

Zkouška inhibice růstu řas



VYPRACOVALI:

TEREZA DVOŘÁKOVÁ
JINDŘICH ŠMÍD

Porovnáváme



- **ČSN EN 28692:** Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Senastrum capricornutum*
- **NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008:** sekce C.3. Zkouška inhibice růstu řas

Popis zkoušky



- **Cíl:** stanovit účinky látky na růst jednobuněčných zelených řas
- **Podstata zkoušky:** Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několik generací vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkoušené látky.
- Kultivace 72 hodin
- Měření hustoty buněk minimálně každých 24 hodin

Limitní zkouška



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- **Neprovádí se**

- **Koncentrace 100 mg/l nebo odpovídající rozpustnosti látky**
- **Cíl: prokázat, že EC50 je vyšší než tato koncentrace**
- **Minimálně 3x se stejným počtem kontrol**
- **Stanovení biomasy i růstové rychlosti**
- **Pokles oproti kontrole o 25 % a více → provedení úplné zkoušky**

Testovací organismy



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Doporučené organismy:
 - *Selenastrum capricornutum*, např. 86.81 SAG, ATCC 22662, nebo CCAP 278/4
 - *Scenedesmus subspicatus*, např. 86.81 SAG, ATCC 22662, nebo CCAP 278/4
- Rychle rostoucí druhy, přednostně:
 - *Selenastrum capricornutum*, např. ATCC 22662, nebo CCAP 278/4,
 - *Scenedesmus subspicatus*, např. 86.81 SAG.
- Jiné musí být uvedeny ve zprávě

Zkušební médium



ČSN EN 28692

**NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008**

- Kvalitní destilovaná nebo deionizovaná
- Destilační přístroj bez měděných částí
- 4 zásobní roztoky

- Kvalitní destilovaná nebo deionizovaná voda s vodivostí menší než 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$
- Destilační přístroj bez měděných částí
- 4 zásobní roztoky
- Sterilizace membránovou filtrací nebo v autoklávu
- pH přibližně 8

Zásobní roztoky



Tabulka 1 - Zásobní roztoky živin

| Živina | Koncentrace v zásobním roztoku | Konečná koncentrace ve zkoušeném roztoku |
|---|--------------------------------|--|
| Zásobní roztok 1 | makrosložky živin | |
| | g/l | mg/l |
| NH ₄ Cl | 1,5 | 15 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 1,2 | 12 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1,8 | 18 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,5 | 15 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 | 1,6 |
| Zásobní roztok 2 | Fe-EDTA | |
| | mg/l | µg/l |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 80 | 80 |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 100 | 100 |
| Zásobní roztok 3 | stopové prvky | |
| | mg/l | µg/l |
| H ₃ BO ₃ | 185 | 185 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 415 | 415 |
| ZnCl ₂ | 3 | 3 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1,5 | 1,5 |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,01 | 0,01 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 7 | 7 |
| Zásobní roztok 4 | NaHCO ₃ | |
| | g/l | mg/l |
| NaHCO ₃ | 50 | 50 |

Kultivační zařízení



ČSN EN 28692

- Teplota $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Stálé a rovnoměrné osvětlení - 400-700 nm
- Intenzita $60\text{-}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}/\text{s}$ ($35 - 70 \times 10^{18}$ fotonů m^{-2}/s) při měření v rozsahu 400–700 nm
- 6 000–10 000 lx

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Teplota $21\text{-}25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Stálé a rovnoměrné osvětlení - 400-700 nm
- Intenzita $60\text{-}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}/\text{s}$ ($35 - 70 \times 10^{18}$ fotonů m^{-2}/s) při měření v rozsahu 400–700 nm
- 6 000–10 000 lx

Činidla



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Zásobní roztoky: příprava rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo kvalitní destilované
- Sterilizace zásobních roztoků přes membránový filtr (0,2 μm), nebo v autoklávu při 120°C po 15 minut
- Úprava pH (při jeho výrazných změnách) na pH ředící vody pomocí HCl a NaOH

- Zásobní roztoky: příprava rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo kvalitní destilované s vodivostí menší než 5 $\mu\text{S/cm}$
- Koncentrace pomocných látek (org. rozpouštědla, emulgátory, dispergátory) minimální, ne víc než 100 mg/l média
- Úprava pH (při jeho výrazných změnách) na pH ředící vody pomocí HCl a NaOH

Měření hustoty



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Přímé počítání pomocí počítače částic, nebo mikroskopem s počítačící komůrkou
- Nepřímé počítání za předpokladu dostatečné citlivosti (10000 buněk na 1 ml) a prokázané dobré korelace s hustotou buněk, mohou být použity i jiné postupy (fotometrie, turbidimetrie, spektrofotometrie)

- Přímé počítání živých buněk, např. pod mikroskopem s počítačícími komůrkami
- Za předpokladu dostatečné citlivosti a prokázané dobré korelace s buněčnou hustotou mohou být použity i jiné postupy (fotometrie, turbidimetrie...)

Zkušební postup



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Orientační zkoušky → koncentrační rozmezí
- Objem inokula by měl být takový, aby hustota buněk byla cca 10^4 buněk/ml
- Koncentrační řada by měla obsahovat 4 – 5 koncentrací od 10 – 90% inhibice růstu

- Orientační zkoušky → koncentrační rozmezí
- Počáteční hustota: cca 10^4 buněk/ml
- Geometrická řada nejméně 5 koncentrací
 - Nejnižší žádný pozorovatelný činek
 - Nejvyšší omezení růstu nejméně o 50 %

Zkušební postup



ČSN EN 28692

**NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008**

- 3 opakování pro každou koncentraci
- 6 stejných kontrolních vzorků bez látky

- 3 opakování pro každou koncentraci
- 3 kontroly bez látky
- 3 kontroly s pomocnou látkou

Provedení zkoušky



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Přidání zkoušené látky k prekultuře řas
- V kultivačním zařízení třepání, míchání nebo probublávání
- Stanovení hustoty po 24, 48 a 72 hodinách
- Měření pH na začátku a po 72 hodinách, nemá se měnit o víc než 1,5

- Přidání zkoušené látky k prekultuře řas
- V kultivačním zařízení třepání, míchání nebo probublávání
- Stanovení hustoty po 24, 48 a 72 hodinách
- Jako blank filtrované médium
- Měření pH na začátku a po 72 hodinách, nemá se měnit o víc než 1,5

Vyhodnocení



ČSN EN 28692

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES)
č. 440/2008

- Pro každou zkoušenou koncentraci a růstový vzorek se sestrojí růstová křivka, v podobě grafu logaritmu střední hodnoty buněk v závislosti na čase.
 - Vypočte se inhibice v procentech
 - Výpočtem plochy pod růstovou křivkou (integrál biomasy)
 - Výpočtem růstové rychlosti
 - EC_{50} se určí sestavením tabulky a sestrojením růstového grafu a od oka proložením přímky
 - NOEC
- EC_{50} pro každý čas měření:
 - Z růstové křivky (hustota buněk x čas)
 - Z grafu snížení specifické růstové rychlosti proti logaritmu koncentrace
 - NOEC

Kritéria jakosti



ČSN EN 28692

- Hustota buněk v kontrole se zvýší za 3 dny alespoň 16x
- pH v kontrole nesmí změnit svoji hodnotu o více než 1,5 jednotky

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

- Hustota buněk v kontrole se zvýší za 3 dny alespoň 16x
- Koncentrace zkoušené látky nesmí klesnout pod 80 % původní hodnoty

Závěr



- Parametry zkoušky se v obou porovnávaných dokumentech výrazně neliší, rozdíly jsou většinou minimální
- Hlavním rozdíly:
 - Nařízení komise (ES) č. 440/2008 povoluje před samotnou zkoušku zařadit provedení limitní zkoušky
 - Liší se kritéria jakosti
 - Liší se požadavky na koncentrační řadu

Děkujeme za pozornost

