

**ZBORNİK RAZISKOVALNIH PRISPEVKOV
ŠTUDENTOV BIOTEHNOLOGIJE
PRI PREDMETU
OKOLJSKA BIOTEHNOLOGIJA (2020/21)**



**ZBORNIK RAZISKOVALNIH PRISPEVKOV
ŠTUDENTOV BIOTEHNOLOGIJE
PRI PREDMETU
OKOLJSKA BIOTEHNOLOGIJA
(2020/21)**

Urednik: Jure Mravlje

**ZBORNIK RAZISKOVALNIH PRISPEVKOV ŠTUDENTOV
BIOTEHNOLOGIJE PRI PREDMETU OKOLJSKA
BIOTEHNOLOGIJA (2020/21)**

V zborniku so zbrani znanstveno–raziskovalni prispevki študentov pri predmetu »Okoljska biotehnologija – rastlinski del« na študiju II. stopnje Biotehnologija. Napisani so na osnovi rezultatov lastnega raziskovalnega dela, ki so ga študenti opravili v študijskem letu 2020/21. Ukvarjali so se s problematiko različnih okoljskih onesnažil in ugotavljali, kako ta vplivajo na rast in razvoj ter izbrane fiziološke parametre pri ječmenu.

Izdajatelj: Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta UL

Recenzentki: prof. dr. Katarina Vogel-Mikuš in prof. dr. Marjana Regvar

Zbral in uredil: asist. Jure Mravlje, jure.mravlje@bf.uni-lj.si

Naslov uredništva: Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, BF UL, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Fotografija z naslovnice: Prikaz poskusa – kalitveni test ječmena v

vertikalnem kalilniku, avtorji: Kristina Andrejc, Maša Strašek, Nejc Urh, Mojca Zafran

Leto izida: avgust 2021

Kraj izida: Ljubljana

Elektronska izdaja

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 72883715

ISBN 978-961-6822-80-0 (PDF)

dostopno: <http://www.bf.uni-lj.si/>

KAZALO VSEBINE

1. Vpliv arzena na rast ječmena (Bohinc, Kreft, Popelar, Dimnik)	2
2. Vpliv bakrovega sulfata (CuSO_4) na rast ječmena (Fabjan, Kolenc, Müller, Smrekar)	8
3. Vpliv herbicida Duplosan KV na rast ječmena (Andrejc, Strašek, Urh, Zafran)	14
4. Vpliv kadmija na rast ječmena (Erčulj, Ratajc, Štepec, Tomac)	23
5. Vpliv mikroplastike na rast ječmena (Čukajne, Dinkovska, Mašinović, Matović)	29
6. Vpliv mila na rast ječmena (Ekselenski, Kaloper, Pungert, Zupančič)	36
7. Vpliv pralnega praška na rast ječmena (Ašič, Hrovatin, Sajovic, Terzić)	47
8. Vpliv prehranskega dopolnila na rast ječmena (Čič, Flajnik, Jenko, Molk)	54
9. Vpliv svinčevega klorida (PbCl_2) na rast ječmena (Hrovat, Košir, Pleško, Smrkolj)	63
10. Vpliv titanovega dioksida (TiO_2) na rast ječmena (Bokalj, Jelenčič, Novak, Zabret)	74
11. Vpliv umetnega gnojila na rast ječmena (Anžur, Koplan, Skrbinek, Udvanc)	79

VPLIV ARZENA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Jure Bohinc, Tinkara Kreft, Ožbej Popelar, Živa Dimnik

Izvleček

Namen dela je bil testirati vpliv arzena na kalitev in rast ječmena. Izvedli smo kalitveni test, pri katerem smo semena namestili v štiri kalilnike ter vsakega zalivali z drugačno koncentracijo raztopine arzena. Po enem tednu smo izmerili dolžine poganjkov in korenin. Izmerili smo tudi svežo in suho maso poganjkov in korenin. Nato smo izvedli analizo vsebnosti fotosinteznih pigmentov, iz pridobljenih poganjkov. Po koncu analiz in meritev pa je sledila statistična obdelava rezultatov. Ugotovili smo, da arzen negativno vpliva na dolžino rasti korenin, poganjkov ter tudi na svežo maso, vendar se je razlika večinoma videla šele pri rastlinah, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji arzena.

Ključne besede: ječmen, seme, arzen, težke kovine, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Onesnaženje s kovinami je velik problem po celem svetu. Eden izmed najbolj razširjenih onesnažil je arzen. Arzen je metaloid, ki je strupen za vse žive organizme in je prisoten v več različnih oblikah, ki tudi določajo njegovo toksičnost. Prevladujoči valenčni obliki sta +3 in +5. Naravno se pojavlja v zemeljski skorji, v okolje pa se močno širi tudi zaradi človeških dejavnosti: metalurgije, rudarstva, proizvodnje polprevodnikov, nepravilnega zbiranja odpadkov ter tudi kmetijstva, kjer se ga uporablja v pesticidih in kemičnih gnojilih. V okolje se sprošča tako v organski kot anorganski obliki (Kofronova et al. 2018). Pri rastlinah se arzen kopiči v različnih tkivih, najprej so njegovemu delovanju izpostavljene korenine, po njegovem transportu v poganjek pa lahko močno zaustavi rast in kopičenje biomase. Arzen v rastlini močno poveča prisotnost reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in negativno vpliva na fotosintezne pigmente. To vodi do resnih morfoloških, fizioloških in presnovnih nepravilnosti pri rastlinah. Kopičenje arzena v tleh pa ne vpliva samo na rast in razvoj rastlin, temveč tudi preko prehranske verige ogroža zdravje ljudi (Heidari 2017). Namen naše naloge je bil raziskati vpliv različnih koncentracij arzena na kalitev in rast ječmena. Predpostavljamo, da bo arzen že v najnižjih koncentracijah negativno vplival na rast korenin in poganjkov kalic, ter vsebnost fotosinteznih pigmentov.

Metode in materiali

Za preverjanje delovanja arzena na rast in razvoj ječmena, smo pripravili raztopine natrijevega arzenata ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) v treh različnih koncentracijah. Kontrolo je predstavljala samostojna Hoaglandova raztopina. Koncentracije 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ smo pripravili tako, da smo natrijev arzenat ustrezno zatehtali in raztopili v Hoaglandovi raztopini. Štiri vertikalne kalilnike smo napojili s približno 30 mL posamezne raztopine, vsak kalilnik z drugo koncentracijo. Nato smo na vsakega z lepilnim trakom položili po 10 semen ječmena tako, da so bila enakomerno razporejena. Kalilnike smo zaprli in jih v vertikalnem položaju

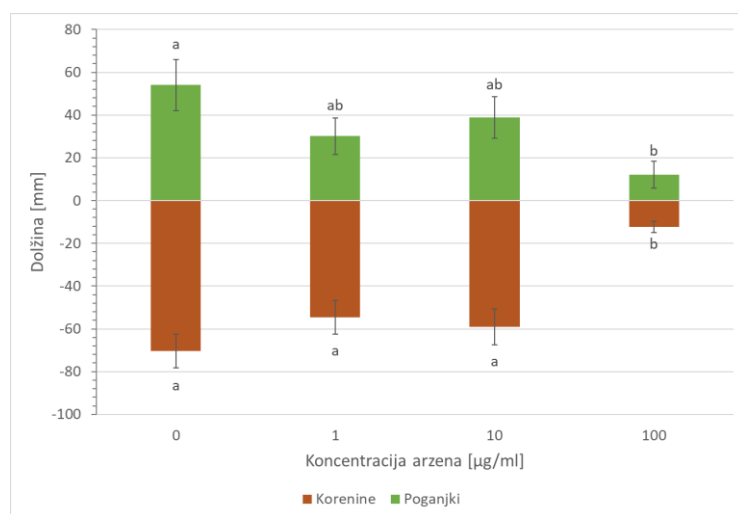
pustili v rastni komori do ponovnega zalivanja s pripravljenimi raztopinami arzena. Kalilniki v rastni komori so bili izpostavljeni 23 °C s fotoperiodo 16/8h.

Kalilnike smo zalili z ustrezno raztopino dvakrat, prvič naslednji dan, drugič pa četrti dan po nastavitvi poskusa. Semena smo pustili kaliti dokler niso korenine kontrolnih semen zrasle do dna kalilnika, kar je bilo en teden po postavitvi poskusa. Kalilnike smo razdrli, pobrali kalice iz posameznega kalilnika ter jim odrezali korenine ter poganjke. Ločeno smo stehtali sveže mase poganjkov in korenin, ki so pripadali kalilniku z določeno raztopino. Zaradi majhne rasti smo posamezne poganjke ali korenine združevali, da je bila masa dovolj velika za tehtanje. Za vsako posamezno raztopino smo dobili do pet ponovitev, tako za korenine kot tudi za poganjke. Stehtane poganjke in korenine smo po dva skupaj zavili v aluminijasto folijo ter jih nato dali v sušilnik za 48 h na 105 °C. Po enem tednu smo ponovno stehtali korenine in poganjke iz aluminijastih paketov in s tem določili njihovo suho maso. Korenine smo po tehtanju zavrgli. Pri nadaljevanju poskusa, smo za določanje vsebnosti klorofila potrebovali več kot 0,02 g mase poganjkov, zato smo ponovno združevali poganjke, da smo dobili dovolj veliko maso.

Poganjke iz posameznih paketkov smo liofilizirali (48 h na -90 °C, 0,001 mbar). Suhe poganjke smo nato v terilnikih strli ter jih predstavili v epruvete, in jih zmešali s 5 mL acetona. Epruvete smo vorteksirali in postavili v hladilnik za 24 h. Naslednji dan smo epruvete centrifugirali (3 min, 2000 obr/ min), supernatant prenesli v kiveto ter s spektrofotometrom izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 470 nm. Koncentracije pigmentov smo izračunali po Monni et al. 2001. Za obdelavo rezultatov smo uporabili program XLSTAT (Addinsoft).

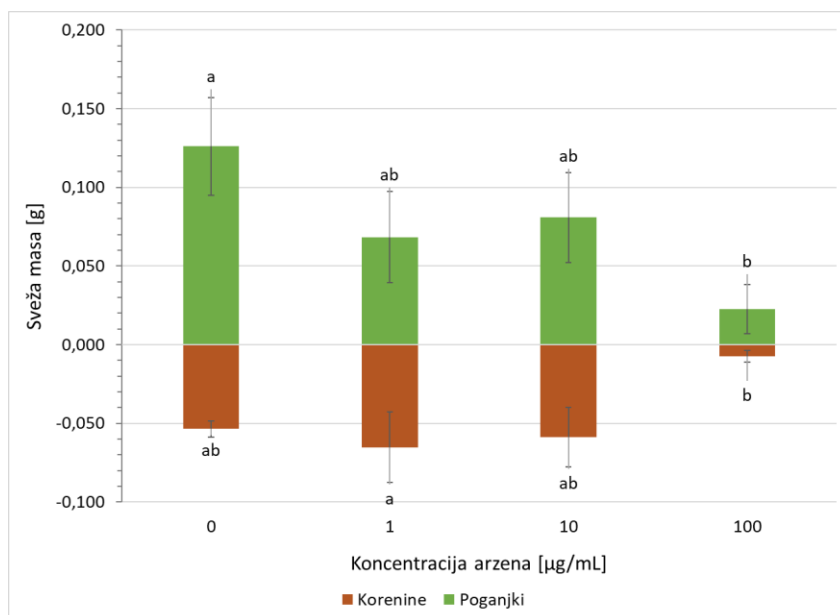
Rezultati

Pri merjenju dolžin poganjkov in korenin smo pričakovali, da bo povečanje koncentracije arzena v raztopini, s katero smo semena vlažili, negativno vplivalo na rast poganjkov in korenin. Torej večja kot bi bila koncentracija arzena manjša bi bila dolžina poganjkov in korenin. S statistično analizo meritev smo ugotovili, da je bila razlika dolžin poganjkov statistično značilna le med kontrolo in kalicami izpostavljenimi 100 µg/mL arzena (Slika 1).



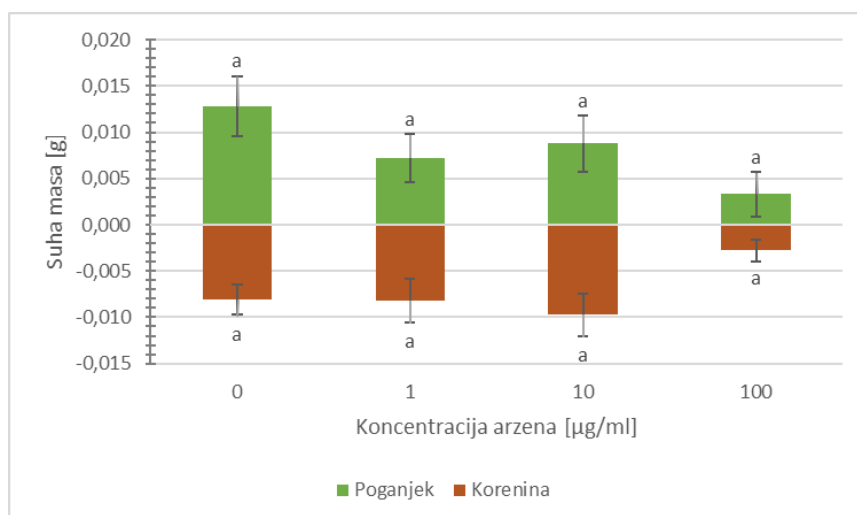
Slika 1: Povprečne dolžine korenin in poganjkov (n=10) pri različnih koncentracijah arzena. Na diagramu so prikazane standardne napake, črke nad stolpci pa predstavljajo statistično značilne razlike.

Enako kot za dolžino poganjkov in korenin smo za svežo maso poganjkov in korenin pričakovali, da bo z naraščanjem koncentracije arzena padala. S statistično analizo meritev smo ugotovili, da je statistična razlika med masami poganjkov le med kontrolo in kalicami, ki so bile izpostavljene 100 $\mu\text{g/mL}$ arzena. Pri koreninah je bilo malo drugače in sicer je bila masa korenin največja pri koncentraciji arzena 1 $\mu\text{g/mL}$, najmanjša pa pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$, zato sta si te dve skupini statistično različni, ostale skupine pa med sabo nimajo statistično značilnih razlik (Slika 2).



Slika 2: Povprečne mase svežih korenin in poganjkov ($n=5$) pri različnih koncentracijah arzena. Na diagramu so prikazane standardne napake, črke nad stolpci pa predstavljajo statistično značilne razlike.

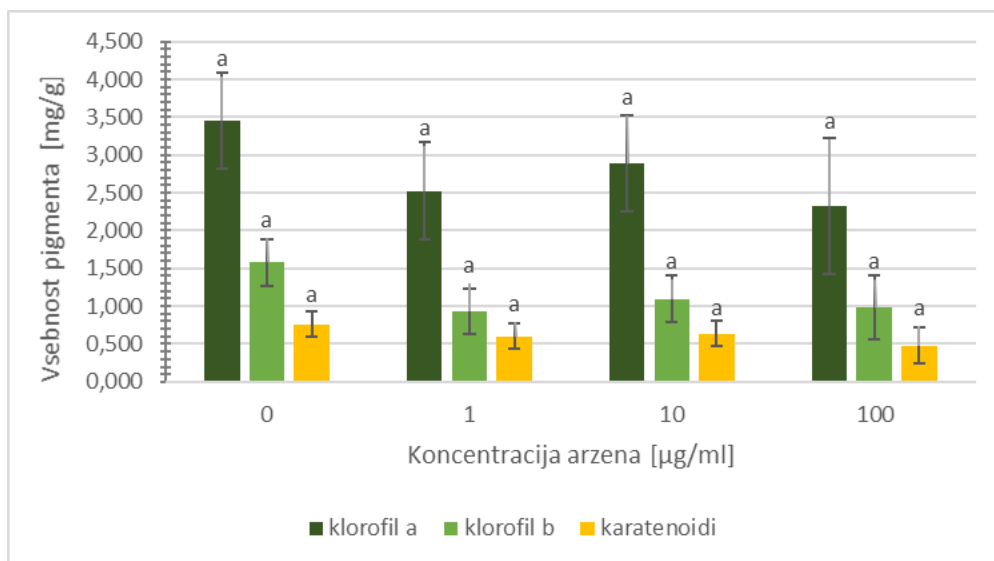
Pri merjenju suhe mase poganjkov nismo zaznali nobenih statistično značilnih razlik med poganjki, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam arzena (Slika 3). Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik pri merjenju suhe mase korenin (Slika 3).



Slika 3: Povprečne mase suhih poganjkov in korenin ($n=5$) pri različnih koncentracijah arzena. Na diagramu so prikazane standardne napake, črke nad stolpci pa predstavljajo statistično značilne razlike.

Na sliki 4 je prikazano, kakšno je bilo spreminjanje koncentracij klorofila a, klorofila b in karotenoidov z naraščanjem koncentracije arzena. Med poganjki, ki so bili izpostavljeni

različnim koncentracijam arzena, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracijah pigmentov.



Slika 4: Povprečne koncentracije fotosinteznih pigmentov v liofiliziranih poganjkih (n=2-5) pri različnih koncentracijah arzena. Na diagramu so prikazane standardne napake, črke nad stolpci pa predstavljajo statistično značilne razlike.

Razprava

Znano je, da prisotnost arzena v tleh znatno zmanjša rast in produktivnost rastlin. To je lahko zato, ker so korenine običajno primarni organ, ki je v stiku z arzenom, kjer ta povzroči lignifikacijo korenin, razpad mikrotubulov, razbarvanje celic in povečanje premera korenin (Chandrakar et al. 2018; Lou et al. 2015). Spremembe v anatomiji korenin in prepustnosti membran ter manjši vnos vode in ionov zatrejo proces fotosinteze v rastlinah, kar je lahko eden od razlogov za zastoj v rasti ob tretiranju z arzenom (Mahdiah et al. 2013).

Pričakovali smo, da bo že najmanjša koncentracija 1 µg/mL vplivala na rast ječmena, torej na samo dolžino poganjkov in korenin. Največji vpliv ima najvišja koncentracija 100 µg/mL, kar smo tudi pričakovali. Statistično značilna razlika je le med kontrolo in koncentracijo 100 µg/mL. Zanimivo bi bilo poskus ponoviti z večjim številom semen in s koncentracijami med 10 µg/mL in 100 µg/mL ter še z višjo koncentracijo arzena na primer 120 µg/mL ter opazovati, kako bi te vplivale na dolžino poganjkov in korenin. Mahdiah et al. (2013) so izvedli podoben poskus na iranski sorti žita *Triticum aestivum*. Koncentracije arzena so bile 0, 1, 2,5, 5, 10, 20 in 30 mg/L in so bile pripravljene sveže kot raztopine natrijevega arzenata. Zaradi povečanja koncentracije arzena so opazili znatno zmanjšanje višine poganjkov. Višina poganjkov pšenice se je vidno zmanjšala, ko je bila koncentracija arzena v raztopini večja od 10 mg/L. Njihovi rezultati so tudi pokazali, da so ob povečani koncentraciji arzena se zmanjša tako rast poganjkov kot tudi korenin, kar je primerljivo z našimi rezultati.

Zaradi strupenosti in močnega fiziološkega delovanja arzena smo pričakovali vpliv na maso korenin in poganjkov že pri koncentraciji 1 µg/mL. Vendar je statistična analiza pokazala, da je razlika med masami svežih poganjkov le med kontrolo in kalicami izpostavljenimi 100 µg/mL arzena. Razliko v sveži masi korenin je bilo mogoče statistično zaznati le med 1 µg/mL

arzena in 100 µg/mL. Po tehtanju in analizi suhe mase korenin in poganjkov ni bilo zaznani nobene statistične razlike. To bi lahko pripisali nizkim masam, katere tehtnica ne zaznava več natančno in na katere že močno vpliva napaka tehtnice. Razlika v sveži masi je lahko tudi posledica privzema vode. Kovine vplivajo na vodni režim rastline, saj zaradi oksidativnega stresa pride do poškodbe membran. V večini člankov je prisotnost arzena vplivala na zmanjšano biomaso rastlin, v nekaterih raziskavah pa je prisotnost arzena v nizkih koncentracijah rast celo povečala, kar bi lahko pojasnilo največjo maso svežih korenin pri 1 µg/mL (Everest and Sandeep 2016). Ta pojav se imenuje hormeza, kar pomeni, da ima strupena snov v nizki koncentraciji spodbujevalen učinek. Glavni razlog za ne vplivanje arzena že pri nižjih koncentracijah pa je verjetno oblika arzena, ki smo ga uporabili. Poznamo dve glavni obliki +3 ali arzenit in +5 ali arzenat. V naši spojini dinatrijevega hidrogen arzenata se nahaja v manj strupeni obliki in sicer +5. Več dejavnikov prispeva k večji strupenosti arzena +3. Arzen (III) se zlahka veže s specifičnimi beljakovinami in prenese v celico. Po drugi strani pa arzen (V) prek tega mehanizma ne more doseči celice. Arzen (V) se mora najprej reducirati na stanje +3, da lahko pride do takšnega transporta. Prav tako se As (III) lahko veže na skupino -SH, ki je prisotna v številnih beljakovinah, encimih in tako zavira njihovo aktivnost (Garland 2018).

Zmanjšanje rasti poganjkov in korenin je lahko povezano z zmanjšanjem vsebnosti fotosinteznih pigmentov in posledično fotosinteze (Mascher et al. 2002). Arzen negativno vpliva na fotosintezne pigmente, klorofila a in b ter karotenoide. Karotenoidi so del fotosinteznih pigmentov, ki igrajo pomembno vlogo pri zaščiti klorofilnega pigmenta v stresnih pogojih. Znano je, da karotenoidi blažijo fotodinamične reakcije, ki vodijo do izgube klorofilov in preprečujejo propad membran v kloroplastih (Farnese et al. 2014). Zmanjšanje skupne vsebnosti klorofila je eden od zgodnjih simptomov strupenosti stresnih dejavnikov, kot je na primer prisotnost kovin (Leão et al. 2014). Naši rezultati so pokazali, da med poganjki, ki so bili obdelani različnimi koncentracijami arzena ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracijah fotosinteznih pigmentov. Sklepamo, da smo tak rezultat dobili zaradi premajhnega števila vzorcev in predlagamo, da bi poskus izvedli na večjemu številu vzorcev. Izbrana metoda (Duncanov test) je sicer primerna za manjše vzorce, lahko pa bi uporabili še kakšno drugo primernejšo statistično metodo za obdelavo istih podatkov.

Zaključki

- V naši raziskavi smo pokazali, da namakanje semen ječmena v različne koncentracije arzena negativno vpliva na dolžino rasti korenin in poganjkov prav tako pa tudi na njihovo svežo maso.
- Dolžina poganjkov in korenin je bila najmanjša pri koncentraciji 100 µg/mL, pri tej koncentraciji pa smo tudi zaznali najmanjšo maso svežih poganjkov. Masa svežih korenin je bila največja pri koncentraciji 1 µg/mL najmanjša pa pri koncentraciji 100 µg/mL.
- Masa suhih korenin in poganjkov je bila najmanjša pri koncentraciji 100 µg/mL. Pri merjenju količin fotosinteznih pigmentov v poganjkih nismo zaznali statistično značilne razlike od kontrole, da bi lahko trdili, da arzen vpliva na njih.
- Celoten poskus bi lahko ponovili z večjim vzorcem semen, saj bi tako dobili zanesljivejše rezultate.

Literatura

- Chandrakar V, Dubey A, in Keshavkant S (2018) Modulation of arsenic-induced oxidative stress and protein metabolism by diphenyleneiodonium, 24-epibrassinolide and proline in *Glycine max* L. *Acta Botanica Croatica*, 77 (1): 51–61. <https://doi.org/10.2478/botcro-2018-0004>
- Everest S, Sandeep K (2016) Phytotoxicity of Arsenic Compound on *Hordeum Vulgare* (L.) Seedlings. *International Journal of Engineering and Management Research* 6 (4): 477-480.
- Farnese FS, Oliveira JA, Farnese MS, Gusman GS, Silveira NM in Siman LI (2014) Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. *Idesia (Arica)*, 32 (1): 99–106. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000100012>
- Garland T (2018) Arsenic. *Veterinary Toxicology*, 3: 411-415, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00023-4>
- Heidari M (2017) Plant responses to arsenic: uptake, metabolism and resistance to arsenic toxicity. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104 (4): 369-376. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.047
- Kofronova M, Maskova P, Lipavska H (2018) Two facets of world arsenic problem solution: crop poisoning restriction and enforcement of phytoremediation. *Planta*, 248 (1): 19-35. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2906-x>
- Leão GA, Oliveira JO, Felipe RTA, Farnese FS in Gusman GS (2014) Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions* 9: 143-151. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.784815>
- Mahdieh S, Ghaderian SM in Karimi N (2013) Effect of arsenic on germination, photosynthesis and growth parameters of two winter wheat varieties in Iran. *Journal of Plant Nutrition*, 36 (4), 651–664. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.754036>
- Monni S, Uhlig C, Junttila O, Hansen E in Hynynen J (2001) Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environmental Pollution*, 122(3): 414-426. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00139-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00139-1)

VPLIV BAKROVEGA SULFATA (CuSO_4) NA RAST JEČMENA

Avtorji: Primož Fabjan, Ana Kolenc, Eva Müller, Eva Smrekar

Izvleček

Baker je eden izmed esencialnih elementov za rast rastlin, vendar pa v visokih koncentracijah zanje postane strupen. Pogosto se pojavlja v odpadnih vodah, s čimer negativno vpliva na okolje in zdravje organizmov, ter na delovanje rastlinskih čistilnih naprav. V raziskavi smo želeli preveriti vpliv različnih koncentracij CuSO_4 na rast in razvoj ječmena. Kalice ječmena smo gojili v vertikalnih kalilnikih z različnimi koncentracijami CuSO_4 (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ in 100 $\mu\text{g/L}$) ter kontrolo. Po tedenski inkubaciji v rastni komori smo določili dolžino korenin in višino poganjkov ter njihovo svežo in suho maso (poganjke smo za to liofilizirali, korenine pa sušili v sušilniku). Vsebnost klorofilov in karotenoidov smo določili s spektrofotometrijo po ekstrakciji pigmentov iz liofiliziranih poganjkov. Izmerjene podatke smo statistično obdelali (enosmerna ANOVA in Duncan post-hoc test). S povečevanjem koncentracije raztopine CuSO_4 je prišlo do zmanjšanja suhe mase poganjkov in zmanjšanja dolžine korenin ječmena. Na suho maso korenin in dolžino poganjkov CuSO_4 ni imel statistično značilnega vpliva. Prav tako pa ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti fotosinteznih pigmentov po izpostavitvah z CuSO_4 v primerjavi s kontrolo. Predvidevamo, da CuSO_4 vpliva na morfologijo kalic ječmena (sprememba oblike, razvejanosti korenin in oblike listov ter suhe mase poganjkov), ne vpliva pa na zmanjšanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov. V literaturi poročajo, da ima na odpornost na Cu velik vpliv genotip, zato bi bilo zanimivo poiskati na Cu odpornejše sorte ječmena.

Ključne besede: ječmen, seme, bakrov sulfat, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Baker je en izmed esencialnih mikroelementov za rast in razvoj rastlin. Deluje kot katalizator v procesu fotosinteze ter igra pomembno vlogo pri tvorbi lignina v celični steni. Kljub temu lahko v visokih koncentracijah postane strupen za rastline, saj zavira celični metabolizem in povzroča oksidativni stres ter z njim povezane posledice na celični ravni – slednje se kažejo v obliki kloroz, nekroz, razbarvanja listov in zaviranja rasti (Borghi et al. 2007; Cuypers et al. 2008). Zaradi različnih človeških aktivnosti (industrija, kmetijstvo ipd.) se baker, poleg drugih kovin in onesnažil, pogosto pojavlja v odpadnih vodah, zaradi česar lahko negativno vpliva na okolje in na zdravje ljudi - na slednje vpliva predvsem ob neposredni izpostavljenosti, ter s sistemskim kopičenjem zaradi uživanja onesnažene hrane in vode (Hrudey et al. 1995).

Za čiščenje odpadnih voda lahko poleg klasičnih čistilnih naprav uporabljamo tudi rastlinske čistilne naprave. Zasnovane so po vzoru naravnih mokriščnih ekosistemov, v katerih rastline, zemlja in prisotni mikroorganizmi s pomočjo različnih bioloških procesov iz odpadne vode odstranjujejo onesnažila, med njimi tudi baker (EPA, 2002; Huguenot et al. 2014). Kljub remediacijski sposobnosti teh sistemov lahko ob preveliki koncentraciji onesnažil odpovejo, saj postanejo pogoji preveč strupeni za rast rastlin in mikroorganizmov. Ker je baker en izmed pogostih onesnažil, je bil tako naš cilj preveriti vpliv različnih koncentracij CuSO_4 na kaljivost

in rast ječmena ter vsebnost fotosinteznih pigmentov v poganjkih. Predpostavili smo, da bodo različne koncentracije CuSO_4 znižale kaljivost, zavirale rast poganjkov, in vplivale na zmanjšanje suhe mase ter vsebnosti fotosinteznih pigmentov, učinek pa se bo s povečevanjem koncentracije CuSO_4 večal.

Metode in materiali

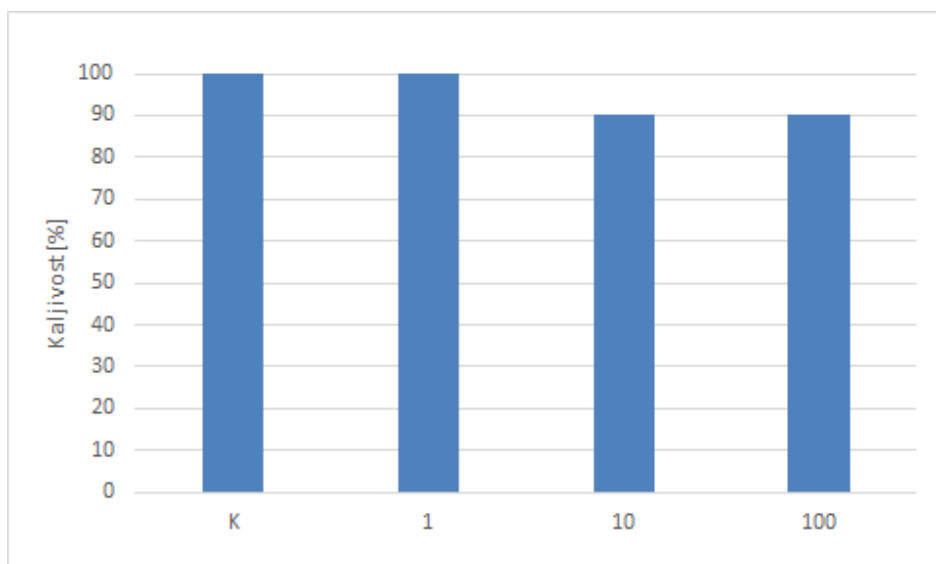
V polovični Hoaglandovi raztopini smo pripravili po 100 ml različnih koncentracij CuSO_4 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) ter kontrolo, ki je vsebovala samo Hoaglandovo raztopino. Hranilna raztopina vsebuje vire makroelementov (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Fe-EDTA , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), mikroelementov (bor, mangan, molibden, baker, cink) in fosfata. S posameznimi raztopinami CuSO_4 in kontrolo smo napojili penasto blazinico, prekrili s črnim kartonom ter ju skupaj z 10 semeni/raztopino namestili v vertikalni kalilnik. Kalilnike smo prenesli v rastne komore (23°C , 16/8h fotoperioda) in omogočili kalitev ječmenovih semen. Inkubacija je trajala 1 teden oz. dokler kontrolni poganjki niso zrasli do dna kalilnika. Med rastjo poganjkov smo redno spremljali poskus in dodajali raztopino CuSO_4 , če je bilo to potrebno. Po končanem poskusu smo določili dolžino korenin in višino poganjkov ter njihovo svežo maso na laboratorijski tehtnici z natančnostjo $0,0001 \text{ g}$. Za določitev suhe mase smo vse poganjke liofilizirali (48h pri -90°C in vakumu $0,001 \text{ mbar}$), korenine pa sušili v sušilniku (24 h pri 105°C). Po 1 tednu smo ves rastlinski material stehali ter določili suho maso na laboratorijski tehtnici. Liofilizirane poganjke smo nato strli v terilnici, jih prenesli v epruvete ter jim dodali 80% aceton do volumna 5 ml . Epruvete smo čez noč prenesli v hladilnik, kjer je potekala ekstrakcija fotosinteznih pigmentov. Vzorce smo nato centrifugirali (2000 obratov/min) in pomerili absorbanco pri 664 nm , 647 nm in 470 nm na spektrofotometru in izračunali vsebnost klorofila a in b ter karoteinov v suhi masi po Monni et al 2001.

Izmerjene podatke o suhi masi, dolžini poganjkov in korenin ter vsebnosti fotosinteznih pigmentov smo statistično obdelali z uporabo programa Microsoft Excel z dodatkom XLSTAT (Addinsoft). Razlike med izpostavitvami smo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Duncan post-hoc testom pri $p < 0,05$. Pri podatkih, kjer je bil vpliv CuSO_4 dovolj velik, smo izračunali EC_{50} (efektivna koncentracija, ki izzove 50% maksimalnega učinka) z uporabo Quest Graph™ EC_{50} Calculator (AAT Bioquest).

Rezultati

Kalitev

Pri kontroli in izpostavitvi z $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ raztopino CuSO_4 je bila kaljivost semen 100%, kalila so vsa semena. Pri izpostavitvah z $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ pa je kalilo devet semen od desetih (Slika 1).



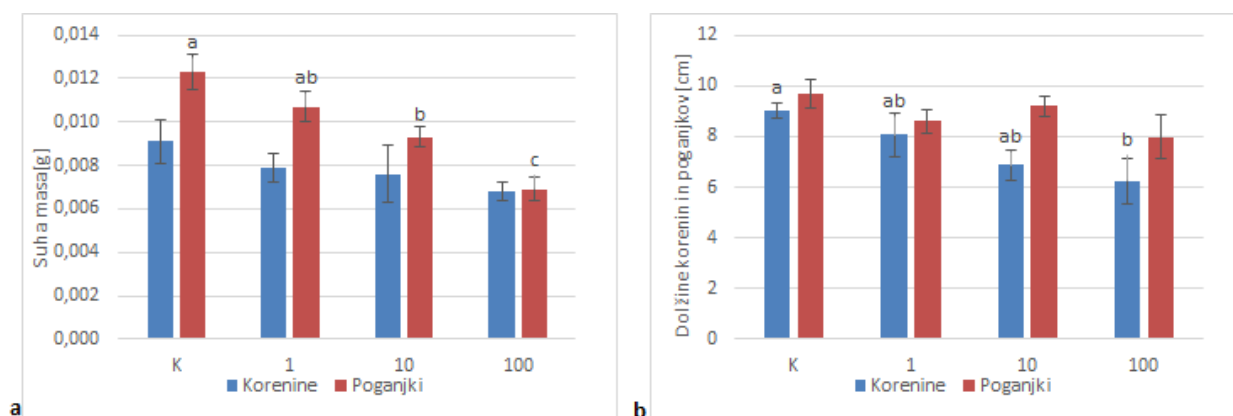
Slika 1: Kaljivost semen ječmena po izpostavitvah z 0 µg ml⁻¹ (kontrola, K), 1 µg ml⁻¹, 10 µg ml⁻¹ in 100 µg ml⁻¹ raztopino CuSO₄.

Dolžina korenin in poganjkov

Povečevanje koncentracije bakrovega (II) sulfata (CuSO₄) je vplivalo na zmanjšanje dolžin pri koreninah pri koncentraciji 100 µg ml⁻¹. Na dolžino poganjkov pa CuSO₄ ni imel statistično značilnega vpliva (Slika 2a).

Masa korenin in poganjkov

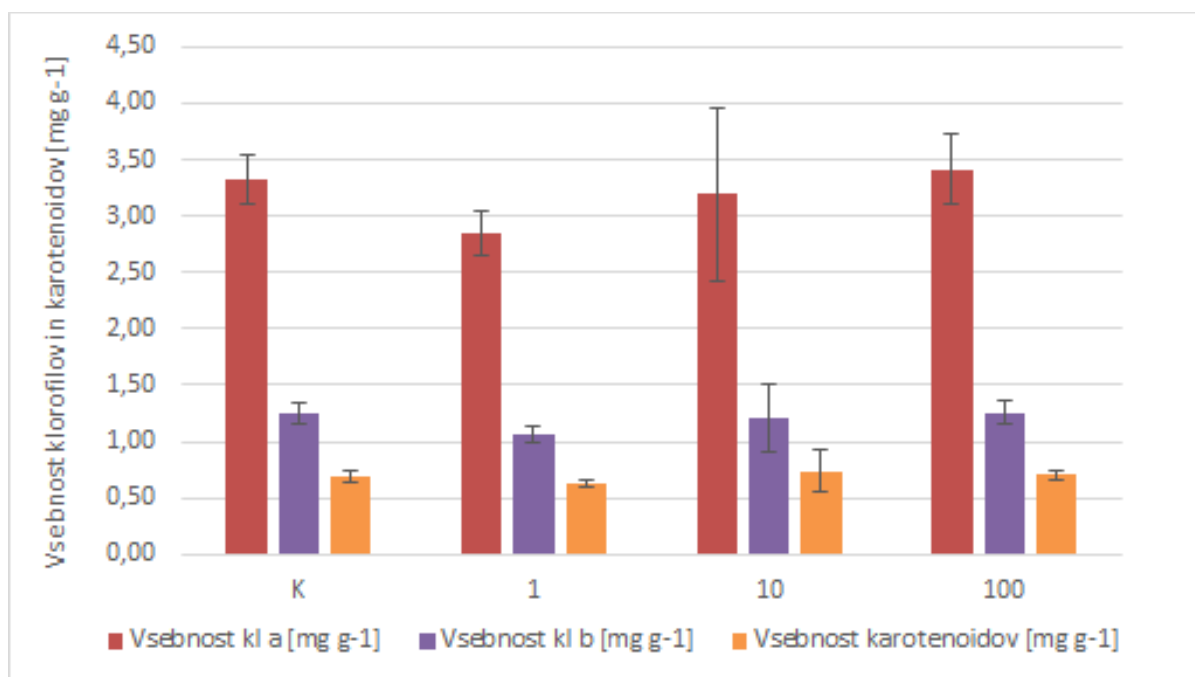
Suhe mase korenin se s povečevanjem CuSO₄ niso spreminjale. Suhe mase poganjkov pa so pri koncentraciji 10 µg ml⁻¹ začele upadati in bile najmanjše pri koncentraciji 100 µg ml⁻¹ (Slika 2b). Nadaljnja analiza je pokazala, da EC₅₀ za CuSO₄ pri poganjkih znaša 106 µg ml⁻¹.



Slika 2: a) Suha masa korenin (modri stolpci) in poganjkov (rdeči stolpci) ječmena, katerega semena smo kalili v 0 µg ml⁻¹ (kontrola, K), 1 µg ml⁻¹, 10 µg ml⁻¹ in 100 µg ml⁻¹ raztopini CuSO₄. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka (n=5). B) Dolžine korenin in poganjkov ječmena pri različnih koncentracijah CuSO₄. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka (n= 10, 10, 9, 9 za K, 1 µg ml⁻¹, 10 µg ml⁻¹, 100 µg ml⁻¹). Z različnimi črkami so označene izpostavitve, pri katerih so bile razlike statistično značilne (enosmerna ANOVA, Duncan post-hoc test pri p <0,05).

Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Pri nobeni izpostavitvi z CuSO_4 ni prišlo do statistično značilnih razlik v vsebnosti klorofilov in karotenoidov (Slika 3).



Slika 3: Vsebnost klorofila a (kl a), klorofila b (kl b) in karotenoidov v poganjkih ječmena, katerega semena smo namakali v $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ (kontrola, K), $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ raztopini CuSO_4 . Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka ($n=5, 4, 3, 3$ za koncentracije $0 \mu\text{g ml}^{-1}$, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Razprava

Kalitev semen

Pri kontroli in $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ je bila kalitev 100 %, pri 10 in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ pa 90 %. Tumulescu et al. (2004) so pri tretiranju s $120 \mu\text{M}$ CuSO_4 dobili 60 % kalitev, pri $1200 \mu\text{M}$ pa le 10 % ječmena, kar nakazuje, da visoke koncentracije znižajo uspešnost kalitve semen. Naših podatkov sicer ne moremo zanesljivo primerjati s podatki iz literature, ker smo imeli premalo ponovitev in nismo naredili statistične analize.

Dolžina in suha masa korenin in poganjkov

Rezultati našega poskusa so pokazali, da CuSO_4 deluje strupeno na ječmen in sicer v odvisnosti od koncentracije. Testirali smo koncentracije $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($4 \mu\text{M}$), $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($40 \mu\text{M}$) in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($400 \mu\text{M}$). CuSO_4 je vplival na dolžino korenin, na pa tudi na dolžino poganjkov. Zanimivo je bilo, da je bilo ravno obratno pri suhi masi. CuSO_4 je vplival na znižanje suhe mase poganjkov, ne pa tudi korenin. To si lahko razlagamo tako, da je prisotnost visokih koncentracij CuSO_4 vplivala na samo morfologijo rastline. Dolžina korenin se je skrajšala, a so korenine postale debelejšje in bolj razvejane. Dolžina poganjkov se ni zmanjšala, a so bili listi ožji oz. tanjši, kar je vplivalo na suho maso. Zelo podoben poskus sta izvedla Cenkcı and Dogan (2015) in sta prišla do podobnih ugotovitev kot mi. Ugotovila sta, da primerljive

koncentracije CuSO₄ (75, 150 in 225 µM) vplivajo na znižanje tako suhe mase korenin kot poganjkov in da je se je suha masa poganjkov bolj zmanjšala kot suha masa korenin, kar deloma sovпада z našimi podatki. Ugotovila sta tudi, da ima vpliv genotipa na občutljivost na CuSO₄ velik vpliv, zato bi bilo za namene bioremediacije ali uporabe za čiščenje odpadnih voda smiselno identificirati sorte, ki so bolj odporne na Cu. Za ta namen sta uspešno uporabila RAPD markerje in pokazala, da bi bila ta metod uporabna za iskanje na Cu odpornih genotipov.

Tudi Žaltauskaitė and Šliumpaitė (2013) sta opazila tako zmanjšanje dolžine poganjkov in korenin ječmena kot zmanjšanje suhe teže poganjkov in korenin pri koncentracijah Cu²⁺ ionov (sicer iz CuCl₂) od 6 do 60 µM.

Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Naši rezultati so pokazali, da CuSO₄ v nobeni koncentraciji ni imel statistično značilnega vpliva na vsebnost fotosinteznih pigmentov, kar se sklada z večino podatkov iz literature. Več avtorjev je pokazalo, da izpostavljenost višjim koncentracijam Cu²⁺ ionov ne vpliva na znižanje koncentracijo klorofila a in b pri koncentracijah vse do 1500 µM (Demirevska-Kepova et al. 2004). Žaltauskaitė and Šliumpaitė (2013) sta še dodatno ugotovila, da srednje konc. Cu²⁺ ionov (od 6 do 30 µM) lahko celo rahlo povišajo konc. klorofila a in b in spremenijo njuno razmerje v ječmenu, morda zato, ker je Cu mikroelement in kot že omenjeno prej, nujno potreben za rastline. Kljub temu, da izpostavljenost ječmena višjim koncentracijam Cu²⁺ ne zmanjša vsebnosti klorofila a in b, pa vseeno zmanjša učinkovitost Calvinovega cikla in asimilacije NH₄⁺ ter hkrati poveča antioksidativni stres (Demirevska-Kepova et al. 2004) in lipidno peroksidacijo (Žaltauskaitė and Šliumpaitė 2013). Nasprotno pa so Lwalaba et al. (2019) opazili statistično značilno znižanje tako klorofila a in b ter karotenoidov pri 100 µM Cu²⁺. To si morda lahko razložimo z ugotovitvijo, da ima na občutljivost ječmena na Cu²⁺ zelo velik vpliv genotip (Cenkci and Dogan 2015).

Zaključki

V poskusu smo spremljali učinek CuSO₄ na kalitev in nadaljnji razvoj ječmenovih semen oz. (v nadaljevanju) poganjkov. Opazovali smo vpliv različnih koncentracij CuSO₄ na dolžino korenin in poganjkov in posledično mokro in suho maso. Ugotovili smo, da v odvisnosti od koncentracije, CuSO₄ negativno vpliva na dolžino korenin, a ne na dolžino poganjka. Suha masa korenin pa se v primerjavi s suho maso poganjkov ni spreminjala. Po analizi vsebnosti klorofilov in karotenoidov je bilo razvidno, da CuSO₄ statistično značilno ne vpliva na vsebnost rastlinskih pigmentov.

Tako smo lahko določili, da CuSO₄ vpliva na morfologijo ječmena, v smislu spremembe oblike, razvejanosti korenin in oblike listov ter suhe mase poganjkov. Ne vpliva pa na zmanjšanje karotenoidnih in klorofilnih pigmentov. Razlog za to bi lahko pripisali vlogi bakra kot pomembnega mikroelementa pri rastlinskem razvoju in morda velikemu vplivu genotipa na občutljivost ječmena na Cu.

Literatura

- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G, Sebastiani L (2007) Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus x canadensis*) to high copper concentrations. *Environ Exp Bot* 62: 290-299 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.001>
- Cenkci S, Doğan N (2015) Random amplified polymorphic DNA as a method to screen metal-tolerant barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *Turk J Bot* 39:747–756 <https://doi.org/10.3906/bot-1412-28>
- Cuyppers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2000) Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol Plant* 110: 512-517 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2000.1100413.x>
- Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Hölzer R, Feller U (2004) Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese, *Environmental and Experimental Botany* 52:253-266 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.004>
- EPA (2002) Onsite Wastewater Treatment Systems Manual. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/2004_07_07_septics_septic_2002_osdm_all.pdf (dostopno 05.06.2021)
- Hrudey S, Chen W, Rouseaux C (1995) Bioavailability in Environmental Risk Assessment. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida <https://doi.org/10.1002/ep.670170105>
- Huguenot D, Bois P, Cornu J, Jézéquel K, Lollier M, Lebeau T (2014) Remediation of sediment and water contaminated by copper in small-scaled constructed wetlands: Effect of bioaugmentation and phytoextraction. *Environ Sci Pollut Res* 22: doi: 10.1007/s11356-014-3406-6 <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3406-6>
- Monni S, Uhlig C, Junttila O, Hansen E, Hynynen J (2001) Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environ Pollut* 112 (3):417-426 [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00139-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00139-1)
- Lwalaba JLW, Zvobgo G, Louis LT, Fu L, Mwamba TM, Mundende RPM, Zhang G (2019) Copper alleviates cobalt toxicity in barley by antagonistic interaction of the two metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 180:234-241 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.077>
- Tomulescu IM, Radoviciu EM, Merca VV, Tuduce AD. (2004). Effect of copper, zinc and lead and their combinations on the germination capacity of two cereals. *J Agric Sci Debrecen* 15:39–42 <https://doi.org/10.34101/actaagrar/15/3355>
- Žaltauskaitė J, Šliumpaitė I (2013) Evaluation of toxic effects and bioaccumulation of cadmium and copper in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ Res Eng Manage* 64:51–58 <http://dx.doi.org/10.5755/j01.erem.64.2.1951>

VPLIV HERBICIDA DUPLOSAN KV NA RAST JEČMENA

Avtorji: Kristina Andrejc, Maša Strašek, Nejc Urh, Mojca Zafran

Izvleček

Namen našega poskusa je bil ugotoviti, če herbicid Duplosan KV v določenih koncentracijah izkazuje vpliv na rast in razvoj rastlin ječmena ter kako se to izraža. Semena ječmena smo v vertikalnih kalilnikih izpostavili različnim koncentracijam Duplosana KV (1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL). Semena v kontrolnem poskusu smo izpostavili Hoaglandovi raztopini. Po sedmih dneh smo rastlinam ječmena izmerili dolžine korenin in poganjkov ter jim določili suho maso. Poganjkom (po liofiliziranju) in koreninam (po sušenju v sušilniku) smo določili suho maso. Po ekstrakciji fotosinteznih barvil iz poganjkov smo z merjenjem absorbance pri različnih valovnih dolžinah določili njihovo vsebnost pri posamezni obravnavi. Kaljivost ječmena je bila pri vseh obravnavah 100%. Koncentraciji Duplosana KV 10 µg/ml in 100 µg/ml sta v primerjavi s kontrolo vplivali na zaviranje rasti korenin in poganjkov. Ti koncentraciji sta tudi imeli vpliv na znižanje sveže mase poganjkov v primerjavi s kontrolo in koncentracijo 1 µg/ml. Vse koncentracije so v primerjavi s kontrolo zmanjšale nastalo suho maso korenin. Vsebnost klorofila a se je v primerjavi s kontrolo zmanjšala pri 10 µg/ml in 100 µg/ml. Prav tako se je pri teh dveh koncentracijah zmanjšala vsebnost klorofila b. Vsebnost karotenoidov je bila pri vseh koncentracijah manjša kot pri kontroli. Efektivne koncentracije 50 (EC50) se za različne analizirane parametre gibljejo med 0,7 in 2,9 µg Duplosana KV na mL.

Ključne besede: ječmen, seme, herbicid, duplosan KV, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Strma rast človeške populacije v zadnjih desetletjih je prinesla povečano potrebo po pridelovanju zadostnih količin hrane. Za povečanje produktivnosti se v kmetijstvu med drugim pogosto uporabljajo pesticidi. Pesticidi so snovi, ki se uporabljajo z namenom ubijanja ali nadzorovanja organizmov, ki so smatrani kot škodljivci ter vključujejo herbicide, insekticide, fungicide, rodenticide (Krieger 2001).

Herbicid Duplosan KV je sredstvo za zatiranje širokolistnih plevelov pri pridelovanju ozimnega in jarega žita brez podsevkov ter na travnikih in pašnikih (Cinkarna Celje d.d. 2013). Uporablja se predvsem za zatiranje plevelov pri navadni pšenici (*Triticum aestivum* L.) in navadnem ječmenu (*Hordeum vulgare* L.) (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano 2021). Glavna aktivna snov Duplosana KV je mekoprop-P. V pretežni meri poteka sprejem herbicida v rastlino preko listov. Mehanizem delovanja mekoprop-P-a temelji na motnjah deljenja in rasti celic, kar se odraža v nenormalni rasti (zvijanje) in vodi v propad občutljivih rastlin (Cinkarna Celje d.d. 2013).

Herbicid se po obdelavi poljskih površin spira v zemljo in naprej v vodne ekosisteme. V nizkih koncentracijah so ga zaznali v potokih in podtalnici mest in podeželj v Severni Ameriki (Pesticides in Surface and Groundwater of the United States, 1998). Prisotnost pesticidov v

čistilnih napravah urbanih okolij se pripisuje predvsem njihovi ne-kmetijski uporabi (upravljanje zelenic na golf igriščih, izobraževalnih ustanovah in parkih ter industrijska kontrola vegetacije) (Köck-Schulmeyer et al. 2013). Zato velik pomen predstavljajo analize vplivov teh snovi (prisotnih v vodovju ter posledično v čistilnih napravah) na različne organizme.

Namen našega poskusa je bil raziskat kako ta herbicid vpliva na rast in razvoj modelne rastline ječmena (*Hordeum vulgare* L.). Analizirali smo vpliv na dolžine korenin in poganjkov, svežo in suho maso ter vsebnost barvil. Kljub temu, da herbicid Duplosan KV naj ne bi imel negativnih učinkov na ječmen, predpostavljamo, da bo, zaradi relativno visokih uporabljenih koncentracij in apliciranja ob neoptimalni razvojni fazi rastline, zaviralno vplival na rast in razvoj te modelne rastline.

Metode in materiali

Pripravili smo raztopine herbicida Duplosan KV s Hoaglandovo raztopino v koncentracijah 1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL. Ustreznim količinam raztopine smo dodali primeren volumen herbicida in dobro premešali. Na filtrirni papir v vertikalnem kalilniku smo položili 10 semen ječmena in z ustrezno koncentracijo herbicida omočili papir in blazinico. Semena, ki so predstavljala kontrolo, smo omočili le s Hoaglandovo raztopino. Vertikalne kalilnike smo previdno zaprli s plastičnim pokrovom in jih za sedem dni postavili v rastno komoro (pogoji: fotoperioda 16/8h (svetloba/tema) in 23°C). Med rastjo smo pazili, da so imela semena vedno dovolj vlage na razpolago. Po potrebi smo dodatno omočili filtrirni papir s Hoaglandovo raztopino ali raztopino primerne koncentracije Duplosana KV.

Po sedmih dneh smo vsem semenom izmerili dolžino korenin in poganjka. Nato smo ločili korenine in poganjke od semen in jih po dva iz posamezne obravnave skupaj stehali ter določili svežo maso korenin in poganjkov. Poganjke smo nato zapakirali v aluminijevo folijo in jih dali liofilizirati, korenine pa posušili v sušilniku.

Po enem tednu smo ponovno stehali poganjke in korenine ter si zabeležili suho maso le teh. Korenine smo po tehtanju zavrgli, liofilizirane poganjke pa smo strli v terilnici, v katero smo postopoma dodajali 80% aceton in izpirali do končnega volumna 5 mL. Ekstrakcija je potekala čez noč v hladilniku. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali in izmerili absorbance s spektrofotometrom pri valovnih dolžinah 664, 647 in 470 nm za določanje vsebnosti barvil (klorofila a in b ter karotenoidov). Za te parametre smo analizirali tudi efektivne koncentracije, ki izzovejo 50% maksimalnega učinka (EC50).

Podatke smo obdelali z MS Excel vtičnikom XLSTAT (Addinsoft).

Rezultati

Kaljivost in rast semen ječmena

Vsa semena pri kontroli in vseh treh koncentracijah herbicida so uspešno kalila. Prav tako so se pri kontroli in vseh koncentracijah iz vseh semenih razvile korenine. Pri koncentracijah 10 µg/mL in 100 µg/mL se pri enem od semen ni razvil poganjek (Slika 1).

Na Sliki 1 lahko vidimo, da rast z višanjem koncentracije Duplosana KV vpada. Pri kontroli so poganjki najvišji in korenine najdaljše. Pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ pa so poganjki in korenine najkrajše.

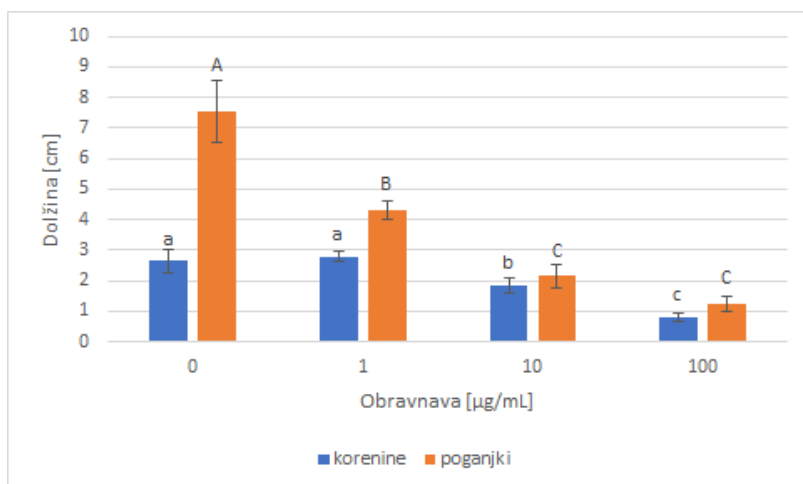


Slika 1: Na sliki so sedem dni stare rastline ječmena, katerih semena so bila med rastjo omočena s Hoaglandovo raztopino (kontrola) ali z različnimi koncentracijami Duplosana KV (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$).

Dolžina korenin in poganjkov

Na sliki 2 so prikazane povprečne dolžine poganjkov in korenin po enotedenski rasti ječmena. Vpliv Duplosana KV s koncentracijo 1 $\mu\text{g/mL}$ je pokazal statistično pomembno razliko v dolžini poganjkov v primerjavi s kontrolo. Vpliv koncentracij 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ se med seboj statistično pomembno ne razlikuje, se pa statistično pomembno razlikuje v primerjavi s kontrolo in koncentracijo 1 $\mu\text{g/mL}$.

Dolžina korenin kalic izpostavljenih 1 $\mu\text{g/mL}$ Duplosana KV ni izkazovala statistično pomembnih razlik v primerjavi s kontrolo. Pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ so bile dolžine korenin v povprečju statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo in koncentracijo 1 $\mu\text{g/mL}$. Pri največji koncentraciji (100 $\mu\text{g/mL}$) se je dolžina korenin statistično značilno razlikovala v primerjavi s kontrolo in drugima dvema koncentracijama.



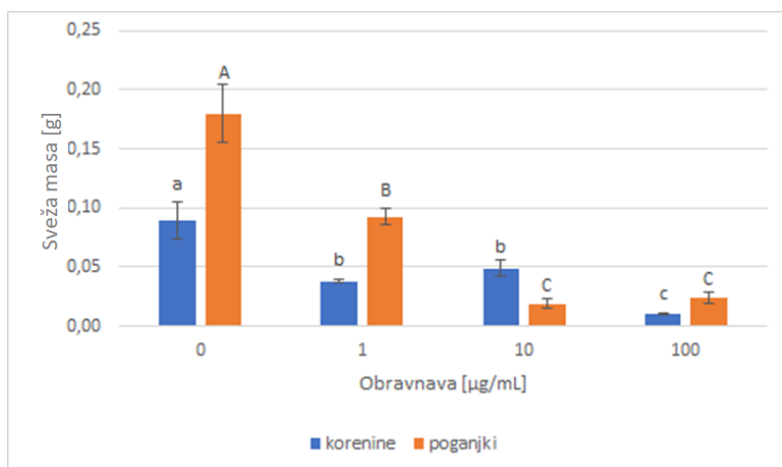
Slika 2: Dolžine korenin (modri stolpci) in poganjkov (oranžni stolpci) ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami Duplosana KV. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=10$) pri sedem dni starih rastlinah. Z različnimi črkami (a, b, c in A, B, C) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA (Duncan test).

Sveža masa korenin in poganjkov

Po sedmih dneh rasti smo tehtali poganjke in korenine za posamezno koncentracijo Duplosana KV in kontrole. Zaradi majhnih mas smo skupaj tehtali po dva poganjka oz. korenini, ki so oz. sta zrastle iz posameznega semena obravnavanega z določeno koncentracijo Duplosana KV.

Na sliki 3 so prikazane povprečne sveže mase dveh poganjkov oziroma korenin. Po obravnavi ječmenovih semen s koncentracijo Duplosana KV $1 \mu\text{g/mL}$ se je masa poganjkov statistično značilno razlikovala od kontrole. Koncentraciji $10 \mu\text{g/mL}$ $100 \mu\text{g/mL}$ se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, medtem ko se statistično značilno razlikujeta od koncentracije $1 \mu\text{g/mL}$ in kontrole.

Po obravnavi ječmenovih semen s koncentracijama Duplosana KV $1 \mu\text{g/mL}$ in $10 \mu\text{g/mL}$ se masi korenin med seboj statistično značilno ne razlikujeta, medtem ko sta statistično značilno različni v primerjavi s kontrolo. Masa korenin pri koncentraciji $100 \mu\text{g/mL}$ je statistično značilno različna od ostalih dveh koncentracij in kontrole.

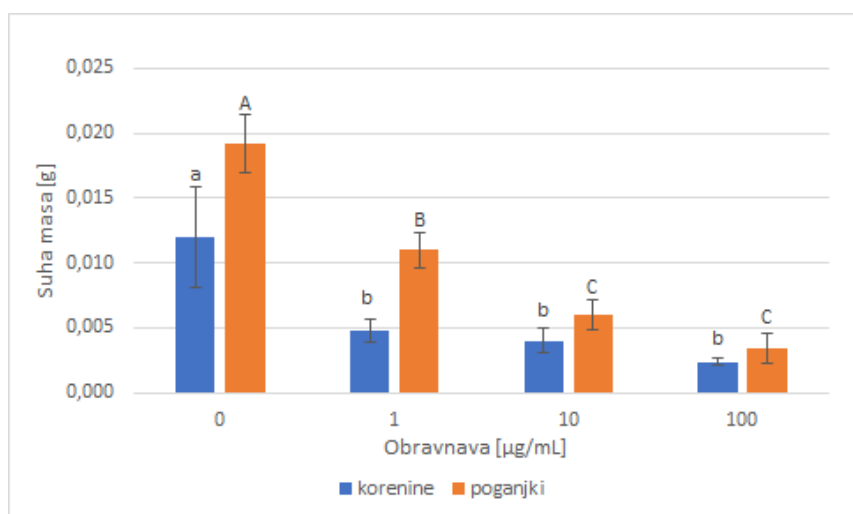


Slika 3: Sveže mase korenin (modri stolpci) in poganjkov (oranžni stolpci) ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami Duplosana KV. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=5$) pri sedem dni starih rastlinah. Z različnimi črkami (a, b, c in A, B, C) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA (Duncan test)

Suha masa korenin in poganjkov

Na sliki 4 so prikazane povprečne suhe mase dveh poganjkov ali korenin. Suha masa poganjkov je bila izmerjena po procesu liofiliziranja, suha masa korenin pa po sušenju v sušilniku.

Povprečna suha masa dveh poganjkov pri kontroli znaša $0,019 \pm 0,0045$ g. Pri obravnavi ječmenovih semen s koncentracijo Duplosana KV $1 \mu\text{g/mL}$ se suha masa poganjkov statistično razlikuje od kontrole. Vpliv koncentracij $10 \mu\text{g/mL}$ $100 \mu\text{g/mL}$ se med sabo statistično ne razlikuje, statistično pomembna razlika pa obstaja med vplivom teh dveh koncentracij ter kontrolo in koncentracijo $1 \mu\text{g/mL}$. Suhe mase korenin vseh treh koncentracij Duplosana KV se statistično značilno razlikujejo od kontrole. Različne koncentracije pa med seboj ne izkazujejo statistično značilnih razlik.



Slika 4: Suhe mase korenin (modri stolpci) in poganjkov (oranžni stolpci) ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami Duplosana KV. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=5$) pri sedem dni starih rastlinah. Z različnimi črkami (a, b, c in A, B, C) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA (Duncan test).

Vsebnost fotosinteznih barvil

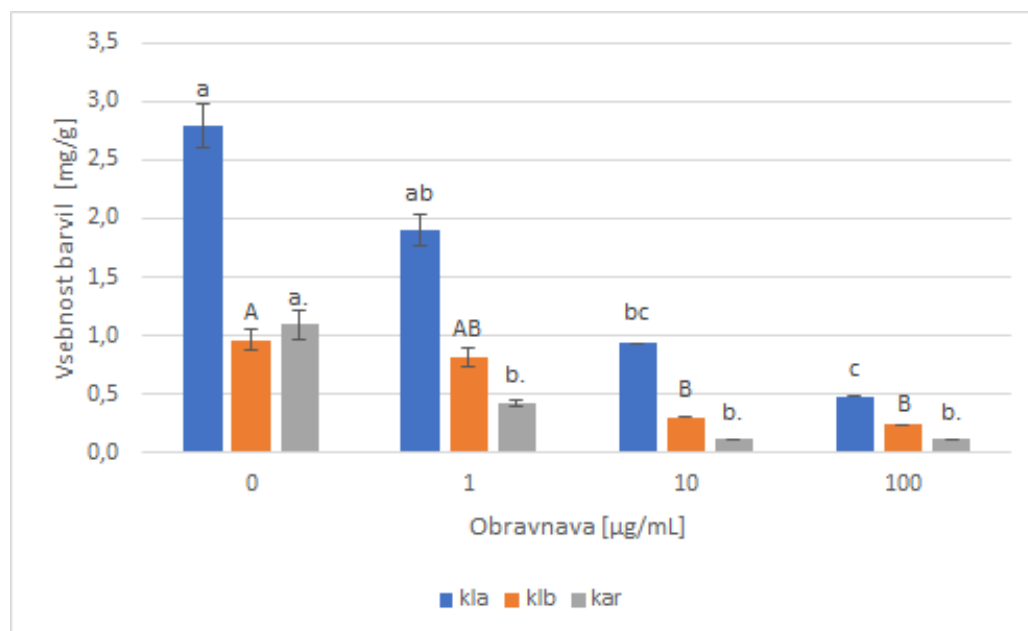
Z namenom določevanja vsebnosti barvil (klorofila a in b ter karotenoidov) je bila pri različnih valovnih dolžinah izmerjena absorbanca po ekstrahiranju poganjkov z 80% acetonom. Pri kontroli in koncentraciji Duplosana KV $1 \mu\text{g/mL}$ sta bila pripravljena dva vzorca, pri koncentracijah $10 \mu\text{g/mL}$ in $100 \mu\text{g/mL}$ pa je zaradi majhne količine materiala bil pripravljen po en vzorec.

Na sliki 5 so prikazane vsebnosti barvil pri različnih obravnavah. Podatki pridobljeni pri koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$ se prekrivajo s podatki iz kontrole in tako ne moremo trditi, da je ta koncentracija imela vpliv na manjšo vsebnost klorofila a pri tej obravnavi. Na podlagi statistične obdelave prav tako ne moremo trditi, da obstaja statistično pomembna razlika v primerjavi s vplivom koncentracij $10 \mu\text{g/mL}$ in $100 \mu\text{g/mL}$, razlika pa obstaja v primerjavi s kontrolo. Pri koncentraciji $100 \mu\text{g/mL}$ se je pokazala statistično pomembna razlika v primerjavi s kontrolo in vplivom koncentracije $1 \mu\text{g/mL}$, v primerjavi s vplivom koncentracije $10 \mu\text{g/mL}$ pa te razlike ni.

Za koncentracijo $1 \mu\text{g/mL}$ ne moremo trditi, da je vplivala na manjšo vsebnost klorofila b v primerjavi s kontrolo, saj se podatki prekrivajo. Za koncentraciji $10 \mu\text{g/mL}$ in $100 \mu\text{g/mL}$ pa

lahko rečemo, da sta statistično pomembno vplivali na zmanjšanje vsebnosti klorofila b v primerjavi s kontrolo. Vplivi teh dveh koncentracij so primerljivi s koncentracijo 1 $\mu\text{g/mL}$.

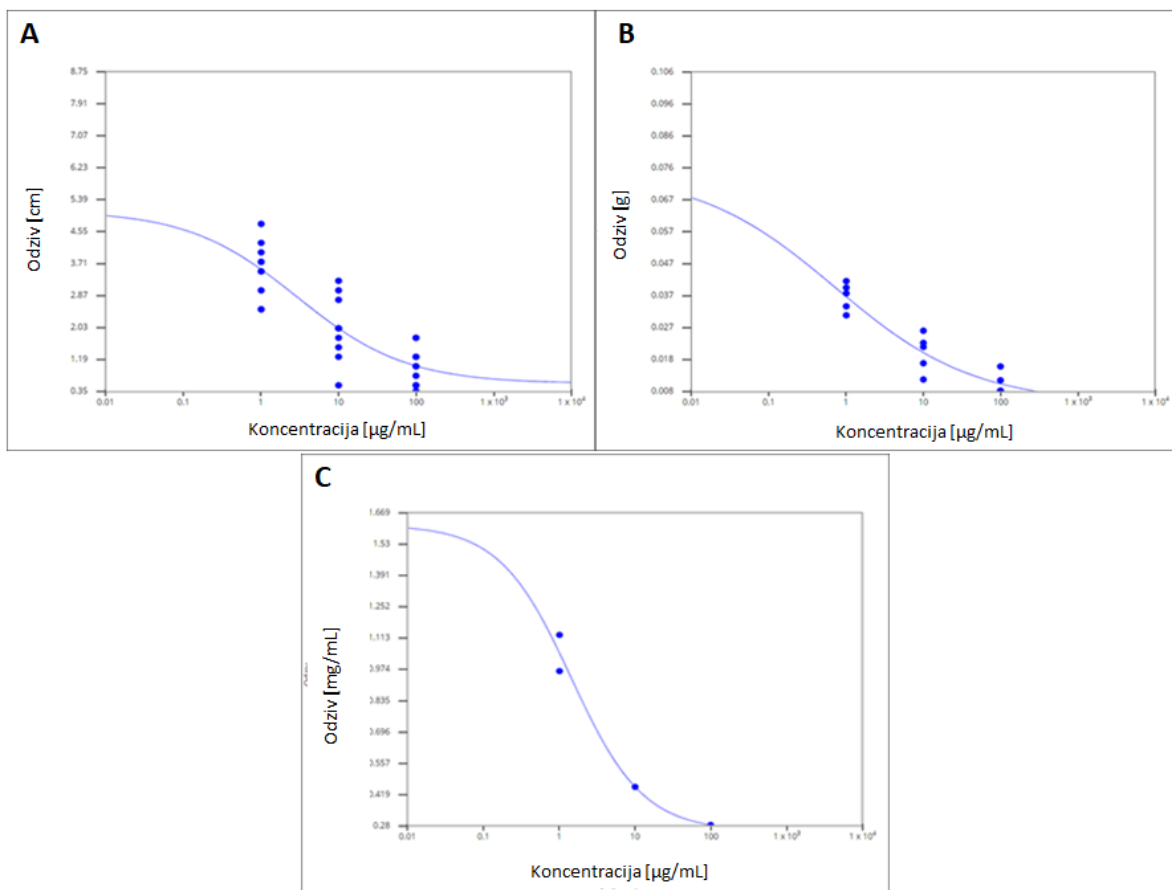
Vpliv vseh treh koncentracij (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$) je izkazal statistično pomembno razliko v primerjavi s kontrolo za vsebnost karotenoidov. Ob primerjavi teh koncentracij med sabo, pa statistično značilne razlike niso izražene.



Slika 5: Vsebnosti klorofila a (modri stolpci), klorofila b (oranžni stolpci) in karotenoidov (sivi stolpci) pri poganjkih ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami Duplosana KV. Pri kontroli in koncentraciji Duplosana KV 1 $\mu\text{g/mL}$ so prikazane povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=2$) pri sedem dni starih rastlinah. Pri koncentracijah 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ so prikazane vrednosti $n=1$. Z različnimi črkami (a, b, c in A, B, C) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA (Duncan test).

Efektivna koncentracija 50 - EC50

EC50 je koncentracija preiskovane snovi, ki pri testnih organizmih povzroči 50% sprememb določenega fiziološkega parametra. V našem poskusu smo analizirali EC50 Duplosana KV za dolžino korenin in poganjkov, svežo in suho maso korenin in poganjkov ter vsebnost fotosinteznih barvil – klorofila a in b ter karotenoidov. Za dolžino korenin in poganjkov se je izkazalo, da je EC50 2,92 $\mu\text{g/mL}$ Duplosana KV, saj se je pri tej koncentraciji dolžina korenin in poganjkov zmanjšala za 50%. Pri koncentraciji 0,72 $\mu\text{g/mL}$ se je za 50% zmanjšala masa korenin in poganjkov. Vsebnost barvil pa se je za 50% zmanjšala pri koncentraciji 1,43 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 6: EC50 Duplosana KV za različne parametre; A – EC50 dolžin korenin in poganjkov; B – EC50 suhe in sveže mase korenin in poganjkov; C – EC50 za vsebnost barvil.

Razprava

V naši raziskavi nas je zanimal vpliv herbicida Duplosana KV na rast in razvoj modelne rastline - ječmena (*H. vulgare*). Glavna aktivna snov tega herbicida je mekoprop-P, ki se pogosto uporablja v kmetijstvu. Ta ima visoko topnost v vodi in je problematičen za okolje, saj je zaradi majhne sorpcije, visoke gibljivosti in počasne razgradnje v tleh, dovzeten za izpiranje iz tal v podtalno vodo (Rodríguez-Cruz et al., 2010). Pri našem poskusu smo imeli veliko višje koncentracije Duplosana KV in posledično aktivne učinkovine, kot pa so ga do sedaj detektirali v čistilni napravi oz. vodotokih. Najvišja koncentracija aktivne učinkovine Duplosana KV (mecoprop-P -a), ki so jo detektirali v pritokih čistilnih naprav (večinoma gospodinjske in urbane odpadne vode) je bila 391 ng/L (0,0004 µg/mL) (Köck-Schulmeyer et al. 2013). V kanadskih potokih pa so detektirali vsebnost mecoprop-P -a 103 000 ng/L (0,103 µg/mL) (Kurt-Karakus et al. 2008).

Mi smo v našem poskusu najprej spremljali kalitev semen obdelanih z različnimi koncentracijami Duplosana KV. Za negativno kontrolo smo uporabili seme ječmena, ki ni bilo omočeno v Duplosanovo raztopino. Vsa semena ječmena, pri različnih koncentracijah tako kot tudi kontrola, so skalila. Iz tega lahko sklepamo, da herbicid ne vpliva na kalitev, tudi če ga uporabimo v višjih koncentracijah. Hussain in sod. (2008) so v njihovi študiji prav tako potrdili, da različni herbicidi nimajo vpliva na kalitev solate (*Lactuca sativa*).

Potem nas je po sedmih dneh zanimala rast kalic, ki smo jo ovrednotili z merjenjem dolžine korenin in poganjkov. Posebno pri poganjkih smo opazili, da je dolžina kar opazno padala z višanjem koncentracije herbicida. Pri koreninah ni bilo opaziti tako očitne razlike v dolžini kot pri poganjkih, ampak je bilo še vedno prisotno zmanjšanje. Iz tega lahko povzamemo, da Duplosan KV vpliva na rast in razvoj rastline, tudi pri nizkih koncentracijah. Večji vpliv je bil opažen pri zaviranju rasti poganjkov kot rasti korenin, iz česar sklepamo, da je do tega prišlo, ker se v listih vrši fotosinteza. Herbicidi lahko povzročijo stres v pridelku, kar se lahko kaže v zaviranju fotosinteze, vplivu na aktivnosti listnih rež ali motenjem presnovnih in fizioloških funkcij rastlin. Ti učinki pa so lahko začasni ali trajni (Araldi et al., 2015).

Izmerili smo tudi svežo in suho maso korenin in poganjkov. Pri obeh je jasno razvidno, da z večanjem koncentracije Duplosana KV, tako sveža kot suha masa manjšata. Te mase so tudi sorazmerne z velikostjo rastlin, ki se je prav tako manjšala.

V raziskavi Kana et al. (2003) je uporaba herbicida klomazona povzročila znižanje ravni klorofila (a in b) in karotenoidov, kar je spremljalo upadanje vsebnosti kompleksov za shranjevanje svetlobe. V naših rezultati se je vsebnost klorofila a v primerjavi s kontrolo zmanjšala pri koncentracijah 10 µg/ml in 100 µg/ml. Prav tako se je pri teh dveh koncentracijah zmanjšala tudi vsebnost klorofila b, vsebnost karotenoidov je bila pri vseh koncentracijah manjša kot pri kontroli. Iz tega lahko sklepamo, da ima Duplosan v določenih koncentracijah vpliv na zmanjšanje vsebnosti fotosinteznih barvil v ječmenu. Posredno torej deluje na fotosintezni aparat v poganjkih ječmena in tako tudi zavira rast le teh. Fluorescenca klorofila se trenutno uporablja kot hitra diagnostična in ne destruktivna metoda za odkrivanje in kvantificiranje škode povzročene zaradi herbicidov na fotosinteznem aparatu listov plevela, pridelkov in okrasnih rastlin (Araldi et al., 2015).

Zaključki

S poskusom smo pokazali, da ima herbicid Duplosan KV v uporabljenih koncentracijah pri ječmenu zaviralen učinek na rast korenin in poganjkov, prav tako pa se je pokazal vpliv na zmanjšanje sveže in suhe mase korenin in poganjkov. Ob povečevanju koncentracij obravnavane snovi se je zmanjšala tudi vsebnost barvil. Iz teh rezultatov sklepamo na to, da Duplosan KV v višjih koncentracijah v rastlini povzroča stres, kar se kaže v zmanjšanju vsebnosti fotosinteznih barvil in pa vplivu na rast. Vpliva herbicida na kalitev semen v tej raziskavi nismo zaznali. EC50 so pokazale, da se 50% sprememb za postavljene parametre zgodi v razponu koncentracij med 0,7 in 1,9 µg/mL.

Pri nadaljnjem raziskovanju, bi lahko izvedli podoben poskus, ampak z rastlinami, ki so zaradi svoje osnovne fiziologije bolj primerne za implementacijo v sisteme čistilnih naprav. Tako bi dobili podatke o vplivih, ki bi bili aktualni direktno za razvoj čistilnih naprav. Raziskovanje v smeri ohranjanja čistega okolja je izrednega pomena, tako za naš vsakdan kot tudi za prihodnost planeta.

Literatura

- Araldi R., Corniani N., Tropaldi L., Girotto M., Belapart D., Simoes P. S., Velini E. D. 2015. Chlorophyll fluorescence in guanandi tree (*Calophyllum brasiliense*) after herbicide application. *Planta daninha*. 33,1: 77-82. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582015000100009>.
- Cinkarna Celje d.d. (2013) Duplosan KV. <https://www.cinkarna.si/si/izdelki/agro-izdelki/1005> (pridobljeno 1.6.2021)
- Hussain M. I., Gonzalez-Rodriguez L., Regiosa M. J. 2008. Germination and growth response of four plant species to different allelochemicals and herbicides. *Allelopathy Journal*. 22,1: 101-110.
- Kana R., Spundova M., Ilík P., Lazar D., Klem K., Tomek P., Nauš J., Prašil O. 2004. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78,3: 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.12.002>.
- Köck-Schulmeyer M, Villagrasa M, López de Alda M, et al (2013) Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Sci Total Environ* 458–460:466–476. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.010>
- Krieger R (ed) (2010) *Handbook of Pesticide Toxicology*, 3rd edition. Academic Press, London
- Kurt-Karakus PB, Bidleman TF, Muir DCG, et al (2008) Chiral current-use herbicides in Ontario streams. *Environ Sci Technol* 42:8452–8458. <https://doi.org/10.1021/es8011854>
- Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS (2021) Seznam registriranih fitofarmacevtskih sredstev. <http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/> (pridobljeno 1.6.2021)
- Pesticides in Surface and Groundwater of the United States: Summary of Results of the National Water Quality Assessment Program (NAWQA), U.S. Geological Survey: Reston, VA, 1998.
- Rodríguez-Cruz S.M., Bælum S., Shaw L. S., Sørensen S.R., Shi S., Aspray T., Jacobsen C.S., Bending G.D. 2010. Biodegradation of the herbicide mecoprop-p with soil depth and its relationship with class III tfdA genes. *Soil Biology and Biochemistry*. 42;1:32-39. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.018>

VPLIV KADMIJA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Špela Erčulj, Tim Ratajc, Urša Štepec, Ana Tomac

Izvleček

Namen dela je bilo preverjanje vpliva različnih koncentracij Cd na dolžino, svežo in suho maso poganjkov in korenin ječmena ter vpliv na vsebnost fotosinteznih pigmentov klorofila A in B ter karotenoidov. Uporabljeni so bili vertikalni kalilniki za rast ječmena pri izpostavitvi različnim koncentracijam Cd, vsebnosti fotosinteznih pigmentov pa so bile določene spektrofotometrično. Zgolj koncentracija Cd 100 µg/mL je statistično značilno vplivala na vrednosti sveže mase in dolžine korenin, pri ostalih koncentracijah Cd pa pri sveži in suhi masi ter dolžini poganjkov in korenin ni prišlo do statistično značilnih razlik med izpostavitvijo ter kontrolo. Vsebnosti klorofila A in B se niso statistično razlikovale med kontrolo in izpostavitvijo 100 µg/mL Cd.

Ključne besede: ječmen, seme, kadmij, težke kovine, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Kadmij (Cd) je znan kot ena izmed najbolj strupenih kovin in obstojnih onesnažil v okolju. Njegov vpliv se kaže predvsem v omejevanju rasti in razvoja rastlin. V primerjavi z drugimi kovinami kot so cink, baker in mangan, je kadmij neesencialna kovina, ki je strupena predvsem v višjih koncentracijah. Na njegovo koncentracijo v prsti vplivajo predvsem industrijske aktivnosti, kot so odlaganje urbanih odpadkov, rudarjenje, proizvodnja umetnih gnojil, metalurška industrija, uporaba pesticidov in fosilnih goriv. Rastlina se s potencialno strupeno kovino najprej sreča s koreninami, tako je vsebnost te kovine v koreninah večine rastlin večja kot v nadzemnih delih. Cd povzroči kompleksne spremembe v rastlinah na genetskem, fiziološkem in biokemijskem nivoju in vodi do fitotoksičnosti. Indikatorji fitotoksičnosti so zvijanje listov, zmanjšanje rasti korenin in poganjkov, zmanjšan transport kovin in zmanjšanje respiratornih in fotosinteznih aktivnosti. Prav tako pa se zmanjša tudi aktivnost encimov in membranske funkcije. Od vseh stranskih učinkov kadmija je najhujša lipidna peroksidacija, saj vodi v propad membran (Muradoglu et al. 2015).

Povečana odvisnost kmetijstva od kemičnih gnojil in hitra industrializacija je povzročila onesnaženje tal s kovinami, med drugim tudi s Cd, ki velja za enega izmed glavnih onesnažil tal, saj je zadrževalni čas Cd v tleh več kot 1000 let (di Toppi and Gabbrielli 1999). V Sloveniji obstaja precej območij, kjer predstavlja onesnaženost s Cd resen, a obvladljiv problem. Precej je takih, kjer je vsebnost Cd v prsti nad mejno vrednostjo (1-2 mg Cd na kg suhe prsti) ali nad kritično vrednostjo (>12 mg Cd na kg suhe prsti). Najbolj obremenjena območja onesnažene zemljine se nahajajo v Mežiški dolini v bližini rudnika in talilnice svinca, v Celju na območju stare Cinkarne, v industrijskem delu Raven na Koroškem, Trbovelj in Idrije. Ta območja so znana predvsem po obratih metalurške in kemične industrije, ki so delovali v preteklosti. Za zmanjšanje tveganja prekomernega vnosa kovin v človeka iz zmanjšanje izpiranja v podtalnico, pa so bile narejene mnoge študije ter projekti, ki se že izvajajo (Agencija RS za okolje 2008).

Cilj našega poskusa je bilo ugotoviti, katera koncentracija Cd je za rastlino še sprejemljiva in katere koncentracije negativno vplivajo na rast in kaljivost. Preverjali bomo hipotezo, ali Cd zmanjša rast rastline in vsebnost količine fotosinteznih pigmentov (klorofila A in B ter karotenoidov).

Metode in materiali

Eksperimentalni del

Pripravili smo polovično Hoaglandovo raztopino s štirimi različnimi koncentracijami Cd: 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$. Za kalitev semen smo uporabili vertikalne kalilnike z blazinico in filtrilnim papirjem, ki so bili omočeni z različnimi Hoaglandovimi raztopinami z ustrežno koncentracijo Cd. V vsakem kalilniku je 7 dni rastlo 10 semen ječmena pri pogojih: fotoperioda 16 h svetloba in 8 h tema ter 23 °C pri vzdrževani primerni vlagi.

Po sedemdnevni inkubaciji smo poganjke in korenine izmerili ter odstranili od semena, da smo določili svežo maso naključno združenih dveh poganjkov in korenin. Korenine smo naknadno sušili v sušilniku 24 h pri 105 °C, poganjke pa liofilizirali 48 h pri –90 °C v vakuumu (0,001 mbar). Nato smo določili suhe mase korenin in poganjkov. Korenine smo po tehtanju zavrgli, združene liofilizirane poganjke pa smo ponovno združevali, kjer suha masa dveh poganjkov ni dosegala 0,02 g. Iz 10 poganjkov smo tako pri vseh koncentracijah pridobili po 4 združene vzorce liofiliziranih poganjkov, ki smo jih zmleli v terilnici ter raztopili v 5 mL 80 % acetona. Ekstrakcija pigmentov je potekala preko noči pri 4 °C. Vse vzorce smo po prekonočni inkubaciji centrifugirali na 2000 rpm za eno minuto do posedanja večjih delcev, supernatant pa smo uporabili za merjenje absorbance pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 470 nm.



Slika 1: Rast ječmena po 5 in 7 dneh eksperimenta pri različnih koncentracijah Cd v vertikalnem kalilniku.

Statistična analiza

Pri podatkih, kjer je $n < 8$, smo za primerjavo več kot dveh neodvisnih setov podatkov uporabili Kruskal-Wallis test, pri primerjavi dveh neodvisnih setov podatkov smo uporabili Mann-Whitney test. Pri Post Hoc analizi, kjer smo primerjali posamezne pare neodvisnih setov podatkov, je bil uporabljen Dunnov test večkratnih primerjav (ang. Dunn's multiple comparisons test).

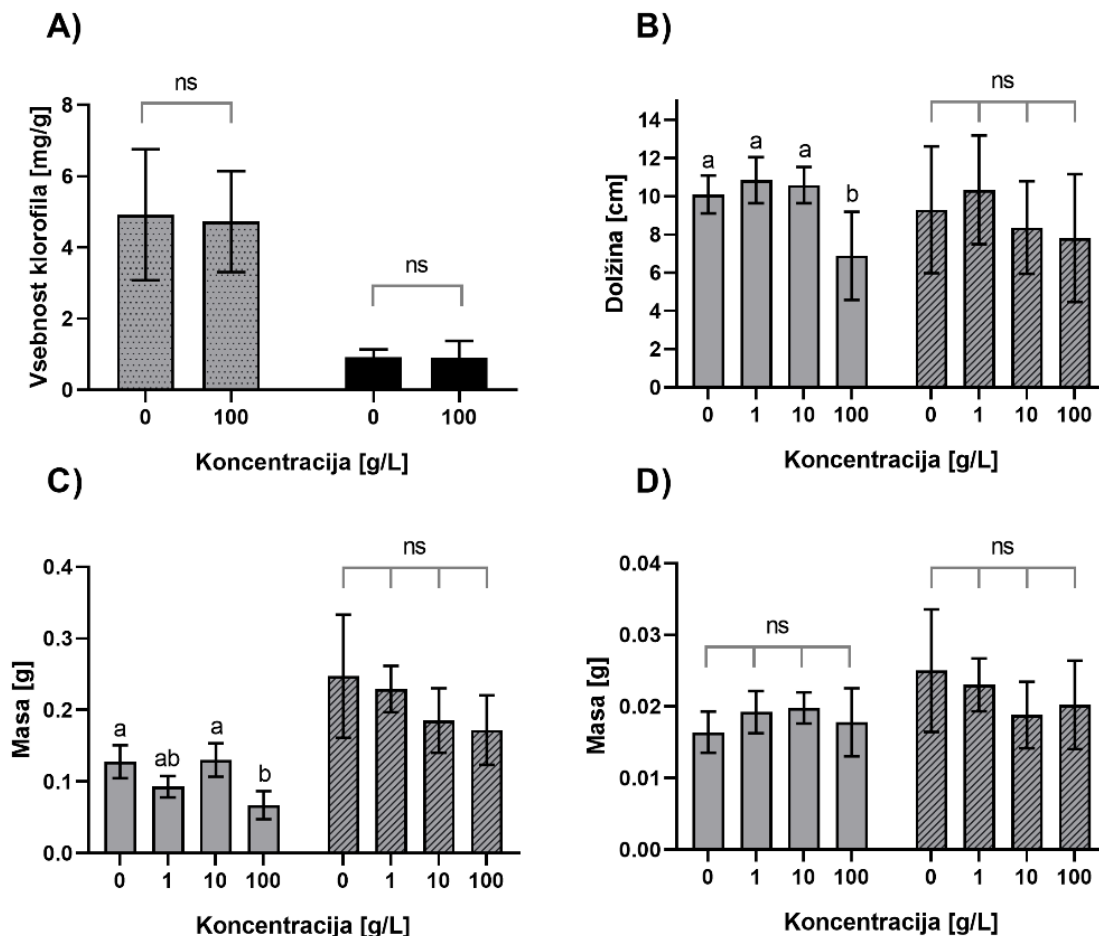
Pri podatkih, kjer je $n \geq 8$, smo za test normalnosti na posameznih neodvisnih setih podatkov uporabili Shapiro-Wilk test. Pri normalno razporejenih vseh neodvisnih setih podatkov se je za primerjavo več kot dveh neodvisnih setov podatkov uporabil enosmerni test variance (ang. one-way ANOVA). Pri Post Hoc analizi, kjer smo primerjali posamezne pare neodvisnih setov podatkov, je bil uporabljen Tukeyev test večkratnih primerjav (ang. Tukey's multiple comparisons test). Pri podatkih, kjer pri vseh neodvisnih setih podatkov ni bila zagotovljena normalna porazdelitev, je bil uporabljen Kruskal-Wallis test ter pri Post Hoc analizi Dunnov test večkratnih primerjav (ang. Dunn's multiple comparisons test).

Za statistično obdelavo podatkov ter njihovo vizualizacijo smo uporabili program GraphPad Prism 8.0.1, stopnja značilnosti α je bila vedno nastavljena na 0,05.

Rezultati

Pri izpostavitvi vsem štirim koncentracijam Cd so vsa semena ječmena uspešno kalila.

Pri vsebnosti klorofila A in B (slika 2 A) ni signifikantnih razlik med koncentracijama Cd 0 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$. Zaradi težav pri izvajanju poskusa, statistična obdelava in vizualizacija podatkov za vsebnost karotenoidov in klorofilov A in B pri koncentracijah Cd 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ ni bila mogoča.



Slika 2: **A** - povprečja in standardni odkloni vsebnosti klorofila A [mg/g] (pikčasti stolpci) ter klorofila B [mg/g] (črni stolpci) pri različnih koncentracijah Cd (0 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$). Mann-Whitney test ($\alpha = 0,05$) pri vsebnosti klorofila A: $p = 0,89$ (ns – ni signifikantno), Mann-Whitney test ($\alpha = 0,05$) pri vsebnosti klorofila B: $p = 0,69$ (ns – ni signifikantno), $n = 4$; **B** - povprečja in standardni odkloni dolžin [cm] korenin (sivi stolpci) in poganjkov (črtasti stolpci) pri različnih koncentracijah Cd (0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$). ANOVA test ($\alpha = 0,05$) pri dolžinah korenin: $p < 0,0001$, Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) pri dolžini poganjkov: $p = 0,14$ (ns – ni signifikantno), $n = 10$; **C** - povprečja in standardni odkloni svežih mas [g] korenin (sivi stolpci) in poganjkov (črtasti stolpci) pri različnih koncentracijah Cd (0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$). Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) pri sveži masi korenin: $p = 0,0046$, Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) pri sveži masi poganjkov: $p = 0,16$ (ns – ni signifikantno), $n = 5$; **D** - povprečja in standardni odkloni suhih mas [g] korenin (sivi stolpci) in poganjkov (črtasti stolpci) pri različnih koncentracijah Cd (0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$). Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) pri suhi masi korenin: $p = 0,40$ (ns – ni signifikantno), Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) pri suhi masi poganjkov: $p = 0,50$ (ns – ni signifikantno), $n = 5$.

Pri dolžinah korenin (slika 2 B) ni bilo signifikantnih razlik pri semenih, izpostavljenih koncentraciji Cd 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ s kontrolo (koncentracija Cd 0 $\mu\text{g/mL}$), pri dolžinah korenin semen, ki pa so bila izpostavljena koncentraciji Cd 100 $\mu\text{g/mL}$ pa je prišlo do signifikantnih razlik med kontrolo in ostalima dvema koncentracijama Cd. Pri meritvah dolžine poganjkov ni prišlo do signifikantnih razlik pri izpostavljenosti z različnimi koncentracijami Cd.

Pri meritvah sveže mase korenin (slika 2 C) ni bilo signifikantnih razlik pri semenih, izpostavljenih koncentraciji Cd 10 $\mu\text{g/mL}$ s kontrolo (koncentracija Cd 0 $\mu\text{g/mL}$), pri semenih,

ki pa so bila izpostavljena koncentraciji Cd 1 $\mu\text{g/mL}$ pa so bile meritve sveže mase korenin primerljive z meritvami kontrole. Sveže mase korenin pri dodatku Cd koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$, je prišlo do signifikantnih razlik z masami pri koncentraciji Cd 10 $\mu\text{g/mL}$ ter pri kontroli, meritve pri koncentraciji Cd 1 $\mu\text{g/mL}$ pa so bile z meritvami pri koncentraciji Cd 100 $\mu\text{g/mL}$ primerljive. Pri meritvah sveže mase poganjkov ni prišlo do signifikantnih razlik pri izpostavljenosti z različnimi koncentracijami Cd.

Pri meritvah suhe mase korenin in poganjkov (slika 2 D) ni prišlo do signifikantnih razlik pri izpostavljenosti z različnimi koncentracijami Cd.

Razprava

Glavni problem pri analizi podatkov iz eksperimentalnega dela so bile napačne meritve absorbance, na podlagi katerih ni bilo možno izračunati vsebnosti klorofila A in B pri koncentracijah Cd 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ ter vsebnosti karotenoidov pri vseh koncentracijah Cd. Eksperimentalni del bi bilo zaradi tega potrebno ponoviti, hkrati pa bi bilo zaradi bolj kvalitetne statistične analize potrebno opraviti več bioloških in tehničnih ponovitev, saj so parametrični testi veliko bolj zanesljivi kot neparametrični, ki so bili v večinskem delu uporabljeni pri statistični analizi.

Signifikantne razlike so bile opazne zgolj pri sveži masi in dolžinah korenin pri koncentraciji Cd 100 $\mu\text{g/mL}$, nižje koncentracije Cd pa niso bile značilno različne od kontrole. Tako lahko na podlagi naših podatkov zaključimo, da zgolj koncentracija Cd 100 $\mu\text{g/mL}$ negativno vpliva tako na svežo maso kot na dolžino korenin. Pri vsebnosti klorofila A in B naj ne bi prišlo do negativnih učinkov pri izpostavitvi 100 $\mu\text{g/mL}$ Cd.

Pri kopenskih rastlinah so korenine najpomembnejši organ za privzem kovin, vključno s Cd, zato so korenine tudi prvi organ, na katerega negativno vpliva izpostavitve Cd pri različnih koncentracijah (Andresen and Küpper 2012). To je opazno tudi pri naših rezultatih, saj se meritve sveže mase in dolžin poganjkov niso statistično značilno razlikovale med posameznimi koncentracijami Cd, pri koreninah pa je bila razlika pri najvišji koncentraciji Cd (100 $\mu\text{g/mL}$) statistično različna, saj se je negativni učinek Cd na rastline ječmena kazal v manjši sveži masi in dolžini korenin. Tudi v študiji iz leta 2002 so opazili krajšanje dolžine korenin ječmena ob dodatku Cd. Za razliko od nas pa se je pri njih signifikantno zmanjšala tudi dolžina poganjkov (Vassilev et al. 2002).

Vsebnost klorofila A in B se v našem primeru pri koncentraciji Cd 100 $\mu\text{g/mL}$ ni značilno razlikovala od kontrole, kar bi lahko pripisali tehničnim težavam pri meritvah absorbance, saj naj bi že izpostavitve nižjim koncentracijam Cd negativno vplivala na vsebnost klorofilov in karotenoidov (Aiman Hasan et al. 2007). V študiji iz leta 2015 so z dodajanjem kadmija zaznali do 30% znižanje vsebnosti klorofila A in do 18% znižanje klorofila B v sadikah jagod. Kadmij namreč inhibira encime, kateri sodelujejo pri sintezi pigmentov (Muradoglu et al, 2015). V študiji so Vassilev in sodelavci dokazali, da se z dodatkom Cd ob rasti poganjkov zmanjša vsebnost klorofila in karotenoidov po 10 dneh izpostavitve. Klorofil se je v njihovem poskusu pri koncentraciji 28 mg Cd/kg prsti znižal za 20% (Vassilev et al. 2002). Tako predvidevamo, da bi morali naš poskus ponoviti, saj smo imeli nenatančne podatke o absorbanci klorofila in bi morda z boljšimi podatki dobili drugačen rezultat. Tudi v študiji vpliva Cd na solato so zaznali zmanjšano vsebnost klorofila pri koncentraciji Cd 50 μM (Dias et al 2012).

Zaključki

Kadmij ima kot ena najbolj potencialno strupenih kovin in vseprisotno industrijsko onesnažilo precejšen vpliv na rast in razvoj rastlin. Po pridobljenih podatkih iz naše raziskave je razvidno, da vpliva predvsem na rast poganjkov in korenin, iz literature pa vidimo, da vpliva tudi na znižanje vsebnosti klorofila v rastlinah. Kljub temu, da v nižjih koncentracijah pri rastlinah nismo dokazali signifikantnih sprememb pa predvidevamo, da se v rastlini tudi nalaga. Uporaba rastlin, ki rastejo na takih degradiranih območjih je neprimerna za prehrano ljudi, ne glede na to, da ob manjših dozah onesnaženja ne pride do fizioloških sprememb rastlin.

Literatura

Agencija RS za okolje (2008) Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Slovenija. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

Aiman Hasan S, Fariduddin Q, Ali B, et al (2007) Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol* 30(2): 165-174.

Andresen E, Küpper H (2013) Cadmium Toxicity in Plants. In: Sigel A, Sigel H, Sigel R (eds) *Cadmium: From Toxicity to Essentiality. Metal Ions in Life Sciences*, vol 11. Springer, Dordrecht, pp 395-413. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_13

Dias MC, Monteiro C, Moutinho-Pereira J, et al (2012) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol Plant* 35:1282-1289. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1167-8>

Muradoglu F, Gundogdu M, Ercisli S, et al (2015) Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological Research* 48:11. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0001-3>

Sanità di Toppi L and Gabbrielli, R (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2): 105–130. [https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(98)00058-6)

Vassilev A, Lidon FC, do Ceo Matos M, et al (2002) Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium- and copper-treated barley plants. *Journal of Plant Nutrition* 25:11. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014699>

VPLIV MIKROPLASTIKE NA RAST JEČMENA

Avtorji: Tjaša Čukajne, Mila Dinkovska, Aldijana Mašinović, Nikita Matović

Izvleček

Namen raziskave je bil preučevanje učinka mikroplastike na fiziološke in rasne parametre ječmena. Poskus smo si zastavili tako, da smo semena omočili z različnimi koncentracijami mikroplastike suspendirane v hranilni raztopini (kontrola, 1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL) in nato preverjali kaljivost semen, višino poganjkov, dolžino korenin, vsebnost fotosinteznih pigmentov in svežo ter suho maso rastlin. Ugotovili smo, da pri višini poganjkov in dolžini korenin pri obravnavi z različnimi koncentracijami mikroplastike ni bilo statistično značilnih razlik. Suha masa korenin, sveža in suha masa poganjkov je bila najvišja pri 10 µg/mL. Vsebnost rastlinskih barvil v poganjkih se s tretiranjem z mikroplastiko ni znižala. Najvišja koncentracija barvil je bila pri obravnavi 10 µg/mL. Sklepamo, da koncentracija mikroplastike 10 µg/mL pozitivno vpliva na rast ječmena in razvoj fotosinteznih barvil, koncentracija 100 µg/mL pa še ne deluje zaviralno, saj ni bilo opaženih statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo.

Ključne besede: ječmen, seme, mikroplastika, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Raziskovalce že skoraj 20 let zanima škoda, ki jo povzroča mikroplastika v okolju. Sprva so njene učinke raziskovali večinoma v morju, vendar so kasnejše študije pokazale, da škoduje tudi kopenskim habitatom in organizmom. Odkrili so jo tudi na kmetijskih poljih, v mestih in industrializiranih območjih. Našli so jo v raznovrstnih izdelkih od kozmetike do sintetičnih oblačil. Richard Thompson (2004) je mikroplastiko opisal kot plastične delce s premerom do 5 milimetrov, ki se v okolici pojavijo kot posledica onesnaženja s plastiko. Mikroplastika je sestavljena iz atomov ogljika in vodika, skupaj povezanih v polimerne verige. Druge kemikalije, ki so tudi običajno prisotne v mikroplastiki so ftalati, polibromirani difenil etri (PBDE) in tetrabromobisfenol A (TBBPA) (Rogers. 2020).

Mikroplastiko lahko razdelimo na primarno in sekundarno. Med primarno mikroplastiko spadajo vsi zelo majhni delci, ki se največ uporabljajo v kozmetičnih preparatih za piling kože. Sekundarna mikroplastika nastane, ko se razgradijo večji delci plastike kot so na primer delci barve ali tekstilna vlakna. Ti majhni koščki bi lahko rabili več kot deset let, da se popolnoma razgradijo. Razgradnja spremeni predvsem barvo, morfologijo površine, velikost delcev, kristaliničnost in gostoto mikroplastike. Na mikroplastiko lahko gledamo kot na fizikalne onesnaževalce tal. Mikrovlakna lahko povzročijo nižjo gostoto tal, kar lahko neposredno pomeni manjšo odpornost na prodiranje korenin rastlin in boljše prezračevanje tal ter s tem večjo rast korenin. Kar se tiče nanodelcev, lahko ti vstopijo v rastlinske korenine in povzročijo veliko škodo kot je na primer sprememba celične membrane, znotrajceličnih molekul in nastanek oksidativnega stresa. Če se deli rastline v katerih je akumulirana mikroplastika uporabljajo za prehrano živine ali ljudi, lahko na ta način mikroplastika vstopa v prehranjevalno verigo vretenčarjev (Rogers. 2020).

Plastične delce lahko najdemo tudi v najbolj izoliranih območjih Zemlje. V raziskavi sta Issac in Kandasubramanian (2021) v 96 od 97 vzorcev, ki so jih zbrali v arktičnem oceanu, odkrila mikroplastiko. 73 % te mikroplastike so predstavljali poliestri iz oblačil. Zmanjšana gostota mikrovlačen jih lahko naredi bolj prenosljive z vodo in vetrom, njihovo visoko razmerje med površino in prostornino pa lahko nase veže škodljive kontaminante, zaradi česar so lahko bolj nevarne za vodne vrste kot druge oblike mikroplastike. Velik delež mikrovlačen lahko zaradi svoje omejene velikosti zdrsne iz čistilnih naprav in se odvede v morske habitate.

Mikroplastika je zaradi svoje majhnosti in velikega razmerja med površino in prostornino nagnjena k sorpciji in kopičenju onesnažil iz okoliške vode. Sorpcija hidrofobnih onesnažil na mikroplastiko velja za pomemben okoljski proces, saj vpliva na mobilnost in biorazpoložljivost teh onesnažil. Znano je, da se v morskih okoljih v mikroplastiki koncentrirajo obstojna organska onesnažila, kot so DDT, PCB in dioksini. Koncentracije onesnažil na mikroplastiki so prostorsko spremenljive. Koncentracije PCB, PAH in HCH na mikroplastiki so odvisne od bližine virov onesnaženja. PE naj bi sorbiral več organskih onesnažil kot druge vrste mikroplastike. Starejša mikroplastika pa je nagnjena k temu, da sorbira več onesnažil kot prvotna. Biološko je mikroplastika nagnjena k temu, da jo kolonizirajo mikroorganizmi. Mikroplastika lahko vpliva na razvoj mikrobnih skupnosti in izmenjavo genov med različnimi bakterijskimi taksoni. Taki geni so na primer geni za odpornost proti antibiotikom in kovinam (Guo et al. 2019)

Namen raziskave je bil preučiti učinek, ki ga ima mikroplastika na fiziološke in rastne parametre ječmena. Na podlagi predhodno izvedenih študij (Qi et al. 2020; Boots et al. 2019) pričakujemo, da bo višina poganjkov in dolžina korenin pri obravnavi z vsemi koncentracijami mikroplastike statistično značilno manjša kot pri kontroli, s povečevanjem koncentracije pa bo vpliv vse večji. Pričakujemo, da se bo skladno s tem znižala tudi sveža in suha masa poganjkov in korenin. Sklepamo, da se bo z višanjem koncentracije mikroplastike znižala vsebnost barvil v poganjkih.

Metode in materiali

Na vajah smo uporabili mikroplastiko, prisotno v mikrokroglicah, ki so bile pridobljene iz pilinga za obraz. Pripravili smo različne raztopine mikroplastike s Hoaglandovo raztopino s koncentracijami 1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL. Hoaglandova raztopina je mineralna raztopina z naborom mineralnih snovi, ki jih rastline potrebujejo za optimalno rast in razvoj. V kalilnik smo položili blazinico in filtrirni papir ter 10 zrn ječmena, ki smo jih omočili s Hoaglandovo raztopino (kontrola) in raztopinami mikroplastike naraščajočih koncentracij. Pri tem smo bili pozorni, da se delci mikroplastike v raztopini niso posedli. Zaprte kalilnike smo za 7 dni postavili v komoro z ravnimi pogoji 23 °C in fotoperiodo 16/8 (svetloba/tema). Med rastjo smo zagotavljali optimalno vlago in po potrebi dodatno omočili filtrirni papir s Hoaglandovo raztopino ali raztopinami ustreznih koncentracij mikroplastike. Po sedmih dneh smo vsem zrnem izmerili dolžino poganjka in korenin. Nato smo poganjke in korenine ločili od zrn in jih po dva iz posamezne obravnave skupaj stehali ter jim določili svežo maso. Poganjke in korenine smo zavili v aluminijevo folijo; poganjke smo liofilizirali, korenine pa posušili v sušilniku. Po 7 dneh smo poganjke in korenine ponovno stehali, ter zabeležili

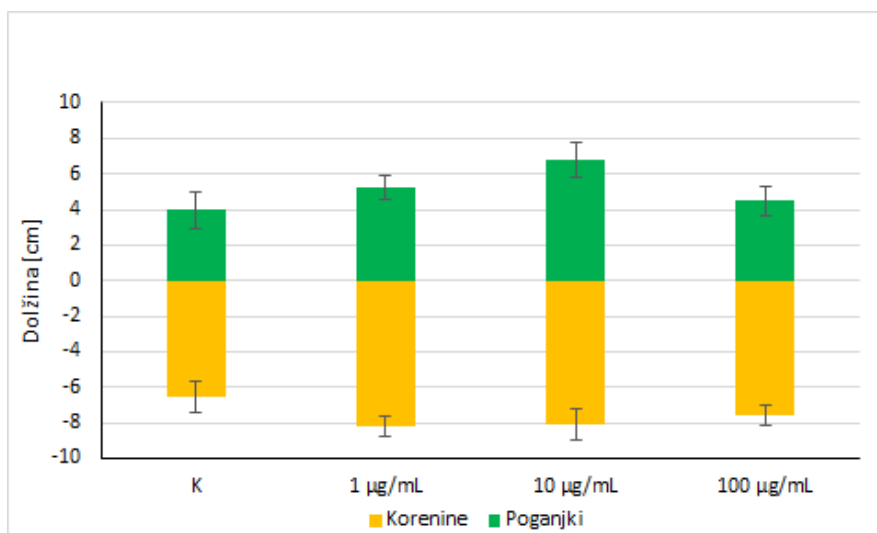
njihovo suho maso. Korenine smo po tem zavrgli, liofilizirane poganjke pa smo strli v terilnici, katerim smo postopoma dodajali 80 % aceton in izpirali do končnega volumna 5 mL. Ekstrakcija je potekala čez noč v hladilniku. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali in s spektrofotometrom izmerili njihove absorbance pri valovnih dolžinah 664, 647 in 470 nm za določanje vsebnosti barvil. Pridobljene rezultate smo statistično obdelali v programu Excel z orodjem XLSTAT. Primerjali smo povprečja parametrov med različnimi obravnavami zrn ječmena z mikroplastiko z analizo variance (ANOVA). Parametre, ki so imeli statistično različna povprečja med različnimi obravnavami, smo dodatno analizirali z Duncanovim post hoc testom pri $p < 0,05$.

Rezultati

Pri kontroli in treh obravnavah z različnimi koncentracijami mikroplastike, so zrna ječmena uspešno kalila in razvila korenine. Pri kontroli in koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ mikroplastike je vzkalilo 8 zrn ($n=8$), medtem ko je pri koncentracijah 1 in 10 $\mu\text{g/mL}$ vzkalilo 9 zrn ječmena ($n=9$), kar je posledica slabega stanja zrna in ne obravnav z različnimi koncentracijami (Slika 1). Statistična analiza je pokazala, da, obravnava zrn ječmena z različnimi koncentracijami mikroplastike ni imela statistično značilnega vpliva na dolžino poganjkov in korenin ječmena (Slika 2).

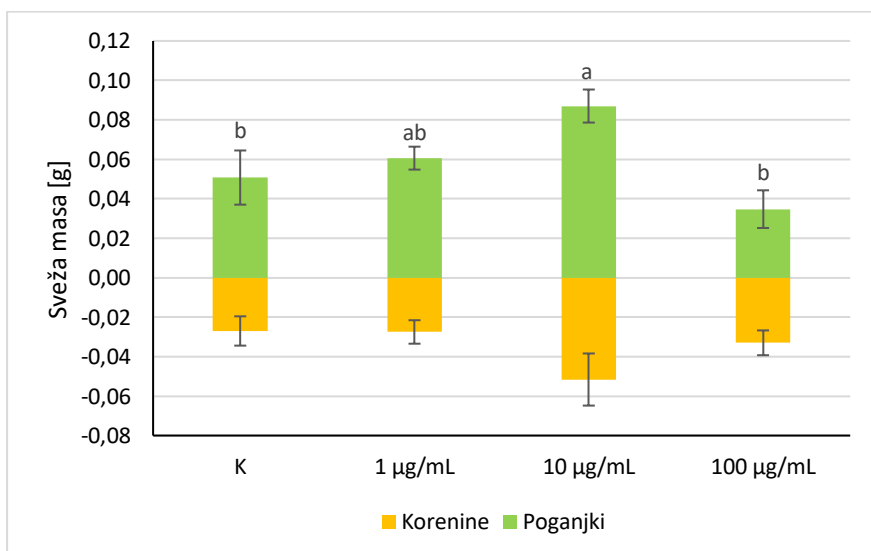


Slika 2: Sedem dni stare rastline semena, katerih zrna so omočena s Hoaglandovo raztopino (kontrola) in različnimi koncentracijami mikroplastike (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$).

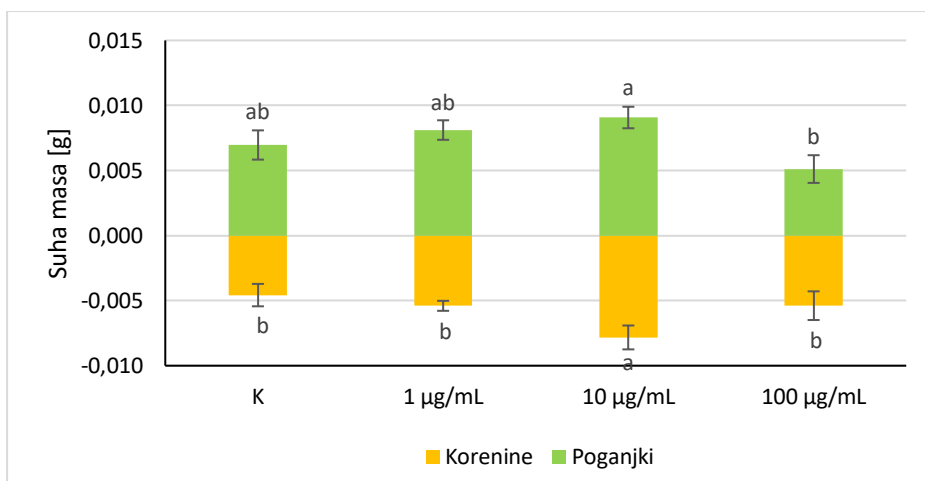


Slika 3: Dolžina poganjkov in korenin ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami mikroplastike. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka pri sedem dni starih rastlinah.

Pri statistični analizi sveže in suhe mase smo pri obravnavi poganjkov in korenin pri koncentraciji 1 µg/mL in pri obravnavi korenin s koncentracijo 10 µg/mL mikroplastike imeli $n=5$, pri ostalih obravnavah pa $n=4$. Rezultati so pokazali, da se sveža masa poganjkov pri kontroli in obravnavi z 100 µg/mL mikroplastike statistično značilno ne razlikujeta, med tem pa se obravnavi statistično razlikujeta od obravnave z 10 µg/mL mikroplastike. Pri sveži masi korenin ne zaznamo statistično značilnih razlik (Slika 3). Analiza suhe mase je pokazala, da se obravnavi poganjkov z 10 in 100 µg/mL statistično značilno razlikujeta. Obravnava korenin z 10 µg/mL pa se statistično značilno razlikuje od kontrole in ostalih obravnav korenin z mikroplastiko (Slika 4).

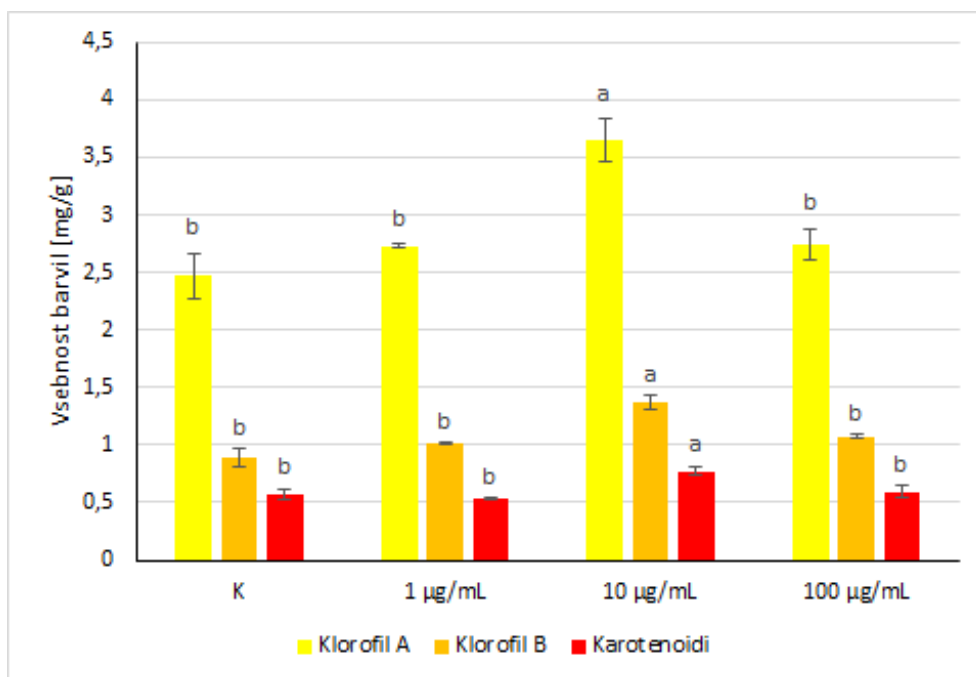


Slika 4: Sveža masa poganjkov in korenin ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami mikroplastike. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka pri sedem dni starih rastlinah. Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize z Duncanovim post hoc testom pri $p<0,05$.



Slika 5: Suha masa poganjkov in korenin ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami mikroplastike. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka pri sedem dni starih rastlinah. Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize z Duncanovim post hoc testom pri $p < 0,05$.

Pri statistični analizi vsebnosti fotosinteznih barvil so rezultati prikazali statistično značilne razlike pri obravnavah zrn z različnimi koncentracijami mikroplastike. Vsebnost klorofila A in B ter karotenoidov pri obravnavi zrn z 10 µg/mL, se statistično značilno razlikuje od kontrole in ostalih obravnav. Med kontrolo in obravnavami z 1 in 100 µg/mL ni statistično značilne razlike (Slika 5).



Slika 6: Vsebnost klorofila pri poganjkih ječmena po sedmih dneh obravnave z različnimi koncentracijami mikroplastike. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=2$), pri koncentraciji 10 µg/mL je prikazana vrednost $n=3$. Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize z Duncanovim post hoc testom pri $p < 0,05$.

Razprava

Po analizi rezultatov smo ugotovili, da obravnava rastlin z mikroplastiko pri nobeni od koncentracij ni vplivala na dolžino korenin in višino poganjkov. Analiza meritev sveže mase korenin nam ni pokazala statistično značilnih razlik med tretiranimi rastlinami in kontrolo, pri analizi sveže mase poganjkov pa smo ugotovili, da je bila sveža masa poganjkov pri kontroli in obravnavi z 100 µg/mL statistično značilno nižja, kot pri obravnavi z 10 µg/mL. Ob tem se sveža masa poganjkov pri obravnavi z 1 µg/mL statistično značilno ne razlikuje od kontrole in ostalih obravnav. Analiza suhe mase, izmerjene po sušenju korenin in liofilizaciji poganjkov je pokazala statistično značilne razlike med obravnavami poganjkov z 10 in 100 µg/mL. Obravnava korenin z 10 µg/mL pa se statistično značilno razlikuje od kontrole in ostalih dveh obravnav korenin z mikroplastiko. Pri analizi meritev vsebnosti barvil so imele rastline obravnavane z 10 µg/mL statistično značilno večjo vsebnost klorofila A, klorofila B in karotenoidov v primerjavi s kontrolo in obravnavama 1 in 100 µg/mL. Ob pregledu literature smo ugotovili, da je količina vsebnosti rastlinskih barvil pomemben rastlinski biomarker. Stresni dejavniki vplivajo na zmanjšanje količine rastlinskih barvil (Kancheva et al. 2008). Iz tega sklepamo, da je prisotnost mikroplastike v koncentraciji 10 µg/mL za rastlino ugodna. V raziskavi Bosker et. al. (2019) so s pomočjo fluorescentno označenih delcev mikroplastike in uporabo konfokalne mikroskopije dokazali, da se delci mikroplastike akumulirajo v pore semen vrtnice kreše (*Lepidum sativum*), kar bi lahko povzročalo počasnejšo kalitev in rast korenin. Kasneje so mikroplastiko našli na koreninah rastlin.

Zaključki

V raziskavi smo preverili vpliv tretiranja semen ječmena z različnimi koncentracijami (1, 10 in 100 µg/mL) mikroplastike na rast poganjkov in korenin, svežo in suho maso poganjkov in korenin ter vsebnost rastlinskih barvil v poganjkih. Rezultati se ne skladajo z našimi pričakovanji. Višina poganjkov in dolžina korenin pri obravnavi z vsemi koncentracijami mikroplastike ni statistično značilno manjša kot pri kontroli, med obravnavami ni bilo nobenih statistično značilnih razlik. Sveža masa korenin se med različnimi obravnavami statistično ne razlikuje, suha masa korenin pa je pri obravnavi z 10 µg/mL statistično značilno višja od ostalih obravnav. Sveža masa poganjkov je pri obravnavi z 10 µg/mL v primerjavi s kontrolo in obravnavo 100 µg/mL statistično značilno višja, suha masa poganjkov pa je pri obravnavi z 10 µg/mL statistično značilno višja, kot pri obravnavi s 100 µg/mL. Vsebnost rastlinskih barvil v poganjkih se s tretiranjem z mikroplastiko ni znižala. Najvišja koncentracija barvil je bila pri obravnavi 10 µg/mL. Iz teh rezultatov sklepamo, da koncentracija mikroplastike 10 µg/mL pozitivno vpliva na rast ječmena in razvoj barvil, koncentracija 100 µg/mL pa še ne deluje zaviralno, saj ni bilo statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo. Glede na to, da nismo ugotovili veliko statistično značilnih razlik med tretmaji sklepamo, da morda izbrane koncentracije mikroplastike niso bile optimalne za tovrstno primerjavo. Za nadaljnje raziskave bi bilo potrebno poskus optimizirati in vključiti širši nabor različnih koncentracij mikroplastike in večje število semen.

Literatura

Boots B, Russell CW, Green DS (2019) Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *American Chemical Society* 53, 19: 11496–11506. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03304>

Bosker T, Bouwman JL, Brun RN, Behrens P, Vijver GM (2019) Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere*, 226: 774-781. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.163>

Guo X, Wang J (2019) The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 142: 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019>

Issac M., Kandasubramanian B (2021) Effect of microplastics in water and aquatic systems. *Environment Science and Pollution Research* 28, 19544–19562.

Kancheva RH, Borisova DS, Iliev IT (2008) Chlorophyll fluorescence as a plant stress indicator. *Solar-Terrestrial Influences Laboratory, Bulgarian Academy of Sciences*.

Rogers K (2020) Microplastics. *Encyclopedia Britannica*.

Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP et al (2004) Lost at sea: Where is all the plastic? *Science* 304, 838- 838. DOI: 10.1126/science.1094559

Qi Y, Ossowicki A, Yang X et al (2020) Effects of plastic mulch film residues on wheat rhizosphere and soil properties. *Journal of Hazardous Materials* 387: 0304-3894. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121711>

VPLIV MILA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Simon Ekselenski, Saša Kaloper, Tjaša Pungert, Ana Zupančič

Izvleček

Namen dela je bil ugotoviti vpliv različnih koncentracij mila za roke v Hoaglandovi hranilni raztopini na: kaljivost semen ječmena, dolžino korenin in poganjkov ječmena, svežo in suho maso ter vsebnost fotosinteznih pigmentov. Pripravavili smo polovične Hoaglandove raztopine. Dodali smo milo za roke, končne koncentracije so bile 1 ug/mL, 10 ug/mL ter 100 ug/mL. Poskus je potekal v vertikalnem kalilniku, gojenje v rastni komori dokler negativna kontrola s koreninami ni prerastla vertikalnega kalilnika. Merili smo izbrane parametre in statistično obdelali podatke. Ugotovili smo: Milo v višjih koncentracijah zavira rast ječmena, vendar je kaljivost pri vseh preizkušenih koncentracijah mila 100%. V primerjavi s kontrolnimi rastlinami je povprečna dolžina poganjkov najkrajša pri koncentraciji 100 ug/mL, prav tako je pri koncentraciji 100 ug/mL najkrajša povprečna dolžina korenin. Zaradi vpliva mila na rast ječmena je opazen tudi vpliv na svežo in suho maso. Prisotnost mila za roke vpliva na vsebnost rastlinskih pigmentov.

Ključne besede: ječmen, seme, milo, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Vodotoki imajo naravne čistilne sposobnosti, a se z večanjem človeške populacije srečujemo z njihovo preobremenjenostjo in posledično manjšo naravno čistilno sposobnostjo. Čistilna sposobnost vodotokov izhaja tako iz dejstva, da se v njih učinkovine redčijo, kakor iz prisotnosti organizmov (predvsem rastlin), ki učinkovine privzemajo v lastno biomaso. Da naravne vodotoke razbremenimo in zmanjšamo negativni človeški vpliv na okolje, odpadno vodo pred izpustom v naravne vodne vire prečiščujemo. V Republiki Sloveniji nadzor nad kakovostjo površinskih voda, podzemnih voda, izvirov ter pitne vode izvaja Agencija Republike Slovenije za okolje (ARSO), ki sledi Zakonu o varstvu okolja (v veljavi od leta 2004), Zakonu o vodah (v veljavi od 2002), Pravilniku o pitni vodi (v veljavi od 2004), Pravilniku o monitoringu onesnaženosti podzemnih voda z nevarnimi snovmi (v veljavi od leta 2000) ter Uredbi o kakovosti podzemne vode iz leta 2002, zakonodaja pa je poenotena tudi z Evropsko vodno direktivo. Glede na to, da so rastline pomembne za očiščevalno sposobnost naravnih vodotokov, možnost čiščenja odpadnih voda pred izpustom v okolje predstavljajo tudi rastlinske čistilne naprave. Biološke čistilne naprave so sestavljene iz mehanskih usedalnikov in aeracijskih bazenov, kjer mikroorganizmi razgrajujejo snovi in prečiščujejo vodo. To vodo se lahko nato nadaljnjo vodi na rastlinsko čistilno napravo, iz le-te pa v reke, morje, okolje izhaja zelo dobro prečiščena voda (Jefferson in sod., 2000).

Rastline, ki se uporabljajo v rastlinskih čistilnih napravah so običajno rastline, ki jih tudi sicer najdemo v naravnih mokriščih. Take rastline so denimo trs, rogoz, lilije, perunike (večinoma gre za enokaličnice), saj so že naravno dobro prilagojene na variabilni režim vode in anoksične razmere (aerenhimi v koreninah).

Naš poskus je potekal na ječmenu, ki je sicer prehrambna rastlina, gojena na polju in posledično nima evolucijsko razvite odpornosti na anoksične razmere na koreninah. Ječmen služi kot modelna rastlina za testiranje strupenosti snovi, ki jih spuščamo v odpadne vode (kovine, kovinski nanodelci, makro- in mikrohranila, pesticidi, kozmetika, praški, detergenti, mila ...). V našem primeru smo preizkušali strupenost mila za roke na kalitev in rast kalic ječmena. V odpadnih vodah namreč najdemo anorganske in organske snovi, velik delež slednjih predstavljajo gospodinjske odpadne vode, ki vsebujejo raznolike kozmetične izdelke, praške, detergente in čistila. Gospodinjska mila vsebujejo površinsko aktivne snovi, katerih namen je razgradnja maščob, olj in voskov. Če odpadna voda, ki vsebuje te površinsko aktivne snovi, pride v stik z rastlino (v primeru rastlinske čistilne naprave), bi lahko negativno vplivala na rast in razvoj rastlin (Hall in sod., 2014). Milo za roke je sredstvo za odstranjevanje umazanije, ki ga vsakodnevno uporabljamo predvsem v osebni higieni. Nepolarni delci mila se vežejo z nepolarnimi maščobnimi delci, tvori se emulzija maščobe in vode, ki jo lahko speremo iz površine. Mila pridobivamo s pomočjo saponifikacije iz maščob in jih med seboj ločimo na trda (vsebujejo natrij) in mazava (vsebujejo kalij). Če milu dodamo različna kemična sredstva za izboljšanje pralnih lastnosti, dobimo detergente - to je sintetično pralno sredstvo, ki pa v nasprotju z mili ni biološko razgradljivo. Mnoga mila za roke in šamponi vsebujejo mila, dišave, barvila in surfaktante (Pandey in sod., 2010, Sandefur, in sod., 2014). Glavne sestavine, ki jih najdemo v (skoraj) vsakem milu za roke so:

- natrij lauret sulfat (anionski detergent in surfaktant),
- natrijev klorid (znižanje pH),
- kokamidopropil betain (detergent in surfaktant),
- natrijev benzoat (protiglivična učinkovina),
- parfum (vonj),
- glicerol (humektant),
- kokamid mea (penjenje),
- citronska kislina (stabilizacija pH).

Cilj vaje je bil pripraviti različne koncentracije raztopine izbrane kemikalije (1/10/100 ug/mL), v našem primeru mila za roke in preveriti kakšen je njegov vpliv na kaljivost semen ječmena, dolžino poganjkov, korenin, njihovo svežo in suho maso ter na vsebnost klorofilov in karotenoidov. Odziv modelne rastline na kemikalijo lahko v grobem enačimo z odzivom rastline v rastlinski čistilni napravi, s tem pa bomo ugotovili ali je sistem na dotično kemikalijo (milo za roke) občutljiv ali ne.

Hipoteze:

- predvidevamo, da bo imelo milo v Hoaglandovi raztopini negativen vpliv na kaljivost semen, dolžine poganjkov, korenin ter na svežo in suho maso,
- predvidevamo, da bo v primerjavi s kontrolo vsebnost klorofila in karotenoidov nižja pri tistih rastlinah, ki so bile izpostavljene milu,
- pričakujemo, da bo vsebnost klorofila in karotenoidov nižja pri tistih rastlinah, ki so bile izpostavljene višji koncentraciji mila ter višja pri tistih, ki so bile izpostavljene nižji koncentracijam mila.

Metode in materiali

Materiali

- semena ječmena
- polovična Hoaglandova hranilna raztopina za zalivanje semen
- milo
- vertikalni kalilnik
- skalpel
- kapalke
- ravnilo
- laboratorijska tehtnica
- aluminijeva folija
- flomaster

Metode

- pripravili smo polovično Hoaglandovo raztopino
- v 100 mL polovične Hoaglandove raztopine smo pripravili koncentracije učinkovine (v našem primeru milo za roke) za poskus:
 - o kontrolna raztopina – samo polovična Hoaglandova raztopina
 - o 1 ug/mL mila v 100 mL polovične Hoaglandove raztopine
 - o 10 ug/mL mila v 100 mL polovične Hoaglandove raztopine
 - o 100 ug/mL mila v 100 mL polovične Hoaglandove raztopine
- modelna rastlina: ječmen (semena)
- poskus je potekal v vertikalnem kalilniku; peno v kalilniku se je zalilo z ustrezno raztopino (kontrola/1/10/100 ug/mL mila za roke) ter nanjo položilo 10 semen ječmena, rast je potekala v rastni komori na fotoperiodi 16/8 svetloba/tema, 23 °C
- rast poganjkov in korenin ječmena smo redno spremljali in po potrebi zalivali z vnaprej pripravljenimi hranilnimi raztopinami ustreznih koncentracij učinkovine
- ko je kontrolna rastlina s koreninami prerastla vertikalni kalilnik, je sledilo podiranje poskusa ter meritve dolžine korenin ter poganjkov ter izračun odstotka kaljivosti
- ločitev poganjkov in korenin od semena ter združevanje po dveh rastlinic skupaj, tako da smo iz vsakega poskusa dobili po 5 paralelk (n=5), tehtanje sveže mase poganjkov in korenin za vsako preverjeno koncentracijo mila za roke
- liofilizacija korenin in poganjkov
- tehtanje suhe mase poganjkov in korenin ter meritve vsebnosti klorofilov
- izvedba statistične obdelave podatkov z računalniškim programom Microsoft Excel z dodatkom XLSTAT (ANOVA, Duncanov test) in računanje vrednosti EC50 z EC50 kalkulatorjem (AAT Bioquest).

Rezultati

Rast poganjkov in korenin ječmena je vidna na spodnjih slikah (slika 1-4). Rezultati so bili pridobljeni 12.05.2021.



Slika 1: Fotografija kontrolnih rastlin ječmena pred podiranjem poskusa.



Slika 2: Fotografija rastlin ječmena pri koncentraciji 1 µg/mL pred podiranjem poskusa.



Slika 3: Fotografija rastlin ječmena pri koncentraciji 10 ug/mL pred podiranjem poskusa.



Slika 4: Fotografija rastlin ječmena pri koncentraciji 100 ug/mL pred podiranjem poskusa.

Kaljivost

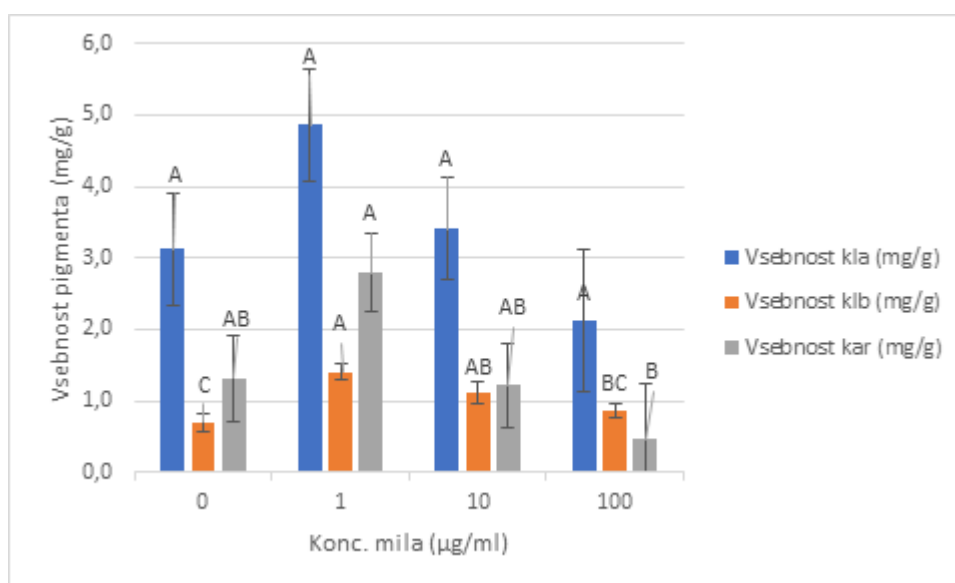
Pri vseh izpostavitvah so semena kalila 100%. Vsakič je vzkalilo vseh 10 posajenih semen.

Vsebnost pigmentov

Za vsebnost klorofila A ni statistično ugotovljenih razlik med množicami podatkov različnih koncentracij mila.

Pri koncentracijah mila 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ je vsebnost klorofila B višja kot pri kontroli (slika 5). Če primerjamo vsebnost klorofila B pri koncentracijah mila 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$, pri koncentracijah mila 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ ter pri koncentracijah mila 100 $\mu\text{g/mL}$ in 0 $\mu\text{g/mL}$, ne moremo trditi, da vrednosti padajo ali naraščajo, saj so množice podatkov primerljive. Vrednosti vsebnosti klorofila B padajo od koncentracije 1 $\mu\text{g/mL}$ do 100 $\mu\text{g/mL}$.

Za vsebnost karotenoidov ponovno ne moremo trditi, da vrednosti padajo ali naraščajo pri koncentracijah mila od 0 $\mu\text{g/mL}$ do 10 $\mu\text{g/mL}$, saj so množice podatkov primerljive. Ob primerjavi vsebnosti karotenoidov pri koncentraciji mila od 1 $\mu\text{g/mL}$ do 100 $\mu\text{g/mL}$ pa z vse višjo koncentracijo mila opazimo vse večje padanje vrednosti karotenoidov.

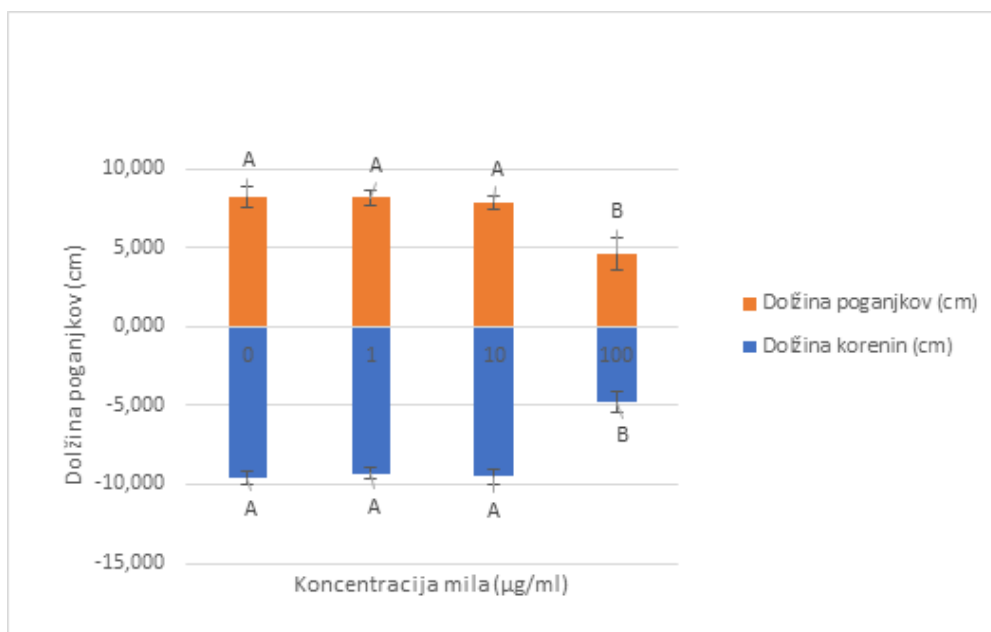


Slika 5: Povprečna vsebnost klorofila in karotena v poganjkih ječmena pri različnih koncentracijah mila. Prikazana je povprečna vrednost $\pm$ SE, $n=5$. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med posameznimi izpostavitvami, ANOVA, Duncanov test.

Dolžine korenin in poganjkov

Tako kot pri poganjkih, tudi pri koreninah pri koncentracijah mila 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ ni razlik v varianci (množice so enake), zato ne moremo trditi, da vrednosti padajo ali naraščajo.

Šele ob primerjavi vrednosti dolžin poganjkov in korenin pri koncentraciji mila 100 $\mu\text{g/mL}$ s kontrolo ali nižjimi koncentracijami pa vidimo zmanjšanje dolžine obeh (slika 6).

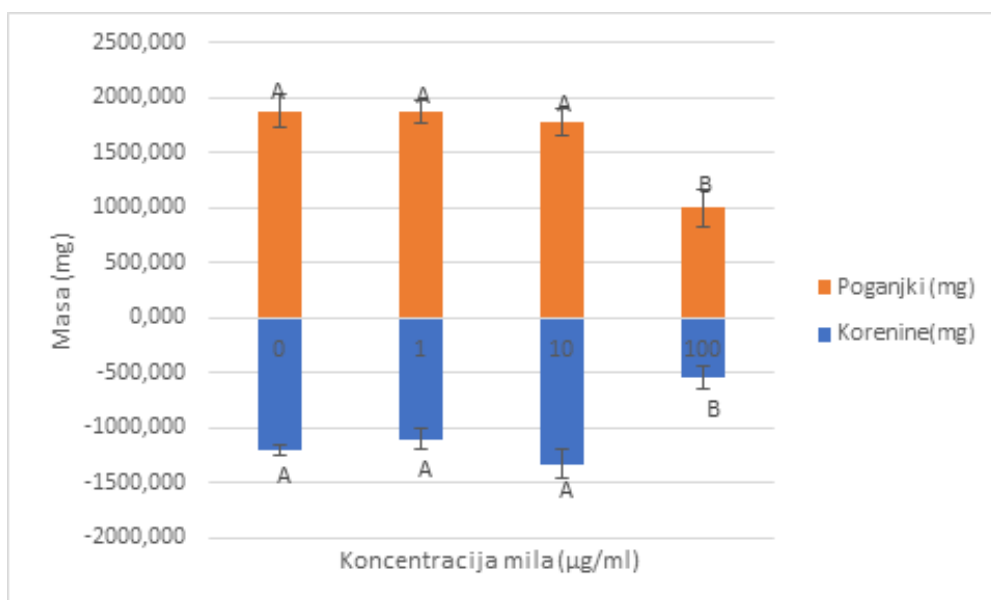


Slika 6: Dolžine korenin in poganjkov ječmena pri različnih koncentracijah mila. Prikazana je povprečna vrednost $\pm$ SE, $n=5$. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med posameznimi izpostavitvami, ANOVA, Duncanov test.

Sveža masa

Tako kot pri poganjkih kot pri koreninah pri koncentracijah mila 0 µg/mL, 1 µg/mL in 10 µg/mL, ni razlik v varianci (množice so enake), zato ne moremo trditi, da vrednosti padajo ali naraščajo.

Ob primerjavi vrednosti dolžin poganjkov in korenin pri koncentraciji mila 100 µg/mL s kontrolo ali nižjimi koncentracijami pa vidimo zmanjšanje mase obeh (slika 7).



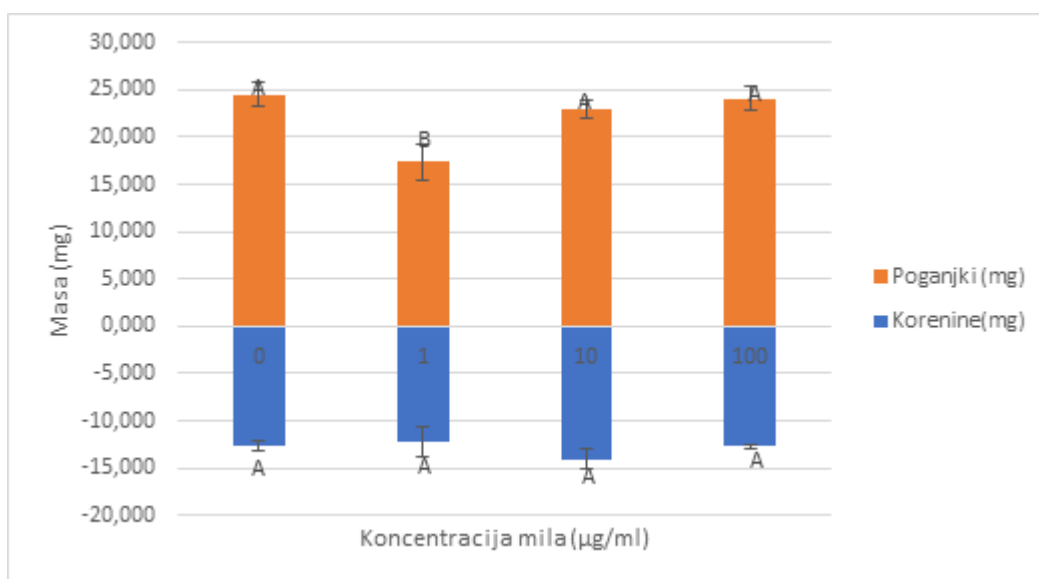
Slika 7: Sveža masa korenin in poganjkov ječmena pri različnih koncentracijah mila. Prikazana je povprečna vrednost $\pm$ SE, $n=5$. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med posameznimi izpostavitvami, ANOVA, Duncanov test.

Suha masa

Za suho maso korenin ni mogoče trditi, da vrednosti padajo ali naraščajo, saj so množice vrednosti mas pri vseh koncentracijah mila enake.

Za suho maso poganjkov je edina možna primerjava med koncentracijo mila 1 $\mu\text{g/mL}$ in kontrolo ali med koncentracijo mila 1 $\mu\text{g/mL}$ in višjimi koncentracijami. Glede na pričakovane rezultate, kjer bi pričakovali, da se suha masa poganjkov znižuje z višanjem koncentracije mila, sklepamo, da gre ali za tehnično napako pri merjenju ali napako pri statistični obdelavi (slika 8).

Primerjava ostalih suhih mas poganjkov med sabo ni mogoča, ker so množice primerljive, oziroma razlik med njimi ni.



Slika 8: Suha masa korenin in poganjkov ječmena pri različnih koncentracijah mila. Prikazana je povprečna vrednost $\pm$ SE, $n=5$. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med posameznimi izpostavitvami, ANOVA, Duncanov test.

EC50

Izračuna EC50 nismo izvajali pri rezultatih vsebnosti klorofila in karotena, dolžin korenin in poganjkov ter pri rezultatih suhe mase korenin in poganjkov ječmena, saj parametri pri največji vrednosti koncentracij mila ne padejo pod 50% kontrolnih vrednosti.

Možno je bilo izračunati EC50 mila za svežo maso korenin in poganjkov. Vrednost znaša 60,48 $\mu\text{g/mL}$ (slika 10).

kontrolnimi rastlinami opazna ob koncentraciji učinkovine 100 µg/mL (slika 6). Ker je bilo v našem poskusu število ponovitev 5 (n=5), gre za premajhen vzorec, da bi lahko govorili o trendu, a lahko vseeno sklepamo, da bi pri višjih preizkušanih koncentracijah lahko opazili tudi vpliv na kaljivost ječmena. Naši rezultati se skladajo z rezultati raziskave Janga in sodelavcev (2017), ki so med drugim preizkušali vpliv mila v prahu na ječmen. Tekom poskusov v petrijevkah so namreč opazili, da prisotnost mila v prahu negativno vpliva na kaljivost semen, rast poganjkov in rast korenin (Jang et al., 2017).

Kot že omenjeno, mila vsebujejo površinsko aktivne snovi, katerih namen je razgradnja maščob, olj in voskov, poleg tega natrijev klorid in citronska kislina povzročita znižanje pH, čeprav milo še vedno ostaja bazično (Hall in sod., 2014). Vpliv teh površinsko aktivnih snovi lahko pričakujemo predvsem na prepustnost celičnih membran rastlinskih celic. V osnovi celične membrane opisujemo kot lipidni dvosloj po modelu tekočega mozaika, milo za roke pa poruši njihovo integriteto. Posledično lahko pri višjih koncentracijah učinkovine pričakujemo nižjo zadrževalno sposobnost celičnih membran in povečano izgubo celici pomembnih snovi. Lahko gre za zelo raznolike molekule, posebej problematično je nenadzorovano prehajanje ionov, beljakovin in nukleinskih kislin (npr. mRNA, ki je tekom poti sinteze beljakovin kratek čas prosta v citoplazmi). Mogoča je tudi izguba lipidnih snovi, čeprav le-ta ni tako problematična, saj glavno zalogo energije v semenu ječmena predstavlja škrob (kasnejša razgradnja do glukoze, ki je osnovni vir energije v celičnih procesih). Nenadzorovana izguba pomembnih molekul iz celic je za rastlino seveda problematična, kar se odraža na rasti.

Vpliv učinkovine je opazen tudi na vsebnost klorofila b in karotenoidov (slika 5). Vsebnost klorofila b je pri rastlinah, izpostavljenih 1 µg/mL in 10 µg/mL višja, kakor pri kontrolnih rastlinah, kar bi lahko pripisali vplivu hormoneze (pojav, ko ima učinkovina v nizkih koncentracijah spodbujevalni učinek, pri višjih koncentracijah pa je strupena). Žal nismo našli podatkov v literaturi, ki bi našo hipotezo o vplivu hormoneze podprli, se pa nam zdi smiselna, saj se rastlina gotovo bori proti stresnemu dejavniku. Dvig vsebnosti pigmentov, ki bi omogočili večji izkoristek fotosinteze vsaj pri nizkih koncentracijah učinkovine, bi bil tako smiseln obrambni odgovor. Po drugi strani pa opazimo padanje vrednosti klorofila b in karotenoidov med koncentracijami 1 µg/mL in 100 µg/mL mila, kar bi lahko pripisali večji prepustnosti celičnih membran in posledično izgube pigmentov zaradi višanja koncentracije učinkovine. Manjša vsebnost fotosinteznih pigmentov bi lahko bila tudi posledica oksidativnega stresa, saj se rastline na stresni dejavnik pogosto odzovejo s sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti oz. radikalov (ROS). Gre za zelo reaktivne molekule, njihova prisotnost pa bi lahko negativno vplivala na vsebnost klorofilov in karotenoidov v celici. Vsebnost klorofila b in karotenoidov v poganjkih ječmena tako predstavlja možnost biološkega markerja za dokazovanje strupenosti mila za roke v odpadnih vodah.

Ob primerjavi podatkov svežih in suhih mas korenin in poganjkov izpostavljenih rastlin napram kontroli lahko opazimo znižanje vrednosti napram sveži in suhi masi kontrolnih rastlin (slika 7 in slika 8), medtem ko statistično značilne razlike med vzorci izpostavljenih rastlin niso opazne (odstopanje pri suhi masi poganjkov rastlin, izpostavljenim 1 µg/mL mila ne pripisujemo vplivu učinkovine, temveč napaki pri delu – npr. napaki pri tehtanju vzorcev ali napačnemu prepisu enega izmed rezultatov meritve, saj za statistično analizo upoštevamo povprečne vrednosti). Rezultati so pričakovani in smiselni, saj se smiselno dopolnjujejo z rezultati povprečnih dolžin korenin in poganjkov izpostavljenih rastlin napram kontrolnim rastlinam. Naši rezultati se skladajo tudi z ugotovitvami raziskave Janga in sodelavcev (2017),

kjer se višina rastlin in sveža masa ječmena nista statistično značilno spreminjala z različnimi preizkušenimi koncentracijami mila v prahu (Jang et al., 2017).

Naši rezultati ne kažejo dovolj velikih sprememb (vsaj 50-odstotni padec oziroma porast pridobljenih vrednosti), da bi lahko pravilno izračunali vrednosti EC50. Za pridobitev primernih podatkov za izračun bi se morali poskusa najverjetneje lotiti pri več preizkušenih koncentracijah in v večjem številu ponovitev, da bi pridobili večji razpon vrednosti.

Zaključek

Če povzamemo, milo za roke v koncentracijah 1/10/100 µg/mL ne vpliva na kaljivost semen, opazni pa so učinki na dolžino poganjkov, dolžino korenin, njihovo svežo maso, vsebnost klorofila in karotenoidov. Za pridobitev natančnejših in statistično značilnih rezultatov bi bilo potrebno poskus ponoviti z višjimi koncentracijami učinkovine in v več ponovitvah, da bi pridobili večji razpon vrednosti. Zaključimo lahko, da ima tudi povsem uveljavljena in družbeno sprejeta učinkovina, kot je milo za umivanje rok, velike negativne vplive na okolje, kar zahteva večjo pozornost družbe. Izrednega pomena ostajajo učinkovito in trajnostno čiščenje odpadnih voda (denimo z rastlinskimi čistilnimi napravami), učinkovit monitoring okolja ter razvoj okolju prijaznejših učinkovin, ki bodo z manjšim negativnim vplivom na okolje omogočale ohranjanje narave za prihodnje generacije.

Literatura

Kopittke PM, Gianoncelli A, Kourousias G, et al (2017) Alleviation of Al toxicity by Si Is associated

Jefferson, B., Laine, A., Parsons, S., Stephenson, T., Judd, S. (2000) Technologies for domestic wastewater recycling. *Urban Water* 1.4: 285-92.

Pandey, P., Gopal, B. (2010) Effect of detergents on the growth of two aquatic plants: *Azolla pinnata* and *hydrilla verticillata*. *Environment & We: An International Journal of Science & Technology*. 5: 107-114

Hall, A., Wood, J., Kolososki, C., Howell, M. (2014) The effects of household chemicals on household plants.

Sandefur, C., Ward, M., & Pedersen, P. (2016) The Effects of Dish Soap on Plant Development. *Plant bioecology and evolution*.

Jang, S. J., Kim, K. R., Yun, Y. B., & Kuk, Y. I. (2017) Effect of Various Organic Emulsifiers on Crop Growth and Weed Control. *Philippine Journal of Crop Science*, 42(3).

Kim, H. U. (2020) Lipid metabolism in plants. In *Plants* (Vol. 9, Issue 7).
<https://doi.org/10.3390/plants9070871>

VPLIV PRALNEGA PRAŠKA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Urška Ašič, Matija Hrovatin, Ema Sajovic, Sanja Terzić

Izvleček

Namen dela je bilo testiranje vpliva pralnega praška na rast ječmena. Uporabili smo metodo gravimetrično določanje suhe in sveže mase korenin in poganjkov, merjenje dolžine korenin in poganjkov ter spektrofotometrično določanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov v poganjkih. Podatke smo statistično analizirali s programom XLSTAT (Addinsoft). Primerjavo varianc smo izvedli z metodo po Duncanu. Pri višjih koncentracijah je pralni prašek povzročil signifikantno zmanjšanje dolžine poganjkov, pri koncentraciji karotenoidov, masi poganjkov in dolžini korenin pa je bilo moč opaziti rahel pojav hormoneze.

Ključne besede: ječmen, seme, pralni prašek, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Čistilna sredstva so dandanes vsakodnevno v uporabi, tako v gospodinjstvih kot industriji, ki se nato izločajo v odpadne vode. Leta 2019 je v Sloveniji prodaja mil in pralnih sredstev znašala skupno 88.626.331 € (SURS, 2020a), v gospodinjstvih pa je bilo proizvedenih 66 ton odpadkov čistil z nevarnimi snovmi (SURS, 2020b). Odpadna voda bi lahko bila uporabljena za namakanje kmetijskih površin in tako reciklirana. Vsebuje za rastline koristen dušik ter esencialne elemente, a pred njeno uporabo jo je treba prečistiti (Poongodi in Sasikala 2013). Čistilna sredstva lahko namreč s svojimi sestavinami vplivajo na rast rastlin (Uzma s sod. 2018). Čistilno sposobnost jim omogočajo površinsko aktivne snovi, ki pa v namakalnih sistemih zmanjšujejo hidravlično prevodnost tal (hitrost, s katero voda teče skozi tla). To vodi do voodpornih tal, kar vpliva na okolje in kmetovanje (Sawadogo s sod. 2014). Pri metodah remediacije odpadne vode med drugim poznamo tudi rastlinske čistilne naprave in umetna mokrišča. Pri slednjih gre za načrtovane sisteme, kjer se izkorišča naravne procese v mokriščih, tako rastlinske kot mikrobne, za obravnavanje odpadnih vod (Vymaza 2009). Pri takih oblikah remediacije pridejo rastline v stik z onesnažili, prisotno pa je pomanjkanje informacij o vplivu pralnih sredstev na te organizme. Prav tako se s takimi odpadki ne ravna pravilno, kar vodi v negativne posledice v okolju (Oseghale s sod. 2017).

Cilj naloge je bilo ugotoviti, ali pralni prašek vpliva na rast in razvoj modelne rastline, ječmena. Predpostavljamo, da pralni prašek zaviralno vpliva na rast modelne rastline in tvorbo pigmentov.

Metode in materiali

Semena

V poskusu so bila uporabljena semena ječmena. V posamezni kalilnik je bilo prenešeno 10 semen za testiranje vpliva različnih koncentracij pralnega praška znanega proizvajalca.

Priprava polovične Hoaglandove raztopine z različnimi koncentracijami pralnega praška

Za pripravo raztopin smo uporabili polovično Hoaglandovo raztopino, saj vsebuje vse potrebne snovi za rast in razvoj semena. V 100 mL hranilne raztopine smo pripravili tri različne koncentracije pralnega praška: 1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL. Za pripravo raztopine s koncentracijo 100 µg/mL smo zatehtali 10 mg pralnega praška in ga raztopili v 100 mL hranilne raztopine. Boljšo topnost pralnega praška smo dosegli s segrevanjem raztopine v mikrovalovki, ki smo jo po raztapljanju ohladili s hladno vodo. Za pripravo raztopine s koncentracijo 10 µg/mL smo raztopino s koncentracijo 100 µg/mL 10-krat redčili s hranilno raztopino. Enako smo raztopino s koncentracijo 10 µg/mL 10-krat redčili, da smo pripravili raztopino s koncentracijo 1 µg/mL. Hranilna raztopina brez pralnega praška je služila za oskrbovanje kontrolnih semen.

Kalitveni test

Za kalitveni test smo pripravili kalilnike. Na spodnjo polovico plastičnega modela za kalilnik smo položili košček pene, ki je zadrževala vlago. Čez peno smo položili filtrirni papir, nanj pa obarvan list papirja, za lažje spremljanje rasti korenin. S 30 mL pripravljene raztopine z ustrežno koncentracijo pralnega praška smo omočili tako pripravljene kalilnike. Na 4 lepilne trakove smo v presledkih nanesti po 10 semen in jih prenesli in fiksirali vsakega v svoj kalilnik na vrh obarvanega papirja. Kalilnike smo nato pokrili s pokrovom. Po potrebi smo semena dodatno omočili z ustreznimi raztopinami, da bi preprečili izsuševanje. Semena smo kalili pri 23 °C in fotoperiodi 16/8, dokler niso korenine kontrolnih semen zrastle do dna kalilnika.

Po zaključku kalitve smo z ravnilom izmerili dolžino korenin in poganjkov ter po dva poganjka in po dve korenini tudi stehtali. Za določitev suhe mase smo korenine sušili v sušilniku pri 105 °C za 24 ur, poganjke pa liofilizirali pri -90 °C in vakuumu 0,001 mbar za 48 ur in nato stehtali.

Spektrofotometrično določanje koncentracije fotosinteznih pigmentov v poganjkih

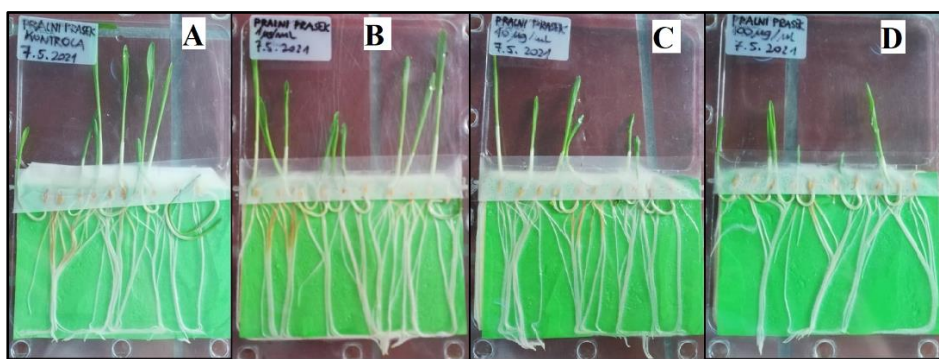
Za določanje koncentracije fotosinteznih pigmentov smo zatehtali približno 20 mg suhih liofiliziranih poganjkov. Če so posamezni poganjki imeli manjšo maso, smo poganjke združili. Liofilizirane poganjke smo strli v terilnici. Ekstrakcijo pigmentov smo izvedli s postopnim dodajanjem 80 % acetona in spirali do končnega volumna 5 mL. Ekstrakcijo smo pustili teči čez noč. Vzorce smo centrifugirali pri 2000 rpm za dobro minuto, da smo odstranili odvečni rastlinski material in supernatantu na spektrofotometru pomerili absorbanco pri valovni dolžini 664 nm za določanje vsebnosti klorofila A, pri 647 nm za določanje vsebnosti klorofila B in pri 470 nm za določanje vsebnosti karotenoidov. Koncentracije fotosinteznih pigmentov smo izračunali po Monni s sod. (2001).

Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program XLSTAT (Addinsoft). Analizo variance smo izvedli z enosmerno ANOVA. Variance posameznih množic podatkov smo med seboj primerjali s post-hoc testom, natančneje z metodo po Duncanu, saj je primeren za množico podatkov, kjer je število podatkov majhno. Efektivne koncentracije 50 (EC₅₀) nismo določali.

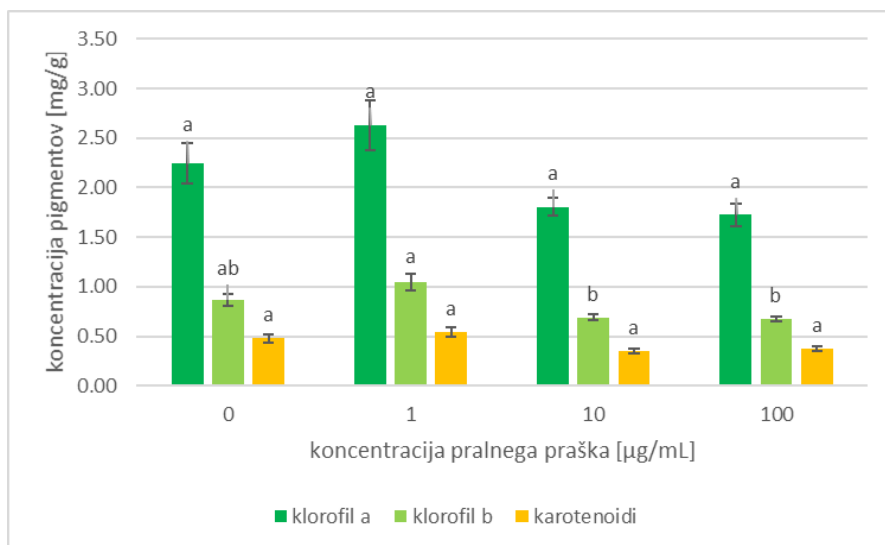
Rezultati

Kalitev semena ječmena po končanem kalitvenem testu je prikazana na Sliki 1. Najgostejši preplet korenin je nastal pri koncentraciji pralnega praška 1 $\mu\text{g/mL}$, najredkejši pa pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$. Pri vseh koncentracijah je večina korenin s svojo dolžino dosegla dno kalilnika. Izmed višjih poganjkov so bili poganjki pri koncentraciji 0 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ pa so rastle najslabše.



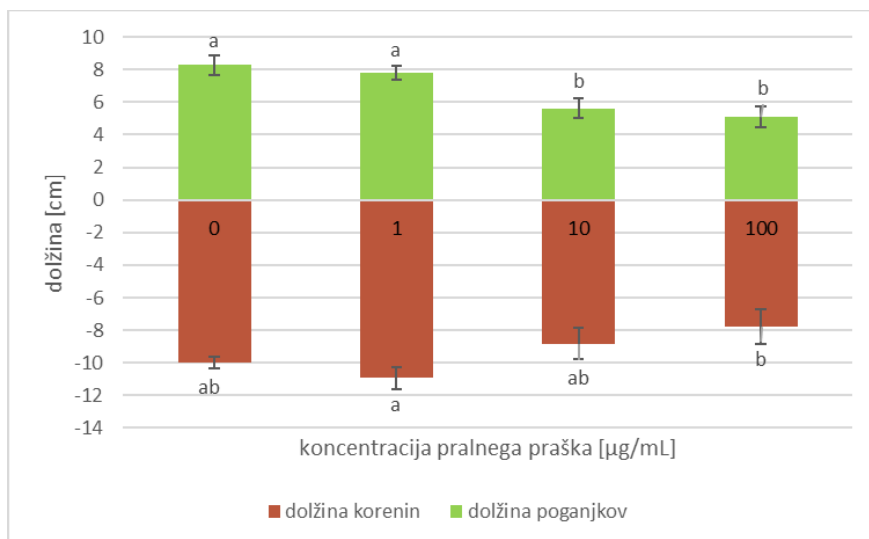
Slika 1: Korenine in poganjki iz semen ječmena po koncu kalitvenega testa. 1A – kontrola (hranilna raztopina brez pralnega praška). 1B – 1 $\mu\text{g/mL}$ pralnega praška. 1C – 10 $\mu\text{g/mL}$ pralnega praška. 1D – 100 $\mu\text{g/mL}$ pralnega praška.

Spreminjanje koncentracij klorofila a, klorofila b in karotenoidov z naraščanjem koncentracije pralnega praška je prikazano na Sliki 2. V primeru koncentracije klorofila a med poganjki pri izpostavitvi različnim koncentracijam pralnega praška in kontrolo ni statistično značilnih razlik. Enako velja za koncentracije karotenoidov. Koncentraciji klorofila b sta pri izpostavitvi 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$ pralnega praška primerljivi s kontrolo (med njima ni statistično značilnih razlik), a manjši od koncentracije pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ pralnega praška. Pri slednji je koncentracija klorofila b primerljiva s kontrolo.



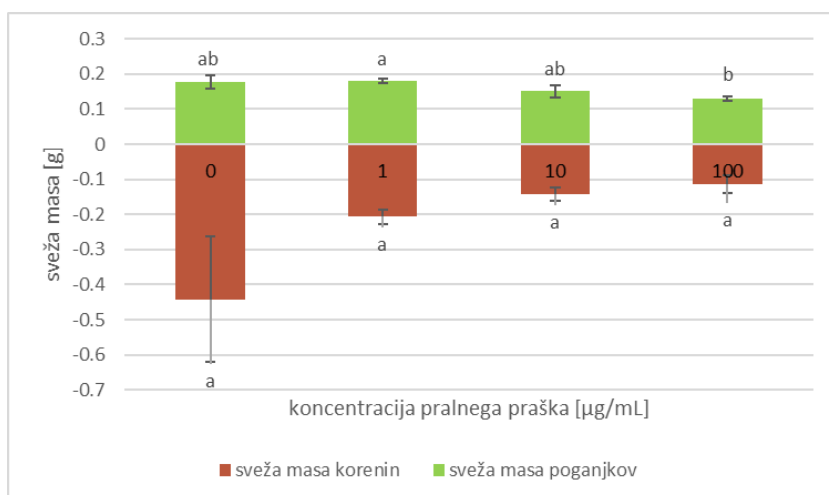
Slika 2: Vsebnost fotosinteznih pigmentov v liofiliziranih poganjkih pri različnih koncentracijah pralnega praška. Statistična analiza je bila opravljena s programom XLSTAT. Na grafu so prikazana povprečja in standardne napake (kontrola: $n=3$; 1 $\mu\text{g/mL}$: $n=4$; 10 $\mu\text{g/mL}$: $n=2$; 100 $\mu\text{g/mL}$: $n=2$), različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike (Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$).

Spreminjanje dolžin korenin in poganjkov z naraščajočo koncentracijo pralnega praška je prikazano na Sliki 3. Med kontrolo in izpostavitvijo 1 $\mu\text{g/mL}$ ni statistično značilnih razlik, enako velja za dolžino poganjkov pri izpostavitvi 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$. Ta skupina poganjkov je krajša od tistih pri koncentraciji pralnega praška 1 $\mu\text{g/mL}$ in kontroli. Poganjki pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ so daljši od poganjkov pri 100 $\mu\text{g/mL}$. Dolžina korenin je pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ primerljiva s kontrolo, pri izpostavitvi 10 $\mu\text{g/mL}$ ni statističnih razlik s kontrolo.



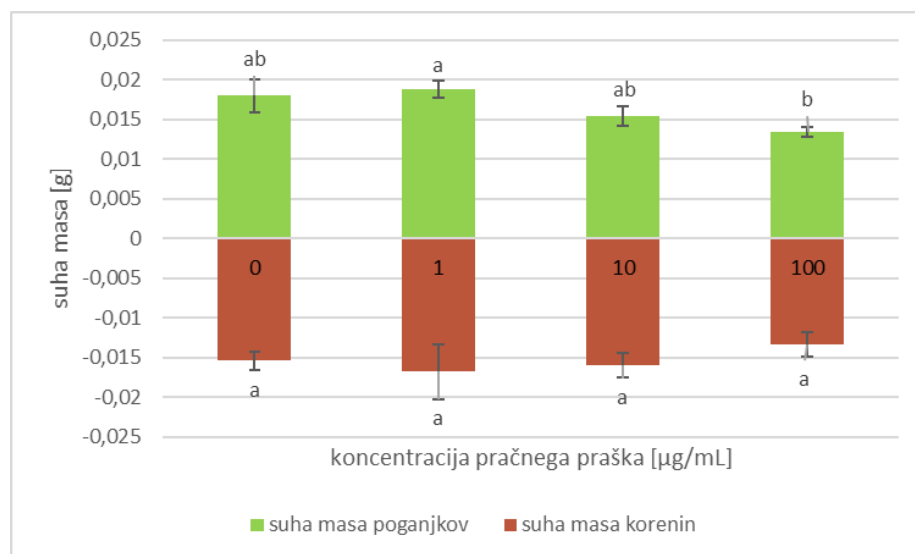
Slika 3: Dolžina poganjkov in korenin pri različnih koncentracijah pralnega praška. Statistična analiza je bila opravljena s programom XLSTAT. Na grafu so prikazana povprečja in standardne napake ($n=10$), različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike (Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$).

Spreminjanje sveže mase korenin in poganjkov pri različnih koncentracijah pralnega praška je prikazano na Sliki 4. Med koreninami ni statistično značilnih razlik glede na kontrolo. Poganjki pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ imajo večjo maso od poganjkov pri 100 $\mu\text{g/mL}$. Sveža masa poganjkov je pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ primerljiva s kontrolo, pri izpostavitvi 10 $\mu\text{g/mL}$ pa ni statističnih razlik s kontrolo.



Slika 4: Sveža masa poganjkov in korenin pri različnih koncentracijah pralnega praška. Statistična analiza je bila opravljena s programom XLSTAT. Na grafu so prikazana povprečja in standardne napake ($n=5$), različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike (Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$).

Spreminjanje suhe mase poganjkov in korenin pri različnih koncentracijah pralnega praška je prikazano na Sliki 5. Med koreninami ni statistično značilnih razlik glede na kontrolo. Poganjki pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ imajo večjo suho maso od poganjkov pri 100 $\mu\text{g/mL}$. Suha masa poganjkov je pri izpostavitvi 1 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ primerljiva s kontrolo, pri izpostavitvi 10 $\mu\text{g/mL}$ pa ni statističnih razlik s kontrolo.



Slika 5: Suha masa poganjkov in korenin pri različnih koncentracijah pralnega praška. Statistična analiza je bila opravljena s programom XLSTAT. Na grafu so prikazana povprečja in standardne napake ($n=5$), različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike (Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$).

Diskusija

Semena ječmena so bila sposobna kalitve pri vseh 3 koncentracijah pralnega praška. (Heidari 2012) je ugotovil, da pralni praški pri koncentraciji 2 g/L nimajo večjega učinka na kalitev semen korenine (*Zea mays*) – inhibicija kalitve se pojavi komaj pri koncentraciji 20 g/L. Uporabljene koncentracije pralnega praška so bile v našem poskusu najmanj 20-krat manjše, zato ni bilo večjega učinka na kalitev semen, prav tako pa smo za semena izpostavili pralnemu prašku, raztopljenemu v hranilni raztopini, avtorji pa v vodni raztopini. Poskusi bi morali ponoviti z višjimi koncentracijami pralnega praška, da bi dosegli toksični učinek na kalitev ječmena.

V primeru suhe in sveže mase korenin ni prišlo do signifikantnih razlik v parametrih pri izpostavitvi semen različnim koncentracijam pralnega praška, je pa pri sveži masi korenin moč opaziti padajoč trend z večanjem koncentracije. Suha in sveža masa poganjkov sta nakazali na pojav hormoneze. Sawadogo in sod. (2014) so pri solati (*Lactuca sativa*) opazili padec suhe mase korenin in poganjkov z večanjem koncentracije pralnega sredstva, a tudi oni so uporabili vodno raztopino in ne hranilne raztopine in je morda zato bil negativen učinek pralnega praška na rastlino večji, kot v našem primeru.

Spreminjanje dolžine korenin je pri nižji koncentraciji pralnega praška nakazalo na pojav hormoneze, dolžina poganjkov pa je z večanjem koncentracije padala. Pri nizkih koncentracijah je bil efekt na dolžino korenin in poganjkov majhen, z višanjem koncentracije pa se je vidno

povečal. Enak pojav so opazil Heidari (2012) pri koruzi in Ehilen in sod. (2017) pri paradižniku (*Solanum lycopersicum*), saj je bil vpliv pralnega sredstva na dolžino do koncentracije 1 g/L zanemarljiv, pri višjih koncentracijah pa so se pokazali zaviralni učinki.

Koncentracija klorofila a in karotenoidov se v izbranem koncentracijskem območju pralnega praška ni razlikovala med poganjki. Nasprotno so Uzma in sod. (2018) po izpostavitvi semen koroze enakim koncentracijam pralnega sredstva ugotovili zmanjšano produkcijo fotosinteznih pigmentov z večanjem koncentracije pralnega sredstva. Pralni praški vsebujejo površinsko aktivne snovi, ki lahko inhibirajo sintezo pigmentov (Chawla in sod. 1987) ali porušijo kompleks pigmenta in proteina in tako povečajo občutljivost pigmenta na fotodegradacijo (Dekker in sod. 2002). Razlike v rezultatih so lahko posledica tega, da so Uzma in sod. (2018) v raziskavi semena izpostavili vodni raztopini pralnega sredstva brez dodanih mineralnih hranil, mi pa hranilni raztopini, ki je omilila učinke detergenta, ali pa je ječmen manj občutljiv kot koroza. Za ustrezno primerjavo rezultatov bi poskus ponovili z vodno raztopino pralnega praška.

Nasprotno je pri klorofilu b moč opaziti rahlo hormezo. Trend povečane vsebnost klorofila pri nizkih dozah pralnega praška in redukcija klorofila pri povečanih dozah je bila opažena tudi pri mungo fižolu (*Vigna radiata* L.) (Poongodi in Sasikala 2013).

Ker pri izpostavitvi pri najvišji koncentraciji 100 µg/mL ni prišlo do padca parametrov pod 50% oziroma do popolnega zavrtja kalitve, nismo mogli določiti efektivne koncentracije 50 (EC₅₀). Poskus bi morali ponoviti in vključiti še višjo koncentracijo pralnega praška, npr. do 20 g/L, kjer bi predvidoma prišlo do občutnega zmanjšanja ali celo popolnega zavrtja kalitve semen ter posledično tudi produkcije pigmentov.

Zaključki

- Pralni prašek v testiranih koncentracijah le v manjši meri vpliva na dolžino ter maso korenin in poganjkov ter vsebnost pigmentov, verjetno tudi zaradi tega, ker smo semena izpostavili pralnemu prašku, raztopljenemu v hranilni raztopini.
- Pri vsebnosti klorofila b, dolžini korenin ter tako suhi kot sveži masi poganjkov je moč opaziti pojav hormeze.
- Zaviralni učinek je imel pralni prašek na dolžino poganjkov.
- Suha in sveža masa korenin ter koncentracija klorofila a in karotenoidov niso izkazovale statistično značilnih razlik pri naraščanju koncentracija pralnega praška.

Literatura

- Chawla G, Viswanathan PN, Devi S (1987) Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture. *Environmental and Experimental Botany*, 27: 311–319. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(87\)90041-4](https://doi.org/10.1016/0098-8472(87)90041-4)
- Dekker JP, Germano M, van Roon H, et al (2002). Photosystem II solubilizes as a monomer by mild detergent treatment of unstacked thylakoid membranes. *Photosynthesis Research*, 72: 203–210. <https://doi.org/10.1023/A:1016188818591>
- Ehilen O, Obadoni BO, Imade F, et al (2017) The effect of detergents on the germination and growth of *Amaranthus hybridus* L. and *Solanum lycopersicon* L. *Nigerian Annals of Natural Sciences*, 16(1): 100–108.
- Heidari H (2012) Effect of irrigation by contaminated water with cloth detergent on plant growth and seed germination traits of maize (*Zea mays*). *Life Science Journal*, 9(4): 1587–1590
- Monni S, Uhlig C, Junttila O, et al (2001) Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environmental Pollution*, 112 (3): 417–426.
- Poongodi N, Sasikala T (2013) Effect of detergent on selected morphological and biochemical parameters of green gram (*Vigna radiata* L.). *Biotechnology*, 2(7): 9–10.
- Sawadogo B, Sou M, Hijikata N, et al (2014) Effect of detergents from grey water on irrigated plants: case of okra (*Abelmoschus esculentus*) and lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Arid Land*, 24: 117–120.
- SURS (2020a) Prodaja industrijskih proizvodov in storitev po dejavnosti proizvoda (EUR), Slovenija, letno. Statistični urad RS
<https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/Data/1706001S.px/table/tableViewLayout2/> (30. maj 2021)
- SURS (2020b) Nastale količine komunalnih odpadkov in ravnanje z njimi (tone), Slovenija, letno. Statistični urad RS
<https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/Data/2706101S.px/table/tableViewLayout1/> (30. maj 2021)
- Uzma S, Khan S, Murad W, et al (2018) Phytotoxic effects of two commonly used laundry detergents on germination, growth, and biochemical characteristics of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Environ Monit Assess* 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7031-6>
- Vymazal J (2009) The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecol. Eng.*, 35: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.08.016>

VPLIV PREHRANSKEGA DOPOLNILA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Maja Čič, Hana Flajnik, Mateja Jenko, Neža Molk

Izvleček

Namen poskusa je bilo raziskati in določiti vpliv multivitaminskega pripravka na kaljenje ječmenovih semen in tako določiti povezave z njegovim vplivom na okolje. Semena smo kalili v kalilnikih iz umetne mase, izvedli smo analizo dolžine poganjkov, sveže in suhe mase ter vsebnosti fotosinteznih pigmentov. Sušenje korenin je potekalo na 105 °C v sušilniku, liofilizacija poganjkov pa pri -90 °C in 0,001 mbar v liofilizerju. Vsebnosti fotosinteznih pigmentov smo določili spektrofotometrično po ekstrakciji z 80 % acetonom. Vitamini in minerali na kaljivost znatno vplivajo šele pri višjih koncentracijah. Višje koncentracije zavirajo rastlinski metabolizem in sintezo barvil, zato predvidevamo, da bo kaljivost semen ječmena ovirana in ostali merljivi parametri (barvila, sveža in suha masa) manjši šele pri višjih koncentracijah prehranskega dopolnila.

Ključne besede: ječmen, seme, prehransko dopolnilo, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

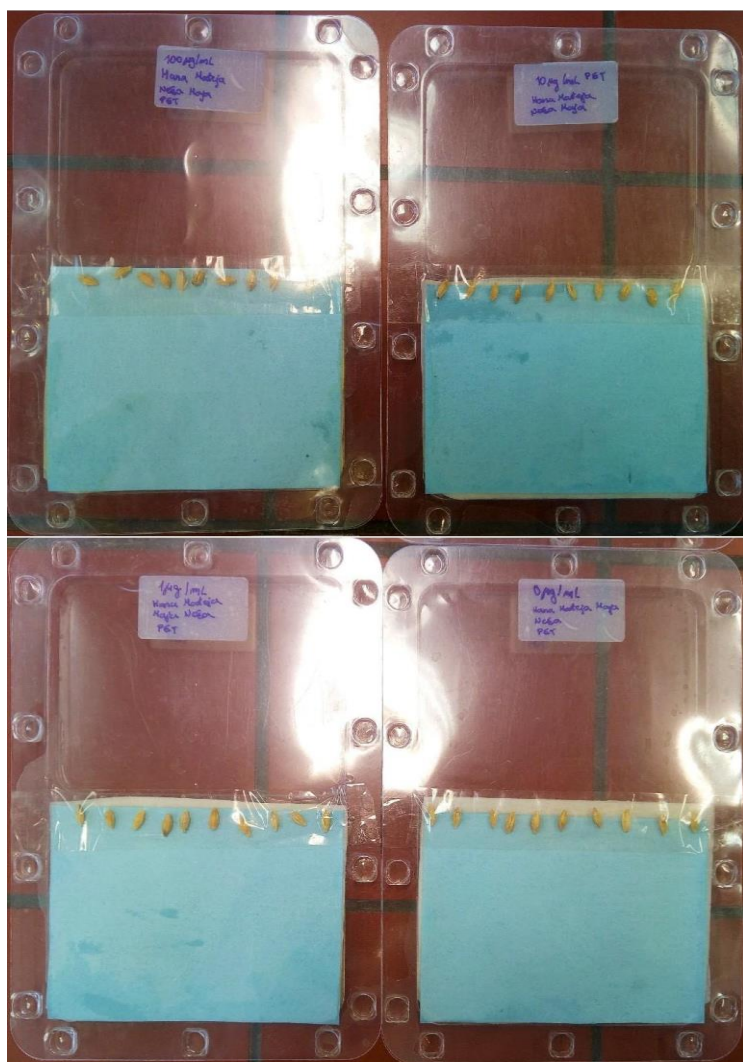
V razvitem svetu se vedno več pozornosti posveča zdravemu načinu življenja, med katerega uvrščamo tudi uravnoteženo in raznovrstno prehrano. Ker pa razviti svet hkrati teži k vedno bolj stresnim pogojem dela in dolgim delovnikom, to vodi do pomanjkanja prostega časa in posledično se veliko posameznikov zateka k hitro pripravljeni prehrani, ki ni dovolj raznolika in pogosto vključuje velike količine soli in maščob. Da bi nadoknadili dnevne potrebe po vitaminih, mineralih, prehranskih vlakninah in maščobnih kislinah, se zatekamo k uporabi prehranskih dopolnil. Ljudje z neuravnoteženo prehrano nismo edina ciljna skupina proizvajalcev prehranskih dopolnil. Danes na trgu najdemo prehranska dopolnila, ki so namenjena vsem in lahko posameznika spremljajo že od rojstva dalje. Potrošniki največkrat posegamo po prehranskih vitaminih, kot so magnezij, vitamin D, vitamin C, železo in različnih multivitaminskih pripravkih (Brewer et al. 2012; Kegl 2020; Kamiński et al. 2020).

Povprečen človek s hrano ne dobi zadostnih količin hranilnih snovi. Zato se priporoča, da primanjkljaj nadoknadi z ustrezno količino prehranskih dopolnil. V praksi pa to pogosto pomeni, da posameznik zaužije številna prehranska dopolnila, kar vodi do prekomernih koncentracij hranil v telesu in kasnejšega izločanja prekomernih količin hranil iz telesa. Ta prehranska dopolnila lahko zaznamo v odpadnih vodah in v čistilnih napravah ter v naravnih vodnih telesih (Česen et al. 2018).

V rastlinskih čistilnih napravah lahko mikro- in makrohranila ter minerali iz prehranskih dopolnil v nizkih koncentracijah delujejo kot stimulatorji rasti. Ekstrakti rastlin, ki se uporabljajo kot sestavine prehranskih dopolnil, se lahko uporabijo kot biostimulatorji rasti ali pa kot biognojila (Yakhin et al. 2017). Ker pa je poraba prehranskih dopolnil velika (v ZDA je bil v letu 2015 trg s prehranskimi dopolnili vreden 37 milijard dolarjev (Resnik 2018), so v vodi prisotne večje koncentracije prehranskih dopolnil, kot bi bilo za rastline optimalno.

Metode in materiali

Uporabili smo 4 vertikalne kalilnike velikosti 14 cm x 25 cm x 2 cm (D x V x Š). V spodnji del kalilnika smo vstavili peno debeline 2 cm, nanjo položili 4 plasti filter papirja in nanj položili barvni papir za lažje opazovanje rasti korenin. Na lepilni trak dolžine 15 cm smo pritrdili 10 neobdelanih semen ječmena, pri tem pa pustili 1 cm prostega roba. Lepilni trak smo nato prilepili na sredino kalilnika (slika 1).



55

Priprava raztopin prehranskega dopolnila

Pripravili smo založne raztopine prehranskega dopolnila Centrum A do Ž (preglednica 1) s koncentracijami 0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL. Tableto prehranskega dopolnila smo zdrobili v terilnici in jo zmešali s 100 mL Hoaglandove raztopine (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) in vse skupaj prelili v 200 mL Shot steklenice in pridobili raztopino s 100 µg/mL. Nato smo z zaporednimi 10-kratnimi redčitvami pridobili še založni raztopini s koncentracijama 10 µg/mL in 1 µg/mL. Kot kontrolo oz. raztopino s koncentracijo 0 µg/mL smo uporabili Hoaglandovo raztopino (slika 2).

Preglednica 1: Sestava ene tablete prehranskega dopolnila (Lekarna Plavž, 2021).

sestavine	v 1 tableti
vitamin A (RE) (25 % kot betakaroten)	800 µg
vitamin E (α-TE)	15 mg
vitamin C	100 mg
vitamin K	30 µg
vitamin B1 (tiamin)	1,4 mg
vitamin B2 (riboflavin)	1,75 mg
vitamin B6	2 mg
vitamin B12	2,5 µg
vitamin D	5 µg
biotin	62,5 µg
folna kislina	200 µg
niacin (NE)	20 mg
pantotenska kislina	7,5 mg
kalcij	162 mg
fosfor	125 mg
magnezij	100 mg
železo	5 mg
jod	100 µg
baker	500 µg
mangan	2 mg
krom	40 µg
molibden	50 µg
selen	30 µg
cink	5 mg



Slika 7: Pripravljene raztopine prehranskega dopolnila s koncentracijami 0, 1, 10 in 10 µg/mL.

Nastavitev poskusa

Nato smo peno in barven papir v kalilniku namočili z 10–20 mL raztopine s primerno koncentracijo raztopine prehranskega dopolnila. Kalilnike smo nato zaprli s pokrovom in jih primerno označili. Označili smo tudi Shot steklenice z raztopinami prehranskega dopolnila. Kalilnike smo nato postavili pokončno in pustili, da se odvečna raztopina odteče in jih nato prestavili v rastno komoro, kjer so bili v pokončni legi v polici. Rastna komora ima fotoperiodo 16:8 (svetloba:tema) in temperaturo okrog 23 °C.

Ječmen smo pustili v rastni komori 7 dni, medtem smo vsak dan ali vsak drugi dan preverili omočenost pene in barvnega papirja, saj morajo biti semena na mokri podlagi ves čas za uspešno kaljenje in optimalne rezultate. Kalilnik smo vmes po potrebi zalili s 5–10 mL Hoaglandove raztopine s prehranskim dopolnilom.

Priprava rastlinskega materiala za določanje dolžine, sveže in suhe mase poganjkov in korenin.

Sedmi dan smo kalilnik razstavili in ločili kalčke ječmena od podlage. Nato smo ločili poganjke in korenine in izmerili njihovo dolžino na 0,5 cm natančno. Nato smo združili po 2 poganjka ali 2 korenini in ju stehtali, kar nam predstavlja svežo maso. Nato smo ju zavili v aluminijasto folijo in jo pravilno označili. Sledilo je sušenje korenin na 105 °C 24 ur in liofilizacija poganjkov 48 ur na -90 °C v vakuumu (0,001 mbar).

Teden kasneje smo stehtali posušene korenine in poganjke in dobili suho maso. Korenine smo zavrgli, poganjke smo uporabili za določanje vsebnosti klorofilov. Po potrebi smo jih združili, da je bila skupna minimalna suha masa 20 ng.

Izolacija klorofilov in karotenoidov

Za izolacijo klorofilov smo poganjke v terilnici, z dodanim 80 % acetonom, zdrobili do te mere, da ni bilo vidnih delcev. Nato smo iz terilnice prelili raztopino poganjkov v epruvete, na katere smo predhodno označili volumen 5 mL, in do te mere nato dolili 80 % aceton. Epruvete smo primerno označili in jih zaprli s silikonskim zamaškom. Na koncu smo jih vorteksirali 5 sekund in jih postavili v hladilnik do naslednjega dne.

Naslednji dan smo dodali 80 % aceton do oznake 5 mL, za konstanten volumen vzorcev, vorteksirali 5 s in nato vzorce centrifugirali približno 1 minuto pri 2000 obratih/minuto, da se je ustvaril trd pelet. Vzorce smo nato prelili v kvarčno kiveto in pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 470 nm v spektrofotometru pomerili absorbanco in preračunali koncentracije

klorofilov a in b ter karotenoidov v vzorcih (Monni et al. 2001). Vrednosti smo zapisali in jih uporabili v statistični obdelavi podatkov.

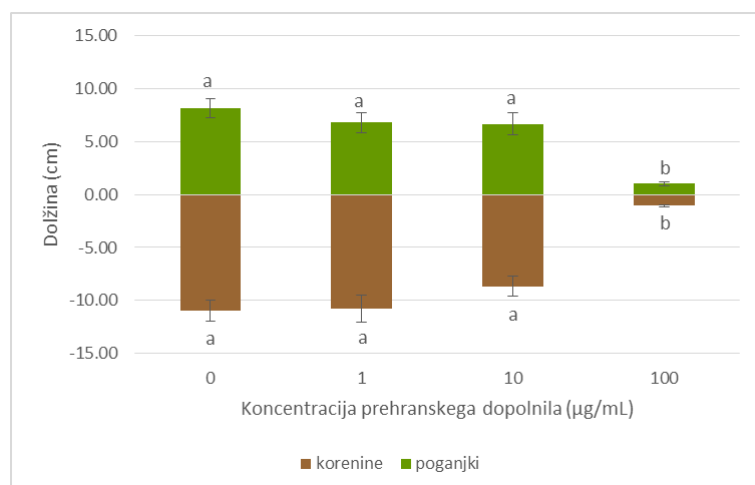
Statistična obdelava podatkov

Rezultate smo analizirali v programu Microsoft Excel z dodatkom XLSTAT Basic (Addinsoft). Za obdelavo podatkov smo uporabili analizo variance (ANOVA) po Duncanovem testu. Pri izračunu standardnih napak (SE) za dolžino poganjkov in korenin, svežo in suho maso smo standardne napake izračunali po enačbi $SE = \text{stdev.p} / \sqrt{n}$, kjer stdev.p pomeni standardni odklon populacije in n število meritev.

Rezultati

Dolžina poganjkov in korenin

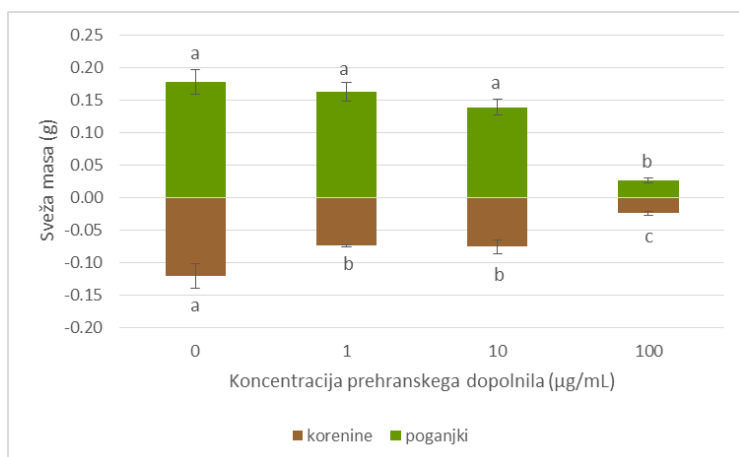
Z naraščajočo koncentracijo prehranskega dopolnila je bila opazna manjša rast korenin in poganjkov, vendar ni statistično signifikantna. Korenine in poganjki so bili najdaljši v primeru rasti brez prehranskega dopolnila. Pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila, 100 µg/mL, je bila rast najmanjša (slika 3).



Slika 8: Vpliv koncentracije prehranskega dopolnila na dolžino korenin in poganjkov. Stolpci prikazujejo povprečje ± standardno napako. n=5, različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike, ANOVA, Duncanov test $p < 0,05$.

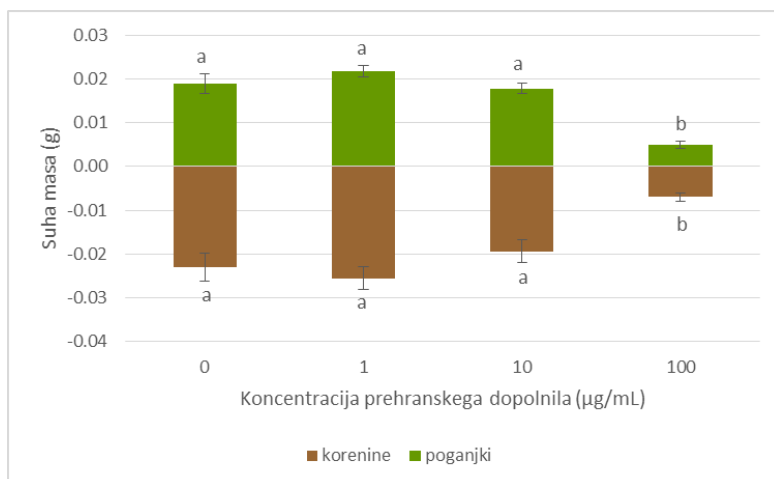
Sveža in suha masa korenin in poganjkov

Tako kot dolžina korenin in poganjkov, sta tudi suha in sveža biomasa padali z večanjem koncentracije prehranskega dopolnila. Sveža masa je primerljiva med meritvami 0, 1 in 10, pri 100 µg/mL pa je upadla. Razlika med povprečnima masama poganjkov, ki so zrastle pri 100 µg/mL in med poganjki, ki niso bili izpostavljeni je 83,3 %. Pri meritvah sveže mase korenin nimamo enakomernega padanja mase, kot ga vidimo pri meritvah sveže mase poganjkov. Izstopa meritev pri koncentraciji 10 µg/mL (slika 4).



Slika 9: Sveža masa korenin in poganjkov v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila. Stolpci prikazujejo povprečje $\pm$ standardno napako. $n=5$, različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike, ANOVA, Duncanov test $p<0,05$.

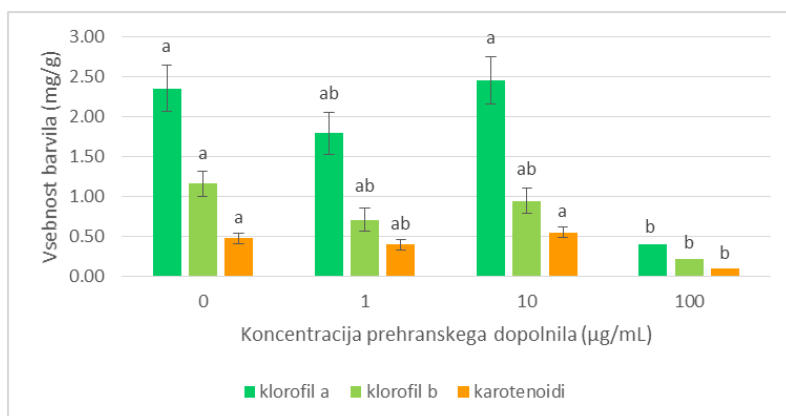
Povprečna suha masa poganjkov je bila pri največji koncentraciji prehranskega dopolnila (100 µg/mL) za 73,68 % nižja kot pri poganjkih, ki niso bili izpostavljeni prehranskemu dopolnilu. Tako kot povprečna suha masa poganjkov, je z naraščajočo koncentracijo toksikanta padala tudi povprečna suha masa korenin. Povprečna suha masa korenin je bila pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila za 69,8 % nižja od suhe mase korenin rastlin kontrole. Tudi pri meritvah suhe mase korenin izstopa meritev pri 1 µg/mL koncentraciji prehranskega dopolnila. Tudi v tem primeru je masa pri tej koncentraciji višja od mase, ki smo jo izmerili vzorcem, ki niso bili tretirani (slika 5).



Slika 10: Suha masa korenin in poganjkov v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila. Stolpci prikazujejo povprečje $\pm$ standardno napako. $n=5$, različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike, ANOVA, Duncanov test $p<0,05$.

Vsebnost klorofila a in b

Najvišje vsebnosti klorofila a smo izmerili pri ječmenu iz skupin 0 in 10 µg/mL. Najnižjo vsebnost klorofila a, b in karotenoidov pa pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila (100 µg/mL). Pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila (100 µg/mL) na grafu ni prikazane standardne napake, saj smo zaradi prenizke mase poganjkov pri tej koncentraciji vse vzorce združili v enega (slika 6).



Slika 11: Vsebnost barvil v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila. Stolpci prikazujejo povprečje $\pm$ standardno napako. $n=5$, različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike, ANOVA, Duncanov test $p<0,05$. Pri koncentraciji 100 µg/mL velja $n=e$, zato se SE ni prikazala.

Razprava

Največji vpliv prehranskega dopolnila na kaljivost semen se je po pričakovanjih kazal pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila, tu je bila razlika tudi statistično značilna. Statistično značilne razlike v sveži masi poganjkov so bile prisotne pri vseh uporabljenih koncentracijah prehranskega dopolnila, kjer je masa pričakovano upadala z višanjem koncentracije prehranskega dopolnila. Pri suhi masi rastlinskega materiala so bile razlike opaznejše le pri najvišji koncentraciji. Razlika v koncentraciji klorofilov a in b ter skupnih karotenoidov se je kazala pri najvišji koncentraciji prehranskega dopolnila, koncentracija vseh fotosintetskih barvil pa je statistično značilno padala z višanjem koncentracije prehranskega dopolnila, z izjemo koncentracij klorofila a in skupnih karotenoidov, ki so bile statistično primerljive s kontrolo (0 µg/mL).

Vpliv različnih koncentracij prehranskega dopolnila na rast rastlin je bil preverjen z več parametri. Vendar pa je v tem primeru nemogoče posplošiti vpliv vseh prehranskih dopolnil na rastline. V to skupino namreč uvrščamo najrazličnejše pripravke in mešanice, kot so proteinski praški, vitamini in minerali, esencialne maščobne kisline, rastlinski izvlečki in še marsikaj drugega. V našem eksperimentu je bila uporabljena mešanica vitaminov in mineralov. Nekatere od prisotnih lahko rastline izkoriščajo kot hranila in jih uporabijo za svojo rast, nekateri pa so zanje toksični ali pa škodljivi pri višjih koncentracijah. Zaradi raznolikosti prehranskih dopolnil je nemogoče primerjati med seboj študije, ki preverjajo njihov vpliv na rastline. Potreben je pregled sestavin posameznega dopolnila in vpliv, ki ga imajo na rast in kaljivost rastlin. Pomembno pa je preučiti tudi formulacijo posameznih vitaminov in mineralov, kajti prehranska dopolnila so prvotno namenjena ljudem in oblike, ki so dostopne nam, morda ne ustrezajo rastlinam.

Izmed mineralov prisotnih v testiranem prehranskem dopolnilu kalcij, fosfor in magnezij spadajo med esencialne rastlinske makronutrientne, železo, mangan, baker, cink in molibden pa med mikronutrientne. Našteti elementi so potrebni za pravilno encimsko aktivnost ter formacijo določenih metabolitov in fotosintetskih pigmentov. Koristnost posameznih elementov za rastline je odvisna tudi od okoljskih razmer. Tako so lahko nekateri elementi za rastline tudi potencialno toksični (White and Brown 2010). Visoke koncentracije lahko

inhibirajo rast. Od mineralov, prisotnih v prehranskem dopolnilu, so rastlinam najbolj neprijazni krom, selen in jod (Brenchley 1924). Vplivajo na kaljivost, rast korenin, stebel in listov (Shanker et al. 2005), povzročajo oksidativni stres ter napačno zvitje proteinov (Gupta and Gupta 2017).

Vpliv vitaminov na rast rastlin je nekoliko drugačen. Veliko prehranskih dopolnil vsebuje vitamine ali prekurzorje, saj ljudje vseh esencialnih vitaminov nismo sposobni sintetizirati sami. Nekatere od potrebnih vitaminov pridobimo prav iz rastlinske prehrane, iz česar je razvidno, da jih rastline sintetizirajo same. Zaradi te sposobnosti rastline ne potrebujejo zunanjih virov vitaminov, čeprav obstajajo pripravki, ki vsebujejo vitamine B, C in E. Ti naj bi pomagali pri rasti rastlin, toleranci na mraz in izboljšali proces fotosinteze, vendar ni veliko študij, ki bi to potrjevale. Velikokrat različne študije pridejo do različnih zaključkov. Redko so bili opisani toksični učinki vitaminov v rastlinah (Castro et al. 2018), prav tako pa niso opisani stimulatorni učinki.

Prehranska dopolnila lahko povzročajo stres za okolje v velikih koncentracijah. Sama dopolnila so formulirana tako, da so bolj toksične snovi v nižjih koncentracijah že zato, ker so primarno namenjena izboljšanju zdravja ljudi. Večje koncentracije se lahko v okolju znajdejo ob izpustu iz industrijskega obrata in ob metanju odvečnih prehranskih dopolnil v odtok. Prehranska dopolnila lahko vsebujejo okolju škodljive snovi, zato je z njimi potrebno ravnati kot z neuporabljenimi zdravili in se jih znebiti po navodilu proizvajalca ali na mestih za zbiranje odpadnih zdravil. Še en vir onesnaženja s prehranskimi dopolnili pa je agronomija. Prvič, prehranska dopolnila iz prehrane živine se lahko znajdejo v gnojnici ali v blatu, ki je kasneje uporabljeno za gnojenje polj. Drugič pa lahko pride do prekomerne uporabe prehranskih dopolnil za rastline (navadno mineralni pripravki) in posledične onesnaženosti kmetijskih površin.

Za določanje vpliva prehranskega dopolnila na rast in kaljivost rastlin bi bilo potrebno testirati posamezne komponente in določiti njihovo toksičnost ter koncentracijo, ki jo rastline tolerirajo. Rezultate študij vpliva prehranskih dopolnil na rastline bi bilo težko primerjati med seboj zaradi razlik v sestavi in sami naravi posameznih prehranskih dopolnil.

Zaključki

V sodobnem svetu veliko posameznikov posega po prehranskih dopolnilih, ki se nato izločajo iz telesa in jih zaznamo v odpadnih vodah in v čistilnih napravah. Prehranska dopolnila v nizkih koncentracijah lahko delujejo stimulatивно na rast rastlin, saj vsebujejo snovi, ki so nujno potrebne tudi za rast in razvoj rastlin, vendar pa prehranska dopolnila pogosto vsebujejo tudi okolju škodljive snovi, kot so krom, mangan in selen, ki predstavljajo breme za rastline v okolju.

Zaključimo lahko, da nizke koncentracije prehranskih dopolnil v okolju ne predstavljajo velike nevarnosti, vendar pa so te koncentracije lahko hitro presežene. Da bi dobili relevantnejše rezultate, bi morali narediti obširnejšo študijo, v katero bi vključili večje število semen in več različnih prehranskih dopolnil z različno sestavo, za analizo rezultatov pa bi uporabili natančnejše analizne tehnike kot npr. elektronska mikroskopija, ki bi nam nudila vpogled v poškodbe rastlinskih celic. Prav tako bi lahko naredili tudi študije vpliva posameznih komponent prehranskih dopolnil na rast rastlin, saj le-teh v obstoječi literaturi ni oz. so nekatere

komponente (predvsem minerali) analizirane le v primeru nadzora rastlin (hiperakumulatorjev), uporabljenih za fitoremediacijo tal, ki so onesnažene s težkimi kovinami.

Literatura

- Brenchley WE (1924) The Effect of Iodine on Soils and Plants. *Annals of Applied Biology* 11:86–111. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1924.tb05695.x>
- Brewer AJ, Ort C, Banta-Green CJ, et al (2012) Normalized Diurnal and Between-Day Trends in Illicit and Legal Drug Loads that Account for Changes in Population. *Environ Sci Technol* 46:8305–8314. <https://doi.org/10.1021/es202447r>
- Castro JLS, Lima-Melo Y, Carvalho FEL, et al (2018) Ascorbic acid toxicity is related to oxidative stress and enhanced by high light and knockdown of chloroplast ascorbate peroxidases in rice plants. *Theor Exp Plant Physiol* 30:41–55. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0100-y>
- Centrum od A do Ž, 60 tablet | Lekarna Plavž. In: <https://lekarna-plavz.com/>. <https://lekarna-plavz.com/lekarna/prehranska-dopolnila/vitamini-minerali/centrum-od-a-do-z-60-tablet/>. Accessed 13 Jun 2021
- Česen M, Heath D, Krivec M, et al (2018) Seasonal and spatial variations in the occurrence, mass loadings and removal of compounds of emerging concern in the Slovene aqueous environment and environmental risk assessment. *Environmental Pollution* 242:143–154. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.052>
- Gupta M, Gupta S (2017) An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Front Plant Sci* 7:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>
- Kamiński M, Kręgielska-Narożna M, Bogdański P (2020) Determination of the Popularity of Dietary Supplements Using Google Search Rankings. *Nutrients* 12:. <https://doi.org/10.3390/nu12040908>
- Kegl EJ (2020) Znanstveno dokumentirani učinki prehranskih dopolnil. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=122446>. Accessed 7 Jun 2021
- Monni S, Uhlig C, Junttila O, et al (2001) Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environmental Pollution* 112:417–426. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00139-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00139-1)
- Resnik DB (2018) Proportionality in Public Health Regulation: The Case of Dietary Supplements. *Food Ethics* 2:1–16. <https://doi.org/10.1007/s41055-017-0023-3>
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ Int* 31:739–753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>
- White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105:1073–1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Yakhin OI, Lubyanov AA, Yakhin IA, Brown PH (2017) Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front Plant Sci* 7:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

VPLIV SVINČEVEGA KLORIDA (PbCl_2) NA RAST JEČMENA

Avtorji: Katja Hrovat, Tamara Košir, Ema Pleško, Karolina Smrkolj

Izvleček

Preučevali smo vpliv svinčevega klorida (PbCl_2) različnih koncentracij (0, 1, 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$) na kalitev semen ječmena *Hordeum vulgare* in na rast poganjkov in korenin kalic. Poskus smo nastavili v vertikalnih kalilnikih in semena sedem dni gojili v rastni komori. Po končanem poskusu smo z ravnilom izmerili dolžino korenin in poganjkov ter s tehtnico določili svežo in suho maso le-teh. V poganjkih smo spektrofotometrično določili vsebnost fotosinteznih pigmentov. Za statistično obdelavo pridobljenih rezultatov smo uporabili orodje Excel in razširitev XLSTAT ter statistično analizo ANOVA z Duncanovim testom. Rezultati kažejo, da svinčev klorid nima vpliva na kalitev semen, dolžino poganjkov in korenin, na svežo in suho maso ter na prisotnost fotosinteznih pigmentov. Ker smo za osnovo uporabili Hoaglandovo hranilno raztopino predvidevamo, da je Pb^{2+} tvoril netopne in rastlinam nedostopne komplekse s fosfatom.

Ključne besede: ječmen, seme, svinčev klorid, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Rastline se tekom življenja spopadajo z različnimi abiotskimi dejavniki stresa, kot so poplave, suše, prekomerna slanost prsti, spremenljive in povišane temperature ozračja ter prisotnost različnih onesnažil v vodi, zraku in prsti. Zaradi nagle in povečane industrializacije ter globalizacije sveta se je onesnaženost okolja s pesticidi, kovinami in drugimi kemijskimi sredstvi povečala, kar negativno vpliva na rast tako divjih kot kmetijsko pomembnih rastlin ter vodi v zmanjšanje pridelka le-teh. Prisotnost onesnažil v okolju je zaskrbljujoča tudi z vidika zdravja ljudi, saj se številne snovi ohranjajo in prenašajo po prehrabeni verigi (Sethy and Ghosh 2013).

Leta 2003 je organizacija ATSDR (ang. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) svinec označila kot drugo najnevarnejšo težko kovino glede na njeno pojavnost v okolju, strupenost in potencial za izpostavljenost ljudem (Yang et al. 2010). Obenem postajajo vedno bolj zaskrbljujoči tudi njegovi učinki na zdravje rastlin in poljščin. Povečana izpostavljenost svinčevim ionom namreč okrne kalitev semen, razvoj poganjkov in korenin ter samo rast rastline. To je posledica povečane sinteze reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki vodi v oksidativni stres, poškodbe proteinov in zmanjšanje njihove sinteze, oksidacijo lipidnih membran ter poškodb DNA. Obenem je okrnjeno privzemanje drugih esencialnih mineralov iz prsti, predvsem železa, mangana in drugih dvovalentnih ionov, zmanjšana sinteza fotosinteznih pigmentov ter učinkovitost fotosinteze, prisotni pa so lahko tudi genotoksični učinki (Pourrut et al. 2011; Yang et al. 2010).

Svinec se v naravi nahaja povsod: v zraku, vodi in tleh. Naravno je prisoten v manjših količinah (10-67 $\mu\text{g/mL}$), ki pa se vse bolj povečujejo zaradi človekovih dejavnosti, predvsem zaradi prometa in industrije, najdemo pa ga tudi v domačih izdelkih kot so barve, gradbeni material, cevi, tudi v kozmetiki. V naravi ga večinoma najdemo v obliki rud, med katerimi so najpogostejše: galenit (PbS), anglezit (PbSO_4) in ceruzit (PbCO_3), ki se nahajajo v zemlji. Svinec spada pod ksenobiotike in ga v naravi najdemo v različnih oblikah: biodostopnih in nedostopnih. Med biodostopne spada le Pb^{2+} oblika. Na biodostopnost vplivajo različni dejavniki: pH, koncentracija, redoks potencial, mineralna sestava tal... Nad pH 6 se njegova biodostopnost v zemlji zmanjša, saj takrat večinoma nastajajo svinčevi fosfati, hidroksidi in karbonati; ki so netopni. PbCl_2 , ki smo ga uporabljali na vajah je v Hoaglandovi raztopini tvoril svinčev klorofosfat, ki je slabo topen v vodi (Zulfiqar et al. 2019).

Negativni učinki svinca so odvisni od njegove koncentracije v okolju in biodostopnosti. Rastline imajo namreč razvite različne mehanizme zmanjšanja njegovega privzema preko korenin ter obrambe proti njegovim škodljivim učinkom. Zmanjšanje privzema je pasiven proces in je posledica prisotnosti Kasparijevega traku v koreninah ter dodatne zadebelitve celične stene na račun prisotnosti svinca. Pomemben je tudi proces razstrupljanja rastlinskega tkiva, pri čemer se svinčevi ioni preko aktivnih transporterjev kopičijo v celičnih predelih, kjer ne morejo poškodovati makromolekul. Dodatno zaščito predstavljata povečana sinteza in aktivnost encimov, ki pretvarjajo kisikove zvrsti v nestrupene produkte, ter povečana sinteza antioksidantov. Kljub temu pa so ti mehanizmi zaščite učinkoviti le pri nižjih koncentracijah svinca, obenem pa njihova aktivacija rastlini predstavlja stres, ki vodi v zmanjšano stopnjo njene rasti oziroma zmanjšano kalitev semen (Pourrut et al. 2011).

Namen poskusa je tako določiti vpliv različnih koncentracij svinčevega klorida (PbCl_2) na kaljivost semen ječmena *Hordeum vulgare* ter na rast poganjkov in korenin. Vpliv na rast smo spremljali z merjenjem dolžine poganjkov in korenin ter z določanjem njihove sveže ter suhe mase. Preverjen je bil tudi vpliv svinčevega klorida na sintezo klorofila a in b ter karotenoidov v mladih poganjkih, kar je bilo določeno z metodo spektrofotometrije. Koncentracije svinca, ki so bile pri tem uporabljene, so znašale 1, 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$, vključen pa je bil tudi kontrolni poskus, pri katerem semena svinčevim ionom niso bila izpostavljena.

Glede na pregledano literaturo, ki poroča o koncentracijski odvisnosti strupenosti svinčevih pripravkov na semena, smo postavili hipotezo, da bodo semena, izpostavljena koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$, kazala najnižjo stopnjo kaljivosti, kalice pa najnižjo stopnjo rasti korenin in poganjkov, najmanjši vpliv pa bo opazen pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$. Podobno hipotezo smo postavili pri vsebnosti klorofilov in kartenoidov, pri čemer naj bi poganjki semen, izpostavljenih najvišji koncentraciji PbCl_2 , vsebovali najmanj pigmentov, največ pa naj bi jih bilo v poganjkih neizpostavljenih semen.

Metode in materiali

Materiali

Za izvedbo poskusa smo potrebovali naslednje materiale in laboratorijsko opremo:

- 380 mL hranilne raztopine ($\frac{1}{2}$ Hoaglandova raztopina)
- 10 mg svinčevega klorida (PbCl_2) v prahu
- 100 mL merilni valj
- 250 mL Schott steklenice
- tehtnica in tehtalna ladjica
- laboratorijske rokavice (obvezno pri delu s PbCl_2 !)
- alkoholni flumaster
- 4 vertikalni kalilniki z dvema odprtinama ter s plastjo pene, filter papirja in črnega papirja
- 40 nepoškodovanih semen ječmena (*Hordeum vulgare*)
- lepilni trak (približno 60 cm)
- Pasteurjeve pipete
- rastna komora (23 °C, fotoperioda 16/8)
- škarje
- ravnilo
- aluminijasta folija
- sušilnik (105 °C)
- liofilizator (-90 °C, 0,001 mbar)
- stojalo za epruvete
- 20 steklenih epruvet z gumijastim zamaškom
- 80% aceton (približno 120 mL)
- terilnica
- vorteks mešalo
- hladilnik (4 °C)
- centrifuga
- kivete
- spektrofotometer

Metode

Priprava založnih raztopin

V tehtalno ladjico smo previdno zatehtali 10 mg svinčevega klorida v prahu ter ga prenesli v 250 mL Schott steklenico. Z merilnim valjem smo odmerili 100 mL hranilne raztopine in jo dodali svincu ter dobro premešali, da se je ta v celoti raztopil. Na steklenici smo označili datum priprave raztopine ter njeno koncentracijo – 100 µg/mL.

Za pripravo raztopine s koncentracijo 10 µg/mL smo v svežo 250 mL Schott steklenico z merilnim valjem odmerili 90 mL hranilne raztopine ter dodali 10 mL založne raztopine s koncentracijo 10 µg/mL. Dobro smo premešali in steklenico primerno označili. Podobno smo pripravili še raztopino s koncentracijo 1 µg/mL – v tretjo Schott steklenico smo odmerili 90 mL založne raztopine in dodali 10 mL raztopine s koncentracijo 10 µg/mL ter dobro premešali.

Priprava kalilnikov

Kalilnikom smo odstranili pokrov in v spodnjo odprtino vnesli plast pene, filter papirja ter črnega papirja v opisanem zaporedju. Pena in filter papir sta po omakanju zadržala hranilno raztopino z različnimi koncentracijami svinčevega klorida oziroma brez njega, črni papir pa je služil kot kontrastno ozadje za spremljanje rasti sicer belih korenin semen ječmena.

Na plast pene in filter papirja smo s Pasteurjevo pipeto postopno nanесли do 30 mL posamezne pripravljene raztopine ter pustili stati, da se je ta popolnoma vpila. Na pokrov posameznega kalilnika smo z nalepko označili datum začetka poskusa ter koncentracijo raztopine svinčevega klorida, s katero smo omočili plasti.

Dalje smo pripravili štiri kose lepilnega traku z dolžino, enako širini kalilnika (približno 15 cm). Na lepljivo stran posameznega traku smo s pinceto enakomerno razporedili 10 semen ječmena, tako da so bila ta orientirana pravokotno glede na lepilni trak.

Ko so se raztopine, s katerimi smo omočili peno in filter papir, vanje popolnoma vpile, smo na spodnjo odprtino kalilnika namestili še plast črnega papirja. Na njegov skrajno zgornji del smo prilepili lepilni trak s semeni, ga dobro pričvrstili ter postopek ponovili pri preostalih treh kalilnikih. Nato smo kalilnike zaprli s pokrovom, kot prikazuje Slika 1A, jih postopoma obrnili vertikalno ter pri tem previdno odcedili morebitno odvečno raztopino, ki se ni v celoti vpila.

Semena smo 7 dni inkubirali v rastni komori pri temperaturi 23 °C in fotoperiodi 16/8 ur.

Tehtanje svežih korenin in poganjkov ter njihovo sušenje

Po končanem sedemdnevem kaljenju smo kalilnike odprli in rastlinice iz njih odstranili. Posebej smo bili previdni pri odstranjevanju korenin s črnega papirja, saj se te tekom rasti prilepijo na podlago. Nato smo s škarjami direktno nad oziroma pod semenom odrezali poganjek ter korenino posamezne rastlinice ter z ravnilom izmerili njuno dolžino.

Sledilo je tehtanje sveže mase poganjkov in korenin. Po dva poganjka oziroma korenini s semen znotraj istega kalilnika smo položili na kos aluminijaste folije, s tehtnico izmerili njuno maso ter si rezultate zabeležili. Postopek smo ponovili za poganjke in korenine, pridobljene s semen iz preostalih treh kalilnikov.

Pare poganjkov in korenin smo nato previdno ovili z aluminijasto folijo, na kateri smo izvedli tehtanje, da se rastlinski material med sušenjem ni zamešal ali izgubil. Sledilo je njegovo sušenje v sušilniku pri temperaturi 105 °C za 48 ur, poganjke pa smo dalje še 48 ur liofilizirani pri temperaturi -90 °C in v vakuumu (0,001 mbar).

Tehtanje suhih poganjkov in korenin ter obdelava poganjkov

V aluminijasto folijo ovit osušen rastlinski material smo odstranili iz sušilnika in s tehtnico določili suho maso parov poganjkov oziroma korenin. Rezultate smo si zabeležili in nato korenine zavrgli.

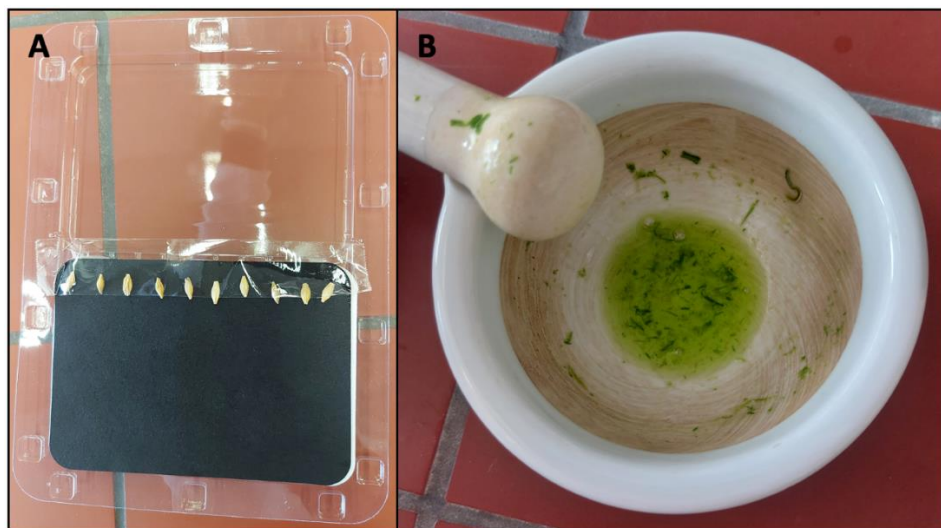
Sledila je obdelava poganjkov za določanje njihove vsebnosti klorofila in karotenoidov.

V stojalu smo si pripravili 20 steklenih epruvet. Z merilnim valjem smo odmerili 5 mL 80% acetona in ga prelili v epruveto ter si nivo meniska označili z alkoholnim flumastrom. Postopek smo ponovili pri preostalih epruvetah, pri čemer smo zaradi hlapnosti acetona vmes nekajkrat preverili, da je njegov volumen ostal enak.

Nato smo zatehtali 0,02 do 0,03 g osušenih poganjkov, pri čemer smo te v nekaj primerih združili, da smo dosegli zahtevani interval mase. Te smo prenesli v terilnico, dodali nekaj

mililitrov acetona ter trli, dokler ni bilo več opaznih delcev stebel. Homogenat smo prelili v ustrezno označeno epruveto in prilili aceton do oznake. Epruveto smo takoj zaprli z gumijastim zamaškom, da smo preprečili izhlapevanje acetona. Postopek smo ponavljali, dokler nismo homogenizirali vseh poganjkov.

Po končani homogenizaciji smo vse epruvete vorteksirali ter njihove oznake prelepili z lepilnim trakom, da smo preprečili njihovo morebitno brisanje. Epruvete z vzorci smo do meritve vsebnosti klorofila in karotenoidov hranili na 4 °C.



Slika 12: **A** – Pripravljen vertikalni kalilnik s plastmi omočene pene, filter papirja in črnega papirja ter desetimi semeni ječmena. **B** – Mletje oziroma homogenizacija suhih poganjkov v terilnici z dodatkom 80% acetona. Prikazan je nepopolno zmlet material, ki tako še ni primeren za nadaljnjo analizo vsebnosti klorofila in karotenoidov.

Spektrofotometrično določanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov

Epruvete z vzorci smo vzeli iz hladilnika in jim dodali 80% aceton do 5 mL oznake. Nato smo jih kratko vorteksirali, da so se vzorci popolnoma homogenizirali, ter jih nekaj minut centrifugirali, da se je rastlinski material posedel.

Nato smo supernatante postopoma prelili v kiveto in s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 470 nm (karotenoidi), 647 nm (klorofil b) in 664 nm (klorofil a) ter si zabeležili rezultate meritev.

Statistična obdelava podatkov

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli z orodjem Excel in njegovo razširitvijo XLSTAT (Addinsoft). Uporabili smo statistično analizo ANOVA z Duncanovim testom.

Rezultati

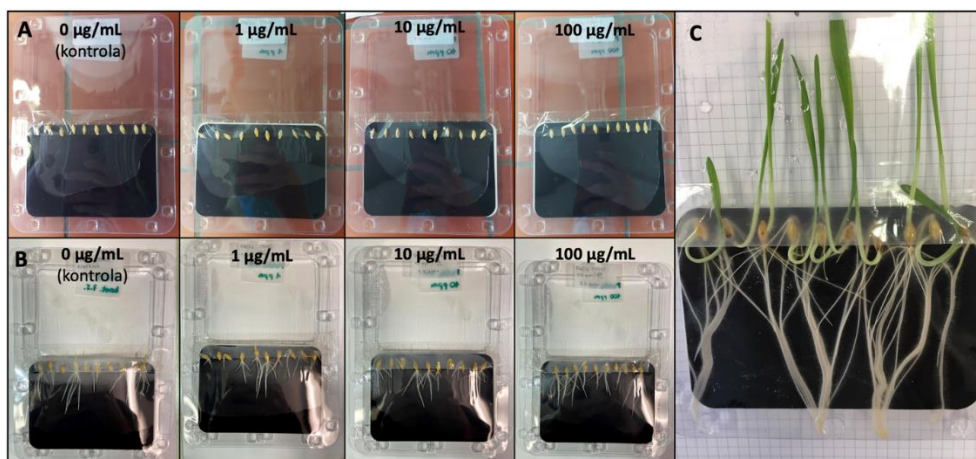
Kaljivost semen ter analiza dolžine poganjkov in korenin

Semena ječmena smo v vertikalnih kalilnikih kalili sedem dni ter pri tem spremljali omočenost plasti. Ta je bila zadostna tekom celotnega trajanja poskusa, zato dodatno zalivanje ni bilo

potrebno. V času kalitve so korenine po dolžini popolnoma prerasle črno plast papirja, kot je prikazano na Sliki 2.

Tako pri kontrolnih semenih kot pri semenih, izpostavljenih različnim koncentracijam PbCl_2 , smo zasledili 100% kaljivost, prav tako pa je pri vseh semenih bila prisotna rast poganjkov in korenin, kot prikazuje Slika 2C.

Pri 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 (Slika 2B) opazimo pojav korenin pri večih semenih in v primerjavi s kontrolnimi semeni so te tudi nekoliko daljše. Velikost poganjkov je v tej fazi rasti največja pri kontroli skupini. Iz rezultatov, prikazanih na Sliki 3, smo zaznali najdaljše poganjke pri semenih, izpostavljenih koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$, najdaljše korenine pa pri 100 $\mu\text{g/mL}$, kot prikazuje Slika 2C.

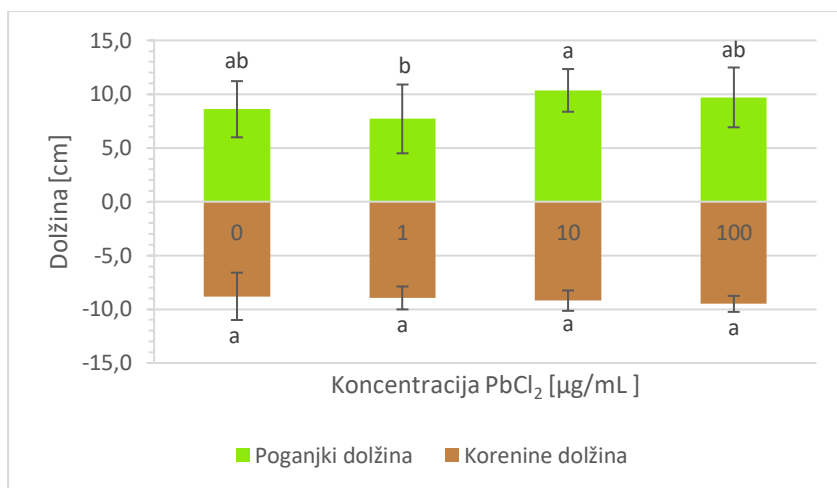


Slika 13: **A** – Priprava vertikalnih kalilnikov z različnimi koncentracijami svinčevega klorida na dan kalitve. **B** – Stanje kalitve in rasti korenin ter poganjkov po tridnevni inkubaciji v rastni komori. **C** – Rast korenin in poganjkov, izpostavljenih PbCl_2 s koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$, po sedmih dneh inkubacije.

S Slike 3 je opazno, da so rezultati dolžine poganjkov razporejeni v tri različne skupine, in sicer A, B in AB. V skupino A so uvrščeni poganjki z največjo dolžino (torej semena, izpostavljena 10 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2), v skupino B so uvrščeni poganjki z najmanjšo dolžino (torej semena, izpostavljena 1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2), v skupino AB pa so uvrščeni poganjki z vmesno dolžino, ki je večja kot v skupini B in manjša kot v skupini A. V to skupino spadajo kontrolna semena in semena, izpostavljena 100 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 .

Rezultati tako nakazujejo, da je najmanjša dolžina poganjkov prisotna pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 , sledi skupina kontrolnih semen, daljši poganjki so bili prisotni pri semenih, izpostavljenih 100 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 . Najdaljše poganjke smo zasledili pri semenih, izpostavljenih 10 $\mu\text{g/mL}$ svinčevega klorida.

Dolžine korenin niso bile razporejene v različne skupine oziroma pripadajo enotni skupini. Najkrajše korenine so bile prisotne pri kontrolni skupini, sledijo korenine semen, izpostavljenih koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 , dalje semena, izpostavljena 10 $\mu\text{g/mL}$ svinčevega klorida, največjo dolžino korenin pa so imela semena, izpostavljena največji koncentraciji PbCl_2 .



Slika 14: Dolžina poganjkov in korenin kaljenih semen, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijami PbCl₂. Prikazane so povprečne dolžine in standardni odklon.

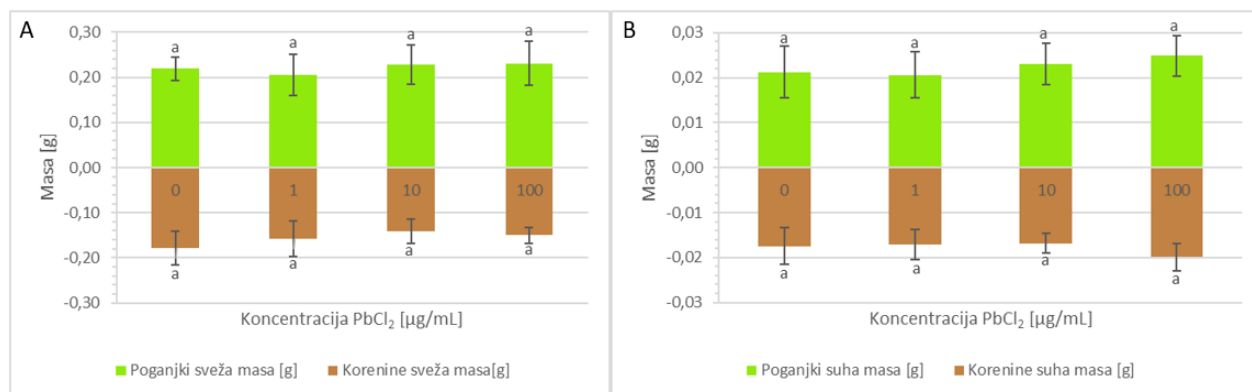
Analiza sveže in suhe mase poganjkov ter korenin

Rezultati, vidni na Sliki 4, nakazujejo, da je najmanjša sveža in suha masa poganjkov prisotna pri koncentraciji 1 µg/mL PbCl₂, sledi kontrolna skupina, nato semena, izpostavljena 10 µg/mL PbCl₂, največjo svežo in suho maso poganjkov pa smo zasledili pri semenih, izpostavljenih 100 µg/mL PbCl₂. Sveže in suhe mase poganjkov kontrolnih semen in semen, izpostavljenih svinčevemu kloridu, pripadajo enotni skupini.

Najmanjša sveža masa korenin je prisotna pri semenih, izpostavljenih PbCl₂ s koncentracijo 10 µg/mL, sledijo semena, izpostavljena 100 µg/mL. Še večjo svežo maso korenin smo zasledili pri skupini z 1 µg/mL PbCl₂, največja pa je bila prisotna pri kontrolni skupini. Sveže mase korenin vseh semen pripadajo enotni skupini, kot to prikazuje Slika 8.

Najmanjša suha masa korenin je bila opažena pri koncentraciji 10 µg/mL, sledijo semena, izpostavljena 1 µg/mL PbCl₂, nato kontrolna semena, največjo suho maso korenin pa smo zasledili pri semenih, ki so kalila v prisotnosti 100 µg/mL PbCl₂. Suhe mase korenin kontrolnih semen in vseh posameznih koncentracij PbCl₂ pripadajo enotni skupini.

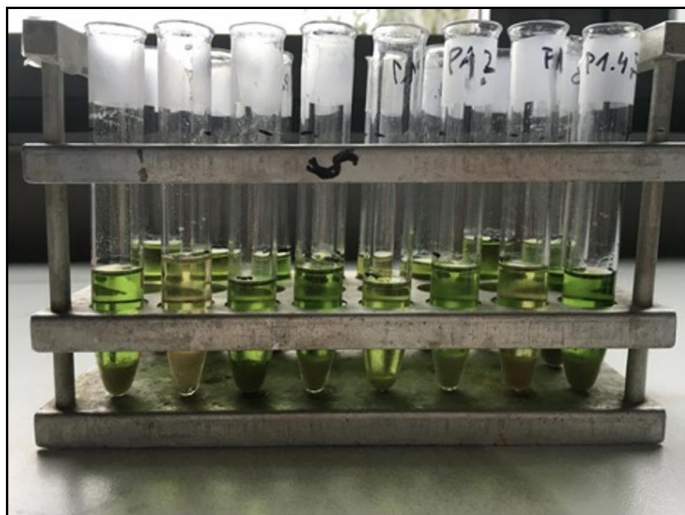
Analiza rezultatov ni pokazala statistično značilnih razlik v svežih in suhih masah korenin in poganjkov med tretmaji semen z različnimi koncentracijami svinčevega klorida ($p > 0,05$).



Slika 15: Prikaz povprečja in standardnega odklona sveže mase (A) ter suhe mase (B) korenin in poganjkov v odvisnosti od koncentracije PbCl₂. Črka »a« označuje razred povprečnih mas.

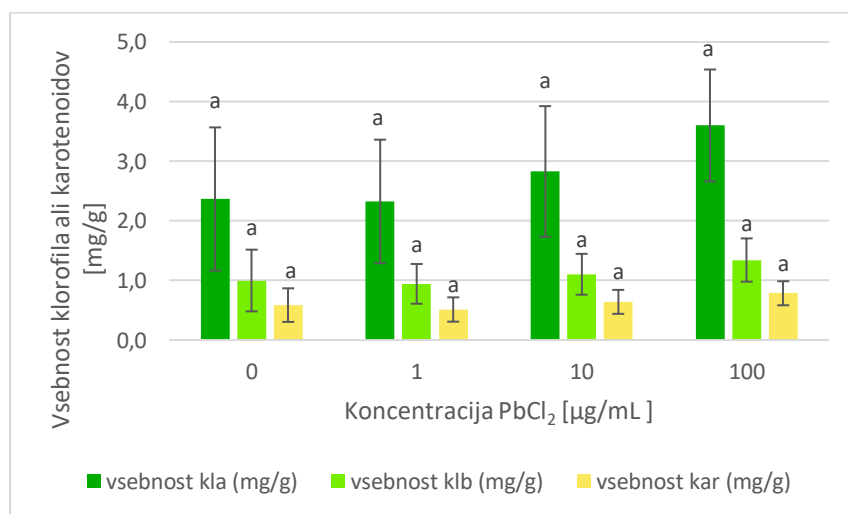
Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Že tekom priprave vzorcev za določanje vsebnosti klorofila in karotenoidov v poganjkih je bilo opaziti razliko v intenziteti zelenega oziroma zeleno-rumenega obarvanja supernatantov (Slika 5), kar nakazuje na različno koncentracijo klorofila a in b ter karotenoidov v poganjkih.



Slika 16: Prikaz razlik v intenziteti zelenega oziroma zeleno-rumenega obarvanja vzorcev, ki nakazujejo na razlike v vsebnosti klorofila a in b ter karotenoidov med vzorci.

Razlike so bile zaznane tudi pri spektrofotometrični analizi vzorcev, kot prikazujejo rezultati na Sliki 7. Nakazujejo, da je najmanjša koncentracija klorofila a in b ter karotenoidov prisotna pri semenih, izpostavljenih koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 , sledi skupina kontrolnih semen, nato semena, izpostavljena 10 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 . Največjo koncentracijo klorofila a in b ter karotenoidov smo zasledili pri semenih, izpostavljenih 100 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 , kar sovpada z rezultati mase poganjkov na Sliki 4. Tako pri koncentraciji klorofila a in b kot karotenoidih rezultati koncentracij v poganjkih kontrolnih semen in vseh posameznih koncentracij PbCl_2 pripadajo enotni skupini.



Slika 17: Prikaz masne koncentracije klorofila a in b ter karotenoidov v posušeni in liofilizirani poganjkih, izpostavljenih različnim koncentracijam PbCl_2 . Prikazane so povprečne masne koncentracije ter njihov standardni odklon.

Razprava

Zaključili smo, da PbCl_2 ni vplival na kaljivost semen, saj smo tako pri kontrolnih semenih kot pri semenih, izpostavljenih PbCl_2 , zaznali 100% kaljivost. Podobne rezultate so opisali tudi Titov et al. (1996), ki so semena ječmena izpostavili različnim koncentracijam $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Svinčev pripravek je na kalitev semen vplival šele pri koncentracijah 1000 mg/mL in več. Tako so poročali, da ima svinec pri nižjih koncentracijah vpliv le na rast in razvoj predvsem korenin ter tudi poganjkov.

Iz rezultatov (Slika2) ne moremo zaključiti, da je prisoten kakršenkoli naraščajoč ali padajoč trend dolžine poganjkov. Poganjki so vidni le pri nekaterih semenih, namreč niso še pognali pri vseh, zaradi česar bi morda bilo potrebno podaljšati čas kalitve oziroma rasti. Prav tako ni opaznih statistično značilnih razlik med skupinami semen, izpostavljenimi različnim koncentracijam svinčevega klorida, in kontrolnimi semeni.

Večje razlike lahko opazimo pri dolžinah korenin med tretmaji z različnimi koncentracijami PbCl_2 in kontrolnim poskusom, kljub temu pa tudi ti rezultati niso statistično značilni. Najmanj korenin je zraslo pri najnižji koncentraciji PbCl_2 in kontroli, številčno in dolžinsko največjo rast smo zasledili pri najvišji koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$. Razlog za nekoliko daljše korenine pri višjih koncentracijah svinca je lahko aktivacija stresnih odzivov. Aktivacija mehanizmov tolerance na stres se lahko odrazi v povečani delitvi koreninskih apikalnih celic (Yang et al. 2000). Vendar pa so Titov et al. (1996) v svoji študiji pokazali, da ima PbCl_2 statistično značilen negativen vpliv na rast korenin. Testirali so vpliv koncentracij v rangi od 0 do 1000 mg/mL, pri čemer so vse zavirale rast, najbolj inhibitorno pa je delovala koncentracija 1000 mg/mL.

Prav tako tudi razlike v dolžini poganjkov niso statistično značilne. V povprečju so bili najmanjši poganjki pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2 , temu sledi kontrola. Razlike med 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$ so minimalne, vendar so v povprečju poganjki nekoliko večji pri 10 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati kažejo, da ima manjša koncentracija (1 $\mu\text{g/mL}$ PbCl_2) inhibitoren učinek na rast poganjkov v primerjavi s kontrolo, medtem ko imata večji koncentraciji (10 in 100 $\mu\text{g/mL}$) spodbuden učinek. Podobnega učinka s povečevanjem koncentracij nismo zaznali pri dolžini korenin.

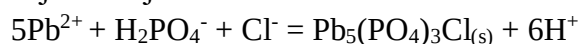
Naši rezultati ne kažejo bistvenih razlik med vplivom PbCl_2 na dolžino poganjkov in korenin. Titov et al. (1996) pa so uspeli dokazati, da je vpliv svinca na rast korenin večji kot na rast poganjkov, kar je smiselno, saj se svinčevi ioni iz prsti oziroma vode absorbirajo preko korenin, njihov prehod do višjih delov rastline pa je do neke mere omejen z obrambnimi mehanizmi rastlin.

Na samo rast in posledično dolžino korenin ter poganjkov bi lahko vplivala tudi postavitev semen. Nekatera semena so bila namreč na črno površino položena tako, da je del semen z zasnovno za korenine gledal navzgor namesto navzdol (Slika3). To sicer ne vpliva na smer rasti korenin in poganjkov, vendar pa morajo ti za doseganje pravilne orientacije zrasti še za dolžino stranice semena, šele nato pa se lahko razraščajo.

Ker je sta sveža in suha masa povezani z rastjo in dolžino korenin in poganjkov, nas ne preseneča, da tudi pri teh meritvah ni prišlo do bistvenih razlik med različnimi koncentracijami PbCl₂.

Rezultati meritev vsebnosti klorofila a in b ter karotenoidov kažejo, da koncentracija 1 µg/mL PbCl₂ deluje nekoliko inhibitorno na sintezo vseh pigmentov v primerjavi s kontrolo, medtem ko sta koncentraciji 10 in 100 µg/mL PbCl₂ delovali rahlo spodbudno. Karotenoidi imajo poleg delovanja v fotosistemi v rastlini tudi vlogo antioksidantov. Ob stresu se poveča koncentracija prostih kisikovih radikalov, ki celicam škodijo, zato se rastlina s povečanim izražanjem karotenoidov zaščiti (de Pascale et al. 2001; Huchzermeyer & Koyro 2005). A so Arshad et al. (2017) prišli do drugačnih zaključkov. Ječmen so izpostavili 100 in 200 µM PbSO₄, pri čemer so ugotovili, da so poganjki kontrolnih semen vsebovali večje količine klorofila a in b kot poganjki semen, izpostavljenih PbSO₄. Pri tem je bilo najmanj pigmentov prisotnih pri poganjkih, izpostavljenih PbSO₄ s koncentracijo 200 µM.

Verjetno je razlog za ne reprezentativne in z literaturo neskladne rezultate nizka dostopnost svinčevih ionov za rastline. PbCl₂ v vodi tvori Pb²⁺ in Cl⁻ ione, ki so rastlini dobro dostopni. Vendar pa v poskusu nismo uporabili le vode, ampak Hoaglandovo raztopino, ki poleg različnih hranilnih snovi vsebuje tudi KH₂PO₄. Ta v raztopini tvori H₂PO₄⁻ ione, ki reagirajo s svinčevimi ioni v naslednji reakciji:



Nastane svinčev klorofosfat, ki v vodni raztopini pri sobni temperaturi ni dobro topen. Posledično tako vezan svinec za rastlino ni dostopen (Miretzky and Fernandez-Cirelli, 2017). Sklepamo, da rastline tretirane s svinčevim kloridom niso privzele dovolj svinčevih ionov, da bi se kazal vpliv na njihovo rast.

Poleg tega je lahko razlog za drugačne rezultate od omenjenih študij tudi različen čas rasti in različne koncentracije svinčevih ionov. Arshad et al. (2017) so rastline gojili 58 dni, mi pa le 7 dni. Če bi bile rastline večje bi lahko poleg pigmentov tudi samo dolžino in maso natančneje izmerili. Poleg tega smo dolžine merili na samo 0,5cm natančno, kar se pri majhnih dolžinah lahko odraža v velikih napakah. Ni pa nujno, da je to edini razlog za drugačne rezultate. Sorte testiranega ječmena pri raziskavah Arshad et al. (2017) ter Titov et al. (1996) niso bile enake kot naša. Te sorte so morda bolj občutljive na svinec in so zato kazale statistično značilne rezultate.

Zaključki

Rezultati so pokazali, da izbrane koncentracije svinčevega klorida nimajo statistično značilnega vpliva na kaljivost semen, dolžino poganjkov in korenin ter na svežo in suho maso, kar je ovrglo našo prvotno hipotezo. Neskladnost rezultatov s hipotezo je bila prisotna tudi merjenju fotosinteznih pigmentov. Razlike pri vseh meritvah med semeni, izpostavljenimi različnim koncentracijam svinčevega klorida, so majhne, zato ne moremo trditi, da imajo različne koncentracije svinčevega klorida inhibitorni ali spodbujevalni učinek na merjene lastnosti ječmena. Za bolj informativne rezultate bi bilo potrebno poskus ponoviti, tokrat z

vodno raztopino brez fosfatnih hranil, z večjim številom semen različnih sort, daljšo dobo rasti in večjim razponom oziroma višjo maksimalno koncentracijo svinčevega klorida.

Literatura

- Arshad T, Maqbool N, Javed F, et al (2017) Enhancing the defensive mechanism of lead affected barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes by exogenously applied salicylic acid. *J Agric Sci* 9, 2: 139-146. <https://doi.org/10.5539/jaz.v9n2p139>
- de Pascale, S., Maggio, A., Fogliano, V., Ambrosino, P., & Ritieni, A. (2001). Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *Horticultural and Science Biotechnology*, 76, 447-453. <https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511392>
- Huchzermeyer, B., & Koyro, H. W. (2005). Salt and drought stress effects on photosynthesis. In M. Pessarakli (Ed.), *Handbook of plant and crop stress* (2nd ed., pp. 751-778). Marcel Dekker Inc., New York, USA. <https://doi.org/10.1201/9781420027877.ch39>
- Miretzky Patricia, Fernandez Cirelli Alicia (2008) Phosphates for Pb immobilization in soils: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8 1610-3653. <https://doi.org/10.1007/s10311-007-0133-y>
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, et al (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 213: 113-136. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4
- Sethy SK, Ghosh S (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med* 4, 2: 272-275. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>
- Titov AF, Talanova VV, Boeva NP (1996) Growth responses of barley and wheat seedlings to lead and cadmium. *Biol Plant* 38: 431. <https://doi.org/10.1007/BF02896675>
- Yang, Y. Y., Jung, J. Y., Song, W. Y., Suh, H. S., & Lee, Y. (2000) Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology*, 124, 1019-1026. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1019>
- Yang Y, Wei X, Lu J, et al (2010) Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 73, 8: 1982-1987. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.041>
- Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M., ... Anjum, M. Z. (2019). Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management*, 250, 109557. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109557

VPLIV TITANOVEGA DIOKSIDA (TiO₂) NA RAST JEČMENA

Avtorji: Bor Bokalj, Amadej Jelenčič, Alenka Novak, Nika Zabret

Izvleček

Namen dela je bil preveriti vpliv nanodelcev TiO₂ na rast ječmena in koncentracijo fotosinteznih pigmentov v poganjkih ječmena. Pričakujemo, da bo dodatek nanodelcev TiO₂ v hranilno raztopino med kalitvijo semen negativno vplival na rast ječmena in znižal koncentracijo pigmentov v poganjkih. Kalice ječmena smo 7 dni gojili v rastni komori ob prisotnosti hranilne raztopine in nanodelcev TiO₂. Ločili smo poganjke od korenin ter jih stehali in posušili. Iz poganjkov smo z acetonom ekstrahirali fotosintezne pigmente in spektrofotometrično določili absorbanco iz katere smo preračunali koncentracije klorofila a in b ter karotenoidov. Dodatek nanodelcev TiO₂ je imel značilen vpliv na svežo maso korenin ječmena, povešale so se koncentracije klorofila a in b, na ostale opazovane parametre pa ni bilo vpliva. V naši raziskavi smo pokazali, da nanodelci TiO₂ nimajo negativnega vpliva na rast ječmena.

Ključne besede: ječmen, seme, titanov dioksid, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Titanov dioksid (TiO₂) je zaradi svojih lastnosti (bela barva, motnost in kemična inertnost) v industriji pogosto uporabljen kot pigment v proizvodih, kot so razne barve, papir, plastika ipd. Uporablja se tudi v kozmetični industriji kot komponenta v sončnih kremah in zobnih pastah. Za ta namen se porabi večina svetovno dostopnega titana. TiO₂ se ne da reciklirati, saj je v končni produkt vključen na tak način, da ga s trenutno tehnologijo ne moremo ločiti od njega. TiO₂ je načeloma neškodljiv za zdravje ljudi, obstaja pa možnost, da so nanodelci strupeni za nekatere vrste vodnih in kopenskih organizmov. V okolje se sprošča vedno več nanodelcev TiO₂, zaradi izpustov odpadkov iz industrije ter uporabe tehnologije nanodelcev v kmetijstvu za gnojenje in pesticide. Vpliv nanodelcev na okolje zaenkrat še ni dobro raziskan, v prihodnosti se lahko pokaže škodljivost nabiranja nanodelcev TiO₂ v okolju (Woodruff in sod., 2017). V dosedanjih študijah so zabeležili različne vplive nanodelcev TiO₂ na rastline, od spodbujanja rasti korenin in poganjkov ter povečanega delovanja antioksidativnih encimov (Abdel Latef in sod., 2018; Gohari in sod., 2020) do zaviranja rasti korenin in poganjkov ter znižanja koncentracije fotosinteznih pigmentov (Doğaroğlu in Köleli, 2017).

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je žito iz skupine Poaceae (trave). Za rižem, pšenico in koruzo je žito s četrtem največjim pridelkom na svetu. Je enoletnica s pokončnim stebлом in malo listi. Največ se uporablja za živalsko krmo in pridelavo piva, prisoten pa je tudi v človeški prehrani in medicinskih izdelkih (Encyclopædia Britannica 2020). Zaradi lastnosti, kot so diploidnost, majhno število kromosomov, velikost rastlin, enostavnost križanja in možnost gojenja v različnih podnebnih pogojih predstavlja ječmen odlično rastlinsko vrsto za genetske in druge raziskave (Saisho in Takeda 2011).

Namen našega eksperimenta je bil podrobneje določiti okoljski učinek nanodelcev TiO_2 ter njihov vpliv na rast in razvoj rastlin. Preizkusili smo učinek dodatka različnih koncentracij nanodelcev TiO_2 semenom ječmena in odkrivali vplive na rast poganjkov in korenin ter vsebnost rastlinskih pigmentov. S pomočjo spektrofotometrije smo izmerili koncentracije klorofila a in b ter karotenoidov v 7 dni starih poganjkih ječmena. Predpostavili smo naslednji hipotezi: (i) dodatek nanodelcev TiO_2 k semenom ječmena bo upočasnil rast poganjkov in korenin in (ii) z višanjem koncentracije nanodelcev TiO_2 se bo nižala koncentracija klorofila a in b ter karotenoidov v poganjkih ječmena.

Metode in materiali

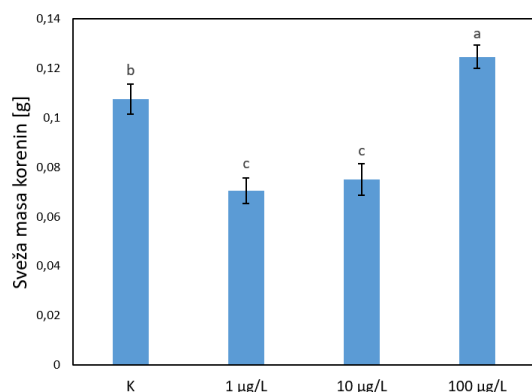
V Hoaglandovi hranilni raztopini smo pripravili založne raztopine nanodelcev TiO_2 s koncentracijami 1, 10 in 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Za kontrolo smo uporabili Hoaglandovo hranilno raztopino. Pripravili smo vertikalne kalilnike, v spodnjo polovico smo položili plast pene, čeznjo filter papir in list papirja črne barve za lažje opazovanje rasti korenin. Na sredino kalilnika smo s pomočjo lepilnega traku v vrsto razporedili 10 semen ječmena, plast pene pa nasičili z ustrezno predhodno pripravljeno raztopino nanodelcev TiO_2 . Kalilnike smo postavili v rastno komoro s stalnimi pogoji 23 °C, 60 % vlago in 16/8 urno fotoperiodo. Po sedmih dneh smo zaključili kalitev semen iz kalilnika in ločili poganjke od korenin. Izmerili smo njihove dolžine in določili svežo maso. Nato smo korenine in poganjke sušili 24 h pri 105 °C ter določili še suho maso. Poganjke smo homogenizirali v terilnici in ekstrahirali rastlinske pigmente v 5 mL 80 % acetona. Meja detekcije fotosinteznih pigmentov je >15 mg suhe mase, zato smo po potrebi vzorce istih koncentracij združili. Vzorce smo čez noč shranili v hladilniku, naslednji dan smo premešali in centrifugirali, da so se posedli večji delci, nato pa spektrofotometrično določili absorbanco pri valovnih dolžinah 664, 647 in 470 nm. Koncentracijo pigmentov smo določili po Monni s sod. 2001. Pridobljene rezultate smo statistično obdelali v programu R. Primerjali smo povprečja parametrov med različnimi koncentracijami nanodelcev TiO_2 z analizo variance (ANOVA). Parametre, ki so imeli statistično različna povprečja med različnimi obravnavami, smo dodatno analizirali z Duncanovim post hoc testom pri $p < 0,05$.

Rezultati

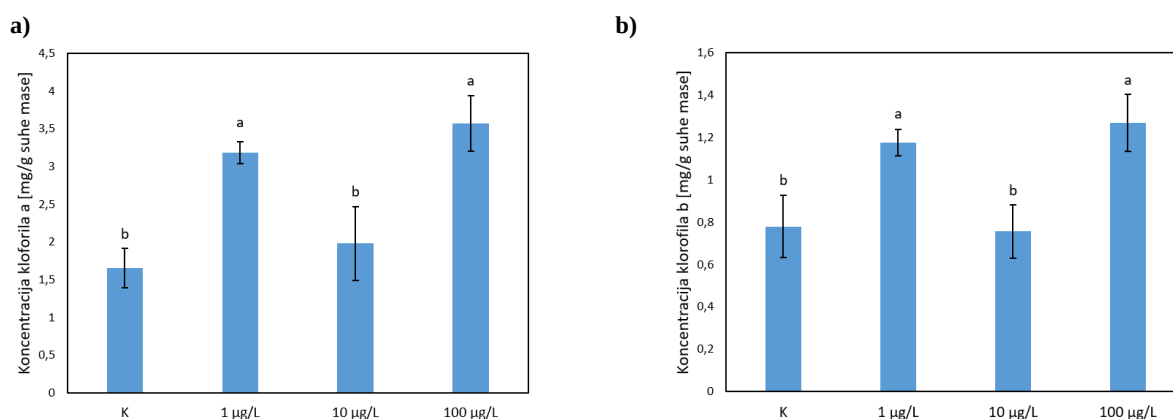
Statistična analiza je pokazala, da dodatek testiranih koncentracij nanodelcev TiO_2 na parametre rasti ječmena ni imel statistično značilnega vpliva. Rezultati meritev dolžine poganjkov in korenin, njihove sveže in suhe mase so kljub dodatku nanodelcev TiO_2 ostali primerljivi s kontrolnimi vrednostmi. Do statistično značilne razlike je prišlo le pri meritvah sveže mase korenin ječmena (slika 1), kjer so se mase korenin kalic, zrastle iz semen namočenih v raztopine nanodelcev TiO_2 s koncentracijama 1 in 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, zmanjšale, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pa povečale v primerjavi s kontrolo.

Meritve absorbanco iz posušenih poganjkov ekstrahiranih fotosinteznih pigmentov klorofila a in b ter karotenoidov smo statistično analizirali. Analiza je pokazala, da se koncentracija tako klorofila a (slika 2a) kot klorofila b (slika 2b) statistično poveša pri poganjkih iz semen, ki so bila namočena v raztopino nanodelcev TiO_2 s koncentracijo 1 in 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, pri koncentraciji 10

$\mu\text{g L}^{-1}$ pa je koncentracija klorofilov a in b primerljiva s kontrolo. Dodatek nanodelcev TiO_2 v raztopino za kalitev semen ječmena ni imel statistično značilnega vpliva na koncentracijo karotenoidov v poganjkih.



Slika 1: Sveža masa korenin ječmena iz semen namočenih v hranilno raztopino (K) ter hranilno raztopino z dodatkom različnih koncentracij nanodelcev TiO_2 . Prikazane so poprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=10$). Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize s Duncanovim post hoc testom pri $p<0,05$.



Slika 2: Koncentracija klorofila a (a) in klorofila b (b) v poganjkih ječmena iz semen namočenih v hranljivo raztopino (K) ter hranilno raztopino z dodatkom različnih koncentracij nanodelcev TiO_2 . Prikazane so poprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n=4$). Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize s Duncanovim post hoc testom pri $p<0,05$.

Razprava

Poganjke in korenine, ki so zrastle iz semen ječmena, ki so kalila v kalilnikih ob dodatku Hoaglandove hranilne raztopine in nanodelcev TiO_2 (1, 10 in 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), smo stehali, izmerili dolžino ter odčitali koncentracijo fotosinteznih pigmentov. Rezultati meritev dolžine poganjkov in korenin niso pokazali statistično značilnih razlik med kontrolo in dodatkom TiO_2 . Tudi na svežo in suho maso korenin in poganjkov dodatek TiO_2 ni imel statistično značilnega vpliva, razen pri sveži masi korenin, ki se je v primerjavi s kontrolo znižala pri 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, nato pa povečala pri koncentraciji 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ nanodelcev TiO_2 . Podobne rezultate so zabeležili že v predhodnih študijah fitotoksičnosti TiO_2 pri ječmenu, čeprav so uporabili koncentracije TiO_2 do 1000 mg L^{-1} (Doğaroğlu in Köleli, 2017; Kořenková in sod, 2017).

Vredno je omeniti, da se nanodelci pri dovolj velikih koncentracijah začnejo združevati v aglomerate, kar lahko vpliva na njihovo delovanje (Cox in sod., 2017). To lahko pojasni velike razlike v nekaterih značilnostih, ki se zgodijo pri večjih koncentracijah. Ta pojav lahko na primer razloži zmanjšanje genotoksičnosti pri večjih koncentracijah TiO_2 v članku Ghosh in sod. (2010) in povečanje sveže mase korenin pri najvišji koncentraciji v našem eksperimentu v primerjavi z nižjimi. Vsekakor je aglomeracija pojav, na katerega bodo morali biti raziskovalci še posebej pozorni v nadaljnjih študijah na tem področju.

Meritev fotosinteznih pigmentov je pogosta metoda za merjenje stresa in strupenosti pri rastlinah, zato smo izmerili koncentracijo klorofila a in b ter karotenoidov v poganjkih ječmena. Koncentraciji klorofila a in b sta se pri dodatku $1 \mu\text{g L}^{-1}$ in $10 \mu\text{g L}^{-1}$ nanodelcev TiO_2 povešali skoraj dvakrat, pri koncentraciji $10 \mu\text{g L}^{-1}$ nanodelcev TiO_2 pa ni bilo statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo. Nihanje vrednosti koncentracije klorofila je lahko posledica neustrezne priprave raztopin nanodelcev TiO_2 , kjer je lahko prišlo do združevanja delcev v večje agregate, ki so izničili učinek TiO_2 na fotosintezno aktivnost poganjkov ječmena. V primeru, da bi bil TiO_2 fitotoksičen, bi morale koncentracije klorofila padati, kar sta s študijo pokazala Doğaroğlu in Köleli (2017), kjer so opazili trend nižanja vrednosti klorofila z višanjem koncentracije TiO_2 do 80 mg L^{-1} , vendar je pri nekaterih vmesnih koncentracijah TiO_2 koncentracija klorofila ostala primerljiva s kontrolo. Pri študiji Kořenková in sod. (2017) pa dodatek TiO_2 v koncentracijah do 1000 mg L^{-1} ni imel statistično značilnega vpliva na koncentracijo klorofila. Rezultati naše raziskave so pokazali, da na koncentracijo karotenoidov dodatek nanodelcev TiO_2 v preučevanih koncentracijah ni imel statistično značilnega vpliva. Za natančnejše ugotavljanje učinkov TiO_2 na vsebnost rastlinskih pigmentov bi morali uporabiti večje število rastlin in višje koncentracije TiO_2 , saj v literaturi navajajo koncentracije TiO_2 v zemlji do 500 mg kg^{-1} (Simonin in sod., 2017).

Zaključki

Po primerjavi dodatka različnih koncentracij nanodelcev TiO_2 v hranilno raztopino za kalitev semen ječmena in kontrole lahko ovržemo našo prvo hipotezo, da bo dodatek nanodelcev TiO_2 upočasnil rast poganjkov in korenin ječmena. Statistično značilen vpliv so imeli nanodelci TiO_2 le na svežo maso korenin, ki se je pri nizkih koncentracijah zmanjšala, pri najvišji koncentraciji nanodelcev pa se je povečala v primerjavi s kontrolo. Pri dolžini poganjkov in korenin ter njihovi suhi masi ni bilo zaznati statistično značilnih razlik. Tudi hipotezo, da bo višanje koncentracije nanodelcev TiO_2 znižalo koncentracijo klorofila a in b ter karotenoidov lahko ovržemo, saj se je koncentracija klorofila a in b v poganjkih v nasprotju s pričakovanji skoraj dvakrat povešala v primerjavi s kontrolo, na koncentracijo karotenoidov pa nanodelci niso imeli statistično značilnega vpliva. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da namakanje semen ječmena v raztopini TiO_2 nima negativnih vplivov na kaljivost, rast ali razvoj ječmena. Menimo, da bi bile potrebne nadaljnje raziskave na večjem številu semen z višjimi koncentracijami TiO_2 ter na različnih rastlinskih vrstah, da bi lahko podrobneje preučili vpliv nanodelcev na okolje.

Literatura

- Abdel Latef AAH, Srivastava AK, El-sadek MSA, et al (2018) Titanium Dioxide Nanoparticles Improve Growth and Enhance Tolerance of Broad Bean Plants under Saline Soil Conditions. *L Degrad Dev* 29:1065–1073. <https://doi.org/10.1002/ldr.2780>
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi S, Sharma N (2017) Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiol. Biochem.* 110:33–49
- Doğaroğlu Z G, Köleli N (2017) TiO₂ and ZnO Nanoparticles Toxicity in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *CLEAN - Soil, Air, Water* 45:1700096. <https://doi.org/10.1002/clen.201700096>
- Encyclopædia Britannica (2020) barley | Description, Nutrition, Uses & Facts | Britannica. In: *Encycl. Br. inc.* <https://www.britannica.com/plant/barley-cereal>. Accessed 20 May 2021
- Ghosh M, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2010) Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81:1253–1262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.022>
- Gohari G, Mohammadi A, Akbari A, et al (2020) Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Sci Rep* 10:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57794-1>
- Kopittke PM, Gianoncelli A, Kourousias G, et al (2017) Alleviation of Al toxicity by Si Is associated with the formation of Al–Si complexes in root tissues of sorghum. *Front Plant Sci* 8:2189. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02189>
- Kořenková L, Šebesta M, Urik M, et al (2017) Physiological response of culture media-grown barley (*Hordeum vulgare* L.) to titanium oxide nanoparticles. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 67(4), 285–291 <https://doi.org/10.1080/09064710.2016.1267255>
- Monni S, Uglih C, Junttila O, et al (2001) Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environmental Pollution*, 112 (3): 417–426. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00139-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00139-1)
- Saisho D, Takeda K (2011) Barley: Emergence as a new research material of crop science. *Plant Cell Physiol.* 52:724–727
- Simonin M, Martins J M F, Le Roux X, et al (2017) Toxicity of TiO₂ nanoparticles on soil nitrification at environmentally relevant concentrations: Lack of classical dose–response relationships. *Nanotoxicology*, 11(2), 247–255 <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1290845>
- Woodruff LG, Bedinger GM, Piatak NM (2017) Titanium. In: Schulz KJ, DeYoung JHJ, Seal RRI, Bradley DC (eds) *Critical mineral resources of the United States—Economic and environmental geology and prospects for future supply: U.S. Geological Survey Professional Paper 1802*. U.S. Geological Survey, Reston, VA, pp T1–T23

VPLIV UMETNEGA GNOJILA NA RAST JEČMENA

Avtorji: Tihomir Anžur, Eva Koplan, Mojca Skrbinek, Rebeka Udvarc

Izvleček

Namen raziskave je bil preučevanje učinka umetnega gnojila na fiziološke in rastne parametre ječmena. Semena ječmena smo v kalilnikih izpostavili različnim koncentracijam gnojila. Vpliv koncentracij gnojila smo preverjali z merjenjem dolžine poganjkov in korenin, njihovo svežo in suho maso ter vsebnostjo klorofila v poganjkih. Ugotovili smo, da izbrane koncentracije gnojil v primerjavi s kontrolo niso vplivale na dolžino poganjkov in korenin ter na njihove mase. Prav tako nismo dobili opaznih statističnih razlik rezultatov pri vsebnosti klorofila a, b in karotenoidov.

Ključne besede: ječmen, seme, umetno gnojilo, kalitev, rast in razvoj, rastline

Uvod

Eden izmed globalnih problemov je prekomerna uporaba gnojil, bogatih s fosforjem, kalijem in dušikom. Ti elementi so sestavni deli mikro- in makrohranil, snovi, ki rastlinam omogočajo rast, v primeru prekomerne uporabe pa povzročijo prevelik razrast mikroorganizmov in evtrofikacije v stoječih ali počasi tekočih vodnih teles. Tako lahko pride do cvetenja vode oz. namnoževanja cianobakterij, ki prerastejo površino vodnega telesa, čez čas pa začnejo hitro odmirati. Takrat pričnejo saprofitske bakterije mrtvo maso razgrajevati, pri tem pa intenzivno porabljajo kisik. Tekom razrasti cianobakterij in njihove razgradnje nastajajo tudi škodljivi metaboliti, ki pa onemogočajo rast drugih organizmov, vodni ekosistemi pa se še dodatno zastrupijo (Heisler in sod., 2008; Moss, 2008).

Omenjeni procesi lahko predstavljajo problem tudi pri delovanju rastlinskih čistilnih naprav, saj se le-te zanašajo na pravilno delovanje mikrobov in rastlin. Glavni delež čiščenja prispevajo aerobne in anaerobne bakterije z adsorpcijo, mineralizacijo ter aerobno in anaerobno razgradnjo, manjši del pa rastline z vezavo mineralnih snovi (npr. fosfatov, nitratov) ter mnogih strupenih snovi v rastlinska tkiva (Individualna RCN postavitev — Strukturni skladi EU v Sloveniji - EU Structural funds and Cohesion Fund in Slovenia).

Namen naše naloge je bil raziskati, kako gnojilo vpliva na modelno rastlino - ječmen. Ta je dokaj občutljiv na onesnažila in se ne uporablja kot del rastlinskih čistilnih naprav, vseeno pa lahko služi kot modelna rastlina za testiranje, kako lahko nanj vpliva količina gnojil, ki se pojavljajo v odpadni vodi.

Predpostavili smo, da bo gnojilo vplivalo na rastne faktorje in fiziološke parametre ječmena ter, da bo pri največji koncentraciji gnojila rast poganjkov in korenin največja, pri najmanjši pa ne bo sprememb v primerjavi s kontrolo.

Metode in materiali

Za modelno rastlino smo izbrali ječmen (*Hordeum vulgare*) in naredili 4 poskuse kaljivosti. Prvi poskus je predstavljal kontrolo, kjer smo uporabili hranilno raztopino, ostali trije pa hranilno raztopino z različnimi koncentracijami umetnega gnojila 100 ug/ml; 10 ug/ml in 1 ug/ml.

Raztopine

- a) Za kontrolo smo uporabili hranilno raztopino - 100 ml polovične Hoaglandove raztopine, ki vsebuje mineralna hranila in omogoča optimalno rast ječmena.
- b) Različne koncentracije učinkovin - najprej smo pripravili založno raztopino tako, da smo v 100 ml hranilne raztopine odpipetirali 100 µl gnojila in dobro premešali (koncentracija gnojila v raztopini je bila 100 µg/ml). Nato smo od založne raztopine odpipetirali 10 ml in jo zmešali z 90 ml hranilne raztopine, premešali in tako dobili 10x redčitev (koncentracija gnojila v raztopini je bila 10 µg/ml). Tudi od tu smo odvzeli 10 ml in jo dodali k 90 ml hranilne raztopine, premešali in tako dobili 100x redčitev (koncentracija gnojila v raztopini je bila 1 ug/ml).

Vzeli smo 4 kalilnike s peno in črnim papirjem, ki smo ju dobro omočili s pripravljenimi tekočinami in pri tem pazili, da je bilo tekočine toliko, da še ni odtekala. V vsak kalilnik smo vstavili po 10 semen. Kalilnike smo inkubirali v rastni komori pri 23°C in 16 urni fotoperiodi naslednjih 7 dni, vmes pa smo merili dolžine korenin in poganjkov ter po potrebi zalivali.

Po 7 dneh smo poskus podrli in z ravnilom izmerili dolžino korenin in poganjkov. Korenine in poganjke smo nato ločili od semena, jih po dva skupaj stehali in jim tako določili svežo maso. Iz vsakega poskusa smo torej dobili rezultate posebej za korenine in poganjke v obliki petih vrednosti.

Korenine smo nato sušili 24 ur v dehidratorju pri temperaturi 105°C. Poganjke pa smo liofilizirali 48 ur na - 90°C in v vakuumu (0,001 mbar). Tako smo določili še suho maso poganjkov in korenin.

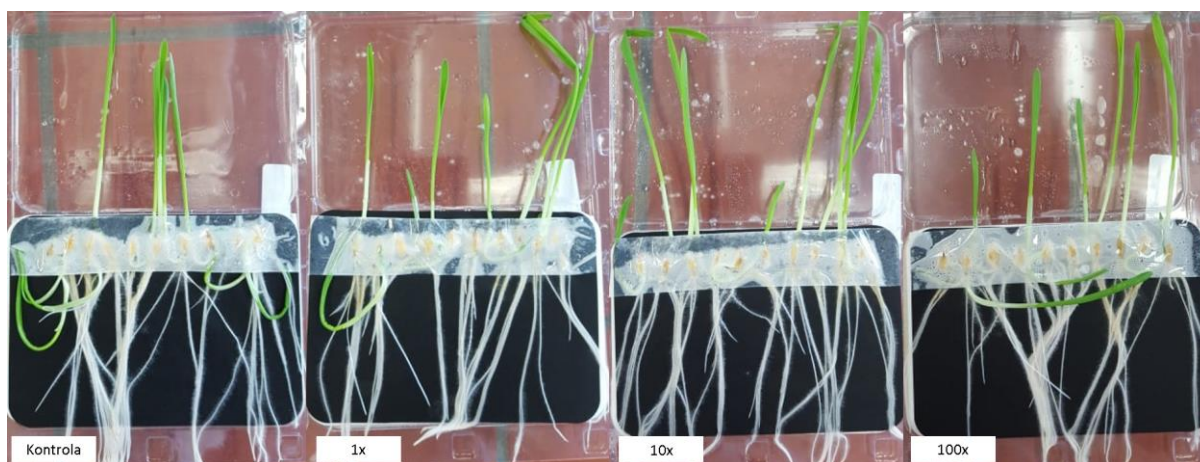
Za določanje klorofila v poganjkih, smo le-tega izolirali z mečkanjem poganjkov v terilnici z acetonom do homogene zmesi. Vsak vzorec s končnim volumnom 5 ml smo shranili v ločenih epruvetah ter jih dobro premešali na vorteksu. Ekstrakcija klorofila je potekala 24 ur pri temperaturi 4°C.

Naslednji dan smo preverili, ali imajo vsi vzorci končni volumen 5 ml in v primerih nižjega volumna dolili aceton. Vzorce smo nato centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto. aceton, v primeru, da je aceton izhlapel, dolili do 5 ml, vorteksirali ter centrifugirali vse vzorce. Nato smo s fotospektrometrom izmerili absorbance pri valovnih dolžinah: 664 nm, 647 nm in 470 nm za določanje vsebnosti barvil.

Dobljene podatke smo nato statistično obdelali v programu Excel ter s statističnim orodjem XLSTAT izvedli analizo variance (ANOVA). Primerjali smo povprečja parametrov med zrni, tretiranimi z različnimi raztopinami gnojil.

Rezultati

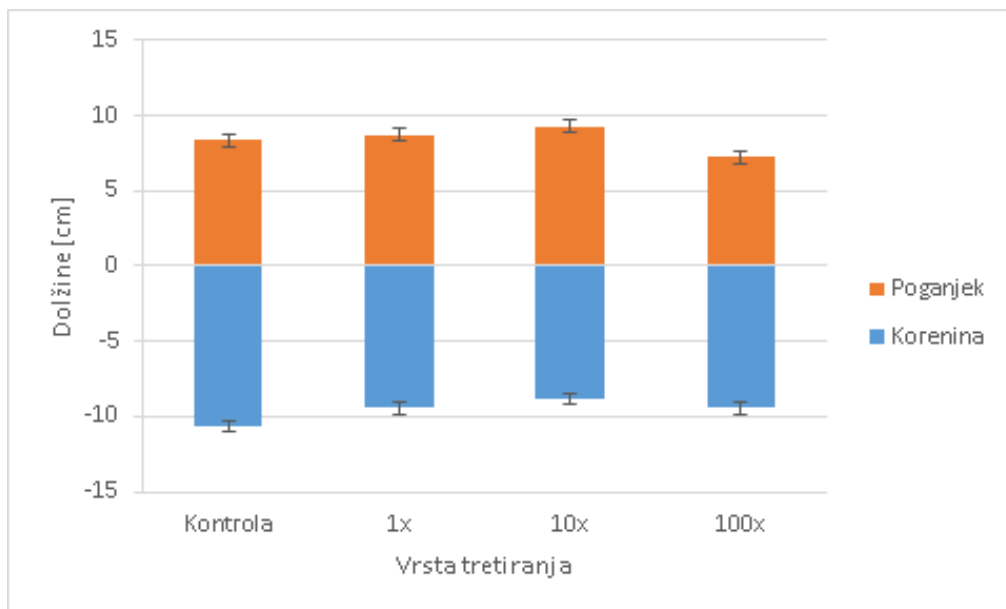
Semena ječmena so v kalilniku po sedmih dneh skalila in pognala poganjke ter korenine.



Slika 1: Sedem dni stare rastline v kalilniku. Kontrola je bila omočena s hranilno raztopino, ostali trije pa hranilno raztopino z različnimi koncentracijami umetnega gnojila 100 ug/ml (1-kratna redčitev); 10 ug/ml (10-kratna redčitev) in 1 ug/ml (100-kratna redčitev).

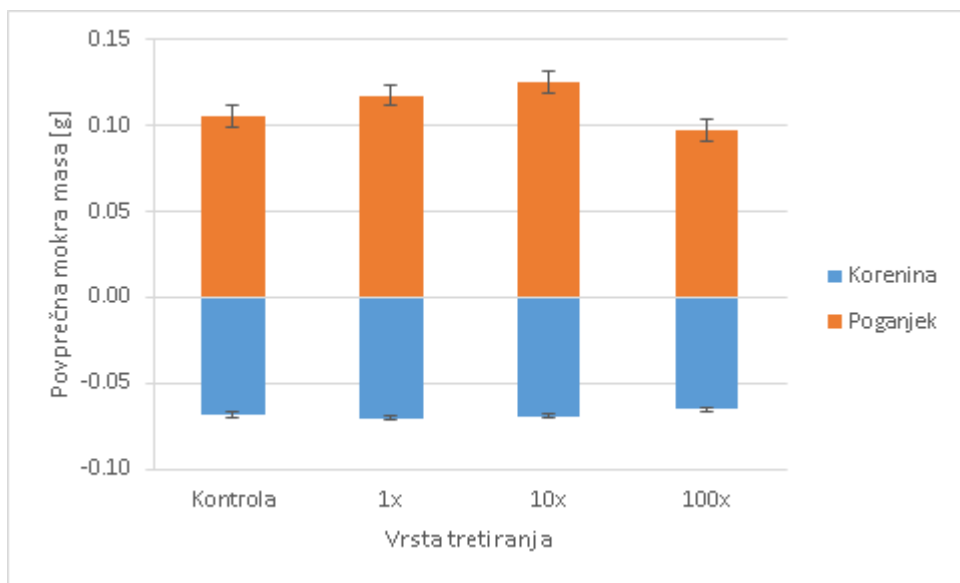
Na Sliki 1 je razvidno, da je z izjemo poskusa, kjer smo preverjali 10-kratno redčitev gnojila (koncentracija 10 ug/ml), skalilo vseh deset semen, pri omenjeni redčitvi pa devet. Nekaljivost ni posledica tretiranja z raztopino, morda je bilo seme poškodovano.

Rastlinam smo najprej izmerili dolžino poganjkov in korenin ter opazili, da se le-te med poskusi zelo malo razlikujejo (Slika 2).



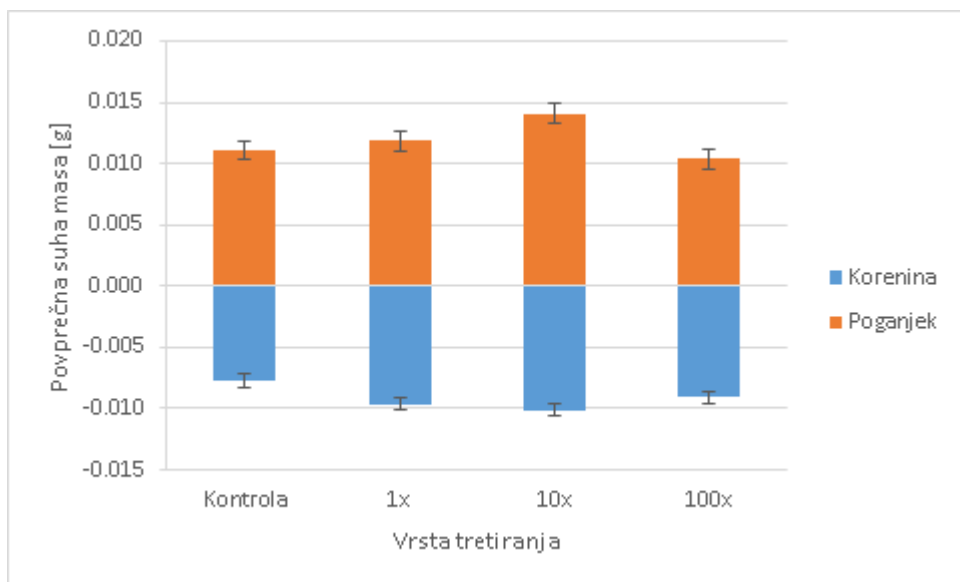
Slika 2: Vrstični diagram prikazuje dolžino poganjkov in korenin v centimetrih po tretiranju s hranilno raztopino (kontrola) oziroma različnimi koncentracijami gnojil.

Korenine in poganjke smo nato ločili od semena, jih po dva skupaj stehtali in jim tako določili svežo maso (Slika 3).



Slika 3: Vrstični diagram prikazuje povprečno mokro maso enega poganjka oziroma korenine po tretiranju z različnimi raztopinami.

Korenine smo nato sušili v dehidratorju, poganjke liofilizirali ter določili še njihovo suho maso (Slika 4).



Slika 4: Vrstični diagram prikazuje povprečno suho maso enega poganjka oziroma korenine po tretiranju z različnimi raztopinami.

Pri statistični analizi sveže in suhe mase korenin in poganjkov so rezultati pokazali, da ni prišlo do statistično značilne razlike med kontrolo in ostalimi poskusi. Prav tako ni bilo opaznih statističnih razlik v vsebnosti klorofila a, b in karotenoidov. Dobljene vrednosti p so bile mnogo večje od želene ($p < 0,05$), ki jo potrebujemo za izvedbo Duncanovega post hoc testa. Program za analizo je na podlagi dobljenega rezultata vse meritve uvrstil v enako skupino, saj med njimi

ni ugotovil razlike. Iz istih razlogov ni bilo možno določiti niti EC50, koncentracije, ki izzove učinek, enak polovici maksimalnega učinka.

Razprava

Po analizi rezultatov smo ugotovili, da tretiranje rastlin z različnimi koncentracijami gnojil pri nobeni od koncentracij ni vplivalo na dolžino korenin in višino poganjkov, prav tako se ni spremenila njihova masa. Analiza meritev sveže mase korenin in poganjkov nam ni pokazala statistično značilnih razlik med tretiranimi rastlinami in kontrolo. Analiza suhe mase, izmerjene po sušenju korenin in liofilizaciji poganjkov, prav tako ni pokazala statistično značilnih razlik med rastlinami, tretiranimi z različnimi koncentracijami gnojila. Prav tako ni bilo opaznih statističnih razlik pri vsebnosti klorofila a, b in karotenoidov.

Koncentracija gnojila, ki jo priporoča proizvajalec, je 10 ml/l enkrat mesečno. Ob predpostavki, da je 1 mg = 1 ml gnojila, so bile naše uporabljene koncentracije 1 ml/l, 10 ml/l in 100 ml/l. Najvišja uporabljena koncentracija je 10-krat višja od koncentracije, priporočene s strani proizvajalca, vpliva na rast ječmena pa vseeno nismo zaznali. Razlog za to je lahko dejstvo, da ko seme kali, le to vsebuje potrebne hranilne snovi za prvi teden življenja, dokler ne razvije pravih listov, začne fotosintetizirati ter dokler ne razvije koreninskega sistema ter začne črpati hranilnih snovi iz tal.

Rezultati se ujemajo z odkritji raziskave Alama in Haidera (2006), ki sta z merjenjem skupne suhe mase poganjkov ječmena, tretiranimi z različnimi koncentracijami gnojila, ugotovila, da dane koncentracije ne vplivajo na rast rastlin v zgodnjih fazah, do razlik pa je prišlo v kasnejših fazah. Za preučevanje učinka gnojila na rast ječmena bi morali zato podaljšati trajanje poskusa in opazovati vpliv gnojila skozi daljše časovno obdobje, saj bi lahko do vpliva gnojila na rast ječmena prišlo šele po določenem času izpostavljenosti določeni koncentraciji gnojila. Lahko bi preverili tudi, kako se rastlina odzove na različne koncentracije gnojila v posameznih ontogeneznih fazah (embriogeneza, juvenilna faza, odrasla vegetativna faza, reproduktivna faza).

Drugi razlog, da v času trajanja poskusa ni prišlo do opaznih vplivov na fiziološke in rastne parametre ječmena, pa je lahko tudi to, da so rastline rasle v hranilni raztopini, ki je očitno pokrila vse potrebe mladih rastlin po hranilih, zato vpliva gnojila ni bilo izraženega. Tudi sama regulacija transporterjev za mineralna hranila je pogojena s tkivno koncentracijo določenih elementov – če jih je v tkivih dovolj, ni signala za ekspresijo dodatnih transporterjev na membranah, zato tudi privzem ostane na neki nizki ravni in rast ostane optimalna pri vseh koncentracijah, kot se je verjetno zgodilo tudi v našem primeru. Če bi prišlo do pomanjkanja nekega elementa, bi prišlo do signala za ekspresijo proteinov tistega določenega transporterja, posledično bi jih rastlina na membrani naredila več in začela več privzemati, s tem bi se spremenila tudi rast. Zato bi bilo morda smiselno preveriti, kakšna bi bila rast ječmena v raztopinah različnih koncentracij gnojila v vodi, namesto v hranilni raztopini.

Zaključki

V raziskavi smo preverili vpliv koncentracij umetnega gnojila na kaljivost semen in na rast poganjkov ter korenin ječmena. Za natančnejšo določanje vpliva gnojila na fiziološke parametre smo izmerili še vsebnost rastlinskih barvil v poganjkih. Statistična obdelava podatkov je pokazala, da tretiranje z gnojilom signifikantno ne vpliva na kalitev in zgodnji razvoj rastlin ječmena, čeprav smo zaznali manjša odstopanja v absolutnih vrednostih meritev. Da bi dobili statistično bolj podprte podatke, bi za nadaljnje poskuse uporabili večje število vzorcev in izvedli več vzporednih poskusov ter tako zagotovili potrebne biološke in tehnične ponovitve.

Literatura

Alam M.Z., Haider S.A. 2006. Growth attributes of barley (*hordeum vulgare l.*) cultivars in relation to different doses of nitrogen fertilizer, Journal of Life and Earth Sciences, 1, 2: 77–82

Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M., Anderson D.M., Cochlan W., Dennison W.C., Dortch Q., Gobler C.J., Heil C.A., Humphries E., Lewitus A., Magnien R., Marshall H.G., Sellner K., Stockwell D.A., Stoecker D.K., Suddleson M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. Harmful Algae, 8, 1: 3–13

Individualna RCN postavitev — Strukturni skladi EU v Sloveniji - EU Structural funds and Cohesion Fund in Slovenia. <http://www.eu-skladi.si/kohezija-do-2013/ostalo/gradiva1/individualna-rcn-postavitev.pdf/view> (17. maj 2021)

Moss B. 2008, February 12. Water pollution by agriculture. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences Royal Society