

# EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY

**KLÁRA KOBETIČOVÁ**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze  
Fakulta technologie ochrany prostředí  
Ústav chemie ochrany prostředí

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:  
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv  
v životním prostředí“*



### Vyučující:

RNDr. Klára Kobetičová Ph.D.

Ústav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

### Zadání:

Dostanete k otestování vzorek odpadní vody o neznámém složení. Na základě informací z přednášek navrhnete postup provedení ekotoxikologických zkoušek. Jaké analýzy a stanovení musí předcházet vlastnímu testování? Navrhnete vhodnou baterii testů ekotoxicity pro testování dodaného vzorku a své rozhodnutí zdůvodněte.

### Použité materiály:

- Roztok odpadní vody (testovaného léčiva) o neznámém složení a koncentracích přítomných látek
- Kultivační roztoky (připravené vyučujícím dle příslušných norem)
- Laboratorní přístroje (pH metr, oximetr, program NIS Elements, světelný mikroskop, stereo mikroskop) a laboratorní sklo či pomůcky pro provedení jednotlivých experimentů.

---

**Pozn.:** TENTO NÁVOD (ROZSAH, PROVEDENÍ TESTŮ, SLEDOVANÉ PARAMETRY) JE UZPŮSOBEN DÉLCE A ÚČELU PROJEKTU MŠMT Č. C29, NĚKTERÉ POUŽÍVANÉ POSTUPY NEJSOU PROTO V SOULADU S UVEDENOU LITERATUROU A LEGISLATIVNÍMI PŘEDPISY.

## Řasový test ekotoxicity

### 1. Účel

Řasové testy toxicity slouží k testování možných toxických účinků látek a vzorků na vodní producenty. Zelené řasy patří do skupiny necévnatých rostlin hojně se vyskytujících v našich vodách a představujících důležitý článek potravního řetězce. Test umožňuje sledovat nejen inhibiční (toxické) účinky látek, ale také stimulační efekty, tzv. úživnost. Díky rychlému nárůstu řas je možné kromě akutního působení pozorovat i chronické účinky testovaných látek.

### 2. Charakteristika testu

Test spočívá v měření nárůstu koncentrace biomasy řas vzorku ve srovnání s kontrolou tvořenou řasovým živným médiem. Řasy jsou kultivovány za stálých světelných i teplotních podmínek. Délka expozice je 72 hodin (studenti založí vlastní test a vyhodnotí test založený vyučujícím v předepsaném časovém intervalu, tj. 72 hodin před začátkem laboratorního cvičení).

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Testovací organizmus

*Desmodesmus subspicatus*

#### 3.2 Živné médium

Živné médium - řasové médium pro kultivaci řas se skládá z deionizované vody a do ní nadávkovaných předepsaných koncentrací určitých solí (viz 1).

#### 3.3 Přístroje a pomůcky

Termoluminostat (kultivační komora zajišťující stálé osvětlení a konstantní teplotu), mikroskop s počítačí komůrkou Cyrrus nebo Bürker, kultivační Erlenmayerovy baňky, buničtinové zátky, pipety, orbitální třepačka, luminometr, spektrofotometr, kyvety.

### 4. Pracovní postup

Do testované odpadní vody přidejte příslušné množství živin dle instrukcí vyučujícího tak, aby byl zachován optimální poměr všech živin pro testovaný organismus.

Ukázka práce s mikroskopem a s počítačí komůrkou.

Určete v mikroskopu koncentraci buněk v zásobní kultuře řas. Pozorováním v mikroskopu určete počet buněk ve 20 čtvercích. Ze známého objemu jednoho čtverce přepočtete získaný průměrný údaj o počtu buněk ve čtvercích na koncentraci řas v jednom ml. Vypočtete množství inokula řas, které je třeba dávkovat do testovaného toxikantu o objemu 25 ml tak, aby počáteční koncentrace řas v baňkách byla 10 000 ks/ml. Objem testovaného média zmenšete o objem inokula řas. Pipetujte vypočítané inokulum řas a vzorku nebo kultivačního média (kontrola) do erlenmayerových baněk. Baňky uzavřete sterilními zátkami z buničiny. Umístěte je do luminostatu za podmínek  $22 \pm 2$  °C, 6 000 lux - 10 000 lux.

Po 72 hodinách expozice odeberte kapátkem po důkladném protřepání kultivační baňky vzorek řasové kultury do kyvety a změřte absorbanci při vlnové délce 670 nm. Podle dodané kalibrační křivky vypočítejte koncentraci buněk v testovaném vzorku a v kontrole a vypočítejte růstovou rychlost (1) a následně inhibici růstu (2) řas v kontrole a ve vzorku. Na základě získaných dat rozhodněte, jak budete postupovat v následujících krocích testování – zda testování ukončíte anebo zvolíte jiný postup.

Výpočet růstové rychlosti:

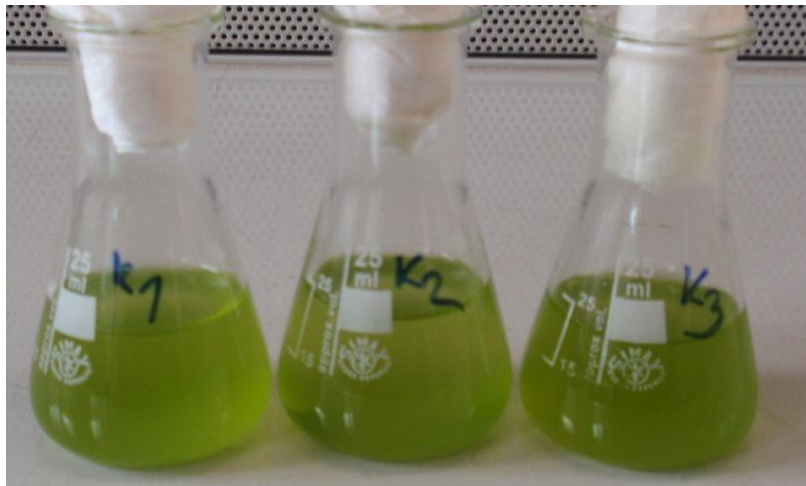
$$\mu = (\ln(N_{72}) - \ln(N_0))/t \quad (1)$$

$\mu$       růstová rychlost  
 $N_0$      koncentrace buněk řas na začátku testu (10 000 ks/ml)  
 $N_{72}$     koncentrace buněk řas po době expozice 72 hodin  
 $t$         doba expozice (72 hodin)

Výpočet inhibice:

$$I = ((\mu_{\text{kontrola}}) - \mu_{\text{(vzorek)}}) / \mu_{\text{(kontrola)}} * 100 \quad (2)$$

$I$             inhibice (%)  
 $\mu_{\text{(kontrola)}}$     růstová rychlost řas v kontrolním vzorku  
 $\mu_{\text{(vzorek)}}$       růstová rychlost řas v testovaném vzorku



**Obrázek 1:** *Desmodesmus subspicatus* – kontrolní vzorky  
(foto: K. Kobetičová, VŠCHT Praha)

### **Test ekotoxicity na okřehku menšímu (*Lemna minor* L.)**

#### 1. Účel

Test se používá k testování toxicity chemických látek a roztoků vůči zástupci vyšších vodních rostlin okřehku menšímu (*Lemna minor* L.). Testuje se, obdobně jako u řas, inhibice růstu. Délka expozice je 7 dní.

## 2. Charakteristika testu

Rostliny okřehku menšího se nechají růst v odpadní vodě a současně se nasadí testovací rostliny do kontrolního živného roztoku. Cílem testu je kvantifikovat účinky látky na vegetativní růst okřehku posouzením počtu stélek - rychlosti růstu a velikosti listové plochy. Studenti založí vlastní test a vyhodnotí test založený vyučujícím v předepsaném časovém intervalu, tj. 7 dní před začátkem laboratorního cvičení).

## 3. Přístroje a pomůcky

### 3.1 Testovací organismy

Kultura okřehku (*Lemna minor* L.)

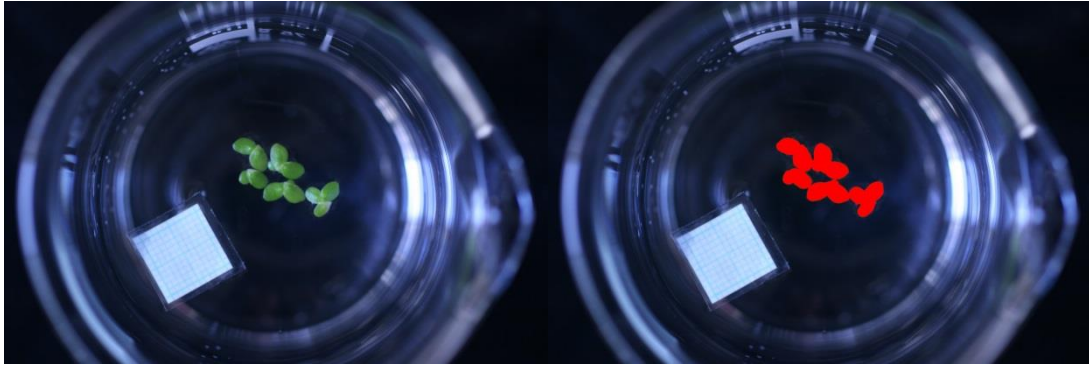
3.2 Kultivační médium podle Steinberga a příslušné soli pro obohacení vzorku – viz příslušná norma.

## 4. Pracovní postup

Do 150ml kádinek nalijte vždy 100 ml vzorku nebo kontrolního média. Do testovacích i kontrolních kádinek přeneste pomocí pinzety 3-4stélkové kolonie okřehku tak, aby v každé kádince byl identický celkový počet stélek, nejlépe 12 stélek. Při přenášení rostlin postupujte opatrně, abyste testovací organismy nepoškodili. Pro každou kádinku pořídte fotografický záznam tak, aby bylo později možné odečíst celkovou plochu stélek v kádince. Na každé fotografii musí být na vodní hladině také plovoucí, voděodolné měřítko. Soubor fotografií opatřete vhodným popisem (jméno skupiny, datum, koncentrace, označení paralely). Kádinky překryjte průhlednou fólií a umístěte do kultivačního boxu s kontinuálním osvětlením. Na začátku i konci testu změřte pH všech vzorků i kontrol a zaznamenejte teplotu. Sledovaná odezva: inhibice růstu, symptomy. Podmínky testu: Teplota:  $24 \pm 2$  °C. Délka expozice: 7 dní. Osvětlení: 6 500 – 10 000 lux.

Pomůcky a chemikálie: standardní živný roztok, destilovaná voda, metanol, 150ml kádinky, potravinářská fólie, kultivační komora s osvětlením, pH-metr, pipety.

Vyhodnocení: sledujte odumřelou tkáň stélek (bílá nebo rozmočená), tzv. nekrózu a zežloutnutí tkáně, tzv. chlorózu. Zaznamenejte také případný rozpad kolonií na 1-2stélkové kolonie, případně odchylky ve velikosti stélek apod. Získané poznatky využijte při závěrečném zhodnocení výsledků. Kromě počítání stélek pořídte opět digitální fotografie testovacích rostlin. Fotografie následně použijete pro výpočet celkové listové plochy okřehku (1) pomocí digitální analýzy obrazu - programu NIS-Elements. Podrobné instrukce k práci s programem získáte od vyučujícího. Vypočítejte inhibici růstové rychlosti okřehku v odpadní vodě ve srovnání s kontrolou (2). Na základě získaných dat rozhodněte, jak budete postupovat v následujících krocích testování – zda testování ukončíte anebo budete v testování pokračovat.



**Obrázek 2:** *Lemna minor* – vlevo kontrolní kádinka rostlinami s mm měřítkem – fotografie před úpravou programem NIS Elements, vpravo ta samá fotografie po úpravě. (Foto: K. Kobetičová, VŠCHT Praha)

### Test akutní toxicity na perloočkách *Daphnia magna*

#### 1. Účel testu

Tento test slouží k testování vlivu chemických látek či roztoků na planktonní organismy.

#### 2. Charakteristika testu

Test je založen na sledování imobilizace perlooček v odpadní vodě po 24 (popř. 48) hodinách expozice. Expozice organismů probíhá při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy za stálé teploty.

#### 3. Materiál a metodika

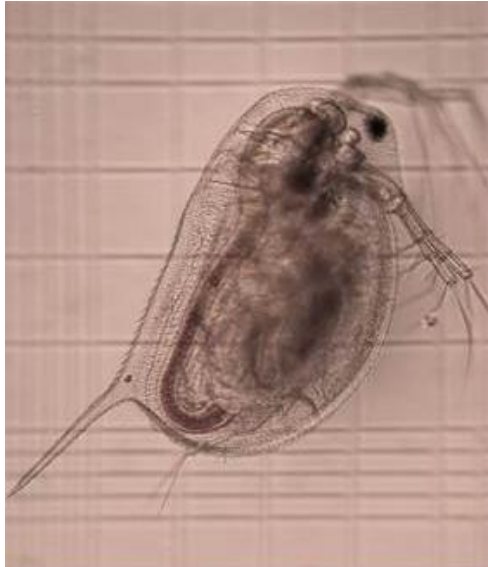
##### 3.1 *Daphnia magna*

3.2 Testovací médium. Pro přípravu testovacího média je nejprve vhodné si připravit zásobní roztoky solí, jejichž složení je popsáno v příslušné normě. K přípravě kultivačního média se použije deionizovaná voda.

#### 4. Pracovní postup

Do zkušebních nádob (kádinek) se připraví se přelije odpadní voda obohacená o příslušné soli. Pro kontrolní skupinu se použije čisté kultivační médium. Perloočky se do nádob vnesou tak, aby celkový počet jedinců na jednu nádobu nepřekročil 10 a aby hustota perlooček nepřekročila 1 ks na 5 ml roztoku. S testem se nasazuje minimálně jedna kontrola. Po stanovené době 24 a 48 hodinách (v našem případě po dvou hodinách) expozice se spočítají imobilizované perloočky. Imobilizací je myšlen stav, kdy se organismy nerozplovou ani po jemné stimulaci do 15 vteřin. Ze získaných dat spočítejte inhibici (2) jedinců v porovnání s kontrolou. Podmínky testu: Teplota -  $(20 \pm 2)$  °C. Délka expozice - 1-2 dny.

Pomůcky a chemikálie: standardní živný roztok, destilovaná voda, Pomůcky a zařízení: 100ml kádinky, kultivační komora s osvětlením, pH-metr, 2 plastová kapátka, plastové sítko, Petriho misce.



**Obrázek 3:** *Daphnia magna* (foto: VŠCHT Praha)

Literatura:

- ČSN EN (2005): Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas. ČNI Praha.
- ISO 20079 (2005): Water quality - Determination of toxic effect of water constituents and waste to duckweed.
- ČSN EN ISO 6341 (1997): Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity.

Výpočty:

## Výsledky:

<b>Organismus</b>	<b>Endpoint (měřený parametr)</b>					
<i>D. subspicatus</i>	Poček buněk (ml)	I (%)	Růstová rychlost			I (%)
<b>Kontrola</b>						
Paralela 1		-				-
Paralela 2		-				-
Paralela 3		-				-
<b>Vzorek</b>						
Paralela 1						
Paralela 2						
Paralela 3						
<i>L. minor</i>	Počet stélek (ks)	I (%)	Růstová rychlost	I (%)	Plocha stélek (mm <sup>2</sup> )	I (%)
<b>Kontrola</b>						
Paralela 1		-		-		-
Paralela 2		-		-		-
Paralela 3		-		-		-
<b>Vzorek</b>						
Paralela 1						
Paralela 2						
Paralela 3						
<i>D. magna</i>	Počet immobilizovaných jedinců				I (%)	
<b>Kontrola</b>						
Paralela 1						-
<b>Vzorek</b>						
Paralela 1						

## Závěry:

- Výsledky testů ekotoxicity ne-prokázaly negativní efekt testované odpadní vody pro .....
- Inhibice-stimulace růstové rychlosti u řas byla .....(%)
- Inhibice-stimulace růstové rychlosti pro počet stélek je .....a pro plochu stélek u okřehku je .....(%)
- Immobilizace jedinců *Daphnia magna* byla v porovnání s kontrolou .....(%)

Na základě výsledků provedených testů ekotoxicity s řasami, okřehkem a dafniemi je-není třeba provést další testování. ....