

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2010

Ročník XIV, číslo 3/2010

Brno 2010

Obsah

1. **Návrh metodiky zacvičení experta pro detekci živočišných proteinů v krmivech mikroskopickou metodou se zaměřením na svalová vlákna a kostní fragmenty jako komponent kontaminace krmiv** 1

Michaela Růžková¹, Lubomír Růžek², Zora Linhová¹, Jaroslava Petrová¹
¹ Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha,
Za Opravnou 4, 150 06 Praha 5
² Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Česká zemědělská univerzita
v Praze

2. **Stanovení cukrů (glukoza, galaktoza, sacharoza, fruktoza, laktoza, maltoza) metodou iontové chromatografie** 16
Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

3. **Vybrané kapitoly z pedologie pro chemiky – 4 Půdní kyselost – a cidita** 27
Ivo Honsa
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Vaňurova 6, 460 01 Liberec

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Návrh metodiky zacvičení experta pro detekci živočišných proteinů v krmivech mikroskopickou metodou se zaměřením na svalová vlákna a kostní fragmenty jako komponent kontaminace krmiv

Michaela Růžková¹, Lubomír Růžek², Zora Linhová¹, Jaroslava Petrová¹

¹ Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL regionální oddělení Praha, Za Opravnou 4, Praha - Motol

² Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Česká zemědělská univerzita v Praze
michaela.ruzkova@ukzuz.cz

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro zjišťování složek živočišného původu definovaných jako výrobky ze zpracování těl a částí těl savců, drůbeže a ryb v krmivech a vychází z EN 152/2009, příloha VI.

Metoda je použitelná pro všechny obsahy (od 0,1 % kontaminace) živočišných tkání ve všech druzích krmiv. Touto metodou lze rozlišit přítomnost tkání suchozemských živočichů a tkání ryb. Podle druhu složek živočišného původu je možné v krmivech prokázat i velmi malá množství (< 0,1 %), která jsou i pod limitem detekce pro tuto metodu v Evropském Nařízení (EN) 152/2009, příloha VI.

Poznámky

- 1. Vzhledem k tomu, že se jedná o značně subjektivní metodu, jejíž výsledek závisí pouze na hodnocení experta, je pro spolehlivé zacvičení nového pracovníka nutné zvolit velmi zásadní osobnostní i vědomostní kritéria, která má splňovat. Budoucí expert má mít biologické vzdělání a zkušenosti v oblasti světelné mikroskopie. Má být cílevědomý, disciplinovaný, a to hlavně pro neustálou nutnost tréninků i po zacvičení (Fumiere a kol., 2009). Sebekázeň a pravidelná rutinní práce se světelným mikroskopem i po úspěšném zacvičení je důležitým předpokladem. Zacvičený expert se má věnovat náhledům referenčního materiálu laboratoře minimálně 2 × týdně, alespoň (3 – 4) h, (van Raamsdonk a kol., 2007). Pokud se tato zásada nedodrží, může pracovník již po měsíci začít ztrácet schopnost rozpoznávat komponenty živočišných proteinů. V následném přezkoušení nebo kruhovém testu laboratoř nemůže, vzhledem k subjektivitě hodnocení, uspět (Jörgensön 2008).*

2 Princip

K identifikaci se používá reprezentativní vzorek odebraný v souladu s ustanoveními směrnice Komise 76/371/EHS ze dne 1. března 1976, kterou se stanoví metody odběru vzorků. Složky živočišného původu se identifikují na základě charakteristických, mikroskopicky rozeznatelných znaků (tj. svalových vláken a jiných masitých částic, chrupavek, kostí, rohů, chlupů, štětín, krve, peří, vaječných skořápek, rybích kostí, šupin). Identifikace musí být provedena jak v prosévané frakci, tak v koncentrovaném sedimentu vzorku.

Pro usnadnění identifikace typu a původu tkání se využívají mikroskopická barviva a činidla.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak, voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Barviva pro detekci srsti a peří

- 1 Jod - jodid draselný (roztok jódu v jodidu draselném, rozředěný v 70% etanolu).
- 2 Cystinové činidlo (2 g octanu olovnatého, 10 g NaOH/100 ml H₂O).

Barviva pro detekci kostních fragmentů, šupin

- 3 Alizarinová červeň (200 mg ve 100 ml vody s 2,5 ml 1M HCl).

Optická činidla

- 4 Imersní olej pro mikroskopii (výrobce: Olympus a.s.).
- 5 Glycerol, 96%.

Bělicí činidla

- 6 Chlornan sodný, 9,6 % aktivního chloru.

Sedimentační činidla

- 7 Tetrachlorethylen, $\rho = 1,62 \text{ g/cm}^3$.

Proplachovací činidla

- 8 Aceton.
- 9 Etanol 96%, denaturovaný hexanem

Voda.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností na 0,001 g.
- 2 Třecí miska s tloučkem.
- 3 Sada sít s velikostí ok max. 0,5 mm.
- 4 Kuželová dělicí nálevka se zátkou a vypouštěcím kohoutem o objemu 500 ml.
- 5 Stereomikroskop, zvětšení až $100\times$ (např. Arsenal, s r.o.).
- 6 Světelný mikroskop, zvětšení $(100 - 1000)\times$ s polarizací (např. Olympus a.s.).
- 7 Třepačka.

5 Postup zkoušky - Stanovení živočišných tkání

5.1 Úprava vzorku

K posuzování vzorku je nutná úprava struktury vzorku mechanickým mletím – v třecí misce nebo pomocí mlýnku. Takto upravený vzorek se dále pomocí síta s oky o max. velikosti 0,5 mm rozdělí na 2 části – hrubší frakci A a jemnější frakci B.

Stanovení živočišných tkání ve vzorcích se provádí ve dvou etapách.

5.2 Posouzení frakcí rychlým náhledem

5.2.1 Posouzení frakce A pod stereomikroskopem

Pod stereomikroskopem se posuzuje nejprve neobarvená frakce A s hrubšími částicemi. V dalším kroku se materiál obarví cystinovým činidlem nebo jod-jodidem draselným. Barviva usnadňují detekci srsti a peří (barví se tmavohnědě až černě). Nalezené tkáně se přenesou pomocí pinzety na podložní sklíčko a přesně se identifikují pod světelným mikroskopem při minimálně 200násobném zvětšení.

5.2.2 Posouzení frakce B pod optickým mikroskopem

Frakce B se rozdělí na 2 části. První se použije k přímému posouzení pod světelným mikroskopem, druhá část (min. 5 g) se použije k sedimentaci.

První část frakce B – reprezentativní část – se přenese na podložní sklíčko s kapkou parafinového nebo glycerinového oleje a přímo se posuzuje pod světelným mikroskopem při nejméně 200násobném zvětšení (nativní preparát).

5.3 Sedimentace vzorku

5.3.1 Navážka vzorku na sedimentaci

Pro sedimentaci se na analytických vahách navažuje vzorek o hmotnosti nejméně 5 g (optimálně 10,00 g), s přesností na 0,01 g.

5.3.2 Sedimentace

Do uzavřené sedimentační nádoby se kvantitativně převede navážený vzorek, přidá se nejméně 50 ml tetrachlorethylenu (7), dobře se protřepe a nechá sedimentovat nejméně 3 min. Poté se sediment oddělí do čisté nádoby přepouštěcím kohoutem a následně usuší. Pro lepší a rychlejší sušení sedimentu je možné jej zachytit na předem zvážený filtrační papír a po následném usušení se získá hmotnost sedimentu rozdílem obou hmotností.

Z horní frakce sedimentační nádoby se opětovně odebere reprezentativní vzorek, usuší a posuzuje pod světelným mikroskopem při nejméně 200násobném zvětšení.

5.3.3 Sušení sedimentu

Sediment se suší v proudu vzduchu v digestoři do konstantní hmotnosti materiálu. Délka sušení závisí na hmotnosti sedimentu.

5.3.4 Vážení sedimentu

Po usušení se sediment zváží s přesností na 0,01 g. Po zvážení se sediment rozdělí na 2 části. Jedna se posoudí pod stereomikroskopem a světelným mikroskopem nejméně při 200násobném zvětšení, druhá část je určena pro barvení.

5.3.5 Barvení sedimentu

Usušený sediment se $2 \times$ propláchne v nejméně 5 ml etanolu (9) za použití třepačky. Po usazení (asi po 1 min) se opatrně slije a poté se na 10 min přidá několik ml (podle množství sedimentu) neředěného chlornanu sodného (6). Poté se ještě přidá asi 10 ml vody a nechá se sedimentovat (2 – 3) min. Voda se suspenzí se slije a opět se přidá 10 ml vody, protřepe se na třepačce, nechá se usadit a slije se. Tento postup se opakuje $2 \times$ až $3 \times$. Po posledním propláchnutí se přidá několik kapek alizarinové červeně (3) a nechá se působit několik s. Obarvený sediment se propláchne $2 \times$ asi 5 ml alkoholu (9) a následně $1 \times$ 5 ml acetonu (8). Proplachuje se pomocí třepačky. Poté se obarvený sediment usuší.

5.3.6 Posouzení sedimentu pod optickým mikroskopem

Obarvený sediment se posuzuje pod světelným mikroskopem nejméně při 200násobném zvětšení

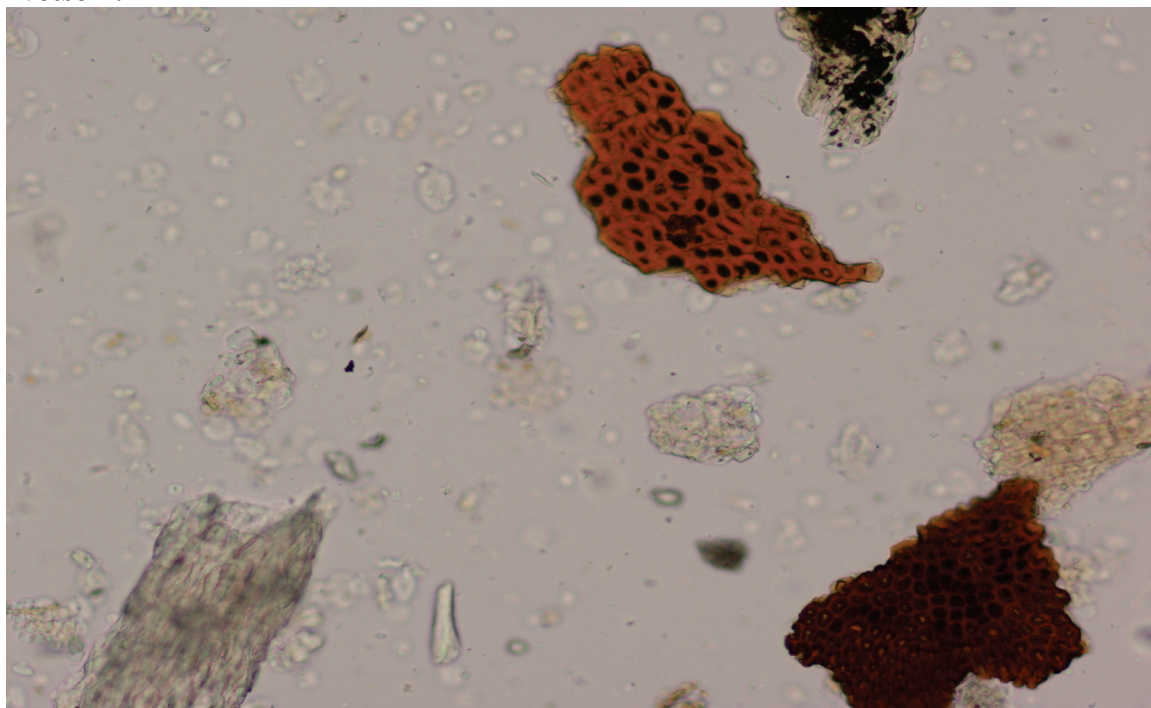
5.4 Vlastní určení kontaminace živočišnými proteiny pomocí mikroskopu a s využitím minimálně 200 násobného zvětšení

Fotografickou dokumentaci pořídila Ing. Michaela Růžková, Ph.D pro účely prezentací. Dokumentace byla shromážděna v letech 2009 a 2010 z referenčního materiálu pracoviště pro detekci živočišných proteinů ÚKZÚZ, NRL RO Praha.

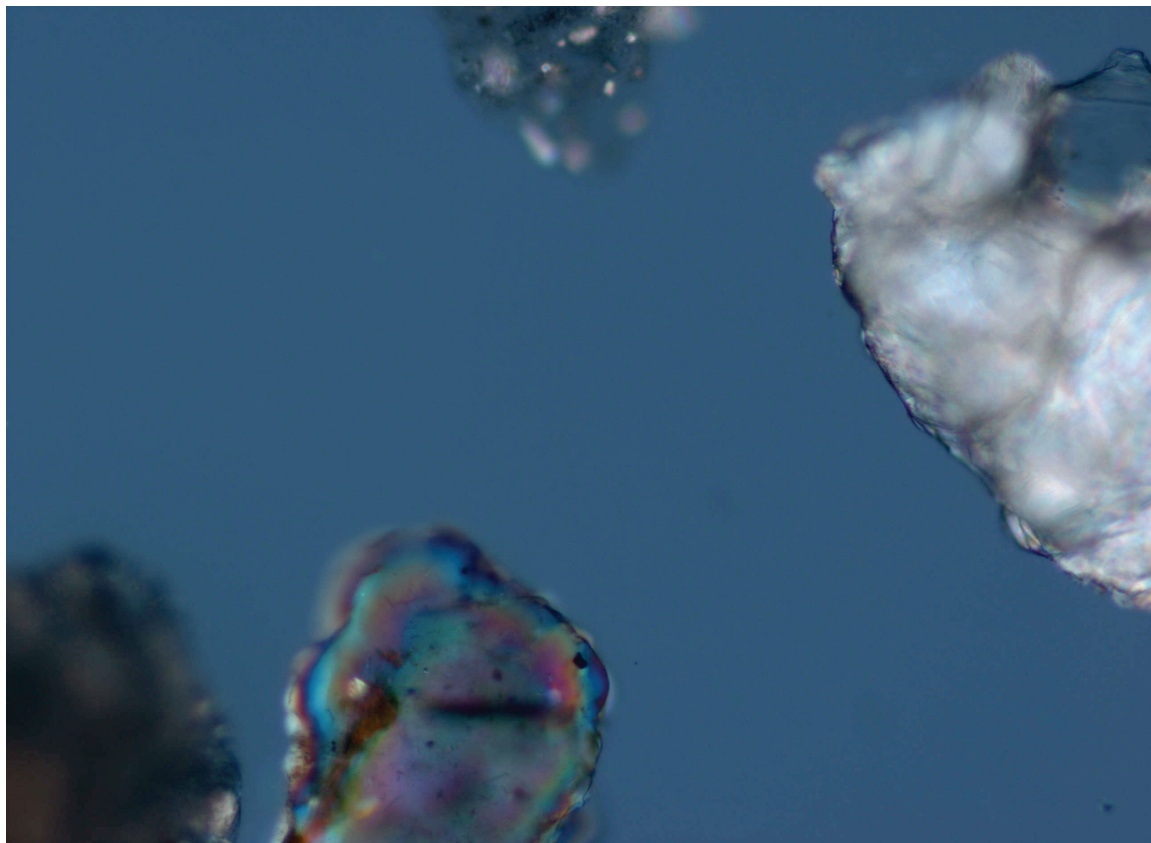
Nativní preparát

V nativním preparátu je možné nalézt jak komponenty z ryb, tak komponenty souhrnně nazývané „ze suchozemských živočichů“ (obr. 1 – 9). Základním principem přípravy nativního preparátu se získá přehled, zda se v krmivech, případně surovinách, pro které platí v současné době úplný zákaz přítomnosti živočišných proteinů, nevyskytují například svalová vlákna, peří, srst, kosti, vaječné skořápky, ale i krvinky a podobné komponenty. Vzhledem k nulové toleranci kontaminace se klade velký důraz na procvičování. Zaškolený pracovník musí bezpečně rozpoznat svalové vlákno v krmivu. Svalová vlákna jako taková jsou identifikovatelná již v malých koncentracích kontaminace krmiva. Zkušený pracovník je schopen rozeznat svalová vlákna ve vzorcích krmiv, kde se kontaminace živočišnými proteiny pohybuje kolem 1% (Fumiere a kol. 2009, Veys 2007).

Obr. 1. Nativní preparát bez kontaminace živočišnými proteiny při 200násobném zvětšení.



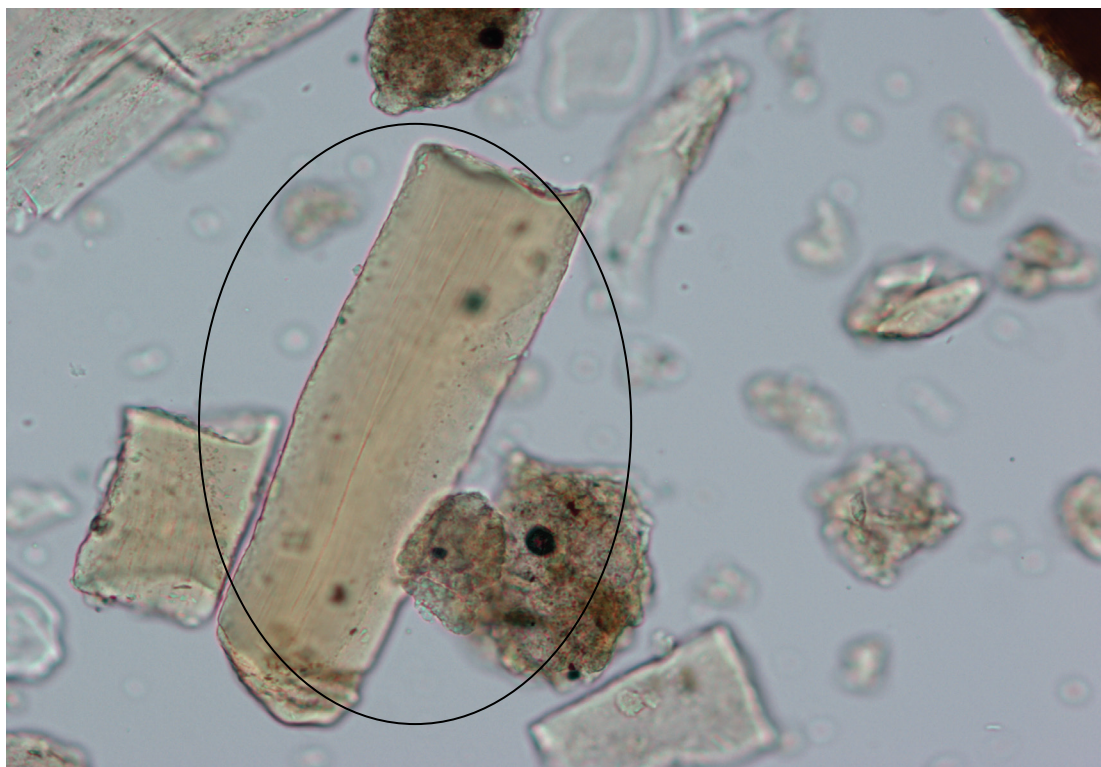
Obr. 2. Preparát bez kontaminace živočišnými proteiny polarizovaný při 200násobném zvětšení.



Svalová vlákna v nativním preparátu

Svalová vlákna jsou velmi dobře identifikovatelná (obr. 3 – 6). Proti okolním částčkám mají svalové snopce a snopečky velmi hladký povrch a při větších zvětšeních (400násobném a větším) jsou vidět i jednotlivá vlákna snopečků. Jsou prakticky nezaměnitelná a i málo zkušený pracovník je dokáže identifikovat již v prvních dnech tréninku. Při nálezů svalového vlákna však není možné určit, zda jde o sval pocházející z ryb nebo suchozemských živočichů (Jørgensen 2008).

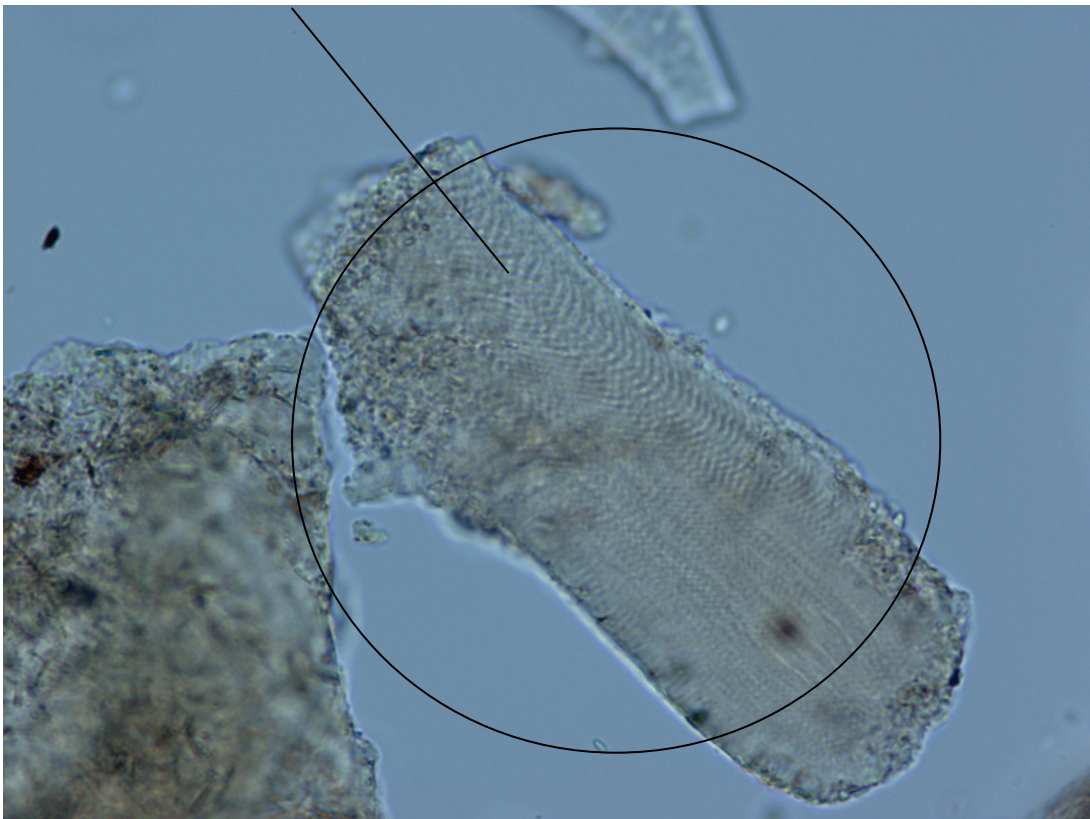
Obr. 3. Svalové vlákno hladké v nativním preparátu při 400 násobném zvětšení.



Obr. 4. Svalová vlákna hladká při 200 násobném zvětšení.



Obr. 5. Svalové vlákno příčně pruhované při 400násobném zvětšení.



Obr. 6. Svalové vlákno příčně pruhované při 200násobném zvětšení.



Kosti v nativním preparátu

Na rozdíl od svalových vláken jsou kosti v nativním preparátu (obr. 7 – 9) snadno zaměnitelné např. za minerály. Možnost zmýlit se při identifikaci kostí v nativním preparátu s minerály způsobuje jejich obdobná lámavost a tvarová podobnost. V tomto případě může pomoci polarizované světlo, které umožní kost spolehlivěji identifikovat (van Raamsdonk a kol. 2007, Veys 2008). V polarizovaném světle minerály světla opaleskují nebo se duhově zbarvují (obr. 2), kdežto živočišné fragmenty tmavnou a v zorném poli se až ztrácejí. Nicméně při nejistém nálezu je třeba vzorek sedimentovat a poté připravit preparát ze sedimentu. Sediment je možné také obarvit, což celkem spolehlivě usnadní rozpoznání kostních fragmentů (barví se červeně). U kostních úlomků lze poměrně jednoduše rozlišit kosti ryb od kostí suchozemských živočichů, a to pomocí lakun, které jsou u rybích kostí protáhlé a rozbíhají se vlásečnicovitě (2), kdežto u kostí suchozemských živočichů jsou lakuny kruhové nebo oválné (1) a podle jejich hustoty a umístění lze i určit, zda jde o kostní fragment ptačí nebo savčí.

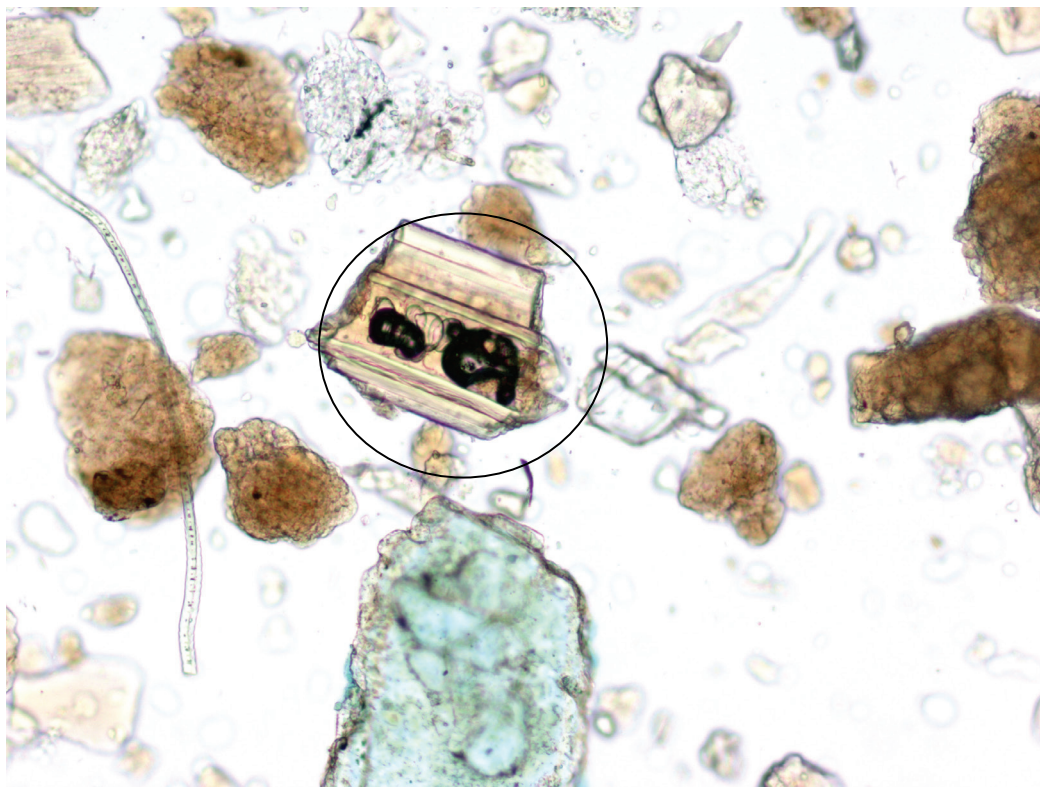
Obr. 7. Kostní fragment savčí v nativním preparátu při 400násobném zvětšení⁽¹⁾



Obr. 8. Kostní fragment savčí v nativním preparátu při 200násobném zvětšení.



Obr. 9. Kostní fragment ryby v nativním preparátu při 200násobném zvětšení.



Preparát ze sedimentu

Identifikace složek živočišného původu u krmiv v sedimentu je zjednodušená jak možností sediment obarvit alizarinovou červení, tak koncentrací těžké frakce, kde jsou přítomné kosti, chrupavky a šupiny, z neživočišných složek to bývají především minerály (Paradies-Severin 2008). Ze sedimentu je tedy možné poměrně jasně a přesně zjistit, o jakou konkrétní kontaminaci se jedná. Fragmenty kostí po obarvení alizarinovou červení jsou červené a jejich identifikace je tak usnadněna (obr. 10 až 14). Avšak jen značně zkušený pracovník může určit, zda se jedná o přítomnost savčích, drůbežích či rybích kostních fragmentů podle umístění a rozložení kostních lakun (Fumiere a kol. 2009). Kostní fragmenty je možné identifikovat u vzorků, ve kterých kontaminace živočišnými proteiny činí nejméně 0,1 % (Reaney 2008, von Holst a kol. 2006). Je to samotná mezní hodnota identifikovatelnosti pro popsanou metodu a je nutné, aby školitel velmi dbal na pečlivost a sebekázeň nového pracovníka. Zásadní je rozpoznání kostí suchozemských živočichů od rybích kostí a není možné, aby se budoucí expert v tomto ohledu mýlil.

Popis fotografií ze sedimentu

Lakuny u rybích kostních fragmentů jsou vlásečnicovitě rozvětvené a protáhlé (2), mohou mít také dutinku (obr. 9). Kostní fragmenty ptačí a savčí se liší množstvím lakun a jejich uspořádáním, jak je patrné na předchozích fotografiích (obr. 10 až 14). Ptačí kostní fragment v porovnání se savčím má větší počet drobnějších kruhovitých (1) lakun (Veys a Baeten 2007).

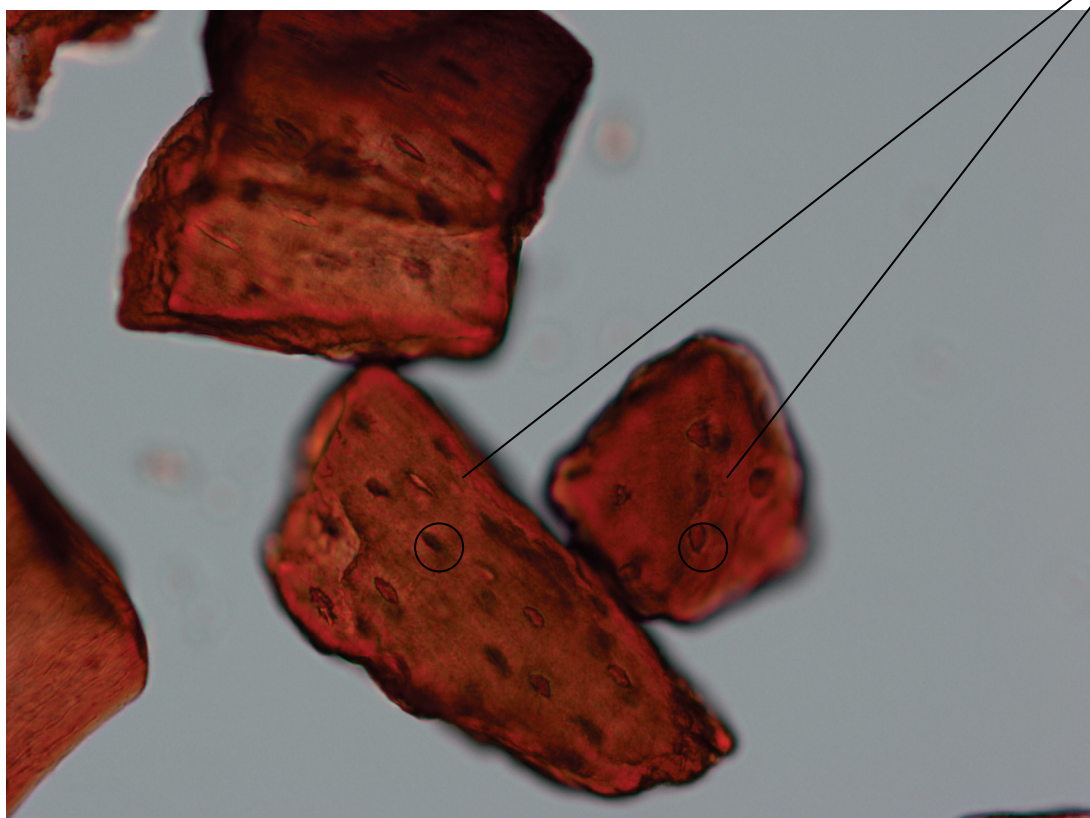
Obr. 10. Drůbeží (ptačí) kostní fragment v preparátu z obarveného sedimentu při 200násobném zvětšení.



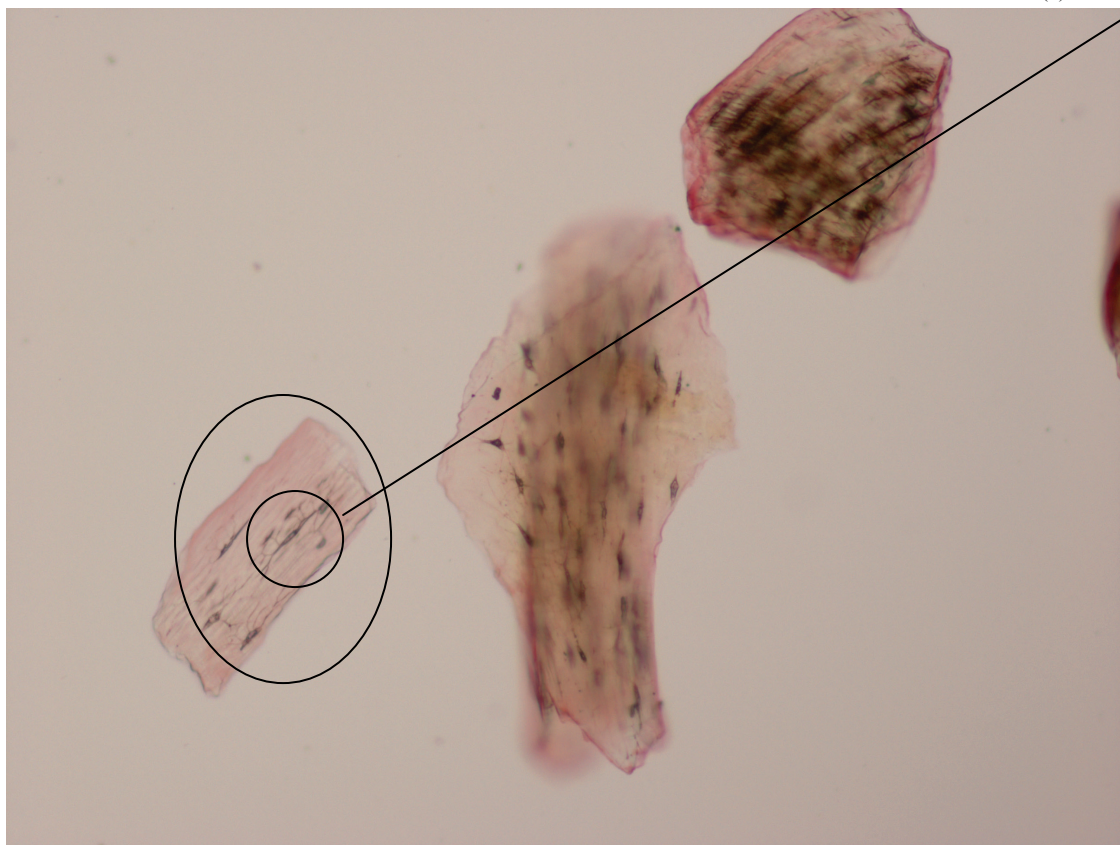
Obr. 11. Savčí kostní fragment v preparátu z obarveného sedimentu při 400násobném zvětšení



Obr. 12. Savčí kostní fragment v preparátu z obarveného sedimentu při 200násobném zvětšení



Obr. 13. Rybí kostní fragmenty v preparátu z obarveného sedimentu při 200násobném zvětšení (2)



Obr. 14. Rybí kostní fragment v preparátu z neobarveného sedimentu při 400násobném zvětšení (2)



6 Literatura

1. EN 152/2009 Příloha VI.
2. Fumiere O., Veys P., Boix A., von Holst C., Baeten V., Berben G. (2009): Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, (13) 59–70.
3. Jörgensen J. S. (2008): The analytical method for the determination of constituents of animal origin, for the official control of feeding stuffs. *Sborník SAFEED-PAP Workshop, Detection, Identification and Quantification of Processed Animal Proteins (PAPs) in Feedingstuffs*, Vilnius; 8–25.
4. Paradies-Severin I. (2008): International Association for Feedingstuff Analysis (IAG) – section Feedingstuff Microscopy. *Sborník SAFEED-PAP Workshop, Detection, Identification and Quantification of Processed Animal Proteins (PAPs) in Feedingstuffs*, Vilnius; 48–56.
5. Raney S. (2008): Identification of Animal Proteins by Alternative Techniques. *Sborník SAFEED-PAP Workshop, Detection, Identification and Quantification of Processed Animal Proteins (PAPs) in Feedingstuffs*, Vilnius; 36–47.
6. van Raamsdonk L.W.D., von Holst C., Baeten V., Berben G., Boix A., de Jong J. (2007): New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, (133) 63–83.
7. von Holst C., Boix A., Baeten V., Vancutsem J., Berben G. (2006): Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. *Food Additives and Contaminants*, (23) 252–264.
8. Veys P., Baeten V. (2007): CRL-AP Interlaboratory study 2007 Report, Workshop Gembloux; 26 s.
9. Veys P. (2007): CRL-AP Interlaboratory study 2007, Quantification Study, Workshop Gembloux; 15–19.
10. Veys P. (2008): Microscopy for detection of PAPs and Protocol for quantification. *Sborník SAFEED-PAP Workshop, Detection, Identification and Quantification of Processed Animal Proteins (PAPs) in Feedingstuffs*, Vilnius; 26–35.

Stanovení cukrů (glukoza, galaktoza, sacharoza, fruktoza, laktoza, maltoza) metodou iontové chromatografie

Eva Fojtlová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
eva.fojtlova@ukzuz.cz

1 Úvod

Postup stanovení obsahu cukrů ve vzorcích krmiv je obsažen v Nařízení č. 152/2009/ES. Podle uvedeného postupu se cukry stanoví titračně podle Luff-Schoorla po jejich extrakci 40% etanolem. Tímto způsobem lze stanovit buď přímo redukující cukry nebo směs přímo redukujících a neredukujících cukrů. Výpočtem lze potom určit obsah neredukujících cukrů. Nelze však rozlišit obsahy jednotlivých cukrů, ale vždy se jedná o stanovení jejich celkového obsahu.

Jednotlivé specifické cukry však lze stanovit metodou iontové chromatografie s použitím ampérometrické detekce.

2 Materiál a metody

Na stanovení jednotlivých druhů cukrů byla vyvinuta chromatografická metoda označovaná jako HPAE- PAD (high performance anion exchange - pulsed amperometric detection).

Jedná se o vysokoúčinnou iontovou chromatografii, kde se jako detektor používá pulzní ampérometrický detektor.

Cukry se převedou do aniontové formy v silně alkalickém prostředí (hodnota pK cukrů leží mezi 12 a 14) a potom se separují na silně bazickém aniontovém iontoměniči v hydroxidové formě. Jako eluční činidlo se obvykle používá NaOH v koncentracích od 0,001 mol/l do 0,150 mol/l.

Pulzní ampérometrický detektor umožňuje detekovat cukry bez požadavku derivatizace. Cukry se detekují měřením elektrického proudu, který se generuje jejich oxidací na povrchu

zlaté pracovní elektrody. Produkty této oxidační reakce ale znečišťují povrch elektrody, a proto musí být elektroda čištěna. Toho se dosáhne změnou potenciálu. Nejprve jeho zvyšováním až na hladinu dostatečnou k oxidaci povrchu zlaté elektrody, to způsobí desorpci produktů vzniklých oxidací cukrů. Potom se potenciál elektrody snižuje až na hodnotu, při které přecházejí oxidy na povrchu elektrody zpět na zlato. PAD pracuje tedy se třemi rychle se opakujícími potenciály. Proud z oxidace cukrů se měří při potenciálu E1. E2 je potenciál, který oxiduje zlatou elektrodu a čistí ji od produktů oxidace cukrů. Potenciál E3 redukuje oxidy zlata na povrchu elektrody zpět na zlato, a tak umožňuje detekci během příštího cyklu při E1. Tyto tři potenciály se mění v pravidelně se opakujících časových intervalech.

CEN/TC 327 v rámci pracovní skupiny řešila ověření a zavedení této metody do evropsky platných norem. Laboratoř se v rámci řešení této práce účastnila validační studie, ve které obdržela 12 vzorků krmiv, v nichž se měla stanovit galaktoza, glukóza, sacharoza, fruktoza, laktoza a maltoza.

3 Princip

Cukr se ze vzorku krmiva extrahuje vodou, extrakt se přechistí a naředí. Přítomné cukry se separují metodou iontové chromatografie a detekují se na ampérometrickém detektoru.

4 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak, voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

- 1 Acetonotril, CH_3CN .
- 2 Hydroxid sodný, NaOH , 50% (m/m) vodný roztok.
- 3 Octan sodný trihydrát, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.
- 4 Eluent 1 (E1), vodný roztok 500mmol/l hydroxidu sodného NaOH .

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 800 ml odplyněné demineralizované vody (6), přidá se 40,0 g 50% roztoku hydroxidu sodného (2), doplní vodou (6) po značku a promíchá.

- 5 Eluent 2 (E2), vodný roztok 500mmol/l octanu sodného.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 800 ml odplyněné demineralizované vody (6), přidá se 68,0 g octanu sodného trihydrátu (3), doplní se vodou (6) po značku a promíchá.
- 6 Eluent 3 (E3), odplyněná demineralizovaná voda.
Příprava: Demineralizovaná voda se filtruje přes membránový filtr 0,2 μm , odplyní se probubláváním helia po dobu minimálně 30 min.
- 7 Fruktóza, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- 8 Galaktoza, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- 9 Glukoza, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- 10 Laktoza monohydrát, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 11 Maltoza monohydrát, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 12 Sacharoza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 13 Dimethyl sulfoxid, (DMSO).
- 14 Methanol.
- 15 Zásobní kalibrační roztok cukrů, 400 mg/l.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 40 mg fruktozy, 40 mg galaktozy, 40 mg glukózy, 40 mg sacharozy, 42 mg laktozy, 42 mg maltozy a rozpustí se ve vodě (6). Roztok se připravuje denně čerstvý!
- 16 Pracovní kalibrační roztoky cukrů.
Příprava: Roztoky se připraví ředěním podle tabulky 1. Každý naředěný standard se dále ředí tak, že do vialky se napipetuje 0,25 ml standardního roztoku a 1,25 ml DMSO (13), vialka se uzavře a promíchá.

Tabulka 1. Ředění pracovních kalibračních roztoků.

Kalibrační roztok	Objem zásobního kalibračního roztoku (ml)	Objem vody (ml)	Koncentrace cukrů po naředění s DMSO (µg/ml)
Standard 1	0,00	10,0	0
Standard 2	0,10	9,90	0,67
Standard 3	0,30	9,70	2,00
Standard 4	0,70	9,30	4,67
Standard 5	1,40	8,60	9,33
Standard 6	2,00	8,00	13,33

5 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 2 Laboratorní odstředivka.
- 3 Ultraturax.
- 4 Iontový chromatograf, např. ICS 3000 Dionex s ampérometrickým detektorem a zlatou pracovní elektrodou.
- 5 Kolona, např. CarboPac PA10 (4 × 250) mm, předkolona, např. Aminotrap (4 × 50) mm.
- 6 Zařízení na přípravu vysoce čisté demineralizované vody, např. Milipore.
- 7 SPE kolonky, např. Waters Sep-Pak Plus C18.
- 8 Automatické pipety.

6 Postup

6.1 Extrakce

Do 100ml kádinky se naváží 600 mg vzorku s přesností 0,1 mg, přidá se 20 ml demineralizované vody, homogenizuje se pomocí ultraturaxu minimálně po dobu 1 min. Kvantitativně se převede do 100ml odměrné baňky, doplní demineralizovanou vodou po značku a promíchá. Alikvotní podíl se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 10 min při 2800 g. Extrakt je nutno dále čistit. Použije se k tomu postup 6.2 nebo 6.3.

6.2 Čištění extraktu pomocí SPE C18

SPE kolonky se připraví a aktivují podle pokynů výrobce.

2 ml čirého odstředěného extraktu (připraveného podle 6.1) se naředí s 2,5 ml demineralizované vody. Naředěný roztok se převede přes aktivovanou SPE C18. První 3 ml eluátu se odstraní, zbytek se zachytí do vhodné nádoby (např vialky). Ve vialce se naředí 0,25 ml vyčištěného vzorku s 1,25 ml DMSO (13), vialka se uzavře a promíchá.

6.3 Čištění extraktu pomocí acetonitrilu

Do 10ml uzavíratelné centrifugační zkumavky se vloží 2 ml čirého odstředěného extraktu (připraveného podle 6.1) a 2,5 ml acetonitrilu (1). Zkumavka se uzavře a dobře promíchá. Nechá se stát přes noc při laboratorní teplotě. Potom se odstředí po dobu 10 min při 2800 g.

Ve vialce se naředí 0,25 ml vyčištěného vzorku s 1,25 ml DMSO (13), vialka se uzavře a promíchá.

6.4 Analýza

Podmínky stanovení (viz. tab. 2 a 3) jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 2. Doporučené podmínky stanovení.

Kolona	Carbopac PA10 (4 × 250) mm nebo obdobná
Předkolona	Amino trap (4 × 50) mm nebo obdobná
Teplota kolony	30 °C
Detekce	Pulzní ampérometrie, zlatá pracovní elektroda Waveform- carbohydrates standard
Objem nástřiku	10 µl
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Eluent	E1– NaOH 500 mmol/l (4)
	E 2 – CH ₃ COONa.3 H ₂ O 500 mmol/l (5)
	E3 – H ₂ O (6)

Tabulka 3. Program gradientové eluce.

Čas (min)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)
0	4	0	96
13	4	0	96
18,4	27	0	73
19	30	2	68
30	30	38	32
31	30	60	10
43	30	60	10
44	30	0	70
54	4	0	96
70	4	0	96

Po ustálení systému se provede nejprve série nástřiků pracovních kalibračních roztoků, které byly připraveny podle bodů (4-15) a (4-16). Potom se za stejných podmínek analyzují extrakty vzorků.

7 Výpočet a vyjadřování výsledků

Při měření a vyhodnocování se používá metoda externí kalibrace.

Z výsledků měření kalibračních roztoků se pomocí softwaru přístroje vypočítá kalibrační křivka pro jednotlivé cukry a s její pomocí se potom kvantifikují neznámé vzorky.

Obsah jednotlivých cukrů X vyjádřený v g/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = (D \times c) / m$$

kde

D ředící faktor,

c koncentrace jednotlivých cukrů odečtená z kalibračního grafu (mg/l),

m hmotnost zkušební vzorku (g).

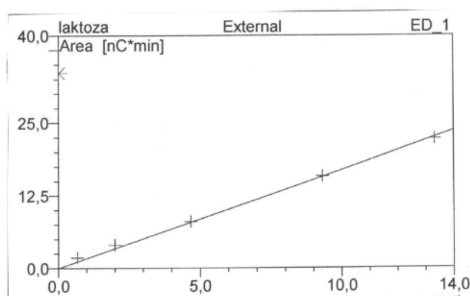
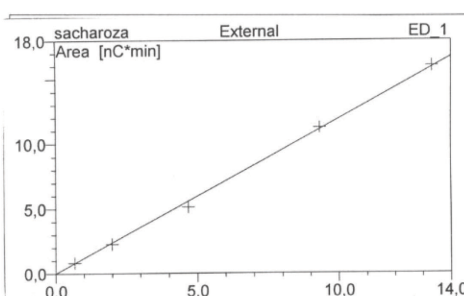
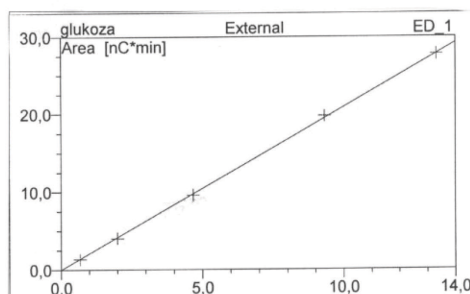
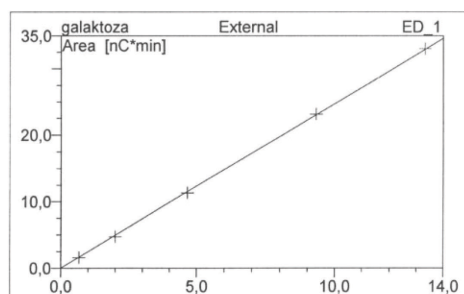
8 Diskuse a výsledky

V práci bylo analyzováno 12 vzorků, které laboratoř obdržela k účasti ve validační studii. Vzorky byly již připraveny k analýze, tedy se neupravovaly. Byly označeny níže uvedenými čísly, žádné další informace o vzorcích nebyly poskytnuty. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Výsledky měření.

Vzorek	Obsah cukru (g/kg)					
	Galaktoza	Glukoza	Fruktoza	Sacharoza	Laktoza	Maltoza
1064	< 0,1	1,168	0,586	8,353	< 0,1	0,602
1150	< 0,1	0,648	< 0,1	44,612	< 0,1	2,054
1259	< 0,1	1,564	0,777	13,015	< 0,1	5,878
1317	< 0,1	5,313	2,848	17,730	12,939	9,167
1363	< 0,1	5,182	5,259	28,314	< 0,1	5,435
1419	< 0,1	0,803	0,673	46,165	< 0,1	1,936
1441	3,302	1,618	< 0,1	< 0,1	374,612	2,322
1587	< 0,1	5,183	6,069	30,778	< 0,1	6,355
1853	3,303	1,509	< 0,1	< 0,1	296,647	1,848
1862	< 0,1	0,876	0,545	6,816	< 0,1	1,536
1883	< 0,1	8,105	3,753	19,408	14,108	14,762
1998	< 0,1	2,231	0,823	11,770	3,159	6,345

Sample Name:	standard 6	Injection Volume:	10,0
Vial Number:	6	Channel:	ED_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	n.a.
Control Program:	cukry_GP_original	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	default	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	11.1.2007 7:03	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	70,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	1,85	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	2,62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	4,60	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	10,13	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	12,40	galaktoza	Lin	5	99,9823	0,0000	2,4722	0,0000
6	13,22	glukoza	Lin	5	99,9716	0,0000	2,0848	0,0000
7	15,93	fruktoza	Lin	5	99,5836	0,0000	1,0962	0,0000
8	17,63	sacharoza	Lin	5	99,8567	0,0000	1,1933	0,0000
9	20,67	laktoza	Lin	5	99,6681	0,0000	1,6845	0,0000
10	25,15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
11	25,30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
12	25,57	maltoza	Lin	4	99,7414	0,0000	0,9537	0,0000
13	27,63	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
14	33,23	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
15	33,52	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
16	61,93	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

default/Calibration(Batch)

Chromeleon (c) Dionex 1996-2001
Version 6.70 SP9 Build 1971

Obr.1. Příklady kalibračních přímk.

Z vyhodnocení validační studie, které organizátoři zaslali laboratoři, vyplývá, že se jednalo o krmivo pro psy, krmivo pro prasata, krmivo pro skot, krmivo pro nosnice, sojové expelery a sušené mléko.

V tabulkách 5 až 10 jsou uvedeny výsledky tak, jak byly vyhodnoceny v rámci celé validační studie.

Tabulka 5. Krmivo pro psy.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	< 0,1		
Glukoza	0,9	41,8	41,8
Fruktoza	0,8	7,5	64,6
Sacharoza	11,4	7,6	25,2
Laktoza	< 0,1		
Maltoza	0,9	37,7	65,0

Tabulka 6. Krmivo pro prasata.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	0,48	4,0	55,1
Glukoza	5,8	15,6	21,4
Fruktoza	5,3	9,4	28,7
Sacharoza	22,4	6,9	11,5
Laktoza	15,1	4,8	12,3
Maltoza	15,9	5,4	15,6

Tabulka 7. Krmivo pro skot.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	< 0,1		
Glukoza	4,7	6,6	11,7
Fruktoza	7,1	5,5	15,5
Sacharoza	36,0	4,9	17,6
Laktoza	0,1	163,0	193,4
Maltoza	7,0	17,1	30,1

Tabulka 8. Krmivo pro nosnice.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	< 0,1		
Glukoza	1,7	12,5	26,4
Fruktoza	1,3	6,1	51,5
Sacharoza	16,4	5,3	23,0
Laktoza	< 0,1		
Maltoza	6,1	13,0	23,9

Tabulka 9. Sojové expelery.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	< 0,1		
Glukoza	0,7	13,9	59,4
Fruktoza	0,6	37,3	116,2
Sacharoza	55,0	1,7	18,1
Laktoza	< 0,1		
Maltoza	1,2	6,2	98,0

Tabulka 10. Sušené mléko.

	Obsah (g/kg)	Opakovatelnost (%)	Reprodukovatelnost (%)
Galaktoza	4,3	3,8	22,5
Glukoza	1,3	20,8	30,2
Fruktoza	< 0,1		
Sacharoza	0,1	63,4	161,3
Laktoza	415,3	1,2	12,7
Maltoza	3,6	5,2	46,9

9 Závěr

Z hodnocení výsledků stanovení pro validační studii vyplývá, že výsledky laboratoře byly přijaty a spolu s výsledky dalších pěti laboratoří byly vyhodnoceny. Výsledkem bylo vydání výše uvedeného postupu jako technické normy CEN/TS 15754.

10 Literatura

1. Joachim Weiss Handbook of Ion Chromatography, 2004.
2. Pracovní materiál TC 327 WI 00327035, Animal feeding stuffs – Determination of sugar content – HPAEC-PAD, 2007.
3. Kommer Brunt Vyhodnocení validační studie TC 327 WI 00327035, 2008.

Vybrané kapitoly z pedologie pro chemiky

Ivo Honsa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Vaňurova 6, 460 01 Liberec

4 Půdní kyselost - acidita

Půdní kyselost či acidita, nebo také reakce vyjádřená hodnotou pH, má v souboru fyzikálně-chemických charakteristik mimořádné postavení. Většina druhů rostlin totiž optimálně prospívá v určitém, někdy poměrně úzkém rozpětí hodnot pH. Tato veličina je tedy faktor, jehož hodnota - za jinak stejných stanovištních podmínek - rozhoduje o druhovém složení rostlinného půdního pokryvu a půdních mikroorganismů. U kulturních rostlin pak, ať již přímo či nepřímo, např. působením na přijatelnost živin, stopových prvků, ale i rizikových látek, ovlivňuje výnos příslušných plodin a jejich kvalitu. Hodnota pH rovněž spolupůsobí na stav půdních koloidů a tím též ovlivňuje strukturu půdy, na níž následně závisí hospodaření se vzduchem a vodou v profilu.

4.1 Podstata kyselosti půd

Příčinou půdní acidity je přítomnost disociabilního vodíku a vyměnitelných Al-iontů. V prvním případě přecházejí H-ionty do půdního roztoku disociací, v druhém případě pak hydrolýzou a roztok se tím okyseluje. Jak známo, ve vodném roztoku a tedy i v půdním nejsou vodíkové ionty přítomny jako protony, ale v hydratované formě např. jako H_3O^+ - hydroniové ionty. Kvůli jednoduchosti se hydratované vodíkové ionty obvykle označují jako H-ionty a v rovnicích se většinou vyjadřují jako H^+ .

4.1.1 Disociace kyselých funkčních skupin

Disociabilní vodík je vázán na skupinách s variabilním, tedy na hodnotě pH závislým nábojem, které se též nazývají kyselé skupiny. Na organických molekulách jsou to karboxylové (COOH)-skupiny a fenolické, enolické a podle možnosti i jiné alkoholické OH-skupiny a dále aminoskupiny. Na povrchu jílových minerálů a oxidů mohou vodíkové ionty

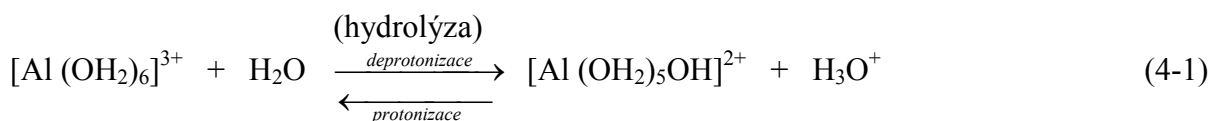
disociovat ze skupin (Al, Fe)OH⁻ a (Al, Fe) OH₂⁻ (odst. 3.2.2.3 a .4). Patří sem i Al-hydroxopolyмеры, např. z mezivrstevních prostorů sekundárních chloritů. Kromě toho mohou být vodíkové ionty vázány i na permanentních nábojích jílových minerálů.

Kvantum H-iontů disociovaných z těchto kyselých skupin se zvětšuje s rostoucí hodnotou pH půdního roztoku. Při stejné hodnotě pH je tím větší, čím větší je kyselost skupiny. Kyselost či síla kyseliny se obvykle udává jako $-\log$ disociačních konstant kyseliny K_A (pK_A). Např. hodnota pK_A 4,7 znamená, že kyselina resp. kyselá skupina je při $pH = 4,7$ disociována z 50 %, tj. že koncentrace nedisociované kyseliny HA je stejná jako koncentrace disociované A^- ($[HA] = [A^-]$). Hodnoty pK_A huminových látek silně kolísají a pro COOH-skupiny dosahují až do silně kyselé oblasti (pK_A cca 3 – 8). Také H-ionty vázané na permanentních nábojích jílových minerálů reagují kvůli slabé vazbě silně kyselé. Proto se poměrně rychle s jílovými minerály přeměňují (silikátové tlumení) a vyskytují se tak jen velmi krátkodobě, pokud vůbec. Oproti tomu jsou fenolické OH-skupiny a skupiny Al-OH- a Si-OH- jílových minerálů slabě až velmi slabě kyselé ($pK_A > 6$).

4.1.2 Hydrolýza iontů Al^{3+} a Fe^{3+}

Druhým zdrojem disociabilních vodíkových iontů jsou vyměnitelné Al-ionty, které mohou být do půdního roztoku převedeny kationtovou výměnou.

Iont Al^{3+} je ve vodném půdním roztoku (ale také již ve vyměnitelném stavu) obklopen 6 molekulami H_2O (hydratován), jejichž kyslík je velmi malým a vysoko nabitým Al tak silně polarizován, že vodíkové ionty hydrolytický disociují a náboj Al-iontu příčinně klesá



Al-kationt reaguje tedy kyselé a označuje se tedy jako kationtová kyselina. Jeho kyselost je středně silná ($pK_A = 4,76$). Jako $[Al(OH_2)_6]^{3+}$ je Al zcela protonizovaný a s rostoucí hodnotou pH je stále více deprotonizován (viz též rovnice 4-20).

Podle toho se Al-ionty v měřitelném množství v půdním roztoku vyskytují teprve při hodnotě pH pod 5,0 (obr. 4-1). Hliník je tedy při $pH < 5,0$ přítomen převážně jako iont $[Al(OH_2)_6]^{3+}$, zatímco deprotonizované (hydrolyzované) formy Al nad uvedeným pH polymerizují jako Al-hydroxid, který se vysráží. Z obr. 4-3 vyplývá, že přírůstek Al s klesající hodnotou pH

je v souladu s přírůstkem podílu Al na kationtovém obsazení (Al-sycení) půdy. Rovněž výměnný Al je stejně jako v roztoku převážně trojmocný, tj. zcela protonizovaný. Koncentrace Al v půdním roztoku roste, jestliže se půdě přidají nepufřující soli (chloridy, sírany, dusičnany), protože se tím Al-ionty vymění.

Podobně jako Al-ionty reagují i Fe³⁺-ionty. Jejich kyselost je však přibližně o 3 řády vyšší ($pK_A = 2,2$). V půdním roztoku se proto vyskytují až v silně kyselé oblasti. Rovnovážná koncentrace Fe³⁺ v přítomnosti relativně snadno rozpustného ferrihydritu (produkt rozpustnosti $\approx 10^{-39}$, převážně amorfni Fe₂O₃.xH₂O) při pH = 3 je teprve 1 μmol/l. Oproti tomu lze zejména v horizontech bohatých humusem a v kyselém prostředí zjistit měřitelné koncentrace iontů Fe²⁺ Mn²⁺, které však nehydrolyzují (pK_A 9,5 resp. 10,6), a proto nepřispívají k aciditě.

4.2 Zdroje H⁺-iontů

H-ionty do půdy vstupují nebo v ní vznikají následujícími způsoby:

4.2.1 Tvorba kyseliny uhličitě a organických kyselin při mikrobiologické oxidaci biomasy a při kořenovém dýchání

Vznikající CO₂ reaguje při pH nad 5 až 5,5 s půdní vodou na kyselinu uhličitou. Rozpustnost CO₂ a tím i koncentrace kyseliny uhličitě ve vodě stoupá s jeho rostoucím parciálním tlakem a stejně jako její disociace klesá s poklesem pH. Parciální tlak CO₂ v půdním vzduchu oživených půdních prostor je nejčastěji (0,2 – 0,7) kPa. Oproti tomu lze množství CO₂ z dešťové vody prakticky zanedbat, protože jeho parciální tlak v atmosféře je pouze 0,032 kPa (= 0,032 obj. %). Množství takto vzniklého CO₂ obnáší ročně cca 10 kmol/ha. Protože CO₂ vytváří kyselinu uhličitou jen při pH vyšším než cca 5, jsou její H-ionty podstatně významnější pro okyselování a vymývání kationtů z většiny zemědělsky využívaných půd než u často kyselých lesních půd.

Při odbourávání biomasy mohou jako meziprodukty vznikat jednoduché organické kyseliny, jako citronová, šťavelová aj. To, zda tyto kyseliny snižují nebo zvyšují hodnotu pH, závisí na jejich kyselosti (síle) a vztahu k hodnotě pH půdy. Je-li hodnota pH vyšší než pK_A kyseliny, hodnota pH půdy poklesne, je-li nižší, pak stoupne. Ve slabě kyselých půdách však nízkomolekulární kyseliny pravděpodobně nemají významnou úlohu při jejich okyselování, protože jsou velmi rychle mikrobiologicky odbourávány. Při odbourávání organických látek obsahujících N a S se tyto uvolňují (např. $R-NH_2 + H_2O \rightarrow R-OH + NH_3$) a jejich oxidací

vznikají silné kyseliny HNO_3 a H_2SO_4 . V organických látkách obsahujících fosfor je tento vázán jako ortofosforečnan, tedy již v oxidované formě, takže při jejich odbourávání již žádná kyselina nevzniká. Organické kyseliny (fulvokyseliny, huminové kyseliny, kap. 2) též vznikají při syntéze huminových látek.

4.2.2 Výdej H-iontů kořeny rostlin při příjmu kationtů

Za přijaté kationty kovů vyloučí kořeny ekvivalentní množství H-iontů, za přijaté anionty ekvivalentní množství OH^- nebo HCO_3^- iontů. Je-li tedy přijaté množství kationtů a aniontů stejné, hodnota pH se nezmění, protože H-ionty reagují s OH^- popř. HCO_3^- ionty na H_2O resp. $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Jestliže se však přijme více kationtů než aniontů (např. při převážné výživě NH_4^+), vytváří se množství H-iontů odpovídající nadbytku kationtů, které mohou okyselovat půdu. Rostlina však, kvůli elektroneutralitě, kompenzuje nadbytek kationtů interní tvorbou aniontů slabých organických kyselin. Protože tyto anionty mohou vázat H-ionty ($\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COOH}$) a v přírodních systémech se opadem vrací do půdy, je i nyní bilance H-iontů vyrovnaná. Teprve když biomasa opouští půdu formou sklizně, vzniká nedostatek bází, kterému odpovídá ekvivalentní přebytek kyseliny v půdě. K tomu ještě přistupuje, že příjem kationtů a přísun bází mohou být v půdě prostorově a časově odděleny, čímž vznikají zřetelné difference hodnot pH v čase a prostoru.

Roční množství H-iontů, vznikající větším příjmem kationtů oproti aniontům se odhaduje na cca (1 – 10) kmol/ha.

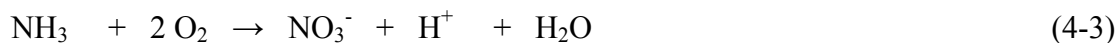
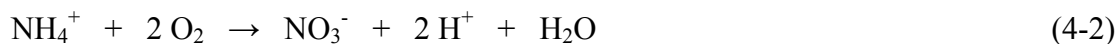
4.2.3 Příspěvek kyselých srážek

Průměrné hodnoty pH srážkových vod za rok jsou např. v SRN 4,3. Obsahují především kyselinu sírovou a dusičnou. Ve střední Evropě představuje roční příspěvek H-iontů v závislosti na místě a vegetačním pokryvu (0,8 – 7) kmol/ha. Zvláště vysoké přínosy se zjišťují pod smrky, protože uvedené kyseliny zvláště účinně zachycují (intercepce).

Zvýšeným atmosférickým přínosem kyselin poklesla v posledních třech až šesti desetiletích hodnota pH mnohých lesních půd severní a střední Evropy až o jednotku (pH). V rozpětí let 1883 – 1983 klesla na jistém přirozeném britském stanovišti hodnota pH z 7,1 v celém profilu na 4,2 v hloubce (0 – 23) cm, na 4,7 v hloubce (23 – 46) cm a na 5,8 v hloubce (46 – 69) cm.

4.2.4 Oxidace NH_4^+ a NH_3 z hnojiv a atmosféry

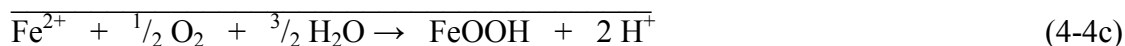
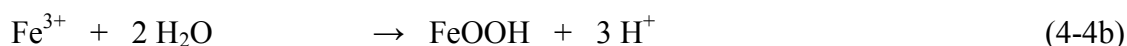
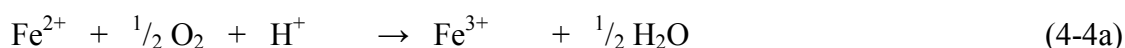
Tato oxidace probíhá mikrobiologicky. Probíhají při tom následující reakce



Je-li ion NO_3^- vymyt, přispívá H-ion k aciditě půdy. Je-li NO_3^- naopak přijat rostlinou, je za to kvůli elektroneutralitě odevzdána báze (OH^- , HCO_3^-) a vzniklý H-ion se neutralizuje. V protonové bilanci celého půdního profilu se proto neobjevuje. Oxidace NH_3 tak nezpůsobuje okyselení. Při oxidaci NH_4^+ oproti tomu vzniká dvojnásobné množství H-iontů, z nichž může být pouze polovina neutralizována příjmem NO_3^- -iontů. NH_4^+ -hnojiva proto okyselují půdu, pokud se H-ionty neneutralizují jiným způsobem. Roční příspěvek H-iontů ve střední a západní Evropě, podmíněný přísunem N, je cca (1 – 3) kmol/ha, avšak v oblastech s velkou produkcí kejdy může vzrůst až na 7 kmol/ha.

4.2.5 Oxidace rozpustných iontů Fe^{2+} a Mn^{2+} a Fe-sulfidů

Jak vyjadřuje rovnice (4-4a), při oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} se spotřebují H-ionty. Protože však iont Fe^{3+} v rozpětí hodnot pH půdy tj. > 3 není stálý, ale ihned hydrolyzuje (rovnice 4-4b), vznikají při sumární reakci oxidace (4-4c) H-ionty.



Podobné platí pro ionty Mn^{2+} , které se oxidací a hydrolyzou mění na MnO_2 .

Sulfidy Fe se vyskytují jako FeS_2 (pyrit) a FeS . Oxidují-li se jak Fe^{II} , tak sulfid, vznikají při oxidaci FeS_2 4 H-ionty (rovnice 4-5) a FeS 2 H-ionty (rovnice 4-6).



Přijdou-li tedy půdy obsahující sulfidy železa do styku se vzdušným kyslíkem, silně se okyselí („acid sulphate soils“). Totéž platí pro odklizové hmoty obsahující pyrit („otrava hald“), které se musejí chránit před přístupem vzduchu zakrytím.

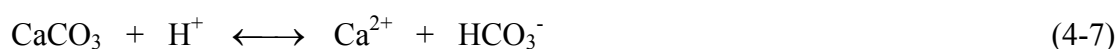
4.3 Tlumivé (pufrující) látky a reakce

Protože v humidních klimatech je množství H-iontů, které se v půdách během jejich vývoje vytvoří, větší, než to, které je půda schopná neutralizovat, dochází k pozvolnému poklesu jejich hodnoty pH a tedy k jejich okyselování (acidifikaci). Rychlost okyselování kromě nátlaku H-iontů závisí především na odolnosti půdy proti změně reakce, kterou lze kvantitativně vyjádřit jako „kyselou neutralizační kapacitu“ (KNK, odst. 4.4). Odolnost proti okyselení spočívá v řadě chemických reakcí, při nichž H-ionty reverzibilně nebo ireverzibilně přecházejí do nedisociované formy, jsou tlumeny či pufrvány. Toto tlumení způsobují rozpuštěné nebo tuhé látky, zvané tlumiče nebo pufrы, na nichž probíhají tlumicí reakce (tlumivé systémy). Hodnoty KNK a pH se tedy nemění se stejnou frekvencí: při stejném nátlaku H-iontů klesá hodnota pH tím pomaleji, čím je půda lépe pufrována. O to víc však ubývá hodnota KNK.

Tlumivé systémy půd jsou velmi různorodé co do druhu, množství a reakční rychlosti. Jejich tlumicí schopnost je možné charakterizovat kyselostí jejich protonizovaných kyselých funkčních skupin (hodnota pK_A). Ta určuje, v které oblasti hodnot pH půdy probíhají určité tlumicí reakce: čím je protonizovaná skupina slaběji kyselá, tj. čím je proton pevněji vázán, tím při vyšší hodnotě pH systém působí. B. Ulrich (l.c.) proto těmto reakcím přiřazuje určité oblasti hodnot pH, ve kterých tlumivě působí (pufrační oblasti) a kterým navíc přisuzuje specifické ekologické funkce.

4.3.1 Tlumení uhličitany

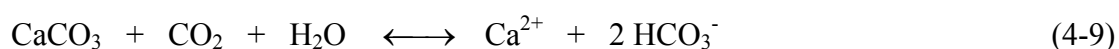
V půdě obsahující uhličitany jsou H-ionty pufrvány podle reakce



H-ionty tedy reagují s CO_3^{2-} -aniontem uhličitanu za tvorby HCO_3^- (hydrogenuhličitanového aniontu). Pro častý případ, kdy H-ionty pocházejí z kyseliny uhličitě

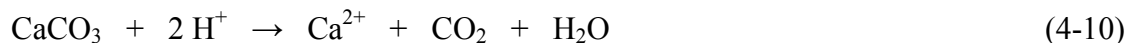


zní zjednodušená reakce



Hodnota pH, která se v půdě ustálí po dobu existence CaCO_3 (kalcitu) je tedy určována konstantní rozpustností kalcitu a parciálním tlakem CO_2 (odst. 4.5.2).

Vápní-li se silněji kyselá půda, jak se to např. v současné době děje u kyselých lesnických využívaných půd, reaguje CaCO_3 až na CO_2 ; jsou tedy tlumeny dvěma moly H -iontů jedním molem CaCO_3 .



Při tom se protonizuje i aniont HCO_3^-

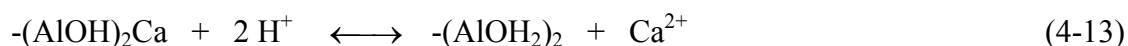
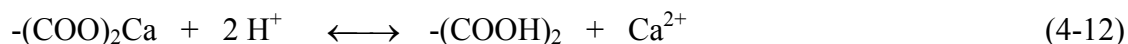


Tato reakce podle parciálního tlaku CO_2 proběhne asi při hodnotě pH 5 zcela vpravo, a to ireverzibilně, protože plynný CO_2 unikne. Pod hodnotou pH 5 je tedy koncentrace HCO_3^- jen velmi malá.

Protože hodnota pH v půdách obsahujících CaCO_3 většinou neklesá pod cca 7 (viz rovnice 4-21) dokud není veškerý CaCO_3 rozpuštěn, musíme vyvodit, že rychlost reakce CaCO_3 s H -ionty postačuje k neutralizaci jejich celkového nátlaku; většinou se dosáhne rovnováhy. Teprve když zbývají pouze hrubší zbytky vápence, může být hodnota pH nižší, než odpovídá rovnováze, protože reakční plocha je velmi malá a uhličitán je nepravidelně rozptýlený.

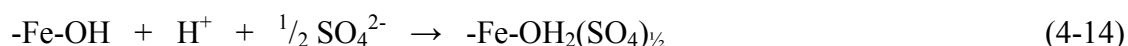
4.3.2 Tlumení na variabilních nábojích

Toto tlumení v prvním kroku spočívá v protonizaci slabě kyselých výměnných míst obsazených kationty na variabilních nábojích (závislých na pH) huminových látek (COOH -skupiny) a na anorganických měničích (jílové minerály a oxidy, kap. 3, odst. 3.2.2.3 až 3.2.2.5). V neutrální oblasti jsou obsazena Ca^{2+} a jinými kationty a poutají H -ionty podle schématu:

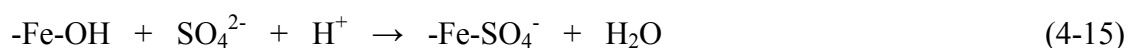


Protože kyselost kyselých skupin na huminových látkách kolísá v širokém rozpětí, rozprostírá se jejich protonizace v odpovídající rozsáhlé oblasti hodnot pH mezi 8 až 3 (obr. 3-7), zatímco funkční skupiny anorganických měničů (jílové mminerály a oxidy) jsou protonizovány hlavně mezi pH 8 až 5,5.

Kvůli slabě kyselému charakteru mohou anorganické skupiny pod jejich izoelektrickým bodem přijímat další H-ion a jsou pak kladně nabitě (odst. 3.2.2.2). Z toho důvodu je v tomto případě příjem H-iontů spojen s adsorpcí ekvivalentních množství aniontů (odst. 3.3.1.1) a ne jako při příjmu prvního H-iontu s desorpcí kationtu. K tomuto procesu dochází např. v kyselých lesních půdách při přísunu kyseliny sírové. Při tom se adsorbuje jak H-iont, tak SO_4^{2-} aniont, např. oxidy Fe a Al



Pokud je však síran adsorbován specificky, tj. ligandovou výměnou, může se při tom uvolnit ion OH^- , který rovněž neutralizuje H-ion

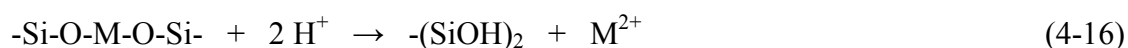


Síran se tak akumuluje především ve spodině a může být desorbován jak dalším okyselením, tak při zvyšování hodnoty pH.

Tlumivé reakce na variabilních nábojích probíhají rychle a jsou prakticky plně reverzibilní. Půdy bohaté na huminové látky, allofany a oxidy, vděčí za podstatný podíl své tlumivé kapacity jejich funkčním skupinám. Tlumivá kapacita huminových látek je často tak vysoká, že tlumivá kapacita půd v oblasti hodnot pH mezi 5 až 7 úzce koreluje s obsahem uhlíku.

4.3.3 Tlumení silikáty

Tlumení křemičitany spočívá v protonizaci skupin Si-O-M. Při tom vznikají skupiny (Si-OH) a kationty kovů se uvolňují ze silikátové vazby (M... kationty kovů, např. K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}), např.:



Kationty přecházejí do výměnné formy nebo do půdního roztoku. Uvolňování kationtů alkálií a alkalických zemin začíná již ve slabě zásadité oblasti. Jeho objem a tím též objem tlumení roste s poklesem hodnoty pH.

K uvolnění nejen -Si-O-M- vazeb, ale i -Si-O-Al-O-Si- vazeb je zapotřebí vyšší koncentrace H-iontů, odpovídající hodnotě $\text{pH} < 5$. Proto nemůže Al-ionty uvolnit kyselina uhličitá a jsou k tomu potřebné silnější kyseliny, např. sírová či dusičná nebo také organické kyseliny.

Uvolněné Al-ionty díky vysokému náboji (odst. 3.2.4.3) disponují silnou výměnnou schopností a pod hodnotou pH 5 stále více nahrazují kationty alkálií a alkalických zemin. Ty tedy při vzrůstající kyselosti nejsou vytěšňovány ionty H_3O^+ s podstatně slabším výměnnou schopností, ale Al (obr. 4-3). Náhrada Ca, Mg atd. hliníkem není tlumivou reakcí, ale jejím důsledkem. Z toho důvodu se vyměnitelné ionty alkálií a alkalických zemin nemají označovat jako vyměnitelné „báze“.

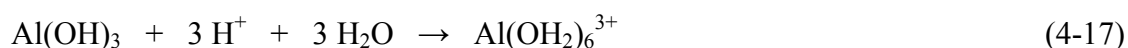
Část Al-iontů může zpětně hydrolyzovat na kladně nabitě hydroxo-Al-polymery, např. $[\text{Al}_6(\text{OH})_{15}]^{3+}$ a neutralizovat permanentní záporné náboje mezi roztažitelnými vrstvami jílových minerálů (např. sekundární chlority). Polymery obsahují rovněž slabě kyselé skupiny AlOH_2 a dochází tak k přeměně silnější kyseliny na slabší.

Rychlost silikátového tlumení je obecně zřetelně menší než karbonátového a na variabilních nábojích. To platí zejména pro mnohdy hrubě zrnité primární křemičitany jako živce nebo slídy. Roční proměna silikátů protony v mírně humidním klimatu je asi (1 – 2) kmol/ha. Reakce je ireverzibilní, protože se při ní silikáty rozpouštějí.

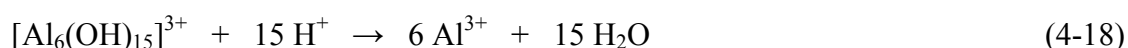
Tlumení silikáty je ekologicky velmi důležité. Na jedné straně způsobuje uvolňování živin, na druhé straně umožňuje při hodnotách $\text{pH} < 5$ tvorbu fytotoxických iontů Al^{3+} (Al- tlumivá oblast podle Ulricha) a vyvolává tak ochuzení půd o vyměnitelné živinné kationty. To se uplatňuje zejména u Mg při vzniku některých novodobých poškození lesních porostů (Zech W. & E. Popp, 1983, l.c.).

4.3.4 Tlumení oxidy, hydroxidy a hydroxid-solemi

Toto tlumení spočívá v protonizaci OH-skupin uvedených sloučenin. Při tom se tyto sloučeniny rozpouštějí a uvolňují ekvivalentní množství kationtů. Např. Al-hydroxidy reagují takto



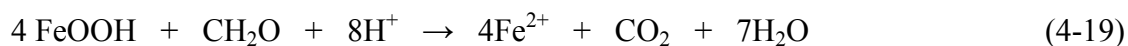
Totéž platí pro hydroxo-Al-polymery na jílových minerálech, které reagují s protony takto



Tak jako u jílových minerálů vedou i tyto tlumivé reakce k vyměnitelným nebo rozpustným Al-iontům. Stejným způsobem reagují Al-hydroxid-soli, např. AlOHSO_4 , jejichž existence se předpokládá v kyselých půdách s přísunem síranů. Při tom vedle Al^{3+} vzniká též rozpustný

SO_4^{2-} . V silně kyselé oblasti takto vázaný SO_4^{2-} se ve velmi silně až extrémně kyselé oblasti opět uvolňuje.

Analogická protonizační reakce u Fe^{III} -oxidů a -hydroxidů má kvůli jejich extrémně nízké rozpustnosti význam až při velmi nízké hodnotě pH (< 3). Oproti tomu spotřebují Fe^{III} -oxidy protony, pokud jsou zredukovány



CH_2O zde představuje modelový vzorec pro biomasu, která je nutná pro redukci, jež zpravidla probíhá mikrobiálně (-biologicky). Je-li ion Fe^{2+} opět zoxidován, vzniká Fe^{III} -oxid a ekvivalentní množství H-iontu a opět se vrací tlumivá kapacita. Ta se snižuje tehdy, pokud se ionty Fe^{2+} vymývají.

4.4 Kyselé a zásaditá neutralizační kapacita půd, potřeba vápnění

Kapacita půdy, schopná neutralizovat kyseliny se nověji označuje jako kyselé neutralizační kapacita (KNK), naopak kapacita schopná neutralizovat zásady (báze) jako bazická (zásaditá) neutralizační kapacita (BNK). KNK a BNK závisí na množství tlumivých substancí uvedených v odst. 4.3 obsažených v půdě a jsou kvantitativním vyjádřením pro její tlumivou kapacitu vůči kyselinám a zásadám.

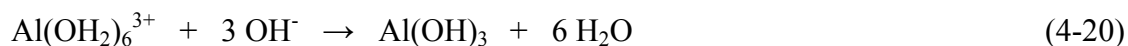
V průběhu vývoje půd v humidních klimatech KNK v důsledku stálého přísunu H-iontů zvolna klesá. Současně z půd mizí kationty kovů (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} aj.), které jsou nahrazovány protony. Současně vzniklé kyselé skupiny (např. COOH) a kyseliny (např. Al^{3+}) mohou být přísunem bází (OH^- , CO_3^{2-} , HCO_3^-) částečným zvratem okyselujících reakcí opět neutralizovány (deprotonizovány). S rostoucím okyselováním, tj. poklesem KNK, roste tedy BNK. Podle ní se pak např. odměřuje množství vápna jako báze, potřebné k neutralizaci půdní kyselosti vzniklé okyselováním a tak ke zvýšení hodnoty pH (potřeba vápnění).

V zemích s rozvinutým průmyslem byla v posledních 100 letech půdám atmosférou dodávána zvýšená množství H-iontů a zbývající KNK je tedy důležitá pro zhodnocení jejich zatížitelnosti kyselinami. KNK určité půdy je rovná sumě všech kovových kationtů vázaných anionty slabých kyselin nebo slabě kyselými funkčními skupinami. Je tedy identická se sumou neprotonizovaných tlumivých substancí. Jak bylo vysvětleno v předchozím odstavci, reakční rychlost tlumivých látek kolísá v širokých mezích. Titruje-li se v laboratoři

zemina kyselinou nebo zásadou, zachytí se pouze rychle reagující podíly KNK (pod výchozí hodnotou pH) resp. BNK (nad výchozí hodnotou pH).

Takové titrační křivky pro 3 půdy jsou znázorněny na obr. 4-4. Jedná se o 3 silně až extrémně silně kyselé půdy s proměnlivým obsahem jílu a huminových látek. Posledními lze zdůvodnit rozdíly ve velikosti a druhu tlumení. Horizont O_h (27,2 % $C_{tot.}$) má mnohem vyšší tlumivou kapacitu (vyjádřenou v mmol chem. ekv./kg a jednotku pH), než oba horizonty minerálních půd (různé stupnice na ose x!), z nichž jilem bohatší B_v -horizont (s 22 % jílu) opět silněji tlumí než jilem chudší (16 % jílu) horizont C_v .

Různý druh tlumení se projevuje v průběhu titrační křivky: Křivka O_h -horizontu je téměř lineární, což svědčí i o tom, že pufrací kapacita je v širokém rozpětí hodnot pH přibližně konstantní. Protože tlumení je v tomto případě v podstatě dáno funkčními skupinami na huminových látkách, ukazuje se, že kyselost těchto skupin je skoro rovnoměrně rozdělena pro celou oblast hodnot pH. Titrační křivky B_v - a C_v -horizontů, chudších na huminové látky, vykazují oproti křivce O_h body inflexe. Mezi hodnotami pH 4 a 5 mají poněkud vyšší tlumivou kapacitu než nad a pod těmito hodnotami. Toto tlumení je způsobeno vyměnitelným Al, který byl vytěsněn, protože titrace proběhla v roztoku KCl ($c_{KCl} = 0,1 \text{ mol/l}$) a podle rovnice



se spotřebovala báze. Při hodnotách pH nad 5 se pak neutralizují protony variabilních nábojů, tj. slabě kyselé skupiny na postranních plochách jílových minerálů a na hydroxo -Al-polymerech, ale také na huminových látkách. H^+ -spotřebu v silně až extrémně kyselé oblasti 3 půd (KNK) bezpochyby způsobuje protonizace Al-hydroxidů a jílových minerálů.

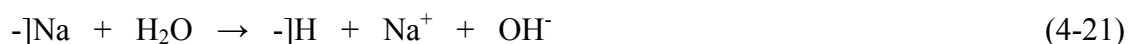
Z titračních křivek lze také odvodit množství vápenatého hnojiva („vápna“), které potřebuje kyselé půda ke zvýšení pH o určitou hodnotu. Tato tzv. potřeba vápnění (vlastně BNK) vztažená na zásady CaO nebo $CaCO_3$, se však nedá exaktně odvodit z hodnoty pH půdy, protože tato podchycuje jen malý podíl celkové acidity. Tak oba minerální horizonty na obr. 4-4 sice mají přibližně stejnou hodnotu $pH_K(4)$, avšak jilem bohatší horizont B_v by měl v celém rozsahu nad pH 4 zhruba dvojnásobnou potřebu vápnění oproti na jíl chudšímu horizontu C_v . Podstatně vyšší potřebu vápnění by měl horizont O_h . Proto by hodnota pH silně okyselených lesních půd při povrchovém vápnění malými dávkami vápna vzrostla jen málo.

4.5 Hodnoty pH půd

Hodnota pH půdy, více či méně těsně spjatá s mnohými jejími vlastnostmi a navíc snadno měřitelná, je jednou z nejdůležitějších půdních charakteristik, sloužících mj. i k třídění půd, jak např. vyplývá z tab. 4-1. V následujícím odstavci bude vyloženo, jak jsou různé hodnoty pH půd vysvětlitelné jejich složením.

4.5.1 Alkalické půdy

Půdy aridních a semiaridních oblastí se slabým nebo zcela chybějícím vymýváním mají většinou alkalické (zásadité) hodnoty pH. To zčásti spočívá v tom, že srážkami přinášený sodík v iontovém obsazení nebo dokonce zásaditě reagující Na_2CO_3 zůstávají v půdě. Měří-li se hodnota pH půdy s výměnným Na ve vodě, dochází k následující reakci



Tato hydrolytická výměna Na vede k disociaci H_2O , protože H-ionty jsou na variabilních nábojích daleko silněji vázány než Na. Zbývající ionty OH^- zvyšují hodnotu pH půdního roztoku, a to tím více, čím více vyměnitelného Na je k dispozici. Rovněž Na z posypových solí může lokálně vést k hodnotám pH přes 8.

Protože je většinou přítomen CO_2 , vzniká místo NaOH (viz výše) Na_2CO_3 , jehož hydrolyza ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$) způsobuje vysokou hodnotu pH (až 11) půd obsahujících Na_2CO_3 . Čím takové půdy obsahují více solí, tím slabší je výměna Na za H-ionty a tím méně alkalický je půdní roztok. Naopak hodnota pH silně vzrůstá, pokud se v těchto půdách zesílí hydrolyza přítokem vody s nízkým obsahem solí nebo bez nich.

4.5.2 Půdy obsahující CaCO_3

Hodnota pH karbonátových (CaCO_3 obsahujících) půd je výlučně určována rozpustností CaCO_3 a parciálním tlakem CO_2 (p_{CO_2}). Pro soustavu $\text{CaCO}_3 - \text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ vyplývá hodnota pH při 25 °C (p_{CO_2} v kPa) ze vztahu

$$\text{pH} = -0,67 \lg p_{\text{CO}_2} + 7,23 \quad (4-22)$$

Rovnice 4-22 platí i pro karbonátové půdy (tab. 4-2). Pro obor parciálních tlaků CO_2 v nich se vyskytujících mezi 0,032 kPa až 1 kPa pak vyplývá rozsah hodnot pH 8,2 až 7,2. Hodnota pH tedy poklesne pod cca 7 až tehdy, je-li všechn reakce schopný uhličitán spotřebován,

tj. rozpuštěn. Dolomit je méně rozpustný než kalcit, a proto rovnovážné hodnoty pH jsou poněkud nižší.

4.5.3 Slabě kyselé půdy

Hodnota pH slabě kyselých půd sice rovněž závisí na parciálním tlaku CO_2 , ale je většinou vyšší než u čisté vody. Pro čistou vodu v závislosti na parciálním tlaku CO_2 pro hodnotu pH platí

$$\text{pH} = -0,5 \lg p_{\text{CO}_2} + 4,9 \quad (4-23)$$

zatímco pro bezkarbonátovou půdu byl zjištěn tento vztah:

$$\text{pH} = -0,36 \lg p_{\text{CO}_2} + 6,4 \quad (4-24)$$

Vyšší hodnota pH půdy oproti čisté vodě spočívá převážně v tlumení variabilními náboji.

4.5.4 Kyselé a silně kyselé půdy

Pod hodnotou pH 5,5 již není reakce půdy ovlivňována parciálním CO_2 . Kyselinou určující hodnotu pH se stává Al, stále více se vyskytující v půdním roztoku (rovnice 4-1). Protože je v rovnováze s vyměnitelným Al, klesá hodnota pH s rostoucím sycením Al (obr. 4-3).

Hodnoty pH nižší než cca 3,5 již nemohou být v souvislosti s hydrolyzou Al podle rovnice 4-1, protože koncentrace hliníku v půdním roztoku k tomu již nedostačuje. Tak nízké hodnoty vznikají buď volnými silnými kyselinami jako např. H_2SO_4 z oxidace pyritu, nebo organickými kyselinami. Vyskytují se proto především v půdách obsahujících sulfidy železa (např. kyselé síranové půdy) nebo v organických horizontech.

4.5.5 Časové a prostorové změny

Hodnota pH různých půd kolísá v závislosti na jejich složení v čase i prostoru. Tak např. v humidních klimatech v průběhu vývoje půd hodnota pH klesá již v kratších časových úsecích a s ní také podíl iontů alkálií a alkalických zemin na kationtovém obsazení (obr. 4-5), které se nahrazují nevyměnitelným vodíkem na variabilních nábojích a kyselé reagujícím Al^{3+} na permanentních nábojích. Podíl kationtů alkálií a alkalických zemin proto nejčastěji koreluje s hodnotou pH (viz. odst. 3.2.5.2).

Podle druhu a množství tlumivých substancí rychlost poklesu hodnoty pH s časem kolísá. V tlumivé oblasti určitých tlumivých substancí, např. uhličitánů nebo jílových minerálů, je pokles hodnoty pH pomalejší, než mezi těmito oblastmi. To také vyplývá z rozdělení četnosti hodnot pH většího počtu půd: maxima se nacházejí v rozpětí hodnot pH 6 až 7 a 3,6 až 4,6. První obor lze přisoudit tlumení všech variabilních nábojů, druhý pak uvolnění Al z jílových minerálů a hydroxidů.

Protože většina H-iontů vzniká mikrobiologickým rozkladem mrtvé biomasy a ten probíhá především na povrchu, klesá hodnota pH v půdním profilu obvykle směrem k povrchu. Výjimku představuje v kyselých lesních půdách horizont L (opad), který, ač povrchový, je často méně kyselý než následující horizonty O a A_h. Je to způsobeno bázemi obsaženými v opadu, zejména organickými a HCO₃⁻ anionty, které se uvolňují při odbourávání organických aniontů. Oba neutralizují H-ionty (viz odst. 4.2.1 - 4.2.2).

Při přeměně půd pod přirozenou, nejčastěji lesní vegetací, na ornou půdu, zvyšuje se její hodnota pH alespoň v ornici na 5 až 7 vápněním, zatímco spodina vykazuje ještě původní nízké pH.

Časové fluktuace hodnoty pH nacházíme v půdách, ve kterých střídavě probíhají oxidační a redukční procesy (např. v půdách rýžovišť). Během redukční fáze je jejich hodnota pH vyšší, protože se H-ionty spotřebují při redukci (viz. rovnice 4-19), zatímco H-ionty uvolněné při oxidaci hodnotu pH snižují.

Větší prostorové rozdíly hodnot pH, až 2 jednotek, se vyskytují v milimetrové oblasti rhizosféry (obr. 4-6). Hodnota pH rhizosféry je nižší než v samotné půdě, je-li přijímáno více kationtů než aniontů, např. při převažující výživě NH₄⁺; naopak je vyšší, je-li přijímáno více aniontů než kationtů, např. při převažující výživě NO₃⁻. Tyto rozdíly hodnot pH jsou tím větší a dosahující tím dále, čím je půda slaběji pufrována.

Rovněž v blízkosti granulí hnojiv se hodnota pH může zřetelně odchylovat od ostatní půdy, pokud při přeměně hnojiva vzniká kyselina. Velmi nízké hodnoty pH se např. objevují při přeměně dihydrogenfosforečnanu (např. v superfosfátu) na hydrogenfosforečnan, kdy současně vzniká volná H₃PO₄ nebo když jsou amonné soli oxidovány na HNO₃ (viz rovnice 4-2).

4.6 Požadavky na hodnotu pH u kulturních půd

Byly zjištěny vztahy mezi výnosem a hodnotou pH půd, ze kterých lze odvodit optimální hodnotu pH potřebnou k dosažení hospodárného optimálního výnosu. Optimální hodnota pH závisí na řadě ekologicky působících půdních vlastností, které na změny pH rozdílně reagují. Sem patří např. toxické působení Al a Mn, přijatelnost makro- a mikroživin a také těžkých kovů, odbourávání humusu a struktura půdy.

V každém případě má být hodnota pH tak vysoká, aby se nemohly projevit toxicky a antagonisticky působící koncentrace Al a Mn. S rostoucí hodnotou pH se však mikroživiny jako Mn, Cu, Zn a B stávají pro rostliny méně přijatelnými. Podobné platí pro fosforečnan, jehož koncentrace v půdním roztoku při hodnotách pH nad 6 klesá (viz obr. 3-19), protože na sebe vzájemně působí s neustále hůře rozpustnými Ca-fosfáty. Rostoucí hodnota pH povzbuzuje činnost mikroorganismů a v silněji kyselých lesních půdách dochází k intenzivnějšímu odbourávání huminových látek. Konečně větší podíl výměnného Ca, především na variabilních nábojích a zejména větší koncentrace Ca v půdním roztoku podporují tvorbu agregátů jílových půd.

Tyto souvislosti se projevují při zohledňování obsahu jílu a humusu (jako snadno zjistitelných charakteristik) při volbě optimální hodnoty pH pro ornou půdu. V SRN se např. pro půdy s < 5 % jílu (a < 4 % org. substance) doporučuje hodnota pH (CaCl₂) jen 5,5, protože se tak současně zamezí jak toxicitě Al (pH dostatečně vysoké), tak nedostatku Mn (pH dostatečně nízké) v takových, většinou na Mn chudých půdách. Především z důvodů zlepšení struktury vzrůstá optimální hodnota se stoupajícím obsahem jílu (tab. 4-3). Nedostatek mikroprvků je u jílovitých středoevropských půd méně pravděpodobný, protože jejich celkový obsah je většinou dostatečný.

V bývalé NDR byly pro jednotlivé půdní druhy doporučeny optimální hodnoty pH (0,1M KCl), odpovídající hodnotám pH (CaCl₂) navrženy takto: písčité 5,5; hlinitopísčité 5,8; písčitohlinitá a písčité hlína 6,1; hlinitá 6,3; jílovitá 6,4. V Británii se pro půdy, na nichž jsou v osevním postupu zastoupeny hlavně brambory a žito, považuje za vyhovující hodnota pH (H₂O) 5,5, pro oves, pšenici a řepku 6,0 a pro cukrovku, ječmen, bob a hrách 6,5. V Holandsku, kde jsou půdy zčásti ovlivněny vysokou hladinou spodní vody, se optimální hodnota pH řídí podle zrnitosti (frakce < 16 μm), půdotvorného substrátu, obsahu organické složky a částečně podle osevního postupu. Jako optimální pH (1M KCl) u jílem chudých písčitých půd (< 5 % org. látek) se doporučuje 5,1 (50 % brambory a obiloviny)

a 5,7 (25 % cukrovka a 75 % obiloviny) a u jílem bohatých nivních a sprašových půd, nezávisle na osevním postupu, 6,4 resp. 6,6.

Předložené srovnání vesměs ukazuje, že pro půdy s nižším obsahem jílu se doporučují podobné, avšak pro jílovitější nižší hodnoty pH, než v SRN. Tak např. doporučení v SRN, aby se půdy s > 17 % jílu (např. třeba na spraši), upravovaly na hodnotu pH 7 (tab. 4-3) nebo dokonce vápnily na obsah CaCO_3 (0,2 – 1) %, není polními pokusy doloženo. Hodnotu $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$ 6,5 pro takové půdy je možné považovat za dostatečnou.

Obsahují-li půdy více než 4 % organické substance, doporučuje se v SRN nižší hodnota pH, než je uvedeno v tab. 4-3. Např. při (9 – 15) % je to hodnota pH 5,0 až 6,0 (písčité-jílovité) a při zorněných vrchovištních půdách 4,0.

U silně zvětralých tropických a subtropických půd (ferralsoly, acrisoly, nitosoly) se většinou požaduje jen taková hodnota pH, kterou by se přijatelný Al snížil na neškodné množství, protože vápenatá hnojiva nejsou vždy dostatečně k dispozici.

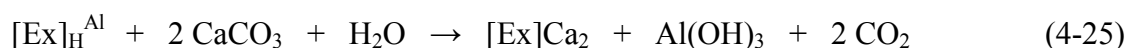
U trvalých travních porostů na minerálních půdách jsou v humusovém horizontu hodnoty pH 5,0 až 5,5 dostačující pro získání kvalitní píce (botanické složení, obsah mikroprvků), u vrchovištních travních porostů 4,5.

V České republice se půdy podle hodnoty $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$ třídí podle tab. 4-4. Optimální hodnoty pH podle druhu půdy jsou uvedeny v tab. 4-5.

4.7 Vápnění

Pokud klesne hodnota pH pod její optimum, může být zvýšena použitím zásaditých neutralizačních látek. Takové bazické látky v podobě vápenců, slínů a dolomitů s proměnlivým obsahem uhličitánů Ca a Mg jsou v přírodě k dispozici v poměrně velkém množství a jsou zemědělci odedávna používány. Další vápenaté hnojivo je pálené vápno (CaO) získané žíháním CaCO_3 v pecích.

Přidá-li se do kyselé půdy CaCO_3 , jsou její H-ionty reakcí s CO_3^{2-} neutralizovány na HCO_3^- a (při hodnotách $\text{pH} < 6$) na $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Při tom jsou zastiženy H-ionty půdního roztoku, vyměnitelného Al a disociabilní vodík na slabě kyselých organických a anorganických funkčních skupinách. Část reakcí probíhajících při okyselování, zejména reverzibilní, probíhá zpětně



CaO se v půdě nejprve sloučí s vodou na Ca(OH)_2 , který pak s půdou reaguje podle rovnice 4-26 (pokud ještě předem s CO_2 nevytvoří CaCO_3)



Hodnota pH tak vzrůstá, zatímco výměnný Al a Mn klesá téměř k nule (obr. 4-7). Silný vzestup výměnného Ca nad hodnotou pH 6 je způsoben náhradou disociabilního vodíku, převážně na huminových látkách.

Rychlost neutralizace vápenatými hnojivy roste zejména s jejich jemností (menšími rozměry částic), na straně půdy pak s klesající hodnotou pH, protože tím vzrůstá gradient mezi pH půdy a pH na povrchu částic vápenatého hnojiva. Nad hodnotou pH 6,0 až 6,5 reaguje CaCO_3 tak pomalu, že ani po letech nemusí být zcela rozpuštěný. Vyrovnání hodnoty pH s kyselou spodinou, tzv. hloubkové působení, probíhá většinou pomalu (obr. 4-8) a může být urychleno vyššími dávkami vápna do svrchní půdy (vysoký gradient hodnoty pH mezi povrchem a spodinou). Vápnění spodiny je další možnost, jak zlepšit růstové podmínky v kořenové zóně pod orníci. To je nutné zejména tehdy, existuje-li tam volný Al.

Potřebné množství vápenatého hnojiva závisí vedle BNK též významně na optimální hodnotě pH. Na intenzivně zemědělsky využívaných půdách jsou většinou nutná jen malá množství vápna, aby se výměnný hliník a z atmosféry pocházející silné kyseliny neutralizovaly (v SRN cca 50 kg CaO/ha.rok). Má-li se však udržet hodnota $\text{pH} > 6$, roste potřeba vápnění exponenciálně (viz též obr. 4-7). To spočívá v nutnosti neutralizovat navíc i slabě kyselé skupiny, protonizované především kyselinou uhličitou produkovanou přímo půdou. Protože však při hodnotě $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$ 6 nemůže již zpravidla být s jistotou dosaženo zvýšení výnosu, není úplná deprotonizace těchto míst většinou potřebná, když navíc nad tuto oblast hodnot pH opět klesá přijatelnost fosforu (fosfátů). Oproti tomu vápnění, které neutralizuje výměnný Al, většinou vede k podstatnému zvýšení výnosů.

U okyselených lesních půd se v SRN v novější době zavádí kompenzační vápnění kvůli imisi kyselin z atmosféry, vypočtené cca na 5 let, a to v množství (2 – 3) t/ha slínu. Vyšší jednorázové dávky se nepoužívají, protože organicky vázaný dusík se pak příliš rychle mineralizuje a může být vyplaven.

V České republice se potřeba vápnění vyjádřená v t CaO/ha stanoví nepřímě podle zjištěné hodnoty $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$, druhu půdy (zrnatosti) a způsobu obdělávání (kultury). Dále se rozlišuje vápnění - úprava hodnoty pH - meliorační a udržovací. Cílem melioračního vápnění je

jednorázovým použitím vyšší dávky vápenatého hnojiva dosáhnout optimální hodnoty pH. Často je spojeno s technickými popř. biotechnickými opatřeními. Omezení max. dávek vyplývá z tab. 4-8. Udržovací vápnění má stabilizovat současný stav půdní reakce doplněním ročních ztrát vápníku vyluhováním a sklizní. V současnosti se průměrná roční ztráta odhaduje asi na 215 kg CaO/ha. Podle výše uvedených zásad jsou pro jednotlivé případy vypracovány normativy dávek vápenatých hnojiv (např. tab. 4-6, 4-7).

4.8 Metody stanovení

Hodnota pH se měří v suspenzi buď v destilované resp. deionizované vodě pH(H₂O) nebo v roztoku soli (nyní zpravidla CaCl₂ c = 0,01 mol/l, dříve KCl c = 1,0 nebo 0,1 mol/l) při poměru tuhé a kapalné fáze 1 : 5 (dříve 1 : 2,5), a to skleněnou elektrodou. Roztokem CaCl₂ c = 0,01 mol/l se simuluje půdní roztok, převládající v zemědělsky využívaných půdách mírně humidní oblasti. Oproti tomu jsou půdní roztoky velmi kyselých nebo silně zvětralých půd (např. v tropech) chudší na soli, zejména Ca (c < 10⁻³ mol/l), takže se zde nejčastěji měří v H₂O (tzv. aktivní pH). Hodnoty pH naměřené při konstantní koncentraci solí jsou méně závislé na ročním období a jiných výkyvech na poli.

U půd v SRN na spraších a pískách byly hodnoty pH(CaCl₂) mezi 3,0 až 7,5 průměrně o (0,6 ± 0,2) jednotek nižší než hodnoty pH(H₂O). To je způsobeno výměnou H- a Al-iontů ionty Ca (odtud výměnné pH). Roztok soli navíc alespoň zčásti potlačuje tzv. efekt suspenze. Ten se projevuje tak, že hodnota pH při ponoření skleněné elektrody do půdní suspenze je v důsledku difuzního potenciálu na referenční elektrodě poněkud nižší než v čirém roztoku nad ní.

V ÚKZÚZ a půdních zkušebnách, které byly zřizovány v předchozích obdobích před vznikem ÚKZÚZ, prošla metodika stanovení hodnoty pH půd složitým vývojem, který by si jistě zasloužil podrobnější zpracování. Např. míchání půdní suspenze při měření se řešilo otáčením kádinky se vzorkem a pevným míchadlem, později metodicky nesprávně proudem vzduchu. Rovněž dostatečně odolná skleněná elektroda nebyla k dispozici a měřilo se poměrně levnou tzv. chinhydronovou elektrodou, realizovanou nasycením měřeného média ekvimolární směsí chinonu a hydrochinonu a ponořením Pt-elektrody. Nejsložitější vývoj prodělaly měřicí přístroje, kterých se na pracovištích ústavu vystřídala řada typů. Přes všechn pokrok však stanovení a měření hodnoty pH vyžaduje pečlivou práci, zejména zacházení s elektrodou. V současnosti je pro toto stanovení závazná revidovaná norma ISO 10 390. Podrobnosti viz Zbíral J. l.c.

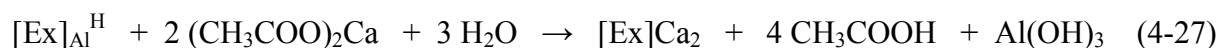
Na rozdíl od hodnoty pH je výraz $\text{pH} - \frac{1}{2} \text{pCa}$, tzv. vápenatý potenciál (Schofield & Taylor), v širokých mezích nezávislý na koncentraci solí v půdním roztoku. Jeho podstatně nižší variabilita než u hodnoty pH spočívá v tom, že Gaponův koeficient pro kationtový pár H-Ca je v určitých rozpětích přibližně konstantní a výměna Ca při změně koncentrace solí je zanedbatelně malá.

Výměnný Al se stanoví opakovanou extrakcí roztokem neutrální soli (nejčastěji KCl nebo NH_4Cl $c = 1 \text{ mol/l}$). Naopak při extrakci roztokem BaCl_2 nebo, ještě silněji CuCl_2 , se vyluhuje část Al komplexně vázaného huminovými látkami.

Kyselá a zásaditá neutralizační kapacita a tím též potřeba vápnění vyplývají z titračních křivek (odst. 4.4) Oproti extrakci roztoky neutrálních solí jsou při titraci zásadou zachyceny i H-ionty slabě kyselých skupin. Spotřeba zásady se rovná BNK. Jednodušší postup stanovení tohoto disociabilního vodíku spočívá v tom, že se půda nechá reagovat s tlumeným roztokem soli, jehož hodnota pH je vyšší než samotné půdy. Extrahované protony sníží hodnotu pH tlumivého roztoku a mohou být stanoveny titračně.

Na tomto principu je založena např. Mehlichova metoda stanovení celkové acidity půd extrakcí roztokem BaCl_2 a triethanolaminu $\text{pH} = 8,1$, která je součástí metody stanovení KVK_{pot} (odst. 3.2.6).

Poměrně často se používají metody stanovení H-iontů (a současně potřeby vápnění) v sorpčním komplexu půdy postupem s dvojím měřením pH. Měří se v suspenzi před a po přidání vhodného tlumivého roztoku s lineární závislostí $\text{pH} - [\text{H}^+]$ v rozpětí hodnot pH např. 4 až 7. Podrobnosti viz Zbíral J. l.c. Metod je víc a liší se především složením a hodnotou pH použitého tlumivého roztoku - pufru (viz např. Zbíral J. l.c., Scheffler-Schachtschabel l.c., Hoffman G. l.c.). Tak např. Adams a Evans používají pufr o $\text{pH} = 8,00$, Mehlich 6,60. V SRN je oficiální metoda podle Schachtschabela, používající roztok octanu Ca $c = 0,5 \text{ mol/l}$ s hodnotou pH 7,5. Ten reaguje s výměnným Al a částí disociabilního H takto

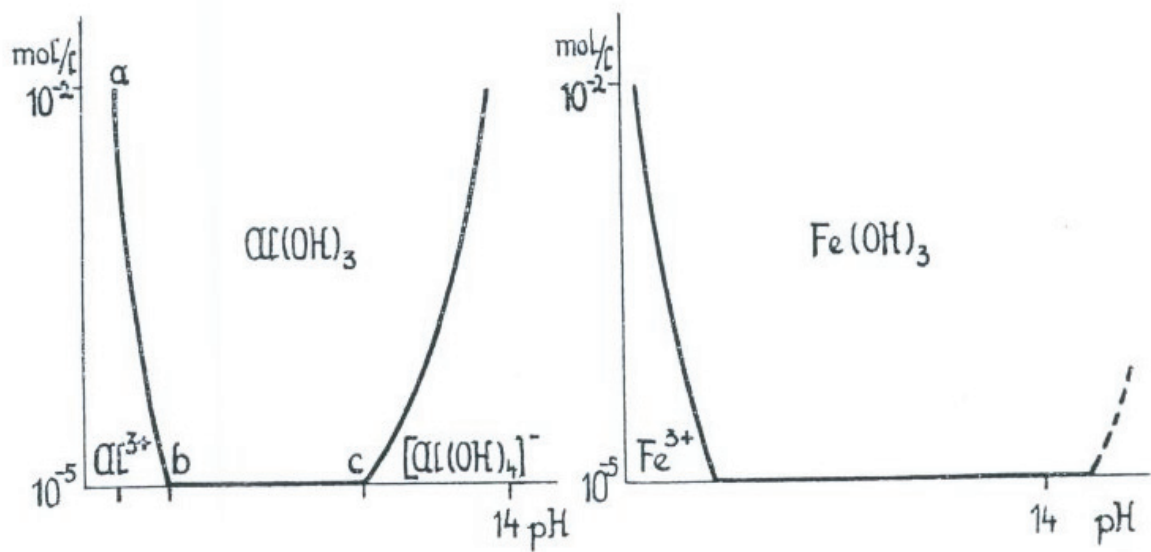


Pokles hodnoty pH vzniklou CH_3COOH je úměrný potřebě bází resp. potřebě vápnění půdy. Protože neutralizační křivka v rozpětí hodnot pH cca 4 až 7 má přibližně lineární průběh (obr. 4-4), může být z výchozí hodnoty pH půdy a její potřeby vápnění na $\text{pH} = 7,0$ s dostatečnou přesností vypočtena potřeba vápnění pro libovolnou hodnotu pH.

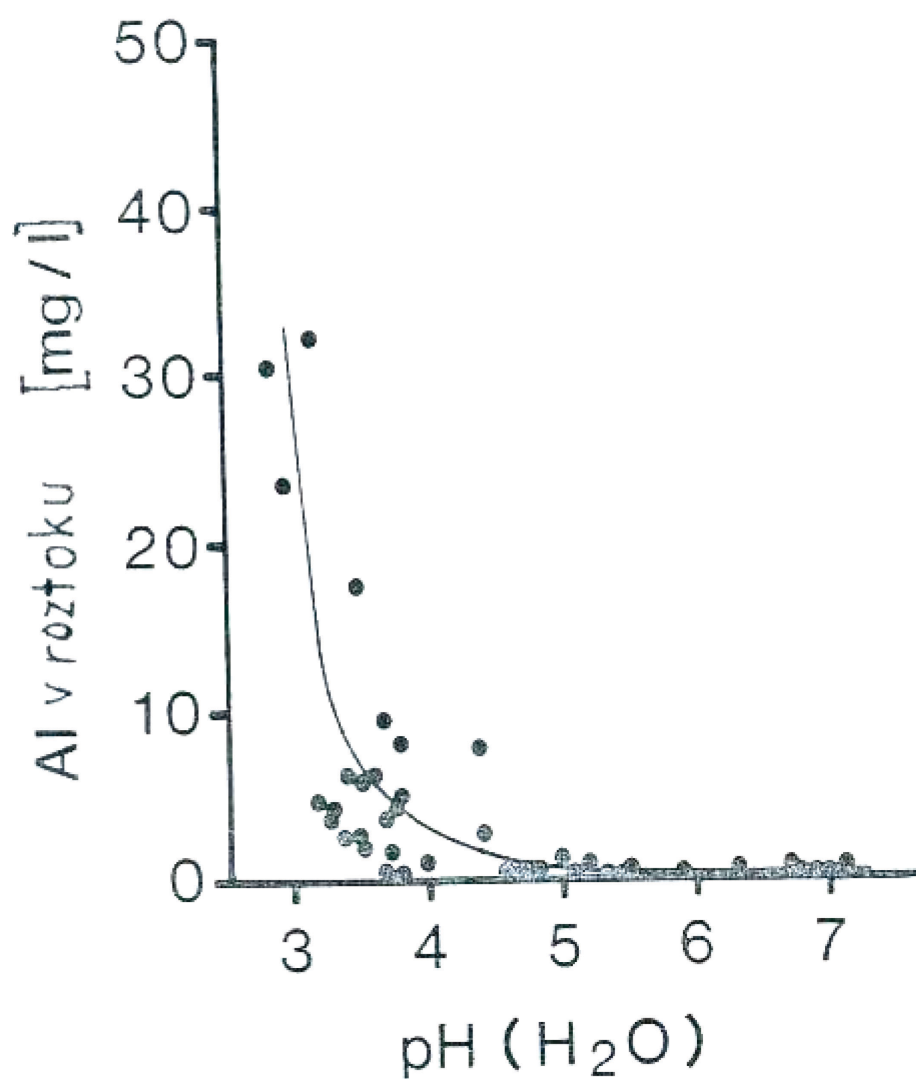
4.9 Literatura (příklady)

1. Bates G.: Determination of pH. Theory and Practice. John Wiley & Sons Inc., New York, London, Sydney 1964; ruský překlad, Izdat. Chimija, Leningrad 1972.
2. Čermák P. a kol.: Pracovní postupy pro agrochemické zkoušení zemědělských půd v České republice v období 2005 až 2010. ÚKZÚZ, odbor APVR, Brno 2005.
3. Číhalík J., Dvořák J., Suk V.: Příručka měření pH. SNTL, Praha 1975.
4. Hoffmann G. (red.): Methodenbuch, Band I. Die Untersuchung von Böden, 4. Aufl. VDLUFA-Verlag, Darmstadt 1991, 1997.
5. Hruška J., Cienciala E. (editoři): Dlouhodobá acidifikace a nutriční degradace lesních půd - limitující faktor současného lesnictví, 2. vyd. ČGS, IFER, Praha a Jílové u Prahy, 2005.
6. Klikorka J., Hanzlík J. (red.): Názvosloví anorganické chemie. Academia, Praha 1987.
7. Laník J., Janíček G.: Základní metodické srovnávací práce k soustavnému zkoušení našich půd na potřebu vápnění. Sborník České akademie zemědělské 16, 2, 1-10 (1941).
8. Neuberg J. (ed.): Komplexní metodika výživy rostlin. Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do zemědělské praxe, 1/1990. ÚVTIZ, Praha 1989.
9. Okáč A.: Analytická chemie kvalitativní, 3.vyd. Academia, Praha 1966.
10. Prax A., Jandák J., Pokorný E.: Půdoznalství. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno 1995.
11. Scheffler F., Schachtschabel P.: Lehrbuch der Bodenkunde, 13. Aufl. F. Enke Verlag, Stuttgart 1992.
12. Šarapatka B.: Pedologie. Vydavatelství UP, Olomouc 1996.
13. Ulrich B.: Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 149, 702-717 (1986).
14. Veselý J., Weiss D., Štulík K.: Analýza iontově selektivními elektrodami. SNTL, Praha 1979.
15. Whitney R.S., Gardner R.: Soil Sci. 55, 127-141 (1943).
16. Zbíral J.: Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I., 2. vydání. ÚKZÚZ, Laboratorní odbor, Brno 2002.
17. Zech W. & E. Popp: Forstw. Cbl. 102, 50-55 (1983).

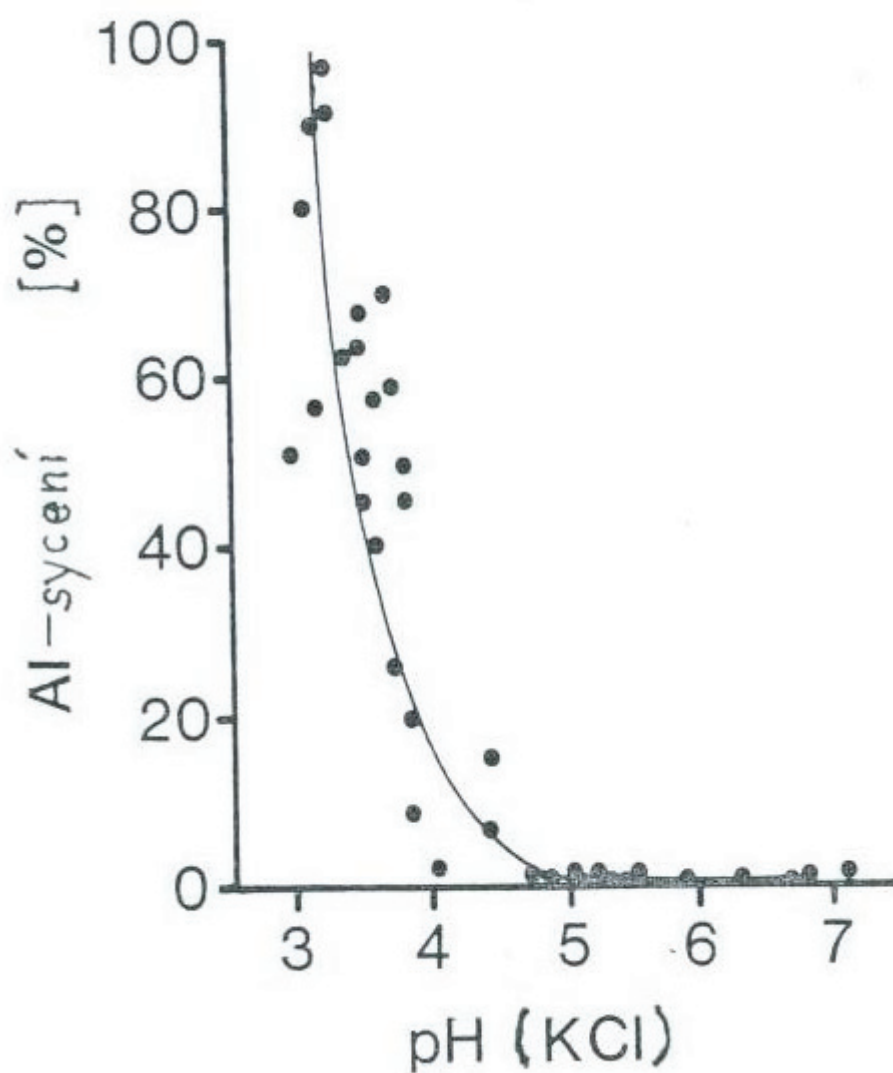
18. ISO 10 390 Soil quality - Determination of pH. Revised version, ISO/CD 10 390. ISO, 2000.
19. ČSN ISO 10 390 Kvalita půdy. Stanovení pH. ČNI, Praha 1996.



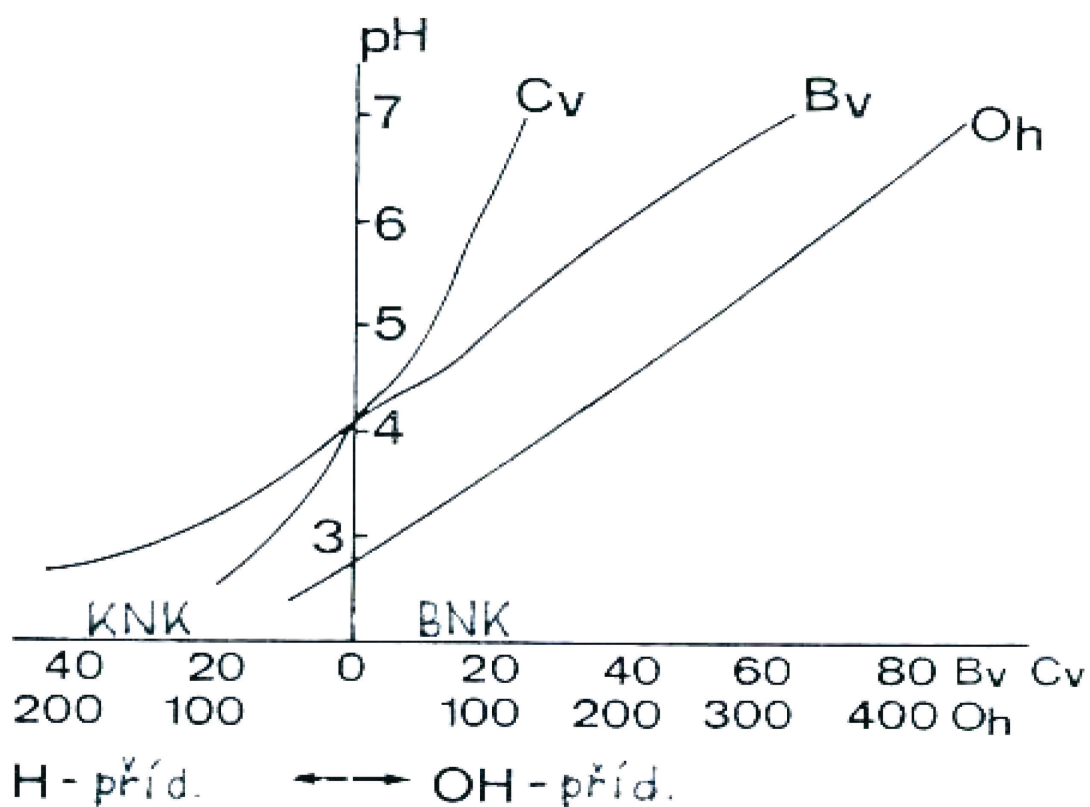
Obr. 4-1. Oblasti srážení hydroxidů $Al(OH)_3$ a $Fe(OH)_3$ v závislosti na pH a koncentraci roztoků. (Okáč A., l.c.).



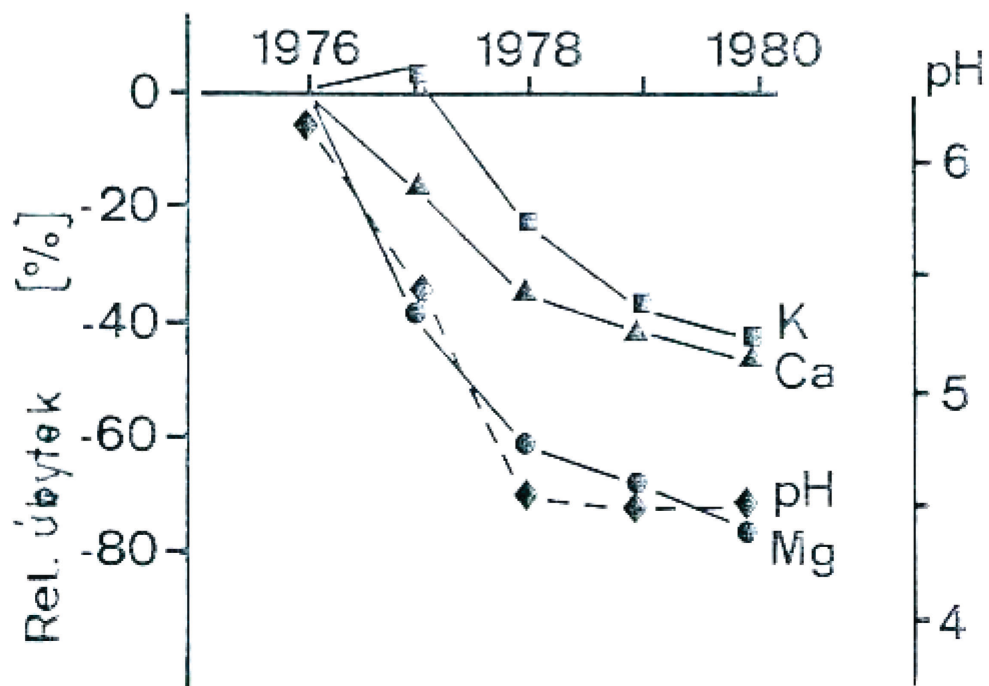
Obr. 4-2. Vztah mezi pH a obsahem Al v nasyceném extraktu u půd na spraši. (Schachtschabel P. & C. G. Heinemann, neuveř., in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



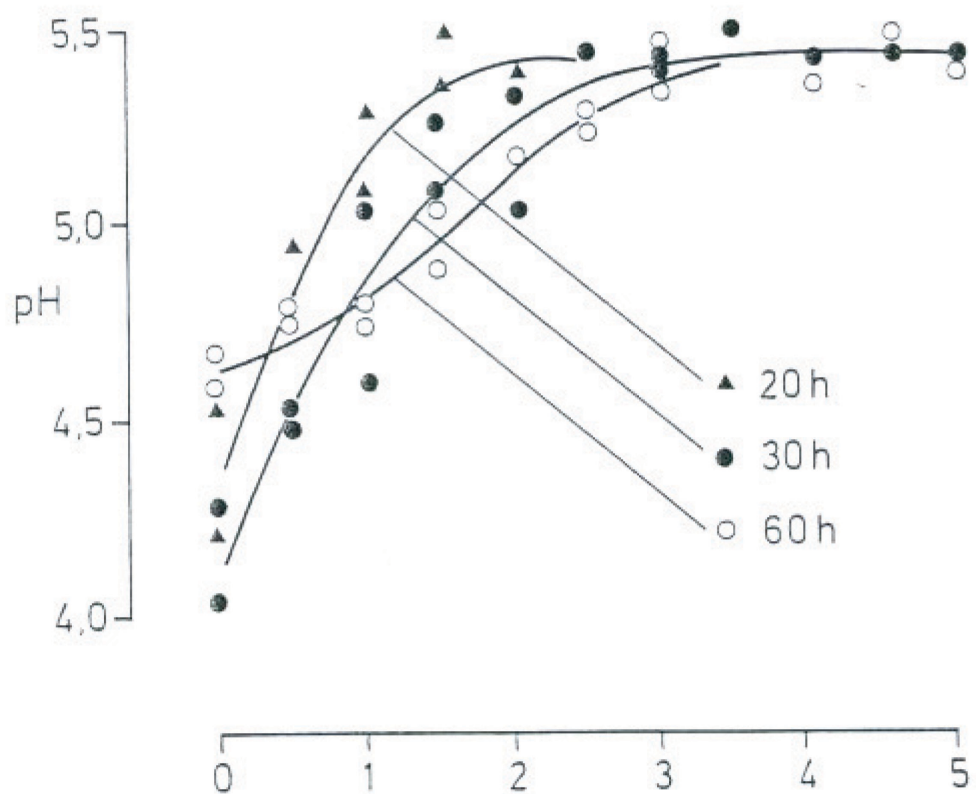
Obr. 4-3. Vztah mezi pH (1M KCl) a Al-sycením půd na spraši, vztaženým na KVK_{ef} . (Schachtschabel P. & C. G. Heinemann, neuveř., in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



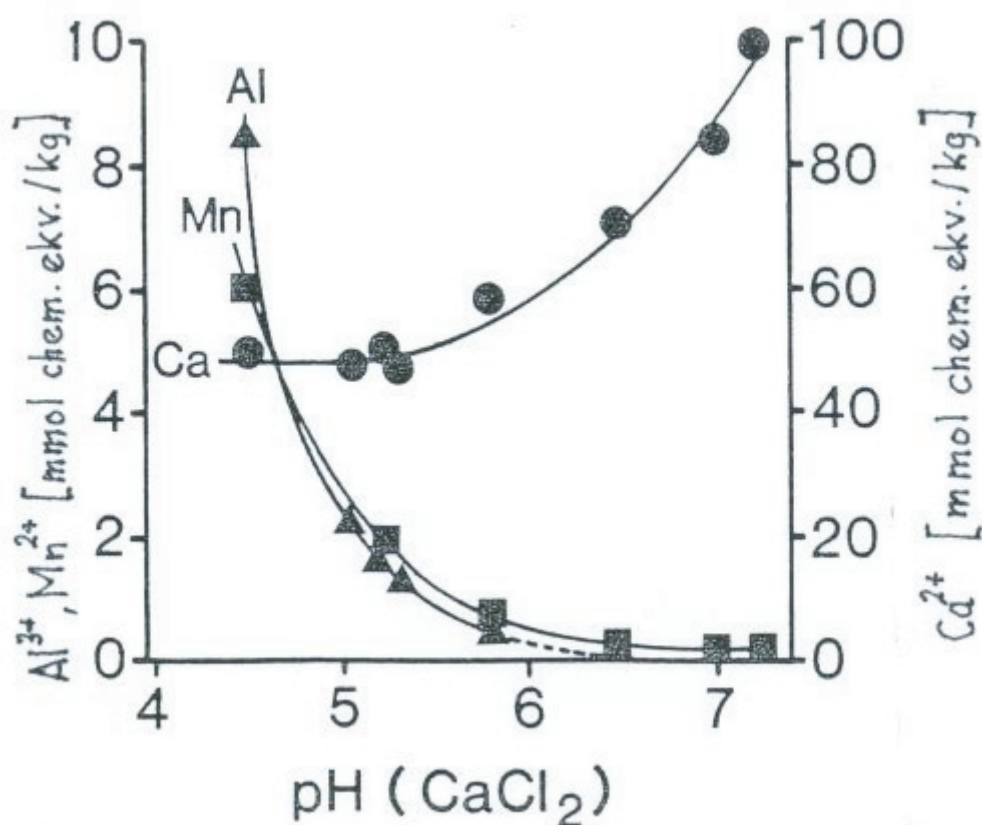
Obr. 4-4. Titrační křivky: 1. organického horizontu O_h (47 % org. složky), 2. horizontu hnědnutí B_v (22 % jílu) podzolované hnědé půdy na fylitové suti, 3. zvětralinového horizontu C_v (16 % jílu) podzolu na žulové suti ve Smrčinách. (Podle P. Süssera, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



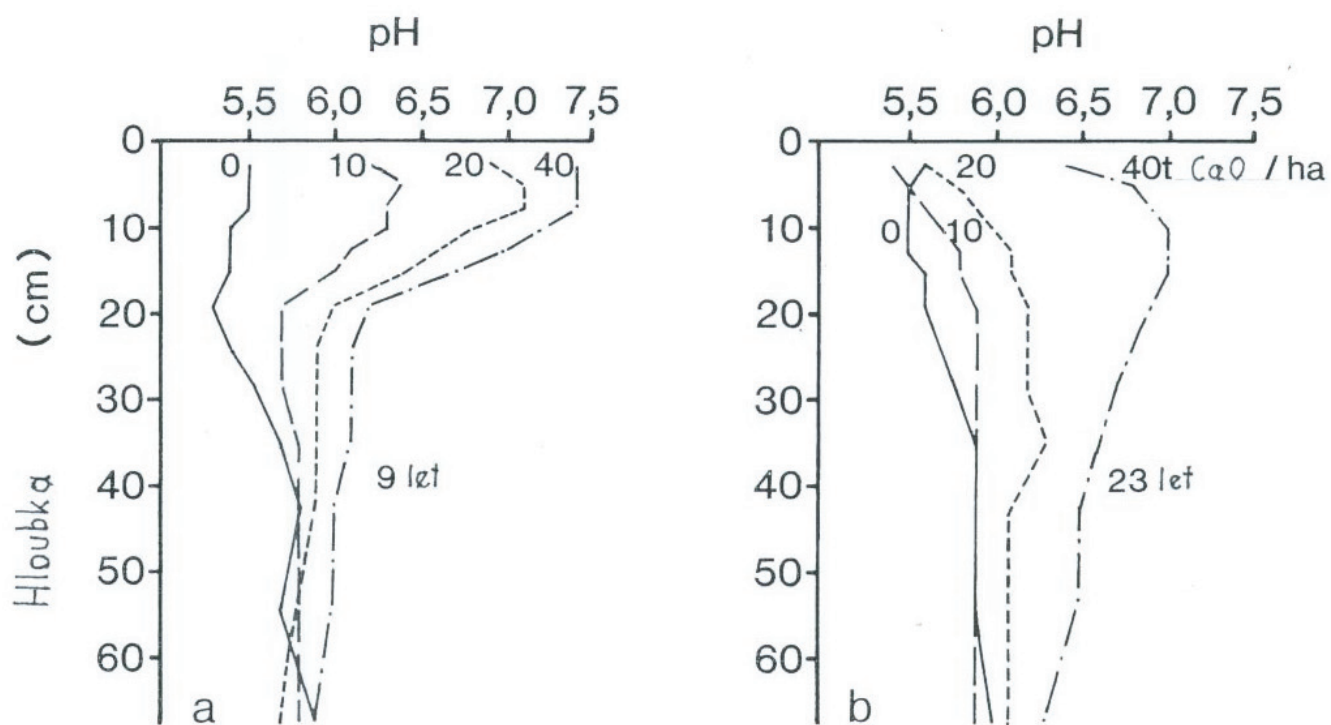
Obr. 4-5. Pokles hodnoty $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ a relativní úbytek vyměnitelných K, Mg a Ca v alfisolu jižní Nigerie s osevním postupem kukuřice-cizrna během 4 let. (Podle H. Grimme, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



Obr. 4-6. Rozšíření změny pH během času v okolí kořene podzemnice olejné v ornici. (Podle Schallera G. & W. R. Fischera, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



Obr. 4-7. Výměnný Al, Mn a Ca jako funkce změny pH vyvolané vápněním nebo okyselením. [Půda: orniční horizont hnědé půdy na soliflukční sprašové hlíně, Bavorsko. Výchozí hodnota pH(CaCl₂: 5,3]. (Podle Schwertmanna U.& H. Amanna, neuveř., in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).



Obr. 4-8. Hodnoty pH jemně písčitohlinité půdy v různé hloubce 9 a 23 let po povrchovém vápnění 0, 10, 20 a 40 t CaO/ha. Trvalý travní porost, srážky 1130 mm/rok. (Podle Browna B. et al., in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno).

**Tab.4-1. Třídění půd podle hodnoty pH(CaCl₂) v SRN
(Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno)**

Půdní reakce	Hodnota pH
Extrémně kyselá	< 3,0
Velmi silně kyselá	3,0 – 3,9
Silně kyselá	4,0 – 4,9
Mírně kyselá	5,0 – 5,9
Slabě kyselá	6,0 – 6,9
Neutrální	7,0
Slabě alkalická	7,1 – 8,0
Mírně alkalická	8,1 – 9,0
Silně alkalická	9,1 – 10,0
Velmi silně alkalická	10,1 – 11,0
Extrémně alkalická	> 11,0

**Tab.4-2. Hodnoty pH (H₂O) půd a vody v závislosti na parciálním tlaku vzdušného CO₂
(1 kPa ≡ 1 obj.%) (Whitney R.S., Gardner R., in: Scheffer, Schachtschabel, l.c.,
upraveno)**

	Parciální tlak vzdušného CO₂ (kPa)			
	0,03	0,1	1	10
Soloněc	9,0	8,6	7,9	7,2
Půda s 9 % CaCO ₃	8,3	8,0	7,35	6,7
Půda bez CaCO ₃	6,9	6,7	6,35	6,0
Destilovaná voda	5,65	5,4	4,9	4,4

Tab. 4-3. Směrnice SRN pro žádoucí hodnoty pH (CaCl₂) v závislosti na půdním druhu. Jíl < 0,002 mm. Obsah organické složky < 4 %. Půdní druhy podle DIN 4220. (Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno)

Půdní druh	Obsah jílu (%)	pH (CaCl ₂)
Písek (0,063 – 2,0) mm	< 5	5,5
Prach (0,002 – 0,063) mm		
Písek slabě hlinitý	5 – 12	6,0
Prach velmi slabě jílovitý		
Písek středně jílovitý	13 – 17	6,5
Prach slabě jílovitý		
Hlína slabě písčitá až jíl	> 17	7,0
Prach středně jílovitý		

Tab. 4-4. Kriteria hodnocení půdní reakce (Čermák P. a kol., l.c.)

Hodnota pH	Půdní reakce
< 4,5	Extrémně kyselá
4,6 – 5,0	Silně kyselá
5,1 – 5,5	Kyselá
5,6 – 6,5	Slabě kyselá
6,6 – 7,2	Neutrální
7,3 – 7,7	Alkalická
> 7,7	Silně alkalická

Tab. 4.-5. Optimální hodnoty pH (Čermák P. a kol., l.c.)

Druh půdy	Optimální pH
Písčítá	5,5 (± 0,2)
Hlinitopísčítá	6,0 (± 0,2)
Písčitohlinitá	6,5 (± 0,2)
Hlinitá, jíl	7,0 (± 0,5)

Pro louky a pastviny (TTP) je udáváno optimální pH mezi 5,0 – 6,0.

Tab. 4.-6. Roční normativy dávek vápenatých hnojiv (t CaO/ha) – orná půda a ovocné sady (Čermák P. a kol., l.c.)

Lehká půda		Střední půda		Těžká půda	
pH	t CaO/ha	pH	t CaO/ha	pH	t CaO/ha
< 4,5	1,20	< 4,5	1,50	<,5	1,70
4,6 – 5,0	0,80	4,6 – 5,0	1,00	4,6 – 5,0	1,25
5,1 – 5,5	0,60	5,1 – 5,5	0,70	5,1 – 5,5	0,85
5,6 – 5,7	0,30	5,6 – 6,0	0,40	5,6 – 6,0	0,50
		6,1 – 6,5	0,20	6,1 – 6,5	0,25
				6,6 – 6,7	0,20

Tab. 4.-7. Roční normativy dávek vápenatých hnojiv (t CaO/ha) – trvalé travní porosty (Čermák P. a kol., l.c.)

Lehká půda		Střední půda		Těžká půda	
pH	t CaO/ha	pH	t CaO/ha	pH	t CaO/ha
< 4,5	0,50	< 4,5	0,70	< 4,5	0,90
4,6 – 5,0	0,30	4,6 – 5,0	0,50	4,6 – 5,0	0,70
		5,1 – 5,6	0,25	5,1 – 5,5	0,35
				5,6 – 6,0	0,20

Tab. 4.-8. Maximální jednorázová dávka CaO na 1 hektar (Čermák P. a kol., l.c.)

Půdní druh	Maximální dávka CaO (t/ha)
Písčítá (lehká)	1,0
Hlinitopísčítá (lehká)	1,5
Písčítóhlinitá (střední)	2,0
Hlinitá (střední)	3,0
Jílovitohlinitá, jílovitá (těžká)	5,0

Překročí-li potřeba vápnění uvedené dávky, je třeba vápnit opakovaně v krátkých intervalech, nejlépe do 2 let.

Tab. 4.-9. Kategorizace půd podle obsahu uhličitánů (Čermák P. a kol., l.c.)

Půdy	% uhličitánů
Nevápnité	< 0,3 %
Slabě vápnité	(0,3 – 3,0) %
Vápnité	(3,1 – 25,0) %
Slíny	(25,1 – 60,0) %
Vápenaté zeminy	> 60,0 %

Bulletin Národní referenční laboratoře XIV 2010/3

Ročník: XIV, č. 3
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2010
Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 59
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196