Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2009

Ročník XIII, číslo 2/2009

Brno 2009

Obsah

1. **Zavedení metod detekce transgenních odrůd rýže LL601, kukuřice DAS 59122, řepy cukrovky H7-1 a bramboru EH 92-527-1, část 1.: kukuřice DAS 59122** 1

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

2. **Zavedení detekce rostlinných patogenů** 11

Hana Hájková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř – Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno

3. **Ověření možnosti náhrady klasického 1 mm sítka mlýnku ZM 200 při mletí slunečnic za distanční sítko 1,5 mm** 21

Zdeněk Kejla
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava

4. **Zavedení a optimalizace pracovních postupů pro nový automatický extraktor Büchi B-811** 29

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

5. **Stanovení hliníku ve vybraných lesních půdách** 35

Přemysl Fiala
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OHP, Hroznová 2, 656 06 Brno

Eva Urbánková, Elena Obdržálková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (http://www.ukzuz.cz).

Zavedení metod detekce transgenních odrůd rýže LL601, kukuřice DAS 59122, řepy cukrovky H7-1 a bramboru EH 92-527-1, část 1.: kukuřice DAS 59122

Hana Hájková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř – Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
hana.hajkova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Cílem práce bylo pomocí zavedeného způsobu detekce rostlinných transgenů rozšířit nabízenou škálu stanovení o postup pro detekci transgenní kukuřice DAS 59122, kterou laboratoř dosud neprováděla.

2 Úvod

Stávající systém detekcí transgenů v rostlinném materiálu je univerzální - specifitu stanovením dodává výběr vhodných amplifikačních primerů. Tak je umožněno zavádění dalších detekcí v podstatě libovolných GM, což v rámci specifických kitů nebylo možné. V rámci našich Jednotných pracovních postupů byla zavedena identifikace další genetické modifikace kukuřice 59122 DAS. Byla vyzkoušena technika amplifikace DNA pomocí univerzálního PCR-kitu (a v něm popsaného protokolu) v kombinaci s primery, jejichž používání je pro příslušnou detekci známo z literatury a materiálů EU. Optimalizace parametrů PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) byla provedena za použití dostupného CRM.

3 Materiál a metody

Základem této metody je

1. Izolace DNA z daného vzorku,
2. Amplifikace DNA pomocí PCR,
3. Vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Výsledky se vyhodnocují za použití systému kontrol a ve srovnání s CRM (certifikovanými referenčními materiály).

3.1 Přístroje a zařízení

1. Laboratorní šrotovník (podmínkou je rozebíratelnost a dekontaminovatelnost šrotovacích součástí),
2. Váhy (s přesností na 0,01g),
3. Elektrická vodní lázeň,
4. Centrifuga,
5. Termostat,
6. Biohazard-box,
7. Elektromagnetické míchadlo,
8. Elektrická vana a zdroj – elektroforéza,
9. Gelově-dokumentační zařízení, (součástí je i snímač Olympus a PC se softwarem AlphaDigiDoc).

Sterilizace a dekontaminace se provádí dle charakteru materiálu buď tepelně (sušárna, autokláv), nebo roztokem přípravku na bázi chlornanu sodného (např. Savo apod.).

3.2 Chemikálie a roztoky

Používá se jeden kit pro izolaci DNA a jeden univerzální kit pro PCR. Přesné chemické složení jednotlivých reagencií výrobce kitů neuvádí.

3.2.1 Kit pro izolaci DNA

GenElute^{TM} Plant Genomic DNA Miniprep Kit, výrobce Sigma-Aldrich - kit pro izolaci DNA z rostlinného materiálu včetně semen.

Kit obsahuje: Lysis Solution Part A, Lysis Solution Part B, Precipitation Solution, Binding Solution, Column Preparation Solution, Wash Solution Concentrate (před prvním použitím se ředí ethanolem 95% až 100% dle návodu), Elution Solution (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH přibližně 8,0), GenElute^{TM} Filtration Columns (kolony) ve zkumavkách, GenElute^{TM} Nucleic Acid Binding Columns (kolony) ve zkumavkách, Collection Tubes (sběrné zkumavky) o objemu 2 ml.

3.2.2 Kit pro amplifikaci DNA

REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix, výrobce Sigma-Aldrich - univerzální reakční směs pro PCR. (Dále je označován jako „REDTaq“.) Obsahuje:

1. 20 mM Tris-HCl (pH8,3) se 100 mM KCl,
2. 3mM $MgCl_2$,
3. 0,002% želatina,
4. Stabilizátory,
5. 0,4 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
6. 0,06 unit/µl Taq DNA-polymeráza,
7. Voda PCR Reagent.

Přípravu reakční směsi pro PCR uvádí tabulka č. 1 zpracovaná dle pokynů výrobce k použití kitu.

Tabulka č. 1: Příprava PCR, kit REDTaq

Složka	1 reakce µl	5 reakcí µl	10 reakcí µl	15 reakcí µl	20 reakcí µl	25 reakcí µl
Voda	18	90	180	270	360	450
REDTaq mix	25	125	250	375	500	625
Specifický amplifikační primer F	1	5	10	15	20	25
Specifický amplifikační primer R	1	5	10	15	20	25
Reakční směs bez templátu	45	225	450	675	900	1125
Templát	5	5 × 5	10 × 5	15 × 5	20 × 5	25 × 5
Reakční směs včetně templátu	50	250	500	750	1000	1250

3.2.3 Charakteristika specifických amplifikačních primerů – viz. tabulka č.2

Tabulka č. 2: Používané primery

Amplikon	Délka [bp]	Název primerů	Charakteristika amplikonu	LOD (Limit detekce dané PCR)
Kukuřice 59122 DAS	86	DAS-59122-7-rb1f DAS-59122-7-rb1r	Specifický pro gen Cry34Ab1, Cry35Ab1 a PAT	ověřeno ≤ 0,1%

3.2.4 Pozitivní a negativní standardy (referenční materiály - RM)

Laboratoř používá referenční materiály, které představují:

1. Negativní kontrolu - má obsah GMO nulový nebo pod limitem detekce (LOD).
2. Pozitivní kontroly - CRM v podobě mouky obsahující asi 1 % a 10 % příslušného GMO, zakoupené přes firmu Fluka Biochemica od IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Belgie. Jedná se o RM uznávaný v rámci EU a ve světě. Pozitivní kontroly obsahující 0,1 % GMO jsou na trhu, budou zakoupeny později. Přehled referenčních materiálů je uveden v tabulce č. 3.

Vedle uvedených kontrol zahrnuje každá rutinní analýza vzorku i tzv. beztemplátovou kontrolu každého běhu PCR pro vyloučení kontaminací, které by mohly způsobit falešně pozitivní výsledky.

Tabulka č. 3: Přehled CRM

Plodina	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Původ, certifikát od	Poznámka
Kukuřice	–	59122 maize (1 % a 10 %)	Set ERM-BF424, Fluka Biochemica IRMM	Dried maize powder
Řepka	IRM 2,3,4,5	–	ÚKZÚZ – ZS Hradec nad Sázavou	Směs negativních kontrol

3.2.5 Další chemikálie (nedodávané v rámci kitů):

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo označené „pro molekulární biologii“.

1. Voda vhodná pro PCR (vodivost do 2 μS),
2. Agaróza pro molekulární biologii (A-5093 Sigma, pro rutinní použití) – pro elektroforézu,
3. Denaturovaný ethanol – pouze do střiček pro čištění povrchů,
4. 95% až 100 % ethanol pro ředění „Wash Solution“ při izolaci DNA,
5. Ethidiumbromid – zásobní a pracovní roztok (Merck, 1%) – pro elektroforézu,
6. Elektroforetický marker pro amplifikáty (GeneRuler 50bp DNA Ladder SMO373 Fermentas, uchovává se ve zkumavkách po cca 20 μl),
7. Ribonukleáza A (ENO 531 Fermentas),
8. Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE (Sigma):
    - Na 2(disodná sůl kyseliny ethyléndiamintetraoctové),
    - Trizma base [tris-(hydroxymethyl)aminomethan],
    - Ledová kyselina octová.

3.3 Vzorky

Vzorky kukuřice byly dodány odborem krmiv ÚKZÚZ (krmná surovina - kukuřičné zrno). Genetická modifikace, jejíž detekce byla nově zavedena, však u nich nalezena nebyla.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Izolace rostlinné DNA a DNA referenčního materiálu

Metodika je přesně popsána v manuálech uvedených kitů a v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“. Navážka mletého vzorku je dvakrát po 60 mg na každý vzorek.

Rozemletý zhomogenizovaný vzorek podstupuje lýzi buněk lyzačním pufrem za přítomnosti proteinázy, degradaci RNA, vysrážení a odstranění ostatních buněčných komponent, navázání DNA na silikagel upevněný v kolonce, promytí navázané DNA a její rozpuštění v elučním pufru. K amplifikaci se používá izolát DNA v objemu dle návodu výrobce PCR kitů.

3.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Příprava reakční směsi

1. Připraví se PCR box: pracovní nástroje a pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů ethanolem a UV zářením po 30 min.

2. Stanoví se počet reakcí (počet vzorků plus příslušné kontroly). Dle tabulky reakčních směsí se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Výsledný objem celkové reakční směsi je 50 µl, viz tabulka č. 1.

3. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí: redestilovaná H_2O, REDTaq Mix (obsahující všechny komponenty potřebné pro PCR včetně DNA-polymerázy) a primery specifické pro hledaný úsek DNA. Tato směs bez templátu se rozpipetuje po množstvích stanovených v tabulce do přichystaných amplifikačních zkumavek.

4. Nakonec se do každé zkumavky přidá 5 µl templátové DNA. Pro beztemplátovou kontrolu se místo templátové DNA přidá tentýž objem vody.

5. Amplifikační zkumavky s dobře utěsněným víčkem se vloží do jamek v bloku termocykleru a spustí se příslušný program.

3.4.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

Je standardní metodou pro tzv. "end-point" vyhodnocení PCR (tj. vyhodnocení po ukončení celé amplifikace), vhodnou pro kvalitativní detekce GMO.

1. Příprava gelu: Uvaří se 2% agarózový gel v elektroforetickém TAE-pufru (Tris-acetát-EDTA). Připraví se nalévací vanička se vhodným hřebínkem. "Zuby" hřebínku vytvoří v tuhnoucím gelu jamky konstantní velikosti. Po mírném zchlazení se přidá roztok ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu), opatrně zamíchá a nalije se do vaničky. Po ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, gel se přenese do elektroforetické vany a převrství se TAE-pufrem.

2. Nanášení vzorků: Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Promyslí se rozvržení vzorků a markerů. Vzorky před nanesením do jamek není třeba barvit (oba používané amplifikační kity používají červenou DNA-polymerázu a toto barvivo během chodu elektroforézy indikuje postup DNA v gelu.) Do jamek se nanesou vzorky amplifikátů a marker molekulové

hmotnosti (obsahuje fragmenty DNA deklarovaných délek) a spustí se chod elektroforézy. Pro amplifikáty se používá krokový marker (po 50 bp).

3. Vyhodnocení: Po 45 min. až 55 min. chodu, když rozdělení fragmentů podle jejich délek již dostatečně pokročilo, se gel prosvítí na transiluminátoru a provede se fotodokumentace. Snímky se popisují, vyhodnotí a uchovávají v počítači.

3.4.4 Zavádění nové PCR-detekce: kukuřice DAS 59122

Cílem je ověření funkčnosti primerů podle vytvořeného amplifikačního programu.

1. Naprogramuje se nový program do termálního cykleru dle návodu k použití přístroje. Konkrétní naprogramování cykleru pro kukuřici 59122 uvádí tabulka č. 4.

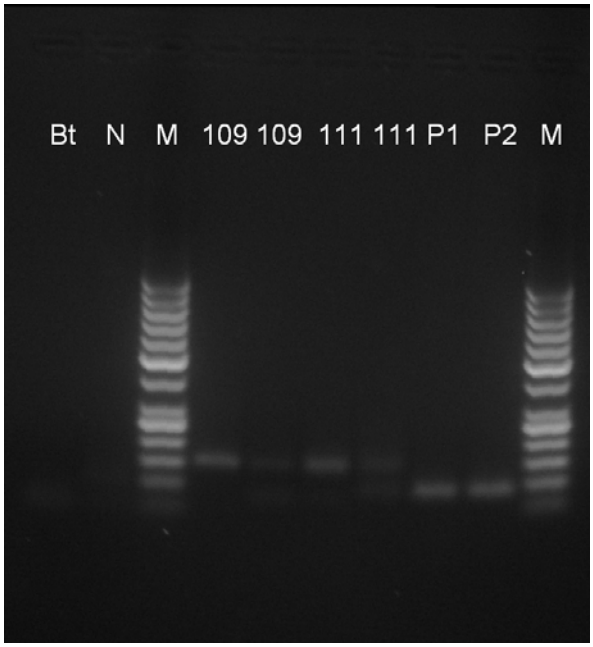
Tabulka č. 4*:* Amplifikované fragmenty a amplifikační program

Hledaný/amplifikovaný úsek		**Amplifikační program**		
Název	**Délka [bp]**	**Název**	**Průběh**	**Poznámka**
Kukuřice DAS	86	C:17 DAS	94 °C/ 8min 30sec /1 cyk. 94 °C/ 0min 30sec 60 °C/ 1min 0sec 72 °C/ 0min 40sec /50 cyklů 72 °C/ 1min 0sec /1 cyk.	Jednoduchá PCR

2. Namíchá se PCR-směs podle tabulek pro daný kit. Jako templát se použije roztok DNA, který obsahuje amplifikovatelný úsek (pozitivní kontrola 1% a 10%). Dále se použije beztemplátová (místo DNA je ve směsi voda) a negativní kontrola, pro zjištění kontaminací a nespecifických reakcí. Jako další se použije DNA ze vzorků kukuřice z laboratoře.

3. Provede se PCR a elektroforéza. Podle obrázků gelu se zjistí přítomnost či nepřítomnost hledaného pruhu, jehož vzdálenost od startu se porovná s 50bp DNA markerem. Výsledek představuje foto č. 1.

Foto č. 1: Amplifikace transgenu DAS, 24.7. 2007

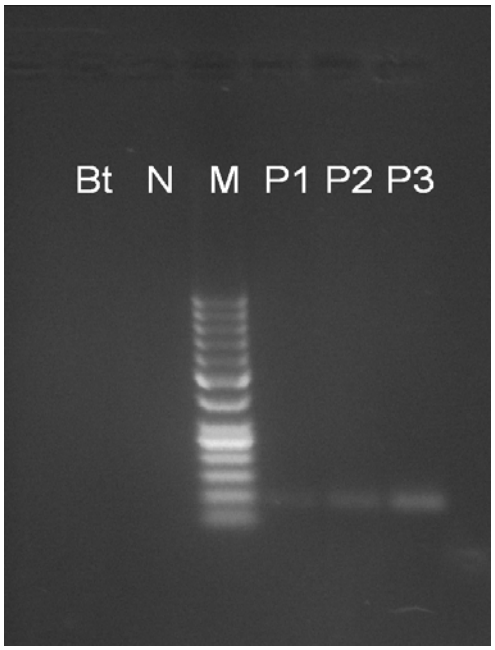


Bt	Beztemplátová kontrola
N	Negativní kontrola IRM 2345
M	Marker 50bp
109,111	Vzorky kukuřice
P1	Pozitivní kontrola CRM 1/2007 1%
P2	Pozitivní kontrola CRM 2/2007 10%

4. Pro zjištění limitu detekce se provede další PCR tak, že se 1% CRM naředí redestilovanou vodou na koncentraci 0,1 %. Namíchá se PCR-směs pro daný kit. Jako templát DNA se použije pouze CRM s koncentrací 0,1 %, 1 % a 10 %.

5. Po skončení PCR reakce se provede elektroforéza. Z obrázku gelu se hodnotí výsledek (opět se srovnáním DNA 50bp markeru), který znázorňuje foto č. 2.

Foto č. 2.: Amplifikace transgenu DAS, 27.7.2007



Bt	Beztemplátová kontrola
N	Negativní kontrola IRM 2345
M	Marker 50bp
P1	Pozitivní kontrola 0,1 % získaná ředěním z CRM 1/2007 1%
P2	Pozitivní kontrola CRM 1/2007 1%
P3	Pozitivní kontrola CRM 2/2007 10%

4 Výsledky a diskuse

Byly analyzovány vzorky krmiv, pozitivní kontroly a negativní kontrola.

V žádném ze vzorků dodaných k rozboru odborem krmiv ÚKZÚZ nebyla detekována přítomnost uvedené modifikace.

Jako pozitivní kontroly pro PCR se zde používají 2 druhy RM ve formě mouky, které byly zakoupeny přes firmu Fluka Biochemica od IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Belgie. Jako 3. pozitivní kontrola byl naředěn RM tak, aby obsah GMO byl 0,1 %. Ve všech pozitivních kontrolách byla nalezena genetická modifikace 59122.

5 Závěr

Byla vyzkoušena technika detekce a identifikace DNA v rámci JPP a ověřena jejich vhodnost v podmínkách pracoviště. Byla zavedena metoda pro detekci další modifikace odrůd kukuřice: 59122 DAS, která bude začleněna do Jednotných pracovních postupů.

6 Literatura

1. MAZZARA M., CODEIL S., EEDE G.: Event-specific method for the quantification of maize line DAS-59122 using real-time PCR, Validation Report, Community Reference Laboratory for GM Food And Feed Italy, Joint Research Centre, http://gmo-crl.jrc.it, **2005**

2. MAZZARA M., CODEIL S., EEDE G.: Event-specific method for the quantification of maize DAS-59122 using real-time PCR, Protocol, Community Reference Laboratory for GM Food And Feed Italy, Joint Research Centre, http://gmo-crl.jrc.it, **2005**

Zavedení detekce rostlinných patogenů

Hana Hájková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř – Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
hana.hajkova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Cílem této práce bylo pomocí nového postupu izolovat a detekovat rostlinné patogeny – fytoplazmy. Detekce se provede pomocí metody PCR, kterou laboratoř využívá při detekci GMO v krmivech a osivech.

2 Úvod

Fytoplazmy jsou obligátní intracelulární patogeny, které vyvolávají řadu významných chorob zemědělských plodin, např. stolbur brambor, proliferaci jabloně, chřadnutí hrušně nebo evropskou žloutenku peckovin. Existuje několik druhů metod detekce fytoplazmových onemocnění, mezi něž patří také metody molekulární – polymerázová řetězová reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP) a sekvenování. Vzhledem ke zkušenosti s PCR bude právě tuto metodu laboratoř využívat při detekci fytoplazem. Laboratoř bude v diagnostice používat izolační a detekční komerční kity.

3 Materiál a metody

Základem této metody je 1. homogenizace rostlinného materiálu, 2. izolace DNA z daného vzorku, 3. amplifikace DNA pomocí PCR a 4. vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Výsledky se vyhodnocují za použití systému kontrol a ve srovnání s pozitivním materiálem, který je součástí detekčních kitů.

3.1 Přístroje a pomůcky

1. Homogenizátor roller (na zpracování čerstvého rostlinného materiálu, podmínkou je možnost dekontaminace),
2. Váhy laboratorní,
3. Elektrická vodní lázeň,

4. Centrifuga,
5. Biohazard-box,
6. Elektromagnetické míchadlo,
7. Elektroforetická vana a zdroj,
8. Gelově-dokumentační zařízení.

Sterilizace a dekontaminace se volí podle charakteru materiálu - buď tepelně (sušárna, autokláv), nebo chemicky (např. ethanol, Savo apod.).

3.2 Chemikálie a roztoky

Při homogenizaci rostlinného materiálu se používá

1. $K_2PO_4.3H_2O$,
2. KH_2PO_4,
3. Sacharóza,
4. BSA (frakce V.),
5. Polyvinylpyrrolidon,
6. Kyselina askorbová.

Dále jeden kit pro izolaci DNA a jeden pro detekci (Přesné chemické složení jednotlivých reagencií výrobce kitů neuvádí). Dále se používá iTaq^{TM} DNA Polymerase (obsahuje polymerázu 5U/µl, 10x iTaq^{TM} Buffer, $MgCl_{2)}$.

3.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu (pufr Dellaporta)

1. Hydrogenfosporečnan draselný trihydrát $K_2PO_4.3H_2O$,
2. Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4,
3. Sacharóza,
4. Bovine serum albumin (frakce V.),
5. Polyvinyl pyrrolidon (PVPK15),
6. Kyselina askorbová.

3.2.2 Kit pro izolaci DNA

DNeasy Plant Mini Kit, výrobce Qiagen, pro izolaci celkové DNA z rostlinných buněk a tkání.

Kit obsahuje: Buffer AP1, Buffer AP2, Buffer AP3/E (před prvním použitím se ředí ethanolem 95% až 100% dle návodu), Buffer AW (před prvním použitím se ředí ethanolem 95% až 100% dle návodu), Buffer AE, RNase A, DNeasy Mini Spin Columns, QIAshredder Mini Spin Columns, Collection Tubes (sběrné zkumavky) o objemu 2 ml.

3.2.3 Kit pro amplifikaci DNA

Kit Universal Phytoplasma, výrobce Loewe.

Obsahuje

1. Premix Universal Phytoplasma (směs primerů a dNTPs),
2. Pozitivní kontrola (DNA nakažené rostliny),
3. Negativní kontrola (DNA zdravé rostliny).

Vedle uvedených kontrol zahrnuje každá rutinní analýza vzorku i beztemplátovou kontrolu každého běhu PCR (místo DNA se přidá voda) pro vyloučení kontaminací, které by mohly způsobit falešně pozitivní výsledky.

3.2.4 Polymeráza

iTaq^{TM} DNA Polymerase, výrobce Biorad

1. Taq polymeráza 5U/µl,
2. 10x iTaq^{TM} Buffer (Polymerase buffer),
3. Roztok $MgCl_2$.

Přípravu reakční směsi pro PCR udává následující tabulka zpracovaná dle pokynů výrobce k použití kitu.

Tabulka č. 1: Příprava PCR, kit Universal Phytoplasma

Složka	1 reakce µl	2 reakce µl	3 reakce µl	4 reakce µl	5 reakcí µl	10 reakcí µl
Voda	32	64	96	128	160	320
Premix Universal	10	20	30	40	50	100
Polymerase Buffer	5	10	15	20	25	50
$MgCl_2$	3	6	9	12	15	30
Taq Polymerase	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2
Templát	5	2 × 5	3 × 5	4 × 5	5 × 5	10 × 5
Reakční směs včetně templátu	55,2	110,4	165,6	220,8	276	552

3.2.6 **Potřebné chemikálie** (nedodávané v rámci kitů)

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo označené „pro molekulární biologii“.

1. Voda vhodná pro PCR (vodivost do 2 μS),
2. Agaróza pro molekulární biologii (A-5093 Sigma, pro rutinní použití) – pro elektroforézu,
3. Denaturovaný ethanol – pouze do střiček pro čištění povrchů,
4. (95 – 100)% ethanol pro ředění „Wash Solution“ při izolaci DNA,
5. Ethidiumbromid – zásobní a pracovní roztok (Merck, 1%) – pro elektroforézu,
6. Elektroforetický marker pro amplifikáty (EZ Load™ Molecular Ruler 100bp PCR Biorad, uchovává se v chladničce),
7. Elektroforetický marker pro amplifikáty (EZ Load™ Molecular Ruler 500bp PCR Biorad, uchovává se v chladničce),
8. Elektroforetický hmotnostní marker (EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad, uchovává se v chladničce),
9. Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE (Sigma):
    - Na 2(disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové),
    - Trizma base [tris-(hydroxymethyl)aminomethan],
    - Ledová kyselina octová.

3.2.7 **Příprava pufru Dellaporta**

Příprava pufru Dellaporta

1. Hydrogenfosporečnan draselný trihydrát $K_2PO_4.3H_2O$	43,4 g,
2. Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4	8,2 g,
3. Sacharóza	200 g,
4. Bovine serum albumin (frakce V.)	3 g,
5. Polyvinyl pyrrolidon (PVPK15)	40 g,
6. Kyselina askorbová	1,06 g/ 200 ml pufru.

Chemikálie 1.- 5. se rozpustí ve sterilní destilované vodě a doplní do objemu 2 l. Takto připravený roztok lze uchovávat při minus 20 °C. Před použitím na homogenizaci rostlinného materiálu se rozpustí a přidá potřebné množství kyseliny askorbové (6.), upraví se na pH 7,6 a do druhého dne spotřebuje. Pufr se používá vychlazený na teplotu 4 °C.

3.3 Vzorky

K dispozici byly tři pozitivní vzorky jabloně napadené Apple proliferation phytoplasma z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského (VŠÚO) v Holovousech.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Na diagnostiku fytoplazmových onemocnění je třeba čerstvý rostlinný materiál. Jako vzorek se používají cévní svazky listů (středové žilky) a lýko z větví. Vzhledem k citlivosti patogenů na vyšší teplotu se pracuje v klimatizované místnosti (cca 16 °C). Také vzorky, spotřební materiál (zkumavky, sáčky…) a pufr se před použitím uchovávají v chladničce.

Postup homogenizace

Do Petriho misky se nastříhají střední žilky listů a naškrábe lýko (cca 2 g). Přelije se 5 ml vychlazeného pufru. Materiál se potom vloží do homogenizátoru (roller), přelije dalšími cca 15 ml pufru a ten se sbírá do vychlazené 50ml zkumavky. Inkubuje se 10 minut na ledě (v lednici). Pak se vzorek centrifuguje 4 min, 1000 g, 4 °C (centrifuga se předem vychladí) a supernatant se slije do nové vychlazené 50ml zkumavky. Tím se odstraní hrubý balast, centrifuguje se 25 min, 10000g, 4 °C. Supernatant se vylije a pelet se použije pro izolaci DNA.

3.4.2 Izolace DNA

Na izolaci DNA se používá komerční kit DNeasy Plant Mini Kit (výrobce Qiagen).

Pracovní postup

1. Do 50ml zkumavky s peletem z rostlinného materiálu se napipetuje 800 µl pufru AP1 a řádně promíchá. Poté se přenese 2 × 400 µl této suspenze do dvou čistých 2ml zkumavek typu eppendorf. Tak se získají z jednoho homogenizovaného vzorku dva vzorky paralelní, které se využijí na detekci fytoplazem. Do každé zkumavky se přidají 4 µl RNázy A a promíchá se na vortexu.
2. Inkubuje se 10 min při 65 °C ve vodní lázni. Během inkubace se 2 × až 3 × vzorky promíchají. V tomto kroku probíhá lýze buněk.
3. K lyzátu se přidá 130 µl pufru AP2, promíchá a inkubuje se 5 min na ledu (vysrážení bílkovin, polysacharidů).
4. Centrifuguje se 5 min při 14 000 rpm.
5. Supernatant se napipetuje do QIAshreddes Mini spin kolonek, které jsou umístěny ve sběrných 2ml zkumavkách a centrifuguje se 2 min při 14000 rpm.

6. Proteklá tekutina se přenese do nové 2ml zkumavky a přidá se cca 1,5 objemu pufru AP3/E. Promíchá se opakovaným pipetováním. (Do pufru AP3/E se před prvním použitím kitu přidá 96% ethanol - množství je uvedeno na lahvičce).
7. Pipetuje se 650 µl vzniklé směsi do kolonek DNeasy Mini spin, umístěných ve sběrných zkumavkách. Centrifuguje se 1 min při 8000 rpm. Proteklá tekutina se vylije.
8. Zopakuje se předchozí krok se zbytkem směsi.
9. DNeasy Mini spin kolonky se přemístí do nových sběrných zkumavek a přidá se 500 µl pufru AW. (Do pufru AW se před prvním použitím kitu přidá 96% ethanol - množství je uvedeno na lahvičce). Centrifuguje se 1 min při 8000 rpm.
10. Znovu se přidá 500 µl pufru AW a centrifuguje 2 min při 14000 rpm.
11. Kolonky DNeasy Mini spin se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se pipetuje 100 µl pufru AE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté centrifuguje 1 min při 8000 rpm. V proteklé tekutině se nachází vyizolovaná DNA.

3.4.3 Polymerázová řetězová reakce PCR

Příprava reakční směsi

1. Připraví se PCR box: pracovní nástroje a pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů ethanolem a UV zářením po 20 min.
2. Stanoví se počet reakcí (počet vzorků plus příslušné kontroly). Dle tabulky reakčních směsí se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Výsledný objem celkové reakční směsi je 55,2 µl včetně templátové DNA.
3. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí: redestilovaná H_2O, premix Loewe, pufr, $MgCl_2$ a polymeráza. Tato směs bez templátu se rozpipetuje po množstvích stanovených v tabulce do přichystaných amplifikačních zkumavek.
4. Nakonec se do každé zkumavky přidá 5 µl templátové DNA. Pro beztemplátovou kontrolu se místo templátové DNA přidá tentýž objem vody.
5. Amplifikační zkumavky s dobře utěsněným víčkem se vloží do jamek v bloku termocykleru a spustí se příslušný program, který uvádí výrobce kitu (viz tab. č. 1).

Tabulka č. 2: Amplifikované fragmenty a amplifikační programy

Hledaný / amplifikovaný úsek		Amplifikační program		
Název	**Délka [bp]**	**Název**	**Průběh**	**Poznámka**
Fytoplazma (univerzální)	862	UNIVERS	95 °C/ 2min 30sec /1 cyklus 93 °C/ 0min 20sec 55 °C/ 0min 60sec 72° C/ 0min 60sec /35 cyklů 72 °C/ 5min /1 cyklus	jednoduchá PCR

3.4.4 Elektroforéza v agarózovém gelu

Je standardní metodou pro tzv. "end-point" vyhodnocení PCR (tj. vyhodnocení po ukončení celé amplifikace).

1. Příprava gelu

Uvaří se 1,5% agarózový gel v elektroforetickém TAE-pufru (Tris-acetát-EDTA). Připraví se nalévací vanička s vhodným hřebínkem a vyrovná se vodováhou. "Zuby" hřebínku vytvoří v tuhnoucím gelu jamky konstantní velikosti. Po mírném zchlazení se přidá 0,1% roztok ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu), opatrně zamíchá a nalije se do vaničky. Po ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, gel se přenese do elektroforetické vany a převrství se TAE-pufrem.

2. Nanášení vzorků

Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Je nutné promyslet rozvržení vzorků a markerů. Vzorky před nanesením do jamek je třeba barvit roztokem bromfenolové modři. Po nanesení vzorků amplifikátů a markeru molekulové hmotnosti (obsahuje fragmenty DNA deklarovaných délek) se spustí chod elektroforézy. Pro amplifikáty se používá krokový marker (100 a 500 bp).

3. Vyhodnocení

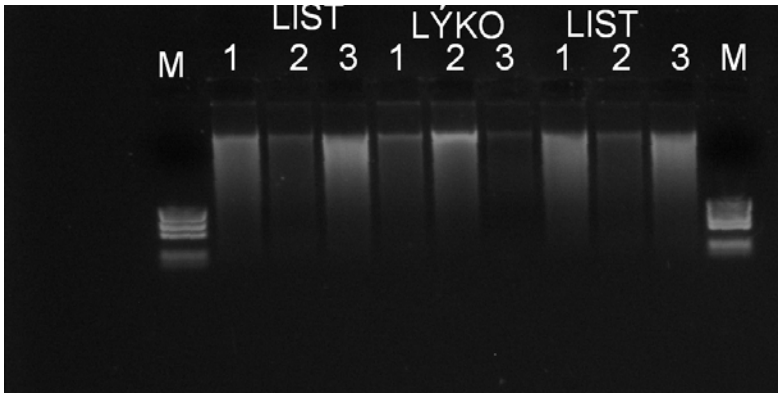
Po dostatečném rozdělení fragmentů (čas a napětí chodu elektroforézy závisí na zařízení, délce hledaných fragmentů, velikosti gelu) se vyjme gel z lázně a prosvítí se na transiluminátoru. Provede se fotodokumentace, snímky se popíší, vyhodnotí a uchovají v počítači.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Zavádění detekce fytoplazem

Dle postupů uvedených v bodě 3.4. se nejprve vzorky zhomogenizovaly a poté byla DNA izolována pomocí kitu DNeasy Plant Mini. 3 µl izolované DNA byly smíchány s nanášecí barvou a vloženy do jamek 1% agarózového gelu, viz obrázek 1.

Obrázek č. 1: Izolovaná DNA

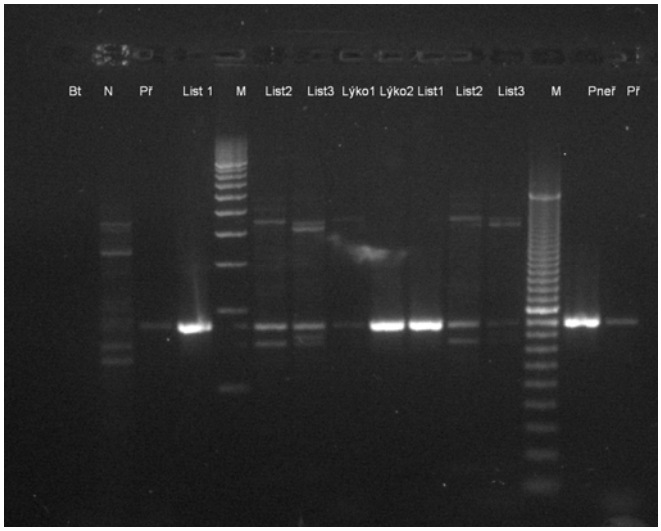


LIST	Materiál střední žilky listů
LÝKO	Materiál lýko
1, 2, 3	Různé vzorky zaslané z VŠÚO
M	Hmotnostní standard DNA

Na fotografii jsou patrné více i méně viditelné pruhy znázorňující vyizolovanou DNA, která zde představuje kompletní DNA z daného vzorku (rostliny) včetně DNA fytoplazem. Do jejího množství tudíž zasahuje také nerovnoměrné rozmístění a koncentrace fytoplazem v rostlině. Další možností různorodosti pruhů je menší množství vzorku, určeného k homogenizaci a izolaci DNA a také nepřesné pipetování při izolaci. Ve vzorcích 1 a 3 je více DNA v listech a méně v lýku, ve vzorku 2 je tomu opačně. Ačkoliv kvalita fotografie po přenesení do textu není příliš vysoká, izolovaná DNA je viditelná v každém běhu agarózového gelu.

Poté se izolovaná DNA použila k přípravě reakční směsi (viz tab. 1) s tím rozdílem, že se vzorky naředily 5 × vodou. Je vhodné, aby vyšší množství DNA reakci nepřetížilo. Byla naředěna i pozitivní kontrola. Dále následovala polymerázová řetězová reakce podle amplifikačního programu (viz tab. č. 2). Výsledek je znázorněn na obrázku č. 2.

Obrázek č. 2: PCR – Universal phytoplasma kit



M	Marker 100 bp a 500 bp,
N	Negativní kontrola,
List 1-3 + Lýko1,3	Vzorky z VŠÚO,
Bt	Beztemplátová kontrola,
Př	Pozitivní kontrola ředěná (5 ×),
Pneř	Pozitivní kontrola neředěná.

Je patrné, že ve srovnání s pozitivními kontrolami jsou všechny vzorky pozitivní. Intenzita pruhů (o velikosti 862 bp) se liší. Tento rozdíl je opět způsoben nepravidelným rozmístěním a koncentrací fytoplazem v rostlině. Další možným zdrojem těchto odchylek je nepřesné pipetování malých objemů při přípravě reakční směsi. Silně pozitivní jsou vzorky list 1 a lýko 2, ostatní vzorky mají pruhy méně viditelné. I přes horší kvalitu fotografie byla prokázána pozitivita všech vzorků v listech i v lýku. Dále byla analyzována neředěná i ředěná pozitivní kontrola, která svou pozitivitu prokázala v obou případech, ale při dalších analýzách se bude používat kontrola neředěná, protože dává lépe viditelný výsledek. V případě rostlinného materiálu se bude používat směsný vzorek z listů a lýka, aby mohly být zachyceny fytoplazmy z různých částí rostliny.

Vzorky roubů jabloní, pozitivní kontrola a negativní kontrola byly analyzovány pomocí metody PCR.

Všechny vzorky dodané k rozboru Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským v Holovousech byly detekovány jako pozitivní. Vzorky mají různou intenzitu pozitivity, protože při analýze záleží na mnoha okolnostech jako jsou vhodný výběr rostlinného materiálu, stupeň napadení rostliny, uchovávání nebo čerstvost rostliny. Tato skutečnost navíc odpovídá reálnému výskytu fytoplazem v přírodě.

Cílem detekce je však pouze kvalitativní vyhodnocení – zda vzorek je nebo není pozitivní (z tohoto důvodu se neuvádí detekční limit).

U této detekce se využívají ke srovnání kontroly (pozitivní a negativní), které jsou součástí kitu. Jsou dodávány ve formě lyofilizátu a mají podle výrobce neomezenou exspirační dobu.

5 Závěr

Byla vyzkoušena technika izolace a amplifikace DNA a ověřena jejich vhodnost v podmínkách pracoviště. Byly detekovány rostlinné patogeny (fytoplazmy) pomocí PCR a byla zavedena metoda pro jejich detekci. Tato metoda, ve které byl při detekci použit Universal Phytoplasma kit, se vztahuje na jakýkoliv druh fytoplazem. V analýzách budou využívány také jiné komerční kity (výrobce Loewe) na určení konkrétní skupiny fytoplazem, u kterých je pracovní postup totožný s kitem univerzálním.

6 Literatura

1. Navrátil, Fialová a kolektiv autorů. Fytoplazmy - obligátní intrabuněčné patogeny, Diagnostika fytoplazem a výsledky průzkumu Státní rostlinolékařské správy. *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, **2008**, 6 – 26, 62 – 67

2. Navrátil, Válová, Fialová, Nečas: Detekce a identifikace škodlivých fytoplazem ovocných dřevin, matodika PCR detekce PřF UP v Olomouci, **2002**, 1 – 16

3. Nečas, Krška, Detection of Phytoplasma ESFY in Apricot Trees using Phloem and Petioles, Plant Protect.Sci., **2005**, 132 – 140

4. Fialová, Navrátil, Valová, Phytoplasma Occurence in Apple Trees in the Czech Republic, Plant Protect.Sci., **2003**, 7 – 12

5. Data Sheets on Quarantine Pests: Apple proliferation cytoplasma, www.eppo.org

Ověření možnosti náhrady klasického 1mm sítka mlýnku ZM 200 při mletí slunečnicových semen za distanční sítko 1,5 mm

Zdeněk Kejla
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava
zdenek.kejla@ukzuz.cz

1 Úvod

Obsah oleje ve slunečnicových semenech se v laboratořích ÚKZÚZ stanovuje metodou NIR spektroskopie. Před vlastním měřením je nutno vzorek pomlít, neboť analýza nepomletých semen nedává spolehlivé výsledky. Mele se běžně na mlýnku Retsch ZM 200 za použití sítka o velikosti ok 1 mm. Obecně lze konstatovat, že při mletí semen s vysokým obsahem oleje dochází k zahřívání mlecích segmentů, k separaci olejnatých částí semen a jejich nanášení na sítko a mlecí komoru. Tyto agregované olejnaté části semene se po ukončení mletí jednotlivých vzorků obtížně ze sítka a mlecí komory vyjímají a navíc se musejí následně homogenizovat se zbytkem pomletého vzorku.

V případě použití distančního sítka s otvory 1,5 mm se díky větší mezeře mezi rotorem a pevným kruhovým sítkem dosáhne šetrnějšího zpracování mletého materiálu, který se zahřívá jen minimálně a nenalepuje se na mlecí segmenty.

Cílem práce bylo na souboru vzorků semen slunečnic proměřit obsah oleje a porovnat výsledky, dosažené na sítku 1 mm (stávající postup) s výsledky vzorků, pomletých na distančním sítku 1,5 mm. Pokud by bylo dosaženo srovnatelných výsledků, používání distančního sítka 1,5 mm by bylo významným přínosem při mletí slunečnicových semen. Zjednodušila by se manipulace se vzorky a zlepšila by se homogenita měřeného vzorku.

2 Materiál a metody

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Ultraodstředivý mlýn Retsch ZM 200 se sítkem 1,0 mm a distančním sítkem 1,5 mm,

2.1.2 Spektrofotometr FOSS NIRSystem 6500,

2.1.3 Kyvety typu small ring cup s křemenným okénkem o průměru 4,5 cm.

2.2 Metoda zkoušení

Při zkoušení vzorků se postupovalo podle JMZ č. 7 – Stanovení tuku (oleje) ve slunečnicovém semenu, řepce jarní a řepce ozimé metodou NIRS. Měřilo se na souboru 230 náhodně vybraných vzorků slunečnice z odrůdových zkušeben ÚKZÚZ (sklizeň 2007). Každý vzorek slunečnice byl po pomletí a zhomogenizování nadávkován do kyvety (2.1.3) a bylo nasnímáno reflektanční spektrum v rozsahu 400 nm – 2500 nm. S použitím softwaru WinISI II (fa ISI LLC., USA) a MatLab (fa MathWorks, USA) pak byla část spektra v oblasti 1100 nm – 2500 nm převedena do kalibrační rovnice a vyhodnocen parametr „olej v sušině“. Vzorky byly nejprve analyzovány po pomletí s použitím klasického sítka 1,0 mm a poté po pomletí s použitím distančního sítka 1,5 mm.

2.3 Vyhodnocování

Výsledky stanovení vzorků po pomletí na sítkách 1,0 mm a 1,5 mm byly pro porovnání obou postupů zpracovány softwarem EffiValidation 3.0 (fa EffiChem, Lysice, CZ).

3 Výsledky

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 1a až 1d. Vždy je uveden průměr ze dvou paralelních stanovení pro analýzu po pomletí na sítku 1,0 mm a 1,5 mm a rozdíl v hodnotách získaných těmito dvěma postupy, vyjádřený v relativních procentech.

Tabulka 1a: Porovnání výsledků analýz oleje po pomletí na sítech 1,0 mm a 1,5 mm

Číslo vzorku	**Síto 1,0 mm** Olej (% / s)	**Síto 1.5 mm** Olej (% / s)	**Rozdíl** (% rel.)	**Číslo vzorku**	**Síto 1,0 mm** Olej (% / s)	**Síto 1.5 mm** Olej (% / s)	**Rozdíl** (% rel.)
3385	56,58	54,77	+ 3,25	**3423**	52,13	52,30	– 0,33
3386	48,81	49,48	– 1,36	**3424**	53,93	53,08	+ 1,59
3387	53,23	53,25	– 0,04	**3425**	49,83	50,42	– 0,98
3388	53,32	54,16	– 1,56	**3426**	49,50	50,21	–1,42
3389	49,09	49,70	– 1,23	**3427**	52,34	52,52	– 0,34
3390	49,94	49,93	+ 0,02	**3428**	56,19	54,56	+ 2,94
3391	52,70	53,39	– 1,30	**3429**	51,64	52,42	– 1,50
3392	58,03	56,96	+ 1,86	**3433**	46,29	45,64	+ 1,41
3393	52,23	52,28	– 0,10	**3434**	45,04	43,80	+ 2,79
3397	57,95	56,72	+ 2,15	**3435**	46,46	45,67	+ 1,71
3398	51,55	51,14	+ 0,80	**3436**	46,36	47,01	– 1,39
3399	53,26	52,17	+ 2,07	**3438**	42,97	43,40	– 1,00
3400	53,92	54,02	– 0,19	**3439**	46,85	46,54	+ 0,66
3401	50,41	51,15	– 1,46	**3440**	47,23	46,22	+ 2,38
3402	49,94	50,36	– 0,84	**3441**	47,04	46,74	+ 0,64
3403	54,24	53,09	+ 2,14	**3445**	56,20	55,06	+ 2,05
3404	58,80	56,93	+ 3,23	**3446**	50,02	49,16	+ 1,73
3405	52,83	52,87	– 0,08	**3447**	50,11	50,57	– 0,91
3409	52,80	52,29	+ 0,97	**3448**	53,30	53,16	+ 0,26
3410	45,25	45,27	– 0,04	**3450**	47,27	48,05	– 1,64
3411	49,67	49,70	– 0,06	**3451**	49,04	49,50	– 0,93
3412	50,07	49,99	+ 0,16	**3452**	40,56	41,18	– 1,52
3413	48,42	47,71	+ 1,48	**3453**	49,92	50,25	– 0,66
3414	46,71	47,26	–1,17	**3454**	53,15	53,08	+ 0,13
3415	50,27	49,81	+ 0,92	**3455**	48,99	49,15	– 0,33
3416	51,41	51,43	– 0,04	**3456**	46,22	47,65	– 3,05
3417	49,83	48,57	+ 2,56	**3457**	48,35	48,79	– 0,91
3421	55,07	54,78	+ 0,53	**3458**	47,51	48,66	– 2,81
3422	47,88	48,80	–1,90	**3459**	54,28	53,43	+ 1,58

Tabulka 1b: Porovnání výsledků analýz oleje po pomletí na sítech 1,0 mm a 1,5 mm

Číslo vzorku	Síto 1,0 mm Olej (% / s)	Síto 1.5 mm Olej (% / s)	Rozdíl (% rel.)	Číslo vzorku	Síto 1,0 mm Olej (% / s)	Síto 1.5 mm Olej (% / s)	Rozdíl (% rel.)
3460	49,38	49,31	+ 0,14	**3498**	57,74	58,26	– 0,90
3461	52,83	52,92	– 0,17	**3500**	50,22	51,03	– 1,60
3462	55,50	54,98	+ 0,95	**3501**	54,19	53,77	+ 0,78
3463	47,95	48,69	– 1,53	**3502**	51,97	51,28	+ 1,34
3464	46,64	47,96	– 2,79	**3503**	52,90	52,83	+ 0,13
3465	48,92	48,18	+ 1,52	**3504**	53,36	52,78	+ 1,09
3466	49,83	49,31	+ 0,44	**3505**	50,48	50,68	– 0,40
3467	48,80	48,84	– 0,08	**3506**	52,86	53,80	– 1,76
3468	46,92	47,75	– 1,75	**3507**	57,73	58,51	– 1,34
3469	46,99	48,22	– 2,58	**3508**	55,76	55,32	+ 0,79
3470	49,79	50,67	– 1,75	**3509**	52,98	53,47	– 0,92
3471	53,71	53,24	+ 0,88	**3510**	55,94	56,68	– 1,31
3472	52,59	52,96	– 0,70	**3511**	53,21	54,65	– 2,67
3473	48,01	47,21	+ 1,68	**3513**	53,49	54,66	– 2,16
3474	49,73	49,79	– 0,12	**3517**	56,02	56,11	– 0,17
3475	51,05	51,46	– 0,80	**3518**	51,57	51,65	– 0,16
3476	48,93	49,88	– 1,92	**3520**	53,35	53,94	– 1,10
3477	49,92	51,05	– 2,24	**3521**	49,99	50,38	– 0,78
3481	58,49	57,32	+ 2,02	**3522**	51,42	52,21	– 1,52
3482	53,10	53,51	– 0,77	**3523**	51,60	52,36	– 1,46
3483	52,37	53,04	– 1,27	**3524**	43,87	42,27	+ 3,71
3484	54,20	54,64	– 0,81	**3525**	49,64	50,97	– 2,64
3485	50,19	51,66	– 2,89	**3526**	52,43	51,91	+ 1,00
3486	51,31	52,83	– 2,92	**3527**	50,62	50,98	– 0,71
3487	52,94	53,48	– 1,01	**3528**	49,22	49,41	– 0,39
3488	44,66	45,61	– 2,10	**3529**	51,55	51,94	– 0,75
3490	53,51	52,77	+ 1,39	**3531**	53,65	53,26	+ 0,73
3491	51,44	51,82	– 0,74	**3532**	51,66	51,96	– 0,58
3492	53,21	50,84	+ 4,56	**3533**	54,36	53,65	+ 1,48
3493	52,45	53,24	– 1,49	**3534**	57,41	56,75	+ 1,16
3494	50,92	51,81	– 1,73	**3535**	48,35	48,82	+ 1,46
3495	56,02	55,76	+ 0,47	**3536**	49,67	50,41	– 1,48
3496	51,84	52,24	– 0,77	**3537**	52,37	52,16	+ 0,40
3497	54,15	54,53	– 0,70	**3538**	49,38	49,79	– 0,71

Tabulka 1c: Porovnání výsledků analýz oleje po pomletí na sítech 1,0 mm a 1,5 mm

Číslo vzorku	Síto 1,0 mm Olej (% / s)	Síto 1.5 mm Olej (% / s)	Rozdíl (% rel.)	Číslo vzorku	Síto 1,0 mm Olej (% / s)	Síto 1.5 mm Olej (% / s)	Rozdíl (% rel.)
3539	51,20	51,26	– 0,12	**3583**	53,25	53,34	– 0,17
3540	51,23	51,03	+ 0,39	**3584**	51,66	52,58	– 1,77
3541	51,27	51,90	– 1,22	**3590**	51,37	51,93	– 1,08
3542	52,13	53,50	– 2,59	**3591**	50,81	51,13	– 0,63
3543	54,81	54,37	+ 0,81	**3593**	52,61	51,68	+ 1,78
3544	54,57	54,33	+ 0,44	**3594**	43,91	44,81	– 2,03
3545	50,95	51,22	– 0,53	**3595**	53,38	53,43	– 0,09
3546	54,59	53,50	+ 2,02	**3596**	50,67	51,41	– 1,45
3547	54,57	53,52	+ 1,94	**3597**	50,14	49,96	+ 0,36
3548	53,53	53,75	– 0,41	**3600**	51,42	50,71	+ 1,39
3549	54,34	53,98	+ 0,66	**3602**	49,76	49,83	– 0,14
3553	53,54	52,45	+ 2,06	**3603**	50,32	50,45	– 0,26
3554	51,15	50,65	+ 0,98	**3604**	52,16	52,13	+ 0,06
3555	50,50	51,63	– 2,21	**3605**	53,63	53,61	+ 0,04
3556	51,66	51,26	+ 0,78	**3606**	52,42	52,35	+ 0,14
3557	48,86	49,81	– 1,93	**3607**	51,19	50,11	+ 2,13
3558	49,01	49,59	– 1,18	**3608**	54,43	54,59	– 0,29
3559	50,12	50,75	– 1,25	**3609**	50,55	50,63	– 0,16
3560	42,80	43,11	– 0,72	**3610**	53,32	52,76	+ 1,06
3561	48,56	49,20	– 1,31	**3611**	47,28	48,10	– 1,72
3562	50,37	51,22	– 1,67	**3613**	50,52	50,90	– 0,75
3563	46,10	47,34	– 2,65	**3617**	51,42	50,81	+ 1,19
3564	46,95	48,24	– 2,71	**3618**	53,88	54,02	– 0,26
3565	48,95	50,18	– 2,48	**3619**	52,70	52,59	+ 0,21
3567	52,17	52,60	– 0,82	**3620**	49,56	50,19	– 1,26
3568	46,59	47,43	– 1,79	**3623**	56,75	55,60	+ 2,05
3569	52,74	52,06	+ 1,30	**3624**	53,49	52,64	+ 1,60
3570	55,03	55,42	– 0,71	**3625**	52,99	50,48	+ 4,85
3574	49,44	48,73	+ 1,45	**3627**	51,37	51,56	– 0,37
3577	46,64	47,39	– 1,60	**3628**	52,77	52,15	+ 1,18
3579	53,46	53,46	0,00	**3631**	55,43	55,35	+ 0,11
3580	53,22	53,42	– 0,38	**3632**	52,24	53,06	– 1,56
3581	46,87	47,61	– 1,57	**3633**	56,90	56,02	+ 1,56
3582	52,57	51,95	+ 1,19	**3634**	53,39	53,62	– 0,43

Tabulka 1d: Porovnání výsledků analýz oleje po pomletí na sítech 1,0 mm a 1,5 mm

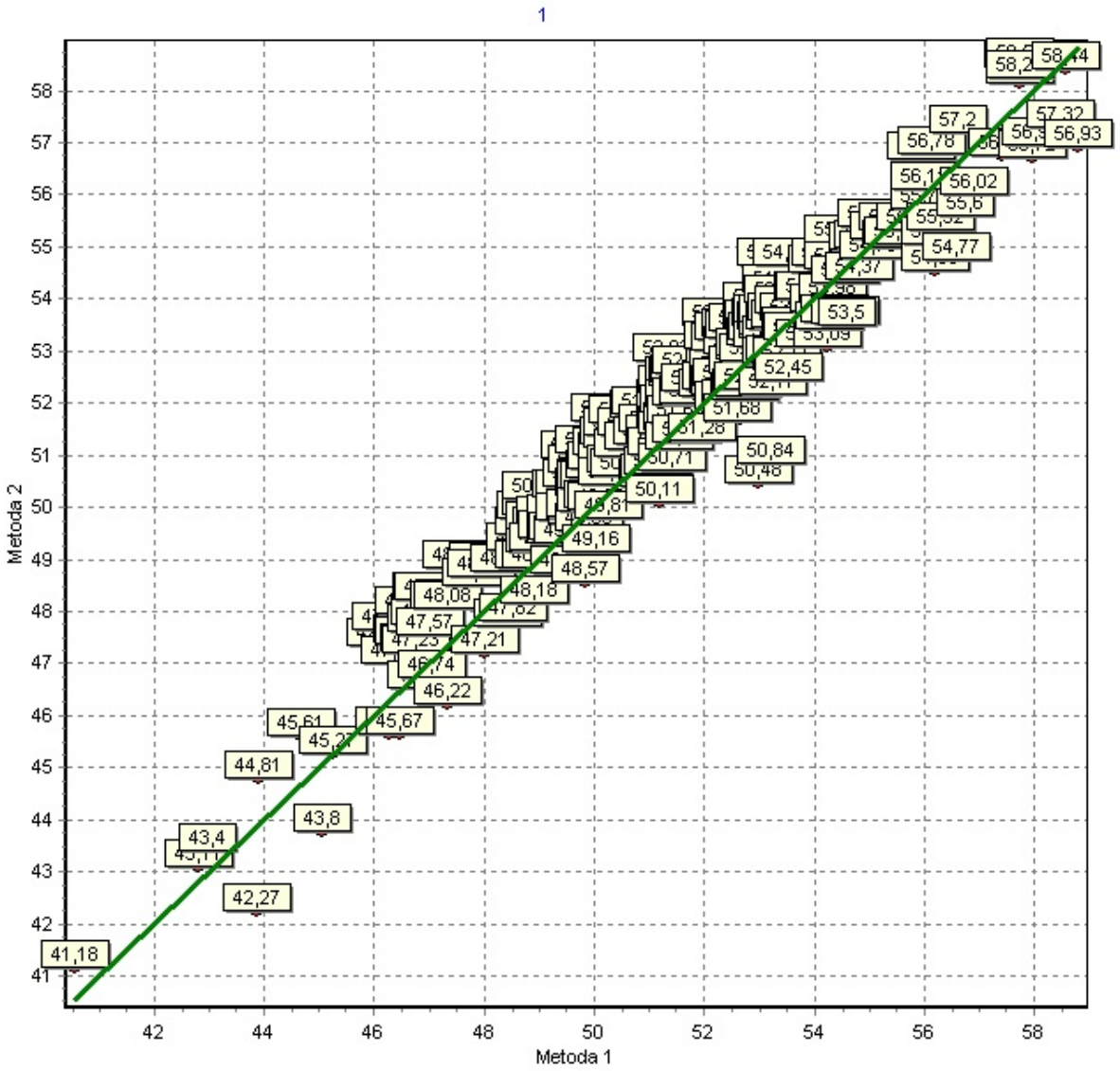
Číslo vzorku	**Síto 1,0 mm** Olej (% / s)	**Síto 1.5 mm** Olej (% / s)	**Rozdíl** (% rel.)	**Číslo vzorku**	**Síto 1,0 mm** Olej (% / s)	**Síto 1.5 mm** Olej (% / s)	**Rozdíl** (% rel.)
3635	53,25	53,57	– 0,60	**3663**	53,65	53,33	+ 0,60
3636	57,72	58,45	– 1,26	**3664**	56,12	56,78	– 1,17
3637	54,98	55,01	– 0,05	**3666**	57,74	58,15	– 0,71
3638	56,62	57,20	– 1,02	**3667**	51,81	52,01	– 0,39
3639	50,31	50,91	– 1,19	**3668**	55,54	55,05	+ 0,89
3640	54,89	54,96	– 0,13	**3675**	49,07	49,18	– 0,22
3641	52,36	52,22	+ 0,27	**3676**	47,01	47,57	– 1,18
3647	52,47	53,30	– 1,57	**3677**	49,91	49,55	+ 0,72
3648	50,89	51,73	– 1,64	**3679**	51,52	51,51	+ 0,02
3649	53,05	53,22	– 0,32	**3680**	48,95	48,86	+ 0,18
3651	56,30	55,32	+ 1,76	**3681**	49,56	49,76	– 0,40
3653	53,15	53,58	– 0,81	**3682**	47,32	48,08	– 1,59
3655	51,53	52,39	– 1,66	**3687**	51,08	50,52	+ 1,10
3656	52,64	53,26	– 1,17	**3690**	50,42	51,41	– 1,94
3659	54,42	55,09	– 1,22	**3691**	49,42	49,39	+ 0,06
3660	53,01	53,12	– 0,21	**3694**	46,75	47,23	– 1,02
3661	58,58	58,44	+ 0,24	**3696**	50,96	50,40	+ 1,10
3662	55,26	55,17	+ 0,16	**3697**	47,85	48,52	– 1,39

Průměrný relativní rozdíl mezi výsledky dosaženými pomletím souboru vzorků na obou sítkách byl 0,093 % oleje v sušině ve prospěch analýz po pomletí na sítku 1,5 mm. Maximální rozdíl mezi oběma postupy nepřesáhl 4,85 % rel.

Správnost nového postupu mletí s využitím distančního sítka 1,5 mm byla ověřena srovnáním obou postupů s použitím t-testu na rozdíl výsledků, který je součástí programu EffiValidation 3.0.

Výsledky t-testu jsou znázorněny na obrázku 1 a v tabulce 2.

Obr. 1: Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (sítko 1,0 mm) a metody 2 (sítko 1,5 mm)



Tabulka 2: Výsledky t-testu na rozdíl výsledků 2 metod

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza
– 0,09347826087	0,73404965561	– 0,18835 až + 0,00139	true

Závěr: Srovnávané metody poskytují statisticky stejné výsledky.

4 Diskuse

Z výsledků uvedených v kapitole 3 vyplývá, že mezi stanovením parametru „olej v sušině“ u slunečnicových semen po pomletí na klasickém sítku 1,0 mm a po pomletí na distančním sítku 1,5 mm není statisticky významný rozdíl. Maximální rozdíl mezi stanoveními byl 2,51 % oleje v sušině, tj. 4,85 % rel., přičemž nejistota měření je 6 % rel. Jen ve čtyřech případech z celkového počtu 230 vzorků byl rozdíl větší než 3 % rel. Z toho vyplývá, že ani nepatrně hrubší mletí na sítku 1,5 mm nemá ve srovnání s mletím na sítku 1,0 mm vliv na výsledek analýzy.

Při stanovení na sítku 1,5 mm jsou výsledky v průměru o 0,09 % oleje v sušině vyšší. To koresponduje se skutečností, že při mletí na tomto sítku nedochází k nalepování olejnatých částí na mlecí segmenty. Tak jsou eliminovány případné ztráty oleje při mletí a přípravě vzorku před měřením. Při práci se sítkem 1,5 mm také dochází k úsporám času při přípravě vzorku, neboť čištění mlecích segmentů je jednodušší. Mlecí segmenty se navíc oproti mletí na sítku 1,0 mm zahřívají jen minimálně a nedochází proto k časovým prodlevám při chladnutí mlýnku. Dále, především u vzorků s vyšším obsahem oleje, nedochází ke spékání olejnatých částí, což přináší další časové úspory při homogenizaci vzorku.

Provedený t-test na rozdíl výsledků dvou metod rovněž potvrzuje, že metodu mletí semen slunečnice na distančním sítku 1,5 mm před analýzou oleje lze použít místo mletí na klasickém sítku 1,0 mm.

5 Závěr

Při stanovení parametru „olej v sušině“ u slunečnicového semene lze při přípravě vzorku používat při mletí distanční sítko 1,5 mm. Metoda dává statisticky stejné výsledky jako při použití klasického sítka 1,0 mm, dochází k úsporám času a jednodušší manipulaci při zpracování a homogenizaci vzorku.

6 Literatura

1. Čižmár D.: Vývoj kalibračních modelů pro parametr olej u slunečnice metodou NIR spektroskopie, Bulletin Národní referenční laboratoře, X., **2006**/3, str. 36 – 41
2. Jednotné metody zkoušení č. 7 – Stanovení tuku (oleje) ve slunečnicovém semenu, řepce ozimé a řepce jarní, Národní referenční laboratoř – regionální oddělení Opava, **2007**
3. Centner V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, **2002**

Zavedení a optimalizace pracovních postupů pro nový automatický extraktor Büchi B-811

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Automatický extraktor Büchi B-811 byl pořízen pro extrakce polychlorovaných bifenylů (PCB), organochlorových pesticidů (OCP) a polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), případně dalších persistentních organických polutantů (POP) z různých materiálů. Extraktor pracuje na podobném principu jako dosud používaný Soxtec (Foss), tj. zrychlené Soxhletovy extrakce. V rámci této práce byla optimalizována doba extrakce a byl vybrán vhodný typ extrakce. Vybrané nastavení bylo ověřeno při extrakci vzorků mezinárodního kruhového testu. Vyhovující výsledky u všech naměřených parametrů prokázaly použitelnost pro tyto účely. Extraktor Büchi B-811 byl zaveden do akreditovaných postupů NRL-RO Brno.

2 Úvod

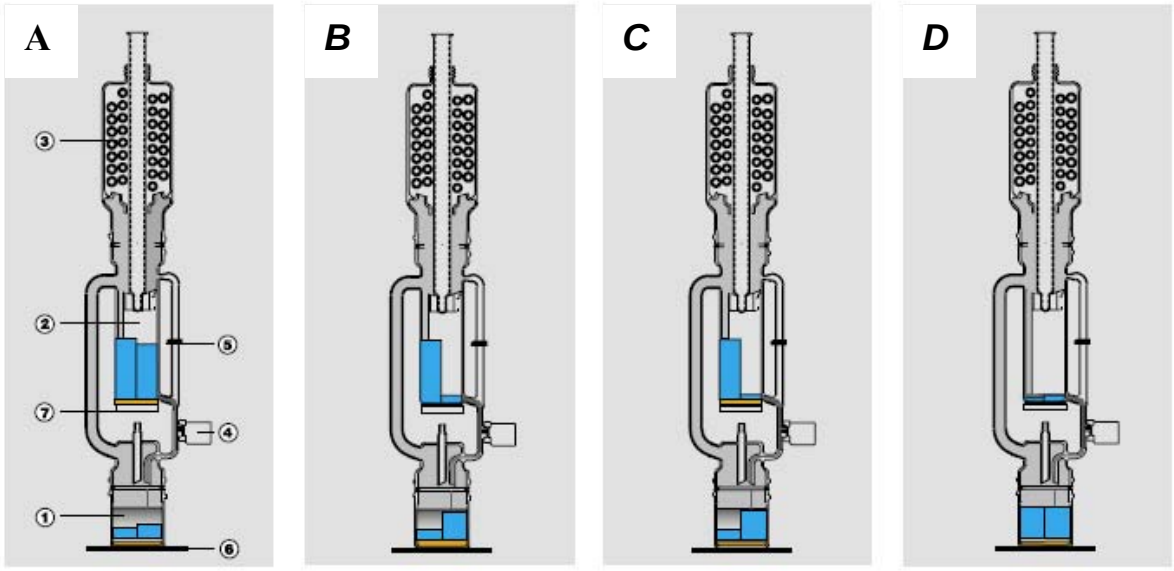
Klasickým způsobem extrakce POP z environmentálních matric je Soxhletova extrakce, která je časově náročná. Doba extrakce pro různé skupiny POP se pohybuje v rozsahu 6 až 24 hodin. Proto je často tato metoda nahrazována účinnějšími extrakčními technikami, například tlakovou extrakcí rozpouštědlem, superkritickou fluidní extrakcí, sonifikací a také zrychlenou Soxhletovou extrakcí. Zařízení, které zrychlenou Soxhletovu extrakci umožňují, jsou například Soxtec od Foss (Dánsko) a B-811 od Büchi (Švýcarsko).

V případě extraktoru Soxtec je celulózová patrona se vzorkem v prvním kroku ponořena do vroucí extrakční směsi a v druhé fázi vysunuta nad hladinu a promývána zkondenzovaným extrakčním rozpouštědlem. Extrakce je zkrácena na dobu 1 až 2 hodiny. Nedostatky tohoto systému jsou následující. Propojení extrakčních pozic prostřednictvím sběrné nádoby pro zkondenzované rozpouštědlo během fáze zkoncentrování, tj. možnost křížové kontaminace v případě přítomnosti vysoce kontaminovaných vzorků v dané extrakční sérii. Dále není možná samostatná manipulace na konkrétní pozici, například při zkoncentrování. Zároveň není možné použít inertní teflonová

těsnění, která jsou velice pevná, a která neumožňují vzhledem k uspořádání Soxtecu dostatečné utěsnění jednotlivých extrakčních pozic.

Další variantou pro zrychlenou Soxhletovu extrakci je B-811 od Büchi. Tento přístroj je určen pro extrakci pevná látka – kapalina, zkoncentrování a případně vysušení extraktu. B-811 umožňuje čtyři různé extrakční techniky: standardní Soxhletovu extrakci (B-standard), Soxhletovu extrakci za tepla (C-warm), extrakci za horka (A-hot) a kontinuální extrakci (D-continuous), viz. obr. č. 1. Při extrakci B je vzorek v patroně extrahován studeným zkondenzovaným rozpouštědlem, u varianty C je zkondenzované rozpouštědlo zahříváno horní topnou plotýnkou umístěnou pod extrakčním tělem. Podobně probíhá extrakce A. Zkondenzované rozpouštědlo se v tomto režimu upouští pouze tak, aby vzorek zůstával stále ponořen v horkém rozpouštědle, a tím se zvýšila účinnost extrakce. Kontinuální režim (D) představuje pouze prokapávaní studeným zkondenzovaným rozpouštědlem (1).

Obrázek č.1 Extrakční režimy extraktoru B-811 (1)



Extrakce A, B a C zahrnují 3 fáze: extrakci vzorku ponořeného v rozpouštědle, promývání zkondenzovaným rozpouštědlem a zkoncentrování extraktu. Výhody tohoto systému jsou následující: rozpouštědlo a extrakt přicházejí do styku pouze s dobře čistitelným sklem a inertním teflonem, tj. systém je vhodný pro reziduální analýzy. Pozice jsou oddělené, čímž je minimalizována možnost křížové kontaminace. Pozice jsou samostatně ovladatelné, což umožňuje zkoncentrování extraktů o různých objemech. Extrakci i sušící kroky lze realizovat v atmosféře inertního plynu.

Cílem práce byla optimalizace extrakčních podmínek a jejich ověření analýzou referenčních materiálů, případně účastí v kruhovém testu a zavedení tohoto zařízení do akreditovaných postupů NRL-RO Brno.

3 Materiál a metody

Materiál a metody použité při zpracování tohoto VÚ jsou popsány v SOP č. 30 NRL-RO Brno (2).

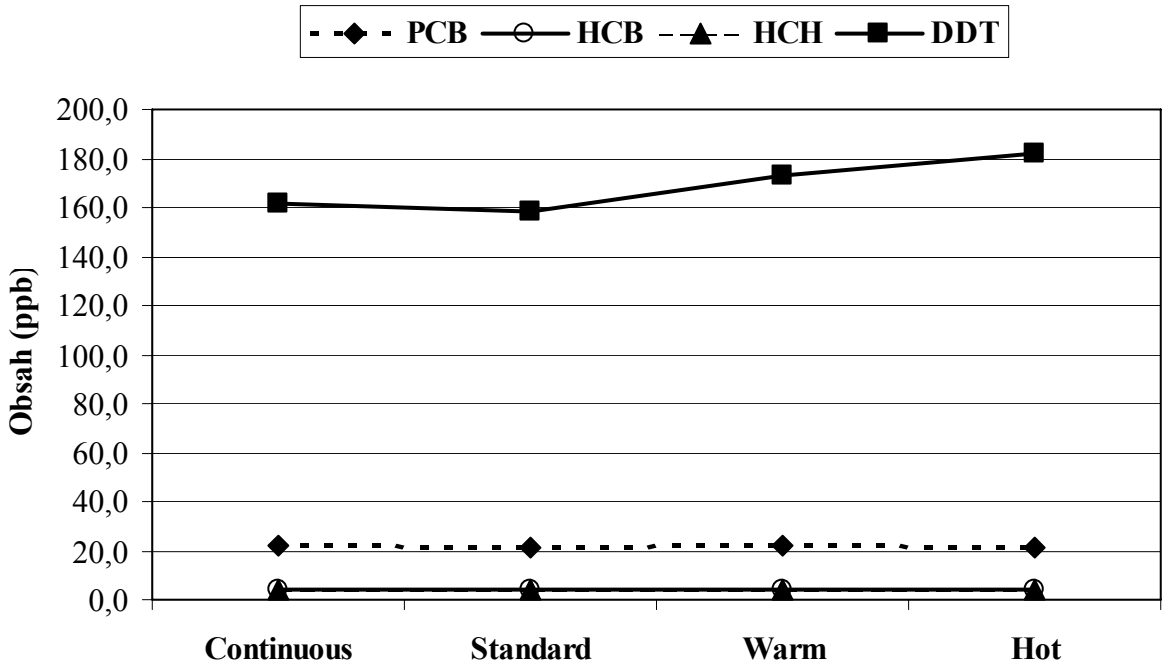
Vzorek byl navážen do skleněné extrakční patrony s fritou, obohacen přídavkem vnitřního standardu a umístěn do extraktoru B-811. Objem extrakčního rozpouštědla (25 % acetonu v hexanu) byl 80 ml. Doba extrakce byla 60 minut a zahrnovala 20minutovou extrakci horkým rozpouštědlem a 40minutové promývání vzorku kondenzovaným rozpouštědlem (program č. 1). Po ukončení cyklu byl extrakt zkoncentrován v extraktoru na objem ~ 5 ml (program č. 2), převeden do srdcovky o objemu 50 ml a zkoncentrován pomocí rotační vakuové odparky na objem ~ 2 ml. Čištění extraktu na silikagelové kolonce a koncové měření pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, Varian) bylo provedeno podle SOP č. 30 (2).

4 Výsledky a diskuse

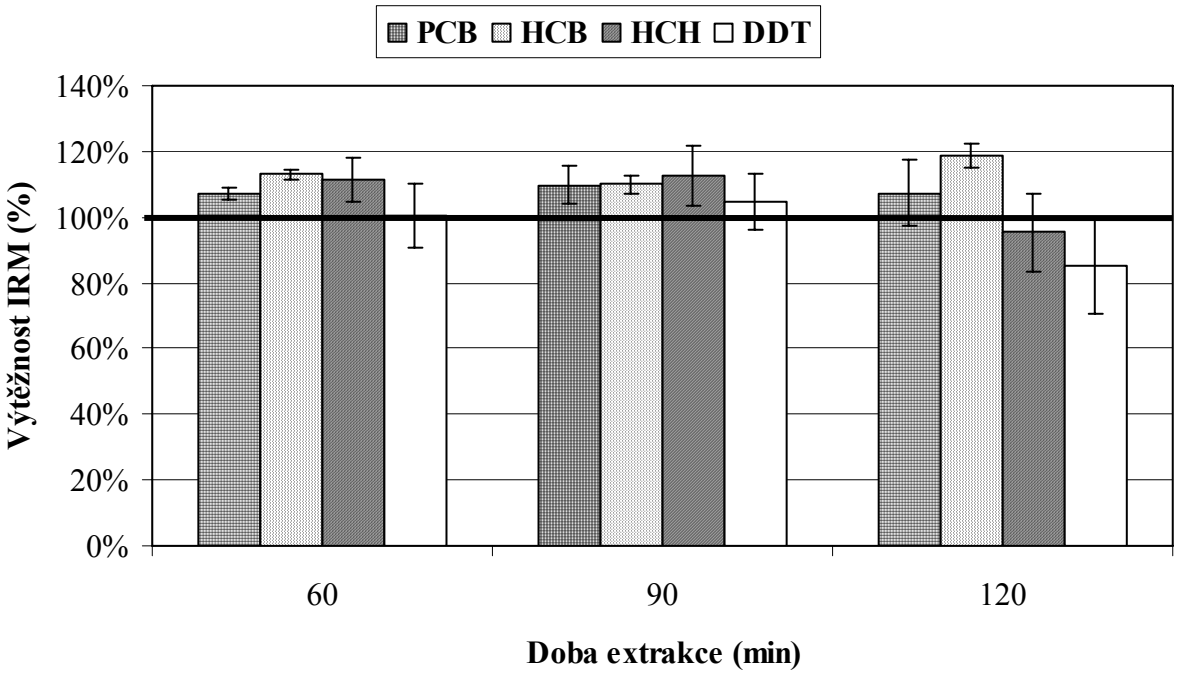
Extraktor B-811 umožňuje čtyři extrakční režimy. V první fázi optimalizace byla porovnána jejich účinnost pro extrakci PCB a OCP ze sedimentů. U všech experimentů byla extrakční doba 1 hodina (20 minut louhování a 40 minut promývání). U obsahů PCB, HCH (skupina α-,β-,γ-,δ-hexachlorocyklohexanu) a HCB (hexachlorbenzenu) nebyly pozorovány výrazné rozdíly v extraktech získaných různými technikami. Avšak u skupiny DDT, která zahrnovala o,p a p,p-DDT a jejich metabolity DDE a DDD, byl se zvyšující se intenzitou extrakce (standard → warm → hot) zaznamenán nárůst obsahu těchto analyt (viz graf č. 1). Nejúčinnější technika, extrakce za horka, byla vybrána pro následující testování doby extrakce.

V závislosti na prodlužujícím se čase extrakce byla sledována výtěžnost jednotlivých analytů v interním referenčním materiálu (IRM). Testované doby byly 1 hodina (20 minut louhování a 40 minut promývání), 1,5 hodiny (30 minut louhování a 60 minut promývání) a 2 hodiny (30 minut louhování a 90 minut promývání). Vyhovující výtěžnost 100 % a více byla stanovena již při extrakci trvající 1 hodinu (viz. graf č. 2). Za účelem zjištění případné křížové kontaminace bylo následně po extrakci IRM provedeno stanovení slepého vzorku s negativním výsledkem.

Graf č. 1: Porovnání účinnosti extrakčních technik B-811



Graf č. 2: Optimalizace doby extrakce za horka



Za optimalizovaných podmínek extrakce (typ: extrakce horkým rozpouštědlem, čas: 1 hodina, rozpouštědlo: 25 % aceton v hexanu) byly extrahovány 4 vzorky sedimentů v rámci mezinárodního kruhového testu Setoc pořádaného univerzitou ve Wageningen.

Všechny stanovené parametry byly vyhovující (viz. tab. č. 1). U dvou parametrů (PCB 153 a 180) bylo z-skóre větší než 2, ale v případě zohlednění nejistoty naší metody byly výsledky vyhovující.

Tabulka č. 1: Obsahy PCB a OCP ve vzorcích Setoc 2008 a jejich vyhodnocení (z-skóre)

Číslo vzorku	1	2	3	4
PCB 28	10,2/0,25	5,2/-2,00	11,4/-0,16	< 0,5
PCB 52	8,8/-0,12	7,3/-0,07	15,8/-0,26	< 0,5
PCB 101	10,5/0,32	9,9/0,27	18,9/-0,10	1,4/-0,76
PCB 118	7,3/-0,03	6,4/-0,08	18,8/0,10	< 0,5
PCB 138	12,3/0,00	11,5/0,29	19,7/-0,24	5,2/-0,61
PCB 153	16,4/0,57	14,6/3,51	24,3/-0,05	6,4/-0,56
PCB 180	9,2/1,04	8,9/2,93	21,4/-0,30	6,4/-0,29
HCB	6,8/0,58	4,2/0,50	54,5/0,60	4,2/0,07
alfa-HCH	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
beta-HCH	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,4/-
gamma-HCH	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,99/-
delta-HCH	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
o,p´- DDE	< 0,5	< 0,5	< 0,5	1,3/-0,36
p,p´- DDE	2,4/-	2,1/-0,36	4,9/-	38,9/0,05
o,p´- DDD	< 0,5	< 0,5	1,4/-	17,3/-0,07
p,p´- DDD	1,7/-	1,1/-	4,4/-	42,9/0,28
o,p´- DDT	< 0,5	< 0,5	< 0,5	11,2/-0,54
p,p´- DDT	< 0,5	0,68/-	< 0,5	44,9/0,74

5 Závěr

V rámci této práce byla zavedena extrakční metoda pro stanovení PCB a OCP v abiotických materiálech s využitím extraktoru Büchi B-811. Správnost optimalizované metody byla potvrzena účastí v mezinárodním kruhovém testu a metoda byla implementována do stávajících SOP pro stanovení PCB a OCP v NRL-RO Brno.

6 Literatura

1. Operační manuál pro extrakční systém B-811, verze D, Büchi Labortechnik AG, **2000**.
2. Příručka kvality NRL-RO Brno,ÚKZÚZ, **2008**, SOP č. 30, Stanovení PCB a OCP metodou GC-MS.

Stanovení hliníku ve vybraných lesních půdách

Přemysl Fiala
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OHP, Hroznová 2, 656 06 Brno
premysl.fiala@ukzuz.cz

Eva Urbánková, Elena Obdržálková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
eva.urbankova@ukzuz.cz
elena.obdrzalkova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Obsah hliníku byl stanoven ve výluhu Mehlich 3, KCl, lučavce královské a $BaCl_2$. Cílem práce bylo posoudit vhodnost těchto čtyř extrakčních roztoků pro odhad potencionální toxicity hliníku vůči sazenicím smrku ztepilého (Picea abies [L] Karst).

Je uvedeno hodnocení vhodnosti uvedených chemických postupů. Opírá se o poznatky z nádobového pokusu a hodnotí obsahy hliníku stanovené KCl, M3, $BaCl_2$, AR ve vztahu k vitalitě /mortalitě smrkových sazenic. Jde tedy o odhad obsahu hliníku, který, jak bylo odvozeno z nádobového pokusu, s velkou pravděpodobností způsobil odumření kořenů sazenic.

2 Úvod

Volné formy hliníku jsou považovány ze jeden z důležitých činitelů vedoucích ke chřadnutí lesa, pro které se ve střední Evropě vžil název „nového poškození lesa“. Doplnění průzkumu výživy lesa, kterým se hodnotí lesní prostředí ve vybraných, zpravidla imisně poškozených přírodních lesních oblastech, o stanovení některé z volných forem hliníku, je opodstatněným požadavkem pro zvýšení informovanosti o zdravotním stavu lesa.

Mnoho vědeckých prací přináší poznatky o chemickém složení půdní vody a jeho působení na kořeny rostlin. Cronan a Grigal (1) předpokládají počátek fyziologického stresu při poměru Ca/Al v půdním roztoku pod hodnotu 1. Většina pokusů týkajících se toxicity hliníku vůči kořenům je odvozena ze studia půdního roztoku a jejich použití v terénním průzkumu je nejasné (2).

Důležitost odvození toxicity hliníku z půdních suchých vzorků zdůrazňuje Drábek (3) a to nejen z důvodů manipulačních a finančních, ale také pro klíčovou roli půdního hliníku vzhledem k jeho

potencionální biopřístupnosti a toxicitě. Autor vypracoval metodiku pro stanovení výměnného hliníku jako slabě vázané frakce rozpustné ve vodě nebo chloridu draselném, dále organicky vázané frakce uvolnitelné $CuCl_2$ extraktem a totální obsah roztokem $Na_4P_2O_7$.

Autor metodiky nastínil možnost všeobecně použitelného odhadu toxicity hliníku vůči smrkovým porostům Jizerských hor.

Průzkum výživy lesa vyžaduje způsob jednotného stanovení uvolnitelné formy hliníku, která by mohla být v souboru běžně šetřených údajů snadno vyhodnocena. Důvodem je informace o toxicitě hliníku nikoli jen aktuální, ale také potencionální. Možné uvolnění amorfních forem hliníku a jiných potencionálně toxických prvků v kyselých podmínkách s následujícím přenosem v půdním roztoku je považováno za chemickou časovanou bombu (4).

3 Experimentální část

Pro potřeby této práce byly vzorky zeminy převzaty z předchozího nádobového pokusu, který se zabýval vlivem tří způsobů ošetření sazenic pěstované v zemině s vyššími obsahy kovů:

Hliník (14000 – 14500) mg/kg,

Železo (18000 – 19600) mg/kg,

Olovo (60 – 75) mg/kg,

Měď (11 – 13) mg/kg,

Chrom (19 – 20) mg/kg,

Kadmium (0,35 – 0,45) mg/kg.

Počáteční koncentrace hliníku v přírodním vzorků byla 8,00 mmol/kg. Jednotlivé varianty ošetřování sazenic se lišily množstvím dodaného hliníku (tab. č. 1).

Tab. č. 1: Varianty ošetřování sazenic

Varianty	**Počáteční koncentrace hliníku v přírodním vzorku (mmol/kg)**	**Hmotnost $AlCl_3.6\ H_2O$/ 1 / nádoba (g)**
I	8,00	0,0
II	8,00	5,28
III	8,00	10,53
IV	8,00	10,53 + dolomitický vápenec

Po skončení nádobového pokusu byly v zeminách jednotlivých variant ošetřování sazenic doplněny chemické analýzy pro stanovení výše uvedených volných forem hliníku a byl hodnocen jejich vliv na vitalitu/mortalitu sazenic podle zvolených variant a podle konečného stavu pěstovaných sazenic. Jako základ byly použity údaje o zemině od živých a odumřelých sazenic. Mortalita ve smyslu počtu uhynulých sazenic byla 27 % (varianta č. 1 - kontrolní); 38 % (varianty č. 2 a č. 3) a 47 % (varianta č. 4).

Zjišťování mortality (vitality) podle jednotlivých variant ošetřování neurčuje exaktně hranici toxicity obsahu hliníku nebo některého z těžkých kovů v rostlinných pletivech. Nejvyšší mortalita je ve variantě č. 4 s doplněním $AlCl_3$ dolomitickým vápencem a ve variantách 2 a 3 je mortalita stejná (38 %). Nejmenší je v kontrolní variantě. Pro účely stanovení meze toxicity bylo zvoleno porovnání obsahů hliníku v zemině od uhynulých a živých sazenic.

Zemina byla odebrána z bezprostřední blízkosti kořínků po vyzvednutí sazenice z nádoby, dále ze střední části nádoby a třetí odběr byl směsný vzorek zeminy odebrané z celého prostoru nádoby. Vzorky byly odebrány zvlášť z nádob od živých a uhynulých sazenic. U každé varianty ošetřování byla odebrána zemina z pěti nádob.

3.1 Chemikálie

3.1.1 Kyselina dusičná, HNO_3, koncentrovaná, p.a.,
3.1.2 Kyselina chlorovodíková, HCl, p.a.,
3.1.3 Chlorid draselný, KCl, p.a.,
3.1.4 Mehlich 3 (M3)(5),
3.1.5 Chlorid barnatý, $BaCl_2$, p.a.

3.2 Zařízení

3.2.1 ICP OES spektrofotometr,
3.2.1 AAS spektrofotometr.

4 Výsledky a diskuse

Tabulka č. 2: Obsahy volných forem hliníku v různých extraktech (* mg/kg, $^{+}$ me/kg)

Varianta	Živé sazenice				Uhynulé sazenice			
	KCl*	M3*	$BaCl_2^{+}$	AR*	KCl*	M3*	$BaCl_2^{+}$	AR*
Zemina od kořene								
I	109,2	2076	9,59	21800	137,6	2300	12,2	22000
II	120,7	2071	5,13	22100	81,7	2275	10,2	21800
III	103,4	2040	6,16	21800	83,1	2218	11,7	21300
IV	14	2134	1,34	22200	22,5	2095	0	20500
Zemina ze střední části nádoby								
I	115,2	2071	11,4	21700	165,8	2346	14,6	21900
II	174,5	2053	9,55	21500	142,3	2356	13,8	21400
III	193,9	2168	11,5	21900	151,4	2067	19,7	21200
IV	34,6	2175	3,6	22200	60,1	2123	2,06	21100
Průměrný vzorek zeminy								
I	195	2141	19,2	21600	218,7	2166	20,4	22000
II	174,5	2102	14,6	21600	216	2190	18,2	22600
III	134,2	2096	13,8	21800	184,5	2216	13	21300
IV	170	2274	9,56	21400	157,7	2272	12,9	21400

Tabulka č. 3: Zjištěné obsahy stanovené ve výluhu M3 (mg/kg)

Varianta	Živé sazenice					Uhynulé sazenice				
	P	**K**	**Ca**	**Mg**	**Al**	**P**	**K**	**Ca**	**Mg**	**Al**
Zemina od kořene										
I	16,1	83,5	897	129,0	2076	16,5	64,3	686	108,0	2300
II	17,6	79,1	728	116,0	2071	15,1	92,9	1040	156,0	2275
III	17,1	77,5	819	133,0	2040	13,7	72,0	822	113,0	2218
IV	12,3	82,9	1260	158,0	2134	15,6	87,6	1390	150,0	2095
Zemina ze střední části nádoby										
I	18,1	73,1	583	92,3	2071	15,0	71,4	704	113,0	2346
II	19,5	62,2	461	79,0	2053	16,4	68,0	436	76,1	2356
III	18,1	69,7	428	74,4	2168	16,3	70,3	703	106,0	2067
IV	13,4	82,4	1160	153,0	2175	16,7	75,3	920	118,0	2123
Průměrný vzorek zeminy										
I	17,8	61,2	347	64,8	2141	17,5	63,1	556	68,7	2166
II	18,8	60,8	500	86,7	2102	16,5	66,1	378	70,6	2190
III	18,3	71,3	554	92,8	2096	17,7	60,3	402	73,9	2216
IV	16,2	61,4	510	77,5	2274	16,8	62,6	556	84,5	2272

Tabulka č. 4: Výměnné kationty vytěsněné výluhem $BaCl_2$ (me/kg)

a) živé sazenice

Varianta	K	Ca	Mg	Mn	Al	Fe	Na	(Al+H)	"CEC"	"BS"%
Zemina od kořene										
I	1,03	37,4	9,63	0,18	9,59	0,11	4,76	11,50	64,3	82,1
II	1,19	74,1	10,60	0,24	5,13	0,05	5,85	6,82	71,6	90,0
III	1,04	52,4	9,13	0,27	6,16	0,08	5,54	7,21	75,3	90,4
IV	1,01	61,3	12,3	0,18	1,34	0,05	4,89	3,70	83,2	95,6
Zemina ze střední části nádoby										
I	0,92	29,5	7,98	0,15	11,4	0,11	4,02	15,20	57,6	73,6
II	1,00	14,2	8,23	0,18	9,55	0,08	4,54	11,50	39,4	70,9
III	0,91	19,0	8,31	0,19	11,5	0,04	5,19	14,20	47,6	70,1
IV	0,90	44,1	10,20	0,15	3,60	0,05	4,89	8,18	68,3	88,0
Průměrný vzorek zeminy										
I	0,86	16,2	5,46	0,10	19,2	0,12	3,18	21,00	46,8	55,0
II	0,83	14,8	4,49	0,09	14,6	0,08	2,90	17,30	40,3	57,0
III	0,78	17,3	4,94	0,10	13,8	0,05	3,88	17,70	44,7	60,3
IV	0,81	22,8	5,34	0,10	9,56	0,04	4,25	13,00	46,2	71,9

b) uhynulé sazenice

Varianta	K	Ca	Mg	Mn	Al	Fe	Na	(Al+H)	"CEC"	"BS"%
Zemina od kořene										
I	1,17	40,5	10,00	0,19	12,20	0,05	6,35	12,50	70,6	82,3
II	1,07	42,9	9,79	0,19	10,20	0,04	5,56	10,50	69,9	84,9
III	1,21	49,4	12,8	0,33	11,70	0,03	5,89	13,40	82,8	83,8
IV	1,07	70,8	11,5	0,18	0,00	0,00	4,63	1,56	89,6	98,3
Zemina ze střední části nádoby										
I	1,09	32,3	8,64	0,16	14,60	0,03	6,33	15,90	64,2	75,3
II	0,90	26,3	7,19	0,11	13,80	0,00	4,89	14,90	54,1	72,5
III	1,03	17,2	5,39	0,11	19,70	0,06	3,80	22,20	49,1	55,3
IV	1,06	60,3	11,40	0,19	2,06	0,00	5,02	3,51	81,4	95,7
Průměrný vzorek zeminy										
I	0,82	17,0	5,30	0,09	20,40	0,00	3,91	20,50	47,5	56,9
II	0,93	21,7	6,26	0,12	18,20	0,06	4,56	18,80	52,3	64,0
III	1,16	37,7	9,71	0,23	13,00	0,05	4,80	14,20	67,6	79,0
IV	0,92	23,9	7,17	0,11	12,90	0,00	3,11	14,40	49,5	70,9

Tabulka č. 5: Obsahy prvků v lučavce královské (mg/kg)

a) živé sazenice

Varianta	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Al
Zemina od kořene							
I	832	3170	2570	7190	219	20300	21800
II	885	3280	2710	7490	229	20600	22100
III	902	3170	2860	7320	237	20600	21800
IV	772	2870	3350	6620	242	21000	22200
Zemina ze střední části nádoby							
I	833	3230	2540	7240	219	20400	21700
II	914	3290	2430	7490	222	20400	21500
III	886	3180	2190	7340	218	20400	21900
IV	793	2940	2960	6770	231	21100	22200
Průměrný vzorek zeminy							
I	884	3220	2140	7290	212	20200	21600
II	881	3160	2330	7350	217	20600	21600
III	881	3160	2650	7280	233	20900	21800
IV	816	2920	2180	6790	215	19700	21400

b) uhynulé sazenice

Varianta	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Al
Zemina od kořene							
I	798	3080	2450	7100	216	20200	22000
II	862	3130	2950	7400	233	20400	21800
III	851	3100	2720	7140	231	20000	21300
IV	830	2960	3140	7030	217	18900	20500
Zemina ze střední části nádoby							
I	787	3100	2380	7190	210	20000	21900
II	866	3120	2480	7330	222	19700	21400
III	881	3170	2380	7260	217	19700	21200
IV	852	3240	2850	7600	226	19700	21100
Průměrný vzorek zeminy							
I	814	3170	2100	7300	218	20100	22000
II	892	3320	2260	7710	212	20600	22600
III	878	3180	2180	7400	215	19800	21300
IV	845	3220	2290	7440	211	19500	21400

Byly zjištěny významné rozdíly v zemině odebrané z nádob s živými a uhynulými sazenicemi. Obsahy hliníku zjištěné v extraktu KCl (tab č. 2) neodpovídají předpokladu vyšších hodnot v zemině od uhynulých sazenic. Zřetelně však reagují na dodaný vápenec ve variantě ošetřování sazenic, který se projevuje poklesem volné formy hliníku ve variantě č. IV. Výjimkou je zde hodnota hliníku zjištěná v zemině od uhynulých sazenic z průměrného vzorku, která činí 157,7 mg/kg. Tato hodnota se příliš neliší od ostatních variant, koresponduje ovšem s poměrně nízkou hodnotou přístupného vápníku (556 mg/kg) a může být způsobena nedokonalým odběrem vzorku. Obsahy zjištěné v extraktu Mehlich 3 (tab č. 3) odpovídají předpokladu nastupující toxicity při zvyšujícím se obsahu hliníku. Hodnoty obsahů této formy hliníku jsou v zemině od uhynulých

sazenic zřetelně vyšší. Výjimky jsou v tomto případě ojedinělé a to rovněž ve variantě s přidaným vápencem v průměrném vzorku zeminy (2274 mg/kg u živých proti 2272 mg/kg u uhynulých sazenic) a v zemině odebrané od kořene (2134 mg/kg u živých proti 2095 mg/kg u uhynulých sazenic). Nevýhodou extrakčního roztoku Mehlich 3 je v tomto případě malá reakce takto vytěsněného hliníku na přidaný vápenec, která se projevuje podle vysokých hodnot hliníku ve variantě č. IV.

Volné kationty Al^{3+} vytěsněné $BaCl_2$ (tab. č. 4) splňují podobně jako Mehlich 3 předpoklad odhadu meze nastávající toxicity. Reakce na přidaný vápenec je zřetelná jako v případě KCl. Celkové obsahy hliníku zjištěné v této práci v extraktu lučavky královské (tab č. 5) nesplňují díky relativně malému rozpětí zjištěných hodnot obsahů hliníku předpoklad pro stanovení meze toxicity případně sestavení stupnice odrážející obsahy vůči citlivosti kořenů.

Pro odhad intervalu nastávající toxicity byly stanoveny spojnicové grafy znázorňující průměrné obsahy zjištěné pro varianty ošetřování 2 a 3 (tab. č. 6). Důvodem bylo použití varianty ošetřování bez vlivu přidaného vápence, na který extrakty KCl a $BaCl_2$ citlivě reagovaly a rovněž pro vyloučení zeminy neovlivněné chlórem, tedy v tomto případě varianty kontrolní. V nádobách těchto variant byl stejný stupeň mortality dosahující 38 %.

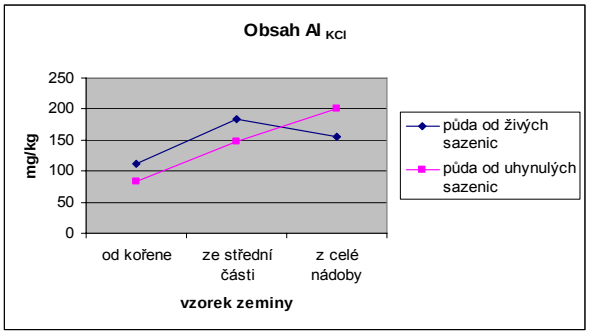
Tabulka č. 6: Obsahy volných forem Al v jednotlivých extraktech při mortalitě 38 %
(* mg/kg, $^+$ me/kg)

Varianta			Živé sazenice			Uhynulé sazenice		
	KCl*	M3*	$BaCl_2^+$	AR*	KCl*	M3*	$BaCl_2^+$	AR*
II	120,7	2071	5,13	22100	81,7	2275	10,2	21800
III	103,4	2040	6,16	21800	83,1	2218	11,7	21300
Průměr	112,1	2056	5,65	21950	82,4	2247	11,0	21550
II	174,5	2053	9,55	21500	142,3	2356	13,8	21400
III	193,9	2168	11,5	21900	151,4	2067	19,7	21200
Průměr	184,2	2111	10,5	21700	146,9	2212	16,8	21300
II	174,5	2102	14,6	21600	216	2190	18,2	22600
III	134,2	2096	13,8	21800	184,5	2216	13	21300
Průměr	154,4	2099	14,2	21700	200,3	2203	15,6	21950

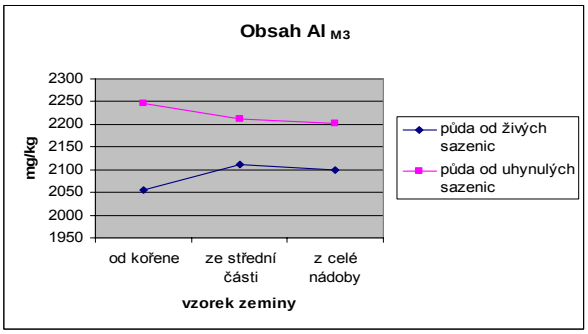
Obsahy stanovené v extraktu KCl nevymezují dostatečně oblast mezi obsahy snesitelnými pro kořeny sazenic a obsahy toxickými. KCl je v tomto ohledu nepoužitelný.

Obsahy stanovené v extraktu Mehlich 3 vymezují okolí hodnoty pravděpodobného počátku toxicity a to ve všech prostorech nádob. Bereme-li v úvahu průměrný vzorek z celé nádoby, představuje tato hodnota hliníku asi (2100 – 2200) mg/kg. Citlivost pro vymezení tohoto okolí má rovněž metoda stanovení obsahu kationtů Al^{3+} vytěsněním roztokem $BaCl_2$. Za povšimnutí zde stojí vzestupný trend počátku předpokládané toxicity od kořenového prostoru přes střední prostor nádoby do celkového průměrného vzorku. Podle tohoto vzorku je hodnota obsahu nastupující toxicity hliníku mezi 14 me/kg a 16 me/kg. Celkové obsahy hliníku v lučavce královské znázorňují vyšší obsahy hliníku u kořene a ve střední části nádoby u uhynulých sazenic. Informují tedy podobně jako Mehlich 3 o vyšším transportním toku materiálu (6) ke kořenům sazenic a jeho akumulaci při útlumu odběru při hynutí. Obsahy zjištěné v celém prostoru nádoby však oblast pravděpodobného počátku toxicity nepostihují. Obsahy celkového hliníku jsou v nádobách s uhynulými sazenicemi vyšší.

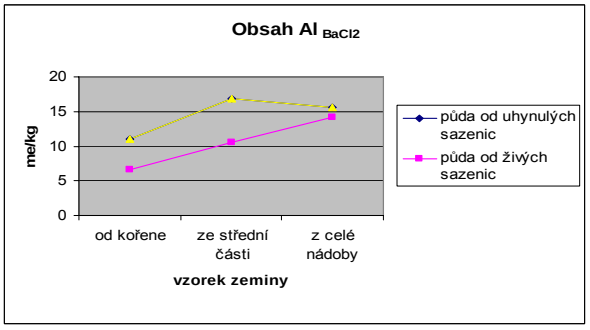
Graf č. 1: Obsah Al/KCl



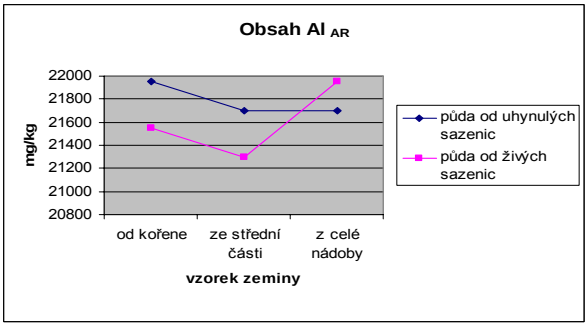
Graf č. 2: Obsah Al/M3



Graf č. 3: Obsah Al/$BaCl_2$



Graf č. 4: Obsah Al/AR



5 Závěr

Extrakt Mehlich 3 se ukazuje podle odhadu toxicity v nádobovém pokusu jako informačně významný chemický postup.

Pravděpodobný počátek toxicity přístupného hliníku vůči kořínkům sazenic smrku se odhaduje na (2100 – 2200) mg/kg.

6 Literatura

1 Cronan C. S., and Gragal D. F.: Use of calcium (aluminium ratios as indicators of stress in forest ecosystems. Journal of Environmental Quality, 24 (**1995**) 209 – 226

2 Binkley D., Hogberg P.: Does atmospheric deposition threaten the Swedish forest? For. Ecol. Manage. 92 (**1997**) 119 – 152

3 Drábek O., Borůvka L., Mládková L., Kocarek M.: Possible metod of aluminium speciation in forest soils, Journal of Inorganic Biochemistry 97 (**2003**) 8 – 12

4 Boudot J.-P., Maitat, J., Rouiller, J.: J. hydrol. 177 (**1996**) 47 – 63

5 Zbíral J.: JPP Analýza půd I, 3.1. (**2002**) 45 – 46

6 Zhang J., George E.: Changes in extrability of cations (Ca, Mg and K) in the rhizosphere soil of Norway spruce (Picea abies) roots, Plant and Soil 243 (**2002**) 209 – 217

Bulletin Národní referenční laboratoře XIII 2009/2

Ročník:	XIII, č. 2
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2009
Odpovědný redaktor:	RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce:	Ing. Iva Strížová
Náklad:	140 výtisků
Počet stran:	46
Tisk:	ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
	e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196