

Stanovení N-NO₃⁻ v listech cukrové řepy

DETERMINATION OF N-NO₃⁻ IN SUGAR BEET LEAVES

Ivana Varga, Darko Kerovec, Meri Engler, Brigita Popović, Zdenko Lončarić, Dario Iljkić,
Vladimir Zebec, Manda Antunović

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Science, Croatia

Největší vliv na růst a obsah sacharosy v rostlinách cukrové řepy má zejména dusík (1). Nadměrné užívání dusíkatých hnojiv v mnoha zemích ve druhé polovině 20. století mělo negativní dopady na kvalitu bulev i výtěžnost cukru (2, 3, 4). Dusík nejen ovlivňuje výnos a kvalitu řepy (5), vysoká koncentrace nitrátů může být nebezpečná i při využití řepy jako krmiva. Nitráty jsou přirozenou složkou stravy, ale jejich nadměrný obsah může působit zdravotní problémy, jako jsou cyanóza či karcinogeneze, nebo být zdrojem kontaminace životního prostředí (6, 7).

Dnes je obsah α -aminodusíku jedním ze selektivních parametrů při šlechtění cukrové řepy (8). Listy s řapíky zdravých rostlin cukrové řepy obsahují velké množství dusíku v nitrátové formě (9). Kritická koncentrace kterékoliv živiny se může měnit v závislosti na odrůdě, klimatu, půdních podmínkách, vlhkosti a výskytu chorob. Obsah dusičnanů nebo dusitanů se sleduje s ohledem na životní prostředí, zemědělství i potravinářství. Podle PARK ET AL. (10) se koncentrace dusičnanů v rostlinách obecně pohybuje v rozmezí 0,02–162 mM. HILLS A URLICH (11) uvádějí, že nejmladší listy, které právě dosáhly své maximální velikosti, jsou obvykle nejvhodnější pro odebrání vzorků; řapíky jsou

optimální pro hodnocení obsahu N, P a Cl v rostlinách, zatímco listová čepel je vhodnější pro stanovení dalších esenciálních prvků. Rozdílné hnojení dusíkem pak má za následek i jeho různý obsah v sušině řapíků (tab. I.).

HILLS A URLICH (11) určili kritické koncentrace dusíku, když se růst rostlin zpomalil ve srovnání s rostlinami majícími hodnoty mimo tyto koncentrace. Uvedení autoři stanovili rozsah obsahu dusičnanového dusíku (N-NO₃⁻) v řepných řapících, ve vzorcích z mladých vyzrálých listů, kde dosahuje 1000 ppm v sušině těchto řapíků (100 ppm v čerstvém materiálu). Stanovili dále, že rostlina může projevit symptomy nedostatku, jsou-li hodnoty N-NO₃⁻ v řapících a bulvě mezi 70–500 ppm. Standardní koncentrace v řapících se pohybuje mezi 350–35000 ppm a bulvě od 800 do 4000 ppm N-NO₃⁻.

Laboratorní stanovení dusičnanů

CARTER A JANSEN (12) zkoušeli v polních podmínkách testovat, mají-li rostliny cukrové řepy dostatečnou úroveň hnojení dusíkem. Pro určení obsahu N-NO₃⁻ v řapících autoři vybrali náhodně čtyřicet řapíků z každé pokusné plochy, přičemž vybírali z každé rostliny pouze mladé, plně vyzrálé listy. Vzorky

Tab. I. Obsah celkového N v sušině cukrové řepy při sklizni (2)

Hnojivo (kg·ha ⁻¹ N)	Listy	Řapíky	Bulva
	N v sušině (%)		
0	2,15	0,94	0,50
45	2,19	0,96	0,52
80	2,31	1,05	0,58
110	2,43	1,10	0,62
145	2,64	1,20	0,67

Tab. I. Obsah N-NO₃⁻ v sušině řapíků v průběhu vegetace (2)

Měsíc	Obsah N-NO ₃ ⁻ (mg·kg ⁻¹)
Červenec	2,15
Srpen	2,19
Září	2,31
Říjen	2,64



Obr. 1. Příprava vzorků v blokovém digesteru



byly při všech vzorkováních odebírány v pozdních ranních hodinách. Řapíky byly předány do laboratoře a rozpuleny. Pro rychlý test obsahu N-NO_3^- v čerstvé tkáni bylo použito dvacek náhodně vybraných polovin řapíků od čepelí a dvacet polovin řapíků od bulev. Zbylé poloviny byly rozřezány na přibližně 3mm díly a rozmixovány. Polovina takto získaného vzorku byla poté vysušena v peci při 50 °C a druhá polovina byla lyofilizována (vysušena mrazem). Vysušené vzorky byly rozmělněny, přesáty a použity pro stanovení N-NO_3^- . Obsah N-NO_3^- v řapících byl určen dvěma různými metodami. Výše uvedený rychlý test čerstvé tkáně listů byl proveden společností vyrábějící hnojiva běžně používanými komerčními metodami. Obsah nitrátového dusíku ve vzorcích sušených v peci a mrazem byl určen s použitím vodného roztoku fenodisulfidické kyseliny z extraktu vzorků. Dnes se v laboratořích např. pro stanovení celkového dusíku používá Dumasova metoda. Ta slouží pro rychlé stanovení obsahu proteinů v potravinách, které se zjišťují při úplném spálení vzorku určením celkového N na základě tepelných vodivostí dusíku a helia (13).

Stanovení N-NO_3^- systémem Reflectoquant

V nedávné studii použili VARGA ET AL. (14) pro analýzu nitrátů v řapících systém Reflectoquant® jako rychlou testovací metodu. Obsah dusičnanů byl stanoven v čerstvé tkáni řapíků po jejich oddělení od listové čepele. Protože se systém Reflectoquant využívá pro stanovení obsahu dusičnanů v zelenině, byla autory pro vzorky řapíků cukrové řepy použita hmotnost doporučená pro stanovení dusičnanů uvedenou metodou v kozlíčku polním (*Valerianella locusta*). Koncentrace v řapíku byla určena reflektometricky po redukci na dusičnany a reakci s Griessovým činidlem. Vzorky čerstvého materiálu řapíků byly

homogenizovány v mixéru. Z homogenního vzorku bylo naváženo 5 mg hmoty, která byla vložena do kádinky a doplněna deionizovanou vodou na 50 ml. Obsah kádinky byl pod hodinovým sklíčkem vařen 15 minut. Ochlazené vzorky pak byly přefiltrovány přes filtrační papír do odměrné baňky a doplněny na konečný objem (100 ml) deionizovanou vodou. Z každého vzorku bylo 10 ml umístěno na čisté a suché laboratorní sklo. Pro analýzu byly použity testovací proužky Reflectoquant firmy Merck pro 3–90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NO_3^- . V případě, že se naměřená hodnota pohybovala byla nad 90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NO_3^- , byl vzorek (10 ml) dále zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:2 nebo 1:3, což bylo v dalším stanovení zohledněno.

Po kalibraci byl testovací proužek Reflectoquant ponořen na 2 sekundy (stisknutím tlačítka Start na reflektometru) do vzorku o teplotě 15–30 °C. Přebytek kapaliny z proužku byl absorbován papírovým ručníkem a po 60 sekundách byl proužek vložen do reflektometru pro měření hodnoty ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Obsah dusičnanů byl vypočítán ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$):

$$\text{Obsah N-NO}_3^- = \frac{\text{naměřená hodnota (mg}\cdot\text{l}^{-1}) \times \text{objem vody (ml)}}{\text{hmotnost vzorku (g)}}$$

HILLS A URLICH (11) uvádějí, že řapíky zralých listů rostlin infikovaných virovou žloutenkou mohou mít vyšší obsah N-NO_3^- než rostliny zdravé, protože nemocné rostliny rostou pomaleji a nitráty se tak v jejich řapících akumulují.

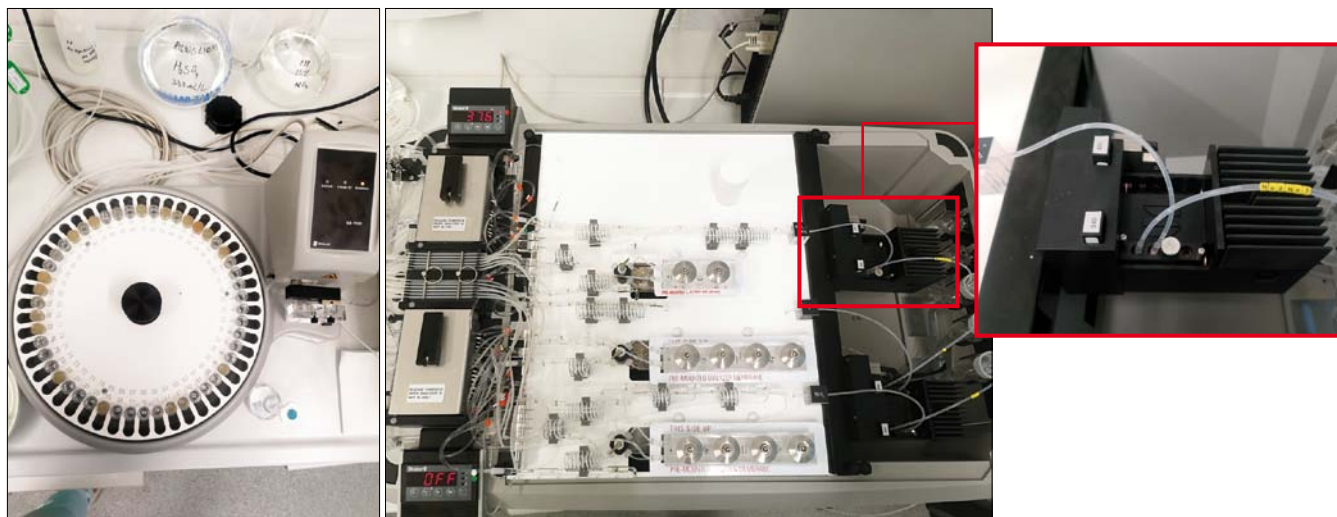
Stanovení N-NO_3^- kontinuální průtokovou analýzou (CFA)

Obecně je pro případy složitější manipulace se vzorkem a delší reakční doby podstatně výhodnější analýza kontinuální průtokové (CFA) s ohledem na rychlost stanovení, spotřebu činidla

Tab. III. Obsah N-NO_3^- v čerstvé tkáni řapíků v průběhu vegetace (14)

Hnojení N	30. 5.	20. 6.	10. 7.	30. 7.	20. 8.	10. 9.	Průměr
	Obsah N-NO_3^- v řapících řepy ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)						
Kontrola (0)	291,67	1 043,33	265,83	105,83	82,50	51,17	307,72
45 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ N	368,33	1 437,50	286,67	185,83	130,83	67,00	412,69
99 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ N	300,00	1 709,17	408,33	244,17	80,83	71,17	468,94
Průměr	320,00	1 396,67	320,28	178,61	98,05	63,11	396,45

Obr. 2. Přístroj CFA (Skalar): vlevo – zásobník na vzorky; uprostřed – vlastní přístroj; vpravo – hlavní část pro spektrofotometrické stanovení $N-NO_2^-$ a $N-NO_3^-$



a požadovanou velikost vzorku (15). CFA lze použít rovněž ke stanovení $N-NO_3^-$ v řapících nebo listech řepy. U této metody je třeba suchý rostlinný vzorek štěpit na blokovém digesteru (obr. 1.b, Kjeldigester Büchi), k tomu se jako činidlo používá kyselina sírová a peroxid vodíku (30%). Vysušené řapíky cukrové řepy musí být zváženy, aby byl získán 1 g rostlinného materiálu (obr. 1.a), který je poté vložen do zkumavky. Do každé zkumavky (300 ml) se přidá 5 ml směsi činidel (4% $HClO_4$ v H_2SO_4) a poté 10 ml 30% peroxidu vodíku, vše se ponechá přes noc. V blokovém digesteru se zkumavky zahřívají po dobu 1 hodiny na $360\text{ }^\circ\text{C}$ (obr. 1.b). Poté se zchlazené, vyčištěné kapalné vzorky (obr. 1.c) přefiltrují, přenesou do baňky a doplní se do 100 ml destilovanou vodou (obr. 1.d.).

Další postup práce se vzorky (po blokovém digesteru) spočívá v následujícím: Je třeba vzorky protřepat po dobu 30 minut s destilovanou vodou a před vložením do vzorkovacích nádobek přefiltrovat. Pak je lze použít ke stanovení $N-NO_3^-$ metodou CFA. Zařízení (obr. 2.) je propojeno s počítačem. Vlastní přístroj CFA odebírá chemikálie a dávkuje, kolik je potřeba (přístroj automaticky koriguje nestejný průtok trubičkami). Zásobník vzorků má 96 položek (obr. 2., vlevo). Na 4. místě je standardní vzorek, který zůstává stejný, aby se zařízení samo kalibrovalo. Obsah nitrátů je měřen ve speciální části, do které jsou přiváděny chemikálie i vzorky a jsou zahřívány na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Systém je odebírá přes membránu, která vzorky čistí. Uvnitř zařízení je malý spektrofotometr, který měří při vlnové délce 540 nm.

Závěr

V současnosti se obsah $N-NO_3^-$ v cukrové řepě většinou stanovuje pomocí přístroje CFA, který se hodí pro větší počet vzorků. Rychle však lze obsah nitrátů v listech cukrové řepy (řapících, čepelích i celých listech) určit pomocí systému Reflectoquant. To je zvláště důležité v případě využívání chrástu jako krmiva pro zvířata. CFA vyžaduje kvalifikovanou obsluhu a podstatnou složkou je příprava činidel. Na rozdíl od toho nevyžaduje systém Reflectoquant žádnou přípravu speciálních reagentů, potřeba je pouze rostlinný materiál a testovací proužky firmy Merck. Obě metody tak jsou pro stanovení $N-NO_3^-$ důležité.

Příspěvek je výsledkem výzkumu v rámci projektu K.01.1.1.04.0052 „Innovative production of organic fertilizers and substrates for growing“ seedlings financovaným Evropskou unií v rámci operačního programu Competitiveness and Cohesion 2014–2020 z Evropského fondu pro regionální rozvoj (ERDF).

Souhrn

Aby dosáhla vysokých výnosů a dobré jakosti bulev, má cukrová řepa značné požadavky výživu makro i mikroprvky. Dusíkatá hnojiva jsou obvykle aplikována do půdy před setím na jaře. Nitráty jsou přítomné v životním prostředí, vzduchu, potravinách (převážně v ovoci a zelenině) i vodě, používají se také jako hnojiva v zemědělství. Dusík rovněž ovlivňuje kvalitu řepných bulev. Listy, a to čepel i řapíky, cukrové řepy jsou důležité pro určení dynamiky živin a výživového stavu rostlin. Stanovení dusičnanů je zvláště důležité také v případě zkrmování chrástu. Článek popisuje metody stanovení obsahu dusičnanů v listech cukrové řepy (Reflectoquant a CFA).

Klíčová slova: $N-NO_3^-$, analýza, cukrová řepa, řapíky.

Literatura

- VARGA, I. ET AL.: Dynamics of sugar beet root, crown and leaves mass with regard to plant densities and spring nitrogen fertilization. *Poljoprivreda*, 26, 2020 (1), s. 32–39.
- DRAYCOTT, A. P.; CHIRSTENSON, D. R.: *Nutrients for sugar beet production. Soil plant relationship*. Trowbridge: CABI Publishing, 2003, 272 s.
- KRISTEK, S. ET AL.: Primjena nitrofikisiraćujćih bakterija u cilju redukcije mineralnih dušićnih gnojiva u uzgoju šećerne repe. *Poljoprivreda*, 26, 2020 (2), s. 65–71.
- RADOĆAJ, D., ET AL.: Remedijacija poljoprivrednoga zemljišta onećišćenog tešćim metalima. *Poljoprivreda*, 26, 2020 (2), s. 30–42.
- POŠPIŠIL, M. ET AL.: Prinos i kvaliteta korijena istraživanja hibrida šećerne repe u sjeverozapadnoj Hrvatskoj u razdoblju od 2010. do 2013. godine. *Poljoprivreda*, 22, 2016 (2), s. 10–16.
- MERINO MAGARIÑO, L.: *Analysis of nitrite and nitrate in foodstuffs-Method development, occurrence, regulation, metrological aspects and exposure*. Universitat de València. Doctoral tesis, 2017.
- NOVOSELEC, J. ET AL.: Biofortifikacija krmiva mikroelementima u hranidbi domaćih životinja. *Poljoprivreda*, 24, 2018 (1), s. 25–34.



8. MÄCK, G.; HOFFMANN, C. M.; MÄRLÄNDER, B.: Nitrogen compounds in organs of two sugar beet genotypes (*Beta vulgaris* L.) during the season. *Field Crops Research*, 102, 2007, s. 10–218.
9. MURPHY, L. S.; SMITH, G. E.: Nitrate Accumulations in Forage Crops. *Agronomy journal*, 59, 1967 (2), s. 171–174.
10. PARK, Y. H. ET AL.: Continuous-Flow Analysis for Determination of Nitrate Using Hydrazine-Copper Method in Plan. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 39, 2006 (4), s. 204–208.

11. HILLS, F. J.; URLICH, A.: Plant analysis as a guide for mineral nutrition of the sugar beets. In REISENAUER, H. M (ED.): *Soil and plant-Tissue Testing in California*. University of California, Division of Agricultural Sciences, 1978, 54 s.
12. CARTER, J. N.; JANSEN, M. E.: Changes in nitrate-nitrogen concentration in sugar beet petioles as influenced by irrigation and fertilizer practices. In *Proc. 18th Ann. Pac. NW Fert. Conf.*, USA, ID, Twin Falls, 1967, s. 131–142.
13. ŠEBEČIĆ, B.; BALENOVIĆ, J.; NUKIĆ, A.: A rapid, simple and ecologically acceptable method for food protein determination. In *25. stručni sastanak Sekcije za zdravstvenu ekologiju*. 1998, January.
14. VARGA, I. ET AL.: Changes of nitrate nitrogen in sugar beet petioles fresh tissue over the season regard to nitrogen fertilization and plant population. *Listy cukrov. řepář.*, 136, 2020 (5–6), s. 198–204.
15. SNYDER, L. R.: Continuous-flow analysis: present and future. *Analytica Chimica Acta*, 114, 1980, s. 3–18.

Varga I., Kerovec D., Engler M., Popović B., Lončarić Z., Ijkić D., Zebec V., Antunović M.: Determination of N-NO₃⁻ in Sugar Beet Leaves

To achieve high yields and high-quality roots, sugar beet has high requirements for both macro and micronutrients. Nitrogen fertilizers are usually applied in the soil before sowing in spring. Nitrates are not only present in the environment, i.e. in the air, food (mostly in fruits and vegetables) and water but they are also used as fertilizers in agriculture. Nitrogen also affects the quality of beet roots, and both the leaves and petioles of sugar beet are important in determining the dynamics and nutritional status of the plants. Nitrate determination is also important when sugar beet leaves and tops are used as fodder. This article describes general determination of nitrate in sugar beet leaves (Refletoquant and CFA).

Key words: N-NO₃⁻, determination, sugar beet, petioles.

Kontaktní adresa – Contact adress:

doc. dr. sc. Ivana Varga, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek, Croatia, e-mail: ivana.varga@fazos.hr