

Manuál k předmětu Obecná ekotoxikologie – cvičení (E5081)

MUNI | RECETOX
SCI



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí - RECETOX
Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita
Brno, Česká Republika
2023

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 dává 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 nasýtí kyslíkem (koncentrace kyslíku by neměla klesnout pod 7 mg/L) a zkontroluje se pH (7,8±0,2)

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 v plastové testovací 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 jamky na oplach přeneseme kapátkem 20 jedinců z nádoby s juvenilů 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

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, odhadneme EC20, EC50, NOEC a LOEC.

Platnost zkoušky

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

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

2. Test klíčivosti semen a inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba* - *Brassicaceae*)

Zkouška akutní toxicity

Zpracováno podle OECD Guideline No.208: Terrestrial plants, growth test

Vyučující: jiri.novak@recetox.muni.cz

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 Guideline 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 byla doba expozice modifikována na 72hodin.

Materiál a chemikálie

- semena hořčice bílé *Sinapis alba* (ideálně 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): 0.11% v/v, 0.33% 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 / miskou
 - 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 (rozmístěte dostatečně od sebe)
 - 5) Petriho misky překryjte potravinovou fólií (zajistí cirkulaci vzduchu a omezí vypařování) a umístěte do temna do inkubační místnosti (pokojová teplota)

Postup 2 - vyhodnocení:

- 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

Obsah protokolu:

- 1) Tabulky s naměřenými hodnotami
- 2) Tabulky s vypočítanými inhibicemi (pentaplikát, průměr, směrodatná odchylka)
- 3) Grafy popisující závislost dávka-odpověď (koncentrace látky v logaritmované podobě)
- 4) Proložení lineární regrese modelu grafy a výpočet hodnot IC_{50} pro klíčivost a inhibici růstu kořene (Excel)
- 5) Závěr – shrnutí a zhodnocení výsledků, odpověď na otázky níže

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					
IC ₅₀ - klíčení (% v/v)					
IC ₅₀ - růst kořene (% v/v)					

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?