	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – Analýza půd</b>  30982.1 – Stanovení glomalinu v půdách Bradfordovou metodou	Vydání	1
		Revize	0

## STANOVENÍ GLOMALINU V PŮDÁCH BRADFORDOVOU METODOU

### 1 Účel a rozsah

Metoda je určena pro stanovení glomalinu v zemědělských a lesních půdách. Uvedený postup slouží jako referenční metoda pro kalibrace NIRS.

#### Poznámky

- Jelikož v půdách ČR dochází k postupnému snižování obsahu a degradaci organické hmoty, je zapotřebí sledovat parametry kvality půdy, které ovlivňují její odolnosti proti větrné nebo vodní erozi. Obsah glomalinu představuje jeden z přístupů k této problematice.*
- Glomalin je glykoprotein, sacharidovo – proteinová složka, která podmiňuje výstavbu půdy a její struktury. Vytváří ho arbuskulární mykorhizické houby, které žijí uvnitř kořenů rostlin a v okolní půdě. Je jedním z ukazatelů kvality organické hmoty půdy. Spojuje jednotlivé půdní částice dohromady a zlepšuje schopnost půdy zadržet v krajině vodu a živiny.*

### 2 Princip

Půda se extrahuje roztokem citronanu sodného, extrakce se provádí v autoklávu při pH 8, v případě vyššího obsahu se extrakce opakuje i vícenásobně.


### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Citronan sodný ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ).
- Citronan sodný ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ),  $c(C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O) = 0,05 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: V asi 400 ml vody (3) se rozpustí 14,705 g citronanu sodného (1) a doplní na objem 1000 ml.
- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- Kit pro stanovení proteinů, Bio-Rad Protein Assay, 600-0005, Bio-RAD, USA.

### 4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy.
- Autokláv.
- Centrifuga Jouan C3.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – Analýza půd</b>  30982.1 – Stanovení glomalínu v půdách Bradfordovou metodou	Vydání	1
		Revize	0


- 4 Mikrodestičkový fotometr (např. Versamax, Molecular Devices, USA).
- 5 Třepačka mikrodestiček.
- 6 Filtrační papír Whatman #1.
- 7 Mikrodestičky, 96-jamkové.

## 5 Postup

Do autoklávatelné centrifugační zkumavky se naváží 1 g půdy a přidá se 8 ml roztoku citronanu sodného (2). Autoklávuje se 60 min při 120 °C. Poté se vzorky odstředí 15 min při 3800 ot./min a supernatant obsahující glomalin se oddělí (uchovává se při 4°C). Přidá se 80 ml roztoku citronanu sodného (2) a celý proces se opakuje, dokud nemá supernatant stálou slámovou barvu (max. 8 ×, v případě lesních půd až 11 ×). Výsledný objem se stanoví pomocí odměrného válce, hodnota se využívá při přepočtu obsahu glomalínu z µg/ml (naměřená hodnota) na mg/g (hodnota glomalínu v půdě).

## 6 Měření

Stanovení koncentrace proteinů v roztoku je založeno na Bradfordově metodě za použití komerčního kitu Bio-Rad Protein Assay od firmy Bio-RAD. K přípravě kalibrační křivky v rozsahu (0 – 300) µg/ml se používá bovinní sérum albumin (BSA). Analýza se provádí podle instrukcí výrobce. Ke 4 ml zásobního roztoku reakčního činidla, Dye Reagent Concentrate, se přidá 16 ml vody (3). Roztok se promíchá a zfiltruje přes filtr Whatman #1. Tento pracovní roztok činidla se připravuje vždy čerstvý. Do jamky mikrodestičky se pipetuje 10 µl standardu nebo vzorku, vždy ve třech opakováních a přidá se 200 µl pracovního roztoku reakčního činidla. Po napipetování se roztoky promíchají 30 s na třepačce mikrodestiček při frekvenci 600 kyvů/min. Měří se při 595 nm ihned po promíchání a poté každých 5 min až do 45. min. Koncentrace proteinů se stanoví výpočtem z kalibrační křivky získané lineární regresí s kvadratickým členem. Po skončení měření jsou hodnoty koncentrací vyneseny do grafu s cílem zjistit stabilitu zbarvení. Pro hodnocení se vezmou data z 15. min, pokud došlo k náhlému vzestupu absorbance díky vzniku sraženiny, použijí se data z předchozího měření. U vzorků lesních půd je potřeba výluhy před stanovením naředit roztokem citronanu sodného (2) (3 ×).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – Analýza půd</b>  30982.1 – Stanovení glomalínu v půdách Bradfordovou metodou	Vydání	1
		Revize	0

## 7 Výpočty

$$C = (A \times B)/1000$$

**C** hodnota glomalínu v půdě (mg/g),

**A** naměřená hodnota glomalínu (μg/ml),

**B** výsledný objem supernatantu (ml).

## 8 Literatura

1. Janos D.P., Garamszegi S., Beltran B, (2008): Glomalin extraction and measurement, *Soil Biology & Biochemistry* 40 (2008) 729-729, Department of Biology, University of Miami
2. Vondrášková Š., (2008): Americký výzkum výskytu a působení glomalínu v půdě.
3. Wright, S.F., Jawson L., (2001): A pressure cooker method to extract glomalin from soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.* (65)6:1734-1735