

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2015

Ročník XIX, číslo 3/2015

Brno 2015

Obsah

1. Zavedení testu ekotoxicity se salátem <i>Lactuca sativa</i> Martin Váňa Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB, Hroznová 2, 656 06 Brno	1
2. Extrakce mikrobiální DNA ze vzorků lesních půd Jiří Čuhel Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB, Hroznová 2, 656 06 Brno	11
3. Stanovení obsahu taninu v široku spektrofotometricky Radvana Šulová, Alena Balarinová, Naděžda Kabátová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno Hroznová 2, 656 06 Brno	23

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení testu ekotoxicity se salátem *Lactuca sativa*

Martin Váňa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
martin.vana@ukzuz.cz

1 Úvod

Ekotoxikologické testy jsou nespecifické, to znamená, že umožňují komplexní hodnocení účinku všech toxických látek a směsí přítomných v půdě nebo v odpadním materiálu (kaly, sedimenty atd.). Odpadní materiály, které lze aplikovat na zemědělskou půdu, mohou obsahovat látky interagující mezi sebou a tím zvyšovat svoji toxicitu. Nespecifičnost ekotoxikologických testů má své klady, ale i zápory. Hlavním pozitivem je rychlost a přístrojová nenáročnost analýz. Data z vhodně zvolené baterie testů mohou sloužit ke zhodnocení potenciální rizik a dopadů toxických látek na ekosystémy. V laboratořích NRL-OMB se k tomuto účelu zavedla sada ekotoxikologických testů, které vycházejí ze standardizovaných norem se zástupci mikroorganismů, bezobratlých živočichů a rostlin (doposud zhodnocení nadzemní části rostliny). Test se salátem *Lactuca sativa*, který vychází rovněž ze standardizované metody, rozšíří tuto baterii o test zaměřený na vývoj a růst kořene. Výhodou tohoto testu je jeho praktičnost, rychlost a jednoduchost provedení.

2 Cíl

Cílem práce bylo zavedení testu s *Lactuca sativa*, stanovení EC₅₀ pro kyselinu boritou jako referenční látku a stanovení opakovatelnosti.

3 Princip

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu agrochemikálií (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva) na vývin a růst kořene salátu *Lactuca sativa* var. *capitata* (salát hlávkový – Safír určený k rychlení) po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Test probíhá

minimálně při šesti koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá (120 ± 2) h a na jeho konci se vyhodnotí vliv na délku kořene v porovnání s kontrolní variantou.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Testovací plastové nádoby s víčky (700 – 1000) ml.
- 4.1.2 Nádoba na míchání umělé půdy (AP).
- 4.1.3 Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
- 4.1.4 Míchačka na umělou půdu.
- 4.1.5 Termostat vytemperovaný na (24 ± 2) °C.
- 4.1.6 pH metr.
- 4.1.7 Petriho misky velké.
- 4.1.8 Předvážky, přesnost 0,5 g, váhivost do 5000 g.
- 4.1.9 Pinzeta, skleněná tyčinka, milimetrový papír.
- 4.1.10 Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
- 4.1.11 Semena salátu *Lactuca sativa* var. *capitata*.

4.2 Chemikálie

- 4.2.1 Umělá půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic $2 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$, křemenný písek – 50 % velikosti zrn v rozmezí 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín - Sigma, CaCO_3 – úprava pH).
- 4.2.2 Zásobní roztok testované látky.
- 4.2.3 Destilovaná voda na ovlhčení.
- 4.2.4 Chlorid draselný, $c(\text{KCl}) = 1 \text{ mol/l}$.
Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.
- 4.2.5 Denaturovaný líh, 4 : 1 (denaturovaný líh : destilovaná voda).

4.2.6 Kyselina boritá.

5 Pracovní postup

Postup je založen na standardizovaných metodách ISO 11269-1 a ISO 17126.

5.1 Příprava umělé půdy (AP)

Umělá půda se skládá z křemenného písku (více než 50 % velikost zrn 0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm $\pm$ 1 mm) a CaCO₃ (slouží k úpravě pH umělé půdy ($6 \pm 0,5$)). Přesátá rašelina (pro testování se salátem se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na minus 80 °C nebo 3× nechá zmraznout při minus 20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v hmotnostním poměru 74 : 20 : 5. Umělá půda se nechá jeden den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví pomocí uhličitanu vápenatého na hodnotu $6 \pm 0,5$. Nechá se další tři dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30042.1). V AP se změří také maximální vodní kapacita (WHC, viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180.1) a obsah sušiny (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30020.1).

5.2 Experimentální uspořádání

Předběžný test: Zvolí se v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Hodnotí se vliv koncentrací s faktorem 10 (např. 1000, 100, 10, 1). Na konci testu se vyhodnocuje délka kořene. Výsledky testu jsou důležité pro navržení experimentálního uspořádání definitivního testu.

Definitivní test: Slouží ke zjištění vlivu chemikálií na délku kořene. Zvolí se koncentrační škála vycházející z předběžného testu v rozmezí koncentrací bez projeveného efektu až po maximální efekt. Při přípravě koncentrační řady obsahující minimálně šest koncentrací se nedoporučuje volit ředící krok vyšší než 2.

Vypočítá se množství AP, které se bude potřebovat na test.

1. Pro NOEC (No observed effect concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt) přístup by se mělo použít alespoň pět koncentrací v geometrické řadě po čtyřech opakováních + osm kontrol.
2. Pro EC_x (Effect concentration – účinná koncentrace při které se projeví x % účinek) přístup se použije až 12 koncentrací po dvou opakováních + šest kontrol.
3. Pro smíšený přístup by se mělo použít šest až osm koncentrací v geometrické řadě po pěti opakováních + pět kontrol.
4. Pro případ rychlého zhodnocení testované látky lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v pěti opakováních.

Na každé opakování je potřeba asi 200 g suché AP. Musí se připočíst ještě přibližně 50 g půdy na změření vlhkosti a pH půdy. Celková spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu.

5.3 Aplikace testované látky

Látka se může buď přidávat společně do množství půdy potřebného na každou koncentraci ($200 \text{ g} \times \text{počet opakování}$) a teprve potom rozvážit do testovacích nádob, nebo se půda nejprve rozváží do jednotlivých nádob a látka se přidá do každé zvlášť. Pokud je to možné, měl by se preferovat první způsob, protože se zajistí větší homogenita koncentrace testované látky v půdě.

Množství testované látky pro aplikaci na AP 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 $1,5 \text{ g/cm}^3$.

Jeden až tři dny před začátkem testu se připraví zásobní roztok testované látky nejvyšší koncentrace a ředící řadou se získá nižší koncentrace testované látky. Podle rozpustnosti testovaných látek se musí lišit jejich aplikace na AP (rovnoměrně se pipetou zakapává AP):

1. Ve vodě rozpustné látky se rozpustí v destilované vodě. Množství roztoku se spočítá tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace a výsledné vlhkosti půdy (dovlhčení na 60 % WHC).
2. Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech se použije těkavé rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Roztokem

rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápnou AP ve skleničkách a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Testovaná látka se tedy aplikuje den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 60 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro salát toxické.

3. Pro látky nerozpustné ve vodě, ani v organických rozpouštědlech se látka pečlivě vmíchá přímo do testované půdy, nebo se použije směs 200 g jemně mletého industriálního křemenného písku, nebo 200 g suchého půdního substrátu a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá. Dohlčí se na 60 % WHC.

5.4 Vlastní postup testu

Před zahájením testu se semena salátu nechají předklíčit na Petriho miskách s filtračním papírem ovlhčeným vodou po dobu asi 20 h – 30 h, při teplotě $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$, bez přístupu světla. Pro vlastní test se vybírají naklíčená semena s kořínkem dlouhým cca 2 mm. Do testovacích nádob se v den zahájení pokusu rozváží 200 g ovlhčené půdy přepočtené na suchou hmotnost. Mírně se stlačí a např. skleněnou tyčinkou rovnoměrně vytlačí 15 mělkých jamek (5×3). Do jamek se následně vloží pinzetou 15 předklíčených semen salátu, kořínkem směrem dolů. Semena se k půdě opatrně přitlačí (pozor, kořínek je křehký), ale nezakrývají se. Nádobky se uzavřou víčkem a umístí se ve znárodněném pořadí do termostatu vytemperovaného na $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ na dobu $120 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Počet koncentrací a opakování se odvíjí od zvoleného experimentálního uspořádání.

5.5 Vyhodnocení testu

Test se vyhodnocuje po $120 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Měří se délka kořene s přesností na 1 mm. Zvýšená pozornost se věnuje šetrnému vytažení kořene z půdy, kořen se nesmí poškodit. Jestliže předklíčené semeno nevytvořilo kořínek, započítá se tato hodnota jako nulová.

Pro zkoušený vzorek a kontrolu se vypočte aritmetický průměr délky kořene ($\bar{x}$), směrodatná odchylka (sd) a variační koeficient (CV).

Kritéria validity

Na konci testu by měla být průměrná délka kořene minimálně 15 mm.

Variační koeficient paralelních stanovení $\leq 20 \%$.

Průměrná vzcházivost semene je $\geq 80 \%$.

5.6 Vyhodnocení dat

Data se vyhodnotí podle interního materiálu NRL-OMB pro vyhodnocení ekotoxikologických dat. Statistiké a grafické zpracování dat se provádí pomocí programu ToxRAT (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Německo). Vypočte se EC_{20} , EC_{50} , LOEC (Lowest observed effect concentration – nejnižší koncentrace, při které byl pozorován nežádoucí efekt) a NOEC. Hodnoty EC_x se vypočtou logit regresí, v případě nesignifikantnosti modelu se použije probit nebo Weibullova analýza.

5.7 Referenční látka

Jednou ročně se salát testuje na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testu. Touto referenční látkou je kyselina boritá.

6 Výsledky a diskuze

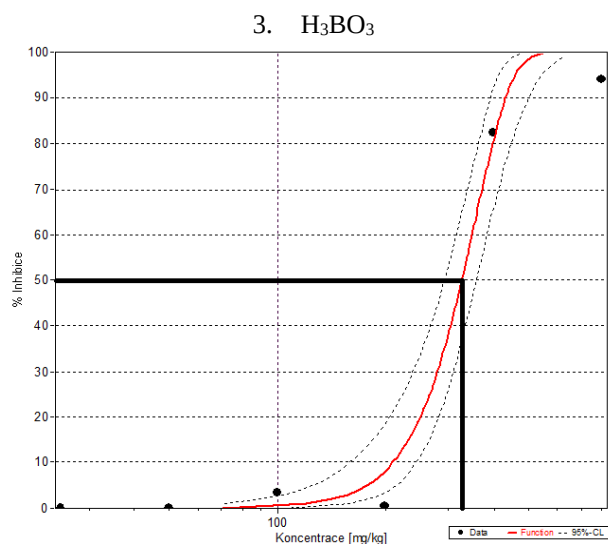
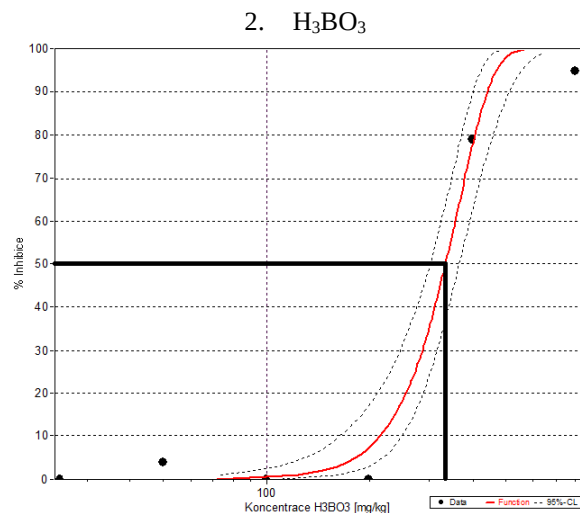
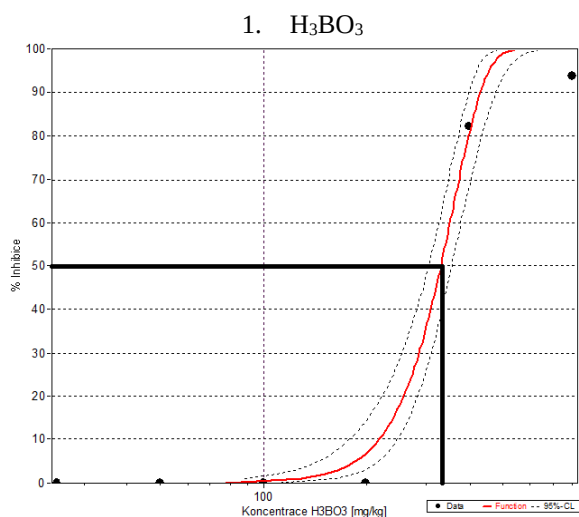
Pro ověření funkčnosti celé metody se provedly čtyři testy s kyselinou boritou, přičemž první nebyl statisticky vyhodnotitelný. Pro tuto referenční látku se v literatuře (<http://www.echa.europa.eu/>) uvádí NOEC 320 mg/kg H_3BO_3 na sušinu testované půdy. Referenční látka se aplikovala na umělou půdu v koncentrační řadě (25; 50; 100; 200; 400; 800) mg/kg suché půdy. Testovaná látka se aplikovala na umělou půdu ve čtyřech opakováních pro každou testovanou koncentraci. Po 120 h se test ukončil a naměřená data se zpracovala (tab. 1 a 2) za pomoci programu TOXRAT. Získaná data (průměrné délky kořene) se vyhodnotila logit a probit regresí, které byly nesignifikantní. Až následná Weibullova analýza prokázala signifikantnost modelu pro výpočet EC_{50} (obr. 1).

Tabulka 1. Výsledky tří testů s H_3BO_3 . Jsou uvedeny průměrné délky kořene ($\bar{x}$), směrodatné odchylky a mediánu délky kořene ($\tilde{x}$).

	22. 3. 2013			12. 4. 2013			18. 4. 2013		
c (mg/kg)	$\bar{x}$ (mm)	sd	$\tilde{x}$ (mm)	$\bar{x}$ (mm)	sd	$\tilde{x}$ (mm)	$\bar{x}$ (mm)	sd	$\tilde{x}$ (mm)
0	31,6	6,1	33	28,9	5,6	30	33,1	3,5	33
25	33,3	5,0	34	29,4	6,3	31	33,5	3,9	34
50	32,6	5,9	33	27,8	6,1	29	33,3	4,8	33
100	34,2	6,1	35	27,3	7,6	27	32,0	5,4	32
200	34,3	5,9	35	29,9	6,5	31	33,0	5,9	32
400	5,7	1,5	5	6,1	2,6	6	5,8	1,5	6
800	2,0	1,5	3	1,5	1,2	2	1,9	1,2	2

Tabulka 2. Souhrnná tabulka ekotoxikologických indexů. Jsou uvedeny EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ (s intervaly spolehlivosti 95% a 99%) a NOEC kyseliny borité.

	22. 3. 2013			
Parametr	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	NOEC
Hodnota (mg/kg)	218,3	257,6	330,8	200
lower 95%-cl	178,9	222,7	304,4	
upper 95%-cl	246,7	283,2	355,2	
lower 99%-cl	161,0	205,7	289,3	
upper 99%-cl	274,2	306,6	373,7	
	12. 4. 2013			
Parametr	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	NOEC
Hodnota (mg/kg)	210,3	250,6	326,9	200
lower 95%-cl	159,9	205,5	292,8	
upper 95%-cl	244,3	281,8	358,3	
lower 99%-cl	139,1	185,2	274,0	
upper 99%-cl	280,9	312,7	382,9	
	18. 4. 2013			
Parametr	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	NOEC
Hodnota (mg/kg)	210,1	250,6	326,9	200
lower 95%-cl	159,9	205,5	292,8	
upper 95%-cl	244,3	281,8	358,3	
lower 99%-cl	139,1	185,2	274,0	
upper 99%-cl	280,9	312,7	382,9	



Obrázek 1. Statistické vyhodnocení inhibice růstu kořene salátu v závislosti na koncentraci testované látky (H_3BO_3). Data jsou proložena logit regresí s vyznačenou hodnotou EC_{50} .

Získaná hodnota NOEC se velice blížila hodnotě uvedené v literatuře. Hodnoty EC_x se v literatuře pro daný test nepodařilo nalézt.

Jako kritické body této metody se jevíly

- délka kořínku při nasazení testu, při delším kořínku než 2 mm docházelo kvůli jeho křehkosti k poškození. Je nutno dodržet jeho maximální délku při zahájení testu.
- šetrné zacházení se vzešlou rostlinkou při ukončení experimentu, velice snadno se stalo, že se kořenek při nevhodné manipulaci (nadměrné síle při vytahování) přetrhnul.

7 Závěr

V rámci práce byla zavedena metoda pro testování chemikálií pomocí testu s využitím rostlinného zástupce *Lactuca sativa*. Metoda bude použita pro testování vlivu agrochemikálií na zemědělskou půdu.

8 Literatura

1. ISO11269-1, Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part1: Method for the measurement of inhibition of root growth, 1993.
2. ISO 17126, Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.), 2005.
3. Becker L., Scheffczyk A., Förster B., Oehlmann J., Princz J., Römbke J., Moser T. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates, *J Soils Sediments*, 2011, 11, 238–248.
4. Moser H., Römbke J. (Eds.). *Ecotoxicological Characterization of Waste Results and Experiences of an International Ring Test*, 2009.
5. <http://www.echa.europa.eu/> (30. 4. 2013)

Extrakce mikrobiální DNA ze vzorků lesních půd

Jiří Čuhel

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
jiri.cuhel@ukzuz.cz

1 Úvod a cíl práce

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je esenciální složkou buňky každého organismu – DNA v sobě uchovává genetickou informaci pro tvorbu všech enzymů. Díky studiu sekvencí půdní DNA mnohými molekulárně-biologickými přístupy je možné celkem zřetelně rozlišit a identifikovat jednotlivé půdní mikroorganismy (bakterie, archaea i eukaryota).

Extrakce DNA z půdy představuje první krok naprosté většiny molekulárně-biologických analýz mikrobiálních společenstev. Během posledních dvaceti let byla vyvinuta celá řada metod extrakce DNA z půdních vzorků, přičemž jednotlivé metody se mohou od sebe podstatně lišit, protože různé půdy se vyznačují nestejnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a při extrakci DNA vyžadují rozdílný metodologický přístup.

Lesní půdy se od běžných zemědělských půd liší především vyšším obsahem organické hmoty a jiným typem humusových látek. Ty se hromadí ve vrchních horizontech půdního profilu (fermentační, humusový) a jejich přítomnost do značné míry komplikuje uspokojivou extrakci DNA, protože fyzikálně-chemické vlastnosti DNA a humusových látek jsou velice podobné a získaný extrakt DNA bývá znečištěn právě humusovými látkami, které se nedaří z extraktu odstranit. Humusové látky potom inhibují následné molekulárně-biologické analýzy.

Na oddělení mikrobiologie a biochemie byla dosud pro extrakci DNA z půd používána metoda „Přímá extrakce DNA z půdních vzorků“ (postup č. 31120.1; Zbírál et al., 2011), která je velice rychlá, levná a standardizovaná podle ISO 11063. Avšak tato metoda byla

vyvinuta především pro izolaci DNA ze zemědělských půd a není pravděpodobné, že by byla vyhovující i pro izolaci DNA z lesních půd.

Cílem této práce bylo otestovat izolaci DNA komerčně dodávaným kitem *PowerSoil™ DNA Isolation kit*, srovnat ji s již zavedenou metodou přímé extrakce DNA a zavést ji v laboratořích NRL.

2 Testování metody extrakce DNA z lesních půd

DNA byla izolována ze dvou lesních půd (listnatý a jehličnatý les) s různými hodnotami fyzikálně-chemických parametrů, a to testovanou metodou extrakce DNA kitem *PowerSoil™ DNA Isolation kit* („izolace kitem“) a v laboratoři již používanou metodou přímé extrakce DNA z půdních vzorků („přímá izolace“) dle postupu č. 31120.1 (Zbíral et al., 2011). Vybrané mikrobiální parametry půd jsou uvedeny v tabulce 1. Vzorky lesních půd byly odebrány v dubnu 2013 z fermentačního (F), humusového (H) a organo-minerálního (M) horizontu podle postupu č. 31000.1, přesáty přes síto s velikostí ok 2 mm a uskladněny při minus 20 °C. Samotná extrakce DNA byla u každého vzorku provedena v šesti laboratorních opakováních.

Tabulka 1. Základní popis a vybrané mikrobiální parametry půd použitých pro testování metody izolace DNA, a to zvláště pro fermentační (F), humusový (H) a organo-minerální (M) horizont (C_{bio} – uhlík mikrobiální biomasy, N_{bio} – dusík mikrobiální biomasy, RES – bazální respirace, SRS – substrátem indukovaná respirace).

Označení plochy	Převažující dřevina	Horizont	Vlhkost g H ₂ O/g	C _{bio} μg C/g	N _{bio} μg N/g	RES μg C/g/h	SRS μg C/g/h
18901	dub letní	F	142,4	2649	682	13,8	259,9
		H	78,3	1233	289	4,6	52,4
		M	33,2	188	29	0,6	6,6
31901	smrk ztepilý	F	106,1	2395	300	12,1	153,2
		H	51,1	1232	125	4,5	49,0
		M	21,2	131	11	0,7	6,2

Testovaná metoda není metodou kvantitativní, jejím smyslem není analyticky stanovit vybranou veličinu. Tato metoda pouze poskytuje vyizolovanou DNA, která slouží pro další molekulárně biologické analýzy. Účelem metody tedy není získat veškerou DNA přítomnou

v půdním vzorku, ale získat DNA v dostatečném množství a kvalitě, aby byla využitelná pro další práci. Z tohoto důvodu nebylo možné stanovit validační parametry. Nicméně jsme se pokusili otestovat využitelnost získané DNA pro navazující molekulární analýzy. DNA vyizolovaná oběma metodami (DNA extrahovaná metodou „přímé extrakce“ byla ještě přečištěna dle postupu č. 31130.1), její přítomnost v extraktu ověřena gelovou elektroforézou podle postupu č. 31160.1 (s tím rozdílem, že na gel nebyly nanášeny produkty PCR, ale přímo roztok DNA), její koncentrace byla stanovena fluorescenční metodou podle postupu č. 31140.1 a DNA byla dále využita pro amplifikaci specifického genového úseku ITS (internal transcribed spacer), jehož úspěšná amplifikace poukazuje na přítomnost hub v půdě, ze které byla DNA extrahována. Amplifikace úseku ITS se provedla polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) podle upraveného postupu č. 31150.1. Úprava spočívala v použití jiných primerů, konkrétně primerů ITS1f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') (Gardes a Bruns, 1993) a ITS4r (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990) a v jiném teplotním profilu PCR reakce (4 min. při 95 °C; 32 cyklů: 60 s při 95 °C, 45 s při 55 °C, 60 s při 72 °C; 15 min při 72 °C). Přítomnost produktů DNA byla ověřena gelovou elektroforézou dle postupu č. 31160.1 (Zbiral et al., 2011).

3 Metoda extrakce DNA z lesních půd kitem *PowerSoil® DNA Isolation kit* (Mo Bio Laboratories, Inc.)

3.1 Rozsah použití

Metoda izolace DNA tímto kitem je především vhodná pro extrakci DNA z půdy. Obecně je kit určen pro vzorky, které obsahují velké množství huminových kyselin (lesní půdy, organické půdy, kompost, sedimenty, mrva). Izolovaná DNA má vysokou čistotu, což je důležité pro úspěšnou PCR amplifikaci DNA mikroorganismů ze vzorku. PCR analýza tímto kitem umožňuje detekci mnoha organismů, včetně bakterií, hub, řas a aktinomycet.

3.2 Princip

Vzorky půd se přidávají do zkumavky s rozbíjecími kuličkami a proběhne rychlá a dokonalá homogenizace. Lyzace buněk probíhá mechanickými a chemickými metodami. Celková genomická DNA se zachytí na křemičité membráně v kolonce. DNA se promývá a eluuje z membrány. Poté je DNA připravena pro PCR analýzu a další aplikace.

3.3 Přístroje a pomůcky

- 3.3.1 Homogenizátor typu „mini bead-beater“ s oscilační frekvencí 3000 kmitů/min.
- 3.3.2 Vortex.
- 3.3.3 Stolní centrifuga s rotorem pro 2,0ml mikrozkušavky typu Eppendorf s nastavitelnou hodnotou g do 10000 g.
- 3.3.4 Vhodná nádoba se šupinkovým ledem.
- 3.3.5 Sada automatických pipet, (20 – 1000) μ l.
- 3.3.6 Špičky s filtrem (100 – 1000) μ l a bez filtru (20 – 200) μ l a (100 – 1000) μ l.
- 3.3.7 Stojánek pro inkubaci vzorků v 2,0ml mikrozkušavkách na vodní lázni umožňující přímý kontakt mikrozkušavky a vody.

Další pomůcky jsou součástí kitu:

- 3.3.8 Rozbíjecí zkušavky PowerBead Tubes (obsahují 750 μ l roztoku).
- 3.3.9 PowerSoil 2,0ml mikrozkušavky.
- 3.3.10 PowerSoil kolonky ve 2,0ml mikrozkušavkách.

3.4 Chemikálie

- 3.4.1 Voda ve vysoké čistotě pro molekulární biologii, H₂O (rezistivita 18,2 M Ω /cm).
- 3.4.2 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 10 mol/l.
Příprava: 400 g NaOH se rozpustí ve vodě (3.4.1) a po vytemperování se upraví na celkový objem 1000 ml.
- 3.4.3 Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 4 mol/l.
Příprava: Smíchá se 333 ml koncentrované HCl (c = 37 %) a 664 ml vody (14).
- 3.4.4 Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid, C₄H₁₁NO₃-HCl, roztok, c(Tris-HCl) = 1 mol/l, pH = 8,0.
Příprava: 121,14 g Tris se rozpustí v 800 ml vody (3.4.1), pomocí HCl (3.4.3) se upraví pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou (3.4.1) na celkový objem 1000 ml.
- 3.4.5 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O, roztok, c(EDTA) = 0,5 mol/l, pH = 8,0.
Příprava: Ke 186,10 g EDTA se přidá 800 ml vody (3.4.1), roztokem NaOH (3.4.2) se upraví pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou (3.4.1) na celkový objem 1000 ml (EDTA se rozpouští až po přidavku roztoku NaOH).

3.4.6 TE pufr, pH 8,0.

Příprava: Smíchá se 10 ml roztoku Tris-HCl (3.4.4) a 2 ml roztoku EDTA (3.4.5) a doplní se vodou (3.4.1) na celkový objem 1000 ml.

Další chemikálie jsou součástí kitu:

3.4.7 PowerSoil roztok C1.

3.4.8 PowerSoil roztok C2.

3.4.9 PowerSoil roztok C3.

3.4.10 PowerSoil roztok C4.

3.4.11 PowerSoil roztok C5.

3.4.12 PowerSoil roztok C6.

Poznámky

1. *Voda, roztoky EDTA, Tris-HCl a TE se sterilizují 20 min při 120 °C a skladují při laboratorní teplotě.*
2. *Kit lze skladovat při teplotě (15 – 30) °C.*
3. *V chladu vznikají v PowerSoil roztoku C1 sraženiny. Zahřátím roztoku na 60 °C se sraženiny rozpustí, roztok C1 se může použít i horký.*
4. *PowerSoil roztok C5 je hořlavý, obsahuje ethanol.*

3.5 Pracovní postup

Do rozbíjecích zkumavek PowerBead Tubes (součást kitu) se přidá 0,25 g přirozeně vlhké půdy a zkumavky se promíchají opatrným vortexováním. Do rozbíjecích zkumavek se přidá 60 µl roztoku C1 a zkumavky se opět zvortexují a nechají se 45 s třepat v homogenizátoru typu *bead-beater* při frekvenci 3000 kmitů/min (Pozn.: Originální protokol dodaný spolu s kitem doporučuje třepání vzorku v horizontální poloze na multivortexu s použitím MO BIO Vortex adaptéru, a to 10 min. při maximální rychlosti. Ten však laboratoři nemá k dispozici. Podle doporučení v literatuře se použil právě homogenizátor typu *bead-beater*.). Poté se rozbíjecí zkumavky centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Supernatant se přenesení do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu), k supernatantu se přidá 250 µl roztoku C2, vzorky se 5 s vortexují a 5 min inkubují při 4 °C. Je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici. Zkušavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozkušavky, která je součástí kitu, se přenese maximálně 600 μ l supernatantu, k němu se přidá 200 μ l roztoku C3, vzorky se krátce vortexují a 5 min inkubují při 4 °C. Je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici. Zkušavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozkušavky, která je součástí kitu, se přenese maximálně 750 μ l supernatantu, k němu se přidá 1200 μ l roztoku C4 a vzorky se 5 s vortexují. Poté se přenese přibližně 675 μ l takto vzniklé směsi do kolonky umístěné ve 2,0ml mikrozkušavce (je součástí kitu) a centrifuguje se 1 min při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije, přidá se dalších 675 μ l směsi a centrifugace se opakuje. Přefiltrovaná kapalina se opět vylije, do kolonky se přidá zbytek směsi, kolonky se stejným způsobem centrifugují a zbytek přefiltrované kapaliny se vylije (Pozn.: Každý vzorek je tedy nutné rozdělit na tři dávky.).

Do kolonek se přidá 500 μ l roztoku C5 a ty se centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije a kolonky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě, aby se odstranily reziduální zbytky roztoku C5.

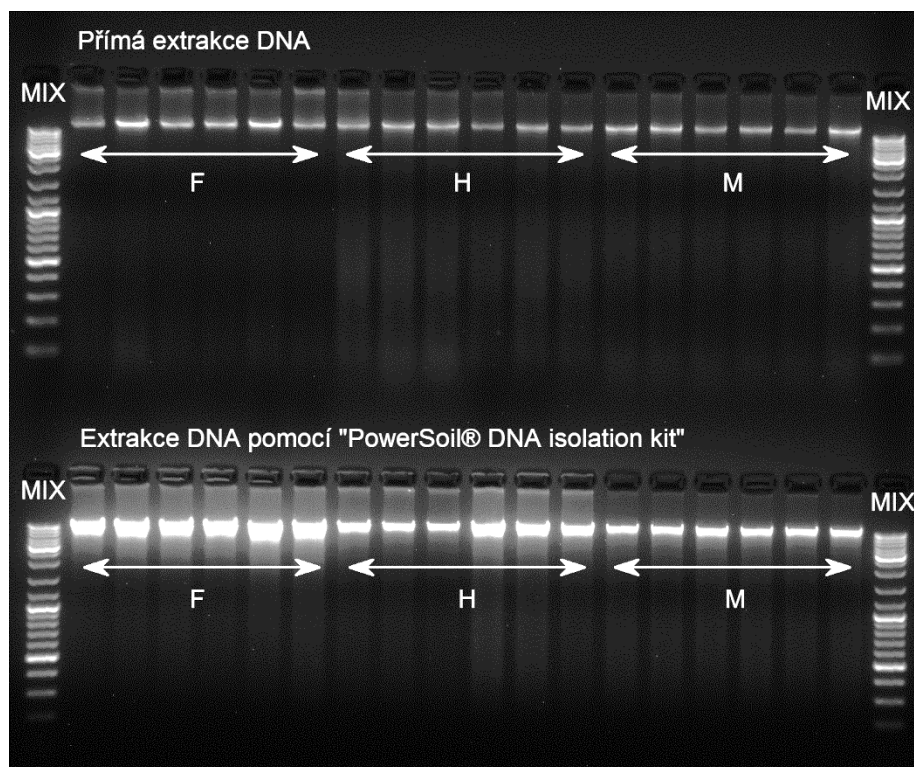
Kolonky se opatrně přenesou do čistých 2,0ml mikrozkušavek (jsou součástí kitu), je nutné zabránit potřísnění kolonek roztoku C5. Doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky se nanese 100 μ l roztoku C6 nebo vody, popř. TE pufru (v našem případě jsme přidali TE pufr, neboť roztok C6 neobsahuje EDTA a s DNA rozpuštěnou v TE pufru má laboratoř během následných aplikací dobré zkušenosti). Kolonky se centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě. Kolonky se z 2,0ml mikrozkušavek odstraní a DNA v mikrozkušavkách je připravena pro různé aplikace. Žádná další purifikace extraktu DNA již není nutná. DNA se uchová při minus 20 °C až do dalšího použití.

4 Výsledky a diskuse

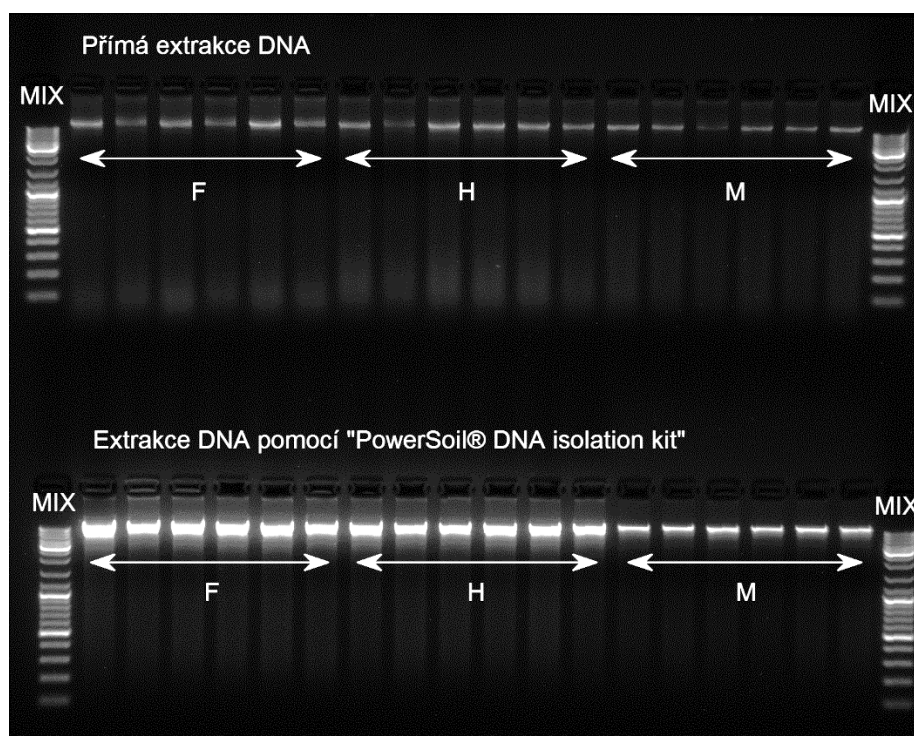
Pro testování metody „Extrakce DNA z lesních půd kitem *PowerSoil™ DNA Isolation kit*“ byly vybrány dva vzorky lesních půd (dále rozděleny na fermentační, humusový a organominerální horizonty), které se podstatným způsobem lišily v základních fyzikálních, chemických i biologických parametrech (tabulka 1), protože mnohé půdní parametry značným způsobem ovlivňují množství, kvalitu a čistotu extrahované DNA (Bakken a Frostegård, 2006). Především vysoký obsah organické hmoty často vede ke koextrakci huminových látek spolu s DNA a tyto látky znesnadňují další molekulární analýzy. Metoda

tedy byla testována na vzorku půdy z dubového (plocha č. 18901) a smrkového (plocha č. 31901) lesa, neboť doubravy a smrčiny se značně liší ve složení a kvalitě humusových látek v půdě.

Byla otestována další použitelnost vyextrahované DNA. Obr. 1 a 2 ukazují vyfotografované gely po gelové elektroforéze s nanesenou DNA získanou oběma extrakčními metodami.



Obr. 1. Fotografie gelu po gelové elektroforéze DNA z půdy odebrané na lokalitě 18901 (doubrava). DNA byla získaná „přímou izolací“ (nahore) a „izolací kitem“ (dole) (6 laboratorních opakování, MIX – standard DNA, F – fermentální horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont).



Obr. 2. Fotografie gelu po gelové elektroforéze DNA z půdy odebrané na lokalitě 31901 (smrčina). DNA byla získaná „přímou izolací“ (nahore) a „izolací kitem“ (dole) (6 laboratorních opakování, MIX – standard DNA, F – fermentační horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont).

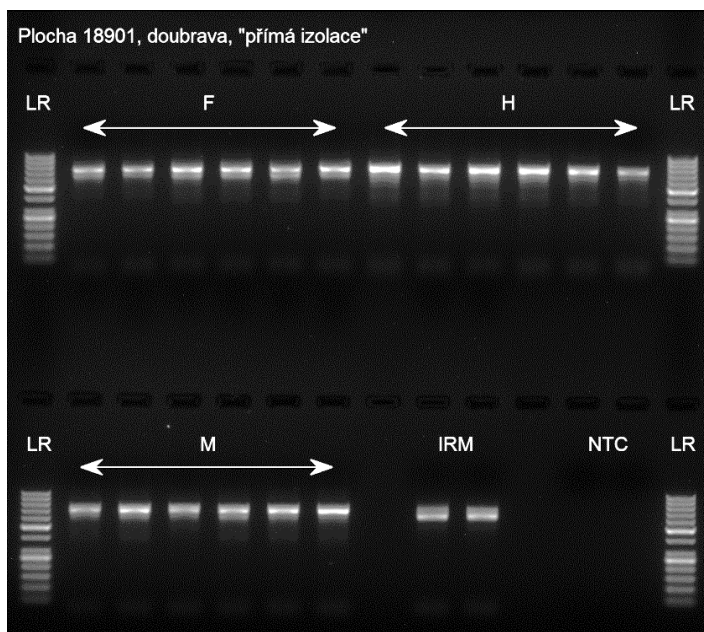
Je zřetelně viditelné, že se ze všech tří půdních horizontů u obou půd podařilo vyizolovat DNA oběma metodami, a to ze všech šesti opakování. Avšak vizuální porovnání gelů celkem přesvědčivě ukazuje, že nová metoda „izolace kitem“ poskytuje DNA ve vyšší koncentraci než metoda „přímé extrakce“. Vizuální zhodnocení je též podpořeno výsledky stanovení koncentrace DNA fluorescenční metodou (tabulka 2). Koncentrace DNA získaná „izolací kitem“ byla $1,2 \times$ až $5,1 \times$ vyšší než koncentrace DNA po „přímé izolaci“, navíc díky přítomným nečistotám (humusové látky) byly některé extrakty DNA po „přímé extrakci“ navzdory následné purifikaci zakaleny a stanovení koncentrace DNA v extraktech nebylo prakticky možné (u některých opakování byla stanovena i záporná hodnota koncentrace DNA).

Tabulka 2. Koncentrace přečištěné DNA získané „přímou izolací“ a „izolací kitem“. Jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky (n = 6).

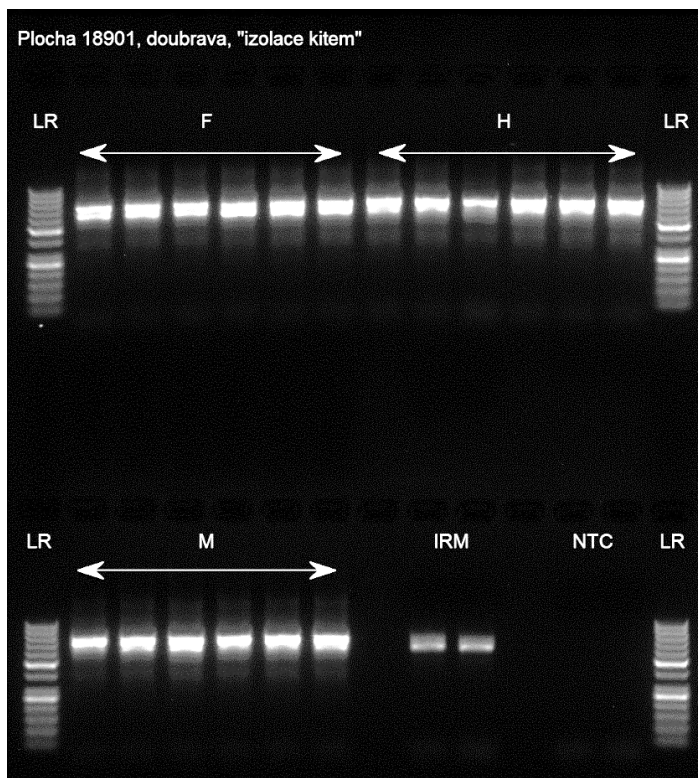
Označení plochy	Převažující dřevina	Horizont	koncentrace DNA (ng/μl)	
			"přímá extrakce"	"extrakce kitem"
18901	dub letní	F	7,3 ± 1,6	20,9 ± 2,2
		H	6,3 ± 0,8	12,0 ± 4,3
		M	5,8 ± 1,8	8,2 ± 0,4
31901	smrk ztepilý	F	3,7 ± 1,5	18,7 ± 3,0
		H	-3,2 ± 1,5	10,9 ± 1,1
		M	3,4 ± 1,5	4,2 ± 0,5

Na druhou stranu není koncentrace DNA pro další molekulárně-biologické využití zcela zásadním parametrem, protože ve většině případů se získaná DNA před dalšími analýzami ředí. Spíše je důležitá celková čistota a integrita DNA, aby mohla posloužit jako vhodný templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Tato čistota a integrita DNA byla otestována rutinní analýzou prováděnou na Oddělení mikrobiologie a biochemie ÚKZÚZ, a to metodou PCR. Pro tuto reakci byl vybrán genový úsek ITS (internal transcribed spacer), který je přítomen pouze v genetické výbavě hub, skupiny tak typické pro ekosystém lesních půd.

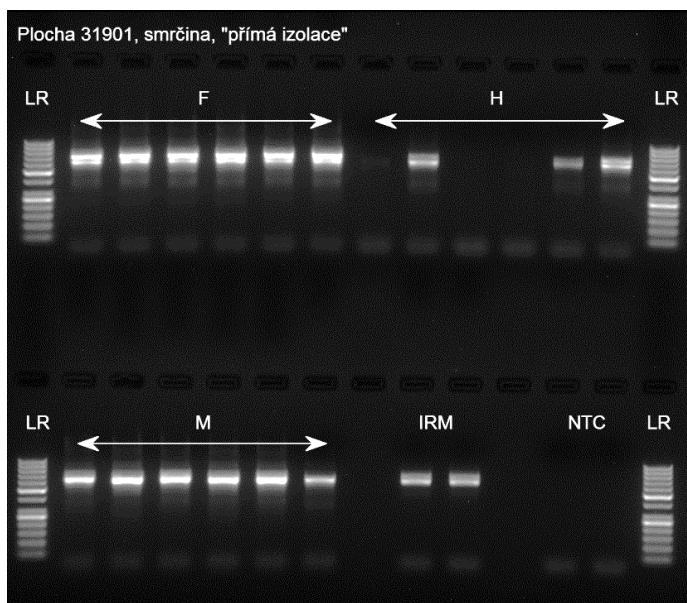
Obr. 3 a 4 jasně ukazují, že extrakce DNA jak „přímou izolací“ tak „izolací kitem“ byla u lesní půdy doubravy úspěšná ve všech půdních horizontech a ve všech šesti laboratorních opakováních. Avšak porovnání gelů produktů PCR ukazuje, že templátová DNA získaná „izolací kitem“ vedla k účinnější reakci PCR, než tomu bylo u DNA získané „přímou izolací“. To je zřejmě způsobeno čistějším extraktem DNA, neboť DNA získaná „přímou izolací“ vykazovala jemný zákal. Metoda „izolace kitem“ poskytuje DNA ve vyšší koncentraci než metoda „přímé extrakce“. Rozdíl mezi kvalitou DNA získanou oběma extrakčními metodami je ještě patrnější u reakce PCR s DNA pocházející z půdních vzorků smrčiny (obr. 5 a 6). Zatímco v případě „přímé izolace“ (obr. 5) PCR neproběhla u všech laboratorních opakování (humusový horizont), tak DNA získaná „izolací kitem“ vedla k mnohem většímu výtěžku PCR reakce, a to ve všech opakováních (obr. 6).



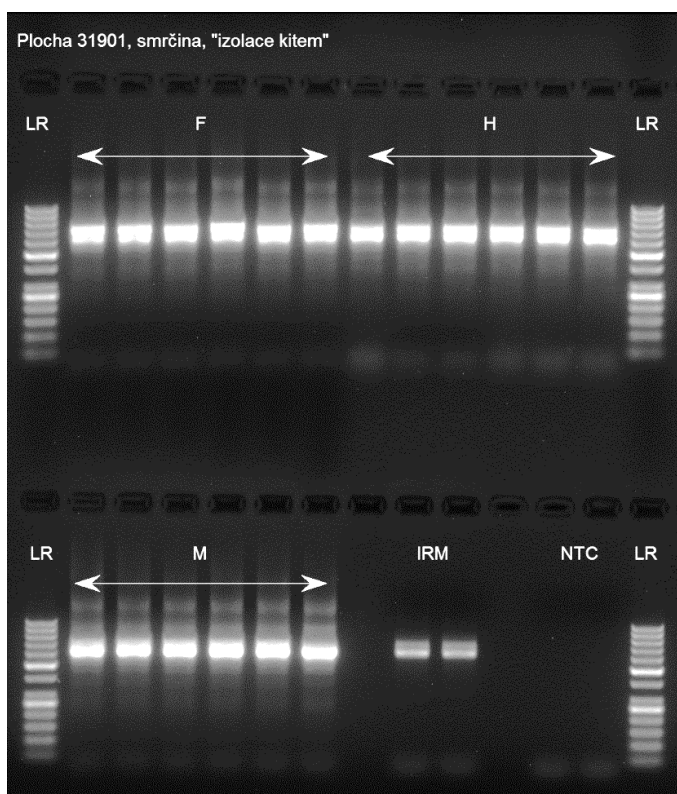
Obr. 3. Fotografie gelu po gelové elektroforéze produktů PCR po amplifikaci genového úseku ITS, kde byla jako templát použita DNA z půdy 18901 (doubrava) získaná „přímou izolací“ (F – fermentační horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont, NTC – beztemplátová kontrola, IRM – pozitivní kontrola, LR – standard DNA „low range“).



Obr. 4. Fotografie gelu po gelové elektroforéze produktů PCR po amplifikaci genového úseku ITS, kde byla jako templát použita DNA z půdy 18901 (doubrava) získaná „izolací kitem“ (F – fermentační horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont, NTC – beztemplátová kontrola, IRM – pozitivní kontrola, LR – standard DNA „low range“).



Obr. 5. Fotografie gelu po gelové elektroforéze produktů PCR po amplifikaci genového úseku ITS, kde byla jako templát použita DNA z půdy 31901 (smrčina) získaná „přímou izolací“ (F – fermentační horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont, NTC – beztemplátová kontrola, IRM – pozitivní kontrola, LR – standard DNA „low range“).



Obr. 6. Fotografie gelu po gelové elektroforéze produktů PCR po amplifikaci genového úseku ITS, kde byla jako templát použita DNA z půdy 31901 (smrčina) získaná „izolací kitem“ (F – fermentační horizont, H – humusový horizont, M – organo-minerální horizont, NTC – beztemplátová kontrola, IRM – pozitivní kontrola, LR – standard DNA „low range“).

5 Závěr

V rámci práce byla úspěšně otestována a zavedena metoda izolace DNA kitem *PowerSoil*[®] *DNA Isolation kit* (Mo Bio Laboratories, Inc.) z lesních půd. Touto metodou se podařilo izolovat DNA z půd s rozdílnými fyzikálními, chemickými a biologickými parametry a DNA je plně využitelná pro další molekulárně-biologické analýzy půdního mikrobiálního společenstva. Bylo ukázáno, že tato metoda extrakce DNA plně nahrazuje doposud používanou přímou extrakci DNA komerčně dodávaným kitem. Navíc v sobě zahrnuje účinnou několikasupňovou purifikaci extraktu DNA a další přečištění jinými metodami pro úspěšné navazující molekulárně-biologické aplikace již není třeba. Metoda je rychlá a jednoduchá na provedení.

6 Literatura

1. Bakken LR, Frostegård Å. Nucleic acid extraction from soil. In: Nannipieri P, Smalla K (Eds.): *Nucleic acids and proteins in soil*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2006**, 49-73.
2. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **1993**, 2, 113-118.
3. ISO 11063 Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples. International organization for Standardization, **2010**.
4. *PowerSoil*[®] DNA Isolation Kit, Instruction Manual. Mo Bio Laboratories, Inc., USA, 1-20.
5. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.): *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, **1990**, 315-322.
6. Zbírál J, Malý S, Váňa M. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, **2011**, 253 s.

Stanovení obsahu taninu v čiroku spektrofotometricky

Radvana Šulová, Alena Balarinová, Naděžda Kabátová

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

1 Úvod

Čirok je stará dlouhodobě využívaná kulturní plodina pěstovaná již ve starém Egyptě. V 15. a 16. století byl v Africe čirok všeobecně rozšířený. Světově patří mezi významné plodiny především v oblastech Asie, saharského a subsaharského pásu Afriky, kde je nedostatek srážek. V Čechách se objevil ve větší míře až ve 20. a 50. letech minulého století. Poslední vlna zvýšeného zájmu o čirok u nás souvisí především s rozvojem bioplynových stanic, pro které poskytuje velké množství kvalitní hmoty.

V současné době se čirok pěstuje ve všech světadílech. V celosvětové produkci zaujímá páté místo v pěstovaných obilovinách hned za pšenicí, kukuřicí, rýží a ječmenem a sedmé místo ve všech pěstovaných plodinách po sóji a bramborách. Jako potravina se čirok nejvíce využívá v Africe a Asii, pro krmné účely v Evropě, USA a Austrálii.

Velmi důležitou vlastností čiroku je chemické složení zrna, které má co nejvíce vyhovovat pěstitelskému směru. Důvodem snížení možnosti jeho použití jako krmiva je vysoký obsah taninů. Proto jeden z důležitých cílů v rámci šlechtění zrnových čiroků je získání materiálů prostých těchto antinutričních látek. Zkrmování čiroku s vysokým obsahem taninů brojlerovým kuřatům způsobuje růstovou depresi a snížení spotřeby krmiva, u slepic pokles snášky.

Úkolem této práce bylo zavést a verifikovat postup na stanovení taninů v čiroku spektrofotometricky podle ČSN ISO 9648.

2 Teoretická část

Čirok se pěstuje především v teplých, sušších oblastech. V posledních letech je patrný posun pěstování čiroku i do severnějších oblastí, kde existují programy šlechtění hybridů čiroků. Šlechtí se zejména na chladuvzdornost, rannost a snížení obsahu antinutričních látek v obilkách. Tak se nabízí větší možnost jeho využití v Evropě k potravinářským účelům.

Čirok pro potravinářské účely se většinou pěstuje na zrno. V potravinářském průmyslu se využívá čirok cukrový pro výrobu sirupů, cukrovinek, lihu, lihových nápojů a piva, protože snadno a rychle zkvašuje. Velmi rozšířená je příprava kaší z mouky a krup v kombinaci s masem a zeleninou. Průmyslově se čiroková mouka využívá pro výrobu lepidel, olejů a škrobu. V poslední době zaznamenává razantní nárůst jako surovina pro produkci etanolu jako paliva z biomasy. Čirok je dále vhodnou kvalitní krmnou plodinou pro vysoký obsah cukrů, velmi dobrou stravitelnost a vysoký výnos zelené silážní hmoty. Z technického čiroku se vyrábějí kartáče a košťata.

V podmínkách České republiky se odrůdy a hybridy čiroku využívají především pro krmné účely a na výrobu bioplynu. Tradiční odrůdy čiroku jsou dnes vytlačovány novými hybridy s příznivějšími agrotechnickými a nutričními vlastnostmi. V posledních letech se nejvíce využívají hybridní odrůdy vzniklé křížením čiroku zrnového nebo cukrového se súdánskou trávou. Jejich výhodou je vysoká produkce jakostní zelené hmoty.

3 Experimentální část

Byl zaveden postup na stanovení obsahu taninů v čiroku obecným spektrofotometricky podle ČSN ISO 9648. Metoda byla ověřena na vzorcích čiroku ze sklizně 2012, které laboratoři dodal Národní odrůdový úřad (NOÚ). Metoda byla verifikována.

3.1 Metoda na stanovení obsahu taninů v čiroku spektrofotometricky

3.1.1 Princip metody

Taniny se ze vzorku extrahují roztokem dimethylformamidu. Po reakci extraktu s citronanem amonno-železitým a amoniakem se následně stanoví spektrofotometricky ve viditelné oblasti při vlnové délce 525 nm.

3.1.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Dimethylformamid.
- 3 Dimethylformamid, vodný roztok, $c(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}) = 75 \text{ \% (V/V)}$.

Příprava: 750 ml dimethylformamidu (2) se přidává do asi 200 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.

- 4 Amoniak, (25 – 29)%, vodný roztok.
- 5 Amoniak, vodný roztok, $c(\text{NH}_3) = 8,0 \text{ g/l}$.

Příprava: 32 ml amoniaku (4) se přidává do asi 500 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.

- 6 Citronan amonno-železitý, s obsahem Fe (16,5 - 18,5) %.
- 7 Citronan amonno-železitý, vodný roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{Fe} \cdot x\text{H}_3\text{N}) = 3,5 \text{ g/l}$.

Příprava: 3,5 g citronanu amonno-železitého (6) se rozpustí ve vodě (1). Poté se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku vodou (1). Roztok je nutné připravit 24 h před použitím.

- 8 Kyselina taninová.
- 9 Kyselina taninová, vodný roztok, $c(\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}) = 2 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,1 g kyseliny taninové (8) se rozpustí v asi 30 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 50ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.

Poznámky

1. *Obsah železa v citronanu amonno-železitém (6) má velký vliv na výsledky stanovení, proto je nutné dodržet uvedený obsah.*
2. *Původ kyseliny taninové (8) výrazně ovlivňuje průběh kalibrační křivky. Z důvodu možnosti provedení mezilaboratorního porovnání výsledků doporučuje norma ČSN ISO 9648 používat kyselinu taninovou od firmy Merck (referenční číslo 773).*

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Spektrofotometr.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 3 Laboratorní ultraodstředivý mlýnek, např. Retsch ZM 200, se sítím o velikosti ok 0,5 mm.
- 4 Minitřepačka typu Vortex.
- 5 Laboratorní třepačka s kývavým pohybem.
- 6 Laboratorní odstředivka, odstředivé zrychlení 3000g.
- 7 Centrifugační zkumavky, 50 ml.
- 8 Zkumavky, asi 20 ml a 10 ml, stojan na zkumavky.
- 9 Automatické pipety s nastavitelným objemem, 1 ml, 5 ml a 10 ml.

3.1.4 Příprava zkušební vzorku

Laboratorní vzorek se po odstranění nečistot důkladně promíchá a kvartací se připraví zkušební vzorek, který se pomele na mlýnku při 1400 ot/min. Použije se síto s velikostí ok 0,5 mm. Namletý vzorek se převede do vhodné uzavíratelné nádoby.

Vzhledem k rychlé oxidaci taninů v rozemletém zrně se ihned po pomletí vzorku přistupuje k vlastnímu stanovení.

Poznámky

3. *Vysušená celá zrna čiroku, která jsou určena ke stanovení obsahu taninů, se mohou uchovávat v prachovnici po dobu několika měsíců, pokud jsou chráněna před světlem.*

3.1.5 Extrakce

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g. Pipetou se ke vzorku přidá 20 ml dimethylformamidu (3), zkumavka se uzavře víčkem a vzorek se extrahuje 1 h na třepačce při laboratorní teplotě. Poté se extrakt odstředí 10 min při odstředivém zrychlení 3000 g. Pro další stanovení se použije připravený supernatant.

3.1.6 Spektrofotometrické stanovení

Příprava slepého pokusu: Do 20ml zkumavek se nadávkuje ve dvou paralelních stanoveních 1 ml připraveného supernatantu vzorku. Poté se do každé zkumavky přidá 6 ml vody (1) a 1 ml amoniaku (5) a obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Vše je nutné provést během první minuty stanovení.

Příprava vzorku: Do dalších dvou 20ml zkumavek se opět ve dvou paralelních stanoveních nadávkuje 1 ml připraveného supernatantu vzorku. Poté se do každé zkumavky přidá 5 ml vody (1) a 1 ml roztoku citronanu amonno-železitého (7) a obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Pak se do obou zkumavek přidá 1 ml amoniaku (5) a zkumavky se znovu protřepou na minitřepačce. Vše je nutné provést během dalších dvou minut stanovení (viz poznámka 4).

Absorbance takto připravených vzorků a příslušných slepých pokusů se změří na spektrofotometru při 525 nm proti vodě, v čase (10 ± 1) min po ukončení operací v každé ze zkumavek.

Výsledkem stanovení je absorbance (A) daná rozdílem mezi absorbancí roztoku vzorku a absorbancí slepého pokusu.

Poznámky

4. *V jednom cyklu lze výše popsáním způsobem, při dodržení všech časových intervalů, stanovit celkem tři vzorky. Celková doba na provedení popsanych operací je 9 min. V 10. minutě se připravené roztoky převedou do kyvet nebo 10ml zkumavek, podle použitého spektrofotometru. V čase (10 ± 1) min po ukončení operací v příslušné zkumavce se změří na spektrofotometru absorbance roztoku při 525 nm proti vodě.*
5. *Pokud se absorbance u takto připravených vzorků nepohybuje v rozsahu kalibrační závislosti, je nutné supernatant vhodně naředit a zopakovat celé spektrofotometrické stanovení. Ředění se zohlední při výpočtu.*

3.1.7 Příprava kalibrační křivky

Ke stanovení obsahu taninů se použije kalibrační křivka získaná proměřením kalibračních roztoků kyseliny taninové. Kalibrační křivka se připravuje vždy v den vlastního stanovení.

Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3,0) ml roztoku kyseliny taninové (9) a poté se doplní dimethylformamidem (3) po značku. Získají se tak kalibrační roztoky o koncentraci kyseliny taninové (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6) mg/ml.

Do 20ml zkumavek označených 0 až 6 se pipetuje vždy 1 ml z každého z kalibračních roztoků.

Poté se do první zkumavky (označené 0) pipetou postupně přidá 5 ml vody (1) a 1 ml citronanu amonno-železitého (7). Obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Pak se přidá 1 ml amoniaku (5) a zkumavka se znovu několik sekund protřepává. Uvedené operace je nutné zvládnout v průběhu jedné minuty. Poté se roztok nechá stát 10 min.

V průběhu 2. minuty se celý výše popsany postup zopakuje s další zkumavkou (označenou 1), a tak se následně postupuje i se zkumavkami označenými 2 až 6.

Absorbance připravených kalibračních roztoků se změří v čase (10 ± 1) min po ukončení operací na spektrofotometru při 525 nm proti vodě.

Z naměřených výsledků se sestojí kalibrační křivka.

Poznámky

6. *Při výpočtu koncentrace kalibračních roztoků je nutné zohlednit čistotu použitého standardu kyseliny taninové (obvykle 95 %).*
7. *Kalibrační křivka nesmí být korigována do nulového bodu.*

3.1.8 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah taninů, vyjádřený jako hmotnostní procento kyseliny taninové, se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{V \times c \times 10^{-3}}{V_1 \times m} \times 100$$

kde V je celkový objem extraktu v ml,

V_1 objem extraktu pipetovaný pro spektrofotometrické stanovení v ml,

c koncentrace kyseliny taninové ve zkušebním vzorku zjištěná z kalibrační závislosti v mg/ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g,

10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg na g.

Výsledek se udává jako průměr minimálně dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na hodnotu opakovatelnosti

3.2 Výsledky a diskuse

V současné době existuje v České republice norma ČSN ISO 9648 na spektrofotometrické stanovení taninů v zrnech čiroku.

Pro ověření a verifikaci této normy byly použity vzorky čiroku, které dodal Národní odrůdový úřad (NOÚ). Byly stanoveny základní validační parametry metody - opakovatelnost a střední opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, meze detekce a nejistota stanovení.

3.2.1 Validační parametry

Opakovatelnost

Výpočet opakovatelnosti byl proveden pomocí software EffiValidation 3.0. - Opakovatelnost - po úrovních z vícenásobného měření. Opakovatelnost byla stanovena na třech koncentračních hladinách. Tyto hladiny byly zvoleny tak, aby postihovaly oblast s nízkým, středním a vysokým obsahem taninu v čiroku. Pro každou koncentrační hladinu byl vybrán jeden vzorek, který byl minimálně v deseti opakováních vždy extrahován a následně analyzován.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Ze směrodatné odchylky, která charakterizuje přesnost výsledků získaných použitou analytickou metodou, byla vypočítána dovolená difference paralelních stanovení $R_{\max}$, tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb.

$$R_{\max} = a_s \cdot s,$$

Kde a_s je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$, jehož hodnota je 2,77.

s směrodatná odchylka z vícenásobných měření jednoho vzorku.

Tabulka č. 1. Opakovatelnost měření a maximální povolená difference dvou par. stanovení v původní hmotě (ph).

Úroveň	Vzorek	Počet vzorků	Průměr měření % (m/m)	s	s _r (%)	R _{max}
1.	9354	10	0,006	0,009	17,38	0,024
2.	9357	12	0,729	0,010	1,33	0,027
3.	9355	12	1,128	0,017	1,48	0,046

Legenda: s - opakovatelnost, s_r – relativní opakovatelnost, $R_{\max}$ - difference par. stanovení

Z tabulky č. 1 vyplývá, že opakovatelnost stanovení je pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná.

Pro zápis výsledků do Labsystému byly vloženy pro povolenou diferenci dvou paralelních stanovení tyto hodnoty: pro obsah taninů vyjádřený jako% (m/m):

< 0,6 % (m/m) 0,03 % abs.

0,7 % – 1,2 % (m/m) 0,06 % abs.

Střední přesnost

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software EffiValidation 3.0. - Opakovatelnost - z paralelních měření. K výpočtu byly použity vzorky čiroku ze sklizně 2012. Obsah taninů se v daných vzorcích čiroku pohyboval v koncentračním rozsahu odpovídající obsahům v běžně se vyskytujících v zrnech čiroku a také uvedených v normě ČSN ISO 9648.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka z paralelních měření a dovolená difference paralelních stanovení $R_{\max}$ podle vztahu.

$$R_{\max} = b_R \cdot s$$

kde b_R je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$, jehož hodnota je 2,46

s směrodatná odchylka získaná z paralelních stanovení.

Tabulka č. 2. Vyhodnocení střední přesnosti a maximální difference dvou par. stanovení.

Vzorek	Počet vzorků	Průměr měření % (m/m)	s	s _r (%)	R _{max}
čirok	22	0,46431	0,011	2,29	0,026

Legenda: s - opakovatelnost, s_r – relativní opakovatelnost, R_{max}. - difference par. stanovení

Z tabulky č. 2 vyplývá, že střední přesnost je u uvedené metody srovnatelná a pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná a výsledky korespondují s hodnotami přesnosti získanými za podmínek opakovatelnosti.

Správnost

V současné době není dostupný žádný CRM čiroku, případně čiroku s deklarovaným obsahem taninu a zároveň nejsou organizovány žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na jeho stanovení. Správnost metody na stanovení obsahu taninu v čiroku byla proto ověřena metodou standardního přídatku s použitím testu výtěžnosti.

Při ověřování správnosti metodou standardního přídatku bylo postupováno následovně. K přesné navážce vzorku s nízkým obsahem hledaného analytu bylo vždy přidáno definované množství standardu kyseliny taninové tak, aby byla připravena řada vzorků na pěti koncentračních hladinách, pokrývajících celý požadovaný rozsah. Na každé z hladin byly připraveny vzorky ve 2 opakováních. Takto připravené vzorky byly analyzovány na spektrofotometru. Získané výsledky stanovení byly vyhodnoceny v programu EffiValidation 3.0. - Správnost - Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Ověření správnosti metody stanovení taninů v % (m/m) v zrnech čiroku.

Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	0,010	-0,009 – 0,009	Přijata
Přídavek 1	0,211	0,205	97,01	0,001	0,189 – 0,221	Přijata
Přídavek 2	0,421	0,425	100,88	0,002	0,409 – 0,441	Přijata
Přídavek 3	0,632	0,631	99,79	0,011	0,613 – 0,648	Přijata
Přídavek 4	0,843	0,837	99,31	0,009	0,820 – 0,854	Přijata
Přídavek 5	1,054	1,049	99,54	0,042	1,021 – 1,078	Přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

Linearita

Linearita popisuje míru lineární závislosti mezi validovanou vlastností a měřením. Pro prvotní ověření linearity byl použit standard kyseliny taninové. Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 0 mg/ml až 0,6 mg/ml kyseliny taninové. Tento koncentrační rozsah odpovídá množství taninu ve vzorku na mezi stanovitelnosti až po obsah taninu 0,8 % vyjádřených jako % (m/m) kyseliny taninové. V případě vyšších koncentrací taninu ve vzorku je nutné pipetovat pouze 0,5 ml supernatantu pro další práci a tuto úpravu pak zohlednit ve výpočtu. U připravených kalibračních roztoků bylo provedeno spektrofotometrické stanovení tak, jak je popsáno v 3.1.7. Kontrola lineární závislosti byla provedena pomocí software EffiValidation 3.0. - Linearita - korelační a QC koeficient. Hodnota korelačního koeficientu R pro uvedený koncentrační rozsah byla 0,9997 a hodnota koeficientu QC byla 1,31 %, přičemž linearita se obecně považuje za prokázanou, když $R > 0,99$ a $QC < 5\%$.

Citlivost

Citlivost je dána změnou signálu, vyvolanou jednotkovou změnou validované vlastnosti. Je vyjádřena směrnici kalibrační přímky. Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0. - Citlivost - ze směrnice přímky. Pro stanovení taninů v čiroku, provedené za výše uvedených podmínek, byla stanovena hodnota citlivosti 1,2288 (absorbance: mg/ml).

Meze detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení detekčních limitů byl použit program EffiValidation 3.0. - Stanovení z kalibrační přímky. Byla použita průměrná hodnota směrnice kalibrační přímky vypočítána

ze 3 kalibračních přímek naměřených v různé dny. Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 0 mg/ml až 0,6 mg/ml kyseliny taninové. Roztoky připravené podle 3.1.7 byly změřeny na spektrofotometru při vlnové délce 525 nm za podmínek metody. Z průměrných hodnot směrnice kalibrační přímky byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti, které jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Meze detekce a stanovitelnosti.

Parametr		Taniny jako % (m/m) kyseliny taninové
Směrnice kalibrační přímky	a	1,2287
Úsek kalibrační přímky	b	0,1581
Korelační koeficient	R^2	0,9989
Koncentrace na mezi detekce	x_D (hmot. %)	0,008
Koncentrace na mezi stanovitelnosti	x_Q (hmot. %)	0,024

Za výše popsaných podmínek metody je mez detekce 0,01 % (m/m) resp. stanovitelnosti 0,024 % taninů vyjádřených jako % (m/m) kyseliny taninové.

Pro zápis výsledků byla použita praktická mez stanovitelnosti 0,03 % (m/m).

Nejistota stanovení

Ke stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty byly použity výsledky analýz vzorků čiroku ze sklizně 2012. Obsah taninů v daných vzorcích se pohyboval v celém koncentračním rozsahu typickém pro odrůdy čiroku. Celkem bylo analyzováno 22 vzorků ve dvou paralelních stanoveních. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0 - Nejistoty z přesnosti - paralelní měření k dispozici. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor pokrytí 2,0.

Tabulka č. 5: Nejistoty pro stanovení obsahu taninu v čiroku.

Vzorek	Koncentrační rozsah % (m/m)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 1,96)	
			(%) rel.		(%) rel.
čirok	< 0,1	0,007	7,97	0,013	15,94
	0,15 – 0,9	0,011	1,69	0,021	3,39
	1,00 – 1,2	0,015	1,22	0,029	2,40

Do Labsystému byly po zaokrouhlení vloženy pro relativní rozšířenou nejistotu stanovení hodnoty 16 % pro koncentrační rozsah < 0,1 % (m/m) a 5 % pro další dvě koncentrační hladiny 0,11 – 1,2 % (m/m).

4 Závěr

Cílem práce bylo zavedení metody na spektrofotometrické stanovení taninů v zrnech čiroku. Byl ověřen extrakční postup pro získání taninů z čiroku i jeho následné spektrofotometrické stanovení uvedené v normě ČSN ISO 9648. Byla stanovena opakovatelnost, střední opakovatelnost, linearita, citlivost, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení.

Pro zápis výsledků do Labsystému byly vloženy následující parametry:

- rozdíl paralelních stanovení 0,03 % abs. u obsahů < 0,6 % (m/m),
0,06 % abs. pro obsahy (0,7% – 1,2) % (m/m),
- mez stanovitelnosti 0,03 % (m/m),
- relativní rozšířenou nejistotu 16 % rel. pro koncentrační rozsah < 0,1 % (m/m),
5 % rel. pro koncentrační hladiny (0,11 – 1,2) % (m/m).

Všechny hodnoty taninů jsou vyjádřené jako % (m/m) kyseliny taninové ve vzorku.

Závěrem je možné říci, že metodu, tak jak byla výše popsána, lze použít pro stanovení taninu v čiroku.

5 Literaturní

1. Helmuth, J., Janovská, D., Stražil, Z., Ust'ak, S., Hýsek, J.: Čírok obecný – možnosti využití v podmínkách České republiky, Metodika pro praxi, VÚRV Praha Ruzyně 2012.
2. ČSN ISO 9648: Čírok – Stanovení obsahu taninu, ČNI Praha, leden 2003.
3. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0.
4. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolenaá diference výsledků paralelních stanovení. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, 1. vydání, SNTL Praha, 1980

Bulletin Národní referenční laboratoře XIX 2015/3

Ročník: XIX, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2015

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 35

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196