční řetězec Trp 373 se účastní stacking interakce s aromatickým systémem na aglykonu substrátu (Obr. 1 B). Tato interakce pak napomáhá správně orientovat glykosydickou vazbu ke štěpení (Tribolo, Berrin, Kroon, Czjzek, & Juge, 2007). Aminokyseliny His (H), Phe (F) a Tyr (Y) obsahují residua, jež mohou rovněž zprostředkovávat stacking interakci substrátem. Tímto je možné vysvětlit jejich aktivitu. Nicméně tato analogie již neplatí pro Gly (G) a Thr (T), které žádný aromatický systém neobsahují a jsou také aktivní. Pokud se jejich aktivita potvrdí, bude to nový vhled do interakce se substrátem.

Další dva substráty (X-Glu a MUG) nebyly vzhledem k technologické obtížnosti hodnoceny kvantitativně. Přesto naznačují podobné spektrum aktivních mutantů.

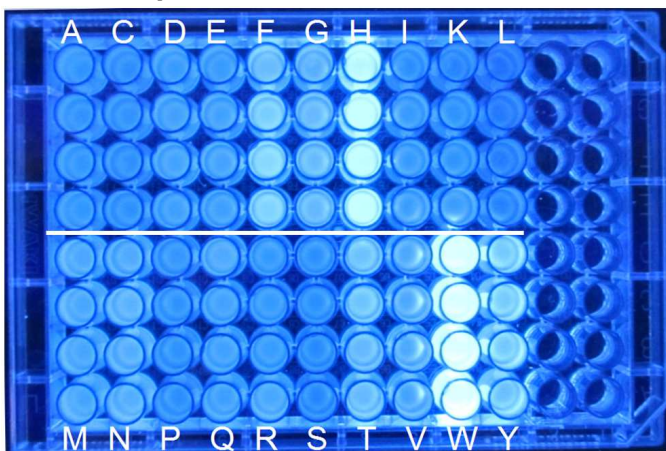
Po hydrolyze X-Glu vzniká dibromdichloroindigo. Barva produktu je modrá, jež dobře kontrastuje s nažloutlým LB médiem. Na desce s X-Glu dominuje dvojice opět W373 a W373H. Viditelnou aktivitu měla i stejná skupina jako u pNPG (W373F, W373G, W373T a W373Y), kterou rozšiřuje navíc W373D, W373E a W373N (Obr. 6).

Obr. 6 - Vzhled desky obsahující médium se substrátem X-Glu (1,0 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Čára dělí horní a dolní skupinu mutant.



Vizualizace fluorescenčního produktu 4-methylumbelliferonu ($\lambda_{\text{EX}} = 372 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 455 \text{ nm}$) u substrátu MUG byla provedena tak, že nakultivovaná deska byla vyfocena na transluminátoru ($\lambda = 312 \text{ nm}$). Z fotografie je vidět, že hydrolyza MUG nejefektivněji probíhá, stejně jako v předešlých případech, W373 a mutantem W373H. Dvojici doplňují méně aktivní mutanti W373F, W373G, W373N a W373Y (Obr. 7).

Obr. 7 - Vzhled desky obsahující médium se substrátem MUG (1,0 mM) po 24 hodinové kultivaci. Každý mutant je zastoupen ve 4 svislých jamkách. Deska byla vyfocena podsvícená transluminátorem při excitační vlnové délce $\lambda = 312 \text{ nm}$.



Na všech 3 substrátech se ukazuje vždy stejná skupina, jež má viditelnou aktivitu (W373F, W373G, W373H, W373T, W373Y). Nejvyšší má aktivitu WT = W373.

Pozice W373 byla v minulosti mutována na W373K. Tato mutace vedla k poklesu aktivity na 0,5% velikost původní formy Zm-p60.1 (na substrátech pNPG a MUG) (Dopitová et al., 2008).

Pozice W373 v Zm-p60.1 odpovídá W388 v enzymu striktosidin-O- β -D-glukosidasy (PDB 2JF7, *Rauvolfia serpentina*). Mutace W388A způsobila výraznou změnu v aktivitě enzymu, jež po mutaci dosahovala 1% původní aktivity (substrátem byl striktosidinglukosid) (Barleben, Panjekar, Ruppert, Koepke, & Stöckigt, 2007).

Pozice W373 v Zm-p60.1 odpovídá W345 v enzymu β -glukosidasy (PDB 2E9L, *Homo sapiens*). Zavedením mutací W345M a W345A mělo opět výrazný vliv na aktivitu, která klesla na až 0,1% původní aktivity na všech studovaných substrátech (*para*-nitrofenolglukosidy) (Triboło et al., 2007). Pozice tryptofanu ve dvou předěšlých případech je velice klíčová pro funkci enzymu.

Z předběžných testů aktivit mutantní knihovny W373 enzymu Zm-p60.1 vyplývá, že tryptofan může být nahrazen i jinou aminokyselinou. Výsledky jsou ve shodě s předchozími studiemi, kde se ukazuje, že vliv záměn na pozici W373 na aktivitu enzymu je vždy výrazný.

ZÁVĚR

Enzym kukuřičná β -glukosidasa Zm-p60.1 patří mezi glykosidhydrolasy (GH). V databázi CAZY (www.cazy.org) je zařazen do rodiny GH1. Rodina GH1 obsahuje skupinu 235 charakterizovaných enzymů a 33 vyřešených 3D struktur. Na základě mnohonásobného sekvenčního přeložení skupiny příbuzných 184 sekvencí a analýzy 33 struktur glykosidas z rodiny GH1 se ukázalo, že nejvíce konzervovanou aminokyselinou odpovídající pozici odpovídající W373 byl tryptofan. Mimo něj byla tato pozice obsazena i několika jinými aminokyselinami. Je pravděpodobné, že aminokyseliny odlišné od tryptofanu, které se objevily v mnohonásobném sekvenčním přeložení, budou ve stejné pozici jako W373. Z toho lze vyvodit, že sekvenční variabilita by mohla v případě Zm-p60.1 ukazovat na možnost mutability pozice W373.

Na základě této bioinformatické analýzy byla testována skutečná mutabilita W373 saturační mutagenézí. Vzhledem k překvapivě vyššímu počtu aktivních klonů bylo rozhodnuto zkonstruovat celou knihovnu W373X.

Po získání celé knihovny W373X byl proveden předběžný skrínig aktivity mutantů. Skrínig probíhal formou kultivace XJb *E. coli* (nesoucí plasmid jednotlivých mutantů) ve 200 μ l média v jamkách na desce formátu MTP 96. Kultivační LB médium bylo obohaceno o substráty *p*-nitrofenyl- β -D-glukopyranosid (*p*NPG), 5-chloro-4-bromo-indolyl- β -D-glukopyranosid (X-Glu) a 4-metylmberliferyl- β -D-glukopyranosid (MUG). Po 24 hodinové kultivaci byla aktivita mutantů kvantitativně hodnocena na substrátu *p*NPG. Nejvyšší aktivitu z mutantů měl WT (W373). Jako

druhou nejvyšší aktivitu projevil mutant W373H. Další aktivní mutanti byli W373F, W373G, W373T a W373Y. Zbývající mutanti vykazovali velmi nízkou nebo téměř žádnou aktivitu na substrátu pNPG. Na ostatních substrátech (MUG, X-Glu) knihovna W373X mutantů naznačuje podobnou tendenci v aktivitě.

Kombinace bioinformatických metod a proteinového inženýrství se ukázala jako vhodný postup pro získání zajímavých nových variant enzymu β -glukosidasy Zm-p60.1. V návazné práci bude sledována změna specifity těchto glukosidas vůči konjugátům cytokininů v rámci vývoje nástrojů pro studium hormonálního systému rostlin.

LITERATURA

Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J., & Stöckigt, J. (2007). Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *The Plant cell*, 19(9), 2886–97. doi:10.1105/tpc.106.045682

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B., & Esen, a. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13555–60. doi:10.1073/pnas.97.25.13555

Dopitová, R., Mazura, P., Janda, L., Chaloupková, R., Jerábek, P., Damborský, J., Filipi, T., et al. (2008). Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1. *The FEBS journal*, 275(24), 6123–6135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016858>

Mayrose, I., Graur, D., Ben-Tal, N., & Pupko, T. (2004). Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. *Molecular biology and evolution*, 21(9), 1781–91. doi:10.1093/molbev/msh194

Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205–17. doi:10.1006/jmbi.2000.4042

Patrick, W. M., Firth, A. E., & Blackburn, J. M. (2003). User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein engineering*, 16(6), 451–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874379>

Tribolo, S., Berrin, J.-G., Kroon, P. a., Czjzek, M., & Juge, N. (2007). The Crystal Structure of Human Cytosolic β -Glucosidase Unravels the Substrate Aglycone Specificity of a Family 1 Glycoside Hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 370(5), 964–975. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.034

Zouhar, J., Vévodová, J., Marek, J., Damborský, J., Su, X. D., & Brzobohatý, B. (2001). Insights into the functional architecture of the catalytic center of a maize beta-glucosidase Zm-p60.1. *Plant physiology*, 127(3), 973–85. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=129268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

STUDY OF CORROSION OF STRUCTURAL MATERIALS FOR A NUCLEAR REACTOR IV GENERATION BY MEANS OF LA-ICP-MS

STUDIUM KOROZE KONSTRUKČNÍHO MATERIÁLU JADERNÉHO
REAKTORU IV GENERACE POMOCÍ LA-ICP-MS

Warchilová T.^{1,2}, Vaculovič T.^{1,2}, Matal O.³, Šimo T.³, Mikuška P.⁴, Kanický V.^{1,2}

¹Laboratory of Atomic Spectrochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, 611 37 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³ENERGOVÝZKUM, s. r.o., Božetěchova 194/17, 61200 Brno, Czech Republic

⁴Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Veveří 967/97, 602 00 Brno, Czech Republic

E-mail: warchilovateza@gmail.com

ABSTRACT

Molten salt reactor (MSR) is one of six types Generation IV reactors. This system employ mixtures of molten fluoride salts as solid fuel coolants or as media carrying molten fissile material and accomplishing heat transfer at the same time. Laser ablation inductively coupled plasma (LA-ICP-MS) was used as a tool for corrosion study of eventual structural materials for MSR cooling circuit. Three types of nickel based materials (Inconel A 686, pure nickel, A071EV) were studied.

High working temperature of 680°C and fluoride salts provoke very strong corrosion surroundings. Corrosion influenced zones were studied by LA-ICP-MS and the 2D maps of lateral elemental distribution were created on the semiquantitative level using the procedure based on the normalization of particular isotopic signals to the sum of signals of all isotopes present in the examined zone. The fluoride “ion intensity” was calculated from stoichiometry of fluoride salt and Li, Na alternatively Zr intensity.

Key words: LA-ICP-MS, molten fluoride salt, corrosion, lateral mapping

Acknowledgments: Czech Science Foundation (101/08/1100) and Czech Ministry of Education, Youth and Sports (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) are acknowledged for support.

ÚVOD

Laserová ablace ve spojení s ICP-MS se již stala poměrně běžnou metodou pro prvkové analýzy materiálů biologické¹⁻³, geologické⁴ či umělecké povahy^{5,6}. Velkou výhodou této metody jsou relativně nízké nároky na úpravu analyzovaných vzorků před analýzou a také rychlost víceprvkové a izotopové analýzy.

Tato práce se zabývá problematikou použití LA-ICP-MS jako nástroje pro laterální mapování koroze kovových vzorků^{7,8}, které byly vyrobeny z materiálů vhodných pro výrobu tepelného výměníku jaderného reaktoru IV. Generace. Reaktorové systémy nové generace musejí splňovat přísné požadavky z hlediska bezpečnosti provozu, energetické účinnosti i šetrnosti k životnímu prostředí⁹. Také minimální produkce jaderného odpadu je pro tyto systémy klíčová. Jedním ze šesti slibných systémů nové generace je reaktor využívající taveniny fluoridových solí – reaktor s tavenými solemi (Molten Salt Reactor)¹⁰. Představuje odklon od tradiční reaktorové technologie. Štěpný materiál (směs uranu, thoria, příp. plutonia) je rozpuštěn v alkalické fluoridové soli. Sůl s rozpuštěným štěpným materiálem cirkuluje v grafitovém jádru reaktoru a přes tepelný výměník přenáší teplo do sekundárního okruhu, taktéž s taveninou alkalické fluoridové solí. Během procesu štěpení dochází ke kontinuálnímu odstraňování štěpných produktů a k zanášení nového štěpného materiálu. Reaktor je možné využít i k výrobě vodíku a odsolování mořské vody. Provozní teplota přesahující 500°C a fluoridová sůl vytvářejí svojí kombinací vysoce korozní prostředí a tudíž kladou velmi vysoké nároky na konstrukční materiál^{11,12} jak samotného reaktoru, tak i tepelného výměníku.

MATERIÁL A METODIKA

Byly vybrány 3 typy materiálů vhodné jako eventuální konstrukční materiál tepelného výměníku pro reaktor pracující s tekutými fluoridovými solemi (MSR) – Inconel A 686, A071EV a čistý nikl. Z těchto materiálů byly vyrobeny testovací tělíška, která byla v kontaktu s taveninou fluoridové soli. Podmínky experimentu jsou uvedeny v tabulce č. I. Po ochlazení a odstranění utuhlé taveniny na povrchu, byla tělíška rozřezána na jednotlivé díly. K měření a studiu hloubky koroze sloužil řez korodovaným vzorkem. Řezy byly vkládány do tablety z epoxidové pryskyřice Araldite a byly vyleštěny diamantovou pastou do vysokého lesku (Obr. 1). Takto upravený vzorek byl umístěn do pohyblivé ablační cely Supercell (objem 33 cm³). Ablační cela umožňuje pohyb vzorku v osách XYZ a zároveň umožňuje sledování vzorku v průběhu ablace díky vestavěné CCD kameře. Ablační cela je součástí komerčního ablačního systému UP-213 (New Wave, USA), ve kterém je zabudován Nd:YAG laser emitující laserové záření o vlnové délce 213 nm (5. harmonická frekvence). Laser pracuje v systému Q-switch, disponuje délkou pulzu 4,2 ns a nabízí možnost nastavení frekvence 1-20 Hz. Cela je pomocí polyuretanové hadičky spojena s ICP-MS spektrometrem 7500ce (Agilent Technologies, Japonsko) s kvadrupólovým analyzátozem, který je

MENDELNET 2012

vybaven kolizní reakční celou. Jako nosný plyn pro aerosol uvolněného materiálu vzorku bylo použito helium. Před vstupem do ICP výboje byl k tomuto plynu přidáván pomocný plyn argon. Pro účely laterálního mapování byl vybrán ablační mód ablace do bodu. Bodový rastr tvoří pravidelně od sebe vzdálené body (Obr. 2). Optimalizované parametry ablace do bodu jsou uvedeny v tabulce II. Mapována byla ta část vzorku, která již při přiblížení mikroskopem signalizovala korozní narušení (Obr. 3). Ablace řezu probíhala směrem od korozní vrstvy směrem k neporušené části materiálu a začínala vždy na rozhraní korozní vrstvy a epoxydové pryskyřice. Pro účely kvantifikace byla použita metoda založená na normalizaci signálu vzhledem k součtu signálů izotopů všech prvků podle vzorce:

$$\text{zastoupení prvku [\%]} = \frac{I_{abund}}{\sum I_{abund}} \times 100$$

kde I_{abund} je intenzita prvku přepočítaná na 100 % zastoupení izotopu. Signál fluoru, který je pro výpočet součtu všech izotopů potřeba, byl vypočítán ze stechiometrických poměrů v solích:

$$I_{abund(F)} = I_{abund(Na)} + I_{abund(Li)} + 4 \times I_{abund(Zr)}$$

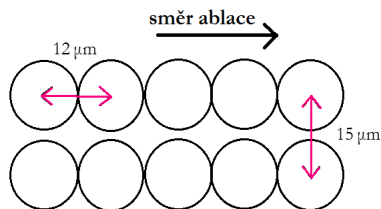
Tab. 1: Složení vzorků a experimentální podmínky

Vzorek	Hlavní komponenty (% m / m)	Tavenina soli	Teplota [°C]	Doba expozice [hod]
Inconel A 686	Ni:Cr:Mo:W:Fe (59:20:16:3:0,3)	LiF:NaF:ZrF ₄ (42:29:29)	680	1000
A071EV	Ni:Mo:Cr:W:Ti (76,3:9:7:4,5:1,7)	LiF:NaF (60:40)	680	1000
Čistý nikl	Ni:Mn:Fe (99:0,8:0,2)	LiF:NaF (60:40)	680	1000

Obr. 1: Řezy korodovaného vzorku v pryskyřici

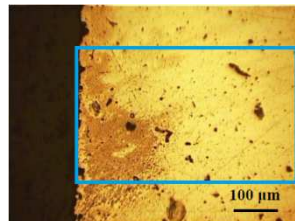


Obr. 2: Naznačení bodového rastru



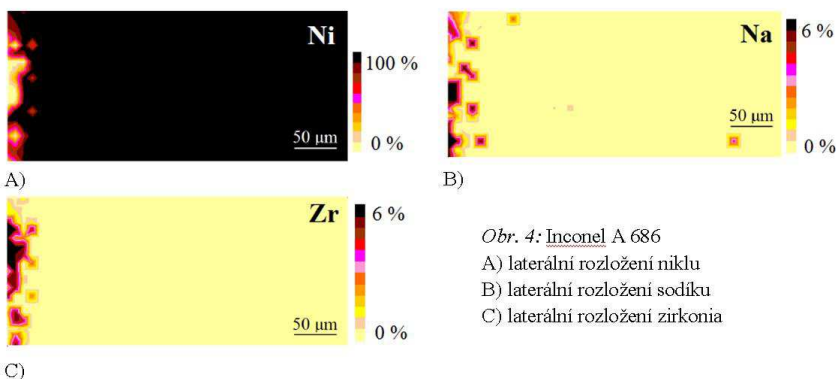
Parametr	Hodnota
Hustota zářivé energie [$\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$]	25
Frekvence laseru [Hz]	20
Doba trvání ablace do jednoho bodu [s]	5
Prodleva mezi dvěma ablacemi [s]	10
Průměr ablačního kráteru [μm]	8
Vzdálenost mezi středy bodů v linii [μm]	12
Vzdálenost mezi liniemi [μm]	15
Průtok He [$\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$]	1,0

Obr. 3: Vzorek z materiálu Inconel A 686 před ablací (tmavé útvary na povrchu vzorku značí korozi, modrý obdélník ohraničuje analyzovanou plochu)



VÝSLEDKY A DISKUZE

Na Obr. 4, 5 a 6 jsou znázorněny mapy distribuce prvků na řezech tří testovaných materiálů na bázi niklu. Korozní vrstva nacházející se při levém okraji řezu vzorku vznikla důsledkem vysokoteplotního a dlouhodobého působení taveniny fluoridové soli LiF-NaF , příp. LiF-NaF-ZrF_4 pro materiál Inconel A 686. Číselný rozsah barevné škály, který je součástí každé mapy, je uveden v jednotkách % m/m. Tmavší barvy znamenají vyšší obsah daného prvku v analyzované části vzorku. Světlejší barvy naopak značí úbytek měřeného prvku.

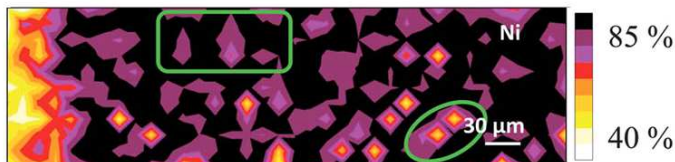


Obr. 4: Inconel A 686

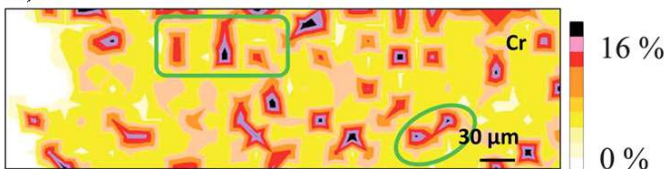
- A) laterální rozložení niklu
B) laterální rozložení sodíku
C) laterální rozložení zirkonia

U všech tří analyzovaných vzorků je v místě kontaktu povrchu vzorku s taveninou fluoridové soli pozorován úbytek niklu. V těchto místech dochází k nárůstu prvků pocházejících z taveniny soli (Li, Na, Zr). Hloubka koroze byla odečtena jako tloušťka vrstvy při okraji vzorku, ve které byl zjištěn zvýšený výskyt prvků z fluoridové soli.

Obr. 5: A071EV A) laterální rozložení niklu B) laterální rozložení chromu C) laterální rozložení sodíku



A)



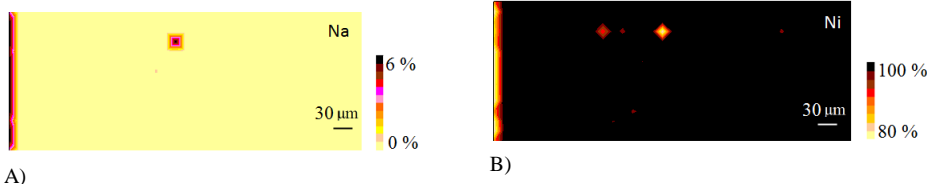
B)



C)

Rozložení chromu ve vzorku A071EV je značně nehomogenní (Obr. 5 B). Z mapy rozložení niklu a chromu lze vypořadovat, že v místech, kde dochází k úbytku niklu, se zvyšuje zastoupení chromu (Obr. 5 A, 5 B, označení zelenou elipsou). Ačkoli byly všechny tři měřené vzorky vystaveny působení taveniny při 680°C po stejnou dobu, koroze je pro každý typ materiálu různá. Za nejodolnější materiál lze považovat čistý nikl, u kterého byla zjištěna nejmenší koroze a to do hloubky 12 µm. U zbývajících dvou materiálů – Inconel A 686, A071EV – koroze přesahuje hloubku 45 µm. Zvláště z map na Obr. 4 lze vyvozovat závěr, že rozsah koroze v měřeném vzorku je značně nehomogenní. V ojedinělých případech jsou hlouběji pod povrchem pozorovány útvary spíše oválného tvaru, v nichž byl detegován zvýšený obsah korozních prvků (Obr. 4 B, 6 A). Důvod vzniku těchto anomálií nebyl dosud objasněn.

Obr. 6: Čistý nikl A) laterální rozložení sodíku B) laterální rozložení niklu



ZÁVĚR

Byla vyvinuta metoda pro prvkové mapování korozních vrstev na řezu materiálem pomocí LA-ICP-MS. Vytvořené mapy zobrazující rozložení sledovaného prvku v materiálu poskytují informace o míře poškození materiálu korozí, čili o hloubce proniknutí taveniny fluoridové soli dovnitř materiálu na bázi niklu. Vytvořené 2D mapy poskytují taktéž informaci o nehomogenním rozložení prvků v materiálu a typu koroze, který se projevil.

LITERATURA

1. Wu B., Becker J. S. (2011): Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307 (1-3): 112-122.
2. Becker J. S., Kumtabtim U., Wu B., Steinacker P., Otto M., Matusch A. (2012): Mass spectrometry imaging (MSI) of metals in mouse spinal cord by laser ablation ICP-MS. *Metalomics*, 4 (3): 284-288.
3. Castro W., Hoogewerff J., Latkoczy C., Almirall J. R. (2010): Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for the elemental analysis bone and teeth samples for discrimination purposes. *Forensic Science International*, 195 (1-3): 17-27.
4. Bea F., Montero P., Stroh A., Baasner J. (1996): Microanalysis of minerals by an Excimer UV-LA-ICP-MS system. *Chemical Geology*, 133 (1-4): 145-156.
5. Koch J., Gunter D. (2011): Review of the State-of-the-Art of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 65 (5): 155A-162A.
6. Giussani B., Monticelli D., Rampazzi L. (2009): Role of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry in cultural heritage research: A review. *Analytica Chimica Acta*, 635 (1): 6-21.
7. Vaculovic T., Warchilova T., Simo T., Matal O., Otruba V., Mikuska P., Kanicky V. (2012): Elemental mapping of structural material for a nuclear reactor by means of LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (8): 1321-1326.
8. Vaculovic T., Sulovsky P., Machat J., Otruba V., Matal O., Simo T., Latkoczy C., Gunter D., Kanicky V. (2009): The EPMA, LA-ICP-MS and ICP-OES study of corrosion of structural

- materials for a nuclear reactor cooling circuit by molten fluoride salt treatment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (5): 649-654.
9. Abram T., Ion S. (2008): Generation-IV nuclear power: A review of the state of the science. *Energy Policy*, 36 (12): 4323-4330.
 10. Uhlř J. (2007): Chemistry and technology of Molten Salt Reactor - history and perspectives. *Journal of Nuclear Materials*, 360 (1): 6-11.
 11. Murty K. L., Charit I. (2008): Structural materials for Gen - IV nuclear reactors: Challenges and opportunities. *Journal of Nuclear Materials*, 383 (1-2): 189-195.
 12. Olson L.C. et al. (2009): Materials corrosion in molten LiF-NaF-KF salt. *Journal of Fluorine Chemistry*, 130 (1): 67-73.

Names of publication:	MendelNet 2012 Proceedings of International Ph.D. Students Conference
Editors:	Ing. Petr Škarpa, Ph.D. doc. Ing. Radim Cerkal, Ph.D. doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D. Ing. Jaromír Kovárník Ing. Ondřej Polák Ing. Ivo Vyskočil
Number of pages:	1297
Publisher:	Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
ISBN:	978-80-7375-836-3

Contributions are published in original version, without any language correction