

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



## **Bulletin 2021**

**Ročník XXV, číslo 1/2021**

**Brno 2021**

## Obsah

- 1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly *Eisenia andrei***  
Markéta Svobodová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
- 2 Stanovení maskovaných mykotoxinů v krmivech**  
Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 15
- 3 Zavedení kvantitativního stanovení geneticky modifikované sóji MON 87701 pomocí qPCR**  
Jiří Čuhel  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 23
- 4 Stanovení sušiny v kapalných biostimulantech – orientační určení meze stanovitelnosti**  
Václav Poštulka  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava,  
Jaselská 552/16, 746 01 Opava 35

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly *Eisenia andrei*

*Markéta Svobodová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
OdMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
Marketa.svobodova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Potenciální vliv hnojiva či agrochemikálie na půdní ekosystém je vhodné ověřit vzorek pomocí baterie normovaných testů s mikroorganismy, bezobratlými a rostlinami tak, aby byly zahrnuty organismy z různých trofických úrovní potravního řetězce s různými funkcemi v ekosystému. Ekotoxikologické testy jsou schopny zhodnotit celkový efekt hnojiv a agrochemikálií na půdní biotu ve spojení s vlastnostmi prostředí. Velká výhoda půdních ekotoxikologických testů spočívá v zahrnutí vlivu matrice samotné a zohlednění jak reálné biodostupnosti toxických látek pro půdní organismy vzhledem k jejich osudu v půdním prostředí, tak i přítomnosti neanalyzovaných významně toxických látek či synergického účinku jejich směsí. Ekotoxikologické testy jsou proto vhodné právě pro hodnocení komplexních směsí, jako jsou hnojiva a suroviny pro jejich výrobu (organické odpady).

Cílem vývojového úkolu bylo zavedení reprodukčního testu se žížalou *Eisenia andrei* a rozšíření stávající baterie ekotoxikologických testů o zemědělsky velice relevantní organismus, neboť žížaly pohybem v půdě převrstvují a provzdušňují půdu a podílejí se na vytváření humusu. Na artifiční půdě kontaminované referenční látkou (kyselinou boritou) byl proto vypracován postup pro stanovení účinků na reprodukci žížaly *Eisenia andrei*.

## 2 Princip

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu hnojiv a agrochemikálií na schopnost reprodukce jedinců žížaly *Eisenia andrei* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Test probíhá minimálně při 6 koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je přibližně uprostřed sledované koncentrační řady. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 56 dní. Po 28 dnech se odeberou dospělí jedinci a vyhodnotí se jejich mortalita (popřípadě nárůst či úbytek biomasy žížal). Na konci testu po dalších 28 dnech inkubace se vyhodnotí vliv na reprodukci žížal spočítáním juvenilů.

## 5 Materiál

### Přístroje a pomůcky

Skleněné testovací nádoby s perforovanými víčky (1 – 2) l.

Nádoba na míchání umělé půdy (AP).

Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.

Míchačka na umělé půdy.

Síto o jmenovité délce ok 2 mm.

Mrazák -20 °C (-80 °C).

pH metr.

Klimatizovaná místnost či růstová komora vytemperovaná na  $(20 \pm 2)$  °C.

Světelný zdroj (např. bílé zářivky) schopný dodávat konstantní intenzitu světla (400 – 800) lux při řízeném cyklu světlo : tma (16 : 8) hodin nebo (12 : 12) hodin.

Luxmetr.

Předvážky, přesnost 1 g.

Předvážky, přesnost 0,01g.

Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.

Vodní lázeň (50 – 60) °C.

Plastový táč.

Počítadlo.

Dřevěná špejle nebo mikrobiologická klička.

Skleněná tyčinka.

## **Chemikálie**

Artifciální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic  $2 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ , křemenný písek – více než 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk  $0,05 \text{ mm} - 0,2 \text{ mm}$ , kaolín – např. Sigma,  $\text{CaCO}_3$  – úprava pH).

Voda (destilovaná, demineralizovaná, deionizovaná) na ovlhčení.

Chlorid draselný, KCl, roztok KCl  $c = 1 \text{ mol/l}$ . Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní na 1000 ml.

Kyselina boritá,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

## **Testovaný organismus a krmení**

Zásobní kultura žížal *Eisenia andrei*.

Granulovaný kravský hnůj.

# **6 Pracovní postup**

Postup je založen na standardizovaných metodách ISO 11268-2 (2012) a OECD 222 (2016) a upraven pro podmínky použití v laboratořích ÚKZÚZ.

## **4.1 Příprava artificiální půdy (AP)**

Artifciální půda se skládá z křemenného písku, kaolínu, přesáté rašeliny a  $\text{CaCO}_3$ , který slouží k úpravě pH artificiální půdy na hodnotu  $6 \pm 0,5$ . Pro test se žížalami se používá světlá rašelina. Přesátá rašelina se defaunizuje hlubokým zamražením na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  nebo se nechá  $3 \times$  zmraznout při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín a rašelina se smíchají v poměru 69 : 20 : 10. Artifciální půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitánem vápenatým na hodnotu  $6 \pm 0,5$ . Nechá se další 3 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 sušina (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30020.1).

## 4.2 Experimentální uspořádání

Předběžný test: Předběžný test je volitelný a je vhodné ho zvolit v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Předběžný test slouží k zjištění rozsahu koncentrací testované látky ovlivňující žízy, např. 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg a 1000 mg/kg. Předběžný test se provádí bez opakování. Pokud nejsou pozorovány žádné účinky ani při koncentraci 1000 mg/kg, lze definitivní test navrhnout jako test limitní. Definitivní test: Slouží ke zjištění mortality jedinců a vlivu na reprodukci. Při přípravě koncentrační řady se nedoporučuje volit ředící krok vyšší než 2.

Možná uspořádání definitivního testu:

1. Pro NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí účinek) přístup se použije alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC<sub>x</sub> (Effect Concentration – účinná koncentrace, při které se projeví účinek u x % sledované populace) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol. Ředící krok může být proměnlivý: menší v nízkých koncentracích a větší ve vysokých koncentracích.
3. Pro smíšený přístup se použije 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 4 opakováních + 8 kontrol.

Limitní test: Pro případ rychlého zhodnocení testované látky lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v 4 opakováních. Limitní test může být dostačující, pokud v předběžném testu nebyly pozorovány žádné toxické účinky.

Spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu. Na každé opakování je třeba 500 g suché AP. Dále je potřeba přičíst minimálně 2 × 20 g suché půdy na kontrolu pH a aktuální vlhkosti.

## 4.3 Aplikace testované látky

Jeden až tři dny před začátkem testu se do celkového množství AP od každé testované koncentrace aplikuje testovaná látka a zároveň se AP ovlhčí na 50 % WHC.

Množství testovaného přípravku 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 testovaného přípravku. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm<sup>3</sup>.

Ze zásobního roztoku testované látky (= nejvyšší koncentrace) se ředící řadou získají nižší koncentrace testované látky. Podle rozpustnosti testovaných látek se musí lišit jejich aplikace na 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 50 % WHC).
2. Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, se použije těkavé rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Množství testované látky potřebné k dosažení požadované koncentrace se rozpustí v rozpouštědle a smíchá se s částí křemenného písku. Po odpaření rozpouštědla v digestoři (nejlépe přes noc) se kontaminovaný písek důkladně promíchá se zbytkem standardní půdy a dovlhčí se na 50 % WHC. 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 žížaly toxické.
3. Pro látky nerozpustné ve vodě, ani v organických rozpouštědlech, se látka pečlivě vmíchá přímo do testované půdy, nebo se použije směs 10 g jemně mletého industriálního křemenného písku (nebo 10 g suchého půdního substrátu) a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá. Dovlhčí se na 50 % WHC.

Uzavřené nádoby s připravenou kontrolní půdou a půdou s přídavkem testované látky se umístí do růstové komory (vytemperované místnosti) do začátku testu. V den zahájení pokusu se nádoby převážívají a doplní se případný úbytek vody. Připravená AP se rozvažuje po 500 g suché hmotnosti do skleněných testovacích nádob. Půda v testovacích nádobách by neměla být udusaná kvůli volnému pohybu žížal.

#### **4.4 Vlastní postup testu**

##### **Příprava a aplikace žížal do testu**

Žížaly do testu by měla tvořit, pokud možno, homogenní populace z hlediska věku, velikosti a hmotnosti. Do testu je vhodné použít dospělé žížaly 2 měsíce až 1 rok staré, stejné velikosti a s dobře vyvinutým opaskem. Podle normy se doporučuje hmotnost (250 – 600) mg na žížalu.

Žížaly je možné před vlastním testem aklimatizovat 1 den až 7 dní v artificiální půdě s přídavkem ovlhčeného granulovaného kravského hnoje.

Do každé testovací nádoby se na povrch půdy aplikuje 10 žížal. Před aplikací do nádoby se žížaly po 10 jedincích opatrně opláchnou v kohoutkové vodě, osuší se papírovou utěrkou a zvaží se. Po aplikaci žížal se testovací nádoby uzavřou perforovanými víčky, aby byl zajištěn dostatečný přísun vzduchu, zvaží se a umístí se do místnosti (růstové komory) vytemperované na  $(20 \pm 2)$  °C. Intenzita osvětlení se nastaví na (400 – 800) lux při řízeném cyklu světlo: tma (16 : 8) hodin.

### **Přídavek potravy do testu**

Potrava se do testovacích nádob přidává 1 den po založení testu. Jako potrava slouží žížalám granulovaný kravský hnůj. Granulovaný hnůj je potřeba před aplikací do nádob ovlhčit destilovanou vodou a nechat asi hodinu odstát, aby se voda vsákla do granulí. Na ovlhčení 5 g suchého hnoje připadá 6 ml destilované vody. Na začátku testu se aplikuje 11 g vlhkého hnoje na testovací nádobu. Hnůj je nejlepší rovnoměrně aplikovat asi 1 cm pod povrch testovací matrice pomocí skleněné tyčinky, aby se ostrým nástrojem inkubované žížaly neporanily. Potrava se přidává každý týden (11 g vlhkého hnoje na opakování). Naposledy se potrava do testovacích nádob přidává 28. den inkubace po vyjmutí dospělých žížal.

### **Kontrola vlhkosti**

Po aplikaci žížal a potravy do testovacích nádob se nádoby uzavřou a zvaží. Váží se kvůli úbytku vody perforovanými víčky každý týden. Na povrch půdy se nejprve rovnoměrně nakape množství chybějící vody, až poté se pod povrch půdy aplikuje potrava. Současně s doplňováním vody a krmením dochází k provětrání testovacích nádob.

### **Vyhodnocení testu**

Po 28 dnech inkubace se vyhodnotí mortalita dospělých žížal. Testovací nádoby se zvaží kvůli doplnění úbytku vody. Obsah testovací nádoby se opatrně vysype na plastový táč. Dospělé žížaly se opatrně vyberou z půdy a spočítají se a umyjí v kohoutkové vodě, usuší se a následně se zvaží. Do půdy se nakape úbytek vody a půda se po krátkém promíchání vrátí zpět do testovací nádoby. Pod povrch půdy se zahrabe 11 g ovlhčeného hnoje, nádoby se uzavřou perforovanými víčky, převáží se a ponechají se inkubovat dalších 28 dní. Každý týden se kontroluje vlhkost a větrání, ale potrava se již nepřidává.

Po 56 dnech inkubace se hodnotí počet vylíhnutých juvenilních žížal. Juvenilní žížaly je možné z půdy vybrat ručně a spočítat, ale tento proces je časově velmi náročný. Proto se pro extrakci



žížal z půdy doporučuje tepelná extrakce. Je možné ponořit testovací nádoby do vodní lázně o teplotě (50 – 60) °C. Po přibližně (20 – 30) minutách se juvenilní žížaly objeví na povrchu půdy a je možné je opatrně rukou odebrat společně s vrchní vrstvičkou půdy a spočítat. Následně je třeba zkontrolovat vnitřní stěny nádoby a prohrábnout vrstvu půdy pod odebraným žížalami a případné nalezené žížaly započítat.

### **Zpracování výsledků testu**

Pro každou koncentraci zkoušeného vzorku a kontrolu se vypočte procentuální mortalita dospělých žížal, aritmetický průměr počtu juvenilních žížal, směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV).

### **Kritéria validity**

Výsledky se považují za platné, pokud v kontrole platí následující podmínky:

1. Mortalita dospělých jedinců po čtvrtém týdnu by neměla v průměru přesáhnout 10 %.
2. Za předpokladu, že na počátku testu bylo zavedeno 10 dospělých jedinců na jednu nádobu, na konci testu by měl být průměrný počet juvenilů na jednu nádobu vyšší nebo roven 30.
3. Na konci testu by variační koeficient pro reprodukční data v kontrole neměl převyšovat 30 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

### **Statistické vyhodnocení dat**

Data jsou hodnocena podle interního materiálu NRL OdMB pro vyhodnocení ekotoxikologických dat. Statistické a grafické zpracování dat se provádí pomocí statistického softwaru ToxRat 3.3.0 (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Německo). Z reprodukčních dat jsou pomocí statistických postupů vypočteny parametry, které charakterizují toxicitu testované látky. Konečným výsledkem jsou parametry NOEC, LOEC (Lowest observed effect concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek), EC20 a EC50, jsou spočítány dle níže uvedeného schématu:

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

### **Stanovení NOEC a LOEC**

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

## **Stanovení ECx**

1. Jako první se proveden výpočet pomocí 2-, 3- nebo 4- parametrické nelineární regrese s kumulativní distribuční funkcí založenou na normálním, logit nebo Weibullovu rozdělení. V případě splnění podmínek pro více modelů, je zvolen model s nejnižším počtem parametrů dávající uspokojivé výsledky (parsimonní model).
2. V případě, že se nepodaří vytvořit model pomocí nelineární regrese, je pro výpočet použita lineární regrese založená na logit, probit nebo Weibullovu rozdělení.

## **Referenční látka**

Jednou ročně se žížaly testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Doporučenou referenční látkou je kyselina boritá ( $H_3BO_3$ ).  $EC_{50}$  (reprodukce) kyseliny borité by se měla pohybovat přibližně v rozmezí 400 mg až 600 mg  $H_3BO_3$  na kilogram suché půdy.

## **5 Výsledky a diskuze**

Pro ověření metody byly nejprve provedeny tři optimalizační testy s nekontaminovanou uměle vytvořenou půdou. Každý z těchto testů tvořilo 8 kontrol. Žížaly byly před testem tři dny aklimatizovány v uměle vytvořené půdě s přidaným ovlhčeným granulovaným kravským hnojem. U těchto tří testů byla vyhodnocena mortalita dospělých žížal po 28 dnech a počet juvenilních žížal na konci testu (Tabulka 1). Juvenilní žížaly byly u prvních dvou testů ručně vybrány z půdy a spočítány. Tento postup je časově náročný. Pro spočítání juvenilních žížal u třetího testu se použila tepelná extrakce ve vodní lázni. Úspěšnost tepelné extrakce byla ověřena kontrolou zbylé půdy ve všech nádobách po odebrání extrahovaných žížal. Pro všechny následující testy byla proto pro snadnější a rychlejší počítání juvenilních žížal použita tepelná extrakce.

**Tabulka 1. Výsledky optimalizačních testů s nekontaminovanou APOD.**

	Počet dospělců		Počet juvenilů			Validita
	Průměr	SD	Průměr	SD	CV (%)	
<b>KONTROLA 1</b>	10	0	10,6	9,8	92	NE
<b>KONTROLA 2</b>	10	0	34,4	7,4	21	ANO
<b>KONTROLA 3</b>	10	0	31,3	4,9	16	ANO

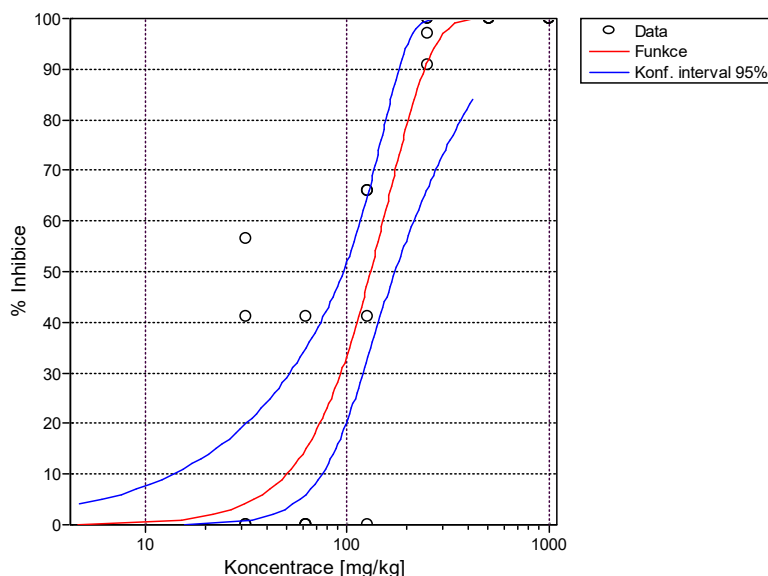
Následně byl proveden test s kyselinou boritou ( $H_3BO_3_1$ ). Podle ISO 11268-2 (2012) by se  $EC_{50}$  kyseliny borité měla pohybovat přibližně v rozmezí (400 – 600) mg/kg suché půdy. Referenční látka byla proto na umělé půdě aplikována v koncentrační řadě 31,25; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 mg/kg suché půdy. Byla založena 4 opakování pro každou koncentraci a 8 kontrol. Vybrané žížaly se před testem tři dny aklimatizovaly v umělé půdě s přidaným ovlhčeným granulovaným kravským hnojem. Byla vyhodnocena mortalita dospělých žížal po 28 dnech a počet juvenilních žížal na konci testu (Tabulka 2). Ze získaných reprodukčních dat byly pomocí programu ToxRat vyhodnoceny ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC,  $EC_{20}$  a  $EC_{50}$  (Tabulka 3). Reprodukční data měla normální rozdělení a nehomogenní rozptyl, proto se pro stanovení NOEC a LOEC použil jednostranný Welchův t-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí. Pro výpočet  $EC_x$  byla použita Weibullova analýza ( $R^2 = 0,390$ ) (Obrázek 1). Nízká hodnota koeficientu determinace byla pravděpodobně způsobena nehomogenním rozptylem reprodukčních dat.

**Tabulka 2. Mortalita dospělců a počet juvenilů u testu s kyselinou boritou  $H_3BO_3_1$ .**

Koncentrace (mg/kg)	Počet dospělců		Počet juvenilů			Validita
	Průměr	SD	Průměr	SD	CV (%)	
<b>0</b>	10	0	32,3	3,6	11	ANO
<b>31,25</b>	10	0	28,5	14,2	50	
<b>62,5</b>	10	0	35,5	11,8	33	
<b>125</b>	10	0	19,0	11,3	60	
<b>250</b>	10	0	1,0	1,4	141	
<b>500</b>	10	0	0,0	0,0	-	
<b>1000</b>	10	0	0,0	0,0	-	

**Tabulka 3. Ekotoxikologické parametry testu H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_1.**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> _1				
Parametr	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	NOEC	LOEC
Hodnota (mg/kg)	73,1	130,4	125	250
Dolní konfidenční limit 95 %	31,5	95,7		
Horní konfidenční limit 95 %	98,6	172,0		



**Obrázek 1. Test H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_1: Křivka dávka-odpověď modelovaná pomocí lineární regrese založené na Weibullovu rozdělení.**

Ačkoliv byla splněna všechna kritéria validity pro test H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_1. Ekotoxikologické parametry ukázaly vyšší citlivost žížal než v referencích a počet juvenilů v kontrolní variantě se pohyboval na hraně validity. Proto byl dále proveden test pro kontrolu vlivu použitého druhu rašeliny (bílá či tmavá) na reprodukci žížal. Do bílé (BRŠ) i tmavé (TRŠ) byla aplikována kyselina boritá v koncentraci 300 mg/kg suché půdy, obě varianty byly zastoupeny ve 4 opakováních. Kontroly pro oba druhy AP měly také 4 opakování. Žížaly byly tentokrát 14 dní před aklimatizací v AP přemístěny na nový chovný substrát, což by mělo indukovat fertilitu žížal. Opět byla vyhodnocena mortalita a počet juvenilů (Tabulka 4).

**Tabulka 4. Rozdíly v mortalitě a reprodukci žížal na základě použitého druhu rašeliny.**

	Počet dospělců		Počet juvenilů			Validita
	Průměr	SD	Průměr	SD	CV (%)	
<b>BRŠ_kontrola</b>	10	0	170,8	47,5	28	ANO
<b>BRŠ_300</b>	10	0	65,3	18,7	29	
<b>TRŠ_kontrola</b>	9,8	0,5	95,0	38,3	40	NE
<b>TRŠ_300</b>	9,5	1,0	17,3	12,7	74	

Na základě srovnání mortality a reprodukce žížal v bílé a tmavé rašelině byly následné testy nadále prováděny s bílou (světlou) rašelinou. Na počtech juvenilů se pravděpodobně také projevil přemístění žížal na nový substrát před vlastní aklimatizací žížal v AP.

Po těchto optimalizacích byly založeny další dva testy s kyselinou boritou. Referenční látka byla proto na umělé půdě aplikována v koncentrační řadě 31,25; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 mg/kg suché půdy ( $H_3BO_3\_2$ ). Na základě výsledků testu  $H_3BO_3\_2$  byla pro test  $H_3BO_3\_3$  zvolena robustnější koncentrační řada (100; 200; 300; 400; 500; 800) mg/kg suché půdy. Byla založena 4 opakování pro každou koncentraci a 8 kontrol. Žížaly do testu byly týden až dva před aklimatizací umístěny na nový substrát. Vybrané žížaly se dále tři dny před testem aklimatizovaly v umělé půdě s přidáním ovlhčeným granulovaným kravským hnojem. Byla vyhodnocena mortalita dospělých žížal po 28 dnech a počet juvenilních žížal na konci testu ( $H_3BO_3\_2$  – Tabulka 5,  $H_3BO_3\_3$  – Tabulka 6). Ze získaných reprodukčních dat byly pomocí programu ToxRat vyhodnoceny ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC,  $EC_{20}$  a  $EC_{50}$  ( $H_3BO_3\_2$  – Tabulka 7,  $H_3BO_3\_3$  – Tabulka 8). Reprodukční data testu  $H_3BO_3\_2$  měla normální rozdělení a nehomogenní rozptyl, proto se pro stanovení NOEC a LOEC použil jednostranný Welchův t-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí. Pro výpočet  $EC_x$  byla použita 3-parametrická nelineární regrese s kumulativní funkcí založená na normálním rozložení ( $R^2 = 0,821$ ) (Obrázek 2). Reprodukční data testu  $H_3BO_3\_3$  měla normální rozdělení a homogenní rozptyl. Pro stanovení NOEC a LOEC se použil Williamsův test. Pro výpočet  $EC_x$  se použila 3-parametrická nelineární regrese s kumulativní funkcí založená na logit rozložení ( $R^2 = 0,928$ ) (Obrázek 3).

**Tabulka 5. Mortalita dospělců a počet juvenilů u testu s kyselinou boritou H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_2.**

Koncentrace (mg/kg)	Počet dospělců		Počet juvenilů			Validita
	Průměr	SD	Průměr	SD	CV (%)	
0	10	0	231,6	40,3	17	ANO
31,25	10	0	212,5	44,6	21	
62,5	10	0	248,8	88,4	36	
125	10	0	241,3	73,6	31	
250	10	0	193,3	44,5	17	
500	10	0	16,8	11,0	66	
1000	10	0	0,0	0,0	-	

**Tabulka 6. Mortalita dospělců a počet juvenilů u testu s kyselinou boritou H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_3.**

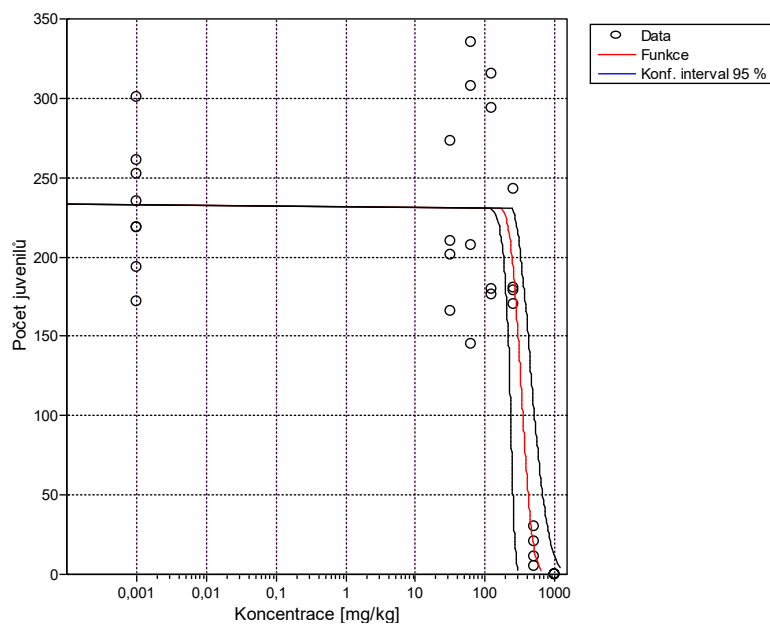
Koncentrace (mg/kg)	Počet dospělců		Počet juvenilů			Validita
	Průměr	SD	Průměr	SD	CV (%)	
0	10	0	77,8	14,0	18	ANO
100	10	0	85,5	6,0	7	
200	10	0	88,8	14,5	16	
300	10	0	60,0	8,1	14	
400	10	0	27,0	8,4	31	
500	10	0	10,0	2,9	29	
800	10	0	0,0	0,0	-	

**Tabulka 7. Ekotoxikologické parametry testu H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_2.**

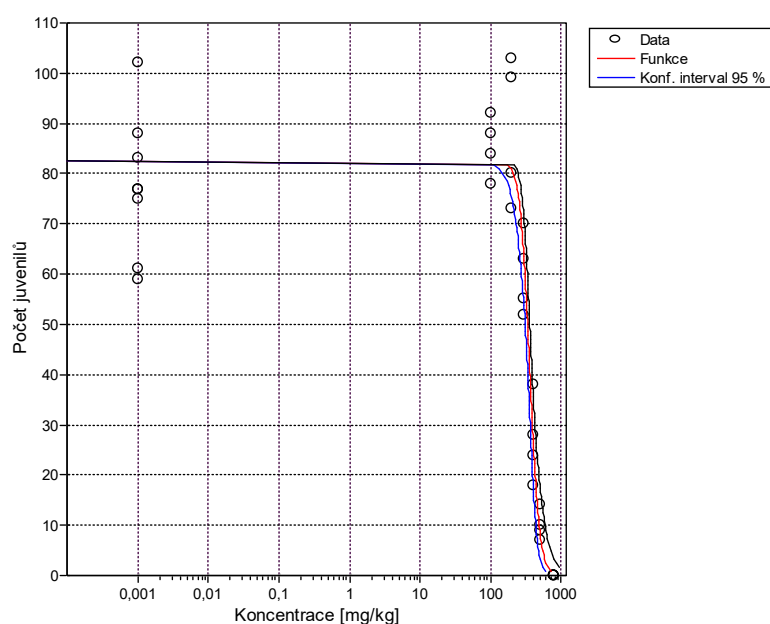
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> _2				
Parametr	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	NOEC	LOEC
Hodnota (mg/kg)	258,0	328,4	250	500
Dolní konfidenční limit 95 %	193,0	226,4		
Horní konfidenční limit 95 %	346,1	470,6		

**Tabulka 8. Ekotoxikologické parametry testu H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>\_3.**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> _3				
Parametr	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	NOEC	LOEC
Hodnota (mg/kg)	287,0	356,6	200	300
Dolní konfidenční limit 95 %	248,6	331,6		
Horní konfidenční limit 95 %	313,2	382,1		



**Obrázek 2. Test  $H_3BO_3\_2$ : Křivka dávka-odpověď modelovaná pomocí 3-parametrické nelineární regrese s kumulativní funkcí založené na normálním rozdělení.**



**Obrázek 3. Test  $H_3BO_3\_3$ : Křivka dávka-odpověď modelovaná pomocí 3-parametrické nelineární regrese s kumulativní funkcí založené na logit rozdělení.**

I když by se podle ISO 11268-2 (2012) měla  $EC_{50}$  kyseliny borité pohybovat přibližně v rozmezí (400 – 600) mg/kg suché půdy pro *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei*, tato norma také uvádí hodnotu geometrického průměru  $EC_{50}$  kyseliny borité z rešerše literatury 420 mg/kg suché půdy pro *Eisenia andrei*. Získané hodnoty  $EC_{50}$  328,4 mg/kg a 356,6 mg/kg suché půdy

jsou tedy mírně nižší, než udává současná ISO norma. Nicméně skupina ISO TC 190/SC4/WG2 Fauna se touto problematikou zabývá, neboť z běžného užívání této metody v praxi byly také reportovány hodnoty EC<sub>50</sub> nižší, než uvádí ISO norma a bude se proto revidovat (Stanislav Malý - osobní sdělení člena skupiny, 2021).

## **6 Závěr**

Byla zavedena metoda pro testování hnojiv a agrochemikálií pomocí chronického testu reprodukce žížaly *Eisenia andrei*. Metoda rozšíří stávající baterii ekotoxikologických testů pro hodnocení hnojiv o zástupce zemědělsky relevantního zástupce půdních bezobratlých.

## **7 Literatura**

1. ISO 11268-2 (2012). Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. International Standardization Organization, Geneva.
2. OECD 222 (2016). Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.



# Stanovení maskovaných mykotoxinů v krmivech

*Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

simona.wawroszova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub. Jsou nejčastěji obsaženy v obilovinách (pšenice, ječmen, žito, oves), rýži, kukuřici, olejnatých semenech a potravinách obsahujících tyto suroviny. Mykotoxiny způsobují nejen ekonomické ztráty v zemědělství ale i problémy při technologickém zpracování potravinářských surovin. Navíc představují vysoké zdravotní riziko pro populaci. V klimatických podmínkách mírného pásu jsou nejrozšířenější mykotoxiny produkované vláknitými houbami rodu *Fusarium*, tzv. fusariové mykotoxiny [1,2,3].

Nejčastěji se vyskytují druhy *F. graminearum*, *F. culmorum*. Tyto patogeny jsou schopné napadat jak vegetativní, tak i reprodukční orgány rostlin a způsobují jejich poškození a úhyn. U cereálií tyto plísně poškozují nejdříve klasy a následně i zrna.

Fusariové houby produkují mykotoxiny, které jsou řazeny do několika skupin. Jedná se o skupinu trichothecenů, fumonisinů a zearalenon. Kromě volných forem mykotoxinů existují i formy vázané, které vznikají při detoxikačních procesech v napadených rostlinách. Jedná se především o konjugáty se sacharidy. Tyto formy se označují jako „maskované“, protože je z důvodu zvýšené polarizace nebylo možno běžnými analytickými postupy detekovat [4].

Do dnešní doby byly identifikovány rostlinné metabolity DON, ZON a ochratoxinu A.

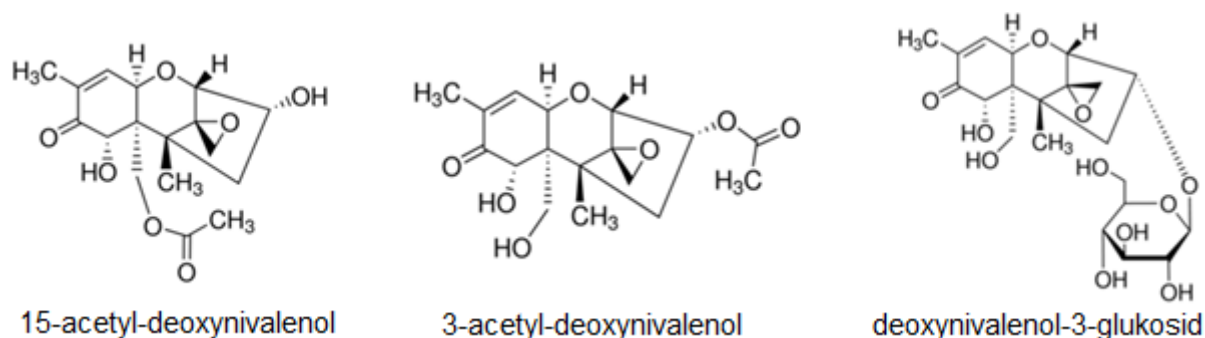
Rostliny se detoxikačními reakcemi pravděpodobně chrání před toxickými látkami z okolního prostředí, dochází při nich k transformacím (deepoxidace, deacetylace a isomerace) a konjugacím. Během těchto reakcí jsou volné mykotoxiny vázány na polárnější látky, např. na glukosu, sulfát či glutathion a vzniklé konjugáty jsou následně ukládány do buněčných vakuol. Toxicita nově vzniklého produktu se tím pro kontaminovanou rostlinu sníží či úplně

eliminuje [1,4,5,6]. Zdraví konzumenta však může být při požití rostlin s maskovanými mykotoxiny i nadále ohroženo. V důsledku hydrolýzy, která probíhá při trávení v trávicím traktu, může totiž dojít k uvolnění původní toxické formy [5,7].

Maskované mykotoxiny je obtížné rutinně analyzovat, protože jsou z důvodu vyšší polaritě hůře extrahovatelné běžnými extrakčními rozpouštědly a pro kvantitativní analýzy nebyly donedávna komerčně dostupné jejich standardy [1,4].

Výskyt maskovaných forem mykotoxinů by se měl preventivně sledovat v krmivech a surovinách pro jejich výrobu.

Tato práce se zabývá validací metody pro stanovení tří maskovaných forem deoxynivalenolu (Obrázek 1) v materiálech rostlinného původu. Metoda pro stanovení deoxynivalenolu-3-glukosidu (D3G), 3-acetyl-deoxynivalenolu (3ADON) a 15-acetyl-deoxynivalenolu (15ADON) byla následně použita k monitoringu těchto mykotoxinů v krmivech a surovinách určených pro jejich výrobu.



**Obrázek 1. Stanovované formy maskovaných mykotoxinů.**

## 2 Chemikálie

Methanol (čistota LC-MS), kyselina mravenčí (čistota LC-MS) a mravenčan amonný (pro MS) od firmy Fluka. Ultračistá voda byla připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation, USA). Acetonitril (čistota HPLC) od firmy Sigma Aldrich (Německo). Standardy deoxynivalenolu-3-glukosidu, 3-acetyl-deoxynivalenolu a 15-acetyl-deoxynivalenolu byly

pořízeny od Sigma Aldrich (Německo). Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním standardů v acetonitrilu. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3 Přístroje a pomůcky**

Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters, USA), vybavený UPLC kolonou, ACQUITY UPLC BEH C18,  $50\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 1,7\text{ }\mu\text{m}$  (Waters, USA) a předkolonou, ACQUITY BEH C18 VanGuard,  $5\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 1,7\text{ }\mu\text{m}$  (Waters, USA). Analytické váhy, ultrazvuková lázeň, horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min, centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem o objemech 15 ml a 50 ml, centrifugační zkumavka Eppendorf o objemu 1,5 ml, stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (Labicom, Česká republika), skleněné vialky o objemu 2 ml.

### **4 Postup přípravy vzorku**

Homogenní vzorek se naváží do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Ke vzorku se následně přidalo 10 ml 0,1% HCOOH. Poté se do zkumavky přidalo 10 ml acetonitrilu. Mykotoxiny se ze vzorku extrahovaly třepáním na horizontální třepačce 20 min při 150 kmitech/min. Poté se přidala pevná směs solí ( $\text{MgSO}_4$  a  $\text{NaCl}$ ) a směs se intenzivně třepala, aby došlo k rozrušení vzniklých hrudek. Vzorek se poté odstředil 5 min při 5000 otáčkách/min. Vrchní acetonitrilová vrstva byla převedena do 15ml polypropylenové zkumavky. Zkumavka byla poté uchovávána 2 hod při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tak, aby došlo k vytěsnění lipidových koextraktů vzorku. Takto vymražený extrakt se opět odstředil 5 min při 3900 otáčkách/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy se převedlo do zkumavky Eppendorf, která byla poté doplněna vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání se roztok přefiltroval přes membránový filtr a převedl do vialky.

## 5 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzovaly metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Před analýzou reálných vzorků byla ověřena citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy byla zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

**Tabulka 1. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.**

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřík	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (5 % B) – 0,2 min (5 % B) – 1,2 min (45 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 8 min (99,5 % B) – 8,1 min (5 % B) – 10 (5 % B)

**Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.**

	RT	Prekursor	CV (eV)	Produktový ion	CE (eV)	Produktový ion	CE (eV)
3ADON	1,15	339	20	203	20	231	15
15ADON	1,15	339	20	321	15	261	15
D3G	0,88	476,2	20	230,8	25	248,6	25

Teplota iontového zdroje – 150 °C, teplota sušícího plynu – 450 °C, průtok sušícího plynu – 700 l/h, průtok „cone gas“ – 15 l/h, průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min, napětí na kapiláře – 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním modu

## 6 Výsledky a diskuse

### Validace stanovení maskovaných forem mykotoxinů

Metoda pro stanovení maskovaných mykotoxinů, založená na QuEChERS extrakci s následnou LC-MS analýzou, byla validována ve vzorcích rostlinného původu (pšenice a seno). Blankové matrice byly obohaceny na třech koncentračních hladinách (200 µg/kg, 500 µg/kg a 1000 µg/kg). Obohacení bylo provedeno v šesti opakováních pro každou matici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena citlivost, správnost, opakovatelnost, selektivita a nejistota. V obou testovaných materiálech byla splněna všechna validační kritéria podle SANTE 11945/2015 [8]. Mezi stanovitelnosti (LOQ) byla nejnižší validovaná hladina a lze ji tedy nazývat jako tzv. reportovací limit (RL). Lineární kalibrační rozsah byl pro všechny tři analyty v rozpětí (500 – 5000) µg/kg a s korelačním koeficientem větším než 0,999. Výsledná validační data jsou uvedena v tabulce 3.

Selektivita je schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě LC-MS analýz jsou pozorovány maticové efekty (ME) v jejichž důsledku je ovlivněn signál analytu přítomností matrice (Tabulka 3). V rámci validace byly ME sledovány v extraktech obou testovaných matic. Maticí efekt byl počítán podle vztahu:  $ME = \frac{\text{směrnice kalibrační křivky v matrici}}{\text{směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle}} \times 100$ . Vzhledem k přítomnosti ME v obou testovaných materiálech byla kvantifikace obsahu mykotoxinů provedena s využitím maticové kalibrace.

Stanovení opakovatelnosti vychází z vícenásobného měření matrice obohacené standardem mykotoxinu na různých hladinách (Tabulka 3).

Správnost metody (70 – 120) % pro stanovení maskovaných mykotoxinů současně s požadavkem na maximální rozšířenou nejistotu ( $\leq 50$ ) podle SANTE 11945/2015 [8] byl splněn v obou testovaných materiálech až na hladině 500 µg/kg. Tato hladina může být tedy LOQ, tj. RL metody.

**Tabulka 3. Validační parametry maskovaných forem mykotoxinů.**

Matrice	Analyt	Koncentrace $\mu\text{g}/\text{kg}$	Správnost (%)	Opakovatelnost (%)	LOQ	ME	RT
Pšenice	D3G	200	67*	2	500	72	0,88
		500	90	6			
		1000	89	7			
	3ADON	200	66*	60*	500	100	1,15
		500	79	15			
		1000	101	2			
	15ADON	200	85	31*	500	103	1,15
		500	87	18			
		1000	101	3			
Seno	D3G	200	39*	7	500	58	0,88
		500	107	1			
		1000	88	9			
	3ADON	200	66*	43*	500	83	1,15
		500	74	9			
		1000	98	3			
	15ADON	200	98	55*	500	101	1,15
		500	71	5			
		1000	101	2			

\*... hodnoty nevyhovují legislativním požadavkům

Pro identifikaci maskovaných mykotoxinů ve vzorcích byla použita kritéria podle SANTE 11945/2015 [8], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je  $\pm 2,5\%$ . Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanoveného ve standardu.

Správnost metody byla navíc ověřena účastí v mezinárodní porovnávací zkoušce organizované EURL: Proficiency test for mycotoxins in oat meal. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4. Ověření správnosti metody pro stanovení maskovaných mykotoxinů.**

Analyt	Předložená hodnota (µg/kg)	Změřená hodnota (µg/kg)	z-score	
D3G	1143 ± 286	1087,1	-0,20	*
	1144 ± 261	1015,82	-0,49	*
3ADON	613 ± 153	654,44	0,27	
	645 ± 110	674,54	0,26	
15ADON	161 ± 40	135,84	-0,63	*
	152 ± 38	135,73	-0,43	*

\* z-score nebylo možno vyhodnotit statisticky z důvodu nízkého počtu výsledků z ostatních laboratoří. Hodnota je vypočítána z předložené hodnoty laboratoře, která pořádala tuto mezilaboratorní porovnávací zkoušku.

Výsledky z účasti v mezinárodní porovnávací zkoušce potvrdily schopnost, správně stanovit 3ADON, 15ADON a D3G ve vzorcích rostlinného původu.

## 7 Závěr

V práci byla provedena validace stanovení konjugovaných forem deoxynivalenolu ve vzorcích rostlinného původu. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v SANTE 11945/2015 [8]. Správnost metody byla ověřena účastí v mezinárodní mezilaboratorní porovnávací zkoušce. Vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení D3G, 15ADON a 3ADON v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda je navíc snadná, rychlá, finančně úsporná a lze ji rozšířit o nové analyty.

## 8 Literatura

1. Hajšlová J., Zachariášová M., Malachová A., Kostalanská M., Kocourek V., Poustka J.,: Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování. Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí, Praha (2008).
2. Champeil A., Doré T., Fourbet J.F.: Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grain, Plant Sci. 166, 1389 (2004).
3. Edwards S.G.: Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins, Toxickol. Lett. 153, 29 (2004).

4. Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R.: Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 3421-3425 (2005).
5. Engelhardt G., Ruhland M., Wallnöfer P.R.: Metabolism of mycotoxins in plants, *Advances in food science*, 21, 71-78 (1999).
6. Schneewis I., Meyer K., Engelhardt G., Bauer J.: Occurrence of zearalenone- $\beta$ -D glucopyranoside in wheat, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 1736-1738, 2002.
7. Young J.C., Fulcher R.G., Hayhoe J.H., Scott P.M., Dexter J.E.: Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats, *Journal of agricultural and food chemistry*, 32, 659-664 (1994).
8. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE 11945/2015.



# Zavedení kvantitativního stanovení geneticky modifikované sóji MON 87701 pomocí qPCR

*Jiří Čuhel*

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

## 1 Úvod

MON 87701 je geneticky modifikovaná sója, která je odolná vůči hmyzím škůdcům z řádu Lepidoptera. Do genetické výbavy transgenní sóji MON 87701 byl z kmene HD73 bakterie *Bacillus thuringiensis* zaveden gen pro expresi proteinu Cry1Ac. Tento protein potom listům sóje poskytuje ochranu proti požeru některými škůdci (např. *Anticarsia gemmatilis*, *Pseudoplusia includens*, *Epinotia aporema*, *Rachiplusia nu*). Kontrolní orgány včetně ÚKZÚZ musí systematicky kontrolovat přítomnost sóji MON 87701 v rostlinném materiálu, krmivech a krmných směsích. Cílem práce bylo verifikovat validovanou metodu kvantitativního stanovení transgenní sóji MON 87701 pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a zavést ji do laboratorní praxe Oddělení mikrobiologie a biochemie (OdMB). Verifikace kvantitativního stanovení v sobě zahrnuje i verifikaci kvalitativního stanovení.

## 2 Materiál a metody

### Chemikálie

Rotor-Gene Probe PCR Kit (QIAGEN).

PCR voda.

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

### **Amplifikační primery**

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

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

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

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

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

Forward primer pro transgen MON 87701

MON 87701 2: 5'-TGG TGA TAT GAA GAT ACA TGC TTA GCA T-3'.

Reverse primer pro transgen MON 87701

MON 87701 1: 5'-CGT TTC CCG CCT TCA GTT TAA A-3'.

### **Sondy**

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

Sonda pro vnitřní (referenční) gen sóji (gen Le1)

*Le1* P: 5'-FAM-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1-3'.

Sonda pro transgen MON 87701

MON 87701: 5'-FAM-TCAGTGTTTGACACACACACTAAGCGTGCC-BHQ1-3'.

### **Použité certifikované referenční materiály (CRM)**

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

MON 87701 – AOCS 0906-A

Interní označení CRM 10/2018, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované sóji MON 87701 (blank) od AOCS. CRM byl dodán ve formě sójového šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

MON 87701 – AOCS 0809-A

Interní označení CRM 6/2019, obsahuje 100 % m/m geneticky modifikované sóji MON 87701 od AOCS. CRM byl dodán ve formě sójového šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA.

MON 810 – ERM®-BF413ak

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

### **Přístroje a pomůcky**

Termocykler Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen).

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

## **3 Pracovní postup**

### **Popis metody kvantitativního a kvalitativního stanovení geneticky modifikované sóji MON 87701**

Metoda je plně v souladu s jednotnými pracovními postupy ÚKZÚZ č.

10264.1 Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu;

10265.1 Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR);

10262.1 Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu;

10263.1 Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR

a vychází z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenů MON 87701 (Charels et al., 2011).

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

Kalibrační řadu pro kvantitativní stanovení sójového transgenů MON 87701 tvoří pět bodů. První bod kalibrační křivky S1 o obsahu GM 9 % m/m má stejnou koncentraci DNA jako vzorky a kontroly použité do PCR (20 ng/μl, 100 ng/reakce). Další body kalibrační řady S2 –

S5 se připraví postupným ředěním vodou dle tabulky 1. Objem roztoků jednotlivých ředění pro kalibrační řadu je závislý na počtu požadovaných amplifikačních křivek pro analýzu. Jednotlivé body kalibrační křivky je nutné ředit do plastových zkumavek s výrazným snížením vaznosti povrchu se vzorkem.

**Tabulka 1. Body kalibrační křivky (S1 – S5) pro kvantitativní stanovení transgenu MON 87701.**

	S1	S2	S3	S4	S5
<b>Poměr ředění</b>		4	4	3	3
<b>ng DNA s VG/reakce</b>	100	25	6,25	2,083	0,694
<b>ng DNA s GM/reakce</b>	9	2,25	0,5625	0,1875	0,0625
<b>ng DNA/μl</b>	20,00	5,00	1,25	0,4167	0,1389

GM – genetická modifikace MON 87701; VG – vnitřní sójový gen *Le1*

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů, sond, programy a koncentrace PCR směsí vycházejí z validované metodiky JRC pro kvantitativní stanovení transgenu MON 87701 (Charels et al., 2011):

Vnitřní gen sóje (gen *Le1*)

Primery: *Le1 F*, *Le1 R*

Sonda: *Le1 P*

Délka ampliconu: 74 bp

Transgen MON 87701

Primery: MON 87701 2 (F), MON 87701 1 (R)

Sonda: MON 87701 P

Délka ampliconu: 89 bp

Amplifikační program je shodný pro vnitřní gen sóji i genetickou modifikaci MON 87701 (tabulka 2) a oba dva geny tedy mohou být analyzovány současně během jednoho běhu PCR. Tabulky 3 a 4 popisují složení reakčních směsí PCR pro transgen MON 87701, respektive pro sójový vnitřní gen *Le1*. Jako negativní kontrola při PCR pro *Le1* byl použit izolát DNA z CRM 3/2018.

**Tabulka 2. Amplifikační program pro gen *Le1* i transgen MON 87701.**

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

**Tabulka 3. Složení reakční směsi qPCR pro transgen MON 87701.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			5,6875
Rotor-Gene Mix	2 ×	1 ×	12,5
Primer F (MON 87701 2)	20 μM	0,6 μM	0,75
Primer R (MON 87701 1)	20 μM	0,6 μM	0,75
Sonda (MON 87701)	20 μM	0,25 μM	0,3125
Templátová DNA	20 ng/μl		5
Objem směsi vč. templátu			25

**Tabulka 4. Složení reakční směsi qPCR pro sójový vnitřní gen *Le1*.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			7,0625
Rotor-Gene Mix	2 ×	1 ×	12,5
Primer F ( <i>Le1</i> F)	20 μM	0,15 μM	0,1875
Primer R ( <i>Le1</i> R)	20 μM	0,15 μM	0,1875
Sonda ( <i>Le1</i> P)	20 μM	0,05 μM	0,0625
Templátová DNA	20 ng/μl		5
Objem směsi vč. templátu			25

## Verifikace metody

Verifikace metody proběhla podle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017).

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

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

Při verifikaci kvalitativní analýzy se stanovuje pouze LOD.

Pro účely přípravy kalibrační křivky, stanovení dynamického rozsahu metody, koeficientu determinace  $R^2$  kalibrační křivky, amplifikační účinnosti, meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti, opakovatelnosti a rozšířené relativní nejistoty byla DNA izolována z CRM 10/2018 (obsahující 0 % m/m geneticky modifikované sóji MON 87701 – blank) a z CRM 6/2019 (obsahující 100 % m/m geneticky modifikované sóji MON 87701), a to v 16, respektive v 6 opakováních.

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

Po provedení testu inhibice (viz níže) byly jednotlivé izoláty (16) DNA z CRM 10/2018 (tj. 0 % GM m/m) smíchány. Výsledná směs pak sloužila k ředění izolátů DNA z CRM 6/2019 (tj. 100 % GM m/m) na jiné hodnoty obsahu GM (viz níže). CRM s jinými hodnotami obsahu GM než 0 a 100 % GM m/m totiž nejsou v případě MON 87701 komerčně dostupné a je nutné si je připravit. V případě CRM 6/2019 (100 % GM m/m) byly první dva izoláty DNA ponechány bez smíchání (byly použity pro účely stanovení meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti, opakovatelnosti a rozšířené relativní nejistoty) a další čtyři izoláty byly smíchány (tato směs byla dále ředěna s DNA izolovanou z CRM 10/2018 a poté byla použita pro přípravu kalibrační křivky).

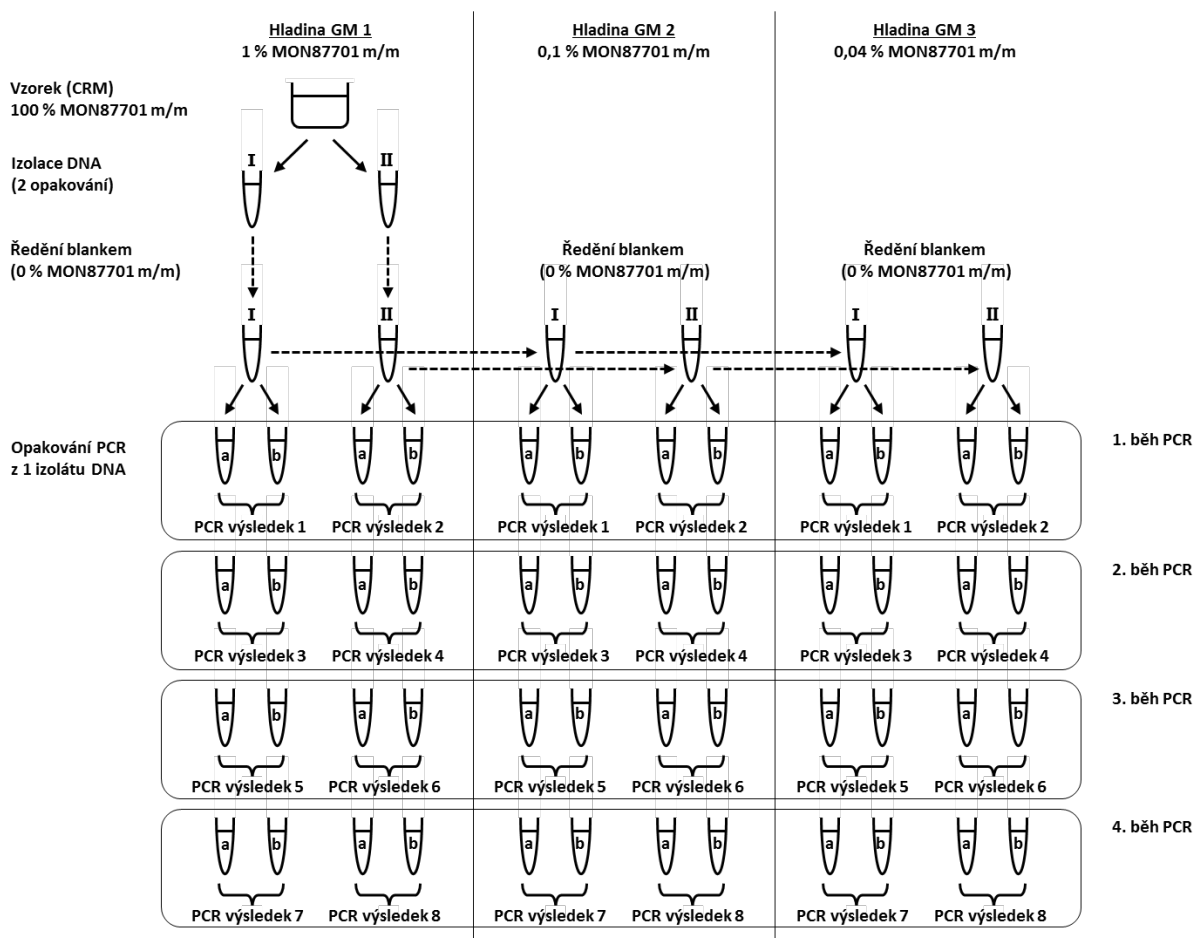
Izoláty DNA byly otestovány na přítomnost inhibitorů PCR dle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Každý izolát DNA

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

Mez detekce, mez stanovitelnosti, správnost, opakovatelnost a rozšířená relativní nejistota byly stanovovány s využitím tří hladin obsahu genetické modifikace (GM) MON 87701, a to 1 % GM m/m; 0,1 % GM m/m a 0,04 % GM m/m.

Protože CRM s těmito hladinami obsahu MON 87701 nejsou komerčně dostupné, byly připraveny postupným ředěním izolátů DNA získaných z CRM se 100 % GM (CRM 6/2019) pomocí izolátu DNA získaného z CRM s 0 % GM (CRM 10/2018). Postup tohoto ředění je detailně popsán ve verifikační metodice pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Obdobným způsobem jsme si také připravili DNA s 9 % GM m/m. Tato DNA byla využita při přípravě kalibrační křivky.

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



Obr. 1. Schéma praktického uspořádání verifikace.

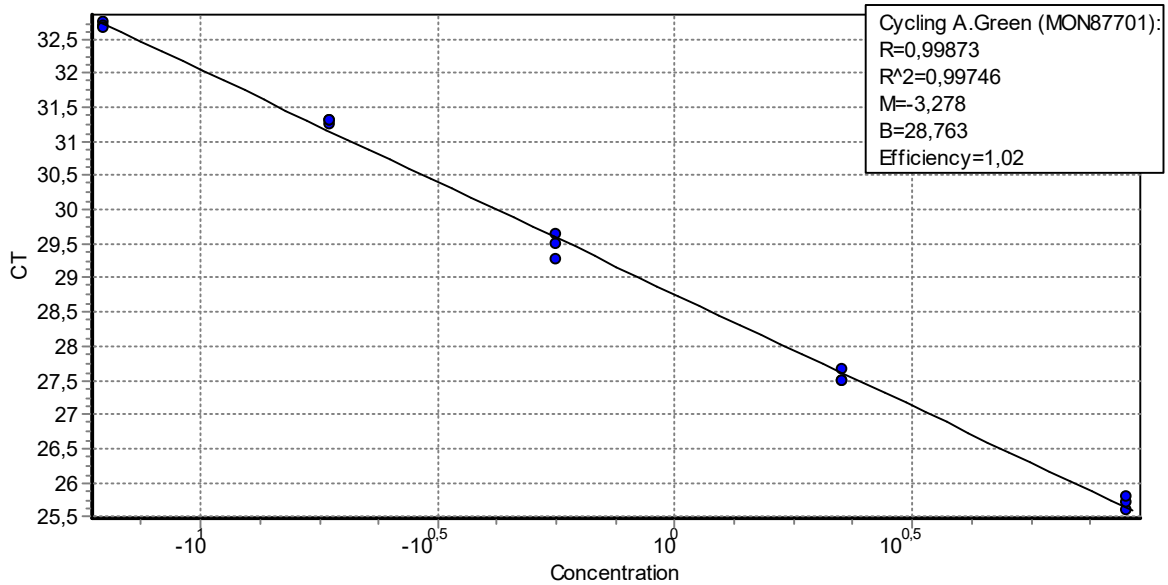
## 4 Výsledky a diskuze

Při zavádění a verifikaci metody pro kvantitativní i kvalitativní stanovení transgenní sóji MON 87701 pomocí qPCR na pracovišti OdMB se nevyskytly žádné potíže bylo možné v plné míře pracovat podle validované metodiky pro kvantifikaci tohoto transgenu (Charels et al., 2013). Pouze před samotnou verifikací bylo nutné optimalizovat nastavení *gainu* (zesílení signálu z detektoru) při spuštění softwaru, který ovládá analýzu qPCR na termocycleru Rotor-Gene Q (2.3.1). *Gain* byl optimalizován a nastaven na hodnotu 5. Příklad kalibrační křivky s koeficientem determinace  $R^2$  a amplifikační účinností je uveden na obrázku 2. Obrázek 3 ukazuje amplifikační křivky jednotlivých kalibračních bodů.

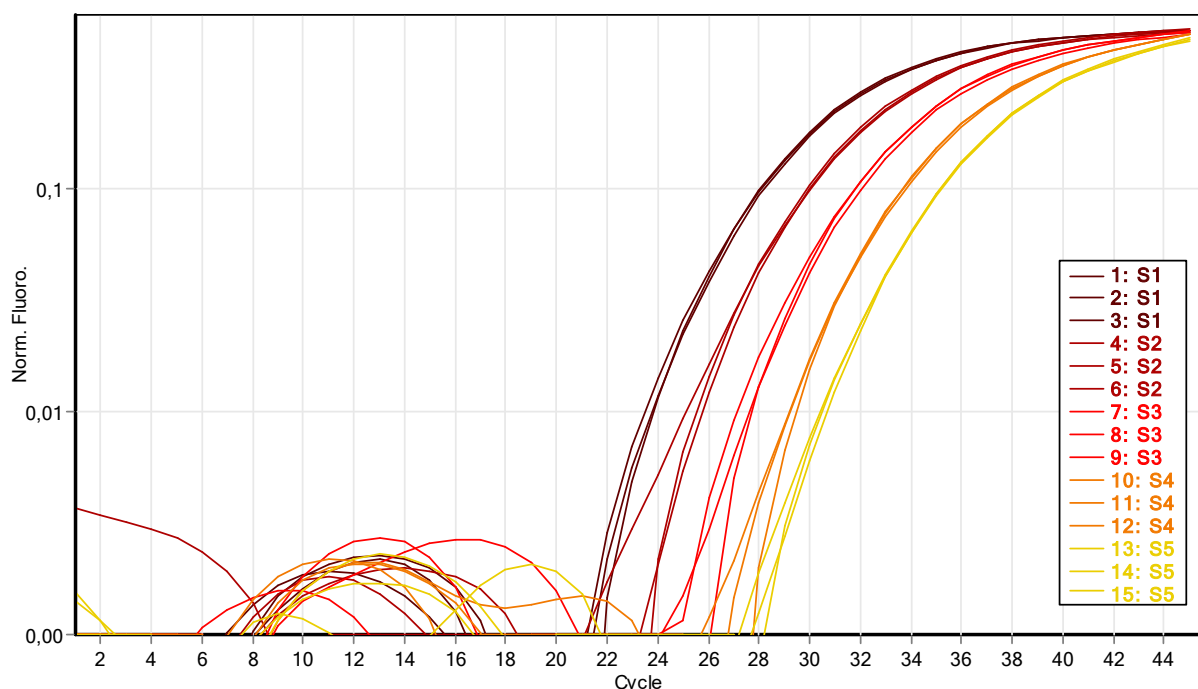
V tabulce 5 jsou uvedeny získané validační parametry pro kvantitativní i kvalitativní stanovení transgenní sóji MON 87701. Správnost metody splnila akceptační limity u dvou z testovaných



hladin: 1 a 0,1 % GM m/m (hladina 0,04 % je již mimo dynamický rozsah). Laboratoř prokázala schopnost věrohodně kvantifikovat vzorek na hladině 0,1 % GM m/m, která tak odpovídá mezi stanovitelnosti. Stanovením meze detekce bylo zjištěno, že lze detekovat obsah transgenu MON 87701 na hladině 0,04 % GM m/m, protože všech 16 opakování s touto hladinou bylo pozitivních na detekci MON 87701 (příklad uveden na obrázku 4). Limity pro minimálně akceptovatelnou výkonnost metody byly dosaženy.



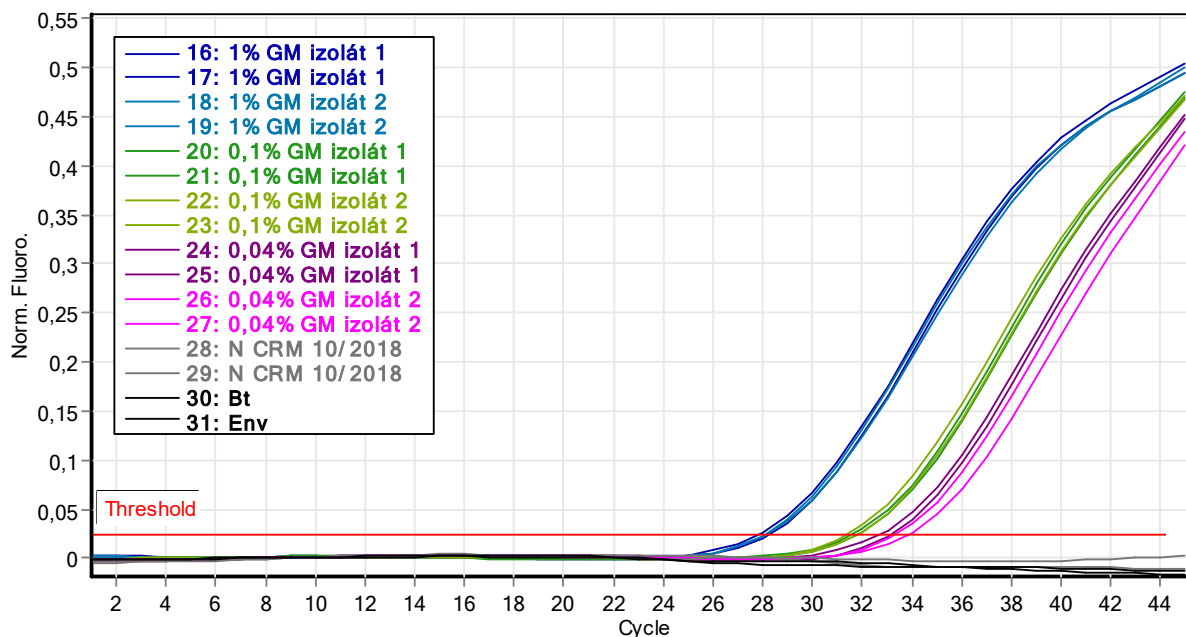
**Obr. 2. Kalibrační křivka (závislost hodnoty Ct na koncentraci DNA) pro transgen MON 87701 s koeficientem determinace  $R^2$  0,997 a s amplifikační účinností (E) 102 %.**



Obr. 3. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) jednotlivých kalibračních bodů (S1 – S5) při kvantifikaci transgenu MON 87701.

Tabulka 5. Získané validační parametry pro kvantitativní stanovení transgenní sóji MON 87701.

	Hladina GM 1 1 % MON 87701	Hladina GM 2 0,1 % MON 87701	Hladina GM 3 0,04 % MON 87701
<b>Správnost</b> (definována odchylkou – bias, tj. relativním rozdílem mezi průměrem z výsledků a referenční hodnotou)	-2,1 %	-13,8 %	-25,0 %
<b>Opakovatelnost</b> (definována $RSD_r$ , tj. relativní směrodatnou odchylkou za podmínek opakovatelnosti)	15,1 %	13,8 %	30,0 %
<b>Rozšířená relativní nejistota</b>	30,2 %	27,6 %	60,0 %
<b>Dynamický rozsah</b>	0,0625 % GM – 9 % GM		
<b>Koeficient determinace <math>R^2</math></b> kalibrační křivky	0,993 pro MON 87701 0,999 pro referenční sójový gen <i>Lel</i>		
<b>Amplifikační účinnost</b>	100,7 % pro MON 87701 98,1 % pro referenční sójový gen <i>Lel</i>		
<b>Mez detekce</b>	0,04 % GM		
<b>Mez stanovitelnosti</b>	0,1 % GM		



**Obr. 4. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) při stanovení meze detekce (LOD) u transgenu MON 87701. Bt – beztemplátová kontrola, Env – kontrola čistoty prostředí při přípravě PCR, N – negativní kontrola.**

## 5 Závěr

Verifikace potvrdila vhodnost použití metody pro daný účel a odpovídá zamýšlenému použití. Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost metody k používání v NRL a její zahrnutí do rozsahu akreditace. Metoda kvantitativního i kvalitativního stanovení transgenní sóji MON 87701 pomocí qPCR se zařadí do postupů zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv, krmných směsí a osiv.

## 6 Literatura

1. Charels D, Mazzara M, Grazioli E, Van den Eede G, 2011. Event Specified Method for the Quantification of Soybean MON 87701 by Real-time PCR – Validation Report. EUR 25136 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg: Publications Office of the European Union, ISBN 978-92-79-22477-5, doi: 10.2788/38101, JRC 68071.
2. Hougs L, Gatto F, Goerlich O, Grohmann L, Lieske K, Mazzara M, Narendja F, Ovesna J, Papazova N, Scholtens I, Žel J, 2017. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection, Luxembourg: Publication Office of the European Union, ISBN 978-92-79-77310-5, doi:10.2760/645114, JRC 109940.

3. JPP č. 10252.1. Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food). ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
4. JPP č. 10262.1. Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
5. JPP č. 10263.1. Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
6. JPP č. 10264.1. Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.
7. JPP č. 10265.1. Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv.

# **Stanovení sušiny v kapalných biostimulantech – orientační určení meze stanovitelnosti**

*Václav Poštulka*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
ONRL Opava, Jaselská 552/16, 746 01 Opava  
vaclav.postulka@ukzuz.cz

## **1 Úvod**

Cílem práce byl předběžný odhad meze stanovitelnosti obsahu sušiny pro dva odlišné postupy stanovení sušiny. Z novelizace Nařízení 2019/1009 ze dne 5. června 2019, kterým se stanoví pravidla pro dodávání hnojivých výrobků EU na trh a kterým se mění nařízení (ES) č. 1069/2009 a (ES) č. 1107/2009 a zrušuje nařízení (ES) č. 2003/2003 vyplývá požadavek vztahování všech analytických výsledků stanovení na obsah sušiny, a proto bylo třeba ověřit mez stanovitelnosti tohoto stanovení.

Z výše uvedených důvodů byl i v rámci CEN TC 455 WG4 doplněn požadavek pro standardizaci o stanovení obsahu sušiny.

Sušina je neodpařitelný zbytek látky, který zbude po zahřívání a odpařování při maximální teplotě do 105 °C až do dosažení konstantní hmotnosti; tedy do stavu, kdy se všechny odpařitelné látky beze zbytku odpaří a žádné další se již dále neodpařují.

V praxi jde o stanovení přesného procentuálního podílu látek z původní hmotnosti, které se při uvedené teplotě neodpařují. Komplementárním doplňkem obsahu sušiny je obsah vlhkosti, což je procentuální vyjádření obsahu látek, které se odpařují při teplotě nižší než 105 °C. Sušina tedy představuje procentuálně kvantifikovaný zbytek hmotnosti po odpařování, vlhkost pak procentuálně vyjádřený úbytek hmotnosti po odpařování.

Součet obou komplementárních procentuálních podílů (obsah sušiny + obsah vlhkosti) je vždy 100 % původní hmotnosti. Příkladem látky se 100 % vlhkostí a 0 % sušiny je destilovaná voda – všechna materie se při odpařování destilované vody beze zbytku odpaří do ovzduší – 100 % hmotnosti destilované vody se změní ve vodní páru a nezůstane po ní vůbec žádný neodpařitelný zbytek, tedy 0 % sušiny.

## 2 Materiál a metody

Experiment byl proveden pro dvě různé metody stanovení sušiny. V první metodě (metoda A) byly roztoky sušeny vždy napřímo, kdežto v druhé metodě (metoda B) byl do váženky předem přidán mořský písek, ke kterému byl navíc přidán vzorek. Pro každou koncentrační hladinu bylo měření provedeno desetkrát. K statistickému vyhodnocení se použil SW EffiValidation.

## 3 Chemikálie

Chlorid sodný, NaCl, p.a., Lachema s.p., č.š. 1096, obsah min.: 99,9 %.

Mořský písek, Lachema s.p. č.š. 1076, obsah min.: čistý.

## 4 Pracovní postup

Bylo naváženo přesně (s přesností na 4 platné číslice) požadované množství chloridu sodného a připravena řada roztoků o těchto koncentracích:

**Tabulka 1. Koncentrace výchozích roztoků.**

No.	1	2	3	4	5	6	7
g NaCl/100 ml	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0	10

Oproti původnímu návrhu experimentu byly přidány do řady navíc dvě nižší koncentrační hladiny (0,1 a 0,5 g NaCl/100 ml).

Každá navážka byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a pečlivě promíchána, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění NaCl.

Stejný postup přípravy roztoků byl aplikován i pro druhou metodu stanovení sušiny.

### **Metoda A**

Do předem vysušených a v exsikátoru vychladlých a zvážených vysoušeček bylo pipetováno z každého roztoku 10 ml. Vysoušečky byly po pipetáži ihned uzavřeny a zváženy. Poté byly otevřené umístěny do sušárny a sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru byly opět zváženy. Hodnoty byly pomocí SW vah exportovány přímo do MS excel a pro každý vzorek byl vypočten obsah sušiny a vlhkosti. Pro každou koncentrační hladinu bylo provedeno deset měření. Použita byla pieta jednonanálová 10ml a laboratorní váhy Kern 770. Vážení bylo provedeno na 4 desetinná místa.

### **Metoda B**

Do každé z vysoušeček bylo přidáno přibližně 10 g mořského písku. Následně byly vysoušečky přesušeny při 105 °C po dobu přibližně 4 hodin do konstantní hmotnosti. Takto připravené vysoušečky byly po vychladnutí v exsikátoru zváženy. Do připravených a zvážených vysoušeček bylo pipetováno z každého roztoku 10 ml, vysoušečky byly ihned uzavřeny, zváženy a poté otevřené umístěny do sušárny. Sušení probíhalo nadvakrát. Po 5 hodinách sušení při 105 °C nedošlo k úplnému vysušení některých vzorků, proto byly dosušeny následující den další 4 hodiny při 105 °C. Vysušené vzorky byly po vychladnutí v exsikátoru zváženy na 4 desetinná místa. Pro každou koncentrační hladinu bylo stanovení provedeno destekrát.

## **5 Diskuse a výsledky**

Po vyvážení vzorků byla spočítán obsah sušiny a vlhkosti pro jednotlivé vzorky v MS Excel. Tyto hodnoty byly použity jako vstup pro kalkulaci jednotlivých mezí v programu EffiValidation. K hodnocení mezí byla použita metoda Meze - 3s - Každý vzorek korigován na slepý pokus, a každá koncentrační hladina byla hodnocena zvlášť. Níže jsou uvedeny souhrnné tabulky pro jednotlivé metody.

**Tabulka 2. Souhrn mezí pro jednotlivé koncentrační hladiny - metoda A.**

	Koncentrace (g NaCl/100 ml)	Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti
<b>METODA A</b>	<b>0,0</b>	0,0403	0,1344
	<b>0,1</b>	0,0467	0,1555
	<b>0,5</b>	0,0242	0,0807
	<b>1,0</b>	0,0271	0,0905
	<b>2,0</b>	0,0415	0,1382
	<b>5,0</b>	0,0853	0,2844
	<b>10,0</b>	0,1023	0,3410
<b>Průměr</b>	<b>0,0525</b>	<b>0,1750</b>	
<b>Sd</b>	<b>0,0297</b>	<b>0,0991</b>	

**Tabulka 3. Souhrn mezí pro jednotlivé koncentrační hladiny - metoda B**

	Koncentrace (g NaCl/100 ml)	Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti
<b>METODA B</b>	<b>0,0</b>	0,0410	0,1368
	<b>0,1</b>	0,0302	0,1007
	<b>0,5</b>	0,0303	0,1009
	<b>1,0</b>	0,0183	0,0609
	<b>2,0</b>	0,0130	0,0433
	<b>5,0</b>	0,0148	0,0493
	<b>10,0</b>	0,0246	0,0821
<b>Průměr</b>	<b>0,0246</b>	<b>0,0820</b>	
<b>Sd</b>	<b>0,0100</b>	<b>0,0335</b>	

Nejnižší vypočtená mez stanovitelnosti je 0,0433 pro metodu B (koncentrace 2,0 g NaCl/100 ml). Nejvyšší mez stanovitelnosti je pak 0,3410 u metody A (koncentrace 10,0 g NaCl/100 ml). Průměrná mez stanovitelnosti pro metodu B je přibližně o polovinu nižší než mez stanovitelnosti u metody A.



## 6 Závěr

Podářilo se ověřit orientační meze stanovitelnosti pro jednotlivé koncentrační hladiny při využití dvou různých postupů při standartních podmínkách stanovení sušiny, 105 °C, do konstantní hmotnosti.

Z experimentu vyplývá, že při použití postupu z metody B (stanovení sušiny na mořském písku) je mez stanovitelnosti poloviční oproti metodě A (stanovení sušiny přímo).

Výstupy z tohoto orientačního stanovení mohou sloužit jako podklad pro určení přibližné meze stanovitelnosti obsahu sušiny u biostimulantů. Nicméně lze předpokládat, že samotné biostimulanty se budou chovat od modelových roztoků odlišně.

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXV, 2021/1**

Ročník: XXV, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2021

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 39

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196