

POROVNÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ ERGOSTEROLU A JEJICH VYUŽITÍ PŘI ANALÝZE PŮDY PODHORSKÉ PASTVINY

JIRÍ JIROUT^{a,b}, JAN TRÍSKA^c, KAMILA RUŽICKOVÁ^c, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ^c, MILOSLAV ŠIMEK^{a,b} a DANA ELHOTTOVÁ^a

^a Ústav půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, ^b Katedra biologie ekosystémů, řirodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^c Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, jirut.jiri@email.cz, triska@usbe.cas.cz, ruzickova@usbe.cas.cz, nada@usbe.cas.cz, misim@upb.cas.cz, danael@upb.cas.cz

Došlo 8.6.09, přepracováno 25.1.10, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: ergosterol, GC-MS-MS, HPLC, GC-FID, biomasa hub, půda, skot

Úvod

Současné znalosti o mikrobiálních společenstvech v půdách naznačují, že z celkového množství mikroorganismů v přírodních vzorcích je obvykle možné kultivovat méně než 1 % všech mikroorganismů¹. Pro detekci a identifikaci všech mikroorganismů, včetně nekultivovatelných, byly vyvinuty metody založené na detekci buněčných markerů, z nichž některé jsou specifické pro určité skupiny mikroorganismů². Ergosterol se považuje za jeden z vhodných markerů biomasy živých saprotrfních hub³, protože je hlavním strukturním steroidem fosfolipidické dvojvrstvy houbové buněčné stěny^{4–7}. Stanovení ergosterolu jako buněčného markeru pro určení biomasy hub bylo přijato jako spolehlivá, robustní a relativně levná metoda sledování biomasy hub v půdních ekosystémech^{8–13}.

Ergosterol, stejně jako další lipidické látky, je snadno extrahovatelný z přírodních vzorků pomocí nepolárních organických rozpouštědel¹⁴. Koncentrace ergosterolu se dosud nejčastěji stanovovala metodou HPLC⁹. Během HPLC mohou ale společně s ergosterolem koeluovat i další látky, které znesnadňují vlastní stanovení ergosterolu^{10,15,16}. Nověji zavedené metody GC-MS analýzy řeší tyto problémy díky vysoké účinnosti separace zkoumaných látek moderními kapilárními kolonami a nabízejí tak lepší selektivitu při detekci biomarkerů v přírodních materiálech a vzorcích¹⁴.

Cílem práce bylo nalézt citlivou metodu pro stanovení ergosterolu a tuto metodu porovnat v rámci metod používaných v mikrobiální ekologii – GC-FID, GC-MS-MS, HPLC a vyvinutou metodu následně použít pro stanovení biomasy hub v půdních vzorcích podhorské pastviny ovlivněné skotem.

Materiál a metody

Použité chemikálie a přístroje

Zásobní roztok ergosterolu (Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci 500 ng μl^{-1} byl připraven vždy těsně před analýzami navážením a rozpuštěním v *n*-hexanu, případně v methanolu. Oba typy standardů byly naředěny příslušným rozpouštědlem pro získání kalibrační křivky v rozsahu 1 až 200 ng μl^{-1} . Roztok nederivatizovaného ergosterolu o koncentraci 100 ng μl^{-1} v *n*-hexanu byl použit jako vnější standard pro GC-FID a GC-MS-MS měření, zatímco roztok ergosterolu o koncentraci 100 ng μl^{-1} v methanolu byl použit jako vnější standard pro HPLC analýzu. Použitá rozpouštědla měla stupeň kvality LiChrosolv[®] a čistotu $\geq 99,8$ % (methanol, acetonitril), resp. ≥ 98 % (*n*-hexan) (Merck KGaA, Německo).

Linearita odpovědi na různé koncentrace standardu ergosterolu v rámci kalibrační křivky byla testována na třech přístrojích:

- 1) GC-FID (HP 5890 series II) – plynový chromatograf s plamenově-ionizačním detektorem a kapilární kolonou Zebron ZB-5ms (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm ; Phenomenex, USA) s těmito parametry analýz: nosný plyn helium o konstantním vstupním tlaku 150 kPa, počáteční teplota kolony 60 °C (1 min), dále teplotní program 15 °C min^{-1} do 200 °C a následně 2,5 °C min^{-1} do 275 °C, na této teplotě prodleva 15 min. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem ClarityTM (Data APEX).
- 2) Finnigan GCQ[®] (ThermoQuest) – plynový chromatograf v kombinaci s hmotnostním detektorem typu iontové pasti a kapilární kolonou Zebron ZB-5ms (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm , Phenomenex, USA) s těmito parametry: nosný plyn helium s konstantní vstupní rychlostí 40 cm s^{-1} , teplota nástřiku 250 °C, počáteční teplota kolony 60 °C, dále teplotní program 20 °C min^{-1} do 200 °C, poté 4 °C min^{-1} do 275 °C a na této teplotě prodleva 20 min. Hmotnostní spektrometr pracoval ve dvou režimech: skenování v plném rozsahu *m/z* 50–500 Da („full scan“) a režim MS-MS, při kterém byl vybrán jako prekurzorový ion molekulový ion ergosterolu o *m/z* 396 Da. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem Xcalibur (Finnigan Corp.).
- 3) HPLC s detektorem s diodovým polem (DAD) (Agilent 1100 Series G1315B) a kolonou Gemini C18, 110A (5 μm , 2 $\times$ 150 mm; Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril : voda

(90:10) o konstantním průtoku 0,41 ml min⁻¹, DAD detektor pracoval v rozsahu vlnových délek 200 až 600 nm. Ergosterol byl detegován při vlnové délce 282 nm. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem ChemStation (Hewlett Packard).

Příprava vzorků a chemická analýza

Půdní vzorky byly odebrány v květnu 2008 z podhorské pastviny používané jako zimoviště skotu (Borová u Chvalšín, Jihočeský kraj)¹⁷. Zimoviště skotu představuje ekosystém silně ovlivněný aktivitou dobytka¹⁸. V rámci vybraného zimoviště byly zkoumány půdy na plochách s různou mírou zátěže paseným skotem, tj. silně ovlivněná (S) a středně ovlivněná (M) půda, které byly porovnány s neovlivněnou půdou podhorské pastviny (C)^{19,20}. Půdní vzorky byly z každé plochy odebrány ve třech nezávislých opakováních. Každé opakování sestávalo ze tří podvzorků, které byly zhomogenizovány přesátím (síta 4 mm) a smíchány. Půdy byly do analýzy skladovány při 4 °C. Koncentrace celkového dusíku (N_{tot}) byla stanovena Kjeldahlovou mineralizační metodou²¹, koncentrace organického uhlíku (C_{ox}) metodou spalování²² a koncentrace dostupného P (P_{av}) metodou Mehlich III (cit.²³).

Extrakce ergosterolu

Celkový ergosterol byl extrahován z 250 mg půdy použitím modifikované metody mikrovlnné extrakce (MAE, microwave assisted extraction) podle Montgomeryho a spol.¹⁰. K půdě ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem byly přidány 2 ml methanolu a 0,5 ml 2M-NaOH. Naplněné zkumavky byly zahřívány v mikrovlnné troubě po dobu 2 × 20 s na střední výkon (cca 500 W) s 10minutovou pauzou mezi zahříváními. Následně byly zkumavky ochlazeny pod tekoucí vodou a obsah zkumavek byl zneutralizován 1 ml 1M-HCl; byly přidány další 2 ml methanolu a ergosterol byl extrahován *n*-hexanem (3 × 2 ml). Celkový extrakt byl odpařen do sucha dusíkem a rozpuštěn v 200 µl *n*-hexanu.

Klasická metoda extrakce ergosterolu¹⁰ spočívala v promíchání 8 g půdy s 30 ml methanolu (2×), výsledný extrakt byl smíchán s 50 ml ethanolu a 1,6 g KOH a následně zahříván po dobu 30 min. Po ochlazení byl ergosterol extrahován 3 × 50 ml hexanu, výsledný extrakt byl odpařen do sucha na rotační odparce a odparek byl rozpuštěn v 1 ml hexanu. Vzorky byly derivatizovány acetanhydridem při teplotě 60 °C po dobu 60 min za přítomnosti suchého pyridinu¹⁴.

Před samotnými analýzami byl vzorek získaný metodou MAE rozdělen na dvě poloviny. Z první poloviny byl 1 µl vzorku v hexanu nanesen do injektoru GC-FID nebo GC-MS-MS. Pro HPLC byl *n*-hexan z druhé poloviny vzorku odfoukán proudem dusíku a nahrazen stejným objemem methanolu; 5 µl vzorku v methanolu bylo nanášeno do injektoru HPLC.

Statistické analýzy

Získaná data byla analyzována softwarem STATISTICA 6 (StatSoft, Inc., USA). Pro hodnocení statistické významnosti rozdílu mezi půdami byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA) s Tukey HSD post-hoc srovnáním. Pearsonova korelace (Pearson *r*) byla použita pro definici závislosti koncentrace ergosterolu na vybraných chemických parametrech. Hladina významnosti byla $\alpha \leq 0,05$.

Výsledky a diskuse

Příprava vzorků

V rámci předběžného pokusu bylo zjištěno, že derivatizace nepřinesla zlepšení vlastností ergosterolu pro detekci metodou GC-MS-MS, a to jak u vnějšího standardu, tak v případě analyzovaného půdního vzorku. Derivatizace se běžně využívá pro chemickou úpravu molekul analytu za účelem zlepšení vlastností analyzovaných látek. Tímto postupem lze zvýšit separační účinnost, rozlišení a citlivost při detekci biomarkerů^{14,16}. Nicméně v tomto případě byly chromatografické píky standardu i hledaného analytu v půdním vzorku i při vynechání derivatizačního kroku souměrné a dobře separované. Zároveň u derivatizovaných vzorků nebylo dosaženo zvýšení citlivosti detekce.

Oproti klasické metodě extrakce, při níž je návratnost ergosterolu z půdních vzorků 70 až 95 %, vykázala metoda mikrovlnné extrakce (MAE) jak vyšší návratnost ergosterolu (90 ± 6 %), tak zároveň nižší variabilitu. Variační koeficient (CV) byl v případě MAE 13 %, zatímco u klasické metody téměř trojnásobný (CV = 36 %).

Metoda MAE je také ekonomičtější a méně zatěžuje životní prostředí. Při použití MAE se používá pouze 10 ml organických rozpouštědel, zatímco při použití klasické metody extrakce je objem organických rozpouštědel větší než 250 ml (cit.¹⁴). Proto jsme se rozhodli používat při dalších analýzách výhradně metodu MAE urychlenou vynecháním derivatizačního kroku.

Analýza GC-FID

Detekční limit metody GC-FID byl při použití čistého roztoku standardu ergosterolu 10 ng µl⁻¹. Za daných podmínek a ve stanoveném rozsahu kalibrační křivky byla linearita odezvy detektoru horší než v případě GC-MS-MS a HPLC (odezvu lépe vystihuje kvadratická funkce ($r = 0,9944$) než lineární ($r = 0,9809$)). Vzhledem k vyššímu detekčnímu limitu metody lze říci, že GC-FID není příliš vhodná metoda pro stanovení ergosterolu v případě nízkých navážek používaných při metodě mikrovlnné extrakce MAE. Při použití vyšších navážek půdy je nutné používat větší objemy organických rozpouštědel a ztrácí se tak ekonomická i ekologická výhodnost MAE metody. Druhou nevýhodou tohoto stanovení je skutečnost, že retenční čas (t_R) je jediným parametrem pro identi-

fikaci látky. Retenční čas však není natolik přesnou charakteristikou, aby bylo možné pouze na jejím základě nalézt a identifikovat zkoumanou látku v přírodních vzorcích.

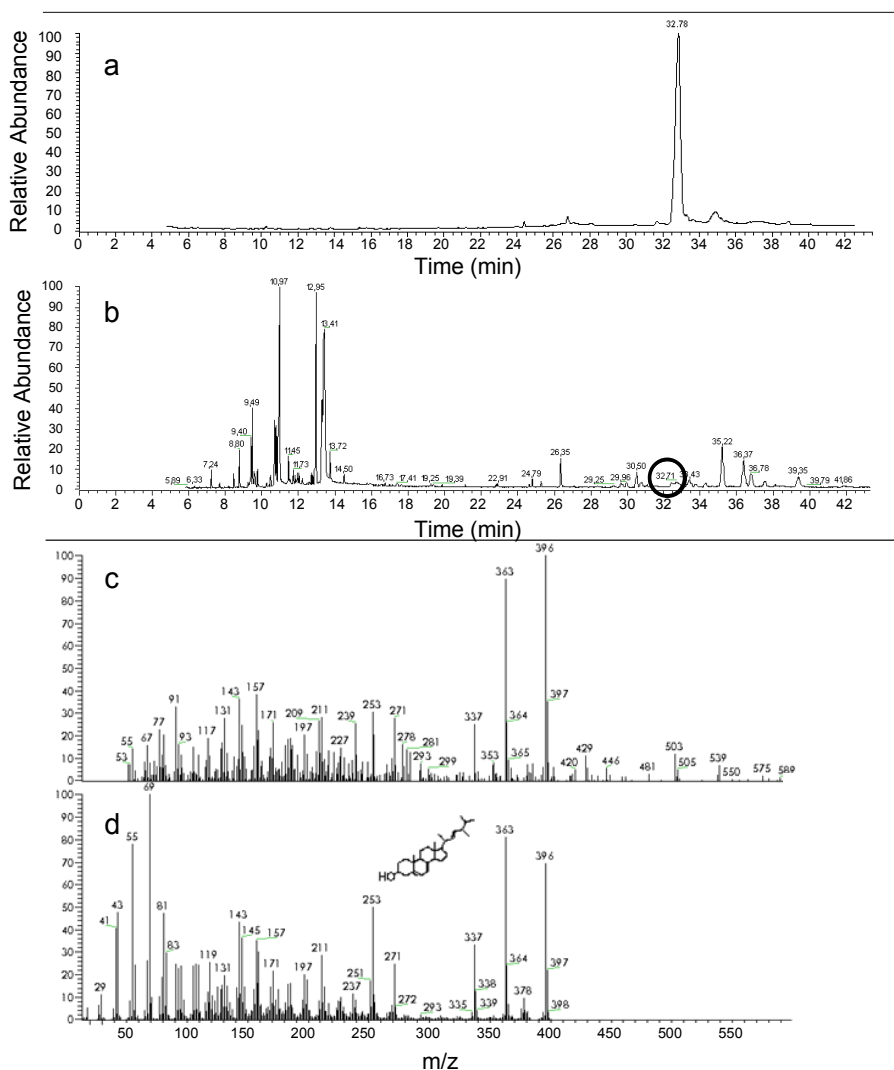
Analýza GC-MS-MS

Detekční limit metody GC-MS-MS za použití čistého ergosterolu byl $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. V případě GC-MS-MS byla odezva detektoru lineární v celém rozsahu kalibrační křivky. Rovnicí kalibrační křivky ($y = 12476x + 28200$; $r = 0,9980$) je vyjádřena závislost plochy píku ergosterolu (y) na jeho koncentraci (x) [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$].

Celkový iontový chromatogram (TIC, total ion chromatogram) standardu ergosterolu stanovený v režimu „full

scan“ je zobrazen na obr. 1a. Retenční čas (t_R) pro standard ergosterolu byl $32,8 \pm 0,15$ min. Následovalo měření půdních vzorků v režimu „full scan“, v tomto případě byla nalezena látka s t_R odpovídajícím ergosterolu ($32,8 \pm 0,17$ min) (obr. 1b). Identifikace ergosterolu byla provedena porovnáním hmotnostního spektra látky nalezené v půdním vzorku (obr. 1c) se spektrem v knihovně spekter Xcalibur NIST (obr. 1d).

Hmotnostní spektra látek identifikovaných jako ergosterol v půdních vzorcích (tj. látek s $t_R = 32,8 \pm 0,17$ min) obsahovala všechny důležité ionty pro identifikaci hledaného analytu. Selektivní režim MS-MS byl proto charakterizován specifickým retenčním oknem a vybraným prekurzorovým iontem (molekulární ion ergosterolu m/z 396 Da), čímž došlo k odfiltrování látek nesouvisejících



Obr. 1. Celkový iontový chromatogram (TIC) GC-MS vnějšího standardu (ergosterol, Sigma-Aldrich, $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) s $t_R = 32,78$ min (a) a TIC půdního vzorku (t_R hledané látky = $32,71$ min) (b). Srovnání hmotnostního spektra hledané látky (c) s hmotnostním spektrem ergosterolu v knihovně spekter Xcalibur NIST (d). Měřeno na přístroji Finnigan GCQ[®] (ThermoQuest) v režimu „full scan“, podmínky stanovení jsou uvedeny v textu

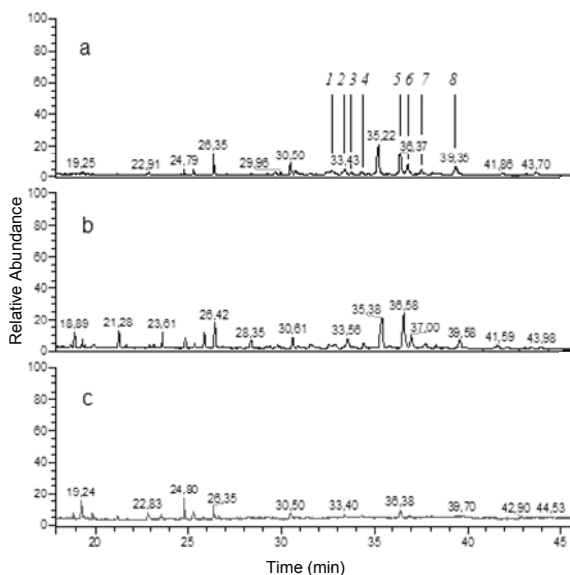
cích se stanovením a samotné měření ergosterolu tak bylo citlivější a přesnější. Obr. 2c a 2d ukazují podobnost rozpadového hmotnostního spektra v rozsahu m/z 100–396 Da u prekurzorového iontu z látky v půdním vzorku (obr. 2a) a ve standardu (obr. 2b). Toto porovnání bylo použito jako další důkaz identifikace ergosterolu v půdních vzorcích.

Během analýzy GC-MS v režimu „full scan“ jsme zaznamenali další píky v TIC půdních vzorků (obr. 3). Látky odpovídající těmto píků byly identifikovány na základě hmotnostních spekter a pomocí příslušných standardů jako kampesterol ($t_R = 33,40$ min), stigmasterol ($t_R = 34,33$ min) a β -sitosterol ($t_R = 36,37$ min) (tři nejčastější fytosteroly v půdě^{24,25}), případně ergostanol a sitostanol ($t_R = 36,78$ min), což jsou steroly biohydrogenované mikroflórou z trávicího traktu zvířat²⁵. Dále jsme zjistili, že nejen počet látek v profilu sterolů, ale také jejich relativní množství ve vzorcích bylo vyšší v půdách zatížených skotem (S a M) ve srovnání s neovlivněnou půdou (C). Přítomnost fytosterolů a příslušných stanolů v půdách S a M je výsledkem zpracování rostlinné stravy pasenými zvířaty a následným vyloučením ve formě exkrementů na povrch půdy na zatížených částech zimoviště skotu²⁵. β -Sitosterol se vyskytoval nejen v TIC půdních vzorků, ale byl detegován i během selektivního režimu MS-MS (obr. 3a). Vysvětlením detekce tohoto sterolu může být přítomnost prekurzorového iontu ergosterolu (m/z 396 Da) ve fragmentačním spektru β -sitosterolu a poměrně široké retenční okno.

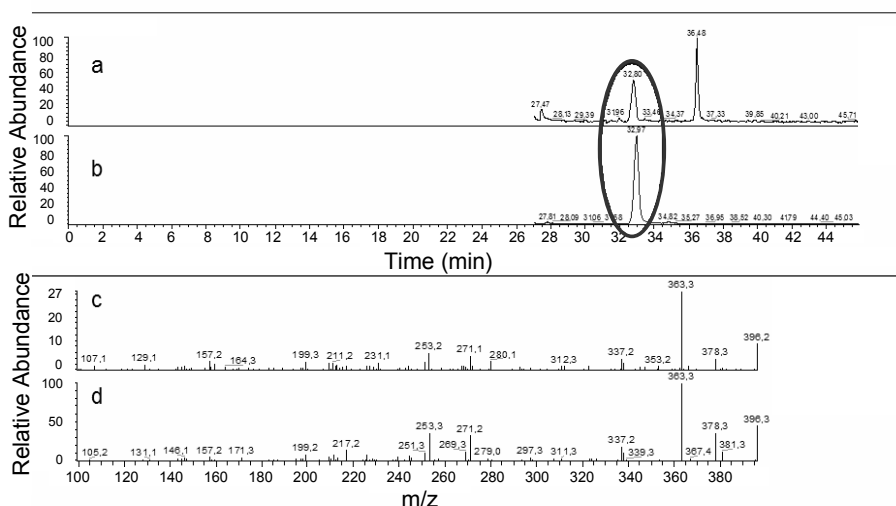
Analýza HPLC

Detekční limit pro metodu HPLC za použití čistého ergosterolu byl srovnatelný s GC-MS-MS, tj. $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

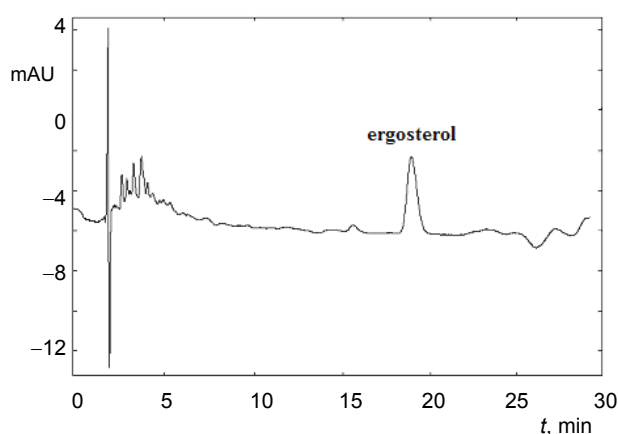
Odezva detektoru byla v celém rozsahu kalibrační křivky lineární a rovnici kalibrační křivky ($y = 18,04x + 5,85$; $r = 0,9998$) je vyjádřena závislost plochy píku ergosterolu (y) na jeho koncentraci (x) [$\mu\text{g ml}^{-1}$].



Obr. 3. Detail celkového iontového chromatogramu (TIC) v režimu „full scan“ půdních vzorků podél gradientu zátěže půdy skotem u silně (a) a středně zatížené (b) půdy v porovnání s nezatíženou půdou (c). Identifikované píky: 1 – ergosterol; 2 – kampesterol; 3 – ergostanol; 4 – stigmasterol; 5 – β -sitosterol; 6 – sitostanol; 7 – β -amyrin; 8 – α -amyrin. Měřeno na přístroji Finnigan GCQ[®] (ThermoQuest) v režimu „full scan“, podmínky stanovení jsou uvedeny v textu



Obr. 2. Srovnání chromatogramu GC-MS-MS iontu m/z 396 Da u půdního vzorku S (t_R hledané látky = 32,80 min) (a) a vnějšího standardu (t_R ergosterolu = 32,97 min) (b) a porovnání rozpadového spektra prekurzorového iontu ($m/z = 396$ Da) ergosterolu v půdním vzorku (c) a ve standardu (d) po použití metody GC-MS-MS. Podmínky stanovení jsou uvedeny v textu



Obr. 4. HPLC chromatogram vzorku z půdy se střední zátěží (M). Měřeno na HPLC přístroji Agilent 1100 Series G1315B s detektorem s diodovým polem (DAD), podmínky stanovení jsou uvedeny v textu

Retenční čas ergosterolu v půdním vzorku byl za daného nastavení 19,2 min. Použitím 95 % methanolu namísto 90 % acetonitrilu jako mobilní fáze bylo možné zkrátit dobu analýzy z 25 na 13 min, nicméně jak rozlišení piků, tak kvantifikace ergosterolu se zhoršily, zejména v případě kvantifikace ergosterolu v půdních vzorcích.

Na chromatogramu vzorku z půd zatížených pastvou skotu získaném metodou HPLC při 282 nm (obr. 4) nebyly nalezeny žádné další steroly ani látky koelující s ergosterolem. Stanovení při 282 nm je pro detekci ergosterolu poměrně vhodné, neboť při této vlnové délce má ergosterol typické maximum v absorpčním spektru²⁶. Přesto lze v literatuře nalézt případy falešně pozitivních identifikací ergosterolu metodou HPLC s UV detektorem¹⁵, případně interferenci s látkami v jiných přírodních vzorcích (vzorky vody, detritu, atd.)^{16,27}. Problém případné koeluce ergosterolu s neidentifikovanými látkami ze vzorku během HPLC lze vyřešit například acetylací ergosterolu¹⁶ a následným stanovením acetátu ergosterolu při vlnové délce 282 nm.

Srovnání metod GC-MS-MS a HPLC

Stanovení koncentrace ergosterolu v půdních vzorcích závisí na použité analytické metodě. Srovnáním metod GC-MS-MS a HPLC jsme našli významné rozdíly v hodnotách koncentrací ergosterolu. Hodnoty získané při analýzách GC-MS-MS byly v průměru o 30 % vyšší než hodnoty získané metodou HPLC, zejména pak při vyšších koncentracích ergosterolu. Vysvětlením tohoto jevu mohou být ztráty způsobené převáděním ergosterolu z extrakčního nepolárního rozpouštědla (hexan) do polárního rozpouštědla vhodného pro HPLC (methanol). Polarita rozpouštědla má v případě ergosterolu podstatný vliv na jeho rozpustnost, jelikož se zvyšující se polaritou rozpouštědla rozpustnost ergosterolu klesá^{28,29}.

Variační koeficient (CV) rostl se zvyšující se koncen-

traci ergosterolu v půdách S a M rychleji u měření metodou HPLC (CV = 0,10, resp. 0,24) než v případě metody GC-MS-MS (CV = 0,05, resp. 0,10). Vzhledem k selektivitě metody GC-MS-MS jsme se rozhodli používat pro studium společenstev hub v půdě na zimovišti skotu pouze výsledky získané touto metodou.

Výhodou kombinace dvou režimů („full scan“ a MS-MS) při analýzách přírodních vzorků metodou GC-MS je možnost detekce celého profilu sterolů v režimu „full scan“. Při použití moderních kapilárních kolon (např. se stacionární fází 5 % fenyl – 95 % dimethylpolysiloxan) dochází k vynikajícímu rozdělení jednotlivých sterolů a příslušných stanolů²⁷. Oproti tomu je analýza celkového profilu sterolů metodou HPLC komplikovaná nedostatečnou selektivitou při separaci sterolů a stanolů v přírodních vzorcích²⁷. Jednotlivé steroly se mezi sebou liší svými absorpčními spektry³⁰ a HPLC při jedné vlnové délce tyto látky nedeteguje.

Koncentrace ergosterolu v půdě zimoviště

Mezi vybranými místy podél gradientu zátěže půdy skotem jsme našli statisticky významné rozdíly v koncentraci ergosterolu. Půda C bez vlivu skotu obsahovala $0,93 \pm 0,34 \mu\text{g g}^{-1}$ (průměr $\pm$ směrodatná odchylka, $n = 3$) ergosterolu, zatímco půda M $14,01 \pm 0,77 \mu\text{g g}^{-1}$ a půda S $29,28 \pm 3,07 \mu\text{g g}^{-1}$ ergosterolu. Rozdíly mezi půdami S, M i C byly statisticky průkazné. Kromě toho byla u zkoumaných půd zjištěna pozitivní korelace mezi koncentrací ergosterolu a koncentrací C_{ox} ($r = 0,9333$; $p = 0,0002$), N_{tot} ($r = 0,9500$; $p = 0,0001$) a P_{av} ($r = 0,9363$; $p = 0,0002$).

V dostupné literatuře lze nalézt minimum údajů týkajících se množství ergosterolu v půdách evropských pastvin^{11,31}. Stanovení ergosterolu v těchto pracích byla prováděna metodou HPLC za použití směsi hexan:propan-2-ol v poměru 98:2 (v/v), resp. methanolu jako mobilní fáze^{11,31}. Na extenzivně využívaných pastvinách ve Velké Británii¹¹ a v Nizozemí³¹ byly takto stanoveny hodnoty koncentrací ergosterolu v rozmezí $0,54\text{--}5,21 \mu\text{g g}^{-1}$, resp. $0,8\text{--}3,8 \mu\text{g g}^{-1}$ půdy.

Z uvedených dat je viditelné, že experimentální zimoviště skotu je zvláštním typem ekosystému odlišným od běžných pastevních stanovišť, a to vzhledem k intenzivnímu působení skotu na půdu, což indikují změny struktury půdy, vegetace²⁰ i chemických parametrů půdy (tab. I). Předpokládali jsme, že půdní houby mohou být potlačeny vyšším pH nebo mechanickým poškozováním mycelií v půdě na místech s vyšší zátěží skotem (S a M) oproti kontrolní půdě C (tab. I). Biomasa půdních hub byla ale naopak na místech ovlivněných skotem a jejich exkrementy vyšší.

Stimulační vliv skotu na biomasu hub je pravděpodobně spojen se značnými vstupy organického uhlíku ve formě exkrementů, které podstatně zvyšují obsah stabilní organické hmoty v těchto půdách¹⁷. Významnou roli zde hraje fakt, že k vysokým vstupům exkrementů do půdy dochází mimo vegetační období a exkrementy jsou během

Tabulka I

Chemické parametry a obsah ergosterolu v půdách zimoviště skotu, Borová u Chvalšín, jižní Čechy (průměr $\pm$ směrodatná odchylka; $n = 3$). Statisticky průkazné rozdíly mezi stanovišti C, M a S jsou vyznačeny odlišnými písmeny abecedy

Půda	Popis	^a pH	^b C _{ox} [g kg ⁻¹]	^c N _{tot} [g kg ⁻¹]	C:N	^d P _{av} [mg kg ⁻¹]	^e Ergosterol [μg g ⁻¹]
C	pastvina, bez vlivu skotu	4,8 $\pm$ 0,0a	50,8 $\pm$ 3,6a	1,7 $\pm$ 0,0a	29,4	5,0 $\pm$ 0,0a	0,9 $\pm$ 0,3a
M	zimoviště, střední zátěž	6,6 $\pm$ 0,0b	101,1 $\pm$ 2,6b	3,9 $\pm$ 0,0b	25,9	217,3 $\pm$ 1,2b	14,0 $\pm$ 0,8b
S	zimoviště, silná zátěž	7,7 $\pm$ 0,3c	174,0 $\pm$ 8,9c	6,5 $\pm$ 0,1c	26,8	636,0 $\pm$ 38,9c	29,3 $\pm$ 3,1c

^a pH v CaCl₂, ^b C_{ox} – organický uhlík, ^c N_{tot} – celkový dusík, ^d P_{av} – dostupný fosfor, ^e ergosterol stanovený metodou GC-MS-MS

tohoto období důkladně zapracovány přezimujícím skotem do půdy^{17,18}. Námi zjištěná poměrně vysoká koncentrace ergosterolu v půdách zimoviště ovlivněných skotem odpovídá předchozím výsledkům ze stejných pokusných ploch na zimovišti skotu¹⁹, kdy bylo zjištěno, že vlivem skotu se celková biomasa půdních mikroorganismů zvyšuje.

Vysvětlením může být také nepřímý vliv vstupů dusíku do půdy – ovlivnění společenstev rostlin a následně i kvality a kvantity rostlinného opadu, změny ve složení kořenových exsudátů a tím i rhizosférických společenstev mikroorganismů³².

Závěry

Pro detekci a stanovení ergosterolu ve složitých přírodních vzorcích (např. v půdě) byla vyhodnocena jako nejvýhodnější metoda GC-MS-MS. Režim MS-MS umožňuje selektovat během analýzy pouze určité molekuly, zatímco v režimu „full scan“ lze využít zejména možnost sledovat složení celkových sterolů v půdě a následně identifikovat nalezené látky na základě hmotnostních spekter. Metoda HPLC sice vykázala podobný detekční limit jako GC-MS-MS, nicméně při stanovení ergosterolu byla více variabilní a nemusí být vždy dostatečně selektivní pro analýzu přírodních vzorků. Pro optimální stanovení ergosterolu metodou GC-FID by měla být navážka vzorků cca o 2 řády vyšší než pro metodu MAE a použitím většího množství rozpouštědel se ztrácí jak ekonomická, tak ekologická výhodnost této metody. Na základě měření koncentrace ergosterolu v půdě ovlivněné přezimujícím skotem byl zjištěn stimulační vliv pobytu skotu na biomasu saprotrofních hub. Biomasa hub v půdě zimoviště skotu byla v porovnání s nezatíženou půdou podhorské pastviny několikanásobně vyšší. Analýza celkových sterolů v námi studovaných půdách ukázala také významné obohacení rostlinnými steroly a jejich deriváty (stanoly) v důsledku aktivity přezimujícího skotu.

Práce byla podpořena z Výzkumného záměru Ústavu půdní biologie BC AV ČR, v. v. i., (č. AV0Z60660521), Výzkumného záměru Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i. (č. AV0Z60870520), grantu MŠMT (LC 06066 Centrum environmentální mikrobiologie) a grantu GA AV ČR (IAA600660605).

LITERATURA

1. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H.: Microbiol. Rev. 59, 143 (1995).
2. Whipps J. M., Haselwandter K., McGee E. E. M., Lewis D. H.: Trans. Brit. Mycol. Soc. 79, 385 (1982).
3. Young I. M., Illian J., Harris J. A., Ritz K.: Soil Biol. Biochem. 38, 1500 (2006).
4. Lees N. D., Skaggs B., Kirsch D. R., Brad M.: Lipids 30, 221 (1995).
5. Grant W. D., West A. W.: J. Microbiol. Methods 6, 47 (1986).
6. Martin F., Delaruelle C., Hilbert J. L.: Mycol. Res. 94, 1059 (1990).
7. Weete A. D.: Adv. Lipid Res. 23, 115 (1989).
8. Seitz L. M., Mohr H. E., Burroughs R., Sauer D. B.: Cereal Chem. 54, 1207 (1977).
9. Zhao X. R., Lin Q., Brookes P. C.: Soil Biol. Biochem. 37, 311 (2005).
10. Montgomery H. J., Monreal C. M., Young J. C., Seifert K. A.: Soil Biol. Biochem. 32, 1207 (2000).
11. Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T.: Soil Biol. Biochem. 32, 989 (2000).
12. Newell S. Y., Miller J. D., Fallon R. D.: Mycologia 79, 688 (1987).
13. Klammer M., Bååth E.: Soil Biol. Biochem. 36, 57 (2004).
14. Axelsson B. O., Saraf A., Larsson L.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 666, 77 (1995).
15. Verma B., Roberts R. D., Headley J. V., Peru K. M., Christofi N.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 33, 3261 (2002).

16. Abramson D., Smith D. M.: J. Stored Prod. Res. 39, 185 (2003).
17. Šimek M., Elhottová D., Klimeš F., Hopkins D. W.: Soil Biol. Biochem. 36, 9 (2004).
18. Hynšt J., Šimek M., Brůček P., Petersen S. O.: Agric. Ecosys. Environ. 120, 269 (2007).
19. Radl V., Gättinger A., Chroňáková A., Němcová A., Čuhel J., Šimek M., Munch J. C., Schlöter M., Elhottová D.: ISME J. 1, 443 (2007).
20. Jirout J., Tříška J., Růžicková K., Elhottová D.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 40, 736 (2009).
21. Kirk P. L.: Anal. Chem. 22, 354 (1950).
22. McGeehan S. L., Naylor D. V.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19, 493 (1988).
23. Mehlich A.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 15, 1409 (1984).
24. Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A. A. M.: J. Environ. Qual. 32, 466 (2003).
25. Rogge W. F., Medeiros P. M., Simoneit B. R. T.: Atmos. Environ. 40, 27 (2006).
26. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A.-M.: J. Sci. Food Agric. 80, 939 (2000).
27. Headley J. V., Peru K. M., Verma B., Roberts R. D.: J. Chromatogr., A 958, 149 (2002).
28. Zhang H., Wolf-Hall Ch., Hall C.: J. Agric. Food Chem. 56, 11077 (2008).
29. Acros Organics, Biochemicals and Reagents, Biochemicals Found in Plants, Sterols, Ergosterol 98%, product information, www.acros.com, staženo 14. ledna 2010.
30. Barros T. F., de Resende M. A.: Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 41, 343 (1999).
31. de Vries F. T., Bloem J., van Eekeren N., Brusaard L., Hoffland E.: Soil Biol. Biochem. 39, 1620 (2007).
32. Bardgett R. D., McAlister E.: Biol. Fertil. Soils 29, 282 (1999).

J. Jirout^{a,b}, J. Tříška^c, K. Růžicková^c, N. Vrchotová^c, M. Šimek^a, and D. Elhottová^a (^a Institute of Soil Biology, Biology Centre, Academy of Sciences of Czech Republic, České Budějovice, ^b Department of Ecosystem Biology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, ^c Institute of System Biology and Ecology, Academy of Sciences of Czech Republic, České Budějovice): **The Comparison of Chromatographic Methods for Ergosterol Determination and Their Application in Analysis of Upland Pasture Soil**

Ergosterol, a biomarker of living saprotrophic fungi, was obtained from soil by microwave-assisted extraction and determined by GC-MS-MS, HPLC, and GC-FID. The GC-MS-MS technique was used to monitor fungal biomass in the soils differently impacted by overwintering cattle. The amount of ergosterol in soil increased from 0.93 ± 0.34 to $29.28 \pm 3.07 \mu\text{g g}^{-1}$ of soil. The detection limits in GC-MS-MS and HPLC methods were ca. ten times lower than in GC-FID. Whereas GC-MS-MS is the best method for monitoring the complex sterol profile in the environment, the selective MS-MS mode allowed the determination of ergosterol in complex matrices by elimination of coeluting peaks. The enrichment of cattle-impacted soils in non-fungal sterols (campesterol, stigmasterol and β -sitosterol) and stanols (ergostanol, sitostanol) was due to digested plant materials and rumen microflora, suggesting significant biochemical changes in the pasture soils under study.