

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2017

Ročník XXI, číslo 1/2017

Brno 2017

Obsah

1	Stanovení nízkých koncentrací dusíku v hnojivech Václav Ryppl, Libuše Tůmová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení NRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň	1
2	Zavedení metody na stanovení aktivity denitrifikačních enzymů v půdních vzorcích Jiří Čuhel Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB NRL, Hroznová 2, 656 06 Brno	13
3	Rozšíření testu pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA) o možnost analyzovat potenciálně biologicky aktivní hnojiva Martin Váňa Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	25
4	Převedení stanovení pesticidů na nový GC-MS/MS systém Petra Kosubová, Klára Kantošová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	33

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení nízkých koncentrací dusíku v hnojivech

Václav Rypl, Libuše Tůmová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení NRL Plzeň,

Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň

vacla.rypl@ukzuz.cz

1 Souhrn

Byl vypracován postup stanovení nízkých koncentrací dusíku v hnojivech.

2 Úvod

Do kategorie hnojiva jsou řazeny různé druhy materiálů. Některé slouží jako zdroj živin, jiné jako pomocné látky pro růst rostlin. Patří sem i např. zálivkové vody. Zatímco u materiálů sloužících jako zdroj živin jsou obsahy dusíku vysoké v řádu jednotek až desítek procent, u materiálů jako jsou pomocné látky nebo zálivkové vody se obsah dusíku pohybuje řádově mezi 10^{-4} až 10^{-1} %. Kvůli potřebě stanovovat tyto nízké koncentrace bylo nutné dosáhnout snížení meze stanovitelnosti.

3 Materiál a metody

3.1 Stanovení dusíku podle Jodlbauera

Byla zvolena Jodlbauerova modifikace Kjeldahlova stanovení dusíku (JPP ÚKZÚZ, postup č. 20135.1). Nízké meze stanovitelnosti bylo dosaženo navážením vzorku do mineralizační tuby, jeho mineralizací a následným vložením mineralizační tuby přímo do destilačně titrační jednotky. Mez stanovitelnosti lze ovlivnit velikostí navážky v závislosti na druhu materiálu.

3.2 Použité materiály

Tabulka 1. Vzorky použité k analýze – LIMS – hnojiva 2016.

Č. vz./typ	Označení vzorku	Výrobce	Deklarovaný obsah N (%)
586/kap	Alg-a-Mic	BOIBIZZ WORLDWIDE BV., Nizozemí	min. 0,09
590/kap	Top - Max	BOIBIZZ WORLDWIDE BV., Nizozemí	min. 0,09
610/kap	AMAGRO Alga	AMAGRO s.r.o., ČR	min. 0,1
611/kap	Ligno AKTIVÁTOR roztok	AMAGRO s.r.o., ČR	
612/pev	Ligno AKTIVÁTOR prášek	AMAGRO s.r.o., ČR	
625/kap	Bio - Algeen S - 90	Schulze a Hermesen GmbH, Německo	
626/kap	Algasol PS		
652/kap	RootMost	Leili Agrochemistry Co., Čína	min. 0,04
658/kap	Fugát Lyckeby		
767/kap	Plagron Seedbooster	Plagron BV., Nizozemí	min. 0,0126
777/kap	Compo Orchid power	Compo GmbH, Německo	min. 0,0225
778/kap	Technologická voda	Vinařství Šabata s.r.o., ČR	
779/kap	Zálivková voda		max. 0,2
kn/pev	IRM 3127 Sediment	ÚKZÚZ	

3.3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.3.1 H_2SO_4 , koncentrovaná, $w = 96 \%$, $\rho = 1,84 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.3.2 Deionizovaná voda – reverzní osmóza s iontoměničovou kolonou ($< 0,2 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$).

3.3.3 Fenol.

3.3.4 Kyselina fenolsírová.

Příprava: 40 g fenolu (3.3.3) rozehřátého na vodní lázni se smíchá s 1000 ml koncentrované H_2SO_4 (3.3.1).

3.3.5 Zinek, práškový.

3.3.6 Síran sodný bezvodý, Na_2SO_4 .

3.3.7 Síran měďnatý, pentahydrát, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3.8 Selen, práškový.

3.3.9 Katalyzátor.

Příprava: Z 1000 g Na_2SO_4 (3.3.6) se odebere (100 – 200) g a jemně se roztře s 5 g selenu (3.3.8) a 50 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.3.7). Rozetřená směs se dokonale promíchá se zbytkem Na_2SO_4 .

3.3.10 Hydroxid sodný, NaOH .

3.3.11 Kyselina sírová, H_2SO_4 , 0,1 mol.l⁻¹.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (3.3.2) se přidá 5,6 ml kyseliny sírové (3.3.1). Po vytemperování se baňka doplní po značku vodou (3.3.2) a obsah se promíchá.

3.3.12 NaOH , roztok, 34% (m/V).

Příprava: 340 g hydroxidu sodného (3.3.10) se za stálého míchání a chlazení rozpustí v 1000 ml vody (3.3.2).

3.3.13 Kyselina boritá, H_3BO_3 , roztok 4% (m/V).

Příprava: V 1000ml baňce se 40 g kyseliny borité za horka rozpustí v asi 700 ml vody (3.3.2). Po vytemperování se baňka doplní vodou (3.3.2) po značku.

3.3.14 Bromkresolová zeleň, roztok 0,1% (m/V).

Příprava: V 1000ml baňce se rozpustí 1 g bromkresolové zeleně v etanolu.

3.3.15 Metylová červeň, roztok 0,1% (m/V).

Příprava: V 1000ml baňce se rozpustí 1 g metylčerveně v etanolu.

3.3.16 Jímací roztok kyseliny borité.

Příprava: Ve vhodné nádobě se promíchají roztoky 1000 ml 4% kyseliny borité (3.3.13), 10 ml 0,1% bromkresolové zeleně (3.3.14) a 7 ml 0,1% metylčerveně (3.3.15). Platí pouze při použití UDK159. Při použití jiné instrumentace se postupuje podle doporučení výrobce přístroje.

3.3.17 TRIS, Tris(hydroxymetyl)-aminometan, $C_4H_{11}NO_3$, $M_r = 121,14 \text{ g.mol}^{-1}$.

3.3.18 Směsný indikátor 0,2% metylčerveně + 0,1% methylenová modř (Tashiro), pro stanovení faktoru kyseliny.

Příprava: Naváží se 0,2 g metylčerveně a 0,1 g methylenové modře, za mírného zahřívání se rozpustí ve 100 ml 96% etanolu a důkladně se promíchá.

3.3.19 $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% roztok.

Příprava: Naváží se 1 g síranu amonného, převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (3.3.2) po značku.

3.3.20 $(NH_4)_2SO_4$, 1% roztok.

Příprava: Naváží se 10 g síranu amonného, převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (3.3.2) po značku.

3.4 Přístroje a pomůcky

3.4.1 Mineralizační blok (Tecator 1015 Digester).

3.4.2 Automatická destilačně titrační jednotka (UDK 159).

3.4.3 Analytické váhy (Sartorius A200S).

3.4.4 Analytické váhy (Sartorius E200D).

3.5 Mineralizace

Do mineralizační tuby se naváží (2 – 20) g vzorku. Navážka se volí podle typu vzorku. Přidá se 15 ml kyseliny fenolsírové (3.3.4), promíchá se a nechá se stát asi 30 min, než je veškerý dusičnanový dusík převeden na p-nitrofenol. Poté se přidá asi 1 g práškového zinku (3.3.5), promíchá se a nechá se stát asi 40 min, než proběhne redukce na p-aminofenol. Následně se přidá asi 5 g katalyzátoru (3.3.9) a promíchá se.

Mineralizační tuba se umístí do mineralizačního bloku (3.4.1) a dále se postupuje podle pokynů na obsluhu mineralizačního bloku. Po dokončení mineralizace se obsah tub nechá (5 – 10) min chladit a poté se opatrně zředí nejvýše 50 ml vody (3.3.2).

Zároveň s mineralizátem vzorku se připraví slepý pokus stejným postupem, avšak bez navážky vzorku.

3.6 Měření

3.6.1 Stanovení faktoru, titru a normality odměrného roztoku

Jako odměrný roztok se použije 0,1 mol.l⁻¹ H₂SO₄ (3.3.11).

Do titrační baňky se diferenčně naváží (0,2 – 0,3) g TRIS (3.3.17) s přesností na 0,0001 g, přidá se 15ml vody (3.3.2) a několik kapek směsného indikátoru tashiro (3.3.18). Titruje se odměrným roztokem kyseliny sírové (3.3.11) do barevného přechodu z šedozelené do červenofialové.

3.6.1.1 Faktor odměrného roztoku se vypočte podle vztahu

$$f_{H_2SO_4} = \frac{m}{0,02423 \times V_{H_2SO_4}}$$

Kde

$f_{H_2SO_4}$ faktor odměrného roztoku kyseliny sírové (3.3.11),

m hmotnost navážky TRIS (3.3.17) [g],

0,02423 množství TRIS odpovídající 1 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.3.11) [g/ml],

$V_{H_2SO_4}$ spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (3.3.11) [ml].

3.6.1.2 Titr odměrného roztoku

$$c = 0,1 \times f_{H_2SO_4}$$

Kde

c je titr odměrného roztoku [mol.l⁻¹].

3.6.1.3 Normalita odměrného roztoku

Platí, že 0,1 mol.l⁻¹ H₂SO₄ = 0,2 N H₂SO₄.

$$n = 2 \times c$$

Kde

n je normalita odměrného roztoku [N].

3.6.2 Měření na automatické destilačně titrační jednotce

Do software přístroje se vloží (n) hodnota normality odměrného roztoku. V metodě se nastaví parametry dávkování jednotlivých chemikálií: 80 ml 34% NaOH (3.3.12), 20 ml H₂O (3.3.2), 30 ml jímacího roztoku kyseliny borité (3.3.16).

Do přístroje se vloží mineralizační tuba se vzorkem, zadá se hodnota navážky vzorku a spustí se destilace. Po dokončení analytického cyklu přístroj zobrazí výsledky v mg dusíku obsaženého v mineralizační tubě.

Výpočet

$$w = \frac{m_1}{m_2 \times 10}$$

Kde

w je obsah dusíku ve vzorku [%],

m₁ naměřené množství dusíku v mineralizační tubě [mg],

m₂ navážka vzorku [g].

4 Výsledky a diskuze

4.1 Přehled výsledků reálných vzorků

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky reálných vzorků hnojiv.

Tabulka 2. Výsledky měření reálných vzorků.

	N %	RSD %
irm3127	0,0596	3,3
586	0,1809	0,4
590	0,1947	0,9
610	0,1609	4,3
611	0,1449	1,6
612	0,6485	2,4
625	0,0205	0,5
626	0,0230	2,7
652	0,0615	2,0
658	0,0376	1,4
767	0,0134	2,5
777	0,0311	1,5
778	0,0033	6,6
779	0,0009	9,0

4.1 Navážky a rozklad vzorků

Použitelná navážka závisí především na charakteru vzorku.

Tabulka 3. Typy vzorků, navážky a použitelnost metody. Uvedeny jsou nejvyšší možné koncentrace celkového dusíku v závislosti na navážce vzorku a tomu odpovídající množství práškového zinku (3.3.5).

Navážka vzorku (g)	N (max.) (%)	Navážka Zn (g)	Typ vzorku
20	< 0,3	1	Zálivkové vody
10	< 0,6	1	Průmyslové hnojivo s minimálním obsahem organických látek
2 až 5	< 1,0	0,7	Pomocné přípravky - typicky s obsahem huminových látek - jsou husté a hnědé
2	< 1,0	0,3	Pevné vzorky a vzorky, které s kys. fenolsírovou a zinkem vytvořily příliš hustou nebo zpěněnou směs

V některých případech, jako jsou materiály s obsahem huminových látek, viskózní kapaliny nebo pevné vzorky, dochází po přidavku fenolsírové kyseliny (3.3.4) a následně zinku (3.3.5) ke ztuhnutí směsi příp. k výraznému pění. Pak je vhodné buď snížit navážku, nebo před započítáním spalování přidat 15 ml koncentrované kyseliny sírové (3.3.1). Po skončení spalování se pak ke směsi musí přidat 20 g NaOH (3.3.10), aby destilace proběhla v zásaditém prostředí.

Mineralizační tuby se vkládaly do mineralizační bloku (3.4.1) vyhřátého na 250 °C a vzniklá pěna se opatrně mícháním odstranila ze stěn tuby. Po odpění se zvýšila teplota na 400 °C, při které se vzorky za občasného míchání spalovaly asi 1 h. Po vyčření do zelenomodré barvy se pokračovalo ještě 30 min. Asi 5 min po ukončení spalování se opatrně spláchly stěny tuby (20 – 50) ml deionizované vody (3.3.2), stále ještě za tepla.

4.2 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti byla určena analýzou nízkých koncentrací dusíku. Do deseti mineralizačních tub bylo napipetováno po 0,5 ml 0,1% roztoku síranu amonného (3.3.19), což odpovídá přibližně 0,106 mg dusíku a následně byla provedena destilace s titrací. Na vyhodnocení byl použit software EffiValidation 3.0 a postup Meze: 3s – IUPAC.

Tabulka 4. Mez stanovitelnosti.

Validovaná vlastnost na mezi detekce (mg N)	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti (mg N)
0,0464	0,1548

Vypočítaná mez stanovitelnosti dobře odpovídá hodnotě 0,2 mg N, kterou uvádí výrobce automatické destilačně titrační jednotky UDK 159.

Tabulka 5. Závislost meze stanovitelnosti na použité navážce vzorku.

Navážka (g)	MS (%)
1	0,0155
2	0,0077
5	0,0031
10	0,0015
20	0,0008

Jako kompromisní mez stanovitelnosti byla vybrána hodnota 0,0050 %.

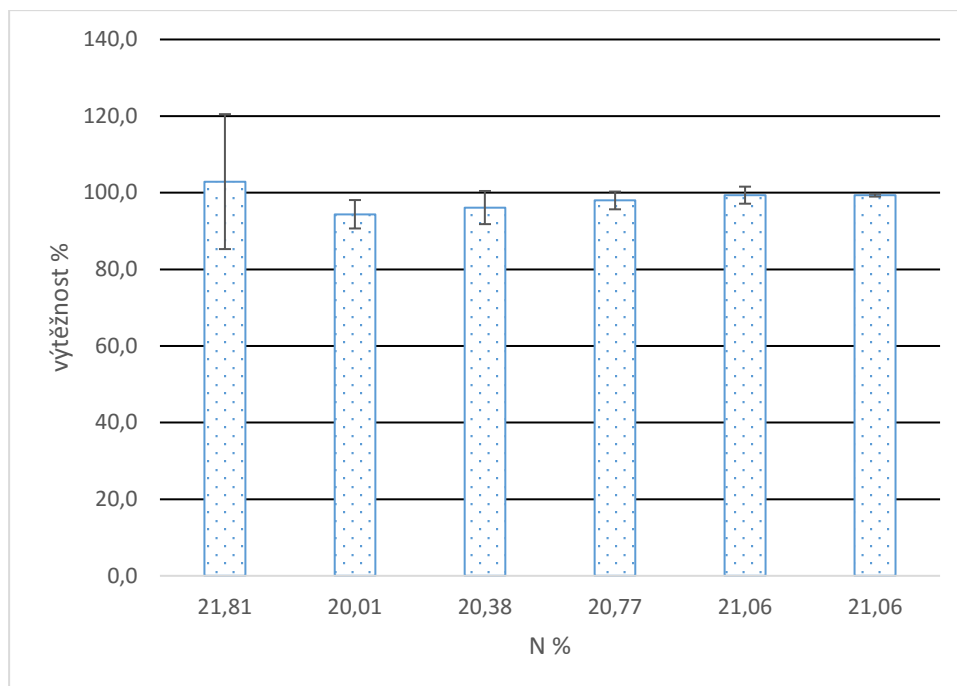
4.3 Výtěžnost

Výtěžnost byla ověřována pomocí 1% roztoku síranu amonného (3.3.20). Teoretický obsah dusíku v síranu amonném je 21,20 %.

Tabulka 6. Naměřené hodnoty 1% (NH₄)₂SO₄.

std 1% (ml)	Průměr N (mg)	Průměr N (%)	Průměr výtěžnost (%)	sd výtěžnost (%)
std 0,1ml	0,22	21,81	102,9	17,6
std 0,2ml	0,40	20,01	94,4	3,7
std 0,3ml	0,61	20,38	96,1	4,3
std 0,4ml	0,83	20,77	98,0	2,3
std 0,5ml	1,05	21,06	99,4	2,2
std 1,0ml	2,11	21,06	99,4	0,4

Graf 1. Výtěžnost.



Vyšší rozptyl výsledků v nízkých hladinách lze připočíst blízkosti meze stanovitelnosti, která odpovídá přibližně 0,155 mg N v mineralizační tubě.

4.4 Správnost

Správnost byla vyhodnocena pomocí referenčního materiálu ÚKZÚZ 3127 – sediment. Byl použit software EffiValidation 3.0 a postup správnost: omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici

Tabulka 7. IRM 3127 sediment – správnost.

Úroveň	Popis	Referenční hodnota %	Naměřeno %	Výtěžnost %	Referenční přesnost %
1	irm3127	0,08136	0,05980	73,50	0,02086
Přesnost %		n	Hypotéza o přesnosti		Hypotéza o správnosti
0,00238		6	Přijata		Přijata

Správnost byla dále kontrolována pomocí „VIRM-K1-kal navázáno na CP1“ s výsledným průměrem 3,372 % N a RSD 2,9 %. Hodnoty z regulačního diagramu jsou DVM 3,149 %, střed 3,328 % a HVM 3,507 %.

4.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vyhodnocena analýzou paralelních stanovení reálných vzorků. Byl použit software EffiValidation 3.0 a postup Opakovatelnost z paralelních měření.

Tabulka 8. Opakovatelnost.

Průměr měření (%)	Opakovatelnost (%)	Rel. opakovatelnost (rel. %)	n
0,11554	0,00491	4,25	28

Jako praktická hodnota byla zvolena relativní opakovatelnost 7 %.

4.6 Nejistota

Nejistota byla vyhodnocena analýzou paralelních stanovení reálných vzorků. Byl použit software EffiValidation 3.0 a postup Nejistoty: Z dat pro vyhodnocení přesnosti - paralelní měření.

Tabulka 9. Nejistota.

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota (%)	0,11554
St. nejistota %	0,00491
Rel. st. nejistota (rel. %)	4,25
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota %	0,00982
Rel. rozšířená nejistota (rel. %)	8,50

Jako praktická hodnota byla zvolena relativní rozšířená nejistota 10 %.

5 Závěr

Metoda poskytuje správné a přesné výsledky a je vhodná k rutinnímu stanovení nízkých koncentrací dusíku v hnojivech.

6 Literatura

1. Jednotné pracovní postupy - Zkoušení hnojiv; Alena Žalmanová, Radmila Varmužová, Jiří Zbírál, Václav Rypl, Jaroslava Petrová, Eva Niedobová, Brno 2015, ISBN 978-80-7401-100-9.
2. UDK159 Automatic Distillation & Titration System – Operating Manual.

Zavedení metody na stanovení aktivity denitrifikačních enzymů v půdních vzorcích

Jiří Čuhel

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno
jiri.cuhel@ukzuz.cz

1 Úvod

Denitrifikace je nejvýznamnější mikrobiální proces, kterým se z půdy uvolňuje do atmosféry oxid dusný (N_2O). Po oxidu uhličitým a metanu je oxid dusný třetím nejúčinnějším skleníkovým plynem, který přispívá ke globálnímu oteplování. V přepočtu na molekulu má N_2O asi $320 \times$ větší radiační účinnost než CO_2 a doba zdržení jeho molekul v atmosféře je přibližně 120 let (Nakicenovic a Swart, 2000). Navíc N_2O přispívá k destrukci ozónové vrstvy ve stratosféře (Crutzen a Ehhalt, 1977) a po určitých přeměnách může také vytvářet kyselý déšť či fotochemický smog. Před industrializací byla koncentrace N_2O v atmosféře 270 ppb, avšak v roce 2011 koncentrace dosáhla již hodnoty 324,2 ppb (IPCC, 2013), což odpovídá nárůstu o 20 %.

Denitrifikací se za anaerobních podmínek nitrátový nebo nitritový dusík (např. uvolněný nitrifikací) jako substrát disimilačně redukuje na plynné sloučeniny dusíku a fixovaný dusík se tím vrací zpět do atmosféry, čímž denitrifikace zapadá jako poslední článek do globálního cyklu dusíku. Jde o sekvenci jednotlivých redukcí, která probíhá podle následujícího schématu:



Oxidované formy N, tj. NO_3^- , NO_2^- , ale i NO a N_2O , slouží jako náhradní terminální akceptory elektronů v dýchacím řetězci za podmínek sníženého parciálního tlaku kyslíku; dovolují tak aerobním mikroorganismům růst a získávat energii i za anaerobních podmínek. Denitrifikace je jediným možným biologickým procesem spotřeby N_2O (Conrad, 1996), nicméně převážně je spíše jeho zdrojem. Ne všechny NO_3^- je totiž redukován až na N_2 , čímž vznikají dva hlavní denitrifikační produkty N_2O a N_2 . Denitrifikaci provádí rozmanitá skupina mikroorganismů – bakterie, archaea a mikroskopické houby, a je katalyzována řadou specifických denitrifikačních

enzymů (reduktasami, které jsou lokalizovány v cytoplasmatické membráně nebo v buněčné periplasmě).

Schopnost denitrifikace mikroorganismů v půdě se nejčastěji stanovuje laboratorní metodou zvanou aktivita denitrifikačních enzymů (DEA). Při měření DEA jde o stanovení maximální aktivity denitrifikačních enzymů právě přítomných v půdním vzorku v době odběru, a to za optimálních podmínek. Toto stanovení nezahrnuje aktivitu enzymů nově syntetizovaných. Optimalizace podmínek pro denitrifikaci je zajištěna výměnou inkubační atmosféry za inertní plyn (nastavení anaerobního prostředí), konstantní inkubační teplotou a přidavkem nitrátu (primární zdroj denitrifikace) a glukosy (zdroj energie a uhlíku pro denitrifikační mikroorganismy). Ke vzorkům je také přidán acetylen, který inhibuje redukci N_2O na N_2 a umožňuje tak stanovit DEA jako produkci N_2O za jednotku času (na rozdíl od N_2 lze koncentraci N_2O snadno měřit plynovou chromatografií). Metoda DEA pro stanovení denitrifikace byla poprvé navržena před 36 lety (Smith a Tiedje, 1979). Od té doby se její použití značně rozšířilo, avšak každá laboratoř si metodu více či méně upravila podle svých potřeb. V současné době probíhá snaha o standardizaci této metody DEA pod hlavičkou Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO). Cílem této práce bylo zoptimalizovat kritické části metody DEA, otestovat ji u půdních vzorků s různými fyzikálně-chemickými parametry a zavést ji v laboratořích NRL – OMB pro rutinní použití.

2 Aktivita denitrifikačních enzymů (DEA) s rozlišením produktů N_2O a N_2

2.1 Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení denitrifikační aktivity ve vzorcích minerálních i organických půd. Hodnoty DEA představují maximální aktivitu denitrifikačních enzymů v půdním vzorku v době odběru. Hodnoty DEA úzce souvisí s biomasou denitrifikátorů a lze je tak interpretovat i jako velikost populace denitrifikačních bakterií.

2.2 Princip

Při respirační denitrifikaci se dusičnany postupně redukují na oxid dusný (N_2O), který lze snadno kvantifikovat plynovou chromatografií a jeho určitá část se v dalším kroku redukuje

na molekulární dusík (N_2), jehož kvantifikace je naopak velice obtížná. Při metodě DEA se využívá inhibice redukce N_2O na N_2 přidaným acetylenem (C_2H_2), kdy jediným produktem denitrifikace zůstává pouze N_2O . Ke vzorku půdy ve skleněné baňce se přidá roztok s nadbytkem dusičnanu a glukosy, v baňce se nastaví anaerobní podmínky, přidá se C_2H_2 a zahájí se inkubace. Po 30 a 60 minutách se vzorek vnitřní atmosféry analyzuje na obsah N_2O plynovou chromatografií a z rozdílů koncentrací se vypočte množství vyprodukovaného N_2O za jednotku času (DEA). Při stanovení obou hlavních produktů denitrifikace (tj. produkce N_2O a N_2 zvlášť) popř. jejich poměru, se měří produkce N_2O z půdy i bez přídavku C_2H_2 . Produkce N_2 se potom vypočte odečtením produkce N_2O stanovené u varianty bez C_2H_2 od produkce N_2O stanovené u varianty s C_2H_2 .

2.3 Přístroje a pomůcky

- 2.3.1 Termostat s teplotou udržovanou na 20 °C.
- 2.3.2 Horizontální třepačka umístěná v termostatu (1).
- 2.3.3 Inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) s otvorem, 100 ml.
- 2.3.4 Černé pryžové zátky k inkubačním lahvím.
- 2.3.5 Zařízení na evakuaci vnitřní atmosféry z inkubačních lahví a jejich opětovné plnění argonem. Zařízení je propojeno s membránovou vývěvou a tlakovou lahví s argonem, přičemž lze manuálně přepínat mezi chodem vývěvy a plněním argonem. Místo argonu lze případně využít i jiný inertní plyn (např. helium He, molekulární dusík N_2). K zařízení je připojen tlakoměr s rozsahem relativního tlaku -100 kPa až +150 kPa a gumové hadičky s jehlami pro spojení s inkubačními lahvemi.
- 2.3.6 Chromatografické plynotěsné stříkačky s teflonovým těsněním a vyměnitelnou jehlou pro manuální nástřik vzorku, 1 ml, jehly mají boční vývod (tzv. „side hole“ ukončení).
- 2.3.7 Umělohmotné stříkačky s jehlou, 10 ml.
- 2.3.8 Plynový chromatograf s detektorem elektronového záchytu (ECD), manuálním nástřikem vzorku a kapilární kolonou HP-PLOT Q.

2.4 Chemikálie

2.4.1 Glukosa bezvodá, $C_6H_{12}O_6$.

2.4.2 Dusičnan draselný, KNO_3 .

2.4.3 Optimalizační roztok, $c(C_6H_{12}O_6) = 1,0 \text{ mmol/l}$, $c(KNO_3) = 1,0 \text{ mmol/l}$.

Příprava: 180,0 mg glukosy (2.4.1) a 101,1 mg dusičnanu draselného (2.4.2) se rozpustí ve vodě vytemperované na 20 °C a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku. Roztok se každý den připraví čerstvý a umístí do termostatu s teplotou 20 °C.

2.4.4 Acetylen, C_2H_2 , technický plyn v tlakové lahvi.

2.4.5 Argon, Ar, technický plyn v tlakové lahvi (čistota 4.6, tj. 99,996 % Ar).

2.4.6 Helium, He, vysoce čistý plyn v tlakové lahvi (čistota 6.0, tj. 99,9999 % He).

2.4.7 Směs argonu (95 %) a metanu (5%), Ar-CH₄ P5, směs plynů v tlakové lahvi.

2.4.8 Kalibrační směs s N₂O o koncentraci cca 300 ppm v N₂ v tlakové lahvi.

2.5 Pracovní postup

Vzorek půdy se vyjme z lednice a naváží se v 6 opakováních po 25 g vlhké půdy do 100ml inkubačních lahví. Nechá se 60 min ohřát v termostatu při 20 °C a poté se do inkubačních lahví odměrným válcem přidá 25 ml optimalizačního roztoku (3) vytemperovaného na 20 °C. Inkubační lahve se uzavřou černými pryžovými zátkami a šroubovými uzávěry s otvorem. Vnitřní atmosféra se vymění za Ar (5) opakovanou evakuací (asi -100 kPa) a plněním Ar (asi 60 kPa) pomocí speciálního zařízení. Tato evakuace a plnění se provede 4 × za sebou, přičemž každá evakuace probíhá 2 min a každé plnění argonem probíhá 1 min. Při výměně vnitřní atmosféry je nutné kontrolovat její průběh na zabudovaném tlakoměru. Po čtvrtém plnění Ar se přetlak v lahvích uvolní vybubláním Ar do vody. Poté se umělohmotnou injekční stříkačkou s jehlou přidá do poloviny lahví (tj. 3 opakování) 10 ml C₂H₂. Vzniklý přetlak v lahvích se následně opět vyrovná vybubláním do vody. Lahve (všech 6 opakování) se umístí na třepačku a inkubují se za stálého třepání (150 kmitů min⁻¹) při teplotě 20 °C. Po 30 a 60 min inkubace se plynotěsnou stříkačkou s jehlou odeberou vzorky vnitřní atmosféry lahví (500 µl) a okamžitě se analyzují na obsah N₂O pomocí plynového chromatografu s detektorem elektronového záchytu (ECD). Plynový chromatograf je předem zkalibrován pomocí kalibrační

směsi s N₂O o koncentraci cca 300 ppm v N₂. Při analýze se jako nosný plyn používá He a jako pomocný plyn pro detektor ECD se používá směs Ar-CH₄ P5 (detailní nastavení plynového chromatografu je uvedeno v příloze). Po ukončení inkubace se lahve otevřou a doplněním vodou se vázkově stanoví objem plynné fáze.

Poznámky

1. *Před použitím zařízení na výměnu vnitřní atmosféry inkubačních lahví je nutné jej předem nechat dobře profoukat argonem – nejméně 2 cykly evakuace a plnění argonem “naprázdno” s prázdnými uzavřenými inkubačními lahvemi.*
2. *Denitrifikace je anaerobní proces, a proto je třeba zabránit kontaminaci vzdušným kyslíkem. Je nutné pravidelně kontrolovat stav gumových hadiček a zátek.*
3. *Celý postup je třeba důsledně standardizovat a dbát na odebrání plynných vzorků z inkubačních lahví v přesných časech (tj. po 30 a 60 min inkubace). Časy odběru se zapisují a při mírné odchylce je nutné adekvátně přepočítat výsledky.*
4. *Po odběru plynných vzorků vnitřní atmosféry inkubačních lahví se plynotěsné stříkačky zapíchnou do vhodné pryžové zátky, aby se mezi analýzami zabránilo úniku vzorku ze stříkačky.*

2.6 Výpočet

Vypočítá se produkce N₂O zvlášť pro variantu s C₂H₂ a zvlášť pro variantu bez C₂H₂. Avšak pouze varianta s C₂H₂ představuje aktivitu denitrifikačních enzymů (DEA) *sensu stricto*.

$$C_{\Delta} = C_{60} - C_{30}$$

$$G = \frac{C_{\Delta} \times V_g}{1000}$$

$$V_l = 25 + 25 - W_d$$

$$L = \frac{\alpha \times G \times V_l}{V_g}$$

$$DEA = \frac{(G + L) \times 28 \times 1000}{W_d \times 22,4 \times 0,5}$$

C ₃₀	koncentrace N ₂ O po 30 min inkubace (ppm)
C ₆₀	koncentrace N ₂ O po 60 min inkubace (ppm)
C _Δ	rozdíl v koncentraci N ₂ O mezi 60 a 30 min inkubace (ppm)
V _g	objem plynné fáze (vnitřní atmosféry) inkubační lahve (ml)
G	produkce N ₂ O do plynné fáze během 30 a 60 min inkubace (μl N ₂ O)
W _d	navážka ekvivalentu suché půdy (g)

V_1	objem kapalné fáze (objem optimalizačního roztoku a vody v navážce půdního vzorku) (ml)
α	Bunsenův absorpční koeficient pro N_2O a danou teplotu (= 0,632 pro 20 °C)
L	produkce N_2O do kapalné fáze během 30 a 60 min inkubace ($\mu l N_2O$)
DEA	aktivita denitrifikačních enzymů vyjádřená jako produkce N- N_2O do plynné i kapalné fáze na 1 g suché půdy za 1 h ($ng N-N_2O g^{-1} h^{-1}$)

Výpočty pro rozlišení produktů N_2O a N_2 během denitrifikační aktivity

Produkce N_2O a N_2 dohromady	= DEA
Produkce N_2O	= $DEA_{bez C_2H_2}$
Produkce N_2	= $DEA - DEA_{bez C_2H_2}$
Relativní produkce N_2O (%)	= $\frac{DEA_{bez C_2H_2}}{DEA} \times 100$

3 Testování metody DEA

Metoda DEA byla testována u tří půdních vzorků s různými hodnotami fyzikálně-chemických parametrů, které jsou uvedeny v tabulce 1. Půdní vzorky byly odebrány 8. 9. 2015 z horní 15cm vrstvy podle postupu č. 31000.1 (Zbíral et al., 2011), přesáty přes síto s velikostí ok 2 mm a uskladněny při -20 °C. Po vytažení z mrazničky byly půdní vzorky alespoň 7 dní ponechány v lednici (4 °C), než bylo zahájeno stanovení DEA.

Tabulka 1. Základní popis a vybrané fyzikální, chemické a mikrobiologické parametry půd použitých pro testování metody DEA. Jsou uvedeny průměry hodnot z let 1998-2014 (C_{ox} – oxidovatelný uhlík, C_{bio} – uhlík mikrobiální biomasy, jíl – zrnitostní frakce < 0,002 mm, TTP – trvalý travní porost, OP – orná půda).

Označení vzorku	7010	7029	7016
Plocha	Žďárná	Nedachlebice	Nikolčice
Okres	Blansko	Uherské Hradiště	Břeclav
Zemědělské využití	TTP	OP	Přechod z OP do TTP
Půdní typ (FAO)	Glejsol	Luvisol	Černozem
$pH_{1M KCl}$	4,9	5,9	7,5
Jíl (%)	10,7	18,0	23,8
C_{ox} (%)	2,84	1,63	1,71
C_{bio} ($\mu g C/g$)	422	229	291

Striktně anaerobní podmínky jsou jednou ze základních podmínek pro správné stanovení aktivity denitrifikačních enzymů, neboť za přítomnosti kyslíku denitrifikační mikroorganismy okamžitě využívají O_2 jako terminální akceptor elektronů (aerobní metabolismus) a rychlost denitrifikace prudce klesá. Důkladná výměna vnitřní atmosféry inkubačních lahví za inertní plyn (Ar) je potom klíčová pro optimalizaci inkubačního prostředí. Evakuace atmosféry inkubačních lahví a plnění inertním plynem se běžně provádí ve 4 cyklech, přičemž typicky každá evakuace probíhá 1 min a každé plnění Ar probíhá 1 min. V rámci optimalizace metody DEA jsme testovali výměnu vnitřní atmosféry inkubačních lahví ve třech režimech:

- 1 min evakuace a 1 min plnění Ar
- 1,5 min evakuace a 0,5 min plnění Ar
- 2 min evakuace a 1 min plnění Ar.

Pro zřetelnější zachycení trendu v nárůstu koncentrace N_2O v inkubačních lahvích byla inkubace prodloužena na 2 h a vzorky vnitřní atmosféry inkubačních lahví byly analyzovány na obsah N_2O každých 30 min.

Při metodě DEA by se denitrifikace měla kvantifikovat v rámci denitrifikační fáze I (Smith a Tiedje, 1979), kdy ještě nedochází k syntéze nových denitrifikačních enzymů (jako odpověď na nastavené anaerobní podmínky). Jedná se tak o aktivitu stávajících denitrifikačních enzymů přítomných v půdě v době jejího odběru. Některé laboratoře v rámci stanovení DEA inkubují půdní vzorky s přidavkem chloramfenikolu, který by měl tento předpoklad zachovat. Jedná se o antibiotikum inhibující syntézu nových proteinů (včetně denitrifikačních enzymů). Součástí připravované normy ISO pro standardizaci metody DEA je inkubace půdních vzorků právě s chloramfenikolem. Je přítomen v optimalizačním roztoku (2.4.3) a jeho koncentrace je 3 mM. V rámci optimalizace metody DEA jsme inkubovali půdní vzorky bez chloramfenikolu i s jeho přidavkem (3 mM). Doba inkubace probíhala 2 h a plynné vzorky vnitřní atmosféry inkubačních lahví jsme analyzovaly na obsah N_2O každých 30 min.

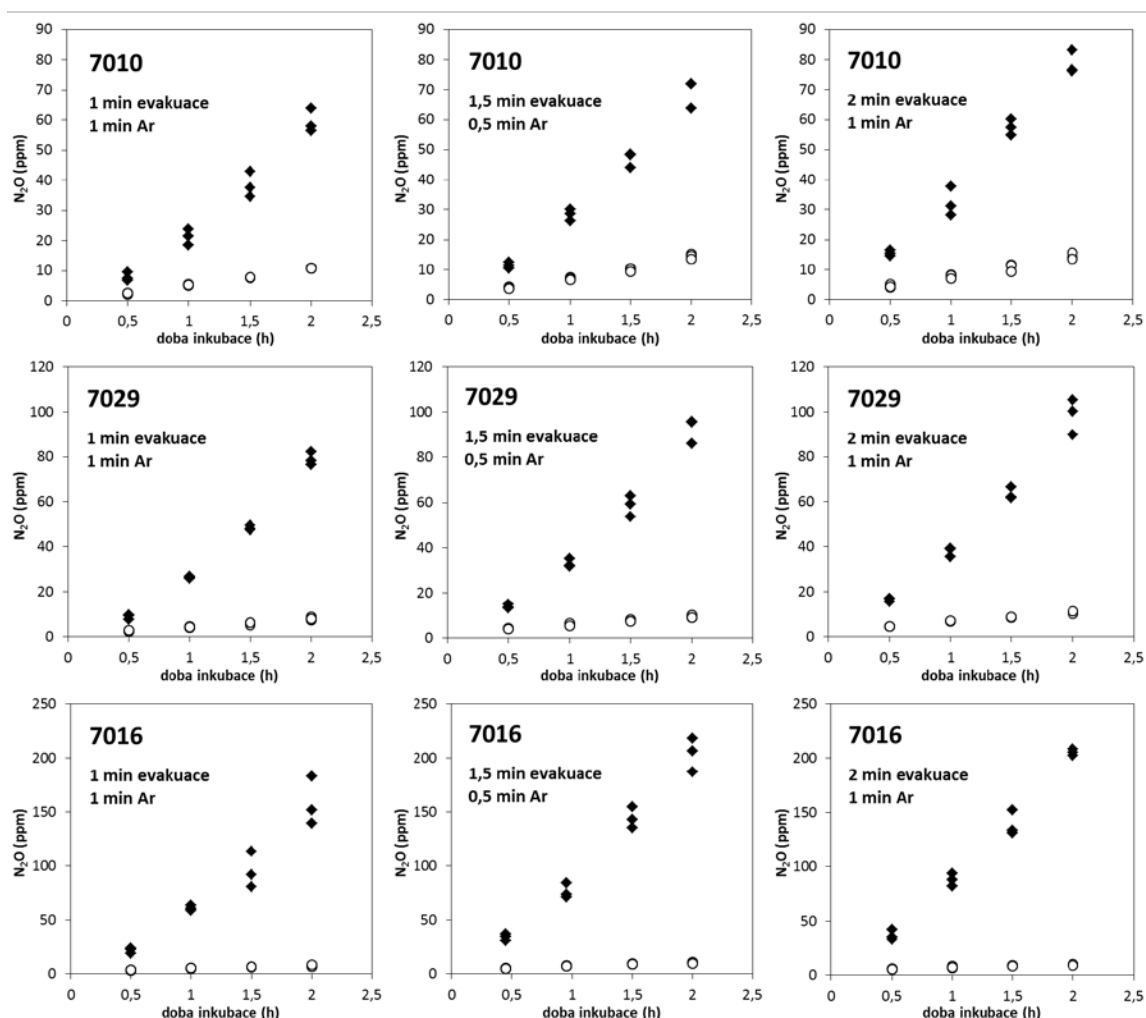
Po optimalizaci metody DEA jsme se pokusili stanovit její opakovatelnost. DEA byla stanovena u půdních vzorků 6 × nezávisle na sobě (6 různých dnů).

4 Výsledky a vyhodnocení

Pro testování metody DEA byly vybrány tři vzorky zemědělských půd, které se lišily v základních fyzikálních, chemických i biologických parametrech (tabulka 1), protože mnohé

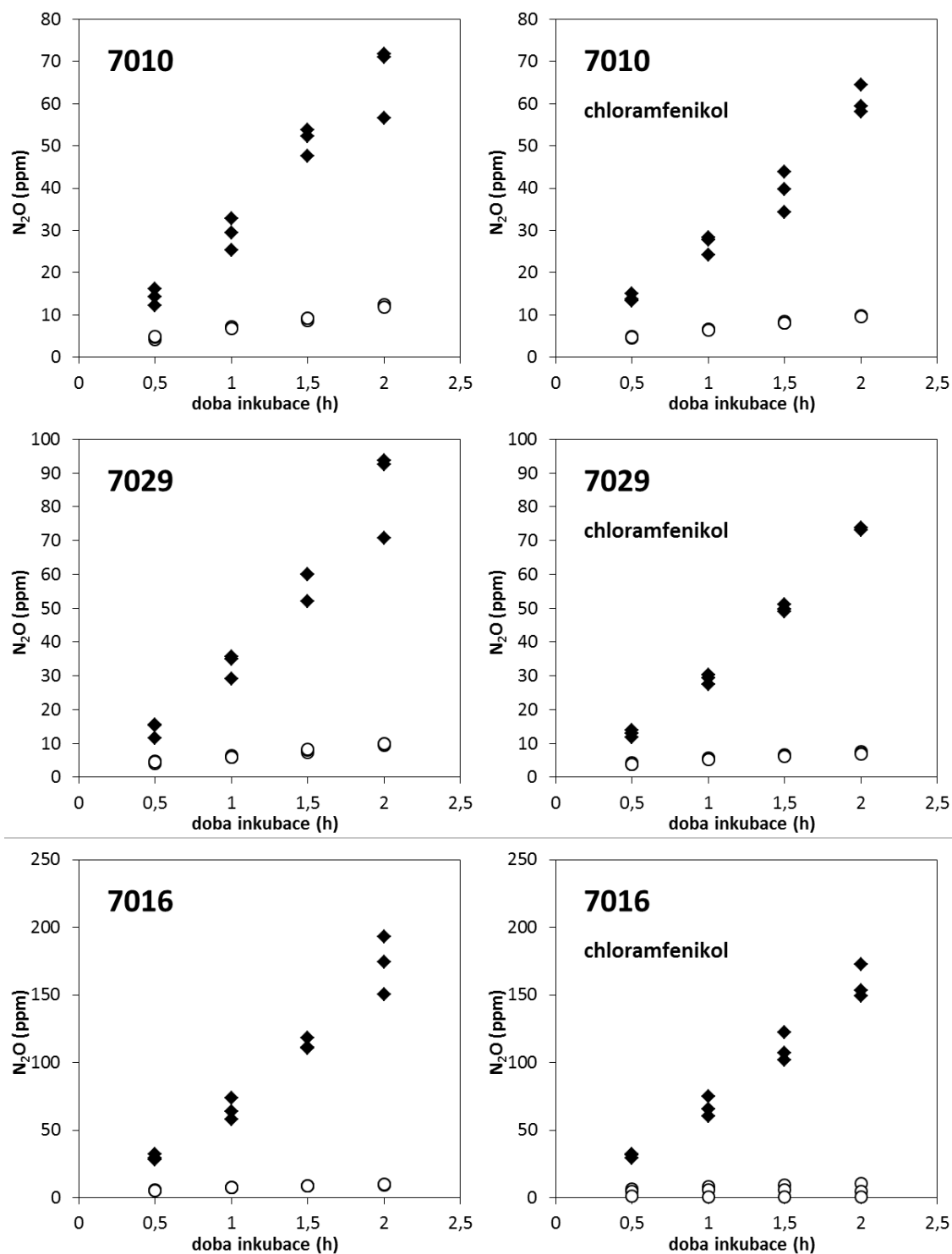
půdní parametry značným způsobem ovlivňují jak celkovou aktivitu denitrifikačních enzymů, tak množství a poměr obou denitrifikačních produktů N_2O a N_2 . Především pH půdy patří mezi nejvýznamnější faktory řídící denitrifikaci. Se vzrůstající hodnotou pH se obecně denitrifikační aktivita zvyšuje, zatímco poměr produktů $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ klesá.

Obrázek 1 ukazuje výsledky testování různé doby evakuace a plnění inkubačních lahví argonem. Se vzrůstající dobou evakuace dochází během inkubace půdních vzorků k prudšímu nárůstu koncentrace N_2O , a to u všech tří půd. Je zřejmé, že evakuace vnitřní atmosféry po dobu 1 min (i když v rámci 4 cyklů) je nedostatečná pro úplné odstranění O_2 z inkubačních lahví. Rozdíl mezi 1,5 a 2 min evakuace již není nijak výrazný, nicméně pro rutinní stanovení DEA zavádíme do metodiky evakuaci atmosféry inkubačních lahví po dobu 2 min.



Obr. 1. Nárůst koncentrace N_2O ve vnitřní atmosféře inkubačních lahví u půd 7010, 7029 a 7016 při testování různého nastavení výměníku plynů: 1 min evakuace a 1 min plnění Ar; 1,5 min evakuace a 0,5 min plnění Ar; 2 min evakuace a 1 min plnění. Jsou zobrazeny výsledky analýz s přidáním C_2H_2 (♦) i bez C_2H_2 (○) (3 laboratorní opakování pro každou variantu).

Obrázek 2 ukazuje výsledky testování přítomnosti chloramfenikolu v optimalizačním roztoku. Koncentrace chloramfenikolu 3 mM vedla ke znatelnému snížení nárůstu koncentrace N_2O během inkubace všech tří půd a tento pokles byl znatelný již během první hodiny inkubace. Murray a Knowles (1999) popsali, že chloramfenikol při koncentracích vyšších než 0,3 mM vede nejen k inhibici syntézy nových denitrifikačních enzymů, ale i k potlačení aktivity denitrifikačních enzymů již přítomných v půdě. Tato koncentrace je $10 \times$ vyšší než koncentrace chloramfenikolu navrhovaná v rámci připravované normy ISO. Jiní autoři se též stavějí k používání chloramfenikolu skepticky a při stanovení DEA jej nedoporučují (např. Pell et al., 1996). Protože chloramfenikol i v rámci našeho testování vedl k podhodnocení výsledků DEA, rozhodli jsme se jej dále nepoužívat. Toto rozhodnutí je podpořeno i krátkou dobou inkubace vzorků při stanovení DEA (60 min), kdy syntéza denitrifikačních enzymů *de novo* je zanedbatelná.



Obr. 2. Nárůst koncentrace N_2O ve vnitřní atmosféře inkubačních lahví u půd 7010, 7029 a 7016 při testování působení přidaného chloramfenikolu: v levém sloupci jsou varianty bez chloramfenikolu, v pravém sloupci varianty s přidaným chloramfenikolem. Jsou zobrazeny výsledky analýz s přidaným C_2H_2 (◆) i bez C_2H_2 (○) (3 laboratorní opakování pro každou variantu).

Po úspěšné optimalizaci metody DEA jsme se pokusili vyhodnotit její opakovatelnost. DEA byla stanovena u všech tří půd nezávisle 6 × za sebou (tj. 6 opakování). Výsledky z jednotlivých dní naznačují, že hodnoty DEA u vzorků 7010 a 7016 se vzrůstající dobou mezi rozmražením vzorku a analýzou vzrůstají (Tabulka 2). Významně se u těchto vzorků mění i rychlosti produkce jednotlivých denitrifikačních produktů N_2O a N_2 . Zdá se, že aktivita denitrifikačního společenstva se v půdních vzorcích po rozmražení mění a není možné s analýzou DEA otálet. V tomto případě nemělo smysl stanovit opakovatelnost metody DEA, protože analýzy z jednotlivých dní byly silně ovlivněny dobou od rozmražení půdního vzorku. Možným řešením by bylo před zamražením půdních vzorků připravit jejich alikvoty a poté je postupně rozmrazovat s tím, že od rozmražení jednotlivých alikvotů do stanovení DEA se zachová stejný časový odstup. Protože hodnoty DEA a produkce N_2O a N_2 se začaly měnit až 14. den po rozmražení vzorku, je nutné při rutinních analýzách stanovit DEA do 14 dnů od rozmražení vzorků.

Tabulka 2. Hodnoty DEA, produkce N_2O a N_2 zvlášť a relativní produkce N_2O stanovené u půd 7010, 7029 a 7016 v různé době po rozmražení půdních vzorků. Jsou uvedeny mediány ze tří laboratorních opakování.

Vzorek	Počet dní po rozmražení	DEA ($\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Produkce N_2O ($\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Produkce N_2 ($\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ (%)
7010	7	224,1	30,8	193,3	13,7
	9	231,5	35,2	196,3	15,2
	10	231,0	33,2	197,8	14,4
	14	280,1	37,1	243,0	13,3
	17	268,5	47,3	221,2	17,6
	20	293,5	48,3	245,2	16,5
7029	7	276,0	28,3	247,7	10,3
	9	240,8	29,2	211,6	12,1
	10	266,3	30,6	235,6	11,5
	14	256,7	28,0	228,7	10,9
	17	269,6	29,5	240,1	10,9
	20	276,1	26,4	249,7	9,6
7016	7	605,9	29,9	576,0	4,9
	9	576,9	32,1	544,7	5,6
	10	603,5	24,8	578,7	4,1
	14	661,1	28,9	632,2	4,4
	17	659,9	27,7	632,3	4,2
	20	690,0	25,2	664,8	3,7

5 Závěr

V rámci této práce byla úspěšně otestována a zavedena metoda pro stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) v půdních vzorcích. Touto metodou se podařilo stanovit potenciální denitrifikační aktivitu v půdách s různými fyzikálními, chemickými a biologickými parametry. Metoda DEA poskytuje informaci nejen o celkové denitrifikační aktivitě, ale také o rychlosti produkce jednotlivých denitrifikačních produktů N_2O a N_2 . Při rutinních analýzách je třeba se vyvarovat zbytečné prodlevy mezi rozmražením půdních vzorků a stanovením DEA, které musí být provedeno do 2 týdnů od rozmražení.

6 Literatura

1. Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and N_2). *Microbiological Reviews*, 1996, 60, 609-640.
2. Crutzen PJ, Ehhalt DH. Effects of nitrogen fertilizers and combustion on the stratospheric ozone layer. *Ambio*, 1977, 6, 112-117.
3. IPCC. Climate Change 2013: The physical science basis. Contribution of working Group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, 2013.
4. Murray RE, Knowles R. Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 3487-3492.
5. Nakicenovic N, Swart R (Eds.). Special report on emissions scenarios: a special report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 570 s.
6. Pell M, Stenberg B, Stenström J, Torstensson L. Potential denitrification activity assay in soil – with or without chloramphenicol? *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28, 393-398.
7. Smith MS, Tiedje JM. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1979, 11, 261-267.
8. Zbiral J, Malý S, Váňa M. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2011, 253 s.

Rozšíření testu pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA) o možnost analyzovat potenciálně biologicky aktivní hnojiva

Martin Váňa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno
martin.vana@ukzuz.cz

1 Úvod

Půdní mikroorganismy jsou nezastupitelnou součástí půdy, podílející se na celkové úrodnosti a kvalitě půd. Používání bioodpadů (digestáty, komposty apod.) jako hnojiv může mít i nežádoucí vedlejší účinky na půdní mikrobiální společenstva. Skladba vstupních surovin bioodpadů hraje důležitou úlohu při výsledném účinku všech toxických látek a směsí přítomných v odpadním materiálu (kaly, sedimenty atd.). Jedním z testů, který může odhalit negativní působení bioodpadu na mikrobiální společenstvo v půdě, je i test sledující nitrifikační aktivitu. Nitrifikační aktivita je spojena s úzkou skupinou mikroorganismů citlivých k působení toxických látek. V laboratořích NRL-OMB byl k tomuto účelu zaveden a zařazen do baterie testů i test pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA). Podle předchozích zkušeností s těmito materiály vyvstala otázka, jaký design testu použít při práci s hnojivy s možným obsahem nitrifikátorů. Správná volba designu testu umožní co nejpřesněji interpretovat získané výsledky.

Cílem práce byla optimalizace testu pro stanovení SNA v případě možného výskytu nitrifikátorů v samotném hnojivu

2 Princip

Standardní půda 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 bioodpadů se ke standardní půdě přidá testovaný bioodpad v koncentrační řadě a ze stanovené nitrifikační aktivity se vypočtou hodnoty LOEC,

NOEC a EC_x. Zároveň se stanoví i nitrifikační aktivita jednotlivých koncentrací samotného bioodpadu.

3 Materiál a metody

3.1 Pomůcky

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

3.1.2 Erlenmeyerovy lahve, 250 ml.

3.1.3 Centrifuga.

3.2 Chemikálie

3.2.1 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄, roztok, c(KH₂PO₄) = 0,2 mol/l.

Příprava: Naváží se 13,61 g KH₂PO₄, rozpustí ve vodě (3.2.9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

3.2.2 Hydrogenfosforečnan draselný, K₂HPO₄, roztok, c(K₂HPO₄) = 0,2 mol/l.

Příprava: Naváží se 17,40 g K₂HPO₄, rozpustí ve vodě (3.2.9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

3.2.3 Chlorečnan sodný, NaClO₃, roztok, c(NaClO₃) = 1 mol/l.

Příprava: Naváží se 10,6 g NaClO₃, rozpustí ve vodě (3.2.9), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.

3.2.4 Síran amonný, (NH₄)₂SO₄.

3.2.5 Chlorid draselný, KCl, roztok, c(KCl) = 4 mol/l.

Příprava: 298 g KCl se rozpustí ve vodě (3.2.9), převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

3.2.6 Chlorid draselný, KCl, roztok, c(KCl) = 2 mol/l.

Příprava: 149 g KCl se rozpustí ve vodě (3.2.9), převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

3.2.7 Zásobní roztok A.

Příprava: Smíchá se 28 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2.1), 72 ml roztoku hydrogenfosforečnanu draselného (3.2.2) a 100 ml vody (3.2.9).

3.2.8 Testovací médium.

Příprava: Smíchá se 10 ml zásobního roztoku A (3.2.7), 15 ml roztoku NaClO₃ (3.2.3) a 0,5 g síranu amonného (3.2.4). pH roztoku je přibližně 7,2. Doplní se vodou (3.2.9) na 1000 ml.

3.2.9 Voda MilliQ ($R > 18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$).

3.2.10 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 40,0 g NaOH se rozpustí ve vodě (3.2.9), po vytemperování a převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku. Pouze při testování chemikálií a extraktů bioodpadů.

3.2.11 Kyselina chlorovodíková, HCl, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 90ml 35% HCl se přidá do vody (3.2.9) a po vytemperování se doplní na celkový objem 1000 ml. pH se upravuje pouze při testování chemikálií a extraktů bioodpadů.

3.3 Pracovní postup

Standardní půda

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

Preinkubace

Do 250ml Erlenmeyerových lahví se naváží standardní půda odpovídající 15 g suché půdy ve třech opakováních pro kontrolu a ve dvou opakováních pro jednotlivé testované koncentrace bioodpadu. Lahve se uzavřou parafilmem a vzorek se preinkubuje 2 dny při 25 °C.

Testování bioodpadů

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

testovaného bioodpadu. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Připraví se koncentrační řada obsahující kontrolu bez přídavku testovaného bioodpadu a minimálně šest testovaných koncentrací uspořádaných v geometrické řadě. Poměr mezi dvěma sousedními koncentracemi nemá být větší než dva. Počet kontrol je tři a počet jednotlivých opakování je dvě pro koncentrace bioodpadu. Do série se zahrne měření nitrifikace v extraktu bez přídavku půdy, aby mohla být provedena korekce naměřených dat odečtením aktivity nitrifikátorů v extraktu. V případě potřeby je nutno upravit pH testovacího média s testovaným bioodpadem na 7,2. K úpravě pH se použije 1 M roztok NaOH (3.2.10) nebo 1 M roztok HCl (3.2.11).

Po skončení preinkubace se ke vzorkům přidá objem testovacího média s testovanou látkou, aby celkový objem roztoku včetně vody přítomné v půdě činil 60 ml. Lahve se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. 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 (3.2.5), čímž dojde k zastavení nitrifikace. Půda se od roztoku oddělí filtrací nebo centrifugací. V roztoku se stanoví koncentrace NO₂⁻. Kalibrační křivka se připraví v roztoku KCl (4.2.6), který se použije i pro ředění vzorků s vysokým obsahem NO₂⁻.

3.4 Výpočet

Krátkodobá nitrifikační aktivita

$$SNA = \frac{C_6 - C_2}{4} \times 1000 \quad (1)$$

SNA krátkodobá nitrifikační aktivita (ng NO₂⁻N/g_{s.p.}/h),

C₆ koncentrace NO₂⁻N (μg/g_{s.p.}) po 6 h inkubace,

C₂ koncentrace NO₂⁻N (μg/g_{s.p.}) po 2 h inkubace.

Vyhodnocení výsledků

EC_x (Effect concentration – účinná koncentrace, při které se projeví x% inhibiční účinek),

LOEC (Lowest observed effect concentration – nejnižší koncentrace, při které je 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

Poznámky

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

4 Výsledky a diskuze

Pro rozšíření testu pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA) o možnost analyzovat potenciálně biologicky aktivní hnojiva bylo vybráno devět přípravků s potenciálním výskytem nitrifikační aktivity přímo v samotném vzorku. Současně byla měřena nitrifikační aktivita bioodpadu po přidání do standardní půdy, ale i nitrifikace samotného přípravku v jednotlivých koncentracích. Z kapacitních důvodů pozic v orbitální třepačce bylo nutno snížit počet opakování v kontrolní variantě na tři a v jednotlivých koncentracích na dvě. Po vyhodnocení výsledků se ukázalo, že snížením opakování se zvýšil rozptyl a pro přesnější vyhodnocení bude nutné zvýšit opakování jednotlivých koncentrací zpět na tři. Průměrné hodnoty nitrifikační aktivity pro jednotlivé koncentrace bioodpadů jsou uvedena v tabulce č. 1. V případě přípravků D6, D7, D8 a Ko1 byla naměřena nitrifikační aktivita v samotném přípravku. Po odečtu hodnot nitrifikace jednotlivých koncentrací samotného bioodpadu od nitrifikace po aplikaci přípravku do standardní půdy byly získány hodnoty nitrifikace nezatížené nitrifikátory přítomnými

v samotném přípravku. Z výsledků je patrné, že konečná nitrifikace jednotlivých testovaných koncentrací D7, D8 a Ko1 se blíží kontrolní variantě nebo je velmi mírně zvýšená v porovnání s kontrolní variantou. Nejvyšší testovaná koncentrace přípravku D8 byla významně vyšší i po odečtení nitrifikace samotného přípravku. Bylo to způsobeno vyšším rozptylem naměřených hodnot nitrifikace v samotném přípravku. Tato skutečnost by měla být odstraněna právě zvýšením počtu jednotlivých opakování na tři, což povede k zpřesnění měření. Přípravek D6 vykazoval již od začátku koncentrační řady pokles nitrifikační aktivity, který se po odečtu hodnot ještě více prohloubil. Pro budoucí testování nelze dopředu určit, který přípravek (bioodpad) bude obsahovat nitrifikátory. Z tohoto důvodu bylo navrženo využít takto upravený design testu. Pro snížení rozptylu naměřených hodnot nitrifikace přítomných v samotném přípravku a zpřesnění výsledků bylo doporučeno zvýšit počet opakování na tři.

Tabulka č. 1. Souhrnná tabulka výsledků testování bioodpadů.

	K	C1	C2	C3	C4	C5	C6
D1a	443	471	476	490	469	471	509
D1b	1	0	0	0	0	0	0
D1c	442	471	476	490	469	471	509
D2a	459	527	285	297	213	165	72
D2b	1	0	0	3	0	9	12
D2c	458	527	285	294	213	156	60
D3a	432	459	405	428	435	398	311
D3b	0	0	0	0	0	0	0
D3c	432	459	405	428	435	398	311
D4a	473	463	483	499	502	587	485
D4b	1	1	0	0	0	7	5
D4c	472	462	483	499	502	580	480
D5a	433	454	434	472	385	420	414
D5b	0	0	0	0	1	1	2
D5c	433	454	434	472	384	419	412
D6a	505	534	542	440	288	214	191
D6b	0	0	1	0	0	15	60
D6c	505	534	541	440	288	199	131
D7a	516	419	492	504	529	558	577
D7b	1	3	0	14	13	29	35
D7c	515	416	492	490	516	529	542
D8a	416	428	477	485	583	659	889
D8b	4	22	23	50	156	231	118
D8c	412	406	454	435	427	428	771
Ko1a	438	440	460	462	482	506	527
Ko1b	1	1	1	7	17	41	82
Ko1c	437	439	459	455	465	465	445

D digetát

Ko kompost

a krátkodobá nitrifikační aktivita (ng NO₂—N/g.s.p./h) bioodpad + půda

b krátkodobá nitrifikační aktivita (ng NO₂—N/g.s.p./h) bioodpad + testovací médium

c rozdíl hodnot nitrifikace

K kontrolní varianta půdy bez přídatku bioodpadu

C1-C6 vzrůstající koncentrace testovaného bioodpadu

C3 doporučená dávka při aplikaci na zemědělskou půdu

5 Závěr

Byl rozšířen test pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA) o možnost analyzovat potenciálně biologicky aktivní hnojiva. Metoda bude použita v rámci testování bioodpadů na zemědělskou půdu.

6 Literatura

1. ISO 15685 Soil Quality – Ammonium oxidation, a rapid method to test potential nitrification in soil. International Organization for standardization, 2012.
2. Šimek, Miloslav: 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.

Převedení stanovení pesticidů na nový GC-MS/MS systém

Petra Kosubová, Klára Kantošová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

ÚKZÚZ analyzuje pesticidní látky od roku 2007 s využitím systému GC-MS/MS 1200 Varian, který byl nahrazen novým, principiálně totožným, avšak citlivějším systémem GC-TQ 7010 Agilent. Cílem práce bylo převedení stávajících měřicích metod na nový systém a jeho ověření analýzou referenčních materiálů a účastí v testech způsobilosti.

2 Teoretická část

Systém GC-MS/MS 1200 Varian se využívá v laboratořích ÚKZÚZ od roku 2004. Jedná se o spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru s trojnásobným kvadrupólovým analyzátozem, který umožňuje velice selektivní způsob detekce označovaný jako SRM/MRM, tj. sledování vybraných přechodů neboli iontů vzniklých při sekundární fragmentaci v kolizní cele. Uvedený měřicí mód byl využit u všech metod jak pro stanovení reziduí pesticidních látek, tak organických polutantů. V roce 2015 byl zmiňovaný systém nahrazen principiálně totožným, avšak citlivějším systémem GC-TQ 7010 Agilent. Cílem práce bylo ověření správnosti funkce GC-TQ 7010 Agilent pomocí analýzy referenčních materiálů, lyofilizované rybí svaloviny (WMF-01) s certifikovanými obsahy polybromovaných difenyletherů (PBDE) a pšenice obsahující rezidua pesticidů (IRM-PTC2). Zároveň byly pomocí tohoto systému změřeny vzorky dodané v rámci testů způsobilosti, konkrétně SETOC 2015/1 (polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) v sedimentech), EUPT-FV17 (pesticidní rezidua v brokolici) a EUPT-CF9 (pesticidní rezidua v kukuřici).

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

Standardy, chemikálie, laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorků, postupy přípravy vzorku, přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení jsou uvedeny v příslušných JPP ÚKZÚZ, postup č. 10595.1 (PBDE), 30670.1 (PAH) a 10610.1 (pesticidy). V práci byl použit plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem GC-MS/MS: CP-3800 GC – 1200 MS (Varian) vybavený kolonou DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) a GC 7890B – 7010 MS TQ (Agilent) vybavený dvěma kolonami HP-5MS UI (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm).

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Ověření pomocí CRM WMF-01

Převedení měřicí metody pro stanovení PBDE bylo ověřeno analýzou certifikovaného referenčního materiálu WMF-01. Výsledky testu ukázaly, že GC-MS/MS systém Agilent 7010 je plně funkční a splňuje požadavky pro poskytování správných výsledků (viz. Tabulka 1).

Tabulka 1. Výsledky analýzy PBDE v CRM WMF-01.

WMF-01	Reference fish tissue fish for organic contaminant analysis (Wellington Laboratories)				
Parametr	Stanovený obsah (ng/g)	Stanovená nejistota (ng/g)	Referenční obsah (ng/g)	Referenční nejistota (ng/g)	Hodnocení
BDE28	3.203	0.85	3.124	0.29	OK
BDE47	144.3	36.0	123.2	24.8	OK
BDE100	36.53	12.5	35.87	14.5	OK
BDE99	38.20	10.8	37.50	4.22	OK
BDE154	18.17	5.22	19.79	2.88	OK
BDE153	14.17	3.82	17.04	8.00	OK
BDE183	0.422	0.19	0.532	0.40	OK

3.2.2 Účast v mezinárodním testu způsobilosti SETOC 2015/1

Vzorky sedimentů k analýze byla připraveny standardním postupem zahrnujícím Soxhletovu extrakci horkým rozpouštědlem pomocí Buchi B-811 a frakcionaci na silikagelové kolonce. Extrakty byly měřeny pomocí GC-MS/MS systému Agilent 7010 v MRM módu a kvantifikace byla provedena s využitím isotopově značených PAH. Získané výsledky poskytovaly vyhovující z-skóre v intervalu (-2,2) s výjimkou jediného nálezu benzo(a)pyrenu ve vzorku

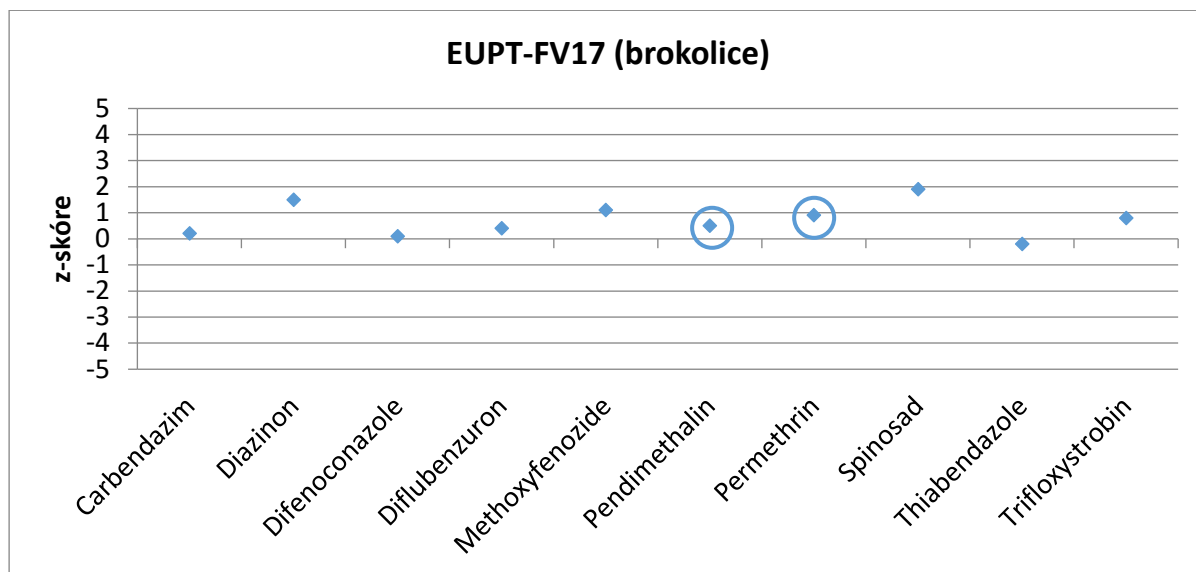
č. 4, který byl podhodnocen, avšak vzhledem k odpovídajícímu z-skóre -2,41 nebyl označen za nevyhovující (viz. Tabulka 2).

Tabulka 2. Hodnocení výsledků (z-skóre) analýzy PAH ve 4 vzorcích sedimentů.

acenaphtene (PAH)	-0.16	-0.62	-0.99	0.24
acenaphtylene (PAH)	-0.12	-0.11	-0.07	-0.27
anthracene (PAH)	-0.48	-1.13	-0.68	0.02
benz(a)anthracene (PAH)	-0.51	-0.88	-0.91	-0.86
benzo(a)pyrene (PAH)	-0.63	-1.44	-1.55	-2.41
benzo(b)fluoranthene (PAH)	-0.49	-0.80	-1.11	-0.60
benzo(ghi)perylene (PAH)	0.31	0.15	0.15	0.27
benzo(k)fluoranthene (PAH)	-0.63	-1.25	-1.17	-0.85
chrysene (PAH)	-0.16	-0.25	-0.38	0.71
dibenz(ah)anthracene (PAH)	-0.36	-0.36	-0.61	-0.55
fluoranthene (PAH)	-1.03	-1.18	-1.22	-0.56
fluorene (PAH)	-0.09	-0.44	-0.70	0.58
indeno(1,2,3-cd)pyrene (PAH)	-0.93	-0.90	-0.91	-1.06
naphtalene (PAH)	-0.92	-0.55	-0.63	-0.21
phenanthrene (PAH)	-1.24	-1.56	-1.37	-0.68
pyrene (PAH)	-1.50	-1.12	-1.09	-0.55

3.2.3 Účast v mezinárodním testu způsobilosti EUPT-FV17

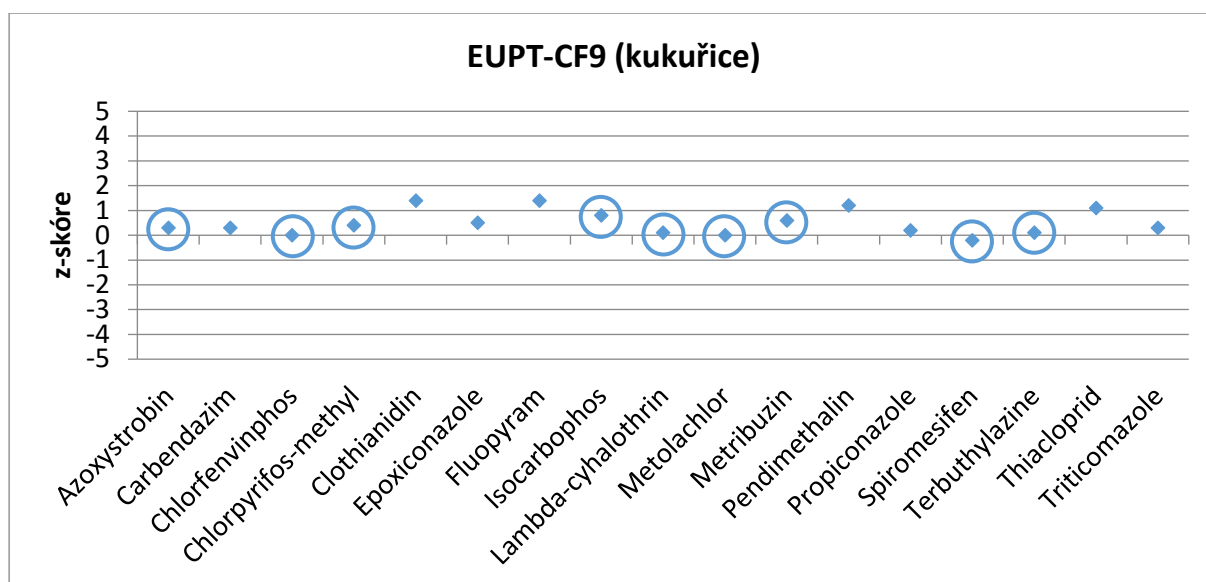
V roce 2015 EURL pro pesticidy v ovoci a zelenině pořádala 17. ročník testu způsobilosti, kde testovacím vzorkem byl brokolicový homogenát. Brokolicový QuEChERS extrakt byl měřen jak LC-MS/MS technikou, tak GC-MS/MS, která byla konkrétně použita při analýze pendimethalinu a permethrinu. Oba nálezy byly vyhovující; u pendimethalinu bylo dosaženo z-skóre 0,5 a u permethrinu 0,9 (Graf 1).



Graf 1. Hodnocení laboratoře ÚKZÚZ v rámci EUPT-FV17. Zakroužkované hodnoty byly změřeny GC-MS/MS technikou s využitím systému Agilent 7010.

3.2.4 Účast v mezinárodním testu způsobilosti EUPT-CF9

Ve stejném roce EURL pro pesticidy v cereáliích a krmivech pořádala 9. ročník testu způsobilosti, kde testovacím vzorkem byla kukuřičná mouka. Kukuřičný QuEChERS extrakt byl opět měřen jak LC-MS/MS technikou, tak GC-MS/MS, která byla použita při analýze 9 parametrů z celkového počtu 18. Jednalo se o azoxystrobin, chlorfenvinphos, chlorpyrifos-methyl, isocarbophos, lambda-cyhalothrin, metolachlor, metribuzin, spiromesifen a terbuthylazine. V grafu 2 jsou zaznamenána z-skóre všech pesticidů stanovených v kukuřičném extraktu, přičemž zakroužkované hodnoty byly analyzovány s využitím systému Agilent 7010. Všechny nálezy byly vyhovující, tj. odpovídající z-skóre ležely v intervalu (-2,2).

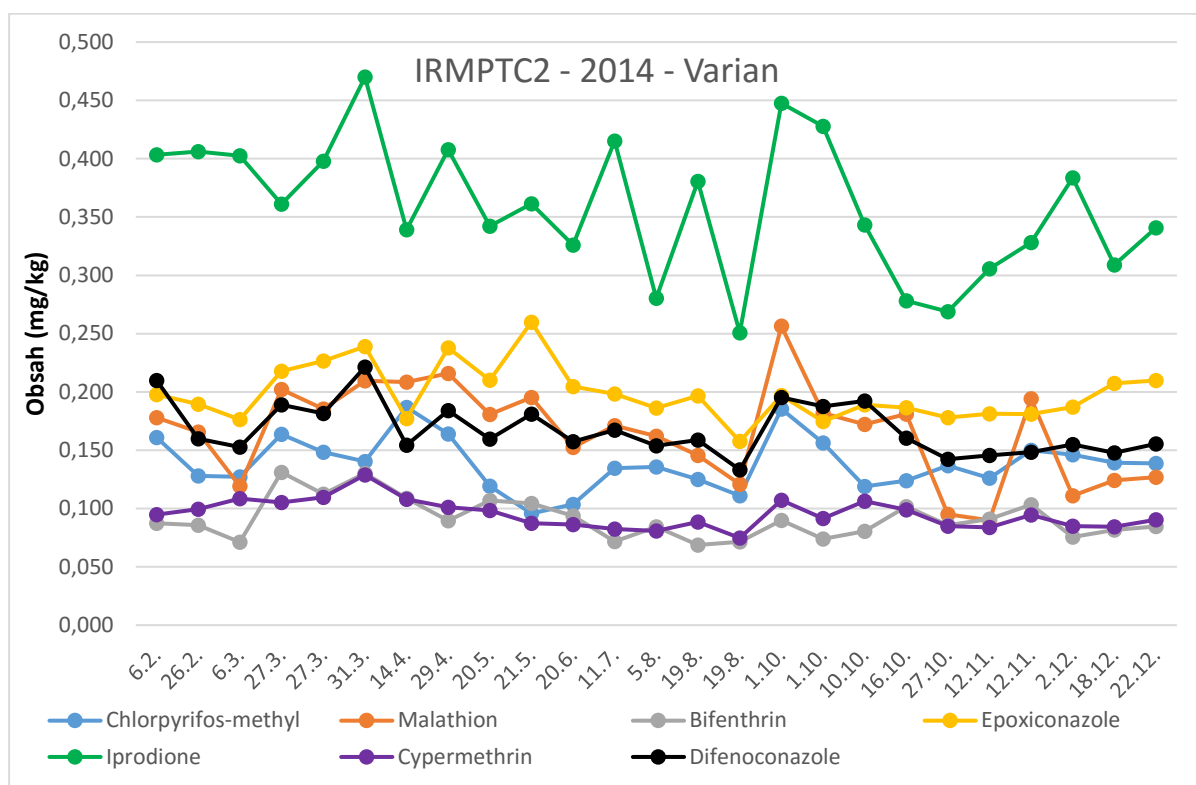


Graf 2. Hodnocení laboratoře ÚKZÚZ v rámci EUPT-CF9. Zakroužkované hodnoty byly změřeny GC-MS/MS technikou s využitím systému Agilent 7010.

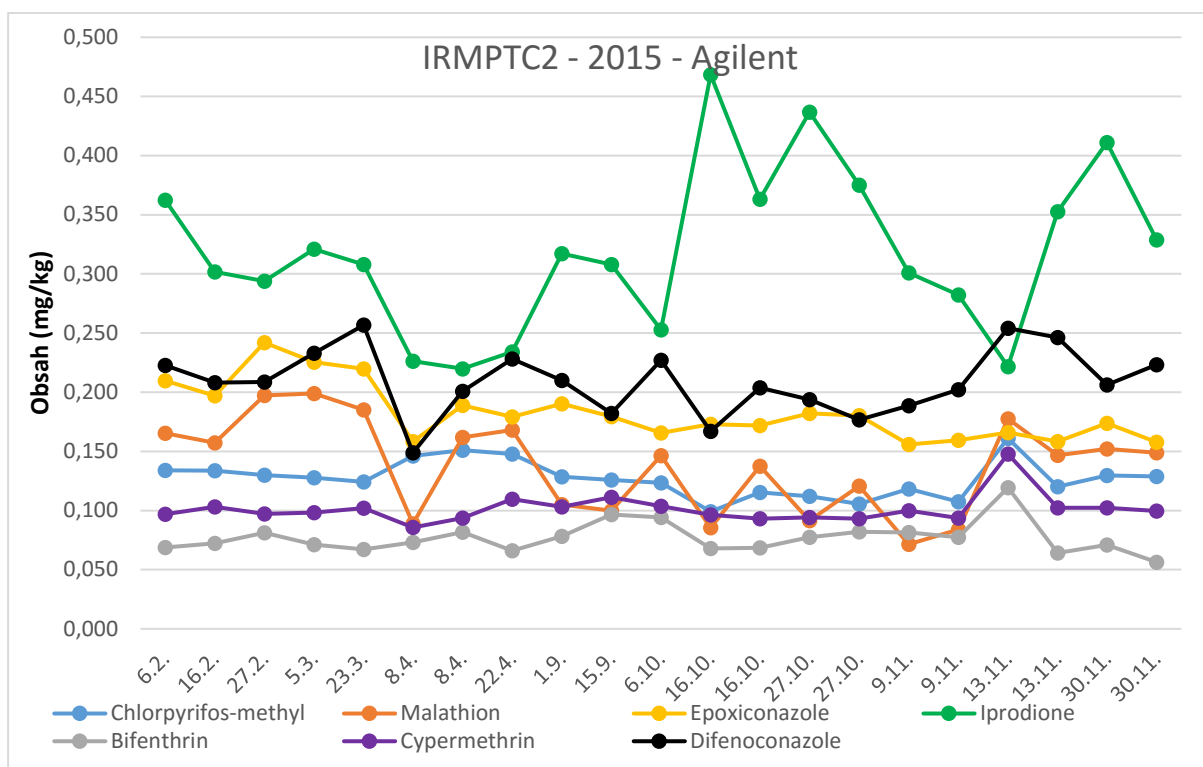
3.2.5 Ověření pomocí IRM-PTC2

Vzorek pšenice dodaný do laboratoře v rámci testu způsobilosti EUPT-C2, který v roce 2008 pořádala EURL pro cereálie a krmiva, je využíván jako interní referenční materiál s obsahem reziduí pesticidů ze skupin, jako jsou insekticidní pyrethroidy a organofosfáty a fungicidní triazoly a strobiluriny. Technikou GC-MS/MS jsou v tomto IRM analyzována rezidua bifenthrinu, chlorpyrifos-methylu, cypermethrinu, difenoconazolu, epoxiconazolu, iprodionu a malathionu. Ostatní pesticidní látky (azoxystrobin, carbendazim, pirimicarb, prochloraz, spiroxamine, trifloxystrobin) se stanovují pomocí LC-MS/MS. Grafy 3 a 4 znázorňují data

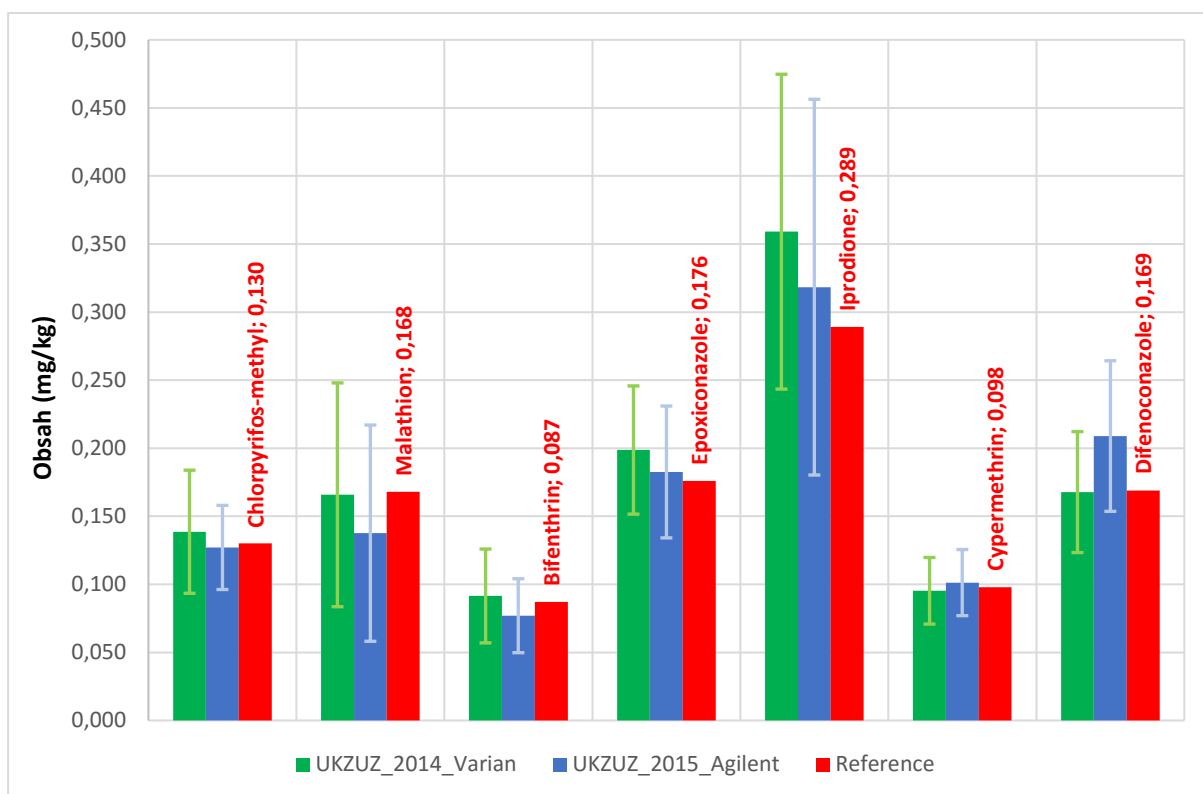
získaná analýzou IRMPTC2 v roce 2014 pomocí systému Varian 1200 a v roce 2015 pomocí systému Agilent 7010. V grafu 5 jsou vedle referenčních a průměrných hodnot získaných pomocí obou systémů znázorněny také směrodatné odchylky, které popisují rozptyl naměřených dat. Průměr směrodatných odchylek získaných v roce 2014 je 16,28 % a v následujícím roce pak 16,98 %, což ukazuje na velice stabilní dlouhodobou vnitrolaboratorní opakovatelnost GC-MS/MS stanovení reziduí pesticidů. Správnost získaných dat lze vyjádřit pomocí z-skóre, přičemž v roce 2014 bylo dosaženo váženého z-skóre 0,19 a v roce 2015 0,26. Obě hodnoty získané s využitím různých systémů potvrzují správnost kontrolních vzorků a zároveň indikují vysokou spolehlivost dat produkovaných při rutinních analýzách.



Graf 3. Obsahy vybraných pesticidů v IRMPTC2 naměřené v roce 2014 pomocí systému Varian 1200.



Graf 4. Obsahy vybraných pesticidů v IRMPTC2 naměřené v roce 2015 pomocí systému Agilent 7010.



Graf 5. Zobrazení referenčních hodnot IRMPTC2, průměrných obsahů a směrodatných odchylek stanovených v IRMPTC2 pomocí systémů Varian 1200 v roce 2014 a Agilent 7010 v roce 2015.

4 Závěr

V roce 2015 bylo úspěšně provedeno navázání nového systému Agilent (GC 7890B – 7010 MS TQ) do vybraných akreditovaných zkoušek vyžadujících GC-MS/MS stanovení, tj. AZ 340 (stanovení PBDE), AZ 335 (stanovení PAH) a AZ 336A (multireziduální stanovení pesticidů).

5 Literatura

1. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10595.1: Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů (PBDE) metodou GC-MS/MS.
2. JPP ÚKZÚZ, postup č. 30670.1: Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou GC-MS.
3. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10610.1: Multireziduální metoda stanovení pesticidů metodou GC-MS.
4. SETOC, International sediment exchange for tests on organic contaminants, quarterly report 2015.1, January-March.
5. EURL-European Union Proficiency Test FV-17, Pesticide Residues in Broccoli Homogenate, Final Report – December 2015.
6. EURL-European Union Proficiency Test CF-9, Pesticide Residues in Maize Flour, Final Report – December 2015.
7. CRL-European Union Proficiency Test CF-2, Pesticide Residues in Wheat Flour, Final Report – December 2008.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXI 2017/1

Ročník: XXI, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2017

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 39

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196