

# VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

## FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

### ÚSTAV EKOLOGIE A CHOROB ZVĚŘE, RYB A VČEL

#### Standardní operační postup - SOP 01

#### Terestrické testy ekotoxicity

#### Stanovení inhibice růstu kořene salátu *Lactuca sativa*

### 1. Cíl

Stanovení ekotoxicity vzorků (odpadů, kontaminovaných půd aj.), pomocí hodnocení růstu kořene salátu (*Lactuca sativa* L.) za standardních podmínek, v porovnání s kontrolou.

### 2. Charakteristika testu

Měří se délka kořenů salátu v kontrole a zkoušeném vzorku po  $120 \pm 2$  h inkubace. Ekotoxicita vzorku je stanovena jako statisticky významný rozdíl v délce kořenů zkoušeného vzorku v porovnání s kontrolou, popř. se stanoví hodnota  $EC_{50}$ .

Pro hodnocení ekotoxicity vzorků se dále použijí následující kritéria:

Inhibice růstu kořene ( $I > 0$ ) - zkrácení střední délky kořene ve vzorku ve srovnání s kontrolou (vyjádření v %).

Stimulace růstu kořene ( $I < 0$ ) - prodloužení střední délky kořene ve vzorku ve srovnání s kontrolou (vyjádření v %).

### 3. Materiál

#### 3.1 Testovací rostliny

**Salát hlávkový** – odrůda Safír (*Lactuca sativa* var. *capitata*). Pro zkoušku se vybírají nepoškozená semena, stejné velikosti a bez chemického ošetření.

### 3.2 Chemikálie a suroviny

- Kyselina boritá - referenční látka
- Artificiální substrát - umělá půda připravená dle směrnice OECD (křemenný písek, kaolinitový jílu, rašelina, CaCO<sub>3</sub>)

### 3.3. Kontrola – artificiální půda

Jako kontrola se použije uměle připravená směs se zaručenou konstantní kvalitou dle směrnice OECD 207. Kontrolní půda se připraví smícháním a důkladnou homogenizací 69 % hmotnostních křemenného písku, 20 % hm. kaolinitového jílu, 10 % hm. rašeliny a 1% hm. CaCO<sub>3</sub> pro úpravu celkového pH na  $6,0 \pm 0,5$ . Vodní kapacita půdy (WHC) je udržována v rozmezí  $70 \pm 5$  %.

### 3.4. Přístroje a pomůcky

- Petriho misky, filtrační papír
- odměrné baňky
- zkušební plastové nádoby s víkem (700 – 1000) ml
- analytické váhy s váživostí min. 500 g
- pH metr
- pinzeta
- nastavitelné automatické pipety
- software pro statistické zpracování dat (TOXICITA 3.1)

### 4. Podmínky testu

- Předklíčená semena salátu *Lactuca sativa* s kořínkem kratším jak 2 mm
- 15 semen ve zkušební nádobě
- 3 paralelní stanovení
- 100 – 150 g testovaného vzorku v jedné zkušební nádobě
- teplota:  $24 \pm 2$  °C, bez přístupu světla
- délka expozice:  $120 \pm 2$  h

## 5. Pracovní postup

Nejprve jsou semena salátu rozložena na připravené Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem a vloženy do inkubátoru, kde se nechají klíčit po dobu 24 – 36 hodin. Teprve po vyklíčení semen na délku kořene max. 2 mm, je možné tyto semena použít do testu.



Obrázek č. 1: Předklíčení semen na Petriho misce

- Připravíme koncentrační řadu testované látky (3 - 5 koncentrací)
- do zkušebních nádob navážíme po 100 – 150 g předem připravené umělé půdy se známou sušinou
- půdu kontaminujeme připravenými koncentracemi testované látky
- kontrolu tvoří umělá půda bez přídavku testované látky
- rozvrhneme pravoúhlé sítě jamek, např. 5 x 3 bodů
- do vytvořených jamek asi 1 cm hlubokých pinzetou rovnoměrně rozmístíme po 15 naklíčených semenech salátu, kořínkem směrem dolů
- semena ke vzorku přitlačíme, vzorkem je nezakrýváme
- připravené nádoby uzavřeme víčkem a vložíme do inkubátoru

Test probíhá v temnu při teplotě  $24 \pm 2$  °C. Po  $120 \pm 2$  hodinách se měří délky všech kořínků s přesností na 1 mm a vypočte se procento inhibice/stimulace růstu kořene a hodnota  $EC_{50}$ .



Obrázek č. 2: Semena salátu v artificiální půdě

## 6. Test na standardu

Pro kontrolu podmínek testu se paralelně nasazuje test se standardem. Referenční látkou pro tento test je kyselina boritá. Navržená rozpětí hodnot  $EC_{50}$  kyseliny borité jsou 250–850 mg/kg.

## 7. Vyhodnocení testu

Základem pro hodnocení zkoušky inhibice růstu kořene je průměrná délka kořene zjištěná v kontrole a zkoušeném vzorku. Jestliže předklíčené semeno nevytvoří kořínek, započítává se tato hodnota do střední hodnoty jako nulová. Pro zkoušený vzorek a kontrolu se vypočítá aritmetický průměr délky kořene, směrodatná odchylka a variační koeficient.

Inhibice nebo stimulace růstu kořene se vypočítá:

$$I = \frac{L_c - L_v}{L_c} \times 100$$

Kde

**I** je inhibice nebo stimulace růstu kořene (%)

$L_c$  je průměrná délka kořene v kontrole (mm)

$L_v$  je průměrná délka kořene ve vzorku (mm)

Je-li **I** > 0, jedná se o inhibici, je-li **I** < 0, jedná se o stimulaci růstu kořene.

Hodnoty EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub> se vypočítají pomocí programu TOXICITA 3.1 (VÚV Ostrava, Czech Republic).

## 8. Validace testu

Výsledky se považují za platné, jestliže jsou splněny následující podmínky:

- na konci testu by měla být průměrná délka kořene v kontrole minimálně 15 mm,
- variační koeficient paralelních stanovení  $\leq 20 \%$ ,
- průměrná vzcházivost semene je  $\geq 80 \%$ .

## 9. Použitá literatura

ISO 17126 (2005): Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.).

ČSN EN ISO 11269-1 (2012): Kvalita půdy – stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru – část 1: Metoda měření inhibice růstu kořene.