

## **Národní referenční laboratoř**

# **Bulletin 2019**

**Ročník XXIII, číslo 2/2019**

**Brno 2019**

- 1 Ověření možnosti stanovení dalších rizikových prvků (Co, Be, V, Mo) v půdním extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES**  
Eva Čižmárová, Elena Obdržálková, Eva Urbánková,  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno  
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
  
- 2 Zavedení kvalitativního stanovení GMO sóji MON 89788 pomocí qPCR**  
Jiří Čuhel  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB  
Hroznová 2, 656 06 Brno 23
  
- 3 Zavedení kvalitativního stanovení GMO kukuřice MON 810 pomocí qPCR**  
Jiří Čuhel  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB  
Hroznová 2, 656 06 Brno 34

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# **Ověření možnosti stanovení dalších rizikových prvků (Co, Be, V, Mo) v půdním extraktu podle Mehlich 3 metodou ICP-OES**

*Eva Čižmárová, Elena Obdržálková, Eva Urbánková*

*Statistické zpracování dat: Stanislav Malý*

## **1 Úvod**

Pro sledování obsahu rizikových prvků a porovnání vzájemných korelací byly vybrány následující 2 typy extrakčních činidel, které se v Národní referenční laboratoři ÚKZÚZ Brno běžně používají. Extrakce podle Mehlich 3 se používá v rámci agrochemického zkoušení zemědělských půd (AZPP) pro stanovení obsahu základních živin a v rámci rozšířeného stanovení mikroprvků. Dále se běžně provádí stanovení celkových obsahů prvků v půdách po mineralizaci horkou lučavkou královskou. Při překročení indikačních hodnot, stanovených podle Vyhlášky MŽP č. 153/2016 Sb. o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy, se provede kontrolní analýza půdního vzorku po extrakci 1M dusičnanem amonným.

V případě extrakčního činidla Mehlich 3 se rizikové prvky nestanovují zcela běžně, ale metoda může sloužit jako vhodná screeningová metoda pro orientační zjištění obsahu rizikových prvků v rámci kompletního rozboru AZPP. Ze systému AZPP je možné potenciálně otestovat půdní vzorky, u kterých by byl předpoklad, že mohou být kontaminovány uvedenými prvky. Extrakční metoda Mehlich 3 je z hlediska laboratorního provozu podstatně ekonomicky i laboratorním prováděním méně náročná než mineralizace půd v lučavce královské a také nezatěžuje tolik životní prostředí používanými silnými minerálními kyselinami jako lučavka královská. Z tohoto pohledu se extrakce půd činidlem Mehlich 3 jeví jako vhodná alternativa k odhalení prvotního zjištění zvýšených obsahů rizikových prvků v půdách.

Cílem této práce je rozšíření možnosti stanovení dalších rizikových prvků Be, Co, V, Mo v půdním extrakčním činidlem Mehlich 3 metodou ICP-OES a možnost stanovení přepočtových pracovních preventivních hodnot pro tyto prvky. Dále byly ověřeny a zpřesněny stávající regresní závislosti pro prvky As, Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn vyjadřující vzájemnou korelaci mezi extrakčním činidlem Mehlich 3 a lučavkou královskou.

## **2 Experimentální část**

Příprava půdních extraktů a analýzy všech půdních vzorků byly prováděny podle metodik JPP ÚKZÚZ Analýza půd I, II. Měření půdních extraktů a mineralizátů na obsahy rizikových prvků bylo provedeno technikou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) s využitím spektrometru s radiálním pozorováním plazmatu SPECTROBLUE (SPECTRO, Německo).

### **2.1 Extrakce půd podle Mehlicha 3 (JPP ÚKZÚZ Analýza půd I, postup č. 30068.1)**

Půda se extrahuje kyselým roztokem, který obsahuje fluorid amonný pro zvýšení rozpustnosti různých forem fosforu vázaných na hliník. V roztoku je přítomen i dusičnan amonný, který příznivě ovlivňuje desorpci draslíku, hořčíku a vápníku. Kyselá reakce vyluhovacího roztoku je nastavena kyselinou octovou a kyselinou dusičnou. Přítomnost EDTA zajišťuje dobrou uvolnitelnost nutričně významných mikroelementů.

### **2.2 Mineralizace půd lučavkou královskou (JPP ÚKZÚZ Analýza půd II, postup č. 30350.1)**

Upravený vzorek půdy se extrahuje směsí koncentrované kyseliny chlorovodíkové a koncentrované kyseliny dusičné (3+1, V+V) za zvýšené teploty.

V tabulce č. 1 jsou uvedeny použité extrakční metody v závislosti na poměru navažovaného vzorku a objemu vyluhovacího roztoku.

**Tabulka č. 1. Použité extrakční metody.**

<b>Metoda</b>	<b>Mehlich 3</b> (CH <sub>3</sub> COOH 0,2M, NH <sub>4</sub> F 0,015M, HNO <sub>3</sub> 0,013M, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0,25M, EDTA 0,001M)	<b>Lučavka královská</b> <b>HCl : HNO<sub>3</sub></b>
<b>Navážka vzorku (g)</b>	<b>10 ± 0,01</b>	<b>5 ± 0,001</b>
<b>Doba extrakce (min)</b>	<b>10</b>	<b>120</b>
<b>Půda: vyluhovací roztok (g : ml)</b>	<b>10 : 100</b>	<b>5 : 100</b>
<b>Teplota při extrakci (°C)</b>	<b>20 ± 2</b>	<b>var</b> <b>140 - 150</b>

### **2.3 Ověření možnosti stanovení obsahu Co, V, Be, Mo v půdním extraktu Mehlich 3 metodou ICP-OES**

Stanovení obsahu Co, Be, V, Mo v půdních extraktech Mehlich 3 bylo ověřeno výběrem vhodných vlnových délek a úpravou spektrálního pozadí na ICP-OES spektrometru s radiálním upořádáním plazmatu SpectroBlue (Německo).

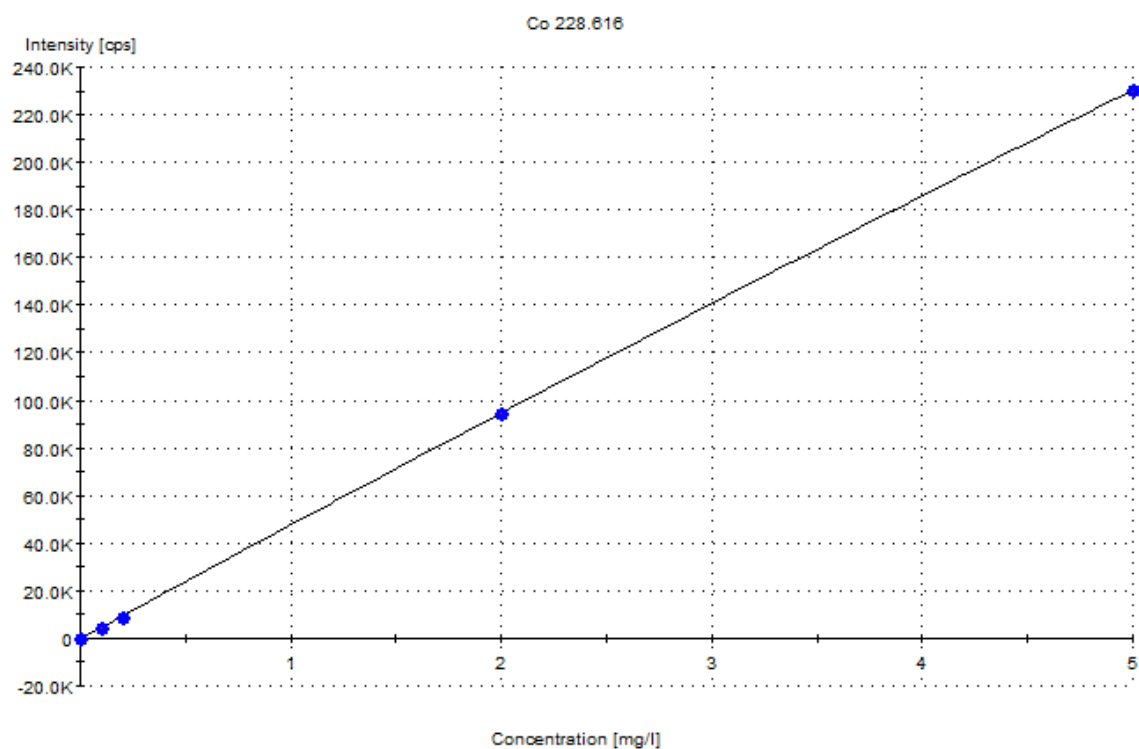
Směsné kalibrační roztoky pro uvedené prvky byly připraveny v matrici extrakčního činidla v rozsahu koncentrací (0; 0,1; 0,2; 2; 5) mg/l jednotlivých prvků.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny vybrané vlnové délky pro měření obsahu Co, Be, V, Mo metodou ICP-OES (platí pro přístroj SpectroBlue). Dále jsou graficky prezentovány kalibrační křivky pro Co, Be, V, Mo na příslušných vlnových délkách.

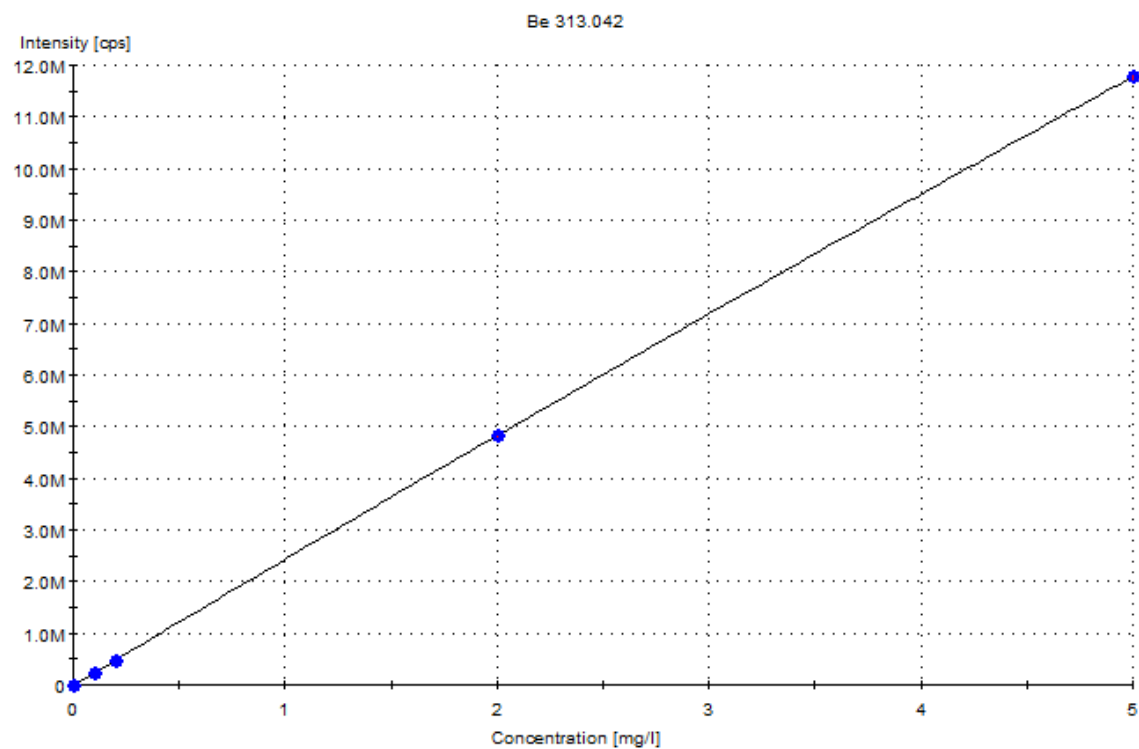
**Tabulka č. 2. Vybrané vlnové délky pro měření Co, Be, V, Mo v extraktu Mehlich 3 na ICP-OES spektrometru SpectroBlue (I atomová čára daného prvku, II iontová čára daného prvku).**

<b>Prvek</b>	<b>Vlnová délka (nm)</b>	<b>Typ čáry</b>
<b>Co</b>	228,616	II
<b>Be</b>	313,042	II
<b>V</b>	292,464	II
<b>Mo</b>	202,095	II

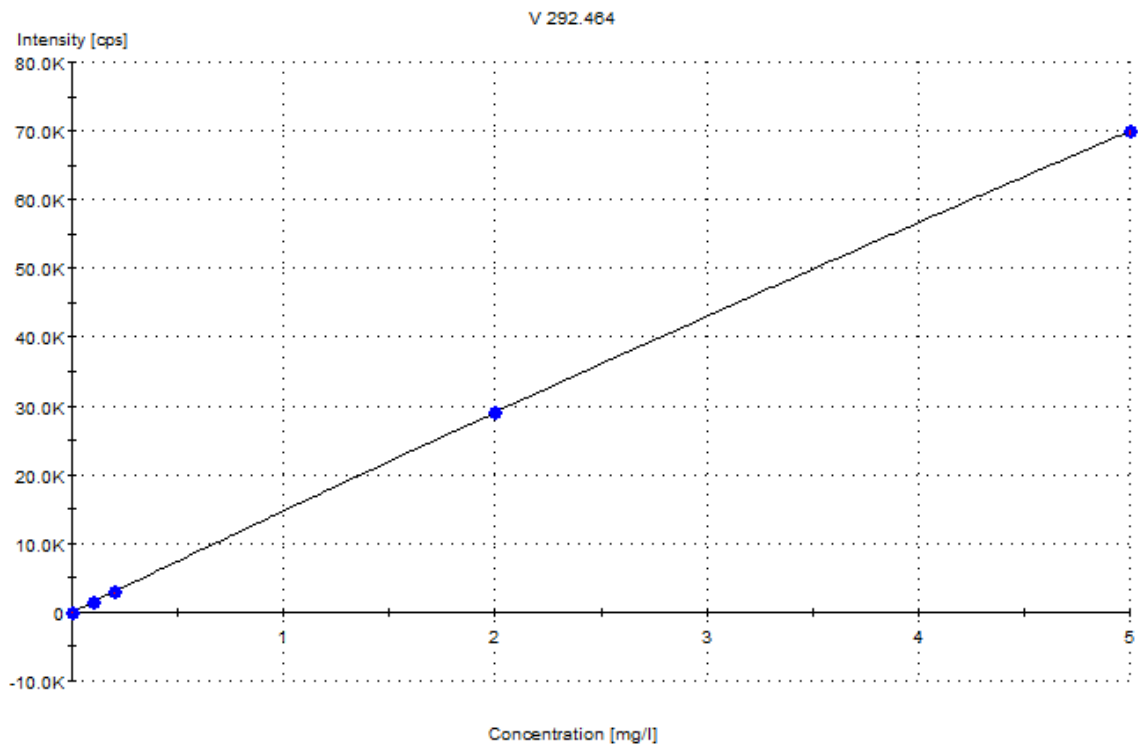
## Co 228,616



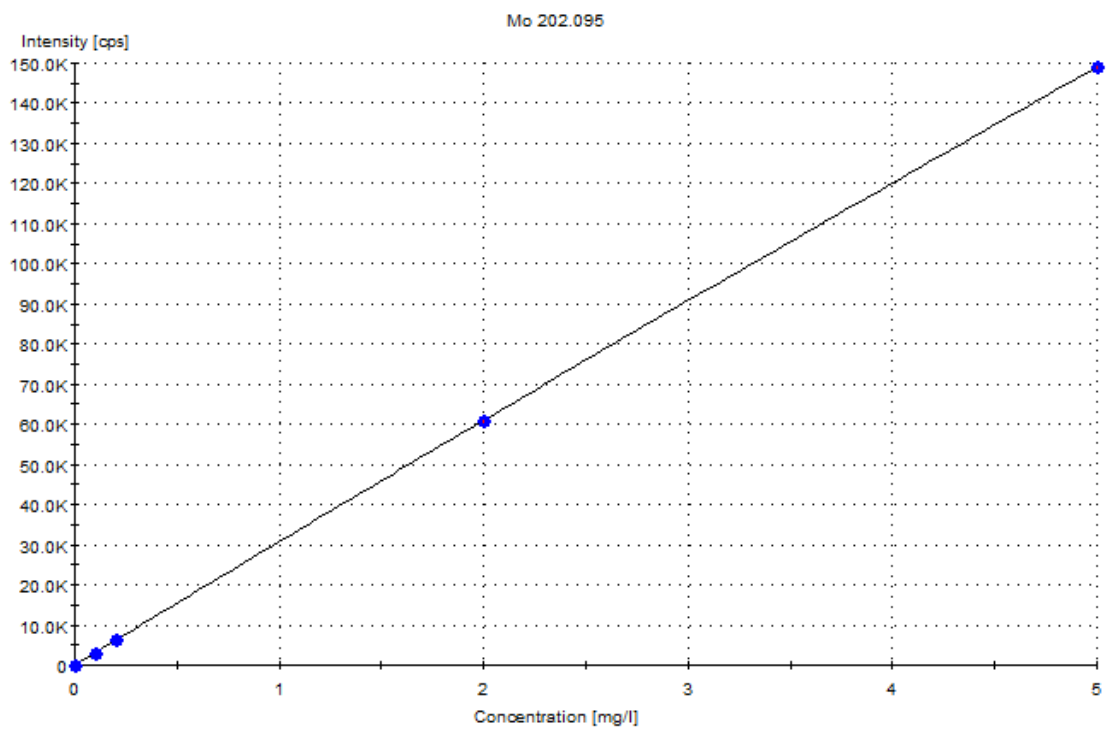
## Be 313,042



## V 292,464



## Mo 202,095



### 3.4 Ověření výtěžnosti standardního přídávku pro stanovení As, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, V, Be, Mo v půdním extraktu Mehlich 3 metodou ICP-OES

Pro měření obsahu vybraných rizikových prvků (As, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Be, V) v extrakčním činidle Mehlich 3 je vhodné připravit směsnou sadu kalibračních roztoků v rozsahu koncentrací (0; 0,1; 0,2; 2; 5) mg/l. Tento postup měření je již zahrnutý pro uvedené prvky v revizi kapitoly č. 30074.1 Analýza extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES podle JPP ÚKZÚZ Analýza půd I (4.vydání, 2016 Brno, revize kapitoly 34-30074.1, platná od 3.3.2017), kde jsou rovněž uvedeny pracovní podmínky měření na ICP-OES spektrometru.

Při měření extraktů Mehlich 3 reálných půdních vzorků na obsah Mo bylo zjištěno, že se tento prvek u všech vzorků nachází pod mezí stanovitelnosti metody ICP-OES, což je 0,2 mg/kg. V tabulce č. 3 je uvedeno vyhodnocení výtěžnosti pro standardní přídavek ke vzorkům IRM používaným při rozšířeném stanovení AZPP (IRM 5012, IRM 5513, IRM 5617). Dále byl standardní přídavek ověřen u 2 vzorků běžných zemědělských půd ze systému AZPP a u vzorku z mezilaboratorního porovnání programu WEPAL 2017/1. Metoda standardního přídávku byla provedena pipetováním objemu 100 µl směšného standardního roztoku prvků (o koncentraci uvedených prvků 100 mg/l) k 10 ml extraktu vzorku Mehlich 3. Standardní přídavek sledovaných prvků byl ve výsledné koncentraci každého prvku 1 mg/l.

Výsledky výtěžnosti jednotlivých přídávků jsou uvedeny v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3: Výtěžnost standardního přídávku o výsledné koncentraci sledovaných prvků 1 mg/l k extraktům vzorků–běžné půdy AZPP, IRM, WEPAL v činidle Mehlich 3**

Vzorek	Cd	As	Pb	Ni	Cr	Mo	Co	Be	V
	<b>214.438</b>	<b>189.042</b>	<b>220.353</b>	<b>231.604</b>	<b>267.716</b>	<b>202.095</b>	<b>228.616</b>	<b>313.042</b>	<b>292.464</b>
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
<b>IRM 5012</b>	0,010	0,004	0,518	0,366	0,030	-0,006	0,205	0,018	0,177
<b>IRM 5012+1ppm (MIX+As,Be,Mo)</b>	1,036	1,036	1,658	1,452	1,026	1,015	1,270	0,971	1,246
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>102,6</b>	<b>103,1</b>	<b>113,9</b>	<b>108,6</b>	<b>99,6</b>	<b>102,0</b>	<b>106,5</b>	<b>96,2</b>	<b>106,9</b>
<b>IRM 5513</b>	0,013	-0,012	0,064	0,269	0,069	-0,007	0,300	0,021	0,069
<b>IRM 5513 + 1 pm (MIX+As,Be,Mo)</b>	1,025	1,017	1,156	1,329	1,046	0,988	1,331	0,973	1,124
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>101,3</b>	<b>102,9</b>	<b>109,2</b>	<b>106,0</b>	<b>97,7</b>	<b>99,5</b>	<b>103,1</b>	<b>96,1</b>	<b>105,5</b>



<b>IRM 5617</b>	0,019	0,015	0,341	0,494	0,039	-0,006	0,172	0,018	0,131
<b>IRM 5617 + 1ppm (MIX+As,Be,Mo)</b>	1,032	1,044	1,431	1,546	1,027	1,010	1,213	0,988	1,178
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>101,4</b>	<b>103,0</b>	<b>109,0</b>	<b>105,2</b>	<b>98,8</b>	<b>101,7</b>	<b>104,0</b>	<b>97,9</b>	<b>104,7</b>
<b>143</b>	0,014	0,133	0,721	0,093	0,031	-0,007	0,082	0,023	0,089
<b>143 + 1 ppm (MIX+As,Be,Mo)</b>	1,011	1,167	1,809	1,126	0,987	0,980	1,098	1,007	1,133
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>99,7</b>	<b>103,4</b>	<b>108,7</b>	<b>103,4</b>	<b>95,6</b>	<b>98,7</b>	<b>101,6</b>	<b>99,3</b>	<b>104,4</b>
<b>160</b>	0,022	0,090	1,095	0,164	0,046	-0,007	0,080	0,025	0,157
<b>160 + 1 ppm (MIX+Be,As,Mo)</b>	1,063	1,128	2,219	1,238	1,046	1,009	1,130	1,005	1,227
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>104,1</b>	<b>103,8</b>	<b>112,4</b>	<b>107,4</b>	<b>100,1</b>	<b>101,6</b>	<b>105,0</b>	<b>98,9</b>	<b>107,0</b>
<b>38 WEPAL 8+1ppm (MIX+Be,As,Mo)</b>	0,858	0,057	0,571	1,599	0,365	0,007	0,067	0,002	0,805
	1,904	1,144	1,646	2,612	1,433	1,082	1,107	1,051	1,831
<b>výtěžnost (%)</b>	<b>104,6</b>	<b>108,7</b>	<b>107,5</b>	<b>101,3</b>	<b>106,7</b>	<b>107,6</b>	<b>104,1</b>	<b>104,9</b>	<b>102,7</b>

Dále jsou uvedeny profily spektrálních čar s odečtem pozadí v jejich spektrálním okolí pro nově stanovované analyty Co, Be, V, Mo na spektrometru ICP-OES SpectroBlue. Jako příklad je pro každý prvek uveden spektrální profil u vzorku č. 38 půdního extraktu Mehlich 3 WEPAL 2017/1 jako samotný extrakt, dále se standardním přídatkem jednotlivých prvků o výsledné koncentraci  $c = 1 \text{ mg/l}$  a ve srovnání se standardním kalibračním roztokem M3TK3 ( $c = 2 \text{ mg/l}$ ).

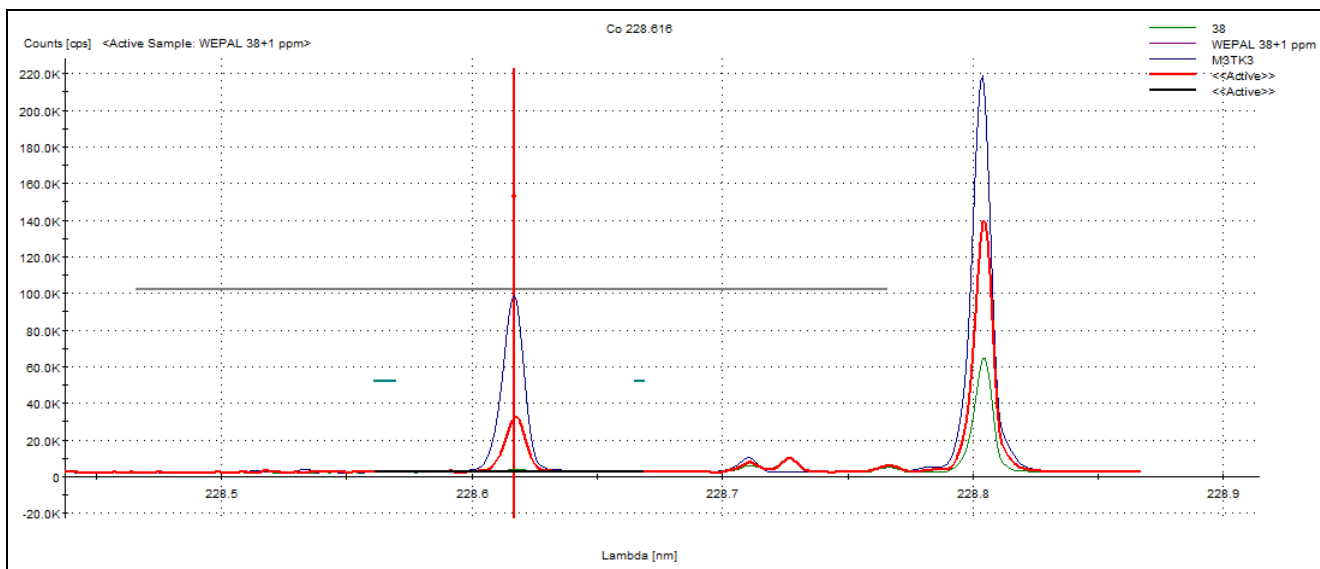
Legenda ke snímaným profilům čar

Zeleně: neznámý vzorek č. 38

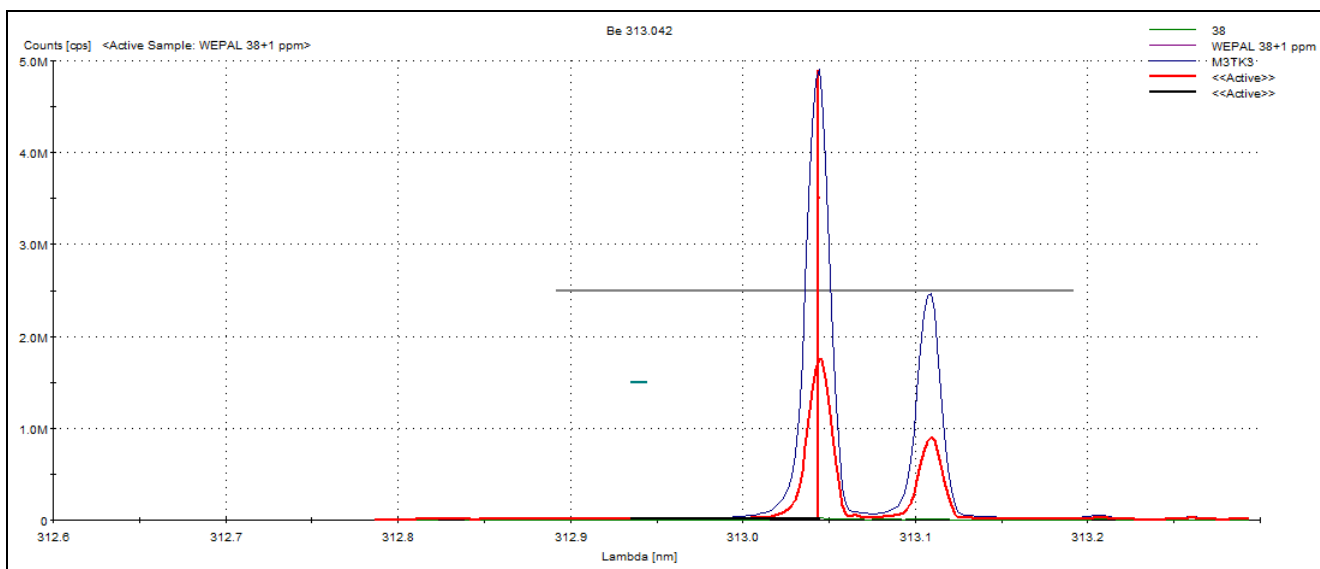
Červeně: neznámý vzorek č. 38 + standardní přídatek

Modře: kalibrační standardní roztok o koncentraci prvku  $2 \text{ mg/l}$  M3TK3

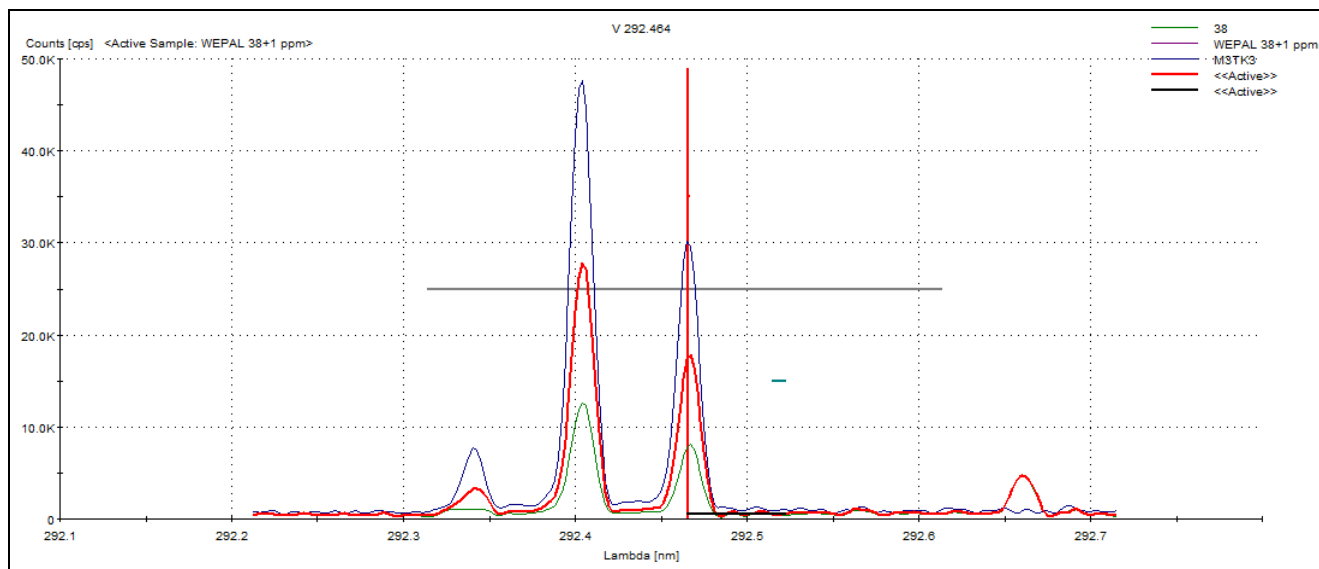
## Co 228,616



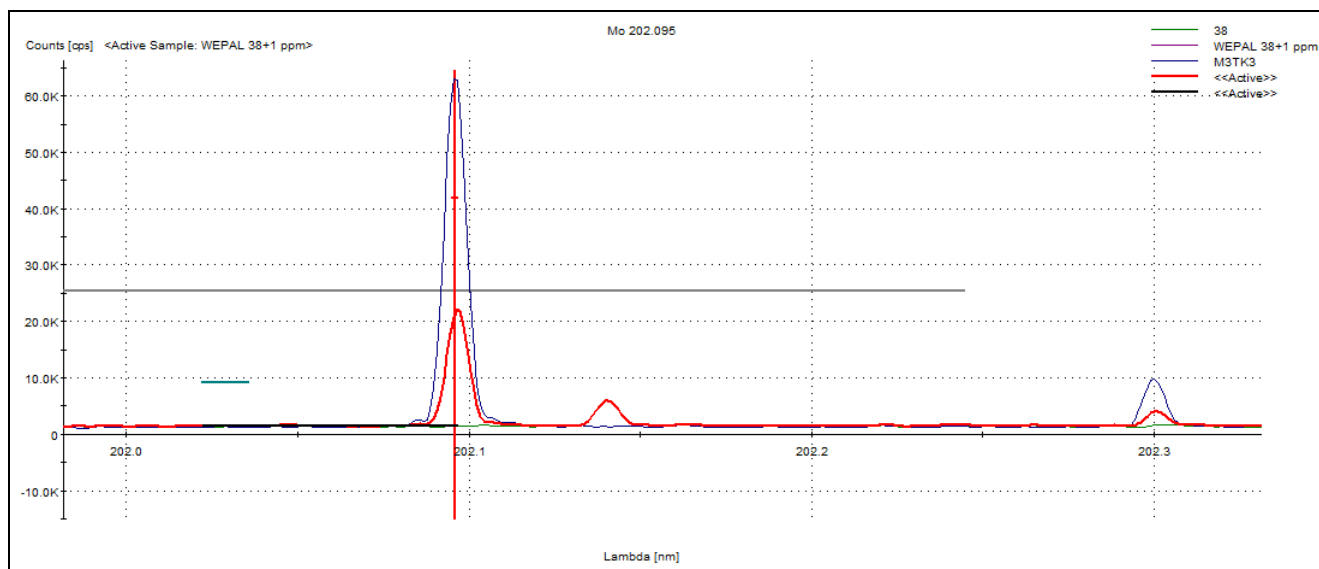
## Be 313,042



## V 292,464



## Mo 202,095



V tabulce č. 4 jsou uvedeny reálné meze stanovitelnosti sledovaných rizikových prvků po extrakci půd činidlem Mehlich 3 a po mineralizaci lučavkou královskou, které byly stanoveny ze souboru slepých pokusů v programu Effvalidation verze 4.0.

**Tabulka č. 4. Meze stanovitelnosti (MS) použitých extrakčních metod s využitím optické instrumentace ICP-OES (SpectroBlue, Německo), hodnoty uvedeny v mg/kg.**

<b>Prvek</b>	<b>Mehlich 3 (mg/kg)</b>	<b>Lučavka královská (mg/kg)</b>
<b>As</b>	0,2	1,5
<b>Cd</b>	0,1	0,15
<b>Pb</b>	0,5	2,0
<b>Cr</b>	0,3	1,5
<b>Ni</b>	0,2	1,5
<b>Cu</b>	0,3	1,5
<b>Zn</b>	1,0	5,0
<b>Co</b>	0,2	0,5
<b>V</b>	0,3	0,5
<b>Be</b>	0,2	0,05
<b>Mo</b>	0,2	0,5

## **4 Statistické zpracování dat, souhrnné výsledky**

Pro vyhodnocení regresní analýzy byly použity alternativní statistické modely regrese OLS (ordinal least square regression), MA (major axis regression), RMA (reduced major axis regression), které vykazovaly srovnatelné výsledky odhadu směrnice lineární regresní přímky. Pro matematický přepočítání kritických hodnot byla použita lineární regresní závislost metodou nejmenších čtverců (OLS). Regresní analýzy byly provedeny s využitím statistického programu R 3.2.3.

### **4.1 Vzájemná korelace mezi extrakčními činidly Mehlich 3 a lučavka královská pro Be, Co, V (aktualizace pro As, Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn)**

V souvislosti s aktuální platností Vyhlášky č. 153/2016 Sb, která specifikuje nové preventivní a indikační hodnoty obsahů rizikových prvků po extrakci půd lučavkou královskou, byla v rámci tohoto vývojového úkolu zpracována regresní analýza mezi činidly Mehlich 3 a lučavka královská. Tyto závislosti byly následně použity pro matematický přepočítání

preventivních hodnot obsahů rizikových prvků v zemědělských půdách pro extrakční činidlo Mehlich 3.

Tabulka č. 5 uvádí základní parametry lineárních regresních závislostí vybraných rizikových prvků v půdách extrahovaných v činidlo Mehlich 3 vztažených proti hodnotám rizikových prvků získaných mineralizací v lučavce královské. Datový soubor byl vytvořen z výsledků půdních analýz RKP odběr 2017.

**Tabulka č. 5. Výsledky regresních analýz Mehlich 3 a lučavka královská vzorky z RKP (Registr kontaminovaných ploch 2017).**

OLS (ordinal least square regression)

lineární model  $Y=a+bX$  (Y- Mehlich 3, X- lučavka královská)

n – počet vzorků pro lineární regresi po vyloučení odlehlých bodů

Ni (RKP) – datový soubor z Registru kontaminovaných ploch 2017

Ni (VSE) – datový soubor z BMP+archiv OMPZ+AZZP 2016+RKP 2017

Prvek	Počet vzorků n	a <sub>min</sub> 2,5%	a	a <sub>max</sub> 97,5%	b <sub>min</sub> 2,5%	b	b <sub>max</sub> 97,5%	Korelační koeficient R	Koeficient determinace R <sup>2</sup>
<b>As</b>	381	0,0047	0,0561	0,1075	0,0322	0,0355	0,0388	0,7323	0,5362
<b>Cd</b>	486	0,0242	0,0309	0,0377	0,5058	0,5270	0,5482	0,9116	0,8311
<b>Cr</b>	599	0,1535	0,1712	0,1890	0,0014	0,0018	0,0022	0,3356	0,1126
<b>Cu</b>	595	-2,3713	-1,8531	-1,3349	0,2863	0,3027	0,3191	0,8303	0,6895
<b>Ni (RKP)</b>	597	0,5310	0,6957	0,8604	0,0553	0,0616	0,0679	0,6209	0,3855
<b>Ni (VSE)</b>	1286	0,7663	0,9048	1,0432	0,0377	0,0431	0,0485	0,4011	0,1609
<b>Pb</b>	584	2,4794	2,9972	3,5150	0,1533	0,1748	0,1963	0,5518	0,3045
<b>Zn</b>	597	-2,0162	-0,9905	0,0351	0,0852	0,0984	0,1117	0,5133	0,2635
<b>Co</b>	566	0,4215	0,5761	0,7306	0,0714	0,0854	0,0994	0,4504	0,2028
<b>V</b>	599	0,7148	0,8183	0,9219	0,0165	0,0182	0,0199	0,6455	0,4166
<b>Be</b>	342	-0,0599	-0,0346	-0,0093	0,2800	0,2996	0,3192	0,8530	0,7276

Tabulka č. 6 uvádí pro srovnání parametry lineárních regresních závislostí rizikových prvků (As, Cd, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb) získaných z původního datového souboru výsledků půdních analýz ze systému BMP a archivu OMPZ (viz výsledky a závěry VÚ 30.01/2015).

**Tabulka č. 6. Výsledky regresních analýz Mehlich 3 a lučavka královská vzorky z BMP a archivu OMPZ - původní regresní modely z roku 2016.**

OLS (ordinal least square regression)

lineární model  $Y=a+bX$  (Y- Mehlich 3, X- lučavka královská)

n – počet vzorků pro lineární regresi po vyloučení odlehlých bodů

Prvek	Počet vzorků n	a <sub>min</sub> 2,5%	a	a <sub>max</sub> 97,5%	b <sub>min</sub> 2,5%	b	b <sub>max</sub> 97,5%	Korelační koeficient R	Koeficient determinace R <sup>2</sup>
As	177	-0,3296	-0,1925	-0,0554	0,04166	0,0478	0,0538	0,7599	0,5774
Cd	224	0,0163	0,0350	0,0537	0,5430	0,5837	0,6244	0,8846	0,7825
Cr	271	0,1304	0,1732	0,2159	0,0036	0,0046	0,0056	0,4875	0,2377
Cu	262	-3,7425	-2,8175	-1,8926	0,2923	0,3219	0,3515	0,7989	0,6383
Ni	282	-	-	-	-	-	-	0,0969	0,00939
Pb	253	-1,9952	-0,7627	0,4698	0,2818	0,3042	0,3265	0,8608	0,7411
Zn	242	-9,9943	-7,7636	-5,5329	0,1678	0,1898	0,2118	0,7387	0,5457

#### 4.2 Stanovení preventivních hodnot pro obsahy rizikových prvků extrahovaných v půdním extrakčním činidle Mehlich 3

Preventivní hodnoty obsahů rizikových prvků v zemědělské půdě zjištěné extrakcí lučavkou královskou (mg/kg sušiny) podle Vyhlášky č. 153/2016 Sb. jsou uvedeny v tabulce č. 7. Odhad preventivních hodnot obsahů rizikových prvků As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, V, Be, Co v půdách zjištěných extrakcí činidlem Mehlich 3, které jsou na základě získaných regresních závislostí vztaženy na preventivní hodnoty v lučavce královské podle Vyhlášky č. 153/2016 Sb., uvádí tabulka č. 8. Pro matematický přepočítání preventivních hodnot byla použita lineární regresní závislost metodou nejmenších čtverců (OLS). V případě některých prvků, u kterých nebyly regresní závislosti zcela akceptovatelné (např. Cr, Ni, Co, V), byl pro přepočítání

preventivních hodnot a jejich hrubý odhad použitý medián výsledků datového souboru.

**Tabulka č. 7. Preventivní hodnoty obsahů rizikových prvků v zemědělské půdě zjištěné extrakcí lučavkou královskou (mg/kg sušiny), viz znění Vyhlášky č. 153 /2016 Sb. z 9.5.2016.**

Kategorie půd	Preventivní hodnota (mg/kg) lučavka královská										
	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
<b>Běžné půdy</b>	20	2,0	0,5	30	90	60	0,3	50	60	130	120
<b>Lehké půdy</b>	15	1,5	0,4	20	55	45	0,3	45	55	120	105

**Tabulka č. 8. Odhad preventivních hodnot obsahů rizikových prvků v zemědělské půdě po extrakci půd v činidle Mehlich 3 (vztaženo na preventivní hodnoty v lučavce královské podle Vyhlášky č. 153/2016 Sb.)**

Kategorie půd	Preventivní hodnota (mg/kg) Mehlich 3										
	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
<b>Běžné půdy</b>	0,7-1,0	0,6	0,3	3,75 hrubý odhad	0,6 hrubý odhad	18-20		4,5 hrubý odhad	18-20	4,5 hrubý odhad	20-25
<b>Lehké půdy</b>	0,5-0,7	0,45	0,2	2,5 hrubý odhad	0,4 hrubý odhad	13-15		4,0 hrubý odhad	15-17	4,0 hrubý odhad	10-15

V tabulce č. 9 jsou uvedeny parametry deskriptivní statistiky souboru experimentálních dat, získaného z půdních vzorků Registru kontaminovaných ploch 2017, které byly vyhodnoceny v programu Microsoft Excel 2010.

**Tabulka č. 9. Popisná statistika souboru experimentálních dat (v mg/kg) n- počet vzorků, LQ- dolní kvartil, UQ-horní kvartil.**

Prvek		M 3	lučavka královská	poměr lučavka / M 3
<b>As</b> n=382	<b>medián</b>	0,400	10,065	25,2
	<b>min</b>	0,150	2,748	
	<b>max</b>	4,540	72,830	
	<b>průměr</b>	0,510	12,649	24,8
	<b>LQ</b>	0,300	8,217	
	<b>UQ</b>	0,558	13,853	
<b>Cd</b> n=489	<b>medián</b>	0,156	0,236	1,5
	<b>min</b>	0,100	0,150	
	<b>max</b>	1,698	2,512	
	<b>průměr</b>	0,184	0,284	1,5
	<b>LQ</b>	0,132	0,200	
	<b>UQ</b>	0,189	0,296	
<b>Cr</b> n=599	<b>medián</b>	0,215	31,590	146,9
	<b>min</b>	0,046	5,607	
	<b>max</b>	1,401	225,300	
	<b>průměr</b>	0,238	36,855	154,7
	<b>LQ</b>	0,158	23,080	
	<b>UQ</b>	0,296	41,910	
<b>Cu</b> n=596	<b>medián</b>	3,379	17,715	5,2
	<b>min</b>	0,415	4,024	
	<b>max</b>	81,210	235,800	



	<b>průměr</b>	5,321	23,481	4,4
	<b>LQ</b>	2,394	13,110	
	<b>UQ</b>	4,845	25,740	

<b>Prvek</b>		<b>M 3</b>	<b>lučavka královská</b>	<b>Poměr lučavka / M 3</b>
<b>Ni</b> n=599	<b>medián</b>	2,020	20,930	10,4
	<b>min</b>	0,230	2,998	
	<b>max</b>	12,170	176,400	
	<b>průměr</b>	2,150	23,542	10,9
	<b>LQ</b>	1,025	14,920	
	<b>UQ</b>	2,960	28,060	
<b>Pb</b> n=585	<b>medián</b>	6,530	19,960	3,1
	<b>min</b>	0,540	4,930	
	<b>max</b>	27,310	96,240	
	<b>průměr</b>	6,869	21,935	3,2
	<b>LQ</b>	4,770	16,460	
	<b>UQ</b>	8,430	24,450	
<b>Zn</b> n=599	<b>medián</b>	4,701	70,310	15,0
	<b>min</b>	1,372	15,300	
	<b>max</b>	137,200	305,400	
	<b>průměr</b>	6,424	72,830	11,3
	<b>LQ</b>	3,434	54,140	
	<b>UQ</b>	6,808	88,225	
<b>Co</b> n=599	<b>medián</b>	1,310	10,200	7,8
	<b>min</b>	0,220	1,528	
	<b>max</b>	6,490	46,520	
	<b>průměr</b>	1,498	11,449	7,6
	<b>LQ</b>	0,860	7,346	
	<b>UQ</b>	1,975	13,660	
<b>Be</b>	<b>medián</b>	0,300	1,168	3,9
	<b>min</b>	0,200	0,432	

<b>n=346</b>	<b>max</b>	1,460	3,778	
	<b>průměr</b>	0,344	1,245	3,6
	<b>LQ</b>	0,233	0,940	
	<b>UQ</b>	0,370	1,455	

<b>Prvek</b>		<b>M 3</b>	<b>lučavka královská</b>	<b>poměr lučavka / M 3</b>
<b>V n=599</b>	<b>medián</b>	1,500	43,290	28,9
	<b>min</b>	0,310	7,313	
	<b>max</b>	7,780	251,900	
	<b>průměr</b>	1,733	50,282	29,0
	<b>LQ</b>	1,130	30,585	
	<b>UQ</b>	2,145	59,120	

Dále jsou uvedeny graficky lineární regresní závislosti mezi extrakčními činidly Mehlich 3 a lučavka královská pro sledované rizikové prvky Co, Be, V, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, získané ze vzorků analyzovaných v rámci odběru 2017 ze systému Registru kontaminovaných ploch.

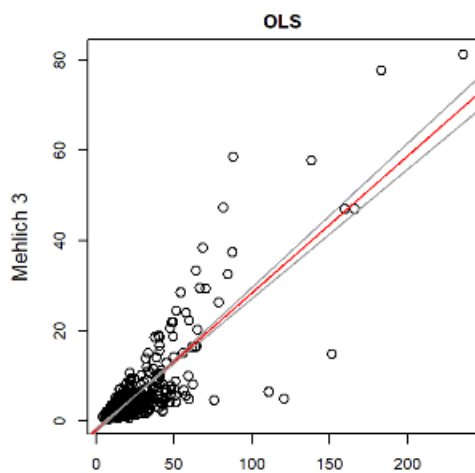
# Grafické znázornění lineárních regresních závislostí rizikových prvků: Mehlich 3 vs. lučavka královská

(datový soubor půdy odběr RKP 2017)

OLS (ordinal least square regression)

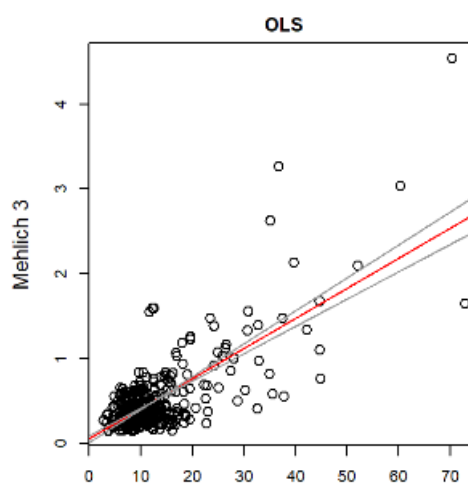
lineární model  $Y=a+bX$  (Y- Mehlich 3, X- lučavka královská)

## Cu



lučavka královská

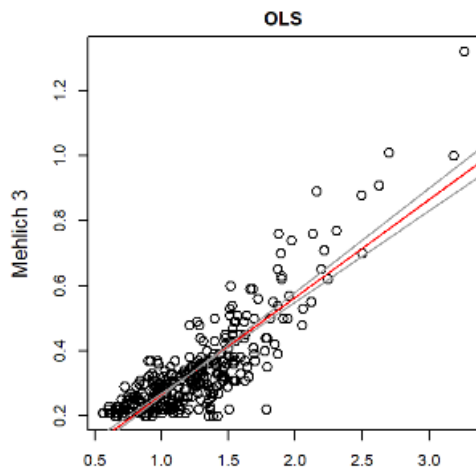
## As



lučavka královská

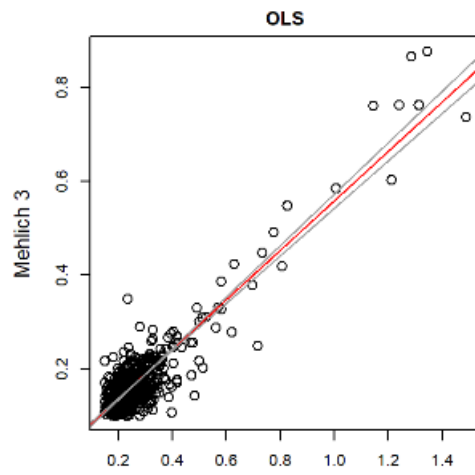
## Be

## Cd



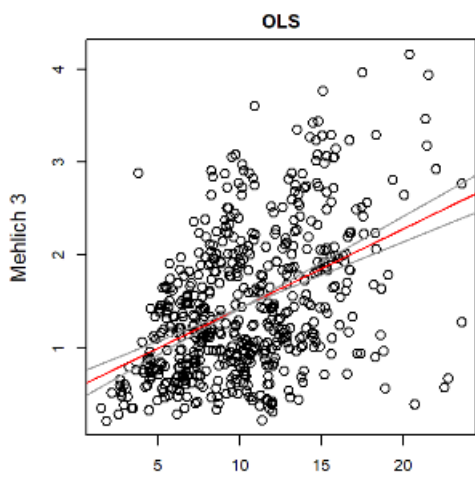
lučavka královská

**Cu**



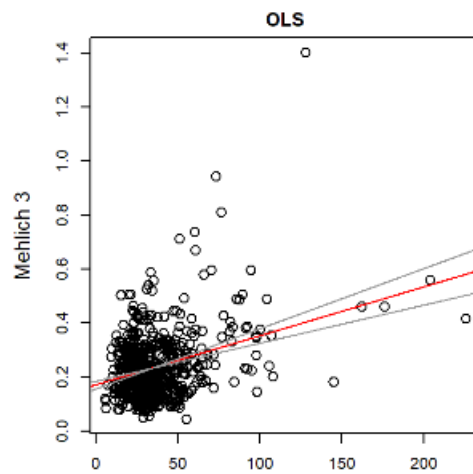
lučavka královská

**Zn**



lučavka královská

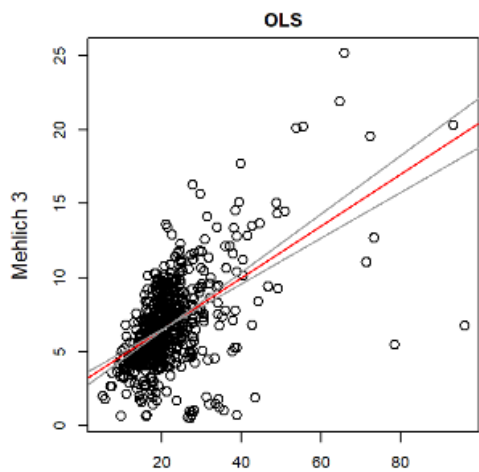
**Co**



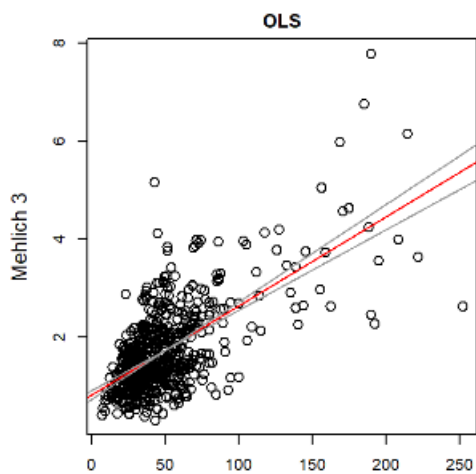
lučavka královská

**Cr**

**Pb**

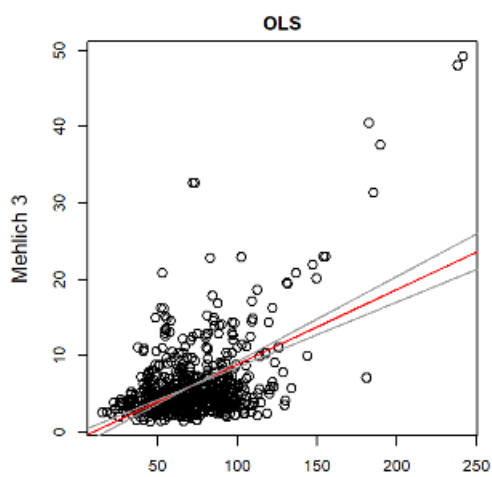


lučavka královská



lučavka královská

**Zn**

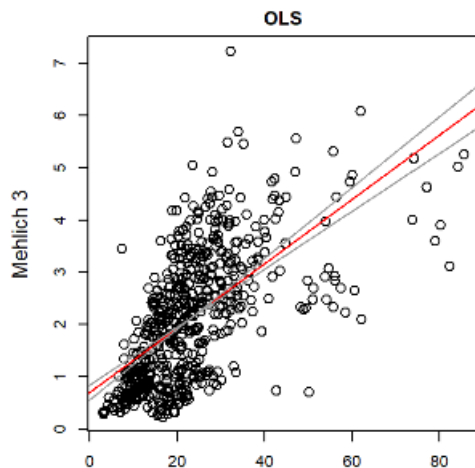


lučavka královská

**Ni**

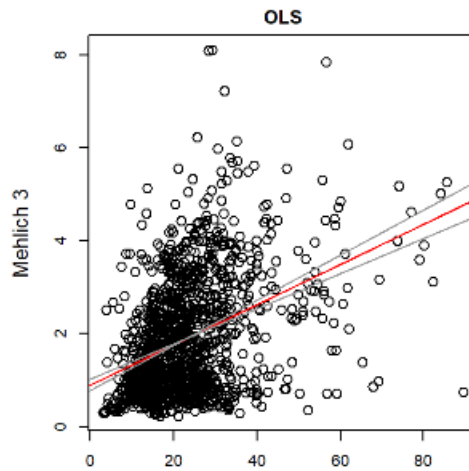
**Ni**

**(RKP 2017)**



**lučavka královská**

**(BMP, OMPZ, AZPP 2016, RKP 2017)**



**lučavka královská**

## 5 Závěr

Byla ověřena možnost stanovení dalších rizikových prvků po extrakci půd činidlem Mehlich 3. Nově byly v půdním extraktu Mehlich 3 stanovovány prvky Co, Be, V, Mo. Dále byly nově vyhodnoceny a zaktualizovány již stávající lineární regresní závislosti pro prvky As, Cd, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb. Pro všechny uvedené prvky s výjimkou Mo byly na základě regresních závislostí mezi činidlem Mehlich 3 a lučavkou královskou stanoveny přepočtové pracovní preventivní hodnoty, které lze potenciálně využít pro hodnocení půdní kontaminace. Pro ověření možnosti rozšířeného stanovení dalších prvků (Co, Be, V, Mo) v extrakčním činidle Mehlich 3 byly analyzovány vzorky odebrané v roce 2017 v rámci Registru kontaminovaných ploch. Tyto analýzy byly také použity na zpřesnění regresních závislostí vyjadřujících vzájemný vztah mezi činidlem Mehlich 3 a lučavkou královskou pro prvky As, Cd, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb. Ověření možnosti stanovení dalších rizikových prvků (Co, Be, V, Mo) v půdním extrakčním roztoku Mehlich 3 bylo provedeno optimalizací metody stanovení na ICP-OES spektrometru a vyhodnocením výtěžnosti standardního přídatku uvedených prvků k reálnému půdnímu extraktu vzorku. Výtěžnosti standardního přídatku se pohybovaly

pro Co v rozmezí (101 – 106) %, pro Be (96 – 105) %, pro V (102 – 107) %, pro Mo (99 – 107) %.

Analytické rozbory půdních vzorků ze systému RKP 2017 byly rozděleny mezi pracoviště ONRL Brno, ONRL Opava a NRL Plzeň. Pro účely VÚ byly všechny extrakce a měření půdních vzorků v činidle Mehlich 3 provedeny na ONRL Brno. Mineralizace a měření vzorků v lučavce královské byly rozděleny mezi pracoviště ONRL Brno a NRL Plzeň, které disponují stejným typem optické instrumentace ICP-OES (SpectroBlue, SpectroArcos). Pracoviště ONRL Opava provádí měření obsahu rizikových prvků v činidle Mehlich 3 v rámci své optimalizované metody a podílelo se na provedení části analýz (asi 200 vzorků) pro účely rozšířeného stanovení rizikových prvků v činidle Mehlich 3 ze vzorků Registru kontaminovaných ploch 2017. Výsledky z ONRL Opava nebyly zahrnuty do statistického zpracování z důvodu měření na jiném typu ICP-OES instrumentace (5100VDV, Agilent Technologies), což by mohlo mít vliv na výsledky získaných korelací zejména měřeními nízkých koncentrací požadovaných prvků v extraktech Mehlich 3.

Byla provedena aktualizace původně navržených lineárních regresních modelů z roku 2016 pro prvky As, Cd, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb a nově byly zpracovány lineární regresní závislosti pro prvky Be, Co, V. Z porovnání regresních závislostí získaných v roce 2016 (datový soubor archiv BMP, archiv OMPZ, příp. AZZP 2016) došlo u některých prvků ke změnám v průběhu korelačních závislostí (např. Zn, Pb) vzhledem k regresním závislostem získaným ze souboru výsledků Registru kontaminovaných ploch 2017. Původní předpoklad, že systém RKP bude obsahovat významně kontaminované půdní plochy těmito prvky se zcela nepotvrdil a v odběrech vzorků RKP 2017 nebyly tak významně různorodé vzorky s vysokými koncentracemi prvků, které v původně navržených regresních modelech mohly částečně výsledky korelací ovlivnit.

V případě korelací extrakčních metod Mehlich 3 a lučavka královská byly vyhodnoceny lineární regresní závislosti jako nejlépe akceptovatelné u Cd, Be, Cu, As (pro Cd  $R = 0,91$ ,  $R^2 = 0,83$ , pro Be  $R = 0,85$ ,  $R^2 = 0,73$ , pro As  $R = 0,73$ ,  $R^2 = 0,54$  a pro Cu  $R = 0,83$ ,  $R^2 = 0,69$ ). Méně vypovídající regresní modely pak byly získány pro V, Zn a Pb. U dalších sledovaných rizikových prvků (Cr, Ni, Co) jsou vzájemné korelace velmi nízké nebo téměř žádné (pro Cr,  $R = 0,34$ ,  $R^2 = 0,11$ , pro Ni  $R = 0,40$ ,  $R^2 = 0,16$ , pro Co  $R = 0,45$ ,  $R^2 = 0,20$ ). Z tohoto důvodu byl proveden hrubý odhad preventivních hodnot na základě vztahu mezi mediánem výsledků souboru dat získaných z obou extrakčních činidel. Poměr hodnot mediánu Mehlich 3: lučavka královská byl aktualizován a stanoven pro Cr jako 1 : 150, pro Ni jako 1 : 11 a pro Co jako 1 :

8. V případě Ni byl vyhodnoceny regresní závislosti jak pro datový soubor výsledků Registru kontaminovaných ploch 2017 ( $R = 0,62$ ,  $R^2 = 0,38$ ) tak i pro datový soubor ze všech analyzovaných vzorků za období 2016-2017 (BMP, AZZP, RKP, OMPZ –  $R = 0,40$ ,  $R^2 = 0,16$ ). Vzájemné korelace mezi obsahem Ni v činidlech Mehlich 3 a lučavka královská jsou velmi nízké i pro velký datový soubor analyzovaných vzorků. Pro Ni nebyl nalezen mezi oběma extrakčními postupy akceptovatelný vztah.

Stanovení obsahu Mo metodou Mehlich 3 není vhodné. Toto extrakční činidlo vykazuje pro Mo velmi nízkou extrakční účinnost. Obsahy všech analyzovaných vzorků byly pro Mo pod mezí stanovitelnosti 0,2 mg/kg. Regresní závislosti nebylo možné z tohoto důvodu vyhodnotit.

Zejména v případě Cd je možné metodu Mehlich 3 vhodně využít pro odhalení vyšších obsahů tohoto prvku v zemědělských půdách. Lineární regresní závislost mezi obsahem Cd v činidle Mehlich 3 a v lučavce královské vykazuje dle koeficientů  $R$  a  $R^2$  velmi úzký vztah. Stanovení obsahu Cd v činidle Mehlich 3 lze využít jako levnou a jednoduchou laboratorní metodu pro odhalení půdní kontaminace tímto prvkem a ke zjištění, zda bude nutné přistoupit k analytickému stanovení v lučavce královské. Navrhované preventivní hodnoty obsahů rizikových prvků As, Cd, Cr, Ni, Pb, Cu, Zn, Co, V, Be v zemědělských půdách extrahovaných činidlem Mehlich 3 ve vztahu k lučavce královské je možné screeningově využít pro monitorování půdní kontaminace uvedenými rizikovými prvky. Podle současné platné ČR legislativy (Vyhláška č. 153/2016 Sb) však zatím není možné výsledky obsahů rizikových prvků v činidle Mehlich 3 úředně hodnotit.

## 6 Literatura

1. J. Zbíral, I. Honsa a kol. autorů, JPP Analýza půd I, **2010**, 66-68,78-83
2. J. Zbíral a kol. autorů, JPP Analýza půd II, **2011**,56-61,97-105,114-115
3. Vyhláška MŽP č. 153/**2016** Sb.,**2016**, 2692-2699
4. Návod k obsluze ICP-OES spektrometru SPECTROBLUE (Spectro, Německo)
5. Software statistického programu R 3.2.3.



# Zavedení kvantitativního stanovení GMO sóji MON 89788 pomocí qPCR

*Jiří Čuhel*

## 1 Úvod

MON 89788 je geneticky modifikovaná sója druhé generace s tolerancí vůči glyfosátu, což je herbicid, který v zelených částech rostlin inhibuje enzym 5-enolpyruvyl-šikimát-3-fosfát syntázu (epsps). Do genetické výbavy transgenní sóji MON 89788 byl z kmene CP4 běžné půdní bakterie *Agrobacterium* sp. zaveden enzym epsps (cp4 epsps), který je již vůči glyfosátu odolný. Kontrolní orgány včetně ÚKZÚZ musí systematicky kontrolovat přítomnost sóji MON 89788 v rostlinném materiálu, krmivech a krmných směsích. Cílem tohoto vývojového úkolu je verifikovat validovanou metodu kvantitativního stanovení transgenní sóji MON 89788 pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a zavést ji do laboratorní praxe Oddělení mikrobiologie a biochemie (OMB).

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Chemikálie

#### 2.1.1 Rotor-Gene Probe PCR Kit (QIAGEN)

2.1.1.1 PCR voda

2.1.1.2 Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (dále Rotor-Gene Mix)

#### 2.1.2 Amplifikační primery

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech.

2.1.2.1 Forward primer pro vnitřní (referenční) gen sóji (gen *Le1*)

*Le1* F: 5`-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3`

2.1.2.2 Reverse primer pro vnitřní (referenční) gen sóji (gen *Le1*)

*Le1* R: 5`-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3`

2.1.2.3 Forward primer pro transgen MON 89788

MON 89788-F: 5`-TCC CGC TCT AGC GCT TCA AT-3`

2.1.2.4 Reverse primer pro transgen MON 89788

MON 89788-R: 5`- TCG AGC AGG ACC TGC AGA A-3`

### 2.1.3 Sondy

Pro analýzy byly použity hydrolyzační sondy TaqMan se značením FAM (6-carboxyfluorescein) a BHQ1 (Black Hole Quencher 1) od firmy Elisabeth Pharmacon. Tyto sondy jsou čteny v zeleném kanálu, který má rozsah vlnových délek (470–510) ± 10 nm.

#### 2.1.3.1 Sonda pro vnitřní (referenční) gen sóji (gen *Lel*)

*Lel* P: 5`-FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-BHQ1-3`

#### 2.1.3.2 Sonda pro transgen MON 89788

MON 89788-P: 5`-FAM-CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT CTG-BHQ1-3`

## 2.2 Použité certifikované referenční materiály (CRM)

Pro analýzy byly použity certifikované referenční materiály (CRM) od AOCS (The American Oil Chemists' Society) a od IRMM (Institute for Reference Material and Measurements).

### 2.2.1 MON 89788 – AOCS 0906-A

Interní označení CRM 10/2018, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované sóji MON 89788 (blank) od AOCS. CRM byl dodán ve formě sójového šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

### 2.2.2 MON 89788 – AOCS 0906-B

Interní označení CRM 12/2018, obsahuje 100 % m/m geneticky modifikované sóji MON 89788 od AOCS. CRM byl dodán ve formě sójového šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

### 2.2.3 MON 810 – ERM®-BF413ak

Interní označení CRM 3/2018, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810 (blank) od IRMM. CRM byl dodán ve formě kukuřičného šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

## 2.3 Přístroje a pomůcky

### 2.3.1 Termocykler Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen)

2.3.2 Plastové zkumavky o objemu 0,5 ml s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem (DNA LoBind Tube 0.5 mL, Eppendorf)

### 3 Pracovní postup

#### 3.1 Popis metody

Metoda je plně v souladu s JPP 10264.1 (Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu), JPP 10265.1 (Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR) a vychází z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenů MON 89788 (Delobel et al., 2013).

DNA byla z CRM izolována extrakčním kitem NucleoSpin® Food (výrobce Macherey – Nagel) postupem dle JPP 10252.1.

Kalibrační řada je pro kvantitativní stanovení sójového transgenů MON 89788 tvořena pěti body. První bod kalibrační křivky S1 o obsahu GM 10 % m/m má stejnou koncentraci jako vzorky a kontroly použité do PCR (20 ng/μl, 100 ng/reakce). Další body kalibrační řady S2 – S5 se připraví postupným ředěním vodou dle tabulky 1. Objem roztoků jednotlivých ředění pro kalibrační řadu je závislý na počtu požadovaných amplifikačních křivek pro analýzu. Jednotlivé body kalibrační křivky je nutné ředit do plastových zkumavek s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem (2.3.2).

**Tabulka 1. Body kalibrační křivky (S1 – S5) pro kvantitativní stanovení transgenů MON 89788.**

	S1	S2	S3	S4	S5
<b>Poměr ředění</b>		4	4	3	3
<b>ng DNA s VG/reakce</b>	100	25	6,25	2,083	0,694
<b>ng DNA s GM/reakce</b>	10	2,5	0,625	0,208	0,069
<b>ng DNA/μl</b>	20,00	5,00	1,25	0,417	0,139

GM – genetická modifikace MON 89788; VG – vnitřní sójový gen *Le1*

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů, sond, programy a koncentrace PCR směsí vycházejí z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenů MON 89788 (Delobel et al., 2013):

Vnitřní gen sóje (gen *Le1*)

Primery: *Le1* F, *Le1* R

Sonda: *Le1* P

Délka ampliconu: 74 bp

Transgen MON 89788

Primery: MON 89788-F, MON 89788-R

Sonda: MON 89788-P

Délka ampliconu: 139 bp

Amplifikační program je shodný pro vnitřní gen sóji i genetickou modifikaci MON 89788 (tabulka 2) a oba dva geny jsou analyzovány současně během jednoho běhu PCR. Tabulka 3 popisuje složení reakčních směsí PCR pro sójový vnitřní gen *Le1* i transgen MON 89788. Jako negativní kontrola při PCR byl použit izolát DNA z CRM 3/2018 (2.2.3).

**Tabulka 2. Amplifikační program pro gen *Le1* i transgen MON 89788.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Akvizice dat fluorescence (zelený kanál)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	ne	1
Denaturace	95	15	ne	45
Annealing a elongace	60	60	ano	

**Tabulka 3. Složení reakční směsi qPCR pro sójový vnitřní gen *Le1* i transgen MON 89788.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			7,063
Rotor-Gene Mix	2×	1×	12,5
Primer F	20 μM	0,15 μM	0,188
Primer R	20 μM	0,15 μM	0,188
Sonda	20 μM	0,05 μM	0,063
Templátová DNA	20 ng/μl		5
Objem směsi vč. templátu			25

### 3.2 Verifikace metody

Celá verifikace metody proběhla v souladu s verifikační metodikou pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017).

Při verifikaci se stanovovaly následující validační parametry (upřesnění metody jejich výpočtu a minimální akceptovatelné hodnoty jsou uvedeny v příslušné validační zprávě):

- Dynamický rozsah
- Koeficient determinace  $R^2$  kalibrační křivky
- Amplifikační účinnost
- Mez detekce (LOD)
- Mez stanovitelnosti (LOQ)

- Správnost
- Opakovatelnost
- Relativní rozšířená nejistota

Pro účely přípravy kalibrační křivky, stanovení dynamického rozsahu metody, koeficientu determinace  $R^2$  kalibrační křivky, amplifikační účinnosti, meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti, opakovatelnosti a rozšířené relativní nejistoty byla DNA izolována z CRM 10/2018 (obsahující 0 % m/m geneticky modifikované sóji MON 89788 – blank) a z CRM 12/2018 (obsahující 100 % m/m geneticky modifikované sóji MON 89788), a to v 16 respektive v 6 opakováních.

Koncentrace DNA ve všech izolátech byla stanovena podle JPP č. 10252.1.

Po provedení testu inhibice (viz níže) byly jednotlivé izoláty (16) DNA z CRM 10/2018 (tj. 0 % GM m/m) smíchány. Výsledná směs pak sloužila k ředění izolátů DNA z CRM 12/2018 (tj. 100 % GM m/m) na jiné hodnoty obsahu GM (viz níže). CRM s jinými hodnotami obsahu GM než 0 a 100 % GM m/m totiž nejsou v případě MON 89788 komerčně dostupné a je nutné si je připravit. V případě CRM 12/2018 (100 % GM m/m) byly první dva izoláty DNA ponechány bez smíchání (byly použity pro účely stanovení meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti, opakovatelnosti a rozšířené relativní nejistoty) a další čtyři izoláty byly smíchány (tato směs byla dále ředěna s DNA izolovanou z CRM 10/2018 a poté byla použita pro přípravu kalibrační křivky).

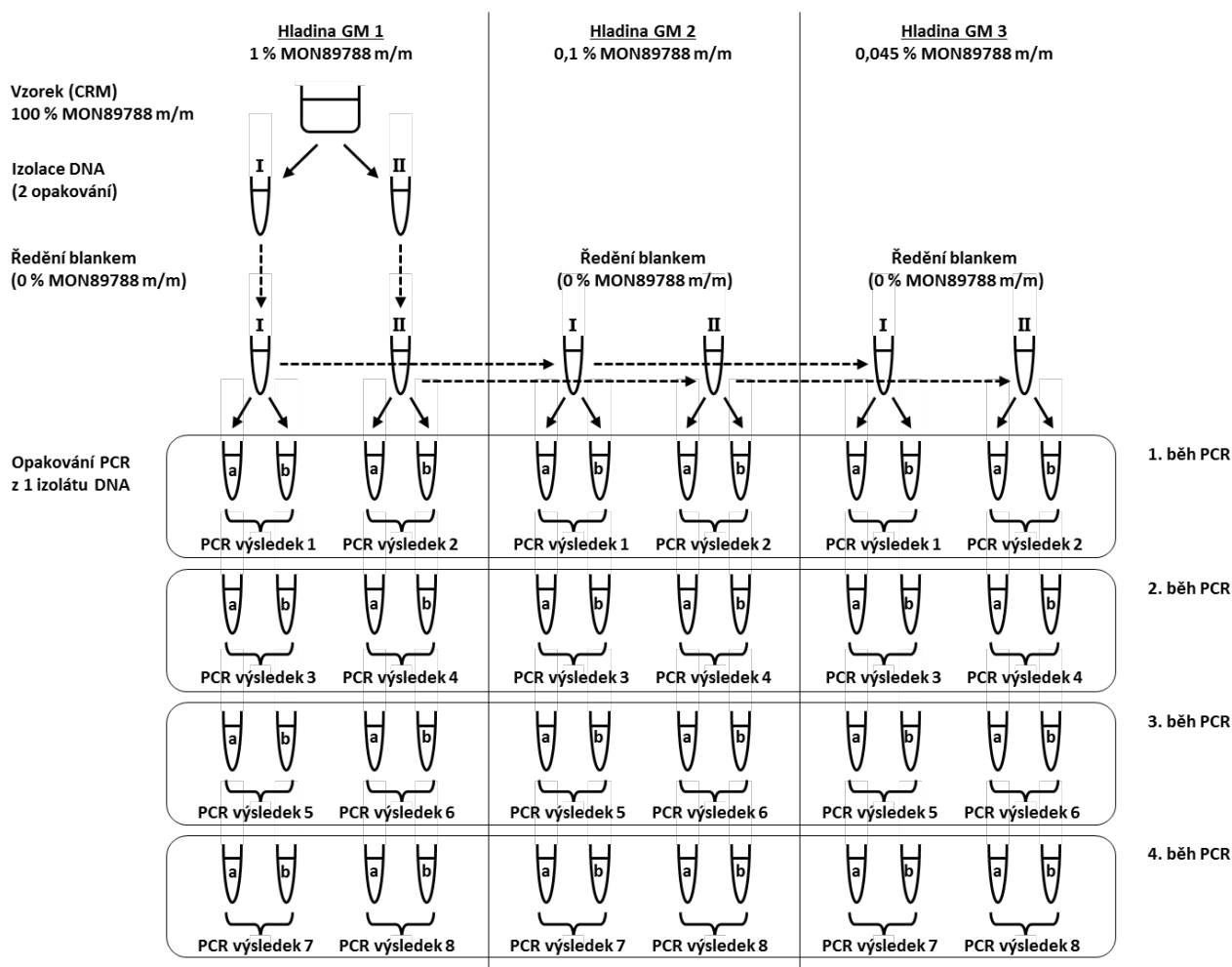
Izoláty DNA byly otestovány na přítomnost inhibitorů PCR podle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Každý izolát DNA byl postupně naředěn na koncentraci 20 ng/μl a dále  $4 \times$  na 5 ng/μl a obě dvě ředění byla podrobena kvantitativnímu stanovení vnitřního sójového genu *Le1*. Poté se vypočítal rozdíl mezi stanovenými hodnotami Ct (počet cyklů, při kterém fluorescence vytvořená amplifikací cílové DNA překročí prahovou hodnotu) u jednotlivých ředěních ( $\Delta Ct$ ) a ten se porovnal s teoretickou hodnotou  $\Delta Ct$  (v tomto případě = 2). Absolutní hodnota rozdílu mezi stanovenou a teoretickou hodnotou  $\Delta Ct$  musí být  $< 0,5$ . Všechny izoláty DNA prošly tímto testem úspěšně, účinek inhibitorů PCR u nich nebyl prokázán.

Mez detekce, mez stanovitelnosti, správnost, opakovatelnost a rozšířená relativní nejistota byly stanovovány s využitím tří hladin obsahu genetické modifikace (GM) MON 89788, a to 1; 0,1 a 0,045 % GM m/m.

Protože CRM s těmito hladinami obsahu MON 89788 nejsou komerčně dostupné, museli jsme si je připravit postupným ředěním izolátů DNA získaných z CRM se 100 % GM (CRM

12/2018) pomocí izolátu DNA získaného z CRM s 0 % GM (CRM 10/2018). Postup tohoto ředění je detailně popsán ve verifikační metodice pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Obdobným způsobem jsme si také připravili DNA s 10 % GM m/m. Tato DNA byla využita při přípravě kalibrační křivky.

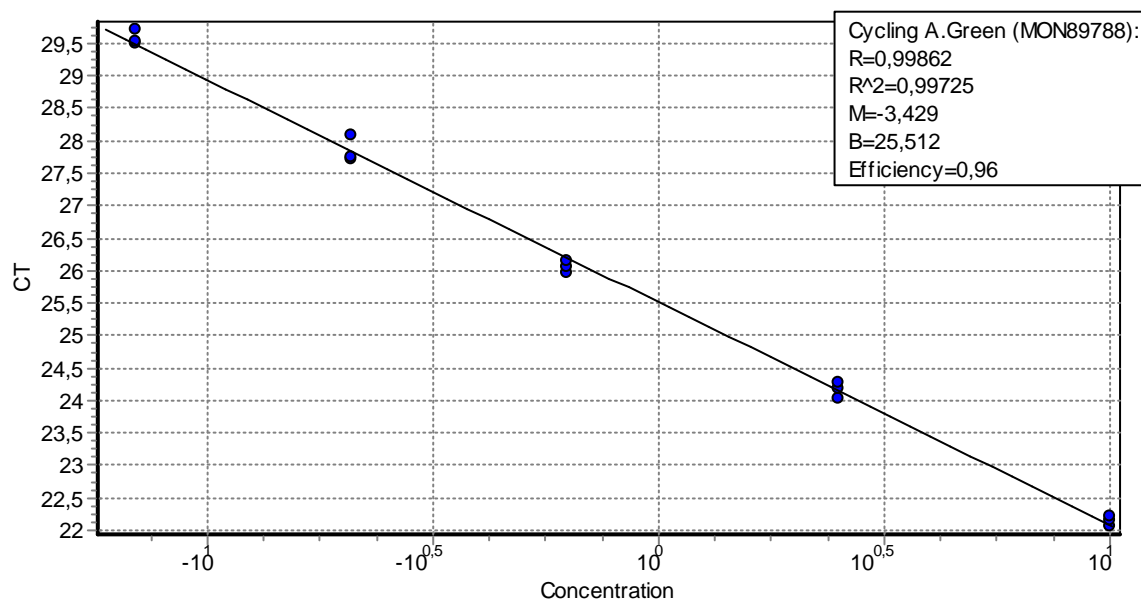
Každá hladina s různým obsahem GM byla zastoupena dvěma izoláty DNA (nezávislá opakování), každý izolát byl během jednoho běhu PCR dále analyzován ve dvou laboratorních opakováních a celá analýza proběhla 4x (tj. 4 běhy PCR za podmínek opakovatelnosti). Jednotlivé běhy PCR proběhly ve dnech 9. 11. 2018, 12. 11. 2018 a 13.11.2018 (tento den dvakrát). Takto bylo získáno 16 dílčích výsledků a 8 odhadů obsahu GM pro jednu hladinu GM. Schéma praktického uspořádání verifikace ukazuje obrázek 1.



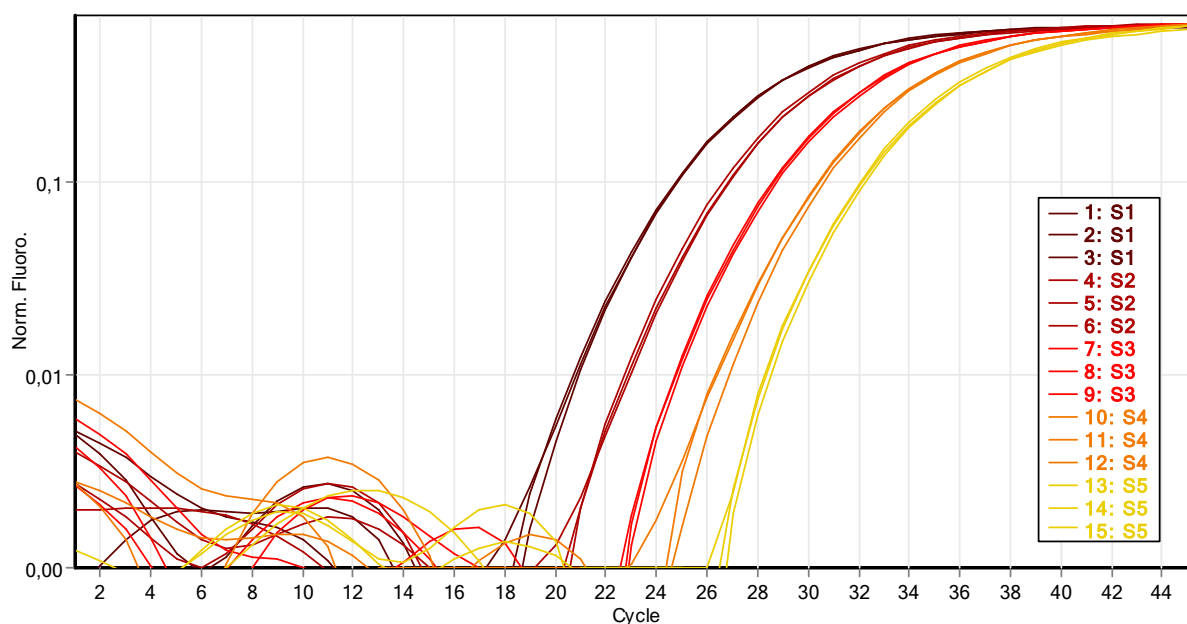
**Obr. 1. Schéma praktického uspořádání verifikace.**

### 3 Výsledky a diskuze

Při zavádění a verifikaci metody pro kvantitativní stanovení transgenní sóji MON 89788 pomocí qPCR na oddělení OMB se nevyskytly žádné potíže a mohli jsme tak v plné míře pracovat dle validované metodiky pro kvantifikaci tohoto transgenu (Delobel et al., 2013). Příklad kalibrační křivky s koeficientem determinace  $R^2$  a amplifikační účinností je uveden na obrázku 2. Obrázek 3 ukazuje amplifikační křivky jednotlivých kalibračních bodů.



**Obr. 2.** Kalibrační křivka (závislost hodnoty Ct na koncentraci DNA) pro transgen MON 89788 s koeficientem determinace  $R^2$  0,997 a s amplifikační účinností (E) 96 %.



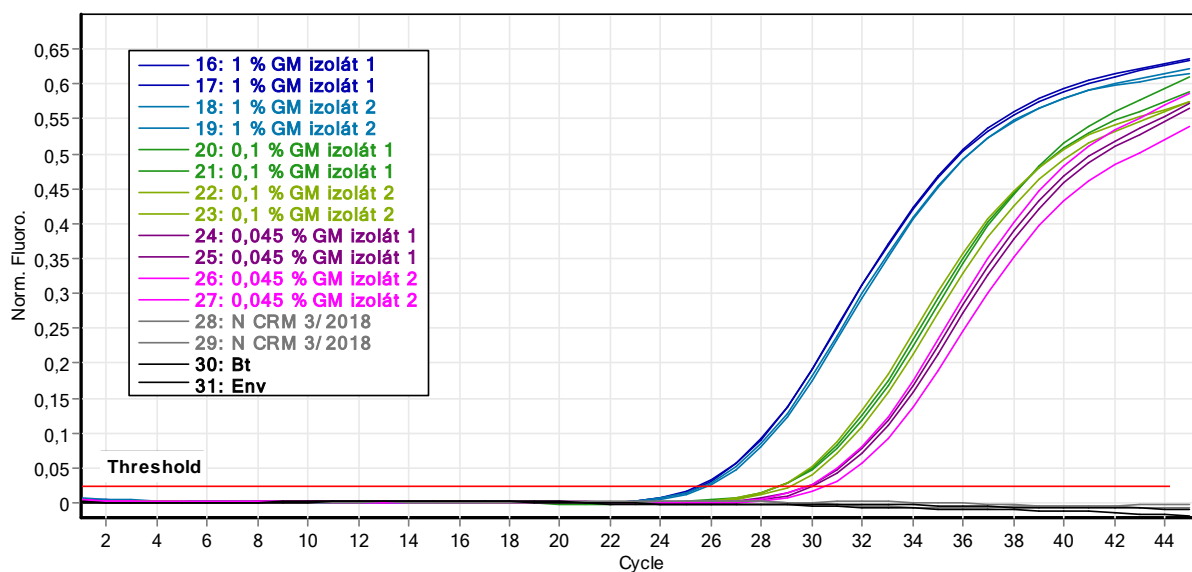
**Obr. 3. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) jednotlivých kalibračních bodů (S1 – S5) při kvantifikaci transgenu MON 89788.**

V tabulce 4 jsou uvedeny získané validační parametry pro kvantitativní stanovení transgenní sóji MON 89788. Správnost metody splnila akceptační limity u dvou z testovaných hladin: 0,5 a 0,1 % GM m/m (hladina 0,045 % je již mimo dynamický rozsah). Laboratoř prokázala schopnost věrohodně kvantifikovat vzorek na hladině 0,1 % GM m/m, která tak odpovídá mezi stanovitelnosti. Stanovením meze detekce bylo zjištěno, že lze detekovat obsah transgenu MON 89788 na hladině 0,045 % GM m/m, protože všech 16 opakování s touto hladinou bylo pozitivních na detekci MON 89788 (příklad uveden na obrázku 4). Limity pro minimálně akceptovatelnou výkonnost metody byly dosaženy.



**Tabulka 4. Získané validační parametry pro kvantitativní stanovení transgenní sóji MON 89788.**

	<b>Hladina GM 1</b> <b>1 %</b> MON 89788	<b>Hladina GM 2</b> <b>0,1 %</b> MON 89788	<b>Hladina GM 3</b> <b>0,045 %</b> MON 89788
<b>Správnost</b> (definována odchylkou – bias, tj. relativním rozdílem mezi průměrem z výsledků a referenční hodnotou)	-10,3 %	1,1 %	11,9 %
<b>Opakovatelnost</b> (definována RSD, tj. relativní směrodatnou odchylkou za podmínek opakovatelnosti)	10,4 %	15,0 %	23,0 %
<b>Rozšířená relativní nejistota</b>	20,8 %	30,0 %	46,0 %
<b>Dynamický rozsah</b>	0,0694 % GM – 10 % GM		
<b>Koeficient determinace <math>R^2</math></b> kalibrační křivky	0,997 pro MON 89788 0,998 pro referenční sójový gen <i>Le1</i>		
<b>Amplifikační účinnost</b>	96,8 % pro MON 89788 95,8 % pro referenční sójový gen <i>Le1</i>		
<b>Mez detekce</b>	0,045 % GM		
<b>Mez stanovitelnosti</b>	0,1 % GM		



**Obr. 4. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) při stanovení meze detekce (LOD) u transgenu MON 89788. Bt – beztemplátová kontrola, Env – kontrola čistoty prostředí při přípravě PCR, N – negativní kontrola.**

## 4 Závěr

Verifikace potvrdila vhodnost použití metody pro daný účel a odpovídá zamýšlenému použití. Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost metody k používání v rámci NRL a její zahrnutí do akreditovaných metod. Metoda kvantitativního stanovení transgenní sóji MON 89788 pomocí qPCR se zařadí do postupů zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv, krmných směsí a osiv.

## 5 Literatura

1. Delobel C, Bogni A, Pinski G, Mazzara M, Van den Eede G, 2013. Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON 89788 Using Real-time PCR - Validation Report corr. version 1 and Validated Method corr. version 1. EUR 26153 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg: Publications Office of the European Union, ISBN 978-92-79-33078-0, doi: 10.2788/20464, JRC84189.
2. Hougs L, Gatto F, Goerlich O, Grohmann L, Lieske K, Mazzara M, Narendja F, Ovesna J, Papazova N, Scholtens I, Žel J, 2017. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection, Luxembourg: Publication Office of the European Union, ISBN 978-92-79-77310-5, doi:10.2760/645114, JRC 109940.
3. JPP č. 10252.1. Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food). ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
4. JPP č. 10264.1. Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv

5. JPP č. 10265.1. Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.

# Zavedení kvantitativního stanovení GMO kukuřice MON 810 pomocí qPCR

*Jiří Čuhel*

## 1 Úvod

Kukuřice MON 810 produkuje díky genetické modifikaci Bt toxin, který selektivně zabíjí housenky škůdce zavíječe kukuřičného. Zemědělci jí proto dříve pěstovali v oblastech s významným výskytem tohoto škůdce: ve středních Čechách, Polabí, v teplých oblastech Moravy, ale i okolo Klatov. V současné době se kukuřice MON 810 v ČR nepěstuje, nicméně kontrolní orgány včetně ÚKZÚZ musí systematicky kontrolovat její přítomnost v rostlinném materiálu, krmivech a krmných směsích.

Cílem tohoto vývojového úkolu je verifikovat validovanou metodu kvantitativního stanovení transgenní kukuřice MON 810 pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a zavést ji do laboratorní praxe Oddělení mikrobiologie a biochemie (OdMB).

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Chemikálie

#### 2.1.1 Rotor-Gene Probe PCR Kit (QIAGEN)

2.1.1.1 PCR voda

2.1.1.2 Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (dále Rotor-Gene Mix)

#### 2.1.2 Amplifikační primery

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech.

2.1.2.1 Forward primer pro vnitřní (referenční) gen kukuřice (*hmg* gen)

ZM1-F: 5`-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3`

2.1.2.2 Reverse primer pro vnitřní (referenční) gen kukuřice (*hmg* gen)

ZM1-R: 5`-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3`

2.1.2.3 Forward primer pro transgen MON 810

Mail-F1: 5`-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3`

2.1.2.4 Reverse primer pro transgen MON 810

Mail-R1: 5`-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3`

### 2.1.3 Sondy

Pro analýzy byly použity hydrolyzační sondy TaqMan se značením FAM (6-carboxyfluorescein) a BHQ1 (Black Hole Quencher 1) od firmy Elisabeth Pharmacon. Tyto sondy jsou čteny v zeleném kanálu, který má rozsah vlnových délek (470–510) ± 10 nm.

#### 2.1.3.1 Sonda pro vnitřní (referenční) gen kukuřice (*hmg* gen)

ZM1: 5`-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1-3`

#### 2.1.3.2 Sonda pro transgen MON 810

Mail-S2: 5`-FAM-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-BHQ1-3`

## 2.2 Použité certifikované referenční materiály (CRM)

Pro analýzy byly použity certifikované referenční materiály (CRM) od IRMM (Institute for Reference Material and Measurements) a od Zemědělské agentury, s.r.o.

### 2.2.1 MON 810 – ERM®-BF413gk

Interní označení CRM 4/2018, obsahuje 10 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810 od IRMM. CRM byl dodán ve formě kukuřičného šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

### 2.2.2 MON 810 – ERM®-BF413ck

Interní označení CRM 5/2018, obsahuje 0,5 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810 od IRMM. CRM byl dodán ve formě kukuřičného šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

### 2.2.3 MON 810 – ERM®-BF413ak

Interní označení CRM 3/2018, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810 (blank) od IRMM. CRM byl dodán ve formě kukuřičného šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

### 2.2.4 Non GMO sója KORADA

Interní označení CRM 1/2001, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované sóji MON 40-3-2 (blank) od Zemědělské agentury, s.r.o. CRM byl dodán ve formě sójových bobů, ze kterých byla vyextrahována DNA.

## 2.3 Přístroje a pomůcky

### 2.3.1 Termocykler Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen)

2.3.2 Plastové zkumavky o objemu 0,5 ml s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem (DNA LoBind Tube 0.5 mL, Eppendorf)

### 3 Pracovní postup

#### 3.1 Popis metody

Metoda je plně v souladu s JPP 10264.1 (Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu), JPP 10265.1 (Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR) a vychází z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenů MON 810 (Mazzara et al., 2009).

DNA byla z CRM izolována extrakčním kitem NucleoSpin® Food (výrobce Macherey – Nagel) postupem dle JPP 10252.1.

Kalibrační řada je pro kvantitativní stanovení kukuřičného transgenů MON 810 tvořena pěti body. Výchozí izolát CRM o obsahu GM 10 % m/m (CRM 4/2018; 2.2.1) má stejnou koncentraci jako vzorky a kontroly použité do PCR (20 ng/μl, 150 ng/reakce). Další body kalibrační řady se připraví postupným ředěním vodou dle tabulky 1. Objem roztoků jednotlivých ředění pro kalibrační řadu je závislý na počtu požadovaných amplifikačních křivek pro analýzu. Jednotlivé body kalibrační křivky je nutné ředit do plastových zkumavek s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem (2.3.2).

**Tabulka 1.** Body kalibrační křivky (S1–S5) pro kvantitativní stanovení transgenů MON 810

	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>
<b>Poměr ředění</b>		4	4	3	3
<b>ng DNA s VG/reakce</b>	150	37,5	9,38	3,125	1,0417
<b>ng DNA s GM/reakce</b>	15	3,75	0,9375	0,3125	0,10417
<b>ng DNA/μl</b>	20,00	5,00	1,25	0,4167	0,1389

GM – genetická modifikace MON 810

VG – vnitřní kukuřičný gen *hmg*

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů, sond, programy a koncentrace PCR směsí vycházejí z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenů MON 810 (Mazzara et al., 2009):

Vnitřní gen kukuřice (*hmg* gen)

Primery: ZM1-F (2.1.2.1), ZM1-R (2.1.2.2)

Sonda: ZM1 (2.1.3.1)

Délka amplikonu: 79 bp

Transgen MON 810

Primery: Mail-F1 (2.1.2.3), Mail-R1 (2.1.2.4)

Sonda: Mail-S2 (2.1.3.2)

Délka ampliconu: 92 bp

Amplifikační program je shodný pro vnitřní gen kukuřice i genetickou modifikaci MON 810 (tabulka 2) a oba dva geny jsou analyzovány současně během jednoho běhu PCR. Tabulky 3 a 4 popisují složení reakčních směsí PCR pro kukuřičný vnitřní gen *hmg* a transgen MON 810. Jako negativní kontrola při PCR byl použit izolát DNA z CRM 1/2001 (2.2.4).

**Tabulka 2. Amplifikační program pro *hmg* gen i transgen MON 810.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Akvizice dat fluorescence (zelený kanál)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	ne	1
Denaturace	95	15	ne	45
Annealing a elongace	60	60	ano	

**Tabulka 3. Složení reakční směsi qPCR pro vnitřní kukuřičný gen (*hmg* gen).**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			4,05
Rotor-Gene Mix	2x	1x	12,5
Primer F (ZM1-F)	20 μM	0,3 μM	0,375
Primer R (ZM1-R)	20 μM	0,3 μM	0,375
Sonda (ZM1)	20 μM	0,16 μM	0,2
Templátová DNA	20 ng/μl		7,5
Objem směsi vč. templátu			25

**Tabulka 4. Složení reakční směsi qPCR pro genetickou modifikaci MON 810.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			4,025
Rotor-Gene Mix	2x	1x	12,5
Primer F (Mail-F1)	20 μM	0,3 μM	0,375
Primer R (Mail-R1)	20 μM	0,3 μM	0,375
Sonda (Mail-S2)	20 μM	0,18 μM	0,225
Templátová DNA	20 ng/μl		7,5
Objem směsi vč. templátu			25

## 3.2 Verifikace metody

Celá verifikace metody proběhla v souladu s verifikační metodikou pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017).

Při verifikaci se stanovovaly následující validační parametry (upřesnění metody jejich výpočtu a minimální akceptovatelné hodnoty jsou uvedeny v příslušné validační zprávě):

- Dynamický rozsah
- Koeficient determinace  $R^2$  kalibrační křivky
- Amplifikační účinnost
- Mez detekce (LOD)
- Mez stanovitelnosti (LOQ)
- Správnost
- Opakovatelnost
- Relativní rozšířená nejistota

Pro účely přípravy kalibrační křivky, stanovení dynamického rozsahu metody, koeficientu determinace  $R^2$  kalibrační křivky a amplifikační účinnosti byla DNA izolována z CRM 4/2018 (obsahující 10 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810; 2.2.1) postupem dle JPP č. 10252.1, a to v šesti opakováních. Po provedení testu inhibice (viz níže) byly izoláty DNA z jednotlivých opakování smíchány.

Pro účely stanovení meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti, opakovatelnosti a rozšířené relativní nejistoty byla DNA stejným postupem izolována z CRM 5/2018 (obsahující 0,5 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810; 2.2.2) a z CRM 3/2018 (obsahující 0 % m/m geneticky modifikované kukuřice MON 810 – blank; 2.2.3), a to ve dvou nezávislých opakováních.

Koncentrace DNA ve všech izolátech byla stanovena dle JPP č. 10252.1.

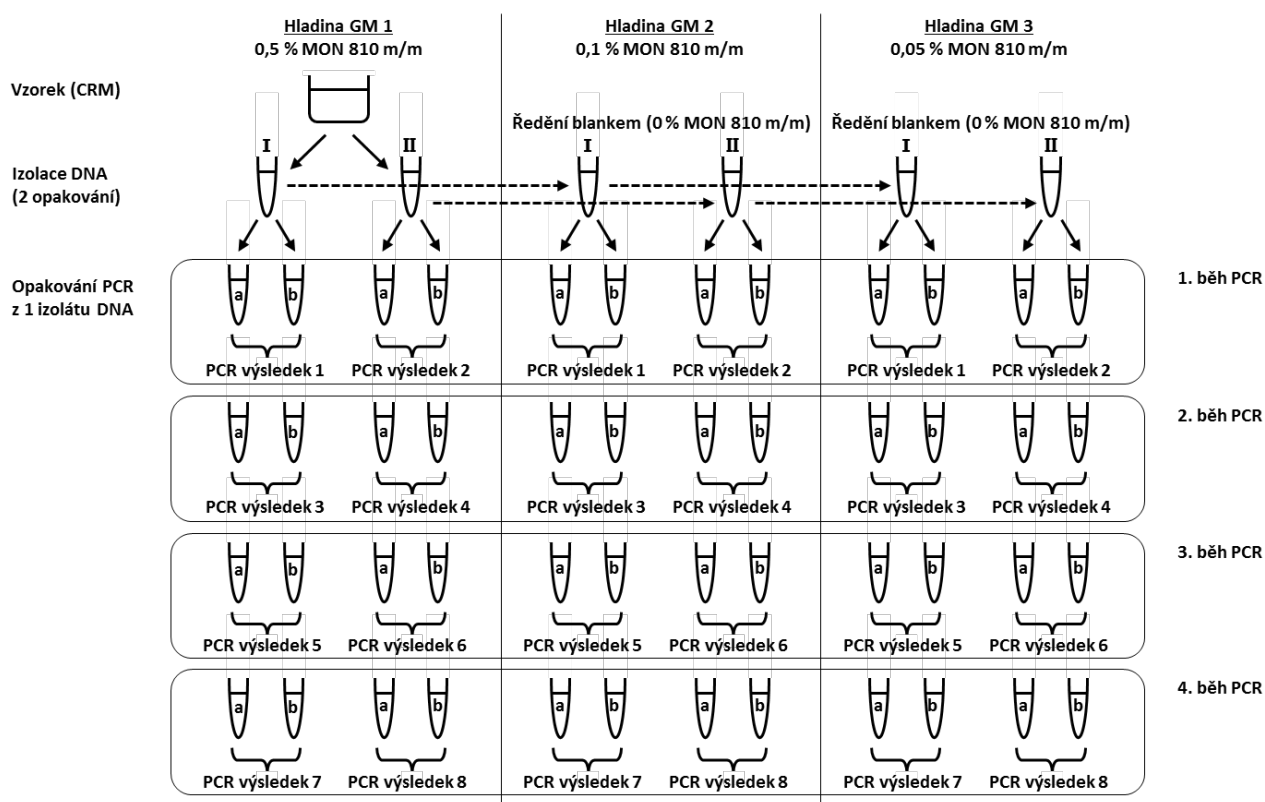
Izoláty DNA byly otestovány na přítomnost inhibitorů PCR dle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Každý izolát DNA byl postupně naředěn na koncentraci 20 ng/μl a dále 4 × na 5 ng/μl a obě dvě ředění byla podrobena kvantitativnímu stanovení vnitřního kukuřičného genu *hmg*. Poté se vypočítal rozdíl mezi stanovenými hodnotami Ct (počet cyklů, při kterém fluorescence vytvořená amplifikací cílové DNA překročí prahovou hodnotu) u jednotlivých ředěních ( $\Delta Ct$ ) a ten se porovnal s teoretickou hodnotou  $\Delta Ct$  (v tomto případě = 2). Absolutní hodnota rozdílu mezi stanovenou a teoretickou hodnotou  $\Delta Ct$  musí být  $< 0,5$ . Všechny získané izoláty DNA



toto kritérium splnily (viz příslušná validační zpráva).

Mez detekce, mez stanovitelnosti, správnost, opakovatelnost a rozšířená relativní nejistota byly stanovovány s využitím tří hladin obsahu genetické modifikace (GM) MON 810, a to 0,5; 0,1 a 0,05 % GM. Hladina 0,5 % GM byla zastoupena izolátem DNA z CRM 5/2018 (2.2.2) a zbývající hladiny byly připraveny smícháním s izolátem DNA z CRM 3/2018 (blank; 2.2.3) podle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017).

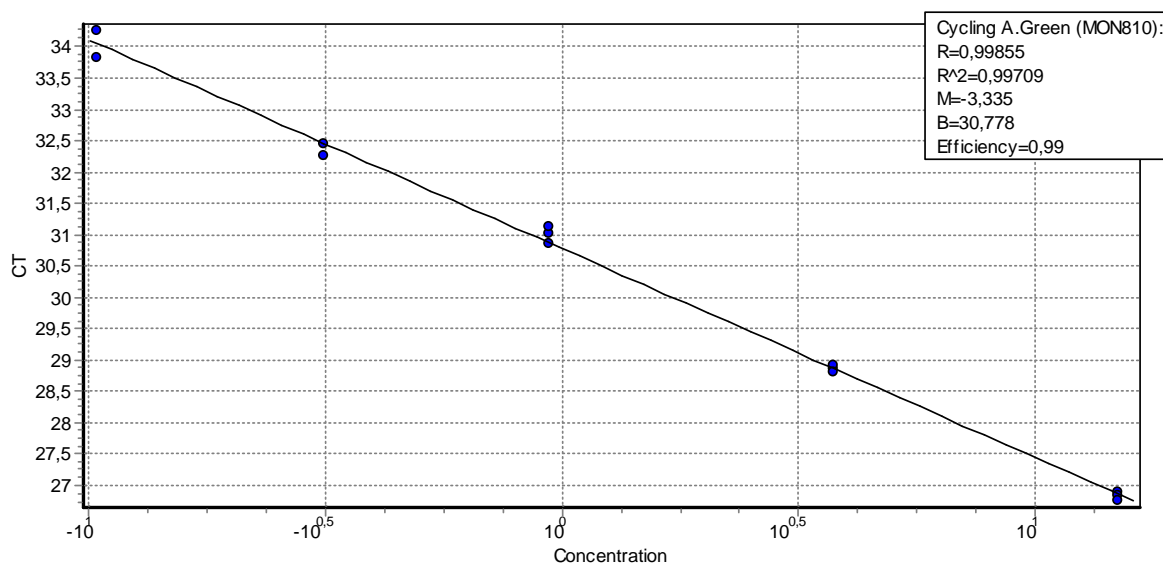
Každá hladina s různým obsahem GM byla zastoupena dvěma izoláty DNA (nezávislá opakování), každý izolát byl během jednoho běhu PCR dále analyzován ve dvou laboratorních opakováních a celá analýza proběhla 4x (tj. 4 běhy PCR za podmínek opakovatelnosti). Jednotlivé běhy PCR proběhli ve dnech 17.7.2018, 18.7.2018, 23.7.2018 a 24.7.2018. Takto bylo získáno 16 dílčích výsledků a 8 odhadů obsahu GM pro jednu hladinu GM. Schéma praktického uspořádání verifikace ukazuje obrázek 1.



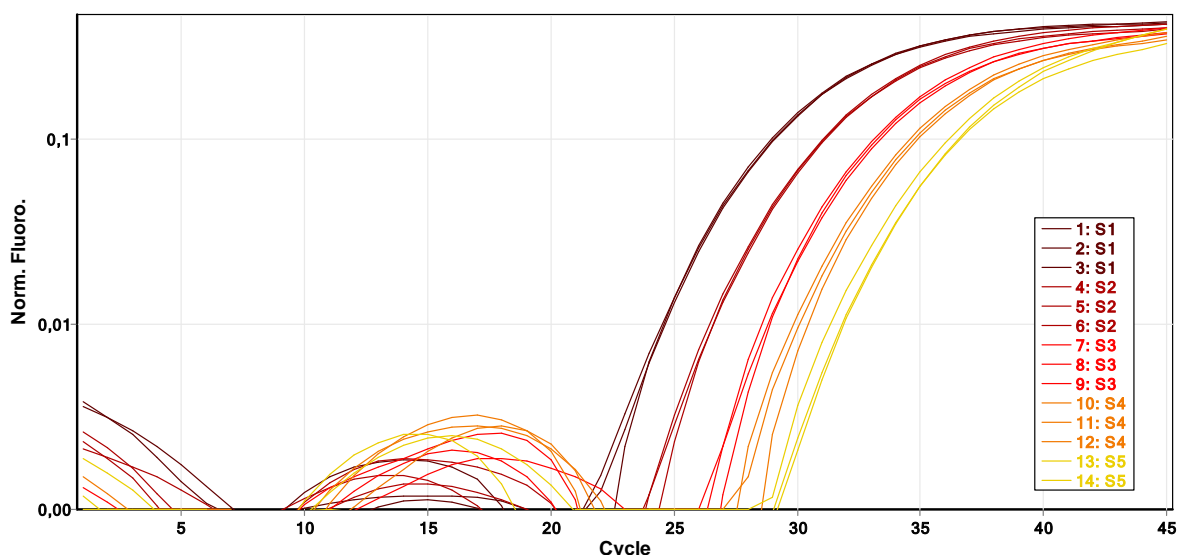
Obr. 1. Schéma praktického uspořádání verifikace.

### 3 Výsledky a diskuze

V počáteční fázi zavádění metody kvantitativního stanovení transgenní kukuřice MON 810 se nedařilo sestavit kalibrační řadu tak, aby kalibrační křivka splnila akceptační kritéria pro koeficient determinace  $R^2$  a amplifikační účinnost. Protože kalibrační křivka byla negativně ovlivněna především body s nejvíce naředěnou DNA, usoudili jsme, že příčina je buď 1) v nemožnosti více ředit již značně ředěnou DNA se zachováním homogenity roztoku nebo 2) v navázání molekul DNA na vnitřní stěny plastových mikrozkušavek, které může být markantní zvláště při nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu jsme se pokusili připravit kalibrační řadu ředěním do speciálních plastových zkumavek s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem (2.3.2). Ukázalo se, že použití těchto mikrozkušavek vede k nápravě parametrů kalibrační křivky, které tak již splňovaly nastavená akceptační kritéria. Příklad kalibrační křivky s vyhovujícím koeficientem determinace  $R^2$  a amplifikační účinností je uveden na obrázku 2. Obrázek 3 ukazuje amplifikační křivky jednotlivých kalibračních bodů.



**Obr. 2. Kalibrační křivka (závislost hodnoty Ct na koncentraci DNA) pro transgen MON 810 s koeficientem determinace  $R^2$  0,997 a s amplifikační účinností (E) 99 %.**

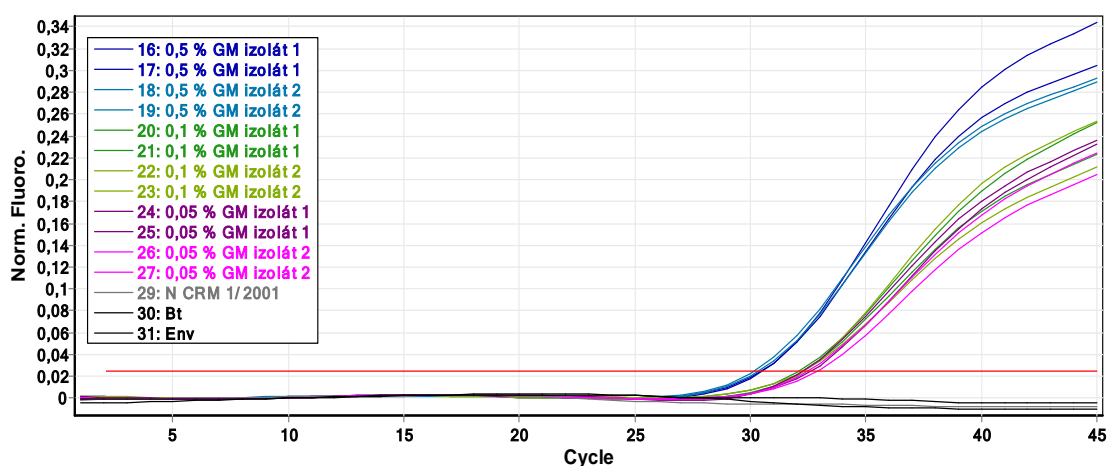


**Obr. 3. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) jednotlivých kalibračních bodů (S1 – S5) při kvantifikaci transgenu MON 810.**

V tabulce 5 jsou uvedeny získané validační parametry pro kvantitativní stanovení transgenní kukuřice MON 810. Správnost metody splnila akceptační limity u dvou z testovaných hladin: 0,5 a 0,1 % GM m/m. Laboratoř prokázala schopnost věrohodně kvantifikovat vzorek na hladině 0,1 % GM m/m, která tak odpovídá mezi stanovitelnosti. Stanovením meze detekce bylo zjištěno, že lze detekovat obsah transgenu MON 810 na hladině 0,05 % GM m/m (příklad uveden na obrázku 4). Limity pro minimálně akceptovatelnou výkonnost metody byly dosaženy.

**Tabulka 5. Získané validační parametry pro kvantitativní stanovení transgenní kukuřice MON 810.**

	<b>Hladina GM 1 0,5 % MON 810</b>	<b>Hladina GM 2 0,1 % MON 810</b>	<b>Hladina GM 3 0,05 % MON 810</b>
<b>Správnost</b> (definována odchylkou – bias, tj. relativním rozdílem mezi průměrem z výsledků a referenční hodnotou)	-11,3 %	13,2 %	55,3 %
<b>Opakovatelnost</b> (definována RSD <sub>r</sub> , tj. relativní směrodatnou odchylkou za podmínek opakovatelnosti)	9,3 %	22,9 %	24,9 %
<b>Rozšířená relativní nejistota</b>	18,6 %	45,8 %	49,8 %
<b>Dynamický rozsah</b>	0,0694 % GM – 10 % GM		
<b>Koeficient determinace R<sup>2</sup> kalibrační křivky</b>	0,996 pro MON 810 0,998 pro referenční kukuřičný gen <i>hmg</i>		
<b>Amplifikační účinnost</b>	101,9 pro MON 810 97,9 pro referenční kukuřičný gen <i>hmg</i>		
<b>Mez detekce (LOD)</b>	0,05 % GM		
<b>Mez stanovitelnosti (LOQ)</b>	0,1 % GM		



**Obr. 4. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) při stanovení meze detekce (LOD) u transgenu MON 810. Bt – beztemplátová kontrola, Env – kontrola čistoty prostředí při přípravě PCR, N – negativní kontrola**

## 4 Závěr

Verifikace potvrdila vhodnost použití metody pro daný účel a odpovídá zamýšlenému použití. Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost metody k používání v rámci NRL a její zahrnutí do akreditovaných metod. Metoda kvantitativního stanovení transgenní kukuřice MON 810 pomocí qPCR se zařadí do postupů zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv, krmných směsí a osiv.

## 5 Literatura

1. Houghs L, Gatto F, Goerlich O, Grohmann L, Lieske K, Mazzara M, Narendja F, Ovesna J, Papazova N, Scholtens I, Žel J, **2017**. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection, Luxembourg: Publication Office of the European Union, ISBN 978-92-79-77310-5, doi:10.2760/645114, JRC 109940.
2. JPP č. 10252.1. Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food). ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
3. JPP č. 10264.1. Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv
4. JPP č. 10265.1. Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
5. Mazzara M, Grazioli E, Savini C, Van den Eede G, **2009**. Report on the Verification of the Performance of a MON810 Event-specific Method on Maize Line MON810 Using Real-time PCR. EUR 24237 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, ISBN 978-92-79-14982-5, doi:10.2788/59036, JRC56609.

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXIII 2019/2**

Ročník: XXIII, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2019

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 43

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196