

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture

JEDNOTNÉ PRACOVNÍ POSTUPY

ANALÝZA PŮD III

Jiří Zbíral, Stanislav Malý a kol.

Brno 2022

Copyright © ÚKZÚZ, Národní referenční laboratoř, Jiří Zbíral, S. Malý a kol., 2022

Vydání čtvrté, rozšířené a přepracované. Platné od 1. 7. 2022.

Příručka neprošla jazykovou úpravou.

Kopírování publikace nebo její části je možné pouze s písemným souhlasem autorů a ředitele NRL ÚKZÚZ.

ÚKZÚZ ani autoři nepřebírají jakoukoliv odpovědnost za újmu nebo škodu způsobenou aplikací (správnou nebo chybnou) uvedených postupů.

OBSAH

Obsah

ÚVOD	1
TECHNICKÉ POZNÁMKY.....	2
STANOVENÍ UHLÍKU A ORGANICKÉ HMOTY PŮDY	4
STANOVENÍ ZTRÁTY ŽÍHÁNÍM.....	5
STANOVENÍ C_{ox} TITRACÍ.....	8
STANOVENÍ C_{ox} SPEKTROFOTOMETRICKY.....	13
STANOVENÍ GLOMALINU V PŮDÁCH BRADFORDOVOU METODOU	17
STANOVENÍ BAREVNÉHO KVOCIENTU Q_4/Q_6	20
STANOVENÍ ORGANICKÉHO UHLÍKU A CELKOVÉHO DUSÍKU V PŮDNÍCH EXTRAKTECH ELEMENTÁRNÍ ANALÝZOU	23
EXTRAKCE UHLÍKU Z PŮDY VODOU A HORKOU VODOU	27
HUSTOTNÍ FRAKCIONACE PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY.....	30
STANOVENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY METODOU NIRS	33
STANOVENÍ UHLÍKU A DUSÍKU ELEMENTÁRNÍ ANALÝZOU	37
STANOVENÍ DUSÍKU	42
STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU PODLE KJELDAHLA S POUŽITÍM SELENU JAKO KATALYZÁTORU	43
STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU TITRAČNÍ METODOU PODLE JODLBAUERA	48
PŘÍPRAVA VZORKŮ A EXTRAKCE PRO STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO A AMONNÉHO DUSÍKU	54
STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO A DUSITANOVÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY	58
STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO DUSÍKU METODOU UVSPEKTROFOTOMETRIE.....	64
STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO DUSÍKU IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODOU	67
STANOVENÍ DUSITANOVÝCH IONTŮ SPEKTROFOTOMETRICKY	69
STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODOU	72
STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY.....	75
STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY (ISO 14256).....	78
STANOVENÍ SÍRY.....	82

OBSAH

EXTRAKCE PŮD PRO STANOVENÍ SÍRANŮ A SÍRY	85
STANOVENÍ SÍRY V PŮDNÍCH EXTRAKTECH METODOU ICP-OES.....	88
STANOVENÍ SÍRANŮ VE VODNÝCH EXTRAKTECH PŮD METODOU IONTOVÉ CHROMATOGRAFIE ...	90
PŮDNĚ MIKROBIOLOGICKÉ METODY	94
ODBĚR, ÚPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ PŮD PRO MIKROBIOLOGICKÉ ROZBORY.....	97
STANOVENÍ UHLÍKU A DUSÍKU MIKROBIÁLNÍ BIOMASY FUMIGAČNÍ EXKTRAKČNÍ METODOU .	102
STANOVENÍ OXIDOVATELNÉHO UHLÍKU V PŮDNÍM EXTRAKTU (K_2SO_4).....	106
STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU V PŮDNÍM EXTRAKTU (K_2SO_4)	109
STANOVENÍ BAZÁLNÍ RESPIRACE TITRAČNÍ METODOU	113
STANOVENÍ BAZÁLNÍ A SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE METODOU GC	116
MĚŘENÍ BAZÁLNÍ RESPIRACE, SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE A RESPIRAČNÍCH RŮSTOVÝCH KŘIVEK SYSTÉMEM OxiTop.....	121
AEROBNÍ N MINERALIZACE A NITRIFIKACE INKUBAČNÍM POKUSEM	129
ANAEROBNÍ N MINERALIZACE (AMONIFIKACE).....	131
KRÁTKODOBÁ NITRIFIKAČNÍ AKTIVITA (SNA).....	133
AKTIVITA UREÁZY	136
STANOVENÍ ENZYMATICKÝCH AKTIVIT PŮDNÍCH MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV POMOCÍ FLUOROGENNÍCH SUBSTRÁTŮ	138
STANOVENÍ AKTIVITY DENITRIFIKAČNÍCH ENZYMŮ (DEA) S ROZLIŠENÍM PRODUKTŮ N_2O A N_2	144
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ ANALÝZA PŮD.....	148
EXTRAKCE DNA Z PŮD KITEM DNEASY® Powersoil® kit	149
STANOVENÍ KONCENTRACE DNA.....	152
AMPLIFIKACE SPECIFICKÝCH ÚSEKŮ DNA METODOU PCR.....	155
ANALÝZA PRODUKTŮ PCR GELOVOU ELEKTROFORÉZOU	159
ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENZYMY	163
STANOVENÍ MAXIMÁLNÍ VODNÍ KAPACITY (WHC)	165
EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY	167
STANOVENÍ VLIVU CHEMIKÁLIÍ NA SUBSTRÁTEM INDUKOVANOU RESPIRACI INKUBAČNÍM POKUSEM	167

OBSAH

STANOVENÍ Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA KRÁTKODOBOU NITRIFIKAČNÍ AKTIVITU	173
KONTAKTNÍ TEST PRO STANOVENÍ INHIBIČNÍHO ÚČINKU PŮD NA DEHYDROGENÁZOVOU AKTIVITU BAKTERIE <i>ARTHROBACTER GLOBIFORMIS</i>	181
TEST Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA DÉLKU KOŘENE SALÁTU (<i>LACTUCA SATIVA</i>)	187
TEST Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA ŘEPKU OLEJKU (<i>BRASSICA NAPUS</i>)	193
TEST Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA ROUPICI <i>ENCHYTRAEUS CRYPTICUS</i>	200
TEST Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA REPRODUKCI A MORTALITU CHVOSTOSKOKA <i>FOLSOMIA CANDIDA</i>	208
STANOVENÍ ÚČINKŮ HNOJIV A AGROCHEMIKÁLIÍ NA REPRODUKCI ŽÍŽALY <i>EISENIA ANDREI</i> ...	215
DODATKY	223
POZNÁMKY KE STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU	223
POUŽITÉ ZKRATKY	232

Autorský kolektiv: Jiří Zbírál, Stanislav Malý, Jiří Čuhel, Markéta Svobodová
Redakční úprava: Dagmar Červenková, Iva Strážová

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Úvod	Vydání	4
		Revize	0

ÚVOD

Oproti předchozímu vydání je tento díl Jednotných pracovních postupů zcela přepracovaný a významně rozšířený především v oblasti mikrobiologických a ekotoxikologických stanovení. Některé uvedené postupy se využívají i při analýzách kalů z čistíren odpadních vod, sedimentů a případně dalších materiálů. Většina uvedených metod a postupů se buď rutinně využívá, nebo byly alespoň ověřeny na pracovištích ústavu. Přednostně byly vybírány postupy zahrnuté nebo připravované do souboru norem ISO a CEN.

Popis jednotlivých pracovních postupů je volen převážně tak, aby nebylo nutné neustálé vyhledávání jednotlivých částí podle odkazů. Tento systém sice způsobí v některých případech opakování již jinde uvedené informace, ale přispěje k celkovému zpřehlednění jednotlivých částí příručky. Postupy úpravy vzorků pro analýzu jsou uvedené v Jednotných pracovních postupech – Analýza půd I.

Každý postup má svoje identifikační číslo, které umožňuje jednoznačnou identifikaci postupu a ocení ji především laboratoře akreditované podle ČSN EN ISO/IEC 17025.

Pokud v postupech najdete chybu nebo nepřesnost, velmi oceníme, když nás na tuto skutečnost upozorníte.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Technické poznámky	Vydání	4
		Revize	0

TECHNICKÉ POZNÁMKY

Pro zlepšení čitelnosti textu a pro celkovou přehlednost postupů byl vytvořen souhrn následujících předpokladů, které nejsou uváděny v konkrétních pracovních postupech.

1. Všechny laboratorní postupy uvedené v této příručce předpokládají dodržování zásad vyplývajících z aplikace správné laboratorní praxe, resp. normy ČSN EN ISO/IEC 17025 a provozního řádu laboratoří.
2. Používá se běžně dostupné přístrojové vybavení a laboratorní sklo (vaříče, vodní a pískové lázně, chemické a odměrné sklo atd.). Použití zvláštního vybavení je výslovně uvedeno u popisu metody.
3. Chemikálie jsou čistoty pro analýzu nebo vyšší, pokud není uvedeno jinak.
4. Nádobí se před použitím řádně vyčistí s ohledem na typ analýzy. Speciální požadavky na vyčištění skla jsou uvedeny u konkrétního postupu.
5. Pod pojmem voda se rozumí voda demineralizovaná (deionizovaná nebo destilovaná s vodivostí $<5 \mu\text{S/cm}$), pokud není uvedeno jinak. Jakost vody pro analytické účely definuje ČSN EN ISO 3696 z roku 1994. Pokud je uvedeno pouze, že se doplní po značku, rozumí se, že se doplňuje po značku demineralizovanou vodou, resp. používaným rozpouštědlem.
6. Přístroje používané pro stanovení se nastavují a optimalizují v souladu s požadavky a doporučeními výrobce.
7. Klasické pipety mohou být v mnoha případech nahrazeny jednoobjemovými nebo nastavitelnými ručními pipetami, vhodnými dávkovači nebo dilutorem. V tomto případě je nezbytné pravidelně ověřovat správnost funkce těchto zařízení.
8. Uvedené navážky chemikálií a objemy připravovaných roztoků je možné měnit podle aktuální potřeby laboratoře pouze při zachování shodných metrologických podmínek. Snížení navážky půdy a současně snížení objemu extrakčního činidla se zpravidla nedoporučuje. Důvodem je zvýšení variability nehomogennitou standardně upravené půdy. Využití jiné třepačky, resp. jiné frekvence třepání může být kritické především při použití slabých extrakčních činidel. Tento vliv je vždy třeba ověřit pro celý rozsah půdních typů a stanovovaných koncentrací. Každou úpravu oproti jednotnému postupu je nutné uvádět v protokolu o zkoušce.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Technické poznámky	Vydání	4
		Revize	0

9. Při ředění vzorků, standardních roztoků a činidel se doporučuje, aby zředovací poměr byl maximálně padesát.
10. Při přípravě standardních roztoků se přednostně používají jednoobjemové kalibrované pipety. Dělené kalibrované pipety se mohou použít pouze v nezbytných případech.
11. Obsah nádob se po přidavku jednotlivých roztoků vždy promíchá. Pečlivé promíchání je nezbytné především po doplnění odměrných baněk po značku nebo po konečném nadávkování všech činidel před dalším zpracováním.
12. Při veškeré práci se dodržují obecné zásady pro bezpečnou práci v laboratořích (ČSN 018003). Při práci s půdními vzorky (zvláště vzorky odebranými z kontaminovaných ploch) je třeba zabránit přímému kontaktu pracovníka se vzorkem. Je vhodné použít inertní rukavice a respirátor. Během manipulace se vzorkem se účinným větráním a odsáváním především ve fázi přípravy vzorků zajistí, aby nedocházelo ke kontaminaci laboratoře.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Stanovení uhlíku a organické hmoty půdy	Revize	0

STANOVENÍ UHLÍKU A ORGANICKÉ HMOTY PŮDY

Stanovení oxidovatelného uhlíku patří mezi základní parametry charakterizující organickou hmotu půdy. Podrobnější charakteristika organické hmoty půdy přesahuje rozsah této publikace. Jedná se především o metody frakcionace organické hmoty a metody určení poměru huminových kyselin a fulvokyselin pro odhad stupně rozložení organické hmoty.

Zkoumání organické hmoty půdy se věnuje celá řada prací, ve kterých se využívají nejmodernější analytické postupy – např. FTIR, NMR, GC-MS, MALDI-TOF apod. Vzhledem ke složitosti problému je značně nepravděpodobné, že by bylo možné dostatečně charakterizovat stav organické hmoty půdy jednoduchým postupem. Podrobnější informace jsou v uvedené literatuře.

Literatura

1. M. Schnitzer: Soil organic matter – the next 75 years. Soil Sci. 151 (1), 41-58, 1991.
2. Rattan Lal: Conceptual basis of managing soil carbon: Inspired by nature and driven by science. Journal of Soil and Water Conservation 2019, 74 (2) 29A-34A; DOI: <https://doi.org/10.2489/jswc.74.2.29A>
3. Rattan Lal: Soil organic matter content and crop yield. Journal of Soil and Water Conservation 2020, 75 (2) 27A-32A; DOI: <https://doi.org/10.2489/jswc.75.2.27A>
4. Hoffland, E., Kuyper, T.W., Comans, R.N.J. et al. Eco-functionality of organic matter in soils. Plant Soil, 455, 1–22 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04651-9>
5. Lehmann, J., Kleber, M. The contentious nature of soil organic matter. Nature 528, 60–68 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature16069>

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30900.1 Stanovení ztráty žiháním	Vydání	4
		Revize	0

STANOVENÍ ZTRÁTY ŽIHÁNÍM

1. Rozsah použití

Postup se používá pro stanovení ztráty žiháním vzorků upravených podle postupu 30010.1, u kterých byla stanovena sušina. Metodu je možné použít pro analýzu půd, sedimentů, kalů a dalších materiálů.

2. Princip

Vzorek se žihá v peci při teplotě $(550 \pm 25) ^\circ\text{C}$ a z rozdílu hmotností před a po žihání se stanoví ztráta žiháním.

Poznámky

- Při uvedené teplotě je oxidace dostatečná, ale ještě nedochází k rozkladu karbonátů.*
- Chemicky vázaná voda se může během zahřívání uvolnit, některé prvky a sloučeniny (železo, sulfidy) se mohou při zahřívání oxidovat. Tyto procesy mohou snižovat, resp. zvyšovat výsledek.*
- Explozivní vzplanutí vzorku může způsobit jeho ztrátu.*
- Při analýze kontaminovaných vzorků se musejí dodržovat příslušná opatření, aby se zabránilo kontaminaci laboratoře hořlavými, výbušnými nebo toxickými plyny.*

3. Pomůcky

- Analytické váhy.
- Sušárna a exsikátor.
- Muflová pec nebo obdobné zařízení s regulací teploty.
- Misky a kelímky z vhodného materiálu pro žihání při předepsané teplotě (porcelán, oxal, nikl, platina, křemenné sklo apod.). Obvykle používané průměry jsou $(50 - 70)$ mm.

4. Pracovní postup

Vzorek půdy upravený podle JPP ÚKZÚZ, Analýza půd I, kap. 1.4 se v mělké misce suší 2 h při $105 ^\circ\text{C}$. Po vychladnutí v exsikátoru se do vyžíhaného a zváženého spalovacího kelímku nebo misky naváží asi $(5 \pm 0,001)$ g vysušeného vzorku a kelímek se žihá při $(550 \pm 25) ^\circ\text{C}$

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30900.1 Stanovení ztráty žiháním	Revize	0

nejméně 1 h. Potom se kelímek po krátkém ochlazení (nejlépe na kovové desce) přemístí do exsikátoru a po vychladnutí se zváží. Hmotnost po žihání se považuje za konstantní, jestliže se zjištěná hmotnost po dalších 30 min žihání v předehřáté peci při $(550 \pm 25)^\circ\text{C}$ liší nejvýše o 0,5 % od předchozí hodnoty nebo o 2 mg bez ohledu na to, která hodnota je vyšší.

Poznámky

- Vzorek se žihá do konstantní hmotnosti. Při analýze půd se často používá postup, kdy se žihá 4 h a dosažení konstantní hmotnosti se nekontroluje.*
- Pokud vzorek obsahuje vysoký podíl organické hmoty a mohlo by dojít k jeho vznícení, je vhodné vzorek vložit do chladné pece a teplotu pomalu zvyšovat. Výsledné teploty by se mělo dosáhnout asi za 2 h. Potom teplotu udržovat nejméně 2 h. Obdobně se postupuje při analýze vlhkého vzorku.*
- Pro analýzu je možné použít vlhký vzorek a sušinu stanovit zvlášť. Pro zjednodušení postupu se může stanovit sušina po navážení do spalovacího kelímku. Pokud není nutné stanovit sušinu, postupuje se podle uvedeného postupu.*
- Pokud se ani po třetím žihání nedosáhne konstantní hmotnosti, zaznamenaná se poslední stanovená hodnota ze tří měření. Tato skutečnost se uvede v poznámce protokolu.*
- Pokud vzorek obsahuje po vyžihání černé uhlíkové částice, zvlhčí se několika kapkami 10% (w/w) roztoku dusičnanu amonného, vysuší, vloží se do chladné pece a pomalu zahřívá a žihá 1 h.*
- Vzorky s vysokým obsahem těkavých a hořlavých látek se doporučuje nejprve opatrně přežítat v digestoři.*

5. Výpočet

Ztráta žiháním (obsah organických látek) v % (w/w) se vypočte podle vztahu

$$\text{LOI} = 100 \times (m_1 - m_2)/m_1$$

$$m_2 = M_2 - W$$

Výsledky se zaokrouhlují na dvě desetinná místa.

- LOI ztráta žiháním (obsah organických látek), (%),
 m_1 hmotnost vzorku před žiháním (g),
 m_2 hmotnost vzorku po žihání (g),
 M_1 hmotnost kelímku se vzorkem před žiháním (g),
 M_2 hmotnost kelímku se vzorkem po žihání (g),
 W hmotnost prázdného vyžihaného kelímku (g).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30900.1 Stanovení ztráty žiháním	Vydání	4
		Revize	0

Literatura

1. ČSN EN 15935 (838126) Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady - Stanovení ztráty žiháním.
2. H. Sun, M. Nelsou, F. Chen, J. Husch: Soil mineral structural water loss during loss on ignition analyses. Can. J. Soil Sci. 89, 603-610, 2009.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30910.1 Stanovení Cox titrací	Vydání	4
		Revize	0

STANOVENÍ C_{OX} TITRACÍ

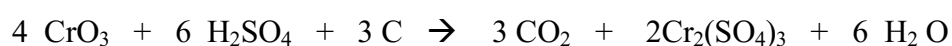
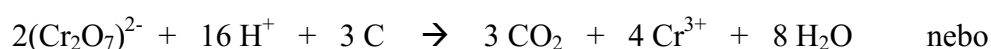
1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro půdy s běžným obsahem a přirozeným složením organických látek.

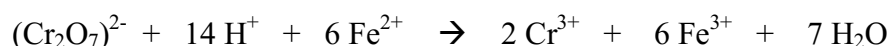
2. Princip

Oxidovatelný organicky vázaný uhlík v zemině se oxiduje kyselinou chromovou v prostředí nadbytku kyseliny sírové za definovaných podmínek. Nespotřebovaná kyselina chromová se stanoví titrací roztokem Mohrovy soli s biamperometrickou nebo vizuální indikací konce titrace.

Rovnice popisující děj při oxidaci:



Rovnice popisující děj při titraci:



3. Pomůcky

1. Analytické váhy.
2. Horkovzdušný sterilizátor (sušárna) s nucenou cirkulací vzduchu.
3. Zařízení pro biamperometrickou titraci s míchadlem. Vhodné je takové, které umožňuje titraci přímo v reakčních nádobkách a míchání skleněným ponorným míchadlem.
4. Automatický titrátor, např. Mettler Toledo T50 Excellence nebo podobný, vybavený elektrodou pro redox titrace.

4. Chemikálie

1. Dichroman draselný, K₂Cr₂O₇.
2. Kyselina sírová, H₂SO₄, koncentrovaná, ρ = 1,84 g/cm³.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	9
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30910.1 Stanovení Cox titrací	Vydání	4
		Revize	0

3. Chromsírová směs, $c(1/6 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,4 \text{ mol/l}$.

Příprava: 40 g dichromanu draselného se rozpustí v 900 ml vody a za stálého míchání, chlazení a po malých dávkách se přidá 1000 ml koncentrované kyseliny sírové (2). Po ochlazení se doplní vodou do 2000 ml.

4. Síran železnatoamonný hexahydrát $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mohrova sůl.

5. Síran železnatoamonný hexahydrát (Mohrova sůl), odměrný roztok, $c((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 40 g Mohrovy soli se v odměrné baňce na 1000 ml rozpustí v 300 ml vody okyselené 20 ml koncentrované kyseliny sírové (2) a doplní se po značku. Roztok se uchovává v tmavé láhvi.

6. Dichroman draselný, $c(1/6 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 4,9031 g dichromanu draselného se rozpustí v asi 200 ml vody a doplní se na objem 1000 ml.

7. Dichroman draselný, $c(1/6 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 1,0 \text{ mol/l}$.

Příprava: 49,031 g dichromanu draselného se rozpustí v asi 300 ml vody a doplní se na objem 1000 ml.

8. Kyselina trihydrogenfosforečná, H_3PO_4 , 85 %, w/w.

9. Difenylamin.

10. Difenylamin, roztok.

Příprava: 0,5 g difenylaminu (9) se rozpustí v 20 ml vody a přidá se 100 ml kyseliny sírové (2).

11. Ortofenantrolin.

12. Síran železnatý.

13. Ortofenantrolin, roztok.

Příprava: 1,624 g o-fenantrolinu (11) a 0,695 g síranu železnatého (12) se rozpustí ve vodě a doplní na 100 ml.

Poznámky

1. Dichroman draselný je vysoce toxická sloučenina, proto je třeba zachovávat příslušná opatření pro ochranu zdraví pracovníků. Dále je potřeba věnovat velkou pozornost likvidaci odpadů s ohledem

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	10
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30910.1 Stanovení Cox titrací	Vydání	4
		Revize	0

na ochranu životního prostředí.

2. Místo roztoku difenylaminu (10) lze použít roztok ortofenantrolinu (13). Barevný přechod je z hnědozelené přes zelenou, modrozelenou do hnědočervené.
3. Stanovení faktoru roztoku Mohrovy soli: 20 ml odměrného roztoku dichromanu (6) se zředí 60 ml vody, přidá se 2,5 ml koncentrované kyseliny sírové (2) a titruje se připraveným roztokem Mohrovy soli (5) do bodu ekvivalence. Faktor se stanovuje denně.

5. Pracovní postup

Úprava vzorku: Vzorek se upraví podle postupu uvedeném v JPP Analýza půd I, kapitola 1.4 na jemnozemi II. Pro přípravu mineralizátu lze zvolit jeden ze dvou následujících postupů. Oba postupy poskytují ekvivalentní výsledky.

Příprava mineralizátu – varianta A: Do vysoké kádinky na 150 ml se naváží ($0,2 \pm 0,0001$) g půdy. Bezpečnostní pipetou nebo vhodným dávkovačem (kde kapalina přichází do styku jen se sklem) se přidá 10 ml chromsírové směsi (3) a obsah se mírným krouživým pohybem promíchá tak, aby zemina neulpěla na stěnách. Současně se do asi tří kádinek odměří po 10 ml chromsírové směsi (3) na slepý pokus. Všechny kádinky se přikryjí hodinovými skly a co nejdříve po smísení se na podnosu vloží na 45 min do sušárny, vyhřáté na $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Po vyjmutí ze sušárny se kádinky nechají asi 10 min chladnout a obsah se opatrně zředí vodou přibližně na 70 ml.

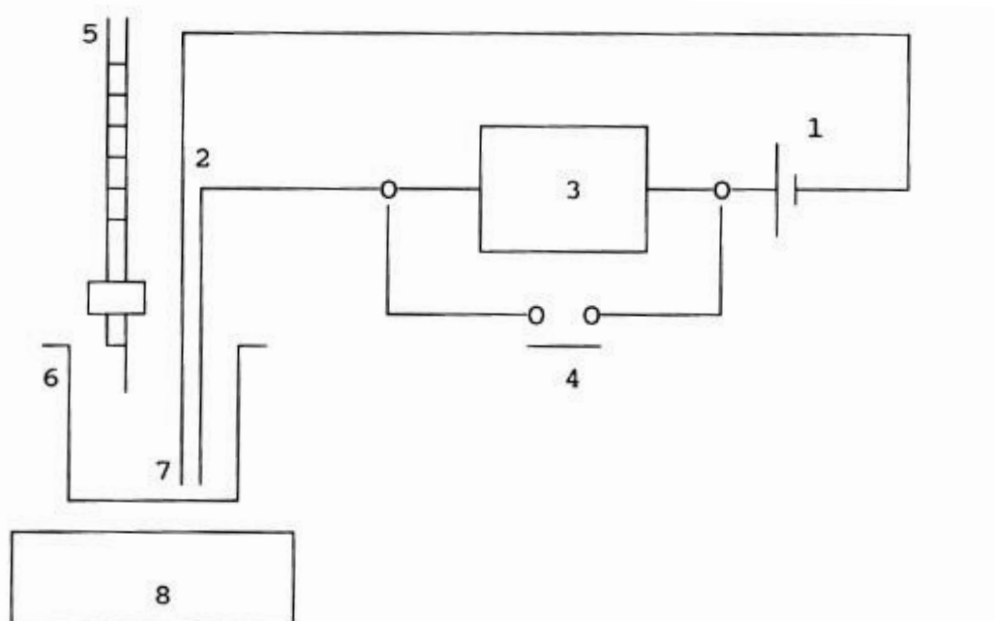
Příprava mineralizátu – varianta B: Do 200ml odměrné baňky se naváží ($0,2 - 1,0$) g půdy s přesností ($\pm 0,0001$) g, pipetou se přidá 20 ml dichromanu draselného (7) a sklopným dávkovačem se opatrně přidá 20 ml koncentrované kyseliny sírové (2). Obsah se promíchá a baňky se vloží na 80 min do sušárny, vyhřáté na $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Současně se připraví dva slepé pokusy, z nichž jeden se vloží do sušárny společně se vzorky a druhý se nechá stát volně při laboratorní teplotě. Po vyjmutí ze sušárny se baňky nechají vychladnout, doplní se vodou po značku a jejich obsah se dobře promíchá. Z tohoto základního roztoku se pipetuje 20 ml do titračních baněk a titruje se postupem uvedeným pod variantou B s vizuální indikací.

Manuální titrace s vizuální detekcí konce titrace: Při vizuální indikaci bodu ekvivalence se k mineralizátu v titrační baňce přidají 2,5 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (8) a 5 kapek roztoku difenylaminu (10). Titruje se roztokem Mohrovy soli (5). Po celou dobu titrace

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	11
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30910.1 Stanovení Cox titrací	Revize	0

je nezbytné roztok intenzivně míchat. Světle fialové zbarvení roztoku přejde jedinou kapkou do šedého zbarvení a tím je titrace ukončena. Přidáním další kapky se objeví zelené zbarvení.

Manuální titrace s biamperometrickou detekcí konce titrace: Po zasunutí elektrod do titrovaného roztoku se za stálého míchání titruje roztokem Mohrovy soli (5) z byrety do trvalého průchodu proudu. Proud na začátku titrace je asi $(50 - 75) \mu\text{A}$. Po prvních kapkách titračního činidla $(25 - 50) \mu\text{A}$ a v bodě ekvivalence je $(150 - 200) \mu\text{A}$. Pokud se hodnoty proudu liší od uvedených, platí pro bod ekvivalence změna proudu o asi $60 \mu\text{A}$. Schéma aparatury je na obr. 1.



Obr. 1. Schéma titrační aparatury (1 – zdroj napětí 1,5 V; 2 – pár platinových elektrod; 3 – mikroampérmetr; 4 – zkratovací spínač; 5 – byreta; 6 – kádinka s titrovaným roztokem; 7, 8 – laboratorní míchačka).

Titrace na automatickém titrátoru: Obsah kádinky se kvantitativně převede do titrační nádoby titrátoru. Ta se umístí do titračního stojanu, tím je zároveň do roztoku vzorku vložena elektroda a míchadlo. Vzorek se za stálého míchání titruje roztokem Mohrovy soli (5). Koncový bod titrace vyhodnotí software přístroje ze souboru naměřených dat pomocí předem definované vyhodnocovací procedury dané metody.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	12
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30910.1 Stanovení Cox titrací	Revize	0

6. Výpočet

Obsah oxidovatelného uhlíku v % (w/w) se vypočte podle vztahu

$$C_{ox} = (a - b) \times f \times 0,03/m$$

- a spotřeba odměrného roztoku Mohrovy soli (5) při slepých pokusech (resp. průměr jejich hodnot), (ml),
- b spotřeba odměrného roztoku Mohrovy soli (5) při vlastním stanovení (ml),
- f faktor odměrného roztoku Mohrovy soli (5),
- 0,03 přepočítací faktor za předpokladu, že 1 ml odměrného roztoku Mohrovy soli (5) odpovídá 0,3 mg C_{ox} ,
- m navážka vzorku (g) (varianta A) nebo alikvotní podíl navážky (g) (varianta B). Výsledky se zaokrouhlují na 2 desetinná místa.

Poznámky

4. Do každé série je nutné zařadit alespoň jeden interní referenční materiál se známým obsahem C_{ox} .
5. Spotřeba chromsírové směsi na oxidaci, vyjádřená rozdílem spotřeb odměrného roztoku Mohrovy soli ($a - b$), nesmí být vyšší než 15 ml. Jinak je nutno zvolit vhodnější navážku. Při splnění této podmínky je účinnost oxidace, provedené popsanou metodou, (75 – 95) % veškerého organického uhlíku v závislosti na kvalitě organické hmoty. Navážku 0,2 g lze použít do obsahu 2,25 % C_{ox} , navážku 0,1 g do obsahu 4,5 % C_{ox} .
6. Průběh oxidace a reprodukovatelnost výsledků závisí mj. na dodržení teploty a času. Vzorky se vloží do sušárny vyhřáté na (130 – 135) °C, teplota po vložení chladných vzorků klesne na požadovanou a je možno odečíst čas. Tento údaj se musí ověřit pro konkrétní sušárnu. Teplota v sušárně se musí měřit v úrovni vzorků v kádinkách. Vhodná je sušárna s nucenou cirkulací vzduchu.
7. Na stanovení mají vliv např. Cl^- , MnO_2 a Fe^{2+} .
8. Výsledky vyjádřené v % C_{ox} je možné přepočítat na % humusu násobením uzančným faktorem 1,724, který vychází z předpokladu, že huminové kyseliny obsahují 58 % C. Tento předpoklad je ovšem splněn pouze v omezeném počtu případů, neboť složení samotných huminových kyselin není konstantní. Vypočtená hodnota tedy má orientační charakter.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	13
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30911.1 Stanovení C _{ox} spektrofotometricky	Revize	0

STANOVENÍ C_{ox} SPEKTROFOTOMETRICKY

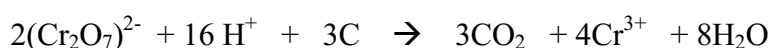
1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro většinu minerálních půd s běžným obsahem a přirozeným složením organických látek. Postup nelze použít pro půdy, které obsahují minerální redukující sloučeniny (např. Cl⁻, Fe²⁺ apod.). Uzančně platí, že obsah chloridů ve zkoumaném vzorku nemá převýšit 2 mg.

2. Princip

Oxidovatelný organicky vázaný uhlík v zemině se oxiduje nadbytkem roztoku dichromanu draselného v prostředí kyseliny sírové při 135 °C. Žlutooranžový dichromanový ion se redukuje na zeleně zbarvený Cr³⁺ ion. Intenzita zeleného zbarvení se měří spektrofotometricky. Pro kalibraci se používá jako základní standard glukóza.

Rovnice popisující děj při oxidaci:



nebo



Poznámky

- 2 mg chloridů ve vzorku odpovídají zdánlivému obsahu oxidovatelného uhlíku asi 0,7 mg.
- Dichroman draselný je vysoce toxická sloučenina. Je nezbytné dodržovat příslušná opatření pro ochranu pracovníků. Dále je třeba věnovat pozornost likvidaci odpadů s ohledem na ochranu životního prostředí.

3. Pomůcky

- Analytické váhy.
- Mineralizační blok s otvory pro tuby. Blok musí umožňovat regulaci teploty v rozsahu (135 ± 2) °C. Velikost tub a hloubka otvorů bloku musí být taková, aby hladina roztoku v tubě po nadávkování všech komponent byla nejméně 10 mm pod horním okrajem otvoru

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	14
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30911.1 Stanovení C _{ox} spektrofotometricky	Revize	0

a výška tub nad blokem nejméně 150 mm. Teplota se měří uvnitř tuby. Aby bylo ohřívání homogenní, musejí být obsazeny všechny otvory v bloku (místo vzorků se mohou použít tuby s 15 ml koncentrované kyseliny sírové).

3. Vibrační míchačka na tuby.
4. Centrifuga.
5. Automatická pipeta.
6. Spektrofotometr vybavený kyvetou o optické délce 10 mm s možností měření při vlnové délce 585 nm.
7. Vodní lázeň.

4. Chemikálie

1. Roztok dichromanu draselného $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,27 \text{ mol/l}$.

Příprava: 80 g dichromanu draselného se rozpustí ve vodě v 1000ml odměrné baňce a po rozpuštění se doplní po značku.

2. Glukóza bezvodá, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
3. Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, $\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$.

5. Pracovní postup

Navážka vzorku: Pro stanovení se používá půda upravená na jemnozem II podle metody 30010.1. Protože účinnost oxidace může záviset na navážce i v případě, že dichroman zůstane stále v nadbytku, je třeba navážku upravit podle tabulky 1.

Tabulka 1. Určení navážky vzorku podle očekávaného obsahu uhlíku.

Obsah uhlíku (mg/kg)	0 – 40	40 – 80	80 – 160	160 – 400	> 400
Navážka (mg)	400 – 500	200 – 250	100 – 125	45 – 50	20 – 25

Oxidace: Příslušná navážka vzorku se převede do spalovací tuby. Automatickou pipetou se přidá 5 ml roztoku dichromanu (1) a potom 7,5 ml kyseliny sírové (3). Obsah tuby se opatrně promíchá za použití vibrační míchačky. Tuby se umístí do mineralizačního bloku

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	15
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30911.1 Stanovení C _{ox} spektrofotometricky	Revize	0

vyhřátého na 135 °C. Zahřívá se 30 min. Po vyjmutí z bloku a ochlazení na laboratorní teplotu se opatrně za chlazení na vodní lázni přidá asi 50 ml vody. Objem tuby se kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky a baňka se doplní téměř po značku. Po vytemperování se objem doplní po značku. Obsah baňky se po úpravě objemu pečlivě promíchá. Suspenze se nechá 60 min usadit a potom se část roztoku dekantuje do centrifugační zkumavky. Odstředí se 10 min při 2000 g. Pokud se v supernatantu i po odstředění vyskytují pevné částice, obsah zkumavky se filtruje přes vhodný filtr ze skleněných vláken. Měří se pouze dokonale čirý roztok. Spolu se vzorky se připravuje nejméně jeden slepý pokus.

Příprava kalibračních roztoků: Standardní roztoky se připraví rozpuštěním navážky glukózy podle tabulky 2 v roztoku dichromanu (1) ve 100ml odměrných baňkách. Baňky se doplní po značku roztokem dichromanu a pečlivě promíchají. Z každého takto připraveného roztoku se pipetuje ($5 \pm 0,05$) ml do mineralizačních tub, přidá se 7,5 ml kyseliny sírové (3) a spolu se vzorky se umístí do mineralizačního bloku. Postup oxidace je jako u vzorků, ale vynechá se přídavek roztoku dichromanu.

Tabulka 2. Kalibrační roztoky glukózy ve dvojchromanovém roztoku.

Kalibrační roztok č.	1	2	3	4	5
Navážka glukózy (g)	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Obsah uhlíku v 5 ml	0	5	10	15	20

Měření: Měří se absorbance dokonale čirých roztoků v kyvetě o optické délce 10 mm při vlnové délce 585 nm v pořadí: kalibrační roztoky, slepý pokus, vzorky. Z hodnot absorbancí kalibračních roztoků a příslušného obsahu uhlíku se podle tabulky 2 sestrojí kalibrační graf, ze kterého se odečtou hodnoty pro jednotlivé vzorky.

Poznámky

3. Měřit se musí nejpozději do druhého dne, protože stáním roztoku dochází k dalším barevným změnám.
4. Kalibrační roztoky se mohou připravit ředěním nejvyššího kalibračního roztoku roztokem dichromanu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	16
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30911.1 Stanovení C _{ox} spektrofotometricky	Revize	0

6. Výpočet

Obsah oxidovatelného uhlíku přepočtený na sušinu se vypočte podle vztahu

$$C_{ox} = (a/m) \times (100 + w)/100$$

- C_{ox} obsah oxidovatelného uhlíku (g/kg),
a obsah organického uhlíku v navážce vzorku (mg),
m navážka vzorku (g),
w obsah vody (%), w/w, vztažený na obsah sušiny půdy stanovený podle ISO 11465.

Stanovení obsahu organické hmoty

$$OM = f \times C_{ox}$$

- OM obsah organické hmoty (g/kg),
f konverzní faktor. Výsledky vyjádřené v % C_{ox} je možné přepočítat na % humusu násobením uzančným faktorem 1,724, který vychází z předpokladu, že huminové kyseliny obsahují 58 % C. Tento předpoklad je ovšem splněn pouze v omezeném počtu případů, neboť složení samotných huminových kyselin není konstantní. Vypočtená hodnota tedy má orientační charakter.

Poznámky

- Do každé série je nutné zařadit nejméně jeden interní referenční materiál (IRM) se známým obsahem C_{ox}.
- V různých půdních vzorcích se touto metodou oxiduje asi 95 % celkového přítomného uhlíku.

Literatura

- ISO 14235 Soil Quality – Determination of organic carbon in soil by sulfochromic oxidation. International Organization for Standardization, 1998.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	17
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30982.1 Stanovení glomalinu v půdách Bradfordovou metodou	Revize	0

STANOVENÍ GLOMALINU V PŮDÁCH BRADFORDOVOU METODOU

1. Rozsah použití

Metoda je určena pro stanovení glomalinu v zemědělských a lesních půdách. Uvedený postup slouží jako referenční metoda pro kalibrace NIRS.

Poznámky

- Jelikož v půdách ČR dochází k postupnému snižování obsahu a degradaci organické hmoty, je zapotřebí sledovat parametry kvality půdy, které ovlivňují její odolnosti proti větrné nebo vodní erozi. Obsah glomalinu představuje jeden z přístupů k této problematice.*
- Glomalin je glykoprotein, sacharidovo-proteinová složka, která podmiňuje výstavbu půdy a její struktury. Vytváří ho arbuskulární mykorhizické houby, které žijí uvnitř kořenů rostlin a v okolní půdě. Je jedním z ukazatelů kvality organické hmoty půdy. Spojuje jednotlivé půdní částice dohromady a zlepšuje schopnost půdy zadržet v krajině vodu a živiny.*

2. Princip

Půda se extrahuje roztokem citronanu sodného, extrakce se provádí v autoklávu při pH 8, v případě vyššího obsahu se extrakce opakuje i vícenásobně.

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Citronan sodný ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- Citronan sodný ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $c(\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: V asi 400 ml vody (3) se rozpustí 14,705 g citronanu sodného (1) a doplní na objem 1000 ml.

- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- Kit pro stanovení proteinů, Bio-Rad Protein Assay, 600-0005, Bio-RAD, USA.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	18
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30982.1 Stanovení glomalinu v půdách Bradfordovou metodou	Revize	0

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Analytické váhy.
2. Autokláv.
3. Centrifuga.
4. Mikrodestičkový fotometr (např. Versamax, Molecular Devices, USA).
5. Třepačka mikrodestiček.
6. Filtrační papír Whatman #1.
7. Mikrodestičky, 96-jamkové.

5. **Pracovní postup**

Extrakce: Do autoklávovatelné centrifugační zkumavky se naváží 1 g půdy a přidá se 8 ml roztoku citronanu sodného (2). Autoklávuje se 60 min při 120 °C. Poté se vzorky odstředí 15 min při 3800 ot./min a supernatant obsahující glomalin se oddělí (uchovává se při 4°C). Přidá se 80 ml roztoku citronanu sodného (2) a celý proces se opakuje, dokud nemá supernatant stálou slámovou barvu (max. 8 ×, v případě lesních půd až 11 ×). Výsledný objem se stanoví pomocí odměrného válce, hodnota se využívá při přepočtu obsahu glomalinu z µg/ml (naměřená hodnota) na mg/g (hodnota glomalinu v půdě).

Měření: Stanovení koncentrace proteinů v roztoku je založeno na Bradfordově metodě za použití komerčního kitu Bio-Rad Protein Assay od firmy Bio-RAD. K přípravě kalibrační křivky v rozsahu (0 – 300) µg/ml se používá bovinní sérum albumin (BSA). Analýza se provádí podle instrukcí výrobce. Ke 4 ml zásobního roztoku reakčního činidla, Dye Reagent Concentrate, se přidá 16 ml vody (3). Roztok se promíchá a zfiltruje přes filtr Whatman #1. Tento pracovní roztok činidla se připravuje vždy čerstvý. Do jamky mikrodestičky se pipetuje 10 µl standardu nebo vzorku, vždy ve třech opakováních a přidá se 200 µl pracovního roztoku reakčního činidla. Po napipetování se roztoky promíchají 30 s na třepačce mikrodestiček při frekvenci 600 kyvů/min. Měří se při 595 nm ihned po promíchání a poté každých 5 min až do 45. min. Koncentrace proteinů se stanoví výpočtem z kalibrační křivky získané lineární regresi s kvadratickým členem. Po skončení měření jsou hodnoty koncentrací vyneseny do grafu s cílem

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	19
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30982.1 Stanovení glomalinu v půdách Bradfordovou metodou	Revize	0

zjistit stabilitu zbarvení. Pro hodnocení se vezmou data z 15. min, pokud došlo k náhlému vzestupu absorpance díky vzniku sraženiny, použijí se data z předchozího měření. U vzorků lesních půd je potřeba výluhy před stanovením naředit roztokem citronanu sodného (2) (3 ×).

6. Výpočet

$$C = (A \times B)/1000$$

- C obsah glomalinu v půdě (mg/g),
 A naměřený obsah glomalinu (μg/ml),
 B výsledný objem supernatantu (ml).

Literatura

1. Janos D.P., Garamszegi S., Beltran B, (2008): Glomalin extraction and measurement, Soil Biology & Biochemistry 40 (2008) 729-729, Department of Biology, University of Miami
2. Vondrášková Š., (2008): Americký výzkum výskytu a působení glomalinu v půdě.
3. Wright, S.F., Jawson L., (2001): A pressure cooker method to extract glomalin from soils, Soil Sci. Soc. Am. J. (65)6:1734-1735
4. Balík J., Sedlář O., Kulháněk M., Černý J., Smatanová M., Suran P. (2020): Effect of organic fertilisers on glomalin content and soil organic matter quality. Plant Soil Environ., 66: 590–597. <https://doi.org/10.17221/385/2020-PSE>
5. Nichols K.A., Wright S.F. (2006): Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. Biology and Fertility of Soils, 43: 215– 220. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0097-2>
6. Wright S.F., Upadhyaya A. (1996): Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science, 161: 575–586. <https://doi.org/10.1097/00010694-199609000-00003>
7. Bradford Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	20
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30984.1 Stanovení barevného kvocientu Q_4/Q_6	Revize	0

STANOVENÍ BAREVNÉHO KVOCIENTU Q_4/Q_6

1. Rozsah použití

Stanovení je vhodné pro půdy upravené podle postupu 30010.1. Existuje průkazná korelace mezi barevným kvocientem $Q_{4/6}$ a poměrem huminových kyselin k obsahu fulvokyselin (HK:FK). Zjištěné závislosti lze využít k hrubému hodnocení jakosti humusových látek.

2. Princip

Huminové a fulvové kyseliny obsažené v půdě barví pyrofosfátový alkalický půdní výluh. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při 465 nm a 665 nm a barevný kvocient $Q_{4/6}$ se stanoví jako poměr absorbancí extrakčního roztoku 465 nm/665 nm.

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Demineralizovaná voda.
2. Pyrofosforečnan sodný dekahydrát, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$.
3. Hydroxid sodný, NaOH.
4. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Ve 30 ml vody (1) se rozpustí 2 g NaOH (3) a upraví se na výsledný objem 50 ml.

5. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, extrakční roztok, $c = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: V asi 600 ml vody (1) se rozpustí 22,3 g pyrofosforečnanu sodného (2). Je-li potřeba, upraví se na pH 12 pomocí 1M NaOH (4). Doplní se výsledný objem 1000 ml.

4. Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy.
2. Rotační třepačka.
3. Centrifuga.
4. UV-VIS spektrofotometr.
5. pH metr.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	21
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30984.1 Stanovení barevného kvocientu Q_4/Q_6	Revize	0

5. Pracovní postup

Extrakce: Do uzavíratelné plastové nádoby o objemu 200 ml se naváží 5,0 g upraveného půdního vzorku (jemnozem I). Dávkovacím zařízením nebo odměrným válcem se přidá $(100 \pm 0,5)$ ml extrakčního roztoku (5) a po uzavření se extrahuje na rotační třepačce 60 min. Po extrakci se suspenze převede do centrifugačních zkumavek a odstředí se 15 min. při 3800 ot./min. Připravené půdní výluhy musí být před měřením na spektrofotometru čiré.

Měření: Srovnávacím roztokem je čistý extrakční roztok (5). Extrační roztoky se měří při 465 nm a 665 nm. Pokud je absorbance při 465 nm příliš vysoká ($> 1,3$), půdní výluhy se naředí extrakčním roztokem (obvykle $5 \times$, $10 \times$, příp. $20 \times$) a měří opakovaně. Ze získaných hodnot absorbancí se vypočítá hodnota barevného kvocientu $Q_{4/6}$.

6. Výpočet

$$Q_{4/6} = A_{465}/A_{665}$$

A_{465}/A_{665} poměr absorbance měřené při 465 a při 665 nm.

Poznámky

1. Poměr zemina : extrakční činidlo je 1 : 20 (w : v).
2. Čím vyšší hodnota barevného kvocientu, tím horší je kvalita humusu. Pravděpodobnou hranici mezi kvalitním a nekvalitním humusem je hodnota $Q_{4/6}$ okolo 4.

Literatura

1. P. Javorský a kol.: Chemické rozborý v zemědělských laboratořích, MZV ČR 1987.2.
2. M. Podsedníková: Stanovení barevného kvocientu $Q_{4/6}$, ÚKZÚZ Brno, 1992.
3. M. Valla, J. Kozák, J. Drbal: Cvičení z půdoznalství – II, VŠZ Praha, 1983.1.
4. F. Pospíšil: Obsah a složení humusu v půdách v českých zemích, Academia, 1980.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	22
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30984.1 Stanovení barevného kvocientu $Q_{4/6}$	Revize	0

Tabulka č. 1. Závislost poměru HK : FK na barevném kvocientu $Q_{4/6}$.

$Q_{4/6}$	HK/FK	$Q_{4/6}$	HK/FK	$Q_{4/6}$	HK/FK
3,0	1,55	5,0	0,51	7,0	0,24
3,1	1,44	5,1	0,49	7,1	0,24
3,2	1,35	5,2	0,47	7,2	0,23
3,3	1,26	5,3	0,45	7,3	0,22
3,4	1,18	5,4	0,43	7,4	0,21
3,5	1,11	5,5	0,41	7,5	0,21
3,6	1,04	5,6	0,40	7,6	0,20
3,7	0,98	5,7	0,38	7,7	0,20
3,8	0,92	5,8	0,37	7,8	0,19
3,9	0,87	5,9	0,35	7,9	0,19
4,0	0,83	6,0	0,40	8,0	0,18
4,1	0,76	6,1	0,33		
4,2	0,74	6,2	0,32		
4,3	0,71	6,3	0,31		
4,4	0,67	6,4	0,30		
4,5	0,64	6,5	0,29		
4,6	0,61	6,6	0,28		
4,7	0,58	6,7	0,27		
4,8	0,55	6,8	0,26		
4,9	0,53	6,9	0,25		

závislost: $y = 17,2 \cdot x^{-2,19}$

Tabulka č. 2. Příklady barevných kvocientů $Q_{4/6}$ vyextrahovaných z ornic (podle Pospíšila).

Půdní představitel	Černozem	Hnědozem	Ilimerizovaná půda	Glejová půda
$Q_{4/6}$	1,1 – 1,4	3,0 – 5,6	3,8 – 5,6	4,6

Půdní představitel	Lužní půda	Nivní půda	Hnědá půda	Podzol
$Q_{4/6}$	3,8	4,6 – 7,0	3,0 – 5,6	4,6

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	23
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30991.1 Stanovení organického uhlíku a celkového dusíku v půdních extraktech elementární analýzou	Revize	0

STANOVENÍ ORGANICKÉHO UHLÍKU A CELKOVÉHO DUSÍKU V PŮDNÍCH EXTRAKTECH ELEMENTÁRNÍ ANALÝZOU

1. Rozsah použití

Postup se používá pro stanovení horkou vodou extrahovatelného půdního C a N a při stanovení C a N půdní mikrobiální biomasy (MBC, MBN) po extrakci půdních vzorků roztokem síranu draselného ($c = 0,5 \text{ mol/l}$). Postup byl ověřen pro minerální půdy a pro půdy organických horizontů lesních půd.

2. Princip

Stanovení je prováděno na analyzátoru CN v roztoku, po odstranění karbonátů kyselinou chlorovodíkovou, spalováním při $800 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

CO_2 se stanoví na NDIR detektoru, N pomocí chemodetektoru nebo chemiluminiscenčního detektoru, v závislosti na typu a vybavení přístroje. Pro vyhodnocení obou stanovení se používá metoda kalibrační křivky.

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Kyslík, O_2 , 99,995 %.
2. Hydrogenftalát draselný, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$.

Příprava: Skleněná vysoušečka s asi 10 g hydrogenftalátu draselného se suší v sušárně 2 h při $(105 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté se uzavře víčkem a umístí do exsikátoru. Po ochlazení je hydrogenftalát draselný připraven k použití.

3. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Příprava: Skleněná vysoušečka s asi 10 g síranu amonného se suší v sušárně 2 h při $(105 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté se uzavře víčkem a umístí do exsikátoru. Po ochlazení je síran amonný připraven k použití.

4. Zásobní směsný kalibrační roztok C ($c = 2500 \text{ } \mu\text{g/ml}$) a N ($c = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	24
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30991.1 Stanovení organického uhlíku a celkového dusíku v půdních extraktech elementární analýzou	Revize	0

Příprava: Ve vodě se rozpustí 1,32840 g $C_8H_5KO_4$ (2) a 1,1792 g $(NH_4)_2SO_4$ (3) a po převedení roztoku do 250ml odměrné baňky se vodou doplní po značku.

5. Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, $c(HCl) = 2 \text{ mol/l}$.

Příprava: 183 ml HCl (35%) se přidá do vody, převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní po značku.

6. Síran draselný, K_2SO_4 .

Koncentrace závisí na ředění vzorků. Protože roztok síranu draselného použitého pro extrakci C a N ($c = 0,5 \text{ ml/l}$) při stanovení MBC/MBN zasluje katalyzátor a tím zkracuje jeho životnost, doporučuje se vzorky ředit vodou. Výsledné koncentraci odpovídá koncentrace síranu draselného použitého pro přípravu kalibračních standardů.

7. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná). Experimentálně je třeba ověřit koncentraci C vzhledem ke koncentracím ve vzorcích.

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Analyzátor C a N v roztoku s automatickým dávkovačem.
2. Automatická pipeta, (20 – 200) μl .
3. Míchadélka.

5. **Pracovní postup**

Kalibrace: Podle tabulky 1 se připraví řada směsných kalibračních roztoků C a N. Výchozí roztok má koncentraci $c(C) = 2500 \mu\text{g/ml}$ a $c(N) = 1000 \mu\text{g/ml}$. Pro přípravu roztoků se použije voda (7) nebo roztok síranu draselného (6), podle extrakce.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	25
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30991.1 Stanovení organického uhlíku a celkového dusíku v půdních extraktech elementární analýzou	Revize	0

Tabulka 1. Příprava směsných standardů C a N.

Pipetovaný roztok ($\mu\text{g C/ml}$) ¹	Pipetovaný objem (ml)	Výsledný objem (ml)	Kalibrační roztok C ($\mu\text{g/ml}$)	Kalibrační roztok N ($\mu\text{g/ml}$)
2500	10	250	100	40
100	35	50	70	28
100	25	50	50	20
100	15	50	30	12
100	10	100	10	4
10	25	50	5	2
10	15	50	3	1,2
10	5	50	1	0,4
10	5	100	0,5	0,2

¹ Jedná se o směsný roztok (C, N), pro přehlednost je v prvním sloupci uvedena pouze koncentrace C.

Měření: Pro měření se použije rozsah kalibrace v závislosti na předpokládané koncentraci C a N ve vzorcích. Do vialek vhodných pro daný typ analyzátoru se napipetují standardy a analyzované roztoky. Přidá se HCl (5) tak, aby pH mělo hodnotu 2. Do vialek se vloží míchadélko a roztoky se před měřením promíchávají 3 min za současného probublávání kyslíkem. Okyselením dochází k odstranění karbonátů. Na začátek a na konec serie se vkládá 3 až 5 vialek s vodou kvůli propláchnutí. Mezi vzorky je rovněž vhodné průběžně vkládat vialky s vodou jako kontrolu.

Spalování probíhá při 800 °C. Objem analyzovaného roztoku a parametry zpracování signálu závisí na typu přístroje.

Poznámky

1. Při použití 5 ml roztoku se pipetuje 26 μl HCl (5) k dosažení pH 2.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	26
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30991.1 Stanovení organického uhlíku a celkového dusíku v půdních extraktech elementární analýzou	Revize	0

6. Výpočet

Nejprve se zkontroluje signifikantnost kvadratického členu kalibrační křivky a v závislosti na výsledku se zvolí odpovídající kalibrační model. Následně se z kalibrační křivky odečtou koncentrace C a N v roztoku vzorku a podle níže uvedeného vztahu se přepočtou na navážku.

$$C_m = C_v \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

- C_m obsah extrahovatelného oxidovatelného uhlíku ($\mu\text{g/g}$) v půdním vzorku, přepočtený na sušinu,
 C_v koncentrace oxidovatelného uhlíku v extraktu odečtená z kalibrační křivky ($\mu\text{g/ml}$),
 V objem extrakčního činidla (ml),
 m navážka suché půdy (g), která odpovídá dané navážce čerstvé půdy,
 w poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy (%).

Stejný přepočet jako pro C platí pro N.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	27
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30992.1 Extrakce uhlíku z půdy vodou a horkou vodou	Revize	0

EXTRAKCE UHLÍKU Z PŮDY VODOU A HORKOU VODOU

1. Rozsah použití

Uvedený postup se používá pro extrakci labilní frakce půdní organické hmoty vodou za laboratorních podmínek (WSC, water soluble C) a při teplotě 80 °C (HWSC, hot water soluble C). V prvním případě se ve stejném významu používá termín rozpuštěný C (DOC, dissolved organic carbon). Postup byl ověřen pro minerální půdy.

2. Princip

Půdní vzorek se třepe s vodou při laboratorní teplotě, odstředí, dekantuje a roztok se filtruje (0,45 µm). Ve filtrátu se stanoví celkový uhlík (WSC). K půdě po dekantaci se přidá voda a půdní suspenze se inkubuje 16 h při 80 °C. Poté se vzorek odstředí, dekantuje a ve filtrátu (0,45 µm) se stanoví celkový C (HWSC).

3. Chemikálie

1. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná)

4. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na (20 ± 2) °C, s třepačkou (250 kmitů/min).
2. Vodní lázeň s teplotou udržovanou na (80 ± 2) °C.
3. Centrifuga s rotorem pro zkumavky (6).
4. Vortex
5. Sestava pro membránovou filtraci vývěva (nálevka pro membránovou filtraci pro filtry o průměru 50 mm, odsávací baňka, membránová vývěva).
6. Zkumavky centrifugační, 85ml, se šroubovacím víčkem.
7. Kádinky, 250 ml.
8. Nitrocelulózové membránové filtry, průměr 50 mm, velikost pórů 0,45 µm. Je třeba se vyhnout dlouhodobému skladování, které vede k uvolnění látek, které zvyšující pozadí.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	28
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30992.1 Extrakce uhlíku z půdy vodou a horkou vodou	Revize	0

5. Pracovní postup

Vodou extrahovatelný C (WSC): Do centrifugační zkumavky se ve třech opakováních naváží takové množství vzorku, které odpovídá 3 g půdy v sušině. Ke vzorku se přidá 30 ml vody a vzniklá suspenze se extrahuje 30 min na třepačce při 20 °C a při frekvenci 250 kyvů/min. Poté se suspenze centrifuguje 20 min při 5500 g. Supernatant se dekantuje a zfiltruje přes membránový filtr do kádinky. Filtrát se skladuje v ledničce, pokud bude analýza probíhat během následujících dvou dnů, jinak se zamrazí (–20 °C). Paralelně se ve třech opakováních zfiltruje 30 ml vody jako blank.

Horkou vodou extrahovatelný C (HWSC): K sedimentu ve zkumavce se přidá dalších 30 ml vody a vzorek se vortexuje (1200 kmitů/min) do vytvoření suspenze. Poté se inkubuje na vodní lázni 16 h při 80 °C. Po skončení inkubace se opakuje vortexace (10 s), centrifugace a filtrace. Filtrát se skladuje v ledničce, pokud bude analýza probíhat během následujících dvou dnů, jinak se zamrazí (–20 °C).

6. Výpočet

$$\text{WSC } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{C } (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

WSC (μg.g⁻¹) obsah vodou extrahovatelného oxidovatelného uhlíku v půdním vzorku přepočtený na sušinu,
C (μg.ml⁻¹) koncentrace oxidovatelného uhlíku v extraktu odečtená z kalibrační křivky,
V objem extrakčního činidla (ml),
m navážka suché půdy (g), které odpovídá dané navážce čerstvé půdy,
w obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Výpočet HWSC se provádí podle stejného vzorce jako WSC.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	29
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30992.1 Extrakce uhlíku z půdy vodou a horkou vodou	Revize	0

Literatura

1. Ghani, A., Dexter, M., Perrot, K.W: Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35, 1231-1243.
2. Jandl, R., Sollins, P.: Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 25, 196-201.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	30
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30994.1 Hustotní frakcionace půdní organické hmoty	Revize	0

HUSTOTNÍ FRAKCIONACE PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY

1. Rozsah použití

Uvedený postup se používá pro fyzikální, jmenovitě hustotní separaci lehké a těžké frakce půdní organické hmoty roztokem polywolframanu sodného (SPT, Sodium Polytungstate) za laboratorních podmínek. Postup byl ověřen pro minerální půdy.

2. Princip

Půdní vzorek se třepá s roztokem polywolframanu sodného (hustota = 1,850 g/cm³), centrifuguje se, nechá se stát a plovoucí lehká frakce se přemístí na filtr (0,7 µm), kde se promyje vodou a vysuší. Těžká frakce na dně zkumavky se promyje vodou a vysuší. Následně se jak v lehké frakci, tak v těžké frakci stanoví obsah organického uhlíku (TOC).

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Polywolframan sodný, 3Na₂WO₄·9WO₃·3H₂O (hustota = 1,850 g/cm³).

Příprava: Na přípravu 348 ml (12 zkumavek) se rozpustí 365,8 g polywolframanu sodného v 285,1 ml vody (2). Podle potřeby se dále přidává voda (2) či polywolframan sodný, dokud se nedosáhne hustoty roztoku 1,850 g/cm³.

2. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Poznámky

1. Výrobce polywolframanu sodného: TC-Tungsten Compounds GmbH, Německo; kat. č. SPT0

4. Přístroje a pomůcky

1. Horizontální třepačka (180 kmitů/min).
2. Centrifuga s rotorem pro zkumavky (6).
3. Hustoměr (rozpětí 1,800 – 1,900 g/cm³).
4. Horkovzdušná sušárna.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	31
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30994.1 Hustotní frakcionace půdní organické hmoty	Revize	0

5. Sestava pro membránovou filtraci pro filtry o průměru 50 mm.
6. Zkumavky centrifugační, 50 ml, s víčkem.
7. Membránové filtry ze skleněných vláken, průměr 50 mm, velikost pórů 0,7 µm.
8. Petriho misky.
9. Odměrný válec pro měření hustoty SPT.
10. Nerezové síto s průměrem oka 0,25 mm.

5. Pracovní postup

Do předem zvážené centrifugační zkumavky se ve dvou opakováních naváží 10 g suché a proseté ($\varnothing$ 2 mm) půdy. Ke vzorku se přidá 25 ml roztoku SPT (1) a vzniklá suspenze se třepe 30 min na třepačce při laboratorní teplotě a při frekvenci 180 kmitů/min. Poté se suspenze centrifuguje 30 min při 1500 g. Materiál ulpělý na víčku a stěnách zkumavky se spláchne 4 × 1 ml roztoku SPT zpět do zkumavky, hrdlo zkumavky se otre buničitou vatou, zkumavka se uzavře a nechá stát 24 h. Plovoucí lehká frakce se opatrně sesbírá lžičkou na zvážený membránový filtr, supernatant se rovněž opatrně slije na filtr a následně se lehká frakce promyje 100 ml vody (2). Prošlý filtrát (tj. SPT) se sbírá za účelem recyklace. Sediment na dně zkumavky (těžká frakce) se resuspenduje v 25 ml vody (2) a centrifuguje 3 min při 2000 g. Supernatant se vylije a sediment se opět resuspenduje, tento proces se opakuje celkem 4 ×. Následně se těžká frakce a lehká frakce společně s membránovým filtrem suší v sušárně 24 h při 60 °C a zváží se. Těžká frakce se lžičkou vyškrabe ze zkumavky, poté se podrtí nebo pomele, a následně proseje přes síto ($\varnothing$ 0,25 mm). Lehká frakce se jen opatrně seškrábne do zvážené porcelánové lodičky. U obou frakcí se metodou suchého spalování při 1100 °C stanoví obsah celkového organického uhlíku (TOC).

Poznámky

1. Hmotnost membránového filtru se po 24 h sušení při teplotě 60 °C nemění.
2. Pokud při vakuovém odsávání lehké frakce zůstane na stěnách zkumavky ulpělý materiál, použije se plastová špachtle k jejímu mechanickému odstranění.
3. Při vakuové filtraci dochází poměrně rychle k promáčení membránového filtru, a tím ke ztrátě lehké frakce či její kontaminaci, proto je nutné provést tuto operaci co nejrychleji.
4. Při použití přečištěného SPT je nutné znát jeho míru znečištění uhlíkem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	32
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30994.1 Hustotní frakcionace půdní organické hmoty	Revize	0

Literatura

1. Carter, M.R, Gregorich, E.G.: Soil sampling and methods of analysis. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008, s. 1224. ISBN 978-0-8493-3586-0.
2. Marriott, E.E., Wander, M.M.: Qualitative and quantitative differences in particulate organic matter fractions in organic and conventional farming systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38, 1527-153

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	33
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30980.3 Stanovení vybraných parametrů půdní organické hmoty metodou NIRS	Revize	0

STANOVENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY METODOU NIRS

1. Rozsah použití

Metoda je určena pro stanovení oxidovatelného uhlíku C_{OX} , celkového obsahu dusíku N_{TOT} a celkového organického uhlíku TOC, glomalinu a barevného kvocientu Q_4/Q_6 ve vzorcích půd.

2. Princip

Vzorky půd se měří metodou NIR spektroskopie v blízké infračervené spektrální oblasti ($4000 - 10000$) cm^{-1} , tj. ($1000 - 2500$) nm s reflektanční detekcí. Stanovené parametry se vyhodnocují matematickými statistickými postupy z kalibračního modelu. Kalibrační model pro určitý parametr vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými NIR metodou a laboratorní referenční metodou (LRM). Měření probíhá v pevném vzorku, který se před měřením předupraví sušením při laboratorní teplotě, mletím a důkladnou homogenizací. Schéma NIR analýzy je znázorněno na obrázku 1.

3. Přístroje a pomůcky

1. Spektrometr měřící v blízké infračervené spektrální oblasti NIR (FT-NIR).
2. Křemenná měřicí kyveta o vhodném průměru.
3. Laboratorní hmoždířový mlýn na zeminy (např. Retsch RM 200 nebo obdobný).

4. Pracovní postup

Příprava vzorků: Metoda NIR spektroskopie nevyžaduje speciální přípravu vzorků, ale musejí být dodrženy určité přesné postupy pro sušení, mletí a homogenizaci vzorků. Způsob úpravy reálných vzorků musí být totožný s postupy, které byly použity při tvorbě kalibračních modelů. Vzorky půd se suší při laboratorní teplotě. Deaglomerují se na laboratorním mlýnku pro zeminy s výstupní velikostí částic 2 mm. Následně se upraví mletím na vhodném mlýnku s prosátím přes síto o velikosti částic 0,25 mm. Upravené a pomleté vzorky se před vlastním měřením důkladně promíchají, aby bylo dosaženo maximální homogenity vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	34
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30980.3 Stanovení vybraných parametrů půdní organické hmoty metodou NIRS	Revize	0

Kalibrace: Z dostatečně rozsáhlého souboru měřených vzorků se vytvoří kalibrační rovnice (model), který kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou. Pro vytvoření vhodného NIR kalibračního modelu je potřeba měření nejméně 60 vzorků půd.

Výsledky měření neznámých vzorků se vyhodnocují softwarově s použitím matematických a statistických postupů aplikovaných na vytvořené příslušné kalibrační modely pro danou matici a parametr. K vyhodnocování získaných spektrálních dat se používá vhodný vyhodnocovací software. Naměřená NIR spektra jsou v tomto programu uložena a následně je možné k jednotlivým vzorkům přiřadit laboratorní referenční hodnoty.

Kalibrace jsou zpracovány vhodnou regresní metodou, např. PLS. Dále se používají různé matematické úpravy snímaných spekter, jako např. derivace, korekce rozptylu záření SNV a výběr vhodných vlnových délek tak, aby byly získány co nejkvalitnější regresní charakteristiky kalibračního modelu.

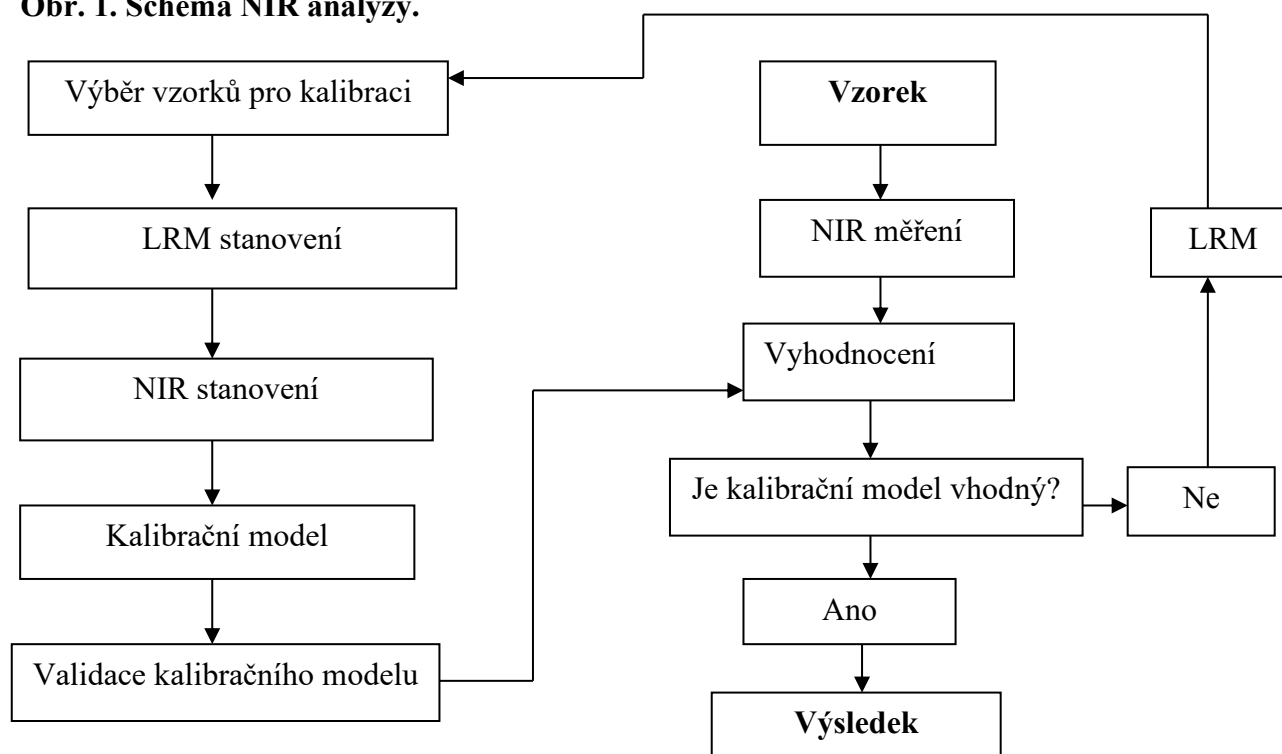
Validace a ověření kalibračního modelu: Ke kontrole kalibračního modelu a ověření predikční schopnosti daného modelu se používá metoda příčné validace (cross validation), která poskytuje optimální počet latentních proměnných (hlavních komponent). Predikční schopnosti vytvořených kalibračních modelů se ověří porovnáním laboratorní referenční metody a NIR metody na testovaných vzorcích, které nejsou zahrnuty do vývoje kalibračního modelu. Predikci neznámých vzorků, které nejsou součástí kalibračního modelu, je nutné provádět v souladu s validačními parametry stanovenými pro danou metodu.

Měření vzorků na NIR spektrometru: Před měřením vzorků se přístroj nastaví podle doporučení výrobce. NIR spektra upravených vzorků se snímají v křemenných kyvetách o průměru např. (2 – 5) cm. Upravený a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřicí kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít. Vzorek se musí nadávkovat tak, aby pokrýval celou plochu kyvety a aby se neobjevovaly vzduchové mezery mezi částmi vzorku, které by mohly negativně ovlivnit správnost měření. Takto nadávkový vzorek se umístí do měřicí části přístroje a nasnímá se jeho NIR spektrum. Všechna NIR měření se provádějí v režimu reflektance. Každý vzorek se měří dvakrát (ve dvou kyvetách).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	35
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30980.3 Stanovení vybraných parametrů půdní organické hmoty metodou NIRS	Revize	0

Výsledky stanovení se uvádějí v %.

Obr. 1. Schéma NIR analýzy.



	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	36
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30980.3 Stanovení vybraných parametrů půdní organické hmoty metodou NIRS	Revize	0

Poznámky

1. *Neznámé vzorky se měří nejméně ve 2 paralelních stanoveních. Pokud hodnota paralelního stanovení překročí opakovatelnost metody NIR spektroskopie uvedenou v tabulce 1, je nutné měření opakovat.*
2. *Opakovatelnost měření NIRS je pro všechny měřené parametry 10 % rel.*

Literatura

1. ČSN EN ISO 17184 Kvalita půdy – Stanovení uhlíku a dusíku blízkou infračervenou spektrometrií (NIRS), ÚNMZ, 2014.
2. Zbírál J., Čížmár D., Malý S., Obdržálková E. (2017): Determination of glomalin in agriculture and forest soils by near-infrared spectroscopy. Plant, Soil and Environment, 63: 226–230. <https://doi.org/10.17221/181/2017-PSE>
3. Modelling soil carbon fractions with visible near-infrared (VNIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy N.M. Knox, S.Grunwald, M.L.McDowell, G.L.Brulandd, D.B.Myers, W.G.Harris
4. Stevens A, Nocita M, Tóth G, Montanarella L, van Wesemael B (2013) Prediction of Soil Organic Carbon at the European Scale by Visible and Near InfraRed Reflectance Spectroscopy. PLoS ONE 8(6): e66409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066409>
5. Mohammad Sadegh Askari, Sharon M. O'Rourke, Nicholas M. Holden, Evaluation of soil quality for agricultural production using visible–near-infrared spectroscopy, Geoderma, Volumes 243–244, 2015, Pages 80-91, ISSN 0016-7061, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.12.012>.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	37
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30990.1 Stanovení uhlíku a dusíku elementární analýzou	Revize	0

STANOVENÍ UHLÍKU A DUSÍKU ELEMENTÁRNÍ ANALÝZOU

1. Rozsah a účel

Postup je určen pro stanovení celkového obsahu dusíku a uhlíku a pro stanovení obsahu anorganického uhlíku a celkového organického uhlíku v půdě.

2. Princip

Ve vzorku se stanoví celkový obsah dusíku (TN) a uhlíku (TC) po spálení při vysoké teplotě v proudu kyslíku viz obrázek 1. Celkový obsah anorganického uhlíku (IC) se ze vzorku uvolní působením kyseliny fosforečné viz obrázek 2. Hodnota celkového obsahu organického uhlíku (TOC) se získá jako rozdíl naměřených hodnot (TC - IC). Pro měření dusíku se používá teplotně vodivostní detektor (TCD), pro uhlík nedisperzivní infračervený detektor (NDIR).

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
2. Kyslík, čistota 99,995 %.
3. Helium, čistota 99,996 %.
4. Uhličitan vápenatý, CaCO_3 , srážený p.a., Reag. Ph Eur.
5. Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , 85 %, $\rho = 1,7 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$
6. Kyselina fosforečná zředěná, H_3PO_4 – přibližně 20 %.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se k asi 500 ml vody (1) přidá 250 ml H_3PO_4 (5).

Po vytemperování se baňka doplní po značku vodou (1) a promíchá.

7. Kyselina ethylendiaminotetraoctová, (EDTA), $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$.
8. Sacharóza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.
9. Chemikálie pro přístroj (např. Primacs SNC100 firmy Skalar), dodáváno jako sada výrobcem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	38
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30990.1 Stanovení uhlíku a dusíku elementární analýzou	Revize	0

Poznámky

- Použití standardních matričních vzorků a kalibračních základních standardních látek závisí na typu používaného přístroje.*

4. Přístroje a pomůcky

- Přístroj určený pro elementární analýzu, (např. PRIMACS 100, Skalar B.V., Breda, Nizozemí).
- Analytické váhy s přesností 0,1 mg, případně mikrováhy s přesností 0,01 mg, podle navážky vzorku.
- Planetový achátový mlýnek (např. RETSCH PM 100 nebo obdobný)
- Achátová třecí miska

5. Postup

Stanovení celkového obsahu uhlíku (TC) a dusíku (TN)

Kalibrace přístroje: Do 4–10 keramických kelímků se naváží například 0-10-20-40-60-80-160 mg EDTA (7), kelímky se vloží do zásobníku přístroje a spálí při vysoké teplotě v proudu kyslíku, vzniklé plyny se následně přivedou na příslušný detektor. Počet kalibračních bodů a rozsah kalibrace se zvolí s ohledem na předpokládané koncentrace stanovovaných prvků v neznámých vzorcích. Je možné rozdělit kalibrační křivku do dvou koncentračních rozsahů. Obsahy C a N v nejvyšším bodě kalibrační křivky pak nesmí překročit maximální hodnotu danou výrobcem přístroje. Pomocí softwaru se vyhodnotí kalibrační křivky, které se použijí pro stanovení obsahů prvků N a C v neznámých vzorcích.

Měření vzorků: Do keramických kelímků se podle očekávaného obsahu dusíku a uhlíku naváží 50 – 1000 mg vzorku, kelímky se vloží do karuselu. Po spuštění analýzy se vzorky spálí při vysoké teplotě v proudu kyslíku a obsahy dusíku a uhlíku se vyhodnocují metodou externí kalibrační křivky. Výsledky se vyjadřují v hmotnostních %.

Stanovení obsahu anorganického uhlíku (IC)

Kalibrace přístroje: Do skleněných kelímků se naváží 0-10-20-40-80 mg CaCO₃ (4). Kelímky

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	39
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30990.1 Stanovení uhlíku a dusíku elementární analýzou	Revize	0

se vloží do zásobníku přístroje. Přístroj automaticky přidá 4 ml 20% H₃PO₄ (6) a postupně zvyšuje teplotu na (150 ± 2) °C. Dochází k rozkladu karbonátů a uvolněný CO₂ je nosným plynem veden do NDIR detektoru.

Měření vzorků: Skleněný kelímek s navážkou 50 – 400 mg vzorku, který je zvlhčen asi 2 ml vody (1), se vloží do přístroje. Přístroj automaticky přidá 4 ml 20% H₃PO₄ (6) a postupně zvyšuje teplotu na (150 ± 2) °C. Dochází k rozkladu karbonátů a uvolněný CO₂ je nosným plynem veden do NDIR detektoru. Obsah anorganického uhlíku se vyhodnocuje metodou externí kalibrační křivky. Výsledkem je obsah anorganického uhlíku (IC) v hmotnostních procentech.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Stanovení celkového obsahu uhlíku (TC), dusíku (TN) a anorganického uhlíku (IC) vyhodnocuje software přístroje a uvádí se v jednotkách hmotnostních %.

Stanovení celkového organického uhlíku (TOC) v hmotnostních % původního vzorku se vypočte podle vztahu:

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

TC obsah celkového uhlíku ve vzorku (%),
IC obsah anorganického uhlíku ve vzorku (%).

Pro vyjádření obsahu TC, TN, IC a TOC v hmotnostních % sušiny se použije vztah:

$$A_s = \frac{A_p \times 100}{S}$$

A_s obsah TC nebo TN nebo IC nebo TOC v sušině vzorku (%),
A_p obsah TC nebo TN nebo IC nebo TOC v původním vzorku (%),
S sušina původního vzorku (%).

Poznámky

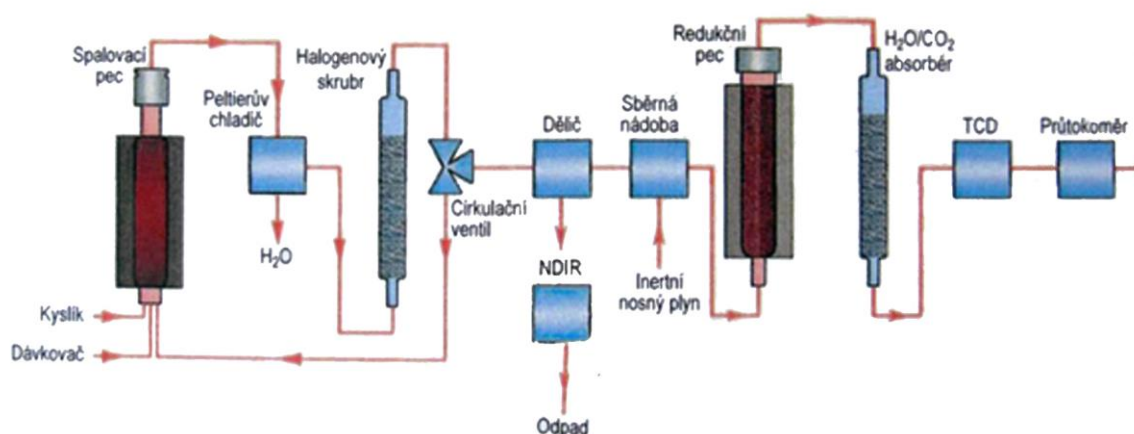
2. Chemikálie a spotřební materiál zpravidla dodává výrobce v kompletní sadě pro určitý počet analýz.
3. Kalibrace se provádí podle doporučení výrobce. Při použití přístroje PRIMACS 100 se přístroj kalibruje pro každou sérii vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	40
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30990.1 Stanovení uhlíku a dusíku elementární analýzou	Revize	0

4. Hmotnost navážky vzorku závisí na typu vzorku a celkovém obsahu analytů ve vzorku v rozsahu 50 – 3000 mg.
5. U vzorků půd s pH nižším než 6,8 platí, že $TC = TOC$. Není tedy nutné stanovení anorganického uhlíku (IC).
6. Pro kvantitativní stanovení dusíku je třeba k navážce vzorku s vyšším obsahem dusičnanového dusíku přidat organickou sloučeninu s vyšším obsahem uhlíku např. sacharózu (8).
7. Výrobce přístroje Primacs100 deklaruje základní měřicí rozsahy 0,1 – 200 mg C a 0,1 – 100 mg N.
8. Při použití přístroje Primacs 100 je spodní hranice pracovního rozsahu 0,05 % pro anorganický uhlík (IC), pro celkový uhlík (TC) i pro celkový dusík (TN).
9. Sušina vzorku se stanoví podle JJP ÚKZÚZ, postup č. 30020.1.

Obrázek 1. Schéma přístroje pro stanovení celkového uhlíku a dusíku metodou elementární analýzy podle návodu k použití přístroje Primacs SNC-100 , Skalar, Nizozemí.

TC – TN stanovení vysokoteplotním spalováním podle Dumase.



Při cirkulaci plynu spalovací pecí je uhlík kompletně zoxidován na CO_2 . Po průchodu děličem plynů se CO_2 stanoví v nedisperzivním infračerveném detektoru (NDIR) jako celkový uhlík. Do sběrné nádoby postupuje pouze 1/80 směsi plynů spáleného vzorku a dochází v ní k zakoncentrování oxidů dusíku NO_x . Po následující redukci oxidů na N_2 a odstranění CO_2 a H_2O přechází směs plynů tepelně vodivostním detektorem (TCD), kde se měří tepelná vodivost proudu směsi plynů proti referenčnímu proudu helia. Rozdíl v přenosu tepla je veličina udávající obsah

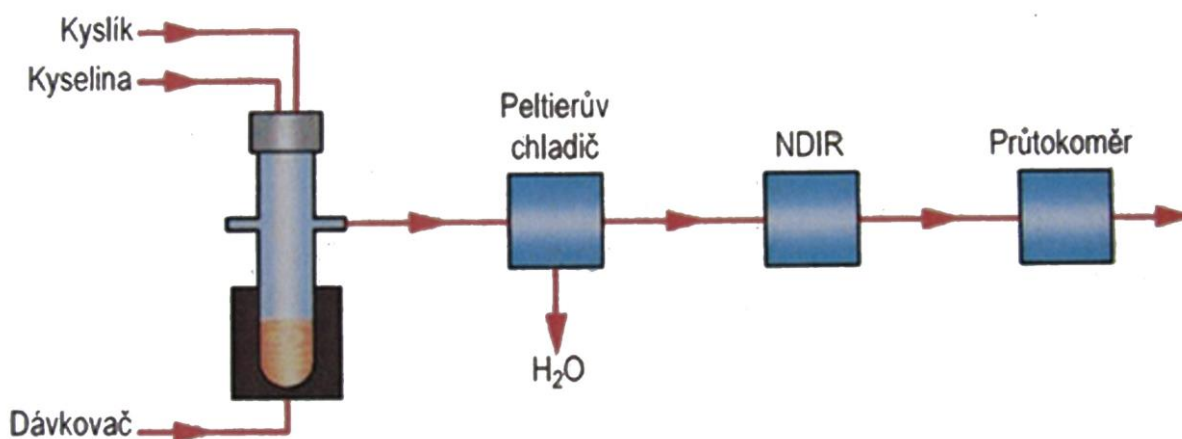
	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	41
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30990.1 Stanovení uhlíku a dusíku elementární analýzou	Revize	0

dusíku ve vzorku.

Obrázek 2. Schéma přístroje pro stanovení obsahu anorganického uhlíku metodou elementární analýzy podle návodu k použití přístroje Primacs SNC-100 , Skalar, Nizozemí.

IC – Okyselením

Vzorky jsou do IC reaktoru vkládány při $(150 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Ke vzorku je automaticky přidána kyselina fosforečná. Uhlíčitany jsou přeměněny na CO_2 , který je vytěsněn nosným plynem a stanoven v NDIR detektoru.



Literatura

1. ČSN EN 15936 – Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady – Stanoví celkového organického uhlíku (TOC) suchým spalováním.
2. Závěrečná zpráva vývojového úkolu č. 30.03/2019 – Kvalita organické hmoty půdy – stanovení celkového organického uhlíku.
3. JPP ÚKZÚZ, postup č. 30020.1 – Stanovení vlhkosti gravimetricky.
4. Primacs SNC-100 Brochure, Skalar Analytical B.V., Tinstraat 12, 4823 AA Breda, The Netherlands.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	42
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Stanovení dusíku	Vydání	4
		Revize	0

STANOVENÍ DUSÍKU

Tato kapitola popisuje některé metody pro stanovení celkového dusíku v půdách, případně v půdních extraktech a dále metody stanovení dusičnanového a amonného dusíku v různých extraktech půd.

Pro stanovení celkového dusíku se nejčastěji používá postup podle Kjeldahla v různých modifikacích, které kromě zlepšené výtěžnosti stanovení mají za cíl i minimalizaci škodlivých vlivů této metody na životní prostředí. Vedle tradiční destilace je možné použít pro stanovení amonného dusíku po mineralizaci i fotometrické stanovení založené na Berthelotově reakci. Dále se může použít titrace uvolněné kyseliny po reakci formaldehydu se síranem amonným.

Pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku byly vybrány fotometrické metody a rovněž postupy využívající iontově selektivní elektrody. Touto problematikou se zabývají normy ISO 11261 a ISO 14256. Pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku jsou v těchto normách navrženy dva postupy – manuální a automatický s využitím FIA nebo SFA. Pro stanovení dusičnanů ve vodných extraktech půd je možné využít kapilární zonální elektroforézu nebo iontovou chromatografii.

Zvláštní pozornost je třeba věnovat odběru, uchování a přípravě vzorků pro analýzu, protože obsah dusíku v půdě i zastoupení jeho jednotlivých forem je velmi proměnlivé. Dodatek 8.1 obsahuje teoretický úvod do problematiky stanovení celkového dusíku.

Literatura

1. V.G.J. Houba, J.J. van der Lee, I. Novozámský, I. Walinga: Soil Analysis Procedures. Soil and Plant Analysis, part 5. Syllabus, Department of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural University, 1989.
2. A. Kleileugenmars, P. Bruttel, P. Kuenze: An improved version of the Kjeldahl Nitrogen Determination. Intern. Lab. July-Aug, 24-26, 1994.
3. J. Zbíral: Závěrečná zpráva VÚ 2/1998. Vliv úpravy vzorků půd na stanovení dusičnanového a amonného dusíku. ÚKZÚZ 1998.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	43
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30921.1 Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru	Vydání	4
		Revize	0

STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU PODLE KJELDAHLA S POUŽITÍM SELENU JAKO KATALYZÁTORU

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro stanovení celkového obsahu dusíku ve všech typech půd a příbuzných materiálech.

2. Princip

Metoda je založena na mineralizaci vzorku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru. Ztrátám dusičnanového dusíku se zabrání přidavkem kyseliny salicylové, která se v kyselém prostředí snadno nitruje. Nitrované sloučeniny se redukují organickou hmotou půdy. Další mineralizací se sloučeniny dusíku převedou na amonný dusík, který se po destilaci stanoví titračně.

3. Pomůcky

1. Mineralizační blok (např. Gerhard).
2. Spalovací tuby, 250 ml.
3. Destilační přístroj (např. Kjeltec).

4. Chemikálie

1. Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/cm}^3$.
2. Práškový selen, Se.
3. Směs kyseliny sírové a selenu.

Příprava: 10 g selenu (2) se rozpustí v 1000 ml koncentrované kyseliny sírové (1) za zahřívání a promíchávání. Původně tmavé zbarvení se změní přes temně fialové do nažloutlého.

4. Kyselina salicylová, krystalická, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COOH}$.
5. Mineralizační směs.

Příprava: 10 g kyseliny salicylové (4) se rozpustí v 1000 ml směsi selen-kyselina sírová

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	44
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30921.1 Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru	Revize	0

(3). Připravený roztok je stálý jeden týden.

6. Peroxid vodíku, H_2O_2 , roztok, 35 % (w/w).

7. Hydroxid sodný, NaOH,

8. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, 40 % (m/V).

Příprava: 400 g pevného hydroxidu sodného se rozpustí v asi 800 ml vody (15) a po vytemperování se objem doplní na 1000 ml.

9. Kyselina sírová, H_2SO_4 , odměrný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: 2,805 ml koncentrované kyseliny sírové (1) se přidá do 500 ml vody (15). Po ochlazení se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní po značku. Před použitím roztoku je nutno stanovit přesnou koncentraci odměrného roztoku kyseliny sírové a vypočítat jeho faktor.

10. Kyselina boritá, H_3BO_3 .

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

Příprava: 400 g kyseliny borité (10) se rozpustí v (5 – 6) l horké vody (15). Po promíchání a přidání indikátoru (13) se doplní na objem 10 l.

12. Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 96 %.

13. Indikátory (např. Tashiro, methylová červeň, Zuzagovo činidlo).

Příprava směsného indikátoru Tashiro: Do kádinky se naváží 0,2 g metylčerveně (volná kyselina) a 0,1 g metylenové modře, za mírného zahřívání se rozpustí ve 100 ml etanolu (12) a důkladně se promíchá.

Příprava indikátoru methylová červeň: 0,30 g methylové červeně se rozpustí ve 100 ml etanolu (12) a promíchá.

Příprava směsného indikátoru Zuzagovo činidlo: 0,83 g bromkresolové zeleně a 0,17 g methyl červeně se rozpustí v 1000 ml teplého etanolu (12), promíchá a po vychlazení doplní po značku.

14. Tris(hydroxymethyl)aminomethan, (TRIS), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$.

15. Demineralizovaná voda.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	45
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30921.1 Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru	Revize	0

5. Pracovní postup

Do mineralizační tuby se přesně naváží ($1,000 \pm 0,001$) g upraveného na vzduchu vysušeného vzorku půdy, přidá se 13 ml mineralizační směsi (5), obsah se pečlivě promísí a nechá se nejméně 2 h stát, nejlépe přes noc. Potom se stříčkou přidává postupně peroxid vodíku (6) ve více malých dávkách (tj. nejvýše 10 ml do každého vzorku), vzorky se umístí do mineralizačního bloku a mineralizace pokračuje v tomto režimu (uvedena je teplota nastavená na programátoru mineralizační jednotky): 20 min na 250 °C, 10 min na 370 °C, 90 min na 420 °C. Po ochlazení se objem doplní vodou na 50 ml. Dusík se stanovuje destilačně. Mineralizační tuba se umístí do destilačního přístroje a destiluje se podle návodu k přístroji. Při použití automatického destilačního zařízení se automaticky dávkuje roztok hydroxidu sodného (8). Amoniak se predestiluje vodní parou do předlohy s kyselinou boritou (11). Již v průběhu destilace se titruje odměrným roztokem kyseliny sírové (9). Obsah celkového dusíku automaticky vypočítá a vyhodnotí přístroj.

Při použití poloautomatického destilačního zařízení se tuba umístí do destilačního zařízení. K přestupníku destilačního zařízení se umístí předloha tak, aby konec přestupníku zasahoval asi 10 mm pod hladinu roztoku v předloze. Jako předloha se použije titrační baňka vhodného objemu, do které se přidá 25 ml roztoku kyseliny borité (11) a několik kapek indikátoru (13), není-li v návodu použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Z dávkovacího zařízení se do destilační tuby opatrně přidá vytěšňovací roztok NaOH (8) a její obsah se začne zahřívat přiváděnou vodní párou. Destiluje se asi 5 min, až objem v předloze dosáhne asi 150 ml, není-li v návodu použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Obsah titrační baňky se titruje ihned po skončení destilace odměrným roztokem kyseliny sírové (9) do právě vzniklé změny zabarvení roztoku.

Souběžně se stejným postupem provede slepá zkouška.

Příklad stanovení faktoru odměrného roztoku H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Do tří titračních baněk o obsahu 250 ml se diferenčně naváží 0,15-0,20 g tris(hydroxymethyl) aminomethanu (14) a rozpustí se v asi 100 ml vody (15), přidají se 2 až 3 kapky Zuzagova činidla (13) nebo směsného indikátoru Tashiro (13) a za stálého míchání se titruje připraveným

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	46
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30921.1 Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru	Vydání	4
		Revize	0

odměrným roztokem kyseliny sírové (5). Titrace je ukončena v okamžiku, kdy titrovaný roztok přejde jedinou kapkou z modré do růžové barvy.

Výpočet faktoru H_2SO_4 , $c(H_2SO_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

$$f_{H_2SO_4} = \frac{1000 \cdot n}{12,114 \cdot V}$$

V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (5) v ml,
n navážka tris-hydroxy-methyl-aminomethanu (14),
1 ml kyseliny sírové ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) je ekvivalentní 12,114 mg tris(hydroxymethyl)aminomethanu.

Poznámky

1. Podle očekávaného obsahu N lze použít i jinou koncentraci H_2SO_4 (např. 0,1 mol/l).
2. Lze použít i postup destilace do silné kyseliny (H_2SO_4) a následné titrace odměrným roztokem hydroxidu sodného (NaOH).

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah celkového dusíku (%) se při jímání destilátu do kyseliny borité a titraci odměrným roztokem kyseliny sírové vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{e \times f_x \times c \times (V_2 - V_1)}{m}$$

X je celkový obsah dusíku (%),
V₁ spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku (ml),
V₂ spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek (ml),
m hmotnost navážky vzorku (g),
f_x faktor odměrného roztoku kyseliny sírové,
c koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové,
e chemický ekvivalent dusíku pro 1 ml odměrného roztoku příslušné koncentrace.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	47
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30921.1 Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla s použitím selenu jako katalyzátoru	Vydání	4
		Revize	0

Přepočet na sušinu

Obsah celkového dusíku v bezvodém vzorku (sušině) X_s se vypočte násobením výsledku koeficientem

$$X_s = \frac{X \times 100}{S}$$

X_s celkový obsah dusíku v sušině (%),
 S sušina vzorku (100 – vlhkost) (%).

Literatura

1. V.G.J Houba, J. J. van der Lee, I. Novozámský, I. Walinga: Soil Analysis Procedures. Soil and Plant Analysis, part 5. Syllabus, Department of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural University, 1989.
2. I. Novozámský, V.G.J Houba, R. van Eck, W. van Vark: A novel digestion technique for multielement plant analysis. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 14, 239-248, 1983.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	48
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Revize	0

STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU TITRAČNÍ METODOU PODLE JODLBAUERA

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro všechny zeminy, pokud neobsahují nevýměnný NH_4^+ . Protože u anonymních vzorků obvykle nelze odhadnout podíl NO_3^- na celkovém N, většinou se celkový dusík v zeminách stanovuje tímto postupem.

2. Princip

Dusičnany, popř. dusitany přítomné ve vzorku se v prostředí kyseliny sírové navážou na aromatickou hydroxysloučeninu, nitroskupina se následně redukuje na aminoskupinu a všechny složky vzorku se rozloží Kjeldahlovým postupem. Vzniklé NH_4^+ ionty se spolu s těmito ionty původně přítomnými ve vzorku po alkalizaci predestilují ve formě NH_3 do odměrného roztoku silné kyseliny nebo do roztoku H_3BO_3 . Zachycený NH_3 se pak stanoví buď titrací nadbytku odměrného roztoku silné kyseliny odměrným roztokem NaOH nebo v případě H_3BO_3 přímo odměrným roztokem silné kyseliny (H_2SO_4).

3. Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy.
2. Mineralizační zařízení vhodné konstrukce.
3. Mineralizační baňky podle Kjeldahla 500 ml, popř. 250 ml.
4. Sklopné pipety (50; 30; 10; 5) ml nebo odměrné válečky k dávkování kyseliny.
5. Titrační baňky 250 ml.
6. Destilační zařízení vhodné konstrukce.
7. Byreta.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	49
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Revize	0

4. Chemikálie

1. Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/cm}^3$.

2. Kyselina fenolsírová.

Příprava: 40 g fenolu se rozpustí v 1 l koncentrované kyseliny sírové (1).

3. Práškový zinek, Zn.

4. Práškový selen, Se.

5. Bezvodý síran sodný, Na_2SO_4 .

6. Krystalický síran měďnatý, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

7. Směsný katalyzátor.

Příprava: Naváží se 1000 g bezvodého síranu sodného (5). Asi (100 – 200) g se jemně roztře s 5 g práškového selenu (4) a 50 g krystalického síranu měďnatého (6). Rozetřená homogenní směs se dokonale smísí se zbytkem síranu sodného.

8. Odpěňovací prostředek, např. parafin, silikonový olej, oktanol.

9. Hydroxid sodný, NaOH.

10. Hydroxid sodný, NaOH, roztok asi 40%.

Příprava: 400 g hydroxidu sodného (9) se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní do 1 litru

11. Hydroxid sodný, NaOH, roztoky $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava roztoku NaOH, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$: 8 g NaOH se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní do 1 litru.

Příprava roztoku NaOH, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$: 4 g NaOH se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní do 1 litru.

12. Kyselina boritá, H_3BO_3 .

13. Kyselina boritá, H_3BO_3 , roztok 4%.

Příprava: 40 g H_3BO_3 (12) a 960 ml vody se rozpustí za tepla.

14. Kyselina sírová, H_2SO_4 , roztoky $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ a $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava roztoku H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$: 10,22 g koncentrované H_2SO_4 (1) se rozmíchá ve vodě a po vytemperování se doplní do 1 litru.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	50
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Revize	0

Příprava roztoku H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$: 5,11 g koncentrované H_2SO_4 (1) se rozmíchá ve vodě a po vytemeprování se doplní do 1 litru.

15. Indikátory.

16. Směsný.

Příprava: 0,2 g methylové červeně a 0,1 g methylenové modře se rozpustí ve 100 ml 96% etanolu a promíchá.

17. Methylová červeně.

Příprava: 0,30 g methylové červeně se rozpustí ve 100 ml 96% etanolu a promíchá.

18. Zuzagovo činidlo.

Příprava: 0,83 g bromkresolové zeleně a 0,17 g methylčerveně se rozpustí v 1000 ml teplého etanolu, promíchá a po vychlazení doplní po značku.

Poznámky

1. Použité chemikálie i zkušební pomůcky nesmějí obsahovat dusík.
2. Fenol je nutno uchovávat v dobře uzavřených hnědých lahvích. Starší preparáty se zbarvují růžově až červeně. Zbarvená chemikálie se nesmí používat.
3. Faktor kyseliny sírové: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$. Např.: Do tří titračních baněk o obsahu 250 ml se diferenčně odváží (0,15 – 0,20) g tris-hydroxymethyl-aminomethanu (molekulová hmotnost TRIS $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 = 121,14 \text{ g/mol}$), rozpustí se v cca 100 ml vody, přidají se 2 až 3 kapky indikátoru (např. Zuzagova činidla)(15) a za stálého míchání se titruje připraveným odměrným roztokem kyseliny sírové až do barevné změny (modrá – špinavě červená). Titrace je ukončena, když titrovaný roztok přejde jedinou kapkou na špinavě červenou barvu.

$$f_x = \frac{1000 \times n}{12,114 \times V}$$

f_x faktor kyseliny sírové,

V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (ml),

n navážka standardu TRISu (g).

Faktor hydroxidu sodného: $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$. Např.: 25 ml odměrného roztoku hydroxidu sodného se pipetuje do titrační baňky o objemu 250 ml. Přidají se 2 kapky vhodného acidobazického indikátoru (15) a titruje se odměrným roztokem kyseliny sírové o koncentraci 0,05 mol/l. Při první změně zbarvení se titrační baňka zakryje hodinovým skličkem a vyvaří se oxid uhličitý. Po ochlazení se roztok v titrační baňce dotitruje. Tento postup se opakuje 3×.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	51
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Revize	0

$$f_x = \frac{A}{B}$$

A spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (ml),

B titrovaný objem odměrného roztoku hydroxidu sodného (ml).

5. Pracovní postup

Mineralizace

Do mineralizační baňky se naváží vhodně upravený vzorek (suchý, vzduchosuchý nebo vlhký), který obsahuje (10 – 20) mg dusíku (obvykle 5 g) a válečkem nebo sklopnou pipetou se přidá 30 ml kyseliny fenolsírové (2) tak, aby se zbytky vzorku z hrdla spláchly do baňky. Pro vzorky s vyšším obsahem dusíku (např. kaly) se kyselina fenolsírová přidá v přebytku (až 80 ml). Opatrně se promíchá, aby vzorek byl zcela provlhčen, avšak aby na stěnách baňky nad kapalinou neulpívaly částičky zeminy. Asi po (15 – 30) min a příp. ochlazení se přidají asi 2 g práškového zinku (3) a promíchá se. Nechá se stát nejméně 2 h, avšak lepší je nechat stát baňky do druhého dne. Pak se přidá asi 10 g směsného katalyzátoru (7) a je-li třeba, (při větších navážkách), přidavek (5 – 20) ml koncentrované H₂SO₄ (1). Po promísení se baňka umístí do mineralizačního zařízení a mírně se zahřívá, dokud směs pění. Při nebezpečí překypění se zahřívání přeruší. Pěnění lze též omezit přidáním odpěňovače (8). Po skončení tvorby pěny se teplota zvolna zvyšuje až na asi 360 °C. Baňkou se občas otáčí, aby kondenzát z hrdla baňky vymyl všechny zbytky do mineralizátu. Po vyjasnění resp. odbarvení roztoku se zahřívá ještě alespoň 30 min.

S každou sérií vzorků se provádí slepá zkouška se stejným množstvím všech chemikálií a podle programu zajištění kvality výsledků zkoušek laboratoře se navažuje vhodný referenční materiál.

Destilace a titrace

Obsah mineralizační baňky se převede do 250ml odměrné baňky a doplní na přesně definovaný objem, z něhož se do destilační tuby odpipetuje alikvotní podíl (50 ml). Tuba se umístí do destilačního zařízení. K přestupníku destilačního zařízení se umístí předloha tak, aby konec přestupníku zasahoval asi 10 mm pod hladinu roztoku v předloze. Jako předloha se použije titrační baňka vhodného objemu, do které se přidá 25 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (14) nebo

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	52
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Vydání	4
		Revize	0

odpovídající množství roztoku kyseliny borité (13) a několik kapek indikátoru (15), není-li v návodu použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Z dávkovacího zařízení se do destilační tuby opatrně přidá vytěšňovací roztok NaOH (10) a její obsah se začne zahřívát přiváděnou vodní párou. Destiluje se asi 5 min, až objem v předloze dosáhne asi 150 ml, není-li v návodu použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Obsah titrační baňky se titruje ihned po skončení destilace (pokud to dovolují podmínky instrumentace, doporučuje se titrovat již během destilace) odměrným roztokem hydroxidu sodného (11) nebo odměrným roztokem kyseliny sírové (14) do právě vzniklé změny zabarvení roztoku. Koncentrace odměrného titračního roztoku (kyselina sírová nebo hydroxid sodný) se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek ve zkoušeném vzorku a podle objemu mineralizátu použitého k destilaci.

Jímání destilátu do kyseliny borité je možné jen v případě, že teplota kondenzátu nepřesáhne 25 °C (chlazení).

Souběžně se stejným postupem provede slepá zkouška.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah celkového dusíku (%) se vypočítá podle vztahu

Při jímání destilátu do kyseliny sírové a retitraci nadbytku odměrným roztokem hydroxidu sodného

$$X = \frac{e \times fx \times (V_o - V_1)}{10 \times m}$$

Při jímání destilátu do kyseliny borité a přímé titraci odměrným roztokem kyseliny sírové

$$X = \frac{e \times fx \times (V_3 - V_2)}{10 \times m}$$

kde

X je celkový obsah dusíku (%),

V_o spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku (ml),

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	53
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30922.1 Stanovení celkového titrační metodou podle Jodlbauera	Revize	0

V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek (ml)

V_2 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku (ml),

V_3 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek (ml),

m hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku (g).

$$m = \frac{\text{navážka} \times \text{pipet.objem}}{\text{objem}}$$

f_x faktor odměrného roztoku,

e chemický ekvivalent dusíku pro 1 ml odměrného roztoku příslušné koncentrace (např. 1 ml přesně 0,05 mol/l kyseliny sírové odpovídá 1,4007 mg dusíku).

Přepočet na sušinu

Obsah celkového dusíku v bezvodém vzorku (sušině) X_s se vypočte násobením výsledku koeficientem

$$X_s = \frac{X \times 100}{S}$$

X_s celkový obsah dusíku v sušině (%),

S sušina vzorku (100 – vlhkost) (%).

Literatura

1. ČSN 68 4065 Příprava odměrných roztoků pro acidobazické titrace, čl. 2.1 a 2.2, z 6.10. 1983
2. ČSN 68 4062 Chemické indikátory. Příprava roztoků indikátorů, odst. 2.3.3 a 2.3.4, z 13.4. 1979.
3. G. Hoffmann et. al.: Methodenbuch, Band I, Die Untersuchung von Böden, kap. 2.2.3. VDLUFA-Verlag. Darmstadt 1991.
4. ISO 11261 Soil quality – Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl method. First edition 1995-03-01.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	54
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30930.1 Příprava vzorků a extrakce pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku	Revize	0

PŘÍPRAVA VZORKŮ A EXTRAKCE PRO STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO A AMONNÉHO DUSÍKU

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro stanovení anorganických forem dusíku ve všech typech půd a příbuzných materiálech. Extrakční postupy je možné použít na čerstvou i vysušenou půdu. Volba extrakčního postupu závisí na variantě analytického postupu pro jednotlivá stanovení.

2. Princip

Dusičnanový a amonný dusík se z půd extrahuje roztokem neutrální soli. Po filtraci nebo odstředění se extrakt použije na stanovení jednotlivých anorganických forem dusíku. V průběhu úpravy a skladování vzorků půd se změny omezí uchováváním při nízkých teplotách.

3. Pomůcky

1. Zařízení pro úpravu čerstvých půdních vzorků (prosev 5 mm).
2. Mrazicí box a chladnička.
3. Předvážky a analytické váhy.
4. Rotační nebo horizontální třepačka.

Poznámky

1. Pro úpravu vzorků je možné použít i struhadlo s otvory přibližně 5 mm.

4. Chemikálie

1. Chlorid draselný, KCl, roztok, $c(\text{KCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 74,55 g chloridu draselného se rozpustí v asi 350 ml vody. Po rozpuštění se roztok převede kvantitativně do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku.

2. Síran draselný, K_2SO_4 , $c(\text{K}_2\text{SO}_4)$, roztok, $c = 10 \text{ g/l}$.

Příprava: 10 g síranu draselného se rozpustí v asi 350 ml vody. Po rozpuštění se roztok převede kvantitativně do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	55
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30930.1 Příprava vzorků a extrakce pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku	Revize	0

3. Chlorid vápenatý, CaCl_2 , roztok, $c(\text{CaCl}_2) = 0,01 \text{ mol/l}$.

Příprava: 1,470 g dihydrátu chloridu vápenatého se rozpustí v asi 350 ml vody. Po rozpuštění se roztok převede kvantitativně do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku.

5. Pracovní postup

Odběr, skladování a úprava vzorku

Během odběru, transportu, úpravy i skladování vzorků půd je třeba zabránit zahřátí nad 4°C . Pokud se vzorky analyzují do 3 dnů od odběru, je možné je skladovat při 4°C . Déle se vzorky smějí skladovat při teplotách -18°C . Vzorky se mohou rozmrazovat před analýzou při laboratorní teplotě, pokud se analyzují do 4 h od začátku rozmrazování. Rozmrazování při 4°C je také možné, ale doba rozmrazování nesmí být v tomto případě delší než 48 h.

Laboratorní vzorek se připraví pečlivým promícháním vzorku a rozmělněním na částice menší než 5 mm.

Poznámky

2. Aby se zkrátila doba potřebná pro rozmrazení vzorku, je vhodné mrazit až upravený laboratorní vzorek.

Varianta A – ISO 14256

40,0 g laboratorního vzorku půdy se naváží do uzavíratelné plastové lahve o objemu 500 ml. Přidá se 200 ml extrakčního roztoku chloridu draselného (1) o teplotě 20°C . Extrakce probíhá na vhodné třepačce při 20°C po dobu 60 min. Po extrakci se suspenze dekantuje do centrifugačních nádobek a odstředí se po dobu 10 min při 3000 g. Čirý supernatant se použije pro další analýzy. Množství čirého podílu vzorku závisí na použité metodě stanovení.

Poznámky

3. Centrifugace může být nahrazena filtrací přes filtrační papíry, které nekontaminují vzorek. Pro stanovení amonného dusíku jsou vhodné běžné archivové filtrační papíry (ne kvantitativní!) promyté před filtrací nejméně dvakrát horkou vodou. První podíl filtrátu se odstraní. Doporučuje se uchovávat filtry nejméně jeden týden v exsikátoru nad koncentrovanou kyselinou sírovou.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	56
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30930.1 Příprava vzorků a extrakce pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku	Revize	0

4. Je možné použít i jinou navážku vzorku, ale je třeba vždy zachovat poměr půdy extrakčnímu činidlu 1 : 5 ($m : V$).

Varianta B – ÚKZÚZ

50,0 g laboratorního vzorku půdy se naváží do uzavíratelné plastové lahve o objemu 1000 ml. Přidá se 250 ml extrakčního roztoku síranu draselného (2) o teplotě 20 °C. Extrakce probíhá 60 min na vhodné třepačce při 20 °C. Po extrakci se suspenze dekantuje a filtruje (poznámka 3).

Poznámky

5. Místo filtrace je možné použít centrifugaci.
6. Místo roztoku síranu draselného lze použít roztok síranu draselného-hlinitého připraveného rozpouštěním 10,0 g dodekahydrátu síranu draselného-hlinitého v demineralizované vodě a úpravou objemu na 1000 ml.
7. Při zachování uvedeného extrakčního poměru se může použít jiná navážka laboratorního vzorku. Snížení navážky nesmí být na úkor homogenity vzorku.

Varianta C

10,00 g upraveného půdního vzorku se extrahuje 100 ml extrakčního roztoku chloridu vápenatého (3) v 250ml polyetylenové lahvi. Na rotační třepačce je při (45 – 55) ot./min a 20 °C dosaženo rovnováhy za 2 h.

Poznámky

8. Chlorid vápenatý je hygroskopický a činidlo je třeba před použitím standardizovat titrací EDTA na eriochromčern T, případně se činidlo může uchovávat neprodyšně uzavřené v chladničce.
9. Místo 1,470 g dihydrátu chloridu vápenatého lze použít 1,11 g bezvodého chloridu vápenatého nebo 2,19 g hexahydrátu chloridu vápenatého.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	57
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30930.1 Příprava vzorků a extrakce pro stanovení dusičnanového a amonného dusíku	Revize	0

Literatura

1. ISO 14256-1: Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field moist soils by extraction with potassium chloride solution. Part 1: Manual method. International Organization for Standardization, 2003. Part 2: Automated method with segmented flow analysis, International Organization for Standardization, 2005.
2. V.G.J. Houba: Soil Extraction Procedures. Extraction with 0,01M CaCl₂. Soil and Plant Analysis, part 5A, Wageningen Agricultural University, 1994.
3. VDLUFA, Methodenbuch, Band 1, Die Untersuchungen von Böden. VDLUFA Verlag, Darmstadt 1991.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	58
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO A DUSITANOVÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY

1. Rozsah použití

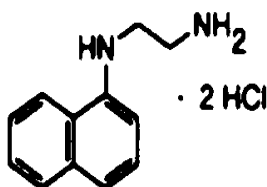
Postup je vhodný pro stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku ve všech extraktech podle metody 30930.1.

2. Princip

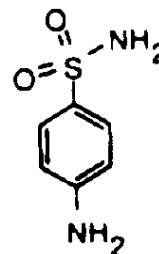
Dusičnany přítomné v extraktu půdy se redukují na dusitany, které tvoří v kyselém prostředí po přidavku sulfanilamidu a N-(1-naftyl) etylendiamin dihydrochloridu (Griess-Ilosvayovo činidlo) azobarvivo. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při 543 nm.

Poznámky

1. Obsah dusitanového dusíku v extraktech půd bývá ve většině případů zanedbatelný, proto je zpravidla možné považovat změřenou hodnotu za obsah dusičnanového dusíku.
2. V této kapitole je popsán manuální postup. Součástí normy ISO 14256-1 je také postup s využitím průtokových analyzátorů (CFA). Vzhledem k různým postupům, které závisejí na typu použitého přístroje, je třeba se při použití analyzátorů řídit návodem k použití a příslušnou firemní aplikační literaturou. Velkou výhodou při použití průtokových analyzátorů je snížení objemu vzorků a činidel a možnost využívat komerčně dodávané reduktory.



N-(1-naftyl) etylendiamin dihydrochlorid



sulfanilamid

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	59
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

3. Pomůcky

1. Spektrofotometr schopný měřit při 543 nm s kyvetou o optické délce 10 mm.
2. Dilutor nebo vhodné dávkovače.
3. Redukční kolona.

4. Chemikálie

1. Dusičnan sodný, NaNO_3 , zásobní standardní roztok, $c(\text{NO}_3\text{-N}) = 600 \text{ mg/l}$.

Příprava: 3,641 g dusičnanu sodného se rozpustí v kádince v asi 200 ml vody. Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku vodou. Roztok je stálý 6 měsíců při uchování ve skle v temnu při teplotě 4 °C.

2. Dusičnan sodný, NaNO_3 , kalibrační standardní roztok, $c(\text{NO}_3\text{-N}) = 6 \text{ mg/l}$

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml zásobního standardního roztoku dusičnanu sodného (1) a baňka se doplní po značku vodou. Tento roztok se připravuje denně čerstvý.

3. Dusitan sodný, NaNO_2 , zásobní standardní roztok, $c(\text{NO}_2\text{-N}) = 600 \text{ mg/l}$.

Příprava: 2,958 g dusitanu sodného se rozpustí v kádince v asi 20 ml vody. Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku vodou. Roztok je stálý 6 měsíců při uchování ve skle v temnu při teplotě 4 °C.

4. Dusitan sodný, NaNO_2 , kalibrační standardní roztok, $c(\text{NO}_2\text{-N}) = 6 \text{ mg/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml zásobního standardního roztoku dusitanu sodného (3) a baňka se doplní po značku vodou. Tento roztok se připravuje denně čerstvý.

5. Hydroxid amonný, NH_4OH , roztok 6% (w/v).

Příprava: 250 ml koncentrovaného hydroxidu amonného (32%) se rozpustí v asi 500 ml vody a objem se upraví na 1000 ml vodou.

6. Tlumivý roztok.

Příprava: V 1000ml kádince se v asi 800 ml vody rozpustí 100 g chloridu amonného. pH roztoku se upraví zředěným roztokem hydroxidu amonného (5) na hodnotu 8,7 až 8,8.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	60
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

Po převedení do 1000ml odměrné baňky se baňka doplní po značku.

7. Zředěný tlumivý roztok.

Příprava: 100 ml tlumivého roztoku (6) se doplní do 1000 ml vodou.

8. Kyselina fosforečná, koncentrovaná, H_3PO_4 , 85%.

9. Kyselina chlorovodíková, HCl , koncentrovaná, $\rho(\text{HCl}) = 1,12 \text{ g/cm}^3$.

10. Směsné činidlo.

Příprava: Do 1000ml kádinky se k asi 600 ml vody přidá 200 ml kyseliny fosforečné (8). Po promíchání se v tomto roztoku rozpustí 80 g sulfanilamidu. Po rozpuštění se roztok převede do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku vodou. Při uchování v chladničce je tento roztok stálý nejméně rok.

11. Roztok N-(1-naftyl) etylendiamino dihydrochloridu.

Příprava: 0,40 g N-(1-naftyl) etylendiamino dihydrochloridu se rozpustí ve 100 ml vody. Roztok musí být uchováván v chladničce. Při ztmavnutí je třeba připravit nový roztok.

12. Vybarvovací činidlo.

Příprava: Smísí se 20 ml směsného činidla (10) a 20 ml roztoku (11). Roztok se uchovává v chladničce. Při ztmavnutí je třeba připravit nový roztok.

13. Reduktor.

Příprava: Asi 10 g kadmiové drtě (velikost 0,3 mm až 0,8 mm) se zalije kyselinou chlorovodíkovou (9), promíchá a nechá 1 min působit. Potom se kadmium pětkrát promyje vodou. Po promytí se kadmium zalije vodou a přidá se asi 0,5 g pentahydrátu síranu měďnatého. Směs se promíchává 1 min a potom se promývá vodou tak, aby došlo k odstranění veškerých volných částecí mědi. Po promytí se opět 1 min promíchává s kyselinou chlorovodíkovou (9), potom se promyje nejméně $5 \times$ vodou. Takto upravené kadmium se uchovává pod vodou až do použití. Kolona se musí kadmíem naplnit do 1 h od přípravy. Kadmium nepoužité pro naplnění kolony se po vysušení může skladovat a použít pro další přípravu reduktoru popsaným postupem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	61
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

5. Pracovní postup

Příprava redukční kolony

Používá se filtrační nálevka o průměru 60 mm se stopkou o průměru asi 5 mm a dlouhou (10 – 12) cm. Stopka je na konci zúžena na vnitřní průměr asi 1 mm a opatřena kohoutem. Do spodní části kolony nad zúžení se vloží asi 1 cm vaty ze skleněných vláken, stopka se zaplní reduktorem asi 1 cm pod začátek stopky a reduktor se překryje opět vrstvou vaty. Plní se suspenzí aktivovaného kadmia při otevřeném ventilu. Rovnoměrného naplnění se docílí pomalým plněním a stálým poklepáváním na stopku. Po naplnění se promyje zředěným tlumivým roztokem (7), uzavře se ventil a nálevka se naplní zředěným tlumivým roztokem a uzavře víčkem. Takto upravená kolona může být skladována několik týdnů.

Příprava redukční kolony před měřením

Nejprve se vypustí zředěný tlumivý roztok z kolony, promyje se vodou, aby se odstranily krystaly soli v nálevce a kolona se promývá nejprve 20 ml zředěného tlumivého roztoku (7), potom 20 ml tlumivého roztoku (6) a opět 20 ml zředěného tlumivého roztoku (7).

Ověření účinnosti redukce

Účinnost redukce se ověří porovnáním absorpance kalibračního standardního roztoku dusičnanového a dusitanového dusíku po redukci a vybarvení. Pokud je rozdíl větší než 5 % rel., je třeba připravit nový reduktor.

Redukce

Po vyprázdnění kolony se uzavře kohout a na vrchní část skelné vaty se pipetuje 1,00 ml půdního extraktu nebo slepého pokusu nebo pracovního standardního roztoku nebo nulového standardního kalibračního roztoku (voda). Do nálevky se přidá 10 ml zředěného tlumivého roztoku (7) a otevře se kohout. Perkolát se jímá do zkumavky nebo baňky o objemu větším než 30 ml. Když hladina tlumivého roztoku v nálevce klesne na úroveň horní ucpávky, přidá se dalších 20 ml zředěného tlumivého roztoku (7). Po perkolaci se před dávkováním dalšího vzorku kolona propláchne asi 10 ml zředěného tlumivého roztoku (7).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	62
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

Spektrofotometrické stanovení

K perkolátu se přidá 200 µl vybarvovacího činidla (12), obsah se pečlivě promíchá a roztoky se nechají stát při laboratorní teplotě. Absorbance roztoků se měří po (60 – 90) min od přidání vybarvovacího činidla při 543 nm v kyvetě o optické délce 10 mm. Při překročení rozsahu kalibrační křivky se půdní extrakt zředí extrakčním činidlem a stanovení se opakuje.

Poznámky

- Norma ISO 14256-1 předpokládá použití pouze jednoho bodu kalibrační křivky a vyžaduje tedy přísně lineární kalibrační křivku. Postup lze modifikovat tak, že se připraví více kalibračních standardních roztoků. Pro přípravu kalibračních standardních roztoků norma nepředpokládá modelování matrice půdního extraktu. Případný vliv nečistot extrakčního činidla se odstraní důsledným zařazováním slepých pokusů.*
- Pokud je třeba stanovit obsah dusitanového dusíku, může se použít shodný postup s vynecháním redukčního kroku a s využitím dusitanového kalibračního standardního roztoku. Vzhledem k podstatně nižším obsahům dusitanů v půdách (obvykle jsou tyto obsahy prakticky nulové) se upraví rozsah kalibrační křivky i ředění vzorků.*

6. Výpočet

$$N = 6 \times [(A_v - A_b) / (A_s - A_n)] \times D \times R$$

- N obsah dusičnanového a dusitanového dusíku v půdě (mg/kg), vztaženo na suchou půdu,
 A_v absorbance vzorku,
 A_b absorbance slepého pokusu,
 A_s absorbance kalibračního standardního roztoku,
 A_n absorbance nulového bodu kalibrační křivky,
 6 koncentrace dusíku v kalibračním standardním roztoku,
 D zředovací faktor – používá se při překročení rozsahu kalibrační křivky, když bylo třeba extrakt půd před měřením ředit,
 R faktor, který zahrnuje extrakční poměr půdy k vyluhovacímu roztoku, provádí korekci na vodu dodanou ve vzorku a přepočítává na sušinu podle ISO 11465.

$$R = V_e / M_s \times (1 + w / 100) + w / 100$$

- V_e objem extrakčního činidla (ml); při extrakci podle ISO 14256-1 V_e = 200 ml,
 M_s navážka vzorku půdy (g); při extrakci podle ISO 14256-1 M_s = 40 g,
 w obsah vody v půdě v hmotnostních procentech vztažený na vysušenou půdu podle ISO 11465.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	63
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30931.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku spektrofotometricky	Revize	0

Literatura

1. ISO 14256-1: Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field moist soils by extraction with potassium chloride solution. Part 1: Manual method. International Organization for Standardization, 2003.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	64
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30932.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku metodou UV spektrofotometrie	Revize	0

STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO DUSÍKU METODOU UV SPEKTROFOTOMETRIE

1. Rozsah použití

Postup byl vyvinut pro analýzu extraktů půd podle varianty A metody 30930.1, ale může se použít i pro stanovení dusičnanového dusíku ve všech extraktech podle metody 30930.1 a v půdních extraktech při mikrobiologických stanoveních.

2. Princip

Dusičnany přítomné v extraktu půdy absorbují světelné záření v UV oblasti spektra (210 nm). Od změřené absorbance extraktu půdy se odečte absorbance téhož extraktu po redukci dusičnanů na dusitany. Výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

Poznámky

- V literatuře se uvádí možnost vynechat redukční krok měřením rozdílu absorbance při 210 nm a 275 nm, ale vzhledem ke specifickým problémům měření v UV oblasti spektra je vhodnější použít zde uvedený postup.*

3. Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr s možností měření při 210 nm s křemennou kyvetou o optické délce 10 mm.
- Dilutor nebo vhodné dávkovače.

4. Chemikálie

- Dusičnan sodný, NaNO_3 , zásobní standardní roztok, $c(\text{NO}_3\text{-N}) = 100 \text{ mg/l}$.

Příprava: 0,3034 g dusičnanu sodného se rozpustí v kádince v asi 100 ml vody. Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně převede do 500ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku vodou. Při uchování ve skle a v temnu při teplotě 4 °C je roztok stálý 6 měsíců.

- Reduktor.

Příprava: K 20 g granulí zinku o průměru asi (3 – 5) mm se přidá potřebné množství zředěné kyseliny sírové (4). Nechá se působit do očištění povrchu granulí. Potom

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	65
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30932.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku metodou UV spektrofotometrie	Revize	0

se granule opláchnou vodou a kapalina se odsaje na Büchnerově nálevce. K opláchnutým granulím se v kádince přidá 150 ml vody a po kapkách se za míchání přidává 25 ml roztoku síranu měďnatého (5). Po zčernání granulí se roztok odsaje a granule se pečlivě opláchnou vodou. Po usušení se skladují v uzavřené skleněné nádobě.

3. Kyselina sírová, H_2SO_4 , zředěná (1 : 10).

Příprava: K asi 700 ml vody se opatrně přidává 100 ml koncentrované kyseliny sírové. Po ochlazení se objem upraví na 1000 ml vodou.

4. Kyselina sírová, H_2SO_4 , zředěná (1 : 1).

5. Síran měďnatý, CuSO_4 , nasycený roztok.

5. Pracovní postup

Kalibrační křivka

Do 100ml odměrných baněk se pipetuje (0,0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0) ml pracovního standardního roztoku (1) a baňky se doplní po značku extrakčním roztokem (2.2.1.4-2). Koncentrace dusičnanového dusíku v připravených roztocích je (0,0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0) mg/l.

Příprava pro měření

Do dvou zkumavek se pipetuje 3,5 ml slepého pokusu, kalibračního standardního roztoku nebo vzorku a 140 μl zředěné kyseliny sírové (3). Po promíchání se do jedné ze zkumavek přidají 3 kousky reduktoru (2) a zkumavky se nechají stát přes noc.

Spektrofotometrické stanovení

Nulová linie přístroje se nastaví na vodu. Potom se měří absorbance jednotlivých roztoků při 210 nm v kyvetě o optické délce 10 mm. Z rozdílů absorbancí s reduktorem a bez reduktoru pro kalibrační standardní roztoky se sestojí kalibrační křivka. Rozdíly absorbancí jednotlivých vzorků s reduktorem a bez reduktoru se vyhodnocují z této křivky. Stejným způsobem se stanoví hodnota slepého pokusu, která se od výsledků odečte. Při překročení rozsahu kalibrační křivky se stanovení opakuje s použitím vzorku zředěného extrakčním činidlem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	66
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30932.1 Stanovení dusičnanového a dusitanového dusíku metodou UV spektrofotometrie	Revize	0

Poznámky

- 2. V průběhu měření musí být zachována konstantní teplota, protože hodnota absorpance dusičnanového iontu je teplotně závislá.*
- 3. Při styku vzorků nebo standardů s plasty může dojít ke zvýšení hodnoty absorpance (přidáním peroxidu vodíku se může tento nárůst odstranit).*
- 4. Stanovení je silně rušeno rozptylem na pevných částechkách v roztoku (např. na vláknech filtračních papírů).*
- 5. V průběhu práce je třeba pracovat se stejnou šarží vody. Je vhodné použít vodu zbavenou organických látek.*

Literatura

1. J. Zbiral: Ověření citlivého stanovení dusičnanů v mokřém depozitu z monitorovacích bodů. Závěrečná zpráva vývojového úkolu 11/92. ÚKZÚZ Brno, 1992.
2. VDLUFA, Methodenbuch, Band 1, Die Untersuchung von Böden. VDLUFA Verlag, Darmstadt 1991.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	67
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30933.1 Stanovení dusičnanového dusíku iontově selektivní elektrodou	Revize	0

STANOVENÍ DUSIČNANOVÉHO DUSÍKU IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODOU

1. Rozsah použití

Postup je použitelný pro analýzu extraktů půd podle varianty B metoda 30930.1. Stanovení ruší přítomnost chloridů, dusitanů, hydrogenuhličitanů a některých dalších aniontů.

2. Princip

Dusičnany přítomné v extraktu půdy způsobují změnu potenciálu dusičnanové iontově selektivní elektrody. Rušivý vliv chloridů se odstraňuje přidávkem síranu stříbrného.

Poznámky

- Vzhledem k rušivému vlivu chloridů nelze použít referenční kalomelovou elektrodu. Pro měření je třeba použít síranový solný můstek nebo referenční merkuro-sulfátovou elektrodu.*

3. Pomůcky

- Milivoltmetr nebo pH-metr s rozsahem nejméně (0 – 400) mV a přesností 0,1 mV.
- Dusičnanová iontově selektivní elektroda a referenční elektroda, která neobsahuje v kontaktním elektrolytu dusičnany ani chloridy.

4. Chemikálie

- Dusičnan sodný, NaNO_3 , zásobní standardní roztok, $c(\text{NO}_3\text{-N}) = 1000 \text{ mg/l}$.

Příprava: 6,068 g dusičnanu sodného se rozpustí v kádince v asi 200 ml vody. Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku vodou. Roztok je stálý 6 měsíců při uchování ve skle v temnu při teplotě 4 °C.

- Dusičnan sodný, NaNO_3 , pracovní standardní roztok, $c(\text{NO}_3\text{-N}) = 200 \text{ mg/l}$.

Příprava: 20 ml zásobního standardního roztoku dusičnanu sodného (1) se pipetuje do 100ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku extrakčním roztokem síranu draselného (30930.1, Chemikálie, položka 2).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	68
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30933.1 Stanovení dusičnanového dusíku iontově selektivní elektrodou	Revize	0

5. Pracovní postup

Kalibrační křivka

Do 100ml odměrných baněk se pipetuje (0; 1; 2; 5; 10) ml pracovního standardního roztoku (2) a baňky se doplní po značku extrakčním roztokem (2.2.1.4-2). Koncentrace dusičnanového dusíku v připravených roztocích je (0; 2; 4; 10; 20) mg/l a pro poměr (půda : extrakční roztok) = (1 : 5) odpovídá (0; 10; 20; 50; 100) mg dusičnanového dusíku na kilogram navážené půdy.

Měření

Standardní kalibrační roztoky a vzorky se přelijí do kádinek o objemu 50 ml. Přístroj i elektrody se pro měření připraví podle příslušných návodů k použití. Na přístroji se nastaví měření absolutního potenciálu a elektrody se ponoří do zkoumaného roztoku. Potenciál se odečte po ustálení s přesností na 0,1 mV. Elektrody se před ponořením do dalšího vzorku opláchnou a pečlivě otrou buničitou vatou. Při překročení rozsahu kalibrační křivky se extrakt ředí extrakčním roztokem. Z hodnot zjištěných pro standardní kalibrační roztoky se sestrojí kalibrační graf.

Poznámky

2. Pokud jsou v půdě přítomné chloridy, přidává se před měřením síran stříbrný.
3. Pro měření je vhodnější použít iontově selektivní elektrodu s obnovitelným kapalinovým rozhraním (Šenkýř-Petr).

Literatura

1. V.G.J. Houba, J.J. van der Lee, I. Novozámský, I. Walinga: Soil Analysis Procedures. Soil and Plant Analysis, part 5. Syllabus, Department of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural University, 1989.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	69
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30934.1 Stanovení dusitanových iontů spektrofotometricky	Revize	0

STANOVENÍ DUSITANOVÝCH IONTŮ SPEKTROFOTOMETRICKY

1. Princip

Reakcí se sulfanilamidem se dusitany převedou na diazoniovou sůl a ta reakcí s N- (1- naftyl) - etylendiaminem na fialovou azo sloučeninu. Intenzita fialového zbarvení se měří spektrofotometricky při 540 nm.

2. Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 540 nm a kyvetou 10 mm.

3. Chemikálie

1. Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, $c(\text{HCl}) = 2,4 \text{ mol/l}$.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 21,9 ml koncentrované HCl, převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po značku.

2. Sulfanilamid.

Příprava: 0,5 g sulfanilamidu se rozpustí ve 100 ml HCl (1).

3. Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, $c(\text{HCl}) = 0,12 \text{ mol/l}$.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 1,10 ml koncentrované HCl, převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po značku.

4. N-(1-naftyl)-etylendiamin.

Příprava: 0,03 g N-(1-naftyl)-etylendiaminu se rozpustí v 10 ml HCl (3). Přípravuje se čerstvý.

5. Dusitan sodný, NaNO_2 , zásobní standardní roztok, $c = 100 \mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$.

Příprava: V 500ml baňce se ve vodě rozpustí 0,2463 g NaNO_2 (s přesností na 0,1 mg) a doplní vodou po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	70
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30934.1 Stanovení dusitanových iontů spektrofotometricky	Revize	0

4. Pracovní postup

Příprava kalibrační křivky

V prvním kroku se do 50ml baňky pipetuje 5 ml zásobního standardního roztoku dusitanu sodného (5) a doplní po značku. Tento roztok má koncentraci 10 µg NO₂-N/ml.

Dále se pipetuje podle tabulky 1.

Tabulka 1. Příprava standardů pro stanovení dusitanů v půdním extraktu.

Krok	Pipetovaný roztok (µg NO ₂ -N/ml)	Pipetovaný objem (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace (µg NO ₂ -N/ml)
1.	100	5	50	10
2.	10	5	50	1
3.	1	5	50	0,10
4.	0,1	5	50	0,01
5.	0,1	5	10	0,05
6.	0,1	20	25	0,08
7.	1	10	50	0,20
8.	0,2	15	25	0,12
9.	0,2	20	25	0,16

Dávkování činidel

Pipetuje se 3000 µl roztoku kalibrační křivky nebo vzorku, přidá se 60 µl roztoku sulfanilamidu (2) a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 60 µl N-(1-naftyl)-etylendiaminu (4) a nechá 20 min vybarvovat. Zbarvení je stále několik hodin.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	71
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30934.1 Stanovení dusitanových iontů spektrofotometricky	Revize	0

Měření

Měří se absorbance standardů a vzorků při 540 nm v 10mm kyvetě. Koncentrace dusitanů v extraktu se stanoví odečtem z kalibrační křivky.

5. Výpočet

Varianta A

Navažovala se daná navážka čerstvého vzorku

$$\text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/g}_{\text{suš}}) = \text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/ml}) \times \frac{V \times (w + 100) + m \times w}{100 \times m}$$

NO₂-N (μg/g_{suš}) koncentrace dusitanového N (μg/ml) v půdním vzorku
přepočtená na sušinu

NO₂-N (μg/ml) koncentrace dusitanového N (μg/ml) v extraktu,

V objem extrakčního činidla (ml),

m navážka čerstvé půdy (g),

w vlhkost vyjádřená jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Varianta B

Navažovala se čerstvá půda, jejíž množství odpovídalo danému množství suché půdy (např. SNA)

$$\text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/g}_{\text{suš}}) = \text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/ml}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

NO₂-N (μg/g_{suš}) koncentrace dusitanového N (μg/ml) v půdním vzorku
přepočtená na sušinu

NO₂-N (μg/ml) koncentrace dusitanového N (μg/ml) v extraktu,

V objem extrakčního činidla (ml),

m hmotnost suché půdy, které odpovídá dané navážce čerstvé půdy (g),

w vlhkost vyjádřená jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	72
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30935.1 Stanovení amonného dusíku iontově selektivní elektrodou	Revize	0

STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODOU

1. Rozsah použití

Postup je použitelný pro analýzu všech extraktů půd podle kapitoly 2.2.1. Stanovení ruší přítomnost látek rychle hydrolyzujících v alkalickém prostředí za uvolňování plynného amoniaku (např. amidy, kyanidy, apod.).

2. Princip

Amonné ionty přítomné v extraktu půdy se kvantitativně převedou na amoniak při pH 11 až 13. Uvolněný amoniak prochází membránou plynové elektrody a mění její potenciál. Změna potenciálu se vyhodnocuje metodou kalibrační křivky.

3. Pomůcky

1. Milivoltmetr nebo pH-metr s přesností 0,1 mV.
2. Amoniaková plynová elektroda.
3. Magnetická míchačka s míchadlem.

4. Chemikálie

1. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, zásobní standardní roztok, $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 250 \text{ mg/l}$.

Příprava: 1,1792 g síranu amonného se rozpustí v kádince v asi 200 ml vody. Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky, přidá se 1 ml chloroformu a baňka se doplní po značku vodou. Roztok je stálý 3 měsíce při uchování ve skle v temnu při teplotě 4 °C.

2. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pracovní standardní roztok, $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 10 \text{ mg/l}$.

Příprava: 10 ml zásobního standardního roztoku síranu amonného (1) se pipetuje do 250ml odměrné baňky a baňka se doplní po značku extrakčním roztokem (2.2.1). Roztok je stálý jeden den.

3. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/l}$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	73
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30935.1 Stanovení amonného dusíku iontově selektivní elektrodou	Revize	0

Příprava: 40 g pevného hydroxidu sodného se rozpustí ve vodě a objem roztoku se upraví na 100 ml. Roztok se skladuje v plastové pevně uzavřené nádobce. Je stálý asi 1 týden.

5. Pracovní postup

Kalibrační křivka

Do 100ml odměrných baněk se pipetuje (0; 2; 4; 6; 10; 20) ml pracovního standardního roztoku (2) a baňky se doplní po značku použitým extrakčním roztokem. Koncentrace amonného dusíku v připravených roztocích je (0; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 2) mg/l a pro poměr (půda : extrakční roztok) = (1 : 5) odpovídá (0; 1; 2; 3; 5; 10) mg amonného dusíku na kilogram navážené půdy.

Měření

Do kádinek o objemu 150 ml se pipetuje 50 ml kalibračních roztoků, vzorků nebo slepých pokusů. Přístroj i elektrody se pro měření nastaví podle návodu k použití. Na přístroji se nastaví měření absolutního potenciálu a elektroda se ponoří do zkoumaného roztoku v kádince umístěné na elektromagnetické míchačce. Za stálého míchání se přidá 0,5 ml roztoku hydroxidu sodného (3) a po ustálení se odečte potenciál elektrody. Za ustálený stav se považuje shodná hodnota potenciálu po dobu 1,5 min. Potenciál se odečte po ustálení s přesností na 0,1 mV. Elektroda se před ponořením do dalšího vzorku opláchne vodou a pečlivě otre buničitou vatou. Měří se od nulového bodu kalibrační křivky směrem k vyšším hodnotám. Při překročení rozsahu kalibrační křivky se extrakt ředí extrakčním roztokem. Z hodnot zjištěných pro standardní kalibrační roztoky se sestrojí kalibrační graf.

Poznámky

1. *Když elektroda vykazuje stálý drift, je pravděpodobně poškozena membrána a je třeba ji vyměnit. Při snížení citlivosti elektrody je třeba vyměnit vnitřní roztok a vyčistit elektrodu.*
2. *Stanovení ruší sloučeniny rtuti. Jejich přítomnost v půdách je nepravděpodobná, ale v případě jejich výskytu se může rušení odstranit přidávkou NaI před měřením.*
3. *Vzorky i kalibrační standardní roztoky musejí mít stálou teplotu.*
4. *K sestrojení kalibračního grafu se běžně používá výpočetní technika, ale může se použít semilogaritmický papír.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	74
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30935.1 Stanovení amonného dusíku iontově selektivní elektrodou	Revize	0

Literatura

1. V.G.J. Houba, J.J. van der Lee, I. Novozámský, I. Walinga: Soil Analysis Procedures. Soil and Plant Analysis, part 5. Syllabus, Department of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural University, 1989.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	75
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30936.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky	Revize	0

STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro stanovení amonného dusíku v půdních extraktech podle metody 30930.1 a v půdních extraktech při mikrobiologických stanoveních.

2. Princip

Stanovení je založeno na Berthelotově reakci amonných iontů s chlornanem a salicylanem, která dává modré zbarvení (salicylátový analog indofenolu). Intenzita zbarvení se měří fotometricky při 660 nm. Výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

3. Přístroje a pomůcky

1. Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 660 nm a kyvetou 10 mm.
2. Dilutor nebo dávkovač.

4. Chemikálie

1. Reakční roztok.

Příprava: V 375 ml vody se rozpustí 17 g salicylanu sodného, 12,5 g citronanu sodného (popřípadě 14,25 g dihydrátu citronanu sodného nebo 17,3 g citronanu sodného s 5½ molekulami vody), 12,5 g vínanu sodného resp. 14,8 g dihydrátu vínanu sodného, přidá se 0,06 g nitroprusidu sodného a doplní vodou do 500 ml.

2. Alkalický chlornan sodný, NaClO.

Příprava: K 1,75 g NaOH se přidá 5 ml zásobního roztoku NaClO (100 mg/ml). Poté se přidá voda na celkový objem asi 20 ml a po rozpuštění NaOH se objem upraví vodou na 25 ml. Pracovní roztok se uchovává maximálně 5 dnů v dobře uzavřené nádobě při 4 °C.

3. Chlorid amonný, NH₄Cl.

Příprava: 1,908 g NH₄Cl se rozpustí v 500 ml vody a objem se upraví vodou na 1000 ml. Získá se zásobní roztok o koncentraci c(N) = 0,5 g/l.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	76
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30936.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky	Revize	0

4. Pracovní standardní roztok chloridu amonného o $c(N) = 0,02 \text{ g/l}$.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml roztoku chloridu amonného a doplní se po značku extrakčním roztokem.

5. Pracovní postup

Kalibrační křivka

Do 100ml odměrných baněk se pipetuje (0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0) ml pracovního standardního roztoku (4). Baňky se doplní po značku extrakčním roztokem. Připravené kalibrační standardní roztoky odpovídají koncentraci amonného dusíku (0; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0) mg/l.

V případě analýzy půdních extraktů při mikrobiologických stanoveních se kalibrační křivka připravuje dle tabulky 1. s přihlédnutím na použitý extrakční roztok.

Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků pro stanovení amonných iontů $\text{mg NH}_4^+ \text{-N/l}$.

Krok	Pipetovaný roztok ($\text{mg NH}_4^+ \text{-N/l}$)	Pipetovaný objem (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace ($\text{mg NH}_4^+ \text{-N/l}$)
1	500	10	50	100
2	100	10	100	10
3	10	20	25	8
4	10	15	25	6
5	10	10	25	4
6	10	5	25	2
7	10	5	50	1
8	1	5	50	0,5

Stanovení

Do zkumavek se pipetuje 5 ml (2,5 ml) reakčního roztoku (1) a 1 ml (0,5 ml) půdního

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	77
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30936.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky	Revize	0

extraktu, slepého pokusu nebo kalibračního roztoku. Obsah zkumavky se důkladně promíchá a nechá stát 15 min. Poté se přidá 0,4 ml (0,2 ml) roztoku chlornanu sodného (2), obsah se opět dokonale promíchá a nechá se 1 h vybarvovat. Výsledné zbarvení je stále několik hodin. Intenzita zbarvení se měří na spektrofotometru při 660 nm. Nulová hodnota přístroje se nastaví na demineralizovanou vodu. Hodnota koncentrace amonných iontů ve vzorku se odečte z kalibrační křivky.

Poznámka

1. Při analýze půd s vysokým obsahem organické hmoty (např. F, H horizonty lesních půd) se může vyskytnout hnědé zbarvení výluhu, které nemá vliv na stanovení.

Literatura

1. J.C. Forster: Soil nitrogen (1995) Assay of anaerobic ammonification.
2. Alef, K.: In Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press London, pp. 79–87.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	78
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30937.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky (ISO 14256)	Revize	0

STANOVENÍ AMONNÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY (ISO 14256)

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro stanovení amonného dusíku v půdních extraktech podle metody 30930.1. Podle ISO 14256 je určen pro extrakty půd chloridem draselným.

Poznámky

- 1. Extrakt půd roztokem síranu draselného je možné použít, ale přítomnost síranů snižuje citlivost stanovení.*
- 2. V této kapitole je popsán manuální postup. Součástí normy je také postup automatický s využitím průtokových analyzátorů (CFA). Vzhledem k různým postupům, které závisí na typu použitého přístroje, je třeba se při použití těchto analyzátorů řídit návodem k použití a příslušnou firemní aplikační literaturou. Velkou výhodou při použití průtokových analyzátorů je snížení objemu vzorků a činidel a přesná časová posloupnost dávkování a měření.*

2. Princip

Stanovení je založeno na Berthelotově reakci. Amonné ionty reagují s chlornanem sodným za vzniku monochloriminu. Ten reaguje s fenolem za vzniku chinon chloroiminu, který s další molekulou fenolu tvoří indofenol, který je v alkalickém prostředí modře zbarvený. Jako katalyzátor reakce se používá nitroprusid sodný. Intenzita modrého zbarvení se stanoví spektrofotometricky při 630 nm a výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

Poznámky

- 3. Stanovení ruší močovina, aminokyseliny a jiné dusíkaté látky, které za podmínek stanovení hydrolyzují za uvolnění amoniaku. Dále ruší měď, sulfidy, kyanidy, thiokyanatany a hořčík v koncentraci nad 30 mg/l.*

3. Pomůcky

1. Spektrofotometr s možností měřit při 630 nm s kyvetou o optické délce 10 mm.
2. Dilutor nebo vhodné dávkovače.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	79
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30937.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky (ISO 14256)	Revize	0

4. Chemikálie

1. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, zásobní standardní roztok, $c = 200 \text{ mg } (\text{NH}_4\text{-N})/1000 \text{ ml}$.

Příprava: 0,9438 g síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se rozpustí v asi 100 ml vody, k roztoku se přidá 0,3 ml koncentrované kyseliny sírové pro potlačení mikrobiální aktivity v průběhu skladování. Roztok se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou po značku. Roztok je stálý 1 měsíc při skladování v tmavé lahvi při teplotě 4 °C.

2. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kalibrační standardní roztok, $c = 2,00 \text{ mg } (\text{NH}_4\text{-N})/1000 \text{ ml}$.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml zásobního standardního roztoku síranu amonného (1) a baňka se doplní po značku vodou. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

3. Fenol, roztok, $c = 70 \text{ g/l}$.

Příprava: 70,0 g fenolu se rozpustí v 1000 ml vody. Roztok je stálý nejméně 1 rok při skladování v tmavé lahvi při laboratorní teplotě.

4. Nitroprusid sodný, $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}) \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, roztok, $c = 0,8 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,8 g nitroprusidu sodného se rozpustí v asi 100 ml vody. Po rozpuštění se objem upraví na 1000 ml.

5. Tlumivý roztok.

Příprava: V asi 500 ml vody se rozpustí 22,0 g pevného hydroxidu sodného NaOH a 280 g dihydrátu citronanu trisodného $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Po rozpuštění se objem upraví na 1000 ml.

6. Reakční činidlo 1.

Příprava: Smísí se 15 ml roztoku nitroprusidu sodného (4) a 15 ml roztoku fenolu (3) se 750 ml vody. Roztok se připravuje před použitím.

7. Reakční činidlo 2.

Příprava: 5,0 g dihydrátu kyseliny dichloroisokyanurové $\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 1000 ml tlumivého roztoku (5). Roztok je stálý nejméně 1 měsíc při uchování při 4 °C.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	80
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30937.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky (ISO 14256)	Revize	0

5. Pracovní postup

Do Erlenmeyerových nebo obdobných baněk o objemu asi 100 ml se pipetuje 10 ml půdního extraktu, slepého pokusu, kalibračního roztoku nebo nulového kalibračního roztoku (voda). Potom se přidá 40 ml reakčního činidla 1 (6) a obsah baňky se dobře promíchá. Po 15 min stání se přidá 1 ml reakčního činidla 2 (7) a roztok se opět pečlivě promíchá. Před měřením se nechají roztoky stát nejméně 5 h při laboratorní teplotě. Poté se měří intenzita zbarvení na spektrofotometru při vlnové délce procházejícího světla 630 nm v 10mm kyvetě.

Poznámky

- Norma předpokládá v této úpravě použití pouze jednoho bodu kalibrační křivky a vyžaduje tedy přísně lineární kalibrační křivku. Postup se může modifikovat tak, že se připraví více kalibračních standardních roztoků. Pro přípravu kalibračních standardních roztoků norma nepředpokládá modelování matrice půdního extraktu. Případný vliv nečistot extrakčního činidla se odstraní důsledným zařazováním slepých pokusů.*
- Norma předpokládá pro přípravu základního standardního roztoku použití chloridu amonného. Vzhledem k tomu, že použití síranu amonného je podstatně vhodnější, byla zde použita tato modifikace normy.*

6. Výpočet

$$W = 2 \times [(A_v - A_b) / (A_s - A_n)] \times D \times R$$

- W obsah dusičnanového a dusitanového dusíku v půdě (mg/kg) - vztaženo na suchou půdu,
 A_v absorbance vzorku,
 A_b absorbance slepého pokusu,
 A_s absorbance kalibračního standardního roztoku,
 A_n absorbance nulového bodu kalibrační křivky,
 2 koncentrace dusíku v kalibračním standardním roztoku (mg/l),
 D zředovací faktor. Používá se při překročení rozsahu kalibrační křivky, když bylo třeba extrakt půd před měřením ředit,
 R faktor, který zahrnuje extrakční poměr půdy k vyluhovacímu roztoku, provádí korekci na vodu dodanou ve vzorku a přepočítává na sušinu podle ISO 11465.

$$R = V_e / M_s \times (1 + w/100) + w/100$$

- V_e objem extrakčního činidla (ml), při extrakci podle ISO 14256 je V_e = 200 ml,
 M_s navážka vzorku půdy (g), při extrakci podle ISO 14256 je M_s = 40 g,
 w obsah vody v půdě v hmotnostních procentech vztažený na vysušenou půdu podle ISO 11465

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	81
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30937.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky (ISO 14256)	Revize	0

Literatura

1. ISO 14256-1: Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field moist soils by extraction with potassium chloride solution. Part 1: Manual method. International Organization for Standardization, 2003.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	82
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Stanovení síry	Vydání	4
		Revize	0

STANOVENÍ SÍRY

Ještě poměrně nedávno byl přísun síry do půdy ve formě atmosférických spadů více než dostatečný. Na začátku devadesátých let minulého století byly však významné emisní zdroje v ČR i v bývalé NDR postupně odsířeny nebo odstaveny. Výsledkem bylo, že mezi rokem 1990 a 2006 byly emise oxidu siřičitého v ČR sníženy o více než 90 %. A tento trend byl v celé Evropě, kde se pro členské státy EU uvádí snížení emisí mezi rokem 1990 a 2011 celkově o 74 %. Jistě velmi vítaná a pozitivní změna – ale tato změna znamená také postupný pokles obsahu rostlinám přístupné síry v půdě. A tak se po mnoha letech zanedbávání stává otázka role síry ve výživě rostlin velmi aktuální.

Síra ve výživě rostlin

Síra je především součástí některých aminokyselin, základních stavebních součástí proteinů (asi 90 % síry přijaté rostlinami se využívá pro tento účel), ale je nutná i pro tvorbu celé řady dalších důležitých sloučenin. Nedostatek síry se nemusí primárně projevit snížením výnosů, ale může se projevit snížením kvality produkce. Pro bilanční výpočty se uvádí, že v 1 t zrna obilovin odchází asi (1,5 – 2) kg síry. U řepky je to však až 20 kg. Z environmentálního hlediska je velmi důležitý vztah mezi sírou a dusíkem. Uvádí se, že nedostatek 1 kg síry způsobí, že rostliny nemohou využít až 15 kg dusíku.

Síra v půdě

Z celkového obsahu síry v půdě je ve formě přístupné pro rostliny asi jen 5 %. Přístupná síra se v půdě vyskytuje jednak jako anorganická – z velké většiny v síranové formě. V této formě je značně pohyblivá a může být postupně vymývána do spodních horizontů mimo dosah kořenového systému rostlin. Tyto ztráty jsou uváděny v rozsahu (30 – 80) kg S/ha. Dalším významným zdrojem síry je organická hmota půdy, kde je poměr (C : N : S) zpravidla (125 : 10 : 1,2). Takže mineralizací půdní organické hmoty se zpřístupňuje kromě dusíku i síra. Na půdách s minimálním vstupem síry je více než 90 % síry vázané právě v organické hmotě půdy. Obsah síranů v půdě je závislý na pH, vlhkosti půdy, teplotě, mikrobiální aktivitě, sorpčních schopnostech půdy, srážkách a na vstupech z atmosféry a z hnojiv. A je tu ještě jeden velmi důležitý zdroj síry pro rostliny – spodní voda. Síraný rozpuštěné ve spodní vodě mohou

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	83
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Stanovení síry	Vydání	4
		Revize	0

kapilárními silami dosáhnout úroveň kořenového systému rostlin. Tento zdroj síry je významnější u středně těžkých a těžkých půd, u lehkých písčitých půd se často nemůže uplatnit. Ovšem i na těžších půdách, kde došlo k utužení půdy v podorničním horizontu, může být tento pohyb síranů pouze omezený.

Síra v systému AZZP

Agrochemické zkoušení zemědělských půd (AZZP) ČR je založené na extrakčním postupu podle Mehlicha 3. Extrakční roztok podle Mehlicha 3 je univerzální extrakční činidlo, ve kterém lze stanovit obsah všech hlavních živin (P, K, Mg, Ca), mikroživin (Cu, Zn, Mn, Fe, B) a také obsah rostlinám přístupné síry. Extrakční roztok podle Mehlicha 3 je použitelný i pro stanovení síry. Jeho velkou výhodou je to, že může velmi efektivně využít moderní analytické metody – především optickou emisní spektrometrii v indukčně vázaném plazmatu. Tato metoda umožňuje současné a velmi rychlé stanovení všech vyjmenovaných prvků v extraktu půdy. Zavedení stanovení síry do systému AZZP bylo tedy bylo poměrně snadné a levné. Postupy stanovení, které jsou využívány v systému AZZP jsou uvedeny v prvním díle (Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ, Analýza půd I).

Norma ISO 11048 popisuje stanovení síranů v půdách po extrakci vodou i po extrakci zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Norma zahrnuje pouze postup gravimetrického stanovení síranů jako síran barnatý, ale především při potřebě stanovení koncentrací síranů v roztoku pod 10 mg/l připouští použití jiných analytických postupů. Je to především ICP-OES, turbidimetrické FIA stanovení, nepřímá FIA spektrofotometrie s použitím 2-aminoperimidinu, SFA s methylthymolovou modří, iontová chromatografie nebo kapilární elektroforéza.

Při použití analytických postupů, které stanovují celkový obsah síry v extraktu (ICP-OES), je třeba počítat s tím, že v extraktech půd není všechna síra ve formě síranové. Výsledky i jejich vyhodnocení musejí s tímto faktem počítat. Podrobněji je tento problém popsán v dále uvedené literatuře.

Použití různých extrakčních postupů umožňuje rozlišit zastoupení lehce a obtížně rozpustných síranů (sádra apod.).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	84
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Stanovení síry	Vydání	4
		Revize	0

Literatura

1. ČSN ISO 11048: Kvalita půdy – Stanovení síranů rozpustných ve vodě a síranů rozpustných v kyselině. ČSNi Praha 1998.
2. J. Zbírál a kol.: Porovnání extrakčních postupů pro stanovení základních živin v půdách ČR. ÚKZÚZ Brno, 172-190. 2001.
3. Kulhánek M., Černý J., Balík J., Sedlář O., Suran P. (2018): Potential of Mehlich 3 method for extracting plant available sulfur in the Czech agricultural soils. Plant Soil Environ., 64: 455-462.
4. Jiří Zbírál, Michaela Smatanová, Pavel Němec (2018): Sulphur status in agricultural soils determined using the Mehlich 3 method. Plant, Soil and Environment, 64, 255-259 <https://doi.org/10.17221/142/2018-PSE>

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	85
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30940.1 Extrakce půd pro stanovení síranů a síry	Vydání	4
		Revize	0

EXTRAKCE PŮD PRO STANOVENÍ SÍRANŮ A SÍRY

1. Rozsah použití

Stanovení je určeno pro půdy upravené podle metody 30010.1.

Poznámky

1. ČSN ISO 11048 předpokládá vyjádření výsledků po přepočtení na sušinu. Pro stanovení sušiny v tomto případě nemá teplota překročit 80 °C, aby nedocházelo ke ztrátě krystalové vody ze sádry. Podíl vzorku použitý pro stanovení sušiny se pro další analýzu nepoužívá.
2. Norma předpokládá další úpravu jemnozeme I tak, aby vzorek prošel sítím 250 μm . Pokud se použijí vzorky o původní zrnitosti (pod 2 mm), jsou výsledky zpravidla o (2 – 5) % nižší. Vzhledem k celkové chybě stanovení dané především chybou odběru vzorku půdy, obvykle se může pro stanovení použít jemnozeme I a rozdíl zanedbat. Tuto skutečnost je však třeba vždy uvést v protokolu.

2. Princip

Navážka upraveného vzorku půdy se extrahuje vodou v poměru (1 : 2) nebo (1 : 5), případně zředěnou kyselinou chlorovodíkovou zředěnou.

3. Přístroje a pomůcky

1. Rotační nebo horizontální třepačka s takovou intenzitou třepání, aby po celou dobu třepání nedocházelo k usazování půdy.
2. Topná deska s regulací teploty nebo písková lázeň.

4. Chemikálie

1. Demineralizovaná voda s obsahem síranů pod mezí detekce použité analytické metody.
2. Kyselina chlorovodíková, HCl, zředěná $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$.

Příprava: K (500 $\pm$ 10) ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($\rho = 1,18 \text{ g/cm}^3$) se opatrně přidává voda (1) až do celkového objemu 1000 ml.

3. Amoniak, zředěný vodný roztok.

Příprava: 500 ml vodného roztoku amoniaku ($\rho = 0,880 \text{ g/cm}^3$) se doplní vodou (1) na 1000 ml.

4. Dusičnan stříbrný, AgNO_3 , roztok, $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$ (přibližně).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	86
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30940.1 Extrakce půd pro stanovení síranů a síry	Revize	0

Příprava: (17 ± 1) g dusičnanu stříbrného se rozpustí v asi 800 ml vody (1) a po rozpuštění se doplní na 1000 ml.

5. Kyselina dusičná, HNO_3 , koncentrovaná, 65%, (m/m), $c(\text{HNO}_3) = 14,4 \text{ mol/l}$, $\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$.

5. Pracovní postup

A: Extrakce vodou (1 : 5)

$(10 \pm 0,1)$ g upraveného vzorku půdy a $(50 \pm 0,5)$ ml vody (1) se třepe v plastové uzavřené nádobě na třepačce 16 h při laboratorní teplotě. Po ukončení extrakce se suspenze filtruje za pomoci Büchnerovy nálevky přes vhodný filtrační papír. Objem získaného filtrátu se zaznamená.

B: Extrakce vodou (1 : 2)

$(50 \pm 0,5)$ g upraveného vzorku půdy a (100 ± 1) ml vody (1) se třepe v plastové uzavřené nádobě na třepačce 16 h při laboratorní teplotě. Po ukončení extrakce se suspenze filtruje za pomoci Büchnerovy nálevky přes vhodný filtrační papír. Objem získaného filtrátu se zaznamená.

C: Extrakce zředěnou kyselinou chlorovodíkovou

Do kádinky o objemu 500 ml se naváží $(2,00 \pm 0,01)$ g upraveného vzorku půdy, přidá se (100 ± 1) ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (2), kádinka se zakryje hodinovým sklem a zahřívá se v dobře táhnoucí digestoři tak, aby mírný var probíhal 15 min. Potom se stěny kádinky opláchnou vodou (1) a ještě za varu se přidá několik kapek koncentrované kyseliny dusičné (5). Potom se po kapkách přidává zředěný roztok amoniaku (3) až do vysrážení seskvioxidů. Přidává se tak dlouho, až se lakmusový papírek zbarví roztokem v kádince do modra. Suspenze se potom filtruje do kónické baňky o objemu 500 ml. Filtrační papír se promývá vodou (1) až do vymizení chloridů (kontroluje se kapkovou zkouškou s dusičnanem stříbrným (4)). Výsledný objem, který by neměl přesahovat 200 ml, se zaznamená.

Poznámky

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	87
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 30940.1 Extrakce půd pro stanovení síranů a síry	Vydání	4
		Revize	0

3. *Při postupech A a B se může extrahovat v centrifugačních tubách a filtrace se může nahradit centrifugací.*
4. *Extrakty se mohou skladovat při teplotě (2 – 5) °C maximálně po dobu 1 týdne.*
5. *Při extrakci kontaminovaných vzorků kyselinou chlorovodíkovou je nebezpečí uvolnění kyanovodíku, sulfanu apod. Je třeba dbát zvýšené opatrnosti.*

Literatura

1. ČSN ISO 11048: Kvalita půdy – Stanovení síranů rozpustných ve vodě a síranů rozpustných v kyselině. ČSNI Praha. 1998.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	88
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30960.1 Stanovení síry v půdních extraktech metodou ICP-OES	Revize	0

STANOVENÍ SÍRY V PŮDNÍCH EXTRAKTECH METODOU ICP-OES

1. Rozsah použití

Stanovení je určeno pro extrakty půd metodou 30940.1. Může se použít i pro stanovení síry v jiných půdních extraktech. Celkový obsah síry v extraktech se stanovuje nezávisle na chemické vazbě.

2. Princip

Aerosol vzorku je veden do plazmatu, kde vlivem vysoké teploty dojde k termické excitaci a ionizaci prvků. Při přechodu do nižších energetických stavů dochází k vyzáření charakteristických kvant, jejichž intenzita je úměrná koncentraci daného prvku ve vzorku.

3. Přístroje a pomůcky

1. Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem.

4. Chemikálie

1. Kyselina nebo voda použitá pro extrakci vzorků.
2. Argon, čistota 4.2 nebo vyšší.
3. Dusík nebo argon, čistota 4.8 nebo vyšší (pokud přístroj vyžaduje proplach optické části).

5. Pracovní postup

Pracovní standardní roztoky

Pro přípravu roztoků pro konstrukci kalibrační křivky se používá základní certifikovaný standardní roztok síry (v síranové formě) o koncentraci síry 1000 mg/l - **S1**. Z tohoto roztoku se desetinásobným zředěním připraví roztok **S2** o koncentraci síry 100 mg/l. Pro kalibraci se využívá i roztok **S2**, proto je třeba upravit jeho matici shodně s ostatními kalibračními body v závislosti na matici měřených vzorků (voda nebo kyselina příp. extrakční činidlo podle Mehlicha 3).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	89
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30960.1 Stanovení síry v půdních extraktech metodou ICP-OES	Revize	0

Kalibrační křivka

Z roztoků S1 a S2 se do 100ml odměrných baněk připraví roztoky pro konstrukci kalibrační křivky podle tabulky 1.

Podmínky měření

Podmínky měření se upraví podle doporučení výrobce a podle ověřovacího měření. Příklad nastavení pro sekvenční přístroj JY-138: - průtok plazmového plynu 13,0 l/min, stínicí plyn 0,28 l/min, zmlžovač - průtok 0,4 l/min při tlaku 0,32 MPa. Výkon plazmy 1,0 kW. Promývací čas 25 s. Při vymývání z nejvyššího standardu na nulový bod kalibrační křivky 45 s. Měří se intenzita nejlépe na vlnové délce emitovaného záření 181,978 nm s korekcí nespecifické emise. Vyhodnocení se provádí metodou kalibrační křivky.

Tabulka 1. Roztoky pro konstrukci kalibrační křivky.

Pořadové číslo kal. roztoku	1	2	3	4	5	6	7
Pracovní standardní roztok	–	S2	S2	S1	S1	S1	S1
Objem odm. baňky (ml)	100	100	100	100	100	100	100
Pipetovaný objem (ml)	–	10	25	5	10	25	50
Koncentrace (mg/l)	0	10	25	50	100	250	500

Poznámky

1. Pro měření je vhodné použít zvlhčovač argonu, který zamezí zanášení zmlžovače vyloučenými solemi ze vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	90
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30971.1 Stanovení síranů ve vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie	Revize	0

STANOVENÍ SÍRANŮ VE VODNÝCH EXTRAKTECH PŮD METODOU IONTOVÉ CHROMATOGRAFIE

1. Rozsah použití

Metoda je určena pro stanovení síranů ve vodných extraktech půd. Metoda je použitelná i pro stanovení chloridů a dusičnanů, a to jak ve vodných extraktech půd, tak i ve vodách.

2. Princip

Vzorek půdy se extrahuje vodou při laboratorní teplotě. Anionty přítomné v extraktu se separují iontovou chromatografií. Jako stacionární fáze se používá měnič aniontů, jako mobilní fáze se používají roztoky solí slabých jedno- nebo dvojsytných kyselin (např. uhličitánů, hydrogenuhličitánů) a hydroxidů. Detekce se provádí pomocí vodivostního detektoru v kombinaci se supresorem.

3. Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
2. Rotační třepačka.
3. Laboratorní odstředivka.
4. Iontový chromatograf s CD detektorem, např. ICS 3000 Dionex nebo podobný.
5. Aniontová analytická kolona, např. AS9-HC Dionex s předkolonou, např. AG 9-HC (Dionex).
6. Zařízení pro přípravu vysoce čisté demineralizované vody.
7. Automatické pipety.
8. Jednorázové mikrofiltry, porozita 0,45 µm a 0,22 µm.

4. Chemikálie

1. Voda, (ultračistá).
2. Uhličitán sodný, Na₂CO₃.
3. Uhličitán sodný, roztok, c(Na₂CO₃) = 0,5 mol/l.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	91
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30971.1 Stanovení síranů ve vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie	Revize	0

Příprava: 26,4973 g uhličitanu sodného (2) se rozpustí v asi 400 ml vody (1), doplní se vodou do objemu 500 ml. Lze použít i komerčně dodávaný roztok.

4. Mobilní fáze.

Složení mobilní fáze závisí na typu používané analytické kolony. Při její přípravě se vychází z pokynů výrobce kolony. Vybraná kombinace separační kolony a mobilní fáze musí splňovat požadavky na rozlišení – R nesmí klesnout pod 1,3. Příklad složení mobilní fáze (pro chromatografické podmínky uvedené v tabulce 3.1.5-1.)

5. Uhličitan sodný, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 9 \text{ mmol/l}$.

Příprava: 18 ml roztoku uhličitanu sodného (3) se napipetuje do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.

6. Základní standardní roztok síranu o koncentraci $1000 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{l}$. Dodává se komerčně.

7. Pracovní roztok síranu I o koncentraci $100 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{l}$.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml základního standardního roztoku (5) a doplní se vodou (1) po značku. Roztok skladovaný v polyethylenových nádobách při $(4 - 6)^\circ\text{C}$ je stálý jeden týden.

8. Pracovní roztok síranu II o koncentraci $10 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{l}$.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml pracovního roztoku I (6) a doplní se vodou (1) po značku. Roztok se připravuje v den použití.

5. Pracovní postup

Příprava extraktu

Vodný extrakt se připravuje podle postupu uvedeného v ČSN ISO 11 048.

Úprava extraktu

Před nástřikem se z extraktu odstraní nerozpuštěné částice buď odstředěním (10000 g , 10 min) nebo filtrací přes jednorázové mikrofiltry.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	92
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30971.1 Stanovení síranů ve vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie	Revize	0

Měření na iontovém chromatografu

Při nastavení chromatografických podmínek se vychází z doporučení výrobce analytické kolony. Příklad nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.

Kolona	AS9-HC 2 × 250 mm, Dionex
Předkolona	AG9-HC 2 × 50 mm, Dionex
Eluent	9,0mM Na ₂ CO ₃
Průtok eluentu	0,25 ml/min
Detekce	Vodivostní detektor
Supresor	ASRS-ULTRA, 2mm Recycle mode
Objem nástřiku	10 ul
Teplota na koloně	25 °C

Uvedené chromatografické podmínky slouží jako příklad. Mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že bude dosaženo odpovídajících separačních parametrů

Kalibrace

Kalibrační roztoky se připraví ředěním pracovního roztoku I (6), pracovního roztoku II (7), popřípadě přímým ředěním základního roztoku (5).

Připraví se asi 5 kalibračních roztoků pokrývajících co nejrovnoměrěji zvolený koncentrační rozsah. Postupuje se např. tak, jak je dále uvedeno pro rozsah (0,1 – 10) mg/l.

Do řady 100ml odměrných baněk se pipetuje (1; 5; 10) ml pracovního roztoku II (7) a (2,5; 5; 7,5) ml pracovního roztoku I (6). Baňky se doplní vodou (1) po značku a dobře se promíchají.

S využitím pracovního roztoku II (7) se tak získá kalibrační řada o koncentracích

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	93
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	30971.1 Stanovení síranů ve vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie	Revize	0

(0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10) mg SO₄²⁻/l.

Kalibrační roztoky se připravují v den použití. Po nastavení chromatografických podmínek a ustálení chodu iontového chromatografu se proměří kalibrační roztoky. Ze získaných dat se sestrojí kalibrační křivka.

Měření vzorků

Po kalibrování přístroje se vzorky změří za stejných podmínek. Jednotlivé anionty se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku s retenčními časy píků roztoku standardu. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Jestliže koncentrace síranu v analyzovaném vzorku přesáhne koncentrační rozsah kalibrace, vzorek se naředí. Může se postupovat také tak, že se provede kalibrace s vyšším kalibračním rozsahem, pokud to výměnná kapacita kolony dovolí a vzorek se znovu analyzuje.

6. Výpočet

Hmotnostní koncentrace síranů ve vodném extraktu se vypočte z plochy jeho píku pomocí kalibrační funkce a výsledek se přepočte podle případného ředění vzorku. Pro výpočet se využívá software přístroje. Výsledky se vyjadřují v mg/l.

Pro přepočet na obsah síranů ve vzorku půdy X (mg/kg) se použije vztah

$$X = (V \times A) / m$$

- X je koncentrace síranů ve vzorku (mg/kg),
- V celkový objem extraktu (ml),
- A koncentrace síranů odečtená z kalibrační křivky (mg/l),
- m hmotnost zkušební vzorku (g).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	94
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Půdně mikrobiologické metody	Vydání	4
		Revize	0

PŮDNĚ MIKROBIOLOGICKÉ METODY

Půdní mikroorganismy jsou nepostradatelné z hlediska zajištění půdních funkcí. Jako příklad můžeme uvést rozklad rostlinných zbytků, transformaci půdní organické hmoty, zpřístupnění živin rostlinám a tvorbu půdní struktury, která následně ovlivňuje vodní a aerační status půdy. Vzhledem k rozmanitosti těchto procesů a pestrosti půdních mikrobiálních společenstev jak z hlediska funkčního, tak taxonomického, je třeba vždy k hodnocení biologické kvality půdy použít sadu metod.

Základním parametrem je mikrobiální biomasa stanovovaná fumigačně-extrakční metodou jako C (MBC), případně N (MBN), vázaný v mikrobiálních buňkách. Mikrobiální biomasa jednak představuje nejlabilnější frakci půdní organické hmoty, jednak „stroj“, odpovědný za téměř všechny přeměny půdní organické hmoty. Tento parametr udává „množství“ mikroorganismů v dané půdě, nevypovídá ale o jeho fyziologii (např. rozlišení mezi aktivními buňkami a buňkami ve stavu dormance). Za tímto účelem je třeba provést analýzu mikrobiálních aktivit.

Půdní mikrobiální společenstva jsou charakteristická mimořádně širokým spektrem metabolických drah, které jim umožňují získávat energii oxidací nejrozličnějších organických i anorganických látek a růst při pestré kombinaci abiotických půdních vlastností (pH, obsah O₂ v půdním vzduchu, redoxní potenciál, obsah a kvalita organické hmoty). Volba metod závisí zejména na účelu studie. Níže uvedené postupy uvádějí základní metody zaměřené zejména na transformaci půdní organické hmoty a koloběh živin. Pro stanovení rychlosti rozkladu půdní organické hmoty a celkové aktivity půdních heterotrofních mikroorganismů se používá mikrobiální respirace (C mineralizace) stanovovaná jako spotřeba O₂ nebo produkce CO₂. Měření se provádí buď bez přídavku substrátu (bazální respirace) nebo s přídavkem glukosy a menšího množství N a P (substrátem indukovaná respirace, SIR). Bazální respirace závisí na množství dostupné organické hmoty, její kvalitě (snadno rozložitelné nízkomolekulární organické sloučeniny vs. obtížně degradovatelné vysokomolekulární polymery) a dále na množství a fyziologii půdních mikroorganismů. Pro interpretaci získaných dat je proto třeba použít dalších půdních vlastností jako je např. MBC či vodou extrahovatelný C. SIR odráží biomasu metabolicky aktivní frakce půdních mikroorganismů, vyšší hodnoty bývají nalézány v půdách se vstupem snadno rozložitelných organických sloučenin (např. určité typy organických hnojiv). Část přidaného

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	95
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Půdně mikrobiologické metody	Vydání	4
		Revize	0

substrátu je využita pro syntézu nové mikrobiální biomasy. Dělení buněk je doprovázeno exponenciálním růstem respirace, jejíž průběh charakterizuje mikrobiální růstovou strategii závislejší zejména na taxonomickém složení společenstev, fyziologii mikroorganismů a předchozích vstupech organických látek do půdy. Alternativně k C se v případě N stanovuje N mineralizace, v tomto případě za aerobních nebo anaerobních podmínek (amoniifikace). Amonifikace byla navržena jako postup pro stanovení zásoby mineralizovatelného N, důležitého z hlediska výživy rostlin. Jak respirace tak mineralizace N je zajišťována převážnou většinou půdních mikroorganismů. Nitrifikace, oxidace amoniaku přes dusitany na dusičnany, je naopak prováděna taxonomicky úzkými skupinami bakterií a archaeí. Jedná se o významný proces z hlediska výživy rostlin, kdy amonné ionty, relativně pevně vázané na minerální částice, jsou oxidovány na labilní dusičnanové. Z uvedeného důvodu je nitrifikace důležitá rovněž z pohledu ochrany spodních vod. Kromě měření nitrifikace inkubačním pokusem je uvedena metoda stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity v půdní suspenzi při optimalizaci pH a koncentraci substrátu. Specifickou skupinu metod představují enzymatické aktivity. Jestliže respirace nebo nitrifikace jsou výsledkem složitých metabolických procesů, v případě enzymů se jedná o stanovení konkrétní reakce. Níže jsou uvedeny postupy pro stanovení vybraných reakcí koloběhu C, N, P a S pomocí chromogenních či fluorogenních substrátů.

Půda představuje významný zdroj emisí skleníkových plynů. Kromě CO₂ se jedná o oxid dusný (N₂O) a metan (CH₄). Poslední jmenovaný je významný pouze v případě trvale zamokřených půd, jako jsou např. mokřady nebo rýžoviště. Publikace uvádí postup pro stanovení potenciální aktivity denitrifikačních enzymů, odpovědných za produkci N₂O během denitrifikace. V rámci tohoto procesu jsou dusičnany postupně redukovány na N₂O, částečně potom až na N₂.

Diverzita mikrobiálních společenstev je zásadní jak z hlediska zajištění zmíněných funkcí půdy, tak z hlediska rezistence a resilience vůči působení stresových podmínek (např. kontaminace či sucho). V prvním případě se jedná o schopnost zachovat půdní funkce bez významnější změny, ve druhém o schopnost jejich návratu na původní hladinu po prvotním vychýlení. Studium půdní mikrobiální diverzity představuje mimořádně složitou problematiku jak z hlediska metodického, tak interpretace dat. Publikace uvádí postup pro extrakci DNA z půdy, amplifikaci specifických úseků metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a následnou analýzu terminálních restrikčních fragmentů. Jedná se o metodu relativní, která umožňuje identifikovat půdy

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	96
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Půdně mikrobiologické metody	Vydání	4
		Revize	0

s podobným složením mikrobálních společenstev.

Závěrem je třeba říci, že tento úvod představuje pouze hrubý nástin toho, co je třeba vzít v úvahu při výběru mikrobiologických metod. Bohatý zdroj potřebných informací lze nalézt např. v níže uvedené monografii kolektivu autorů pod vedením M. Šimka.

Literatura

1. M.Šimek a kol.: Živá půda: biologie, ekologie, využívání a degradace půdy. Praha: Academia, 789 s. 2019.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	97
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31000.1 Odběr, úprava a skladování vzorků pro mikrobiologické rozbor	Revize	0

ODBĚR, ÚPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ PŮD PRO MIKROBIOLOGICKÉ ROZBORY

1. Rozsah použití

Postup je určen pro úpravu a skladování půdních vzorků pro laboratorní stanovení aerobních mikrobiálních procesů v orných půdách, půdách trvalých travních porostů, lesních půdách a pro molekulárně-biologické rozbor (analýza DNA). Níže uvedené postupy se používají v rámci monitoringu mikrobiálních parametrů půd ČR. V případě odběru pro jiné účely je třeba upravit počet odběrových ploch na dané lokalitě, stanovit jejich rozmístění a upravit počet vpichů z dané plochy.

2. Přístroje a pomůcky

1. Síto o jmenovité délce ok 2 mm.
2. Sondýrka/Eijkelkamp, vrták holandského typu (Edelman), průměr 4 cm.
3. Měřicí pásma.
4. Výtyčky, vytyčovací kolíky.
5. Plastové zamrazovací sáčky (27 cm × 35 cm).
6. Štítky.
7. Provázek.
8. Zápisník a psací potřeby.
9. Právítko.
10. Přenosný chladič box s namraženými destičkami.
11. Zařízení pro vyměření pravého úhlu (orné a travní půdy).
12. GPS (lesní půdy).
13. Hlubokomrazicí box s pracovní teplotou –80 °C (pro dlouhodobé skladování půd pro analýzu DNA).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	98
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31000.1 Odběr, úprava a skladování vzorků pro mikrobiologické rozbor	Revize	0

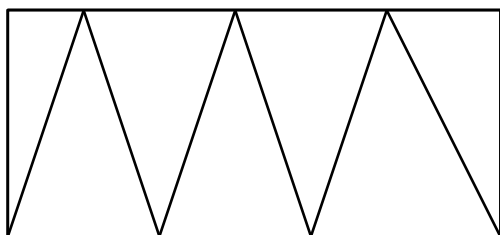
3. Chemikálie

1. Lih denaturovaný.

Příprava: Denaturovaný lih se smíchá s vodou v poměru (4 : 1).

4. Pracovní postup

Odběr vzorků orných půd a minerálních horizontů půd trvalých travních porostů v případě, že není přítomen humusový horizont: Vzorky se odebírají sondýrkou dle odběrového schématu na obrázku 1. Na každé odběrové ploše je provedeno 18 vpichů, ze kterých je vytvořen směsný vzorek. Orné půdy a půdy travních porostů se odebírají z vrstvy (0 – 15) cm, půdy trvalých travních porostů po odstranění drnové vrstvy. Jestliže jsou v půdách travních porostů ve vrstvě (0 – 15) cm rozlišitelné horizonty, vzorky se odebírají z vrchního horizontu. Pokud by v tomto případě nebylo dosaženo požadované hmotnosti, je třeba zvýšit počet vpichů. Části vegetačního pokryvu, viditelné kořeny a velké části rostlin se odstraní. Mezi odběry na jednotlivých plochách je nutno sondýrku důkladně očistit. V případě, že se ve vzorcích budou provádět molekulárně-biologické analýzy, je třeba ji mezi odběry otřít denaturovaným lihem (4 : 1).



Obrázek 1. Odběrové schéma.



Obrázek 2. Odběr vzorků orné půdy.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	99
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31000.1 Odběr, úprava a skladování vzorků pro mikrobiologické rozbor	Revize	0

Odběr vzorků lesních půd: Vytyčí se čtverec o stranách přibližně 100 m, zaznamenaná se jeho poloha (GPS). Vzorky se odebírají na náhodně zvolených 10 odběrových místech. Kolíky se označí čtverec o délce 25 cm. Odstraní se opad a z celé plochy se odebere vzorek fermentačního horizontu. V jednom z rohů se vyznačí čtverec o straně 10 cm a z vyznačené plochy se odebere vzorek humusového horizontu. Poté se ze stejné plochy odebere vzorek minerálního horizontu pomocí 4 vpichů do hloubky 10 cm. Pokud je humusový horizont málo vyvinutý a odebraného vzorku by vzhledem k množství požadovanému na analýzy bylo málo, odebírání se z celé plochy (25 × 25) cm. Do odběrového protokolu se zaznamená mocnost opadového, fermentačního a humusového horizontu.



Obrázek 3. Odběr vzorků lesních půd.

Popis vzorků a odběrový protokol: Na štítku jsou uvedeny následující údaje: kód pozorovací plochy, kultura (orná půda, travní porosty), odebraná vrstva v cm, datum a jméno osoby, která odběr prováděla.

Příklad: 2001/ O/ 0-15 / 5.4.1999/ D. Villa

O odběru se vyhotoví protokol, který obsahuje stejné údaje jako jsou uvedeny na štítku. Do protokolu se zaznamenávají všechny další údaje, které mohou mít na výsledné hodnoty vliv

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	100
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31000.1 Odběr, úprava a skladování vzorků pro mikrobiologické rozborů	Revize	0

(sněhová pokrývka, zamokření, různé způsoby obhospodařování odběrové plochy apod.).

Transport vzorků: Vzorky by měly být transportovány v plastovém sáčku tak, aby se minimalizovaly změny v obsahu vlhkosti. Vzorky mají být uchovány v chladu a temnu (chladicí box). Vzorky se co nejdříve dopraví do laboratoře a uloží v ledničce při teplotě $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Pokud je to možné, mělo by se zabránit zhutnění vzorku.

Zpracování vzorků: Vzorky mají být zpracovány co nejdříve po odběru.

Vzorky minerálních horizontů: Ze vzorků se před proséváním na sítu o jmenovité délce strany ok 2 mm odstraní zbytky rostlin, větší půdní fauna a kameny. Prosévá se ručně. Je-li půda příliš vlhká k prosévání, vzorek se rozprostře a nechá obleschnout tak, aby bylo možno jej prosít. V průběhu vysoušení se vzorek mělní prsty a často promíchává, aby se zabránilo nadměrnému vysušení povrchu. Běžně se vysouší při laboratorní teplotě, a to jen do té míry, aby bylo možno půdu prosít. Co nejrychlejší prosetí vzorků pro analýzu DNA a stanovení profilů půdních enzymatických aktivit má nejvyšší prioritu.

Vzorky organických horizontů: Ze vzorků fermentačních horizontů se odstraní nenarušené zbytky rostlin (např. větve, listy, kořeny). Částečně rozložené rostlinné zbytky se rozmělní tak, aby mohly být prosety přes síto o jmenovité délce strany oka 2 mm. Vzorky humusových horizontů se zpracují stejně jako vzorky minerálních horizontů.

Zásady pro práci se vzorky pro molekulárně-biologické analýzy:

1. Vzorky pro molekulárně-biologické analýzy se upravují přednostně.
2. Síta a podnosy se před použitím a mezi jednotlivými vzorky oplachují vodou a lihem.
3. Vzorky se prosévají v rukavicích, na každý vzorek se použijí nové rukavice.
4. Na každý vzorek se používá čistý filtrační papír.
5. Před přípravou je třeba nachystat dostatečné množství nastříhané buničité vaty na utírání sít, podnosů a pracovních ploch.

Skladování vzorků: Vzorky se uchovávají v temnu při $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$. V optimálním případě se analýzy provedou ihned po odběru vzorků. Nedoporučuje se uchovávat taková množství vzorku, při kterých dochází ke vzniku anaerobních podmínek na dně vzorkovnice, např. ve vrstvách

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	101
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31000.1 Odběr, úprava a skladování vzorků pro mikrobiologické rozbor	Revize	0

nad sebou. Doba uchování vzorků by neměla přesáhnout 3 měsíce. Vzorky nesmějí být vysušeny ani nesmí dojít k jejich nadměrnému zvlhčení. V případě potřeby je možno vzorky po prosátí zamrazit při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před analýzou se standardně rozmrazují nejméně týden při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky pro molekulárně-biologické analýzy se analyzují ihned po úpravě. Pokud to není možné, skladují se při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nejdéle 2 roky) nebo při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nejdéle 10 let). DNA se extrahuje ihned po rozmrazení. Jestliže jsou vzorky zmrazeny, mohou být rozmrazeny pouze jednou.

Preinkubace: Před začátkem laboratorních analýz by měl být vzorek preinkubován, aby bylo umožněno vytvoření rovnovážných podmínek mikrobiálního metabolismu. Podmínky preinkubace jsou uvedeny pro každou metodu zvlášť.

Literatura

1. ISO 18400-206 Soil quality — Sampling — Part 206: Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory, 2018.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	102
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31010.1 Stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou	Revize	0

STANOVENÍ UHLÍKU A DUSÍKU MIKROBIÁLNÍ BIOMASY FUMIGAČNÍ EXKTRAKČNÍ METODOU

1. Rozsah použití

Fumigační extrakční metoda je vhodná pro stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy ve vzorcích půd minerálních i organických. Je použitelná pro půdy kyselé, s čerstvým přídatkem organické hmoty a pro půdy odebrané z míst s vysokým obsahem vody.

2. Princip

Během fumigace půdního vzorku se intaktní mikrobiální buňky lyzují a mikrobiální organická hmota se uvolní do půdy. Neživá organická hmota není fumigací významně ovlivněna. Půdní vzorky se fumigují 24 h chloroformem. Obsahy organického uhlíku a dusíku se stanoví v extraktech (K_2SO_4 , $c = 0,5 \text{ mol/l}$) fumigovaných a nefumigovaných půd a z rozdílů se vypočtou hodnoty obsahu půdního mikrobiálního uhlíku a dusíku.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
2. Exsikátor, průměr asi 30 cm.
3. Lahvičky, 125 ml.
4. Vodní vývěva.
5. Horizontální třepačka.
6. Centrifuga.
7. Varné kamínky.
8. Filtrační papír.

4. Chemikálie

1. Chloroform bez etanolu (např. LiChrosolv, Merck).
2. Síran draselný, $c(K_2SO_4) = 0,5 \text{ mol/l}$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	103
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31010.1 Stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou	Revize	0

Příprava: 87,1 g K₂SO₄ se rozpustí ve vodě a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

3. Hydroxid sodný, NaOH.

Poznámky

1. V případě, že ve vzorcích má být stanoven dusík mikrobiální biomasy, musí se použít taková šarže K₂SO₄, jejíž roztok (0,5 mol/l) po mineralizaci peroxodisíranem draselným vykazuje při 210 nm dostatečně nízkou absorbanci. Zpravidla vyhovují chemikálie dodávané firmou Merck.

5. Pracovní postup

Preinkubace: Navážené vzorky (pro fumigaci i pro extrakci bez fumigace) se preinkubují jeden den při teplotě (25 ± 2) °C. Obsah vody ve vzorcích při analýze by měl být vyšší než 30 % maximální vodní kapacity (WHC) pro zajištění maximální účinnosti par chloroformu při fumigaci. Půdy, jejichž vlhkost je nižší než uvedená hodnota, jsou standardně dovlhčeny na 60 % WHC. Lahve se vzorky, které budou fumigovány, se označí na štítku tužkou, aby nedošlo k odstranění označení během fumigace. V případě potřeby, např. u půd s velmi nízkou vlhkostí, se dovlhčuje na nižší hodnotu obsahu vody v rozmezí (30 – 60) % WHC. Tato skutečnost musí být uvedena ve výsledkovém protokolu.

Fumigace a extrakce: Do exsikátoru se vloží větší filtrační papír ovlhčený vodou, kádinka s několika pecičkami NaOH (3) k jímání CO₂ uvolněného ze vzorků a kádinka s asi 40 ml chloroformu (1) s varnými kamínky. Do lahvíček o objemu přibližně 125 ml se navažuje čerstvá půda ve třech opakováních, v případě minerálního a humusového horizontu odpovídající 10 g suché půdy, v případě fermentačního horizontu odpovídající 5 g suché půdy. Vzorky orných půd a půd trvalých travních porostů se navažují ve třech opakováních, lesních půd ve čtyřech. Vrstva půdy nesmí být vyšší než 2 cm, jinak nastávají problémy s odstraněním chloroformu po skončení fumigace. V případě potřeby se navážka vzorku a následně extrakčního činidla odpovídajícím způsobem sníží. Vzorky se preinkubují a poté umístí do exsikátoru. Ten je evakuován, dokud chloroform silně nevěre 2 min. Poté se uzavře a umístí na 24 h na temné místo.

Po fumigaci se exsikátor zavzdušní a vyčistí, odstraní se kádinka s chloroformem a na dno se položí nový vlhký filtrační papír. Exsikátor se 12 × po 2 min evakuuje a opakovaně

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	104
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31010.1 Stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou	Revize	0

se zavzdušní, aby došlo k odstranění par chloroformu.

Fumigované vzorky se extrahují 40 ml roztoku K_2SO_4 (2) 30 min na horizontální třepačce (200 kmitů/min). Poté se odstředí, převedou do jiných centrifugačních zkumavek a vloží se do mrazáku na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby došlo k vysrážení $CaSO_4$. Vzorky organických horizontů se filtrují přes filtrační papír s nízkým obsahem amonných iontů. Paralelně se propláchnou filtrační papír stejným množstvím extrakčního roztoku ve třech opakováních ke stanovení C a N (blank). Případný zákal v extraktech vzorků fermentačních horizontů se odstraní odstředěním 10 min při 14 000 ot/min. V den zahájení fumigace se stejným způsobem extrahují nefumigované vzorky. V extraktech se stanoví oxidovatelný uhlík a celkový dusík. Vzorky se před analýzou uchovávají při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chemická analýza fumigovaných a nefumigovaných vzorků probíhá současně.

6. Výpočet

Množství uhlíku mikrobiální biomasy MBC ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) se vypočte ze vztahu

$$\text{MBC} = (\text{CF} - \text{CNF}) / K_{\text{ec}}$$

CF oxidovatelný uhlík ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) extrahovaný z fumigovaných půd, v případě organických horizontů po odečtu blanku,

CNF oxidovatelný uhlík ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) extrahovaný z nefumigovaných půd, v případě organických horizontů po odečtu blanku,

K_{ec} přepočítávací faktor, $K_{\text{ec}} = 0,38$.

Množství dusíku mikrobiální biomasy MBN ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) se vypočte ze vztahu

$$\text{MBN} = (\text{NF} - \text{NNF}) / K_{\text{en}}$$

NF celkový dusík ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) extrahovaný z fumigovaných půd, v případě fermentačních horizontů po odečtu blanku,

NNF celkový dusík ($\mu\text{g/g}_{\text{suš}}$) extrahovaný z nefumigovaných půd, v případě fermentačních horizontů po odečtu blanku,

K_{en} přepočítávací faktor, $K_{\text{en}} = 0,45$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	105
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31010.1 Stanovení uhlíku a dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou	Revize	0

Literatura

1. ISO 14240-2 Soil Quality – Determination of soil microbial bioamass – Part 2: Fumigation – extraction method. International Organization for Standardization, 1997.
2. Joergensen, R.G. The fumigation extraction method for microbial biomass nitrogen. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Alef, K., Nannipieri, P., Eds.; Academic Press: London, 1995; 188-390

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	106
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Revize	0

STANOVENÍ OXIDOVATELNÉHO UHLÍKU V PŮDNÍM EXTRAKTU (K₂SO₄)

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení oxidovatelného uhlíku v extraktech vzorků půd. Standardně se používá při stanovení uhlíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou.

2. Princip

V přítomnosti silné kyseliny se organická hmota oxiduje a Cr(VI) redukuje na Cr(III). Úbytek Cr(VI) se stanoví fotometricky.

3. Přístroje a pomůcky

1. Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 340 nm.
2. Sušárna s kontrolou teploty.
3. Zkumavky s kovovým uzávěrem, např. Fisher Scientific, (120 × 17) mm, tloušťka stěny 1,2 mm.

4. Chemikálie

1. Dichroman draselný, K₂Cr₂O₇, roztok, c(K₂Cr₂O₇) = 25 mmol/l.

Příprava: 0,3680 g K₂Cr₂O₇ se rozpustí ve vodě a po převedení do 50ml odměrné baňky se doplní po značku.

2. Kyselina sírová, H₂SO₄, 95 %.
3. Mineralizační směs.

Příprava: K 10 ml roztoku dichromanu draselného (1) se přidá 25 ml vody a poté se opatrně za míchání tyčinkou přidá 73 ml kyseliny sírové (2) a nechá vychladnout.

4. Glukóza bezvodá.
5. Síran draselný, K₂SO₄, roztok, c(K₂SO₄) = 0,5 mol/l.

Příprava: 87,1 g K₂SO₄ se rozpustí ve vodě a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	107
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Vydání	4
		Revize	0

5. Pracovní postup

Příprava standardních roztoků: Standardy (0; 5; 10; 20; 30; 40; 50) µg C/ml se připravují v roztoku síranu draselného (5). V roztoku síranu draselného (5) se rozpustí 0,25 g glukózy (4) navážené s přesností na 0,1 mg a doplní se roztokem (5) do 100 ml. Výsledný roztok má koncentraci 1000 µg C/ml. Dále se pipetuje dle tabulky 1.

Tabulka 1. Příprava standardů pro stanovení oxidovatelného uhlíku v extraktu.

Krok	Pipetovaný roztok (µg C/ml)	Pipetovat (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace (µg C/ml)
1.	1 000	5	100	50
2.	50	5	50	5
3.	50	5	25	10
4.	50	10	25	20
5.	50	15	25	30
6.	50	20	25	40

Mineralizace: Do zkumavek s kovovým uzávěrem se napipetují 3 ml mineralizační směsi (3) a přidají 2 ml standardu nebo vzorku. Směs se důkladně promíchá, zkumavky se uzavřou a nechají mineralizovat v sušárně 40 min při 135 °C. Po skončení mineralizace se vzorky nechají 2 h zchladnout. V případě stanovení uhlíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou se u filtrovaných vzorků zároveň stanoví i obsah uhlíku v blanku.

Měření: Měří se absorbance standardů a půdních extraktů při 340 nm. Množství oxidovatelného uhlíku v extraktech se stanoví výpočtem z kalibrační křivky. Pokud jsou hodnoty absorbance extraktů mimo rozsah kalibrační křivky, extrakt se zředí síranem draselným (5) a mineralizace se opakuje.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	108
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Revize	0

6. Výpočet

$$C(\mu\text{g. g}^{-1}) = C(\mu\text{g. ml}^{-1}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

C (μg.g⁻¹) obsah extrahovatelného oxidovatelného uhlíku v půdním vzorku přepočtený na sušinu,

C (μg.ml⁻¹) koncentrace oxidovatelného uhlíku v extraktu odečtená z kalibrační křivky,

V objem extrakčního činidla (ml),

m navážka suché půdy (g), které odpovídá dané navážce čerstvé půdy,

w obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Literatura

1. V.P. Yakovchenko, L.J. Sikora: Modified dichromate method for determining low concentrations of extractable organic carbon in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 1998, 29, 421-433.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	109
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31030.1 Stanovení celkového dusíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Revize	0

STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU V PŮDNÍM EXTRAKTU (K₂SO₄)

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení celkového dusíku v extraktech (0,5M K₂SO₄) vzorků minerálních i organických půd. Standardně se používá při stanovení dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou.

2. Princip

Organický dusík v půdním extraktu se oxiduje na nitrátové ionty peroxodisíranem draselným v alkalickém prostředí. Koncentrace nitrátových iontů se stanoví fotometricky měřením absorbance v UV oblasti při 210 nm po odečtení absorbance vzorku, ve kterém byly nitráty odstraněny pomocí Zn/Cu reduktoru.

3. Přístroje a pomůcky

1. Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 210 nm.
2. Zkumavky s uzávěrem a septem, např. zkumavka bakteriologická se závitem GL, (16 × 100) mm, tloušťka stěny 1,8 mm, Fisher Scientific; septum La-Pha-Pack, PTFE red/Silicone white/PTFE red, 45 ° shore A, 1,0 mm.
3. Tlakový hrnec s indikátorem tlaku.

4. Chemikálie

1. Peroxodisíran draselný, K₂S₂O₈.
2. Kyselina boritá, H₃BO₃.
3. Hydroxid sodný, NaOH, c(NaOH) = 3,75 mol/l.

Příprava: 75 g NaOH se rozpustí ve vodě a po převedení do 500ml odměrné baňky a vytemperování se doplní po značku.

4. Zinek granulovaný, (3 – 5) mm.
5. Síran měďnatý, pentahydrát, CuSO₄.5H₂O, nasycený roztok.
6. Kyselina sírová, H₂SO₄, roztoky (1 : 1) (příprava reduktorů) a (1 : 10) (stanovení nitrátů).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	110
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31030.1 Stanovení celkového dusíku v půdním extraktu (K_2SO_4)	Revize	0

7. Mineralizační směs.

Příprava: Naváží se 10 g peroxodisíranu draselného (1), 6 g kyseliny borité (2) a přidá 20 ml roztoku hydroxidu sodného (3). Směs se promíchá, přidá se voda a po rozpuštění doplní na celkový objem 200 ml. Směs se připravuje vždy čerstvá. Váží se plastovou nebo skleněnou lžičkou do skleněné váženky.

8. Reduktor.

Příprava: K 250 g granulí zinku (4) se přidá kyselina sírová (6), aby granule byly ponořeny a nechá se působit do očištění povrchu granulí. Po opláchnutí vodou a odsátí se přidá 25 ml nasyceného roztoku $CuSO_4$ (5). Po zčernání se granule opláchnou vodou, aby neodpadávaly kousky reduktoru. Před aplikací na vzorky je třeba danou šarži připraveného reduktoru vyzkoušet na kalibrační křivce. Reduktory je možno s touto procedurou používat opakovaně.

9. Chlorid amonný, NH_4Cl .

10. Síran draselný, K_2SO_4 , $c(K_2SO_4) = 0,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: 87,1 g K_2SO_4 se rozpustí ve vodě a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

5. Pracovní postup

Příprava standardních roztoků: V 500ml odměrné baňce se ve vodě rozpustí 1,9095 g NH_4Cl s přesností na 0,1 mg a doplní se vodou po značku. Získá se zásobní roztok o koncentraci 1000 $\mu g NH_4^+-N/ml$. Dále se pipetuje dle tabulky 1. Standardy (0; 1; 3; 5; 8; 12) $\mu g NH_4^+-N/ml$ se připravují v 0,5M K_2SO_4 (10).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	111
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 31030.1 Stanovení celkového dusíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Vydání	4
		Revize	0

Tabulka 1. Příprava standardů pro stanovení organického dusíku v extraktu.

Krok	Pipetovaný roztok ($\mu\text{g NH}_4\text{-N/ml}$)	Pipetovat (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g NH}_4\text{-N/ml}$)
1.	1000	5	100	50
2.	50	20	25	40
3.	50	15	25	30
4.	30	10	25	12
5.	40	5	25	8
6.	50	5	50	5
7.	5	5	25	1
8.	5	15	25	3

Mineralizace: Do zkumavek se pipetují 2 ml mineralizační směsi (7), 2 ml standardu nebo vzorku, zkumavky se uzavřou a vloží do tlakového hrnce s 1 l vody. Mineralizace se nechá probíhat 30 min od chvíle, kdy indikátor tlaku ukazuje maximální tlak. V případě stanovení dusíku mikrobiální biomasy fumigační extrakční metodou se u filtrovaných vzorků stanoví zároveň i obsah dusíku v blanku.

Redukce nitrátů: Před měřením se pipetuje 1500 μl vzorku nebo standardu a 2000 μl roztoku 0,5M K₂SO₄ (10). Každý vzorek i standard se pipetují dvakrát. K napipetovaným vzorkům a standardům se přidá 140 μl H₂SO₄ (1 : 10) (6), roztok se důkladně promíchá, k jednomu opakování každého paralelního stanovení se přidají 2 až 3 granule reduktoru (8) a vzorky nechají přes noc při laboratorní teplotě. Vzorky, jejichž absorbance je mimo rozsah kalibrační křivky, je třeba naředit před mineralizací. Optimální poměry je třeba vyzkoušet.

Měření: Absorbance standardů a vzorků se měří při 210 nm. Hodnoty absorbancí roztoků s reduktory se odečtou od hodnot absorbancí roztoků neredukovaných. Koncentrace celkového dusíku v extraktu ($\mu\text{g/ml}$) se stanoví z kalibrační křivky.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	112
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31030.1 Stanovení celkového dusíku v půdním extraktu (K ₂ SO ₄)	Revize	0

6. Výpočet

$$N(\mu\text{g. g}^{-1}) = N(\mu\text{g. ml}^{-1}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

N (μg.g ⁻¹)	obsah extrahovatelného celkového dusíku v půdním vzorku přepočtený na sušinu,
N (μg.ml ⁻¹)	koncentrace celkového dusíku v extraktu odečtená z kalibrační křivky,
V	objem extrakčního činidla (ml),
m	navážka suché půdy (g), která odpovídá dané navážce čerstvé půdy,
w	obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Literatura

1. P.C. Cabrera, M.H. Beare: Alkaline persulfate oxidation for determining total nitrogen in microbial biomass extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1993, 57, 1007-1012.
2. E. Kandeler: Bestimmung von Nitrat. In *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*, F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1993; 369-371.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	113
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31040.1 Stanovení bazální respirace titrační metodou	Revize	0

STANOVENÍ BAZÁLNÍ RESPIRACE TITRAČNÍ METODOU

1. Rozsah použití

Metoda se používá pro stanovení bazální respirace ve vzorcích půd minerálních i organických. Metoda není vhodná pro karbonátové půdy.

2. Princip

Půdní vzorek se inkubuje v uzavřené lahvi nad roztokem hydroxidu sodného, do kterého se jímá uvolněný CO₂. Jeho množství se stanoví zpětnou titrací.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
2. Lahve, 350 ml.
3. Erlenmeyerovy baňky, 100 ml.
4. Sáčky z monofilu nebo jiného vhodného materiálu.
5. Byreta

4. Chemikálie

1. Destilovaná voda, oxid uhličitý se odstraní vyvařením.
2. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: 2,00 g NaOH se rozpustí ve vodě zbavené oxidu uhličitého (1) a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

3. Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 8,8 ml HCl (35%) se přidá do vody (1), převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní po značku.

4. Chlorid barnatý, BaCl₂, roztok, $c(\text{BaCl}_2) = 0,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: 10,4 g BaCl₂ nebo 12,2 g BaCl₂·2H₂O se rozpustí ve vodě (1), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	114
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31040.1 Stanovení bazální respirace titrační metodou	Revize	0

5. Fenolftalein.

Příprava: 0,1 g fenolftaleinu se rozpustí ve 100 ml 60% (v/v) etanolu.

6. Metyloranž.

Příprava: 0,1 g metyloranže se rozpustí ve 100 ml vody (1).

7. Uhličitan sodný, Na_2CO_3 , roztok, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: 5,2995 g Na_2CO_3 sušeného 30 min při $(270 - 300)^\circ\text{C}$, se rozpustí ve vodě a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

5. Pracovní postup

Obsah vody ve vzorku: Stanovení respirace se provádí při obsahu vody, který odpovídá $(40 - 60) \%$ maximální vodní kapacity (WHC). Standardně se půdy dovlhčují na 60 % WHC. V případě velmi nízkého obsahu vody toto může být problematické a zvolí se dovlhčování na nižší hodnotu. V každém případě se ale půdy v rámci jednoho experimentu dovlhčují na obsah vody odpovídající stejné hodnotě WHC. Tato hodnota se uvede do výsledkového protokolu.

Preinkubace: Půdy se preinkubují při 22°C do doby konstantní rychlosti respirace. Pro orné půdy a půdy trvalých travních porostů bazálního monitoringu byla experimentálně nalezena vhodná doba 6 dní. Na preinkubaci se do 100ml Erlenmeyerovy baňky naváží čerstvá půda odpovídající množství sušiny uvedenému v tabulce 1 a po kapkách se přidá voda na definovanou hodnotu WHC. Erlenmeyerovy baňky jsou během preinkubace uzavřeny parafilmem. Vzorky se navažují ve třech opakováních.

Inkubace vzorků a stanovení uvolněného CO_2 : Do 350ml lahví se pipetuje 20 ml roztoku NaOH (2). Navážka odpovídající množství suché půdy uvedenému v tabulce 1 se převede do sáčku z monofilu a zavěsí do lahve nad roztok NaOH a vzorek se inkubuje 72 h. Paralelně se provádí 5 slepých stanovení. Jímaný CO_2 se stanoví zpětnou titrací roztokem HCl (3), po přidavku 2 ml roztoku BaCl_2 (4) na fenolftalein (5). Pokud je spotřeba HCl na titraci nižší než 2 ml, stanovení se opakuje se sníženou navážkou. Roztok HCl se standardizuje titrací 10 ml roztoku Na_2CO_3 (7) na metyloranž (6). Po přechodu roztoku ze žlutého do oranžového zbarvení se titrační nádobka přikryje hodinovým sklíčkem, vyvaří se CO_2 a po ochlazení se dotitruje do oranžového zbarvení.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	115
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31040.1 Stanovení bazální respirace titrační metodou	Revize	0

Při použití automatické byrety je nutné před titrací důkladně byretu propláchnout roztokem HCl (všechny její vnitřní části), aby se z byrety uvolnily všechny bubliny vzduchu. Po nasátí HCl do vnitřního válce byrety odpustíme cca 5 ml HCl zpět do zásobní lahve, vynulujeme byretu a teprve potom začínáme titrovat.

Tabulka 1. Navážky půd na preinkubaci a inkubaci pro stanovení bazální respirace.

Vzorek (horizont)	Preinkubace (g _{suché půdy})	Inkubace (g _{suché půdy})
Fermentační	3,2	2,50
Humusový	4,5	3,75
Minerální	16,0	15,0

6. Výpočet

$$RES = \frac{600 \times (S - V) \times f}{m \times 72}$$

RES bazální respirace přepočtená na sušinu ($\mu\text{g CO}_2\text{-C.g}_{\text{suš}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

S spotřeba HCl (3) na slepý pokus (ml),

V spotřeba HCl (3) na vzorek (ml),

m navážka suché půdy (g), která odpovídá dané navážce čerstvé půdy,

f $10/V_0$, kde V_0 je spotřeba HCl (3) na titraci 10 ml Na_2CO_3 (7) (ml).

Literatura

1. K. Alef: Soil respiration. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, K. Alef, P. Nannipieri, Eds.; Academic Press: London, 1995; 214-217.
2. ISO 16072 Soil Quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, 2002.
3. R. Öhlinger: Bestimmung der Bodenatmung in Laborversuch. In *Bodengologische Arbeitsmethoden*, F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin, Eds.; Springer- Verlag Berlin: 1993; 86-90.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	116
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31042.1 Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

STANOVENÍ BAZÁLNÍ A SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE METODOU GC

1. Rozsah použití

Postup se používá pro stanovení bazální respirace (BR) a substrátem indukované respirace (SIR) mikroorganismů ve vzorcích minerálních i organických půd. Postup není vhodný pro karbonátové půdy.

2. Princip

Půdní vzorek se aerobně inkubuje v uzavřené lahvi s přídavkem (SIR) nebo bez přídavku (BR) substrátu. Respirací organismů se v lahvi uvolňuje CO_2 , který se v čase stanovuje metodou plynové chromatografie.

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Glukosa bezvodá, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
2. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
3. Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 .
4. Substrát.

Příprava: Substrát se připraví v třecí misce s tloučkem důkladným smícháním a rozemnutím 8,42 g glukosy (1), 1,37 g síranu amonného (2) a 0,21 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3).

5. Helium, He, vysoce čistý plyn v tlakové lahvi (čistota 6.0, tj. 99,9999 % He).
6. Kalibrační směs s CO_2 o koncentraci přibližně 0,1 obj. % v N_2 v tlakové lahvi.
7. Kalibrační směs s CO_2 o koncentraci přibližně 3 obj. % v N_2 v tlakové lahvi.
8. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	117
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31042.1 Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

4. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
2. Erlenmeyerovy baňky, 100 ml.
3. Inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) s otvorem, 100 ml.
4. Černé pryžové zátky k inkubačním lahvím.
5. Chromatografické plynotěsné stříkačky s teflonovým těsněním a vyměnitelnou jehlou pro manuální nástřik vzorku, 1 ml, jehly mají boční vývod (tzv. „side hole“ ukončení).
6. Plynový chromatograf s tepelně vodivostním detektorem (TCD), manuálním nástřikem vzorku a kapilární kolonou HP-PLOT Q.

5. Pracovní postup

Obsah vody ve vzorku: Půdy mají mít vlhkost, která odpovídá (40 – 60) % maximální vodní kapacity (WHC). Vzorky se dovlhčují na 60 % WHC v případě stanovení BR a na 40 % WHC v případě stanovení SIR. Rozdíly v obsahu vody pro BR a SIR jsou způsobeny skutečností, že promíchání substrátu s půdou ovlhčenou na 60 % WHC vede ke slepení půdních částic, což znemožňuje účinnou výměnu plynů mezi vzorkem a okolím. Je-li obsah vody ve vzorku velmi nízký, může být ovlhčení na 60 % WHC problematické. V tomto případě se při stanovení BR zvolí dovlhčení na nižší hodnotu. Vždy se ale půdy v rámci jednoho experimentu dovlhčují na obsah vody odpovídající stejné hodnotě WHC a tato hodnota se uvede do výsledkového protokolu.

Preinkubace: Půdy se preinkubují v termostatu 4 dny při $22 ^\circ\text{C}$. Na preinkubaci se do 100ml Erlenmeyerovy baňky nebo do 100ml inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) naváží takové množství čerstvé půdy, které odpovídá obsahu sušiny uvedenému v tabulce 1. Pokud je obsah vody ve vzorku nižší než 60 % WHC (v případě BR) resp. 40 % WHC (v případě SIR), vzorek se na danou hodnotu dovlhčí a Erlenmeyerovy baňky nebo inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) se uzavřou parafilmem resp. černou pryžovou zátkou. Navažuje se ve 3 opakováních.

Měření: Parametry stanovení BR a SIR v půdách fermentačního, humusového a minerálního

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	118
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31042.1 Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

horizontu shrnuje tabulka 1. Po skončení preinkubace se půda naváží do čistých 100ml inkubačních lahví se šroubovým uzávěrem (GL 45). V případě SIR se před samotným vzorkem do inkubačních lahví naváží substrát a teprve poté vzorek a půda se se substrátem důkladně promíchá. Inkubační lahve se uzavřou černými gumovými zátkami a šroubovými uzávěry s otvorem. Ihned poté se lahve se vzorky umístí do termostatu s nastavenou teplotou 22 °C a zahájí se inkubace. Po 2,5 h a 5 h inkubace (v případě SIR) resp. po 4 h a 24 h inkubace (v případě BR) se plynotěsnou stříkačkou s jehlou odebere cca 0,6 ml vzorku vnitřní atmosféry lahví. Objem vzorku ve stříkačce se upraví na 0,5 ml a vzorek se okamžitě analyzuje na koncentraci CO₂ pomocí plynového chromatografu s tepelně vodivostním detektorem (TCD). Plynový chromatograf je předem zkalibrován pomocí kalibračních směsí s CO₂ o koncentraci přibližně 0,1 obj. % v N₂ (6) a 3 obj. % v N₂ (7). Při analýze se jako nosný plyn používá helium (5).

Tabulka 1. Základní parametry pro stanovení bazální respirace (BR) a substrátem indukované respirace (SIR) metodou plynové chromatografie. Uvedené hodnoty navážek jsou rovny obsahu sušiny v naváženém čerstvém vzorku.

Parametr	BR	SIR
Preinkubace (g _{sušina}), FH	4,0	4,0
Preinkubace (g _{sušina}), HH	6,75	6,75
Preinkubace (g _{sušina}), MH	13,5	13,5
Inkubace (g _{sušina}), FH	3,5	3,5
Inkubace (g _{sušina}), HH	6,25	6,25
Inkubace (g _{sušina}), MH	12,5	12,5
Obsah vody (% WHC)	60,0	40,0
Substrát (g), FH	–	viz pozn. 1
Substrát (g), HH	–	viz pozn. 1
Substrát (g), MH	–	0,125
Čas odběru plyných vzorků od počátku inkubace (h)	4 a 24	2,5 a 5

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	119
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31042.1 Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Revize	0

FH fermentační horizont,
HH humusový horizont,
MH minerální horizont.

Poznámky

1. V případě stanovení SIR v organických horizontech lesních půd je třeba množství přidaného substrátu zjistit experimentálně. Přídavek substrátu při měření SIR se podle ISO 16702 řídí obsahem půdní organické hmoty (SOM). Pokud je obsah SOM nižší než 5 %, přidává se 1 g substrátu na 100 g sušiny, což odpovídá navážkám 0,035 g substrátu pro fermentační horizont a 0,063 g substrátu pro humusový horizont. V ostatních případech potom 0,2 g substrátu na 1 g SOM. V praxi se SIR stanovuje při pěti koncentracích od fixní navážky vztahené na sušinu po navážku vycházející z obsahu SOM. Pro hodnocení se použije maximální dosažená hodnota SIR. Množství SOM se stanoví výpočtem z C_{ox} (oxidovatelný uhlík), pro přepočet se používá koeficient 1,72.
2. Postup je třeba důsledně dodržovat a dbát na odebírání plyných vzorků z inkubačních lahví v přesných časech. Časy odběru se zapisují a při mírné odchylce je nutné přepočítat výsledky.
3. Po odběru plyných vzorků vnitřní atmosféry inkubačních lahví se plynotěsné stříkačky zapíchnou do vhodné pryžové zátky, aby se mezi analýzami zabránilo úniku vzorku ze stříkačky.

6. Výpočet

Rychlost bazální (BR) nebo substrátem indukované respirace (SIR) se vypočítá podle vztahů:

$$C_{\Delta} = C_b - C_a$$

$$G = C_{\Delta} \times V_g \times 10$$

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

$$\text{BR nebo SIR} = \frac{(G + L) \times 12}{W_d \times 22,4 \times t}$$

C_a změřená koncentrace CO_2 po 2,5 h (v případě SIR) nebo po 4 h (v případě BR) inkubace (obj. %),
 C_b změřená koncentrace CO_2 po 5 h (v případě SIR) nebo po 24 h (v případě BR) inkubace (obj. %),
 C_{Δ} rozdíl v koncentraci CO_2 mezi jednotlivými měřeními (obj. %),
 V_g objem plyné fáze (vnitřní atmosféry) inkubační lahve (ml),
 G produkce CO_2 do plyné fáze mezi jednotlivými měřeními ($\mu\text{l CO}_2$),
 W_d navážka ekvivalentu suché půdy (g),
 V_l objem kapalné fáze = objem vody v půdě (ml),

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	120
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 31042.1 Stanovení bazální a substrátem indukované respirace metodou GC	Vydání	4
		Revize	0

α Bunsenův absorpční koeficient pro CO₂ a danou teplotu ($\alpha = 0,889$ pro 22 °C),
L produkce CO₂ do kapalně fáze mezi jednotlivými měřeními ($\mu\text{l CO}_2$),
t doba mezi jednotlivými měřeními, tj. 2,5 h v případě SIR a 20 h v případě BR,
BR nebo SIR bazální respirace nebo substrátem indukovaná respirace vyjádřená jako produkce
C-CO₂ do plynné i kapalně fáze na 1 g suché půdy za 1 h ($\mu\text{gC-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Literatura

1. ISO 14240-1 Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. International Organization for Standardization, 1997.
2. ISO 16072 Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. International Organization for Standardization, 2001.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	121
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

MĚŘENÍ BAZÁLNÍ RESPIRACE, SUBSTRÁTEM INDUKOVANÉ RESPIRACE A RESPIRAČNÍCH RŮSTOVÝCH KŘIVEK SYSTÉMEM OxiTop

1. Rozsah použití

Metoda se používá pro stanovení bazální respirace, substrátem indukované respirace a specifické růstové rychlosti půdních heterotrofních mikroorganismů ve vzorcích půd minerálních i organických.

2. Princip

Půdní vzorek se inkubuje v uzavřené lahvi s měřicí hlavicí OxiTop (WTW GmbH, SRN). Spotřeba O_2 vede k poklesu tlaku, neboť uvolněný CO_2 se jímá do roztoku hydroxidu sodného, který je umístěn v nádobce na dně lahve. Měřicí zařízení průběžně zaznamenává pokles tlaku, který je poté přepočten na množství spotřebovaného O_2 . V případě bazální respirace se k půdě nepřidává žádný substrát. Přídavek substrátu obsahující glukózu vede k okamžitému zvýšení respirace, tzv. substrátem indukované respiraci (SIR). Ta se stanovuje během několika následujících hodin, dokud je spotřeba O_2 dostatečně lineární. Exponenciální zvýšení rychlosti respirace je výsledkem růstu mikrobiální biomasy tzv. r-strategů. Z respirační růstové křivky se výpočtem stanoví specifická růstová rychlost μ . Její hodnota je nepřímo úměrná generační době daných mikroorganismů.

3. Přístroje a pomůcky

1. Systém OxiTop (WTW, SRN): ovládací jednotka, měřicí hlavice, adapter, kabel na přenos dat do PC, software pro přenos dat do tabulkového procesoru.
2. Lahve 100 ml (bazální respirace, SIR) a 500 ml (respirační křivky) se závitkem GL45.
3. Termostat s nastavitelnou teplotou 22 °C a výkyvy teploty maximálně 0,3 °C od nastavené hodnoty.
4. Erlenmeyerovy baňky, 100 ml.
5. Plastové nádobky pro roztok hydroxidu sodného.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	122
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

4. Chemikálie

1. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: 100 g NaOH se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní na celkový objem 1000 ml.

2. Substrát.

Příprava: Substrát se připraví důkladným smícháním a rozemnutím 8,42 g glukózy bezvodé, 1,37 g síranu amonného a 0,21 g dihydrogenfosforečnanu draselného v třecí misce.

5. Pracovní postup

Obsah vody ve vzorku: Půdy mají mít vlhkost odpovídající (40 – 60) % maximální vodní kapacity (WHC). Vzorky se dovlhčují na 60 % WHC v případě bazální respirace a na 40 % WHC v případě měření SIR a respiračních křivek. Uvedené hodnoty byly v laboratoři půdní mikrobiologie a ekotoxikologie ÚKZÚZ experimentálně zjištěny jako optimální pro daná stanovení. Rozdíly v obsahu vody pro bazální respiraci na jedné straně a SIR a respirační křivky na druhé jsou způsobeny skutečností, že promíchání substrátu s půdou ovlhčenou na 60 % WHC vede ke slepení půdních částic, což znemožňuje účinnou výměnu plynů mezi vzorkem a okolím. Je-li obsah vody ve vzorku velmi nízký, může být vlhčení na 60 % WHC problematické. V tomto případě se při stanovení bazální respirace zvolí dovlhčování na nižší hodnotu. Vždy se ale půdy v rámci jednoho experimentu dovlhčují na obsah vody odpovídající stejné hodnotě WHC. Tato hodnota se uvede do výsledkového protokolu.

Preinkubace: Půdy se preinkubují 4 dny při 22 °C. Na preinkubaci se do 100ml Erlenmeyerovy baňky naváže takové množství čerstvé půdy, které odpovídá obsahu sušiny uvedenému v tabulce 1. Pokud je obsah vody vzhledem k WHC nižší, než je uvedeno v tabulce 1, vzorek se na danou hodnotu dovlhčí a baňky se uzavřou parafilmem.

Měření bazální respirace: Parametry stanovení bazální respirace v půdách fermentačního, humusového a minerálního horizontu shrnuje tabulka 1. Po skončení preinkubace se půda naváže do inkubačních lahví a na dno lahve se umístí nádobka s roztokem NaOH (1). Na lahev se nasadí

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	123
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

adapter, těsnění a měřicí hlavice. Ihned poté se lahev se vzorkem umístí do termostatu s nastavenou teplotou 22 °C a zahájí se měření. Protože stanovení je založeno na měření změny tlaku, není možno během inkubace se vzorky manipulovat. Otevírání termostatu se musí omezit na minimum.



Obrázek 1. Zařízení pro měření půdní respirace OxiTop.

Měření SIR a respirační křivky, metoda s konstantním přídatkem substrátu: Základní parametry měření substrátem indukované respirace a respiračních křivek v půdách organických a minerálních horizontů shrnuje tabulka 1. Tento postup se používá při analýze minerálních zemědělských půd, při analýze organických půd v kombinaci s metodou přídatku substrátu v závislosti na obsahu půdní organické hmoty (SOM).

Do 150ml kádinek se naváží substrát a přidá se půdní vzorek. Půda a substrát se důkladně zhomogenizují a vzorek se převede do inkubační lahve daného objemu. Pak se na dno lahve umístí nádobka s roztokem NaOH (1). Na lahev se nasadí adapter, těsnění a měřicí hlavice. Ihned poté se lahev se vzorkem umístí do termostatu s nastavenou teplotou 22 °C a zahájí se měření.

V případě organických půd může dojít k předčasnému vyčerpání O₂. Jestliže je během inkubace zaznamenáno snížení tlaku o více než 150 hPa, což představuje pokles koncentrace O₂ přibližně

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	124
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

na 25 % původní hodnoty, je třeba měření opakovat se sníženou navázkou a odpovídajícím množstvím substrátu.

Systém OxiTop umožňuje průběžné sledování průběhu respirace a v případě potřeby je možno měření předčasně ukončit a hlavici uvolnit pro další analýzy (viz návod k použití zařízení).

Během inkubace nelze se vzorky manipulovat a otevírání termostatu musí být omezeno na minimum.

Tabulka 1. Základní parametry pro stanovení bazální respirace, SIR a měření respiračních křivek s konstantním přídavkem substrátu systémem OxiTop. Uvedené hodnoty navážek uvádějící obsah sušiny v naváženém čerstvém vzorku.

Parametr	Bazální respirace	SIR	Respirační křivky
Preinkubace (g _{sušina}), FH	4,0	4,0	8,0
Preinkubace (g _{sušina}), HH	6,75	6,75	8,0
Preinkubace (g _{sušina}), MH	13,5	13,5	16,0
Inkubace (g _{sušina}), FH	3,5	3,5	7,5
Inkubace (g _{sušina}), HH	6,25	6,25	7,5
Inkubace (g _{sušina}), MH	12,5	12,5	15,0
Obsah vody (% WHC)	60,0	40,0	40,0
Inkubační lahev (ml)	100	100	500
Substrát (g), FH	–	0,035	0,075
Substrát (g), HH	–	0,063	0,075
Substrát (g), MH	–	0,125	0,150
Objem NaOH (ml)	5,0	5,0	15,0
Doba inkubace (h)	96	10,0	96 ¹

¹ u potenciálně kontaminovaných půd 144 h,
124

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	125
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

FH fermentační horizont,
HH humusový horizont,
MH minerální horizont.

Poznámky

- Důvodem, proč se SIR měří samostatně a neodečítá se přímo z počátku respirační křivky, je relativně malá citlivost systému OxiTop způsobená tím, že krok měření tlaku je 1 hPa. Požadované citlivosti při stanovení SIR se dosáhne snížením poměru objemu nádoby k navážce půdního vzorku. V organických půdách je hodnota SIR zpravidla natolik vysoká, že přímý odečet SIR z respiračních křivek je možný.*

SIR a respirační křivky, metoda s přidavkem substrátu v závislosti na obsahu SOM: Přídavek substrátu při stanovení SIR a měření respiračních křivek se podle ISO 16702 řídí obsahem půdní organické hmoty. Pokud je obsah SOM nižší než 5 %, přidává se 1 g substrátu na 100 g sušiny, což odpovídá navážkám v tabulce 1. V ostatních případech potom 0,2 g substrátu na 1 g SOM. Množství SOM se stanoví výpočtem z C_{ox} , pro přepočet se používá koeficient 1,72 převzatý z literatury. Navážky vzorků pro měření respiračních křivek udává tabulka 2, ostatní parametry měření jsou stejné jako v tabulce 1. Je vhodné provést paralelní měření s fixní navážkou substrátu. V případě měření SIR v půdách s obsahem SOM vyšším než 5 % se měření provádí při pěti vzrůstajících navážkách substrátu. Jako minimální se bere navážka dle tabulky 1, jako maximální 0,2 g substrátu na 1 g SOM. Maximální získaná hodnota SIR se bere jako hodnota výsledná.

Tabulka 2. Navážky vzorků pro měření respiračních křivek s přidavkem substrátu podle obsahu SOM.

Parametr	Respirační křivky
Preinkubace ($g_{sušina}$), FH	4,0
Preinkubace ($g_{sušina}$), HH	5,5
Preinkubace ($g_{sušina}$), MH	16,0
Inkubace ($g_{sušina}$), FH	3,75
Inkubace ($g_{sušina}$), HH	5,0
Inkubace ($g_{sušina}$), MH	15,0

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	126
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

FH – fermentační horizont, HH – humusový horizont, MH – minerální horizont.

6. Výpočet

Výpočet spotřebovaného O₂: Výpočet spotřebovaného O₂ vychází ze stavové rovnice ideálního plynu.

$$R = \frac{32 \times 10^2 \times V_{fr} \times \Delta p}{8,314 \times 295 \times m_{suš}}$$

R spotřebovaný O₂ od počátku měření (μg/g), viz poznámka 1,
 32 molární hmotnost O₂ (g/mol),
 10² koeficient pro přepočet jednotek,
 V_{fr} volný objem (ml) (viz níže),
 Δp pokles tlaku (hPa),
 8,314 plynová konstanta (m³.Pa.K⁻¹.mol⁻¹),
 295 teplota (K),
 m_{suš} navážka suché půdy (g).

Výpočet volného objemu V_{fr}:

$$V_{fr} = V_{tot} - V_{av} - V_{am} - V_{sm}$$

V_{fr} volný objem (ml),
 V_{tot} celkový objem (objem lahve + prostor v adaptéru – těsnění) (ml),
 V_{av} objem prázdné absorbční nádoby (ml),
 V_{am} objem roztoku NaOH (ml),
 V_{sm} objem půdních částic (ml). Pro minerální půdy se pro výpočet objemu půdních částic z navážky počítá s literárně udávanou hustotou půdních částic 2,65 g/cm³. Pro fermentační horizont se používá hodnota 1,75 g/cm³ a pro humusový 2,06 g/cm³, které byly experimentálně stanoveny jako průměr 12 vzorků v laboratoři půdní mikrobiologie a ekotoxikologie ÚKZÚZ.

Výpočet bazální respirace a substrátem indukované respirace: Hodnota bazální respirace a substrátem indukované respirace (μgO₂.g⁻¹.h⁻¹) se vypočítají jako směrnice regresní přímky závislosti spotřebovaného kyslíku gramem suché půdy na čase. Protože ustálení systému trvá určitý čas, standardně se pro vyhodnocení použijí data od 13,3 h v případě bazální respirace a od 4,17 h v případě SIR. Pokud by v daném časovém úseku došlo k narušení linearitu závislosti spotřeby O₂ na čase, je možno k výpočtu použít jiný časový interval.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	127
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0

Výpočet specifické růstové rychlosti μ z růstových křivek: Specifická růstová rychlost μ se vypočítá pomocí nelineární regrese ze závislosti spotřeby O_2 na čase v exponenciální fázi růstové křivky. Nejprve se stanoví čas t_{max} , kdy je dosaženo maximální rychlosti respirace. K tomuto účelu se pro celý průběh růstové křivky spočtou krátkodobé rychlosti respirace během 2,4h intervalu, který je dostatečně krátký, aby bylo možno rychlost spotřeby O_2 považovat za konstantní. Hodnotu t_{max} nelze zjistit pouhým odečtem dvou následujících hodnot kumulativní spotřeby O_2 díky relativně malé citlivosti měřicího systému. Počáteční hodnoty měření nejsou použity pro výpočet z důvodu ustalování měřicího systému.

Vztah závislosti kumulativní spotřeby O_2 na čase lze popsat vztahem:

$$R = \frac{r}{\mu} \times (e^{\mu \cdot t} - 1) + K \times t + p$$

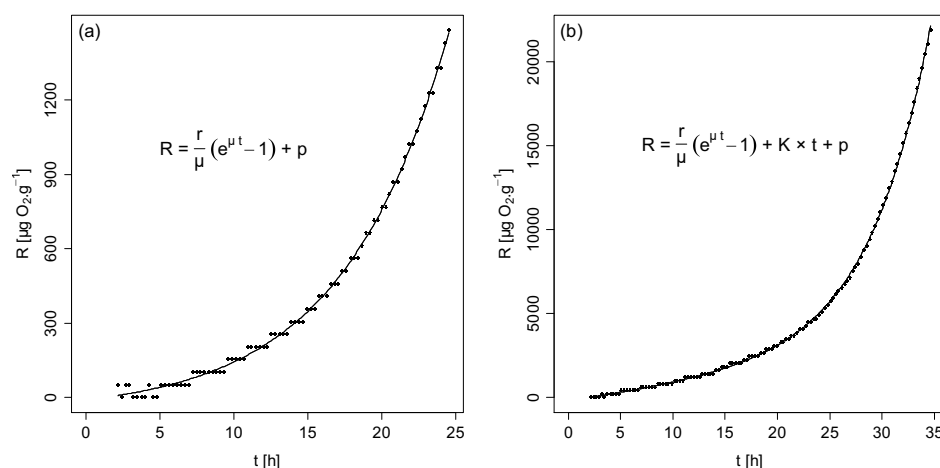
- R kumulativní spotřeba O_2 ($\mu g/g$),
r rychlost respirace r-strategů ($\mu g O_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$),
K rychlost respirace K-strategů ($\mu g O_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$),
 μ specifická růstová rychlost ($1/h$),
t uplynulý čas (h),
p konstanta přepočtu na počáteční hodnotu tlaku, numericky se jedná o vypočtenou hodnotu R v počátku měření.

Stanovená hodnota K je zpravidla signifikantní pouze v organických půdách s přidavkem substrátu v závislosti na obsahu SOM. Pokud je hodnota K nesignifikantní, provede se výpočet μ bez členu $K \times t$. Vždy je třeba provést grafickou kontrolu proložení dat modelem (obrázek 2).

Poznámky

2. Vypočtená kumulativní spotřeba O_2 vychází z hodnoty poklesu tlaku v čase t. Protože na počátku měření dochází díky ustalování podmínek ke změnám tlaku, které nejsou spojeny se změnami koncentrace O_2 , vypočtená hodnota R neodpovídá skutečné spotřebě O_2 . Výpočet skutečné spotřeby O_2 odečtem hodnoty p od R je nepřesný, protože hodnota p se získává extrapolací R do počátku měření, tedy do oblasti, ve které nejsou k dispozici naměřená data. Výše uvedené skutečnosti nemají zásadní vliv na výpočet specifické růstové rychlosti μ .
3. Z hlediska růstových křivek se r-strategie rozumějí mikroorganismy, které přidáný substrát využijí k růstu biomasy, K-strategové pouze k získání energie.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	128
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31050.1 Měření bazální respirace, substrátem indukované respirace a respiračních růstových křivek systémem OxiTop	Revize	0



Obrázek 2. Respirační růstové křivky. Příklad orné půdy, člen je K nesignifikantní (a), lesní půda, fermentační horizont, člen K je signifikantní (b).

Literatura

1. ISO 16072 Soil Quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, 2002.
2. ISO 17155 Soil quality — Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves, 2012.
3. Pell, M., Stenström, J., Granhall, U. Soil Respiration. In *Microbial methods for assessing soil quality*, Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A., Eds; CABI Publishing: Wallingford, 2005; 117-126.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	129
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31060.1 Aerobní N mineralizace a nitrifikace inkubačním pokusem	Revize	0

AEROBNÍ N MINERALIZACE A NITRIFIKACE INKUBAČNÍM POKUSEM

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení aerobní N mineralizace a nitrifikace ve vzorcích půd minerálních i organických.

2. Princip

Rychlost aerobní N mineralizace se stanoví jako čistý přírůstek koncentrace amonných a nitrátových iontů během inkubace půdního vzorku při konstantní teplotě a dané vlhkosti. Rychlost nitrifikace je definována jako čistý přírůstek nitrátových iontů za výše uvedených experimentálních podmínek.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
2. Centrifuga.
3. Erlenmeyrovky baňky, 100ml.
4. Parafilm.

4. Chemikálie

1. Chlorid draselný, KCl, roztok, $c(\text{KCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

Poznámky

1. V případě stanovení obsahu nitrátů přímou absorpcí v UV oblasti se pro extrakci použije taková šarže KCl, jejíž 1M roztok vykazuje dostatečně nízkou absorbanci při 210 nm.

5. Pracovní postup

Do 100ml Erlenmeyerovy baňky se naváží čerstvá půda odpovídající 10 g sušiny a vzorek se dovlhčí na 60 % maximální vodní kapacity (WHC). Poté se zaznamená hmotnost baňky

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	130
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31060.1 Aerobní N mineralizace a nitrifikace inkubačním pokusem	Revize	0

se vzorkem s přesností na 1 mg. Baňka se uzavře parafilmem a vzorek se inkubuje 3 týdny při 22 °C. Každý týden se doplňuje obsah vody na původní hodnotu. Erlenmeyrova baňka se nechá několik minut odkrytá bez parafilmu, aby došlo výměně plynů s okolní atmosférou. Na konci inkubace se ke vzorku přidá 50 ml roztoku chloridu draselného (1), suspenze se třepe 60 min na horizontální třepačce (200 kmitů/min) a odstředí. V čirém extraktu se stanoví koncentrace amonných a nitrátových iontů. Na počátku pokusu se stejným způsobem, včetně dovlhčení půdy na 60 % WHC, připraví extrakt pro stanovení počáteční koncentrace amonných a nitrátových iontů. Stanovení se provádí ve třech opakováních.

6. Výpočet

$$N_{\min} = \frac{(\text{NH}_{4\text{-K}} + \text{NO}_{3\text{-K}}) - (\text{NH}_{4\text{-P}} + \text{NO}_{3\text{-P}})}{21}$$

$$\text{NIT} = \frac{\text{NO}_{3\text{-K}} - \text{NO}_{3\text{-P}}}{21}$$

$N_{\min}$ aerobní N mineralizace ($\mu\text{gN} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),

NIT nitrifikace ($\mu\text{gN} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),

$\text{NH}_{4\text{-K}}$ obsah $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) ve vzorku na konci inkubace,

$\text{NO}_{3\text{-K}}$ obsah $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) ve vzorku na konci inkubace,

$\text{NH}_{4\text{-P}}$ obsah $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) ve vzorku na počátku inkubace,

$\text{NO}_{3\text{-P}}$ obsah $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) ve vzorku na počátku inkubace.

Literatura

1. ISO 14238 Soil Quality – Biological methods – Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these. International Organization for Standardization, 2012.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	131
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31070.1 Anaerobní N mineralizace (amonifikace)	Revize	0

ANAEROBNÍ N MINERALIZACE (AMONIFIKACE)

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení anaerobní N mineralizace ve vzorcích půd minerálních i organických.

2. Princip

Půdní vzorek se týden inkubuje při 40 °C v uzavřené zkumavce naplněné vodou, aby se zamezilo přístupu kyslíku a oxidaci amonných iontů na nitrátové. Z rozdílu koncentrací NH_4^+ na konci a na počátku inkubace se stanoví rychlost amonifikace.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na (40 ± 2) °C.
2. Centrifuga
3. Zkumavky na inkubaci: lumen 14 mm, výška 90 mm.

4. Chemikálie

1. Chlorid draselný, KCl, roztok, $c(\text{KCl}) = 2$ mol/l.

Příprava: 149 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

5. Pracovní postup

Vzorky minerálních půd: Do 8 inkubačních zkumavek se naváží 5 g čerstvé půdy, přidá se 8 ml vody (vodní hladina dosahuje asi 3 mm pod horní okraj zkumavky), suspenze se důkladně protřepe a preinkubuje 2 dny při 40 °C. Poté se ve čtyřech vzorcích stanoví počáteční koncentrace amonných iontů a čtyři se inkubují dalších 7 dní. Po skončení inkubace se ve zbývajících vzorcích stanoví amonné ionty. Obsah zkumavky se převede do vytárované vhodné lahvičky o objemu přibližně 125 ml, zkumavka se vypláchne 2×10 ml roztoku KCl (1) a poté vodou. Suspenze se doplní vodou na celkovou hmotnost 45,84 g (poměr čerstvá půda : extraktant = 1 : 8) a třepe 1 h na horizontální třepače (200 kmitů/min). Extrakt se odstředí a ve vzorcích se stanoví koncentrace amonných iontů.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	132
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31070.1 Anaerobní N mineralizace (amonifikace)	Revize	0

Vzorky organických půd: V případě vzorků s vysokým obsahem organické hmoty, jako jsou např. vzorky F a H horizontů lesních půd, není možné z objemových důvodů pracovat s navážkou uvedenou pro minerální půdy. V tomto případě se navažují 3 g vzorku, přidá se 8 ml vody a vzorky se inkubují za stejných podmínek jako vzorky minerálních půd. Po skončení inkubace a převedení suspenze do extrakční láhve se suspenze doplní vodou na celkovou hmotnost 43,84 g. V případě, že suspenzi nelze protřepat, použije se k homogenizaci špachtle. Podobně se špachtle použije pro převedení suspenze ze zkumavky do extrakční nádoby.

6. Výpočet

$$AMO = \frac{C_7 - C_0}{7}$$

AMO anaerobní amonifikace ($\mu\text{gNH}_4^+\text{-N}\cdot\text{g}_{\text{suš}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),

C_7 obsah $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ve vzorku na konci inkubace ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{suš}}^{-1}$),

C_0 obsah $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ve vzorku na počátku inkubace ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{suš}}^{-1}$).

Literatura

1. K. Alef: Assay of anaerobic ammonification. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, K. Alef, P. Nannipieri, Eds.; Academic Press: London, 1995; 281.
2. L.G. Bundy, J.J. Meisinger: Nitrogen availability indices. In *Methods of Soil Analysis. Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*, R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, A. Wollen, Eds.; SSSA: Madison, 1994; 951-984.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	133
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31080.1 Krátkodobá nitrifikační aktivita (SNA)	Revize	0

KRÁTKODOBÁ NITRIFIKAČNÍ AKTIVITA (SNA)

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity ve vzorcích orných půd a minerálních horizontů půd trvalých travních porostů.

2. Princip

Nitrifikací se rozumí oxidace NH_4^+ na NO_2^- a NO_3^- . Jedná se o dvoustupňový proces, v prvním stupni se amonné ionty (substrátem nitrifikačních bakterií je ve skutečnosti zřejmě amoniak) oxidují na dusitanové, ve druhém se dusitany oxidují na dusičnany. Za běžných podmínek se dusitanové ionty v půdě neakumulují.

Vzorek se inkubuje 6 h v třepané suspenzi při saturaci substrátem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a s přídavkem NaClO_3 , který inhibuje oxidaci NO_2^- na NO_3^- , což umožňuje stanovit pouze přírůstek NO_2^- . Krátká inkubační doba neumožňuje zvýšení počtu nitrifikátorů a výsledná hodnota představuje potenciální nitrifikační aktivitu v okamžiku zahájení pokusu.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s horizontální třepačkou a nastavitelnou teplotou 25 °C.
2. Erlenmeyerovy baňky, 250 ml.
3. Filtrační papír vhodný k filtrování půdní suspenze, např. Macherey-Nagel, k.č. 440018. Je třeba předem ověřit, že filtrační papír neobsahuje dusitany.
4. Centrifuga, pokud se půdní suspenze místo filtrace odstřeďuje.

4. Chemikálie

1. Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , roztok, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 13,61 g KH_2PO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

2. Hydrogenfosforečnan draselný, K_2HPO_4 , roztok, $c(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 17,40 g K_2HPO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	134
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31080.1 Krátkodobá nitrifikační aktivita (SNA)	Revize	0

3. Chlorečnan sodný, NaClO_3 , roztok, $c(\text{NaClO}_3) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 10,6 g NaClO_3 , rozpustí ve vodě (9), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.

4. Síran amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5. Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(\text{KCl}) = 4 \text{ mol/l}$.

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

6. Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(\text{KCl}) = 2 \text{ mol/l}$.

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

7. Zásobní roztok A.

Příprava: Smíchá se 28 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (1), 72 ml roztoku hydrogenfosforečnanu draselného (2) a 100 ml vody (9).

8. Testovací médium.

Příprava: Smíchá se 10 ml zásobního roztoku A (7), 15 ml roztoku NaClO_3 (3) a 0,5 g síranu amonného (4). pH roztoku je přibližně 7,2. Doplní se vodou (9) na 1000 ml.

9. Voda MilliQ.

5. Pracovní postup

Preinkubace: Do 250ml Erlenmeyerových baněk se naváží čerstvá půda odpovídající 15 g sušiny ve třech opakováních, lahve se uzavřou parafilmem a vzorek se preinkubuje 2 dny při 25 °C.

Krátkodobá nitrifikační aktivita: Po skončení preinkubace se ke vzorkům přidá 60 ml testovacího média a baňky se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. Vzorek se nechá důkladně třepat tak, aby půda nezůstávala usazena na dně (170 ot/min). Po 2 h a 6 h se odebere 5 ml suspenze, ke kterým se přidá 5 ml roztoku KCl (5). Tím dojde k zastavení nitrifikace. Půda se od roztoku oddělí filtrací nebo centrifugací. V roztoku se stanoví koncentrace NO_2^- . Kalibrační křivka se připraví v roztoku KCl (6), který se použije i pro ředění vzorků s vysokým obsahem NO_2^- .

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	135
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31080.1 Krátkodobá nitrifikační aktivita (SNA)	Revize	0

6. Výpočet

$$SNA = \frac{C_6 - C_2}{4}$$

SNA krátkodobá nitrifikační aktivita ($\text{ngNO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),

C_6 obsah $\text{NO}_2^- \cdot \text{N}$ ($\text{ng} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) po 6 h inkubace,

C_2 obsah $\text{NO}_2^- \cdot \text{N}$ ($\text{ng} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1}$) po 2 h inkubace.

Literatura

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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	136
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31090.1 Aktivita ureázy	Revize	0

AKTIVITA UREÁZY

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro stanovení aktivity ureázy ve vzorcích půd minerálních i organických.

2. Princip

Aktivita ureázy se stanovuje jako množství uvolněných amonných iontů během 2h inkubace půdního vzorku s ureou při 37 °C.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na 37 °C ± 2 °C.
2. pH metr
3. Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 660 nm a kyvetou 10 mm.
4. Lahvičky o objemu přibližně 125 ml.
5. Centrifuga.

4. Chemikálie

1. Močovina (urea).

Příprava: Navážka 2,4 g močoviny se rozpustí v 400 ml vody a roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml. Roztok se připravuje denně čerstvý.

2. Chlorid draselný, $c(\text{KCl}) = 2,5 \text{ mol/l}$ a síran stříbrný $c(\text{Ag}_2\text{SO}_4) = 100 \text{ mg/l}$.

Příprava: Naváží se 100 mg Ag_2SO_4 , přidá se 700 ml H_2O , dále se přidá 186 g KCl a roztok se doplní do 1000 ml vodou.

3. Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 20 \text{ \%}$.

Příprava: 20 g NaOH se rozpustí ve vodě a roztok se po vytemperování doplní vodou na celkový objem 100 ml.

4. Borátový pufr, pH 10.

Příprava: 28,43 g dekahydrátu tetraboritanu sodného, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 750 ml vody, pH se upraví na hodnotu 10 přidávkem NaOH (3) a pufr se doplní vodou na celkový objem 1000 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	137
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31090.1 Aktivita ureázy	Revize	0

5. Pracovní postup

V případě vzorků minerálního a humusového horizontu se do 125ml lahvíček naváží 5 g čerstvé půdy v šesti opakováních. V případě vzorků fermentačního horizontu se navažuje 2,5 g čerstvé půdy. Tři navážky slouží ke stanovení vlastní ureázové aktivity (vzorek), tři jako blank. Do lahvíček se vzorky se přidá 20 ml borátového pufru (4) a 2,5 ml roztoku močoviny (1) a suspenze se promíchá. Do lahvíček s blanky se přidá pouze 20 ml borátového pufru (4). Vzorky se inkubují 2 h při 37 °C. Poté se jak do vzorků, tak do blanků přidá 30 ml roztoku KCl-Ag₂SO₄ (2) a suspenze se nechá třepat 30 min. Do blanků se bezprostředně po přidavku roztoku KCl- Ag₂SO₄ (2) přidá 2,5 ml roztoku močoviny (1). Suspenze se odstředí 10 min při 8 000 g a v supernatantu se stanoví koncentrace amonných iontů. Kalibrační křivka v rozsahu (0 – 8) µgNH₄⁺-N/ml se připraví v roztoku získaném smícháním 250 ml roztoku KCl-Ag₂SO₄ (2) a 165 ml borátového pufru (4). Případný zákal se odstředí. Amonné ionty se musejí stanovit tentýž den. Při analýze za použití metody se salicylanem je v tomto případě nutno přesně dodržet stejné časové odstupy mezi vzorky při přidávání vzorku do reakčního roztoku jako při přidávání roztoku chlornanu a při měření absorbancí. Měří se 75 min po napipetování chlornanu.

6. Výpočet

$$URE = \frac{C_V - C_B}{2}$$

URE aktivita ureázy (µgNH₄⁺-N.g_{suš}⁻¹.h⁻¹),
C_V koncentrace NH₄⁺-N (µg.g_{suš}⁻¹) ve vzorku,
C_B koncentrace NH₄⁺-N (µg.g_{suš}⁻¹) v blanku.

Při výpočtu koncentrace amonných iontů v roztoku se počítá s celkovým objemem extrakčního činidla 52,5 ml.

Literatura

1. Alef, K., Nannipieri, P. Urease activity. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Alef, K., Nannipieri, P., Eds.; Academic Press: London, 1995; 316-320.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	138
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

STANOVENÍ ENZYMATICKÝCH AKTIVIT PŮDNÍCH MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV POMOCÍ FLUOROGENNÍCH SUBSTRÁTŮ

1. Rozsah použití

Metoda se používá pro stanovení níže uvedených enzymatických aktivit v minerálních a organických půdách.

2. Princip

Půdní suspenze se po přidavku fluorogenního substrátu inkubuje 3 h při 30 °C v 96-jamkové mikrodestičce. Enzymatické aktivity se stanoví jako množství ze substrátu uvolněného 4- methylumbeliferonu (MUF) daným množstvím půdy za jednotku času.

3. Přístroje a pomůcky

1. Mikrodestičkový fluorimetr s filtry 355 nm/460 nm, vybavený termostatem.
2. Termostat s nastavitelnou teplotou 30 °C ± 2 °C s elektrickou zásuvkou.
3. Třepačka mikrodestiček.
4. Dilutor.
5. Mikrodestičky, 96 jamek, průsvitné.
6. Ultrazvuková lázeň.
7. Erlenmeyrovy baňky, 250 ml.

Poznámky

1. Citlivost detektoru fluorimetru určuje, zda je daný přístroj pro stanovení enzymatických aktivit vhodný. Toto je nutno experimentálně ověřit změřením kalibrační křivky a stanovením aktivity vybraného enzymu dle níže uvedeného postupu. Doporučuje se *b*-glukosidáza, která vykazuje dostatečně vysokou aktivitu ve většině půd.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	139
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

4. Chemikálie

1. 4-methylumbeliferon (MUF).
2. Dimethylsulfoxid (DMSO).
3. Fluorogenní substráty (Tabulka 1; výrobce např. Glycosynth, UK).
4. Octan sodný trihydrát.
5. Kyselina octová, > 99,8%.
6. Sterilní voda, sterilizovaná v autoklávu 20 min při $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$.
7. Acetátový pufr, pH 5,5, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: V 600 ml vody se rozpustí 68,04 g trihydrátu octanu sodného a pH se upraví kyselinou octovou na hodnotu 5,5. Roztok se doplní vodou na 1000 ml. Pufr se sterilizuje v autoklávu 20 min při $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Skladuje se v ledničce maximálně 2 týdny. V případě, že se před analýzou připravuje čerstvý, sterilizace není nutná.

8. Standardní roztok MUF, $c = 6,67 \text{ mmol/l}$, (S_MUF).

Příprava: 0,1176 g se rozpustí ve 100 ml DMSO. Připravuje se vždy čerstvý. Daná navážka platí pro bezvodý MUF (Sigma, k.č. M1381-25G, $M_r = 176,17 \text{ g/mol}$).

9. Roztoky substrátů.

Příprava: Rozpuštěním navážek substrátů dle tabulky 2 ve 300 μl DMSO a doplněním na celkový objem 10 ml sterilní vodou se připraví zásobní roztoky o koncentraci 10 mmol/l. Pracovní roztok se připraví ředěním zásobního roztoku. K 0,80 ml substrátu se přidá 11,2 ml acetátového pufru. Finální koncentrace substrátu v jamce je 0,5 mmol/l. Pro přípravu roztoků se používají hnědé odměrné baňky a během celého procesu je třeba maximálně dbát o co nejmenší expozici roztoků přímým světlem. Roztoky jsou při skladování v ledničce stále přibližně 2 týdny. Před každou analýzou se změří jejich fluorescence (150 μl substrátu, pracovní koncentrace) a ověří se, zda nedošlo k jejich rozkladu. Některé substráty se při skladování v ledničce vysrážejí, při ředění na pracovní roztok se rozpustí.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	140
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

Tabulka 1. Fluorogenní substráty pro stanovení enzymatických aktivit.

Enzym	Substrát	Prvek	Cílová molekula
Arylsulfatáza	4-MUF-sulphate	Síra	Mineralizace organické síry
α -glukosidáza	4-MUF- α -D-glukopyranosid	Uhlík	Škrob a glykogen
Enzym	Substrát	Prvek	Cílová molekula
Cellobiosidáza	4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	Uhlík	Celulóza
β -xylosidáza	4-MUF- β -D-xylopyranosid	Uhlík	Xylan, xylobióza
β -Glukosidáza	4-MUF- β -D-glukopyranosid	Uhlík	Celulóza
Fosfodiesteráza	bis-(4-MUF)-fosfát	Fosfor	Hydrolýza fosfátových diesterů
Chitináza	4-MUF-N-acetyl- β -D-glukosaminid	Uhlík	Štěpení β -1-4-glycosidických vazeb v chitinu a chitobióze
Fosfomonoesteráza	4-MUF-fosfát	Fosfor	Hydrolýza fosfátových monoesterů

MUF 4-methylumbeliferon.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	141
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

Tabulka 2. Navážky substrátů pro stanovení enzymatických aktivit. Anglické názvy jsou uvedeny z důvodu častého přímého nákupu ze zahraničí.

Substrát	Navážka (g)
4-MUF-sulphate	0,0294
4-MUF- α -D-glucopyranoside	0,0338
4-MUF- β -D-cellobiopyranoside	0,0501
4-MUF- β -D-xylopyranoside	0,0308
4-MUF- β -D-glucopyranoside	0,0338
bis-(4-MUF)-phosphate	0,0414
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminide	0,0379
4-MUF-phosphate	0,0256

5. Pracovní postup

Půdy: Půdní vzorky se musejí ihned prosetí analyzovat nebo skladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analýzy se provedou následující den po rozmrazení při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kalibrační křivka: Kalibrační křivka se připravuje pro každý vzorek zvlášť z důvodu vlivu půdních částic na fluorescenci. Standardní roztoky MUF se připraví tak, aby finální koncentrace v jamkách mikrodestičky byly (0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 4,0; 5,0; 6,0) $\mu\text{mol/l}$. Pro ředění se používá dilutor, postup přípravy udává tabulka 3. Kalibrační křivka se připravuje vždy čerstvá. Při práci se standardem je třeba na nezbytné minimum omezit expozici připravovaných roztoků přímým světlem. Do jamek mikrodestičky se pipetuje 50 μl půdní suspenze (viz níže) a 150 μl standardu; jedenkrát pro každou ze čtyř navážek. Před odběrem půdní suspenze z Erlenmeyerovy baňky se s ní důkladně zakrouží.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	142
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

Tabulka 3. Příprava kalibrační křivky pro stanovení enzymatických aktivit (finální koncentrace v jamkách 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 4,0; 5,0 a 6,0 $\mu\text{mol MUF/l}$). Uvedené výsledné koncentrace odpovídají koncentracím v jamce mikrodestičky.

Krok	Pipetovaný roztok ($\mu\text{mol/l}$)	Pipetovaný objem (μl)	Objem pufru (7) (μl)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
1	S_MUF (8)	100	1900	250 (S1)
2	250 (S1)	160	3840	10 (S2)
3	10 (S2)	2400	1600	6
4	10 (S2)	2000	2000	5
5	10 (S2)	1600	2400	4
6	10 (S2)	1000	3000	2,5
7	10 (S2)	400	3600	1
8	10 (S2)	200	3800	0,5
9	10 (S2)	40	3960	0,1

Příprava půdní suspenze a inkubace vzorků: Do 250ml Erlenmeyerových baněk se naváží 1 g čerstvé půdy ve čtyřech opakováních, přidá se 100 ml acetátového pufru a suspenze se vloží na 120 s do ultrazvukové lázně. Před odběrem půdní suspenze se s baňkou důkladně zakrouží. Do jamky mikrodestičky se pipetuje 50 μl půdní suspenze a 150 μl pracovního roztoku substrátu. Z každé baňky se pipetuje pro daný enzym dvakrát. U vzorků obsahujících rostlinné zbytky (např. F horizont lesních půd) je třeba kontrolovat, zda během pipetování nedošlo k ucpání špičky a napipetování menšího objemu. Vzorky se inkubují 3 h při 30 °C. Během inkubace se mikrodestičky intenzivně třepou (přibližně 500 kyvů/min).

Poznámky

2. Substrát 4-MUF-fosfát (4-MUF-phosphate) vykazuje vysokou fluorescenci. V půdách s vysokou fosfatázovou aktivitou nelze stanovení provést, protože koncentrace uvolněného MUF je brzy po zahájení inkubace mimo rozsah kalibrační křivky. V takovém případě se připravená půdní suspenze dále ředí 10 $\times$. Do 50ml Erlenmeyrových baňky se pipetuje 9 ml acetátového pufru a 1 ml půdní suspenze.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	143
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31100.1 Stanovení enzymatických aktivit půdních mikrobiálních společenstev pomocí fluorogenních substrátů	Revize	0

Z takto naředěné půdní suspenze se připraví i kalibrační křivka. Další postup, včetně navážky substrátu, zůstává beze změny. Enzymatické aktivity, které se budou spolu porovnávat, se musejí stanovit v suspenzi stejného ředění.

Měření: Měří se fluorescence (355 nm/460 nm) standardů a vzorků v časech 1 h, 2 h a 3 h po zahájení inkubace při teplotě 30 °C. Před vlastním měřením je třeba experimentálně optimalizovat zesílení na detektoru (gain).

6. Výpočet

Množství uvolněného MUF se stanoví výpočtem z kalibrační křivky s kvadratickým členem. Pokud není kvadratický člen signifikantní, není v modelu zahrnut.

Enzymatická aktivita se vypočte ze vztahu:

$$A = \frac{(MUF_T - MUF_P) \times 400 \times (w + 100)}{t}$$

A enzymatická aktivita, (nmol MUF.g⁻¹.h⁻¹),

MUF_T koncentrace MUF (μmol/l) na konci měření,

MUF_P koncentrace MUF (μmol/l) na počátku měření,

t doba inkubace (h),

w obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

V případě ředění půdní suspenze pro stanovení fosfatázy se hodnota aktivity vypočtená dle výše uvedeného vztahu násobí 10.

Pro výpočet aktivity se standardně použijí hodnoty koncentrací MUF naměřené po 60 min a 180 min inkubace. V případě, že naměřená fluorescence po 180 min překročí hodnotu odpovídající standardu 6,0 μmol MUF/l, použijí se hodnoty získané po 120 min.

Literatura

1. ISO/TS 22939 Soil Quality – Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates, 2019.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	144
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31092.1 Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) s rozlišením produktů N_2O a N_2	Revize	0

STANOVENÍ AKTIVITY DENITRIFIKAČNÍCH ENZYMŮ (DEA) S ROZLIŠENÍM PRODUKTŮ N_2O A N_2

1. Rozsah použití

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

2. Princip

Při respirační denitrifikaci se dusičnany postupně redukují na oxid dusný N_2O , který lze snadno kvantifikovat plynovou chromatografií. Jeho určitá část se v dalším kroku redukuje na molekulární dusík N_2 , jehož kvantifikace je naopak velice obtížná. Při metodě DEA se využívá inhibice redukce N_2O na N_2 přidaným acetylenem C_2H_2 , kdy jediným produktem denitrifikace zůstává pouze N_2O . Metodou DEA se stanovuje maximální denitrifikační aktivita půdy za optimalizovaných inkubačních podmínek.

3. Chemikálie

1. Glukosa bezvodá, $C_6H_{12}O_6$.
2. Dusičnan draselný, KNO_3 .
3. Optimalizační roztok, $c(C_6H_{12}O_6) = 1,0 \text{ mmol/l}$, $c(KNO_3) = 1,0 \text{ mmol/l}$.

Příprava: 180,0 mg $C_6H_{12}O_6$ (1) a 101,1 mg KNO_3 (2) se rozpustí ve vodě (9) vytemperované na 20 °C a po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.

Roztok se každý den připraví čerstvý a umístí do termostatu s teplotou 20 °C.

4. Acetylen, C_2H_2 , technický plyn v tlakové lahvi.
5. Argon, Ar, technický plyn v tlakové lahvi (čistota 4.6, tj. 99,996 % Ar).
6. Helium, He, vysoce čistý plyn v tlakové lahvi (čistota 6.0, tj. 99,9999 % He).
7. Směs argonu (95 %) a metanu (5%), Ar- CH_4 P5, směs plynů v tlakové lahvi.
8. Kalibrační směs s N_2O o koncentraci cca 300 ppm v N_2 v tlakové lahvi.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	145
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31092.1 Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) s rozlišením produktů N ₂ O a N ₂	Revize	0

9. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
2. Horizontální třepačka.
3. Inkubační lahve se šroubovým uzávěrem (GL 45) s otvorem, 100 ml.
4. Černé pryžové zátky k inkubačním lahvím.
5. Zařízení na evakuaci vnitřní atmosféry z inkubačních lahví a jejich opětovné plnění argonem. Zařízení je propojeno s membránovou vývěvou a tlakovou lahví s argonem, přičemž lze manuálně přepínat mezi chodem vývěvy a plněním argonem. Místo argonu lze případně využít i jiný inertní plyn (např. helium He, molekulární dusík N₂). K zařízení je připojen tlakoměr s rozsahem relativního tlaku -100 kPa až +150 kPa a gumové hadičky s jehlami pro spojení s inkubačními lahvemi.
6. Chromatografické plynotěsné stříkačky s teflonovým těsněním a vyměnitelnou jehlou pro manuální nástřik vzorku, 1 ml, jehly mají boční vývod (tzv. „side hole“ ukončení).
7. Umělohmotné stříkačky s jehlou, 10 ml.
8. Plynový chromatograf s detektorem elektronového zachytu (ECD), manuálním nástřikem vzorku a kapilární kolonou HP-PLOT Q.

5. **Pracovní postup**

Vzorek půdy se vyjme z lednice a naváží se v 6 opakováních po 25 g přirozeně vlhké půdy do 100ml inkubačních lahví. Nechá se 60 min ohřát v termostatu při 20 °C a poté se do inkubačních lahví odměrným válcem přidá 25 ml optimalizačního roztoku (3) vytemperovaného na 20 °C. Inkubační lahve se uzavřou černými pryžovými zátkami a šroubovými uzávěry s otvorem. Vnitřní atmosféra lahví se vymění za Ar (5) opakovanou evakuací (cca -100 kPa) a plněním Ar (cca 60 kPa) pomocí speciálního zařízení. Tato evakuace a plnění se provede 4 × za sebou, přičemž každá evakuace probíhá 2 min a každé plnění argonem probíhá 1 min. Při výměně vnitřní atmosféry je nutné kontrolovat její průběh na zabudovaném tlakoměru. Po čtvrtém plnění Ar se přetlak v lahvích uvolní vybubláním Ar do vody. Poté se umělohmotnou injekční stříkačkou s jehlou přidá do poloviny lahví (tj. 3 opakování) 10 ml

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	146
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31092.1 Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) s rozlišením produktů N ₂ O a N ₂	Revize	0

C₂H₂. Vzniklý přetlak v lahvích se následně opět vyrovná vybubláním do vody. Lahve (všech 6 opakování) se umístí na třepačku v termostatu a inkubují se za stálého třepání (150 kmitů/min) při teplotě 20 °C. Po 30 min a 60 min inkubace se plynotěsnou stříkačkou s jehlou odeberou vzorky vnitřní atmosféry lahví (cca 0,6 ml). Objem vzorku v plynotěsné stříkačce se upraví na 0,5 ml a vzorek se okamžitě analyzuje na obsah N₂O pomocí plynového chromatografu s detektorem elektronového zachytu (ECD). Plynový chromatograf je předem zkalibrován pomocí kalibrační směsi s N₂O o koncentraci cca 300 ppm v N₂ (8). Při analýze se jako nosný plyn používá He (6) a jako pomocný plyn pro detektor ECD se používá směs Ar-CH₄ P5 (7).

Poznámky

1. Před použitím zařízení na výměnu vnitřní atmosféry inkubačních lahví je nutné jej předem nechat dobře profoukat argonem – nejméně 2 cykly evakuace a plnění argonem “naprázdno” s prázdnými uzavřenými inkubačními lahvemi.
2. Denitrifikace je anaerobní proces, a proto je třeba zabránit kontaminaci vzdušným kyslíkem (je nutné pravidelně kontrolovat stav gumových hadiček a zátek).
3. Celý postup je třeba důsledně standardizovat a dbát na odbírání plynných vzorků z inkubačních lahví v přesných časech (tj. po 30 a 60 min inkubace). Časy odběru se zapisují a při mírné odchylce je nutné adekvátně přepočítat výsledky.
4. Po odběru plynných vzorků vnitřní atmosféry inkubačních lahví se plynotěsné stříkačky zapíchnou do vhodné pryžové zátky, aby se mezi analýzami zabránilo úniku vzorku ze stříkačky.
5. U půdních vzorků lze stanovit DEA nejpozději 14 dní po jejich rozmrazení. Po této době dochází ke znatelnému zkreslení výsledků.

6. Výpočet

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

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

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

$$V_l = 25 + 25 - W_d$$

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	147
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31092.1 Stanovení aktivity denitrifikačních enzymů (DEA) s rozlišením produktů N ₂ O a N ₂	Revize	0

$$L = \frac{\alpha \times G \times V_1}{V_g}$$

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

- C₃₀ koncentrace N₂O po 30 min inkubace (ppm),
 C₆₀ koncentrace N₂O po 60 min inkubace (ppm),
 C_Δ rozdíl v koncentraci N₂O mezi 60 a 30 min inkubace (ppm),
 V_g objem plynné fáze (vnitřní atmosféry) inkubační lahve (ml),
 G produkce N₂O do plynné fáze během 30 a 60 min inkubace (μl N₂O),
 W_d navážka ekvivalentu suché půdy (g),
 V₁ objem kapalné fáze (objem optimalizačního roztoku a vody v navážce půdního vzorku) (ml),
 α Bunsenův absorpční koeficient pro N₂O a danou teplotu (= 0,632 pro 20 °C),
 L produkce N₂O do kapalné fáze během 30 a 60 min inkubace (μl N₂O),
 DEA aktivita denitrifikačních enzymů vyjádřená jako produkce N-N₂O do plynné i kapalné fáze na 1 g suché půdy za 1 h (ng N-N₂O g⁻¹ h⁻¹)

Výpočty pro rozlišení produktů N₂O a N₂ během denitrifikační aktivity

Produkce N₂O a N₂ dohromady = DEA

Produkce N₂O = DEA_{bez C₂H₂}

Produkce N₂ = DEA – DEA_{bez C₂H₂}

Relativní produkce N₂O (%) = $\frac{DEA_{bez\ C_2H_2}}{DEA} \times 100$

Literatura

1. M. S. Smith, J. M. Tiedje. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biol. Biochem. 11, 261-267, 1979.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	148
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Molekulárně biologická analýza půd	Vydání	4
		Revize	0

MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ ANALÝZA PŮD

Obecné zásady

1. Pracovní plochy se před započítím a po skončení práce otřou lihem (líh : voda = 4 : 1). Lihem se před použitím otřou i spodní části pipet.
2. Pracuje se výhradně ve zdravotnických bezpudrových rukavicích.
3. V případě, že během práce dojde k ukápnutí roztoku, ihned se utře tamponem a kontaminovaná plocha se otře lihem. Rovněž je možné mít na stole list filtračního papíru, který se v případě kontaminace ihned nahradí čistým.
4. Do laminárního boxu se nikdy nevnáší materiál obsahující nukleové kyseliny (kromě primerů).
5. Přenášení věcí z/do laminárního boxu se omezí na minimum.
6. Při manipulaci se vzorky nebo chemikáliemi v mrazáku se používají rukavice. Mrazák **nesmí** být vybaven funkcí pro odmrazování (defrost).
7. Je výhodné roztoky před prvním použitím rozdělit v závislosti na množství, které se spotřebuje v jednotlivých sériích. Jedná se o opatření pro případ kontaminace, kdy se doporučuje vyměnit všechny používané roztoky.
8. DNA se skladuje zásadně v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižší. Při práci jsou zkumavky se vzorky umístěny na ledu v polystyrenovém chladicím stojánku. Je třeba však zamezit zbytečnému opakovanému zmrazování a rozmrazování DNA. Pokud je tedy DNA jednou rozmrazena a plánuje se s ní pracovat po dobu cca 4 týdnů, skladujeme ji již v lednici.
9. Vzorky a chemikálie se v mrazáku umístí v různých zásuvkách.
10. Místnost, ve které se pracuje s DNA, se pravidelně 30 min před započítím práce ošetřuje germicidní lampou, stejně jako laminární box.
11. Při pipetování roztoků obsahující DNA se používají špičky s filtrem.
12. Roztoky se před použitím zhomogenizují na vortexu a před pipetováním stočí na minicentrifuze. Tím se předejde rozstříknutí roztoku z víčka mikrozskumavky při jejím otevření.
13. Odpad obsahující DNA se po skončení práce odnese z místnosti k likvidaci.
14. Veškeré laboratorní sklo, spotřební plast, voda a roztoky připravené v laboratoři se před použitím sterilizují v autoklávu při teplotě $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 min.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	149
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31113.1 Extrakce DNA z půd kitem DNeasy® Powersoil ®Kit	Revize	0

EXTRAKCE DNA Z PŮD KITEM DNEASY® POWERSOIL® KIT

1. Rozsah použití

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

2. Princip

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

3. Chemikálie

Všechny chemikálie jsou součástí kitu DNeasy® Powersoil® Kit (Qiagen):

1. Roztok C1.
2. Roztok C2.
3. Roztok C3.
4. Roztok C4.
5. Roztok C5.
6. Roztok C6.

Poznámky

1. Kit lze skladovat při teplotě (15-25) °C.
2. V chladu vznikají v roztoku C1 (1) sraženiny. Zahřátím roztoku na 60 °C se sraženiny rozpustí, roztok C1 může být použit i horký.
3. PowerSoil roztok C5 (5) obsahuje ethanol, je hořlavý.
4. Roztok C4 (4) je nutné těsně před použitím důkladně protřepat.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	150
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31113.1 Extrakce DNA z půd kitem DNEasy® Powersoil®Kit	Revize	0

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Homogenizátor typu „mini bead-beater“ s oscilační frekvencí 3000 kmitů/min.
2. Vortex.
3. Stolní centrifuga s rotorem pro 2,0ml mikrozkušavky typu Eppendorf s nastavitelnou hodnotou g do 10000 g.
4. Vhodná nádoba se šupinkovým ledem.
5. Sada automatických pipet pokrývající rozsah (20 – 1000) µl.
6. Špičky s filtrem pro rozsah (100 – 1000) µl a bez filtru pro rozsahy (20 – 200) µl a (100 – 1000) µl.
7. Stojánek pro inkubaci vzorků v 2,0ml mikrozkušavkách na vodní lázni umožňující přímý kontakt mikrozkušavky a vody.

Další pomůcky jsou součástí kitu DNeasy® Powersoil® Kit (Qiagen):

8. Rozbíjecí zkumavky PowerBead Tubes (obsahují 750 µl roztoku).
9. 2,0ml mikrozkušavky Collection Tubes.
10. Kolonky MB Spin Columns ve 2,0ml mikrozkušavkách.

5. **Postup**

Do rozbíjecích zkumavek PowerBead Tubes (součást kitu) se přidá 0,25 g přirozeně vlhké půdy, zkumavky se promíchají opatrným vortexováním a krátce stočí na minicentrifuze. Do rozbíjecích zkumavek se přidá 60 µl roztoku C1 (1), zkumavky se opět zvortexují a nechají se 45 s třepat v homogenizátoru typu bead-beater při frekvenci 3000 kmitů/min. Poté se rozbíjecí zkumavky centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Supernatant (tj. přibližně [400 – 500] µl, ještě může obsahovat nějaké půdní částice) se opatrně přenese do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu), k supernatantu se přidá 250 µl roztoku C2 (2), vzorky se 5 s vortexují a 5 min inkubují při 4 °C (je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici). Zkumavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozkušavky (součást kitu) se přenese maximálně 600 µl supernatantu (je třeba

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	151
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31113.1 Extrakce DNA z půd kitem DNEasy® Powersoil ®Kit	Revize	0

nenasát pelet), k němu se přidá 200 µl roztoku C3 (3), vzorky se krátce vortexují a 5 min inkubují při 4 °C (je nutné použít vodní lázeň s ledem, nikoliv lednici). Zkumavky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě.

Do čisté 2,0ml mikrozukavky (součást kitu) se přenese maximálně 750 µl supernatantu (je třeba nenasát pelet), k němu se přidá 1200 µl roztoku C4 (4) a vzorky se 5 s vortexují. Poté se přenese přibližně 675 µl takto vzniklé směsi do kolonky umístěné ve 2,0ml mikrozukavce (součást kitu) a centrifuguje se 1 min při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije, přidá se dalších 675 µl směsi a centrifugace se opakuje. Přefiltrovaná kapalina se opět vylije, do kolonky se přidá zbytek směsi, kolonky se stejným způsobem centrifugují a zbytek přefiltrované kapaliny se vylije (každý vzorek je tedy nutné rozdělit na tři dávky.).

Do kolonek se přidá 500 µl roztoku C5 (5) a ty se centrifugují 30 s při 10000 g při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná kapalina se vylije a kolonky se centrifugují 60 s při 10000 g při laboratorní teplotě, aby se odstranily reziduální zbytky roztoku C5.

Kolonky se opatrně přenesou do čistých 2,0ml mikrozukavek (součást kitu), je nutné zabránit potřísnění kolonek roztokem C5. Doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky se nanese 100 µl roztoku C6 (6) (alternativně lze použít PCR vodu). Kolonky se centrifugují 30 s při 10000 g při pokojové teplotě. Kolonky se z 2,0ml mikrozukavek odstraní a DNA v mikrozukavkách je připravena pro různé aplikace. Další purifikace extraktu DNA již není nutná. DNA se uchová při –20 °C až do dalšího použití.

Literatura

1. DNeasy® PowerSoil® Kit Handbook. Qiagen, 1-23, 2017.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	152
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31140.1 Stanovení koncentrace DNA	Revize	0

STANOVENÍ KONCENTRACE DNA

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná ke stanovení koncentrace DNA v půdním extraktu.

2. Princip

DNA se obarví fluorescenčním barvivem a intenzita emise se měří při 460 nm.

3. Chemikálie

DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay (Sigma-Aldrich, USA), obsahuje chemikálie 1 až 3. Kit se skladuje při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1. Fluorogenní barvivo, bisBenzimide H 33258 (Hoechst 33258), $c = 10\text{ mg/ml}$.
2. Standard DNA, Calf thymus DNA, $c = 1\text{ mg/ml}$.

Zkumavka se standardem se inkubuje při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu (15 – 30) min. Poté se důkladně rozmíchá a rozaliquotuje po cca 120 μl . Jednotlivé alikvoty se skladují při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nedoporučují se více jak čtyři cykly zamražení a rozmražení. Po každém rozmražení by měl být standard DNA opět inkubován při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu (15 – 30) min, aby se DNA v roztoku zcela rozpustila.

3. Pufr, $10 \times$ Fluorescent assay buffer.

Po prvotním rozmražení se pufr uchovává při teplotě (2 – 8) $^{\circ}\text{C}$.

4. Voda ve vysoké čistotě pro molekulární biologii, H_2O (rezistivita 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$).
5. Roztok Hoechst 33258, $c = 1\text{ mg/ml}$.

Příprava: V 1,5ml mikrozkuhavce se smíchá 100 μl bisBenzimide H 33258 (Hoechst 33258) (1) a 900 μl vody (4). Roztok se uchovává v temnu při teplotě (2 – 8) $^{\circ}\text{C}$.

6. Pracovní roztok Hoechst 33258, $c = 2\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Příprava: Smíchá se 50 μl roztoku Hoechst 33258 (5), 2,5 ml $10 \times$ Fluorescent assay buffer (3) a 22,5 ml vody (4). Pracovní roztok Hoechst 33258 se před analýzou připravuje vždy čerstvý.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	153
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31140.1 Stanovení koncentrace DNA	Revize	0

7. Standard DNA, $c = 100 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: V 1,5ml mikrozkuhavce se smíchá 100 μl Calf thymus DNA (2), 100 μl 10 $\times$ Fluorescent assay buffer (3) a 800 μl vody (4). Roztok se promíchá a skladuje při teplotě (2 – 8) °C maximálně po dobu šesti měsíců.

8. Standard DNA, $c = 10 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: V 1,5ml mikrozkuhavce se smíchá 10 μl Calf thymus DNA (2), 100 μl 10 $\times$ Fluorescent assay buffer (3) a 890 μl vody (4). Roztok se promíchá a skladuje při teplotě (2 – 8) °C maximálně po dobu šesti měsíců.

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Mikrodestičkový fluorimetr s filtry 355 nm/460 nm.
2. Sada automatických pipet (2 – 1000) μl .
3. Automatická pipeta (1 – 5) ml.
4. Špičky s filtrem pro objemy (2 – 200) μl , bez filtru pro objemy (200 – 1000) μl .
5. Mikrodestičky, 96 jamek, průsvitné.
6. Mikrozkuhavky typu Eppendorf, 1,5 ml.

5. **Pracovní postup**

Kalibrační křivka: Kalibrační křivka se připravuje dle tabulky 1 přímo v jamkách mikrodestičky. Každá koncentrace se pipetuje ve dvou opakováních.

Pipetování vzorků a činidla: Do jamek mikrodestičky se pipetuje 5 μl vzorku ve třech opakováních. Ke kalibrační křivce i vzorkům se pomocí osmikanálové automatické pipety přidá 200 μl pracovního roztoku Hoechst 33258 (6) a obsah jamek se promíchá (nasáváním a vypuštěním ve špičce automatické pipety, cca 8 $\times$). Jako nulový bod kalibrační křivky slouží pracovní roztok Hoechst 33258 (6).

Měření: Měří se fluorescence standardů i vzorků při Ex 355 nm/Em 460 nm.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	154
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31140.1 Stanovení koncentrace DNA	Revize	0

Tabulka 1. Příprava standardů DNA.

Standard DNA (µg/ml)	Pipetovaný objem (µl)	Množství DNA v jamce (ng)
10	2	20
10	3,5	35
10	5	50
10	7,5	75
10	10	100
100	2	200
100	3	300

6. Výpočet

Pro závislost fluorescence na koncentraci standardu platí vztah

$$\text{Fluor} = a + b \times \text{DNA}$$

Fluor fluorescence,

DNA obsah DNA (ng),

a, b parametry regresní křivky.

Literatura

1. DNA Quantitation Kit, Fluorescent Assay, Technical Bulletin. Sigma-Aldrich, USA, 1-4.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	155
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31150.1 Amplifikace specifických úseků DNA metodou PCR	Revize	0

AMPLIFIKACE SPECIFICKÝCH ÚSEKŮ DNA METODOU PCR

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro amplifikaci specifických úseků DNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) v půdních extraktech pomocí premixu od firmy Lucigen a DNA polymerázy od firmy Thermo Scientific™. V případě použití jiných chemikálií se postup upraví dle návodu k použití.

2. Princip

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda rychlého zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA. Množený (amplifikovaný) úsek DNA je ohraničen tzv. primery, což jsou krátké fragmenty DNA, které si díky své komplementaritě přisadají ke koncům vybraného úseku. Od přisadlých primerů probíhá syntéza DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (rozvolnění na jednořetězce), přisadání primerů a syntézu DNA.

3. Chemikálie

1. Premix FailSafe™ PCR 2X PreMix F (Lucigen, USA). Uchovává se při –20 °C. Roztok by neměl být opakovaně rozmrazován a zamrazován. Při prvním použití se proto rozalíkvotuje dle předpokládaného počtu reakcí v jednotlivých sériích. Při celkovém objemu reakční směsi 30 µl se používá 15 µl premixu na jednu reakci.
2. DNA polymeráza, DreamTaq™ Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA), 5 U/µl, uchovává se při –20 °C.
3. Bovine Serum Albumin (BSA) (Thermo Scientific™, USA), 20 mg/ml, uchovává se při –20 °C.
4. Voda pro PCR, komerčně dodávaná.
5. Amplifikační primery, F primer (z anglického forward), R primer (z anglického reverse).
6. Zásobní roztok primerů.

Příprava: Primery (5) se dodávají v lyofilizovaném stavu. Zásobní roztok se připraví dle

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	156
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31150.1 Amplifikace specifických úseků DNA metodou PCR	Revize	0

pokynů výrobce. Zpravidla se přidává voda (4) tak, aby vznikl roztok o koncentraci 100 pmol/μl. Množství vody (4) se liší pro každou šarži a výrobce ho udává na průvodní dokumentaci. Roztok se rozdělí a podíly se uchovávají při teplotě –20 °C. Je třeba se vyhnout jejich opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Poznámky

- 1. V případě následné T-RFLP analýzy jsou forward primery značeny vhodnou fluorescenční sondou na 5' konci dle typu detektoru použitého sekvenátoru.*
- 2. 1 U – jedna jednotka enzymu katalyzuje inkorporaci 10 nmol deoxyribonuklotidů do polynukleotidové frakce během 30 min při 70 °C.*

4. Přístroje a pomůcky

1. PCR cykler.
2. PCR box (laminární box).
3. Vortex s nastavitelnou frekvencí (1200 – 1600) ot/min.
4. Sada automatických pipet (0,1 – 1000) μl (v laminárním boxu), špičky s filtrem pro pipetování primerů a roztoků obsahující primery.
5. Automatická pipeta (0,5 – 10) μl (mimo laminární box, na pipetování vzorku).
6. Špičky s filtrem pro pipetování vzorků.
7. PCR mikrozkmavky, 0,2 ml, s vypouklým víčkem.
8. Mikrozkmavky typu Eppendorf 1,5 ml.
9. Zamrazovací stojánek pro práci s polymerázou.
10. Chladicí stojánek pro uchování vzorků během pipetování.

Poznámky

- 3. Špičky, které se použijí pro přípravu PCR směsi jsou umístěny v laminárním boxu až do jejich vypotřebování.*

5. Pracovní postup

Obecné zásady: PCR směs se pipetuje a rozaliquotuje do PCR zkumavek v laminárním boxu při zapnuté cirkulaci vzduchu. Před samotnou prací se laminární box dekontaminuje UV zářením

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	157
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31150.1 Amplifikace specifických úseků DNA metodou PCR	Revize	0

po dobu 30 min. Templát se přidává jako poslední krok mimo laminární box. Je třeba omezit přenášení věcí z/do laminárního boxu na minimum. Všechny roztoky se před použitím důkladně promíchají vortexem.

Pipetování PCR směsi: Stanoví se počet reakcí (počet vzorků ve dvou opakováních, dvě pozitivní kontroly, dvě bezteplátové kontroly, jedna reakce navíc jako rezerva pro pipetovací chybu). Dle tabulky 1 se vypočtou celkové objemy roztoků, které se budou pipetovat pro přípravu PCR směsi. Připraví se PCR směs obsahující vodu (4), primery (6), DNA polymerázu (2), BSA (3) a premix (1). DNA polymeráza (2) se během pipetování umístí do zamrazovacího stojánu. Pro pipetování primerů (6) se použijí špičky s filtrem. Výsledná směs se důkladně promíchá. Připravená PCR směs se pomocí špiček s filtrem rozalíkovatuje do PCR mikrozkuvek. Mimo laminární box se pomocí špiček s filtrem ke směsi přidá templát. Optimální množství závisí na obsahu DNA a inhibitorů přítomných v extraktu. Templát se předtím krátce vortexuje při 1600 ot/min. Výsledná směs se nepromíchává, pouze se stočí na minicentrifuze.

Spuštění PCR: Zkumavky se umístí do PCR cykleru a spustí se vhodný amplifikační program. V případě potřeby se přidají zkumavky s 30 µl vody tak, aby v každé řadě a v každém sloupci byla alespoň jedna. Pokud se s produkty PCR reakce pracuje tentýž den, uloží se při 4 °C, jinak při –20 °C.

Tabulka 1. Složení PCR směsi pro jednu reakci při celkovém objemu reakční směsi 30 µl.

Roztok	Objem (µl)
Voda (4)	(14,53 – x)
Forward primer (6)	0,06
Reverse primer (6)	0,06
DNA polymeráza (2)	0,2
BSA (3)	0,15
Premix (1)	15,0

x = objem templátu (µl)

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	158
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31150.1 Amplifikace specifických úseků DNA metodou PCR	Revize	0

Poznámky

4. Pro dosažení optimálního průběhu PCR lze měnit objemy templátu, primerů (6), BSA (3) a vody (4), přičemž voda (4) doplňuje reakci na požadovaný objem 30 μ l. Pouze objem premixu (1) je neměnný.

Literatura

1. FailSafeTM PCR PreMix Selection Kit, FailSafeTM PCR system with PreMix Choice, FailSafeTM Enzyme Mix Only, FailSafeTM PCR 2X PreMixes. Lucigen, USA, 1-9, 2019.
2. Thermo Scientific DreamTaq Hot Start DNA Polymerase, Product Information. Thermo Fisher Scientific Inc., USA, 2016.
3. Bovine Serum Albumin (BSA), molecular biology grade, Product Information. Thermo Fisher Scientific Inc., USA, 2017.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	159
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31160.1 Analýzy produktů PCR gelovou elektroforézou	Revize	0

ANALÝZA PRODUKTŮ PCR GELOVOU ELEKTROFORÉZOU

1. Rozsah použití

Metoda se používá pro ověření účinnosti polymerázové řetězové reakce (PCR).

2. Princip

Fragment DNA se pohybuje v agarózovém gelu rychlostí, která závisí na jeho velikosti a vloženém napětí. Z polohy a intenzity pásu na elektroforegramu se určí, zda PCR proběhla požadovaným způsobem.

3. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
2. Agaróza pro molekulární biologii.
3. Kyselina octová, ledová, CH_3COOH .
4. Hydroxid sodný, NaOH , roztok, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě (1) a po vytemperování se doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

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

Příprava: 88,3 ml 35% HCl se převede do 1000ml odměrné baňky částečně naplněné vodou (1). Po vytemperování se doplní po značku.

6. Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Na_2EDTA), $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 186,1 g Na_2EDTA a rozpustí v (750 – 800) ml vody (1). pH roztoku se upraví na hodnotu 8,5 přidáním roztoku NaOH (4). Roztok se převede do odměrné baňky a doplní vodou (1) na objem 1000 ml. Přefiltruje se přes filtrační papír vysoké hustoty a skladuje se do spotřebování při laboratorní teplotě.

7. Tris(hydroxymethyl)aminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Tris).

8. Standard DNA – elektroforetický marker pro amplifikáty; volba závisí na očekávané délce

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	160
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31160.1 Analýzy produktů PCR gelovou elektroforézou	Revize	0

analyzované DNA (např. GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, SM0373, Thermo Scientific™).

9. Nanášecí barva, bývá součástí balení standardu DNA (8).

10. Ethidium bromid, pracovní roztok.

Příprava: Připraví se zředěním komerčně dodávaného 1% zásobního roztoku vodou (1) na finální koncentraci 0,1 %.

11. TAE pufr, 50 ×.

Příprava: V 650 ml vody se rozpustí 242 g Tris (7). Rozpouštění lze urychlit ultrazvukem. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové (3) a 100 ml roztoku Na₂EDTA (6). Doplní se vodou na objem 1000 ml. Neautoklavuje se. Uchovává se v těsně uzavřené lahvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

12. TAE pufr, 1 ×.

Příprava: Roztok se připraví zředěním 20 ml TAE pufru (11) vodou (1) na celkový objem 1000 ml.

4. **Přístroje a pomůcky**

1. Gelová elektroforéza s nalévací vanou přibližně o délce 10 cm a hřebenem.
2. Transiluminátor.
3. Automatická pipeta (2 – 20) µl.
4. Fotodokumentační zařízení.
5. Elektromagnetická laboratorní míchačka s ohřevem do 300 °C.
6. pH metr.
7. Erlenmeyerova baňka, 100 ml.

5. **Pracovní postup**

Příprava 2% agarózového gelu: Nalévací vana se umístí na vodorovnou plochu a nasadí se hřeben. Zdvoujnásobení kapacity je možno docílit umístěním dvou hřebenů za sebou. Do 100ml Erlenmeyerovy baňky se naváží 1,0 g agarózy (2) a přidá 50 ml TAE pufru (12). Suspenze se důkladně promíchá tak, aby žádná agaróza nezůstala na dně baňky. Rozpouštění probíhá

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	161
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31160.1 Analýzy produktů PCR gelovou elektroforézou	Revize	0

za stálého míchání při teplotě asi 280 °C. Suspenze se nechá důkladně povařit do vyčerení. Důkladné rozvaření agarózy je klíčové pro získání kvalitního záznamu z analýzy. Během chlazení se suspenze průběžně promíchává opatrným krouživým pohybem. Přitom je třeba zamezit vzniku bublinek. Ještě za horka se přidá 7,5 µl pracovního roztoku ethidium bromidu (10) (pracuje se v rukavicích). Když teplota suspenze dosáhne asi 80 °C, naleje se do nalévací vany a nechá ztuhnout. Pokud gel nebude použit bezprostředně po ochlazení, umístí se s nalévací vanou do ledničky (je třeba jej uzavřít do umělohmotného sáčku, aby nedocházelo k intenzivnímu vysoušení gelu), kde může být skladován několik dní.

Nanášení vzorku a vlastní analýza: Do elektroforetické vany se naleje TAE pufr (12) a vloží se do ní nalévací vana s gelem, ze kterého se opatrně vytáhne hřeben. Gel by měl být ponořen (2 – 3) mm pod hladinou pufru. Dle pokynů výrobce se ke vzorkům přidá nanášecí barva (9) (míchání nanášecí barvy a vzorku probíhá na parafilmu nebo v jamkách Terasakiho destičky), celkový objem závisí na použitém hřebenu (ve většině případů dostačuje smíchání 4,0 µl TAE pufru [12] a 2,0 µl standardu DNA [8]; 8,0 µl vzorku a 2,0 µl nanášecí barvy [9]). Standardy (8) a vzorky se nanášou do jamek gelu. Optimální množství standardu (8) se zjistí experimentálně. Při nanášení na gel je špička pipety v horní části jamky nebo těsně nad ní. Po nanášení vzorků se elektroforetická vana uzavře víkem, připojí ke zdroji napětí a pustí elektrický proud. DNA putuje ke kladné elektrodě. Pro gel o délce 10 cm se vzdáleností 15 cm mezi elektrodami se doporučuje napětí 90 V. Analýza se ukončí ve chvíli, kdy čelo vzorků a standardů dosáhne asi 2/3 vzdálenosti mezi jamkou a koncem gelu. TAE pufr (12) pro elektroforézu lze použít maximálně desetkrát.

Dokumentace: Gel se opatrně přenesení na transiluminátor. Je třeba mít na paměti, že transiluminátor vyzařuje UV záření, které může poškodit zrak. Fotografie se snímá jako černobílá a v nejvyšší kvalitě. UV záření degraduje DNA, proto se pro případ opakovaného pořízení fotografie minimalizuje čas, kdy je vzorek ozářen. Bezprostředně po analýze se z originálního obrázku pořídí pracovní kopie. Na obrázku se uvede název projektu, charakterizace cílové sekvence, popíší se jednotlivé vzorky a standardy a případně uvedou další důležité skutečnosti.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	162
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31160.1 Analýzy produktů PCR gelovou elektroforézou	Revize	0

Poznámky

1. Z originálního obrázku se ihned pořídí kopie, která se dále zpracovává a analyzuje. Některé úpravy jsou nevratné a pokud by se nevhodně provedly na originále, příslušná informace by byla nevratně ztracena.

Literatura

1. S. Surzycki. Agarose gel electrophoresis of DNA. In *Basic Techniques in Molecular Biology*, Surzycki, S.; Springer, Berlin, 163-191, 2000.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	163
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31170.1 Štěpení DNA restrikčními enzymy	Revize	0

ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENZYMY

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro analýzu libovolné DNA.

2. Princip

Produkt PCR se štěpí specifickým restrikčním enzymem a vzniklé fragmenty se dále analyzují.

3. Chemikálie

1. Restrikční enzym, 10 U/μl (v případě odlišné koncentrace se upraví dávkování).

4. Přístroje a pomůcky

1. PCR termocykler.
2. Automatická pipeta (0,5 – 10) μl.
3. Špičky s filtrem (0,5 – 10) μl.
4. PCR mikrokumavky, 0,2 ml.
5. Stojánek na PCR mikrokumavky.
6. Zamrazovací stojánek pro mikrokumavky pro práci s restrikčním enzymem.

5. Pracovní postup

Do PCR mikrokumavky se pipetou se špičkou s filtrem napipetuje 10,0 μl vzorku a 0,6 μl restrikčního enzymu. Zkumavka s restriktázou se během pipetování umístí v zamrazovacím stojánku. Připravená směs se promíchá ihned po napipetování enzymu. Zkumavka s restriktázou je během pipetování umístěna v zamrazovacím stojánku.

Směs se inkubuje 2 h v PCR cykleru při teplotě udávané výrobcem pro daný enzym. Poté se enzym inaktivuje inkubací reakční směsi při teplotě a po dobu udávanou výrobcem. V případě, že produkty reakce se po skončení štěpení ihned analyzují, skladují se při –20 °C.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	164
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III 31170.1 Štěpení DNA restrikčními enzymy	Vydání	4
		Revize	0

Poznámky

1. *Množství vzorku a s tím související množství enzymu se řídí množstvím potřebným pro další práci.
Pro T-RFLP analýzu postačuje 6 µl.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	165
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31180.1 Stanovení maximální vodní kapacity	Revize	0

STANOVENÍ MAXIMÁLNÍ VODNÍ KAPACITY (WHC)

1. Rozsah použití

Metoda je vhodná pro všechny typy půd.

2. Princip

Metoda popisuje postup stanovení maximální vodní kapacity (water holding capacity, WHC) v půdách minerálních i organických. Tento parametr se používá pro výpočet množství vody, které se přidává k půdním vzorkům při inkubačních půdně-mikrobiologických a ekotoxikologických testech.

3. Přístroje a pomůcky

1. Váhy s váživostí 200 g a přesností 0,001 g.
2. Sušárna s kontrolou teploty.
3. Skleněné trubice o průměru 50 mm a výšce 50 mm.
4. Parafilm.
5. PE nádoba s jemným pískem, kterou je možno proplachovat vodou. Naplnění pískem je do výše 10 cm ode dna.
6. Filtrační papír.

4. Pracovní postup

Minerální půdy: Jedna strana skleněné trubice se zakryje filtračním papírem, který se uchytí gumičkou. Vzniklá nádoba se naplní asi do poloviny čerstvou půdou a umístí na 1 h na vodní lázeň tak, aby hladina vody byla mírně nad horní hranicí půdy. Po 45 min se nádoba s pískem (5) důkladně promyje vodou tak, aby písek nasákl a nadbytečná voda odtekla. Je nutno zajistit, aby povrch pískové plochy byl vodorovný na celé ploše. Na písek se položí navlhčená tkanina a na ni se umístí skleněné trubice s půdou. Aby se zabránilo odpařování vody, trubice se uzavřou parafilmem, do kterého se udělá několik dírek jehlou. Po 3 h se ve vzorcích půd stanoví vážkově obsah vody. Vzorky se převedou do váženek a suší 8 h při 105 °C. Maximální vodní kapacita

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	166
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31180.1 Stanovení maximální vodní kapacity	Revize	0

se vyjádří jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Organické půdy: Skleněné trubice se dnem z filtračního papíru se naplní asi do 1/2 výšky čerstvou půdou a umístí na vodní lázeň tak, aby hladina vody byla mírně nad horní hranicí půdy. Stříčkou se vzorek ovlhčí a špachtlí promíchá tak, aby byl homogenní. Zajistí se, aby nebyly půdní částice na stěnách válce. Dále se pokračuje jako v případě minerálních půd. Pokud je třeba, suspenze se promíchá špachtlí, aby došlo k dokonalému kontaktu vody s půdou.

5. Výpočet

$$\text{WHC} = \frac{\text{PV} - \text{VV}}{\text{VV}} \times 100$$

WHC maximální vodní kapacita (%), procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy,

PV hmotnost půdního vzorku před vysušením (g),

VV hmotnost vysušeného vzorku (g).

Literatura

1. R. Öhlinger: Bestimmung der maximalen Wasserkapazität im Laborversuch. In *Bodengologische Arbeitsmethoden*, F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin, Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1993, 345.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	167
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY

STANOVENÍ Vlivu CHEMIKÁLIÍ NA SUBSTRÁTEM INDUKOVANOU RESPIRACI INKUBAČNÍM POKUSEM

1. Rozsah použití

Metoda je určena k testování vlivu netěkavých chemikálií na schopnost půdního mikrobiálního společenstva mineralizovat glukózu jako snadno rozložitelnou organickou sloučeninu po jednorázové aplikaci testovaného přípravku.

2. Princip

Test inhibice substrátem indukované respirace (SIR) se stanoví dlouhodobým inkubačním pokusem. Stanovení probíhá minimálně při dvou koncentracích daného přípravku, nižší vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu. Paralelně probíhá inkubace kontrolního vzorku neošetřeného přípravkem. Půdní vzorek se inkubuje v uzavřené lahvi s měřicí hlavicí OxiTop (WTW GmbH, SRN). Spotřeba O₂ vede k poklesu tlaku, neboť uvolněný CO₂ se jímá do roztoku hydroxidu sodného, který je umístěn v nádobce na dně lahve. Měřicí zařízení průběžně zaznamenává pokles tlaku, který se poté přepočte na množství spotřebovaného O₂. Přídavek substrátu obsahující glukózu vede k okamžitému zvýšení respirace, tzv. substrátem indukované respiraci (SIR). Ta se stanovuje během několika následujících hodin, dokud je spotřeba O₂ dostatečně lineární.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat.
2. Erlenmeyerovy baňky, 1000 ml.
3. Parafilm.
4. Systém OxiTop (WTW, SRN): ovládací jednotka, měřicí hlavice, adapter, kabel na přenos dat do PC, software pro přenos dat do tabulkového procesoru.
5. Lahve se závitem GL45, 100 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	168
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

6. Termostat s nastavitelnou teplotou 22 °C a výkyvy teploty maximálně 0,3 °C od nastavené hodnoty.

7. Plastové nádoby pro roztok hydroxidu sodného.

4. Chemikálie

1. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \text{ mol/l}$.

Příprava: 100 g NaOH se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní na celkový objem 1000 ml.

2. Substrát.

Příprava: Substrát se připraví důkladným smícháním a rozemnutím 8,42 g glukózy bezvodé, 1,37 g síranu amonného a 0,21 g dihydrogenfosforečnanu draselného v třecí misce.

5. Pracovní postup

Standardní půda: Standardní půda by měla být písčitá s nízkým obsahem organické hmoty.

Doporučená kritéria jsou:

- obsah písku (50 – 75) %,
- pH (5,5 – 7,5),
- obsah organického uhlíku (0,5 – 1,5) %
- obsah uhlíku mikrobiální biomasy by měl být minimálně 1 % z celkového organického uhlíku.

Je třeba mít detailní informace o historii plochy, ze které se půda odebírá. Tyto údaje zahrnují data o vegetaci, aplikovaných přípravcích na ochranu rostlin, minerálních a organických hnojivech nebo případné kontaminaci. Je vhodné zvolit plochu, která umožní dlouhodobý odběr. Půda by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřena přípravky na ochranu rostlin. Organické hnojivo by nemělo být aplikováno během posledních 6 měsíců. Hnojení minerálním hnojivem je akceptovatelné pouze v případě, kdy je to souladu s požadavky na výživu rostlin, nejedná se o hnojivo s biocidním účinkem a od odběru uplynuly minimálně tři měsíce.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	169
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

Poznámky

1. V laboratořích ÚKZÚZ se pro potřeby analýzy používá půda z plochy půdního bazálního monitoringu v Račíně, kód 7042. Průměrné hodnoty fyzikálních, chemických a biologických parametrů naměřené v letech 1999 až 2006 jsou: obsah písku 53,9 % (odběry 1999, 2000, 2001, 2006); pH(KCl) 5,4; obsah oxidovatelného uhlíku 2,1 %; obsah uhlíku mikrobiální biomasy tvoří 1,19 % z celkového organického uhlíku.

Odběr, úprava a skladování standardní půdy: Odběr by neměl následovat po období sucha nebo zatopení plochy trvající déle než 30 dní. Transport a úprava půd probíhá dle obecných zásad pro mikrobiologické analýzy půd (viz JPP ÚKZÚZ, postup č.31000.1).

Preinkubace: Ve třech opakováních se do 1000ml Erlenmeyrových baněk naváží půda odpovídající 400 g sušiny. Jedna navážka slouží jako kontrola, další dvě pro testování přípravku. Uvedená hodnota navážky vychází z maximální délky pokusu a třech paralelních stanovení SIR při každém odběrovém termínu (7 odběrových termínů $\times$ 3 opakování $\times$ 13,5 g_{suš} navážky odpovídá asi 290 g). Pokud je obsah vody nižší, než odpovídá 40 % WHC, půda se na tuto hodnotu dovlhčí. V opačném případě se preinkubuje při přirozené vlhkosti. Lahve se vzorky se po přidavku vody zvaží a uzavřou parafilmem. Preinkubace probíhá 2 dny při 22 °C.

Koncentrace testované látky (přípravku): Množství testované látky pro aplikaci na standardní půdu se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Testují se minimálně dvě koncentrace, nižší odpovídá maximální dávce aplikované na půdu, vyšší násobku této hodnoty. Pokud má být přípravek aplikován vícekrát za sezónu, testovaná koncentrace vychází z celkové aplikované dávky. Vyšší testovaná koncentrace ale nemá přesáhnout desetinásobek jednotlivé maximální doporučené dávky.

Jestliže je testovaný přípravek rozpustný ve vodě, připraví se vodné roztoky tak, aby po jejich aplikaci do půdy celkový obsah vody pokud možno nepřesáhl 60 % WHC. Do kontrolního vzorku se přidá odpovídající množství vody. Je-li obsah vody v kontrolním vzorku velmi nízký, může být

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	170
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

vlhčení problematické. Při přílišném ovlhčení může dojít ke slepení půdních částic, což znemožňuje účinnou výměnu plynů mezi vzorkem a okolím.

Pokud je testovaný přípravek nerozpustný ve vodě, vmíchá se pečlivě do půdy a ovlhčí se na stanovenou vlhkost.

Inkubace: Po skončení preinkubace se vzorky zváží a doplní se úbytek vody. Teprve poté se přidá testovaná látka, resp. voda v případě kontroly, a po důkladném promíchání vzorků se odeberou z každé baňky tři dílčí vzorky k přímému stanovení SIR (viz odstavec *Měření SIR, metoda s konstantním přídatkem substrátu*).

Poté se zaznamená hmotnost, Erlenmeyrovy baňky se vzorky se zalepí parafilmem a uloží do termostatu na 22 °C (den 0). Každý týden do 28. dne se vzorky zváží a doplní se úbytek vody. Následně (28. den) se vzorky důkladně promíchají, odeberou se dílčí vzorky na stanovení SIR, opět se zváží a uloží zpět do termostatu na 22 °C. Jestliže je 28. den rozdíl mezi kontrolní půdou a půdou s aplikovaným substrátem při nižší dávce vyšší než 25 %, inkubace pokračuje, maximálně však do 98. dne. SIR se stanovuje každých 14 dní. Jestliže je v kterémkoliv termínu naměřený rozdíl mezi nižší testovanou koncentrací a kontrolou roven nebo nižší než 25 %, test se ukončí se závěrem, že testovaná dávka nemá dlouhodobý negativní vliv na mineralizaci uhlíku. Úbytek vody se doplňuje každý týden. Erlenmeyrova baňka se přitom nechá několik minut odkrytá bez parafilmu, aby došlo k výměně plynů s okolní atmosférou.

Poznámky

2. V případě testování vlivu jiných látek než agrochemikálií se použije modifikovaný postup, který lze nalézt v přehledu publikací uvedených v přehledu literatury.

Měření SIR, metoda s konstantním přídatkem substrátu: Do 150ml kádinek se naváží substrát (2) a přidá se půdní vzorek dle tabulky 1. Půda a substrát (2) se důkladně zhomogenizují a vzorek se převede do 100ml inkubační lahve. Pak se na dno lahve umístí nádobka s roztokem NaOH (1). Na lahev se nasadí adapter, těsnění a měřicí hlavice. Ihned poté se lahev se vzorkem umístí do termostatu s nastavenou teplotou 22 °C a zahájí se měření.

Systém OxiTop umožňuje průběžné sledování průběhu respirace a v případě potřeby je možno měření předčasně ukončit a hlavici uvolnit pro další analýzy (viz návod k použití zařízení). Během

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	171
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

inkubace nelze se vzorky manipulovat a otevírání termostatu musí být omezeno na minimum.

Tabulka 1. Základní parametry pro stanovení SIR s konstantním přídatkem substrátu systémem OxiTop. Uvedené hodnoty navážek uvádějící obsah sušiny v naváženém čerstvém vzorku.

Parametr	SIR
Preinkubace (g _{sušina})	13,5
Inkubace (g _{sušina})	12,5
Obsah vody (% WHC)	40,0
Inkubační lahev (ml)	100
Substrát (g)	0,125
Objem NaOH (ml)	5,0
Doba inkubace (h)	10,0

6. Výpočet a hodnocení

Výpočet spotřebovaného O₂: Výpočet spotřebovaného O₂ vychází ze stavové rovnice ideálního plynu.

$$R = \frac{32 \times 10^2 \times V_{fr} \times \Delta p}{8,314 \times 295 \times m_{suš}}$$

- R spotřebovaný O₂ od počátku měření (μg/g),
32 molární hmotnost O₂ (g/mol),
10² koeficient pro přepočet jednotek,
V_{fr} volný objem (ml) (viz níže),
Δp pokles tlaku (hPa),
8,314 plynová konstanta (m³.Pa.K⁻¹.mol⁻¹),
295 teplota (K),
m_{suš} navážka suché půdy (g).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	172
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31200.1 Stanovení vlivu chemikálií na substrátem indukovanou respiraci inkubačním pokusem	Revize	0

Výpočet volného objemu V_{fr} :

$$V_{fr} = V_{tot} - V_{av} - V_{am} - V_{sm}$$

V_{fr} volný objem (ml),
 V_{tot} celkový objem (objem lahve + prostor v adaptéru – těsnění) (ml),
 V_{av} objem prázdné absorpční nádoby (ml),
 V_{am} objem roztoku NaOH (ml),
 V_{sm} objem půdních částic (ml). Pro minerální půdy se pro výpočet objemu půdních částic z navážky počítá s literárně udávanou hustotou půdních částic $2,65 \text{ g/cm}^3$.

Výpočet substrátem indukované respirace: Hodnota substrátem indukované respirace ($\mu\text{gO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) se vypočítá jako směrnice regresní přímky závislosti spotřebovaného kyslíku gramem suché půdy na čase. Protože ustálení systému trvá určitý čas, standardně se pro vyhodnocení použijí data od 4,17 h. Pokud by v daném časovém úseku došlo k narušení linearit závislosti spotřeby O_2 na čase, je možno k výpočtu použít jiný časový interval.

Hodnocení: Přípravek má negativní vliv na schopnost mikrobiálního společenstva mineralizovat snadno rozložitelné uhlíkaté sloučeniny, jestliže naměřená hodnota SIR ve vzorku s nižší koncentrací testovaného přípravku je minimálně o 25 % nižší než SIR kontrolního vzorku.

Variační koeficient pro kontrolní vzorek musí být menší než 15 %.

Literatura

1. Vyhláška č. 389/2005 Sb. ze dne 15. 9. 2005, kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí. Ministerstvo životního prostředí, Česká republika.
2. Šimek, M. (2003). Fyzikální vlastnosti půdy. *Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky půdy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – Biologická fakulta, České Budějovice. ISBN 80-7040-629-1.
3. ISO 16072 (1997). Soil Quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. International Organization for Standardization, Geneva.
4. Pell, M., Stenström, J., Granhall, U. (2005). 7.2 Soil Respiration. *Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A., Microbial methods for assessing soil quality*, 117-126.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	173
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

STANOVENÍ VLIVU CHEMIKÁLIÍ NA KRÁTKODOBOU NITRIFIKAČNÍ AKTIVITU

1. Rozsah použití

Metoda určuje postup pro stanovení inhibice krátkodobé nitrifikační aktivity chemikáliemi a extrakty bioodpadů. Lze ji použít i pro detekci přítomnosti látek inhibující nitrifikační aktivitu v půdě a půdních materiálech. Nitrifikací se v uvedené metodě rozumí oxidace NH_4^+ na NO_2^- .

2. Princip

Vzorek se inkubuje 6 h v třepané suspenzi při saturaci substrátem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a s přídavkem NaClO_3 , který inhibuje oxidaci NO_2^- na NO_3^- , což umožňuje stanovit pouze přírůstek NO_2^- . V případě stanovení toxicity chemikálií a extraktů bioodpadů se ke vzorkům přidá testovaná chemikálie nebo daný extrakt v koncentrační řadě a ze stanovené nitrifikační aktivity se vypočtou hodnoty LOEC, NOEC a EC_{x} . Při testování toxicity půd se SNA stanoví ve standardní půdě, testovaném vzorku a jejich směsi. Toxicita testované půdy se stanoví porovnáním průměrné hodnoty SNA ve standardní a testované půdě se stanovenou nitrifikační aktivitou ve směsném vzorku.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat s horizontální třepačkou a nastavitelnou teplotou 25 °C.
2. Erlenmeyerovy baňky, 250 ml.
3. Filtrační papír vhodný k filtrování půdní suspenze, např. Macherey-Nagel, k. č. 440018. Je třeba předem ověřit, že filtrační papír neobsahuje dusitany.
4. Centrifuga, pokud se místo filtrace půdní suspenze odstředí.
5. Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 540 nm a kyvetou 10 mm.

4. Chemikálie

1. Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , roztok, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 13,61 g KH_2PO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	174
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

baňky a doplní po značku.

2. Hydrogenfosforečnan draselný, K_2HPO_4 , roztok, $c(K_2HPO_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 17,40 g K_2HPO_4 , rozpustí ve vodě (9), převede do 500ml odměrné baňky a doplní po značku.

3. Chlorečnan sodný, $NaClO_3$, roztok, $c(NaClO_3) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 10,6 g $NaClO_3$, rozpustí ve vodě (9), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.

4. Síran amonný, $(NH_4)_2SO_4$.

5. Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(KCl) = 4 \text{ mol/l}$.

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

6. Chlorid draselný, KCl , roztok, $c(KCl) = 2 \text{ mol/l}$.

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

7. Zásobní roztok A.

Příprava: Smíchá se 28 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (1), 72 ml roztoku hydrogenfosforečnanu draselného (2) a 100 ml vody (9).

8. Testovací médium.

Příprava: Smíchá se 10 ml zásobního roztoku A (7), 15 ml roztoku $NaClO_3$ (3) a 0,5 g síranu amonného (4). pH roztoku je přibližně 7,2. Doplní se vodou (9) na 1000 ml.

9. Voda MilliQ.

10. Kyselina chlorovodíková, HCl , roztok, $c(HCl) = 2,4 \text{ mol/l}$.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 21,9 ml koncentrované HCl , převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po značku.

11. Sulfanilamid.

Příprava: 0,5 g sulfanilamidu se rozpustí ve 100 ml HCl (1).

12. Kyselina chlorovodíková, HCl , roztok, $c(HCl) = 0,12 \text{ mol/l}$.

Příprava: K 50 ml vody se přidá 1,10 ml koncentrované HCl , převede do 100ml odměrné

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	175
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

baňky a doplní vodou po značku.

13. N-(1-naftyl)-etylendiamin.

Příprava: 0,03 g N-(1-naftyl)-etylendiaminu se rozpustí v 10 ml HCl (3). Připravuje se čerstvý.

14. Dusitan sodný, NaNO₂, zásobní standardní roztok, c = 100 µg NO₂-N/ml.

Příprava: V 500ml baňce se ve vodě rozpustí 0,2463 g NaNO₂ (s přesností na 0,1 mg) a doplní vodou po značku.

15. Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 1 mol/l.

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

16. Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 1 mol/l.

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

5. Pracovní postup

Standardní půda: Jako standardní půda se používá nekontaminovaná půda se známou hodnotou SNA v rozmezí (200 – 800) ng NO₂⁻-N/g_{suš.}. Půda se skladuje za podmínek uvedených v JPP ÚKZÚZ, postup č. 31000.1.

Preinkubace: Při stanovení toxicity chemikálií, hnojiv a extraktů bioodpadů se do 250ml Erlenmeyerových baněk naváže čerstvá půda odpovídající 15 g sušiny ve třech opakováních, baňky se uzavřou parafilmem a vzorek se preinkubuje 2 dny při 25 °C. Podmínky preinkubace pro stanovení toxicity půd jsou uvedeny v odstavci *Testování kontaminovaných půd*.

Testování chemikálií a hnojiv: K testování se použije standardní půda. Množství testované látky pro aplikaci na standardní půdu se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	176
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

Předběžný test: Před vlastním stanovením lze provést předběžný test na širokém rozsahu koncentrací s cílem najít vhodný testovaný rozsah koncentrací. Předběžný test je volitelný a je vhodné ho zvolit v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Předběžný test se provádí s jedním opakováním pro každou koncentraci.

Standardní test: Připraví se koncentrační řada obsahující kontrolu bez přídavku testované chemikálie a minimálně pět testovaných koncentrací uspořádaných v geometrické řadě. Počet kontrol a jednotlivých opakování je minimálně tři. Poměr mezi dvěma sousedními koncentracemi nemá být větší než dva. Nejnižší koncentrace by neměla mít žádný vliv na nitrifikaci, nejvyšší by měla vykazovat inhibici v rozsahu (50 – 100) %.

V případě, že k rozpuštění testované chemikálie bylo třeba užít rozpouštědla, jeho množství nesmí přesáhnout 100 mg/l. V tomto případě se provádí stanovení s další kontrolou obsahující pouze rozpouštědlo při nejvyšší koncentraci dosažené v koncentrační řadě.

U testování hnojiv se do série zahrne měření nitrifikace v jednotlivých koncentracích přípravku bez přídavku půdy, aby mohla být provedena korekce naměřených dat odečtením aktivity nitrifikátorů v samotných koncentracích přípravku. Po skončení preinkubace se ke vzorkům přidá objem testovacího média s testovanou chemikálií přidaného, aby celkový objem roztoku včetně vody přítomné v půdě činil 60 ml. V případě potřeby je nutno upravit pH testovacího média s testovanou chemikálií na 7,2. K úpravě pH se použije roztok NaOH (15) nebo HCl (16). Lahve se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. Nitrifikační aktivita se stanoví dle odstavce *Stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity*.

Limitní test: V odůvodněných případech lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v 5 opakováních.

Testování kontaminovaných půd: Testované půdy a standardní půda se navažují do Erlenmeyerových baněk dle tabulky 1 a dovlhčí se na 60 % WHC. Poté se půdy preinkubují 2 dny ve tmě při 20 °C. Po preinkubaci se z navážek, které jsou v tabulce 1 označeny jako půdy pro směsný vzorek, připraví směsné vzorky. Každý směsný vzorek obsahuje navážku odpovídající 7,5 g testované a 7,5 g standardní suché půdy. Směsný vzorek a vzorky půd testované a standardní se preinkubují další jeden den ve tmě při 20 °C. Poté se ke vzorkům přidá 60 ml testovacího média

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	177
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

a inkubace pokračuje, jak je uvedeno v odstavci *Stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity*.

SNA se stanoví ve směsném vzorku, v půdě testované a standardní, a to vždy ve čtyřech opakováních.

Tabulka 1. Navážky standardní a testované půdy pro stanovení vlivu polutantů na nitrifikaci. Navážky odpovídají množství sušiny ve vzorku.

Vzorek	Navážka (g)	Počet navážek	Erl. baňka (ml)
Standardní půda (přímé stanovení)	15,0	4	250
Standardní půda na směsný vzorek	16,0	2 × počet testovaných půd	100
Testovaná půda (přímé stanovení)	15,0	4	250
Testovaná půda na směsný vzorek	16,0	2	100

Testování vodních extraktů bioodpadů (např. čistírenských kalů): Připraví se suspenze testovaného materiálu s vodou v poměru 1 : 10 (navážka odpovídající sušině : voda) a hodnota pH se upraví hydroxidem sodným (15) nebo kyselinou chlorovodíkovou (16) na 7,5. Suspenze se nechá třepat 24 h a poté se pevné částice od extraktu oddělí centrifugací. Vliv extraktu na půdu se testuje v koncentrační řadě, která zahrnuje kontrolu bez extraktu. Nejvyšší testovaná koncentrace extraktu se připraví smícháním extraktu s koncentrovaným testovacím médiem tak, aby po jejím zředění extraktem bylo dosaženo koncentrace běžného testovacího média (8). Poté se pH upraví na 7,2 a připraví se geometrická koncentrační řada. Poměr mezi dvěma sousedními koncentracemi nemá být větší než dva. Pro přípravu koncentrační řady se použije testovacím médium (8). Do série se zahrne měření nitrifikace v extraktu bez přídavku půdy, aby mohla být provedena korekce naměřených dat odečtením aktivity nitrifikátorů v extraktu. Baňky se umístí na třepačku s nastavenou teplotou 25 °C. Nitrifikační aktivita se stanoví dle odstavce *Stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity*.

Stanovení krátkodobé nitrifikační aktivity: Vzorek se nechá důkladně třepat tak, aby půda nezůstávala usazena na dně (170 ot/min). Po 2 h a 6 h se odebere 5 ml suspenze, ke kterým se přidá

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	178
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

5 ml roztoku KCl (5). Tím dojde k zastavení nitrifikace. Půda se od roztoku oddělí filtrací nebo centrifugací. V roztoku se stanoví koncentrace NO_2^- . Kalibrační křivka se připraví v roztoku KCl (6), který se použije i pro ředění vzorků s vysokým obsahem NO_2^- .

Stanovení koncentrace dusitanových iontů spektrofotometricky:

Příprava kalibrační křivky: V prvním kroku se do 50ml baňky pipetuje 5 ml zásobního standardního roztoku dusitanu sodného (14) a doplní po značku. Tento roztok má koncentraci 10 $\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$. Dále se pipetuje podle tabulky 2.

Tabulka 2. Příprava standardů pro stanovení dusitanů v půdním extraktu.

Krok	Pipetovaný roztok ($\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$)	Pipetovaný objem (ml)	Výsledný objem (ml)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$)
1.	100	5	50	10
2.	10	5	50	1
3.	1	5	50	0,10
4.	0,1	5	50	0,01
5.	0,1	5	10	0,05
6.	0,1	20	25	0,08
7.	1	10	50	0,20
8.	0,2	15	25	0,12
9.	0,2	20	25	0,16

Dávkování činidel: Pipetuje se 3000 μl roztoku kalibrační křivky nebo vzorku, přidá se 60 μl roztoku sulfanilamidu (11) a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 60 μl N-(1-naftyl)-etylendiaminu (13) a nechá 20 min vybarvovat. Zbarvení je stále několik hodin.

Měření: V 10mm kyvetě se měří absorbance standardů a vzorků při 540 nm. Koncentrace dusitanů v extraktu ($\mu\text{g NO}_2\text{-N/ml}$) se stanoví odečtem z kalibrační křivky.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	179
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

6. Výpočet a hodnocení

Výpočet koncentrace dusitanů v půdním vzorku přepočtená na sušinu: Navažovala se čerstvá půda, jejíž množství odpovídalo danému množství suché půdy.

$$\text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/g}_{\text{suš}}) = \text{NO}_2 - \text{N} (\mu\text{g/ml}) \times \frac{V + \frac{w \times m}{100}}{m}$$

$\text{NO}_2\text{-N} (\mu\text{g/g}_{\text{suš}})$ koncentrace dusitanů v půdním vzorku přepočtená na sušinu,
 V objem extrakčního činidla (ml),
 m hmotnost suché půdy, které odpovídá dané navážce čerstvé půdy (g),
 w vlhkost vyjádřená jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Výpočet krátkodobé nitrifikační aktivity:

$$\text{SNA} = \frac{C_6 - C_2}{4} \times 1000$$

SNA krátkodobá nitrifikační aktivita ($\text{ng NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{g}_{\text{suš}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),
 C_6 koncentrace $\text{NO}_2^- \cdot \text{N}$ ($\text{ng/g}_{\text{suš}}$) po 6 h inkubace,
 C_2 koncentrace $\text{NO}_2^- \cdot \text{N}$ ($\text{ng/g}_{\text{suš}}$) po 2 h inkubace,
 1000 přepočet μg na ng .

Hodnocení kontaminovaných půd: Kontaminovaná půda je považována za toxickou, jestliže platí

$$M_m + \text{SD}_m < 0,9 \times (M_c + M_p)/2$$

M_m průměrná hodnota SNA ve směsném vzorku,
 SD_m směrodatná odchylka SNA směsného vzorku,
 M_c průměrná hodnota SNA standardní půdy,
 M_p průměrná hodnota SNA kontaminované půdy.

Hodnocení chemikálií, hnojiv a extraktů bioodpadů: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí účinek), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při které je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace, při které se projeví $x\%$ inhibiční účinek). V případě limitního testu se provede

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	180
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31220.2 Stanovení vlivu chemikálií na krátkodobou nitrifikační aktivitu	Revize	0

statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. *Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.*
2. *Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).*

Literatura

1. ISO 15685 (2004). Soil quality – Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification – Rapid test by ammonium oxidation. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Šimek, M. (2003). Fyzikální vlastnosti půdy. *Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky půdy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – Biologická fakulta, České Budějovice, ISBN 80-7040-629-1.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	181
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

KONTAKTNÍ TEST PRO STANOVENÍ INHIBIČNÍHO ÚČINKU PŮD NA DEHYDROGENÁZOVOU AKTIVITU BAKTERIE *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS*

1. Rozsah použití

Bakterie *Arthrobacter globiformis* lze použít pro testování většiny látek, které nemají silně těkavou povahu. Lze je také použít pro reálně kontaminovanou půdu. pH testované půdy nesmí být nižší než 5.

2. Princip

Princip testu je založen na inhibici dehydrogenázové aktivity kultury bakterií *Arthrobacter globiformis* po přímém kontaktu s kontaminovanou půdou. V případě testování vlivu chemikálií se připraví koncentrační řada a zjišťují se hodnoty účinné koncentrace EC_x.

3. Přístroje a pomůcky

1. Termostat vytemperovaný na 30 °C.
2. Mikrodestičkový fluorimetr, (Ex 535 nm, Em 590 nm).
3. pH metr.
4. Předvážky, přesnost 0,01 g, váživost do 200 g.
5. Sušárna nebo vodní lázeň.
6. Mrazák –20 °C.
7. Autokláv.
8. Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
9. 24jamkové mikrodestičky.
10. Lžička, parafilm, jehla, plastové kapátko.

4. Chemikálie

1. Artificiální půda ("bílá" rašelina – velikost částic 2 mm ± 1 mm, křemenný písek – > 50 %

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	182
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO₃ pro úpravu pH).

- Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 1 mol/l.

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a po vytemperování se doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

- Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 0,1 mol/l.

Příprava: 8,77 ml 35% HCl se přidá do vody a po vytemperování se doplní na výsledný objem 1000 ml v odměrné baňce.

- Destilovaná voda (vodivost < 10 µS/cm).

- Živné médium A.

Příprava: V 600 ml destilované vody se rozpustí 10 g kaseinového peptonu, 5 g kvasnicového extraktu, 5 g D(+) glukózy, 5 g chloridu sodného. Roztok se doplní vodou na objem 1000 ml. Médium se autoklávuje 20 min při (121 ± 3) °C.

- Živné médium B.

Příprava: Odměří se 333 ml živného média A do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku.

- Fosfátový pufr.

Příprava: V 600 ml destilované vody se rozpustí 7,24 g dihydrogenfosforečnanu draselného KH₂PO₄, 12 g hydrogenfosforečnanu draselného K₂HPO₄, 2 g octanu sodného C₂H₃NaO₂, 2 g D(+) glukózy. Roztok se doplní vodou na objem 1000 ml. Upraví se pH na 7 ± 0,2. Pokud se bude skladovat, autoklávuje se 20 min při (121 ± 3) °C.

- Dimethylsulfoxid (DMSO).

- Resazurin, CH₆NO₄Na.

- Benzylalkonium chlorid (BAC), C₁₂H₂₅N(CH₃)₂C₇H₇Cl.

5. Testovaný organismus

- Lyofilizovaná kultura *Arthrobacter globiformis*.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	183
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

6. Pracovní postup

Příprava resazurinového barviva: V 1000 ml fosfátového pufru se rozpustí 45 mg resazurinu. Roztok se skladuje ve tmě při (0 – 8) °C. Za těchto podmínek je stálý jeden týden.

Zpracování a skladování půdních vzorků: Viz JPP ÚKZÚZ, postup č.31000.1.

Referenční půda:

1. Nekontaminovaná půda stejného složení odebraná v blízkosti kontaminované plochy. Tato půda nesmí obsahovat kontaminanty (což se ověří např. chemickými analýzami).
2. Půda, která splňuje následující parametry: obsah organické hmoty nesmí být vyšší než 1,5 %, frakce půdy < 20 µm nesmí přesáhnout 20 %, obsah písku (50 – 75) %, pH (5 – 7,5) (např. LUFA 2.2).
3. Artificiální půda, vlhkost 33 % WHC.
4. Křemenný písek pro testování chemikálií.

Příprava artificiální půdy (AP): Artificiální půda se skládá z křemenného písku (velikost zrn 0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (např. Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm ± 1 mm) a CaCO₃, který slouží k úpravě pH artificiální půdy na 6 ± 0,5. Přesátá rašelina (pro testování s roupicemi se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na –80 °C nebo 3× nechá zmrznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v poměru (69 : 20 : 10). Artificiální půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitánem vápenatým na hodnotu 6 ± 0,5. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. pH se měří na začátku i konci testu v suspenzi půdy a KCl (c = 1 mol/l) v poměru 1 : 5 (půda : KCl). V AP se změří také WHC (maximální vodní kapacita) a sušina. Pokud není známa maximální vodní kapacita dané artificiální půdy, musí se před testem zjistit (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180.1).

Experimentální uspořádání:

1. Při testování chemikálií a odpadů se jako referenční půda volí křemenný písek. Pro testování se volí geometrická řada (0; 12,5; 25; 50; 100) % ve 4 opakováních, kdy se smíchá testovaná látka s kontrolním materiálem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	184
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

2. Při testování půd se testovaná půda porovnává s referenční půdou ve 4 opakováních.

Vlastní postup testu: Lyofilizované bakterie *Arthrobacter globiformis* se mohou použít ihned po rozmrazení, nejpozději však do 6 h. Po vyjmutí lyofilizovaných bakterií z mrazáku se do vialky s lyofilizovanými bakteriemi přidá 0,5 ml studené destilované vody a umístí se na (20 – 30) min do lednice (6 ± 2) °C. Pro přípravu pracovního inokula se přenese celý obsah vialky do 20 ml média B vytemperovaného na 30 °C.

Analyzované půdy je vhodné použít co nejdříve po vzorkování. Analyzované půdy se rozváží po čtyřech opakováních do 24jamkové mikrodestičky po 0,6 g do každé jamky, včetně čtyř opakování kontrolní půdy. Dále je nutné deaktivovat přirozenou dehydrogenázovou aktivitu. Mikrodestička s rozváženou půdou se umístí do vodní lázně vytemperované na (85 ± 2) °C po dobu 10 min a následně se zchladí na laboratorní teplotu přenesením do studené vody na 15 min. Tato procedura se opakuje 2 ×.

Po deaktivaci přirozené dehydrogenázové aktivity se pipetou přidá do mikrodestičky 0,6 ml destilované vody a 0,4 ml inokula bakterií. Následně se mikrodestička inkubuje 2 h při 30 °C na horizontální třepačce při 150 kmitů/min. Dále se přidá 0,8 ml připraveného roztoku resazurinu a změří se fluorescence v mikrodestičkový fluorimetru (Ex 535 nm, Em 590 nm). Měření se opakuje každých 15 min po dobu 1 h. Mezi měřeními se destička inkubuje v termostatu na horizontální třepačce při 30 °C. Souhrnný postup je uveden v tabulce 1.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	185
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

Tabulka 1. Souhrnná tabulka navážek.

	Jednotka	Blank	Kontrola	Vzorek
Kontrolní materiál (vlhký)	g	0,6	0,6	
Analýzovaná půda (vlhká)	g	–		0,6
Voda	ml	0,6	0,6	0,6
Deaktivace dehydrogenázové aktivity				
Inokulum	ml	–	0,4	0,4
Živné médium B	ml	0,4	–	–
Inkubace (2 h, 30 °C, ve tmě)				
Resazurin	ml	0,8	0,8	0,8
Měření každých 15 min				

7. Výpočet a hodnocení

Výpočet inhibičního efektu:

$$IE = 100 - \left[\frac{S_s}{S_c} \times 100 \right]$$

IE inhibiční efekt (%),

S_s nárůst fluorescence vzorku mezi 15. min a 45. min,

S_c nárůst fluorescence kontroly mezi 15. min a 45. min.

Nárůst fluorescence ve vzorku a kontrole se určí lineární regresí.

Kritéria validity testu: Výsledky jsou považovány za platné, jestliže fluorescence kontrolní půdy v průběhu měření (0 – 60) min vzrostla více než 5 ×. Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

Hodnocení kontaminovaných půd: Jako kontaminované půdy se označí půdy, u kterých došlo ke 40% inhibici fluorescence vzhledem ke kontrole.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	186
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31230.1 Kontaktní test pro stanovení inhibičního účinku půd na dehydrogenázovou aktivitu bakterie <i>Arthrobacter globiformis</i>	Revize	0

Hodnocení chemikálií a hnojiv: Pokud se testovaná chemikálie, půda, odpad nebo sediment smíchaly v koncentrační řadě s kontrolní půdou výsledek se vyjadřuje jako % inhibice.

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí účinek), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při které je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace, při které se projeví x% inhibiční účinek). V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.
2. Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).

Referenční látka: Jako referenční látka je doporučena BAC (10). Způsobená inhibice by se měla pohybovat v rozmezí (30 – 80) %. Při koncentraci 600 mg/kg je průměrná inhibice 58,2 %.

Literatura

1. ISO/DIS 10871 (2009). Water quality – Determination of the inhibition of dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* – Solid contact test using the redox dye resazurine. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Neumann-Hensel, H., Melbye, K. (2006). Optimisation of the Solid-Contact Test with *Arthrobacter globiformis* (7 pp). *Journal of Soils and Sediments*, 6(4), 201-207

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	187
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

TEST Vlivu chemikálií na délku kořene salátu (*LACTUCA SATIVA*)

1. Rozsah použití

Postup je určen pro testování toxicity látek, které nemají silně těkavou povahu. Test je zaměřený na vývoj a růst kořene.

2. Princip

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu agrochemikálií (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva) na vývin a růst kořene salátu *Lactuca sativa* var. capitata (salát hlávkový – Safír, určený k rychlení) po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Test probíhá minimálně při šesti koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá (120 ± 2) h a na jeho konci se vyhodnotí vliv na délku kořene v porovnání s kontrolní variantou.

3. Přístroje a pomůcky

1. Testovací plastové nádoby s víčky (700 – 1000) ml.
2. Nádobu na míchání umělé půdy.
3. Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
4. Míchačka na umělou půdu.
5. Termostat vytemperovaný na (24 ± 2) °C.
6. pH metr.
7. Petriho misky (velké).
8. Předvážky, přesnost 0,5 g, váživost do 5000 g.
9. Milimetrový papír, pravítko.
10. Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
11. Fixační fólie.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	188
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

4. Chemikálie

- Artificiální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic 2 mm ± 1 mm, křemenný písek – > 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO₃ pro úpravu pH).
- Zásobní roztok testované látky.
- Destilovaná voda na ovlhčení.
- Chlorid draselný, KCl, roztok, c(KCl) = 1 mol/l.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

- Denaturovaný líh, 4 : 1 (denaturovaný líh : destilovaná voda).
- Kyselina boritá, H₃BO₃.

5. Testovaný organismus

- Semena salátu *Lactuca sativa* var. capitata

6. Pracovní postup

Příprava artificiální půdy (AP): Artificiální půda se skládá z křemenného písku (více než 50 % zrněk velikosti 0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (např. Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm ± 1 mm) a CaCO₃ (slouží k úpravě pH). Přesátá rašelina (pro testování se salátem se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na –80 °C nebo se 3× nechá zmrznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín a rašelina se smíchají v hmotnostním poměru 69 : 20 : 10. AP se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30042.1). Pokud je potřeba, pH se upraví pomocí uhličitanu vápenatého na hodnotu 6 ± 0,5. Nechá se další tři dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. 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).

Experimentální upřádkání:

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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	189
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

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

Možná uspořádání definitivního testu:

1. Pro NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt) přístup je vhodné použít alespoň 5 koncentrací v geometrické řadě po čtyřech opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace, při které se projeví x% účinek) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol.
3. Pro smíšený přístup je vhodné použít 6 až 8 koncentrací v geometrické řadě po 5 opakováních + 5 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 5 opakováních.

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

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

Množství testované látky pro aplikaci na umělé půdě se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Jeden až tři dny před začátkem testu se připraví zásobní roztok testované látky (= nejvyšší

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	190
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

koncentrace) a ředící řadou se 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 60 % WHC).
2. Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, se použije těžké rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Roztokem rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápně uměle vytvořená půda a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Testovaná látka se tedy aplikuje den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 60 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolu s použitým rozpouštědlem (bez testované látky), aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro salát toxické.
3. Pro látky nerozpustné ve vodě ani v organických rozpouštědlech se látka pečlivě vmíchá přímo do testované půdy, nebo se použije směs 200 g jemně mletého industriálního křemenného písku, nebo 200 g suchého půdního substrátu a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá a dovlhčí se na 60 % WHC.

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

Vyhodnocení testu: Test se vyhodnocuje po (120 ± 2) h. Měří se délka kořene s přesností na 1 mm. Zvýšená pozornost se věnuje šetrnému vytažení kořene z půdy. Je nutné dbát na to, aby nedošlo k poškození kořene. Jestliže předklíčené semeno nevytvořilo kořínky, započte se tato hodnota jako nulová.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	191
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

7. Vyhodnocení dat

Pro každou koncentraci zkoušeného vzorku a kontrolu se vypočte aritmetický průměr délky kořene, směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV).

Kritéria validity:

Výsledky jsou považovány za platné, pokud platí následující podmínky:

1. Na konci testu musí být průměrná délka kořene salátu v kontrole ≥ 15 mm.
2. Variační koeficient paralelních stanovení je ≤ 20 %.
3. Průměrná vzcházivost semene je ≥ 80 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x . V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. *Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.*
2. *Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).*

Referenční látka: Jednou ročně se salát testuje na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testu. Touto referenční látkou je kyselina boritá (H_3BO_3). Doporučená hodnota EC_{50} kyseliny borité se pohybuje v rozmezí 300 mg/kg_{suš} až 650 mg/kg_{suš}.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	192
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31268.1 Test vlivu chemikálií na délku kořene salátu (<i>Lactuca sativa</i>)	Revize	0

Literatura

1. ISO 11269-1 (1993). Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. International Organization for Standardization, Geneva.
2. ISO 17126 (2005). Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.). International Organization for Standardization, Geneva.
3. Becker, L., Scheffczyk, A., Förster, B., Oehlmann, J., Princz, J., Römbke, J., Moser, T. (2011). Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 238-248.
4. Moser, H., Römbke, J. (Editors) (2009). Ecotoxicological Characterization of Waste – Results nad Experiences of an International Ring Test. Springer Science+Business Media, LLC, New York. ISBN 978-0-387-88958-0.
5. Vyhláška č. 94/2016 Sb. ze dne 23. 3. 2016, o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zdravotnictví, Česká republika.
6. [http://www.echa.europa.eu/\(30.4.2013\)](http://www.echa.europa.eu/(30.4.2013)).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	193
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

TEST Vlivu CHEMIKALIÍ NA ŘEPKU OLEJKU (*BRASSICA NAPUS*)

1. Rozsah použití

Postup je určen pro testování toxicity látek, které nemají silně těkavou povahu.

2. Princip

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu agrochemikálií (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva) na schopnost růstu rostlin 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 uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 35 dní. Po 35 dnech se vyhodnotí vzhled rostlin, čerstvá hmotnost, suchá hmotnost, délka prýtu, a pokud se vyvinuly lusky, tak počet lusků se semeny.

3. Přístroje a pomůcky

1. Testovací plastové nádoby (700 – 1000) ml.
2. Síto o jmenovité délce ok 4 mm.
3. Nádoba na míchání umělé půdy (AP).
4. Míchačka na umělou půdu.
5. Růstová komora vytemperovaná na $(23 \pm 3) ^\circ\text{C}$, (13000 ± 2000) lux, vlhkost $(75 \pm 25) \%$.
6. pH metr.
7. Předvážky, přesnost 0,5 g, váživost do 5000 g.
8. Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
9. Zavlažovací bavlněné knoty.
10. Raznice, kladivo.
11. Fotodokumentační zařízení.
12. Testovací skleněné nádoby (150 – 200) ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	194
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

4. Chemikálie

- Artificiální půda ("tmavá" spodní rašelina – velikost částic $2\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$, křemenný písek – $> 50\%$ hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk $0,05\text{ mm} - 0,2\text{ mm}$, kaolín – např. Sigma, CaCO_3 pro úpravu pH).
- Zásobní roztok testované látky.
- Destilovaná voda na ovlhčení.
- Chlorid draselný, KCl, roztok, $c(\text{KCl}) = 1\text{ mol/l}$.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

- Denaturovaný líh, 4 : 1 (denaturovaný líh : destilovaná voda), v/v.
- Chemikálie pro přípravu Steinbergova media:

Mikroprvky

Zásobní roztok živin č. 1, kyselina boritá, $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 120\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 120 mg H_3BO_3 se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok živin č. 2, síran zinečnatý, heptahydrát, $c(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 180\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 180 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok živin č. 3, molybdenan sodný, dihydrát, $c(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 44\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 44 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok živin č. 4, chlorid manganatý, tetrahydrát, $c(\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}) = 180\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 180 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok živin č. 5, chlorid železnatý, hexahydrát, $c(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) = 760\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 760 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok živin č. 6, EDTA disodná sůl dihydrát, $c(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 1500\text{ }\mu\text{g/l}$.

Příprava: 1500 mg EDTA se rozpustí ve vodě a doplní do 100 ml v odměrné baňce

Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Mikroprvky se připraví ve formě zásobních roztoků a uchovávají se v lednici při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Před použitím se nechají vytemperovat na laboratorní teplotu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	195
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

Makroprvky

Dusičnan draselný, $c(\text{KNO}_3) = 350 \text{ mg/l}$.

Tetrahydrát dusičnanu vápenatého, $c(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}) = 295 \text{ mg/l}$.

Dihydrogenfosforečnan draselný, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 90 \text{ mg/l}$.

Hydrogenfosforečnan draselný, $c(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 12,6 \text{ mg/l}$.

Heptahydrát síranu hořečnatého, $c(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 190 \text{ mg/l}$.

Makroprvky se naváží a rozpustí v destilované vodě. Navážka se přizpůsobí množství 10 l. Ze zásobních roztoků mikroprvků č. 1 až 5 se pipetou přidá po 1 ml a doplní se destilovanou vodou do 10 l. Připravené Steinbergovo médium se používá pro zálivku rostlin.

5. Testovaný organismus

1. Semena řepky jarní *Brassica napus*.

6. Pracovní postup

Příprava umělé půdy (AP): Umělá půda se skládá z křemenného písku (velikost zrn 0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (např. Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm ± 1 mm) a CaCO_3 , který slouží k úpravě pH umělé půdy na $6 \pm 0,5$. Přesátá rašelina (pro testování s roupicemi se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na -80°C nebo 3× nechá zmraznout při -20°C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v poměru (69 : 20 : 10). Umělá půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitanem vápenatým na hodnotu $6 \pm 0,5$. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. pH se měří na začátku i konci testu v suspenzi půdy a KCl ($c = 1 \text{ mol/l}$) v poměru 1 : 5 (půda : KCl). V AP se změří také WHC (maximální vodní kapacita) a sušina. Pokud není známa maximální vodní kapacita dané umělé půdy, musí se před testem zjistit (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180).

Experimentální uspořádání:

Předběžný test: Zvolí se v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Test trvá 14 dní. Na konci testu se vyhodnocuje vzcházivost rostlin. Výsledky testu jsou důležité pro navržení

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	196
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

experimentálního uspořádání definitivního testu.

Definitivní test: Slouží ke zjištění vlivu chemikálií na růst rostlin. Test trvá 5 týdnů. Na konci testu se hodnotí vzhled rostliny, počet vzešlých rostlin, čerstvá hmotnost prýtu, suchá hmotnost prýtu, počet lusků a semen (pokud jsou vyvinuty lusky). Při přípravě koncentrační řady se nedoporučuje volit ředící krok vyšší než 2. Před použitím AP jako půdy referenční se dává přednost nekontaminované půdě s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako zkoušené půdy.

Možná uspořádání definitivního testu:

1. Pro NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt) přístup by se mělo použít alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace při které se projeví x% účinek) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol.
3. Pro smíšený přístup by se mělo použít 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 5 opakováních + 5 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 5 opakováních.

Spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu. Na každé opakování je potřeba asi 400 g AP. Musí se připočíst ještě přibližně 50 g půdy na změření vlhkosti a pH půdy.

Příprava testovacích nádob: Používají se testovací nádoby s objemem (700–1000) ml, viz obrázek

1. Doprostřed nádoby se raznicí vyrazí 2 otvory o velikosti 10 mm. Otvorem se protáhne knot. Knot by neměl být v nádobě vyšší než 1 cm a pod nádobou by měl být dlouhý podle výšky zavlažovací nádoby. Každá testovací nádoba má svou zavlažovací nádobu. Může se použít bavlněný knot anebo knot se skleněnými vlákny.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	197
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0



Obrázek 1. Testovací nádoba.

Aplikace testované látky a rozdělení AP do testovacích nádob: 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 testované látky pro aplikaci na AP se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy $1,5 \text{ g/cm}^3$.

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

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). Roztokem rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápně AP a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Testovaná látka se tedy aplikuje den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 50 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	198
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro řepku toxické.

- Pro látky nerozpustné ve vodě, ani v organických rozpouštědlech se látka pečlivě vmíchá přímo do testované půdy, nebo se použije směs 200 g jemně mletého industriálního křemenného písku, nebo 200 g suchého půdního substrátu a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá. Dovlhčí se na 50 % WHC. (Platí pouze pro AP).

Připravená AP se rozvažuje po 400 g suché hmotnosti do testovacích nádob.

Vlastní postup testu: Po aplikaci látky se zasadí 10 semen řepky (5 – 10) mm pod povrch půdy. Nádobý se umístí ve znáhodněném pořadí do růstové komory vytemperované na $(23 \pm 3) ^\circ\text{C}$ s osvitem (13000 ± 2000) luxů a se světelným režimem 16 : 8 (světlo : tma). Následující den se do zavlažovacích nádob nalije Steinbergovo medium. Na začátku testu je možné přidat i tekuté hnojivo (např. Substral) do všech nádob pro podporu růstu rostlin. Jakmile vzejde v kontrolní variantě 50 % rostlin, začíná běžet délka testu (= D0). Zhruba po 7 dnech od D0 se zredukuje počet rostlin na 8 rostlin na nádobu, pokud je to možné. Test se průběžně 2× týdně kontroluje a znáhodní se umístění nádob v růstové komoře. Při kontrolách se doplní množství Steinbergova media v zavlažovacích nádobách tak, aby byl zavlažovací knot namočen v mediu. Pokud se v průběhu testu objeví květy, zaznamená se to a provede se opylení jemným štětečkem anebo „včelí tyčinkou“.

Vyhodnocení testu: Po 14 dnech od D0 se provede první sklizeň. V testovacích nádobách musejí zůstat 4 rostliny. Zhodnotí se stav ušřížených rostlin, jejich počet a čerstvá hmotnost. Rostliny se ušříhnou těsně u povrchu půdy, změří se jejich délka, zváží se čerstvá hmotnost každé rostliny zvlášť a po usušení při $60 ^\circ\text{C}$ (cca 8 h do konstantní hmotnosti) se zváží sušina rostlin. Po 4 týdnech se provede konečná sklizeň. Ušříhnou se zbylé rostliny a hodnotí se následující parametry:

- růstové stádium podle BBCH schématu (systém jednotného kódování fenologických růstových fází jednoděložných a dvouděložných rostlin),
- počet lusků se semeny, pokud se objevily,
- čerstvá hmotnost prýtu (bez lusků),
- sušina prýtu každé nádoby.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	199
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31270.1 Test vlivu chemikálií na řepku olejku (<i>Brassica napus</i>)	Revize	0

7. Vyhodnocení dat

Kritéria validity testu:

Výsledky jsou považovány za platné, pokud v kontrole platí následující podmínky:

1. Počet vzešlých rostlin v kontrole je nejméně 75 %.
2. Ne více než jedna ze vzešlých rostlin uhynula v průběhu testu.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x. V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. *Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.*
2. *Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).*

Referenční látka: Jednou ročně se rostliny testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných rostlin. Touto referenční látkou může být sulfid zinečnatý, kyselina boritá nebo trichloracetát sodný.

Literatura

1. ISO 22030 (2005). Soil quality – Biological methods – Chronic toxicity in higher plants. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Meier, U. (2001). Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. *BBCH Monograph*, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Blackwell, Oxford.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	200
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

TEST Vlivu CHEMIKALIÍ NA ROUPICI *ENCHYTRAEUS CRYPTICUS*

1. Rozsah použití

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu agrochemikálií (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva) na schopnost reprodukce jedinců roupice *Enchytraeus crypticus* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Pro testování většiny látek, které nemají silně volatilní povahu, lze použít jedince pěstované na agaru nebo v zahradním substrátu.

2. Princip

Test probíhá minimálně při šesti koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 28 dní. Na konci testu se vyhodnotí vliv na reprodukci.

3. Přístroje a pomůcky

1. Testovací skleněné nádoby (150 – 200) ml.
2. Síto o jmenovité délce ok 2 mm.
3. Nádoba na míchání umělé půdy.
4. Míchačka na umělou půdu.
5. Růstová komora vytemperovaná na 20 °C, osvit (400 – 800) lux.
6. pH metr.
7. Předvážky, přesnost 0,01 g, váživost do 200 g.
8. Lupa s osvětlením, počítadlo
9. Mrazák –20 °C.
10. Luxmetr.
11. Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
12. Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
13. Petriho misky sterilní, průměr 10 cm.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	201
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

14. Měkká entomologická pinzeta.
15. Plastové nádoby (15 × 20 × 3) cm k počítání juvenilů.
16. Parafilm.
17. Termostat vytemperovaný na 20 °C.
18. Autokláv.
19. Laminární box.

4. Chemikálie

1. 1% roztok Bengálské červeně.

Příprava: 1 g Bengálské červeně se rozpustí v alkoholu a doplní alkoholem na 100 ml.

2. Artificiální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic 2 mm ± 1 mm, křemenný písek – > 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO₃ pro úpravu pH).
3. Agar.
4. Zásobní roztok testované látky.
5. Destilovaná voda na ovlhčení.
6. Chlorid draselný, KCl, roztok, c(KCl) = 1 mol/l.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

7. Denaturovaný líh, 4 : 1 (denaturovaný líh : destilovaná voda).
8. Autoklávované ovesné vločky.

Příprava: Ovesné vločky se sterilizují 20 min 121 °C.

9. Millipore voda.

5. Testovaný organismus

1. Zásobní kultura roupic *Enchytraeus crypticus*.

6. Pracovní postup

Příprava artificiální půdy (AP): Artificiální půda se skládá z křemenného písku (velikost zrněk

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	202
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (např. Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm ± 1 mm) a CaCO₃, který slouží k úpravě pH umělé půdy na 6 ± 0,5. Přesátá rašelina (pro testování s roupicemi se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na –80 °C nebo 3× nechá zmraznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v poměru (69 : 20 : 10). Umělá půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitánem vápenatým na hodnotu 6 ± 0,5. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. pH se měří na začátku i konci testu v suspenzi půdy a KCl (c = 1 mol/l) v poměru 1 : 5 (půda : KCl). V AP se změří také WHC (maximální vodní kapacita) a sušina. Pokud není známa maximální vodní kapacita dané umělé půdy, musí se před testem zjistit (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180.1).

Experimentální uspořádání:

Předběžný test: Zvolí se v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Test trvá 14 dní. Na konci testu se vyhodnocuje mortalita jedinců. Výsledky testu jsou důležité pro navržení experimentálního uspořádání definitivního testu.

Definitivní test: Slouží ke zjištění mortality jedinců a vlivu na reprodukci. Test trvá 4 týdny. 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 efekt) přístup se použije alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace při které se projeví účinek u x % sledované populace) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol.
3. Pro smíšený přístup se použije 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 4 opakováních + 5 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 5 opakováních.

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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	203
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

koncentrace a kontroly se zakládá ještě jedno opakování pro měření pH a aktuální vlhkosti na konci testu.

Aplikace testované látky a rozdělení AP do testovacích nádob: 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 testované látky pro aplikaci na AP se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Jeden až tři dny před začátkem testu se připraví zásobní roztok testované látky (= nejvyšší koncentrace) a ředicí řadou se získá 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). Roztokem rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápně AP ve skleničkách a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Aplikace se tedy provádí den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 50 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro roupice 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 přídatkem testované látky se umístí do růstové komory. V den zahájení testu se nádoby převážají a doplní se případný úbytek vody.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	204
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

Připravená AP se rozvažuje po 20 g suché hmotnosti do skleněných testovacích nádob. Půda v testovacích nádobách by neměla být udusaná kvůli volnému pohybu živočichů.

Vlastní postup testu: Po aplikaci látky se vmíchá do půdy potrava – 25 mg mletých ovesných vloček (autoklávovaných) do každé testovací nádoby. Z agaru se vybere do Petriho misek s vodou po 10 jedincích *E. crypticus* s opaskem (tím se opláchnou). Poté se z náhodně vybrané Petriho misky zavede 10 jedinců *E. crypticus* do testovacích nádob. Skleničky se zváží, hmotnost každé nádoby se zapíše. Uzavře se parafilmem, který se proděraví jehlou. Skleničky se uloží v náhodném uspořádání do růstové komory vytemperované na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$, s osvětlením (400 – 800) luxů. Světelný režim se nastaví na 16 : 8 (světlo : tma). Každý týden se zváží všechny testovací nádoby a případný hmotnostní úbytek vody se doplní adekvátním množstvím destilované vody. Do skleniček, kde nejsou patrné zbytky potravy, se nasype každý týden 25 mg mletých ovesných vloček. Případné plesnivějící zbytky vloček se odstraní. Důležité je, aby při krmení byly ovesné vločky důkladně zakryté půdou (zabrání se rozvoji plísně).

Kontrola vlhkosti a krmení: Každý týden se kontroluje vlhkost zvážením nádob. Případný úbytek hmotnosti se doplní destilovanou vodou. Potrava se kontroluje zároveň s úbytkem vody. Pokud jsou ovesné vločky zkonzumované, nasype se 25 mg nových vloček a zahrnou se. Pokud jsou patrné nějaké zbytky, přidá se méně vloček. Jestli je patrná plíseň, odstraní se před krmením a zapíše se, ve které variantě se vyskytovala.

Vyhodnocení testu a počítání juvenilů: Po čtvrtém týdnu se spočítají juvenilové flotační metodou barvením Bengálskou červení. Do každé testovací nádoby s roupicemi se přidá 5 ml etanolu a nadbytek vody tak, aby nad povrchem substrátu vznikla vrstva (2 – 3) cm (cca 50 ml). Pomocí 1ml pipety se odměří do každého opakování 400 μl 1% roztoku Bengálské červeně. Nádoby se uzavřou nepropustným víčkem, 5 s se protřepou. Uzavřené sklenice se nechají přes noc v klidu a počítá se následující den. Obsah skleničky se vylije do misek na počítání jedinců, stěny skleničky se důkladně opláchnou a nechají se v klidu. Za chvíli se pozoruje, zda se zde neobjeví jedinci *E. crypticus* (výrazně červené, asi 3mm „nitky“). Obarvení jedinci se nejlépe počítají pomocí lupy s osvětlením. Počet jedinců *E. crypticus* se zaznamená. Vzniklý odpad testovacího substrátu a roztoku se vylije do nádob k tomu určených. Doba nutná ke spočítání jedinců z jedné nádoby se pohybuje okolo 35 min. Z předem určené kontroly (bez organismů, bez testovací látky)

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	205
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

se změří pH a aktuální vlhkost umělé půdy.

7. Vyhodnocení dat

Kritéria validity testu:

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

1. Mortalita jedinců po čtvrtém týdnu by neměla v průměru přesáhnout 20 %.
2. Za předpokladu, že na počátku testu bylo zavedeno 10 dospělých jedinců na jednu nádobu, na konci testu by měl být průměrný počet juvenilů vyšší než 50 jedinců na jednu nádobu.
3. Na konci testu by koeficient variance spočítaný pro reprodukční data neměl převyšovat 50 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x. V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.
2. Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).

Referenční látka: Jednou ročně se roupice testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Touto referenční látkou je kyselina boritá (H₃BO₃).

8. Laboratorní chov roupice *Enchytraeus crypticus*

Příprava chovného substrátu: Jako chovný substrát se používá 17% agar nebo nepřesátý zahradní substrát. Agar se připraví rozpuštěním 17 g agaru v 1000 ml destilované vody. Rozlije se do autoklávovatelných nádob a zautoklávuje. Po zautoklávování se může přímo použít a rozlít v laminárním boxu do Petriho misek nebo nechat vychladnout a uskladnit v lednici při 4 °C. Petriho misky s agarem se nechají v boxu vychladnout a použijí se pro založení nového chovu

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	206
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

nebo se uskladní v lednici při 4 °C. Zahradní substrát se defaunizuje hlubokým zamražením na – 80 °C nebo 3× se nechá zmraznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. V chovném substrátu se změří pH v KCl, WHC (maximální vodní kapacita) a sušina. Pokud je to nutné, před použitím se upraví pH půdy uhličitánem vápenatým na hodnotu (6 ± 0,5). Chovný substrát se ovlhčí na 50 % WHC a důkladně se promíchá míchačkou na půdu. Poté se substrát rozdělí do chovných nádob.

Podmínky chovu: Roupice druhu *Enchytraeus crypticus* se chovají na Petriho miskách s agarem nebo v plastových krabičkách naplněných chovným substrátem nebo přírodní půdou ve vrstvě asi 5 cm. Krabička je uzavřena proděravěným víkem kvůli přístupu vzduchu. Chovné nádoby se uchovávají v termostatu nebo v klimatizované inkubační místnosti při asi 20 °C. Agar se kontroluje při krmení, nesmí být převlhčený (tekutý). Půda v chovných nádobách by měla být vlhká, ale ne mokrá. Vlhkost se kontroluje mnutím substrátu mezi prsty. Pokud ulpí kapičky vody na prstech, není třeba vlhčit. Chov se kontroluje a krmí podle potřeby 2 × týdně. Krmí se autoklávovanými ovesnými vločkami (kvůli odstranění roztočů) v menších dávkách přímo do substrátu. Pokud se objeví plíseň, odstraní se, v případě agaru se zlikviduje celá miska. Jednou týdně se zahradní substrát opatrně provzdušní.

Pokud jsou podmínky pro chov roupic vyhovující:

1. Roupice nemají tendenci opustit chovný substrát.
2. Jsou viditelná různá vývojová stadia.
3. Roupice se rychle pohybují v substrátu.
4. Roupice jsou více nebo méně bíle zbarveny.

Nový chov: S kulturami roupic na agaru se pracuje v laminárním boxu. Nástroje pro krmení a manipulaci s roupicemi se před každým použitím ožehnou nad plamenem a teprve pak se použijí. Víčko se také před uzavřením vždy ožehne. Přibližně jednou za 3 až 4 měsíce se přesadí roupice *Enchytraeus crypticus* na nový agar. Starý agar je po této době nahnědlý a značně rozměkklý. Z původního agaru se sterilní pinzetou nebo háčkem odeberou roupice a přenesou se na nový agar. Do nového chovu se vybírají převážně dospělí jedinci (roupice s vyvinutým opaskem s vajíčky). Roupice ve starších agarech mají tendenci opouštět misku s agarem a shlukovat se na víčku. Tito

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	207
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31290.1 Test vlivu chemikálií na roupici <i>Enchytraeus crypticus</i>	Revize	0

jedinci se mohou vrátit do původního chovného agaru opatrným odstraněním z víčka nebo se s nimi může založit nový chov na agaru. Pokud je agar příliš starý (nahnědlý a značně rozměklý), chov na agaru se zlikviduje zalitím lihem a vyhozením do komunálního odpadu.

Literatura

1. ISO 16387 (2002). Soil quality – Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determination of effects on reproduction. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Šimek, M. (2003). Fyzikální vlastnosti půdy. *Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky půdy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – Biologická fakulta, České Budějovice, ISBN 80-7040-629-1.
3. OECD 220 (2004). Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	208
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

TEST Vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka *FOLSOMIA CANDIDA*

1. Rozsah použití

Metoda je určena k hodnocení potenciálního vlivu agrochemikálií (např. hnojiva, přípravky na ochranu rostlin) na mortalitu dospělců a schopnost reprodukce jedinců chvostoskoka *Folsomia candida* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Jedince ze synchronizované kultury lze použít pro testování většiny látek, které nemají silně volatilní povahu.

2. Princip

Test probíhá minimálně při 6 koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která se nachází uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 32 dní a na jeho konci se vyhodnotí mortalita dospělců a vliv na reprodukci.

3. Přístroje a pomůcky

1. Testovací skleněné nádoby (150 – 200) ml.
2. Síto o jmenovité délce ok 2 mm.
3. Nádobka na míchání umělého půdy.
4. Míchačka na umělého půdy.
5. Růstová komora vytemperovaná na 20 °C, osvět (400 – 800) lux.
6. pH metr.
7. Předvážky, přesnost 0,01 g, váhivost do 200 g.
8. Dokumentační systém.
9. Mrazák –20 °C.
10. Lux-metr.
11. Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
12. Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	209
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

13. Exhaustor.

14. Parafilm.

15. Plastové kulaté krabičky s pevně uzavíratelnými víky o průměru asi 10 cm.

4. Chemikálie

- Artificiální půda ("tmavá" spodní rašelina – velikost částic 2 mm ± 1 mm, křemenný písek – > 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO₃ pro úpravu pH).
- Pálená sádra.
- Aktivní uhlí.
- Zásobní roztok testované látky (testovaná půda).
- Destilovaná voda na ovlhčení.
- Černý inkoust.
- Chlorid draselný, KCl, roztok, c(KCl) = 1 mol/l.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

- Denaturovaný líh, 4 : 1 (denaturovaný líh : destilovaná voda), v/v.
- Sušené rozdrčené kvasnice.

5. Testovaný organismus

- Zásobní kultura chvostoskoků *Folsomia candida*.

6. Pracovní postup

Příprava artificiální půdy (AP): Artificiální půda se skládá z křemenného písku (velikost zrněk 0,05 mm – 0,2 mm), kaolínu (např. Sigma), přesáté rašeliny (velikost částic 2 mm ± 1 mm) a CaCO₃, který slouží k úpravě pH artificiální půdy na 6 ± 0,5. Přesátá rašelina (pro testování s roupicemi se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na –80 °C nebo 3× nechá zmraznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v poměru (69 : 20 : 10). Artificiální půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitánem vápenatým

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	210
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

na hodnotu $6 \pm 0,5$. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. pH se měří na začátku i konci testu v suspenzi půdy a KCl ($c = 1 \text{ mol/l}$) v poměru 1 : 5 (půda : KCl). V AP se změří také WHC (maximální vodní kapacita) a sušina. Pokud není známa maximální vodní kapacita dané umělé půdy, musí se před testem zjistit (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180.1).

Synchronizace: Do testu je potřeba nasadit stejně staré jedince, a proto se provádí synchronizace. Na nový vlhčený substrát (sádra s aktivním uhlím v poměru 8 : 1) se přemístí dospělí jedinci (nejméně 300 dospělých jedinců = založení synchronizace), dospělci se nekrmí. Po 1 dni se dospělí jedinci odstraní. Po odstranění dospělců zůstávají v kultivační nádobě jen vajíčka. Asi 13 dnů po založení synchronizace se líhnou první juvenilové. Zaznamená se den vylíhnutí (objevení) prvních juvenilů. Pokus se zakládá 12 dní po objevení prvních juvenilů (stáří se pohybuje v rozmezí 10 až 12 dnů). Synchronizovaní jedinci se umístí do testovacích nádob s půdou (= start testu).

Experimentální uspořádání:

Předběžný test: Zvolí se v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Test trvá 14 dní. Na konci testu se vyhodnocuje mortalita jedinců. Výsledky testu jsou důležité pro navržení experimentálního uspořádání definitivního testu.

Definitivní test: Slouží ke zjištění mortality dospělých jedinců a vlivu na reprodukci. Test trvá 4 týdny. Na konci testu se hodnotí mortalita a vliv 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 efekt) přístup se použije alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC_x (Effect concentration – účinná koncentrace při které se projeví účinek u x % sledované populace) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol.
3. Pro smíšený přístup se použije 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 4 opakováních + 5 kontrol.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	211
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

Limitní test: Pro případ rychlého zhodnocení testované látky lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v 5 opakováních.

Spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu. Na každé opakování je třeba 30 g suché AP. Dále je potřeba přičíst minimálně 2×20 g suché půdy na kontrolu pH a aktuální vlhkosti. Od každé koncentrace a kontroly se zakládá ještě jedno opakování pro měření pH a aktuální vlhkosti na konci testu.

Aplikace testované látky a rozdělení AP do testovacích nádob: 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 testované látky pro aplikaci na AP se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se kalkuluje, dle doporučení zahraničních expertů, s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testované chemikálie. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy $1,5 \text{ g/cm}^3$.

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

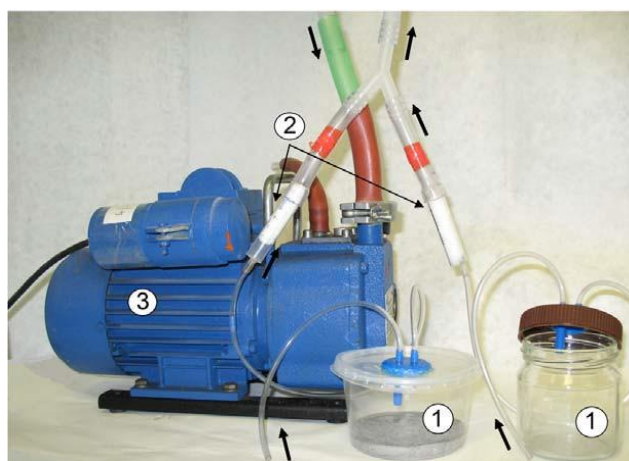
1. Ve vodě rozpustné látky se rozpustí v destilované vodě. Množství roztoku se spočítá tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace a výsledné vlhkosti půdy (dovlhčení na 50 % WHC).
2. Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, se použije těkavé rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Roztokem rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápně AP ve skleničkách a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Aplikace se tedy provádí den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 50 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro chvostoskoky 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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	212
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

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 do začátku testu. V den zahájení testu se nádoby převážívají a doplní se případný úbytek vody. Připravená AP se rozvažuje po 30 g suché hmotnosti do skleněných testovacích nádob. Půda v testovacích nádobách by neměla být udusaná kvůli volnému pohybu živočichů.

Vlastní postup testu: Dvanáctý den po objevení juvenilů v synchronizaci se 10 jedinců přemístí pomocí exhaustoru (viz obrázek 1) do skleničky s ovlhčenou půdou. Do středu skleničky se přidá špetka (asi 2 mg) sušených rozdrcených kvasnic a zakápně se vodou. Nádobky se označí lihovým fixem, zváží se a zapisuje se hmotnost kvůli úbytku vody. Testovací nádoby se váží bez parafilmu. Nádobka se uzavře parafilmem (nebo potravinářskou fólií a gumičkou) a proděraví se kvůli výměně plynů. Skleničky se uloží v náhodném uspořádání do růstové komory vytemperované na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$, s osvětlením (400 – 800) luxů. Světelný režim se nastaví na 16 : 8 (světlo : tma). Potrava se dodává do testu stejně jako v chovech v podobě sušeného pekařského droždí. Špetka (asi 2 mg) kvasnic se přidává do skleniček s chvostoskoky na začátku a v půlce trvání testu (po 14 dnech). Nejprve se přidá špetka kvasnic a pak teprve se doplní úbytek vody, kterým se také ovlhčí kvasnice. Provětrává se každý týden při dovhlčování. Testovací nádoby se opět umístí v náhodném uspořádání zpět do růstové komory.



- 1 exhaustor
- 2 filtry
- 3 vývěva
- proudění odsávaného vzduchu

Obrázek 1. Exhaustor.

Kontrola vlhkosti: Úbytek vody se sleduje vážením nádob při založení a následně každý týden.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	213
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

Pokud by byl zaznamenán úbytek vody, doplní se.

Vyhodnocení testu, počítání dospělců a juvenilů: Test se vyhodnocuje 32 dnů po založení testu. Vyhodnocuje se mortalita dospělců a vliv na reprodukci prostřednictvím počtu nově vylíhnutých juvenilů. K tomuto účelu se používá flotační metoda. Obsah testovací nádoby se vysype do počítací nádoby, testovací nádoba se důkladně vypláchne destilovanou vodou a přidá se asi 20 kapek (800 ml) černého inkoustu do počítací nádoby. Jemným štětečkem se míchá obsah nádoby, aby se dostali všichni juvenilové i dospělí jedince na hladinu. Štěteček se důkladně opláchne, aby na něm nezůstali žádní chvostoskoci. Poté se doplní do nádoby voda, aby byla cca 2 cm pod okraj. Nejdříve se spočítají dospělci, poté se vloží umělohmotná rozdělovací mřížka pro počítání juvenilů. Pomocí dokumentačního zařízení se pořídí snímek misky s chvostoskoky. Jedinci se počítají z pořízené fotografie.

V předem určené kontrole bez organismů se změří pH a aktuální vlhkost artificiální půdy.

7. Vyhodnocení dat

Kritéria validity testu:

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

1. Mortalita dospělců by neměla přesáhnout 20 %.
2. Počet juvenilů při vyhodnocení testu musí být vyšší než 100 na 1 opakování.
3. Na konci testu by neměl koeficient variance spočítaný pro reprodukční data v kontrole převyšovat 30 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x. V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	214
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31300.1 Test vlivu chemikálií na reprodukci a mortalitu chvostoskoka <i>Folsomia candida</i>	Revize	0

Poznámky

1. Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.
2. Pro hodnocení dat je vhodné použít software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).

Referenční látka: Jednou ročně se chvostoskoci testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Jako referenční látku je možné použít kyselinu boritou, EC₅₀ se udává v rozmezí (147 – 503) mg/kg sušiny.

8. Laboratorní chov chvostoskoka *Folsomia candida*

Příprava chovného substrátu: *Folsomia candida* se chová v plastových krabičkách o velikosti asi 10 cm. Chovný substrát tvoří směs sádry a aktivního uhlí v poměru (8 : 1) až (10 : 1). Chovný substrát ve formě prášku se ovlhčí destilovanou vodou až do úplné saturace (např. 240 g sádry, 30 g aktivního uhlí a 200 ml vody). Poté se opatrně přelije do chovné nádoby (asi po 60 g). Směs by měla tvořit asi 1cm vrstvu na dně. Chovný substrát je nutné udržovat dostatečně vlhký. Ovlhčuje se Pasteurovou pipetou a destilovanou vodou. Voda se přikapává, dokud se rychle vsakuje. Povrch substrátu by se neměl lesknout. Chovné nádoby musejí být pevně uzavřeny víkem.

Podmínky chovu: Chovné nádoby s chvostoskoky se uchovávají ve tmě v termostatu při asi 20 °C. Chovný substrát se vyměňuje jednou za 6 týdnů. Chov je nutné kvůli pevně uzavřeným nádobám větrat minimálně dvakrát týdně. Chov se krmí (2 – 3) × týdně malým množstvím sušených rozdrcených kvasnic, které se trochu ovlhčí vodou.

Literatura

1. ISO 11267 (1999). Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil contaminants. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Šimek, M. (2003). Fyzikální vlastnosti půdy. *Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky půdy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích ISBN 80-7040-629-1.
3. OECD 232 (2009). Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	215
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

STANOVENÍ ÚČINKŮ HNOJIV A AGROCHEMIKÁLIÍ NA REPRODUKCI ŽÍŽALY *EISENIA ANDREI*

1. Rozsah použití

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu hnojiv a agrochemikálií na schopnost reprodukce žížaly *Eisenia andrei* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Tento chronický test je použitelný pro půdy a materiály neznámé kvality (např. kontaminované půdy, odpadní materiály). Účinky přípravku se hodnotí za použití definovaného umělého půdního substrátu (artificiální půdy). Tato metoda není určena k testování volatilních látek a nebere v úvahu stálost látky v průběhu testu.

2. Princip

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.

3. Přístroje a pomůcky

1. Skleněné testovací nádoby s perforovanými víčky, (1 – 2) l.
2. Nádoba na míchání artificiální půdy (AP).
3. Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
4. Míchačka na artificiální půdu
5. Síto o jmenovité délce ok 2 mm.
6. Mrazák –20 °C (–80 °C).
7. pH metr.
8. Klimatizovaná místnost či růstová komora vytemperovaná na (20 ± 2) °C.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	216
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

9. 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.

10. Luxmetr.

11. Předvážky, přesnost 1 g, váživost do 5000 g.

12. Předvážky, přesnost 0,01 g, váživost do 200 g.

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

14. Vodní lázeň, (50 – 60) °C.

15. Plastový táč.

16. Počítadlo.

17. Dřevěná špejle nebo mikrobiologická klička.

18. Skleněná tyčinka.

4. Chemikálie

1. Artificiální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic 2 mm ± 1 mm, křemenný písek – více než 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO₃ – úprava pH).

2. Chlorid draselný (KCl), roztok KCl, c = 1 mol/l.

Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí v destilované vodě a doplní na 1000 ml.

3. Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) na ovlhčení.

4. Granulovaný kravský hnůj.

5. Testovaný přípravek.

5. Testovaný organismus

1. Zásobní kultura žížal *Eisenia andrei*.

6. Pracovní postup

Příprava artificiální půdy (AP): Artificiální půda se skládá z křemenného písku, kaolínu, přesáté rašeliny a CaCO₃, který slouží k úpravě pH artificiální půdy na 6 ± 0,5. Pro test se žížalami

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	217
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

používáme světlou rašelinu. Přesátá rašelina se defaunizuje hlubokým zamražením na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo se nechá $3 \times$ zmrznout 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. Artificiální půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se její 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).

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 žížaly, 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_x (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.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	218
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

Dále je potřeba přičíst minimálně 2×20 g suché půdy na kontrolu pH a aktuální vlhkosti.

Aplikace testované látky a rozdělení AP do testovacích nádob: 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 $1,5 \text{ g/cm}^3$.

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 ve vodě (3). 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 přídatkem testované látky se umístí do místnosti (růstové komory) vytemperované na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ do začátku testu. V den zahájení

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	219
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

testu se nádoby převáží 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.

Vlastní postup testu: Do každé testovací nádoby je na povrch půdy aplikováno 10 žížal. 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. Doporučovaná hmotnost na jednu žížalu je (250 – 600) mg. Doporučuje se žížaly před vlastním testem aklimatizovat 1 až 7 dní v umělé půdě s přísadkou ovlhčeného granulovaného kravského hnoje.

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

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 vodou (3) a nechat asi hodinu odstát. Na ovlhčení 5 g suchého hnoje připadá 6 ml vody (3). Na začátku testu se aplikuje 11 g vlhkého hnoje na testovací nádobu. Hnůj se pomocí skleněné tyčinky opatrně zahrabe asi 1 cm pod povrch testovací matrice.

Po aplikaci žížal a potravy do testovacích nádob se nádoby uzavřou a zvaží.

Kontrola vlhkosti a krmení: Každý týden se kontroluje vlhkost zvažením nádob. Případný úbytek hmotnosti se doplní vodou (3). Na povrch půdy se nejprve rovnoměrně nakape množství chybějící vody, až poté se pod povrch půdy aplikuje potrava (11 g vlhkého hnoje na opakování). Naposledy se potrava do testovacích nádob přidává 28. den inkubace po vyjmutí dospělých žížal. Současně s doplňováním vody a krmením dochází k provětrání testovacích nádob.

Vyhodnocení testu a počítání juvenilů: Po 28 dnech inkubace se vyhodnotí mortalita dospělých

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	220
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

žížal. Testovací nádoby se převážejí kvůli doplnění úbytku vody. Obsah testovací nádoby se opatrně vysype na plastový táč. Dospělé žížaly se opatrně vyberou z půdy a spočítají se, umyjí se v kohoutkové vodě, osuší a následně zvážejí. 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, převážejí a ponechají se inkubovat dalších 28 dní. Každý týden se kontroluje vlhkost a větrá se, 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 je pro extrakci žížal z půdy doporučena tepelná extrakce. Tepelnou extrakci je možné provádět ponořením testovací nádoby do vodní lázně o teplotě (50 – 60) °C. Po přibližně (20 – 30) min 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 odebranými žížalami a případné nalezené žížaly započítat.

Po vyhodnocení testu je nutné všechny žížaly vystavené testované látce usmrtit. Žížaly se usmrtí zmražením při –20 °C (–80 °C).

7. Vyhodnocení dat

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 neměl převyšovat 30 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	221
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

Statistické vyhodnocení: Pomocí statistické analýzy dat se vypočítají ekotoxikologické parametry NOEC, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x. V případě limitního testu se provede statistické srovnání testované látky s kontrolou.

Poznámky

1. Statistické vyhodnocení se řídí interním materiálem NRL-OdMB pro hodnocení ekotoxikologických dat.
2. Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf, Německo).

Referenční látka: Jednou ročně se žížaly testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Doporučenou referenční látkou je kyselina boritá (H₃BO₃). EC₅₀ (reprodukce) kyseliny borité by se měla pohybovat přibližně v rozmezí 200 mg a 600 mg H₃BO₃ na kilogram suché půdy.

8. Laboratorní chov žížaly *Eisenia andrei*

Příprava chovného substrátu: Chovný substrát tvoří směs hnoje, zahradního substrátu a rašeliny v poměru 40 : 50 : 10. Zahradní substrát a rašelina se defaunizují hlubokým zamražením na – 80 °C nebo se nechají 3× zmrznout při –20 °C a při laboratorní teplotě se nechají opakovaně rozmraznout. Chovný substrát je stabilně ovlhčen na (60 – 80) % WHC. Dostatečnou vlhkost substrátu je možné jednoduše zjistit tak, že pokud se připravený substrát zmáčkne, měly by se mezi prsty sevřené ruky objevit kapičky vody. pH substrátu by se mělo pohybovat v rozmezí 6 až 7 a upravuje se přidávkou uhličitanu vápenatého.

Podmínky chovu: Chovný substrát se umístí do neprůhledných plastových nádob (objem 10 l až 50 l) společně se žížalami a zakryje se filtračním papírem nebo prodyšným víkem. Vrstva chovného substrátu by měla mít výšku asi 20 cm. Optimální teplota pro chov je (20 ± 2) °C. Každý týden se substrát provzdušní, ovlhčí a na povrch se nanese krmná směs kravského hnoje či kukuřičného šrotu. Vždy po asi 3 měsících je nutné přemístit žížaly do nového substrátu. Vyčerpání substrátu je indikováno tím, že se žížaly pohybují velmi pomalu a mají žlutý zadní konec. V tomto případě se doporučuje přesun na čerstvý substrát a snížení počtu žížal na nádobu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	222
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	31320.1 Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

Pokud jsou podmínky pro chov žížal vyhovující:

1. Žížaly nemají tendenci opustit chovný substrát.
2. Jsou viditelná různá vývojová stadia.
3. Žížaly se rychle pohybují v celém objemu substrátu.
4. Žížaly se neshlukují.

Synchronizace chovu: Chov se synchronizuje odebráním dostatečného množství kokonů (jeden kokon obsahuje 2 až 5 žížal) a jejich umístěním do nového chovného substrátu. Synchronizaci je možné provádět také přemístěním dospělých jedinců s vyvinutými opasky do nového substrátu, kde jsou ponechány přibližně 14 až 28 dní a následně se přemístí do jiné nádoby. V původní nádobě pak zůstanou pouze kokony, ze kterých se získá synchronizovaná kultura.

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 Organization for Standardization, Geneva.
2. OECD 222 (2016). Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	223
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

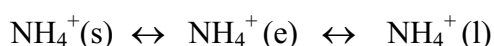
DODATKY

POZNÁMKY KE STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU

Všeobecně o dusíku v půdách

Odhlédne-li se od N_2 , N_2O a NO_x v plynné fázi, je půdní dusík v ornicích z (95 – 98) % přítomen v organické vazbě, a to v huminových látkách, rostlinných zbytcích, biomase a odumřelých organismech. Obsah organicky vázaného dusíku v minerálních půdách je v úzké korelaci s organickým uhlíkem a kolísá v mezích (0,02 – 0,4) %. V organických půdách (rašelinné zeminy, hrabanka, popř. humusový horizont lesních půd) může dosáhnout i 3 % v sušině. Předpokládá se, že ve většině orníc je (30 – 70) % organického dusíku vázáno v aminokyselinách a aminocukrech, zabudovaných do molekul huminových látek a (1 – 7) % připadá na báze nukleových kyselin.

Z normálních kulturních půd ($pH > 5$) přijímají vyšší rostliny anorganicky vázaný dusík převážně ve formě lehce rozpustných a též snadno vyplavitelných dusičnanů (NO_3^-) a jen v malé míře jako rozpuštěné, popř. výměnné ionty NH_4^+ . Ionty NH_4 jsou též fixovány v mezivrstevních prostorech třívrstevných jílových minerálů (vermiculity, illity, smektity, ale též strukturně příbuzné slidy), přičemž mezi fixovanou (s), výměnnou (e) a rozpuštěnou (l) formou existuje rovnováha:



Rychlost uvolňování fixovaného NH_4^+ závisí na obsazované poloze ve struktuře příslušného minerálu; z některých poloh se neuvolní. Na rozdíl od NO_3^- množství NH_4^+ v půdním profilu v podstatě koreluje s obsahem minerálních koloidů, i když se mění s hloubkou a během roku. Ve spodních horizontech s minimálním obsahem organických sloučenin může fixovaný NH_4^+ představovat až 25 % celkového N, v případě parahnědozemí s vysokým obsahem zejména illitických minerálů (29 – 66) %.

Organické a anorganické sloučeniny dusíku v půdě podléhají neustálým změnám, vytvářejícím koloběh mobilizace (mineralizace) a imobilizace (syntézy) s řadou mezistupňů a to hlavně

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	224
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

činností půdních mikroorganismů. Půdní cyklus dusíku není vůči okolí uzavřen, má vstupy i výstupy a to anorganických i organických forem. Změny probíhají i v odebraných vzorcích zemin během skladování a sušení, přičemž pro analytika je při analýze anorganických forem dusíku důležitá zejména nitrifikace (mineralizace organického dusíku $\text{N} \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$). V zájmu zachování stavu anorganických forem dusíku v okamžiku odběru musí být vzorek zpracován a analyzován při dodržení zvláštních opatření (rychlý transport do laboratoře, chlazení, konzervace atd.). Podrobněji o koloběhu dusíku v půdách a přílehlých geosférách v citované literatuře.

Principy a metody stanovení celkového N v zeminách

Pro stanovení všech forem dusíku jedním procesem bez předchozí separace nebo frakcionace připadají v úvahu dvě principiálně odlišné metody. Starší metoda podle Dumase oxidací za sucha s klasickým gazometrickým stanovením vzniklého N je v současné době již plně automatizovaná a hojně využívána.

V praxi se prosadily četné modifikace Kjeldahlovy metody mineralizace za mokra koncentrovanou kyselinou sírovou s různými přísadami. Při ní se organické sloučeniny dusíku oxidují na NH_4^+ (CO_2 , H_2O), který se pak spolu s NH_4^+ přítomným již ve vzorku vydestiluje z alkalického prostředí jako NH_3 do určitého objemu odměrného roztoku kyseliny sírové nebo do dostatečného přebytku roztoku kyseliny borité. Zde se pak stanoví neutralizační titrací, a to v případě destilace do odměrného roztoku kyseliny titrací jejího nespotřebovaného nadbytku odměrným roztokem zásady, v případě destilace do roztoku H_3BO_3 přímou titrací odměrným roztokem kyseliny. NH_4^+ lze rovněž stanovit iontově selektivní elektrodou. Při mineralizaci se ke vzorku přidávají jednak soli ke zvýšení bodu varu mineralizátu, jednak katalyzátory k urychlení oxidace.

Stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla – obecné poznámky Volba vhodné varianty mineralizace

Kjeldahlovu rozkladu tvrdošijně vzdorují dusíkaté heterocyklické sloučeniny, látky s vazbami N–N N–O (např. azolátky, nitroso- a nitro- sloučeniny, di- a tri- aziny) a dále dusitany a dusičnany, které vytěkají. Uvedené organické látky jsou v půdách přítomny pouze v mizivých

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	225
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

množstvích a zanedbání jejich úplného rozkladu se na výsledku prakticky neprojeví. Do jisté míry to platí i o dusitanech, které představují pouze meziprodukt při nitrifikaci. Obsah dusičnanů je většinou velmi nízký v období vegetačního klidu po sklizni až do předjaří. V období zvýšené nitrifikace organických látek a NH_4^+ nebo brzy po hnojení hnojiv s obsahem dusičnanů a konečně i v zahradních půdách však již při běžném rozkladu dochází ke znatelným ztrátám způsobujícím, že výsledky stanovení celkového dusíku jsou statisticky významně nižší než skutečné hodnoty přesto, že jistý podíl NO_3^- se při normálním Kjeldahlově rozkladu redukuje látkami přítomnými v zemině.

Jako předběžná operace, která během kyselé mineralizace zabrání vytěkání dusičnanů, se nejčastěji používá přídavek fenolu nebo kyseliny salicylové (obecně aromatické CO– látky) do kyseliny sírové. Při tom se NO_3^- váže nitrací jádra (přednostně do p- polohy) a NO_2^- skupina se v druhém kroku redukuje nascentním vodíkem (přídavkem Zn, Jodlbauer) nebo thiosíranem (Förster) na NH_2- skupinu, která již je mineralizovatelná. Jinou možností je způsob podle Bremnera a Shawa, při kterém se nejprve v kyselém prostředí zoxiduje NO_2^- na NO_3^- manganistanem a NO_3^- se následně redukuje nascentním vodíkem (práškovým železem) na NH_4^+ .

Fixovaný NH_4^+ se jednoduchou mineralizací podle Kjeldahla stanoví tehdy, pokud jeho množství nepřekročí 25 % celkového obsahu dusíku, což platí pro všechny vzorky z humusového a pro většinu vzorků ze spodních horizontů. V případě parahnědozemí je však podíl fixovaného NH_4^+ vyšší (až 66 %) a ke stanovení celkového dusíku se musí zvolit rozklad, který je schopný rozrušit silikátovou krystalovou mřížku jílových materiálů. Proto se tyto vzorky obvykle před vlastní mineralizací zpracovávají směsí $\text{HCl} + \text{HF}$, aby se uvolněný NH_4^+ zahrnul do celkového dusíku.

Obecné pokyny pro mineralizaci podle Kjeldahla

K rozboru se běžné používá zhomogenizovaná jemnozeme I (< 2 mm) v rovnovážném stavu se vzdušnou vlhkostí. K zajištění vyhovující opakovatelnosti a reprodukovatelnosti u obsahů dusíku do 0,5 % má být vzorek upraven na maximální velikost zrna 0,5 mm, v rozsahu

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	226
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

(0,5 – 1,0) % dusíku na 0,25 mm a nad 1 % dusíku na 0,15 mm. S přechodem na menší navážky při semimikrometodách se pro obsahy dusíku do 1 % musí vzorek upravit alespoň na 0,15 mm, pro vyšší obsahy na 0,10 mm. Optimální množství celkového N v navážce při makrometodě je asi (10 – 20) mg, při semimikrometodě asi 1 mg.

K analýze se mohou navažovat i přirozeně vlhké vzorky, zejména hrozí-li ztráty dusíku během sušení, např. únikem NH_3 . K tomu jsou náchylné vzorky z půd hnojených krátce před odběrem statkovými hnojivy nebo minerálními hnojivy s obsahem NH_4^+ . Kvůli obtížné homogenizovatelnosti takovýchto vzorků se však i při vyšších navážkách zhoršuje opakovatelnost a reprodukovatelnost výsledků.

Nejdůležitější podmínkou úplnosti rozkladu v přiměřeném čase je teplota při zahřívání s H_2SO_4 , závislá především na množství přítomných solí. Zvýšení bodu varu lze dosáhnout přidavkem K_2SO_4 nebo Na_2SO_4 , přičemž sodná sůl je méně výhodná mj. nižší rozpustností a zvýšeným vystřikováním v průběhu rozkladu. Optimální množství síranu draselného je (0,6 – 0,7) g na 1 ml H_2SO_4 . Vyšší dávky sice zvyšují teplotu a zkracují proces, takže často není nutný přídavek katalyzátoru, ale způsobují ztuhnutí mineralizátu po vychladnutí. V semimikroprovedení se dávka K_2SO_4 snižuje na (0,2 – 0,3) g na 1 ml H_2SO_4 , čímž se ovšem prodlužuje doba rozkladu. Při překročení teploty asi 400 °C (> 1,3 g K_2SO_4 na 1 ml H_2SO_4) již dochází ke znatelným ztrátám dusíku a ke zkrácení mineralizace je tedy výhodnější použít katalyzátor. V případě síranu sodného se kvůli nižší rozpustnosti používají dávky (0,2 – 0,4) g na 1 ml H_2SO_4 a přesto je mineralizát po vychladnutí často ztuhlý.

Nejúčinnější katalyzátor oxidace – kovová rtuť nebo její sloučeniny – se v současnosti s ohledem na životní prostředí již běžně nepoužívá, i když nezpůsobuje ztráty dusíku. U vzorků zemin je nejrozšířenější použití směsi práškového selenu a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v různém vzájemném poměru. Např. původní Wieningerova směs obsahuje vedle K_2SO_4 1,5 % CuSO_4 (bezv.) a 2,0 % Se, v ÚKZÚZ je obvyklý poměr $(\text{Se} : \text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}) = (1 : 10)$.

Selen umožňuje relativně rychlé odbarvení resp. vyjasnění a vyčiření mineralizátu, avšak bez záruky úplného rozkladu všech sloučenin dusíku v tomto okamžiku. V zahřívání se proto musí ještě nějakou dobu pokračovat. Selen způsobuje ztráty dusíku pouze ve větším množství.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	227
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

Mohou však vzniknout při delším zahřívání, zejména zahřívá-li se stěna mineralizační baňky nad hladinou kyseliny.

Často se používají katalyzátory bez rtuti a selenu, např. směs Missouri (K_2SO_4 s 0,3 % bezv. $CuSO_4$) nebo katalyzátor s TiO_2 v anatasové modifikaci (K_2SO_4 s 2,8 % TiO_2 a 1,8 % bezv. $CuSO_4$) popř. ZrO_2 . Doba mineralizace s TiO_2 se prodlužuje až dvojnásobně a se směsí Missouri někdy až trojnásobně oproti použití směsi Se + $CuSO_4$.

Dávkování usnadňují komerčně vyráběné tablety (např. Merck – Kjeltab) různého složení o standardní hmotnosti 5 g. Nevýhodou je obecně odchylné složení, vhodné spíše pro biologické materiály a poměrně vysoká cena.

Kyselina sírová musí být prostá sloučenin dusíku a má mít hustotu $\rho = (1,830 - 1,840)$ g/cm³. Orientačně lze odhadnout spotřebu kyseliny sírové na rozklad, resp. oxidaci vždy 1 g jednotlivých složek v zemině takto: C 10,0 ml, organické látky průměrně 5,8 ml, Al_2O_3 1,63 ml, Fe_2O_3 1,04 ml, $CaCO_3$ 0,55 ml, jíl 0,6 ml. Kyselina se rovněž spotřebuje na přeměnu síranu draselného nebo sodného na hydrogensíran, a to asi 3 ml na 10 g K_2SO_4 . V závislosti na konkrétních podmínkách mineralizace, jako je např. objem baňky nebo teplota a intenzita odsávání dochází též ke ztrátám kyseliny odpařováním a konečně je třeba zajistit její optimální přebytek na konci rozkladu kvůli dosažení žádoucí teploty. Nižší výsledek může být způsoben jak velkým nadbytkem, tak nedostatkem kyseliny. Optimální dávky kyseliny vzhledem k doporučeným navážkám vzorků jsou uvedeny u jednotlivých pracovních postupů. Při použití větších navážek se dávky kyseliny musejí přiměřeně zvýšit.

K rozkladu v makroměřítku se obvykle používají rozkladné tuby a mineralizační bloky.

Zahřívání

Počáteční fáze zahřívání při Kjeldahlově mineralizaci je zpravidla spojená se silným pěněním mineralizátu (únik oxidu uhličitého a vody), který může i přetéci z hrdla baňky. Proto se zpočátku musí zahřívát velmi opatrně nebo dokonce zahřívání přerušit. Tvorbu pěny poněkud omezují odpeňovače, např. parafín nebo látky snižující povrchové napětí (oktanol), které nesmějí obsahovat dusík. Aby tato fáze proběhla beze ztrát, napomáhá též volba vhodného objemu

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	228
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

baňky, např. při navážkách 5 g nebo při vysokém obsahu humusu 1 g zeminy do 500ml baňky, i když dochází k poněkud většímu odpařování kyseliny. V počátečních fázích mineralizace je vhodné podle možnosti baňkou občas míchat. Doporučuje se rovněž, aby baňky při zahřívání byly v šikmé poloze, asi $(30 - 45)^\circ$ od svislice. Po uklidnění se má zahřívání řídit tak, aby kyselina kondenzovala asi ve dvou třetinách délky hrdla, čímž se zároveň při občasném pootočení baňky podle osy splachují zbytky vzorku do baňky.

Při zahřívání stěny baňky, která není ve styku s mineralizátem, může dojít ke zřetelným ztrátám dusíku. Lze tomu zabránit např. azbestovou deskou s otvorem poněkud menším, než je průměr hladiny kapaliny v baňce. U vzorků zemin zpravidla nikdy nedojde k úplnému vyčištění mineralizátu (nerozpuštěný zbytek, písek). Odbarvení, resp. ustálení světlého zbarvení mineralizátu nemusí znamenat konec mineralizace, zejména při použití selenu. Zahřívání se proto musí prodloužit asi o $(30 - 45)$ min.

Mineralizační zařízení jakékoliv konstrukce s plynovým nebo elektrickým topením musí zajistit teplotu mineralizátu alespoň 360°C a zároveň zabránit překročení teploty 400°C , při které již dochází ke ztrátám dusíku. Naopak, zejména při chladnutí mineralizátu, může dojít k absorpci plynného NH_3 z laboratorní atmosféry a ovlivnění výsledků.

Destilace amoniaku

Rozmanité aparatury, určené k destilační separaci NH_3 z mineralizátu, jsou v podstatě dvojího druhu: buď umožňují destilaci přímo z mineralizační baňky, nebo vyžadují převedení celého objemu popř. alikvotní části kyselého roztoku do destilační nádoby.

NH_3 se může predestilovat buď přímým zahříváním nebo destilací vodní párou. K destilaci NH_3 je přípustný každý přístroj, pokud:

1. zajistí kondenzaci páry při jímání v předloze,
2. zamezí ztrátám NH_3 do ovzduší,
3. zajistí úplné predestilování NH_3 ,
4. účinným lapačem kapek zamezí strhávání kapének alkalického roztoku do destilátu.

K vytěšňování amoniaku se obvykle používá roztok hydroxidu sodného (bez CO_3^{2-}) o hustotě

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	229
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

$\rho = 1,330 \text{ g/cm}^3$ (přibližně 30 %, w/w). Z toho vyplývá, že na každý 1 ml H_2SO_4 zbývajících v mineralizátu resp. obsažený v alikvotním podílu použitém pro destilaci, je nutno přidat nejméně 3,7 ml NaOH (2 ml na každý 1 g kyseliny). Mineralizát se musí před přidáním NaOH zředit vodou, aby se předešlo vyloučení Na_2SO_4 z přesyceného roztoku. Reakční směs se při neutralizaci silně zahřívá, což u některých typů přístrojů může vést ke ztrátám NH_3 , vystřikování alkalické kapaliny popř. k poškození aparatury, a proto se roztok hydroxidu sodného musí přidávat opatrně.

Vlastní destilace probíhá v souladu s provozními podmínkami příslušné aparatury. Úspěch této operace spočívá jednak v úplném predestilování NH_3 , jednak v zamezení přenosu alkalického roztoku do destilátu. Úplnost resp. konec destilace NH_3 se nejlépe zjistí titrací při destilaci (viz níže). Ostatní způsoby, při kterých se sleduje objem destilačního zbytku nebo destilátu, popř. doba destilace, musejí být vždy ověřeny zkoušením vhodného RM (referenčního materiálu) za stejných podmínek. U vzorků zemin při přímé destilaci způsobuje přítomný písek nepravidelný var, který lze nejlépe zklidnit pórovitými varnými kaménky (neobsahujícími NH_3).

Titrace

Destilát lze titrovat při destilaci NH_3 nebo po ní, je-li v předloze roztok kyseliny borité (10 ml – 20 ml, 40 g $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{l}$). Výhodou titrace při destilaci je možnost sledování úplného predestilování NH_3 a při slepém pokusu možnost ověření strhávání alkalických kapének z destilační nádoby.

Starší literatura dává jako správnější přednost destilaci do odměrného roztoku silné kyseliny (H_2SO_4 nebo HCl), avšak novější považuje způsob destilace do roztoku H_3BO_3 za rovnocenný. Jedním z předpokladů této rovnocennosti je, že teplota destilátu v případě H_3BO_3 nepřekročí 25 °C, zatímco při použití destilace do odměrného roztoku silné kyseliny nemusí být chlazení destilátu tak intenzivní. To je výhodné zejména při destilaci vodní párou. Látková koncentrace a objem odměrného roztoku kyseliny v předloze je zpravidla předepsaná v příslušném pracovním postupu.

K indikaci konce titrace lze obecně použít jakýkoliv postup, poskytující při analýzách materiálů

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	230
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

se známým obsahem dusíku správné výsledky, tedy např. potenciometrii. Obvykle se však používá vhodný indikátor. Vedle bromkresolové zeleně, methylčerveně nebo jiných, nejčastěji směsný indikátor podle Tashira, obsahující methylčerveně a methylenovou modř v poměru (2 : 1) s barevným přechodem z červenofialové přes šedou ($\text{pH} = 5,4$) do zelené. Při vizuální indikaci musí mít titrovaný roztok laboratorní teplotu, resp. pod 25°C , protože při vyšší teplotě dochází k posunu barevného přechodu indikátoru s azoskupinou a tím k chybám při titraci. Zejména při semimikrostanovení se rovněž doporučuje směs bromkresolové zeleně a methylčerveně v poměru (3 : 2) s barevným přechodem z vínově červené přes šedou ($\text{pH} = 5,1$) do zelené.

Zkoušky

Slepou zkouškou, která zahrnuje všechny operace postupu, se prověřuje kvalita činidel. Vykonává se bez náhrady zkušebního vzorku organickou látkou neobsahující dusík, nebo lépe s ekvivalentním množstvím např. sacharózy, protože se tím zredukuje nitro- nebo nitrosylové skupiny případně přítomné v činidlech. Získaný výsledek slepé zkoušky se má blížit nule, zhruba v rozpětí jedné kapky příslušného odměrného roztoku. Při větší odchylce (asi do 0,3 ml odměrného roztoku) se tato odečítá od zjištěné spotřeby na vzorek jako korekce. Ještě větší odchylky vyžadují ověření čistoty jednotlivých chemikálií dílčími zkouškami nebo zjištění, zda v aparatuře nedochází ke strhávání alkalických kapének destilátu.

Funkce destilačního přístroje se přezkouší navážkou vhodného množství síranu amonného nebo odměřením jeho roztoku o známé koncentraci do destilační baňky. Po alkalizaci se destiluje. Nízký výsledek může být způsoben netěsností přístroje nebo neúplným predestilováním NH_3 .

Zkouška celého postupu včetně mineralizace se provede opět se známým množstvím síranu amonného. Není-li chyba v destilaci, může být nižší výsledek způsoben ztrátami při předchozích operacích (vystříknutím, vytékáním sloučenin dusíku apod.).

K prověření celého procesu s pozadím vedlejších složek přítomných ve vzorcích je nejvhodnější spolehlivý referenční materiál (RM) zeminy buď certifikovaný nebo alespoň interně ověřený kruhovými testy. Používání čistých organických látek jako RM je pro daný účel málo vhodné. V laboratoři by tedy měly být k dispozici alespoň 3 různé RM zemin, lišící

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	231
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
	Dodatky – Poznámky ke stanovení celkového dusíku	Revize	0

se obsahem humusu (a tedy i N_t), texturou (zrnitostí) a půdním typem (a tedy kvalitou humusu). Jestliže se slepý pokus obecně má provádět nejméně jednou (2 paralelní zkoušky), při přípravě kteréhokoliv nového činidla, kontrolní zkouška s RM má být zařazena do každé série. Při stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou se pracuje s poměrně malými kvanty NH_3 . Každá kontaminace skladovaných vzorků a referenčních materiálů (zemin) plynným čpavkem popř. jeho absorpce do kyselých analytických roztoků může vést ke zkreslení výsledků. Jednou z nutných podmínek správnosti výsledků stanovení celkového dusíku je tedy skladování vzorků a provádění analýz v atmosféře bez NH_3 .

Literatura

1. F. Scheffer, P. Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde, str. 259 ad. F. Enke Verlag. Stuttgart 1992.
2. ČSN 56 0020 Stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla. Obecné pokyny. 1987.
3. G. Hoffmann G. et al.: Methodenbuch, Band I, Die Untersuchung von Böden, kap. 2.2.0. VDLUFA – Verlag. Darmstadt 1991.
4. ČSN 68 4062 Chemické indikátory. Příprava roztoků indikátorů. 1979.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	232
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Dodatky – Použité zkratky	Vydání	4
		Revize	0

POUŽITÉ ZKRATKY

AAS – atomová absorpční spektrofotometrie

AES (FAES) – atomová (plamenová) emisní spektrofotometrie (plamenová fotometrie)

AU – absorbanční jednotka

BR – bazální respirace

DIN – normy SRN

EC_x – účinná koncentrace, při které se objeví x% inhibiční účinek

EDTA (Chelaton III, Komplexon III, Titriplex III) – kyselina etylendiamintetraoctová (většinou její dvojsodná sůl)

EPA – Environmental Protection Agency, agentura pro životní prostředí (USA)

FAAS – plamenová atomová absorpční spektrofotometrie

FIA – analýza v nesegmentovaném toku (flow injection analysis)

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

IC – iontová chromatografie

ICP-AES (ekvivalenty OES-ICP, místo ICP někdy ICAP) – atomová emisní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IR – infračervená spektroskopie

ISE – iontově selektivní elektroda

ISO – International Standard Organization

JPP – jednotné pracovní postupy

LID – nejnižší neúčinné ředění

LOEC – nejnižší koncentrace, při které je pozorován nežádoucí efekt

MPZ ÚKZÚZ – mezilaboratorní porovnávací zkoušky pro analytické laboratoře, které pořádá ÚKZÚZ

NIRS – blízká infračervená spektroskopie

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	233
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III Dodatky – Použité zkratky	Vydání	4
		Revize	0

NMR – nukleárně magnetická rezonance

NOEC – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt, zkušební koncentrace těsně pod LOEC

OM – organická hmota

SFA – analýza v segmentovaném toku (segmented flow analysis)

SIR – substrátem indukovaná respirace

SOM – půdní organická hmota

SNA – krátkodobá nitrifikační aktivita

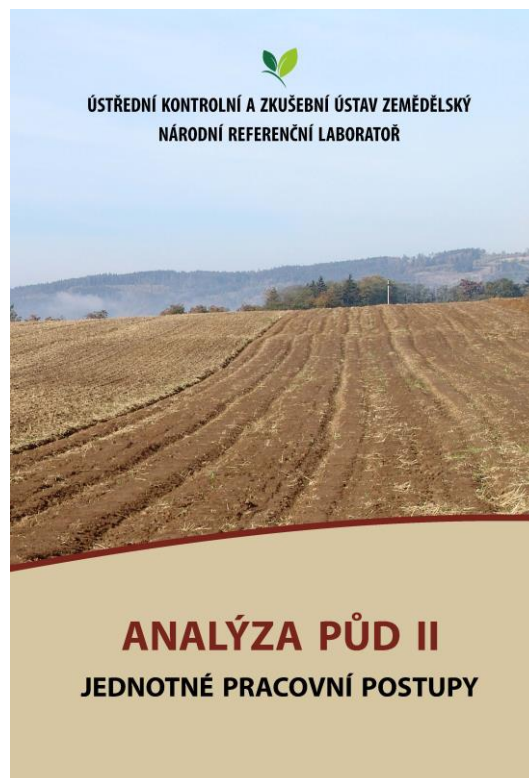
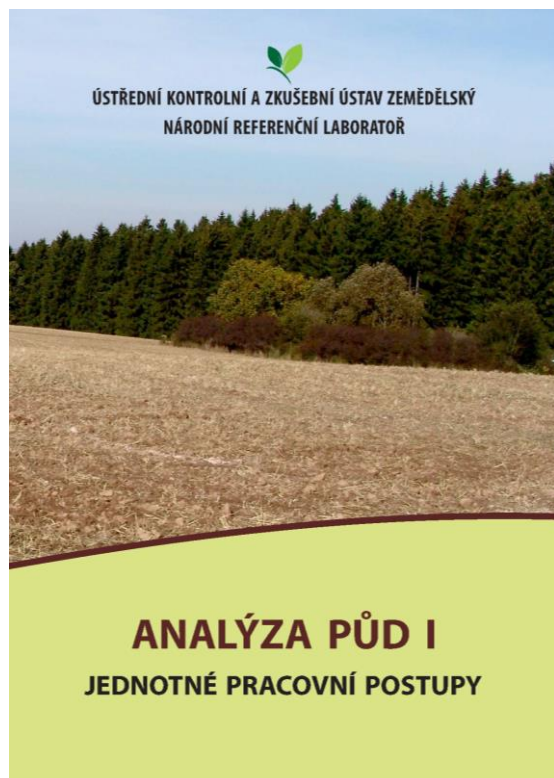
UV-VIS spektrofotometrie – spektrofotometrie ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti spektra

v/w – objemová jednotka vztažená na hmotnostní jednotku (obdobné označení i v jiných kombinacích)

WHC – maximální vodní kapacita

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	234
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
		Revize	0

ÚKZÚZ vydal v letech 2016 a 2019 první a druhý díl příručky Analýza půd



Vydané jednotné pracovní postupy je možno zakoupit v ÚKZÚZ. Objednávat lze e-mailem na adrese
miroslava.berankova@ukzuz.cz

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	235
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III	Vydání	4
		Revize	0

Jednotné pracovní postupy - Analýza půd III

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2022

Odpovědný redaktor: Iva Strížová

Autoři: Jiří Zbíral, Stanislav Malý a kol.

Náklad: 60 výtisků

Počet stran: 235

Tisk: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Hroznová 2

603 00 Brno

Tel. 543 548 111

e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-7401-211-2