

ČSN EN 28692

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas

Scenedesmus subspicatus a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989)



Ing. Miroslav Plotěný

ČSN EN 28692

- **Přijata organizací CEN v roce 1993.**
- **Určuje metodu stanovení toxických účinků chemických sloučenin na růst planktonních sladkovodních řas.**
- **Podstata spočívá v inhibici růstu jednodruhového řasového kmene, kultivovaného v přesně stanovených podmínkách v koncentrační řadě zkoušené látky.**

ČSN EN 28692

Potřebné roztoky:

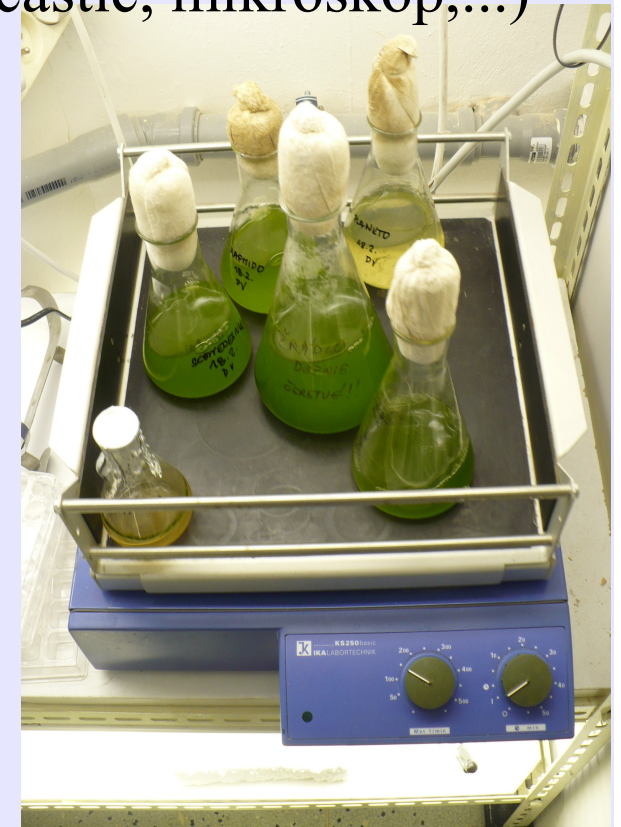
- Zkušební organismus – planktoní zelené řasy *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum*
- Voda – u živného substrátu a roztoku zkoušených látek se používá deionizovaná voda nebo voda obdobné jakosti.
- Živiny a jejich roztoky – 4 zásobní roztoky dle daných koncentrací chemických látek jakosti p.a. daných normou, které jsou nutné sterilizovat membránovou filtrací nebo v autoklávu (4. roztok ale nelze)
...

Pozn.: Nutno dávat pozor na znečištění organickými a anorganickými látkami během přípravy a skladování. Vyvarovat se zařízením obsahující měď.

ČSN EN 28692

Přístroje a pomůcky:

- Klimatizovaný box nebo přizpůsobená místnost (zářivka, neměnné podmínky,...)
- Přístroje pro měření množství buněk řas (počítač částic, mikroskop,...)
- Filtrační aparát pro membránové filtry 0,2 μm
- Kultivační nádoby (Erlmjayrovy baňky 250ml, zátky propouštějící vzduch)
- Autokláv
- pH-metr



ČSN EN 28692

Postup zkoušky:

- **Zásobní roztok živin** – vždy čerstvý, před použitím 30 min. provzdušňovat nebo ponechat přes noc v kontaktu se vzduchem. Pomocí hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové se pH upraví na hodnotu $8,3 \pm 0,2$.
- **Příprava inokula** – 1 díl zásobního roztoku na 8 dílů vody, který se doplní inokulační kulturou v exponenciální fázi růstu na koncentraci 10000 buněk na ml
- **Volba koncentrační řady** – dle předběžné zkoušky...
- **Příprava zásobních roztoků zkoušené látky** – roztok, který dále ředíme
- **Příprava zkušebních roztoků** – výsledný objem by měl být stejný (6x kontrola, 3x každá koncentrace)

Inkubace:

Teplota $23 \pm 2^\circ\text{C}$

Bílé světlo od 400 nm do 700 nm

Světelná intenzita od 60 do $120 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$

Lze využít Luxmetrů pak ideální rozsah od 6000 do 10000 lx.

Třepat, míchat nebo provzdušňovat – pro zajištění výměny plynů a udržení pH.

Měření:

Minimálně po 24 hod., vzorek odebrat pipetou a nevracet zpět. Ukončení nejdříve po 72 hodinách.



ČSN EN 28692

Zkouška se považuje za neplatnou když:

pH se změní o více než 1,5 jednotky

hustota buněk u kontroly se musí zvýšit minimálně 16krát za 72 hodin.

Vyjádření výsledků:

- **Vyměření růstových křivek**
- **Výpočet inhibice v procentech**
 - plocha pod růstovou křivkou $E_b C_{50}$ (integrál biomasy)
 - růstová rychlost $E_r C_{50}$
- **Určení EC_{50}**
- **Určení NOEC ($NOE_b C$, $NOE_r C$)**

ČSN EN 28692

Protokol o zkoušce:

- zkoušená látka;
- zkušební organismus (druh, původ, způsob kultivace,...);
- podrobné údaje o zkoušce (začátek a konec pokusu, teplota, pH, koncentrační řada, složení média, intenzita a jakost osvětlení, metoda měření, inkubační zařízení...);
- výsledky (hustoty buněk v každé baňce, průměrné hustoty pro koncentraci, růstové křivky, vztah mezi koncentrací a účinkem, hodnoty EC_{50} a NOEC, ostatní pozorované účinky);
- další skutečnosti významné z hlediska užitého postupu.

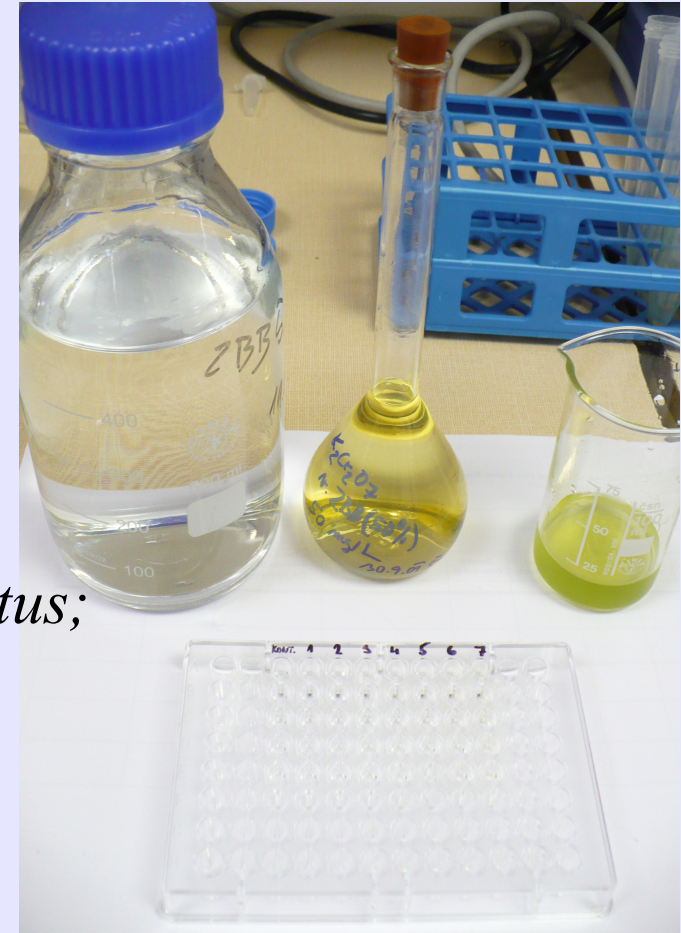
Miniaturizace – sérologické destičky

Rozměr 9x12 cm

96 jamek o objemu 0,25 ml

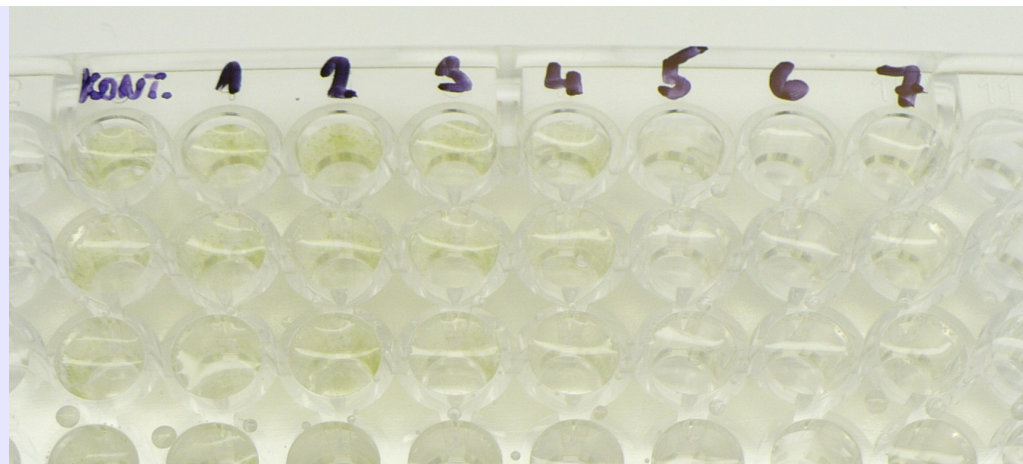
Praktická ukázka s dichromanem draselným

- koncentrační řada:
20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 a 0,3125 mg/l;
- ZBB médium sterilizované v autoklávu;
- zkušební organismus *Scenedesmus subspicatus*;
- osvětlení standardní zářivka 40 W.



$EC_{50} = 5,5 \text{ mg/l}$

$NOEC = 2,5 \text{ mg/l}$



Závislost inhibice na koncentraci dichromanu draselného

