

Jakost vod
**ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU
SLADKOVODNÍCH ŘAS**

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

ČSN
EN 28692

Materiály a činidla

◎ Planktonní sladkovodní řasy

- *Scenedesmus subspicatus* Chodat (86.81 SAG)
- *Selenastrum capricornutum* Printz (ATCC 22662 nebo CCAP 278/4)

◎ Voda

◎ Zásobní roztoky živin

- makrosložky živin
- Fe – EDTA
- stopové prvky
- NaHCO_3

Přístroje a pomůcky

- ⊙ Klimatizovaný box se stálým osvětlením bílou zářivkou
- ⊙ Přístroje pro měření množství buněk řas (spektrofotometr)
 - Přístroj musí být schopen přesně změřit nejnižší hustotu buněk 1000 v 1 ml
- ⊙ Kultivační nádoby
- ⊙ Filtrační aparát pro membránové filtry
- ⊙ Autokláv
- ⊙ pH-metr

Postup zkoušky

- Příprava zásobního roztoku živin
- Příprava inokula
 - Řasové buňky odebrané ze zásobní exponenciálně rostoucí řasové kultury + zásobní roztok živin + voda
 - Hustota buněk 10000 v 1 ml
 - 3 denní předkultivace za podmínek průběhu zkoušky
- Volba koncentrací zkoušené látky
 - Koncentrace zkoušené látky se volí v geometrické řadě [mg/l]
 - Několik (4-5) koncentračních úrovní, v rozmezí od 10% do 90% inhibice růstu kultury

Postup zkoušky

◎ Příprava zásobních roztoků zkoušené látky

- “ Roztok zkoušené látky se naředí ve vodě tak, aby vznikla série zásobních roztoků, pokrývající celý rozsah zkoušky
- “ Obvykle bez úpravy pH

◎ Příprava zkušebních roztoků

- “ Zásobní roztok zkoušené látky + voda + koncentrovaný roztok živin + inokulum
- “ Objem inokula tak, aby počáteční hustota buněk ve zkoušených roztocích byla kolem 10000 v 1 ml.

Postup zkoušky

◎ Inkubace

- “ Za stálého osvitů bílým světlem o intenzitě od $60 \mu\text{E}/(\text{m}^2.\text{s})$ do $120 \mu\text{E}/(\text{m}^2.\text{s})$ při měření v rozsahu PAR (400-700nm)
- “ 4 W – 7,3 W zářivky univerzálního bílého světla ve vzdálenosti 0,35 m od média s řasovou kulturou
- “ Řasové buňky se udržují v suspenzi třepáním, mícháním nebo provzdušňováním tak, aby byla zajištěna výměna plynů a aby se zamezilo změnám pH ve zkoušených vzorcích

◎ Měření

- “ Každých 24h v objemech 5 ml
- “ Zkouška trvá 72h
- “ Na konci zkoušky se měří pH vzorků

Kritéria platnosti

- ⦿ Zkouška se považuje za neplatnou, pokud není dosaženo podmínek:
 - Hustota buněk u kontrolního vzorku se musí zvýšit více než 16x za 72h.
 - pH v kontrolním vzorku se nemá změnit během zkoušky o více než 1,5 jednotky

Vyjadřování výsledků

◉ Vyměření růstových křivek

- hodnoty změřených hustot buněk se zaznamenávají spolu s koncentracemi zkoušené látky a dobou měření
- Pro každou koncentraci a kontrolní vzorek se sestrojí růstová křivka v podobě grafu logaritmu střední hustoty buněk v závislosti na čase.

◉ Výpočet inhibice v procentech

- Plocha pod růstovou křivkou (integrál biomasy)
- Růstová rychlost

Vyjadřování výsledků – výpočet inhibice

- Plocha A pod růstovou křivkou (integrál biomasy)

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

t_n doba n -tého měření od počátku zkoušky

N_0 počáteční hustota buněk

N_1 změřená hustota buněk v čase t_1

N_n změřená hustota buněk v čase t_n

vypočítají se střední hodnoty A pro každou koncentraci a kontrolní vzorek. Z těchto hodnot se pak vypočítá inhibice (I_{Ai}), v %, pro každou zkoušenou koncentraci ze vzorce:

$$I_{Ai} = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100$$

A_i průměrná plocha pro zkoušenou koncentraci i

A_c průměrná plocha pro kontrolní vzorek

Vyjadřování výsledků – výpočet inhibice

● Růstová rychlost

Vypočítá se růstová rychlost μ pro každou zkoušenou kulturu ze vzorce

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

kde t_n je doba posledního měření od začátku zkoušky
 N_0 jmenovitá počáteční hustota buněk
 N_n poslední naměřená hustota buněk

Alternativně se zjistí hodnota μ pro každou zkoušenou koncentraci a kontrolní vzorek. Z nich se pak vypočítá inhibice růstu $I_{\mu i}$, v procentech pro každou zkoušenou koncentraci i podle vzorce.

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

μ_i je střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i
 μ_c je střední růstový rychlost u kontrolního vzorku

Vyjadřování výsledků

○ Určení EC_{50}

- Z hodnot inhibice při dané koncentrace proti odpovídajícím koncentracím se sestaví graf
- Zkoušená koncentrace - odpovídající 50% inhibici - se vynese na logaritmické stupnici

○ Určení NOEC

Výklad výsledků

- ⊙ Hodnoty EC_5 a NOEC jsou toxikologická data, odvozená z laboratorního pokusu, provedeného za definovaných podmínek. Prokazují potenciální riziko, avšak nemohou být přímo použity pro předpověď účinků v přirozeném prostředí
- ⊙ Při jejich výkladu se přihlíží k tvaru růstových křivek.