

# STUDIJNÍ MATERIÁL 3:

## Zkouška inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*

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

### 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 na 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.

### Přístroje a chemikálie

- řasová kultura o dostatečné hustotě buněk na mL - kultivovaná ve standardním médiu (50% ZBB médium)
- 96-jamkové mikrotitrační desky (250uL/jamka), automatické pipety, špičky k pipetám, nádoby pro vyředění odpovídajících koncentrací testované látky
- destilovaná voda, nesterilní 200% ZBB médium
- dichroman draselný – pozitivní kontrola

### 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)

### Příprava experimentu a pracovní postup:

Pro založení pokusu je potřeba přichystat správně naředěné inokulum řas v 50% ZBB médiu, které napipetujeme po 125uL do každé testové jamky (tvoří tedy polovinu objemu testové jamky). Druhou polovinu objemu jamky (125 uL) pak tvoří ředění vzorku v 50% médiu, které následně přidáváme k řasovému inokulu dle pipetovacího schématu:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank médium	blank C5	blank C4	blank C3	blank C2	blank C max	blank médium	blank PC4	blank PC3	blank PC4	blank PC1	blank médium
B	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
C	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
D	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
E	blank médium	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	blank médium
F	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
G	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
H	blank médium	blank C5	blank C4	blank C3	blank C2	blank C max	blank médium	blank PC4	blank PC3	blank PC4	blank PC1	blank médium

**NC** = negativní kontrola

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

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

**C5 min** = nejnižší koncentrace testované látky

**C1 max** = nejvyšší koncentrace testované látky

### Příprava média

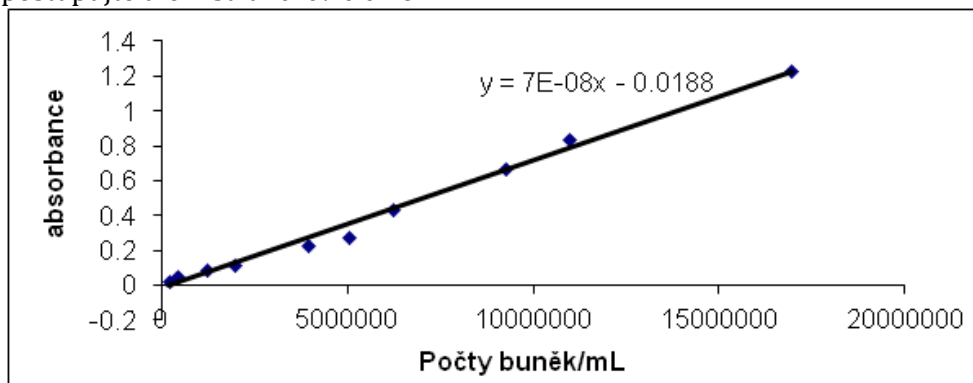
Řasy se kultivují v 50% ZBB médiu, jde o optimalizovanou směs živin a minerálů vhodnou pro kultivaci řas a sinic (přesné složení bude diskutováno na cvičení). Stejně médium se užívá i pro expozice řas v testu toxicity. K dispozici budete mít koncentrát, 200% ZBB médium, tento zásobní roztok se ředí na požadovanou koncentraci destilovanou vodou.

### Příprava inokula řas – řasové suspenze

Řasové inokulum v exponenciální fázi růstu (=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 hustotu buněk na 1 mL a odpovídající objem. Výchozí množství buněk/mL na začátku experimentu by mělo být cca **100 000**. Počty buněk na mL zjistíme pomocí měření na spektrofotometru (A680) a výpočtu s užitím rovnice kalibrační křivky (viz obr.1). Obvykle řasy do testu ředíme faktorem 4 (tedy 1:3).

### Určení počtu buněk/mL v zakoncentrované 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

Řasovou suspenzi naředíme v kádince 50% ZBB médiem na dvojnásobný počet buněk na mL než je výsledný požadovaný počet (tedy na 200 000 buněk/mL), protože suspenzi budeme následně v jamkách 2x ředit přidávaným vzorkem v médiu.

Takto naředěnou suspenzi řas rozpipetujeme na 96-jamkovou mikrotitrační desku dle pipetovacího schématu – 60 vnitřních jamek desky, okrajové jamky jsou určeny pro blanky.

Před rozpipetováním suspenzi řas důkladně promíchejte. Pozor – řasy mají tendenci sesedat, **míchání je opravdu důležité!**

## **Příprava koncentrační řady testované látky a pozitivní kontroly**

Koncentrační řadu testované látky (vzorku) si připravíme postupným ředěním zásobního roztoku látky (vzorku) 50% ZBB médiem v plastový epinkách či skleněných vialkách.

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

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

Při úvahách nad objem přidávaného vzorku je nutné myslet na to, aby koncentrace média a případně rozpouštědla byla ve všech jamkách stejná. Obsah rozpouštědla by neměl přesáhnout **0.5% cílového objemu v testové jamce (v/v)**. V některých případech je tedy nutné koncentraci zásobního roztoku adekvátně upravit.

V každém kroku je nutné směs testované látky s 50%ZBB médiem důkladně promíchat – (vortex/pipeta/krouživý pohyb).

Jednotlivé koncentrační varianty rozpipetujeme na desku po **125 uL** na jamku

- 1 ředění vzorku ve vialce/epince- pro 7 jamek + rezerva = **1000 uL**.

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 rozpuštěný **ve vodě**.

## **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\_2015 ve formátu datum\_latka\_casovy interval (např: 150331\_carbofuran\_0h; 150401\_carbofuran\_24h; atd.)

## **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)

## 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 odlehle 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 růstu oproti negativní/rozpouštědlové kontrole 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 VÝTĚZKU (Yield inhibition)**:

Z upravených hodnot vypočítáme výtěžek biomasy dle vzorce:

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

kde:

$OD_{\text{start}}$	- absorbance (po odečtení blanku) v čase 0 (dny);
$OD_{\text{konec}}$	- 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 vypočtěte 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 Excelu a GraphPadu 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.

### 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.

# 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 zbarvené 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.

## 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 ( $t = 15^{\circ}\text{C}$ ).

## 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
- 

## Podmínky testu

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

## Příprava experimentu a pracovní postup

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

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

1. Ampulku s lyofilizovanou kulturou vyjmeme z mrazicího 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 naředěné bakterie pak ponecháme inkubovat v suché lázni při teplotě  $15^{\circ}\text{C}$  po dobu minimálně 15, ale spíše 30 minut.

## 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 popsany 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.

Celý experiment se běžně provádí v duplikátu (je samozřejmě možné použít i jiný počet replikátů) – ve cvičeních budeme celý experiment provádět jen jednou, přičemž každou koncentraci budeme testovat v 5 opakováních (každá dvojice využije pouze polovinu desky).

Tab. 1: Možná podoba napipetované desky se vzorky:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	NC/SC	NC/SC	PC	PC	NC/SC	NC/SC						
b	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
c	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
d	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
e	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
f	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
g	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
h	NC/SC	NC/SC	PC	PC	NC/SC	NC/SC						

**NC**- negativní kontrola (2% roztok NaCl)

**SC** – rozpouštědlová (solvent) kontrola - (2% roztok NaCl) s přídavkem rozpouštědla

**PC**- pozitivní kontrola (standardně se používá roztok dichromanu draselného v koncentraci  $EC_{50}=53 \text{ mg/l} = 18,7 \text{ mg/l Cr}^{VI+}$ )

**C 1- C5**- koncentrace vzorků

Pozn. 1. 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 jedné desce jsou měřeny vzorky pro 2 dvojice, NC/SC budete mít dohromady*).

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

Nejvyšší koncentraci látky C1 si připravte ve vialce smísením zásobního roztoku vzorku a 2% roztoku NaCl. Poté rozpipetujte C1 na desku dle schématu (**300uL na jamku**) a další ředění připravte opět s použitím 2% roztoku NaCl přímo na ředící desce. Pro usnadnění práce je možné použít multikanálovou pipetu.

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 (do odpadu). Pokud by se napipetovaný objem v pipetě vrátil zpět do jamek, tak by v těchto jamkách byl dvojnásobný objem roztoku

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

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

Pozn. 2. Příprava C1 může být složitější a je třeba uvažovat o charakteru zásobního roztoku vzorku/testované látky.

1. Roztok vzorku neobsahuje sůl (NaCl) - v tomto případě je nutné do vzorku přidat slany 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 **300µLvzorku**. – *toto je varianta, kterou používáme ve cvičení*

Pozn. 3. 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  $7,4 \pm 0,3$ .

Během 30 min temperování ředicí desky si připravíme druhou (bílou-měřicí) desku a do ní napipetujeme **30 µL suspenze bakterií** (byla naředěna a temperována dříve).

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

### 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.

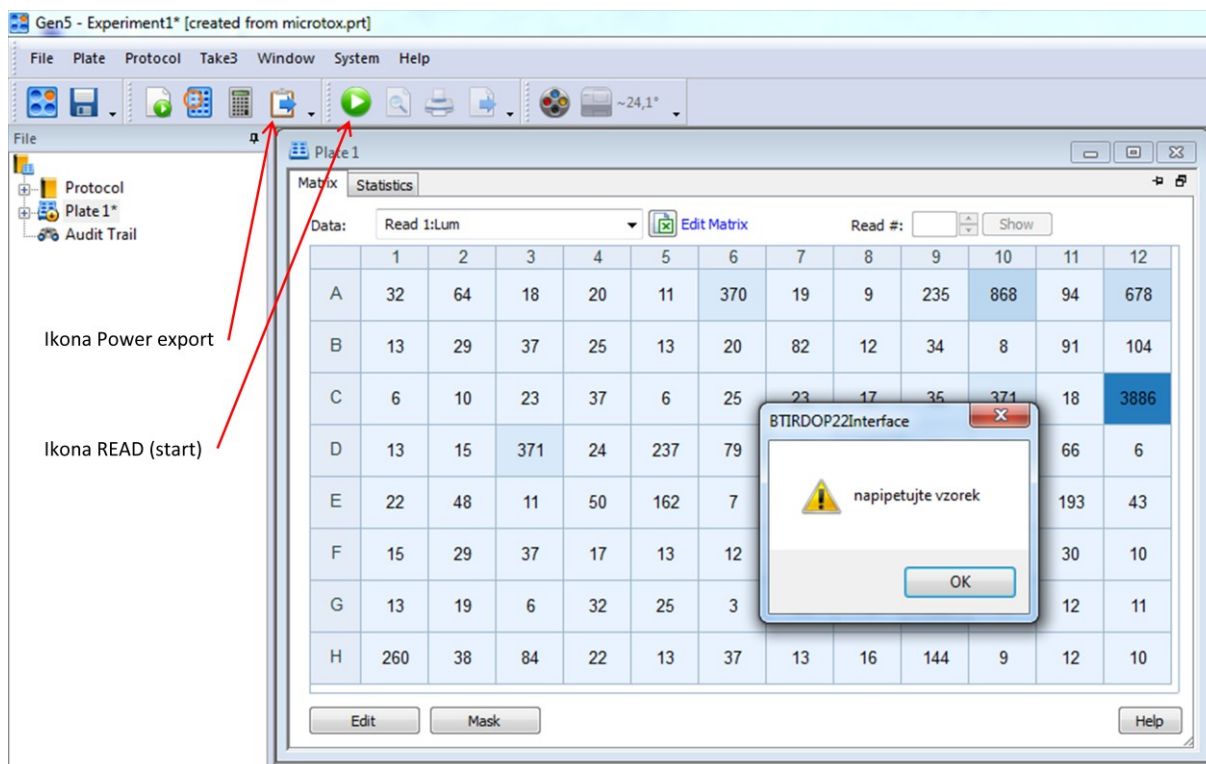
Po napipetování vzorků umístíme bílou desku zpět do přístroje a odklikneme tabulku. Měření automaticky pokračuje po dobu 30- ti minut.

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 níže).

Pozn: Při výpočtech koncentrací a ředění **nezapomeňte, že se vzorky v průběhu přípravy experimentu ředí suspenzí bakterií** – v kroku nepipetování z průhledné ředicí do bílé měřicí desky.





Obr. 2: Výřez obrazovky softwaru Gen5 při měření luminometrem. Můžete vidět výše popsané ikony a okno vyzývající k napipetování vzorků z jedné desky do druhé.

## 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 vypočítá procentuální úbytek světla (inhibice bioluminiscence):

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

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.

## 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<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

18.7 mg/L Cr (VI) = 52.9 mg/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

# 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*).

## Princip

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

## 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>

## Podmínky testu

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

## Příprava experimentu a pracovní postup

### 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±0,2)  
(*médium budete mít připravené*)

### 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.

## 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)

## Nasazení organismů do testu

Do jamky na oplach přeneseme kapátkem 20 jedinců z nádoby s juvenily 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	NC/SC
1	C min	C min	C min	C min	C min
2					
3					
4					
5	C max	C max	C max	C max	C max

Jamka na oplach                      Testové jamky

## Expozice a vyhodnocení imobilizace

Desku s dafniemi necháme exponovat v kultivační 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 rozplavat 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.

## 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

## 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