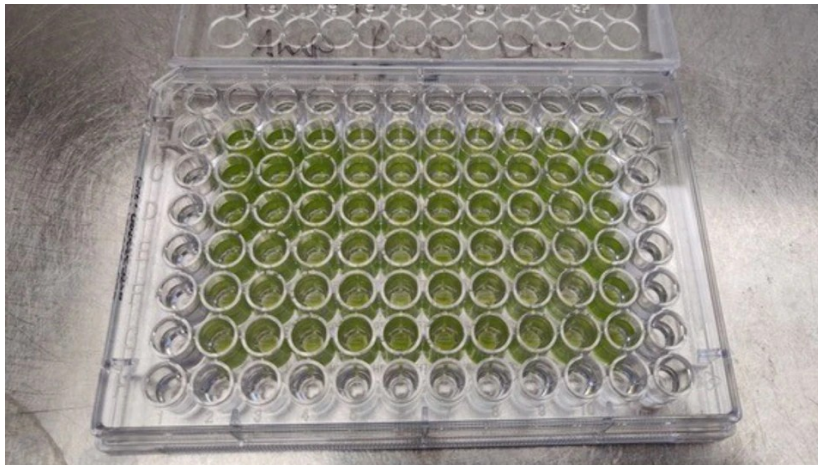


Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*



OECD Guideline 201

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en

OECD/OCDE

201

Adopted: 23 March 2006
Annex 5 corrected: 28 July 2011

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals are periodically reviewed and updated in the light of scientific progress. With respect to Guideline 201, Alga, Growth Inhibition Test (adopted June 1984), the need to extend the Guideline to include additional species and update it to meet the requirements for hazard assessment and classification of chemicals has been identified. The revision has been completed on the basis of extensive practical experience, scientific progress in the field of algal toxicity studies, and extensive regulatory use, which has occurred since the original adoption.

2. Definitions used are given in Annex 1.

PRINCIPLE OF THE TEST

3. The purpose of this test is to determine the effects of a substance on the growth of freshwater microalgae and/or cyanobacteria. Exponentially growing test organisms are exposed to the test substance in batch cultures over a period of normally 72 hours. In spite of the relatively brief test duration, effects over several generations can be assessed.

4. The system response is the reduction of growth in a series of algal cultures (test units) exposed to various concentrations of a test substance. The response is evaluated as a function of the exposure concentration in comparison with the average growth of replicate, unexposed control cultures. For full expression of the system response to toxic effects (optimal sensitivity), the cultures are allowed unrestricted exponential growth under nutrient sufficient conditions and continuous light for a sufficient period of time to measure reduction of the specific growth rate.

5. Growth and growth inhibition are quantified from measurements of the algal biomass as a function of time. Algal biomass is defined as the dry weight per volume, e.g. mg algae/litre test solution. However, dry weight is difficult to measure and therefore surrogate parameters are used. Of these surrogates, cell counts are most often used. Other surrogate parameters include cell volume, fluorescence, optical density, etc. A conversion factor between the measured surrogate parameter and biomass should be known.

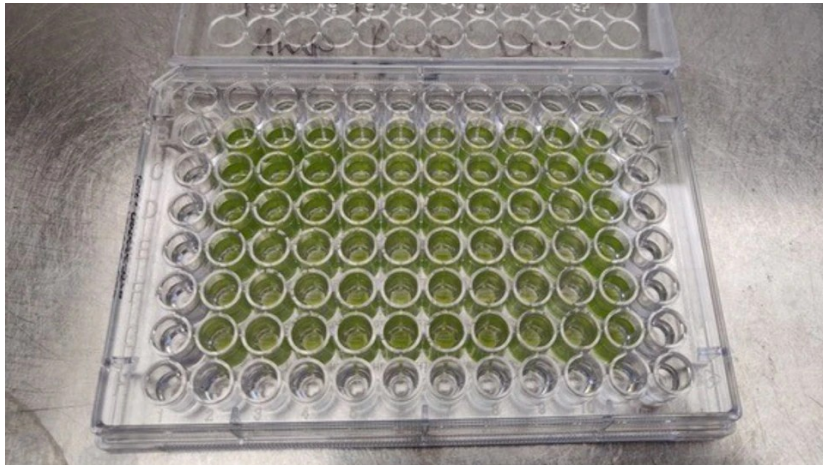
6. The test endpoint is inhibition of growth, expressed as the logarithmic increase in biomass (average specific growth rate) during the exposure period. From the average specific growth rates recorded in a series of test solutions, the concentration bringing about a specified x % inhibition of growth rate (e.g. 50%) is determined and expressed as the E₅₀ (e.g. E₅₀).

7. An additional response variable used in this Guideline is yield, which may be needed to fulfil specific regulatory requirements in some countries. It is defined as the biomass at the end of the exposure

© OECD, (2011)

You are free to use this material for personal, non-commercial purposes without seeking prior consent from the OECD, provided the source is duly mentioned. Any commercial use of this material is subject to written permission from the OECD.

Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*



- Sledujeme růst řas v čase
- Srovnáváme růstovou rychlost řasové kultury ve variantě ošetřené testovanou látkou a kontrolní variantě
- Test trvá 72h
- Řasy kultivujeme v růstovém médiu – Erlenmayerovy baňky nebo 96-ti jamkové mikrotelky
- Vlivem testované látky může dojít k inhibici nebo stimulaci růstu
- Míru růstu můžeme stanovit – počítáním buněk, spektrofotometricky (absorbance chlorofylu A680)

Plánování experimentu – obecně

- Ředění řasové suspenze
- Ředění testované látky – rozpustnost ve vodě, rozpouštědlo?
- Ředění pozitivní kontroly – dichroman draselný (ve vodě)
- Rozložení na desce / potřebný objem
- Načasování měření

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

- Jamka na desce – objem 250 uL
- Jedna jamka = 1 experimentální varianta – zpravidla v několika opakováních (typicky 3)
- Relevantní kontroly – negativní, rozpouštědlová, blanky
- Potřebný materiál, lab. nádobí, chemikálie



125 uL řasová suspenze v médiu

125 uL médium + testovaná látka v rozpouštědle

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

Příklad **triclosan**: cílová koncentrace v jamce **500 ug/L – 166 ug/L – 55.5 ug/L – 18.5 ug/L – 6.2 ug/L** (3x ředící řada)

Triclosan rozpuštěný v MeOH: $c = \text{XX mg/L} ??$

Maximální obsah rozpouštědla v testovém systému – **0.5%**



125 uL řasová suspenze v médiu

125 uL médium + testovaná látka v rozpouštědle **1%** → koncentrace se v jamce 2x sníží (rozředí)



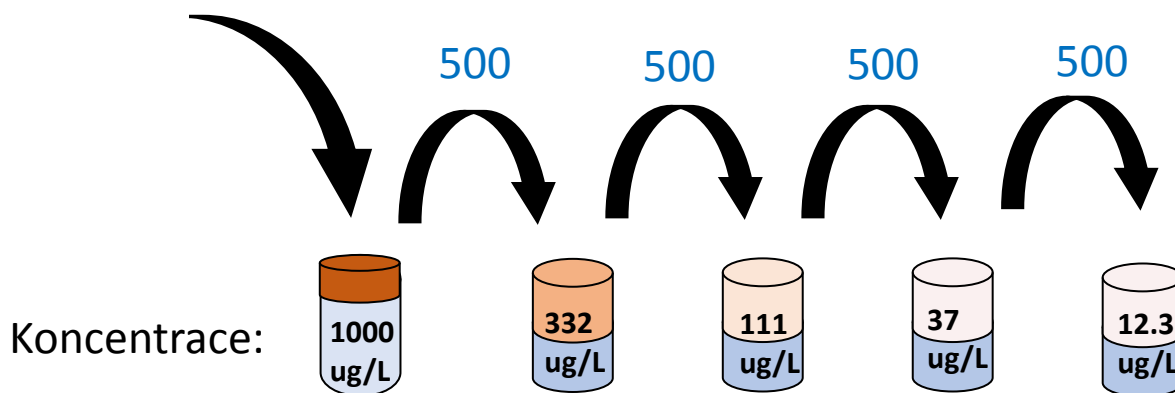
Triclosan
XX mg/L
v MeOH

15 uL (**1%**)

3x ředící řada = ředění 1:2

Potřebný objem na jednu
koncentrační variantu:

$125\text{uL} \times 5 = 625\text{ uL}$
+ rezerva 1000uL

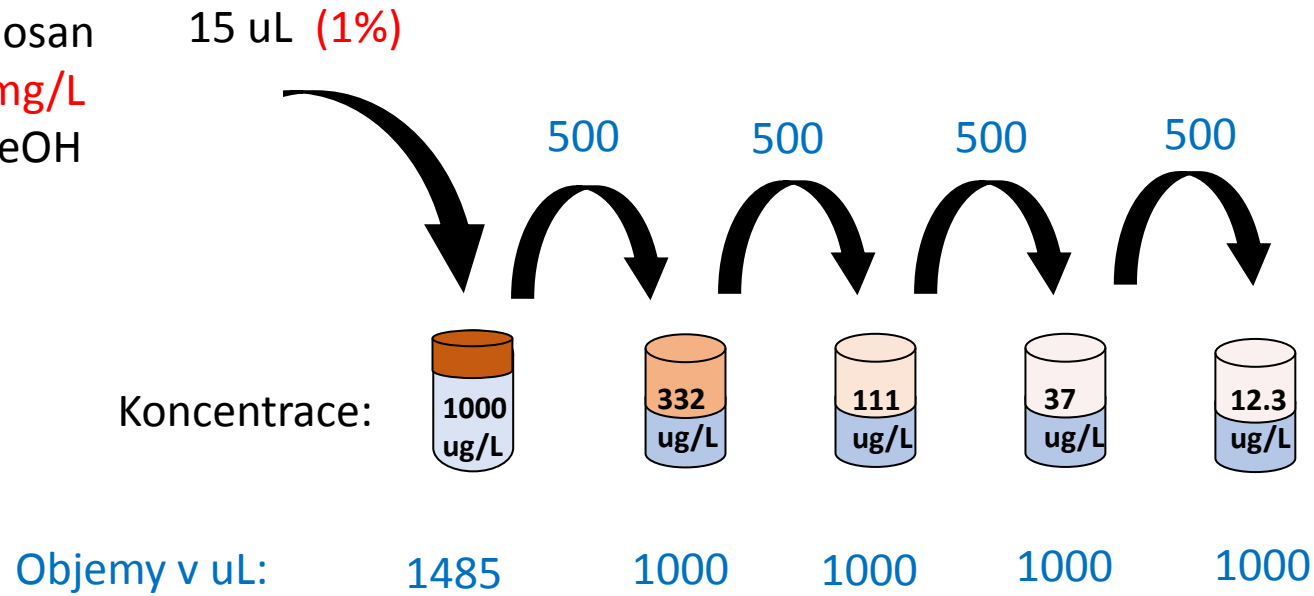


Objemy v uL: 1485 1000 1000 1000 1000



Triclosan
XX mg/L
v MeOH

3x ředicí řada = ředění 1:2

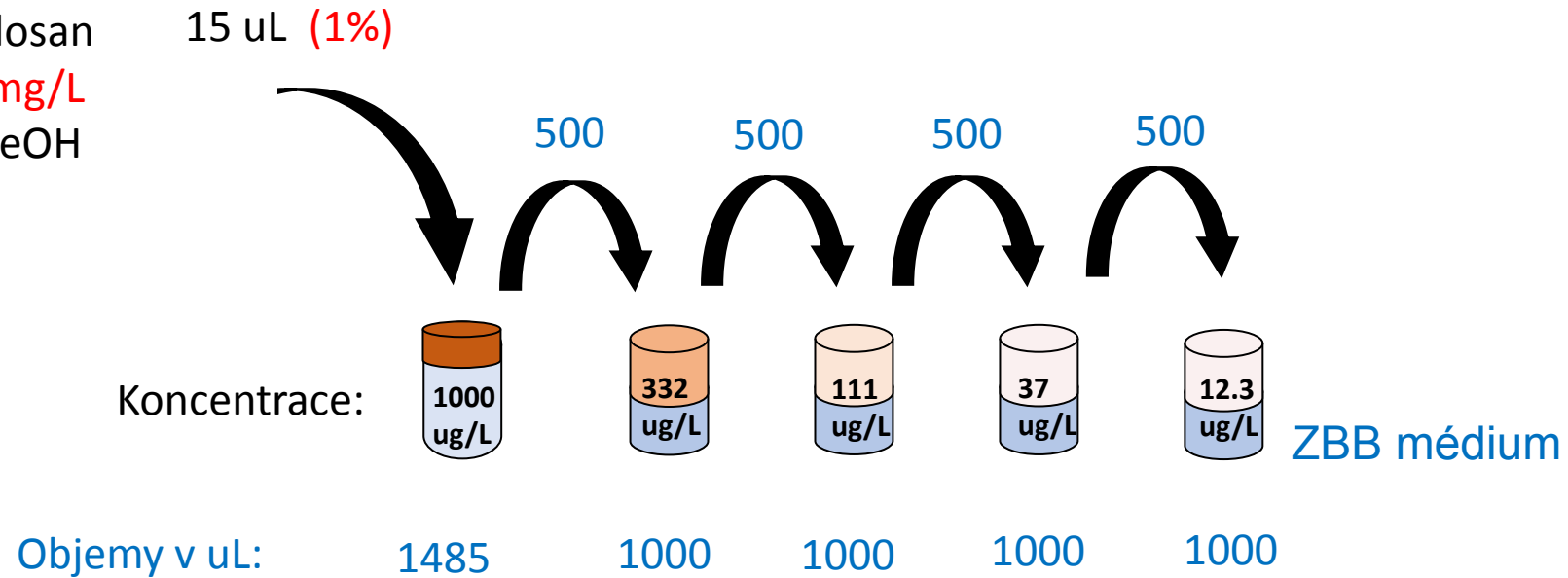


Jak zajistíme ve všech koncentračních variantách triclosanu stejnou koncentraci rozpouštědla (MeOH) **1%**?



Triclosan
XX mg/L
v MeOH

3x ředicí řada = ředění 1:2



Jak zajistíme ve všech koncentračních variantách triclosanu stejnou koncentraci rozpouštědla (MeOH) **1%**?

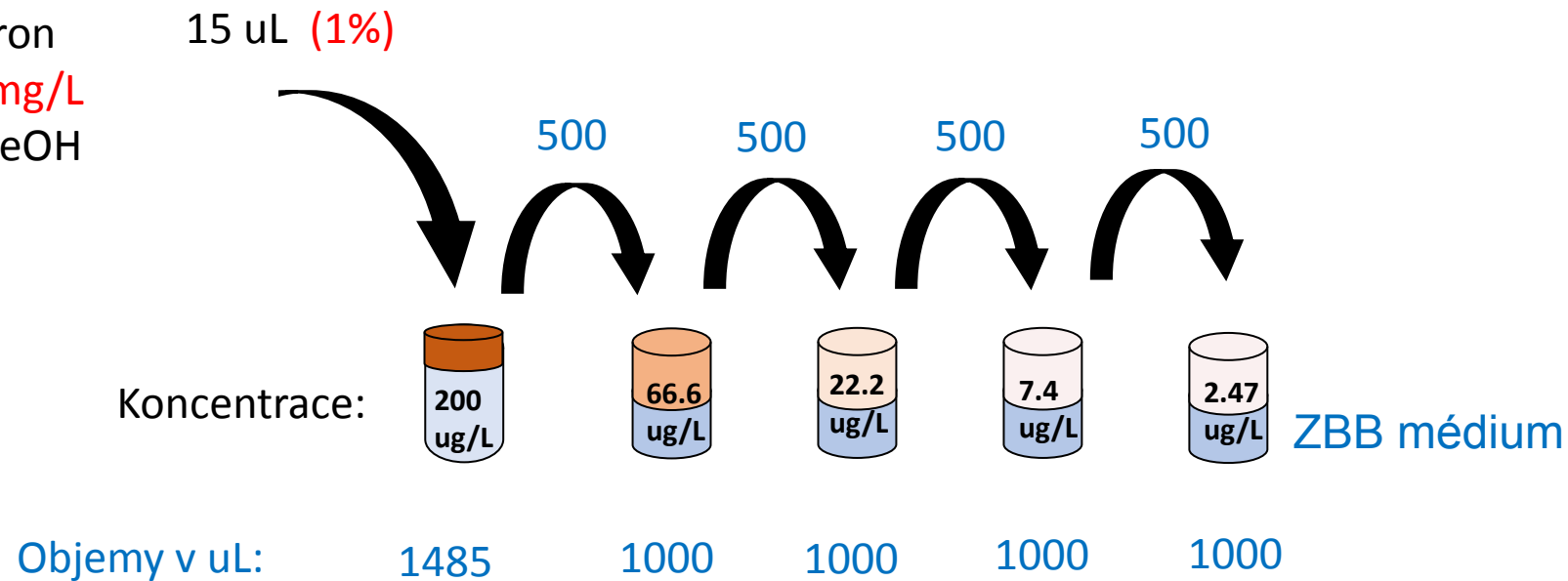
Předmíchám si médium + **1% MeOH** a rozpipetuju do jednotlivých variant – potom postupné ředění

4x1000uL = 4mL + rezerva 5mL + **50uL MeOH**



Diuron
20 mg/L
v MeOH

3x ředicí řada = ředění 1:2



Jak zajistíme ve všech koncentračních variantách triclosanu stejnou koncentraci rozpouštědla (MeOH) **1%**?

Předmíchám si médium + **1% MeOH** a rozpipetuju do jednotlivých variant – potom postupné ředění

$4 \times 1000 \text{ uL} = 4 \text{ mL} + \text{rezerva} = 5 \text{ mL}$

Solvent control = $125 \text{ uL} \times 10 = 1250 + \text{rezerva} = 1.5 \text{ mL}$

Celkem **6.5 mL + 65 uL MeOH**



Dichroman
2 g/L
ve vodě

2x ředící řada = ředění 1:1

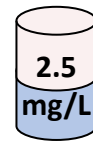
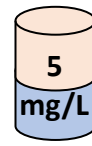
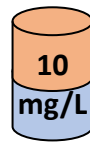
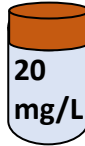
20 uL (1%)

1000

1000

1000

Koncentrace:



ZBB médium

Objemy v uL:

1980

1000

1000

1000

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

Materiál k experimentu

- 1x vanička na multikanál pipetu
- Multikanál pipeta 300uL
- Pipety 5mL, 1000uL, 200uL, 20uL + špičky
- 2x kádinka
- 10 vialek (20mL)
- Řasová suspenze, 50% ZBB médium
- Transparentní PS 96-jamková deska s víčkem
- Methanol/DMSO
- Popisovače
- Zásobní roztok diuronu a dichromanu