

3.Zkouška inhibice reprodukce s chvostoskokem

Folsomia candida

Zpracováno podle normy ISO 11267 (2011)

Vyučující: marek.sudoma@recetox.muni.cz

Cílem úlohy je naučit se postup standardizovaného běžně používaného půdního biotestu, pomocí kterého se hodnotí vliv kontaminace půd na přežívání a reprodukci chvostoskoka *Folsomia candida*. Tento biotest lze použít pro hodnocení ekotoxicity chemických látek, reálně kontaminovaných přírodních půd, vytěžených sedimentů a hlušiny, kalů z čistíren odpadních vod, odpadů, sutí a drtí a dalších pevných matric.

Princip testu

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

Přístroje a chemikálie

- Rašelina, křemičitý písek, jíla, CaCO₃, kys. boritá, dH₂O, inkoust nebo tuš, sádra, aktivní uhlí, 1M KCl, sušené kvasnice,
- fotoaparát se stativem, lampičky, předvážky, analytické váhy, inkubátor, pH metr,
- skleničky na testy (cca 150 mL) s víčky, exhaustor/dětská odsávačka, štěteček, Petriho misky, vyhodnocovací miska, papír, černá plastová folie, nálevky, filtrační papíry, infuzní lahve, odměrné sklo, mikropipety, nerezové mísy, ochranné pomůcky, drobné lab. vybavení

Založení chovu

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

Synchronizace chovů

Do testů se používají 10 - 12 dní staří juvenilní chvostoskoci, proto je nutné kulturu chvostoskoků sjednotit – synchronizovat. Na nový substrát (sádra s aktivním uhlím v poměru

9:1) přemístíme pomocí dechového exhaustoru větší jedince (= založení synchronizace). Přemístění chvostoskoků na nový substrát obvykle spouští ovipozici. Po 2 dnech dospělé jedince odstraníme a v kultivační nádobě zůstávají jen vajíčka (zkontrolujeme pod binokulárem). Počkáme na vylíhnutí vajíček a poté, co se objeví první juvenilové, odpočítáme 10 – 12 dní.

Příprava umělé půdy

Umělá půda dle norem OECD a ISO má složení:

- 10 % vysušená rašelina přesátá a homogenizovaná přes 2 mm síto
- 20 % kaolinový jíl s obsahem kaolinitu minimálně 30%
- 70 % křemenný písek s minimálně 50% zrn 0.05 – 0.2 mm
- CaCO₃ se přidává tak, aby výsledné pH (KCl) bylo 6 ± 0.5; obvykle 0,5 % CaCO₃

Studenti připraví 1 kg umělé půdy.

Maximální vodní kapilární kapacita půdy

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

Detailní návod pro stanovení WHC je uveden v „SOP-01-CZ Sušina a WHC“

Studenti stanoví 50% WHC umělé půdy, kterou připravili.

Stanovení pH půdy

Studenti ověří, zda je pH_{KCl} sledovaných půd v rozmezí 6 ± 0,5.

Detailní návod pro stanovení pH je uveden v „SOP-02-CZ pH“

Postup testu

Studenti budou stanovovat toxicitu kys. borité pro chvostoskoka ve dvou koncentracích 100 mg a 200 mg/kg půdy.

Kontaminace půdy:

- Studenti připraví zásobní roztok kyseliny borité (vhodnou koncentraci roztoku určí sami na základě požadavků shrnutých v dokumentu: „Příprava na test F. candida“
- Umělou půdu rozdělte na tři části a zbytek ponechte stranou:
 - o 300 g čisté umělé kontrolní půdy (=AS; artificial soil)
 - o 300 g kontaminované půdy; koncentrace 100 mg kys. borité / 1 kg půdy (sušiny)
 - o 300 g kontaminované půdy; koncentrace 200 mg kys. borité / 1 kg půdy (sušiny)
- Připravte kontaminační roztoky smícháním dH₂O a zásobního roztoku kys. borité tak, aby jejich výsledný objem odpovídal přídatku vody na ovlhčení 50% WHC.
- Ovlhčete a zároveň kontaminujte půdu připravenými roztoky
- Dobře promíchejte

Začátek testu:

- Do skleněných nádobek na test navažte po 30 g půdy (připraveno vždy ve čtyřech opakováních).
- Na povrch půdy dejte špetku kvasnic.
- Ze synchronizovaného chovu pomocí exhaustoru odeberte vždy 10 jedinců (dávejte pozor na správný počet!) a vyklopte je do testovací nádoby s půdou. Tento krok vyžaduje jistou praxi. Vyzkoušejte si jedince několikrát spočítat nanečisto.
- Nádoby těsně uzavřete víčky
- Nádoby umístěte do inkubátoru (teplota 20 ± 2 °C).

Průběh testu:

- Každý týden nádoby provětrejte a dosypte špetku kvasic.

Konec testu:

Po 28 dnech od založení testu vyhodnoťte mortalitu a reprodukci pomocí flotační metody.

- připravte fotoaparát se stativem pro fotografování misek. Na stativ připněte lampičky ze dvou stran, aby dobře osvětlovaly počítací misky.
- Do testovací nádoby nalijte vodu z kohoutku a zvortexujte
- Poté beze zbytku přelijte suspenzi do počítací nádoby (zbytky půdy můžete vypláchnout stříčkou).
- K suspenzi kápněte pár kapek inkoustu a zamíchejte potřepáním.
- Vedle misky, kterou budete fotit, umístěte popisek.
- Misky vyfoťte spolu s popiskem alespoň třikrát a mezi focením misky podle potřeby protřepejte.
- Kapalnou část z misek vylejte do výlevky, pevnou část vyklepte do pytle na kontaminovaný odpad.

Vyhodnocení testu a vypracování protokolu o zkoušce:

Každá skupinka studentů samostatně vyhodnotí výsledky pro všechny varianty a opakování.

- Na fotkách spočítejte počet dospělců a juvenilů a porovnejte jejich případný úbytek s kontrolní variantou. Počty uveďte v tabulce, spolu s průměry a směrodatnými odchylkami.
- Stanovte mortalitu dospělců (%) a inhibici jejich reprodukce (%; úbytek juvenilů v porovnání s kontrolou). Zobrazte výsledky graficky. Uveďte jako průměry spolu se směrodatnými odchylkami.
- Výpočet NOEC či EC50 není vzhledem k nízkému počtu sledovaných variant směrodatný. Vypočtete ale, zda mezi kontrolou a testovanými variantami došlo ke statisticky významnému rozdílu v mortalitě a reprodukci. Po ověření shodnosti rozptylu ověřte shodnost výsledku např. studentovým T-testem a výsledek (p-value) uveďte.
- Do protokolu dále uveďte svoje poznámky, postup a cokoliv vám přijde důležité si zapamatovat.