



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Předúprava vzorků – koncepční úvaha

B. Maršálek



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Proč předúprava jako téma EB?

- V současné době existuje nepřehledné množství možností jak předupravit vzorek pro ekotoxikologické biotesty.
- Vždy jde o koncepční úvahu, kterou musíme náležitě zdůvodnit a zdokumentovat v protokolu testu, protože jde o významný zásah, který zásadním způsobem ovlivní výsledek a interpretovatelnost ekotoxikologických biotestů.



Důvod předúpravy vzorků

- **Odlišení typů toxikantů**, které mohou koakčně působit na testovací organismus

Separaci rušivých vlivů

- (trofie v případě producentů, ,
- vysoké „**tvrdosti**“ vody v případě dafnií,
- **separaci biomasy** cyanobakterií v surovém extraktu (pigmenty, soli a biokumulované kovy a jiné polutanty),
- čímž **zvyšujeme korelaci mezi sledovaným toxikantem a toxickým efektem na testovací organismus**



...alespoň deset příkladů:

- • **Tepelná úprava:** zahřátí, autoklávování, či převaření je významný zásah, který odstraní termolabilní toxikanty a nechá vyniknout termostabilní. Typický příklad použití je denaturace některých pesticidů, nebo odlišení hepatotoxinů od neurotoxinů při testování ekotoxicity extraktů biomasy cyanobakterií. Termolabilní neurotoxické alkaloidy jsou denaturovány při 70°C a hepatotoxické microcystiny zůstanou aktivní. Tento zásah nelze doporučit obecně, v některých vzorcích se toxicita na korýše zvýší (viz graf. Č. 1). V přírodních vzorcích například vod a sedimentů se tepelnou úpravou změní biodostupnost živin i toxikantů!



2.

- • **Změny hodnoty pH:** TIE, TRE doporučuje vyluhovat vzorky půd, sedimentů a odpadních vod jednak při pH 3, 11 a při přirozeném pH z lokality. Dále jsou doporučeny systémy extrakčních pufrů, které stejný vzorek extrahují při plynule se měnícím pH gradientu od 2 do 12. Tento postup je doporučen především při podezření z toxicity kovů a amoniaku. Pozor, extrémní hodnoty pH mohou změnit toxikologický profil mnoha pesticidů! Tato metodika je často používána v kombinaci s se stripováním, zeolity a filtrací.



- ● **Stripování, probublávání:**
- Probublávání (většinou intenzivní 1h)
- **je použitelné pro okysličení podzemních vod** (kde může docházet k úhynu konzumentů při nedostatku kyslíku), je běžně používáno při
- **odstranění amoniaku a volatilních látek.**
podezření na přítomnost tenzidů, které v průběhu stripování vytváří pěnu.



4.

- • **Thiosíran sodný:** intenzivní stripování může **zoxidovat toxické látky**, které pak mají odlišné toxikologické profily a proto je doporučeno přidávat 3-5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Vzorek je ale **nutno před biotestem kontinuálně aerovat** tak, aby byla dosažena hodnota validace testů (většinou 60% nasycení kyslíkem).



- • **EDTA** - (kys. ethylendiamintetraoctová) je používána jako dvojsodná sůl v koncentracích 200-5000 $\mu\text{g/l}$. Efekt je především na chelataci kovů, v nejvyšší uvedené koncentraci však také odstraní mikroprvky z media pro řasové testy



6.

- **Filtrace:** může zásadním způsobem změnit toxicitu.
Skleněné filtry mají tu výhodu, že **nesou použití organických rozpouštědel**, což nejde např. u nitrocelulozových.

Např. koloidní frakce, která **zůstane zachycena na filtračním papíře může představuje často 60-75% toxicity celého vzorku**. Takto si lze velmi zkreslit výsledky testů v neprospěch detekce toxicity.

Často se také zapomíná, že jednoduchým ekvivalentem oddělení pevné a kapalně fáze (což je cílem filtrace) je **centrifugace**, která zanáší do procesu přípravy vzorků méně vlivů než filtrace.



- **Sorbenty na principu zeolitů a jílových minerálů** jsou používány v metodice TRE/TIE pro odlišení a odstínění vlivů



- **SPE – extrakce pevnou fází:** nejčastěji používanou náplní kolon je C-18 silikagel (pro separaci organických molekul), ale použít lze kolony dle typu separovaných látek od sloučenin hliníku, až po XAD-7 a jim podobné náplně. Zde jsou důležité procesy **prekondiciace kolony** tak, aby chytala ty látky, které koncentrovat má a propouštěla takové látky, které potřebujeme odseparovat. Jde o využití technik analytické chemie a jejich účinnost a vhodnost pro stanovení např. toxicity biomasy cyanobakterií a **odstínění rušivých vlivů v testech toxicity**



- **Extrakce organickými rozpouštědly:** je běžné a výhodné využívat zvyklostí a postupů používaných v přípravě vzorků pro analytickou environmentální chemii, je však nutno být si vědom vlivu organického rozpouštědla na testovací organismy. Z organických rozpouštědel (metanol, etanol, aceton, oktanol, heaxanol a dalších běžných v analytické chemii) je pro ekotoxikologické biotesty nejčastěji používán dimethylsulfoxid (DMSO). Řasové testy toxicity snášejí dle našich zkušeností do 3% DMSO, korýši 5-7%, ryby 5-10% bakterie až 20% DMSO. **Blíže viz přednáška Doc. Mičiety.**



- • **Kombinace metod:** nejčastěji používaným systémem předúpravy vzorku pro ekotoxikologické biotesty je kombinace výše uvedených a dalších metod.
- pH úprava s aerací (volatilní látky, tenzidy)
- EDTA a aerace (kovy a amoniak)
- Filtrace a C-18 kolony (organické látky, biomasa sinic)
- Filtrace /centrifugace ve spojení s molekulárními sítí pro předem definované velikosti molekul
- Lyofilizace předem homogenizované biomasy sinic poskytne jiné výsledky testů toxicity, než testování zamražených vzorků biomasy
- Různé způsoby homogenizace vzorků (ultrazvuk, třepání, mletí a drcení, suchých a zmražených vzorků atd).



Způsob přípravy vzorků z přírody:

- standardní výluh dle ISO, OECD, ČSN...
100g + 1000 ml destil. Vody • 20_+3°C
24 h rotační třepačka
- separace 5µm filtrace nebo centrifugace
- direct testy
- známá koncentrace látky - s úpravou pH/bez úpravy
- frakcionace SPE C-18
- EDTA,
- Aktivní uhlí
- Extrakce do DMSO
- Extrakce do org. Rozpouštědel – koncentrace + purifikace



Zdroje variability v testech toxicity

- Způsob, doba a místo **odběru**, reprezentativnost odběrového místa, **přeprava** (teplota, vzdálenost, fixace, míchání)
- Způsob a doba **uchovávání** (teplota, světlo, těkavost, biotické a chemické interakce s matricí)
- **Příprava vzorků** (extrakce, doba a způsob skladování extraktů, způsob oddělení matrice, extrakční činidlo)
- **Příprava ředící řady**, (použitá media zvolený rozsah koncentrací)
- Použitý **testovací organismus** a jeho metabolická aktivita, stáří, zdrav. stav.
- **Experimentální design** - množství opakování, objem vzorku, pH, O₂, způsob osvětlení, krmení, těkavost, stabilita zkoumané látky v podmínkách testu světlo+ lab. Teplota - statické/průtočné
- SOP/ GLP/ akreditace
- Způsob **vyhodnocení** - zvolená expozice, endpoints,
- **Interpretace dat** - zvolená kritéria ECx TU, třídy čistoty a **uhodovatelnosti**, indexy kumulace atd.



Závěr

- Vždy jde o koncepční úvahu, kterou musíme náležitě zdůvodnit a zdokumentovat v protokolu testu, protože jde o významný zásah, který zásadním způsobem ovlivní výsledek a interpretovatelnost ekotoxikologických biotestů.
- Vše uvést do testovacího protokolu!!!(interpretace variability!!!)





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí