

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2005

Ročník IX, číslo 3/ 2005

Brno 2005

Obsah

- | | | |
|----|--|----|
| 1. | Vybrané kapitoly z pedologie pro chemiky | 1 |
| | (Ivo Honsa, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Národní referenční laboratoř, Oddělení speciálních analýz půd Liberec) | |
| 2. | Zjištění vlivu zmražení na vybrané půdně- mikrobiální parametry | 22 |
| | (Stanislav Malý, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie Brno) | |
| 3. | Stanovení obsahu D⁹- tetrahydrocannabinolu (D⁹-THC) v konopí setém | 33 |
| | (Naděžda Kabátová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno) | |

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

Bulletin Národní referenční laboratoře IX 2005/ 3

Ročník: IX, č. 3
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2005
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 130 výtisků
Počet stran: 58
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou

ISSN 1212- 5466

Vybrané kapitoly z pedologie pro chemiky

RNDr. Ivo Honsa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení speciálních analýz půd Liberec,
Vaňurova 6, 460 01 Liberec

1. Zrnitostní složení půdy (textura)

1.1. Úvod

Tuhá fáze zemin je směsí zrn minerálů, úlomků hornin, novotvarů a částic humusu různého tvaru a velikosti. Jako zrnitost, zrnitostní či mechanické složení nebo textura zemin se označuje rozdělení velikostí zrn jako diskrétních izolovaných částic. Ty se však v zeminách vyskytují zřídka a většinou jsou více či méně stmeleny do agregátů. Pojem zrnitosti pak zpravidla znamená rozdělení jednotlivých minerálních zrn, jak se získávají dispergací agregátů konvenčním způsobem co nejdůležitějším rozrušením tmelících látek. Agregáty a organická složka se do zrnitosti nezahrnují.

Zrnitostní složení je nesporně jednou z nejdůležitějších půdních charakteristik, která spolu s dalšími charakteristikami určuje řadu fyzikálních a chemických vlastností, ovlivňuje půdotvorné procesy, filtraci anorganických a organických látek a půdní úrodnost, tedy stanovištní podmínky pro rostliny.

1.2. Tvar a povrch částic

Tvar a velikost zrn jsou dány druhem a velikostí zrn minerálů v matečných horninách, průběhem fyzikálního a chemického zvětrávání a velikostí zrn novotvarů. Případný transport vodou či větrem vede k zaoblování částic a též k jejich diferenciaci. V hrubších – písčítých a prachových frakcích převládají zrna tvaru kulového nebo nepravidelných mnohostěnů, protože jsou z velké části tvořeny neštěpným křemenem s lasturnatým lomem. V jemnějších frakcích stoupá podíl lístkovitých a šupinkovitých částic, tvořených slídamy a jílovými minerály – tedy silikáty s vrstevnatou stavbou krystalové mřížky a zpravidla s dobrou štěpností v jednom směru.

Tvar půdních částic podstatně ovlivňuje jejich vzájemné uspořádání. Tak např. 4 kulové částice mají při těsném uspořádání 6 dotykových bodů, ale 4 lístkové částice se vzájemně dotýkají $\frac{3}{4}$ celkového povrchu. Lístkové částice proto při vhodném uložení způsobují vysokou kohezi. S klesající velikostí zrna se při stejném celkovém objemu rychle zvětšuje počet zrn a jejich povrch, jak vyplývá z tab. 1- 1, odvozené pro kulové částice.

Jak již bylo řečeno, v jemnějších frakcích stoupá podíl lístkovitých částic a některé jílové materiály s roztažitelnou mřížkou mají navíc velký vnitřní povrch, takže skutečný povrch jílové frakce může dosáhnout až $400 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

1.3. Klasifikace zrnitostních frakcí

Elementární půdní částice se třídí do skupin daných určitým rozpětím velikosti, tzv. zrnitostních frakcí nebo kategorií. Klasifikace do kategorií není libovolná, ale frakce o příslušném rozpětí velikosti zrn má mít některé *shodné základní fyzikální nebo fyzikálně chemické vlastnosti*, které má též zastupovat ve směsi s ostatními kategoriemi. Jednotlivé obory zabývající se půdní texturou se v této klasifikaci přirozeně občas liší. V zemědělské pedologii (a v příbuzných oborech) se volí tak, aby vyjadřovala *vztah vlastností jednotlivých frakcí ke stanovištním požadavkům pěstovaných rostlin*.

Ve většině klasifikací je základním dělítkem mezi *skeletem a jemnozemí rozměr 2 mm*, který byl zvolen proto, že v případě kulových částic je horní hranicí kapilárního pohybu vody. Frakce nad 2 mm – *skelet* – již nemá schopnost vodu zadržovat. Jedním z prvních objektivních třídění *jemnozeme* byl Atterbergův systém, založený na předpokladu rovnoměrného zastoupení částic. Jde o sestupnou geometrickou řadu s konstantou $10^{-1/2} = 0,316$ a sled velikostí zrn je tedy : 2 – 0,63 – 0,2 – 0,063 – 0,02 – 0,0063 – 0,002 mm. V logaritmické stupnici hodnota 0,63 dělí interval 2 – 0,2 na dvě geometricky stejné části. Toto třídění se v některých zemích s malými obměnami udrželo dodnes a znovu se uplatňuje v normách ISO. Např. systém třídění v SRN je 2 – 0,063 – 0,002 – 0 mm (s mezihodnotami 0,63 – 0,2; 0,02 – 0,0063; 0,00063 – 0,0002 mm), ve Švýcarsku a v USA 2 – 0,05 – 0,002 – 0 mm. U nás byla původně zavedena klasifikace Kopeckého, zprvu převzatá od Schöneho, pro kterou byl též konstruován dosud ještě občas používaný plavící přístroj. Jemnozeme pod 2 mm se jím roztrídí na 4 kategorie : I. jílnaté částice pod 0,01 mm, II. prach 0,01 – 0,05 mm, III. práškový písek 0,05 – 0,10 mm a IV. písek 0,10 – 2,00 mm. Dosud někdy používané upravené podrobnější třídění a pojmenování zrnitostních frakcí podle Kopeckého je uvedeno v tab. 1- 2. Pro účely komplexního průzkumu zemědělských půd, který probíhal

v letech 1961 až 1971 (KPP), bylo použito třídění podle tab. 1- 3, užívané v zemědělské pedologii jako oficiální dosud.

V systémech třídících jemnozemi na 3 frakce se obvykle nejjemnější nazývá **jíl**, střední **prach** a nejhrubší **písek**. Rozpětí velikosti částic těchto frakcí se poněkud liší podle zemí a oborů použití. Tak např. ČSN 72 1001, určená ovšem pro stavební potažmo geotechnické účely a v současné době postupně nahrazovaná jednotlivými ČSN EN ISO (1.c.), uvádí tato rozpětí: pod 0,005 mm, 0,005 – 0,063 mm a 0,063 – 2 mm. V USA se vedle výše uvedených rozpětí používají též tato : pod 0,005 mm, 0,005 – 0,05 mm a 0,05 – 2 mm. ČSN EN ISO 14688-1, určená opět pro inženýrské účely, předepisuje pro základní frakce tato rozpětí: pod 0,002 mm, 0,002 – 0,063 mm a 0,063 – 2 mm. Mezihodnoty a rozpětí velikostí částic skeletu až nad 630 mm důsledně sledují řadu s konstantou $10^{-1/2}$ popř. $10^{1/2}$. Pro opatření na ochranu půdy, pro sanaci kontaminovaných oblastí a pro pedologické účely obecně se někde již používá ISO 11259.

Částečně již zmiňované mineralogické složení jednotlivých zrnitostních frakcí je výsledkem zvětrávacích, půdotvorných a popř. transportních procesů. Obecně platí, že s klesající velikostí částic se snižuje podíl zbytků hornin, zastoupených hlavně ve skeletu, snižuje se podíl primárních minerálů a naopak vzrůstá podíl minerálů sekundárních. V jemnozemi je ve všech frakcích s výjimkou jílu, díly své odolnosti, silně zastoupen **křemen**. Bývá však přítomen i v jílových frakcích. **Draselné živce** jsou v malé míře zastoupeny ve frakcích menších rozměrů, ve fyzikálním jílu se vyskytují zřídka. Snáze zvětratelné **plagioklasy** (sodno- vápenaté živce), **amfiboly**, **augity** aj. se vyskytují zřídka a v jílové frakci, právě pro svůj rychlejší rozklad, se vůbec nevyskytují. **Slíd** přibývá se zmenšováním rozměru částic, v jílové frakci jsou však nahrazovány **jílovými minerály**.

1.4. Zrnitostní rozbor

1.4.1. Dispergace zemin

Předpokladem správného provedení zrnitostního rozboru je co nejdokonalejší vzájemné oddělení všech jednotlivých částic, aniž by současně došlo k jejich destrukci. Hlavním cílem přípravy vzorků pro tento rozbor tedy je dosáhnout maximální míry oddělení elementárních částic a udržení tohoto stavu po celou dobu trvání rozboru. Za tím účelem je nutné identifikovat faktory, způsobující nebo ovlivňující jednak **agregaci**, t.j. shlukování částic, jednak **dispergaci**, t.j. jejich rozptyl.

Koagulaci koloidů v zeminách způsobují především dvojmocné kationty, prakticky hlavně Ca^{2+} a Mg^{2+} . Jsou-li koloidy nasyceny jednomocnými kationty, zejména Na^+ , může koagulaci způsobit vyšší koncentrace elektrolytů v půdním roztoku. Při dlouhodobém vysušování zkoagulovaných koloidů může být nepříznivě ovlivněna reverzibilita procesu a opětná možnost rozpadu mikroagregátů.

Mikroagregáty a makroagregáty jsou fixovány různými **tmelícími látkami**, k nimž patří zejména **humus**, dále **nehydratované a hydratované oxidy železa a hliníku a uhličitany**. Intenzita stmelovacího procesu se zvyšuje odvodňováním agregátů, které zmenšuje tloušťku vodních filmů obalujících částice a ty jsou pak s klesající vzdáleností více poutány kohezními silami.

Úspěch **dispergace** zeminy, t.j. rozrušení mikro– i makroagregátů, tedy spočívá v co nejúplnějším zrušení vlivu tmelících složek a v udělení opačného směru cementačním procesům. Snahou je rehydratací částic, zejména koloidních, získat pro každou dostatečný vodní film. Pouhým zalitím vzorku zeminy nadbytkem vody by proces rehydratace probíhal příliš pomalu a proto se urychluje vařením, roztíráním, třepáním a mícháním hydrosuspenze. Původně mezinárodně doporučené **preparační metody A a B** (s použitím chemických činidel nebo bez nich) byly většinou nahrazeny preparací vzorku zeminy **varem s roztokem hexametafosforečnanu sodného a uhličitanu sodného** a podle potřeby následným manuálním roztíráním tak, aby nedošlo k destrukci elementárních částic. První činidlo váže koagulující ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} do rozpustných chelátů, přebytek Na^+ iontů pak nahradí ostatní ionty v půdních koloidech, v důsledku silnější elektrické dvojvrstvy způsobí jejich peptizaci a spolu s alkalickou reakcí usnadní rehydrataci půdních částic. Za těchto podmínek je peptizací **organických koloidů (humusu)** potlačen i jejich agregační vliv, takže při obsahu zhruba do 2% v zemině není nutné je zvlášť odstraňovat. K tomu se ještě před vlastní preparací při obsahu do 10% používá oxidace peroxidem vodíku. Jak již bylo uvedeno, **rozpustné soli** (též sádrovec) koagulují minerální částice a ovlivňují tak výsledek. Při obsahu nad 0,05% se ze vzorku zeminy odstraňují promýváním vodou zejména v případě, že se při preparaci nepoužije komplexotvorný hexametafosforečnan sodný. Odstranění **tmelů seskvioxidů** (Fe_2O_3 , Al_2O_3) je diskutabilní problém a řeší se podle účelu zrnitostního rozboru. U běžných zemědělských půd se zpravidla nepoužívá. Je-li třeba, třepe se vzorek delší dobu (přes noc) s roztokem dithioničitanu a octanu sodného. Podobně se rovněž výjimečně odstraňuje **tmel** CaCO_3 a MgCO_3 kyselinou chlorovodíkovou zejména tehdy, pokud se při preparaci nepoužije hexametafosfát. V zájmu zachování stability hydrosuspenze je nutné

održet nízkou koncentraci elektrolytu. Některé metodiky používají k dispergaci difosforečnan sodný, jako např. v SRN (Hoffmann G., 1.c.).

Intenzivní dispergace lze dosáhnout též *ultrazvukem*, zejména u hlinitých zemin. Výsledky této racionální metody se však mohou lišit od výsledků získaných chemickou preparací.

1.4.2. Metody zrnitostního rozboru

Nejjednodušší metodou stanovení jednotlivých zrnitostních frakcí je *prosévání sítí* o určité velikosti otvorů. Prosévání je jediný vhodný způsob pro *oddělení a třídění skeletu*. Některé metodiky se při třídění skeletu spokojí s proséváním za sucha (např. Hoffmann G. et al., 1.c.), většinou se však používá mokrá způsob. Ten se doporučuje i v případech, kdy se současně stanoví i jemnozeme, popř. její hrubší frakce síťováním. U zemin obsahujících více než 10% jemnozeme totiž může být použití suché metody zdrojem chyb. Na druhé straně pro sedimentační metodu nejsou vhodné vysoušené vzorky, a proto se zpravidla rozbor jemnozeme, byť s částečným použitím síťování, provádí z odděleného vzorku. Pro stanovení a třídění skeletu se totiž např. podle metody ÚKZÚZ (KPP, frakce 2- 4, 4- 30 a nad 30 mm) požaduje vzorek o hmotnosti 5- 10 kg odebraný jen pro tento účel a např. při stanovení valounů nad 75 mm podle ČSN EN ISO/TS 17892- 4 má být hmotnost prosévaného vzorku nejméně 56 kg. Pro třídění skeletu se obvykle používají síta s prosévacím prostředkem (přepážkou) z děrovaného plechu s kruhovými otvory, u jmenovité velikosti otvoru 2 mm je při separaci jemnozeme od skeletu použití takového síta principiální. Jednotlivé velikostní frakce skeletu získané mokřím proséváním se po vysušení váží a počítají se hmotnostní zlomky zpravidla vyjádřené v procentech. Jednu z výjimek představuje metoda ÚKZÚZ, při které se v odměrném válci s vodou měří jejich objem a počítají se objemová procenta. To ovšem předpokládá, že teplota vody příliš nekolísá kolem 20° C. Ani zde však přirozeně není vyloučena možnost vážení frakcí a výpočet hmotnostních procent.

Nejmenší rozměr částic stanovitelný mokřím síťováním je 0,05 mm, avšak již na sítu o velikosti otvorů 0,1 mm vznikají potíže s povrchovým napětím vody, když jemnější částičky, důležité pro charakteristiku půdních vlastností, ulpívají na síťovině. Používání *filtrů s definovanou velikostí pórů*, např. papírových (0,005- 0,001 mm) nebo keramických (0,1- 0,0002 mm) pro oddělení určité frakce není v pedologii obvyklé.

Pro třídění jemnějších zrnitostních frakcí se nejčastěji používají nepřímé *sedimentační metody*, založené na zákonech o závislosti rychlosti sedimentace částice (o určité hustotě) na její velikosti. V klidném disperzním prostředí (kapalině) se rozeznávají tři obory sedimentace, vymezené Reynoldsovým číslem Re pro kulové částice.

Definice Re:

$$Re = \frac{v \cdot d \cdot r}{h} = \frac{v \cdot d}{n} \quad [\text{bez rozměru}]$$

kde: v - sedimentační rychlost	[LT ⁻¹]
d - průměr částice	[L]
η- dynamická viskozita	[ML ⁻¹ T ⁻¹]
v - kinematická viskozita	[L ² T ⁻¹]

L - dráha

T - čas

M- hmotnost

Pro $Re < 1$, t.j. pro $0,08 > r > 0,001$ mm platí **Stokesův vztah** $v(r^2)$, kde v je sedimentační rychlost kulové částice o poloměru r v disperzním prostředí. Pro $1 < Re < 1000$, t.j. pro $0,08 \leq r \leq 1$ mm je odvozen **Budrykův (též Oseenův) vztah** $v(r)$ a pro $Re > 1000$, t.j. pro $r > 1$ mm **Rittingerův vztah** $v(r^{1/2})$. V oboru platnosti Stokesovy rovnice, když se zpočátku zrychlený pohyb změnil na rovnoměrný, jsou dráhy částic přímé, v oboru Budrykovy rovnice jsou křivočaré a v oblasti Rittingerovy rovnice přibližně šroubovicové. Při pedologických rozbořech je tedy nejdůležitější Stokesova rovnice:

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{g \cdot r^2 \cdot (\rho_z - \rho_o)}{h}$$

kde: g - tíhové zrychlení	[LT ⁻²]
r - poloměr částic	[L]
ρ _z - hustota částic	[ML ⁻³]
ρ _o - hustota disperzního prostředí	[ML ⁻³]
η - dynamická viskozita	[ML ⁻¹ T ⁻¹]

L - dráha

T - čas

M- hmotnost

U částic menších než 10^{-3} mm je již laminární pohyb částečně narušován Brownovým pohybem molekul a Stokesův vztah se musí upravit.

Platnost Stokesova zákona předpokládá splnění následujících podmínek:

- $Re < 1$, kdy jsou klesající částice laminárně obtékány kapalinou.
- Částice jsou podstatně větší než molekuly kapaliny, aby Brownův pohyb neovlivňoval jejich pád.
- Suspenze musí být dostatečně zředěná, aby se částice mohly volně pohybovat. Teoreticky by koncentrace měla být nižší než 1%, prakticky nemá být větší než 2- 3%, aby vzniklá nepřesnost byla zanedbatelná. Průměr sloupce suspenze má být oproti průměru sedimentujících částic "nekonečně", tedy dostatečně velký. Částice blíže než 0,1 mm u stěny sedimentačního válce jsou při pádu podstatně ovlivňovány.
- Mezi částicemi a kapalinou nesmí docházet ke vzájemnému působení (např. "klouzání").
- Částice jsou kulového tvaru, pevné a s hladkým povrchem a nemají elektrický náboj.

Půdní částice zpravidla nesplňují některé podmínky platnosti Stokesova zákona. Nemají kulový tvar, většinou nesou elektrický náboj a jejich povrch není hladký. Velikost určité částice je tedy definována jako průměr koule, která se při sedimentaci chová stejně, t.j. má stejnou sedimentační rychlost a hovoříme o jejím *efektivním nebo ekvivalentním průměru*. Existují též pozměněné varianty Stokesovy rovnice, vyhovující jiným tvarům částic. Naopak je možné při rozboru dodržet nízkou koncentraci suspenze a dostatečně velký průměr sedimentační nádoby.

Další komplikací sedimentačního rozboru je rozdílná hustota částic zeminy. Do vzorce se zpravidla dosazuje 2,65 jako průměr hustot nejčastěji se vyskytujících minerálů (např. křemen 2,65; kalcit 2,6- 2,8; ortoklas 2,53- 2,58; plagioklasy 2,62- 2,76; biotit 2,70- 3,10; muskovit 2,77- 2,93; montmorillonit 2,00- 2,30; kaolinit 2,58- 2,67; illit 2,50- 2,70 atd., humus 1,0- 1,6). Hustotu částic fyzikálního jílu snižuje jejich hydratační obal.

Přes všechny uvedené nedostatky se princip sedimentace používá pro zrnitostní rozbor nejčastěji. Podle způsobu aplikace sedimentace jde o metody vyplavovací, sedimentační v klidném prostředí, centrifugační a metody sedimentační rovnováhy.

Pro *vyplavovací (elutriační) metodu* se u nás používal (a občas dosud používá) přístroj podle Kopeckého, kterým se zemina roztrídí na 4 kategorie (viz odst. 1.3). Tři z nich zůstanou

ve válcích, nejjemnější I. kategorie se odplaví. Přístroj byl konstruován podle staršího Schöneho přístroje tak, aby se s postupně zvětšujícím se průměrem vzájemně propojených tří válců zmenšovala průtoková rychlost a zemina se tak roztřídila na 3 frakce (II. až IV. kategorie). Průměry válců se odvodily z empiricky zjištěného Schöneho vzorce, stanoveného pro sedimentaci částic o průměru d v proudící kapalině:

$$d = 0,0314 v^{7/11} \quad [\text{mm}]$$

kde: v - sedimentační rychlost [LT^{-1}]

L - dráha

T - čas

a jsou následující : 30 ± 1 ; 56 ± 2 ; 178 ± 4 mm. Přístrojem má protéci 1000 ml vody za 202 sekund. Podrobnosti v literatuře. Výhodou metody je možnost použití větší navážky, obvykle 50 g, nevýhodou mj. větší spotřeba vodovodní, t.j. tvrdé vody s proměnlivou teplotou a tedy viskositou. Další nevýhodou je nemožnost přímého stanovení nejdůležitější první kategorie, zpravidla rozhodující o klasifikaci zeminy. Při jejím výpočtu se uplatňují všechny eventuální ztráty během rozboru a zvyšuje se tak jeho nepřesnost. Prostorová náročnost, zdouhavost a pracnost rozboru spolu s uvedenými nevýhodami způsobily, že kdysi velmi užitečná metoda, která přispěla k rozvoji pedologického průzkumu u nás, ustoupila expeditivnějším postupům.

Sedimentační metody v klidném prostředí mají tyto modifikace: dekantační, hustoměrnou a pipetovací.

Při ***dekantační metodě*** se opakovaně po vypočtené době t vypouští z určité hloubky h sedimentačního válce vrchní sloupec suspenze, takže se získávají částice o sedimentační rychlosti menší než $v = h/t$. Proces se opakuje do úplného vyčiření vypouštěné kapaliny, spojené podíly se odpaří k suchu a váží. Metoda původně představovala nutný doplněk k vyplavovací metodě, protože umožňuje přímo stanovit fyzikální jíl, je poměrně přesná, protože se používá destilovaná voda, bere se v úvahu teplota a výsledky se přepočítávají na sušinu. Dnes se většinou používá pro získávání separovaných zrnitostních frakcí pro další rozbor. Pro běžné zrnitostní rozbor je zdouhavá, neboť se principiálně začíná s odpouštěním jemných, nejděle sedimentujících frakcí.

Při ***hustoměrné (areometrické) metodě*** se v určitých časových intervalech měří hustota suspenze, která s úbytkem postupně sedimentujících částic klesá. Vyhodnocuje se početně a pomocí nomogramu. Hustota suspenze se měří v odměrném válci 1000 ml hustoměrem

s válcovou baňkou opatřenou mírně kuželovým zakončením dole a stejným kuželovým přechodem do stonku nahoře. Tato konstrukce má jednak omezit sedimentaci částic na hustoměru, jednak pokud možno vyloučit víření suspenze při jeho vkládání a vyjímání (Cassagrande A.D., 1.c.). Po kalibraci je vlastní stanovení jednoduché, prostorově nenáročné a s nízkými náklady, vyžaduje však minimální kolísání teploty suspenze a tedy i v místnosti, zamezení působení sálavého tepla apod. Protože zúžený profil mezi stěnou sedimentačního válce a hustoměrem ruší sedimentaci, musí se hustoměr po každém měření (s výjimkou počátku sedimentace) ze suspenze vyjmout, opláchnout a osušit. Četnost měření nesmí být nadměrná, poněvadž každým vnořením a vynořením hustoměru se ruší sedimentace. Výhodou je, že se prakticky nemění objem suspenze. Metoda je jako alternativní zařazena do ČSN CEN ISO/TS 17892- 4.

V zemědělské pedologii nejčastěji používaná *pipetovací metoda* je podrobně popsána v JPP III. Z určitých hloubek h_1 , h_2 atd. sedimentující suspenze se po uplynutí příslušných dob t_1 , t_2 atd. odebírá malý podíl (1/40), který se po vysušení váží. Velikosti částic odpovídá sedimentační rychlost $v_1 = h_1/t_1$, $v_2 = h_2 /t_2$ atd. Metodická úprava pipetovací metody popsaná v ČSN CEN ISO/TS 17892-4 (1.c.) je určena pro geotechnické účely a od metodiky podle JPP III se liší v detailech, např. objemem pipety (20 ml) nebo používáním jiných hloubek ponoru pipety a tedy sedimentačních časů. Výhody pipetovací metody spočívají v poměrně vysoké produktivitě, malé spotřebě vody a možnosti stanovit všechny frakce jemnozeme s libovolným rozpětím velikostí jejich částic z jedné navážky. Stejně tak je možno stanovit např. pouze jílnaté částice pod 0,01 mm pro určení půdního druhu podle některých klasifikačních systémů. Zanedbatelná není ani malá prostorová náročnost. Naopak je metoda relativně náročná na dodržování pracovního postupu a podmínek (alespoň změkčená temperovaná voda, místnost se stálou teplotou, vyloučení otřesů např. umístěním sedimentačních válců na konzole atd.). Nutnou podmínkou reprodukovatelnosti výsledků je pečlivost a zkušenost laboratorního personálu při provádění rozborů.

Centrifugační, popř. ultracentrifugační metody a metody sedimentační rovnováhy mají význam hlavně pro separaci koloidních frakcí. Při těchto metodách se dosahuje urychlení sedimentace náhradou gravitace odstředivým zrychlením. Při běžných zrnitostních rozborech pro zemědělské popř. ekologické účely nejsou tyto postupy obvyklé.

Je třeba ještě upozornit na skutečnost, že různé metody založené na principu sedimentace nemusejí vždy dávat shodné výsledky. Je to mj. způsobeno rozdílným chováním nekulových

částic (lístkových, tyčinkových aj.) o různé hustotě v proudící kapalině při plavení a ve sloupci kapaliny při klidné sedimentaci.

V současné době se nabízí řada více či méně automatizovaných postupů a přístrojů, založených většinou na platnosti Stokesova zákona s využitím buď prosté sedimentace nebo odstředivé síly a s optickou nebo gravimetrickou detekcí, vybavených počítačem a obrazovým displejem, takže zrnitostní rozbor se jeví jako jednoduchá a pohodlná záležitost. Přístroje založené na měření extinkce procházejícího nebo odraženého světla v suspenzi ovšem předpokládají, že sedimentující částice mají stejnou hustotu, barvu či odrazivost pro světlo. Např. fotometrické měření částic pod 0,002 mm je omezeno vysokým extinkčním koeficientem. Zejména u zemin s vysokým obsahem jílu to může vést k odchylkám od klasické sedimentační metody. Na ohybu světla je založena laserová difraktometrie. Světelný paprsek při dopadu na kulovou částici v závislosti na její velikosti vytváří kruhový chybový obrazec, který se zachytí kruhově uspořádanými detektory. Podle teorie ohybu světla (Fraunhofer) se počítá průměr částice. Protože koncentrický ohybový obrazec poskytují pouze kulové částice, stanoví se pro částice jiného tvaru ekvivalentní průměr, který však není totožný s ekvivalentním průměrem vyplývajícím ze sedimentační metody. Jistá statistická souvislost v závislosti na různých formách jílových minerálů podle druhu a geologického původu sice v určitých mezích dovoluje korekci výsledků, avšak přijatelnost rozborů jílových zemin je značně omezená. Závažné omezení využití tohoto principu v pedologii představuje velmi malý objem suspenze, který se přístrojem měří– zpravidla nejvýše 10 ml, výjimečně až 100 ml, při celkové navážce tuhého vzorku do 1g. Oddělení alikvotního podílu suspenze, který by byl dostatečně reprezentativní alespoň pro částice kolem 0,01 mm, je zjevně obtížné. Před použitím různých těchto postupů (popř. nákupem drahého přístroje) nelze než doporučit srovnání s běžnou pipetovací metodou, která v kombinaci s mokrým proséváním obecně platí jako standard a v delším výhledu nelze očekávat zásadní změnu instrumentace.

1.5. Vyhodnocení rozborů a klasifikace půd podle zrnitostního složení

1.5.1. Vyjadřování výsledků zrnitostních rozborů

Bylo již uvedeno, že obsah jednotlivých frakcí v zemině se obvykle udává jako hmotnostní zlomek zpravidla vyjádřený v procentech. Některé klasifikační systémy, zejména pro zemědělské účely, vystačí pro základní určení půdního druhu se stanovením frakce

jílnatých částic (např. pod 0,01 mm). Pro komplexní zhodnocení zeminy resp. půdy je však nezbytné znát její celkové zrnitostní složení včetně skeletu, je-li přítomen. Výsledky se pak upravují tabelárně nebo, při dostatečném počtu stanovených frakcí, lze konstruovat **kumulativní (integrální) zrnitostní křivku**, která je výhodná pro srovnávání různých zemin, a to i mezinárodně, nebo též pro zjišťování obsahu frakcí libovolných rozměrů. Nejčastěji se křivka vynáší do semilogaritmické sítě, kde na vodorovné ose (x) je logaritmická stupnice průměru zrn a na svislé ose (y) lineární (aritmická) stupnice hmotnostního zlomku vyjádřeného v procentech příslušné kumulativní frakce (obr. 1- 1). Křivky v této síti mají u přirozených půd zpravidla plynulý esovitý průběh bez náhlých změn, zlomů či vybočení. Nepravidelnosti mohou být způsobeny buď chybou při rozboru, nebo např. tím, že zemina obsahuje příměs cizorodého (byť přírodního) materiálu, při jehož větším obsahu pak kumulativní křivka nemá jen jediný bod inflexe. Zřetelněji se tato situace může projevit na **frekvenční (derivační) formě zrnitostní křivky** více než jedním píkem (obr. 1- 2). Její použití v pedologii se omezuje na speciální případy, podobně jako vynášení relativní četnosti obsahu frakcí do pravděpodobnostní stupnice. Strmost kumulativní i frekvenční zrnitostní křivky též ukazuje na stupeň vytřídění zeminy– čím strmější křivka, tím užší rozpětí nejvíce zastoupených velikostí částic a tím vyšší stupeň vytřídění, např. u zemin na spraších nebo vátých pískách. Novější generace přístrojů uvedených v odst. 1.4.2 a vybavených počítačem jsou díky programovému vybavení schopné zobrazit různé typy křivek nebo četnostních histogramů, ovšem s uvedenými principiálními výhradami k vlastnímu stanovení.

1.5.2. Klasifikace zemin a půd podle zrnitostního složení

Existuje více klasifikačních systémů pro určování půdního druhu, a to i v rámci jedné země, protože jsou vypracovány pro různé účely. Vedle toho pro tentýž účel mohou být v různých zemích stanovena různá kritéria v závislosti na pestrosti půdního fondu v daném prostoru. Mezinárodní unifikace se prozatím podařilo dosáhnout v nezemědělském oboru – geotechnice a i v ČR se zaváděním souborů norem pro geotechnický průzkum a zkoušení ČSN EN ISO 146 88 a ČSN CEN ISO/TS 17 892 postupně nahrazuje ČSN 72 1001.

V zemědělské pedologii se v ČR dosud používá **klasifikace půdních druhů podle KPP**, vycházející z Novákovy sedmičlenné stupnice podle obsahu I. kategorie (částice menší než 0,01 mm), uvedená v tab. 1- 4. Pokud se půdní druh vyjadřuje podle tabulky zkratkami (symboly), používají se velká písmena pouze tam, kde se současně nevyskytují symboly půdních typů, složené výlučně nebo převážně z velkých písmen. **Skeletovitost** se podle tohoto systému částečně hodnotí přímo v terénu. Obsahuje-li zemina **více než 50% skeletu**, označuje

se podle převládající frakce jako hrubě písčité (Phr) převládá-li frakce 2- 4 mm (při převládání písku v jemnozemi), jako silně šterkovitá (Š) převládá-li frakce 4- 30 mm, nebo jako silně kamenitá (K), převládá-li frakce > 30 mm. V kategorii Š a K se jemnozemi hodnotí pouze ve 3 stupních podle seskupení. Příklad: Š_t – zemina silně šterkovitá s jílovitou (těžkou) jemnozemi. V ostatních případech (*méně než 50% skeletu*) se jemnozemi hodnotí podle sedmičlenné stupnice. Obsahuje-li zemina *5- 50% skeletu*, doplní se údaj o zrnitosti (půdním druhu) jemnozemi podle převládání šterku (4- 30 mm) nebo kamení (> 30 mm) o údaj o skeletovitosti resp. šterkovitosti podle tab. 1- 5.

Při zpracování pedologických podkladů pro odvodňovací meliorace se u nás používal systém podle Kopeckého, založený na hodnocení podle I. a II. kategorie a znázorněný buď tabulkou nebo např. diagramem na obr. 1- 3. Pro stavební účely se používal systém tří frakcí podle ČSN 72 1001, znázorněný trojúhelníkovým diagramem na obr. 1- 4. Na obr. 1- 5 je pro ilustraci uveden diagram pro klasifikaci půd podle zrnitosti, užívaný ve Švýcarsku, a to v původním znění i s německými, francouzskými, italskými a anglickými terminologickými ekvivalenty půdních druhů, které mohou být užitečné při studiu cizojazyčné literatury.

Klasifikace a pojmenování zemin podle již zmíněného zaváděného souboru ČSN EN ISO 14 688 pro geotechnické účely je záležitost poměrně složitá a účelově odlišná od běžné pedologické klasifikace. Vedle zrnitosti bere v úvahu další inženýrské vlastnosti zemin, např. obecně obsah organických látek, plasticitu, způsob uložení, konzistenci a další, zatímco např. sorpce nebo půdní typ nejsou důležité. Pro zemědělství a lesnictví má tento soubor důležitý význam při budování melioračních systémů a vodních nádrží.

1.6. Vliv zrnitosti na ekologii a úrodnost půd

Jednotlivé zrnitostní frakce obecně ovlivňují vlastnosti půd následujícím způsobem:

Skelet. Podle tvaru skeletu lze posoudit původ půdotvorného substrátu. Ostrohranný skelet je příznačný pro primární popř. deluviální uložení, zatímco zaoblené, opracované částice jsou typické pro sekundární uložení přemístěné vodou. Skelet v malém množství (asi do 10- 20%) nepůsobí v půdě nepříznivě ani na vývoj rostlin, ani při obdělávání. Někdy může dokonce způsobovat jisté vylehčení půd a zvýšení propustnosti pro vodu i vzduch.

Vyšší obsah jde však již na úkor jemnozeme, hlavně jemnějších frakcí, významných pro půdní dynamiku. Zvláště nepříznivě se projevují vrstvy skeletu s těžkým jílovitým tmelem.

Písek (IV. kategorie). Zatímco křemenný písek je zcela inertní a odolný vůči všem dalším zvětrávacím a pedogenetickým procesům, nekřemenný je potenciální zásobou živin při dalším zvětrávání a jejich uvolňování. Vysoký obsah písku způsobuje u půd snadnou rozsypavost, vysychavost a vysokou propustnost pro vodu a vzduch.

Práškový písek (III. kategorie). Zpravidla se nevyskytuje ve větších množstvích a nemá podstatný vliv na vlastnosti půd. Při větším obsahu způsobuje náchylnost půd k erozi.

Prach (II. kategorie). Má velký vliv na fyzikální vlastnosti půd. Vysoký obsah způsobuje střední soudržnost, vazkost, vhodný vodní a vzdušný režim, avšak méně příznivou strukturu. Jsou to půdy vhodné pro nejnáročnější plodiny. Dobré vlastnosti hlinitých půd jsou dány právě vysokým obsahem prachových částic.

Jílnaté částice (I. kategorie). Zpravidla se dělí na jemný prach a fyzikální jíl. Fyzikální jíl je významnější, rozhoduje o propustnosti půdy pro vodu a pozitivně i negativně ovlivňuje její vlastnosti svým velmi aktivním povrchem a povahou jílových minerálů.

Již za časů A.D. Thaera (viz kap. 0.1) byl druh půdy považován za dobrý základ pro posuzování úrodnosti půd a používal se při jejich oceňování. Mnohé faktory určující výnos, jako např. vodní a tepelný režim a nabídka kyslíku a živin v kořenovém prostoru rozhodně závisí na zrnitosti. Protože výnos určují i další půdní vlastnosti, jako struktura, zhutnění, obsah humusu a jeho kvalita, minerální složení a kyselost, může výnosnost při stejném půdním druhu značně kolísat. Konečně i klima a počasí trvale ovlivňují výnos. Následující vývody, uvádějící do souvislostí výše uvedená fakta, je třeba chápat jako orientační.

Písčité půdy jsou při každém vlhkostním stavu snadno zpracovatelné. Velký podíl hrubých pórů způsobuje dobré provzdušnění, ale také omezenou schopnost zadržovat užitečnou vodu, kdy navíc v důsledku nízké kapilarity je i efektivní kořenový prostor jen malý. V humidním klimatu vysoká propustnost sice brání nadržování vody na povrchu, ale také podporuje vyplavování živin, zatímco při závlahovém hospodářství v aridním klimatu je jen malé nebezpečí škodlivého zasolení. Nízká tepelná kapacita podporuje jarní prohřívání, mající rovněž za následek intenzivní činnost mikroorganismů, dokud je půda vlhká. To intenzifikuje odbourávání organické složky, takže obsahy humusu jsou relativně nízké a praxe hovoří o "požírači hnoje". Rovněž zásoby živin a schopnost je poutat (sorpce) jsou nízké. Především tyto vlastnosti a nízká schopnost zadržovat vodu jsou hlavní příčiny nízké výnosnosti

písčitych půd. Vliv vlhkosti půdy jako faktoru minima objasňují většinou vysoké výnosy při vysoké hladině spodní vody nebo při umělém zavlažování. Půdy s vyšším obsahem jemného písku popř. půdní druh hlinitopísčité nebo s obsahem prachového či jílovitého podílu jsou zřetelně příznivější. Podle okolností je možné pokusit se u písčitych půd zlepšit jejich schopnost vázat vodu a živiny přídatkem jílu.

Jílovité půdy sice mají ze všech půdních druhů největší objem pórů, ale jen malý podíl hrubých pórů a s tím jen mírné až špatné provzdušnění. Rovněž podíl středních (semikapilárních) pórů a s tím i využitelná maximální kapilární kapacita jsou nízké. Zejména při zhutnění jsou v humidním klimatu navíc často zamokřené v důsledku nízké propustnosti pro vodu. To vše často způsobuje jen slabou výnosnost těchto půd. Vysoký obsah jílu kromě toho ve vlhkém i v suchém stavu způsobuje tak silný odpor vůči pluhu při orbě, že jejich úspěšné zpracování je možné jen při úzce vymezeném rozpětí vlhkosti. Nazývají se proto těžké nebo také "minutové půdy", protože doba jejich zpracování musí být přesně přizpůsobena. Z toho důvodu jsou často využívány pro trvalé travní porosty. Oproti tomu jsou schopny poutat živiny a zásoby četných živin zpravidla vysoké. Nepříznivá struktura odvápněných maršů se dříve zlepšovala smísením ornice s pískem obsahujícím uhličitán vápenatý ze spodiny. Dnes se ulehlé jílovité půdy meliorují hlubokým kypřením. To lze však provést jen tehdy, je-li i spodina dostatečně vyschlá.

Hlinité a prachové půdy se středním obsahem jílu mají při nepřilíš hutném uložení jak dostatečné provzdušnění, tak vysokou schopnost zadržovat užitečnou vodu. Protože i jejich zásoby živin jsou střední až vysoké, náleží ve středoevropském prostoru k nejúrodnějším půdám, poskytujícím výnos až 12 t/ha pšenice nebo 60 t/ha cukrovky. Prachové půdy při obsahu jílu pod 17% mají obecně sklon k odkalování ornice a jsou pak vodou snadno erodovány.

Skeletové půdy při vysokém obsahu kamenů mají nízkou kvalitu, protože kořenový prostor, schopnost zadržovat vodu a vázat živiny i zpracovatelnost jsou špatné. Mají-li být přesto využívány jako orné, doporučuje se metoda minimálního obdělávání, při kterém se nevyorávají kameny, ale bioturbací se překrývají jemnozemí.

1.7. Literatura (příklady)

1. Borovec Z.: *Metody laboratorního výzkumu hornin a minerálů*. Karolinum, Praha **1992**.
2. Cassrande A.D.: *Aräometer-Methode zur Bestimmung der Kornverteilung*. Berlin **1934**.
3. Gupta S., Häni H.: *Methoden für Bodenuntersuchungen*. Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene. Liebefeld- Bern **1989**.
4. Hoffmann G. et al.: *Methodenbuch , Band I, Die Untersuchung von Böden*. VDLUFA – Verlag, Darmstadt **1991, 1997, 2000**.
5. Horák Z., Krupka F., Šindelář V.: *Technická fyzika*. SNTL, Praha **1961**.
6. Klika J., Novák V., Gregor A. (red.): *Praktikum fytoecologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství*. NČSAV, Praha **1954**.
7. Kouzov P.A.: *Osnovy analiza dispersnogo sostava promyšlennych pilej i izmělčennych materialov*. Izd. "Chimija", Leningrad **1974**.
8. Kutílek M.: *Vodohospodářská pedologie*. SNTL, Praha **1978**.
9. Landsperský H.: *Měření povrchu a velikosti částic práškových materiálů*. SNTL, Praha **1967**.
10. Němec A.: *Rozbory hnojiv, rašelin a půd*. In: Chemická technologie, svazek VI., Technické rozbory, díl I., kapitola X. Čs. společnost chemická, Praha **1948**.
11. Scheffer F., Schatschabel P.: *Lehrbuch der Bodenkunde*, 13. Aufl.. F. Enke Verlag, Stuttgart **1992**.
12. Schöne E.U.: *Schlämmanalyse i.u. Schlammapparat*. Berlin **1867**.
13. Sirový V. et al.: *Průzkum zemědělských půd ČSSR (Souborná metodika)*, 3. díl, Metodika laboratorních rozborů. MZVŽ, Praha **1967**.
14. Smolík L.: *Pedologie*. SNTL, Praha **1957**.
15. Valla M., Kozák J., Drbal J.: *Cvičení z půdoznalství – II*. SPN, Praha **1983**.
16. Zbírál J., Honsa I., Malý S., Čížmár D.: *Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. ÚKZÚZ*, Brno **2004**.
17. ČSN ISO 565 *Zkušební síta. Kovová tkanina, děrovaný plech a elektroformovaná folie. Jmenovité velikosti otvorů*. (Říjen **1994**).
18. ČSN ISO 2395 *Zkušební síta a prosévací. Terminologie*. (Říjen **1994**).
19. ČSN ISO 2591 *Zkušební prosévání. Část 1: Metody, při kterých se používají zkušební síta z kovové tkaniny a děrovaného plechu*. (Říjen **1994**).
20. ČSN ISO 3310-1 *Zkušební síta. Technické požadavky a zkoušení. Část 1: Zkušební síta z kovové tkaniny*. (Červen **2005**).
21. ČSN ISO 3310-2 *Zkušební síta. Technické požadavky a zkoušení. Část 2: Zkušební síta z děrovaného plechu*. (Červen **2005**).
22. ČSN ISO 3310-3 *Zkušební síta. Technické požadavky a zkoušení. Část 3: Zkušební síta z elektroformované folie*. (Říjen **1994**).
23. ČSN EN ISO 14688-1 *Geotechnický průzkum a zkoušení – Pojmenování a zařídování zemín – Část 1: Pojmenování a popis*. (Červen **2003**).
24. ČSN EN ISO 14688-2 *Geotechnický průzkum a zkoušení – Pojmenování a zařídování zemín – Část 2: Zásady pro zařídování*. (Březen **2005**).
25. ČSN CEN ISO/TS 17892-4 *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemín – Část 4: Stanovení zrnitosti zemín*. (Duben **2005**).
26. ČSN 72 1001 *Pojmenovanie a opis hornín v inžinierskej geológii*.

Tab.1- 1. Kulové částice

poloměr koulí	počet koulí	celkový povrch
1 cm	1	12,6 cm ²
1 mm	10 ³	126 cm ²
0,1 mm	10 ⁶	1 260 cm ²
0,01 mm	10 ⁹	12 600 cm ²
0,001 mm (1 μm)	10 ¹²	126 000 cm ²
0,1 μm	10 ¹⁵	126 m ²

Tab.1- 2. Podrobná upravená klasifikace zrnitostních frakcí podle Kopeckého (Kutílek 1978)

φ zrn [mm]	označení frakce		
pod 0,0001	koloidní jíł	I.kategorie (jílnaté částice)	jemnozern
pod 0,002	fyzikální jíł		
0,002 – 0,01	jemný prach		
0,01 – 0,05	prach		
0,05 – 0,1	práškový písek	III.kategorie	skelet
0,1 – 0,2	velmi jemný písek	IV.kategorie	
0,2 – 0,5	jemný písek		
0,5 – 2,0	střední písek		
2 – 16	drobný štěrč		skelet
16 – 63	střední štěrč		
63 – 125	hrubý štěrč		
nad 125	kameny		

Tab.1- 3 Klasifikace zrnitostních frakcí podle KPP

φ zrn [mm]	označení frakce	
pod 0,001	jíł	jemnozern
0,001 – 0,01	jemný prach	
0,01 – 0,05	hrubý prach	
0,05 – 0,25	jemný písek	
0,25 – 2,00	střední písek	
suma pod 0,01	jílnaté částice	
2 – 4	hrubý písek	skelet
4 – 30	štěrč	
nad 30	kamení	

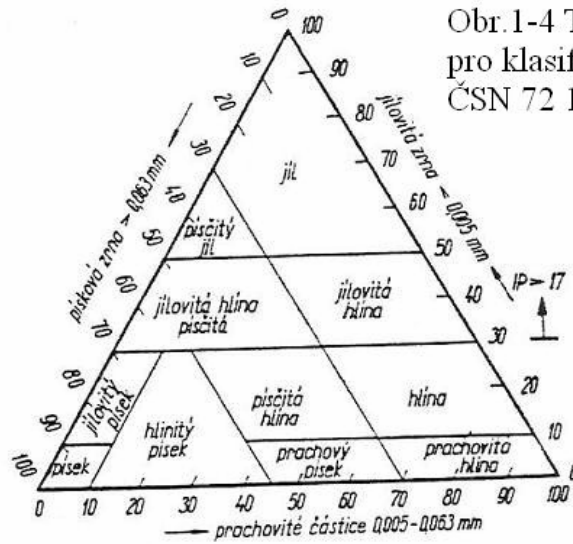
Tab.1- 4 Půdní druhy podle KPP

obsah I. kategorie [%] (částice menší než 0,01 mm)	označení půdního druhu		seskupení
	slovní	symboly	
0 – 10	písčítá	P(p)	lehká – L(l)
10 – 20	hlinitopísčítá	HP(hp)	
20 – 30	písčitohlinitá	PH(ph)	střední – S(s)
30 – 45	hlinitá	H(h)	
45 – 60	jílovitohlinitá	JH(jh)	těžká – T(t)
60 – 75	jílovitá	JV(jv)	
více než 75	jíl	J(j)	

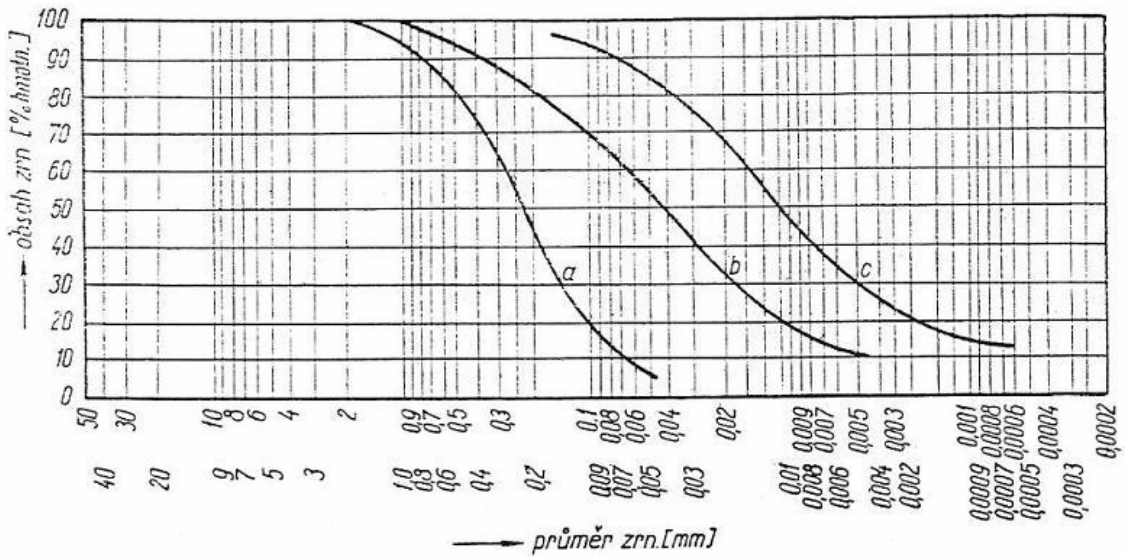
Tab.1- 5 Hodnocení skeletovitosti podle KPP

% obsahu skeletu	převládá	
	štěrk	kamení
5 – 10	s příměsí	
10 – 25	slabě štěrkovitá Š ₁	slabě kamenitá K ₁
25 – 50	středně štěrkovitá Š ₂	středně kamenitá K ₂

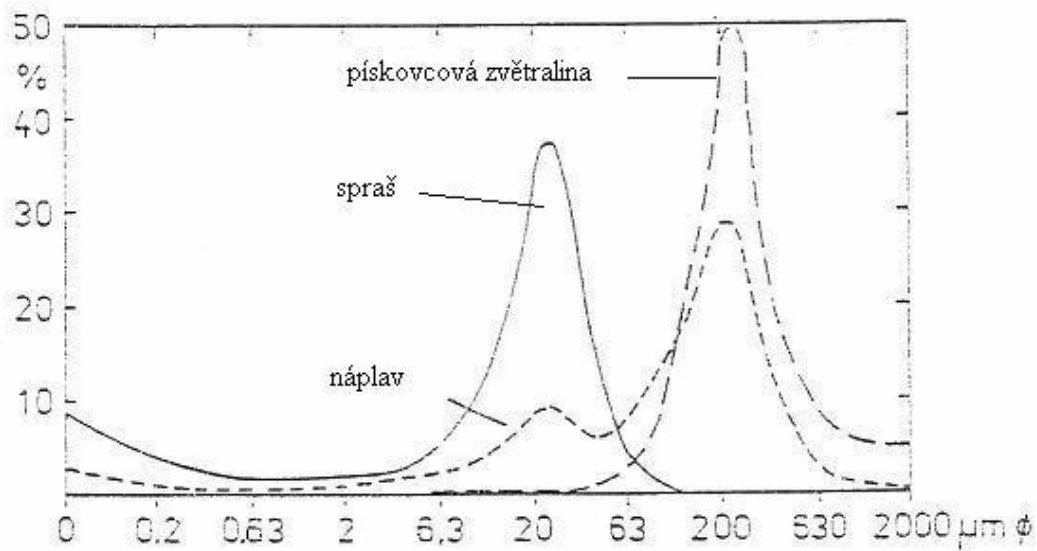
Obr.1-4 Trojúhelníkový diagram pro klasifikaci zrnitosti půd podle ČSN 72 1001 (Kutílek 1978)



Obr.1-1 Kumulativní zrnitostní křivky (Kutílek 1978)

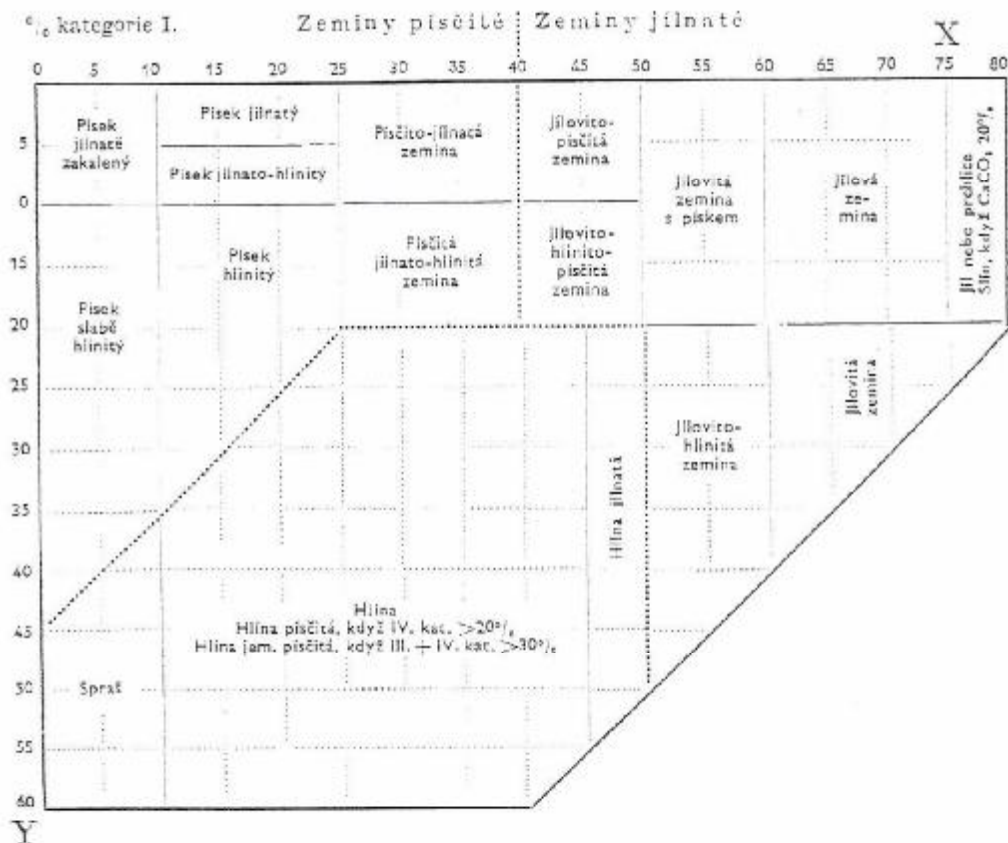


a — písčité půda, b — písčitohlinitá, c — jílovlitá půda



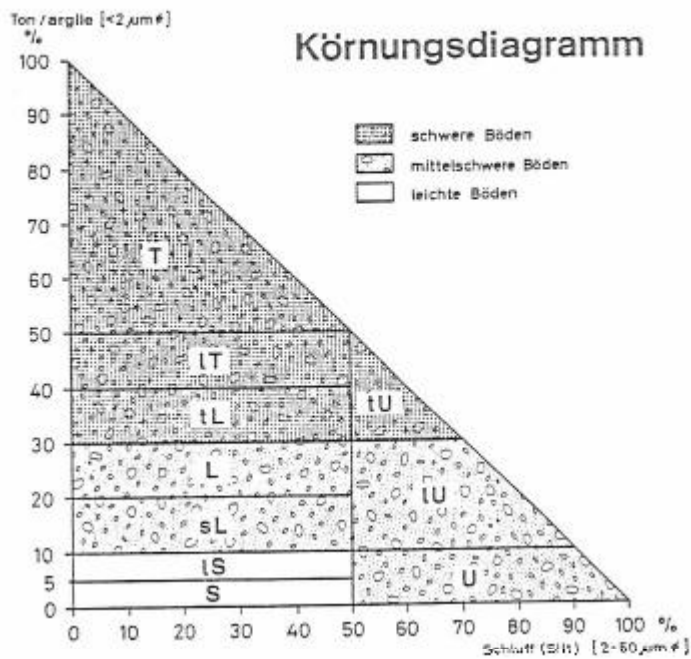
Obr. 1-2 Frekvenční zrnitostní křivka jemnozeme přirozené naplavené zeminy smíšené z cca 1/3 spraše 2/3 pískovcové zvětraliny.
(Blume, in: Scheffer, Schachtschabel l.c., upraveno)

Spirhanzlův klasifikační grafikon
 k označování zemin podle klasifikační stupnice *Kopeckého*.



Na ose X vyhledají se % kategorie I. mechanického rozboru, na ose Y % kategorie II. Průsečík souřadnic udává klasifikační označení dané zeminy podle její zrnitosti.

Obr.1-3



T	Tonboden	sol argileux	terreno argilloso	clay soil
IT	lehmiger Ton	argile limoneuse	argilla limosa	loamy clay
tL	toniger Lehm	limon argileux	limo argilloso	clay loam
tU	toniger Schluff	silt argileux	silto argilloso	clay silt
L	Lehmboden	sol limoneux	terreno limoso	loam
sL	sandiger Lehm	limon sableux	limo sabbioso	sandy loam
tU	lehmiger Schluff	silt limoneux	silto limosa	loamy silt
U	Schluffboden	sol silteux	terreno siltoso	silty soil
tS	lehmiger Sand	sable limoneux	sabbio limosa	loamy sand
S	Sandboden	sol sableux	terreno sabbioso	sandy soil

0 - 2	μm (0.002 mm)	Ton
2 - 50	μm (0.002 - 0.05 mm)	Schluff (Silt)
50 - 2000	μm (0.05 - 2 mm)	Feinsand

Obr. 1-5 Štycarský diagram pro klasifikaci půd podle zrnitosti (Gupta, Páni, 1989)

Zjištění vlivu zmražení na vybrané půdně-mikrobiální parametry

Stanislav Malý

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- OMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
stanislav.maly@ukzuz.cz

1. Úvod

Podle mezinárodní normy pro odběr a uskladnění vzorků pro stanovení půdních aerobních mikrobiálních procesů (ISO 10381-6) je možno půdní vzorky skladovat maximálně 3 měsíce při + 4° C. Tento požadavek se jeví jako obtížně splnitelný v případě, kdy je během krátkého období odebrán větší počet vzorků a/nebo ve vzorcích má být proveden větší počet analýz. Možné řešení tohoto problému představuje uskladnění vzorků při – 20° C. Na rozdíl od + 4° C dochází při této teplotě k zastavení mikrobiálních procesů, což umožňuje uchovávat vzorky delší dobu a pro analýzu připravit vždy jen tolik půd, kolik je v rámci pracoviště časově zvládnutelné. Proces zmražení a rozmražení ale může vést ke změně půdní struktury, což by se mohlo projevit např. na změně rychlosti mineralizace půdní organické hmoty a v souvislosti s tím na dalších mikrobiálních vlastnostech. Cílem této práce bylo zjistit, zda zmrazování půd ovlivňuje mikrobiální parametry, které se rutinně stanovují v laboratoři půdní mikrobiologie NRL- OMB.

2. Materiál a metody

2.1. Odběr, úprava a skladování půd

Pro účely této práce byly použity vzorky odebrané v rámci monitoringu půdních mikrobiálních vlastností orných půd a půd trvalých travních porostů v dubnu a říjnu 2004. Vzorky byly v obou případech odebrány z vrstvy 0- 15 cm. Po dopravení do laboratoře byly zhomogenizovány a poté byla jedna část uskladněna v ledničce a bezprostředně poté analyzována, druhá zmrazena při – 20° C. Před homogenizací byly vzorky uloženy při + 4° C. Zmražené vzorky byly rozmražovány při + 4° C, doba před zahájením analýz byla minimálně týden. Všechny vzorky byly před analýzami prosety přes 2 mm síto. Detailní časový plán analýz udává tabulka 1.

2.2. Fyzikálněchemické půdní vlastnosti

Stanovení půdních fyzikálních a chemických vlastností (obsah jílu, pH v 1 M KCl, celkový dusík N_{tot} , kationtová výměnná kapacita CEC) bylo provedeno na pracovištích NRL- OSAP Liberec a NRL- RO Brno. Stanovení organického uhlíku C_{org} bylo provedeno v laboratoři půdní mikrobiologie NRL- OMB. Analýzy byly provedeny dle Jednotných pracovních postupů (JPP) - Analýza půd I (2002) a Analýza půd III (2004).

2.3. Mikrobiologické parametry

V rámci VÚ byly provedeny níže uvedené mikrobiologické analýzy. Zkratky uvedené v závorce jsou použity ve výsledkových tabulkách.

1. Uhlík mikrobiální biomasy (C_{bio} , $\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}$)
2. Bazální respirace (RES, $\mu\text{gCO}_2\text{-C}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
3. Měření respiračních křivek (RKR) s vyhodnocením lag fáze (LAG, min) a maximální růstové rychlosti (MAX, $\mu\text{gO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
4. Anaerobní N mineralizace (AMO, $\mu\text{gNH}_4^+\text{-N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
5. Krátkodobá nitrifikační aktivita (SNA, $\text{ngNO}_2\text{-Ng}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
6. Aktivita ureázy (URE, $\mu\text{gNH}_4^+ \text{- N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
7. Aktivita β -glukosidázy (GLU, $\mu\text{g } p\text{-nitrofenolu}\cdot\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$)

Analýzy byly provedeny dle postupů uvedených v JPP – Analýza půd III, níže jsou proto uvedeny pouze principy metod.

Uhlík mikrobiální biomasy byl stanoven fumigačně- extrakční metodou, stanovení extrahovaného uhlíku bylo provedeno spektrofotometricky po oxidaci chromsírovou směsí. Před fumigací byly vzorky preinkubovány jeden den při + 25° C. Před měřením bazální respirace byly vzorky preinkubovány 6 dní při + 22° C. Při vlastním stanovení byly vzorky 3 dny inkubovány v uzavřené nádobě nad roztokem hydroxidu sodného. Paralelně byl inkubován roztok hydroxidu sodného jako slepý pokus. Množství uvolněného CO_2 bylo stanoveno z rozdílu HCl spotřebované při titraci slepého vzorku a při titraci roztoku hydroxidu s absorbovaným CO_2 uvolněným během respirace. Stanovení probíhalo při obsahu vody odpovídající 60% maximální vodní kapacity. Respirační křivky byly měřeny pomocí systému Sensomat firmy WTW (SRN) po přidavku glukózy s přidavkem síranu amonného

a dihydrogenfosforečnanu draselného. Vzorky byly inkubovány 4 dny při + 22° C v uzavřené nádobě s měřicí hlavicí s tlakovým senzorem. V nádobě byla umístěna malá nádobka s roztokem hydroxidu sodného. Při respiraci dochází vlivem spotřeby kyslíku k poklesu tlaku, který je v pravidelných intervalech zaznamenáván měřicí hlavicí. Protože uvolněný CO₂ je jímán do roztoku hydroxidu, pokles tlaku odpovídá spotřebovanému množství kyslíku. Při vynesení závislosti spotřebovaného kyslíku na čase získáme sigmoidální křivku. Množství uvolněného O₂ za jednotku času v bodě inflexe označíme jako maximální růstovou rychlost a dobu do zahájení exponenciální fáze růstu jako lag fázi. Rychlost respirace byla spočtena jako směrnice přímk 10 po sobě jdoucích měření. Průsečík přímky s nejvyšší hodnotou směrnice s časovou osou označuje dobu lag fáze. Stanovení probíhalo při vlhkosti odpovídající 40% maximální vodní kapacity. Vzorky byly před měřením 4 dny preinkubovány při téže teplotě, při které probíhalo měření. Anaerobní N mineralizace (amonifikace) byla stanovena jako čistý přírůstek amonných iontů ve vzorcích inkubovaných ve zkumavkách naplněných vodou po dobu 9 dní. Amonné ionty byly extrahovány a fotometricky stanoveny po 2 dnech a na konci inkubace. Krátkodobá nitrifikační aktivita byla stanovena jako čistý přírůstek dusitanových iontů v půdní třepané suspenzi po přidavku substrátu (NH₄)SO₄, při pH 7.2 a teplotě + 25° C. Oxidace dusitanových iontů na dusičnanové byla inhibována přidavkem chlorečnanu. Vzorek půdní suspenze pro fotometrické stanovení nitritů byl odebírán po 2 a 6 hodinách. Před analýzou byly vzorky preinkubovány 2 dny při + 25° C. Aktivita ureázy byla stanovena jako množství uvolněných amonných iontů půdním vzorkem po přidavku urey. Půdní suspenze byla inkubována 2h při + 37° C a pH 10. Při stanovení aktivity β- glukosidázy byly půdní vzorky inkubovány 1h při + 37° C s přidavkem β-D-glukosidu. Aktivita enzymu byla vyjádřena jako množství uvolněného p-nitrofenolu.

Veškerá fotometrická stanovení byla provedena pomocí spektrofotometru UV2 (Unicam).

Mikrobiologická stanovení nemohla být provedena ve všech vzorcích díky časovému omezení. Tato práce souvisela s revizí výše uvedené normy pro odběr a skladování půd pro aerobní mikrobiologické analýzy. Analýzy bylo nutno ukončit tak, aby 31.1.2005 mohla být zaslána souhrnná zpráva na sekretariát ISO TC 190 SC4/ WG4 Kvalita půdy – Biologie – Mikrobiologie.

2.4. Statistické vyhodnocení

Pro porovnání dat naměřených ve vzorcích půd uskladněných při + 4° C a ve vzorcích zmrazených byl použit párový t- test. Pro vyhodnocení byl použit program Statistica 6.0 firmy StatSoft, Tulsa, USA.

3. Výsledky a diskuse

Fyzikálně- chemické vlastnosti půd udává tabulka 2. Přehled naměřených mikrobiologických dat udává tabulka 3. Statistická analýza neprokázala vliv zmrazení na žádný sledovaný mikrobiologický parametr s výjimkou bazální respirace (Tabulka 4). V případě bazální respirace se navíc mohla projevit skutečnost, že s výjimkou dvou půd uskladněných při + 4° C, byla celá série vždy analyzována v jednom termínu. V tomto případě se na výsledném hodnocení více projeví vlivy, které způsobují, že daná série se od průměru liší v kladném či záporném směru.

Získané výsledky otevírají možnost zmrazení půd pro mikrobiologické analýzy. Hlavní výhoda spočívá v možnosti připravit si jen takový počet vzorků, který může být během krátké doby analyzován. Domníváme se, že tento postup je vhodnější než využít maximální doby pro uskladnění dané normou ISO 10381- 6. Uvedené tři měsíce je relativně dlouhá doba vzhledem ke skutečnosti, že + 4° C neznamenaají zastavení biologických procesů v půdě. Během této doby může dojít ke změnám ve struktuře a stavu mikrobiálních společenstev. Zároveň by možnost uskladnění vzorků při – 20° C do značné míry odstranila omezení počtu vzorků, které mohou být během krátké doby odebrány. To je v některých projektech, jako je např. monitoring, důležité kritérium. Zároveň je ale třeba zdůraznit, že vliv procesu zmrazování závisí jednak na charakteru daného půdního parametru, jednak na fyzikálních a chemických vlastnostech půdy. Výsledky dosažené v této práci proto nelze bez provedení dalších experimentů zobecnit ani pro další půdní mikrobiální charakteristiky ani pro půdy s odlišnými fyzikálně- chemickými vlastnostmi.

4. Závěr

Nebyl prokázán vliv uskladnění vzorků při -20°C na obsah uhlíku mikrobiální biomasy, parametry charakterizující růstové křivky, anaerobní N mineralizaci, krátkodobou nitrifikační aktivitu, aktivitu ureázy a β -glukosidázy. Signifikantní rozdíly byly nalezeny pouze v případě bazální respirace. Pro účely stanovení uvedených mikrobiologických parametrů, s výjimkou bazální respirace, je možno vzorky půd s fyzikálně-chemickými vlastnostmi nalézajícími se v rozsahu hodnot použité sady půd před analýzou na několik měsíců zamrazit. Doba rozmrazování při $+4^{\circ}\text{C}$ musí být minimálně týden.

5. Literatura

1. ISO 10381- 6 Soil quality – Sampling– Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. International Organization for Standardization **1993**.
2. Zbíral J.: Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I., 2.vydání; Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Brno, **2002**.
3. Zbíral J.: Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III., 2.vydání; Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Brno, **2004**.

Tabulka č. 1. Časový plán odběru vzorků s uvedením data jejich zmražení, rozmražení a provedení analýz.

I – vzorky uchované při + 4° C,

F – vzorky zmražené.

Ostatní zkratky a jednotky viz. odst. 2.3.

Vzorek č.	Datum odběru	Datum zmražení	Datum rozmražení	C _{bio} I	C _{bio} F	RES I	RES F	RKR I	RKR F
1	08.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
2	08.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
3	05.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
4	08.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
5	08.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
6	05.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
7	05.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
8	07.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
9	06.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
10	06.04.04	16.04.04	07.07.04	-	-	-	-	-	-
11	11.10.04	14.10.04	29.12.04	29.12.04	19.01.05	09.11.04	18.01.05	26.10.04	14.01.05
12	27.09.04	29.09.04	29.12.04	03.11.04	19.01.05	09.11.04	18.01.05	29.10.04	14.01.05
13	04.10.04	05.10.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	14.10.04	10.01.05
14	27.09.04	30.09.04	29.12.04	-	-	23.11.04	18.01.05	14.10.04	14.01.05
15	04.10.04	05.10.04	29.12.04	22.11.04	19.01.05	23.11.04	18.01.05	09.12.04	21.01.05
16	01.10.04	04.10.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	14.10.04	10.01.05
17	01.10.04	04.10.04	29.12.04	02.01.05	12.01.05	23.11.04	18.01.05	14.10.04	10.01.05
18	04.10.04	05.10.04	29.12.04	07.12.04	26.01.05	23.11.04	18.01.05	09.12.04	27.01.05
19	04.10.04	05.10.04	29.12.04	22.11.04	19.01.05	23.11.04	18.01.05	09.12.04	10.01.05
20	27.09.04	30.09.04	29.12.04	-	-	23.11.04	18.01.05	14.10.04	21.01.05
21	27.09.04	30.09.04	29.12.04	11.10.04	19.01.05	23.11.04	18.01.05	14.10.04	21.01.05
22	27.09.04	30.09.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	18.10.04	10.1.05
23	27.09.04	30.09.04	29.12.04	11.10.04	19.01.05	23.11.04	18.01.05	18.10.04	21.01.05
24	27.09.04	30.09.04	29.12.04	-	-	23.11.04	18.01.05	18.10.04	27.01.05
25	04.10.04	05.10.04	29.12.04	22.11.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	09.12.04	10.01.05
26	01.10.04	04.10.04	29.12.04	-	-	23.11.04	18.01.05	18.10.04	27.01.05
27	01.10.04	04.10.04	29.12.04	02.01.05	19.01.05	23.11.04	18.01.05	18.10.04	21.01.05
28	01.10.04	04.10.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	18.10.04	14.01.05
29	01.10.04	04.10.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	22.10.04	14.01.05
30	27.09.04	30.09.04	29.12.04	11.10.04	12.01.05	23.11.04	18.01.05	22.10.04	14.01.05

Tabulka č. 1. (pokračování)

Vzorek č.	AMO I	AMO F	SNA I	SNA F	GLU I	GLU F	URE I	URE F
1	-	-	-	-	27.05.04	20.07.04	26.05.04	15.07.04
2	-	-	-	-	27.05.04	14.07.04	31.05.04	13.07.04
3	-	-	-	-	27.05.04	14.07.04	27.04.04	13.07.04
4	-	-	-	-	27.05.04	20.07.04	27.04.04	15.07.04
5	-	-	-	-	27.05.04	14.07.04	27.04.04	13.07.04
6	-	-	-	-	28.05.04	20.07.04	19.05.04	15.07.04
7	-	-	-	-	28.05.04	20.07.04	31.05.04	15.07.04
8	-	-	-	-	28.05.04	20.07.04	24.05.04	15.07.04
9	-	-	-	-	28.05.04	14.07.04	29.05.04	13.07.04
10	-	-	-	-	31.05.04	14.07.04	31.05.04	13.07.04
11	25.10.04	17.01.05	07.12.04	10.01.05	26.10.04	17.01.05	02.11.04	25.01.05
12	24.11.04	17.01.05	06.12.04	10.01.05	26.10.04	17.01.05	02.11.04	25.01.05
13	11.10.04	17.01.05	25.10.04	10.01.05	-	-	30.11.04	25.01.05
14	22.11.04	17.01.05	01.11.04	10.01.05	-	-	30.11.04	25.01.05
15	11.10.04	17.01.05	01.11.04	10.01.05	-	-	30.11.04	25.01.05
16	11.10.04	17.01.05	25.10.04	10.01.05	-	-	30.11.04	25.01.05
17	22.1.04	17.01.05	25.10.04	10.01.05	-	-	30.11.04	25.01.05
18	22.11.04	17.01.05	01.11.04	10.01.05	-	-	30.11.04	20.01.05
19	11.10.04	17.01.05	01.11.04	10.01.05	-	-	08.12.04	20.01.05
20	22.11.04	19.01.05	07.12.04	10.01.05	-	-	08.12.04	20.01.05
21	22.11.04	19.01.05	01.11.04	11.01.05	22.11.04	14.01.05	08.12.04	20.01.05
22	11.10.04	19.01.05	01.11.04	11.01.05	22.11.04	14.01.05	08.12.04	20.01.05
23	22.11.04	19.01.05	01.11.04	11.01.05	22.11.04	14.01.05	08.12.04	20.01.05
24	11.10.04	19.01.05	01.11.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	20.01.05
25	11.10.04	19.01.05	07.12.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	18.01.05
26	22.11.04	19.01.05	01.11.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	13.12.04	18.01.05
27	22.11.04	19.01.05	25.10.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	18.01.05
28	11.10.04	19.01.05	25.10.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	18.01.05
29	11.10.04	19.01.05	25.10.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	18.01.05
30	11.10.04	17.01.05	25.10.04	11.01.05	11.11.04	11.01.05	10.12.04	18.01.05

Tabulka č. 2. Vybrané fyzikální a chemické půdní vlastnosti.

Vzorek č.	Jíl (%)	pH	C_{org} (mg.g⁻¹)	N_{tot} (mg.g⁻¹)	CEC (mmol.kg⁻¹)
1	10,4	6,5	13,3	1,35	170
2	12,6	7,2	22,6	2,37	270
3	4,5	4,9	13,6	1,42	185
4	17,1	6,6	24,7	2,00	270
5	14,0	7,0	21,2	2,09	235
6	7,7	6,7	40,2	4,07	350
7	4,0	6,1	16,9	1,65	200
8	8,8	7,2	22,2	2,17	230
9	6,4	5,7	15,6	1,67	260
10	4,2	5,6	16,7	1,76	320
11	6,4	4,3	43,9	3,76	350
12	10,0	4,9	51,8	5,09	410
13	21,2	7,2	15,3	1,61	245
14	16,2	5,9	8,5	1,05	150
15	16,0	5,5	14,5	1,42	190
16	11,5	4,8	15,0	1,51	190
17	6,9	5,2	25,7	2,50	200
18	21,9	7,2	16,0	1,72	270
19	17,2	6,7	17,3	1,71	250
20	19,8	7,3	9,5	1,11	190
21	27,8	6,7	19,0	2,08	350
22	17,1	5,7	14,0	1,57	205
23	18,8	6,1	18,3	1,94	260
24	13,9	5,6	12,3	1,34	190
25	18,3	5,9	12,6	1,38	190
26	8,7	3,9	25,3	2,30	240
27	6,5	6,2	12,3	1,44	180
28	5,6	5,5	19,7	1,84	160
29	4,0	5,5	33,9	3,35	260
30	21,4	6,9	18,1	2,09	280

Tabulka 3. Výsledky mikrobiologických analýz.**I – vzorky uchované při + 4° C,****F – vzorky zmrazené.****Ostatní zkratky a jednotky viz. odst. 2.3.**

Vzorek č.	C_{bio} I	C_{bio} F	RES I	RES F	LAG I	LAG F	MAX I	MAX F
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	442	482	1,38	1,12	974	1080	1,92	2,19
12	1076	1017	2,13	1,91	253	660	1,39	2,34
13	216	177	1,80	1,50	1033	1037	4,32	4,86
14			0,91	0,71	1164	1253	3,69	3,53
15	160	208	0,86	0,76	1086	1062	4,22	3,84
16	222	200	0,30	0,54	1427	1456	3,16	3,14
17	424	492	1,49	1,42	862	598	2,68	3,00
18	217	264	1,27	1,39	1058	1005	4,05	3,80
19	114	240	1,08	0,79	1001	959	5,34	4,94
20			1,33	1,20	991	1111	2,92	3,07
21	178	272	0,83	0,79	1059	1095	6,00	5,11
22	241	212	0,86	0,57	880	971	4,39	4,10
23	259	270	0,64	0,74	958	940	4,43	4,83
24			0,80	0,52	1124	1258	3,39	3,41
25	196	184	1,45	0,95	1066	1042	4,12	4,13
26			1,30	1,06	1364	1204	3,26	2,87
27	202	209	1,27	0,65	956	1063	5,32	4,76
28	238	231	1,52	0,95	908	870	3,59	3,26
29	672	632	1,88	1,39	514	534	2,01	2,38
30	242	236	1,60	1,28	919	989	5,81	5,32

Tabulka 3. (pokračování).

Vzorek č.	AMO I	AMO F	SNA I	SNA F	URE I	URE F	GLU I	GLU F
1	-	-	-	-	25,7	23,6	126	152
2	-	-	-	-	40,7	39,2	215	166
3	-	-	-	-	6,3	7,7	118	112
4	-	-	-	-	15,2	18,3	241	220
5	-	-	-	-	32,8	37,4	164	154
6	-	-	-	-	19,4	12,1	303	314
7	-	-	-	-	3,9	4,5	184	183
8	-	-	-	-	15,5	14,0	243	260
9	-	-	-	-	8,0	8,0	167	162
10	-	-	-	-	13,4	12,3	241	210
11	12,33	9,76	7	15	10,8	11,5	276	240
12	16,98	13,16	20	46	20,4	17,5	708	585
13	1,59	2,03	690	648	46,2	45,3	-	-
14	1,82	1,62	128	153	8,2	9,4	-	-
15	4,12	2,43	449	308	19,5	21,8	-	-
16	3,48	3,86	101	143	15,0	15,8	-	-
17	6,92	11,8	67	39	10,7	11,6	-	-
18	3,08	4,50	682	810	46,6	46,5	-	-
19	6,22	6,23	527	640	37,2	35,6	-	-
20	2,38	2,67	1061	787	42,4	35,8	-	-
21	3,10	4,72	667	785	37,2	36,9	172	164
22	7,34	6,45	666	525	17,8	16,8	264	243
23	5,47	5,85	620	615	35,1	34,8	223	225
24	3,55	4,24	270	144	5,8	4,5	134	118
25	7,25	7,08	443	318	18,3	18,3	260	271
26	7,17	7,72	4	8	7,0	6,7	243	205
27	4,92	4,45	194	118	6,5	6,4	250	296
28	5,66	5,04	51	46	6,9	6,1	313	282
29	13,42	13,5	339	246	15,2	17,6	517	522
30	5,42	4,26	1161	1040	47,8	45,1	222	230

Tabulka č.4. Výsledky párového t- testu testující nulovou hypotézu: zmrazení nemá žádný vliv na stanovované mikrobiologické parametry.

	Cbio	RES	AMO	SNA	URE	GLU
Rozdíl	-14,0	0,22	0,043	35,7	0,403	12,3
n	16	20	20	20	30	22
t	1,091	4,407	0,110	1,559	0,910	1,715
t_{0,05}	2,131	2,093	2,093	2,093	2,045	2,080
p	0,29231	0,00030	0,91350	0,13559	0,28685	0,10106

Rozdíl mezi hodnotami naměřenými v půdách uskladněných při + 4° C a zmrazenými byl spočítán pro každý vzorek (Rozdíl). Tyto hodnoty byly použity pro výpočet párového t- testu. Zkratky mikrobiologických parametrů viz. odst. 2.3.

n – počet vzorků,

t – vypočtená hodnota t,

t_{0,05} – kritická hodnota t na hladině významnosti 0,05,

p – pravděpodobnost, že při platnosti nulové hypotézy budou získány minimálně tak odlehle výsledky jako jsou hodnoty naměřené.

Stanovení obsahu D9- tetrahydrocannabinolu (D9-THC) v konopí setém

Naděžda Kabátová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
nadezda.kabatova@ukzuz.cz

1. Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.), prastará kulturní rostlina s mnohostranným využitím, se v povolených odrůdách s obsahem Δ^9 - THC menším než 0,2 % vrací po létech útlumu do zemědělské výroby také v České republice.

Konopí patří k nejvýznamnějším přadným rostlinám mírného pásma. V zemích EU je pěstování konopí podporováno a mezi spotřebiteli jsou propagovány konopné materiály. Projevuje se tak tendence nahrazovat ve větší míře umělá vlákna, jejichž likvidace je z hlediska životního prostředí stále více problematická.

V roce 2004 se Česká republika stala součástí Evropské unie. Vystala tak povinnost daná ustanovením čl.5a odst.2 nařízení (ES) č. 1251/1999 a čl. 7b nařízení (ES) č. 2316/1999, která ukládá státním orgánům vytvořit systém pro ověřování obsahu Δ^9 - THC v odrůdách konopí setého. Stát musí zajistit kontrolu 30% ploch, na nichž se pěstuje konopí určené k produkci vlákna. Provádění těchto analýz je podmínkou vyplácení přímé platby na plochu osetou konopím (nařízení Komise č. 2199/03 o Jednotné platbě na plochu).

Naše laboratoř byla pověřena Ministerstvem zemědělství ČR prováděním zkoušek na stanovení obsahu Δ^9 - THC v konopí. U odebraných vzorků byl stanoven obsah Δ^9 - THC dle postupu uvedeného v příloze XIII, článku 7b nařízení (ES) č.2316/1999. Zároveň byla provedena částečná validace metody na vybraném souboru vzorků a standardů.

Součástí práce se stalo i posouzení návrhu Komise EU na nový přístup k ověřování obsahu Δ^9 - THC v konopí, který jsme obdrželi na počátku roku 2004. Tento návrh předpokládá, že by se v určitých, přesně vymezených případech, sledoval poměr obsahu Δ^9 - THC/CBD. Pro odrůdy konopí, určené k produkci vlákna, by po celé vegetační období měl mít tento

poměr hodnotu menší než 0,15. Zavedení uvedeného parametru by v budoucnu vedlo ke zjednodušení odběru vzorků a celkovému urychlení kontroly ploch osetých konopím.

2. Charakteristika konopí setého

2.1. Popis rostliny

Konopí je jednoletá, původem dvoudomá kulturní rostlina ze Střední Asie. Botanická klasifikace konopí byla po dlouhou dobu nejasná, botanici se nemohli shodnout na příslušné čeledi. Dnes se konopí obvykle zařazuje do zvláštní čeledi konopovitých (Cannabaceae), kam vedle konopí patří pouze chmel. Rozlišují se tři základní druhy konopí:¹⁾

- **Konopí seté** (*Cannabis sativa*, L.), u kterého se určují tři formy
 - severní - narůstá max. do 0,8 m a dozrává za 60 až 80 dní; pěstuje se až k polárnímu kruhu v podmínkách dlouhého dne, ovšem s malým výnosem semene i stonku,
 - jižní - původní typ konopí, narůstá do výšky 3,5 až 4 m, s vegetační dobou 130 až 180 dní; dává vysoký výnos jemného vlákna, ale relativně malý výnos semen,
 - přechodný typ - vznikl křížením předchozích typů a je vhodný pro pěstování ve střední Evropě, podle půdních a klimatických podmínek dorůstá výšky 1,7 až 2,5 m (výjimečně až 3,5 m); dává dobrý výnos vlákna i semene a dozrává za 90 až 120 dní.
- **Konopí plané** (*Cannabis ruderalis*) – nevýznamný jednoletý plevel,
- **Konopí indické** (*Cannabis indica*, L.) pěstované v teplejších klimatických oblastech nejen pro vlákno a semeno, ale i pro vysoký obsah psychotropních látek (THC), kterých může být v sušině některých částí 10 – 12% a které slouží k výrobě hašiše a následně dalších narkotik. Okvětí a vrcholové olistění je surovinou pro psychotropní drogu „marihuanu“. V České republice není jeho pěstování povoleno (pouze výjimečně k lékařským účelům).

Konopí seté je statná rostlina, u níž byly dlouholetým výběrovým šlechtěním získány jednodomé variety, které více vyhovují pěstitelským potřebám. Rostlina má vzpřímenou,

řídce větvenou lodyhu, která je v bazální části stlačeně válcovitá, v horní hranatá a uvnitř dutá. Je pokryta jemným chmýřím a má kulovitý kořen. Konopí je cizosprašné, větrosnubné i na větší vzdálenost. Plody jsou vejčité nažky. Listy mají charakteristický tvar, podobající se prstům otevřené ruky.

Má vysoký obsah celulózy a ligninu, obsahuje až 30% kvalitních lýkových vláken. V porovnání s ostatními kulturními rostlinami je relativně odolné proti různým škůdcům a nemocem. Patří mezi několik rostlin, u kterých se vyvinul účinný systém tzv. vlastní ochrany. Konopím uvolňované těkavé látky chrání i ostatní rostliny pěstované v okolí. Konopí vykazuje také silné protierozivní účinky. Svými kořeny vytahuje z půdy těžké kovy a ukládá je ve stonku. Během několika let dokáže doslova vyčistit kontaminovanou půdu.

2.2. Využití konopí

Konopí je považováno za výjimečnou rostlinu, která potřebuje jen omezenou chemickou ochranu a má velkou rozmanitost využití. Je udáváno až 25 tisíc různých výrobků, pro něž slouží jako výchozí surovina.

Využití jednotlivých částí rostliny v různých průmyslových a dalších odvětvích hospodářství shrnuje následující přehled.

Vlákno

- Textilní průmysl - u konopného vlákna se hodnotí především pevnost, pružnost, antistatické a hygienické vlastnosti, schopnost zachycovat UV záření, poréznost a prokázané antimikrobiální účinky. Používá se především k výrobě technických textilií (lana, motouzy, hadice, rybářské sítě, dopravní pásy, při výrobě kobereců, plachtovin, potahových tkanin atd.). V posledních letech nachází jemné konopné vlákno uplatnění pro výrobu směsných přízí s ostatními přírodními, ale i umělými vlákny, ze kterých se vyrábí košiloviny, džínsoviny, oblekové látky, ale i pletené výrobky.
- Papírenský průmysl - výroba cigaretového papíru a papíru pro technické využití. Sortiment papíru vyráběný z konopí se vyznačuje vysokou pevností a odolností vůči vodě.

- Automobilový průmysl - výroba termo- a duroplastických lisovaných dílců k obkladům dveří a zavazadlového prostoru. Konopné vlákno se používá i k náhradě azbestu na brzdová a spojková obložení.
- Stavebnictví - výroba izolačních rohoží.
- Zvláštní upotřebení - matracoviny, žíněnky, při výrobě obuvi.

Pazdeří (vedlejší produkt při zpracování konopného stonku)

- Podestýlka pod zvířata s mimořádnou nasákavostí.
- Součást substrátu pro pěstování jedlých hub a kompostů.
- Plnicí složka při výrobě určitých stavebních dílců.

Konopné semeno

- Krmivo - především pro ptáky, případně k výkrmu ryb.
- Potravinářský průmysl.
- Kosmetický a farmaceutický průmysl - používá se vylisovaný olej - má vysoký obsah nenasycených mastných kyselin. Konopný olej a listí se používá k výrobě řady léků proti astmatu, epilepsii, skleróze.

Konopí patří mezi tzv. energetické rostliny a produkce biomasy jako náhrady fosilních paliv nabývá na stále větším významu.²⁾

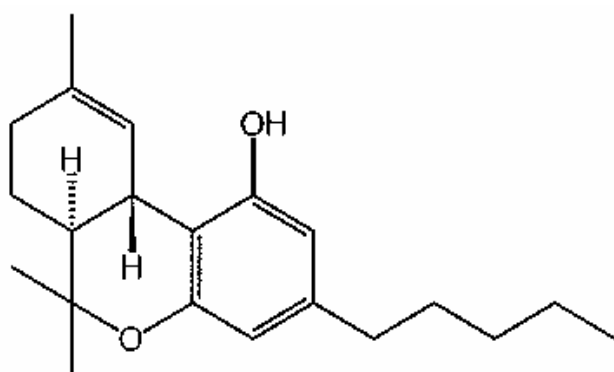
Konopí má v porovnání s plastickými hmotami 100 % bezodpadovost. I „dosloužilé“ konopné výrobky se použijí k výrobě papíru, shoří v kotelně nebo zetlí jako každá organická hmota v kompostu.

2.3. Chemické složení konopí

Specifickou skupinou sekundárních produktů, charakteristických pro druh Cannabis (konopí), jsou látky terpenického původu, které jsou souhrnně označovány jako cannabinoidy.

Tyto látky jsou produkovány rostlinnou tkání, v systému žláz, ve formě pryskyřice. Ta je až z jedné třetiny tvořena právě cannabinoidy. Pryskyřičné žlázy se nacházejí na povrchu všech částí rostlin s výjimkou kořenů a semen. Nejvíce siličných žlázek je na samičích květech s listy. V konopí bylo popsáno více než 60 cannabinoidů.³⁾

Hlavním nositelem psychotropního účinku konopí je Δ^9 - tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC nebo jen THC), systematicky 3- pentyl- 6,6,9- trimethyl- 6a,7,8,10a- tetrahydro- 6H- dibenzo [b,d] pyran-1-ol (Obrázek č.1). Byl popsán i jeho derivát Δ^8 - THC, který se liší polohou dvojné vazby.



Obrázek č.1: Δ^9 - tetrahydrocannabinol

Δ^9 - THC se vyskytuje u všech druhů konopí a to od stopových množství až po téměř 95% ze všech obsažených cannabinoidů. Jak v České republice, tak ve všech zemích Evropské unie, lze pěstovat pouze povolené odrůdy konopí setého s obsahem Δ^9 - THC < 0,2 %.

K dalším cannabinoidům, které již psychotropní účinky nemají, ale které lze v konopí běžně nalézt, patří cannabidiol (CBD), cannabichromen (CBC) a cannabigerol (CBG). Tyto cannabinoidy včetně Δ^9 - THC mají pentylový postranní řetězec. Uvedené cannabinoidy se mohou vyskytovat i jako propyl- deriváty a pak nesou označení- cannabidivarin (CBDV), cannabichromevarin (CBCV), cannabigerovarín (CBGV) nebo Δ^9 - tetrahydrocannabivarín (THCV). Tyto propyl- deriváty jsou však méně časté.

V konopí jsou cannabinoidy syntetizovány a akumulovány jako jejich příslušné karboxy- kyseliny. Když je rostlina sušena, skladována nebo zahřívána, jsou tyto kyseliny postupně nebo zcela dekarboxylovány na neutrální formy (např. CBDA \rightarrow CBD). Pro zjednodušení se v literatuře obvykle uvádějí cannabinoidy ve zkratkách, jako jejich neutrální formy.

Při analýzách můžeme ve vzorcích konopí nalézt i tzv. cannabinol (CBN). Nejedná se o přírodní cannabinoid, ale o látku, která vzniká odbouráváním THC při nevhodném způsobu skladování konopí. V čerstvých rostlinách nebo v nově připravených vzorcích se CBN nevyskytuje.

2.4. Biosyntéza cannabinoidů

První specifický krok v biosyntéze cannabinoidů je kondenzační reakce geranylpyrofosfátu s kyselinou olivetolovou. Vzniklý cannabigerol (CBG) je přímým prekursorem pro CBD, CBC, a jak se v současné době předpokládá, i pro THC (viz. obrázek č.2). Ve starších odkazech bylo THC považováno za další cyklizační produkt CBD. Nebyla však potvrzena existence enzymu CBD- cyklázy, která by katalyzovala syntézu THC přes CBD.⁴⁾

Konopí je podle vzájemného poměru Δ^9 - THC a CBD řazeno do několika fenotypů, označovaných také často jako chemotypy. Již v roce 1973 byly popsány tři základní chemotypy

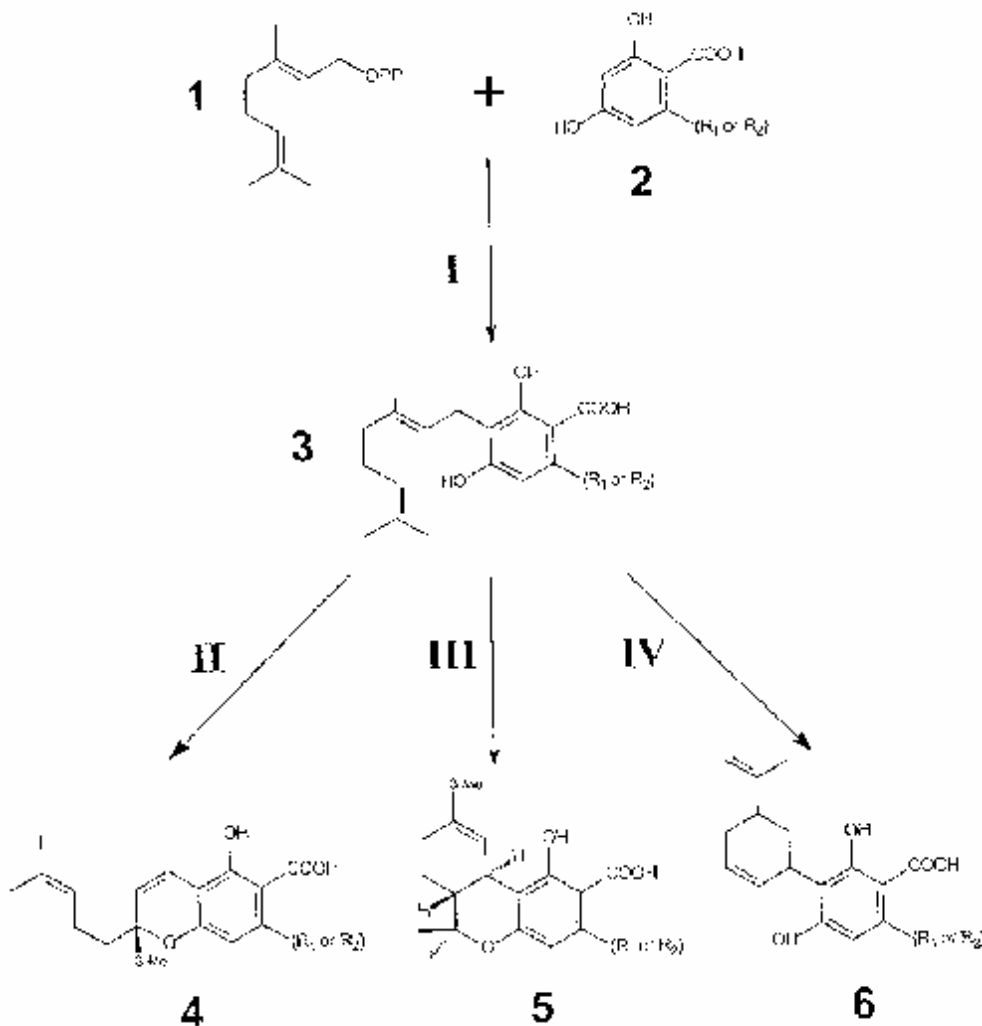
chemotyp droga – obsah THC > 0,3 % a CBD < 0,5 %,

chemotyp střední droga – obsah THC > 0,3 % a CBD > 0,5 %,

chemotyp vlákno – obsah THC < 0,3 % a CBD > 0,5 %.

Vedle těchto tří velmi častých chemotypů založených na vzájemném poměru THC a CBD, byly později popsány i jiné vzácnější, v nichž převažujícím cannabinoidem je buď THCV - chemotyp nalezený v konopí původem z Jižní Afriky nebo CBG - chemotyp identifikovaný poprvé ve Francii.

Bylo navrženo několik dalších metod pro klasifikaci konopí, které spočívají ve stanovení různých poměrů zahrnujících obsahy hlavních cannabinoidů včetně CBN. Některé novější metody jsou založeny na analýzách DNA.



Obrázek č.2: Biosyntéza cannabinoidů (1. geranylpyrofosfát, 2. kys.olivetolová, 3. CBG(V), 4. CBC(V), 5. THC(V), 6. CBD(V), I-geranylpyrofosfát: olivetolát geranyltransferáza, II- CBC(V) synthaza, III- THC(V) synthaza, IV- CBD(V) synthaza, R₁- propyl, R₂- pentyl)

3. Metody stanovení obsahu Δ^9 - THC v konopí

Ke stanovení obsahu Δ^9 - THC lze použít chromatografické metody. V případě, že chceme rozlišit kyselá a neutrální cannabinoidy, je vhodné využít buď chromatografii na tenké vrstvě nebo analýzu metodou HPLC. V současné době je ke stanovení cannabinoidů nejčastěji používána metoda plynové chromatografie s použitím detektoru FID nebo MS. Vzhledem k vysoké teplotě injektoru jsou všechny kyselá cannabinoidy dekarboxylovány a výsledek odpovídá součtu jejich neutrálních a kyselých forem.

V nařízení (ES) č. 2316/1999, článku 7b, příloze XIII je uvedena metoda GC pro kvantitativní stanovení Δ^9 -THC. Je zde popsán odběr vzorků podle toho, zda se jedná o kontrolu produkce konopí určeného na vlákno nebo zda jde o proces, kdy má být nová odrůda schválena a zapsána na seznam povolených odrůd (viz. tabulka č. 1).

Tabulka č.1: Podmínky pro odběr vzorků konopí

	Postup A	Postup B
Oblast aplikace	Kontrola produkce	Zapsání na seznam povolených odrůd
Odběry		
Velikost odebraného vzorku na každé kontrolované parcele	50 rostlin	200 rostlin
Odebíraná část rostliny	Horních 30 cm obsahujících nejméně jedno samičí květenství u každé vybrané rostliny	Horní třetina každé vybrané rostliny
Doba odběru	V období od 20. dne po začátku až do 10. dne po ukončení kvetení.	Během 10 dnů následujících po ukončení kvetení

Odebrané vzorky konopí musí být nejpozději do 48 hodin vysušeny při teplotě do 70° C. Poté jsou zbaveny stonků a semen a umlety na polojemný prášek. Takto připravený vzorek se extrahuje hexanem, s přidavkem vnitřního standardu squalanu, v ultrazvukové lázni. Po odstředění je možno supernatant nastříkovat do plynového chromatografu s detektorem FID. Pro analýzu je doporučena nepolární kapilární kolona s 5% fenylu v methyl polysiloxanové fázi. Kvantitativní vyhodnocení se provede metodou vnitřního standardu.

3.1. Návrh nového přístupu k posuzování konopí

Jak již bylo uvedeno, aby bylo možno získat finanční dotace z fondů Evropského společenství, je nutno 30% výměry konopí určeného k produkci vlákna kontrolovat přesně stanoveným způsobem, který určí jednotlivé členské státy. Hledají se proto nové možnosti, jak tuto kontrolu zjednodušit, neboť obsah Δ^9 -THC v konopí velmi závisí jak na odebírané části rostliny, tak na době odběru.

Běžně se připouští, že obsah Δ^9 -THC v samičím květenství je 2× až 4× vyšší než v listech a 2× vyšší než v celé horní třetině rostliny. Jeho obsah se mění také v průběhu vegetačního cyklu rostliny. Na počátku cyklu, kdy má rostlina jen listy, se sice obsah Δ^9 -THC postupně zvyšuje, nicméně zůstává nízký. Jakmile začne doba květu, měření prováděné na směsi listů a květenství prokáže zvýšení obsahu Δ^9 -THC. Od konce květu dochází k dalšímu zvýšení obsahu Δ^9 -THC způsobenému patrně ztrátou části listů, čímž se zvyšuje podíl květenství na rostlině. Na základě toho lze konstatovat, že relativní poměr listů a květenství u rostliny v průběhu vegetačního cyklu má velký vliv na obsah Δ^9 -THC. Z toho vyplývá, že když podmínky odběru vzorků podle postupů A a B nejsou stejné, budou se lišit i výsledky měření obsahu Δ^9 -THC podle použitého postupu. Proto je hledáno vhodnější kritérium pro posuzování psychotropního potenciálu konopí.

Částečným řešením může být návrh nové metody na posuzování obsahu Δ^9 -THC v konopí, který zavádí nový parametr - poměr obsahu Δ^9 -THC/CBD. Tento poměr je pro všechny zelené části rostliny dané odrůdy v průběhu celého vegetačního cyklu prakticky konstantní⁵⁾. Pro konopí chemotypu „vlákno“ byla navržena hodnota daného poměru menší než 0,15, čímž bude zaručeno, že obsah Δ^9 -THC v rostlině nepřesáhne povolenou hodnotu 0,2 %. Úkolem jednotlivých členských zemích EU je ověřit, zda pro jimi pěstované odrůdy, za daných klimatických a ekologických podmínek, je tato hodnota akceptovatelná.

Výhodou návrhu je, že odběr vzorků může být proveden již v době, kdy rostlina dosáhne výšky 50 cm a je možno odebírat jen malé množství rostlinného materiálu. Provádí se u reprezentativního vzorku 50 rostlin tak, že je odebrán pouze jeden list z horních 30 cm rostliny. Tento postup však může být použit pouze v případě, že se jedná o kontrolu kultivovaných ploch, osetých povolenými odrůdami konopí, tzn. alternativa k postupu A. Aby mohla být nová odrůda zapsána na oficiální seznam autorizovaných odrůd, je zapotřebí stále respektovat postup B v jeho celistvosti.

3.2. Metoda stanovení obsahu Δ^9 - THC a CBD v odrůdách konopí

3.2.1. Princip metody

Vysušený a pomletý vzorek konopí se extrahuje hexanem. CBD a Δ^9 - THC se kvantitativně stanoví metodou kapilární plynové chromatografie za použití detektoru FID.

3.2.2. Chemikálie

n- Hexan (Pestanal), pro chromatografii,

Squalan (2,6,10,15,19,23- hexamethyltetracosan), Sigma,

Δ^9 - tetrahydrocannabinol, 1mg/ ml v methanolu, Sigma,

Cannabidiol, 1mg/ ml v methanolu, Sigma,

Cannabinol, 1mg/ ml v methanolu, Sigma,

3.2.3. Přístroje a pomůcky

Zkumavky,

Vialky se šroubovacím uzávěrem, objem 2 ml,

Reakční vialky, objem 5 ml,

Automatická dávkovací pipeta, 100– 1000 μ l,

Ultraodstředivý mlýn ZM100 (síto 0,5 mm) nebo tříštivý kávomlýnek ETA 062,

Termovap TV10,

Ultrazvuková lázeň,

Odstředivka,

Plynový chromatograf Varian CP-3800 s detektorem FID,

3.2.4. Příprava vzorku

Vzorek konopí musí být nejpozději do 48 hodin po odběru vysušen do konstantní hmotnosti (obsah vlhkosti 8- 13 %) při teplotě do 70 °C. Po vysušení se uchovává bez drčení při teplotě do 25 °C na tmavém místě.

3.2.5. Příprava zkušebního vzorku

Z vysušeného vzorku se odstraní stonky a semena velikosti přes 2 mm. Pomele se tak, aby byl získán polojemný prášek (veškeré částice musí projít sítím 1 mm). Takto namletý vzorek může být skladován na suchém, tmavém místě při teplotě do 25° C po dobu nejdéle deseti týdnů.

3.2.6. Extrakce

Extrakční roztok: 35 mg squalanu (vnitřní standard) se rozpustí ve 100 ml hexanu. Do zkumavky se naváží 100 mg zkušebního vzorku, přidá se 5 ml extrakčního roztoku, obsahujícího vnitřní standard. Zkumavka se vloží do ultrazvukové lázně, kde se vzorek extrahuje po dobu 20 min. Poté se vzorek odstředuje při asi 3000 ot./min. po dobu 5 minut. Připravený supernatant se převede pomocí automatické pipety do 2 ml vialky a vloží se do automatického dávkovače GC k provedení kvantitativní analýzy.

Pro dosažení vyšší citlivosti stanovení (snížení detekčních limitů) lze supernatant s nízkým obsahem analytů zakoncentrovat.

3.2.7. Stanovení plynovou chromatografií

Analýza cannabinoidů se provede izotermálně při teplotě 260° C, s nástřikem vzorku 1 µl a splitovacím poměrem 1: 40. Při průtoku N₂ 0,4 ml/min opouští všechny sledované látky kolonu mezi 9 až 16 min. Píky cannabinoidů v analyzovaném vzorku se identifikují na základě jejich retenčních časů, porovnáním s referenčním vzorkem o známém složení.

Vyhodnocení se provede metodou vnitřního standardu z kalibrační přímkou.

Provede se tříbodová, případně pětibodová kalibrace (podle toho, zda se jedná pouze o kontrolu ploch osetých technickým konopím nebo o proces uznávání dané odrůdy)

v rozsahu 0,002– 0,5 mg/ml Δ^9 - THC a CBD v extrakčním roztoku, což pro výše popsanou metodu odpovídá obsahu 0,01- 2,5% Δ^9 - THC a CBD v reálném vzorku. Obsahy jednotlivých látek jsou automaticky vypočítávány z kalibračních závislostí pomocí softwaru Star GC Workstation v.5.51, který je základním příslušenstvím plynového chromatografu.

3.2.8. Chromatografické podmínky

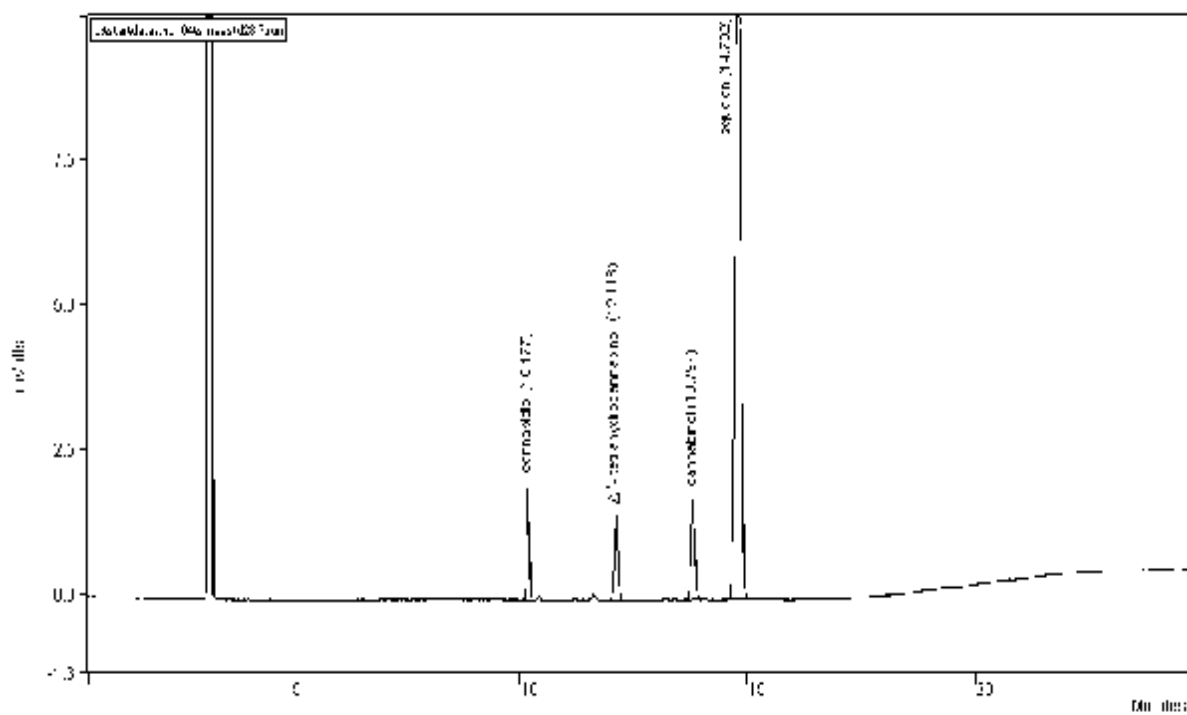
Kolona	DB5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm),
Nosný plyn	dusík,
Program.průtok N ₂	0,4 ml/ min (19 min) → 0,5 ml/ min (31 min),
Teplota injektoru	300° C,
Teplota detektoru	300° C,
Teplotní program	260° C (16 min) – 10 °C/ min – 290° C (31 min)
Nástřík	1 μl, split 1: 40

V tabulce č.2 jsou uvedeny retenční časy t_R jednotlivých cannabinoidů a jejich relativní retenční časy R_{t_r} vzhledem k vnitřnímu standardu pro výše uvedený teplotní program a kolonu. Cannabinol je zde uveden z důvodu, že jeho přítomnost může být indikátorem nesprávného skladování vzorku.

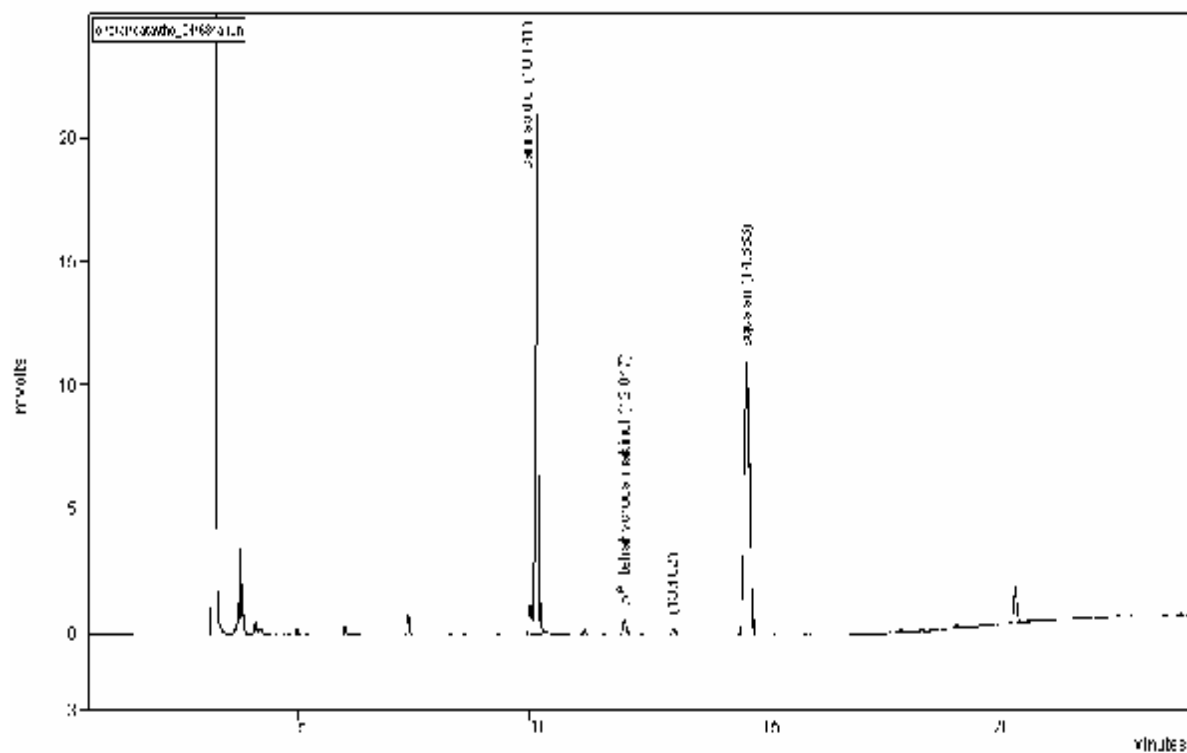
Tabulka č.2: Retenční časy a relat. retenční časy stanovovaných látek

Analyt	Zkratka	t_R (min)	R_{t_r}
Cannabidiol	CBD	10,177	0,69
Δ^9 - tetrahydrocannabinol	Δ^9 - THC	12,118	0,82
Cannabinol	CBN	13,797	0,93
Squalan		14,792	1,00

Obrázek č.3 je chromatogram se standardy základních stanovovaných cannabinoidů. Obrázek č.4 je vzorový chromatogram odrůdy Benico. U vzorku lze pozorovat nepřítomnost píku CBN, což svědčí o správnosti uchovávání vzorku před vlastní analýzou.



Obrázek č.3: Chromatogram standardů základních cannabinoidů



Obrázek č.4: Chromatogram vzorku odrůdy Benico

3.3. Ověření a částečná validace metody

Pro ověření a provedení částečné validace metody na stanovení obsahu Δ^9 - THC a CBD byly použity vzorky, dodané do naší laboratoře v rámci požadované kontroly 30% ploch, na nichž se pěstuje konopí pro produkci vlákna. Další část vzorků byla dodána odborem odrůdového zkušebnictví, který má již třetím rokem ve zkušebních pokusech polskou odrůdu Silesia. Tato odrůda byla testována na dvou stanicích společně se standardy, kterými byly odrůdy Benico a Juso 11. Celkově bylo analyzováno 25 vzorků.

Původní požadavek stanovení obsahu Δ^9 - THC byl rozšířen o stanovení obsahu cannabidiolu tak, aby mohl být stanoven poměr obsahu Δ^9 - THC/CBD (viz.kapitola Návrh nového přístupu k posuzování konopí). Vypočítané poměry pro u nás pěstované odrůdy byly porovnány s hodnotou navrženou pro odrůdy technického konopí.

Velký vliv na správnost výsledků analýz vzorků má správná a pečlivá příprava zkušebního vzorku a následné mletí. Součástí této práce bylo mimo jiné odzkoušení vhodnosti mlýnků, které jsou v současné době v naší laboratoři k dispozici. Dále byl sledován vliv doby extrakce na výsledný obsah stanovovaných látek.

Byly stanoveny hodnoty opakovatelnosti, meze detekce pro Δ^9 - THC a CBD a hodnoty nejistoty stanovení Δ^9 - THC a CBD. K ověření správnosti metody bylo použito metody standardního přídávku, neboť není komerčně dostupný vhodný CRM. Doposud také nebyly organizovány žádné mezinárodní porovnávací zkoušky zahrnující tato stanovení.

3.3.1. Mletí vzorku

Z hlediska správnosti výsledků je velmi důležité zvolit správný postup při mletí vzorku. V průběhu mletí by nemělo docházet k zahřívání vzorku a zároveň k ulpívání konopné pryskyřice na součástech mlýnku. Z uvedených důvodů je vhodný vibrační kulový mlýn (firmy Retsch, Fritsch). Tento mlýnek v naší laboratoři není k dispozici a jeho pořizovací náklady jsou vysoké.

Z mlýnků používaných v naší laboratoři byl vybrán k odzkoušení tříštivý kávomlýnek ETA 062 a ultraodstředivý mlýn ZM100 firmy Retsch. Vhodnost mlýnků byla testována na souboru 18 vzorků. Jednotlivé vzorky konopí byly rozděleny vždy na dvě části,

z nichž každá byla pomleta na příslušném mlýnku a takto připravený vzorek byl stanoven ve dvou paralelních stanoveních.

U kávomlýnku byla doba mletí jednoho vzorku rozdělena do tří částí po 20 sekundách tak, aby se zabránilo zahřátí vzorku. V případě ultraodstředivého mlýnku Retsch bylo použito kruhové síto s otvory 0,50 mm. U obou mlýnků bylo důležité, aby všechny jejich součásti byly mezi mletím jednotlivých vzorků důkladně očištěny ethanolem.

Z tabulky č.3 vyplývá, že výsledky stanovení s použitím obou mlýnků jsou prakticky srovnatelné, což bylo potvrzeno i vyhodnocením v programu EffiValidation 3.0 (Správnost - Srovnání dvou metod - t- test na rozdíl výsledků). Větší rozdíly mezi některými výsledky ve prospěch jednoho či druhého mlýnku lze vysvětlit problémy s docílením zcela homogenních vzorků (relat. poměr listů a květenství ve vzorku). Z hlediska snadné obsluhy a čištění je výhodnější použití kávomlýnku.

Tabulka č.3: Srovnání výsledků stanovení sledovaných látek při použití rozdílných mlýnků

Vzorek č.	% CBD		% D ⁹ - THC	
	kávomlýnek	Retsch	kávomlýnek	Retsch
393	0,90	0,86	0,06	0,06
394	0,54	0,48	0,08	0,09
395	1,03	0,98	0,35	0,33
396	1,24	1,04	0,32	0,30
397	1,45	1,48	0,09	0,09
398	1,02	0,76	0,11	0,09
399	1,40	1,52	0,43	0,48
400	1,11	1,27	0,58	0,81
401	1,15	1,20	0,05	0,05
402	1,17	0,92	0,06	0,05
677	0,57	0,56	0,03	0,03
678	0,22	0,24	0,01	0,01
679	0,78	0,74	0,04	0,04
680	0,29	0,28	0,01	0,01
681	1,29	1,29	0,06	0,07
682	1,15	1,04	0,06	0,05
683	1,43	1,14	0,09	0,07
684	2,31	2,15	0,11	0,10

3.3.2. Extrakce vzorku

Dalším krokem při ověřování metody bylo odzkoušení vlivu doby extrakce na výsledný obsah stanovovaných látek ve vzorku konopí. K tomuto účelu byl vybrán vzorek odrůdy Silésia, který vykazoval vyšší hodnoty obou analytů.

Do každé zkumavky bylo naváženo 100 mg zkušební vzorku a bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku. Poté byly zkumavky umístěny v ultrazvukové lázni. Doba extrakce činila v jednotlivých případech 10, 15, 20, 25 a 30 min. Pro každou z variant bylo provedeno 8 opakování. Takto připravené vzorky byly nastříknuty do GC.

Byly stanoveny obsahy Δ^9 - THC a CBD a vypočítány směrodatné odchylky pro jednotlivé doby extrakce viz. tabulka č.4. Z uvedených výsledků vyplývá, že doporučená doba extrakce 20 minut je dostačující a přesnost stanovení je zcela vyhovující.

Tabulka č.4: Porovnání vlivu doby extrakce vzorku na obsah stanovovaných látek

Doba extrakce	Obsah (%)	Měření č.								Průměr (%)	Směrod. odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.		
10 min.	THC	0,317	0,320	0,315	0,240	0,232	0,330	0,266	0,323	0,29	0,040
	CBD	0,957	0,924	0,917	0,681	0,679	0,969	0,761	0,909	0,85	0,122
15 min.	THC	0,322	0,324	0,322	0,322	0,326	0,312	0,314	0,277	0,31	0,016
	CBD	0,930	0,908	0,911	0,897	0,926	0,882	0,872	0,801	0,89	0,041
20 min	THC	0,334	0,330	0,325	0,314	0,308	0,323	0,324	0,321	0,32	0,008
	CBD	0,982	0,936	0,956	0,914	0,863	0,914	0,895	0,920	0,92	0,036
25 min	THC	0,321	0,331	0,324	0,323	0,321	0,315	0,328	0,325	0,32	0,005
	CBD	0,879	0,889	0,882	0,888	0,895	0,898	0,891	0,874	0,89	0,008
30 min.	THC	0,306	0,321	0,322	0,304	0,316	0,317	0,320	0,318	0,32	0,007
	CBD	0,853	0,900	0,918	0,864	0,884	0,890	0,892	0,860	0,88	0,022

3.3.3. Zkoncentrování vzorku

Zkoncentrování vzorku je jednou z možností, jak zlepšit detekční limity stanovovaných látek. Vložení tohoto kroku bude dále diskutováno v kapitole Meze detekce a stanovitelnosti.

Pro ověření, zda krok zkoncentrování neovlivňuje výsledky stanovení jednotlivých analytů, bylo použito 8 vzorků v běžně dostupném koncentračním rozsahu. Každý vzorek byl připraven dle základního postupu. Po provedení nástřiku do GC byl extrakt převeden do reakční vialky. Ta byla umístěna do koncentrátoru vzorků Termovapu, který byl nastaven

na teplotu 40° C. Odvod par rozpouštědla byl urychlen přívodem proudu dusíku nad hladinu roztoku. Vzorek byl zkoncentrován na objem 1 ml. Po homogenizaci v ultrazvukové lázni byl opět analyzován na GC.

Průměrné výsledky ze dvou paralelních stanovení pro oba postupy jsou uvedeny v tabulce č.5. Vyhodnocení bylo provedeno v programu EffiValidation 3.0 - Správnost - Srovnání dvou metod - t- test na rozdíl výsledků. Toto testování prokázalo, že srovnávané analytické postupy poskytují statisticky stejné výsledky.

Tabulka č.5: Srovnání výsledků stanovení bez a se zkoncentrováním vzorku

Vzorek č.	CBD %	CBD(konc.) %	D ⁹ -THC %	D ⁹ -THC(konc.)%
1	0,078	0,075	0,007	0,007
2	0,316	0,305	0,108	0,103
4	1,315	1,358	0,041	0,040
5	0,253	0,252	0,010	0,010
6	0,252	0,251	0,009	0,008
7	0,351	0,343	0,157	0,151
8	1,486	1,503	0,074	0,070
9	2,226	2,336	0,816	0,823

3.4. Stanovení validačních parametrů

3.4.1. Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení hodnot měřené vlastnosti kolem střední hodnoty, zapříčiněné působením náhodných chyb. Statistickou mírou přesnosti je směrodatná odchylka (s) resp. relativní směrodatná odchylka (s_r).

Ke stanovení hodnot opakovatelnosti byly použity výsledky paralelních měření 25 reálných vzorků konopí setého. Koncentrace Δ⁹- THC a CBD se v těchto vzorcích pohybovaly v rozsahu, který se předpokládá pro běžně pěstované odrůdy konopí setého registrované v EU. U Δ⁹- THC pak koncentrace u některých vzorků odrůdy Silesia překračovala až 3× povolený obsah této psychotropní látky.

Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0 – Opakovatelnost – Z paralelních měření. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.6.

Ze směrodatné odchylky, která charakterizuje přesnost výsledků získaných použitou analytickou metodou, lze vypočítat dovolenou diferenci paralelních stanovení, tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb^{6,7)}.

Diference dvou paralelních stanovení byla vypočítána podle vzorce

$$R = a_s \cdot s ,$$

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

Tabulka č.6: Opakovatelnost stanovení Δ^9 - THC a CBD

Stanovovaná látka	Opakovatelnost (s)	Rel. opakovatelnost (s_R) %	Diference R (s . 2,77)
Δ^9 - THC	0,00507	3,37	0,014
CBD	0,02575	2,57	0,071

Dle nařízení (ES) č.2316/1999, článek 7b, příloha XIII - stanovení obsahu Δ^9 - THC v odrůdách konopí setého, je povolen rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními 0,03%. Pro CBD není tato hodnota uvedena. Z výsledků v tabulce č.6 je patrné, že jsme danému požadavku pro stanovení Δ^9 - THC vyhověli a že stanovená opakovatelnost pro CBD v daném koncentračním rozsahu (0,1- 2,5%) je akceptovatelná.

3.4.2. Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s akceptovanou nebo deklarovanou referenční nebo vztažnou hodnotou.

V současné době není dostupný žádný CRM konopí a zároveň nejsou organizovány žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na tato stanovení. Správnost metody stanovení Δ^9 - THC byla proto ověřena metodou standardního přídávku. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0, parametr Správnost - Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici.

K tomuto účelu byl použit vzorek konopí, který vykazoval velmi nízké hodnoty obou stanovovaných látek. K výchozímu vzorku bylo přidáno známé množství standardu Δ^9 - THC a CBD. Byla připravena koncentrační řada do obsahu 0,4 % Δ^9 - THC. Takto připravené

vzorky byly analyzovány a výsledky stanovení byly zpracovány v programu EffiValidation 3.0 (viz.tabulka č.7).

Tabulka č.7: Ověření správnosti metody stanovení D⁹- THC

Popis	Přídavek (mg)	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	0,00014	-0,00061 – 0,00061	Přijata
Přídavek 1	0,05	0,0489	97,8	0,00141	0,04458 – 0,05322	Přijata
Přídavek 2	0,1	0,0989	98,9	0,00283	0,09028 – 0,10752	Přijata
Přídavek 3	0,2	0,1934	96,7	0,00495	0,17833 – 0,20847	Přijata
Přídavek 4	0,4	0,4209	105,2	0,00707	0,39938 – 0,44242	Přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

U CBD bylo provedeno kontrolní měření na stejných koncentračních hladinách jako u THC a výtěžnost stanovení se pohybovala v rozmezí od 95,5 do 90,5%.

3.4.3. Stanovení mezí detekce a stanovitelnosti

Mez detekce je hodnota, nad kterou lze odezvu vzorku věrohodně odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti je hodnota, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení.

Pro stanovení meze detekce a stanovitelnosti byl použit program EffiValidation 3.0 – Stanovení ze signálu slepého pokusu v chromatografii.

Byla vytvořena řada kalibračních standardů pro Δ^9 -THC a CBD o koncentraci 0,001 až 0,2 mg/ml extrakčního roztoku, což pro popsanou metodu představuje 0,005 – 1% stanovovaných látek v reálném vzorku. Připravené roztoky byly změřeny na plynovém chromatografu a následně byly vyhodnoceny výšky píků obou látek. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační přímka, byla vypočítána směrnice této přímky a korelační koeficient (EffiValidation 3.0 – Kalibrace). Dále bylo nutné zjistit maximální kolísání základní linie, tj. rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou šumu v intervalu, který je dán 20- ti násobkem pološířky sledovaného píku. Byly připraveny 4 slepé vzorky, které byly změřeny na GC. Po zadání požadovaného intervalu pro daný analyt, byla řídicím softwarem Star 5.5, automaticky vypočítána velikost šumu.

Ze směrnic kalibračních přímk a hodnot maximálního kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti (viz.tabulka č.8.).

Tabulka č.8: Mez detekce/stanovitelnosti pro CBD a Δ^9 - THC

2. Parametr		CBD	Δ^9 - THC
Směrnice kalibr. přímky	b_1	54137,0	38649,7
Korelační koeficient	R	0,9996	0,9999
Max. kolísání zákl.linie	h_{max} (mV)	18,00	20,25
Koncentr. na mezi detekce	x_D (mg/ ml)	0,0010	0,0016
	x_D % (m/ m)	0,005	0,008
Koncentr. na mezi stanovitelnosti	x_Q (mg/ ml)	0,0033	0,0052
	x_Q % (m/ m)	0,017	0,026

V případě potřeby kvantifikovat velmi nízké obsahy Δ^9 - THC a CBD lze detekční limity dále snížit vhodným zkoncentrováním vzorku, případně změnou teplotního programu GC docílit zvýšení odezvy stanovovaných látek.

V rámci práce na vývojovém úkolu bylo dosaženo snížení detekčních limitů vložím kroku - zkoncentrování extraktu vzorku na 1 ml. Úpravou metody se podařilo snížit hodnoty x_D/x_Q u CBD na 0,001 % resp. 0,004 % a u Δ^9 - THC na 0,002 % resp. 0,006 %.

Druhá možnost počítá se změnou teplotního programu. Metoda popsaná v nařízení (ES) č. 2316/1999 popisuje analýzu vzorku izotermně při 260° C. Zjistili jsme, že použitím teplotního programu s počáteční hodnotou 150 °C při nástřiku a následným teplotním gradientem do 260° C, lze dosáhnout zvýšení odezvy obou stanovovaných látek. Tato možnost bude ověřena během analýzy vzorků ze sklizně 2005.

Vzhledem k tomu, že našim hlavním úkolem je prokázat, že obsahy Δ^9 - THC v kontrolovaných vzorcích nepřekračují Evropskou unií předepsaný limit 0,2 %, rozhodli jsme se prozatím používat metodu v nezměněné podobě s detekčními limity x_D/x_Q u CBD 0,01 % resp. 0,02% a u Δ^9 -THC 0,01% resp. 0,03%.

3.4.4. Nejistoty stanovení Δ^9 -THC a CBD

Stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty bylo provedeno z hodnot paralelních měření jednotlivých vzorků v programu EffiValidation 3.0. Hodnoty nejistoty stanovení Δ^9 - THC a CBD jsou uvedeny v tabulce č.9.

Tabulka č.9: Hodnoty nejistoty stanovení Δ^9 - THC a CBD

Stanovovaná látka	Relativní standardní nejistota %	Relativní rozšířená nejistota % (k=1,96)
Δ^9 - THC	4,57	8,95
CBD	2,37	4,64

3.5. Vyhodnocení poměru obsahu Δ^9 -THC/CBD pro odrůdy pěstované v ČR

Součástí práce bylo i posouzení, zda pro odrůdy konopí pěstované v ČR je akceptovatelný návrh EU, že poměr Δ^9 - THC/CBD musí být menší než 0,15, čímž bude zaručeno, že obsah Δ^9 -THC v rostlině nepřesáhne povolenou hodnotu 0,2%.

Toto ověření se provádí z důvodu, že vzájemný poměr hlavních cannabinoidů závisí na genetických faktorech, nicméně jeho obsahy mohou být ovlivněny i faktory ekologickými. Genetické faktory podmiňují významnou změnu obsahu Δ^9 - THC (od faktoru 1 až do více než 1000), zatímco ekologické faktory jsou odpovědné za mnohem menší změnu (přibližně 1 – 2)⁵⁾.

V rámci vývojového úkolu byl sledován poměr obsahu Δ^9 -THC/CBD u tří odrůd:

Benico – odrůda registrovaná v ČR,

Juso 11 – ukrajinská odrůda zahrnutá ve společném katalogu odrůd EU,

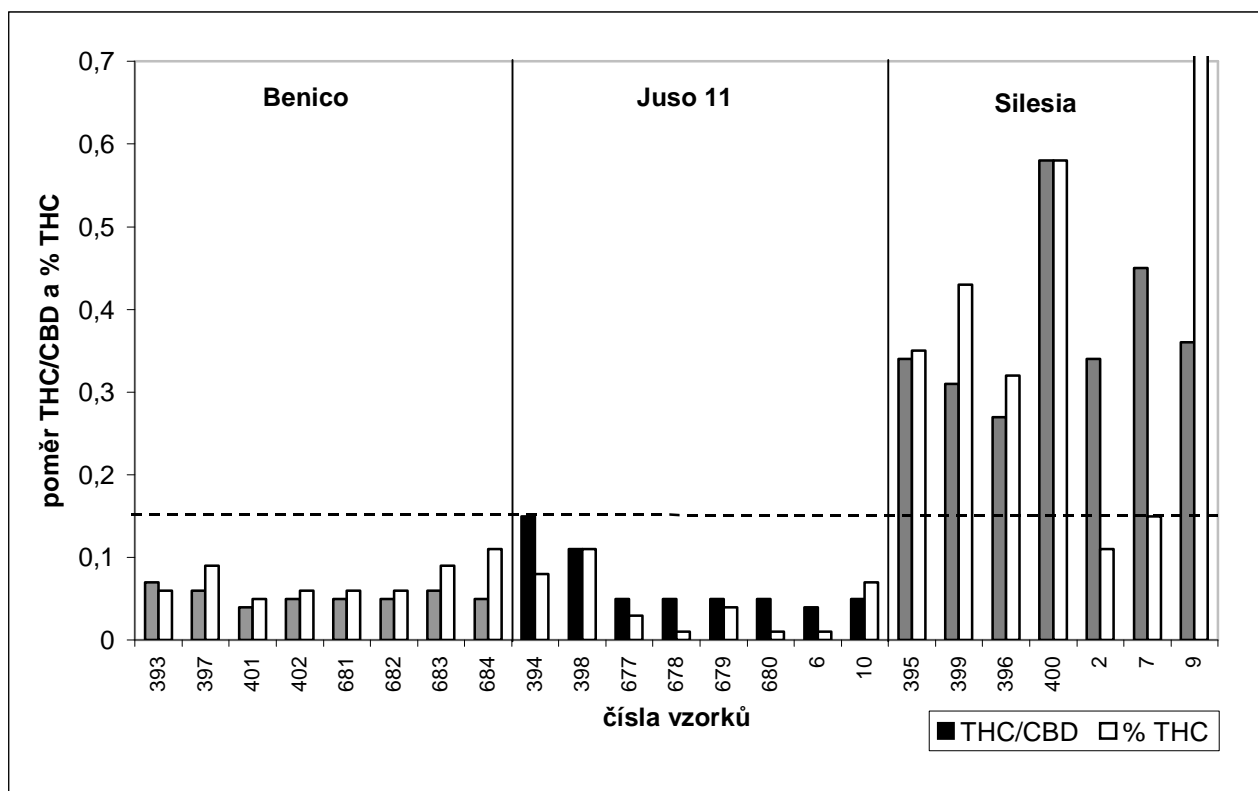
Silesia – polská odrůda, která je v registračním řízení a byla pěstována na zkušebních stanicích odboru odrůdového zkušebnictví.

Vypočítané poměry obsahů Δ^9 - THC/CBD pro kontrolované vzorky konopí jsou uvedeny dle jednotlivých odrůd v tabulce č.10. Pro posouzení, zda je splněna podmínka, že pro obsah Δ^9 - THC < 0,2% musí být hodnota poměru Δ^9 - THC/CBD < 0,15, jsou v tabulce uvedeny i hodnoty Δ^9 - THC. Z tabulky č.10 a z grafu (viz. obrázek 5) je patrné, že u odrůdy Benico

a Juso 11, které jsou v seznamu povolených odrůd EU, se obsah Δ^9 - THC pohybuje v povolených hladinách a zároveň je splněna podmínka, že poměr obsahu Δ^9 - THC/CBD je menší než 0,15. U odrůdy Silesia, která byla v registračním řízení a u níž obsahy Δ^9 - THC překračovaly povolená 0,2%, byla zároveň překročena i povolená hodnota poměru Δ^9 - THC/ CBD. U vzorků č.2 a 7, kde zkušební vzorek tvořily pouze listy této odrůdy (mají 2× až 4× nižší obsah Δ^9 - THC než samičí květenství) byl obsah Δ^9 - THC < 0,2%, ale poměr obsahu Δ^9 - THC/CBD i zde potvrdil, že se nejedná o odrůdu konopí chemotypu „vlákno“.

Tabulka č.10: Poměry obsahů D⁹- THC/CBD ve sledovaných odrůdách konopí

Odrůda	Vzorek č.	D⁹- THC (%)	D⁹- THC/CBD
Benico	393	0,06	0,07
	397	0,09	0,06
	401	0,05	0,04
	402	0,06	0,05
	681	0,06	0,05
	682	0,06	0,05
	683	0,09	0,06
	684	0,11	0,05
Juso 11	394	0,08	0,15
	398	0,11	0,11
	677	0,03	0,05
	678	0,01	0,05
	679	0,04	0,05
	680	0,01	0,05
	6	0,01	0,04
	10	0,07	0,05
Silesia	395	0,35	0,34
	399	0,43	0,31
	396	0,32	0,27
	400	0,58	0,58
	2	0,11	0,34
	7	0,15	0,45
	9	0,82	0,36



Obrázek č.5: Poměry obsahů Δ^9 - THC/CBD v porovnání s obsahem Δ^9 - THC ve sledovaných odrůdách konopí

3. Závěr

Cílem práce bylo ověřit metodu na stanovení Δ^9 - THC a CBD, tak jak je popsána v nařízení (ES) č.2316/1999, článek 7b, příloha XIII a provést její částečnou validaci.

Byla ověřena správnost postupu jednotlivých kroků přípravy vzorku konopí. Bylo prokázáno, že při navrženém postupu použití tříštivého kávomlýnku ETA nedochází k nežádoucímu rozkladu Δ^9 - THC během procesu mletí. Dále bylo ověřeno, že metodou navržená doba 20 minut pro extrakci vzorku v ultrazvukové lázni je dostatečná.

Byly stanoveny jednotlivé validační parametry v koncentračním rozsahu odpovídajícím možnostem výskytu těchto látek v reálných vzorcích. Byla splněna podmínka opakovatelnosti pro Δ^9 - THC daná příslušným nařízením. Pro CBD není tato hodnota uvedena, stanovená opakovatelnost je však pro daný koncentrační rozsah 0,1- 2,5% akceptovatelná.

Meze stanovitelnosti jsou pro Δ^9 - THC 0,03 % a pro CBD 0,02%. Pro případ nutnosti kvantifikovat velmi nízké obsahy Δ^9 - THC a CBD byla ověřena možnost snížit meze stanovitelnosti na 0,01 % u obou látek vložním kroku zkoncentrování vzorku.

Relativní rozšířená nejistota pro Δ^9 - THC byla stanovena 10% a pro CBD 5%.

Správnost metody stanovení Δ^9 - THC byla vzhledem k absenci komerčně dostupného CRM konopí ověřena metodou standardního přídatku. Následné vyhodnocení v programu EffiValidation 3.0 potvrdilo, že analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

V současné době neprobíhají žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky, byla proto navázána spolupráce s profesorem G. Fournierem (Francie), který je odborným garantem pro otázku konopí v EU. Obdrželi jsme nabídku analyzovat jejich vzorky s následným porovnáním a vyhodnocením výsledků.

V průběhu vývojového úkolu bylo potvrzeno, že u vzorků odrůd Benico a Juso 11 (jsou na seznamu povolených odrůd EU) nebyl překročen povolený obsah Δ^9 - THC a poměr obsahů Δ^9 - THC/CBD byl menší než 0,15. Bylo tak potvrzeno, že Evropskou unií navržená hodnota pro poměr obsahů Δ^9 - THC/CBD < 0,15 je pro dané odrůdy akceptovatelná.

U vzorků odrůdy Silesia (v registračním řízení), kde obsahy Δ^9 - THC překračovaly povolenou hranici, byla zvýšena i hodnota poměru Δ^9 - THC/CBD více než 2×. U dvou analyzovaných vzorků obsahujících pouze listy této odrůdy (mají 2× až 4× nižší obsah Δ^9 - THC než samičí květenství) byl obsah Δ^9 - THC < 0,2 %, ale poměr obsahu Δ^9 - THC/CBD i zde správně potvrdil, že se nejedná o odrůdu konopí chemotypu „vlákno“.

Zavedení parametru - poměr obsahu Δ^9 -THC/CBD by v budoucnu vedlo ke zjednodušení odběru vzorků a celkovému urychlení kontroly ploch osetých povolenými odrůdami konopí.

5. Literatura

1. Sladký, V.: Zásady pěstování konopí setého. Konopí, šance pro zemědělství a průmysl, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, **2004**, str.16-17
2. Situační a výhledová zpráva, Len a konopí, Ministerstvo zemědělství ČR, Praha, **2004**, str.16-17
3. Dupal, L.: Cannabinoidy: Účinné složky. Kniha o marihuaně, 2. vydání, MAŤA, Praha, **2004**, str.20 - 29
4. de Meijer E.P.M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.M.C., Ranalli P., Mandolino G.: The Inheritance of Chemical Phenotype in Cannabis sativa L..Genetics, **2003**, 163, str.335-346
5. Fournier, G., Beherec, O., Bertucelli, S.: Interet du rapport Δ^9 -THC/CBD dans le controle des cultures de chanvre industriel. Annales de Toxicologic Analytique, **2003**, XV
6. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolená diference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, **1980**
7. Vilamová, V.: Zabezpečení jakosti výsledků zkoušek, Bulletin LO 2004/2, ÚKZÚZ Brno, **2004**, str.1-19
8. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0
9. Regulation (EC) No 2316/1999, Article 7b, Annex XIII, Community method for the quantitative determination of Δ^9 -THC (tetrahydrocannabinol) content in hemp varieties