

Laboratorní praktikum z půdní ekotoxikologie



Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D., Mgr. Jana Vašíčková



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta

Brno, Česká Republika

2012



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Obsah

1	CÍLE PRAKTIKA	3
2	BEZPEČNOST PRÁCE V LABORATOŘI	4
3	MATERIÁL A POMŮCKY	5
4	ORGANIZACE CVIČENÍ	6
5	PŘÍPRAVA ARTIFICIÁLNÍ PŮDY, PŘÍDAVEK TESTOVANÝCH LÁTEK	7
5.1	OVĚŘENÍ PH.....	7
5.2	MĚŘENÍ WHC _{MAX} A OVLHČENÍ PŮDY	8
5.3	PŘÍDAVEK KONTAMINANTŮ DO PŮDY	8
6	CHOV A TEST S ŽÍŽALOU <i>EISENIA FETIDA</i>	9
6.1	ZALOŽENÍ CHOVU.....	9
6.2	POSTUP TESTU.....	9
7	CHOV A TEST S ROUPICÍ <i>ENCHYTRAEUS CRYPTICUS</i>.....	11
7.1	ZALOŽENÍ CHOVU.....	11
7.2	POSTUP TESTU.....	11
7.3	VYHODNOCENÍ TESTU – ZPŮSOB Č.1.....	12
7.4	VYHODNOCENÍ TESTU – ZPŮSOB Č.2.....	12
8	CHOV A TEST S CHVOSTOSKOKEM <i>FOLSOMIA CANDIDA</i>.....	13
8.1	ZALOŽENÍ CHOVU.....	13
8.2	POSTUP TESTU.....	13
9	TEST INHIBICE KOŘENE SALÁTU <i>LACTUCA SATIVA</i>.....	15
9.1	PŘEDKLÍČENÍ SEMÍNEK.....	15
9.2	POSTUP TESTU.....	15
10	CHOV A TEST S HLÍSTICÍ <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>.....	16
10.1	ZALOŽENÍ CHOVU.....	16
10.2	POSTUP TESTU.....	16
11	VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ, KŘIVKY DÁVKA-ODPOVĚĎ	17

1 Cíle praktika

Cílem tohoto praktika je naučit vás postupy pěti půdních ekotoxikologických testů, které se dnes stávají nenahraditelné při hodnocení chemických látek, pesticidů, hnojiv, odpadů, kalů, kontaminovaných půd a sedimentů. Postupy, s nimiž se seznámíte, vychází z následujících standardů a reflektují dosavadní zkušenosti výzkumníků centra RECETOX s nimi.

- ✓ ISO 11268-1 (1993): Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ✓ ISO 11268-2 (1998): Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ✓ OECD Test No. 222 (2004): Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- ✓ ISO 11267 (1999): Soil quality. Inhibition of reproduction of Collembola *Folsomia candida* by soil pollutants. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ✓ ISO 16387 (2004): Soil quality. Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of effects on reproduction and survival. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ✓ OECD Test No. 220 (2004): Enchytraeid reproduction test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- ✓ ISO 11269-1 (1993): Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora – Method for the measurement of inhibition of root growth. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ✓ ASTM Standard E 2172-01 (2001): Standard guide for conducting laboratory soil toxicity with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Annual Book of ASTM Standards 11:1606 - 1616.

Prostudujte si všechny návody a také pokyny k bezpečné práci v laboratořích před započítím vlastního praktika. Materiál a metody si projděte, ale nemusíte jim věnovat příliš pozornost, vše pro vás bude v laboratořích nachystáno.

Během praktika si dělejte poznámky a zapisujte zejména všechny detaily k prováděným postupům a výsledkům. Kdykoliv něco nevíte, zeptejte se vyučujících a pamatujte na úsloví „dvakrát měř a jednou řež“. Některé části uvidíte pouze demonstrativně, avšak hlavní část – vlastní testy toxicity - budete po zaškolení do jednotlivých metod provádět samostatně.

Na konci cvičení odevzdáte protokoly z celého cvičení, na základě nichž a na základě vaší docházky do praktik dostanete zápočet. Protokoly odevzdá každá skupina (ne jednotlivci) pro všechny prováděné testy. Protokol musí obsahovat: 1) název, seznam studentů ve skupině, krátkou úvodní část, 2) stručný popis postupu, kde dát důraz zejména na rozdíly oproti postupům v těchto návodech, 3) všechny výsledky skupiny přehledně uspořádané do tabulek, 4) zpracované výsledky (skupiny, či případně i výsledky ostatních skupin) – průměry, SD, RSD, grafy dávka-odpověď, odhad NOEC, LOEC, LC50 a EC50, 5) Interpretace výsledků, možné příčiny chyb, odchylek, závěr.

2 Bezpečnost práce v laboratoři

- ✓ Následující pokyny nenahrazují pokyny závazné v rámci Univerzity a Fakulty (<http://www.rect.muni.cz/nsso/>, zejména část věnovaná BOZP a chemickým látkám), jste povinni si je prostudovat a dodržovat je.
- ✓ V laboratoři se smíte pohybovat pouze, jste-li oblečeni v laboratorním oděvu (tj. plášť a při delším pobytu i laboratorní kalhoty a košile). S půdou, chovnými substráty a chemickými látkami pracujte pouze v pryžových rukavicích.
- ✓ Do laboratoře si nenoste oblečení ani zavazadla, nechte je k tomu určené šatně. V laboratoři nesmíte konzumovat jídlo, pít nápoje a kouřit.
- ✓ Před započítím prací v laboratořích budete seznámeni, kde jsou prostředky první pomoci a hasicí přístroje. Tato místa si zapamatujte.
- ✓ Před vlastní manipulací s chemickými látkami a kontaminovanou půdou budete upozorněni vyučujícím na případná rizika, způsob manipulace a osobní ochrany zdraví. I přesto si můžete prostudovat bezpečnostní pokyny k těmto látkám v některé z internetových databází (např. <http://www.sci.muni.cz/php/eurochemnet/>; www.atsdr.cdc.gov; www.inchem.org; www.tera.org/iter; www.piskac.cz/ETD; extoxnet.orst.edu; toxnet.nlm.nih.gov)
- ✓ Se všemi chemikáliemi nakládejte tak jak to uvádí pokyny na etiketách látek plus pokyny vyučujícího a údaje získané z toxikologických databází.
- ✓ Studentky v jiném stavu nesmí navštěvovat praktika.
- ✓ Při pipetování využívejte mikropipet či skleněných pipet s násadci a nikdy nepipetuje ústy.
- ✓ Odpady ze cvičení obsahující chemické látky likvidujte způsobem dle pokynů vyučujícího. Nikdy je nevylévejte do výlevky a neodhazujte do koše. Kontaminovanou půdu ukládejte do určených nádob.
- ✓ Co nejdříve po práci umyjte veškeré používané sklo náležitým způsobem (např. detergent lázeň, horká voda, destilovaná voda, sušárna) a vraťte je na své místo. Plasty dle pokynů vyučujícího buď vyhazujte do odpadů, nebo umývejte. Stejně tak další materiál a pomůcky po práci vraťte na své místo.
- ✓ Při úrazu jste povinni jej nahlásit vyučujícímu.
- ✓ S přístroji zacházejte opatrně a podobně také se sklem - vždy lépe pomalu a promyšleně, než rychle a bez uvážení.
- ✓ Při práci s potenciálními patogenními mikroorganismy (*E. coli* v kultuře hlístic a hnůj v chovech žířal - tetanus) věnujte zvýšenou pozornost své ochraně formou rukavic a mytí rukou po práci.
- ✓ Při rozsypaní nebo rozlití škodlivé látky ihned informujte vyučujícího a okamžitě zajistěte její zneškodnění.
- ✓ Při potřísnění kůže žíravými látkami co nejdříve začněte oplachovat postižené místo dostatkem teplé vody (asi 30 - 35° C) po dobu 10 – 15 min. Informujte vyučujícího.
- ✓ Při zasažení očí chemickými látkami, zejména žíravými, vyplachujte oči 10 – 15 min proudem vody či fyziologického roztoku. V laboratoři jsou k dispozici oční sprchy pro tento případ nehody. Informujte vyučujícího.
- ✓ Při náhodném požití chemikálií vyvolejte zvracení, vypijte dostatečné množství vody a opět vyvolejte zvracení (nesmí se použít při požití žířavin či tenzidů). Následně užívejte aktivní uhlí z lékárničky – použijte desetinásobek předpokládaného požitého množství chemikálie. Informujte vyučujícího.

3 Materiál a pomůcky

- vysušená rašelina (zahradnická tř. 1, vrchovištní, pH 3,5 – 5,0, Agro CS) - defaunizovaná
- kaolinový jíl s obsahem kaolinitu minimálně 30% (Sigma - Aldrich, Kat. č. 18672)
- křemenný písek s minimálně 50% zrn 0,05 - 0,2 mm (Filtreační písky s.r.o., Chlum)
- hnůj kravský suchý granulovaný (Agro CS) či suchý nekontaminovaný koňský hnůj
- zahradní substrát (Agro CS) - defaunizovaný
- vhodné nádoby na přípravu a uchování umělé půdy
- válečky s fritou vespod na WHC; fotografická miska
- destilovaná voda; CaCO₃; roztok 1M KCl na měření pH a pufrů
- CdCl₂; nerezové mísy a lžíce na kontaminaci půd; sklenice na kontaminované půdy
- plastové boxy na chovy žížal (10 - 20 litrů); krabičky s víčky na testy s žížalami a na chovy roupic (500 – 700 ml); plastové petriho misky Ø 10 cm a 8 cm; skleničky s víčky na testy s roupicemi a chvostokoky (cca 150 ml); plastové zkušební nádoby s víčky na testy s rostlinami (plocha minimálně 150 cm², výška minimálně 5 cm)
- háček z mikrobiologické kličky; agar (Roth); vločky mleté; Bengálská červeň; etanol; bílá akrylová barva
- sádra, aktivní uhlí, sušené kvasnice, exhaustor, štěteček, miska s mřížkou na vyhodnocování testu s chvostokoky
- LB médium: 10 g trypton + 5 g yeast extrakt + 10 g NaCl + 1 ml 1M NaOH doplnit vodou do 1 litru a autoklávovat
- NGM agar: 3 g NaCl + 17 g bactoagar + 2,5 g bactopectone + 1 ml cholesterol (5 mg/ml EtOH) + 975 ml H₂O a autoklávovat; následně přidat sterilní roztok solí: 1 ml 1M CaCl₂ + 1 ml 1M MgSO₄ + 25 ml 1M KH₂PO₄
- Kultura *E. coli* OP 50
- kónické zkumavky plastové 50 a 15 ml; platinový drátek; koloidní roztok Ludox®
- sada mikropipet různých objemů; váhy s váživostí do několika kg; přesné analytické váhy; pH metr; vrtačka s míchadlem; třepačky; inkubační místnost; termostat; sušárna; binokulární mikroskop; autokláv; flow box; sušárna; kahan
- běžné laboratorní sklo - odměrné baňky, válce a kádinky různých objemů; nálevky; uzavíratelné sklenice různých objemů; porcelánové pohárky, různě velké Petriho misky, mikrobiologická hokejka
- filtrační papíry archy a kruhové výseče; laboratorní papírové ubrousky
- běžné laboratorní pomůcky – lžičky, kopistky, pinzety, váženky, alobal, potravinářská fólie, parafilm, špičky na pipety; pasteurky; fixy, lepicí páska, nůžky, stříčky s vodou a lihem
- pryžové rukavice – latexové a vinylové; respirátory

4 Organizace cvičení

Filosofií praktika je **maximálně samostatná práce studentů**. Z povahy a délky jednotlivých metod vyplývá, že cvičení nemůže probíhat jako pravidelná týdenní výuka. Studentům je vyučujícím předvedena péče o chovy, za asistence si vlastní chovy hned na začátku semestru založí a poté se celý semestr o modelové organismy starají sami. Kontaminovaná půda je připravena vyučujícím, avšak studentům je demonstrativně předvedena jak příprava umělé půdy, tak metodika kontaminace půd. Co se týká testů, jsou studentům demonstrovány všechny klíčové kroky postupů v několikahodinových blocích na začátku semestru a poté již studenti provedou samostatně všechny testy s připravenou kontaminovanou půdou. Vyučující pouze kontroluje stěžejní kroky a je během celého semestru k dispozici při problémech či dotazech. Na konci semestru je hromadný blok věnovaný vyhodnocení získaných výsledků včetně představení statistických postupů.

Průběh praktika lze tedy shrnout do **rámcového plánu**:

	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Enchytraeus crypticus</i>	<i>Folsomia candida</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Blok 1	Příprava umělé půdy a příprava kontaminované půdy (začátek semestru) <ul style="list-style-type: none"> ukázka rašeliny, písku a jílu ukázka umělé půdy suché a mokré, ukázka standardní půdy LUFA 2.2 ukázka měření WHC a pH ukázka přidavku toxické látky do umělé půdy (Cd jako CdCl₂) 				
Bloky 2,3,4,5,6	Založení chovu (začátek semestru) <ul style="list-style-type: none"> ukázka a pokyny k péči o chovy ukázka substrátů a jejich přípravy ukázka manipulace s organismy studenti si zakládají svůj chov a pečují o něj během semestru 			není	není
	Předvedení důležitých kroků z postupů testů (začátek semestru)				
	manipulace s žížalami vážení žížal založení testu co kontrolovat během testu hledání žížal a vážení	manipulace s roupicemi založení testu co kontrolovat během testu barvení, Ludox, fotografování	manipulace s chvostoskoky založení testu co kontrolovat během testu flotační metoda fotografování	založení semínek na naklíčení založení testů podmínky testu ukončení testu měření délky kořínků vyhodnocení výsledků	apod. manipulace s hlísticemi založení testu Ludox extrakce počítání pod mikroskopem
Samostatná část	Realizace testů (nutno začít do poloviny semestru), studenti sami: <ul style="list-style-type: none"> navazují připravenou kontaminovanou půdu do nádob na test přidávají organismy (žížaly nejprve i zváží) a potravu během testu kontrolují potravu a úbytek vlhkosti do testů s <i>E. fetida</i> a <i>E. crypticus</i> nasazují organismy přímo z chovu, u testu s <i>F. candida</i> je potřeba počítat s cca 20 dny před testem na synchronizaci po 28 dnech od založení testů vyhodnocují mortalitu a reprodukci <i>E. crypticus</i> a <i>F. candida</i>, po 14 dnech váhové změny a mortalitu u <i>E. fetida</i> někdy během semestru provádí test s rostlinami <i>Lactuca sativa</i> 				není
Blok 7	Vyhodnocení výsledků u PC (konec semestru) křivky dávka odpověď, modely a vyhodnocení NOEC, LOEC, LC a EC 50/10				

5 Příprava umělé půdy, přidavek testovaných látek

Umělá půda dle OECD a ISO norem má složení: 10% vysušená rašelina přesátá a homogenizovaná přes 2 mm síto, 20% kaolinový jíl s obsahem kaolinitu minimálně 30% a 70% křemenný písek s minimálně 50% zrn 0,05 - 0,2 mm. CaCO_3 se přidává tak, aby výsledné pH (KCl) bylo $6 \pm 0,5$. Většinou v množství kolem 0,5%.

- Připravte 20 kg této půdy tak, že do vhodné nádoby (objem 20 – 40 litrů) navažte 14 kg písku, 4 kg jílu a 2 kg rašeliny.
- Všechny komponenty za sucha důkladně promíchejte, nejlépe vrtačkou s míchací násadou.
- K jednomu kilogramu směsi přidejte 4 g CaCO_3 , zamíchejte, ovlhčete destilovanou vodou na 50% WHC (jak zjistit WHC půdy viz níže) a opět důkladně promíchejte.
- Ovlhčenou půdu nechte do druhého dne ustát a změřte pH půdy postupem níže.
- Pokud je pH nižší než 5,5, přidejte k tomuto kilogramu další 1 g CaCO_3 , důkladně zamíchejte, nechte do druhého dne ustát a opět změřte pH.
- Pokud pH stále nevyhovuje, přidejte další 2 g a opakujte postup.
- Zjištěný přídavek dostačující na doladění pH(KCl) mezi 5,5 a 6,5 použijte pro celou várku půdy.
- Ve výjimečných případech je pH s 0,4 % CaCO_3 vyšší než 6,5 a pak nezbývá než postup s jedním kilogramem opakovat a přidat tentokrát méně CaCO_3 , např. pouze 3 g.

5.1 Ověření pH

- Do kónické zkumavky s objemem 50 ml přidejte 5 ml půdy a doplňte na 30 ml roztokem 1M KCl.
- Suspenzi důkladně třepte po dobu 5 minut.
- Vzorek nechte stát nejméně 2 hodiny a dle návodu pH metru měřte pH suspenze po důkladném protřepání.
- U pH metru je také kontaktní elektroda přímo na měření pH vzorku půdy. Můžete změřit pH dostatečně vlhké půdy pomocí této elektrody. Pozor na to, že hodnoty pH měřené kontaktní elektrodou jsou o 0,5 – 1 jednotku pH vyšší.



5.2 Měření WHC_{max} a ovlhčení půdy

Maximální vodní kapilární kapacita půdy (MVK či WHC_{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. Při takovémto nasycení se vzduch nachází jen v nekapilárních pórech, tedy zemina obsahuje největší množství vody hygroskopické, obalové a kapilární. Procentuální vyjádření WHC znamená kolik procent nasycení půdy vodou - maximální WHC_{max} (100% WHC) - je požadováno.

- Padesát g suché umělé půdy umístíte do předem zváženého a vysušeného válečku s fritou vespod, zeminu poklepte, aby sesedla.
- Válec umístíte do nádoby s vodou tak, aby hladina vody byla asi ve výšce sloupce vzorku.
- Ve vodní lázni válec ponechte 3 hodiny, poté jej přemístíte na misku s pískem (s tkaninou na povrchu).
- Miska s pískem a vzorky musí být přikryta, aby se zabránilo vysoušení vzorků.
- Po 3 h zvažte váleček i s půdou. Vážení opakujte po 30 min, a pokud se tato 2 vážení liší, nechte váleček další hodinu na misce s pískem.
- Vzorek se i s válečkem po zvážení vysušte do konstantní hmotnosti při $105 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ a opět zvažte. WHC_{max} vypočtete dle vztahu: $WHC_{max} (\text{ml.g}^{-1}) = (M_{vz} - M_k - 50) / 50$, kde M_{vz} je hmotnost nasycené zeminy i s válcem (g) a M_k je hmotnost válce (g).
- Vlhkost umělé půdy do testů je ideální cca 50 % WHC .
- Vzhledem k tomu, že výchozí umělé půda je zcela suchá stačí WHC_{max} podělit dvěma a vynásobit množstvím ovlhčované půdy v gramech a víte, kolik destilované vody musíte přidat.

5.3 Přídavek kontaminantů do půdy

Testovaná látka rozpustná ve vodě (v tomto případě kadmium jako $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se přidává do půdy suché jako roztok ve vodě potřebné pro ovlhčení půdy na požadované procento WHC . Vyučující připraví roztoky o požadované koncentraci a aplikuje je do suché půdy. Následně půdu s roztoky důkladně promíchá. Připraveno je 2 kg čerstvé váhy pro každou z 8 koncentrací – 32, 63, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 mg $\text{Cd}/\text{kg}_{\text{suš.}}$. Dostatečné množství nekontaminované umělé půdy je ovlhčeno na požadované procento WHC destilovanou vodou a slouží jako kontrola. Každá skupina studentů testuje dvě koncentrace a kontrolu, vše ve třech opakování pro každý test. Na konci cvičení si skupiny navzájem vymění výsledky.



6 Chov a test s žížalou *Eisenia fetida*

6.1 Založení chovu

- Navažte cca 1 kg zahradního substrátu, 0,8 kg hnoje, 0,2 kg rašeliny a 20 g CaCO_3 do plastového boxu na chovy žížal.
- Suchou směs pořádně promíchejte a vodovodní vodou ovlhčete na cca 80% WHC a důkladně promíchejte.
- WHC_{max} není třeba měřit - optimální vlhkost poznáte „pěstní zkouškou“ tak, že stlačíte-li ovlhčený substrát v pěsti, mají se na povrchu vytlačit malé kapičky, ale voda nesmí vytékat.
- Do druhého dne nechte připravený substrát ustálit.
- Změřte pH (postupem stejným jako v kapitole 5). Pokud je pH(KCl) v rozmezí 5,5 – 7, lze přidat žížaly. Pokud je pH jiné, je potřeba ho upravit pomocí CaCO_3 (zvýší pH) či přídavkem rašeliny (sníží pH).
- Z jiných chovů přidejte dostatečné množství (min 50) dospělých i juvenilních žížal.
- Půdu v boxu přikryjte vlhkým papírem a z alobalu vyrobte víko na box s několika otvory pro přístup vzduchu.
- Chov umístěte do vhodných podmínek – inkubační místnost s teplotou 20 ± 2 °C.
- Každý týden zkontrolujte vlhkost substrátu, ručně substrát prokypřete a na povrch přidejte ovlhčený hnůj jako potravu. Každý týden zapisujte stav chovů.

Není potřeba pro účely cvičení:

- Věkově synchronizovanou kulturu lze založit tak, že do čerstvého substrátu přidáte dospělé žížaly a po 4 týdnech, kdy nakladou kokony, je zase odstraníte.
- Nová populace je po minimálně 2 měsících k použití do testu.
- Aklimatizaci lze provést tak, že potřebný počet vhodných žížal (viz níže) dáte do boxu s cca 5 kg umělého substrátu s přídavkem cca 50 g hnoje.

6.2 Postup testu

- Do skleněných nádob navažte 500 g půdy na každou koncentraci a opakování.
- Na povrch půdy dejte cca 2 g kukuřičného šrotu a zahrabejte do horní vrstvy půdy.
- Pro test použijte tři opakování na každou koncentraci i kontrolu.



- Krabičky označte nejen koncentrací ale i číslem opakování.
- Do testovacích krabiček přidejte 10 dospělců žížal *E. fetida* z chovu – měli by mít vyvinutý opasek, stáří min 2 měsíce a váhu 300 - 600 mg.
- Postupujte tak, že žížaly opatrně vyhledejte v chovu, opláchněte je v běžné vodě na velké Petriho misce a poté 10 vhodných žížal jemně osušte na papírovém ubrousku, zvažte s přesností na 3 desetinná místa a umístěte do krabičky s testovanou půdou.
- Navážku žížal na začátku testu zapište. Krabičky zavřete víčky s pár otvory, celé zvažte a váhu poznamenejte.
- Poté je umístěte do inkubační místnosti do 20 ± 2 °C.
- Každý týden zvažte každou krabičku, poté ji otevřete, odstraňte případnou plíseň a přidejte 2 g kukuřičného šrotu. Doplňte úbytek vody (rozdíl váhy celé krabičky nyní a před týdnem).
- Po 14 dnech vyhodnoťte mortalitu a váhový úbytek žížal.
- Půdu z krabičky vysypte na hliníkový podnos a opatrně prohledejte.
- Zaznamenejte počet kokonů a přežívajících žížal (= pouze žížaly reagující na mechanický stimul).
- Přežívající žížaly opláchněte v obyčejné vodě na velké Petriho misce, jemně osušte na papírovém ubrousku a zvažte s přesností na 3 desetinná místa. Váhu zapište.



7 Chov a test s roupicí *Enchytraeus crypticus*

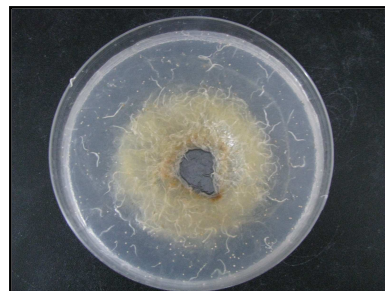
7.1 Založení chovu

Roupice druhu *Enchytraeus crypticus* chováme na 1% agaru v plastových Petriho miskách (před založením testu jsou roupice přemísťovány pro aklimatizaci do umělé půdy).

- Roupice přeneste háčkem ze původního chovu na nově připravený agar.
- Misky uchovávejte v termostatu nebo v klimatizované inkubační místnosti při 18 ± 2 °C.
- Každý týden roupice zkontrolujte a přidejte špetku potravy na povrch agaru.

7.2 Postup testu

- Do každé testovací skleničky navažte 20 g půdy a přimíchejte potravu - pomleté autoklávané ovesné vločky.
- Na daný objem půdy stačí malá kopistka ovesných vloček. Potravu vmíchejte do půdy.
- Před založením testu byly roupice aklimatizovány v umělé půdě. Naberte část umělé půdy kovovou lžičkou a přeneste ji do skleněné Petriho misky naplněné vodou.
- Umělou půdu jemně rozmíchejte ve vodě a pomocí háčku vyberte dospělé roupice (velcí červíci s opaskem - bílá ztlustěna ve střední části jejich těla).
- Do každé skleničky dejte 10 dospělců.
- Poté skleničky uzavřete a zvažte (hmotnost zaznamenejte na nádobku či do laboratorního deníku).
- Skleničky umístěte do inkubační místnosti do 18 ± 2 °C.
- Každý týden do skleniček přidejte špetku namletých vloček. Pokud jsou patrné zbytky předchozí potravy, musí být nejprve odstraněny háčkem.
- Po 28 dnech expozice ukončete test.
- Do každé testovací nádoby přidejte 5 ml etanolu a vodovodní vodu tak, aby dosahovala cca 3 cm nad povrch půdy.
- Poté přidejte 200 – 300 µl roztoku Bengálské červeně (0,01 g v 1 ml etanolu).
- Skleničky zavřete víčky a směs několik vteřin protřepejte. Skleničky se vzniklou suspenzí nechte do druhého dne stát při laboratorní teplotě.



Další den vyhodnoťte počet rouspic v testovacích skleničkách. Po obarvení jsou dospělé rouspice červené, jednoznačně větší než velké množství přítomných juvenilů a mají viditelný opasek. Všechny nalezené rouspice jsou považovány za přeživší, mrtvé organismy se rychle rozkládají.

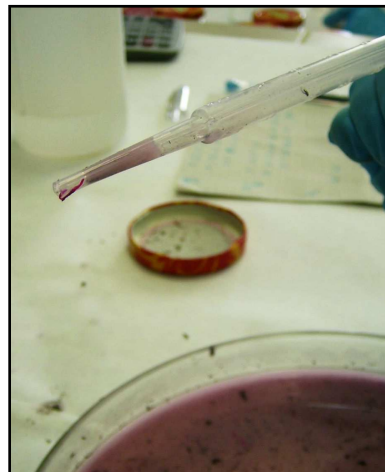
7.3 Vyhodnocení testu – způsob č.1

- Nachystejte si velkou skleněnou Petriho misku, do které slijte trochu obarvené tekutiny ze skleničky.
- Na dně jsou vidět obarvené rouspice. Pomocí plastového kapátka nabírejte rouspice, dávejte je bokem a zaznamenávejte jejich počet.
- Po odebrání všech rouspic přilijte další část suspenze ze testovací skleničky.

Zvlášť hodnotěte počet přežívajících dospělců, kteří byli na začátku nasazeni do testu, a počet narozených mláďat – poznáte je dle velikosti.

7.4 Vyhodnocení testu – způsob č.2

- Do skleničky si vymačkejte trochu bílé akrylové barvy (velikosti oříšku) a přilijte vodu
- Míchejte tak dlouho, dokud nevznikne mléčně bílý roztok.
- Do 400 ml kádinky si nalijte koloidní roztok Ludox[®], přilijte část (30 ml) bílého roztoku a opět pečlivě zamíchejte.
- Do plastové misky přilijte obsah skleniček s obarvenými rouspicemi a poté přilijte asi 50 ml bílé obarveného Ludoxu.
- Mírně s plastovou nádobou pohybujte, aby se promíchaly vrstvy Ludoxu s obsahem skleničky s rouspicemi.
- Položte misku na stůl a nechte chvíli ustát. Při správném promíchání dojde k vynesení obarvených rouspic na povrch.
- Přeneste misku do fotografické komory a povrch vodní hladiny s rouspicemi vyfotografujte.
- Natavení fotoaparátu: po zapnutí nastavte focení na auto (zelený nápis shora), v přední části aparátu zmáčkněte tlačítko pro makro (symbol kytičky) a fotografování bez blesku (symbol přeškrtnutého blesku)
- Na fotkách spočítejte počet dospělců a juvenilů.



8 Chov a test s chvostoskokem *Folsomia candida*

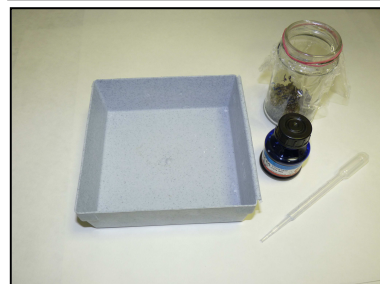
8.1 Založení chovu

Kultura *F. candida* se chová v plastových krabičkách nebo na Petriho miskách.

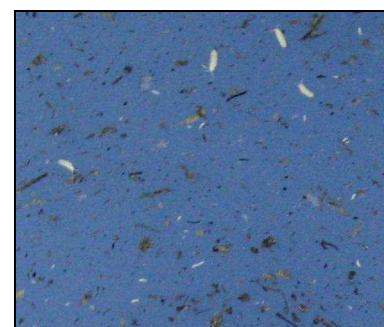
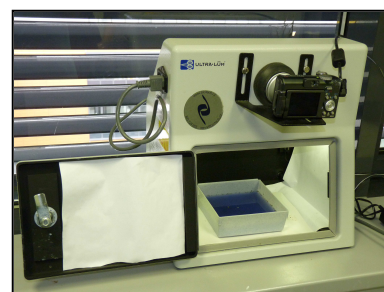
- Smíchejte sádro a aktivní uhlí v poměru cca 9 :1.
- Tento prášek nasypete do misek zhruba do 1 cm vrstvy.
- Následně opatrně přidávejte destilovanou vodu až do úplné saturace.
- Nechte připravené misky několik hodin zaschnout.
- Do substrátu vytvořte ostrým předmětem několik rýh (pro kladení vajíček).
- Optimální vlhkost poznáte tak, že černý substrát je lehce matný ne lesklý a po pokapání vodou se tato pomalu vsakuje.
- Doprstřed misky přidejte špetku sušených kvasnic (droždí) a pokapte destilovanou vodou.
- Ze starších chovů přidejte na misku pomocí exhaustoru cca 40 středně velkých chvostoskoků.
- Misku dobře uzavřete a popište.
- Chov uchovávejte při 20 ± 2 °C.
- Chov je nutné kvůli pevně uzavřeným nádobám větrat minimálně dvakrát týdně, kdy také kontrolujte vlhkost substrátu a přidávejte špetku kvasnic ovlhčených kapkou vody.
- Do testů se používají 10 - 12 dní staří juvenilní chvostoskoci.
- Tuto synchronní kulturu připravte tak, že 10 dospělých chvostoskoků dáte do nové misky se substrátem a poté co nakladou vajíčka (cca 2 dny, ale zkontrolujte mikroskopem – vajíčka jsou malé kuličky v otvorech v substrátu) je odstraňte.
- Počkejte na vylíhnutí vajíček a poté, co se objeví první juvenilové, odpočítejte 10 – 12 dní.

8.2 Postup testu

- Do skleněných nádobek na test navažte po 30 g půdy.
- Na povrch půdy dejte špetku kvasnic.
- Ze synchronizovaného chovu pomocí exhaustoru odeberte 10 juvenilů – dávejte zejména pozor na správný počet – a vyklepte je do testovací nádoby s půdou.
- Nádobky uzavřete a poté zvažte.



- Nádobu umístěte do temna a teploty $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Každý týden nádoby zvažte a porovnejte váhu s původní. V případě úbytku doplňte vodu.
- Každý týden taky dosypte špetičku kvasic.
- 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 počítací nádoby (zbytky půdy můžete vypláchnout několikrát vodou).
- K suspenzi kápněte pár kapek inkoustu a opět opatrně zamíchejte štětečkem.
- Počítací misku vložte do fotografické komory a vyfoťte vodní hladinu digitálním fotoaparátem.
- Natavení fotoaparátu: po zapnutí nastavte focení na auto (zelený nápis shora), v přední části aparátu zmáčkněte tlačítko pro makro (symbol kytičky) a fotografování bez blesku (symbol přeškrtnutého blesku)
- Na fotkách spočítejte počet dospělců a juvenilů.



9 Test inhibice kořene salátu *Lactuca sativa*

9.1 Předklíčení semínek

- Před zahájením testu se musí nechat semínka předklíčit.
- Na dno velkých skleněných Petriho misek položte vatu nebo filtrační papír a ovlhčete tak, aby v misce nestála voda.
- Rovnoměrně rozprostřete semínka na povrchu a přikryjte misku víčkem.
- Nechte semínka klíčit při laboratorní teplotě po dobu 24-48 hodin.
- Do testu vybírejte pouze semínka s kořínkem velikosti maximálně 2 mm.

9.2 Postup testu

- Do plastových krabiček navažte 300 g půdy
- Dohlčete půdu tak, aby výsledná vlhkost odpovídala 60 % WHC
- Povrch půdy v krabičkách trochu uhladte a skleněnou tyčinkou si vytvořte pravoúhlou síť jamek např. 3 x 5 bodů.
- Do vytvořených jamek pinzetou rovnoměrně rozmístěte po 15 předklíčených semenech salátu.
- Semena sadte kořínkem vždy dolů, jemně přitlačte k substrátu. Pozor, semínka půdou nezakryvejte.
- Misky se zasazenými semínky přikryjte víčkem a ponechejte v termostatu po dobu 120 ± 2 h při 24°C .
- Po uplynutí této doby vyndejte misky z termostatu a změřte délku kořínků salátu.
- Každou rostlinku opatrně vyndejte nejlépe pomocí lžičky, při vytahování rostlinek ze substrátu buďte opatrní, kořínky jsou velmi jemné a hrozí přetržení.
- Délku všech kořínků si zaznamenejte a z výsledků vypočítejte výslednou inhibici růstu kořene.



10 Chov a test s hlísticí *Caenorhabditis elegans*

10.1 Založení chovu

- Hlístice *C. elegans* chováme na 2-3 mm NGM agaru s nárůstem *E. coli* (OP50) v Petriho miskách při teplotě 18 ± 2 °C.
- Nad plamenem ožehněte platinový drátek a ze starého chovu přeneste několik jedinců na novou misku získanou od vyučujícího. Hlístice nabírejte pod binokulárním mikroskopem.
- Jednou týdně chov kontrolujte pod binokulárním mikroskopem, kontaminované misky zrušte.
- Jedenkrát za měsíc kultury přesadte na čerstvý agar.
- Před vlastními testy populaci synchronizujte.
- Vyberte gravidní jedince (pod binokulárem jsou patrná vajíčka uvnitř těla jedince) na novou misku, po naklazení vajíček (nejpozději druhý den) dospělé odstraňte a vajíčka nechte inkubovat v termostatu při 20 °C.
- Z vajíček se vylíhnou dospělci po 3 - 4 dnech.

10.2 Postup testu

- Do 40 mm Petriho mističek navažte 2,3 g půd a ovlhčete 1,5 ml destilované vody.
- Poté pomocí platinového drátku přeneste 10 synchronizovaných jedinců do půdy na mističce.
- Inkubujte mističky v termostatu při 20 °C po dobu 3 dnů.
- Po skončení expozice izolujte hlístice pomocí koloidního roztoku Ludox[®].
- Půdu z mističky beze zbytku opláchněte do 50 ml centrifugační zkumavky velmi pečlivě tak, aby žádná část půdy nezůstala na mističkách.
- Celkem na toto použijte maximálně 30 - 40 ml Ludoxu[®].
- Zkumavky uzavřete uzávěrem, protřepáním vytvořte suspensi a centrifugujte při 2000 rpm cca 3 min.
- Poté supernatant slijte do velké Petriho misky a pod binokulárním mikroskopem počítejte hlístice.
- Jedinci, kteří jsou vyextrahováni, jsou započítáni jako živí, mrtví jedinci se v půdě rychle rozloží.



11 Vyhodnocení získaných výsledků, křivky dávka-odpověď

Výstupem většiny ekotoxikologických testů jsou parametry LOEC (lowest observed effect concentration = nejnižší z testovaných koncentrací, která už způsobila statisticky významný efekt), NOEC (no observed effect concentration = nejvyšší z testovaných koncentrací, která ještě nezpůsobila žádný statisticky významný efekt), LC_{10} a LC_{50} (koncentrace při níž je pozorována mortalita 10% či 50%), EC_{10} a EC_{50} (koncentrace při níž je pozorována inhibice reprodukce nebo růstu oproti kontrole 10% či 50%). Koncentrace u těchto parametrů se vyjadřují jako nominální (= množství látky původně nadávkované do půdy) koncentrace v $mg/kg_{suš}$. Následující odstavce popisují jak postupovat s výsledky půdního testu ekotoxicity.

- Vytvořte ze získaných dat přehlednou tabulku, kde sloupce zleva doprava jsou jednotlivé koncentrace včetně kontroly (v podstatě koncentrace 0 mg/kg).
- Řádky jsou jednotlivá opakování (v našem případě 3 řádky).
- U mortality zapište tzv. survival (= přežívání) počet živých organismů na konci testu. Důvodem je, že v této podobě parametr s narůstající koncentrací klesá, stejně jako u reprodukce.
- U reprodukce zapište počet juvenilů na konci testu.
- V programu MS Excel vypočítejte průměrnou hodnotu, směrodatnou odchylku (SD) a relativní směrodatnou odchylku (RSD, tj. koeficient variance, CV, SD dělená průměrem v procentech) pro každou koncentraci pro oba parametry.
- Výsledky vynesete do grafu, kde na ose X jsou koncentrace a na ose Y průměrná hodnota parametru s chybovými úsečkami.
- Z těchto grafů odhadněte okometricky jaké budou asi hodnoty parametrů NOEC, LOEC, LC_{50} a EC_{50} .

- Upravte data pro statistickou analýzu.
- V případě programu GraphPad Prism stačí tabulku otočit tak, že řádky jsou koncentrace a sloupce výsledky jednotlivých opakování.
- Takto data importujte do statistického programu např. Statistica for Windows nebo GraphPad Prism.
- V případě programu Statistica for Windows tak, že první sloupec obsahuje koncentrace, druhý kód koncentrace (kontrola = 1, první koncentrace = 2, druhá = 3 atd.), třetí číslo opakování, čtvrtý a pátý výsledné hodnoty přežívání a reprodukce. Jednotlivá opakování jsou tedy psána pod sebou a první a druhý sloupec vlastně fungují jako kódovací. Vložte za první sloupec ještě jeden sloupec, do nějž vypočítejte přirozené logaritmy koncentrací.

- V programu Statistica for Windows v modulu ANOVA zjistěte, zda je celkově významný efekt koncentrací na výsledný parametr (tj. zda ANOVA vychází s $P < 0,05$).
- Ověřte, zda je v jednotlivých koncentracích homogenní rozptyl např. Levenovým testem (musí vyjít s $P > 0,05$).
- Následně proveďte test vzájemných kontrastů (např. Dunnettův test) mezi koncentracemi a první koncentrace, která se liší významně ($P < 0,05$) od předchozí je LOEC a ona předchozí je NOEC.
- Pro určení LC_{50} použijte probitovou regresi.
- Data vyjádřete tak, že v prvním sloupci budete mít přirozený logaritmus koncentrace, v druhém sloupci jedničku či nulu (jako přežili / nepřežili) a ve třetím kolika procent

organismů se přežili / nepřežili u dané koncentrace týká. Pro každou koncentraci jsou tedy uvedeny dvě čísla, kolik procent přežilo (např. 20 ze 30 = 67 v řádku s jedničkou) a kolik procent nepřežilo (např. 10 ze 30 = 33 v řádku s nulou).

- Data importujte do statistického softwaru např. Statistica for Windows.
- V modulu nelineární regrese zvolte probitovou regresi a proveďte ji. Zde je nutno modelovat jen souměrnou část křivky, začněte až od NOEC/LOEC koncentrací.
- Výsledek regrese potom v Excelu vložte do modelu a namodelujte regresní křivku.
- Hodnotu EC_{50} vypočítejte na stejných datech jako byly připraveny pro ANOVA v modulu nelineární regrese, logistická regrese.
- Do zadání pro rovnici zadejte vztah: $Y = c / (1 + \exp(-1 * b * (\text{Log}(X) - \text{Log}(a))))$, kde Y je sloupec s výsledným parametrem a X je sloupec s nelogaritmovanou koncentrací a a , b , c jsou parametry křivky.
- Pro model použijte metodu nejmenších čtverců a Levenberg-Marquardt algoritmus. Zde musíte přibližně nastavit hodnoty parametrů - c (počáteční hodnota křivky - kontrola, strop dat), b (sklon - většinou -1 až -3), a (odhadovaná 50% inhibice).
- Výsledky modelu vložte do MS Excel a modelujte regresní křivku.
- Hodnota a je přímo EC_{50} včetně 95% intervalů spolehlivosti.