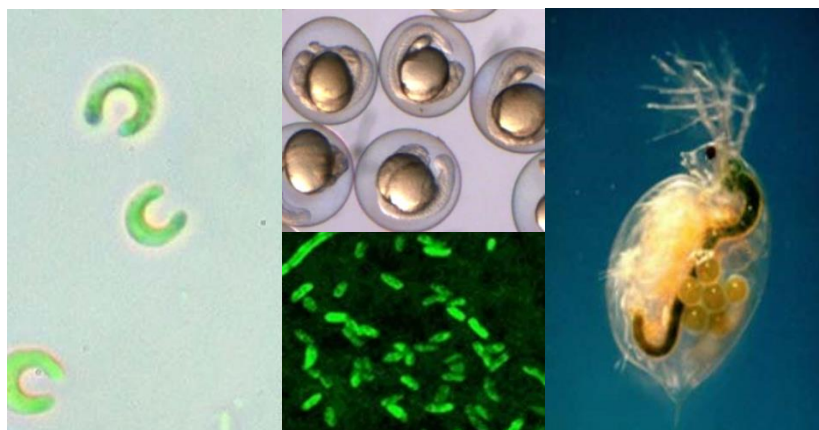


Manuál k předmětu
Experimentální a aplikovaná toxikologie a
ekotoxikologie – cvičení (E1241)
Blok 4

MUNI | RECETOX
SCI



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí - RECETOX
Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita
Brno, Česká Republika
2019

1. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*)

Zkouška akutní toxicity

Zpracováno podle ČSN ISO 6341

Vyučující: marie.smutna@recetox.muni.cz

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 NaHCO₃, chlorid vápenatý CaCl₂, síran hořečnatý MgSO₄
- pozitivní kontrola - dichroman draselný K₂Cr₂O₇

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 CaCl₂ se rozpustí v 1L destilované vody
- 4,93g MgSO₄ se rozpustí v 1L destilované vody
- 2,59g NaHCO₃ 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
- aerací se roztok nasatí 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 **10 mL** 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.

Nasazení organismů do testu

Do první jamky - 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.

	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

Jamka na oplach Testové jamky

Obr.1 schéma testovací destičky a rozložení koncentrací

Expozice a vyhodnocení imobilizace

Desku s dafniemi necháme exponovat v kultivační laboratoři při teplotě 20 ± 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 opakováních. Pomocí softwaru Graphpad Prism stanovíme účinné koncentrace EC20, EC50, NOEC a LOEC.

$$\%I = \frac{x}{5} * 100 \quad \text{Kde: } x \text{ je počet imobilizovaných jedinců}$$

Platnost zkoušky

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

- Mortalita v kontrole na konci zkoušky je $\leq 10\%$
- 24h- EC₅₀ pro dichroman draselný je v rozsahu 0.6-2.1 mg/L

2. Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*

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

Vyučující: eva.travnickova@recetox.muni.cz

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, po 24, 48, 72 hodinách expozice
- Podmínky expozice:
 - teplota 23°C
 - osvětlení 2080 lx (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:

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium
B	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC1	PC2	PC3	PC4	blank médium
C	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC1	PC2	PC3	PC4	blank médium
D	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC1	PC2	PC3	PC4	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	PC1	PC2	PC3	PC4	blank médium
G	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC1	PC2	PC3	PC4	blank médium
H	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium	blank médium

Příprava média

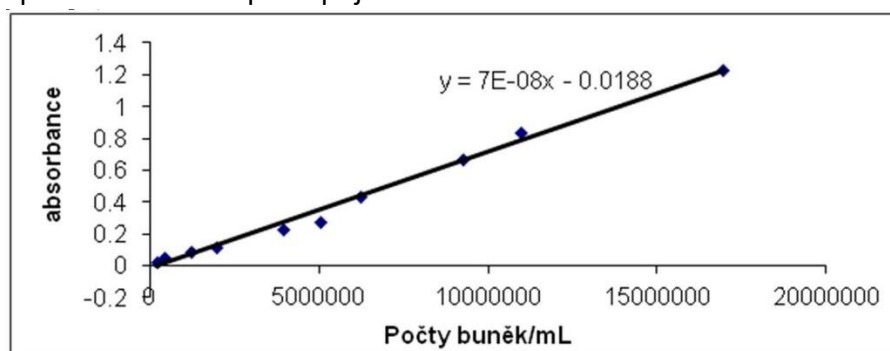
Řasy se kultivují v 50% ZBB médiu, jde o optimalizovanou směs živin a minerálů vhodnou pro kultivaci řas a sinic (přesné složení bude diskutováno na cvičení). Stejně médium se užívá i pro expozice řas v testu toxicity. K dispozici budete mít koncentrát, 200% ZBB médium, tento zásobní roztok se ředí na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

Testovaná látka: **diuron** v 5-bodové koncentrační řadě: **3.125-6.25-12.5-25-50 µg/L** (DF 2). Zásobní roztok diuronu je rozpuštěn ve vodě v koncentraci 20 mg/L.

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:/E1241_cviceni_2019 ve formátu datum_latka_casovy interval (např: 150331_triclosan_0h; 150401_triclosan_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 odlehlé hodnoty (CV>10%)
4. Endpoint – **INHIBICE RŮSTOVÉ RYCHLOSTI (Growth rate inhibition)**:

Z upravených hodnot vypočítáme růstovou rychlost dle vzorce:

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

kde:

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

μ_K	průměr specifické růstové rychlosti kontroly
μ_v	průměr specifické růstové rychlosti jednotlivých variant koncentrací toxikantu
$\%I$	procento inhibice růstu oproti negativní/rozpuštědlové 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 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 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 bloku 3 (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

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

Zpracováno podle ISO 14735 (2005)
Vyučující: jiri.novak@recetox.muni.cz

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.

2.1. Princip

Testovacím organismem v testu je mořská gramnegativní bakterie *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio 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 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 ($t = 15^{\circ}\text{C}$).

2.2. Přístroje a chemikálie

Chlazený termostat s možností temperace na 15°C , chlazený luminometr, automatické pipety 5 – 50 μl , 50 – 200 μl , 200 – 1000 μl , 1000 – 5000 μl , špičky, NaCl, modelové toxikanty: Síran zinečnatý ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 3,5-Dichlorfenol nebo Dichroman draselný ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

2.3. Podmínky testu:

- teplota: 15°C
- délka expozice 15 a 30 min.

2.4. Příprava vzorku

Testované látky naředíme v požadovaných koncentracích v pracovní mikroděsce, jako standardní rozpouštědlo se používá 2% NaCl (chlorid sodný) s výsledným objemem minimálně 150 μl na jamku. Nezapomeneme zahrnout i sadu kontrol (pozitivní kontrola např. ředící řada $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, negativní a případně i solventovou kontrolu). Desku dáme i se vzorky vychladit do lednice. Environmentální vzorky se zkoušejí co nejdříve po odběru či přípravě. Vzorek se důkladně protřepe a je-li to nutné, homogenizuje. Je-li pH vzorku mimo povolený rozsah ($7,4 \pm 0,3$), je třeba před testováním upravit.

2.5. Postup testu

- K lyofilizované kultuře bakterie ihned po otevření přidáme 0,5 ml 2% NaCl a necháme ji v ledové lázni rehydratovat minimálně 15 min.
- Přidáme 100 μl rehydratované kultury do 4 ml vychlazeného 2% NaCl (15°C) a necháme 10 minut vytemperovat (resuscitovat).
- Zředěná suspenze bakterií se pipetuje do bílé desky po 30 μl na jamku.

- Po dalších 10 minutách ekvilibrace se měří počáteční intenzita světla synchronizovaně po 45 sekundách. Po každém měření se přidává 800 µl 2% NaCl (negativní kontrola) respektive měřeného vzorku.
- Další měření se provádí synchronizovaně po 15 a 30 minutách.

2.5.1. 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 (15 nebo 30 min), I_{kt} je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase t a I_{k0} je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase 0.

Ke kvantitativnímu vyhodnocení se vypočte procentuální úbytek světla tj. 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, kdyby neobsahoval toxikant a 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.

2.6. Protokol

Protokol ze cvičení bude kromě krátkého shrnutí teorie obsahovat tabulku s primárními daty a vypočtené hodnoty inhibice (pro jednotlivá opakování + průměry se směrodatnými odchylkami), grafy popisující závislost dávka-odpověď ($\log C$ vs $\text{Inh}\%$) pro změřené časy expozice s proloženými modelovými křivkami, z které byl proveden odhad EC_{50} a (vložen z GraphPadu či Excelu) hodnoty tohoto odhadu pro změřené časy expozice. Zhodnocení výsledků, diskuse nad případnými nesrovnalostmi.

2.7. 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 ZnSO₄·7H₂O

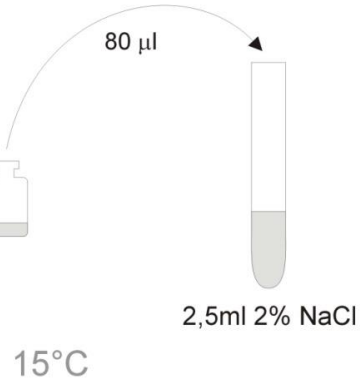
18,7 mg/l Cr (VI) 52,9 mg/l K₂Cr₂O₇

Schematický náčrt zkumavkové verze testu Microtox

A. Příprava kultury

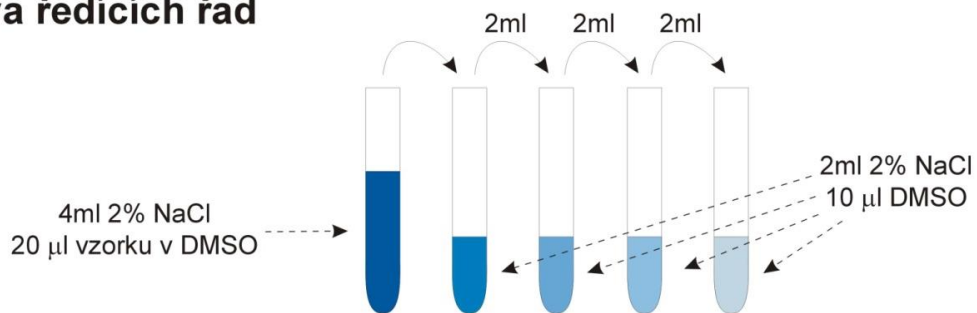


resuscitace
30 min

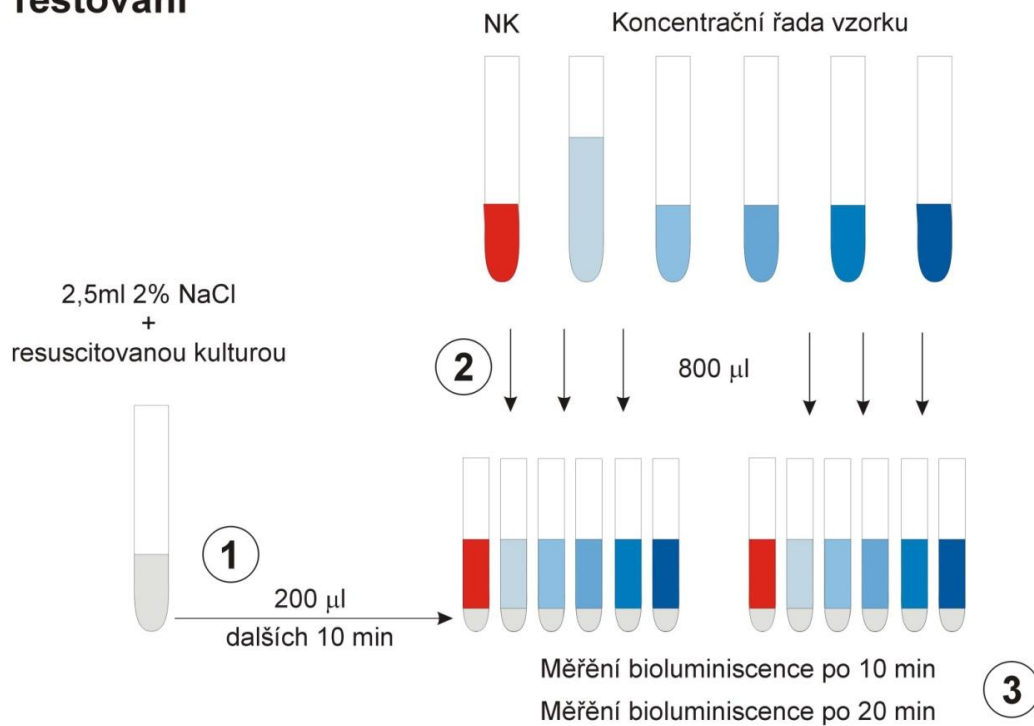


resuscitace
10 min

B. Příprava ředících řad



C. Testování



4. Test stanovení akutní toxicity pro rybí embryo

Zpracováno podle normy OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

Vyučující: eliska.rozmankova@recetox.muni.cz

Ryby jakožto konzumenti vyššího řádu hrají v ekosystému důležitou úlohu. Jsou součástí potravních pyramid, podílejí se na distribuci živin, promíchávání sedimentů a vodního sloupce, jakožto vrcholoví predátoři mají vliv na celkové uspořádání vodních ekosystémů. Důležitá je i jejich funkce hospodářská, sportovní a rekreační. Úhyny ryb jsou častým a mediálně používaným indikátorem chemických havárií, a tím i znečištění životního prostředí. Testy na rybách jsou v toxikologii a ekotoxikologii dlouhodobě využívány. Testy na dospělých jsou však testy na zvířatech, a tak se pojí s určitými etickými problémy. V posledních desetiletích je snaha omezování testů na zvířatech a jejich nahrazování alternativními testy, takzvané 3R (Reduction, Refinement, Replacement). Jedním z těchto testů je i test na embryích *Dania reria*. Tento test není testem na zvířatech, neboť raná vývojová stadia nejsou považována dle platné legislativy za zvířata. Předpokládá se, že embryo necítí bolest a celkový stres je nižší než u dospělých jedinců. Na druhou stranu bylo prokázáno, že výsledky akutního testu na embryích jsou srovnatelné s výsledky testů na dospělých.

Princip testu

Embrya *Dania reria* jsou exponována různým koncentracím testované látky v krystalizačních miskách. Test začíná okamžitě po fertilizaci a pokračuje po dalších 96 hodin (4 dny). Letální a subletální efekty jsou určeny porovnáním s kontrolou a použity pro výpočet LC50, EC50, NOEC a LOEC. Ve standardním testu se používá minimálně 5 koncentrací testované látky a kontrola. V této zkrácené verzi pro účely cvičení bude v jedné krystalizační misce 20 embryí na jednu koncentraci látky a studenti si své výsledky nasdílí, ve výsledku tedy budeme mít 4 replikáty. V OECD normě 236 se používá 20 embryí na koncentraci v plastových 24 jamkových mikroděskách, v OECD 210 je to 80 embryí na koncentraci rozdělených do 4 replikátů, v ISO 15088 je to deset embryí na koncentraci a v ISO s dospělci *Dania reria* se používá 7 jedinců na koncentraci. V testu se použije látka s prokázanými teratogenními, embryotoxickými, nefrotoxickými, hepatotoxickými, karcinogenními a neurotoxickými účinky, která je těkavá a vstřebává se kůží i sliznicemi (ethanol), popřípadě standardní látka pro tento test 3,4-dichloroaniline (T).

Přístroje a chemikálie

Krystalizační misky, standardní medium, 1000 µl pipeta, 200 µl pipeta, špičky na pipety, Pasteurova pipeta, testovaná chemikálie diuron, rozpouštědlo DMSO, ethanol, methylcellulóza, anestetikum MS-222, binokulár, stříčky, laboratorní papír, laboratorní rukavice.

Podmínky testu

- Test probíhá při teplotě 26±1°C.
- Úspěšnost fertilizace vajíček by měla být více než 70 %
- Nasycení media kyslíkem by mělo být na konci testu více než 80 % v kontrole a nejvyšší testované koncentraci
- V negativní kontrole (a v rozpouštědlové, je-li použita) by mělo přežít více než 90 % embryí
- V negativní kontrole (a v rozpouštědlové, je-li použita) by mělo být na konci testu vyklubáno minimálně 80 % embryí

- Medium je připraveno podle ISO 5667 a ISO 7346-3. Možné rozpětí pH během testu je 6,5 – 8,0. Skládá se ze solí rozpuštěných v milliQ vodě ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , KCl). Médium již pro vás bude připraveno.
- Světelný režim je nastaven na 14 hodin světla a 10 hodin tmy
- Pozitivní kontrola (např. 4 mg/L 3,4-dichloroaniline) způsobí úmrtí minimálně 30 % embryí.

Postup testu

Cvičení je stejně jako standardní test rozděleno do 5 dnů. První den se pokus založí, každý den (ideálně vždy po 24, 48, 72 a 96 hod) probíhá kontrola embryí. Mrtvá embrya jsou z krystalizačních misek okamžitě odstraněna. Závěrečné vyhodnocení probíhá v 96 hpf (hours post fertilization) za použití směsi methylcellulózy a anestetika MS-222 (10 ml methylcellulózy a 2,5 ml anestetika) jsou larvy imobilizovány pro snazší pozorování a je možné pořídit fotodokumentaci několika malformací pro použití v protokolech. Celkem se pracuje s negativní kontrolou (ve standardním médiu), s rozpouštědlovou kontrolou (standardní medium s přídatkem rozpouštědla DMSO ve stejném objemu, jaký se nachází v koncentrační řadě) a pět vzrůstajících koncentrací testované látky diuron. Jako pozitivní kontrola je použito 5 vzrůstajících koncentrací ethanolu. Pro statistické vyhodnocení dostanou studenti výsledky od ostatních skupin.

Den 1 – založení testu

Cílem prvního dne je rozpoznání správně se vyvíjejících embryí pro test, nacvičení práce s binokulárem a přenos embryí. Po přenesení dáme misky kultivovat do kultivační komory s řízeným světlem a teplotou (26°C a 14 hodin světlo, 10 hodin tma).

Pozor, nejprve přenášíme embryo do kádinky s roztokem o stejné koncentraci, teprve poté jsou přeneseny do finálních krystalizačních misek (dbáme na co nejmenší rozředění roztoků médiem).



Obrázek 1: embrya 3 hodiny po fertilizaci, vpravo dole je vidět jediné zdravé embryo

Den 2 – pozorování efektů po 24 hodinách vývoje

Nejdříve se naučíme rozpoznávat správně se vyvíjející embrya. Následně všechny efekty v jednotlivých koncentracích zaznamenáme do protokolu. Pozorování proběhne pod binokulárem připojeným k počítači. Efekty bude pozorovat celá skupina na obrazovce. K pokusu pořídíme obrazovou dokumentaci.

Pozorované efekty po 24 hodinách:

Letální efekty: koagulace, neoddělení ocasu embrya od žloutku, nevyvinutí somitů.

Subletální efekty: nevyvinuté oči, deformace, kontrakce a jakékoliv další odchylky od normálu.



Obrázek 2: zdravě se vyvíjející embrya 24 hpf

Den 3 – pozorování efektů po 48 hodinách vývoje

Postup bude stejný jako v den 2. Pozorované efekty se však budou lišit. Navíc budeme pozorovat počty vylíhlých embryí.

Pozorované efekty po 48 hodinách:

Letální efekty: koagulace, nepřítomnost tlukotu srdce, neoddělení ocasu embrya od žloutku, nevyvinutí somitů.

Subletální efekty: různé typy deformací, speciálně pak deformace srdce, páteře, ocasu, změna počtu srdečních tepů za minutu, líhnutí.



Obrázek 3: zdravě se vyvíjející embrya 48 hpf

Den 4 – pozorování efektů po 72 hodinách vývoje

Postup bude stejný jako v den 2.

Letální efekty: koagulace, nevyvinutí somitů, nepřítomnost tlukotu srdce, neoddělení ocasu.

Subletální efekty: různé typy deformací, speciálně pak deformace srdce, páteře, ocasu, změna počtu srdečních tepů za minutu, líhnutí.

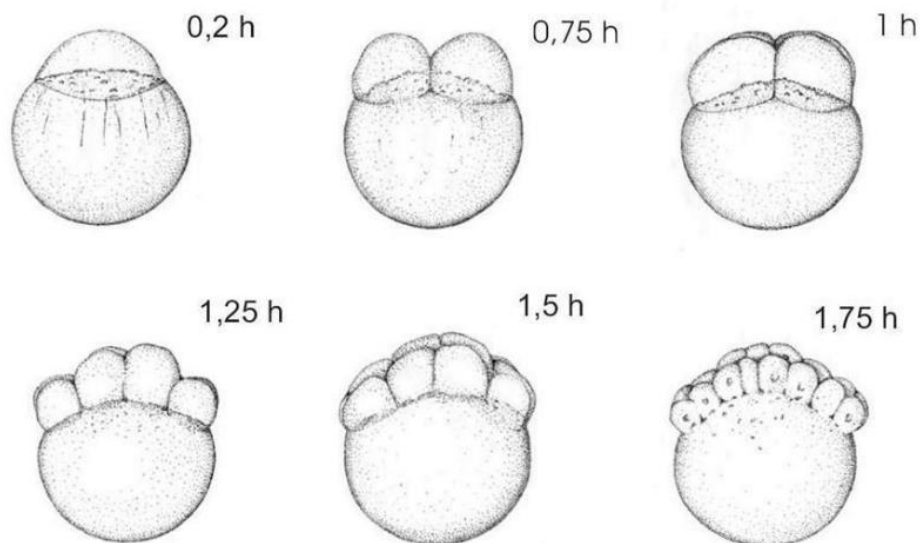
Den 4 – pozorování efektů po 96 hodinách vývoje

Zaznamenáme konečnou mortalitu pro každý replikát, jakož i počet (ne)vylíhlých embryí. Následně jedince přesuneme do kádinky se směsí methylcellulóza+anestetikum a pozorujeme je na Petriho misce pod mikroskopem, zajímavé efekty můžeme vyfotit připojenou kamerou. Zapisujeme různé typy deformací: páteře, ocasu, hlavy, nevyvinutí čelistí, neabsorbovaný žloutkový vak, různé edémy (srdce, žloutkového vaku, ...), nevyvinutý či nenafoklý plynový měchýř.

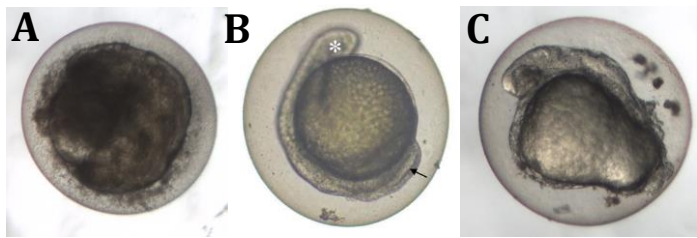
Na závěr testu je provedena eutanázie zebříček za použití pár kapek esenciálního oleje z hřebíčku.

Protokol - Zpracování výsledků

Každý student zpracuje a odevzdá hodnoty EC50, LC50 a NOEC pro všechny pozorované efekty. Je potřeba vypočítat i směrodatnou odchylku. Do výpočtu pro pozdější časy je potřeba začlenit také embrya uhynulá v předchozích dnech. Dále pak spočítat EC50 a NOEC pro jednotlivé subletální efekty. Pro výpočet použijte materiály z bloku 3. Pro NOEC použijte Dunnet, Williams, nebo Wilcoxon test. Pro výpočet EC50 a LC50 použijte běžný postup z přednášek.



Obrázek 4: Správně se vyvíjející embryo (zdroj: norma OECD 236)

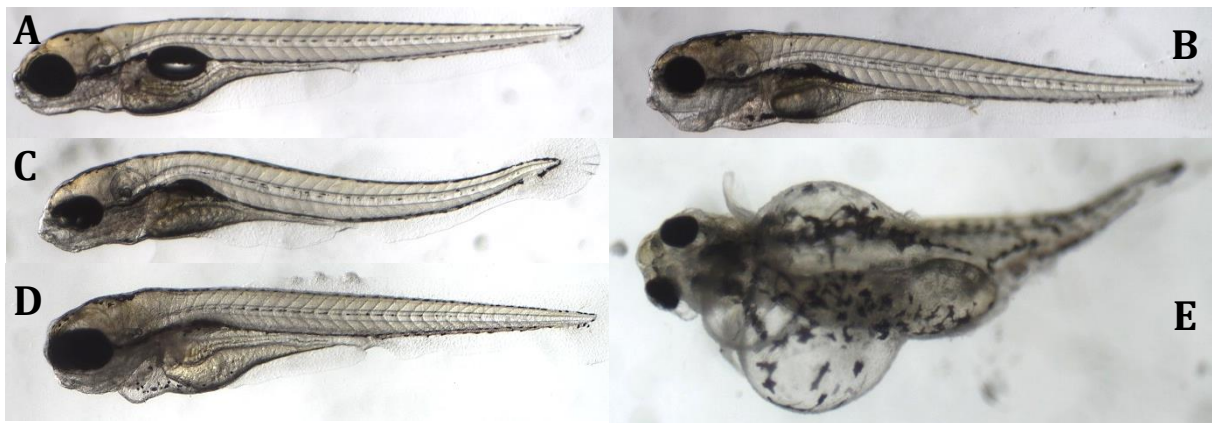


Obrázek 5: špatně se vyvíjející embrya (1dpf)

A koagulace

B neoddělení ocásku od žloutku (zdroj: norma OECD 236)

C Nevyvinutí somitů



Obrázek 6: malformované larvy zebřičky po 96 hpf

A zdravá larva

B malformace čelistí, chybějící plynový měchýř, srdeční edém, špatně absorbovaný žloutkový vak

C Deformace páteře, málo nafouklý plynový měchýř, malformace hlavy

D malformace hlavy, srdeční edém, absence plynového měchýře, nevstřebaný žloutkový vak

E Vážně deformity páteře, ocasu, hlavy, množství edémů