

## Test klíčivosti semen a inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

### Úvod

Test byl vyvinut ke zjištění toxických vlastností odpadních vod a vodných výluhů odpadů na zástupci producentů – vyšších rostlin. Testuje se vliv vodného roztoku na klíčivost semen a růst kořenů kulturní plodiny hořčice bílé (*Sinapis alba*) v počátečním stadiu vývoje.

Test spočívá v kultivaci semen v Petriho miskách na filtračním papíře nasyceném testovaným roztokem. Hodnotí se procento vyklíčených semen a nárůst kořene klíčících rostlinek v porovnání s kontrolou kultivovanou pouze v přítomnosti živného média.

zpracováno dle

- Metodického pokynu MŽP ČR pro hodnocení toxicity odpadů a vodných výluhů (Vyhl. MŽP ČR 338/1997)
- Slovenské technické normy pro odpadové hospodářství STN 83 8303
- OECD Guideline No.208: Terrestrial plants, growth test

Metoda stanovení akutní toxicity pro *Sinapis alba* (*Brassicaceae*)

- A) vodných výluhů
- B) průmyslových odpadních vod

### Charakteristika organismu

Hořčice bílá, *Sinapis alba*, patří do čeledi brukvovitých, *Brassicaceae*. Je to jednoletá, časně jarní rostlina – olejnina. Olej, kterého obsahuje semeno 24-32%, je využíván v potravinářském průmyslu i pro technické účely na výrobu mýdel, ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Patří zároveň mezi krmné plodiny.

Hořčice má tenký vřetenovitý kořen, vzpřímenou lodyhu, roztroušeně chlupatou, až 150 cm vysokou s jasně zelenými listy. V dolní části jsou listy pravidelně lyrovitě peřenoklané až peřenodílné, v horní části trojklané. Květy jsou oboupohlavné čtyřčetné s chlupatými stopkami. Zpočátku jsou sestaveny v klubkaté květenství, později v protáhlé hrozny, kde jednotlivé květy kvetou odspoda. Plody jsou odstálé, bíle štětinaté šešule, s trojžilnými až pětižilnými chlopněmi a se smáčklým, mečovitě zahnutým zobanem, který je obvykle delší nežli samotná šešule.

Semeno rostliny je na brukvovité rostliny poměrně velké, je žluté nebo bělavě žluté kulovitého tvaru. Dosahuje průměru 1,5 - 4 mm. Po vyklíčení vyrůstá jednoduchý kořen s hypokotylem. Později je kulovitý a bohatě rozvětvený. Rostlině se nejlépe daří na středně hlinitých nebo hlinitopísčítých půdách, dobře hnojených, s dostatkem vápníku a s neutrální až mírně alkalickou půdní reakcí (Kočič, Rakovický, Švagr: Testy semichronické toxicity se semeny, VŠCHT, 2001).

### Podmínky testu a použité chemikálie

<b>Testovací organismus:</b>	<i>Sinapis alba</i>
Barva	okrově žlutá (sytě žlutá)
velikost	1,5 – 2,5 mm
klíčivost	minimálně 90%
<b>Sledovaná odezva:</b>	1) klíčivost 2) inhibice růstu kořene ve srovnání s kontrolou

<b>Podmínky testu:</b>	
teplota	20°C ± 2°C
objem testovaného roztoku	5 ml v jedné Petriho misce
velikost Petriho misky	8 – 8,5 cm
počet testovacích semen	5 na jedné Petriho misce
doba expozice	96 hodin (upraveno ze standardních 72 hod)
počet paralelních stanovení	2-3
osvětlení	bez přístupu světla
<b>Chemikálie:</b>	testovaná látka, zřed'ovací voda připravená podle ISO 7346
<b>Pomůcky a zařízení:</b>	Petriho misky, filtrační papír hrubší pórovitosti, nůžky, pinzeta, pipety, odměrné baňky, milimetrové měřítko, termostat

Zásobní roztok	Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku [g·L <sup>-1</sup> ]
Č. 1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11,76
Č. 2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,93
Č. 3	NaHCO <sub>3</sub>	2,59
Č. 4	KCl	0,23

Příprava kultivačního média: Na přípravu kultivačního média se použije 25ml každého zásobního roztoku: do odměrné baňky o objemu 1l se vlije malé množství destilované vody, následuje 25ml od každého zásobního roztoku a objem se doplní destilovanou vodou po rysku. Hodnota pH by se měla pohybovat v rozmezí 7,8 ± 0,2. Případná úprava pH se provádí roztokem NaOH nebo HCl. Takto připravená zřed'ovací voda se před použitím v testu nemusí dále upravovat. Možno přechovat v lednici při teplotě 6°C pro další experimenty.

### Testy akutní toxicity na standardu

Vzhledem k možným změnám stavu semen a klíčivosti, je třeba ověřovat jejich kvalitu a podmínky testování pomocí testu toxicity na standardu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Testy akutní toxicity se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy. Rozpětí EC<sub>50</sub>, jež má kultura při době kultivace 72 hodin splňovat je uvedeno v tabulce.

Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na standardech

Standard	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (p.a.)
Rozpětí hodnot EC <sub>50</sub> [mg·L <sup>-1</sup> ]	10 – 50

### Příprava vzorku

Vzorek se připraví ředěním testovaného vzorku v určeném objemu kultivačním médiu.

### Postup testu

- připravte kultivační médium dle návodu
- vložte kruhové výseče z filtračního papíru do čistých Petriho misek (v duplikátech)
- připravte následující koncentrace dodaného testovaného vzorku: 0.25% v/v, 0.5% v/v, 1% v/v, 3% v/v (do 15 mL kultivačního média napipetujte potřebný objem testovaného vzorku – 37.5 µl, 75 µl, 150 µl, 450 µl / 15 mL - změnu celkového objemu zanedbejte)
- připravené expoziční roztoky dávkujte do Petriho misek - vždy 5 mL / misku
  - u kontrol použijte 5 mL standardního média bez vzorku
  - použijte jednu pipetu a postupujte od nejnižší po nejvyšší koncentraci

- do každé misky vložte 5 semen hořčice bílé (vybraná semena dopředu namočená 20 min v destilované vodě)
- Petriho misky překryjte potravinovou fólií (zajistí cirkulaci vzduchu a omezí vypařování), důkladně popište a umístěte do temna do inkubační místnosti (pokojová teplota)
- Po ukončení experimentu stanovte počet vyklíčených semen v kontrolách a v jednotlivých ředěních a u vyklíčených jedinců vyhodnoťte celkovou délku kořene. Získané výsledky lze využít pro výpočet hodnot  $IC_{50}$  (koncentrace zabraňující vyklíčení u 50% semen, resp. koncentrace 50% inhibující růst kořene)

#### **Vyhodnocení testu**

- Po ukončení expozice spočítejte počty nevyklíčených semen na jednotlivých miskách a zapište do tabulky (viz. protokol)
- S využitím programu PROBIT vypočtete  $IC_{50}$  pro inhibici klíčení a zapište spolu s intervaly spolehlivosti do tabulky
- U vyklíčených semen vyhodnoťte délku kořene (s přesností na milimetry) a zapište do tabulky
- Vypočítejte průměrnou hodnotu u každé varianty a hodnoty vyjádřete jako % kontroly a % inhibice (vyjádřete jako celá čísla)
- S využitím programu PROBIT vypočtete  $IC_{50}$  pro inhibici růstu kořene a zapište spolu s intervaly spolehlivosti do tabulky
- Program PROBIT je možno stáhnout ze stránky US EPA:  
<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>
- Hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibici klíčení a inhibici růstu kořene můžete rovněž určit lineární regresí: Vyneste získané inhibice v % do grafu v programu Microsoft Office Excel. Křivku proložte lineární regresní přímkou a dle rovnice regrese odečtete z osy x koncentraci vzorku, ve které došlo k 50% inhibici růstu a klíčivosti.