

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2015

Ročník XIX, číslo 1/2015

Brno 2015

Obsah

- 1. Kvantitativní stanovení kyseliny močové v organických hnojivech metodou HPLC**
Václav Ryppl, Alena Žalmanová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň 1
- 2. Ověření postupu analýzy hnojiv metodou FAAS a ICP-OES**
Eva Urbánková, Eva Niedobová, Jiří Zbíral
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 8
- 3. Izolace a stanovení počtu bakterií rodu Enterococcus (Enterococcus faecium) podle ČSN EN 15788**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno 19

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Kvantitativní stanovení kyseliny močové v organických hnojivech metodou HPLC

Václav Rypl, Alena Žalmanová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
vaclav.rypl@ukzuz.cz

1 Souhrn

Byl vypracován postup pro kvantitativní stanovení kyseliny močové v organických hnojivech, aby bylo možné s dostatečnou přesností určit rozhodovací kritérium 15 % příměsi cizí organické hmoty do kravského hnoje.

2 Úvod

Bylo zjištěno, že někteří výrobci přidávají do peletovaného kravského hnoje i drůbeží trus a deklarují tuto směs jako čistý kravský hnůj. Se Sekcí úřední kontroly se výrobci dohodli, že za čistý kravský hnůj bude považována směs s obsahem maximálně 15 % cizí organické hmoty. Vznikla tak potřeba určení množství cizí organické hmoty v těchto směsích. Jako ukazatel byla zvolena kyselina močová, která se téměř nevyskytuje v trusu savců, ale vyskytuje se ve vysokých koncentracích v trusu ptáků.

3 Materiál a metody

Jedná se o HPLC stanovení pomocí hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) za izokratických podmínek a UV detekcí. Vzorek se extrahuje roztokem Li_2CO_3 . K rozdělení dochází na HILIC koloně a jako mobilní fáze se použije pufr acetonitril s octanem amonným v poměru (90 : 10). Vyhodnocení bylo provedeno formou externí kalibrace a odečítány byly plochy píků.

3.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Li_2CO_3 , 10 mM roztok, extrakční činidlo.
Příprava: Naváží se 1,4777 g Li_2CO_3 , převede se do 2000ml odměrné baňky pomocí asi 1000 ml vody (4), rozpustí se za pomoci ultrazvukové lázně a doplní po značku vodou (4).
- 2 Kyselina močová, základní standard 500 mg/l.
Příprava: Naváží se 50 mg kyseliny močové, převede se do 100ml baňky pomocí asi 70 ml extrakčního činidla (1), rozpustí se za pomoci ultrazvukové lázně a doplní po značku extrakčním činidlem (1).
- 3 Acetonitril (Sigma-Aldrich) - Chromasolv[®] for HPLC, gradient grade.
- 4 Voda – deionizovaná voda redestilována s KMnO_4 .
- 5 Octan amonný, 100 mM roztok.
Příprava: Naváží se 3,8542 g octanu amonného, převede do 500ml odměrné baňky a doplní vodou (4) po značku.
- 6 Kyselina octová pro HPLC; w = min. 99,7 %; $\rho = 1,049 \text{ g/ml}$.
- 7 Mobilní fáze, (acetonitril : octan amonný) = (90 : 10).
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se pipetuje 100 ml octanu amonného (5), doplní acetonitrilem (3) po značku a po úpravě pH na 4,5 pomocí kyseliny octové (6) se roztok vloží na 15 min do ultrazvukové lázně pro odstranění vzduchu.
- 8 Acetonitril, 50%.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 500 ml vody (4) a doplní se acetonitrilem (3) po značku.
- 9 Acetonitril, 95%.
Příprava: Do 250ml odměrné baňky se nalije 12,5 ml vody (4) a doplní se acetonitrilem (3) po značku.

3.2 Přístroje a pomůcky

- 1 HPLC Waters, detektor Waters 486, autosampler Waters 717 plus, Waters 515 HPLC Pump, Waters in-line degaser
- 2 pH metr , např. WTW pH 526.
- 3 Automatická pipeta (0,05 – 1) ml.
- 4 Centrifuga 5000 ot/min, např. Sigma 2-16K.

- 5 Centrifuga 13000 ot/min.
- 6 Ultrazvuková lázeň.
- 7 Třepačka horizontální.
- 8 Analytické váhy.
- 9 Laboratorní mlýnek, např. Retsch Grindomix GM 200.
- 10 Plastové lahvičky se šroubovacím uzávěrem, 250 ml.
- 11 Plastové uzavíratelné mikrozkmavky, 1,5 ml.

4 Pracovní postup

4.1 Úprava a extrakce vzorku

Vzorek se usuší při 60 °C, pomele na mlýnku a proseje přes síto s velikostí ok 0,5 mm. Na analytických vahách se naváží 0,5 g vzorku a převede do uzavíratelných plastových lahviček o objemu asi 250 ml pomocí 100 ml extrakčního činidla (1). Nádobky se uzavřou a vloží na 5 min do ultrazvukové lázně a pak na 30 min do horizontální třepačky. Vzorek se poté odlije do centrifugační kyvety (podle velikosti kyvety 10 ml až 50 ml) a hrubé nečistoty se odstředí 15 min při 5000 ot/min. Jemné nečistoty se odstraní tak, že přibližně 1,4 ml odstředěného vzorku se pipetuje do 1,5ml plastové uzavíratelné mikrozkmavky a odstředí 5 min při 11000 ot/min. Podle obsahu kyseliny močové ve vzorku se pipetuje (0,2 – 0,5 ml) extraktu do 10ml odměrné baňky a doplní se mobilní fází (7) po značku. Pak se odebere alikvot do 1,5ml plastové uzavíratelné mikrozkmavky a ten se vloží do odstředivky na 5 min při 11000 ot/min. Takto upravený extrakt je možné přelít do vialek a vložit do HPLC.

4.2 Příprava kalibračních standardů

Do 50ml odměrné baňky se automatickou pipetou pipetuje 0,1 ml základního standardu (2) a do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,25; 0,50; 0,75; 1,00) ml základního standardu (2) a baňky se doplní po značku mobilní fází (7). Výsledné koncentrace kyseliny močové v kalibračních standardech jsou (1; 5; 10; 15; 20) mg/l. Před vložením do HPLC se standardy odstředí 5 min při 11000 ot/min.

4.3 Chromatografické podmínky a měření

Průtok mobilní fáze (7) byl nastaven na 2 ml/min, injekce vzorku 40 µl, teplota kolony 30 °C, vlnová délka 285 nm. Byla použita kolona XBridge Amide (150 × 4,6 mm; 3,5 µm; 130Å) a vlastní eluce probíhá za izokratických podmínek. Retenční čas je 6 min a kapacitní faktor 5. Pro oplach jehly se použije acetonitril (9). Po ukončení analýzy se kolona vyplachuje 40-ti kolonovými objemy acetonitrem (8). Kolona se uchovává v acetonitrilu (3). Nastavení chromatografických podmínek bylo odvozeno od aplikačního listu firmy Waters s ohledem na použitou instrumentaci a účel použití.

5 Výpočet

Obsah kyseliny močové se vypočítá z kalibrační závislosti tak, že se sestrojí graf závislosti plochy píku kyseliny močové na koncentraci v daném rozsahu a jednotlivé body jsou proloženy polynomem prvního stupně. Rovnice této křivky se pak použije k výpočtu koncentrace kyseliny močové v extraktech.

Obsah kyseliny močové ve vzorku x v g/kg se vypočítá podle vztahu

$$x = \frac{c \times V_3 \times V_1 \times 10^{-3}}{V_2 \times m}$$

kde

x je koncentrace kyseliny močové ve vzorku (g/kg),

c je koncentrace kyseliny močové v extraktu odečtená z kalibrační závislosti (mg/l),

V_1 je objem použitého extračního činidla (ml)

V_2 je pipetovaný objem extraktu k naředění mobilní fáze (ml),

V_3 je objem baňky, v které byl extrakt naředěn mobilní fází (ml),

m je navážka vzorku (g),

10^{-3} je přepočítávací koeficient z jednotek mg/kg na g/kg, při převodu z mg/kg na hmotnostní procenta (hm.%) je třeba použít koeficient 10^{-4}

Obsah cizí organické hmoty ve vzorku z % se vypočítá podle vztahu

$$z = \frac{x \times 100}{a}$$

kde

Z je obsah cizí organické hmoty (%),

x je koncentrace kyseliny močové ve vzorku (g/kg),

a je koncentrace kyseliny močové v čistém slepičím trusu $a = 100$ (g/kg).

Koeficient a byl určen pomocí analýzy čistého slepičího trusu a má význam předpokládané maximální koncentrace kyseliny močové v organickém materiálu. Analýzou bylo zjištěno, že slepičí trus obsahuje (60 – 90) g/kg kyseliny močové a tyto hodnoty byly poté zaokrouhleny na 100 g/kg a použity k výpočtu obsahu cizí hmoty ve vzorku. Rozhodovací kritérium maximálně povolených 15 % cizí organické hmoty tedy odpovídá obsahu 15 g/kg kyseliny močové ve vzorku hnojiva.

6 Validace

Validace byla provedena pomocí softwaru EffiValidation 3.0 a byly testovány tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, mez stanovitelnosti, citlivost a nejistota.

Opakovatelnost

Výpočet opakovatelnosti byl proveden krokem – Opakovatelnost z paralelních měření. K výpočtu bylo použito 20 paralelních stanovení a byla zvolena jedna koncentrační hladina.

Tabulka 1. Opakovatelnost.

Průměr měření (hm. %)	Opakovatelnost (hm. %)	Rel. opakovatelnost (%)	n
3,777	0,102	2,703	20

Jako praktická hodnota byla zvolena 5% relativní opakovatelnost.

Správnost

Výpočet správnosti byl proveden krokem – Správnost velký koncentrační rozsah – slepý pokus není k dispozici t-test. Správnost byla testována na reálném vzorku s nízkou koncentrací analytu, ke kterému byla přidána různá množství kyseliny močové. Pro testování byl vybrán vzorek 166/2013 Lims – hnojiva Plzeň.

Tabulka 2. Správnost.

Úroveň	Popis	Přídavek (mg/l)	Naměřeno (mg/l)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg/l)	Interval spolehlivosti	Hypotéza
1	166	0,000	0,000	0,0	0,0046	0,0	Přijata
2	166	2,500	2,520	100,8	0,0200	2,487 - 2,553	Přijata
3	166	5,000	5,046	100,9	0,0549	4,957 - 5,134	Přijata
4	166	7,500	7,443	99,2	0,0776	7,318 - 7,567	Přijata
5	166	10,000	10,053	100,5	0,0872	9,913 - 10,193	Přijata

Z výsledků vyplývá, že metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Linearita

Linearita byla vyhodnocena krokem – Linearita korelační a QC koeficient. Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci (1; 5; 10; 15; 20) mg/l kyseliny močové. Hodnota korelačního koeficientu R pro uvedený rozsah byla 0,999981 a hodnota QC koeficientu byla 0,46 %, přičemž linearita se považuje za prokázanou, když $R > 0,99$ a $QC < 5 \%$.

Mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla určena krokem – Meze: ze signálu slepého pokusu v chromatografii. Z chromatogramu slepého pokusu bylo určeno kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku kyseliny močové. Pro výpočet byla dále odečtena směrnice kalibrační křivky. Bylo vypočteno, že mez detekce je 0,028 mg/l a mez stanovitelnosti 0,093 mg/l. Jako praktická mez stanovitelnosti byla zvolena hodnota 0,2 mg/l, což po přepočtu činí 0,8 g/kg.

Citlivost

Citlivost byla určena krokem – Citlivost z kalibrační přímky. K výpočtu byly použity kalibrační roztoky 1; 5; 10; 15; 20 mg/l a jejich signály. Hodnota citlivosti byl stanovena na 73060 jednotek signálu.

Nejistota

Nejistota byla určena krokem – Nejistoty: z přesnosti – paralelní měření k dispozici. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor rozšíření 2. K výpočtu bylo použito 20 paralelních stanovení.

Tabulka 3. Nejistota.

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota (hm. %)	3,777
Standardní nejistota (hm. %)	0,102
Relativní standardní nejistota (%)	2,703
Faktor pokrytí	2
Rozšířená standardní nejistota (hm. %)	0,204
Relativní rozšířená nejistota (%)	5,405

Jako praktická hodnota relativní rozšířené nejistoty byla zvolena hodnota 10 %.

7 Závěr

Metoda poskytuje statisticky správné a přesné výsledky a je vhodná ke kvantitativnímu stanovení kyseliny močové v organických hnojivech.

8 Literatura

1. XBridge Amide HPLC columns – application notebook, firma Waters.
2. Žalmanová, Rypl: Závěrečná zpráva vývojového úkolu A1/2010 – Využití HPLC pro stanovení kyseliny močové.
3. M. A. Eiteman, R. M. Gordillo, M. L. Cabrera, Analysis of oxonic acid, uric acid, creatine, allantoin, xanthine and hypoxanthine in poultry litter by reverse phase HPLC, Frensenius J Anal Chem (1994) 348: 680 – 683.
4. B. Pekić, B. Slavica, Z. Zeković, High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Uric Acid in Feces of Egg-Laying Hens, Chromatographia Vol. 27, No. 9/10, May 1989, 467 – 468.
5. Noel S. Quiming, Nerissa L. Denola, Yoshihiro Saito, Alicia P. Catabay, Kiyokatsu Jinno, Chromatographic Behavior of Uric Acid and Methyl Uric Acids on a Diol Column in HILIC, Chromatographia 2008, 672 April (No. 7/8) 507 – 515.
6. Uživatelská příručka EffiValidation 3.
7. Příručka řešených příkladů EffiValidation 3.

Ověření postupu analýzy hnojiv metodou FAAS a ICP-OES

Eva Urbánková, Eva Niedobová, Jiří Zbírál

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

1 Souhrn

Pro ověření postupu analýzy hnojiv metodou plamenové atomové absorpční spektrofotometrie (FAAS) atomové emisní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES) byla použita hnojiva s obsahem mikroelementů pod 10 % i nad 10%. Vzorky byly rozloženy a v mineralizátech byly stanoveny obsahy mědi, manganu, zinku, železa, bóru a molybdenu.

2 Úvod

V současné době se analýzy mikroelementů (ME) v hnojivech provádějí podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 2003/2003, kde jsou popsány v kapitole 9 (obsahy ME < 10 %) a v kapitole 10 (obsahy ME > 10 %). Jedná se o metody již zastaralé (zvláště v kap. 10) nebo zpracované nejednotným způsobem (kap. 9). To je důvodem, proč CEN TC 260, pracovní skupina 7, usiluje o obnovení mandátu pro nové zpracování těchto dvou kapitol Nařízení. Výsledkem by měly být jednoduché a co nejjednodušší postupy, které by obsahovaly stanovení ME metodou FAAS a metodou ICP-OES.

Tato práce se zabývá analýzou hnojiv s obsahem mikroelementů nad 10 % i pod 10 %, a to stanovením Cu, Mn, Zn, Fe metodou FAAS a ICP-OES. Hnojiva byla rozložena dle Metody 10.1 (mikroelementy nad 10 %) a 9.1 (mikroelementy pod 10 %). Mineralizáty byly po vhodném naředění analyzovány metodou FAAS a ICP-OES. U ME s obsahem pod 10 % byl také sledován vliv lanthanu na možné matrix efekty.

Výsledky této práce budou použity pro podporu návrhu nových metod stanovení ME v hnojivech.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 1 Kyselina chlorovodíková, HCl, $c = 6 \text{ mol/l}$.
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3 Destilovaná voda.
- 4 Roztok lanthanu o koncentraci 10 g/l .
- 5 Certifikované standardní roztoky Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, B o koncentraci 1 g/l (Analytika).

3.2 Přístroje a pomůcky

- 1 Spalovací blok s trubicemi a chladiči (MB 442 BH, Mezos, Hradec Králové).
- 2 FAAS (Varian SPECTRAA 300, Varian, Mulgrave, Austrálie).
- 3 ICP-OES (SPECTRO BLUE, Spectro, Kleve, Německo).
- 4 Zařízení pro ultračistou vodu (MilliQ A10 Advantage, Millipore, Molsheim, Francie).
- 5 Plastové lahve.
- 6 Filtry.

3.3 Příprava vzorku

3.3.1 Příprava vzorku hnojiv s obsahem mikroelementů nad 10 %

Do spalovacích trubic se naváží 1 g hnojiva, ovlhčí se malým množstvím vody (3), zalije se 10 ml kyseliny chlorovodíkové (1) a přidá se 50 ml vody (3). Ve spalovacím bloku se uvede k varu a vaří se 30 min . Po vychladnutí se kvantitativně převede do 250 ml odměrné baňky. Po vytemperování se doplní vodou po značku. Poté se filtruje přes vhodný filtr do plastové lahve. Stejným způsobem se připraví slepý pokus.

3.3.2 Příprava vzorků hnojiv s obsahem mikroelementů pod 10 %

Do spalovacích trubic se naváží 10 g hnojiva, ovlhčí se malým množstvím vody, zalije se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (1) a přidá se 50 ml vody (3). Ve spalovacím bloku se uvede k varu a vaří se 30 min . Po vychladnutí se kvantitativně převede do 250 ml odměrné

baňky. Po vytemperování se doplní vodou po značku. Poté se filtruje přes vhodný filtr do plastové láhve. Stejným způsobem se připraví slepý pokus.

3.4 Měření

3.4.1 Měření ICP-OES

Před měřením byly vzorky ředěny tak, aby se výsledné koncentrace analytů pohybovaly v rozmezí kalibrační přímky. Mineralizáty byly ředěny kyselinou chlorovodíkovou (2) tak, aby výsledná koncentrace HCl byla v rozsahu (0,5 – 2,5) mol/l.

Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním základních certifikovaných roztoků (5) a obsahovaly (0, 1, 2, 10 20, 50) mg/l Zn, Cu, Mn, Fe, B, Mo. Koncentrace HCl v kalibračních roztocích byla 0,5 mol/l.

Měřicí podmínky pro optický emisní spektrometr jsou uvedeny v tabulce 1. Vybrané vlnové délky zájmových analytů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 1. Pracovní podmínky ICP-OES.

Plasma power	1550 W
Coolant flow	14,50 l/min
Auxiliary flow	1,00 l/min
Nebulizer flow	1,00 l/min
Peristaltic pump	30 rpm

Tabulka 2. Vlnové délky ICP-OES.

Prvek	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Mo
Vlnová délka (nm)	249,773	324,754	259,941	259,373	213,856	202,095

3.4.2 Měření FAAS

Před měřením byly vzorky ředěny kyselinou chlorovodíkovou (2) tak, aby se výsledná koncentrace analytů pohybovaly v rozmezí kalibrační přímky. Pro korekci případných matrix efektů byl jako vytěšňovací činidlo přidán lanthan (4) tak, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 1 g/l. Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním základních

certifikovaných roztoků (5) a obsahovaly (0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10) mg/l Cu, Mn, Zn a Fe. Do každého bodu kalibrační přímky byl přidán lanthan (4) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 g/l. Výsledná koncentrace HCl byla 0,5 mol/l. Měřicí podmínky pro FAAS a vlnové délky měřených prvků jsou uvedeny v tabulce 3. Obdobným způsobem byl v případě ME s obsahem pod 10 % testován vliv přítomnosti La na jednotlivé prvky. Testován byl přídatek 0, 0.5, 1 a 2 g La/l.

Tabulka 3. Pracovní podmínky FAAS.

Prvek	Vlnová délka (nm)	Proud HKL (mA)	Plamen	Štěrbina (nm)
Fe	248,3 nm	5	acetylen-vzduch	0,2
Cu	324,8 nm	4	acetylen-vzduch	0,5
Zn	213,9 nm	5	acetylen-vzduch	1,0
Mn	279,5 nm	5	acetylen-vzduch	0,2

4 Výsledky a diskuse

4.1 Hnojiva s obsahem ME nad 10 %

Bylo analyzováno 9 vzorků ve dvou paralelních měřeních metodou ICP-OES (každý mineralizát měřen 4 ×) a 8 vzorků metodou FAAS (každý mineralizát měřen 1 ×). Získané průměrné hodnoty pro jednotlivé metody jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka 4. Výsledky analýz vzorků hnojiv s obsahem ME nad 10 %, stonásobné ředění FAAS, stonásobné ředění ICP-OES.

Vzorek	FAAS (mg/l)	FAAS (%)	ICP-OES (mg/l)	ICP-OES (%)	Deklarace (%)
Ferrous Sulphate	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe
	7,85	19,6	7,98	20,0	21,0
Iron Chelate FeEDTA	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe
	5,36	13,4	5,41	13,5	13,0
Zinc Oxide	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn
	29,7	74,3	32,8	81,9	80,0
Zinc Chelate ZnEDTA	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn
	5,68	14,2	6,12	15,3	15,0
Boron Ethanolamine	B	B	B	B	B
			4,16	10,4	10,9
Copper Oxide	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu
	8,67	86,7	8,21	82,1	86,0
Copper Chelate CuEDTA	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu
	5,74	14,4	5,90	14,8	15,0
Manganese Sulphate	Mn	Mn	Mn	Mn	Mn
	12,7	31,8	13,0	32,6	32,0
Manganese Chelate MnEDTA	Mn	Mn	Mn	Mn	Mn
	4,93	12,3	4,87	12,2	13,0

U vzorku „Copper oxide“ za stávajících podmínek nedošlo zcela k rozpuštění a výsledky analýz ukázaly poloviční obsah deklarované hodnoty. Proto byl vzorek mineralizován znovu za stejných podmínek, ale s poloviční navázkou (0,5 g). Poté byl opět změřen a u obou měření (FAAS a ICP-OES) výsledek odpovídal dané deklaraci.

U 8 vzorků bylo provedeno srovnání obou metod s využitím t-testu, viz tabulka 5, které potvrdilo shodné výsledky u obou metod u vybraného souboru vzorků.

Tabulka 5. Statistické srovnání (t-test, MS EXCEL) pro stanovení ME nad 10 %.

Vzorek	FAAS (%)	σ_{FAAS} (%)	ICP-OES (%)	$\sigma_{ICP-OES}$ (%)	t	$t_{kritické}$
Ferrous Sulphate	19,6	0,54	20,0	0,40	0,701	4,303
Iron Chelate FeEDTA	13,4	0,37	13,5	0,27	2,165	4,303
Zinc Oxide	74,3	2,03	81,9	1,64	4,152	4,303
Zinc Chelate ZnEDTA	14,2	0,39	15,3	0,31	1,092	4,303
Copper Oxide	86,7	2,36	82,1	1,64	0,350	4,303
Copper Chelate CuEDTA	14,4	0,39	14,8	0,30	1,146	4,303
Manganese Sulphate	31,8	0,87	32,6	0,65	3,200	4,303
Manganese Chelate MnEDTA	12,3	0,34	12,2	0,24	0,507	4,303

* $t < t_{kritické}$, výsledky jsou shodné

** $t > t_{kritické}$, výsledky nejsou shodné

4.2 Hnojiva s obsahem mikroprvků pod 10 %

Pro zjištění případných spektrálních interferencí při stanovení Cu, Fe, Mn a Zn v hnojivech byl sledován vliv různé koncentrace La na jejich stanovení. La se používá jako vytěšňovací činidlo, aby nedocházelo ke tvorbě termálně stabilních sloučenin mikroprvků s fosfáty. V tabulkách 6, 7, 8 a 9 jsou uvedeny výsledky stanovení pro jednotlivé koncentrační hladiny La.

Tabulka 6. Vliv La na stanovení Cu metodou FAAS.

	La 0 g/l		La 0.5 g/l		La 1 g/l		La 2 g/l		F	F _{kritické}
Vzorek	Cu		Cu		Cu		Cu			
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%		
AVA PK 50-18	1,980	0,010	2,080	0,010	1,920	0,010	1,930	0,010	1,000	5,987
AVA PK 50-18	2,030	0,010	2,100	0,011	2,020	0,010	1,930	0,010		
NPK 8-13-11 Cererit	1,440	0,007	1,470	0,007	1,480	0,007	1,440	0,007	3,000	5,987
NPK 8-13-11 Cererit	1,470	0,007	1,510	0,008	1,510	0,008	1,460	0,007		
NPK 8-13-11	1,640	0,008	1,680	0,008	1,650	0,008	1,630	0,008	1,000	5,987
NPK 8-13-11	1,620	0,008	1,710	0,009	1,660	0,008	1,620	0,008		

Tabulka 7. Vliv La na stanovení Zn metodou FAAS.

	La 0 g/l		La 0.5 g/l		La 1 g/l		La 2 g/l		F	F _{kritické}
Vzorek	Zn		Zn		Zn		Zn			
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%		
AVA PK 50-18	3,640	0,018	3,760	0,019	3,710	0,019	3,730	0,019	0,356	5,987
AVA PK 50-18	3,740	0,019	3,760	0,019	3,860	0,019	3,760	0,019		
NP 15-20	9,870	0,247	10,32	0,258	10,32	0,258	10,36	0,258	6,787	5,987
NP 15-20	10,37	0,259	10,59	0,265	10,09	0,265	10,61	0,265		
NPK 8-13-11 Cererit	2,740	0,014	2,770	0,014	2,780	0,014	2,780	0,014	0	5,987
NPK 8-13-11 Cererit	2,740	0,014	2,820	0,014	2,850	0,014	2,830	0,014		
NPK 8-13-11	6,60	0,031	6,170	0,031	6,250	0,031	5,840	0,031	7,042	5,987
NPK 8-13-11	6,110	0,031	6,440	0,032	6,240	0,032	6,160	0,032		

Tabulka 8. Vliv La na stanovení Fe metodou FAAS.

	La 0 g/l		La 0.5 g/l		La 1 g/l		La 2 g/l		F	F _{kritické}
Vzorek	Fe		Fe		Fe		Fe			
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%		
AVA PK 50-18	1,27	0,318	1,25	0,313	1,23	0,308	1,27	0,318	0,143	5,987
AVA PK 50-18	1,25	0,313	1,29	0,323	1,25	0,313	1,20	0,300		

Tabulka 9. Vliv La na stanovení Mn metodou FAAS.

	La 0 g/l		La 0.5 g/l		La 1 g/l		La 2 g/l		F	F _{kritické}
Vzorek	Mn		Mn		Mn		Mn			
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%		
AVA PK 50-18	6,230	0,031	6,330	0,032	6,240	0,032	5,960	0,030	0,158	5,987
AVA PK 50-18	6,350	0,032	6,290	0,031	6,160	0,031	6,050	0,030		

Výsledky byly statisticky zpracovány analýzou rozptylu (ANOVA, MS EXCEL) a bylo zjištěno, že vliv La je statisticky nevýznamný ($F < F_{\text{kritické}}$) a tudíž nebyl prokázán vliv matrice na stanovení sledovaných mikroprvků. U vzorku NPK 8-13-11 a NP 15-20 při stanovení Zn byly hodnoty F vyšší než hodnota kritická a to z důvodu, že data nemají normální rozložení. Při posuzování výsledků v rámci nejistoty stanovení (5,57 %), která byla vypočítána z paralelních stanovení, se výsledky shodují. Vzhledem k tomu, že nebyl pozorován zásadní vliv matrice na stanovení Cu, Fe, Zn a Mn, bylo provedeno srovnání výsledků metod FAAS a ICP-OES pro koncentrační úroveň La 1g/l, jak je uvedeno v připravované normě CEN (3). Byly analyzovány 4 vzorky ve dvou paralelních metodou ICP-OES (každý mineralizát měřen 4 ×) a metodou FAAS (každý mineralizát měřen 1 ×). Výsledky (průměrné hodnoty ze dvou paralelních stanovení) jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10. Výsledky analýz vzorků hnojiv s obsahem ME pod 10 %.

Vzorek	FAAS	FAAS	ICP-OES	ICP-OES	Deklarace	FAAS ředění	ICP-OES ředění
	mg.l ⁻¹	%	mg.l ⁻¹	%	%		
AVA PK 50-18	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe	100 ×	10 ×
	1,24	0,311	12,4	0,310	0,3		
AVA PK 50-18	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu	2 ×	2 ×
	1,97	0,010	2,27	0,012	0,010		
NPK 8-13- 11 Cererit	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu	2 ×	2 ×
	1,50	0,008	1,43	0,007	0,004		
NPK 8-13- 11	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu	2 ×	2 ×
	1,66	0,008	1,66	0,008	0,008		
AVA PK 50-18	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn	2 ×	2 ×
	3,79	0,019	3,91	0,020	0,018		
NPK 8-13- 11 Cererit	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn	2 ×	2 ×
	2,82	0,014	2,79	0,014	0,08		
NPK 8-13- 11	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn	2 ×	2 ×
	6,25	0,032	5,82	0,029	0,030		
NP 15-20	Zn	Zn	Zn	Zn	Zn	10 ×	10 ×
	10,2	0,262	10,6	0,265	0,250		
AVA PK 50-18	B	B	B	B	B	-	10 ×
			21,5	0,538	0,5		
NPK 8-13- 11 Cererit	B	B	B	B	B	-	2 ×
			9,78	0,049	0,03		
NPK 8-13- 11	B	B	B	B	B	-	2 ×
			11,5	0,058	0,056		
AVA PK 50-18	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	2 ×	2 ×
			6,04	0,031	0,032		
NPK 8-13- 11 Cererit	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	2 ×	2 ×
			0,860	0,004	0,005		
NPK 8-13- 11	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	2 ×	2 ×
			0,165	0,001	0,001		
AVA PK 50-18	Mn	Mn	Mn	Mn	Mn	2 ×	2 ×
	6,20	0,032	7,25	0,037	0,025		

Za účelem srovnání obou metod byl opět využit párový t-test, jehož výsledky jsou prezentovány v tabulce 11.

Tabulka 11. Statistické srovnání (t-test, MS EXCEL) pro stanovení mikroprvků pod 10 %.

Vzorek	FAAS	σ_{FAAS}	ICP-OES	$\sigma_{\text{ICP-OES}}$	t	$t_{\text{kritické}}$
	%	%	%	%		
Fe (AVA PK 50-18)	0,311	0,017	0,310	0,016	0,060	4,303
Cu (AVA PK 50-18)	0,010	0,001	0,012	0,0006	1,700	4,303
Cu (NPK 8-13-11 Cererit)	0,008	0,000	0,007	0,0004	1,020	4,303
Cu (NPK 8-13-11)	0,008	0,000	0,008	0,0004	0,358	4,303
Zn (AVA PK 50-18)	0,019	0,001	0,020	0,001	0,436	4,303
Zn (NPK 8-13-11 Cererit)	0,014	0,001	0,014	0,0007	0,267	4,303
Zn (NPK 8-13-11)	0,032	0,002	0,029	0,002	1,633	4,303
Zn (NP 15-20)	0,262	0,014	0,265	0,014	0,248	4,303
Mn (AVA PK 50-18)	0,032	0,002	0,037	0,002	2,427	4,303

* $t < t_{\text{kritické}}$, výsledky jsou shodné

** $t > t_{\text{kritické}}$, výsledky nejsou shodné

Statistickým zpracováním výsledků analýz vzorků hnojiv pod 10% se potvrdila shoda mezi oběma metodami na vybraném souboru vzorků.

5 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit, zda metoda ICP-OES a upravená metoda FAAS pro stanovení ME v hnojivech poskytuje jednak akceptovatelné výsledky stanovení a jednak jestli jsou metody z hlediska výsledků shodné. Analýzou 8 vzorků hnojiv nad 10% a 4 vzorků hnojiv pod 10% bylo prokázáno, že obě metody poskytují u vybraných vzorků hnojiv shodné výsledky. U vzorků hnojiv s obsahem mikroprvků pod 10% byl sledován případný vliv matrice při analýze metodou FAAS, který ovšem nebyl u vybraných vzorků prokázán. Pro tento účel byly analyzovány mineralizáty s přidavkem různých koncentrací lanthanu. Přesto pro případnou korekci matričních efektů byla doporučena koncentrace La 1 g/l. Pro potlačení možných matrix efektů při analýze metodou ICP-OES je vhodné použít vyšší

výkon plazmatu (1500 W a vyšší). Oba typy hnojiv je možno analyzovat s využitím jedné sady kalibračních standardů (jak u metody FAAS, tak u metody ICP-OES), po příslušném naředění tak, aby se sledované obsahy pohybovaly v rozsahu kalibračních standardů.

6 Literatura

- 1 Nařízení Evropského Parlamentu a rady (ES) č. 2003/2003, Metoda 10.1.
- 2 Nařízení Evropského Parlamentu a rady (ES) č. 2003/2003, Metoda 9.1.
- 3 CEN – TC 260, WG 7 Doc. N209: Proposal for a combined FAAS method to detect micronutrients in fertilizers.

Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus*

(*Enterococcus faecium*) podle ČSN EN 15788

MVDr. Kateřina Staňková

Kateřina Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

1 Úvod

Probiotika jsou živé kultury mikroorganismů, které jsou přidávány do potravin a krmiv.

Mezi nejčastěji přidávané mikroorganismy patří bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Bacillus*. Mechanismus účinku probiotik není přesně znám. Předpokládá se, že zmíněné mikroorganismy jednak přímo, jednak prostřednictvím své metabolické aktivity, zlepšují mikrobiální osídlení trávicího traktu (znemožňují kolonizaci trávicího traktu patogenními mikroorganismy), zvyšují účinnost enzymů ve střevě a stimulují imunitní systém. U prasat a drůbeže je znám i jejich vliv na zvýšení užitkovosti.

Enterococcus faecium je komenzální mikroorganismus běžně se vyskytující v trávicím traktu člověka a většiny zvířat. Jedná se o gram pozitivní, fakultativně anaerobní bakterii tvořící kolonie na agaru se žlučí, eskulinem a azidem sodným.

2 Cíl

Na oddělení mikrobiologie a biochemie ÚKZÚZ se pro stanovení bakterií rodu *Enterococcus* v rámci cílené kontroly přítomnosti doplňkových látek v krmivech dosud používala metoda Stanovení obsahu bakterií rodu *Enterococcus* – obecný postup (postup č. 10110.1). Cílem práce bylo zavést metodu dle ČSN EN 15788 Krmiva – Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus*. Tato metoda byla vyvinuta pro stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* v doplňkových látkách, premixech a krmivech.

3 Princip

Základem této metody je homogenizace vzorku, příprava výchozí suspenze, ředící řady a inokulace roztěrem na povrch ploten (Petriho misky) se selektivním médiem. Plotny se inkubují v aerobních podmínkách po dobu (24 ± 2) h při teplotě (37 ± 1) °C. Narostlé kolonie se spočítají a vyjádří se jako kolonie tvořící jednotky (CFU) v g nebo kg krmiva.

4 Pracovní postup

4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Analytické váhy.
- 4.1.2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 4.1.3 pH metr.
- 4.1.4 Magnetické míchadlo.
- 4.1.5 Přístroj ke sterilizaci teplem - autokláv nebo tlakový hrnec.
- 4.1.6 Sušárna.
- 4.1.7 Termostat s teplotou udržovanou na (37 ± 1) °C.
- 4.1.8 Vodní lázeň.
- 4.1.9 Vortex.
- 4.1.10 Sterilní laboratorní sklo – lahve s uzávěrem 0,5 l, Erlenmeyerovy baňky 250 ml, odměrné baňky, kádinky, zkumavky, Petriho misky.
- 4.1.11 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (100 – 1000) µl a sterilní špičky bez filtru.
- 4.1.12 Jednorázové plastové nebo sterilní skleněné hokejky.
- 4.1.13 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál na odpad, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí dle charakteru materiálu buď tepelně v sušárně 1 h při $(115 - 120)$ °C, v autoklávu 15 min při (121 ± 1) °C nebo chemicky, např. 70% etanolem, přípravkem Savo, apod.

4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie čistoty p. a.

4.2.1 Základní ředící roztok pro přípravu výchozí suspenze

Chlorid sodný NaCl	8 g
Chlorid draselný KCl	0,2 g
Hydrogenfosforečnan sodný Na_2HPO_4	1,15 g
Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4	0,2 g
(re)destilovaná voda	

Příprava: Uvedené chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě. pH se upraví na hodnotu $(7,3 \pm 0,2)$ a doplní v odměrné baňce do objemu 1000 ml. Takto připravený roztok se sterilizuje 15 min v autoklávu při $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu.

4.2.2 Ředící roztok pro přípravu série ředění

Peptonová voda

Bakteriologický pepton	1 g
Chlorid sodný NaCl	8,5 g
(re)destilovaná voda	

Příprava: Uvedené chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě. pH se upraví na hodnotu $(7,0 \pm 0,2)$ a doplní v odměrné baňce do objemu 1000 ml. Takto připravený roztok se sterilizuje 15 min v autoklávu při $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu.

4.2.3 Kultivační půda

Půda se žlučí, eskulinem a azidem

Casein peptone	17 g
Meat peptone typP	3 g
Kvasniční extrakt	5 g
Žluč (degydratovaná)	10 g
Chlorid sodný	5 g
Aesculin	1 g
Citronan železito-amonný	0,5 g
Azid sodný	0,25 g
Agar	13,5 g
(re)destilovaná voda	

Příprava: Uvedené chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě. pH se upraví na hodnotu $(7,1 \pm 0,2)$ a doplní do objemu 1000 ml. Takto připravený roztok se sterilizuje 15 min v autoklávu při $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Zchladí se ve vodní lázni na teplotu $(48 \pm 1) ^\circ\text{C}$ a po 20 ml se nalévá do Petriho misek. Agar v miskách se nechá ztuhnout v termostatu 12 h nebo přes noc při $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Misky s kultivační půdou se mohou skladovat 2 týdny při $4 ^\circ\text{C}$. Před použitím se vytemperují na laboratorní teplotu.

4.2.4 Ostatní potřebné chemikálie

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

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí v (re)destilované vodě a doplní se na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

Kyselina iminodiodiová (IDA).

(re)destilovaná voda.

Denaturovaný 70% etanol.

5 Materiál

Pro zavedení nové metody bylo použito pět vzorků dodaných do laboratoře k analýze.

1. Vzorek č. 1112/2011 – kompletní krmná směs pro odchov telat s deklarovaným množstvím bakterií *Enterococcus faecium* $1,06 \times 10^9 \text{ CFU}$ v 1 kg krmiva.
2. Vzorek č. 1113/2011 – kompletní krmná směs pro telata s deklarovaným množstvím bakterií *Enterococcus faecium* $(0,8 - 6,6) \times 10^9 \text{ CFU}$ v 1 kg krmiva.
3. Vzorek č. 787/2012 – premix pro prasata, s deklarovaným množstvím mědi 7500 mg/kg (skutečné množství zjištěné analýzou laboratoří RO 8133 mg/kg), s deklarovaným množstvím zinku 45000 mg/kg (skutečné množství zjištěné analýzou RO 43700 mg/kg) a s deklarovaným množstvím bakterií *Enterococcus faecium* $150 \times 10^9 \text{ CFU}$ v 1 kg krmiva.
4. Vzorek s laboratorním číslem 1583/2012 – premix pro prasata, s deklarovaným množstvím mědi 5000 mg/kg (skutečné množství zjištěné analýzou laboratoří RO 5450 mg/kg), s deklarovaným množstvím zinku 35000 mg/kg (skutečné množství zjištěné analýzou RO 33290 mg/kg) a s deklarovaným množstvím bakterií *Enterococcus faecium* $167 \times 10^9 \text{ CFU}$ v 1 kg krmiva.

5. Vzorek s laboratorním číslem 1584/2012 – minerální krmivo pro prasata, s deklarovaným množstvím mědi 4500 mg/kg (skutečné množství zjištěné analýzou laboratoří RO 4330 mg/kg), neobsahující zinek a s deklarovaným množstvím bakterií *Enterococcus faecium* $16,7 \times 10^9$ CFU v 1 kg krmiva.

6 Pracovní postup

Uvaří se a vysterylizuje se agar se žlučí, eskulinem a azidem.

Vzorky se připravují ve třech paralelních navážkách. Naváží se $(20 \pm 0,1)$ g testovaného vzorku a přidá se $(180 \pm 0,1)$ ml ředícího roztoku pro přípravu výchozí suspenze (4.2.1). Doporučuje se zkontrolovat pH výchozí suspenze a upravit je na hodnotu $(7,3 - 8,1)$. K vzorkům obsahujícím měď (nad 200 mg/kg krmiva) případně zinek (není uvedeno množství) se přidá kyselina iminodioctová (chelatační činidlo). Takto připravené vzorky se 3 min intenzivně míchají na míchadle. Poté se nechají 30 min stát. Nakonec se opět intenzivně míchají 2 min na míchadle. Tímto postupem se získá základní ředění 10^{-1} .

Podle deklarovaného obsahu bakterií *Enterococcus faecim* ve vzorku se připraví ředící řada – série zkumavek s 9 ml peptonové vody (4.2.2), dále pepton. 1 ml výchozí suspenze 10^{-1} se přenese do zkumavky s peptonem. Vzniklé ředění je 10^{-2} . Tato směs se řádně promíchá na vortexu a přenese se do další zkumavky obsahující pepton. Postup se opakuje, dokud se nezískají dvě po sobě jdoucí ředění vhodná pro inokulaci a inkubaci.

Z každé vybrané zkumavky se odebere 0,1 ml vzorku a přenese se na Petriho misku s agarem. Inokulum se rozetře sterilní hokejkou rovnoměrně a co nejrychleji po povrchu půdy.

Naočkované misky se převrátí dnem vzhůru a vloží se do termostatu. Misky se inkubují (24 ± 2) h při (37 ± 1) °C. Poté se narostlé kolonie spočítají.

V případě, že v jednom nebo v obou po sobě jdoucích ředěních nenarostou žádné kolonie bakterií rodu *Enterococcus* nebo naroste kolonií více než 250, zopakuje se analýza vzorku a zvolí se vhodnější ředění.

Počítání kolonií

Pro výpočet se použijí misky s nejvíce 250 koloniemi ve dvou po sobě jdoucích ředěních.

Kolonie narostlé na miskách jsou bíle zbarvené, neprůsvitné, s lesklým povrchem, okrouhlého tvaru, celokrajné, konvexní nebo kuželovitého profilu. Jejich velikost je v rozmezí $(1 - 2)$ mm. V okolí kolonií je kultivační půda zbarvená tmavohnědě v důsledku hydrolýzy eskulinu (Obr. 1).



Obr. 1. Petriho miska s bakteriemi *Enterococcus faecium*.

Celkový počet mikroorganismů N na g vzorku se vypočte podle vztahu

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

ΣC součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách,

V objem inokula aplikovaného na misku v ml,

n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,

d faktor prvního pro výpočet použitého ředění,

Výsledek se vyjádří jako celkový počet mikroorganismů na g nebo kg vzorku jako číslo násobené 10^9 .

6.1 Výsledky a diskuse

Vzorky kompletních krmných směsí bez obsahu mědi

Provedly se dvě na sobě nezávislé analýzy dvou vzorků kompletní mléčné krmné směsi pro odchov telat vždy ve třech paralelních navážkách. Podle předpokládaného množství obsahu bakterií *Enterococcus faecium* se pro inokulaci a inkubaci zvolila ředění 10^{-3} a 10^{-4} u vzorku č. 1112/2011 a 10^{-4} a 10^{-5} u vzorku č. 1113/2011. Po 24h inkubaci ploten při $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ se spočítaly narostlé kolonie na miskách (Obr. 1). Počty narostlých kolonií a z nich vypočítané celkové počty mikroorganismů N na kilogram vzorku jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 1 a Tabulka2.).

Tabulka 1. Výsledky dvou na sobě nezávislých analýz vzorku 1112/2011 (37°C , 24 h).

	počet kolonií ředění 10^{-3}	počet kolonií ředění 10^{-4}	N (CFU v 1 kg)
1	156	11	$1,52 \times 10^9$
	101	11	$1,02 \times 10^9$
	115	10	$1,14 \times 10^9$
2	104	20	$1,13 \times 10^9$
	100	14	$1,04 \times 10^9$
	110	16	$1,15 \times 10^9$

Tabulka 2. Výsledky dvou na sobě nezávislých analýz vzorku 1113/2011 (37°C , 24 h).

	počet kolonií ředění 10^{-4}	počet kolonií ředění 10^{-5}	N (CFU v 1 kg)
1	33	7	$3,64 \times 10^9$
	41	8	$4,46 \times 10^9$
	31	4	$3,18 \times 10^9$
2	32	2	$3,09 \times 10^9$
	28	4	$3,09 \times 10^9$
	30	6	$3,27 \times 10^9$

Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že ačkoli proběhly dvě na sobě nezávislé analýzy, počet kolonií narostlých na miskách v obou dvou ředěních a celkový počet mikroorganismů N z nich určený jsou přibližně shodné. Výsledky vzorků č. 1112/11 a 1113/11 odpovídají

deklarované hodnotě.

Pro mikrobiologické analýzy je důležité, aby se paralelní stanovení shodovala v řádu. Všechny analýzy vzorků 1112/2011 a 1113/2011 ukázaly, že tento požadavek byl splněn.

Vzorky premixů a minerálního krmiva s obsahem mědi případně zinku

Byly otestovány celkem tři vzorky s obsahem mědi a provedeno několik experimentů:

- Testování přidaného množství kyseliny iminodiotové ke vzorku, a to (100, 200, 250, 300 a 350) mg na navážku vzorku.
- Zředění vzorků pšeničnou moukou: 2×, 3×, 4×, 5×, 10×, 20×.
- Upuštění od doporučení normy ČSN EN 15788, a to od úpravy pH základního ředění vzorku na pH (7,3 – 8,1), kdy bylo třeba přidat velké množství NaOH a tím se změnilo počáteční ředění z 10^{-1} na ředění neurčité.
- Snížení navážky vzorku a změna množství základního ředícího roztoku pro přípravu výchozí suspenze, a to z 20 g + 180 ml (jak uvádí norma ČSN EN 15788) na 1g + 100 ml (dle postupu 10110.1).
- Změna inokulace vzorku: místo roztěru 0,1 ml inokula na žluč-eskulinovou půdu na zalití 1 ml inokula touto půdou, a to z důvodu, že *Enterococcus faecium* je fakultativně anaerobní bakterie a lépe roste při mírném nedostatku kyslíku.

Vzorek 787/2012

U tohoto vzorku bylo provedeno 6 experimentů:

1. Přídavek kyseliny iminodiotové v množství (100; 200; 500) mg do 180 ml základního ředícího roztoku, navážka 20 g, úprava pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě roztěrem, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci byl nárůst kolonií *E. faecium* nulový. Výsledky viz Tabulka 3.

Tabulka 3. Výsledky 1. experimentu u vzorku č. 787/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	CFU/kg $\times 10^9$
100	0	0	0	-
	0	0	0	-
	0	0	0	-
200	0	0	0	-
	0	0	0	-
	0	0	0	-
500	0	0	0	-
	0	0	0	-
	0	0	0	-

2. Ředění vzorku moukou, navážka 20 g, přidání 100 mg kyseliny iminodiotové do základního ředícího roztoku (180 ml), úprava pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě roztěrem, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci byl nárůst kolonií *E. faecium* nulový. Výsledky viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Výsledky 2. experimentu u vzorku č. 787/2012.

Ředění premixu	IDA (mg)	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	CFU/kg $\times 10^9$
2 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
3 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
4 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
10 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	1	0	-

3. Ředění vzorku moukou, navážka 20 g, přidání 100 mg kyseliny iminodiotové do základního ředícího roztoku (180 ml), bez úpravy pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě roztěrem, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci došlo k nízkému nárůstu kolonií bakterie *E. faecium* u dvacetinásobného zředění vzorku hladkou moukou a přidáním 100 mg kyseliny iminodiotové. Počet CFU nebyl z důvodu nízkého počtu bakterií stanoven. Výsledky viz Tabulka 5.

Tabulka 5 Výsledky 3. experimentu u vzorku č. 787/2012.

Ředění premixu	IDA (mg)	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	CFU/kg $\times 10^9$
5 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
10 ×	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
	100	0	0	0	-
20 ×	100	4	6	2	-
	100	0	8	0	-
	100	0	0	0	-

4. Snížení navážky na 1 g, přidání kyseliny iminodiotové v množství (50; 100; 150; 200) mg přímo ke vzorku, zalití 100 ml základního ředícího roztoku, bez úpravy pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě roztěrem, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci došlo k mírnému nárůstu kolonií bakterie *E. faecium* u vzorků, do kterých bylo přidáno 150 mg a 200 mg kyseliny iminodiotové. Počet CFU nebyl stanoven, protože narostl velmi nízký počet kolonií. Výsledky viz Tabulka 6.

Tabulka 6. Výsledky 4. experimentu u vzorku č. 787/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	CFU/kg $\times 10^9$
50	0	0	0	-
	0	0	0	-
	0	0	0	-
100	0	0	0	-
	0	0	0	-
	0	0	0	-
150	1	3	1	-
	0	1	0	-
	0	0	0	-
200	1	17	1	-
	2	8	0	-
	0	0	0	-

5. Navážka vzorku 1 g, přidání kyseliny iminodiotové v množství (100; 150; 200; 250; 300) mg přímo ke vzorku, zalití 100 ml základního ředícího roztoku, bez úpravy pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě zalitím, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci došlo k nárůstu kolonií bakterie *E. faecium*. Při tomto způsobu kultivace se jevil jako dostatečný přídavek 250 mg kyseliny iminodiotové. Počet CFU nebyl stanoven, protože po sobě jdoucí ředění se shodují, místo toho, aby se od sebe 10 × lišily. Výsledky viz Tabulka 7.

Tabulka 7. Výsledky 5. experimentu u vzorku č. 787/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	CFU/kg $\times 10^9$
100	0	0	-
	0	0	-
	1	0	-
150	23	26	-
	34	25	-
	36	22	-
200	166	311	-
	200	315	-
	172	> 300	-
250	> 300	240	-
	> 300	243	-
	> 300	241	-
300	> 300	> 300	-
	> 300	> 300	-
	> 300	> 300	-

6. Navážka vzorku 1 g, přidání kyseliny iminodiotové v množství (100; 150; 200; 250; 300) mg přímo ke vzorku, zalití 100 ml základního ředicího roztoku, bez úpravy pH, inokulace na žluč-eskulinové půdě roztěrem, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci došlo k nárůstu kolonií bakterie *E. faecium* u všech vzorků. Jako nejvhodnější se jeví přidání 300 mg kyseliny iminodiotové. Výsledky viz tabulka 8.

Tabulka 8. Výsledky 6. experimentu u vzorku č. 787/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	Ředění 10^{-5}	CFU/kg $\times 10^9$
250	75	-	-	-
	82	-	-	-
	90	-	-	-
300	> 300	110	6	1,05
	> 300	301	34	3,05
	> 300	368	54	4,02
350	> 300	46	4	0,5
	> 300	123	8	1,2
	> 300	160	10	1,5

Celkový počet *N* kolonií tvořících jednotek (CFU) na kilogram krmiva tohoto vzorku vyšel mnohonásobně nižší, než byla jeho deklarovaná hodnota, která ale nemusí odpovídat skutečnosti. Protože byl tento vzorek staršího data a k dispozici byly dva novější vzorky obsahující měď, rozhodla se je laboratoř otestovat.

Vybraly se postupy, které dávaly u vzorku 787/2012 uspokojující výsledky: navážka 1 g, přidání 100 ml základního ředícího roztoku, přidání (200; 250; 300) mg kyseliny iminodiotové, bez úpravy pH, zalití inokula půdou a kultivace 24 h při 37 °C.

Vzorek 1583/2012

U vzorku 1583/2012 byly provedeny dva experimenty:

1. Navážka 1 g, 100 ml základního ředícího roztoku, (200; 250; 300) mg kyseliny iminodiotové (IDA), bez úpravy pH, zalitím inokula žluč-eskulinovou půdou, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci došlo k nárůstu kolonií bakterie *E. faecium* u všech vzorků, ale s výsledkem několikanásobně nižším, než byla deklarovaná hodnota. Výsledky viz Tabulka 9.

Tabulka 9. Výsledky 1. experimentu u vzorku č. 1583/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-1}	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	Ředění 10^{-5}	Ředění 10^{-6}	CFU/kg $\times 10^9$
200	> 300	> 300	189	78	26	1	9,45
	> 300	> 300	196	62	28	0	8,2
	> 300	> 300	182	80	33	4	10,3
250	> 300	> 300	197	46	6	0	4,7
	> 300	> 300	206	41	2	0	3,9
	> 300	> 300	230	29	1	1	2,7
300	> 300	> 300	289	39	10	1	4,5
	> 300	> 300	301	54	2	2	5,1
	> 300	> 300	305	31	2	3	3,0

2. Ředění vzorku moukou $20 \times$, navážka 20 g zředěného vzorku (jak to odpovídá normě ČSN EN 15788), 180 ml základního ředícího roztoku, přidání (200; 250; 300) mg kyseliny iminodiotové, bez úpravy pH, inokulace zalitím, kultivace 24 h při 37 °C.

Po 24h kultivaci při 37 °C byly odečteny Petriho misky s narostlými koloniemi bakterie *E. faecium*. Výsledný počet CFU se shoduje v paralelních stanoveních, ale liší se od deklarované hodnoty (skutečné množství *Enterococcus faecium* nemusí odpovídat deklarované hodnotě). Nejlépe se jeví použití 200 mg a 250 mg kyseliny iminodiotové. Výsledky viz Tabulka 10.

Tabulka 10. Výsledky 2. experimentu u vzorku č. 1583/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-1}	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	Ředění 10^{-5}	Ředění 10^{-6}	CFU/kg $\times 10^9$
200	> 300	> 300	> 300	> 300	39	4	78,2
	> 300	> 300	> 300	> 300	41	5	83,6
	> 300	> 300	> 300	> 300	35	6	74,5
250	> 300	> 300	> 300	> 300	44	9	96,4
	> 300	> 300	> 300	> 300	50	7	103,6
	> 300	> 300	> 300	> 300	46	6	94,5
300	> 300	> 300	> 300	170	19	4	41,8
	> 300	> 300	> 300	153	17	2	34,5
	> 300	> 300	> 300	161	21	3	43,6

Vzorek 1584/2012

U minerálního krmiva 1584/2012 byl proveden pouze jeden experiment:

Snížení navážky na 1 g a přidání 100 ml ředícího roztoku pro základní ředění (výchozí ředění je tudíž 10^{-2}), přidání (200; 250; 300) mg kyseliny iminodiotové k základnímu ředění, bez úpravy pH základního ředění a zalití inokula žluč-eskulinovou půdou.

Po 24h kultivaci při 37 °C byly odečteny Petriho misky s narostlými koloniemi bakterie *E. faecium*. Výsledný počet CFU na kg minerálního krmiva byl ve všech paralelních stanoveních obdobný a nelišil se od deklarované hodnoty, v podstatě ji mírně převyšoval. Vyhovovalo použití všech tří množství kyseliny iminodiotové k navážce 1 g vzorku. Výsledky viz Tabulka 11.

Tabulka 11. Výsledky experimentu u vzorku č. 1584/2012.

IDA (mg)	Ředění 10^{-2}	Ředění 10^{-3}	Ředění 10^{-4}	Ředění 10^{-5}	Ředění 10^{-6}	CFU/kg $\times 10^9$
200	> 300	> 300	130	26	1	14,2
	> 300	> 300	192	30	4	20,2
	> 300	> 300	173	16	4	17,2
250	> 300	> 300	127	15	2	12,9
	> 300	> 300	115	22	0	12,5
	> 300	> 300	124	24	3	13,5
300	> 300	> 300	179	21	1	18,2
	> 300	> 300	216	20	2	21,5
	> 300	> 300	217	9	3	20,5

Při stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* se postupovalo podle normy ČSN EN 15788. Z poznámky uvedené v normě, z předchozí metody používané laboratoří (č. 10110.1) i z výše uvedených výsledků je zřejmé, že stanovení těchto bakterií komplikuje přítomnost mědi (příp. zinku) ve vzorcích. (V normě se uvádí množství mědi nad 200 mg/kg minerálního krmiva/premixu, v postupu č. 10110.1 se uvádí množství nad 2500 mg/kg minerálního krmiva/premixu). Z tohoto důvodu se provedly experimenty jak na vzorcích bez obsahu mědi, tak s obsahem mědi. Co se týče vzorků s mědí, byly k dispozici vzorky pouze s obsahem mědi nad 4000 mg/kg, a to v jedné minerální krmné směsi a ve dvou premixech, ve kterých se vedle mědi vyskytoval i zinek, který také může stanovení komplikovat.

7 Závěr

Cílem této práce bylo přejít od dosud používané metody pro stanovení počtu probiotických bakterií rodu *Enterococcus* v krmivech (postup ÚKZÚZ č. 10110.1) k postupu podle ČSN EN 15788 Krmiva – Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus*. U vzorků, které neobsahovaly měď, šlo pouze o otestování metody a adaptování podmínkám laboratoře, jelikož jsou v dané normě uvedeny veškeré podmínky pro zpracování vzorku, přípravu výchozí suspenze, ředění, kultivační půdy, inokulaci a inkubaci.

U minerálních krmných směsí s obsahem mědi se experimentálně podařilo upravit přípravu výchozí suspenze tak, aby se mohla provádět analýza. Byla snížena navážka na 1 g vzorku, bylo přidáno 100 ml základního ředícího roztoku pro přípravu výchozí suspenze, 300 mg kyseliny iminodiotové do výchozího ředění, od úpravy pH na hodnotu (7,3 – 8,1) se upustilo a zinokulum bylo zalito kultivačním médiem,

U premixů s vyšším obsahem mědi a zinku se experimentálně nepodařilo upravit přípravu výchozí suspenze vzorku tak, aby se mohly vzorky zařadit do analýz. V optimalizaci postupu přípravy výchozí suspenze pro stanovení bakterií rodu *Enterococcus* v premixech s vyšším obsahem minerálních látek (mědi a zinku) bude laboratoř pokračovat.

8 Literatura

1. prEN 15788, Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*) spp., CEN, **2008**.
2. ČSN EN 15788, *Krmiva – Izolace a stanovení počtu bakterií rodu Enterococcus (E. faecium)*, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, **2010**.
3. JPP - Stanovení obsahu bakterií rodu *Enterococcus* – obecný postup.

Bulletin Národní referenční laboratoře XIX 2015/1

Ročník: XIX, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2015

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 34

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196