

Test s dafniemi

Test akutní toxicity na Daphnia magna dle ČSN EN ISO 6341 (1997)

Michal Dymák

Veronika Navrátilová

2010

Podstata testu

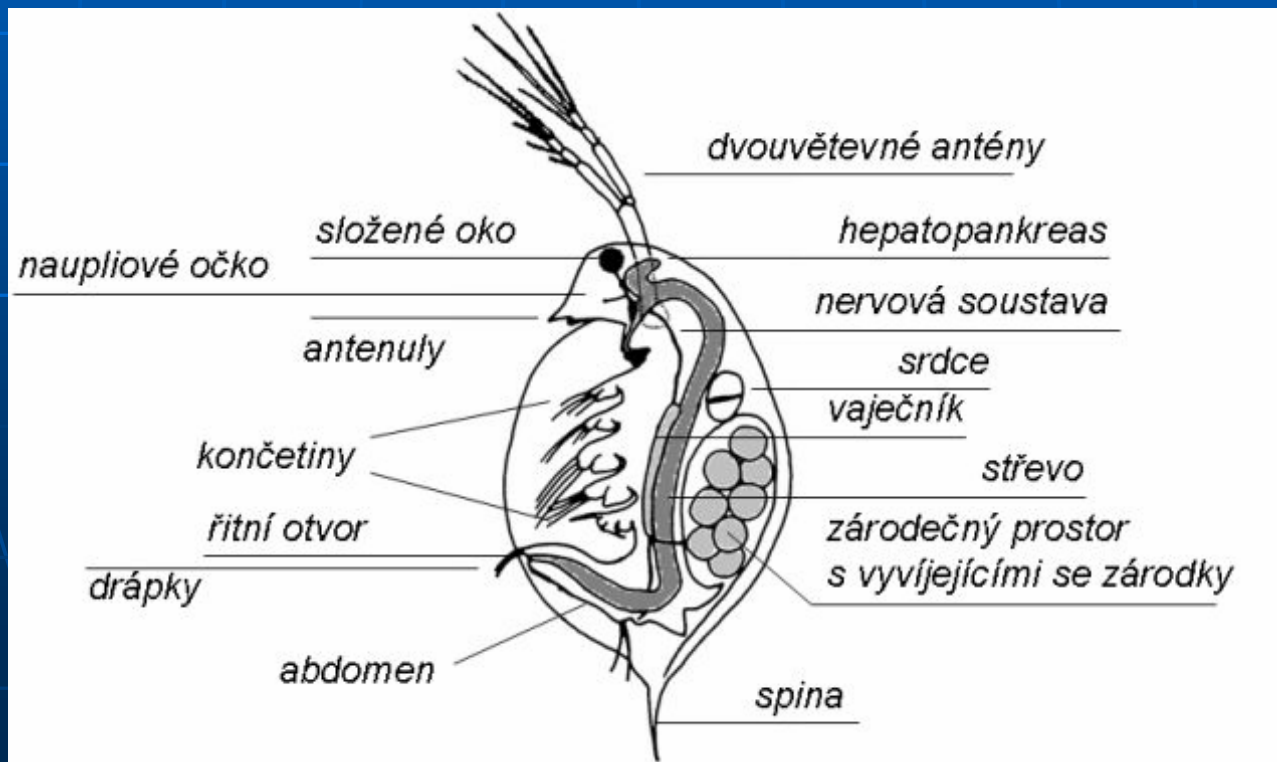
- Zjišťuje se počáteční koncentrace účinné látky, která za 24/48 hodin zimobilizuje 50% testovaných jedinců
 - 24h -> 24h EC50
 - 48h -> 48h EC50

Podmínky zkoušky

- Tma nebo fotoperioda 16h světlo/8h tma
- Látky podléhající rozkladu na světle
– testovat ve tmě
- Teplota $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Bez toxických výparů či prachu ovlivňujících průběh testu

Testovací organismus

- *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea)
- Dafnie je vodní korýš
- Je to konzument



Daphnia magna Strauss



Testovací organismus

- Matečný chov krmíme 1x denně mikroskopickou řasou
- Do testu nasazujeme jedince mladší 24 hodin
- V předstihu (2-3 dny) odlovíme gravidní samice do samostatné nádrže
- Po vylíhnutí sítkou lovíme narozené jedince a nasazujeme ihned do testu

Testovací organismus

- Většinou se udržuje chov a mladí jedinci se používají na testování
- Případně je možné komerčně získat tzv. daphtoxkit obsahující tzv. efipia což jsou zvláštní chitinová pouzdra uzavírající zimní vajíčka - jedná se tedy o dormantní stádia perlooček

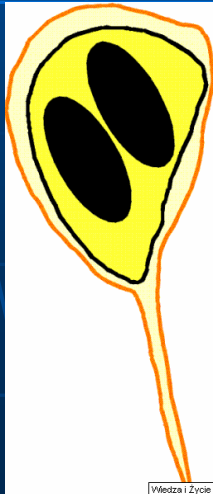
Testovací organismus



Kultura
mikroskopických
řas - krmivo



daphtoxkit



efipium

Použití testu pro testování:

- Rozpustných chemických látek
- Průmyslových odpadních vod
- Povrchových či podzemních vod
- Výluhů zemin, sedimentů odpadů a dalších matric

Ředící voda - médium

- Používáno během testu jako médium pro perloočky
- Definované složení
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11,76 g/l
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,93 g/l
 - NaHCO_3 2,59 g/l
 - KCl 0,23 g/l
- Každou navážku rozpustíme v 1l destilované vody
- pH roztoku $7,8 \pm 0,2$

Ředící voda - médium

- Z každého ze 4 zásobních roztoků odebereme 25ml a doplníme destilovanou vodou na 1l
- Před použitím v testu provzdušňujeme do nasycení
- pH média $7,8 \pm 0,2$

Zpracování vzorku - odběr

- Odběrovou nádobu zcela naplnit
- Provést test nejdéle 6 hodin po odběru
- Pokud nelze dodržet 6h interval, ihned po odběru zchladit na 4°C případně zamrazit na - 20°C a zpracovat do 48h

Zpracování vzorku – předúprava vzorku

- Rozpustíme známé množství vzorku v určeném objemu rozpouštědla
- Rozpouštědlo nejčastěji destilovaná voda
- Nádoby z inertního materiálu

Samotné testování

- Smícháme definované množství roztoku odpadu s definovaným množstvím ředící vody
- Roztok odpadu se dávkuje do série nádob ve zvyšujícím se množství – koncentrační řada

Baňka č.	Koncentrace v %
1	100
2	50
3	25
4	12,5
5	6,25

Samotné testování

- Do každé nádoby 20 jedinců – minimálně 2 ml roztoku na jedince
- Negativní kontrola – stejné podmínky avšak místo roztoku odpadu je přidána destilovaná voda

Samotné testování

- Během testu se organismy nekrmí
- Po 24/48 h se spočítají imobilizovaní jedinci
- Imobilizovaný jedinec je takový, který se po poklepání do 15s nerozplave i když např. hýbe antenami

Ověřování citlivosti

- Pravidelně se chov testuje na citlivost referenčním toxikantem $K_2Cr_2O_7$
- Průběh stejný jako normální test avšak místo vzorku je přítomen dichroman v koncentrační řadě

Určení EC50

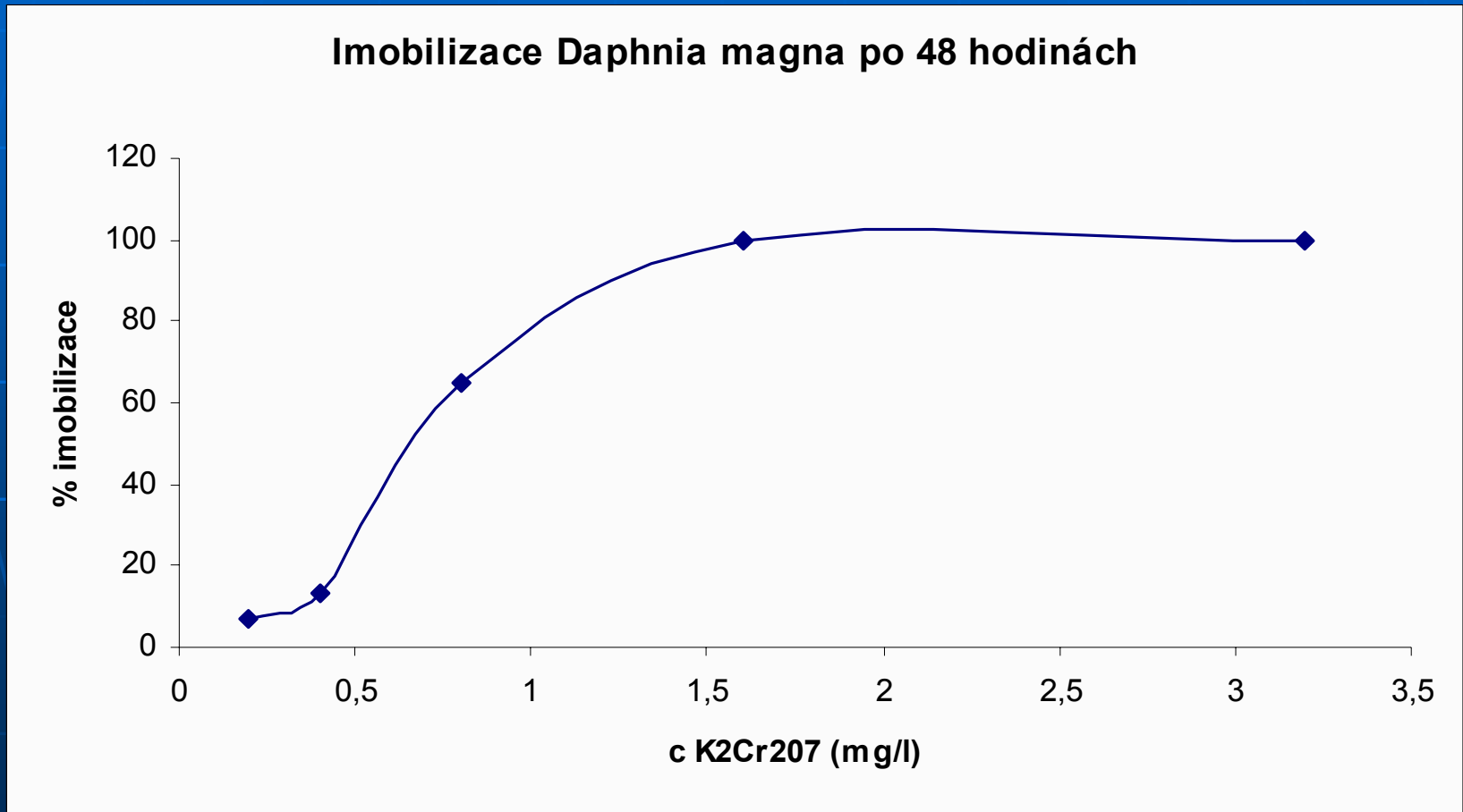
- Spočítáme počty imobilizovaných jedinců pro každou koncentraci
- Data zaznamenáme do tabulky

Určení EC50

	kontrola		0,2 mg/l		0,4 mg/l		0,8 mg/l		1,6 mg/l		3,2 mg/l	
expozice (h)	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
A	0	0	0	0	0	1	1	2	4	5	5	5
B	0	1	0	0	0	0	1	1	4	5	5	5
C	0	0	0	1	0	1	1	5	4	5	5	5
D							2	5				
Celkem	0	1	0	1	0	2	5	13	12	15	15	15
% efekt	0	6,67	0	6,67	0	13,33	25	65	80	100	100	100

Z tabulky vytvoříme bodový graf

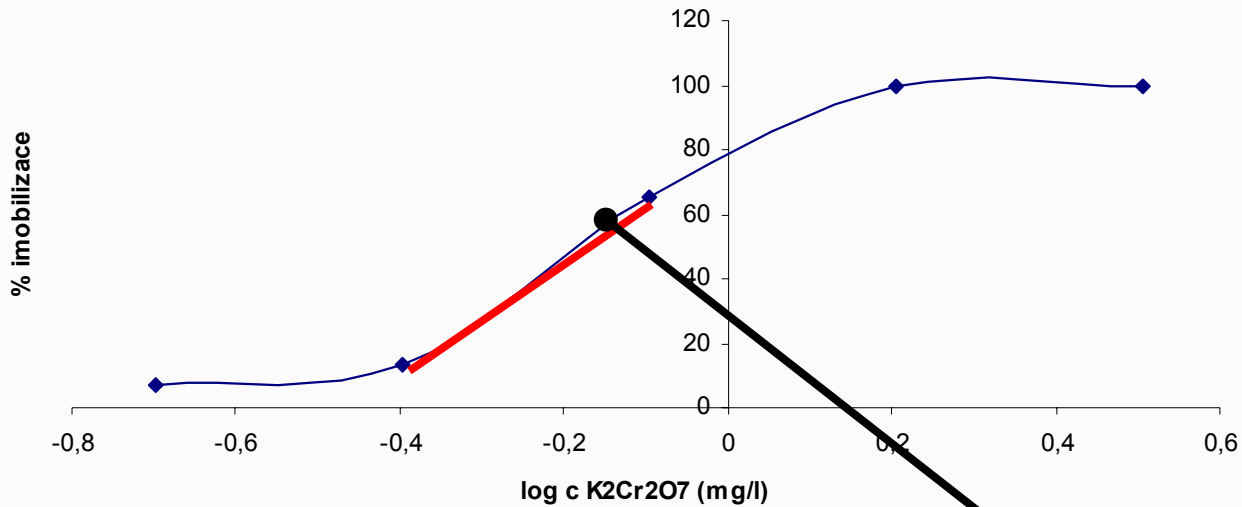
Určení EC50



křivku zlogaritmuje...

Určení EC50

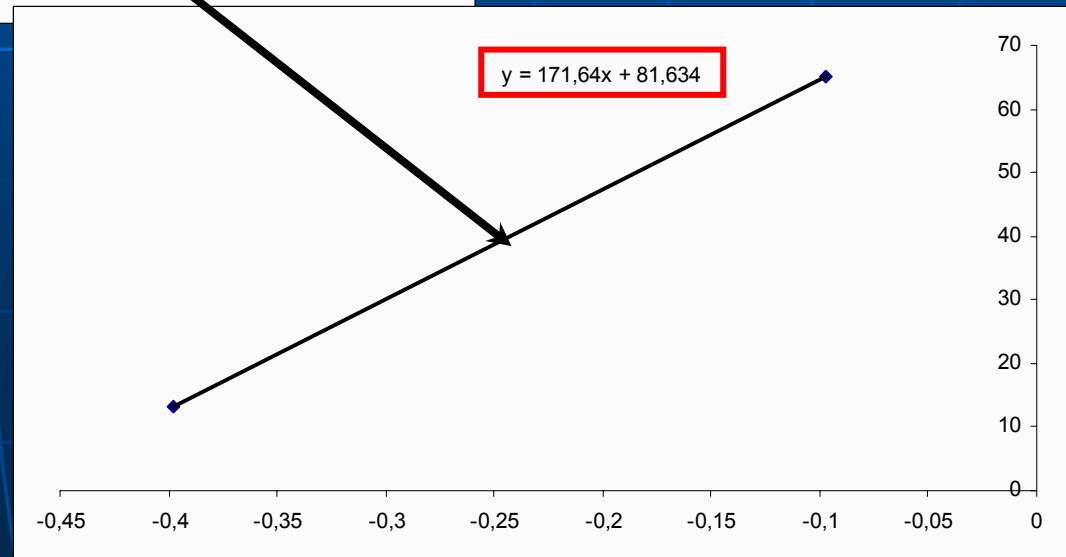
logaritmovaná křivka imobilizace Daphnia magna po 48 hodinách



$$y = 171,64x + 81,634$$

$$\text{EC50} = (50 - 81,634) / 171,64$$

$$\text{EC50 (48h)} = 0,65 \text{ mg/l}$$



Validita výsledků

- Koncentrace O_2 nesmí po celou dobu experimentu klesnout pod 80 % (min 2 mg/l)
- Povolená maximální mortalita kontroly je 10 %.
- Test probíhá při stálé teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



Díky za pozornost!