

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Kinetika a teplotní závislost enzymů rozkládajících celulózu v arktických půdách

Jan Vazač

Vedoucí práce: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

České Budějovice

2012

Vazač J. (2012). Kinetika a teplotní závislost enzymů rozkládajících celulózu v arktických půdách. [Kinetics and temperature dependance of cellulose degrading enzymes in the Arctic soils. Bc. Thesis, in Czech] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Kinetics and temperature dependance of β -glucosidase and cellobiosidase was investigated in arctic soil. These enzymes are key in cellulose degradation, while β -glucosidase produces the final product of cellulose degradation, the glucose, which is readily available to soil microbes and can influence the CO₂ production. The enzyme activities was measured using fluorogenic substrates.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 27.4.2012

.....

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěl poděkovat mému školiteli Ing. Jirkovi Bártovi, Ph.D, který mi byl při psaní práce nepostradatelným rádcem a navigátorem a bez jehož pomoci by práce nevznikla. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Petru Čapkovi a ostatním doktorandům ze skladu doktorandů za ochotu jim vlastní. Další poděkování patří paní prof. Ing. H. Šantrůčkové CSc., panu doc. Ing. J. Elsterovi, CSc., doc. RNDr. O. Ditrichovi, CSc. a panu RNDr. M. Devetterovi, Ph.D za umožnění přístupu k literárním pramenům. Největší dík však patří mé nejmilejší, rodině a mým přátelům za jejich bezmeznou podporu a za to, že mě vždy drží nad vodou.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	2
2.1 Půdní enzymy	2
2.2 Extracelulární enzymy	3
2.2.1 Celulázy	3
2.2.2 β -glukozidáza.....	4
2.3 Enzymatická aktivita a faktory ovlivňující mikrobiální složení.....	5
2.4 Faktory ovlivňující aktivitu extracelulárních enzymů	6
2.4.1 Teplota	6
2.4.2 Chemické složení půdy a dostupnost živin.....	7
2.4.3 Půdní vlhkost	9
2.4.4 pH	9
2.5 Kinetika půdních enzymů	10
2.6 Arktická oblast.....	12
2.6.1 Charakteristika odběrové oblasti	12
2.7 Periglaciální (kryogenní) procesy arktické oblasti	14
2.7.1 Kryoturpace	14
2.8 Periglaciální útvary arktické oblasti	16
2.9 Příklady významných útvarů vyskytujících se v arktických oblastech	17
2.9.1 Podpovrchové	17
2.9.2 Povrchové	18
2.10 Mikroorganismy arktické oblasti a permafrostu.....	19
2.11 Vliv uhlíku v půdách permafrostu na globální oteplování	20
3. Metodika.....	21
3.1 Odběrová oblast a odběr půdních vzorků	21
3.2 Stanovení suché hmotnosti půdy (sušiny)	22
3.3 Použité roztoky a substráty.....	22
3.3.1 Fluorogenní substráty	22
3.3.2 Kalibrační roztok	23
3.3.3 Zásobní roztoky fluorogenních substrátů	23
3.3.4 Konečná koncentrace.....	23
3.5 Měření kinetiky a teplotní závislosti β -glukozidázy a celobiozidázy.....	23
3.5.1 Použitá metoda	24

3.5.2 Příprava půdních vzorků.....	24
3.5.3 Měření fluorescence enzymů.....	24
3.6 Koeficient Q10	26
3.7 Zpracování dat	27
4. Výsledky.....	28
4.1 Kinetika enzymů v půdách Tajmyru	28
4.2 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách Tajmyru	31
4.3 Koeficient Q10	33
5. Diskuze	35
5.1 Kinetika enzymů v půdách Tajmyru	35
5.2 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách Tajmyru	36
5.3 Koeficient Q10	37
6. Závěr.....	38
7. Použitá literatura.....	39
8. Přílohy	47

Seznam použitých zkratk:

DMSO	dimethylsulfoxid
K_m	Michaelisova konstanta
MUF	4-methylumbelliferyl
MUFC	4-methylumbelliferyl β -D-cellobiopyranoside
MUFG	4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside
Q_{10}	Zvýšení rychlosti reakce způsobené zvýšením teploty o 10 °C
SOM	půdní organický materiál (organická hmota)
V_{max}	maximální rychlost reakce/aktivity
a	hodnota směrnice (v tomto případě teplotní závislosti)
n	počet pozorování

1. Úvod

Půdní enzymy jsou spolu s mikroorganismy, kteří je syntetizují, esenciálními články dekompozice a půdní respirace. Dekompozice organického půdního materiálu je obecně jedním z hlavních předpokladů pro zajištění koloběhu a rovnováhy živin ve světových terestrických ekosystémech. Skupinou enzymů, která zajišťuje dekompozici celulózy, je skupina celuláz. Tyto enzymy zprostředkovávají uvolňování uhlíku do půdního prostředí. Odtud tento prvek zčásti prostřednictvím půdní respirace difunduje do atmosféry, absorbuje se do půdního profilu, či se rozpouští ve vodě, odkud může být dále využíván.

Klasickým modelem ukládání půdního uhlíku je jeho mineralizace. V arktických oblastech dochází k dalšímu typu absorpce uhlíku, kdy je spolu s organickým půdním materiálem z povrchových vrstev půd především působením vody pohřbíván do hlubších půdních horizontů. V těchto kryoturbačních horizontech se procesy spojené s dalším zpracováním uhlíku vlivem teploty značně zpomalují. V hlubších, věčně zamrzlých vrstvách arktických půd – v permafrostech – se často zcela zastavují.

Ve zmrzlých půdách arktických oblastí se nalézá asi třikrát více uhlíku než v atmosféře a živých rostlinách celého světa dohromady (Gorham 1991, Zhang et al. 1999). Díky neustálému růstu průměrné roční teploty, který je v arktických oblastech dvakrát až třikrát rychlejší než kdekoliv jinde na Zemi (1), vyvstává otázka, jaký dopad budou mít tyto teplotní změny na aktivitu celuláz v tajících vrstvách arktických půd a s nimi i na další uvolňování skleníkových plynů a v konečném důsledku na klima celého světa.

Cíle práce:

1. Stanovení kinetických parametrů (K_m , V_{max}) a teplotní závislosti (Q_{10}) pro vybrané enzymy v organickém horizontu arktické tundry.
2. Porovnat tyto parametry s výsledky enzymatických aktivit z kryoturbačního půdního horizontu.

Hypotézy:

1. S vyšší teplotou se bude zvyšovat V_{max} i K_m β -glukozidázy a celobiosidázy.
2. Odpověď enzymatické aktivity na zvyšující se teplotu bude výraznější v organickém horizontu, který je vystavován v průběhu sezony větším teplotním výkyvům.

2. Literární rešerše

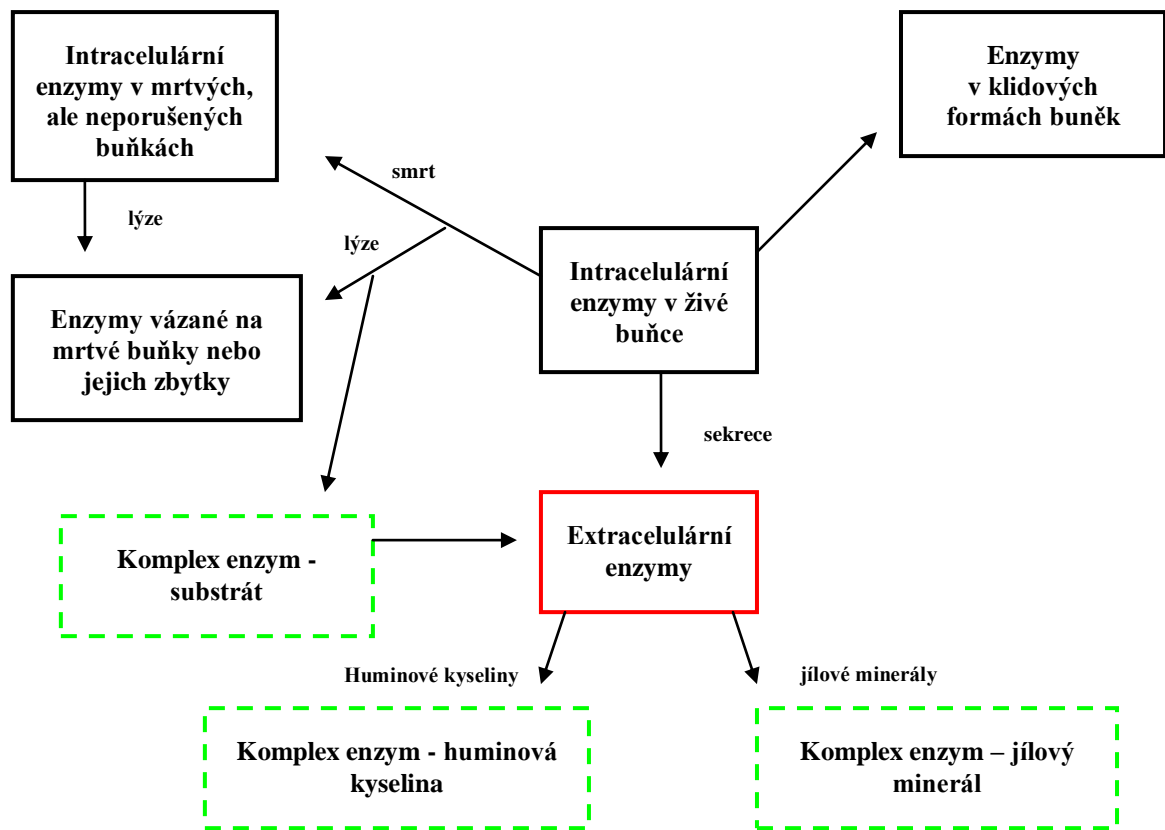
2.1 Půdní enzymy

Enzymy jsou jednoduché či složité proteiny, které jsou jako biologické mediátory aktivní jak uvnitř žijících půdních organismů, tak i extracelulárně, kdy jsou do půdy aktivně sekretovány kořeny, houbami a v neposlední řadě také mikroorganismy (Bakshi a Varma 2011). Půdní enzymy jsou důležité pro katalýzu reakcí nezbytných pro životní procesy půdních mikroorganismů a pro stabilizaci půdního složení (Dick 1994). V půdním systému tak enzymy hrají klíčovou biochemickou roli v celkovém procesu rozkladu organické hmoty (Burns 1983, Sinsabaugh et al. 1991), v uspořádání organických částic a v koloběhu živin (Dick 1994).

Půdní enzymy jsou buňkami syntetizovány buďto neustále (konstitutivní), nebo jsou buňkami produkovány, pouze je-li jejich aktivita nezbytná (inducibilní). Konstitutivní enzymy jsou často syntetizovány při nízkých koncentracích substrátu, zatímco produkce inducibilních enzymů je spojená s vysokými koncentracemi substrátu. Mezi oběma těmito skupinami enzymů existuje mezičlánek ve formě skupiny třetí (Tate 2000).

Lokalizace enzymů v půdě může být různá (Obr.1):

1. Enzymy spojené s živými, metabolicky aktivními buňkami v půdách: nacházející se v buněčné cytoplazmě, vázané na buněčnou stěnu, či jako buňkou nedávno produkované extracelulární enzymy.
2. Enzymy spojené s funkčními, ale nedělicími se buňkami.
3. Enzymy, které jsou připojené k mrtvým buňkám nebo buněčným zbytkům, nebo které difundovaly z mrtvých či umírajících buněk, které je původně vyprodukovaly.
4. Enzymy, které jsou “permanentně“ imobilizované na částicích jílových půd nebo huminových koloidech. Takovéto enzymy mohou zůstat aktivní po dlouhé časové periody. Takto mohou imobilizované půdní enzymy vzniknout jak z eukaryotické tak prokaryotické buňky (Bakshi a Varma 2011).



Obr.1: Hlavní zdroje a distribuce enzymů v půdním prostředí (upraveno dle Tate 2000).

2.2 Extracelulární enzymy

Jak již bylo řečeno, extracelulární enzymy jsou půdní katalyzátory, účastníci se procesů spjatých s rozkladem organické hmoty a s koloběhem živin v půdě. Jednotlivé skupiny enzymů můžeme rozlišit podle jejich specifity pro daný prvek. Fosfatázy jsou klíčovou skupinou enzymů pro cyklus fosforu (P), přičemž hrají významnou roli při hydrolýze esterů a anhydridů kyseliny fosforečné (Schmidt a Laskowski 1961). Ovlivňují také růst rostlin (Speir a Ross 1978). Skupinou spojenou s cyklem dusíku (N) jsou proteázy, které jsou důležité pro jeho mineralizaci (Ladd a Jackson 1982), čímž regulují jeho dostupnost rostlinám podmiňujících jejich růst (Stevenson 1986). Skupinou pro tuto práci nejpodstatnější jsou však celulózy, které zajišťují cyklus uhlíku (C).

2.2.1 Celulózy

Celulózy jsou skupinou enzymů katalyzujících degradaci celulózy, což je polysacharid sestávající z glukózových podjednotek, které jsou spojené do lineárních řetězců

pomocí glykosidických β -1,4 vazeb (Deng a Tabatabai 1994). Sousedící glukózové podjednotky rotují o 180° , což způsobuje vysokou symetrii celulózy se stejným počtem hydroxylových skupin na obou koncích řetězce. Spojování sousedních molekul celulózy hydrogenovými vazbami a Van der Waalsovými silami vede k paralelnímu uspořádání a krystalické struktuře. Díky spojení hydrogenovými vazbami vznikají silná stabilní supramolekulární vlákna vysoké pevnosti (Gardner a Blackwell 1974a,b, Krassig 1993, Nevell a Zeronian 1985). Celulóza je nejrozšířenější organická sloučenina v biosféře, odpovídající téměř 50 % biomasy vytvořené při fotosyntetické fixaci CO_2 (Eriksson et al. 1990). Celulóza je nezbytná jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy, které díky ní mohou růst, vyvíjet se a udržovat svou aktivitu (Deng a Tabatabai 1994).

Celulolytické enzymy se dělí do několika podskupin. Patří sem endo-1,4- β -glukanázy, které štěpí řetězce celulózy náhodně, exo-1,4- β -glukanázy, která vyštěpují glukózu nebo celobiózu z neredukovaných konců řetězců celulózy a nakonec β -D-glukozidáza, která hydrolizuje celobiózu a další rozpustné celodextriny na glukózu (Bakshi a Varma 2011). Celobiozidáza je další zástupce tohoto systému celuláz, který se účastní hydrolýzy glukosidických vazeb tím, že vyštěpuje celobiózu z konců řetězců celulózy. Obecně tedy celulolytické enzymy rozkládají celulózu na glukózu, celobiózu a různě dlouhé oligosacharidy. Tento proces zajišťuje uvolnění uhlíku jako zdroje energie pro další využití mikroorganismy (White 1982).

Hlavními producenty půdních celuláz jsou houby, které tvoří 60 až 90 % mikrobiálního společenství, které se stará o degradaci celulózy (Rabinovitch et al. 2001). Mezi další významné producenty celulytických enzymů patří například aktinomycety.

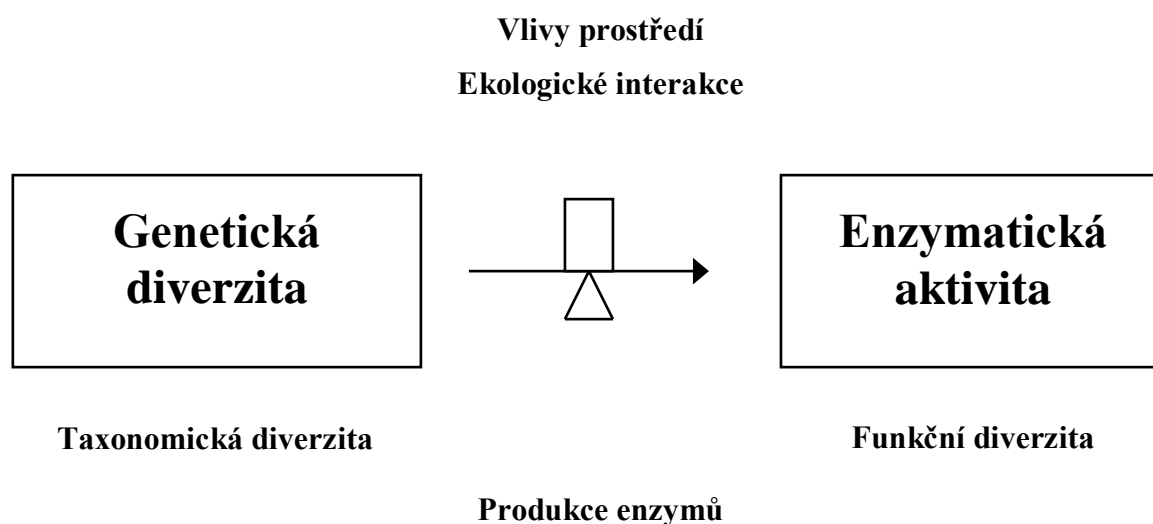
2.2.2 β -glukozidáza

β -glukozidáza je v půdách běžný a převládající enzym, nesoucí jméno podle vazby, kterou hydrolizuje. Jeho důležitá role v půdách spočívá v katalýze hydrolýzy a biodegradace různých typů glukosidů nalézajících se ve zbytcích rostlin, které podléhající dekompozici (Ajwa a Tabatabai 1994, Eivazi a Tabatabai 1988, Martinez a Tabatabai 1997, Tabatabai 1994). β -glukozidázy na glukózu hydrolyzují kromě celobiózy také celodextriny (Birsan et al. 1998). Finálním produktem je stejně jako u celé skupiny celuláz uhlík (C) (Esen 1993).

2.3 Enzymatická aktivita a faktory ovlivňující mikrobiální složení

Mnoho enzymů potřebuje pro svou katalytickou aktivitu přítomnost dalších sloučenin - kofaktorů. Spojení kofaktorů s apoenzymy (proteínovou složkou), se nazývá holoenzym. Tyto aktivní komplexy nalezneme například u některých oxidoreduktáz. Jiné enzymy vyžadují pro dosažení své maximální aktivity přítomnost (navázání) kofaktorů železnatých iontů (Nannipieri et al. 2002). Existují ale i enzymy, které navázání kofaktorů nevyžadují. Mezi takovéto enzymy patří například hydrolázy, které tvoří relativně jednoduché enzymatické systémy (Burns 1983, Dick a Tabatabai 1992).

Aktivita půdních enzymů je charakterizována vztahem mezi enzymem, jeho substrátem a výsledným produktem reakce (Tate 2000). Aktivita je proměnlivá, přičemž závisí nejen na genové expresi, ale také na změnách ekologických podmínek daného prostředí (Nannipieri 1994). Ke genové expresi sice v přírodních podmínkách běžně dochází, ale vyskytuje se zde řada faktorů, které mohou tomuto procesu zabránit. Také se předpokládá, že mikrobiální složení půdy určuje její potenciál pro rozklad půdních substrátů díky tomu, že je většina půdních procesů zprostředkovaná mikroby a zajišťovaná enzymy (Kandeler et al. 1996) (Obr.2).



Obr.2: Schéma zobrazující možné spojitosti mezi taxonomickou diverzitou, genetickou diverzitou, funkční diverzitou a enzymatickou aktivitou upraveno dle (Kandeler et al. 1996).

Mikrobiální biomasa a enzymatická aktivita vykazuje v půdním horizontu značnou prostorovou variabilitu. Aktivity enzymů dále naznačují, že činnost mikroorganismů klesá spolu s hloubkou a tím sníženou dostupností biomasy (Enowashu et al. 2009).

S klesající hloubkou se v půdách mění i samotné zastoupení mikrobiálních společenstev. Mezi dvěma zkoumanými horizonty (opadovým a horizontem v hloubce 2 m) (Fierer et al. 2003) zaznamenali výrazný pokles mikrobiální diverzity a trojnásobný pokles v druhovém složení. Tento fakt přisuzovali zejména dostupnosti uhlíku, který se v opadových vrstvách vyskytuje v hojné míře díky přítomnosti organického materiálu, kořenových exudátů a kořenových zbytků. Uhlík v nižších vrstvách bývá často limitujícím prvkem (Ajwa et al. 1998).

Jako jedny z hlavních faktorů ovlivňující mikrobiální složení počítáme dle Zogg et al. (1997) teplotu půdy a půdní vlhkost (Lundquist et al. 1999).

2.4 Faktory ovlivňující aktivitu extracelulárních enzymů

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují aktivitu extracelulárních enzymů. Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující enzymatické reakce patří teplota, dostupnost živin, půdní vlhkost, pohyb iontů v půdách, pH a přítomnost či absence inhibitorů a aktivátorů (Burns 1978, Tabatabai 1994). Jednotlivé faktory se navíc vzájemně ovlivňují.

2.4.1 Teplota

Teplota ovlivňuje mnoho biologických, chemických a fyzikálních procesů, které probíhají v půdách. Příklady takovýchto procesů jsou dekompozice, mineralizace, změny mikrobiálních společenstev či enzymatické reakce obecně (Voroney 2007). Teplota nejvíce ovlivňuje povrchové partie půdy, přičemž její vliv klesá spolu s půdní hloubkou. Je tomu tak kvůli kolísání teploty, které je na povrchu nejvýraznější. V případě dekompozice lze konstatovat, že její rychlost s rostoucí teplotou stoupá a naopak. Šantrůčková (2001) uvedla, že při nízkých zimních teplotách se dekompozice zpomaluje, ale stále probíhá až do chvíle, kdy půda zmrzne.

Existují dva aspekty teplotní závislosti enzymů. Prvním je závislost stability enzymů na teplotě, tedy schopnost enzymů zachovat si svou strukturu navzdory změnám teploty, kdy je právě struktura klíčovým faktorem stability enzymů. Strukturu těchto proteinů můžeme

definovat jako primární, sekundární a terciální, přičemž termín makrostabilita je udáván energií uvolněnou enzymem k získání terciální struktury. V druhém případě se jedná o závislost katalytické funkce enzymu na teplotě, kdy teplota ovlivňuje dostupnost aktivního místa enzymu (Wallenstein 2011). Do aktivního místa enzymu se váže substrát, což vede ke katalýze (Privalov a Tsalkova 1979). Mikrostabilita odpovídá energii potřebné k vratným změnám struktury enzymu (například k navázání substrátu) (Wallenstein 2011). Rozdíl mezi uvolněnou energií při tvorbě mikro a makrostability definuje celkovou stabilitu enzymu (Zavodszky et al. 1998).

Teplota je faktor provázaný s pH. Maximum enzymatické aktivity nastává s dosažením optimální teploty a tím i optimálního pH. Hodnoty nad i pod touto hranicí vedou ke snížení aktivity enzymu (Tabatabai 1994).

S každým zvýšením teploty o 10 °C v intervalu teplot od 0 do 30 °C, dochází k zdvojnásobení až ztrojnásobení mikrobiální aktivity (Šantrůčková 2001). Enzymy jsou velké proteinové molekuly, které jsou podrobovány i teplotám převyšujícím 50 °C. Tyto vysoké teploty způsobují denaturaci proteinové struktury enzymů (Campbell a Smith 1993). Pokud se přesuneme na mikrobiální úroveň, nalezneme teplotní toleranci pro růst mikrobů mezi 0 – 70 °C. Některé bakterie však dokáží běžně růst i při teplotách okolo 100 °C (Heinen a Lauwers 1981). Extrémem jsou pak arktické druhy s aktivitou pod 0 °C (Tate 2000).

Enzymy vyskytující se v arktických půdách mají obvykle nízká teplotní optima, která jim ve zdejších půdách zaručují optimální aktivitu. Díky těmto vlastnostem jsou takovéto enzymy přednostně produkovány arktickými psychrofilními mikroby. Složení mikrobiálního společenství je potom zpětně ovlivněno účinností enzymů (Huston et al. 2000, Coker et al. 2003, Feller 2003). Wallenstein et al. (2009) zkoumal vliv teploty na aktivitu β -glukozidázy v arktických půdách, přičemž objevil, že teplota vysvětluje 72 % veškerých změn aktivity tamních enzymů a je tedy dominantním faktorem. Teplota zde podle jeho výzkumu ovlivňuje aktivitu enzymů daleko podstatněji než například sezónní změny půdního enzymatického společenství.

2.4.2 Chemické složení půdy a dostupnost živin

Dostupnost živin je v půdách dalším důležitým faktorem, umožňujícím buněčný růst a vývoj. Nejpodstatnějšími látkami pro tvorbu buněčné struktury jsou uhlík, dusík, fosfor a

síra. Uhlík a dusík pocházejí převážně z mineralizace rostlinných zbytků, zatímco fosfor a síra se mimoto nacházejí ve velkých koncentracích v půdních minerálech (Tate 2000).

Dostupnost živin i chemické složení půd je zřejmě nejvíce ovlivněno přístupem mikrobu a enzymů k organickému materiálu a následnou dekompozicí. Nejrychleji probíhá dekompozice opadu. Je tomu tak díky počátečním vysokým hodnotám rozpustných polymerických polysacharidů v rostlinném materiálu. Čerstvý opad se nejčastěji skládá ze 3 až 7 % rozpustných polysacharidů, 15 až 27 % celulózy a 15 až 50 % ligninu. Nejprve dochází k rozkladu rozpustných sacharidů, poté celulózy a až nakonec dochází k dekompozici naakumulovaného ligninu. V průběhu rozkladu materiálu dochází k postupné produkci enzymů účastnících se dekompozice. V iniciačních fázích vykazují nejvyšší aktivitu β -glukozidázy. Když zůstává 20 až 60 % organického materiálu, vrcholí aktivita celuláz obecně a po vyčerpání celulózy vrcholí aktivita fenoloxidáz (Osono a Takeda 2005, Sinsabaugh et al. 2002, Fioretto et al. 2007, Papa et al. 2008).

Hromadění půdního dusíku silně ovlivňuje aktivitu enzymů. Vitousek a Howard (1991) uvedli, že větší dostupnost půdního dusíku může zapříčinit vyšší požadavek mikrobu a rostlin pro uhlík a fosfor. Mimoto fixace dusíku rostlinami vede ke zvýšení aktivity půdních fosfatáz, což může učinit z fosforu limitující prvek (Zou et al. 1995, Allison et al. 2006). Naproti tomu zvýšený obsah fosforu v půdě má za následek úpadek aktivity fosfatáz, který je dán jejich nízkým požadavkem k dostupnosti půdního fosforu (Olander a Vitousek 2000). Zvýšené hladiny dusíku v půdě mohou inhibovat produkci fenoloxidáz houbami (Fog 1988, Carreiro et al. 2000). Fog (1988) uvedl, že jsou oxidázy produkovány, pokud je dusík limitujícím prvkem, přičemž mohou dále sloužit k získání dusíku ze složitých polymerů jako je lignin.

Depozice půdního dusíku mají značný dopad i na uhlík. Stimulace aktivity celuláz může vést k rychlejší dekompozici jejich zásob, zatímco inhibice aktivity oxidáz může zapříčinit zpomalení dekompozice složitějších organických materiálů (Carreiro et al. 2000). Účinek dusíku na uhlík tak záleží na chemickém složení opadu a organického materiálu daného ekosystému (Carreiro et al. 2000, Neff et al. 2002). Zásoby půdního uhlíku obecně fungují jako primární regulátor vývoje mikrobiálního společenství v tom smyslu, že obsah mikrobiální biomasy vzájemně koreluje s obsahem organického uhlíku (Knapp et al. 1983).

2.4.3 Půdní vlhkost

S obsahem půdní vlhkosti je provázána rychlost dekompozice. V suchých oblastech obecně probíhá dekompozice nejpomaleji, přičemž maximální rychlosti dosahuje při zvýšení obsahu vody v půdě. Rychlost dekompozice se výrazně zvýší při zaplnění přibližně 60 % póru vodou. Menší obsah vody narušuje kontinuální vodní prostředí, vytvářené mezi půdními mikroby, vyšší obsah zase dostupnost kyslíku (Sextone et al. 1985, Tate 2000).

Půdní vlhkost je jedním z klíčových faktorů ovlivňujícím aktivitu půdních procesů. Voda zde sehrává svou roli při: stavbě těl rostlin i živočichů, výměně půdních plynů, transportu živin, ovlivňování teploty půdy, a v neposlední řadě slouží jako médium pro růst a životní cykly mikrobů. Pokud je vody dostatek, je nelimitujícím faktorem a biologická aktivita záleží primárně na teplotě. Role se částečně obrací, když začne půda vysychat (Tate 2000, Voroney 2007). V období sucha je obvykle zaznamenán pokles mikrobiální biomasy, což mívá za následek i pokles enzymatické aktivity (Ross 1987, Sardans a Penuelas 2005). Ke stejnému závěru došli i Criquet et al. (2002, 2004) a Sardans a Penuelas (2005), kteří mimo jiné zjistili výrazné snížení činnosti právě β -glukozidázy.

U jednotlivých skupin mikrobů pozorujeme různé tolerance k vysychání půdy. Bakterie jsou k vysychání náchylnější než aktinomycety a houby, které tyto podmínky snášejí nejlépe. To je dáno schopností hub a aktinomycet tvořit vlákna, pomocí nichž jsou schopné překonat sušší místa (Tate 2000, Morris 1999).

2.4.4 pH

pH hraje v půdách důležitou roli při růstu a ostatních procesech týkajících se mikroorganismů, hub a rostlin. pH ovlivňuje mnoho faktorů, které mají dopad na mikrobiální, ale i enzymatickou aktivitu. Má také vliv na ionizaci a rozpustnost kofaktorů a substrátů, což ovlivňuje rychlost katalytických reakcí. Příkladem může být iniciace navázání substrátu do aktivního místa enzymu (Voroney 2007, Tabatabai 2002).

Mikroorganismy jsou obecně schopné růst při pH od 1 do 11, což zajišťuje jejich obrovskou diverzitu (Tate 2000). Optimem pro většinu mikroorganismů je pH kolem 7, které zajišťuje dobrou dostupnost živin. Obdobné podmínky preferují i aktinomycety, které se vyskytují v alkalických půdách s vyšším pH (Šlajsová 2011). Houby naproti tomu tolerují kyselejší půdy s nižším pH (Killham 1994).

Každý enzym má své pH optimum, při kterém jeho aktivita dosahuje vrcholu. Hodnoty pod i nad tímto optímem vykazují aktivitu nižší, v inhibičních podmínkách dokonce žádnou (Tabatabai 1994). Optimální pH pro β -glukozidázu a celbiozidázu se nachází v intervalu od 4 do 5 (Niemi a Vepsäläinen 2005).

2.5 Kinetika půdních enzymů

Měření enzymové kinetiky v půdě je důležité pro zjištění maximální potenciální aktivity a afinity daného enzymu k substrátu, jehož přeměnu katalyzuje

Rychlost dané reakce můžeme zjistit postupným zvyšováním koncentrace substrátu, přičemž ostatní podmínky zůstávají neměnné (konstantní). Obecně lze biologické procesy rozdělit do dvou kategorií: nultého řádu “zero-order“ a prvního řádu “first-order“. Rychlost reakce u procesů nultého řádu je konstantní a nezávislá na koncentraci substrátu, kdežto rychlost reakce u procesů prvního řádu je přímo úměrná koncentraci substrátu (Tate 2000). Při nízkých koncentracích substrátu jde o reakci prvního řádu, kdežto při vyšších koncentracích, kdy je enzym nasycen, jde o reakci nultého řádu. Kinetiku enzymů s jedním aktivním místem, kam se váže substrát, popisuje kinetická rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

Kde V je rychlost reakce, S je koncentrace substrátu, V_{max} je maximální rychlost enzymové reakce, K_m odpovídá koncentraci substrátu, při které rychlost konverze substrátu odpovídá $V_{max}/2$. K_m také udává afinitu enzymu k substrátu (Wallenstein et al. 2011). Při inhibici reakce substrátem se používá modifikovaná verze rovnice Michaelise a Mentelové, kde K_I představuje inhibiční konstantu:

$$v = \frac{V_{max} \cdot (S)}{K_m + (S) + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)}$$

U Michael-Mentenovi funkce existuje přímá spojitost mezi teplotní sensitivitou V_{max} a aktivační energií enzymatické reakce (Davidson a Janssens 2006). Hodnota K_m se spolu s teplotou zvyšuje, což snižuje afinitu enzymu k substrátu a tudíž i jeho navázání. Pokud se koncentrace substrátu blíží hodnotě K_m , vliv teploty na V_{max} může být snížen. To vede k celkovému snížení závislosti enzymatické reakce na teplotě (Davidson et al. 2006).

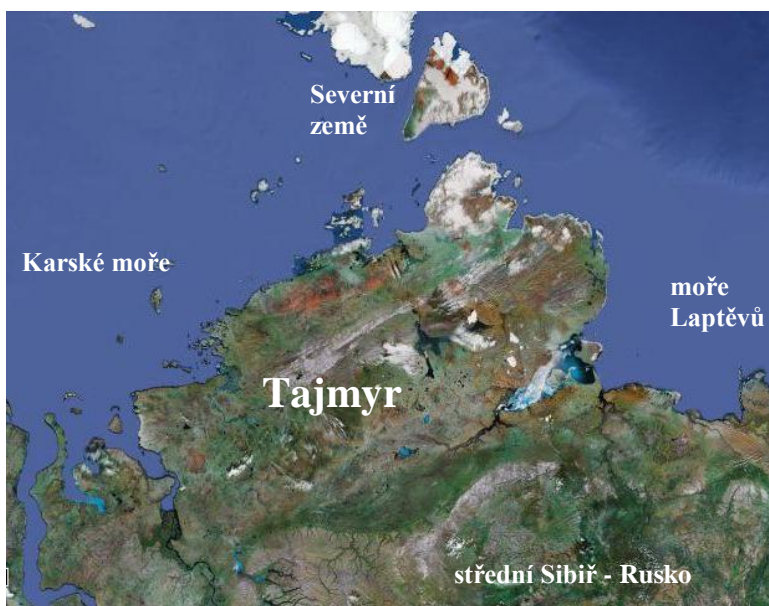
Dalším důležitým prostředkem pro zjišťování biologické odpovědi na změny teploty je hodnota Q_{10} . Tato hodnota vyjadřuje změnu biologického procesu v reakci na zvýšení teploty o 10 °C (Lloyd and Taylor 1994).

2.6 Arktická oblast

Arktická oblast zabírá podstatnou část severní polokoule. Leží severně od arktického stromového pásma, kde se rozprostírá na ploše o rozloze $7,2 \times 10^6 \text{ km}^2$. Přibližně 66 % této rozlohy náleží Kanadě a Rusku. Převážnou část léta je zde 24 hodin denního světla a naopak na 24 hodin tmy připadá téměř celá zima (Tarnocai 2009).

Pro arktické klima jsou charakteristická krátká, studená léta a dlouhé, extrémně studené zimy. Průměrná roční teplota dosahuje hodnot nižších než $0 \text{ }^\circ\text{C}$ a minimální zimní teploty méně než $-40 \text{ }^\circ\text{C}$. Nejteplejším měsícem je červenec s průměrnými teplotami mezi 7 až $10 \text{ }^\circ\text{C}$ v jižní části a 3 až $5 \text{ }^\circ\text{C}$ v severní části. Nejchladnějším měsícem je naopak leden s průměrnými teplotami mezi -20 až $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ (FitzPatrick 1997, Tarnocai 2009). Srážky se zde pohybují mezi 50 až 1200 mm za rok (FitzPatrick 1997). Převážně jsou však nízké (60 až 160 mm) a vyskytují se většinou ve formě sněhu (Tarnocai 2009). Podle Tedrow (1977) rozeznáváme v arktické oblasti tři základní klimatické subzóny: polární pouště, subpolární pouště a tundry.

2.6.1 Charakteristika odběrové oblasti



Obr.3: Poloostrov Tajmyr, Střední Sibiř. Upraveno dle (2).

Tajmyr je poloostrov s rozlohou přibližně $400\,000 \text{ km}^2$, tvořící část Sibiřské platformy. Povrch je členitý s průměrnou nadmořskou výškou 500 m n.m. . V severní části se

od východu k západu táhne pohoří Byrranga, dosahující výšky 1 146 m n.m.. Pohoří je silně zaledněné s 96 ledovci, které zabírají území o velikosti 30 km². Nejsevernější bod Tajmyru mys Chelyuskin, je zároveň nejsevernějším bodem Euroasijského kontinentu. Náhorní plošina Putorana s výškou až 1 700 m n.m. je vysoko položená planina vulkanických hornin, která tvoří přírodní jižní hranici. Náhorní plošina je zónou polární pouště přecházející v zóny alpínské tundry na jejích svazích a lesní tundry pod nimi (Sale 2008).

Souřadnice odběrové oblasti (72,4928° s.š., 101,6418° v.d.) odpovídají subzóně tundry.



Obr.4: Znárodnění oblastí Tundry s rozlohou $8,8 \cdot 10^6 \text{ km}^2$, průměrnou roční teplotou pod $-13 \text{ }^\circ\text{C}$ a průměrnými ročními srážkami mezi 100 až 210 mm (Post et al. 1982).

Charakteristickými rostlinami pro subzónu tundry jsou mechy, lišejníky, traviny, keře, smrky, borovice, modřín, ale i vrby. Dominantními půdami jsou kambisoly, glejosoly a histosoly, které se nacházejí především v přímořských oblastech a v depresích (propadlinách). Důkazy zimního zamrznání (promrznání) jsou poměrně vzácné a slabé podzoly a luvisoly. Mezi další vzácnější půdy patří černice, andosoly a fluvisoly, jejichž výskyt je spojován s řekami (FitzPatrick 1997)

V souvislosti se subzónou tundry se setkáváme s termínem periglaciál, který jako první popsal Lozinski (1912). Jde o oblasti, které nejsou pokryté věčným ledem “glacial ice“, přestože jsou vystaveny intenzivnímu promrznání. Z hlediska charakteristiky půdního horizontu nalezneme v těchto arktických územích aktivní vrstvu na povrchu, podpovrchový

permafrost a mezi těmito vrstvami nalézající se kryoturbační vrstvu (Lozinski 1912, Bockheim a Tarnocai 1998).

Aktivní vrstva při přibližné síle mezi 30 až 60 cm promrzá každou zimu a rozmrzá každé léto, zatímco souvislá vrstva permafrostu, dosahující na Sibiři síly od 100 až do 500 m, zůstává zamrzlá permanentně (FitzPatrick 1997, Tarnocai 2009).

2.7 Periglaciální (kryogenní) procesy arktické oblasti

Nejpodstatnějším procesem formujícím periglaciální útvary v arktických oblastech je opakující se proces tání - tuhnutí vody v tamějších půdách nazývaný regelace (FitzPatrick 1997, Drake a Shreve 1973). Tarnocai (2009) uvádí, že hlavními kryogenními procesy, které ovlivňují vznik arktických půd, jsou kromě tání a tuhnutí vody také kryoturbace, mrazové vzdouvání "frost heave", kryogenní třídění "cryogenic sorting", termální krakování "thermal cracking" a růst masy ledu "ice build-up".

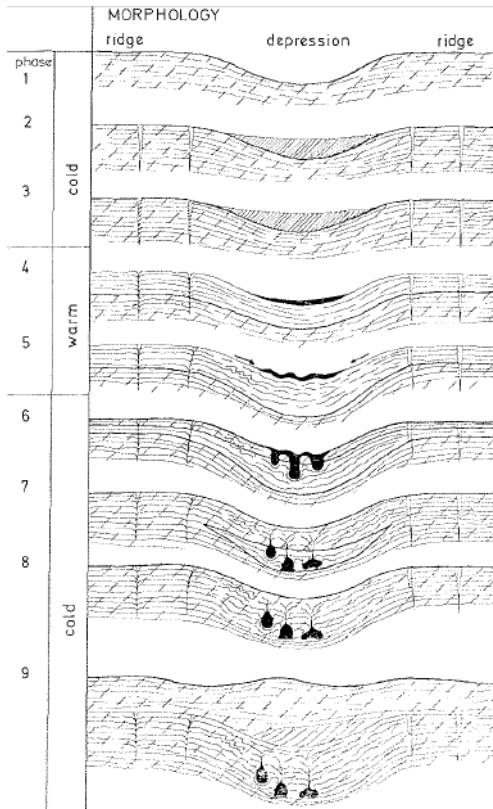
2.7.1 Kryoturbace

Kryoturbace patří mezi jedny z nejběžnějších půdních procesů v arktických půdách. První podmínkou působení kryoturbace je vytvoření organického horizontu. Vznik organického horizontu je přisuzován malému množství organického materiálu, které je pravidelně produkováno vegetací. Tento organický materiál podléhá v povrchové vrstvě půd dekompozici působením půdních mikroorganismů a jejich extracelulárních enzymů. V důsledku hromadění tohoto materiálu se vytváří organický půdní horizont. Důsledkem kryoturbace může být poté přemístění části organického materiálu do hlubších půdních vrstev (Bockheim a Tarnocai 1998). Spolu s organickým materiálem se translokují i uhlík, který se do půdy primárně dostává fixací CO₂ rostlinami a mikroorganismy z atmosféry. Fixace CO₂ z atmosféry může být zvláště pak pro severněji položené půdní oblasti jediným zdrojem uhlíku (FitzPatrick 1997, Kokelj a Burn 2005).

Rozpustné organické látky (živiny) se spolu s vlhkostí přesouvají půdním horizontem směrem dolů, přičemž obohacují permanentně zmrzlé vrstvy půd. Pohyby vody jsou řízeny působením gravitace a probíhají souběžně s teplotním gradientem – z půd s vyšší teplotou do půd s teplotou nižší (Kokelj a Burn 2005). Ke kryoturbacím dochází na základě rozličných typů půdních prasklin (narušení), které jsou způsobovány expanzí mrznoucí vody

a zapříčiňují vertikální i horizontální pohyb půdního materiálu (Walker et al. 2002, Peterson a Krantz 2003).

V případě, že se SOM dostane do studenějších a hlubších vrstev, kde je rychlost dekompozice organické hmoty výrazně pomalejší, může být pohřbený SOM zakonzervován po stovky i tisíce let. Výsledkem je průměrný obsah uhlíku v kryoturbační vrstvě, dosahující hodnot přibližně 49 až 61 kg.m⁻². Organická vrstva pro srovnání obsahuje přibližně 43 až 144 kg.m⁻² (Tarnocai et al. 2007).

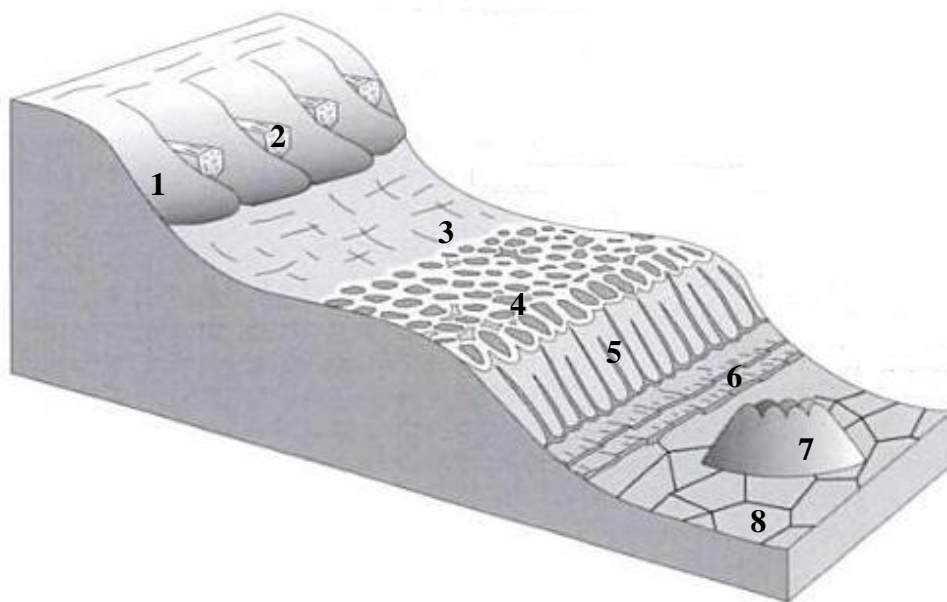


Obr.5: Na obrázku vlevo vidíme průběh kryoturbače během 9 sezón (Hayse 1983). Obrázek vpravo odpovídá výsledku kryoturbačního procesu (3).

2.8 Periglaciální útvary arktické oblasti

Formování ledových útvarů vystavuje arktické půdy stresům a tlakům, které vedou k jejich deformacím a vyúsťují v přeuspořádání půdních horizontů. Tyto procesy vedou k neobvyklým morfologickým, termálním, fyzikálním i chemickým změnám (Tarnocai 2007). Tyto změny indukují tvorbu unikátních povrchových útvarů, které se od sebe značně nejen morfologicky liší a jejich klasifikace není vždy snadná (FitzPatrick 1997).

Tyto povrchové útvary popsal již Washburn (1956), přičemž je rozdělil na tříděné “sorted“ a netříděné “non-sorted“. Kamenné kruhy a polygony patří mezi tříděné útvary, ostatní zmíněné mezi netříděné. Tříděné se vyskytují v mnoha odlišných formách a vytvářejí systémy, které jsou formovány kameny a balvany. Také netříděné jsou velice rozličné a mohou vytvářet systémy, které však neobsahují formace kamenů či balvanů.



Obr.6: Schéma naznačující obecnou závislost mezi sklonem svahu, kamennou masou (stoniness) na povrchu půd, vzdáleností mezi povrchem a permafrostem, vodními podmínkami a vegetací. V příkré nejvýše položené části svahu nalezneme tory [1] a “talus cones“ [2], které jsou modelovány hromaděním, zvětráváním a sesuvem skalního materiálu. Svah dále přechází v oblast kamenných moří [3], kde dochází k tříštění materiálu mrazem, deflací větrem a početným kamenným sesuvům. V oblasti kamenných kruhů [4], které se tvoří na silně kamenitém podloží, sklon svahu dále klesá. Sklon se poté prudce zvyšuje na hodnoty okolo 25° a vytváří se pruhy “stripes“ [5] s možným výskytem vegetace. Pruhy se

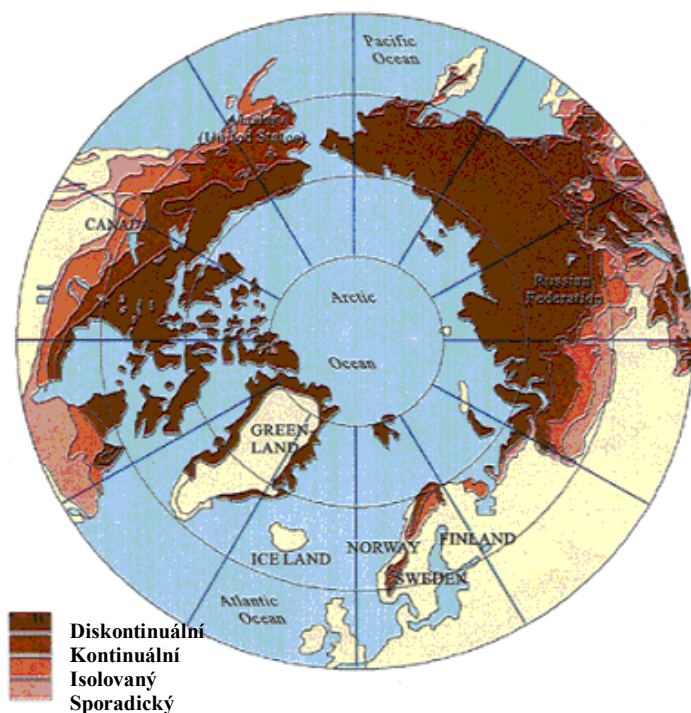
mění v terasy (6) s vegetací a vodou, která se zde akumuluje nad vrstvou permafrostu., jak sklon opět klesá. V nížinách se objevují pinga [7] a polygony [8] s ledovými klíny “ice wedges“. Upraveno dle (FitzPatrick 1997).

2.9 Příklady významných útvarů vyskytujících se v arktických oblastech

2.9.1 Podpovrchové

Permafrost

Permafrost je definován jako země, která zůstává zamrzlá nejméně po dva roky, ale obecně jde o půdy zmrzlé permanentně. Vyvíjí se už při teplotách lehce pod 0 °C. Nachází se i v teplejších oblastech Sibíře, a to díky působení lesů, které snižují množství do půdy vstupujícího tepla (FitzPatrick 1997). Nejsilnější vrstva permafrostu (1500 m) se nachází na Sibíři v oblasti Schalagonzy (Baranov a Kudfryavtsev 1963). Permafrost obecně najdeme na 26 % světové pevniny (Williams a Smith 1989). Na ruském území půdy s permafrostem čítají 11 milionů km², což činí 65 % povrchu Ruska (Makeev 1993). Kryosoly, ve kterých se permafrost nachází v síle více než 2 m, zahrnují 18 milionů km², což představuje asi 13 % světové pevniny (Bockheim et al. 1994).



Obr.7: Světová mapa rozšíření permafrostu. Upraveno dle (5)

Ledové klíny

Jsou ledové útvary expandující půdním horizontem směrem dolů, přičemž se vyvíjejí, je-li průměrná roční teplota nižší než $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud teplota aktivní vrstvy klesne k -15 až $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, země (včetně permafrostu) se rozpadne do hexagonálních nebo obdélníkových systémů, majících od 10 do 30 m v průměru. Takovéto systémy se nazývají polygony (Mackay 1993a,b, 1995). Vlivem tání se voda dostane do prasklin mezi polygony a zmrzne. V létě tyto praskliny přikryje půda a led pohřbí (Lauriol et al. 1995). Část ledu roztaje a způsobí přeskupení materiálu. Tento proces se mnohokrát opakuje. Důsledkem je růst klínů, přičemž v oblastech Sibíře mohou být i 10 m široké a 50 m hluboké (Lachenbruch 1962).

2.9.2 Povrchové

Termokarst

Termokarst je kopcovitý terén, který je formován nerovnoměrným táním permafrostu, v důsledku zvyšování teploty, zkázy vegetace, požárů, záplav, nebo odlesňování. Zvláštním typem termokarstů je "alas". Propadlina plní se vodou a tvoří jezera, která se sytí sedimenty, načež se z nich vytvářejí periglaciální útvary jako například ledové klíny (FitzPatrick 1997).

Pingo

Je kruhový kopcovitý útvar s ledovým jádrem. Mohou být až 60 metrů vysoké a 300 m široké. Podle všeho existují dva druhy. Pinga typická pro oblast tundry, která vznikají díky únikům vody z nesouvislé vrstvy permafrostu. A pinga oblastí s kontinuálním permafrostem vznikajících z naplavenin či ze dna dřívějších jezer. Vyskytují se ve shlucích (FitzPatrick 1997).

Polygony

Rozdělujeme do skupin polygonů s nízkým centrem a s centrem vysokým. Polygony tvoří schémata podobná sítím. Vznik a charakteristika viz ledové klíny.

2.10 Mikroorganismy arktické oblasti a permafrostu

Permafrost s teplotou pohybující se v arktických oblastech od 0 do -17 °C, funguje jako fyzikální a biogeochemická bariéra, která omezuje vstup vody a dalších faktorů ovlivňující prostředí do sebe sama (Gilichinski 2002, Vorobyova et al. 1997). V tomto na první pohled nehostinném prostředí nalezneme mnoho mikrobiálních druhů, přičemž některé z nich patří mezi nejstarší žijící na Zemi. Biomasa těchto mikrobů, je zde často mnohonásobně vyšší, než je tomu ve vyšších půdních horizontech (Steven et al. 2006). Až 80 % bakteriální populace permafrostu tvoří ultramikroformy bakterií, které jsou charakteristické silně zahuštěnou buněčnou stěnou, nehomogenní cytoplasmou, která obsahuje mnoho agregátů, těsně sbalenými ribozomy, nukleusem z fibroidního materiálu s malými vezikuly, a velkými dutinami, které se vytvářejí formací ledových krystalů (Dmitriev et al. 2000, Vorobyova et al. 2001, Soina et al. 2004). Pro mikroby je v permafrostu stěžejní ochranná tekutá vrstva vodného roztoku, která jim umožňuje přežít - být aktivní, zabraňuje zničení mikrobů ledovými krystaly a slouží jako živný roztok pro mikrobiální růst (Gilichinsky 2002). Zachovalost DNA ve vrstvách permafrostu navíc nasvědčuje tomu, že tamní bakterie měly/mají schopnost pomalé metabolické regenerace poškozené DNA (Willerslev et al. 2004).

Mikroorganismy jsou v podmínkách permafrostu schopné jak růst, tak i metabolizovat. Rychlost metabolismu mikroorganismů v permafrostu, můžeme podle Price a Sowers (2004) rozdělit do tří skupin: rychlost dostatečná pro bakteriální růst, rychlost dostačující pro zachování metabolismu a rychlost dostatečná pro přežití. Minimální teplota, při které mikroorganismy metabolizují doposud nebyla přesně určena. Steven et al. (2006) ale při měření dokázali, že dokonce i při nejnižší testované teplotě -40 °C byla prokázána fixace CO₂ mikroorganismy. Ačkoliv je aktivita mikroorganismů v permafrostech nízká, může mít významný dopad na globální koloběh prvků jako je uhlík, dusík a síra například tím, že syntetizují enzymy (Rivkina et al. 2004).

2.11 Vliv uhlíku v půdách permafrostu na globální oteplování

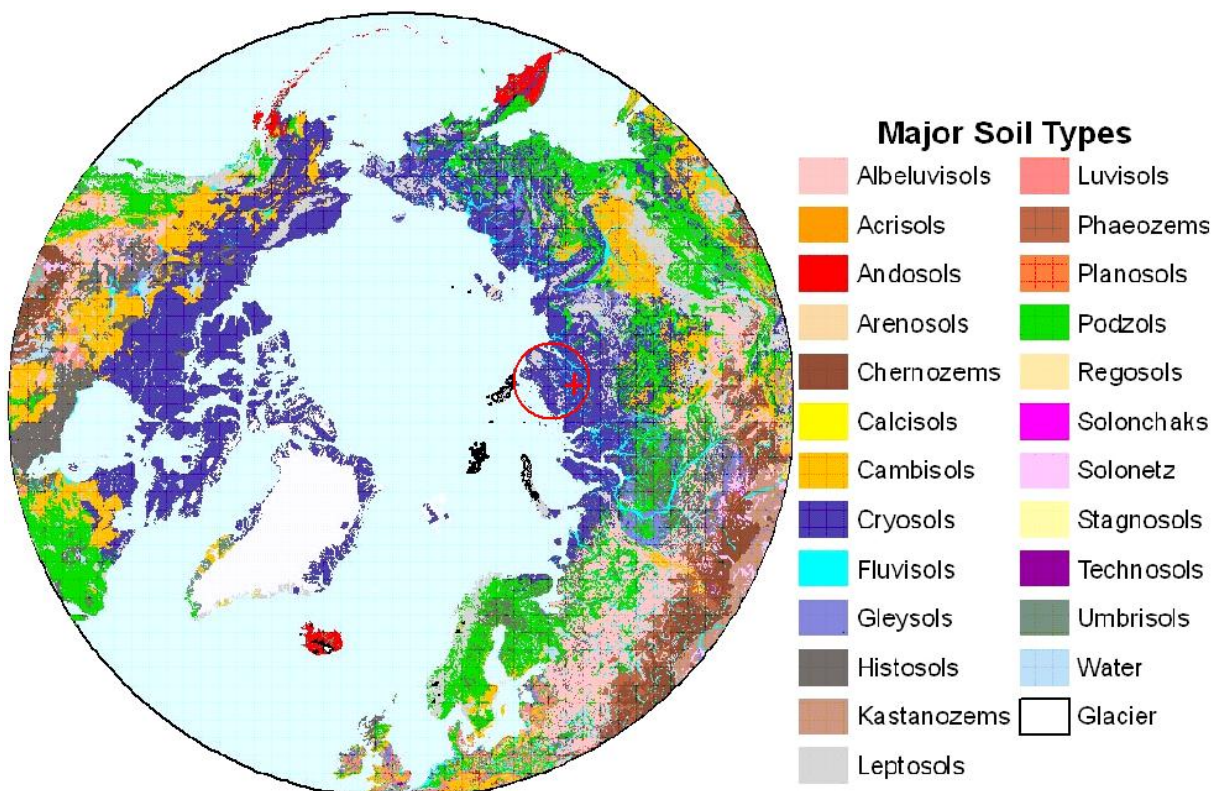
Půdním systémům je obecně přisuzována dvojitá role úschoven “sink“ a producentů “source“ uhlíku, přičemž terestrické a přímořské permafrosty jsou označovány za vůbec nejzranitelnější zásobárny uhlíku na Zemi (Osterkamp 2001, Zimov et al. 2006). Celosvětové zásoby organického uhlíku, které existují ve formě SOM jsou přinejmenším čtyřikrát větší, než celosvětové zásoby uhlíku v atmosféře a v živých rostlinách dohromady (Jobbágy a Jackson 2000). Asi jedna třetina těchto veškerých půdních zásob uhlíku se nachází na severní polokouli v obrovských vrstvách zmrzlé půdy, které se vyskytují přibližně na 24 % plochy této polokoule (Gorham 1991, Zhang et al. 1999). Při zvyšující se teplotě dochází k rychlejší dekompozici SOM, vyšší aktivitě půdních enzymů a s tím souvisejícímu vyššímu uvolňování hlavních skleníkových plynů (CO₂, CH₄ a N₂O) do atmosféry.

Za tvorbu skleníkových plynů jsou zodpovědné mikroorganismy, jejichž aktivita je ovlivňována vlastnostmi půdy a klimatickými podmínkami (Wagner a Liebner 2009, Elverland 2009). Táním permafrostu se do atmosféry může uvolnit velké množství skleníkových plynů, což bezesporu přispěje ke globálnímu oteplování a zapříčiní změnu charakteru ekosystému arktické tundry a s ní další uvolňování uhlíku (Oechel et al. 1993).

Podle IPCC (4) teploty povrchu arktické pevniny rostou výrazněji než kdekoli jinde na Zemi. Wuebbles a Hayhoe (2002) na základě výpočtů předpokládají, že metan, který uniká z arktických permafrostů může zvýšit účinek skleníkových plynů až o 20 %. Díky těmto změnám Nelson et al. (2001) předpokládá, že by mohlo dojít k tání permafrostu na značném území Sibíře, což by mělo za následek zesílení aktivní vrstvy (organického horizontu). Ve východní Sibíři by se do konce 21. století mohla zvýšit průměrná roční teplota půdy až o 6 °C a aktivní vrstva půdy zesílit až o 2 m (Stendel et al. 2007). Anisimov et al. (1999) zase uvedl, že by do roku 2100 mohlo zmizet až 25 % oblastí s výskytem permafrostu.

3. Metodika

3.1 Odběrová oblast a odběr půdních vzorků



Obr.8: Klasifikace půd severního polárního kruhu s vyznačením odběrové plochy (4).

Odběrová plocha se nacházela v oblasti střední Sibiře na nejsevernějším poloostrově Eurasie – Tajmyru. Zeměpisné souřadnice 72,4928° s.š. a 101,6418° v.d. odpovídají subzóně tundry. Půdami odběrové oblasti jsou především kryosoly, které se charakteristicky vyskytují na kontinuální vrstvě permafrostu a také fluvisoly s charakteristickým výskytem kolem říčních sítí. Podrobnější charakteristika v kapitole 2.6.1.

Odběr půdních vzorků se uskutečnil v srpnu roku 2011. Vzorky se odebíraly z lokalit odpovídajících charakteristické vegetaci pro zvolenou oblast a ze dvou půdních horizontů – organického (hloubka 5 až 20 cm) a krypturbačního (hloubka 40 až 60 cm). Dále byly vzorky homogenizovány přes síto s velikostí ok 5 mm a uloženy ve 4 °C před dalšími analýzami

3.2 Stanovení suché hmotnosti půdy (sušiny)

Suchá hmotnost půdy (sušina) je bezrozměrná veličina, která určuje podíl hmotnosti suché půdy v 1 g čerstvého vzorku. Sušina byla získána navážením přibližně 4 g půdního vzorku v předem zvažené váženke. Po zvažení byl půdní vzorek vysoušen po dobu 16 hodin při 105 °C do konstantní hmotnosti. Nakonec byl vzorek převážen a připraven k dalšímu použití.

Výpočet suché hmotnosti půdy (s):

$$s = \left(\frac{m_s - m_v}{m_1 - m_v} \right)$$

m_s - hmotnost váženky se suchou půdou po vysušení (g)

m_v - hmotnost váženky (g)

m₁ - hmotnost váženky s vlhkou půdou před vysušením (g)

3.3 Použité roztoky a substráty

Během pokusu se souběžně měřilo celkem 5 půdních enzymů (betaglukozidáza, celobiozidáza, fosfatáza, chitináza a alanin aminopeptidáza). Tato práce se věnuje vyhodnocení aktivit pouze dvou klíčových enzymů při degradaci celulózy (betaglukozidázy a celobiozidázy).

3.3.1 Fluorogenní substráty

Pro měření enzymatické aktivity byly použity následující zásobní roztoky substrátů:

- 4-methylumbelliferyl β-D-cellobiopyranoside (MUFC)
- 4-methylumbelliferyl β-D-glucoopyranoside (MUFG)

Tab.1: Tabulka použitých enzymů, fluorogenních substrátů (MUF) použitých při měření enzymatické aktivity, cílovými molekulami degradace a výsledných prvků.

Enzym	Substrát	Degradace	Prvek
β -glukozidáza (EC 3.2.1.21)	4-MUF- β -D-glukopyranosid	celulózy	uhlík
Celobiozidáza (EC 3.2.1.91)	4-MUF- β -D-celobiopyranosid	celulózy	uhlík

3.3.2 Kalibrační roztok

Jako kalibrační roztok byl použit 1,0 mM MUF (4-methylumbelliferyl). 1,0 mM MUF byl získán rozpuštěním 3,52 mg MUF v 20 ml DMSO. Z tohoto zásobního roztoku byla dále připravena ředící řada o koncentracích 50, 25 a 5 mM.

3.3.3 Zásobní roztoky fluorogenních substrátů

Jako zásobní roztoky sloužily 2,75 mM MUFG a 2,50 mM MUFC. 2,75 mM MUFG byl získán rozpuštěním 0,0186 g MUFG v 20 ml DMSO (dimethylsulfoxidu). 2,50 mM MUFC byl získán rozpuštěním 0,02502 MUFC v 20 ml DMSO. Tyto zásobní roztoky byly dále ředěny redestilovanou vodou, díky čemuž byla vytvořena ředící řada o koncentracích: 2000, 1000, 500, 125, 50, 25, 5 a 2,5 mM.

3.3.4 Konečná koncentrace

Konečné koncentrace půdních substrátů bylo dosaženo napipetováním 200 μ l půdního extraktu nebo 200 μ l redestilované vody do mikrodestičky k 50 μ l fluorogenního substrátu o příslušné koncentraci. Konečné koncentrace tedy byly: 400, 200, 100, 50, 25, 10, 5 a 2,5 mM.

3.5 Měření kinetiky a teplotní závislosti β -glukozidázy a celobiozidázy

Kinetika se měřila pro 6 různých teplot (0, 5, 10, 20, 30, 40 °C) a 8 koncentrací fluorogenních substrátů MUFG a MUFC.

3.5.1 Použitá metoda

Aktivita studovaných enzymů β -glukozidázy a celobiozidázy byla měřena pomocí fluorimetrické metody. Při této metodě se využívá mikrodestička o 96 jamkách, která umožňuje analýzu (proměření aktivity) velkého množství půdních vzorků (enzymů) v relativně krátkém čase při zvoleném počtu opakování (Marx et al. 2001). Měření fluorescence probíhalo pomocí mikrodestičkového analyzátoru Infinite F200 (TECAN, Switzerland) s excitací 360 nm a emisí 465 nm.

3.5.2 Příprava půdních vzorků

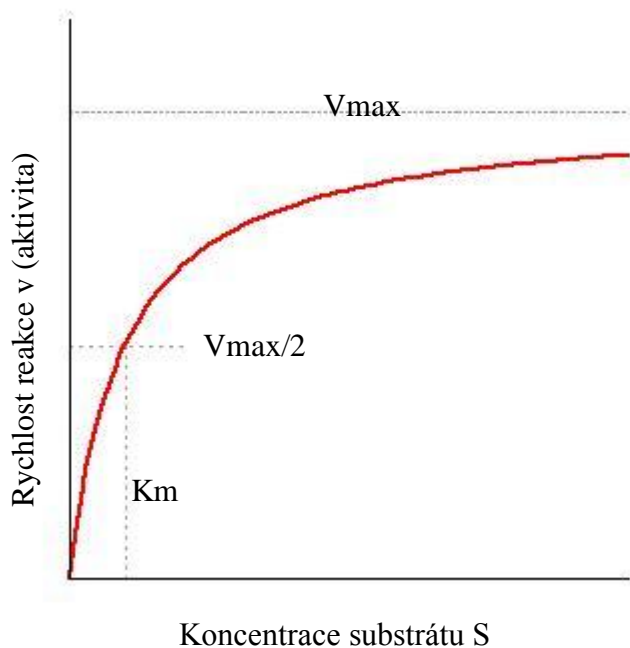
Extrakce půdního vzorku probíhala bezprostředně před začátkem měření. K odváženému 1,5 g půdy bylo přidáno 150 ml redestilované sterilní vody. Kádinka se směsí byla vložena do ledové tříště. Poté byl půdní extrakt homogenizován pomocí homogenizátoru Utra-Turrax (IKA, Germany) při maximální rychlosti po dobu 4 minut. Homogenát byl před vlastní analýzou umístěn do chladu (4 °C). Po napipetování fluorogenních substrátů a standardů do mikrodestiček bylo přidáno 200 μ l homogenátu.

3.5.3 Měření fluorescence enzymů

Do příslušných jamek mikrodestičky bylo nejprve napipetováno 50 μ l odpovídajících substrátu (MUFG, MUFC) z připravených zásobních roztoků o koncentracích 2,5, 5, 25, 50, 125, 500, 1000, 2000 mM. Poté bylo napipetováno 50 μ l kalibračního roztoku (MUF) v koncentracích 5, 25 a 50 mM. Dále bylo do odpovídajících jamek napipetováno 50 μ l redestilované vody, která sloužila jako negativní kontrola. Nakonec bylo pomocí multipipety do všech jamek napipetováno 200 μ l půdního homogenátu. Mezi jednotlivými úseky pipetování se měnily špičky, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

Mikrodestičky byly následně temperovány v inkubátorech při příslušných teplotách 1 h. Poté byly bez víček vkládány do mikrodestičkového analyzátoru, kde byla měřena fluorescence během 2 kinetických cyklů, po 1 a po 12 h. Výsledkem fluorescence byly tedy hodnoty pro 2 pravá a 2 technická opakování, celkový počet pozorování byl 4 (n = 4).

Výpočet kinetiky enzymatických reakcí (rovnice Michaelise a Mentelové)



Obr.9: Model závislosti koncentrace substrátu na aktivitě enzymu podle Michaelise a Mentelové (6).

$$v = \frac{V_{max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

v - rychlost enzymatické reakce (nmol/h/g)

V_{max} - maximální rychlost enzymatické reakce

S - počáteční koncentrace substrátu (mM)

K_m - Michaelisova konstanta (Afinita enzymu k substrátu. Je dána koncentrací substrátu, při které je dosaženo polovičního nasycení enzymu a tím i poloviční maximální rychlosti reakce.)

Výpočet enzymatické aktivity:

$$\text{aktivita} = \left(\frac{A}{B \cdot C \cdot D \cdot E} \right)$$

A - nárůst fluorescence po odečtení blanku (*F*)

B - směrnice kalibrace ($F \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} / \mu\text{mol}$)

C - navážka vlhké půdy (*g*)

D – hmotnost sušina

E - objem extrakčního činidla (*l*)

Výpočet teplotní závislosti:

Naměřené hodnoty teplotní závislosti byly proloženy lineární interpolační funkcí (polynomická funkce 1. stupně), která nám svou strmostí naznačila míru teplotní závislosti enzymů. Tato funkce odpovídá Eukleidovské geometrii, která říká, že dvěma různými body prochází jediná přímka.

$$y = f(x) = ax + b$$

a – je hodnota směrnice

3.6 Koeficient Q₁₀

Koeficient Q_{10} udává stupeň změny aktivity enzymu v závislosti na změně teploty o 10 °C. (Kolikrát se rychlost reakce/aktivita enzymu zvýší, zvýší-li se teplota o 10 °C). Koeficient Q_{10} byl vypočítán pro dva teplotní intervaly (0 až 10 °C a 10 až 20 °C).

Výpočet koeficientu Q_{10} :

$$Q_{10} = \text{EXP}(\text{SLOPE} \cdot 10)$$

Q_{10} – udává kolikrát se zvýší aktivita enzymu při změně teploty o 10°C

EXP – Exponenciální funkce

SLOPE – Hodnota směrnice (vyjadřuje teplotní citlivost každého kinetického parametru enzymu)

3.7 Zpracování dat

Pro zpracování dat a jejich grafickou prezentaci byl použit program Microsoft Excel (výpočet průměrů a směrodatných odchylek). Pro výpočet kinetických konstant V_{\max} a K_m a nelineární regresní model podle Michaelis-Mentenové byl použit program GraphPad Prims 4.0.

4. Výsledky

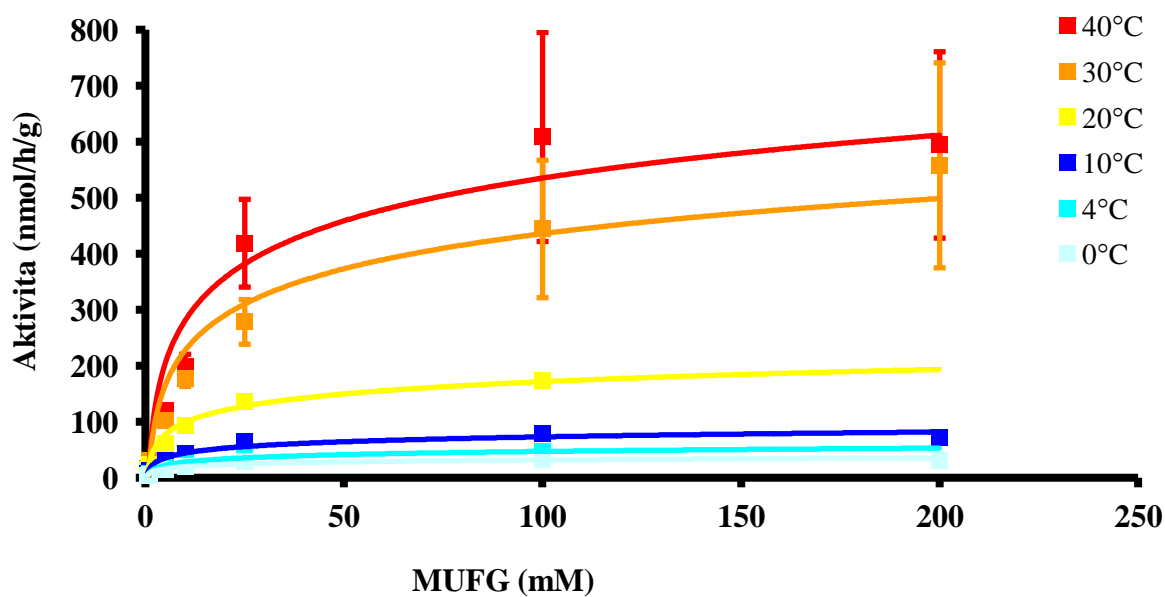
4.1 Kinetika enzymů v půdách Tajmyru

Při testovaných teplotách (0, 4, 10, 20, 30 a 40 °C) byly u β -glukozidázy i celobiozidázy v obou půdních horizontech naměřeny odlišné průběhy kinetiky. β -glukozidáza v obou půdních horizontech dosahovala vyšších aktivit než celobiozidáza. V organickém horizontu byly naměřeny hodnoty o řád vyšší, než tomu bylo v horizontu kryoturbačním.

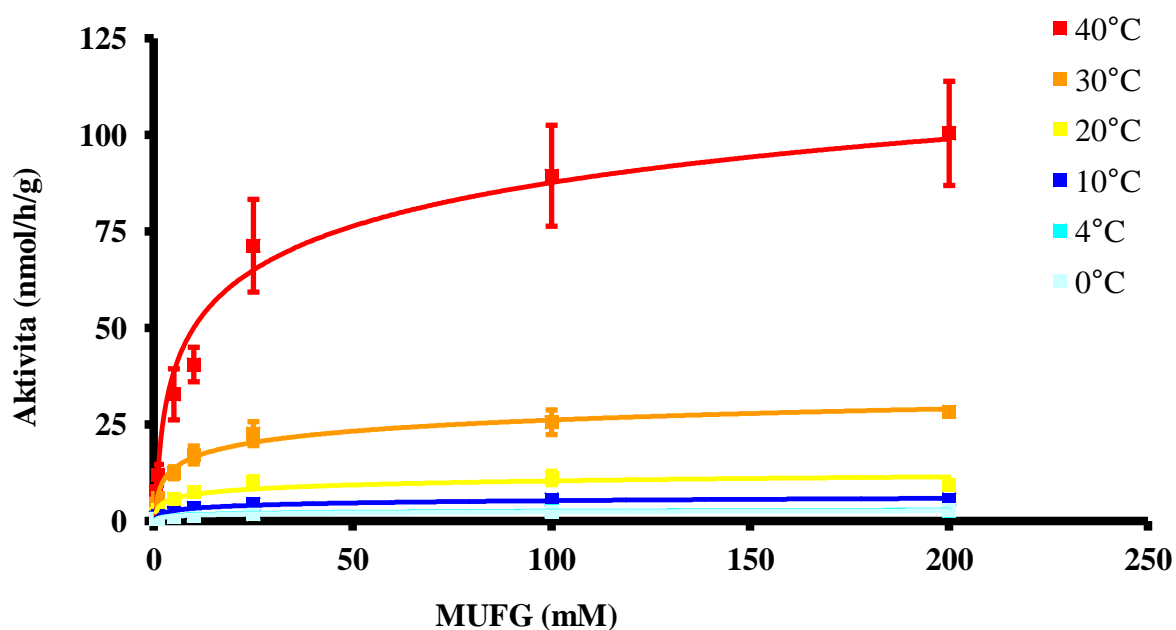
U β -glukozidázy v organickém horizontu (Obr.10A) byly při měření kinetiky pro teploty 0, 4 a 10 °C, zjištěny mezi jednotlivými zvyšujícími se koncentracemi substrátu nízké hodnoty V_{max} (nízký nárůst aktivity). U teploty 20 °C byl nárůst výraznější. Nejvyšších hodnot V_{max} a s nimi i nejvyšších hodnot K_m dosáhla β -glukozidáza u měřené teploty 40 °C, přičemž hodnoty V_{max} i K_m pro 30 °C byly jen lehce nižší. V kryoturbačním horizontu byl vývoj kinetiky β -glukozidázy u teplot 0, 4, 10 a tentokrát i 20 °C velice podobný tomu v organickém horizontu při teplotách 0, 4 a 10 °C (Obr.10B). Dalším rozdílem byly naměřené hodnoty V_{max} a K_m při 30 °C, kdy se průběh kinetiky β -glukozidázy v kryoturbačním horizontu podobal průběhu v organickém horizontu při 20 °C. Nejvyšších hodnot V_{max} a K_m opět dosáhla β -glukozidáza při 40 °C.

U celobiozidázy byl v organickém horizontu (Obr.11A) zjištěn podobný průběh kinetiky jako v témže horizontu u β -glukozidázy. Celobiozidáza se však lišila ve vývoji kinetiky u teploty 40 °C, u které byly naměřené nižší hodnoty V_{max} než u teploty 30 °C. V kryoturbačním horizontu byla aktivita celobiozidázy vůbec nejnižší (Obr.11B). Vývoje kinetik při teplotách 0, 4, 10 a 20 °C si byly podobné, stejně jako kinetiky naměřené při teplotách 30 a 40 °C. Rozdíly mezi těmito skupinami nebyly tolik zásadní, jak tomu bylo v ostatních případech.

A) β -glukozidáza - organický horizont

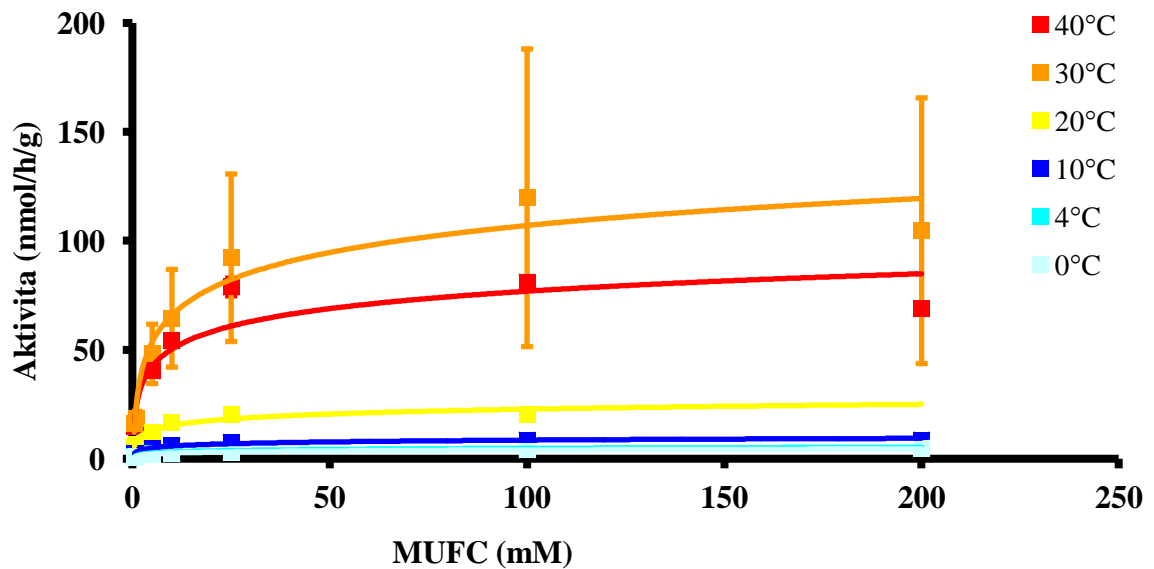


B) β -glukozidáza - kryoturbační horizont

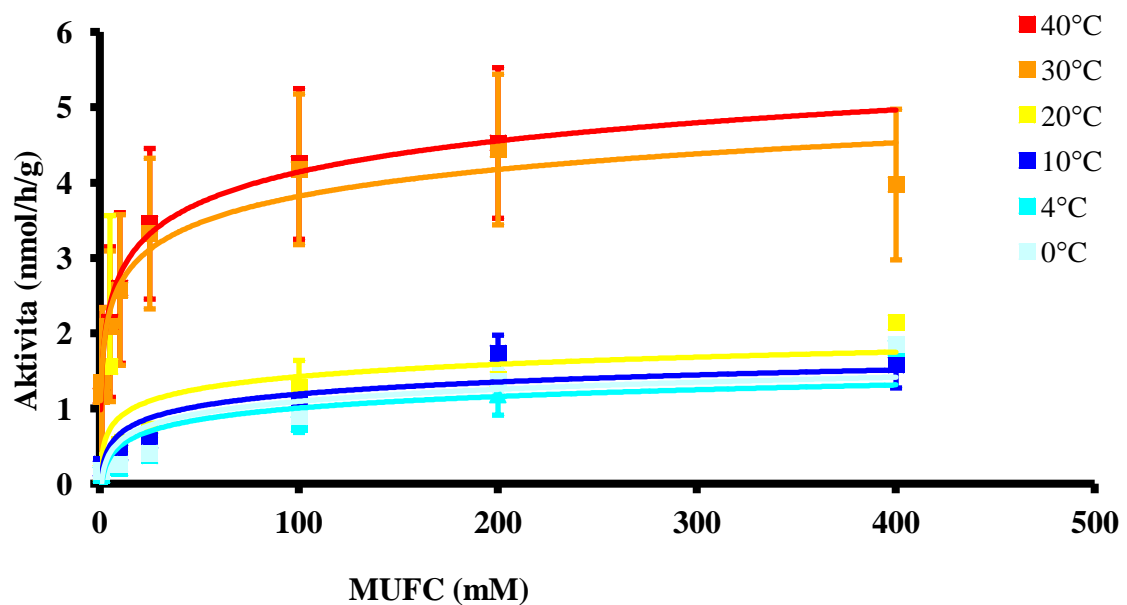


Obr.10: Vynesení kinetiky β -glukozidázy (závislosti aktivity enzymu na dostupnosti substrátu) pro jednotlivé teploty (0, 4, 10, 20, 30, 40 °C) v organickém (A) a kryoturbačním (B) horizontu ($n = 4$).

A) Celobiozidáza - organický horizont



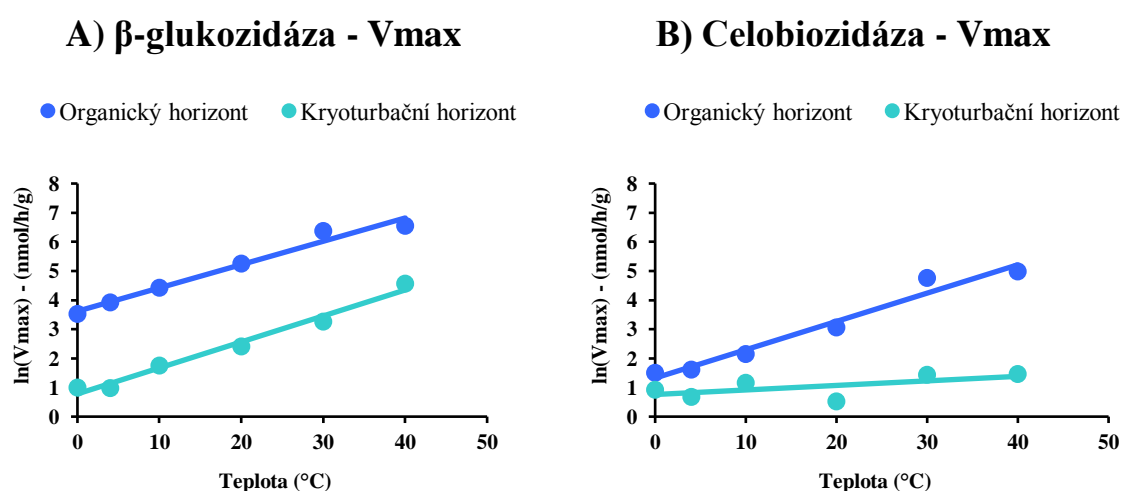
B) Celobiozidáza - kryoturbační horizont



Obr.11: Vynesení kinetiky celobiozidázy (závislosti aktivity enzymu na dostupnosti substrátu) pro jednotlivé teploty (0, 4, 10, 20, 30, 40 °C) v organickém (A) a kryoturbačním (B) horizontu ($n = 4$).

4.2 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách Tajmyru

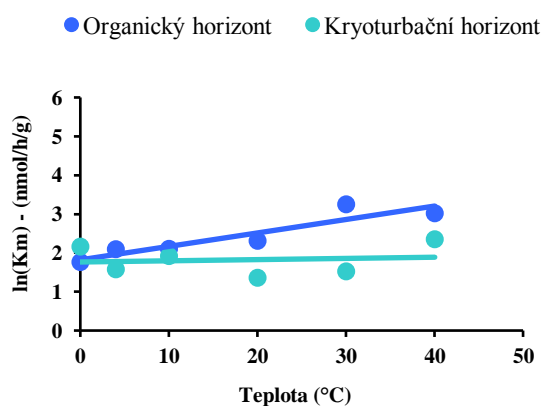
Všechny zjištěné teplotní závislosti V_{\max} (maximální enzymatické aktivity) byly pozitivního charakteru (tj. s rostoucí teplotou rostla aktivita enzymů). Výsledky ukazují, že teplotní závislost V_{\max} je pro β -glukozidázu v organickém ($a = 0,0803$) i kryoturbačním horizontu ($a = 0,0891$) velice podobná, což potvrzují i hodnoty koeficientu Q_{10} (Obr.12A). U celobiozidázy byly rozdíly v teplotní závislosti V_{\max} mezi oběma horizonty výraznější (Obr.12B). Zatímco v organickém horizontu byla zjištěna vysoká teplotní závislost V_{\max} ($a = 0,097$), v kryoturbačním byla velice nízká ($a = 0,01583$).



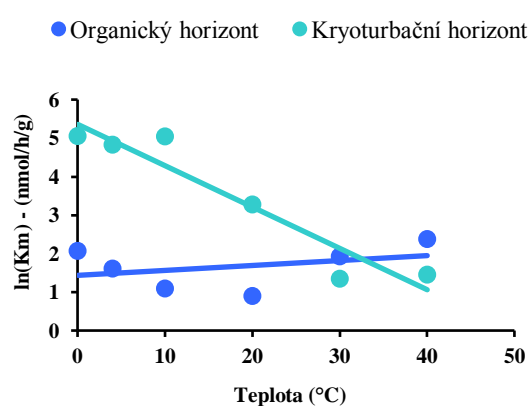
Obr.12: Teplotní závislosti logaritmovaných hodnot V_{\max} β -glukozidázy (A) a celobiozidázy (B) v organickém a kryoturbačním horizontu odběrové oblasti ($n = 4$).

U výsledků teplotní závislosti K_m (míry afinity enzymu k dodanému substrátu) byla zjištěna výraznější variabilita. U β -glukozidázy byla v organickém horizontu naměřena nejvyšší pozitivní teplotní závislost K_m ($a = 0,0345$). Naproti tomu v kryoturbačním horizontu byla teplotní závislost velmi nízká ($a = 0,003$) (Obr.13A). U celobiozidázy byly teplotní závislosti K_m mezi organickým a kryoturbačním horizontem velice odlišné. V organickém horizontu byla zjištěna velmi slabá pozitivní závislost ($a = 0,0127$), zatímco v kryoturbačním horizontu byla zjištěna závislost výrazně negativní ($a = -0,1074$) (Obr.13B).

C) β -glukozidáza - K_m



D) Celobiozidáza - K_m



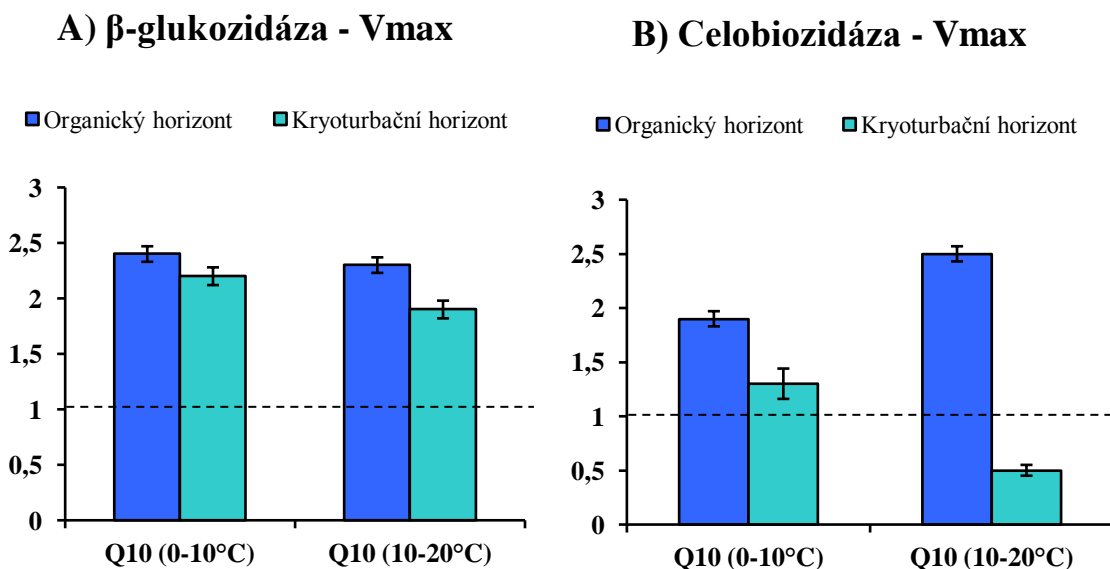
Obr.13: Teplotní závislosti zlogaritmovaných hodnot K_m β -glukozidázy (C) a celobiozidázy (D) v organickém a kryoturbačním horizontu odběrové oblasti ($n = 4$).

Rozklad polymerní celulózy, na kterém se podílí hlavně celobiozidáza, není v kryoturbačním horizontu urychlen se zvyšující se teplotou. To by mohlo být způsobeno snižující se dostupností substrátu, který se projevuje snížením K_m při zvyšující se teplotě.

4.3 Koeficient Q₁₀

Naměřené hodnoty Q₁₀ byly u β-glukozidázy v obou teplotních intervalech i v obou půdních horizontech pozitivního charakteru a velice podobné (Obr.14A). V teplotním intervalu od 0 do 10°C však byly hodnoty Q₁₀ v organickém i kryoturbačním horizontu vyšší. U celobiozidázy bylo variací v naměřených hodnotách Q₁₀ více (Obr.14B). V organickém horizontu byla naměřena vyšší hodnota Q₁₀ v teplotním intervalu od 10 do 20 °C. V kryoturbačním tomu bylo naopak, přičemž v intervalu od 10 do 20 °C vykazovala hodnota Q₁₀ negativní charakter.

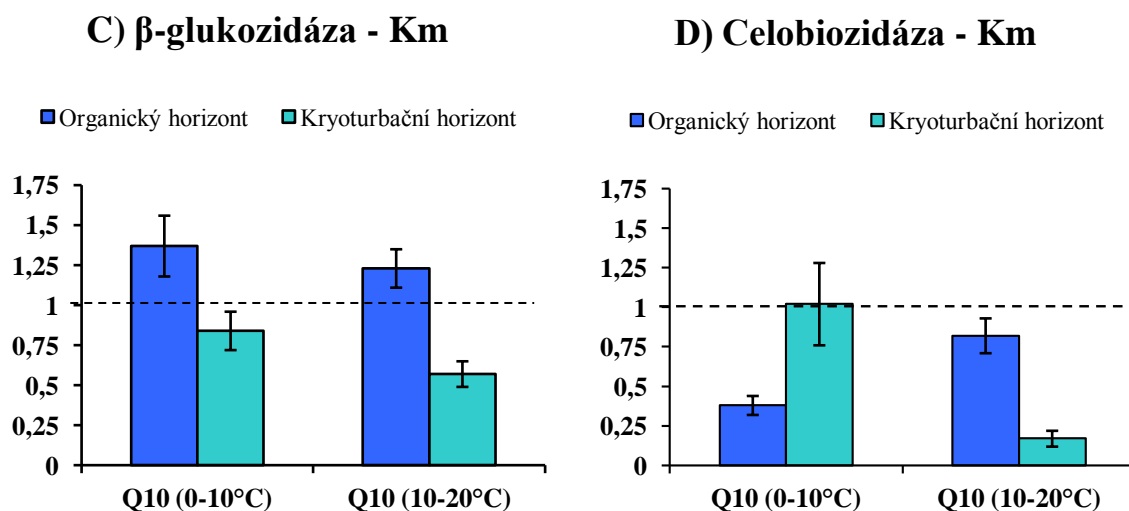
Ve vzájemném srovnání enzymů dosahovala vyšších hodnot Q₁₀ téměř ve všech případech β-glukozidáza. Jedinou výjimkou byla hodnota Q₁₀ v organickém horizontu celobiozidázy v teplotním intervalu od 10 do 20 °C, která byla zároveň hodnotou nejvyšší. Nejnižší hodnota ležela ve stejném teplotním intervalu, ale v kryoturbačním horizontu. Hodnoty Q₁₀ byly ve všech případech vyšší v organickém horizontu než v kryoturbačním. Zajímavostí srovnání obou enzymů bylo konstatování, že u obou enzymů byly hodnoty Q₁₀ pro kryoturbační horizont v teplotním intervalu 0 až 10 °C vyšší než v intervalu 10 až 20 °C.



Obr.14: Grafické vynesení hodnot Q₁₀ (teplotní intervaly 0 až 10 °C a 10 až 20 °C) pro V_{max} β-glukozidázy (A), celobiozidázy (B) a změnu jejich aktivity v organickém a kryoturbačním horizontu. Pozn: Přerušovaná čára v grafech ukazuje hranici mezi pozitivní a negativní teplotní závislostí enzymových aktivit (n = 4).

Nárůst hodnot K_m byl pozorován pouze v případě β -glukozidázy v organickém horizontu a to v obou teplotních intervalech (Obr.15C). V teplotním intervalu 0 až 10 °C byl nárůst afinity výraznější než v intervalu 10 až 20 °C. V kryoturbačním horizontu byla zjištěna negativní teplotní závislost K_m β -glukozidázy. U celobiozidázy byla zjištěna téměř nulová teplotní závislost v kryoturbačním horizontu v teplotním intervalu (0 až 10 °C) (Obr.15D). V ostatních případech byla u celobiozidázy naměřena závislost negativní.

Nejvyšší pozitivní teplotní závislost K_m vykazovala β -glukozidáza v organickém horizontu a teplotním intervalu 0 až 10 °C. Nejvyšší negativní pak celobiozidáza v kryoturbačním horizontu a teplotním intervalu 10 až 20 °C. Zajímavostí opět bylo, že u obou enzymů byly hodnoty Q_{10} pro kryoturbační horizont v teplotním intervalu 0 až 10 °C vyšší než v intervalu 10 až 20 °C.



Obr.15: Grafické vynesení hodnot Q_{10} (teplotní intervaly 0 až 10 °C a 10 až 20 °C) pro K_m β -glukozidázy (C), celobiozidázy (D) a změnu jejich afinity k substrátu v organickém a kryoturbačním horizontu. Pozn: Přerušovaná čára v grafech ukazuje hranici mezi pozitivní a negativní teplotní závislostí enzymových aktivit ($n = 4$).

5. Diskuze

5.1 Kinetika enzymů v půdách Tajmyru

Celosvětové zásoby organického uhlíku nacházejícího se ve formě SOM jsou přinejmenším čtyřikrát větší, než celosvětové zásoby uhlíku nacházejícího se v atmosféře a v živých rostlinách (Jobbágy a Jackson 2000). Předpokládá se, že dekompozice těchto obrovských zásob SOM a následně i půdní respirace a produkce CO₂ se zvýší spolu s teplotou (Davidson a Janssens 2006). Naprostá většina těchto predikcí, týkajících se vztahů mezi změnami teploty a mikrobiální aktivity, však nebere v potaz kinetiku extracelulárních enzymů, sekretovaných do půdy mikrobiálními dekompozitory (Allison et al. 2010).

Naše výsledky, popisující kinetiku β -glukozidázy a celobiozidázy při šesti teplotách (0, 4, 10, 20, 30 a 40 °C) v Tajmyrských půdách, potvrzují tvrzení o teplotní závislosti enzymů, které ve své práci nastínil Wallenstein et al. (2009). Změna aktivity β -glukozidázy a celobiozidázy se při 6 měřených teplotách v organickém a kryoturbačním horizontu se zvyšující se koncentrací substrátu lišila. Obecně bylo zjištěno, že až na výjimky byl nárůst aktivity obou enzymů v půdním profilu při teplotách 0 až 20 °C nízký. Naopak při teplotách 30 až 40 °C byl nárůst enzymatické aktivity podstatně vyšší.

Výsledky kinetiky β -glukozidázy v arktických půdách Aljašky ve své práci zveřejnili German et al. (2012). Při použití stejné metody došli při měření enzymatické aktivity v organickém horizontu k odlišným výsledkům. Přestože se stejně jako v naší práci aktivita β -glukozidázy zvyšovala spolu s testovanou teplotou, v Aljašských půdách vykazovala vyšší afinitu k substrátu už od nízkých teplot, což mělo za následek i vyšší aktivitu při nízkých teplotách. Celkové maximální naměřené hodnoty aktivity β -glukozidázy v Aljašských půdách, byly řádově čtyřikrát vyšší, než námi zjištěné hodnoty aktivity β -glukozidázy v půdách Tajmyru. Tento podstatný rozdíl v aktivitě a afinitě enzymů k substrátu mezi jednotlivými arktickými oblastmi, může být do jisté míry vysvětlen dobou odběru. Naše vzorky byly odebírány v létě (v srpnu), což je období, které Wallenstein et al. (2009) v arktických půdách označili za období s nejnižší enzymatickou aktivitou i afinitou enzymu k substrátu. To je patrně způsobeno nedostatkem půdního dusíku nezbytného k syntéze enzymů. Naopak nejvyšší aktivita enzymů byla zjištěna v posledních dnech zimního období a na začátku jara, kdy začíná sezonní rozmrazání organického horizontu. Wallenstein et al. (2009) předpokládají, že je tato vysoká enzymatická aktivita dána činností mikroorganismů

v zimních měsících, kdy syntetizují enzymy s nízkými teplotními optimy, jejichž aktivace souvisí s tímto jarním rozmrzáním (Huston et al. 2000).

Z našich měření dále vyplynulo, že aktivita β -glukozidázy je v půdách Tajmyru jak v organickém tak i v kryoturbačním horizontu vyšší než aktivita celobiozidázy, což ve své práci potvrzuje i Tabatabai (1994), který definuje β -glukozidázu v půdách jako dominantní enzym.

5.2 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách Tajmyru

Přízůsobení citlivosti enzymu k teplotním podmínkám na základě zeměpisné šířky, nebylo u půdních enzymů doposud prokázáno. Obecně přijímanou myšlenkou však je, že enzymy adaptované pro chladné oblasti jsou citlivější ke změnám teploty než ty, které se vyskytují v oblastech teplejších (Koch et al. 2007). Primárně je tato citlivost dána odlišnou strukturou enzymů adaptovaných pro chladné oblasti, což zapříčiňuje například rychlejší navázání substrátu do aktivního místa při nízkých teplotách, ale také může vést k rychlejší denaturaci těchto proteinů a tedy i ztrátě jejich funkce při teplotách vyšších (Hochachka a Somero 2002).

Stejně jako German et al. (2012), i my jsme zjistili, že všechny zjištěné teplotní závislosti V_{\max} byly pozitivního charakteru (tj. s rostoucí teplotou rostla aktivita enzymů). Zjistili jsme, že β -glukozidáza ($a = 0,0803$) i celobiozidáza ($a = 0,097$) v teplotním intervalu (0 až 40 °C) projevovala v půdách Tajmyru vyšší teplotní závislost V_{\max} , než β -glukozidáza ($a = 0,055$) i celobiozidáza ($a = 0,064$) v půdách Aljašky. Pokud jde o teplotní závislost K_m došli jsme k tomu, že β -glukozidáza v půdách Tajmyru, projevovala téměř identickou teplotní závislost K_m ($a = 0,0345$), jako β -glukozidáza v půdách Aljašky ($a = 0,034$). To už neplatilo u celobiozidázy, u které byla teplotní závislost v půdách Tajmyru průkazně nižší ($a = 0,0127$), než v půdách Aljašky ($a = 0,039$).

Stejně jako German et al. (2012) nebo Stone et al. (2012), i my jsme došli k závěru, že V_{\max} a K_m extracelulárních enzymů jsou veličiny citlivé k teplotě. Také jsme se shodovali v objevení větší variace v odpovědi K_m na změnu teploty než v případě V_{\max} .

5.3 Koeficient Q₁₀

K ověření teplotní citlivosti enzymů v různých oblastech výskytu může velmi dobře posloužit koeficient Q_{10} . Pokud srovnáme hodnoty V_{\max} a K_m pro Q_{10} s průměrnou změnou teploty (roční teplotou) dané oblasti, můžeme dostat předpokládané odpovědi enzymů na dané změny teploty (Wallenstein et al. 2009). Vztah mezi koeficientem Q_{10} a průměrnou roční teplotou by mohl vypovídat o lokálním přizpůsobení enzymů daným zeměpisným podmínkám (German et al. 2012).

Tomu nasvědčují i námi naměřené hodnoty Q_{10} pro V_{\max} i K_m v půdách Tajmyru, které jsou pro β -glukozidázu i celobiozidázu v organickém i kryoturbačním horizontu vyšší v teplotním intervalu (od 0 do 10 °C) než v intervalu (od 10 do 20 °C). Jedinou výjimkou byla vyšší naměřená hodnota Q_{10} pro celobiozidázu v kryoturbačním horizontu. Tyto výsledky mohou naznačovat přizpůsobení enzymů nízkým teplotám chladné oblasti Tajmyru, což by mohlo přispět k domněnce o přizpůsobení citlivosti enzymu k teplotním podmínkám na základě zeměpisné šířky. German et al. (2012) však tuto domněnku potvrdil pouze pro aktivitu β -glukozidázy pomocí zkoumání hodnot K_m . Hodnoty K_m mohou totiž objasnit rozdíly v enzymatické odpovědi na různé koncentrace substrátu při různých teplotách, což může poskytnout srovnání v aktivitě enzymů mezi jednotlivými zeměpisnými šířkami, nebo srovnání v aktivitě enzymů v závislosti na vývoji teploty dané lokality (Stone et al. 2012, Tabatabai et al. 1994).

6. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit kinetické parametry (K_m a V_{max}) a teplotní závislost Q_{10} pro β -glukozidázu a celobiozidázu v organickém a kryoturbačním půdním horizontu Tajmyru a následně naměřené aktivity v obou půdních horizontech vzájemně porovnat.

- Byla zamítnuta hypotéza o paralelním zvyšování V_{max} a K_m s teplotou. Zatímco hodnoty V_{max} tuto podmínku splňovaly, hodnoty teplotní závislosti K_m celobiozidázy byly v kryoturbačním horizontu značně negativní.
- Byla potvrzena hypotéza o výraznější odpovědi β -glukozidázy a celobiozidázy na zvyšující se teplotu v organickém horizontu oproti kryoturbačnímu.
- β -glukozidáza vykazovala v obou půdních horizontech i při všech testovaných teplotách (0 až 40 °C) vyšší aktivitu než celobiozidáza.
- Nejvyšší afinita enzymu k substrátu byla zjištěna v organickém horizontu u β -glukozidázy, nejnižší poté u celobiozidázy v kryoturbačním horizontu.
- V organickém horizontu byly u obou enzymů až na jedinou výjimku naměřeny vyšší hodnoty Q_{10} (pro V_{max} i K_m) než v horizontu kryoturbačním.

7. Použitá literatura

- Ajwa H.A. a Tabatabai M.A. (1994). Decomposition of different organic materials in soils. *Biology and Fertility of Soils* 18, 175–182.
- Ajwa H.A., Rice W.C., Sotomayor D. (1998). Carbon and nitrogen mineralization in tallgrass prairie and agricultural soils. *Water Air and Soil Pollution* 75, 141–158.
- Allison S.D., Nielsen C.B., Hughes R.F. (2006). Elevated enzyme activities in soils under the invasive nitrogen-fixing tree *Falcataria moluccana*. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1537–1544.
- Allison S.D., Wallenstein M.D., Bradford M.A. (2010). Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, 3, 336–340.
- Anisimov O.A., Nelson F.E., Pavlov A.V (1999). Predictive scenarios of permafrost development under conditions of global climate change in the XXI century. *Earth Cryol* 3, 15–25.
- Bakshi M. a Varma A. (2011). Soil Enzyme: The State-of-Art. *Soil Enzymology* (eds. G. Shukla, A. Varma), pp. 1-24. Springer Heidelberg Dordrecht, London, New York.
- Baranov I.J. a Kudfryavtsev V.A. (1963). Permafrost in Euroasia. Proceedings of the permafrost International Conference Indiana. *National Academy of Science, National Research Council Publication* 1287, 98-102.
- Birsan C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose D.R., Tull D., Wakarchuck W.W., Wang Q., Warren R.A.J., White A., Withers S.G. (1998). Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochemical Society Transactions* 26, 156–160.
- Bockheim J.G. a Tarnocai C. (1998). Recognition of cryoturbation for classifying permafrost-affected soils. *Geoderma* 81, 281–293.
- Bockheim J.G., Ping C.L., Moore J.P., Kimble J.M. (1994). Gelisols: A new proposed order for permafrost-affected soils. *Proc. Meeting on Classification, Correlation, and Management of Permafrost-Affected Soils* (eds. J.M. Kimble, R. Ahrens), pp. 25–45. Soil Conservation Service, Washington DC.
- Burns R.G (1983). Extracellular enzyme—substrate interactions in soil. *Microbes in Their Natural Environments* (eds. J.H. Slater, R. Whittenbury, J.W.T. Wimpenny), pp. 249–298. Cambridge University Press, Cambridge.
- Burns R.G. (1978). *Soil enzymes*. Academic Press, New York.
- Campbell P.N. a Smith A.D. (1993). *Biochemistry illustrated: an illustrated summary of the subject for medical and other students of biochemistry*. 3rd Edn., Logman Singapore Publishers, Singapore.
- Carreiro M.M., Sinsabaugh R.L., Repert D.A., Parkhurst D.F. (2000). Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81, 2359–2365.
- Coker J.A., Sheridan P.P., Loveland-Curtze J., Gutshall K.R., Auman A.J., Brenchley J.E. (2003). Biochemical characterization of a beta-galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic *Arthrobacter* isolate. *Journal of Bacteriology* 185, 5473–5482.

- Criquet S., Ferre E., Farnet A.M., Le Petit J. (2004). Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1111–1118.
- Criquet S., Tagger S., Vogt G., Le Petit J. (2002). Endoglucanase and beta-glycosidase activities in an evergreen oak litter: annual variation and regulating factors. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1111–1120.
- Davidson E.A. a Janssens I.A. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440, 165–173.
- Davidson E.A., Janssens I.A., Luo Y. (2006). On the variability of respiration in terrestrial ecosystems: moving beyond Q10. *Global Change Biology* 12, 154–164.
- Deng S.P. a Tabatabai M.A. (1994). Cellulase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1347–1354.
- Dick R.P. (1994). Soil enzyme activities as indicators of soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment, soil science society of America* (eds. J.V. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicek, B.A. Stewart), pp. 107–124. American Society of Agriculture, Madison.
- Dick W.A. a Tabatabai M.A. (1992). Significance and potential uses of soil enzymes. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management* (eds. Metting, F. B., Jr.), pp. 95–127. Marcel Dekker, New York.
- Dmitriev V.V., Suzina N.E., Rusakova T.G., Gilichinsky D.A., Duda V.I. (2000). Ultrastructural characteristics of natural forms of microorganisms isolated from permafrost grounds of eastern Siberia by the method of low-temperature fractionation. *Doklady Biological Science* 378, 304–306.
- Drake L.D. a Shreve R.L. (1973). Pressure Melting and Regelation of Ice by Round Wires. *Proceedings of The Royal Society A* 332, 51-83.
- Eivazi F. a Tabatabai M.A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 20, 601–606.
- Elverland E. (2009). The Arctic System. Norwegian Polar Institute, Tromsø, Norway.
- Enowashu E., Poll C.H., Lamersdorf N., Kandeler E., (2009). Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition in a spruce forest soil. *Applied Soil Ecology* 43, 11-21.
- Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P. (1990). Biodegradation of cellulose. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components* (eds. K.E.L. Eriksson, R.A. Blanchette, P. Ander), pp. 89–180 Springer, New York.
- Esen A. (1993). b-Glucosidases-biochemistry and molecular biology, ACS symposium series 533. American Chemical Society, Washington DC.
- Feller G. (2003). Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 648–662.
- Fierer N., Schimel J.P., Holden P.A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 167–176.
- Fioretto A., Papa S., Pellegrino A., Fuggi A. (2007). Decomposition dynamics of *Myrtus communis* and *Quercus ilex* leaf litter: mass loss, microbial activity and quality change. *Applied Soil Ecology* 36, 32–40.

- FitzPatrick E.A. (1997). Arctic soils and permafrost. *Ecology of Arctic Environments* (eds. S.J. Woodin a M. Marquiss), pp. 1-40. Blackwell Science, Oxford.
- Fog K. (1988). The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 63, 433–462.
- Gardner K.H. a Blackwell J. (1974a). Structure of native cellulose. *Biopolymers* 13, 1975–2001.
- Gardner K.H. a Blackwell J. (1974b). The hydrogen bonding in cellulose. *Biochim Biophys Acta* 343, 232–237.
- German D.P., macelo K.R.B., Stone M.M., Allison S.D. (2012). The Michaelis–Menten kinetics of soil extracellular enzymes in response to temperature: a cross-latitudinal study. *Global Change biology* 18, 1468–1479.
- Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V., Petrovskaya L., Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Fattakhova R., Tiedje J.M. (2005). Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol Ecology* 53, 117–128.
- Gorham E. (1991). Northern peatlands role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Journal of Applied Ecology* 1,182–195.
- Heinen W. a Lauwers A.M. (1981). Growth of bacteria at 100°C and beyond. *Archives of Microbiology* 129, 127-128.
- Heyse I. (1983). Cryoturbation Types in Eolian Würm Late Glacial Sediments in Flanders, Belgium. *Polarforschung* 53, 87-95.
- Hochachka P.W., Somero G.N. (2002). *Biochemical Adaptation*. Oxford University Press, New York, USA.
- Huston A.L., Krieger-Brockett B.B., Deming J.W. (2000). Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice. *Environmental Microbiology* 2, 383–388.
- Jobbágy E.G. a Jackson R.B. (2000). The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications*, 10, 423–436.
- Kandeler E., Kampichler C., Horak O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23, 299–306.
- Killham K. (1994). *Soil ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Knapp E.B., Elliot L.F., Campbell G.S. (1983). Microbial respiration and growth during the decomposition of wheat straw. *Soil biology and Biochemistry* 15, 319-3232.
- Koch O., Tscherko D., Kandeler E. (2007). Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemical Cycles*, 21, GB4017.
- Kokelj S.V. a Burn C.R. (2005). Geochemistry of the active layer and near-surface permafrost, Mackenzie delta region, Northwest Territories, Canadian. *Journal of Earth Sciences* 42, 37–48.
- Krassig H.A. (1993). *Cellulose: structure, accessibility and reactivity*. 1st Edn. Gordon & Breach. Yverdon, Switzerland.
- Ladd J.N. a Jackson R.B. (1982). *Nitrogen in agricultural soils* (eds. F.J. Stevenson), pp. 173–228. American Society of Agronomy, Wisconsin.

- Lachenbruch A.H. (1962). Mechanism of Thermal Contraction Cracks and Ice-wedge-polygons in Permafrost. *Geological Society of America*, Special Paper No. 70, pp. 69.
- Lauriol B., Duchesne C., Clark I.D. (1995). Systematic water infiltration in ice wedges – results of an O-18 and deuterium study. *Permafrost and Periglacial Processes* 6, 47-55.
- Lloyd J. and Taylor J.A. (1994). On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* 8, 315–323.
- Lozinski W. (1912). Die periglaziale Fazies der mechanischen Verwitterung. XI International Geological Congress 1910, 1039-1053.
- Lundquist E., Scow K., Jackson L., Uesugi S., Johnson C. (1999). Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1661–1675.
- Mackay J.R. (1993a). The sound and speed of ice-wedge cracking, Arctic Canada. *Canadian Journal of Earth Science* 30, 509-518.
- Mackay J.R. (1993b). Air temperature, snow cover, creep of frozen ground, and time of ice wedge cracking, western Arctic coast. *Canadian Journal of Earth Science* 30, 1720-1729.
- Mackay J.R. (1995). Ice wedges on hillslopes and landform elevation in the late Quaternary, western Arctic coast, Canada. *Canadian Journal of Earth Science* 32, 1093-1105.
- Makeyev O.V., (1993). Cryopedology: fundamental and technical basis. *Proc. First International Conference on Cryopedology* (eds. D.A. Gilichinsky), pp. 7–15. Russian Academy of Sciences, Pushchino.
- Martinez C.E. and Tabatabai M.A. (1997). Decomposition of biotechnology by-products in soils. *Journal of Environmental Quality* 26, 625–632.
- Marx M.C., Wood M., Jarvis S.C., (2001). A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1633-1640.
- Morris S.J. (1999). Spatial distribution of fungal and bacterial biomass in southern Ohio hardwood forest soils: fine scale variability and microscale patterns. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1375–1386.
- Nannipieri P. (1994). The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (eds. C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta, P.R. Grace), pp 238–244. Adelaide, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Madison.
- Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P. (2002). Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil. *Enzymes in the Environment* (eds. R.G. Burns, R.P. Dick), pp. 1-34. Marcel Dekker, New York.
- Neff J.C., Townsend A.R., Gleixner G., Lehman S.J., Turnbull J., Bowman W.D. (2002). Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature* 419, 915–917.
- Nelson F.E., Anisimov O.A., Shiklomanov N.I. (2001). Subsidence risk from thawing permafrost. *Nature* 410, 889–890.
- Nevell T.P. and Zeronian S.H. (1985). Cellulose chemistry fundamentals. *Cellulose and its applications: chemistry, biochemistry and applications* (eds. J.F. Kennedy, G.O. Philips, D.J. Wedlock, P.A. Williams), pp. 15– 29. John Wiley & Sons, Chichester.

- Niemi R.M. a Vepsäläinen M. (2005). Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods* 60, 195–205.
- Oechel W.C., Hastings S.J., Jenkins M., Riechers G., Grulke N.E., Vourlitis G.L. (1993). Recent change of arctic tundra ecosystems from a net carbon sink to a source. *Nature* 361, 520–526.
- Olander L.P. a Vitousek P.M. (2000). Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175–190.
- Osono T. a Takeda H. (2005). Decomposition of organic chemical components in relation to nitrogen dynamics in leaf litter of 14 tree species in a cool temperate forest. *Ecological Research* 20, 41–49.
- Osterkamp T.E. (2001). Subsea permafrost. *Encyclopedia of ocean sciences* (eds. J.H. Steele, S.A. Thorpe, K.K. Turekian), pp. 2902–2912. Academic Press, New York.
- Papa S., Pellegrino A., Fioretto A. (2008). Microbial activity and quality changes during decomposition of *Quercus ilex* leaf litter in three Mediterranean woods. *Applied Soil Ecology* 40, 401–410.
- Peterson R.A. a Krantz W.B. (2003). A mechanism for differential frost heave and its implications for patterned-ground formation. *Journal of Glaciology* 49, 69–80.
- Post W.M., Emanuel W.R., Zinke P.J., Stangenberger A.G. (1982). Soil carbon pools and world life zones. *Nature* 298, 156–159.
- Price P.B., Sowers T. (2004). Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 4631–4636.
- Privalov P.L. a Tsalkova T.N. (1979). Micro-stabilities and macro-stabilities of globular-proteins. *Nature* 280, 693–696.
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashchenko V.I. (2001). Theoretical basis of the biotechnology of wood composites. Wood and wood-decaying fungi, 1st Edn., Nauka, Moscow.
- Rivkina E., Laurinavichuis K., McGrath J., Tiedje J.M., Shcherbakova V., Gilichinsky D. (2004). Microbial life in permafrost. *Advances in Space Research* 33, 1215–1221.
- Ross D.J. (1987). Soil microbial biomass estimated by the fumigation-incubation procedure: seasonal fluctuations and influence of soil moisture content. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 397–404.
- Sale R. (2008). *The Arctic. The Complete Story*. Frances Lincoln, London
- Sardans J. a Penuelas J. (2005). Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 455–461.
- Sextone A.J., Parkin T.B., Tiedje J.M. (1985). Temporal response of soil denitrification rates to rainfall and irrigation. *Soil Science Society of America Journal* 49, 99-103.
- Schmidt G. a Laskowski M. Sr (1961). Phosphate ester cleavage (Survey). *The enzymes* (eds. P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), pp. 3–35. Academic, New York.
- Sinsabaugh R.L., Antibus R.K., Linkins A.E. (1991). An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34, 43–54.

- Sinsabaugh R.L., Carreiro M.M., Alvarez S. (2002). Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. *Enzymes in the environment* (R.G. Burns, R.P. Dick), pp. 249–265 Marcel Dekker, New York.
- Soina V., Mulyukin A.L., Demkina E.V., Vorobyova E.A., El-Registan G.I. (2004). The structure of resting bacterial populations in soil and subsoil permafrost. *Astrobiology* 4, 345–358.
- Speir T.W. a Ross D.J. (1978). Soil phosphatase and sulphatase. *Soil enzymes* (eds. R.G. Burns), pp. 197–250. Academic, London.
- Stendel M., Romanovsky V.E., Christensen J.H., Sazonova T. (2007). Using dynamical downscaling to close the gap between global change scenarios and local permafrost dynamics. *Global Planet Change* 56, 203–214.
- Steven B., Léveill   E., Pollard W.H., Whyte L.G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* 10, 259–267.
- Stevenson F.J. (1986). Cycles of Soil-Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. Wiley Interscience Publisher, John Wiley & Sons, New York.
- Stone M.M., Weiss M.S., Goodale C.L., Adams M.B., Fernandez I.J., German D.P., Allison S.D. (2012). Temperature sensitivity of soil enzyme kinetics under N-fertilization in two temperate forests. *Global Change Biology* 18, 1173–1184.
- Šantr  ckov  H. (2001). Ekologie p  dy. BF JU a   PB AV   R v   esk ch Bud jovic ch.
- Šlajsov  P. (2011). Aktivita p  dn ch enzym   v horsk ch smr in ch napaden ch l kozroutem smrkov m. Magistersk  diplomov  pr ce. P  rodov deck  fakulta, Jiho esk  univerzita,   esk  Bud jovice.
- Tabatabai M.A. (1994). Soil enzymes. *Methods of soil analysis* (eds. A.L. Page, R.H. Miller, D.R. Keeney), pp 775–833. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Tabatabai M.A. (2002). Soil Enzymes. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (eds. G. Bitton), pp. 2899-2910. Wiley, New York.
- Tarnocai C., Ping C.L., Kimble J. (2007). Carbon cycles in the permafrost region of North America. *The first state of the carbon cycle report (SOCCR): The North American carbon budget and implications for the global carbon cycle* (eds. A.W. King, L. Dilling, G.P. Zimmerman, D.M. Fairman, R.A. Houghton, G. Marland, A.Z. Rose, T.J. Wilbanks), chapter 12. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Climate Data Center, Asheville.
- Tarnocai Ch. (2009). Arctic Permafrost Soils. *Permafrost Soils* (eds. R. Margesin), pp. 3-16. Springer, Berlin.
- Tate R.L. III. (2000). Soil microbiology, 2st Edn., Wiley, New York.
- Tedrow J.C.F. (1977). Soils of the Polar Landscapes. Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey
- Vitousek P.M. a Howarth R.W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115.
- Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M., Minkovskaya N., Zalinova N., Mamukelashvili A., Gilichinsky D.A., Rivkina E., Vishnivetskaya T. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol* 20, 277–290.

- Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M., Minkovskaya N., Zalinova N., Mamukelashvili A., Gilichinsky D.A., Rivkina E., Vishnivetskaya T. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology* 20, 277–290.
- Voroney R.P. (2007). The Soils Habitat. *Soil Microbiology and Biochemistry* (eds. E.A. Paul), pp. 25-49. Academic press, Elsevier, Oxford.
- Wagner D. a Liebner S. (2009). Global Warming and Carbon Dynamics in Permafrost Soils: Methane Production and Oxidation. *Permafrost soils* (eds. R. Margesin), pp. 219-236. Springer, Berlin.
- Walker D.A., Romanovsky V.E., Krantz W.B., Ping C.L., Peterson R.A., Raynolds M.K., Epstein H.E., Jia J.G., Wirth D.C. (2002). Biocomplexity of frost boil ecosystem on the Arctic Slope, Alaska. ARCUS 14th Annual Meeting and Arctic Forum 2002, Arlington, Virginia, USA.
- Wallenstein M., Allison S.D., Ernakovich J., Steinweg J.M., Sinsabaugh R. (2011). Controls on the Temperature Sensitivity of Soil Enzymes: A Key Driver of In Situ Enzyme Activity Rates. *Soil Enzymology* (eds. Shukla G., Varma A.), pp. 245-258. Springer, Berlin.
- Wallenstein M.D., McMahon S.K., Schimel J.P. (2009). Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology* 15, 1631–1639.
- Washburn A.L. (1956). Classification of patterned ground and review of suggested origins. *Geological Society of America Bulletin* 67, 823-866.
- White A.R. (1982). Visualization of cellulases and cellulose degradation.. *Cellulose and other natural polymer systems: biogenesis, structure, and degradation* (eds. R.M. Brown), pp. 489–509. Plenum, New York.
- Willerslev E., Hansen A.J., Rønn R., Brand T.B., Barnes I., Wiuf C., Gilichinsky D., Mitchell D., Cooper A. (2004). Long-term persistence of bacterial DNA. *Current biology* 14, R9–R10.
- Williams P.J. a Smith M.W. (1989). The frozen earth: fundamentals of geocryology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wuebbles J., Hayhoe K. (2002). Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Reviews* 57, 177–210.
- Zavodszky P., Kardos J., Svingor A., Petsko G.A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7406–7411.
- Zhang T., Barry R.G., Knowles K., Heginbotton J.A., Brown J. (1999). Statistics and characteristics of permafrost and ground-ice distribution in the northern hemisphere. *Polar Geography* 23,132–154.
- Zimov S.A., Schuur E.A.G., Chapin III F.S. (2006). Permafrost and the global carbon budget. *Science* 312,1612–1613.
- Zogg G., Zak D., Ringelberg D., Macdonald N., Pregitzer K., White D. (1997). Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal* 61, 475–481.
- Zou X., Binkley D., Caldwell B.A. (1995). Effects of dinitrogen-fixing trees on phosphorus biogeochemical cycling in contrasting forests. *Soil Science Society of America* 59, 1452–1458.

Seznam internetových zdrojů:

- 1) <http://climate.nasa.gov/kids/news/index.cfm?FuseAction=ShowNews&NewsID=13>
- 2) <http://maps.google.cz/>
- 3) <http://www.rossway.net/soilcryoturbation.htm>
- 4) http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/index.htm
- 5) <http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/library/maps/Circumpolar/Images/Circumpolar.jpg>
- 6) <http://depts.washington.edu/wmatkins/kinetics/michaelis-menten.html>

8. Přílohy

Příloha.1: Tabulka zlogaritmovaných hodnot V_{max} a K_m jejich standartních odchylek (SO) pro β -glukozidázu a Celobiosidázu v organickém a kryoturbačním horizontu a pro teploty 0, 5, 10, 20, 30, 40 °C (Obr.7).

Enzym	Půdní horizont	Teplota (°C)	$\ln(V_{max})$	SO $\ln(V_{max})$	$\ln(K_m)$	SO $\ln(K_m)$
β -glukosidáza	Organický	0	3,53	0,12	1,76	0,24
		5	3,92	0,08	2,09	0,14
		10	4,43	0,17	2,10	0,28
		20	5,26	0,11	2,31	0,15
		30	6,38	0,62	3,25	0,94
		40	6,55	0,58	3,02	0,88
β -glukosidáza	Kryoturbační	0	1,00	0,04	2,16	0,34
		5	0,98	0,02	1,58	0,17
		10	1,75	0,07	1,92	0,31
		20	2,41	0,11	1,36	0,27
		30	3,26	0,13	1,52	0,27
		40	4,57	0,26	2,35	0,52
Celobiosidáza	Organický	0	1,50	0,08	2,07	0,45
		5	1,61	0,05	1,61	0,22
		10	2,15	0,05	1,09	0,13
		20	3,06	0,10	0,90	0,13
		30	4,77	0,68	1,93	1,15
		40	4,99	0,87	2,38	1,53
Celobiosidáza	Kryoturbační	0	0,92	0,08	5,05	1,02
		5	0,68	0,82	4,83	1,31
		10	1,16	0,13	5,05	1,33
		20	0,52	0,04	3,28	0,89
		30	1,44	0,14	1,35	0,70
		40	1,46	0,16	1,45	0,75

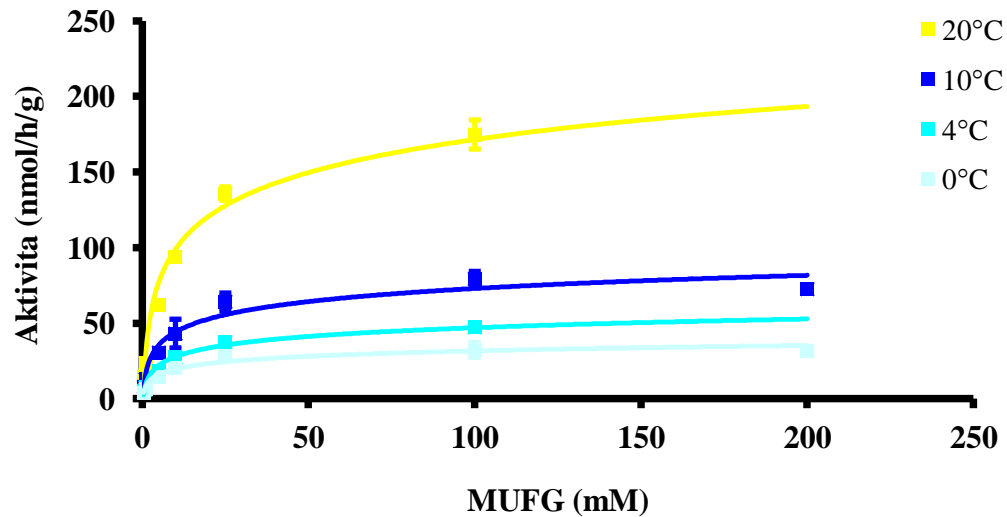
Příloha.2: Tabulka zlogaritmovaných průměrných hodnot Q_{10} (pro V_{max}) a jejich standartních odchylek (SO) v teplotních intervalech (0-10 °C a 10-20 °C) pro β -glukozidázu a celobiosidázu v organickém a kryoturbačním horizontu (Obr. 14A,B).

enzym	Horizont	$\ln(Q_{10}) - (0-10^{\circ}\text{C})$		$\ln(Q_{10}) - (10-20^{\circ}\text{C})$	
		Hodnota průměru	SO	Hodnota průměru	SO
β -glukozidáza	Organický	2,45	0,07	2,29	0,07
	Kryoturbační	2,22	0,08	1,93	0,08
Celobiosidáza	Organický	1,94	0,07	2,49	0,07
	Kryoturbační	1,33	0,14	0,53	0,05

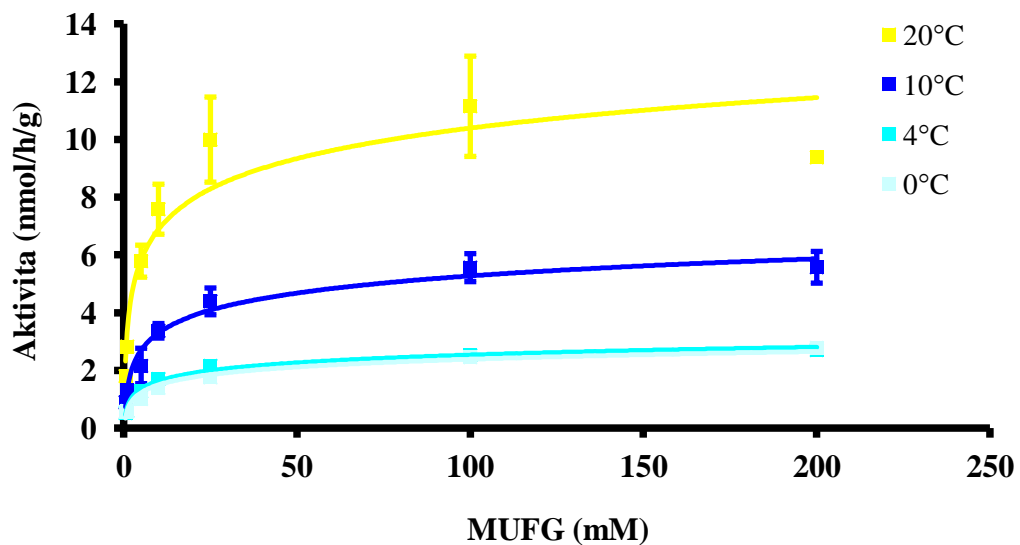
Příloha.3: Tabulka zlogaritmovaných průměrných hodnot Q_{10} (pro K_m) jejich standartních odchylek (SO) v teplotních intervalech (0-10 °C a 10-20 °C) pro β -glukozidázu a celobiosidázu v organickém a kryoturbačním horizontu (Obr. 15A,B).

enzym	Horizont	$\ln(Q_{10}) - (0-10^{\circ}\text{C})$		$\ln(Q_{10}) - (10-20^{\circ}\text{C})$	
		Hodnota průměru	SO	Hodnota průměru	SO
β -glukozidáza	Organický	1,37	0,19	1,23	0,12
	Kryoturbační	0,84	0,12	0,57	0,08
Celobiosidáza	Organický	0,38	0,06	0,82	0,11
	Kryoturbační	1,02	0,26	0,17	0,05

A) β -glukozidáza - organický horizont

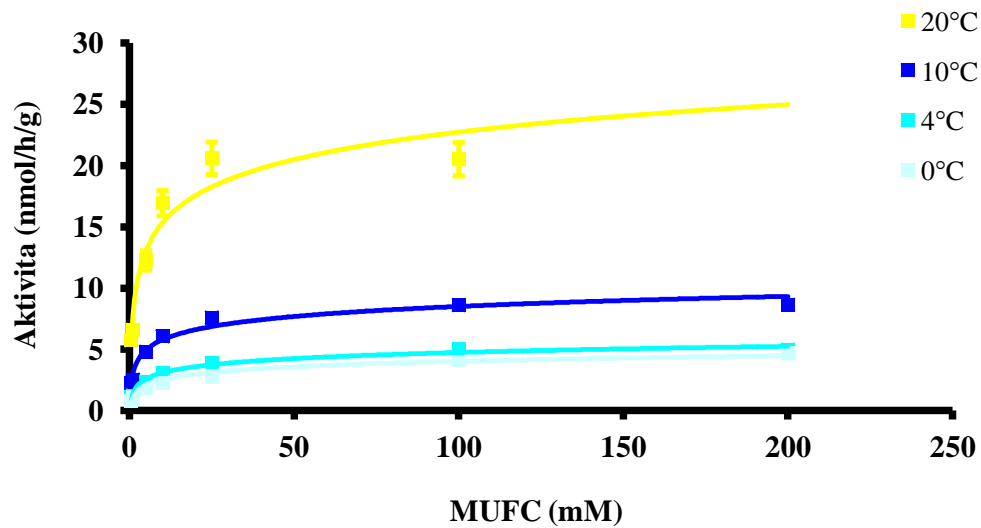


B) β -glukozidáza - kryoturbační horizont

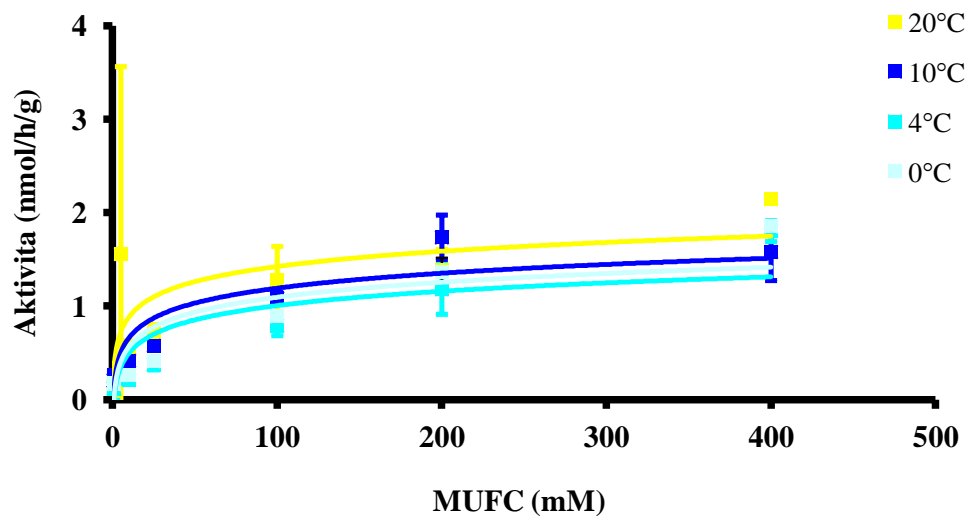


Příloha.4: Vynesení kinetiky β -glukozidázy (závislosti aktivity enzymu na dostupnosti substrátu) pro reálně dosažitelné teploty (0, 4, 10 a 20 °C) v organickém (A) a kryoturbačním (B) půdním horizontu ($n = 4$).

A) Celobiozidáza - organický horizont



B) Celobiozidáza - kryoturbační horizont



Příloha.5: Vynesení kinetiky celobiozidázy (závislosti aktivity enzymu na dostupnosti substrátu) pro reálně dosažitelné teploty (0, 4, 10 a 20 °C) v organickém (A) a kryoturbačním (B) půdním horizontu Tajmyru ($n = 4$).