	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

STANOVENÍ VLIVU CHEMIKÁLIÍ NA KRÁTKODOBOU NITRIFIKAČNÍ AKTIVITU

1 Účel a rozsah

Metoda určuje postup pro stanovení inhibice krátkodobé nitrifikační aktivity chemikáliemi a extrakty bioodpadů. Lze ji použít i pro detekci přítomnosti látek inhibující nitrifikační aktivitu v půdě a půdních materiálech. Nitrifikací se v uvedené metodě rozumí oxidace NH_4^+ na NO_2^- .

2 Princip

Vzorek se inkubuje 6 h v třepané suspenzi při saturaci substrátem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a s přidavkem NaClO_3 , který inhibuje oxidaci NO_2^- na NO_3^- , což umožňuje stanovit pouze přírůstek NO_2^- . V případě stanovení toxicity chemikálií a extraktů bioodpadů se ke vzorkům přidá testovaná chemikálie nebo daný extrakt v koncentrační řadě a ze stanovené nitrifikační aktivity se vypočtou hodnoty LOEC, NOEC a EC_x . Při testování toxicity půd se SNA stanoví ve standardní půdě, testovaném vzorku a jejich směsi. Toxicita testované půdy se stanoví porovnáním průměrné hodnoty SNA ve standardní a testované půdě se stanovenou nitrifikační aktivitou ve směsném vzorku.

3 Chemikálie

1 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , roztok, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 13,61 g KH_2PO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

2 Hydrogenfosforečnan draselný, K_2HPO_4 , roztok, $c(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 17,40 g K_2HPO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

3 Chlorečnan sodný, NaClO_3 , roztok, $c(\text{NaClO}_3) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 10,6 g NaClO_3 , rozpustí ve vodě (9), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.


4 Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5 Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(\text{KCl}) = 4 \text{ mol/l}$.

Příprava: 298 g KCl se rozpustí ve vodě, převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

6 Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(\text{KCl}) = 2 \text{ mol/l}$.

Příprava: 149 g KCl se rozpustí ve vodě, převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

7 Zásobní roztok A.

Příprava: Smíchá se 28 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (1), 72 ml roztoku hydrogenfosforečnanu draselného (2) a 100 ml vody (9).

8 Testovací médium.

Příprava: Smíchá se 10 ml zásobního roztoku A (7), 15 ml roztoku NaClO₃ (3) a 0,5 g síranu amonného (4). pH roztoku je přibližně 7,2. Doplní se vodou (9) na 1000 ml.

9 Voda MilliQ.

10 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, c(HCl) = 2,4 mol/l.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 21,9 ml koncentrované HCl, převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po značku.

11 Sulfanilamid.

Příprava: 0,5 g sulfanilamidu se rozpustí ve 100 ml HCl (1).

12 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, c(HCl) = 0,12 mol/l.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 1,10 ml koncentrované HCl, převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po značku.

13 N-(1-naftyl)-etylendiamin

Příprava: 0,03 g N-(1-naftyl)-etylendiaminu se rozpustí v 10 ml HCl (3). Připravuje se čerstvý.

14 Dusitan sodný, NaNO₂, zásobní standardní roztok, c = 100 µg NO₂-N/ml.

Příprava: V 500ml baňce se ve vodě rozpustí 0,2463 g NaNO₂ (s přesností na 0,1 mg) a doplní vodou po značku.

15 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 1 mol/l.

Příprava: 40,0 g NaOH se rozpustí ve vodě, po vytemperování a převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku. Pouze při testování chemikálií a extraktů bioodpadů.

16 Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 1 mol/l.


Příprava: 90 ml 35% HCl se přidá do vody a po vytemperování se doplní na celkový objem 1000 ml. pH se upravuje pouze při testování chemikálií a extraktů bioodpadů.

4 Přístroje a pomůcky

1 Termostat s horizontální třepačkou a nastavitelnou teplotou 25 °C.

2 Erlenmeyerovy baňky, 250 ml.

3 Filtrační papír vhodný k filtrování půdní suspenze, např. Macherey-Nagel, k. č. 440018. Je třeba předem ověřit, že filtrační papír neobsahuje dusitany.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

- 4 Centrifuga, pokud se místo filtrace půdní suspenze odstředí uje.
- 5 Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 540 nm a kyvetou 10 mm.

5 Postup

5.1 Preinkubace

Při stanovení toxicity chemikálií a extraktů bioodpadů se do 250ml Erlenmeyerových baněk naváží čerstvá půda odpovídající 15 g sušiny ve třech opakováních, baňky se uzavřou parafilmem a vzorek se preinkubuje 2 dny při 25 °C. Podmínky preinkubace pro stanovení toxicity půd jsou uvedeny v odstavci 5.4 Testování kontaminovaných půd.

5.2 Standardní půda

Jako standardní půda se používá nekontaminovaná půda se známou hodnotou SNA v rozmezí (200 – 800) ng NO₂⁻ - N/g_{suš.}. Půda se skladuje za podmínek uvedených v JPP AP III, kap. 5.1., postup 31000.1.


5.3 Testování chemikálií a hnojiv

K testování se použije standardní půda. Množství testované látky pro aplikaci na standardní půdu se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Připraví se koncentrační řada, která obsahuje kontrolu bez přídavku testované chemikálie a minimálně pět testovaných koncentrací uspořádaných v geometrické řadě. Počet kontrol a jednotlivých opakování je minimálně tři. Poměr mezi dvěma sousedními koncentracemi nemá být větší než dva. Nejnižší koncentrace by neměla mít žádný vliv na nitrifikaci, nejvyšší by měla vykazovat inhibici v rozsahu (50 – 100) %.

V odůvodněných případech lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v pěti opakováních.

V případě potřeby je nutno upravit pH testovacího média s testovanou chemikálií na 7,2. K úpravě pH se použije roztok NaOH (15) nebo HCl (16). V případě, že k rozpuštění testované chemikálie bylo třeba užít rozpouštědla, jeho množství nesmí přesáhnout 100 mg/l. V tomto případě se provádí stanovení s další kontrolou, která obsahuje pouze rozpouštědlo při nejvyšší koncentraci dosažené v koncentrační řadě. Před vlastním stanovením se provádí předběžný test na širokém rozsahu koncentrací s cílem najít vhodný testovaný rozsah koncentrací. Předběžný test se provádí s jedním opakováním pro každou koncentraci. U testování hnojiv se do série zahrne měření nitrifikace v jednotlivých koncentracích přípravku bez přídavku půdy, aby mohla být provedena korekce naměřených dat odečtením aktivity nitrifikátorů v samotných koncentracích přípravku. Po skončení preinkubace

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

se ke vzorkům přidá objem testovacího média s testovanou chemikálií přidaného, aby celkový objem roztoku včetně vody přítomné v půdě činil 60 ml. Lahve se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. Nitrifikační aktivita se stanoví podle odstavce 5.6.

5.4 Testování kontaminovaných půd

Testované půdy a standardní půda se navažují do Erlenmeyerových baněk podle tabulky 1 a dovlhčí se na 60 % WHC. Poté se půdy preinkubují 2 dny ve tmě při 20 °C. Po preinkubaci se z navážek, které jsou v tabulce 1 označeny jako půdy pro směsný vzorek, připraví směsné vzorky. Každý směsný vzorek obsahuje navážku odpovídající 7,5 g testované a 7,5 g standardní suché půdy. Směsný vzorek a vzorky půd testované a standardní se preinkubují další jeden den ve tmě při 20 °C. Poté se ke vzorkům přidá 60 ml testovacího média a inkubace pokračuje, jak je uvedeno v odstavci 5.6.


SNA se stanoví ve směsném vzorku, v půdě testované a standardní, a to vždy ve čtyřech opakováních.

Tabulka 1. Navážky standardní a testované půdy pro stanovení vlivu polutantů na nitrifikaci. Navážky odpovídají množství sušiny ve vzorku.

Vzorek	Navážka (g)	Počet navážek	Erl. baňka (ml)
Standardní půda (přímé stanovení)	15,0	4	250
Standardní půda na směsný vzorek	16,0	2 × počet testovaných půd	100
Testovaná půda (přímé stanovení)	15,0	4	250
Testovaná půda na směsný vz.	16,0	2	100

5.5 Testování vodních extraktů bioodpadů (např. čistírenských kalů)

Připraví se suspenze testovaného materiálu s vodou v poměru 1 : 10 (navážka odpovídající sušině : voda) a hodnota pH se upraví hydroxidem sodným (15) nebo kyselinou chlorovodíkovou (16) na 7,5. Suspenze se nechá třepat 24 h a poté se pevné částice od extraktu oddělí centrifugací. Vliv extraktu na půdu se testuje v koncentrační řadě, která zahrnuje kontrolu bez extraktu. Nejvyšší testovaná koncentrace extraktu se připraví smícháním extraktu s koncentrovaným testovacím médiem tak, aby po jejím zředění extraktem bylo dosaženo koncentrace běžného testovacího média (8). Poté se pH upraví na 7,2 a připraví se geometrická koncentrační řada. Poměr mezi dvěma sousedními koncentracemi nemá být větší než dva. Pro přípravu koncentrační řady se použije testovacím médiem (8). Do série se zahrne měření nitrifikace v extraktu bez přídavku půdy, aby mohla být provedena korekce naměřených dat odečtením aktivity nitrifikátorů v extraktu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

Baňky se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. Nitrifikační aktivita se stanoví podle odstavce 5.6.

5.6 Stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity

Vzorek se nechá důkladně třepat tak, aby půda nezůstávala usazena na dně (170 ot/min). Po 2 h a 6 h se odebere 5 ml suspenze, ke kterým se přidá 5 ml roztoku KCl (5). Tím dojde k zastavení nitrifikace. Půda se od roztoku oddělí filtrací nebo centrifugací. V roztoku se stanoví koncentrace NO_2^- . Kalibrační křivka se připraví v roztoku KCl (6), který se použije i pro ředění vzorků s vysokým obsahem NO_2^- .

5.7 Stanovení koncentrace dusitanových iontů spektrofotometricky


5.7.1 Příprava kalibrační křivky

V prvním kroku se do 50ml baňky pipetuje 5 ml zásobního standardního roztoku dusitanu sodného (14) a doplní po značku vodou (9). Tento roztok má koncentraci 10 $\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$.

Dále se pipetuje podle tabulky 2.

Tabulka 2. Příprava standardů pro stanovení dusitanů v půdním extraktu.

Krok	Pipetovaný roztok ($\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$)	Pipetovaný objem (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$)
1.	100	5	50	10
2.	10	5	50	1
3.	1	5	50	0,10
4.	0,1	5	50	0,01
5.	0,1	5	10	0,05
6.	0,1	20	25	0,08
7.	1	10	50	0,20
8.	0,2	15	25	0,12
9.	0,2	20	25	0,16

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

5.7.2 Dávkování činidel

Pipetuje se 3000 µl roztoku kalibrační křivky nebo vzorku, přidá se 60 µl roztoku sulfanilamidu (11) a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 60 µl N-(1-naftyl)-etylendiaminu (13) a nechá 20 min vybarvovat. Zbarvení je stále několik hodin.

5.7.3 Měření

V 10mm kyvetě se měří absorbance standardů a vzorků při 540 nm. Koncentrace dusitanů v extraktu (µg NO₂-N/ml) se stanoví odečtem z kalibrační křivky.

6 Výpočet

6.1 Výpočet koncentrace dusitanů v půdním vzorku přepočtená na sušinu

Navážovala se čerstvá půda, jejíž množství odpovídalo danému množství suché půdy

$$\text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g}/\text{g}_{\text{suš}}) = \text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g}/\text{ml}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m} \quad (1)$$

NO₂-N (µg/g_{suš}) koncentrace dusitanů v půdním vzorku přepočtená na sušinu,

V objem extrakčního činidla (ml),

m hmotnost suché půdy, které odpovídá dané navážce čerstvé půdy (g),

w vlhkost vyjádřená jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

6.2 Krátkodobá nitrifikační aktivita


$$\text{SNA} = \frac{C_6 - C_2}{4} \times 1000 \quad (2)$$

SNA krátkodobá nitrifikační aktivita (ng NO₂⁻-N.g_{suš}⁻¹. h⁻¹),

C₆ koncentrace NO₂⁻-N (µg/g_{suš}) po 6 h inkubace,

C₂ koncentrace NO₂⁻-N (µg/g_{suš}) po 2 h inkubace,

1000 přepočet µg na ng.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

6.3 Testování kontaminovaných půd

Spočítá se

M_m průměrná hodnota SNA ve směsném vzorku,

SD_m směrodatná odchylka SNA směsného vzorku,

M_c průměrná hodnota SNA standardní půdy,

M_p průměrná hodnota SNA kontaminované půdy.

Jestliže platí

$$M_m + SD_m < 0,9 \times (M_c + M_p)/2,$$

potom je kontaminovaná půda považována za toxickou.

6.4 Testování chemikálií a extraktů bioodpadů

EC_x (Effect concentration – účinná koncentrace, při které se projeví x% inhibiční účinek),
 LOEC (Lowest observed effect concentration – nejnižší koncentrace, při které byl pozorován nežádoucí efekt),
 NOEC (No observed effect concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt, zkušební koncentrace těsně pod LOEC) se vypočtou podle níže uvedeného schématu:

Pro testování normality rozdělení se použije Shapirův-Wilkův test a pro testování homogenity rozptylů Levenův test.

Stanovení NOEC/LOEC


- 1 Data mají normální rozdělení a homogenní rozptyl: jednostranný Dunnettův test.
- 2 Data mají normální rozdělení a nehomogenní rozptyl: jednostranný Welchův t-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí.
- 3 Data nemají normální rozdělení: jednostranný U-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí.

Stanovení EC_x

Probit nebo logit regrese, Weibullova analýza

Porovnání testované látky s kontrolou (limitní test)

- 1 Data mají normální rozdělení a homogenní rozptyl: jednostranný t- test.
- 2 Data mají normální rozdělení a nehomogenní rozptyl: jednostranný Welchův t-test.
- 3 Data nemají normální rozdělení: jednostranný Mann-Whitneyův U-test

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31220.2 – Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

Poznámky

1. *Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf).*

7 Literatura

- 1 ISO 15685 Soil Quality - Ammonium oxidation, a rapid method to test potential nitrification in soil. International Organization for standardization, 2004.
- 2 M. Šimek: Fyzikální vlastnosti půdy. *Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky*, 1. vydání, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích - Biologická fakulta, České Budějovice 2003, 131 s., ISBN 80-7040-629-1.