

# Návody k laboratorním úlohám Ekotoxikologické biotesty cvičení (Bi-5620c)



## Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí - RECETOX

Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita

Brno, Česká Republika

2013

(modifikováno v březnu 2014)



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



# 1. Test s chvostoskokem *Folsomia candida*

Zpracováno podle normy ISO 11267 (1999)

Cílem úlohy je naučit se postup půdního biotestu, který hodnotí efekty na přežívání a reprodukci chvostoskoka *Folsomia candida*. Tento biotest lze použít pro hodnocení ekotoxicity chemických látek (pesticidy, hnojiva), reálně kontaminovaných půd, vytěžených sedimentů a hlušiny, kalů z čistíren odpadních vod, odpadů, sutí a drtí a dalších pevných matric.

## 1.1. Princip testu

Synchronizovaná kultura chvostoskoků *F. candida* je exponována po dobu 28 dnů testované látky (kadmium) v umělé půdě. Na konci testu se hodnotí mortalita dospělých jedinců a reprodukce.

## 1.2. Přístroje a chemikálie

- synchronní kultura chvostoskoků
- umělá půda s pH  $6 \pm 0.5$  a ovlhčená na 50% WHC ve variantě bez kadmia - kontrola a ve variantě s 800 mg/kg kadmia)
- skleničky na testy (cca 150 mL), folie, gumičky
- sušené kvasnice, exhaustor, štěteček, miska s mřížkou na vyhodnocování testu
- inkoust
- váhy s přesností na 0.1 g
- inkubační místnost nebo termostat
- běžné laboratorní sklo a pomůcky – kádinky, filtrační papír, papírové ubrousky, lžičky, pasteurky, fixy, nůžky, stříčky s vodou, pryžové rukavice, laboratorní pláště

## 1.3. Podmínky testu

## 1.4. Příprava experimentu

### 1.4.1. Založení chovu

Kultura chvostoskoků *F. candida* se chová v plastových krabičkách nebo na Petriho miskách na směsi aktivního uhlí a sádry. Sádra a aktivní uhlí se smíchá v poměru cca 9 :1. Do misky se nalije trochu vody a přidá mix aktivního uhlí a sádry tak, aby se vytvořila na dně souvislá vrstva. Připravené misky se nechají několik hodin zaschnout. Do substrátu se vytvoří ostrým předmětem několik rýh (pro kladení vajíček). Doprůstřed misky se pak přidá špetka sušených kvasnic (droždí) a ovlhčí destilovanou vodou. Ze starších chovů se přidá na misku pomocí exhaustoru cca 40 středně velkých chvostoskoků. Miska se dobře uzavře a popíše. Chov se uchovává při  $20 \pm 2$  °C. Chov je nutné kvůli pevně uzavřeným nádobám větrat jednou týdně, kdy se také kontroluje vlhkost substrátu a přidává špetka kvasnic. Optimální vlhkost se pozná tak, že černý substrát je lehce matný ne lesklý a po pokapání vodou se tato pomalu vsakuje.



### 1.4.2. Synchronizace chovů

Do testů se používají 10 - 12 dní staří juvenilní chvostokoci. Na nový substrát (sádra s aktivním uhlím v poměru 9:1) přemístíme pomocí dechového exhaustoru větší jedince (= založení synchronizace). Přemístění chvostokoků na nový substrát obvykle spouští ovipozici. Po 2 dnech dospělé jedince odstraníme a v kultivační nádobě zůstávají jen vajíčka (zkontrolujeme pod binokulárem). Počkáme na vylíhnutí vajíček a poté, co se objeví první juvenilové, odpočítáme 10 – 12 dní.

### 1.4.3. Příprava umělé půdy

Umělá půda dle norem OECD a ISO má složení:

- 10% vysušená rašelina přesátá a homogenizovaná přes 2 mm síto
- 20% kaolinový jíl s obsahem kaolinitu minimálně 30%
- 70% křemenný písek s minimálně 50% zrn 0.05 – 0.2 mm
- $\text{CaCO}_3$  se přidává tak, aby výsledné pH (KCl) bylo  $6 \pm 0.5$

### 1.4.4. Maximální vodní kapilární kapacita půdy

Maximální vodní kapilární kapacita půdy ( $\text{WHC}_{\text{max}}$  dle angl. Maximum Water Holding Capacity) je stav, kdy je půda schopna v přirozeném uložení udržet v kapilárních pórech největší množství vody. Vyjadřuje se v jednotkách objemu vody na gram suché zeminy. Procentuální vyjádření  $\text{WHC}$  znamená kolik procent nasycení půdy vodou - maximální  $\text{WHC}_{\text{max}}$  (100%  $\text{WHC}$ ) - je požadováno. Vlhkost umělé půdy do testu s chvostokoky je ideální cca 50%  $\text{WHC}$ .

## 1.5. Postup testu

### 1.5.1. Založení testu:

- Do skleněných nádobek na test navažte po 30 g půdy (2 opakování od každé koncentrace i kontroly).
- Na povrch půdy dejte špetku kvasnic.
- Ze synchronizovaného chovu pomocí exhaustoru odeberte 10 juvenilů (dávejte pozor na správný počet!) a vyklepte je do testovací nádoby s půdou.
- Nádoby uzavřete víčky a poté zvažte.
- Nádoby umístěte do inkubační místnosti (teplota  $20 \pm 2$  °C).
- Každý týden nádoby zvažte a porovnejte váhu s původní. V případě úbytku váhy doplňte vodu.
- Každý týden dosypte špetku kvasnic.

### 1.5.2. Vyhodnocení testu:

- Po 28 dnech vyhodnoťte mortalitu a reprodukci pomocí flotační metody.
- Do testovací nádoby nalijte vodu z kohoutku a opatrně promíchejte do rovnoměrné suspenze pomocí štětečku.
- Poté beze zbytku přelijte suspenzi do počítačové nádoby (zbytky půdy můžete vypláchnout několikerým vymytím vodou).
- K suspenzi kápněte pár kapek inkoustu a opět opatrně zamíchejte štětečkem.
- Počítačovou misku vložte do fotografické komory a vyfotťte vodní hladinu digitálním fotoaparátem.



- Natavení foťáku: po zapnutí nastavte focení na auto, v přední části foťáku zmáčkněte tlačítko pro makro (symbol kytičky) a fotografování bez blesku (symbol přeškrtnutého blesku).
- Na fotkách spočítejte počet dospělců a juvenilů.

## 1.6. Protokol

## 1.7. Ověření testu, platnost



## 2. Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*

Zpracováno podle normy OECD 201 (ISO 8692) a české technické normy TNV 757741.

### 2.1. Princip

Odpověď organismu (inhibice/stimulace růstu) po expozici dané koncentraci látky je porovnávána s průměrným růstem kontroly.

Test byl optimalizován pro provedení v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Exponovaným organismem je zelená řasa *Raphidocelis subcapitata* (Syn. *Selenastrum subcapitata*, *Pseudokirchneriella subcapitata*). Vybrané koncentrace sledované látky jsou testovány vždy v 5 opakováních. V experimentu stanovujeme růst řas jako změnu optické density řasové suspenze na konci a začátku experimentu. Optická densita (absorbance 680nm) koreluje s počtem buněk na mL a měříme ji pomocí spektrofotometru, je tedy dobrým a jednoduchým zástupným parametrem k rychlému stanovení růstu řas v testovém systému.

### 2.2. Přístroje a chemikálie

- řasová kultura o dostatečné hustotě buněk na mL - kultivovaná ve standardním médiu (50% ZBB médium)
- 96-jamkové mikrotitrační desky, automatické pipety, špičky k pipetám, nádoby pro vyředění odpovídajících koncentrací testované látky
- destilovaná voda, nesterilní 200% ZBB médium
- dichroman draselný – pozitivní kontrola

### 2.3. Podmínky testu

- doba expozice: 3 dny (72h)
- interval měření: založení testu 0h, po 24, 48, 72 hodinách expozice
- teplota 23°C
- osvětlení 2080 lux (použití klasické halogenové zářivky a zářivky Aqua Glo fialová, 40W)

### 2.4. Příprava experimentu a pracovní postup:

#### 2.4.1. Příprava média

Řasy se kultivují v 50% ZBB médiu, jde o optimalizovanou směs živin a minerálů vhodnou pro kultivaci řas a sinic (přesné složení bude diskutováno na cvičení). Stejně médium se užívá i pro expozice řas v testu toxicity. K dispozici budete mít koncentrát – 200% ZBB médium, z tohoto koncentrátu je potřeba naředit dostatečné množství 50% ZBB média pro experiment.

#### 2.4.2. Příprava inokula řas – řasové suspenze

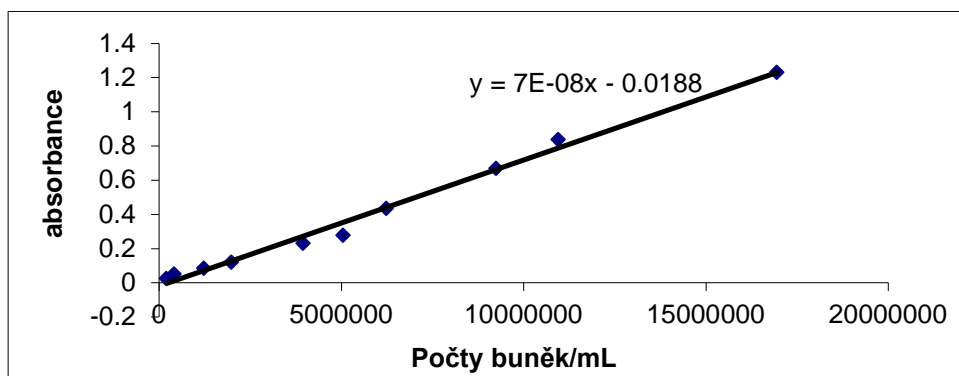
Řasové inokulum (=koncentrovaná řasová suspenze odebraná z laboratorní kultury) odebereme sterilně ze zásobní kultury v kultivační laboratoři. Potom řasové inokulum vyředíme kultivačním médiem (50% ZBB) na požadovanou hodnotu buněk na mL a odpovídající objem. Výchozí množství buněk/mL na začátku experimentu by mělo být cca **400 000** (přibližně odpovídá optická hustota v rozmezí 0,03-0,04 při 680 nm). Počty buněk na mL zjistíme pomocí měření na



spektrofotometru a výpočtu s užitím rovnice kalibrační křivky (viz níže). Obvykle řasy do testu ředíme faktorem 4 (tedy 1:3).

Určení počtu buněk/mL v zakonzentrované řasové suspenzi – řasovém inokulu:

Měření optické density provedeme na čisté mikrodesece. Do 3 sousedících jamek napipetujeme 250 uL 50% ZBB média (blank) a do dalších 3 sousedících jamek napipetujeme **250uL** koncentrované řasové suspenze. Proměříme absorbanci (680nm) a naměřené údaje použijeme pro výpočet ředícího faktoru. Ředící faktor vypočteme pomocí jednoduché lineární kalibrační rovnice (závislost optické density na počtu buněk na mL). Při měření na spektrofotometru postupujte dle instrukcí cvičícího.



Obr.1: Kalibrační křivka pro závislost absorbance na počtu buněk v řasové suspenzi

### 2.4.3. Příprava koncentrační řady testované látky a pozitivní kontroly

Pro přípravu koncentrační řady testované látky je důležité si nejprve uvědomit:

1. Jaký objem směsi řas+média+testované látky budu potřebovat pro 5 opakování, jaký objem pro negativní kontrolu/ pozitivní kontrolu? **Vždy je dobré uvažovat i nějakou rezervu!**
2. Jaký ředící faktor (DF – dilution factor) je mezi jednotlivými koncentracemi?
3. Jaké negativní kontroly je třeba zahrnout do experimentu (je látka rozpuštěna ve vodě nebo v organ. rozpouštědle)?

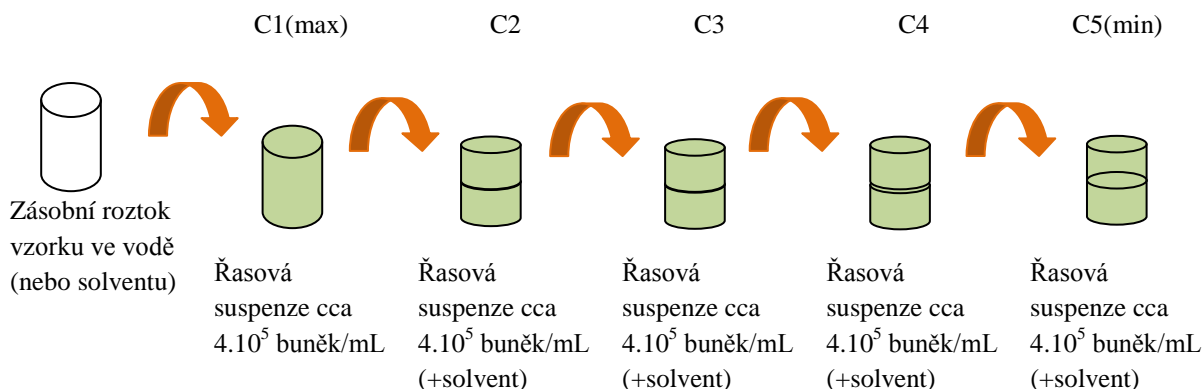
Objem vzorku přidávaný do nejvyšší koncentrace C1 (max) závisí na koncentraci zásobního roztoku a cílové koncentraci v testu. Objem přidávaného vzorku by však neměl přesáhnout 1% cílového objemu ve vialce C1, aby nedošlo k naředění řas a média. V případě přidávání vzorku v organickém rozpouštědle je nejvyšší přípustný objem přidávaného vzorku **0.5%** cílového objemu ve vialce C1 (v/v). V některých případech je tedy nutné koncentraci zásobního roztoku adekvátně upravit.

Testovanou látku přidáváme ke správně vyředěné řasové suspenzi (viz 2.4.2.), tak abychom získali potřebnou nejvyšší testovanou koncentraci látky. Dále pak pokračujeme postupným ředěním k nejnižší koncentraci. V každém kroku je nutné směs řas a testované látky důkladně promíchat – krouživým pohybem i pipetou. Pozor – řasy mají tendenci sesedat, **míchání je opravdu důležité!**

Jednotlivé koncentrační varianty si připravíme ve skleněných vialkách, z těch budeme pipetovat na desku do jamek dle schématu.

- Do jedné jamky na desce se pipetuje **250 uL**.
- Pro 5 jamek + rezerva **1400 uL**.

Schéma postupného ředění vzorku:



Doporučené uspořádání koncentračních variant testované látky a kontrol na 96-jamkové desce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	=	dH <sub>2</sub> O									
B		C min				C max	NC	PC min	PC	PC	PC max	
C		C min				C max	NC					
D		C min				C max	NC					
E		NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	
F		C min				C max	NC					
G		C min				C max	NC					
H												

**NC** = negativní kontrola

**SC** = rozpouštědlová kontrola (solvent control)

**PC** = pozitivní kontrola (dichroman draselný 1.25-2.5-5-10 mg/L)

**C min** = nejnižší koncentrace testované látky

**C max** = nejvyšší koncentrace testované látky

Obdobně jako u testované látky postupujeme při přípravě 4-bodové koncentrační řady pozitivní kontroly – dichromanu draselného. Cílové koncentrace jsou **1.25-2.5-5-10 mg/L** (DF 2) a koncentrace zásobního roztoku je **2 g/L**. Dichroman draselný je rozpuštěn **ve vodě**.

#### 2.4.4. Měření absorbance

Absorbanci měříme při vlnové délce 680 nm. **Před každým měřením je nutné jednotlivé jamky promíchat multikanálovou pipetou !!!!**

Získaný soubor (ve formátu MS-Excel) uložte na pevný disk počítače do adresáře "C:/biotesty\_cviceni\_2014 ve formátu datum\_latka\_casovy interval (např: 140310\_carbofuran\_0h; 140311\_carbofuran\_24h; atd.)

#### 2.4.5. Expozice

Mikrodestičku přikryjeme víčkem a exponujeme v inkubační místnosti s řízeným světelným režimem.

- Doba expozice: 3 dny
- Interval měření: 0h, 24h, 48h, 72h
- Podmínky expozice: teplota 23°C, osvětlení 2080 lx (použití klasické halogenové zářivky a zářivky Aqua Glo fialová, 40W)

### 2.5. Vyhodnocení

Výsledkem testu toxicity na řasách jsou dva endpointy – **inhibice růstové rychlosti a inhibice výtěžku**. Vyhodnocení výsledků experimentu provádíme v programech MS Excel a GraphPad Prism. V MS Excel provedeme první výpočty.

1. Od každé naměřené hodnoty vzorku/kontroly odečteme průměrnou absorbanci blanku (destil. voda v okrajových jamkách).
2. Pro každou koncentrační variantu/kontrolu vypočteme průměr, směrodatnou odchylku a koeficient variance
3. Vyloučíme případné odlehlé hodnoty (CV>10%)
4. Endpoint – **INHIBICE RŮSTOVÉ RYCHLOSTI (Growth rate inhibition):**  
Z upravených hodnot vypočítáme růstovou rychlost dle vzorce:

$$\mu = \frac{\ln OD_{\text{konec}} - \ln OD_{\text{start}}}{t_{\text{konec}} - t_{\text{start}}}$$

kde:

- $\mu$  průměrná specifická růstová rychlost v čase 0-x (dny);
- $t_{\text{start}}$  časový začátek expozice (0 den);
- $t_{\text{konec}}$  časový interval měření (x-tý den);
- $OD_{\text{start}}$  absorbance (po odečtení blanku) v čase 0 (dny);
- $OD_{\text{konec}}$  absorbance (po odečtení blanku) v čase x (dny);





Hodnoty růstové rychlosti použijeme pro výpočet inhibice růstu dle vzorce:

$$\%I = \frac{\mu_K - \mu_V}{\mu_K} * 100$$

kde:

$\mu_K$  - průměr specifické růstové rychlosti kontroly

$\mu_V$  - průměr specifické růstové rychlosti jednotlivých variant koncentrací toxikantu

$\%I$  - procento inhibice způsobené v dané koncentrační variantě

Pro kontrolu validity testu je třeba spočítat růstovou rychlost v každém časovém intervalu (0-24; 24-48; 48-72) – růstová rychlost kontroly by se měla pohybovat v intervalu 0.4-1.

#### 5. Endpoint – INHIBICE VÝTĚŽKU (Yield inhibition):

Z upravených hodnot vypočítáme výtěžek biomasy dle vzorce:

$$Y = OD_{konec} - OD_{start}$$

kde:

$OD_{start}$  - absorbance (po odečtení blanku) v čase 0 (dny);

$OD_{konec}$  - absorbance (po odečtení blanku) v čase x (dny);

Dále vypočítáme inhibici výtěžku biomasy dle vzorce:

$$\%I = \frac{Y_K - Y_V}{Y_K} * 100$$

kde:

$Y_K$  - výtěžek kontroly

$Y_V$  - výtěžek jednotlivých variant koncentrací toxikantu

#### 6. Výpočet účinných koncentrací:

Výsledné hodnoty inhibice růstové rychlosti a výtěžku biomasy vložte vždy k odpovídajícímu logaritmu koncentrace do softwaru GraphPad PRISM, a vypočtete hodnoty **IC50**, **IC20**, **NOEC** a **LOEC** pro oba endpointy. Stejný výpočet proveďte pro pozitivní kontrolu – dichroman draselný. Při výpočtu postupujte dle instrukcí získaných na úvodní hodině – Dr. Jiří Novák.



7. V MS Excel sestrojte graf závislosti inhibice růstové rychlosti a výtěžku biomasy na koncentraci toxikantu a obdobný graf s pozitivní kontrolou – dichromanem draselným. V grafu zobrazte variabilitu vašich výsledků vyznačením směrodatné odchylky.

## 2.6. Ověření citlivosti

Zkouška se považuje za platnou, pokud se EC50 způsobena referenčním roztokem (dichroman draselný- pozitivní kontrola) pohybuje v rozmezí 0.8-1.2 mg/L.



## 3. Zkouška inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri*

Zpracováno podle ISO 14735 (2005)

Jedná se o rychlý, jednoduchý a levný test akutní toxicity na prokaryotickém organismu, který slouží ke sledování toxických účinků nejen čistých chemických látek či jejich roztoků, ale i environmentálních směsí extrahovaných z různých vzorků. Tato metoda je méně vhodná pro silně zabarvené vzorky nebo vzorky obsahující nerozpuštěné látky nebo látky, které reagují s živným roztokem nebo podléhají změnám během zkoušky (například vysrážení, biochemickému nebo fotochemickému rozkladu), a tím mohou poskytovat nesprávné výsledky, popřípadě zhoršit reprodukovatelnost.

### 3.1. Princip

Testovacím organismem v testu je mořská bakterie *Vibrio fischeri*, která za optimálních podmínek intenzivně luminuje (světélkuje). Test je založen na zhášení bioluminiscence této bakterie, je-li ve vzorku přítomna biodostupná toxická látka, která může metabolickou aktivitu bakterií významně snížit, případně zastavit. To se ihned projeví poklesem intenzity luminiscence (bioluminiscence). Množství emitovaného světla se měří luminometrem před a po přidání testované látky (po 15 a 30 minutách expozice). Teplota v průběhu testu musí být konstantní ( $t = 15^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2. Přístroje a chemikálie

- Cirkulační termostat s možností teploty na  $15^{\circ}\text{C}$
- Chlazený luminometr,
- Automatické pipety 5 – 50  $\mu\text{l}$ , 50 – 200  $\mu\text{l}$ , 200 – 1000  $\mu\text{l}$ , 1000 – 5000  $\mu\text{l}$ , špičky,
- NaCl
- Modelový toxikant - dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) – pozitivní kontrola

### 3.3. Podmínky testu

- teplota:  $15^{\circ}\text{C}$
- délka expozice 15 a 30 min.

### 3.4. Příprava experimentu a pracovní postup

#### 3.4.1. Příprava bakteriální suspenze *Vibrio fischeri* pro test:

Bakterie je nutné připravit ve dvou, na sebe navazujících krocích:

1. Ampulku s lyofilizovanou kulturou vyjmeme z mrazícího boxu a do ampulky napipetujeme **0.5 mL rekonstitučního roztoku** dodávaného společně s bakteriemi. Třepáním rozpustíme lyofilizované bakterie v roztoku a po rozpuštění bakterií je pomocí pipety provzdušníme. Takto připravenou ampulku necháme inkubovat na ledu v lednici min 30 minut.
2. Po uplynutí 30 minut je možné rehydratované bakterie rozředit pro test. **100  $\mu\text{L}$  rehydratované suspenze** napipetujeme do **4 mL roztoku 2% NaCl** ve zkumavce (je také možné použít výrobcem dodávaný rekonstituční roztok z plastové nádoby). Použití výrobcem dodávaného roztoku je žádoucí, je-li k dispozici, jelikož dosažené luminiscence jsou



vyšší. Takto naředené bakterie pak ponecháme inkubovat v suché lázni při teplotě 15°C po dobu minimálně 15, ale spíše 30 minut.

### 3.4.2. Příprava koncentrační řady testované látky a pozitivní kontroly

Připravíme si dvě 96-jamkové desky. Jednu průhlednou - v ní se bude připravovat ředící řada a jednu bílou - ta bude nakonec měřena.

Předem je nutné si rozmyslet rozložení vzorků na desce a podle toho začít s její přípravou. Níže popsaný postup je platný pro ředění vzorků pomocí dvojkové ředící řady. V případě potřeby jiného stupně ředění je třeba příslušně upravit pipetované objemy do jednotlivých jamek. V tomto případě pamatujeme na výsledný objem vzorku v jamce. Ředění probíhá přímo v desce postupným přepipetováním určitého objemu z jedné jamky do druhé.

Test se provádí v duplikátu (je samozřejmě možné použít i jiný počet replikátů) – ve cvičeních budeme každou koncentraci testovat v 5 opakováních (využijeme pouze polovinu desky).

Tab. 1: Možná podoba napipetované desky se vzorky:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	neg c	neg c	pos. C	pos.c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c
b	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
c	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
d	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
e	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
f	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
g	C0	C0	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	neg c	neg c
h	neg c	neg c	pos.c	pos.c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c	neg c

**Neg c-** negativní kontrola (2% roztok NaCl)

**Pos c-** pozitivní kontrola (standardně se používá roztok dichromanu draselného v koncentraci EC 50-53 mg/l - 18,7 mg/l Cr<sup>VI+</sup>)

**C 0- C4-** koncentrace vzorků

Pozn. Je nutné mít na desce alespoň 2 duplikáty negativní kontroly. Lepší však je mít dvě jamky na každém řádku a pro každý řádek s nimi počítat pro výpočet korekčního faktoru pro daný řádek.

Na každém řádku může být koncentrační řada jednoho vzorku nebo může být vzorek naředen do více řádků, je-li to potřeba (hodně toxický vzorek).

Do jamek 1 a 2 napipetujeme výchozí koncentraci testovaného vzorku. Následující krok je poté závislý na charakteru vzorku:

1. Roztok vzorku neobsahuje sůl (NaCl)- v tomto případě je nutné do vzorku přidat slanou roztok, aby výsledná koncentrace NaCl byla přibližně 2% (kvůli osmotické rovnováze-). K tomuto účelu se používá prakticky nasycený roztok soli (32 %) - aby se vzorek co nejméně naředil. V tomto případě se do jamky napipetuje **280 μL vzorku** a přidá se **20μL koncentrovaného**



**slaného roztoku.** Výsledný objem v jamce je tedy **300 µL**. Pamatujte, že tímto se vzorky naředí- nutno zohlednit ve výpočtech!

2. Testovaný vzorek byl přímo připraven za pomoci 2 % roztoku NaCl (týká se látek, které jsou k dispozici v sypkém nebo suchém stavu a před měřením se připravuje roztok). V tomto případě se do prvních jamek napipetuje přímo **300µL vzorku**.

Do ostatních jamek na desce se napipetuje **150 µL 2% roztoku NaCl**. Tento roztok se použije i jako negativní kontrola.

Stejně jako u vzorku postupujeme u pozitivní kontroly ( $K_2Cr_2O_7$ ,  $c=53\text{ mg/l}$ )

Po tomto kroku máme v prvních dvou sloupečcích napipetovány vzorky a ve všech ostatních jamkách máme **150 µL ředícího roztoku** (2 % NaCl).

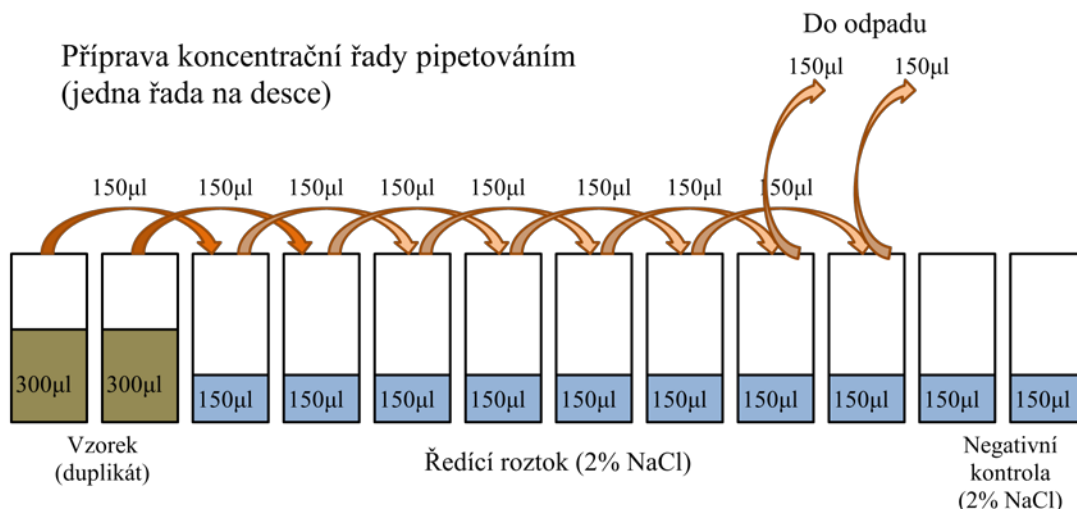
Následně pomocí pipety přímo na mikrodесce připravíme koncentrační řadu testovaného vzorku tak, že z prvních dvou jamek pipetujeme vždy 150 µL do následujících jamek. K tomuto kroku je možné použít multikanálovou pipetu, pomocí které je možné napipetovat všechny duplikáty (multiplikáty) najednou.

Důležité: Nezapomeňte, že na desce musí zůstat jamky s negativní kontrolou, bez vzorku. A také na to, že je nutné při posledním ředění vzorku nevracet kapalinu z pipety zpět do jamek, ale vypustit ji jinam. Pokud by se napipetovaný objem v pipetě vrátil zpět do jamek, tak by v těchto jamkách byl dvojnásobný objem roztoku.

(Environmentální vzorky se zkoušejí co nejdříve po odběru či přípravě. Vzorek se důkladně protřepe a je-li to nutné, homogenizuje. Vzorek by měl být upraven na  $pH\ 7,4 \pm 0,3$ )



Obr. 1: Schéma přípravy dvojkové koncentrační řady pipetováním (2 opakování paralelně).



Takto připravenou desku dáme temperovat na 15°C po dobu 30 minut.

Před uplynutím této doby si připravíme druhou (bílou) desku a do ní napipetujeme **30 µL suspenze bakterií** (byla připravena a naředěna dříve – viz bod 2.4.1).

Nyní máme připraveny všechno potřebné a můžeme začít s měřením desky.

### 3.4.3. Expozice a měření luminiscence

Použijeme destičkový luminometr Biotech synergy TM umístěný v chladicí skříni v přístrojové laboratoři.

Přístroj se ovládá pomocí počítačového programu Gen 5



Otevřeme testový protokol mikrotox.prt (ve složce experiment) a umístíme desku na rámeček luminometru. Program spustíme klikem na tlačítko READ. Software nás vyzve k uložení měření. Po uložení a odsouhlasení kontrolních oken deska zajede do přístroje a změří se počáteční luminiscence bakterií. Až je změřena každá jamka, deska znovu vyjede z přístroje a na obrazovce se objeví okno „napipetujte vzorek“ (Obr. 2). Pomocí multikanálové pipety napipetujeme **120 µL vzorků z průhledné desky** do bílé desky k bakteriím. Dáváme přitom pozor, abychom vzorky nějak na desce neposunuli a tím jsme nezměnili výsledky. Pokud budeme při přepipetování vzorků postupovat od negativních kontrol a nejzředěnějších roztoků k nejvyšším koncentracím, není potřeba měnit špičky.

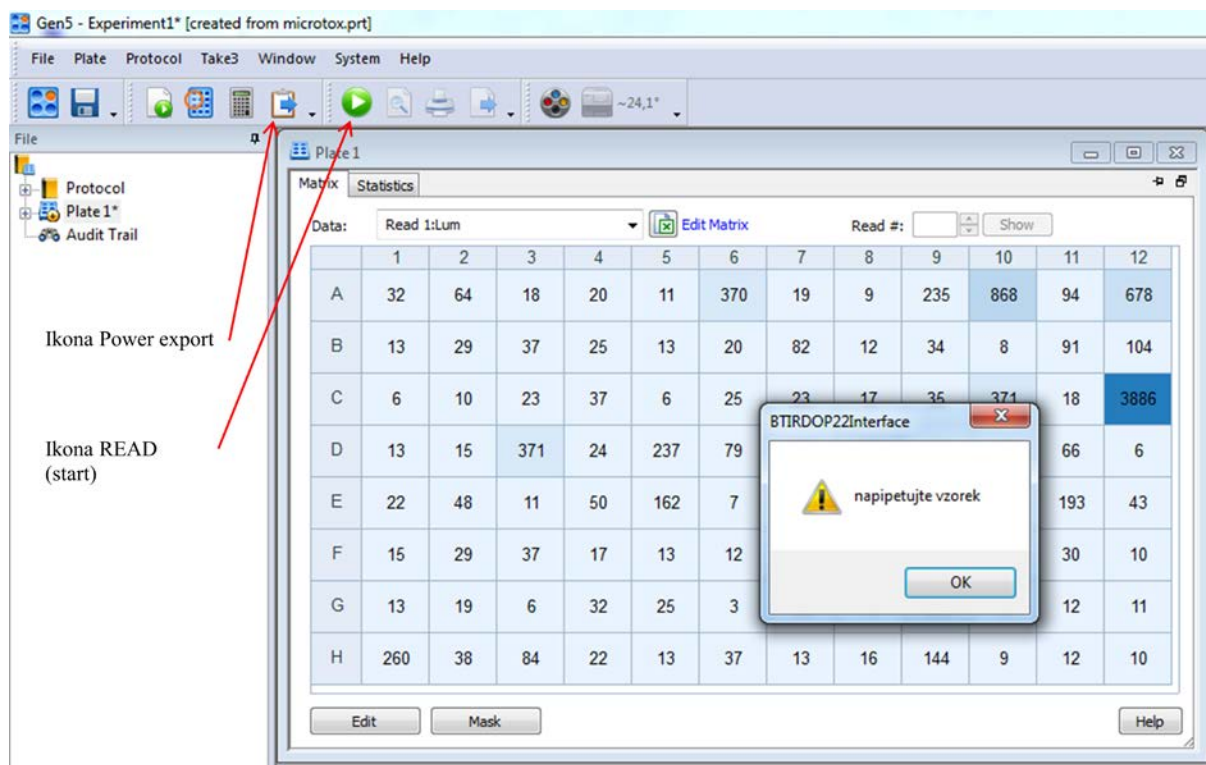
Po napipetování vzorků umístíme bílou desku zpět na Carrar přístroje a odklikneme tabulku. Měření automaticky pokračuje po dobu 30- ti minut.

Po třiceti minutách deska vyjede z přístroje a pomocí nástroje Power export (obr. 2) si necháme výsledné luminiscence vyexportovat do Excelu.

Získaná data poté vyhodnotíme, spočítáme výsledné inhibice a EC 50. Je vhodné z korekčních faktorů negativních kontrol udělat průměr a ten dosazovat do vzorce inhibice luminiscence (viz 3.5).

Pozn: Nezapomeňte, že se vzorky v průběhu přípravy desky naředily. První ředění nastalo, pokud byl ke vzorkům přidán koncentrovaný solný roztok na ustanovení správné slanosti, a podruhé tím, že byly všechny jamky rozředěny bakteriemi. Je proto nutné, přesně spočítat koncentrace v jednotlivých jamkách, které byly testovány - nikoli pouze napipetované koncentrace, jelikož ty se změnilly a ovlivnily by výslednou hodnotu EC.

Obr. 2: Výřez obrazovky při měření přístroje. Můžete vidět výše popsané ikony a okno vyzývající k napipetování vzorků z jedné desky do druhé.



### 3.5. Výpočty

Nejdříve vypočítáme koeficienty přirozeného vyhasínání bioluminiscence pro jednotlivé časy:

$$R_t = I_{Kt} / I_{K0}$$

Kde:

$R_t$  je koeficient přirozeného vyhasínání v čase  $t$

$I_{Kt}$  je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase  $t$

$I_{K0}$  je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase 0

Ke kvantitativnímu vyhodnocení se vypočte procentuální úbytek světla (inhibici luminiscence):

$$\text{Inh}_\% = (R_t \cdot I_0 - I_t) / (R_t \cdot I_0) \cdot 100$$

Kde:

$R_t$  je koeficient přirozeného vyhasínání v čase  $t$

$I_0$  je bioluminiscence v čase 0

$I_t$  je naměřená bioluminiscence v čase  $t$

Výpočet  $EC_{50}$  se provádí z křivky dávka-odpověď. K výpočtu doporučujeme použít program GraphPad Prism, s jehož obsluhou jste byli seznámeni v předchozích hodinách.

### 3.6. Ověření citlivosti

Zkouška se považuje za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- Koeficient přirozeného vyhasínání  $R_t$  se pohybuje v rozmezí 0,6-1,8
- Referenční roztoky (všechny tři pro zásobní kulturu nebo pouze dichroman draselný pro každý test) způsobují 20-80% inhibici po 30 minutách pro následující koncentrace standardních látek:

3,4mg/L 3,5-Dichlorphenol

2,2 mg/L Zn (II) 9,67 mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

18,7 mg/L Cr (VI) = 52,9 mg/L  $K_2Cr_2O_7$





## 4. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity

Zpracováno podle ČSN ISO 6341

Metoda stanovení akutní toxicity chemických látek, průmyslových odpadních vod a povrchových nebo podzemních vod pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

### 4.1. Princip

Zkouška je založena na určení koncentrace látky, která za 24 (48) hodin imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna* vystavených podmínkám testu.

### 4.2. Přístroje a chemikálie

- automatická pipeta + špičky
- plastová kapátka
- testovací destička (30 jamek, objem jamky 10 mL)
- kádinky
- odměrný válec
- chemikálie na přípravu média - chlorid draselný KCl, hydrogenuhličitan sodný NaHCO<sub>3</sub>, chlorid vápenatý CaCl<sub>2</sub>, síran hořečnatý MgSO<sub>4</sub>
- pozitivní kontrola - dichroman draselný K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

### 4.3. Podmínky testu

- teplota: 20 ± 2 °C
- délka expozice 24hod (48 hod.)
- fotoperioda 16h světla/8 h tmy

### 4.4. Příprava experimentu a pracovní postup

#### 4.4.1. Příprava média

Nejprve je třeba připravit dostatečné množství média pro všechny kroky postupu experimentu.

Zásobní roztoky:

- 8,88g CaCl<sub>2</sub> se rozpustí v 1L destilované vody
- 4,93g MgSO<sub>4</sub> se rozpustí v 1L destilované vody
- 2,59g NaHCO<sub>3</sub> se rozpustí v 1L destilované vody
- 0,23g KCl se rozpustí v 1L destilované vody

- na 1L média se dávkuje 25 mL z každého zásobního roztoku, do odměrné baňky 1L se nalije část destilované vody, přidají se zásobní roztoky a doplní se destilovaná voda



- aeraci se roztok nasytí kyslíkem (koncentrace kyslíku by neměla klesnout pod 7 mg/L) a zkontroluje se pH ( $7,8 \pm 0,2$ )  
(... zásobní roztoky budete mít k dispozici)

#### 4.4.2. Příprava organismů na test

Do experimentu se nasazují jednodenní juvenilové, proto je potřeba 1 den před založením experimentu vyčlenit do speciální nádoby – kádinky (0.5L) s médiem několik gravidních samic. Toto přenesení samic do oddělené nádoby je impulsem k rození mláďat.

#### 4.4.3. Příprava koncentrační řady testované látky

Ředící řadu testované látky (5 konc. bodů) připravíme v dostatečném objemu ve skleněných kádinkách. Látku postupně ředíme v médiu a přidáváme-li látku (vzorek) v jiném rozpouštědle než ve vodě, tak je nutné dbát na to, aby ve všech testových variantách byla stejná koncentrace rozpouštědla, maximálně však **0.5% v/v**. Z kádinek potom napipetujeme po **10mL** do každé testové jamky na plastové testové desce dle doporučeného schématu. Na každou koncentraci připadá 5 opakování, přičemž první jamka v řadě slouží jako jamka na oplach.

Jako pozitivní kontrola se používá standardní toxikant dichroman draselný (3,2 – 1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 mg/L).

(... desku s pozitivní kontrolou založí cvičící)

#### 4.4.4. Nasazení organismů do testu

Do jamky na oplach přeneseme kapátkem 20 jedinců z nádoby s juvenilny a poté přenášíme po 5 jedincích do jednotlivých testových jamek. Tímto zabráníme nežádoucímu naředění testované látky při manipulaci s kapátkem.

Schéma desky:

	A	B	C	D
NC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC
1	C min	C min	C min	C min
2				
3				
4				
5	C max	C max	C max	C max

jamky na oplach      testové jamky

#### 4.4.5. Expozice a vyhodnocení imobilizace

Desku s dafniemi necháme exponovat v kulturační laboratoři při teplotě  $20 \pm 2$  °C a světelném režimu 16h světlo/8h tma.

Na konci zkušební doby 24h (48h) se spočítají mobilní jedinci v každé nádobě. Jedinci, kteří nebudou schopni se rozpavit za 15 s po mírném zamíchání roztoku, se považují za imobilizované, i kdyby dosud pohybovali tykadly.

Výsledky včetně jakýchkoli anomálií v chování dafnií si zaznamenáme.

#### 4.5. Vyhodnocení výsledků a výpočty

Výsledky zaznamenáme do Excelu a jednoduchým výpočtem určíme % imobilizace v jednotlivých opakování. Pomocí softwaru Graphpad Prism stanovíme účinné koncentrace EC20, EC50, NOEC a LOEC.

$$\%I = \frac{x}{5} * 100$$

Kde:

$x$  je počet imobilizovaných jedinců

#### 4.6. Platnost zkoušky

Zkouška se považuje za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- mortalita v kontrole na konci zkoušky je  $\leq 10\%$
- 24h- EC<sub>50</sub> pro dichroman draselný je v rozsahu 0,6-1,7 mg/L

