

Metoda pro stanovení toxicity pro reprodukci u *Daphnia magna*

Metoda C.20 dle přílohy směrnice 2001/59/ES



Daphnia magna jako modelový organismus

Ke zkoušce se používá druh *Daphnia magna* Straus (1820), neboli hrotnatka velká (vodní blecha)

Říše *Animalia* (živočichové) – Kmen *Arthropoda* (členovci) – třída *Branchiopoda* (lupenonožci) – řád *Cladocera* (perloočky) – čeleď *Daphniidae* (hrotnatkovití) – rod *Daphnia* (hrotnatka)

- 3 – 5 mm dlouhý, převážně planktonický sladkovodní živočich
- dospívají během 6 - 10 dní, množí se partenogeneticky, životnost až 56 dní při 20°C

Podstata metody

Mladé samičí dafnie se exponují zkoušené látce

Zkouška trvá 21 dní

Nedospělí jedinci pocházející z dospělých dafnií, které uhynuly se vyloučí

Reprodukční schopnost exponovaných organismů se porovná s kontrolní skupinou

Testovací organismy

Daphnia magna Straus (1820)

Identifikace klonu nejlépe uvedením genotypu

Musí pocházet ze zdravé kultury

Zásobní kultura se musí chovat v podmínkách
podobných zkoušce

Zkušební médium

Eleandtova média M4 a M7, popř. jiná validní

Doporučuje se stanovit celkový organický uhlík (TOC)
- v médiu (před přidáním řas) by TOC měl být nižší než 2mg/l

M4 a M7 se nedoporučují pro testy látek obsahující kovy -> jiné média

Rozpuštěný O_2 > 3mg/l, pH mezi 6 a 9 (± 1.5)

Obnovování zkušebního média

Častost obnovy závisí na stálosti zkoušené látky,
alespoň však 3x týdně

Při nestálosti koncentrace zkoušené látky by mělo být
zváženo častější obnovování média nebo
průtoková zkouška

Informace o zkoušené látce

Zdroj informací jsou výsledky zkoušky akutní toxicity

Nutná je spolehlivá analytická metoda kvantitativního stanovení látky ve zkoušených roztocích

Strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle,
rozpuštěnost a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti

Zkušební roztok a zkušební koncentrace

ZR se připravuje ředěním zásobního roztoku, který se připravuje nejlépe rozpuštěním látky ve zkuš. médiu

Někdy použití rozpouštědel a dispergátorů (aceton, methanol, ethanol; Cremophor RH40, HCO-40)

Rozpouštědla a dispersanty do 0.1ml/l, lépe je nepoužívat

Zkušební roztok a zkušební koncentrace II

Zkušební koncentrace se připravuje alespoň v pěti variantách s faktorem <3,2 (geometr. řada)

$$C_n = C_0 * q^n \quad n = 1,2,3,\dots$$

Rozptyl koncentrací se nastavuje podle cíle testu:

- LOEC/NOEC
- EC_x

Nepoužívá se koncentrace se stat. významným účinkem na přežití dospělců -> toxicita pro reprodukci a mortalitu

Uspořádání zkoušky

Expozice se rozvrhuje pro jednotlivé zkušební nádoby

Poté náhodný přístup k obsluze nádob

Při ovlivnění počátečními nebo okolními podmínkami,
by mělo být zvaženo jiné uspořádání zkoušky
(blok)

Podmínky expozice

- Nasazování organismů
- Počet organismů
- Krmení
- Další aspekty chovu

Nasazování a počet organismů

Po jednom organismu do nádob s 50 – 100 ml média

U semistatických zkoušek jednotlivě pro každou koncentraci 10 organismů

U průtokových zkoušek se navrhuje jiné uspořádání
- po skupinách

Krmení

Nejlépe denně, avšak alespoň třikrát týdně

Živé buňky řas jednoho nebo více druhů:

Chlorella sp., *Pseudokirchneriella subcapitata*,
Scenedesmus subspicatus

Stačí dodávat 0.1 – 0.2 mg C/dafnie za den

Při určení potřebného množství stravy zástupným ukazatelem se tvoří nomogram

Další aspekty chovu

Osvětlení – 16 hod. s intenzitou do 15 - 20 μ E/m²s

Teplota – 18 – 22°C, ne však kolísání o více jak 2°C

Provdzušňování – nesmí se provzdušňovat

Kontrolní skupina

Nasazuje se jedna série kontrolních skupin pro kontrolu zkušebního média

Dle potřeby – jedna série kontrolních skupin obsahujících rozpouštědlo nebo dispergátor

Potomstvo, mortalita a další parametry

Potomstvo se nejlépe každý den vybírá a počítá

Mortalita matečných organismů se zaznamenává současně s počítáním potomstva

Je možno zároveň pozorovat a měřit i jiné účinky, než je samotná reprodukce.

- měření délky matečných organismů na konci zk.
- doba narození prvních plůdků
- velikost a počet potomků jednoho organismu
- počet potracených plůdků,...

Četnost měření

Jednou týdně: O₂, teplota, tvrdost a pH v médiu, kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

U statické koncentrace zkoumané látky ($\pm 20\%$) se měří nejvyšší a nejnižší hodnoty na začátku při přípravě a při obnovování vzorku

Při zkouškách s nepředpokládanou statickou koncentrací se analyzují všechny koncentrace ihned po jejich přípravě a při obnovování