

Cvičení k předmětu Bi5580 Obecná ekotoxikologie

Nutné potřeby, které studenti přinesou s sebou do cvičení:

- Tento návod
- Poznámkový sešit, psací potřeby
- Nůžky
- Pravítko (s milimetrovým rozlišením)
- Přezůvky

Úvodní přípravné otázky: (zdroj informací pro odpovědi - materiály k přednáškám, www.google.com)

- Jaký je význam použitého organismu (= modelový zástupce rostlin)?
- Jaké jsou praktické (ekologické) důsledky eventuálního poškození klíčení rostlin?
- Co to je IC50 a co to je IC99? Proč se používá právě IC50 a ne například IC99?

Úloha - Stanovení ekotoxicity v testu klíčení rostlin

Úvod:

Ve skleněných Petriho miskách jsou semena hořčice seté umístěna na filtrační papír a exponována 5 mL standardního média s různým ředěním testované látky. Jako negativní kontrola slouží varianta se semeny exponovanými jen čistým médiem.

Po ukončení experimentu se stanoví počet vyklíčených semen v kontrolách a v jednotlivých ředěních a u vyklíčených jedinců se vyhodnotí celková délka kořene. Získané výsledky lze využít pro výpočet hodnot IC50 (koncentrace zabraňující vyklíčení u 50 % semen, resp. koncentrace inhibující z 50 % růst kořene).

Metodika testu klíčení je standardizována do podoby Guidline OECD (No. 208) a metodického pokynu MŽP ČR pro hodnocení toxicity odpadů a vodných výluhů (Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, Vyhl. MŽP ČR 338/1997). Ve standardní podobě se provádí 4 dny (96 hodin). Pro účely cvičení může být doba expozice modifikována na 72 hodin.

Materiál a chemikálie

- semena hořčice bílé *Sinapis alba* (s atestem testu klíčivosti) – 30 min dopředu ponořené v destilované vodě
- skleněné Petriho misky o průměru 10 cm, pipety 5 a 10 mL, automatické mikropipety, filtrační papír, vialky pro přípravu ředění testované látky, pinzeta, laboratorní plastická folie, špičky k pipetám



- zásobní roztok standardního kultivačního média

Tab. 1: Zásobní roztoky solí pro testy na semenech hořčice bílé

Zásobní roztok	Chemikálie	Koncentrace v zásobním roztoku [g·l ⁻¹]
Roztok 1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	117,6
Roztok 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49,3
Roztok 3	NaHCO ₃	25,9
Roztok 4	KCl	2,3

Příprava média: napipetovat 5 ml každého roztoku a doplnit do 1 l destilovanou vodou. Případně upravit pH na 7,6-8.

Postup 1 - příprava EXPOZICE:

1) Petriho misky popište jménem, datem, koncentrací testované látky. Do takto připravených Petriho misek připravte a vložte kruhové výseče z filtračního papíru. Test bude proveden v duplikátech - celkem připravte 8 Petriho misek (2x kontrola + 2x 3 ředění vzorku A).

2) Příprava ředění vzorku

- připravte následující koncentrace dodaného testovaného vzorku

(vzorek A): 0.25% v/v, 0.5% v/v, 1% v/v (do 12 mL standardního média napipetujete potřebný objem testovaného vzorku - změnu celkového objemu zanedbejte)

- ředění proveďte v dodaném standardním médiu (roztok solí a základních živin nutných pro klíčení rostlin).

3) Připravené expoziční roztoky dávkujte do Petriho misek - vždy 5 mL / misku

- u kontrol použijte 5 mL standardního média bez vzorku

- použijte jednu pipetu a postupujte od nejnižší po nejvyšší koncentraci

4) Do každé misky vložte 5 semen hořčice bílé

5) Petriho misky překryjte potravinovou fólií (zajistí cirkulaci vzduchu a omezí vypařování) a umístěte do temna do inkubační místnosti (pokojová teplota)

Postup 2 - vyhodnocení KLÍČENÍ:

1) Po ukončení expozice **spočítejte počty nevyklíčených semen** na jednotlivých miskách a zapište do tabulky

2) U vyklíčených semen **vyhodnoťte délku kořene** (s přesností na milimetry) a zapište do tabulky

3) Vypočítejte průměrnou hodnotu u každé varianty a hodnoty vyjádřete jako % kontroly a % inhibice (vyjádřete jako celá čísla)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



- 4) Zhotovte grafy z vypočítaných dat včetně rozptylu (směrodatná odchylka)
- 5) Vyhodnocení IC50 proveďte pomocí lineární regrese se zahrnutím logaritmu koncentrace (Excel)
- 6) Schéma protokolu: princip, postup, výsledková tabulka, grafy pro jednotlivé sledované parametry a závěry



PROTOKOL - Cvičení z Obecné ekotoxikologie

TEST EKOTOXICITY KLÍČENÍ ROSTLIN:

Jména operátorů:

Datum založení expozice:

Datum hodnocení toxicity:

-> délka expozice (počet dní):

Rostlina číslo	Kontrola	Testovaný vzorek (koncentrace % v/v)			Pozn.
		0,25%	0,5%	1%	
Celkem semen	10	10	10	10	
Počet nevyklíčených					
Délky kořenů - Miska A					
1					
2					
3					
4					
5					
Délky kořenů - Miska B					
1					
2					
3					
4					
5					
Průměr délky kořenů					
% kontroly	100				
Směrodatná odchylka					
% inhibice	0				
Směrodatná odchylka					
IC50 - klíčení (% v/v)					
IC50 - růst kořene (% v/v)					



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Otázky do protokolu:

- 1) Který z hodnocených parametrů je citlivějším ukazatelem toxicity?
- 2) Jak věrohodné jsou vypočítané hodnoty IC50?
- 3) Jaké množství testované látky způsobí inhibici růstu kořene o 99 %? Je tento výsledek věrohodný?

