

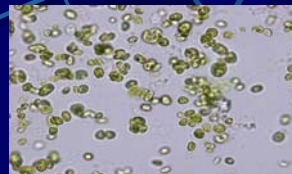
Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas

Test ekotoxicity látky podle normy:
ČSN EN 28692

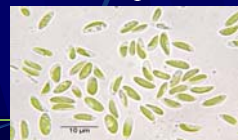
1

Používané druhy řas (inokulum):

Scenedesmus subspicatus



Selenastrum capricornutum



2

Princip

- Metoda je založena na sledování inhibičního efektu zkoumané látky na růst biomasy sladkovodních planktonních řas.
- Jednotlivé řasové kmeny se kultivují po dobu několika generací v definovaném médiu roztoku živin, vody a zkoumané látky.
- Zkoušená látka je v médiích přítomna v podobě koncentrační (geometrické) řady.
- Doba inkubace testu je minimálně 72 hodin za konstantních podmínek (Osvětlení, teplota...)

3

Příprava a průběh testu

- Připravíme si sadu zásobních roztoků živin podle normy.
- Nechá se ustanovit kyslíková rovnováha mezi atmosférou a roztokem. Zkontrolujeme pH (8,3 ± 0,2)
- Řasové inokulum se připraví z exponenciálně rostoucí kultury. Předkultivace trvá 3 dny.
- Zásobní roztok živin se smíchá s požadovaným množstvím deionizované vody a přidá se takový objem řasové kultury, aby po desetinasobném zředění vodou byla výsledná hustota buněk 10 000 v 1 ml.

4

- Koncentrace zkoušené látky se volí v geometrické řadě a měla by pokrývat alespoň 4-5 řádů v rozmezí 10-90% inhibice růstu kultury.
- Jako nádobu lze použít Erlenmayerovy baňky.
- Koncentrovaný roztok živin by měl tvořit 1/10 celkového objemu roztoku v baňce.
- Do některých baňek se nepřidá testovaná látka a tyto budou použity jako kontrolní varianty.
- Každá testovaná koncentrace 3x opakování
- Kontrola 6x opakování.

5

Inkubace

- Nádoby se inkubují při cca 23°C
- Za stálého osvětlení bílým světlem dané intenzity a kvality.
- Vlnová délka ideálně 400-700 nm.
- Každých 24 hodin se odebere malý průběžný vzorek a stanoví se počet buněk v 1 ml vzorku

6

Měření testu

- Z baňky se pipetou odebere malý objem kultury (5ml) a spočítá se obsah buněk.
- Vzorek se zpět nevrací.
- Pro počítání buněk se používá mikroskop s počítací komůrkou, počítač částic, nebo se použijí nepřímé metody detekce (spektrofotometrie, turbidimetrie, fluorescence).
- Na začátku a konci pokusu se změří pH všech pokusných variant

7

Interpretace výsledků

- Sestavíme tabulku pro koncentrace látky a konečnou hustotu kultury.
- Vypočteme procenta inhibice.
- Vytvoříme graf ($y = \% \text{ inhibice}$, $x = \text{koncentrace}$)
- Určíme hodnotu NOEC, EC_{50} , růstovou rychlost a plochu pod růstovou křivkou.
- sestavíme protokol o zkoušce (Zkoušená látka, organismus, teplota, osvětlení, složení média, datum počátku a trvání, zkoušené koncentrace, pH, metoda měření, výsledky měření, vypočítané inhibice).

8

Možné uspořádání testu:



9

Kritéria platnosti testu:

- Hustota buněk u kontrolního vzorku se musí zvýšit alespoň 16x za 72 hodin (růstová rychlost 0,9 za den).
- Změna pH nesmí být větší než 1,5 jednotky.

10