JAKOST VOD - ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS

ISO 8692:2004

Pavla Polanská
Ivona Vychodilová

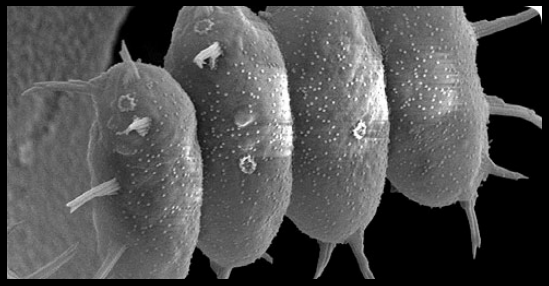
Předmět normy

- určuje metodu **stanovení inhibice růstu jednobuněčných zelených řas** látkami a směsmi obsaženými ve vodě nebo odpadní vodou

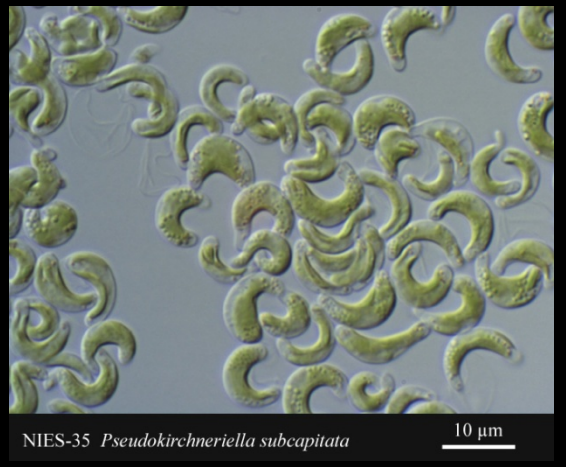
- použitelná pro látky které jsou snadno **rozpustné ve vodě**, popř. **slabě rozpustné org. a anorg. látky, těkavé sloučeniny, těžké kovy, odpadní voda** (ISO 14442, ISO 5667-16)

Zkušební organismus

- Desmodesmus subspicatus (Scenedesmus subspicatus)



- Pseudokirchneriella subcapitata (Selenastrum capricornutum)



- Scenedesmus quadricauda (ČR)

→ řád: Chlorococcales

Postup zkoušky

příprava růstového média

⇩

předkultivace inokula

⇩

příprava zkoušených a kontrolních sad

⇩

inkubace

⇩

měření

Příprava média

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku	Konečná hmotnostní koncentrace ve zkoušeném roztoku
Zásobní roztok 1: makrosložky živin	NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l	12 mg/l
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l	18 mg/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l	15 mg/l
	KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
Zásobní roztok 2: Fe-EDTA	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l	64 µg/l
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l	100 µg/l
Zásobní roztok 3: stopové prvky	H_3BO_3[a]	185 mg/l	185 µg/l
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l	415 µg/l
	$ZnCl_2$	3 mg/l	3 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l	1,5 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l	0,01 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l	7 µg/l
Zásobní roztok 4: $NaHCO_3$	$NaHCO_3$	50 g/l	50 mg/l

[a] H_3BO_3 může být rozpuštěna přidáním 0,1 mol/l NaOH.

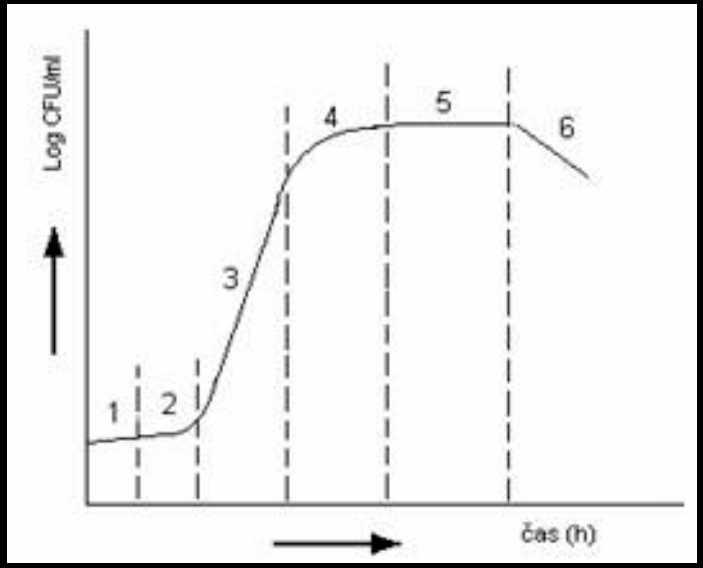
Přibližně k 500 ml vody se přidá:

- 10 ml zásobního roztoku 1 (5.3);
- 1 ml zásobního roztoku 2 (5.3);
- 1 ml zásobního roztoku 3 (5.3);
- 1 ml zásobního roztoku 4 (5.3).

Doplní se do 1 000 ml vodou.

Předkultivace inokula

- 2-5 dní před začátkem zkoušky
- dostatečně nízká hodnot buněk (udržení exponenciálního růstu)



Příprava kontrolních a zkoušených sad

- zvolit vhodné koncentrace testované látky

  (EC_x – koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek x% snížení μ ve vztahu ke kontrolním vzorkům)
- příprava zkoušeného vzorku (filtrace, neutralizace, rozpuštění nevodných vzorků)
- jednotlivé koncentrace vzorku (nejméně tři replikáty) + 6 kontrolních vzorků

- Lze provést limitní zkoušku s jedinou koncentrací k prokázání nepřítomnosti toxicity. Počet replikátů pro tuto jedinou koncentraci by měl být 6

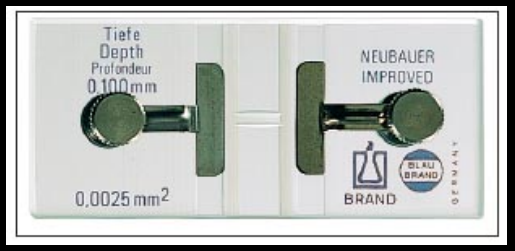
Inkubace

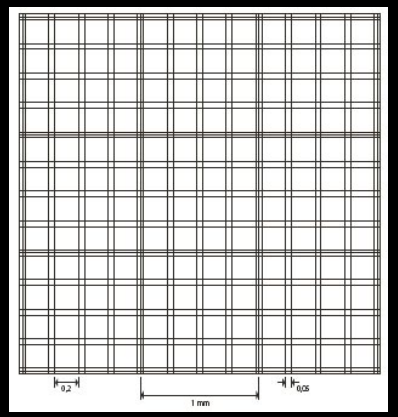
- počáteční hustota buněk by neměla přesáhnout **10^4 buněk/ml**
- inkubace při ~ 23°C
- kontinuální bílé světlo
- kontinuální třepání, míchání, nebo provzdušňování (usnadnění přestupu CO_2 ze vzduchu do média)
- dostatečné uzavření nádob

Měření

- zkouška trvá nejméně 72 hodin, každých 24 hod. se měří hustota buněk

  - počítač částic
  - **mikroskop a počítací komůrka**
  - nepřímo – fluorimetrie, turbidimetrie, fotometrie





- kontrola pH, kontrola vzhledu buněk a totožnosti testovaného org.

Výpočet

- sestavení růstové křivky pro každou zkoušenou koncentraci a kontrolu
- výpočet průměrné **specifické růstové rychlosti μ**, pro každou zkoušenou kulturu:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

kde

t_0 je doba začátku zkoušky;

t_L je doba ukončení zkoušky [nebo doba posledního měření během období exponenciálního růstu v kontrolních kulturách (9.1)];

x_0 je jmenovitá počáteční hustota buněk;

x_L je hustota buněk měřená v době t_L.

- podle střední hodnoty μ pro každou zkoušenou a kontrolní sadu replikátů se vypočítá **procentuální inhibice** ze vzorce:

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

kde

$I_{\mu i}$ je procentuální inhibice (růstová rychlost) u zkoušené koncentrace i;

μ_i je střední růstová rychlost u zkoušené koncentrace i;

μ_c je střední růstová rychlost u kontrolního vzorku.

Závěr

- regresní analýzou určíme EC_x (koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek x% snížení μ ve vztahu ke kontrolním vzorkům)

  - EC_x prokazuje potenciální riziko, ale nemůže být použita přímo pro předpověď účinku v přirozeném prostředí
- při interpretaci výsledků se bere v úvahu tvar růstových křivek (např: zpožděný nástup růstu)

Děkujeme za pozornost