

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
ÚSTAV EKOLOGIE A CHOROB ZOOZVÍŘAT, ZVĚŘE, RYB A VČEL

Test akutní toxicity (96 hodinový test) - Nitěnka obecná *Tubifex tubifex*

1. Cíl

Tento test slouží ke stanovení akutní toxicity (24hLC50, 48hLC50, 72hLC50 a 96hLC50) síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Síran měďnatý je doporučenou referenční látkou a akutní test slouží k ověření citlivosti nitěnek *Tubifex tubifex*, k potvrzení jejich dobrého zdravotního stavu a tedy i platnosti testů toxicity. Stanovení vlivu referenční látky síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se provádí 1krát měsíčně.

2. Charakteristika testu

Test bude prováděn s červem *Tubifex tubifex* dle metodiky Maestre a kol. (2009) a doporučení ASTM (2005). Princip testu spočívá v tom, že je určitý počet jedinců nitěnek vystaven rozsahu koncentrací zkoušené látky a sleduje se vliv na jejich mortalitu.

3. Materiál

3.1 Testovací organismy

Tubifex tubifex – ve stáří 4–5 týdnů, přibližně stejné velikosti

3.2 Testované chemikálie

Jako standardní látka pro ověření vitality nitěnek a kontrolu správnosti testu je použit roztok pentahydrátu síranu měďnatého **$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck)**, jehož hodnoty akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním. Zjištěné hodnoty akutní toxicity síranu měďnatého jsou v rozsahu:

24h LC50 = 0,11– 0,28 mg.l⁻¹

48h LC50 = 0,07– 0,19 mg.l⁻¹

72h LC50 = 0,04– 0,1 mg.l⁻¹

96h LC50 = 0,03– 0,8 mg.l⁻¹ Maestre a kol. (2009).

3.3 Přístroje a pomůcky

- kádinka 250 ml (30x)
- odměrná baňka 500 ml (5x)
- odměrná baňka 1000 ml (1x)
- entomologická pinzeta
- preparační jehla
- Petriho misky
- nastavitelná automatická pipeta
- špičky
- analytické váhy
- Parafilm[®]
- inkubátor

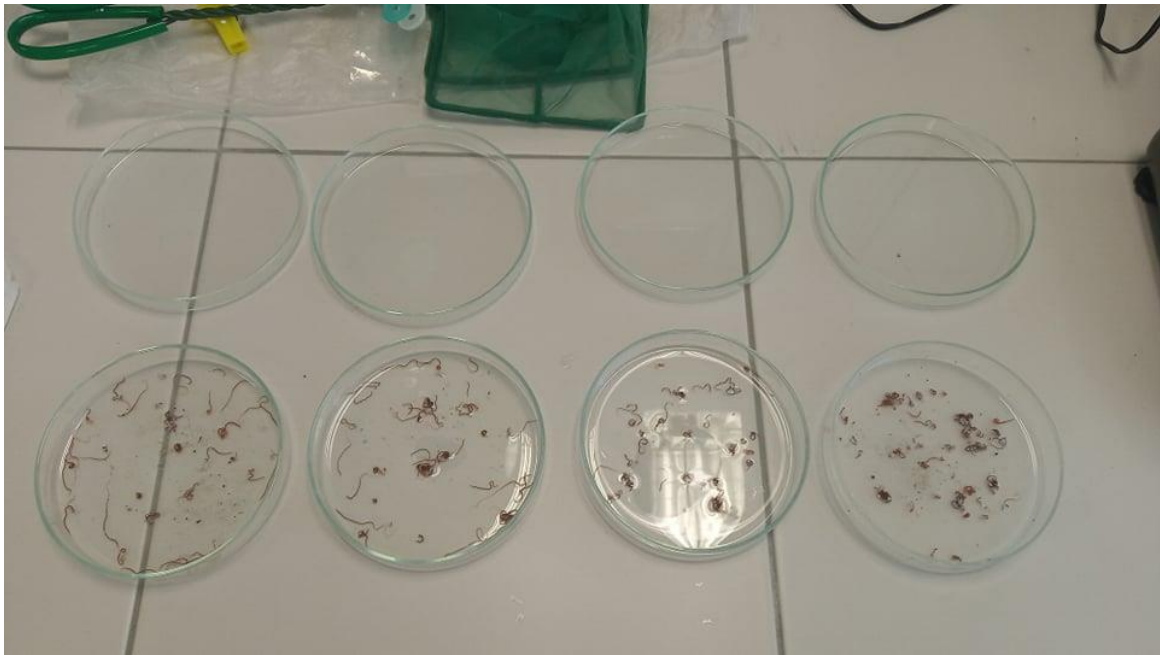
4. Podmínky testu

- Nitěnky ve stáří 4–5 týdnů, přibližně stejné velikosti
- množství zkoušené látky či kontroly v jedné kádince: 100 ml
- 5 nitěnek na zkušební kádinku
- inkubátor:
 - teplota: 20–22 °C
 - bez světla
- bez krmení a výměny roztoků
- délka expozice: 96 hodin

5. Pracovní postup

5.1 Odchyt nitěnek

Před samotným testem je potřeba si oddělit z akvarijního chovu část nitěnek a přemístit je pomocí pinzety do Petriho misek s malým množstvím destilované vody. Vybírají se přibližně stejně velké nitěnky.



Obrázek č. 1: nitěnky v Petriho miskách určené k testování

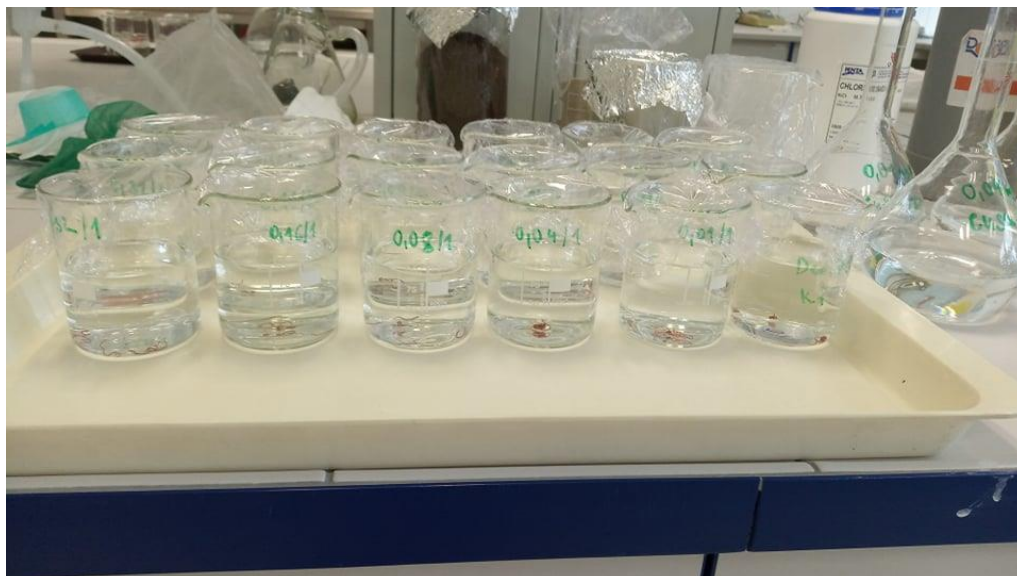
5.2 Příprava referenční látky

- Připravíme koncentrační řadu testované látky (5 koncentrací)
- Do kádinky navážíme 1 mg (0,001 g) síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, v cca 50 ml destilované vody rozpustíme navážku
- roztok přelijeme do odměrné baňky (1000 ml) a doplníme destilovanou vodou po rysku
- takto připravíme **zásobní roztok o koncentraci 1 mg.l⁻¹**
- tento zásobní roztok se dále ředí do **500 ml odměrných baněk**, až se připraví koncentrační řada o koncentracích: **0,01; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg.l⁻¹**
- **koncentrace 0,01 mg.l⁻¹**: 5 ml zásobního roztoku + 495 ml destilované vody
- **koncentrace 0,04 mg.l⁻¹**: 20 ml zásobního roztoku + 480 ml destilované vody
- **koncentrace 0,08 mg.l⁻¹**: 40 ml zásobního roztoku + 460 ml destilované vody
- **koncentrace 0,16 mg.l⁻¹**: 80 ml zásobního roztoku + 420 ml destilované vody
- **koncentrace 0,32 mg.l⁻¹**: 160 ml zásobního roztoku + 340 ml destilované vody



Obrázek č. 2: Připravená koncentrační řada

- každou koncentraci rozdělíme po 100 ml do kádinek o objemu 250 ml, tím získáme 5 opakování od každé koncentrace
- připravíme 5 opakování kontroly, tj. 100 ml destilované vody do každé 250 ml kádinky
- každou kádinku překryjeme Parafilmem®, abychom zabránili vypaření, a vložíme do inkubátoru.



Obrázek č. 3: Založený test s nitěnkami

5.3 Vlastní testování

- testování probíhá při teplotě 20–22 °C
- z Petriho misky se rychle, ale opatrně pomocí entomologické pinzety dá osušit na filtrační papír 5 přibližně stejně velkých nitěnek, aby nedošlo k naředění roztoku
- do každé kádinky se přenese 5 nitěnek
- a napipetuje se 100 ml vzorku od každé koncentrace
- pro každou koncentraci se zvolí 5 opakování
- připravíme i 5 opakování s destilovanou vodou – kontrola
- celkem budeme mít k otestování 30 kádinek (5 koncentrací po 5 opakování a 5 kontrol)
- po 24 hodinách zkontrolujeme a zaznamenáme počet nehybných jedinců
- po 96 hodinách test vyhodnotíme
- tyto údaje se použijí pro výpočet akutní toxicity, který se vyjádří pomocí LC50
- nitěnky z testu se vyřadí, nedají se použít pro další testování.

6. Vyhodnocení testu

- jako endpoint se hodnotí nehybnost a mortalita (nitěnky nejeví známky pohybu do 10 s ani po kontaktu s preparační jehlou),
- spočítá se počet nehybných organismů po 24, 48, 72 a 96 hodinách,
- výsledky testů se statisticky vyhodnotí, např. pomocí programu TOXICITA.

Výpočet

Výsledkem je hodnota akutní toxicity, stanovená na základě počtu uhynulých a nehybných jedinců nitěnek po expozici v referenční látce po 24, 48, 72 a 96 hodinách v porovnání s kontrolou.

7. Použitá literatura

ASTM E1706-05 (American Society for Testing and Materials), 2005. Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediments-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. ASTM, Philadelphia.

MAESTRE Z., MARTINEZ-MADRID M., RODRIGUEZ P. (2009): Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72** (8), 2083–2089.

MÉNDEZ-FERNÁNDEZ L., MARTÍNEZ-MADRID M., RODRIGUEZ P. (2013): Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects, *Ecotoxicology*, **22** (10), 1445–1460.