

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

ÚSTAV EKOLOGIE A CHOROB ZVĚŘE, RYB A VČEL

Standardní operační postup - SOP 03

Terestrické testy ekotoxicity

Stanovení inhibice reprodukce roupic (*Enchytraeus* sp.)

1. Cíl

Tento test slouží ke stanovení vlivu půdních kontaminantů a chemických látek na reprodukci půdního kroužkovce (roupice) rodu *Enchytraeus*.

2. Charakteristika testu

Test bude prováděn s roupicemi druhu *Enchytraeus albidus* nebo *Enchytraeus crypticus* dle normy ISO 16387. Princip testu spočívá v tom, že je určitý počet jedinců roupic vystaven řadě ředění kontaminované půdy nebo rozsahu koncentrací zkoušené látky a sleduje se vliv na jejich přežití a reprodukci.

3. Materiál

3.1 Testovací organismy

Enchytraeus crypticus – V laboratorních podmínkách se roupice chovají na 1 % agaru v plastových Petriho miskách. Misky se uchovávají v termostatu nebo v klimatizované inkubační místnosti při 18 ± 2 °C. Roupice je nutné každý týden vlhčit, krmit nadrcenými ovesnými vločkami na povrch agaru a větrat.

3.2 Chemikálie a suroviny

- Bengálská červeň
- Etanol

Tento dokument vznikl za podpory projektu IVA FVHE VFU Brno č. 2018FVHE/2190/33.

Řešitelé: Mgr. Daniela Hlávková a Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.

- Kyselina boritá
- Artificiální substrát - umělá půda připravená dle směrnice OECD (křemenný písek, kaolinitový jíl, rašelina, CaCO₃)

3.3. Kontrola – artificiální půda

Jako kontrola se použije uměle připravená směs se zaručenou konstantní kvalitou dle směrnice OECD. Kontrolní půda se připraví smícháním a důkladnou homogenizací 69 % hmotnostních křemenného písku, 20 % hm. kaolinitového jílu, 10 % hm. rašeliny a 1% hm. CaCO₃ pro úpravu celkového pH na $6,0 \pm 0,5$. Vodní kapacita půdy (WHC) je udržována v rozmezí 40–60 %..

3.4. Přístroje a pomůcky

- Petriho misky
- odměrné baňky
- skleněné zkušební nádoby s víčkem
- analytické váhy, s přesností nejméně na 1 mg
- pH metr
- pinzety, háčky, kličky
- fotoaparát s makroobjektivem
- nastavitelné automatické pipety
- temperovaná kultivační komora s osvětlením
- software pro statistické zpracování dat (TOXICITA 3.1)

4. Podmínky testu

- Dospělé roupice s vajíčky v oblasti opasku, aklimatizované v umělé půdě nejméně 24 h před zkouškou
- množství zkoušené směsi či kontroly v jedné nádobě: 20 g
- 10 roupic na zkušební nádobu
- krmení: rozemleté ovesné vločky, množství přizpůsobit příjmu potravy
- teplota: 20 ± 2 °C
- pH $6,0 \pm 0,5$
- vlhkost umělé půdy i zkoušené směsi: 40–60 %

Tento dokument vznikl za podpory projektu IVA FVHE VFU Brno č. 2018FVHE/2190/33.

Řešitelé: Mgr. Daniela Hlávková a Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.

- osvětlení: fotoperioda 16 h světlo/8 h tma
- délka expozice: 28 dní

5. Pracovní postup

Před založením testu je třeba roupice přemístit pro aklimatizaci do umělé půdy. V testu se používají dospělí jedinci přibližně stejné velikosti.

- Připravíme koncentrační řadu testované látky (3 - 5 koncentrací)
- do zkušebních nádob navážíme po 20 g předem připravené umělé půdy
- půdu kontaminujeme připravenými koncentracemi testované látky
- kontrolu tvoří umělá půda bez přídavku testované látky
- pomleté ovesné vločky vmícháme do půdy
- do nádob vložíme 10 roupic s viditelným opaskem
- nádoby zvážíme na začátku zkoušky a poté jednou týdně – úbytek hmotnosti se vyrovnává odpovídajícím množstvím deionizované vody
- sklenice s roupicemi překryjeme parafilmem (potravinářskou fólií) a vložíme do inkubátoru
- dvakrát týdně parafilm odkryjeme (provzdušnění nádoby).

Test probíhá v inkubační místnosti při teplotě 18 ± 2 °C. Po 28 dnech expozice se počítá počet jedinců.

- Do každé testovací nádoby přidáme 5 ml etanolu a destilovanou vodu tak, aby dosahovala cca 3 cm nad povrch půdy
- přidáme 200 – 300 µl roztoku Bengálské červeně (0,01 g v 1 ml etanolu)
- nádoby zavřeme víčky a směs několik vteřin protřepáváme
- nádoby se vzniklou suspenzí necháme do druhého dne stát při laboratorní teplotě
- další den vyhodnotíme počet roupic v testovacích nádobách.

Po obarvení jsou dospělé roupice červené, jednoznačně větší než velké množství přítomných juvenilů. Všechny nalezené roupice jsou považovány za přeživší, mrtvé organismy se rychle rozkládají.



Obrázek č. 1: obarvení roupic

6. Test na standardu

Jednou ročně se roupice testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testu. Touto referenční látkou je kyselina boritá. Navržená rozpětí hodnot EC_{50} kyseliny borité jsou 100–300 mg/kg.

7. Vyhodnocení testu

- Do nádoby vymačkáme trochu bílé akrylové barvy a přilijeme destilovanou vodu
- mícháme, dokud nevznikne mléčně bílý roztok
- do skleničky si nalijeme koloidní roztok Ludox©, přilijeme část (20 ml) bílého roztoku a opět pečlivě zamícháme
- do Petriho misky přilijeme obsah skleniček s obarvenými roupicemi a asi 50 ml bílé obarveného Ludoxu
- mírně s Petriho miskou pohybujeme, aby se promíchaly vrstvy Ludoxu s obsahem skleničky s roupicemi.

Při správném promíchání dojde k vynesení obarvených roupic na povrch.

- povrch vodní hladiny s roupicemi vyfotografujeme a na pořízeném snímku spočítáme počet dospělců a juvenilů.



Obrázek č. 2: Petriho misky s roupicemi po obarvení Ludoxem

Výsledné hodnoty reprodukčních parametrů jedinců vystavených zkoušené směsi se porovnají s hodnotami reprodukčních výsledků v kontrole, vypočítá se inhibice reprodukce v procentech, mortalita dospělců v procentech a následně hodnota 28dEC₅₀ (efektivní koncentrace, která vyvolá po 28 dnech expozice 50% inhibici reprodukce testovaných jedinců).

8. Validace testu

Výsledky se považují za platné, jestliže v kontrole jsou splněny následující podmínky:

- na konci testu nemá mortalita dospělých roupic překročit v průměru 20 %,
- na konci testu by měl být průměrný počet nedospělých jedinců větší než 25 na jednu zkušební nádobu za předpokladu, že na začátku testu bylo do každé zkušební nádoby vloženo 10 dospělých roupic,
- variační koeficient vypočítaný pro údaje o reprodukci nemá být na konci testu vyšší než 50 %.

9. Použitá literatura

ČSN EN ISO 16387 (2014): Kvalita půdy – Vliv znečišťujících látek na *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Stanovení vlivu na reprodukci.

OECD GUIDELINE 220 (2004): *Enchytraeid Reproduction Test*