

Nitěnka obecná

Tubifex tubifex



Charakteristika a chov nitěnek

Vypracovala: Bc. Martina Karlíková, DiS.
Mgr. Daniela Hlávková, Ph.D.
prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.

Projekt IVA 2020

2020FVHE/2190/40

Charakteristika

- Nitěnka obecná je drobný sladkovodní červ o velikosti cca 3 cm.
- Délka života: 1-6 týdnů dle teploty.
- Přirozeně se vyskytují v organicky znečištěné (hnilíci), stojaté nebo mírně proudící vodě.
- Žijí na dně zavrtné do bahna.
- Zdrojem potravy jsou bakterie a organické zbytky obsažené v bahně.

Taxonomie

Říše	Živočichové (<i>Animalia</i>)
Kmen	Kroužkovci (<i>Annelida</i>)
Třída	Opaskovci (<i>Clitellata</i>)
Podtřída	máloštětinatci (<i>Oligocheta</i>)
Řád	nitěnkovci (<i>Plesiopora</i>)
Čeľad'	nitěnkovití (<i>Tubiciciade</i>)
Rod	nitěnka (<i>Tubifex</i>)

Charakteristika

- Dýchá za pomoci svého těla, kterým přijímá kyslík.
- V přední části těla je spojením několika článků vytvořen tzv. opasek, který slouží k rozmnožování.
- Články těla jsou pokryté drobnými štětinkami, které jim umožňují pohyb.
- Využívá se jako indikátor znečištění (podle množství výskytu).
- Tělo živé/zdravé nitěnky je zbarvené do červena díky hemoglobinu.
- Uhynulá nitěnka je šedo-bílá.

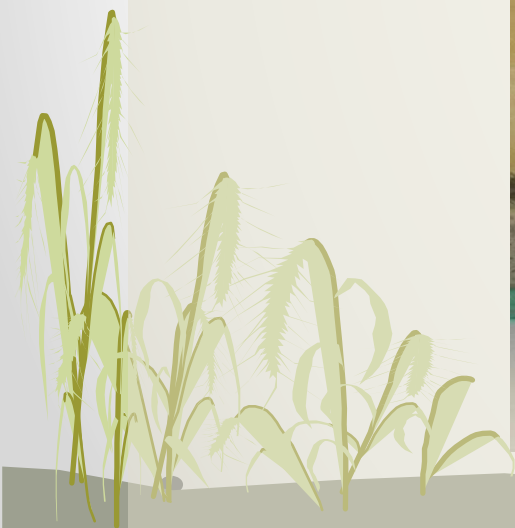
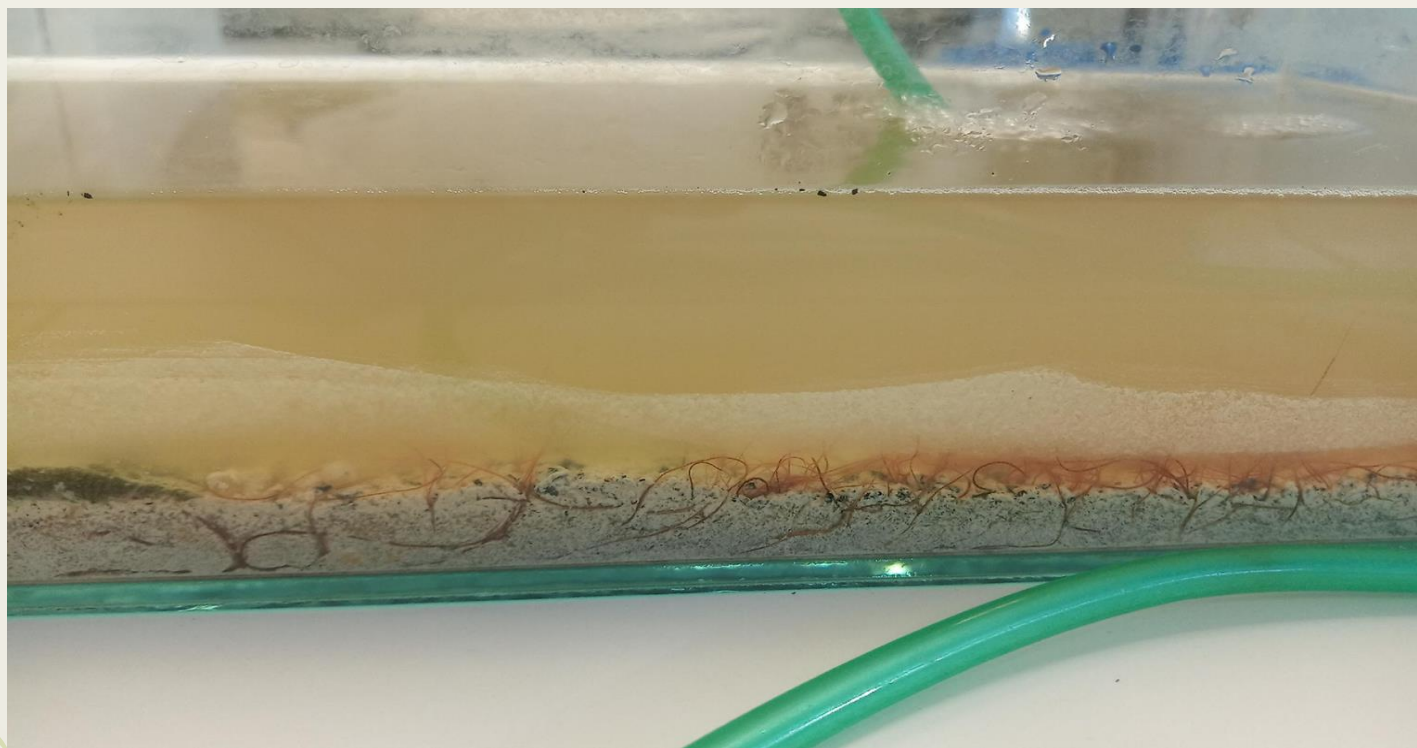


Tato fotka od autora Neznámý autor s licencí [CC BY-ND](#)

Podmínky chovu

- Optimální podmínky pro přežití:
- teplota vody v rozmezí 5 – 28°C a pH vody 5 – 9,
- nepřetržitá aerace vody

Chov založen podle normy OECD Guideline 207.



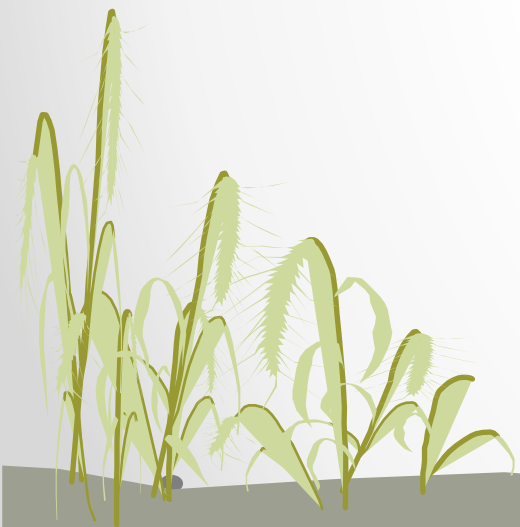
Příprava a uchování sedimentu

- Světelný režim: 16 hod světla: 8 hod tma Výměna sedimentu: za 12 týdnů.
- Teplota okolního vzduchu $20 \pm 2 \text{ C}^\circ$
- Krmení: 2x týdně + 1x týdně čištění a doplnění destilované H₂O

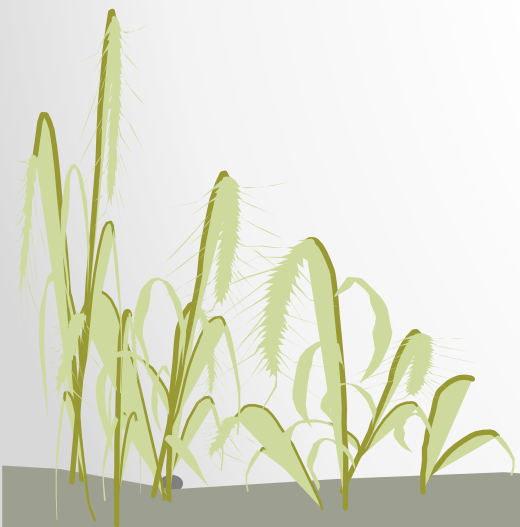
Složka	Charakteristika	% suchého sedimentu
Rašelina	Usušená na vzduchu, velikost částic < 0,5 mm	$2 \pm 0,5$
Písek	velikost částic < 2 mm, ale > 50 % částic v rozsahu 50–200 μm	76
Jíl	Obsah kaolinitu > 30 %	22 ± 1
Uhličitan vápenatý	Chemicky inertní, dodává se do suchého sedimentu	0,05 – 1
Destilovaná voda	Dodává se do suchého sedimentu	30 – 50

- **pH půdy** bylo upraveno pomocí uhličitanu vápenatého na $6 \pm 0,5$.

Příprava půdy



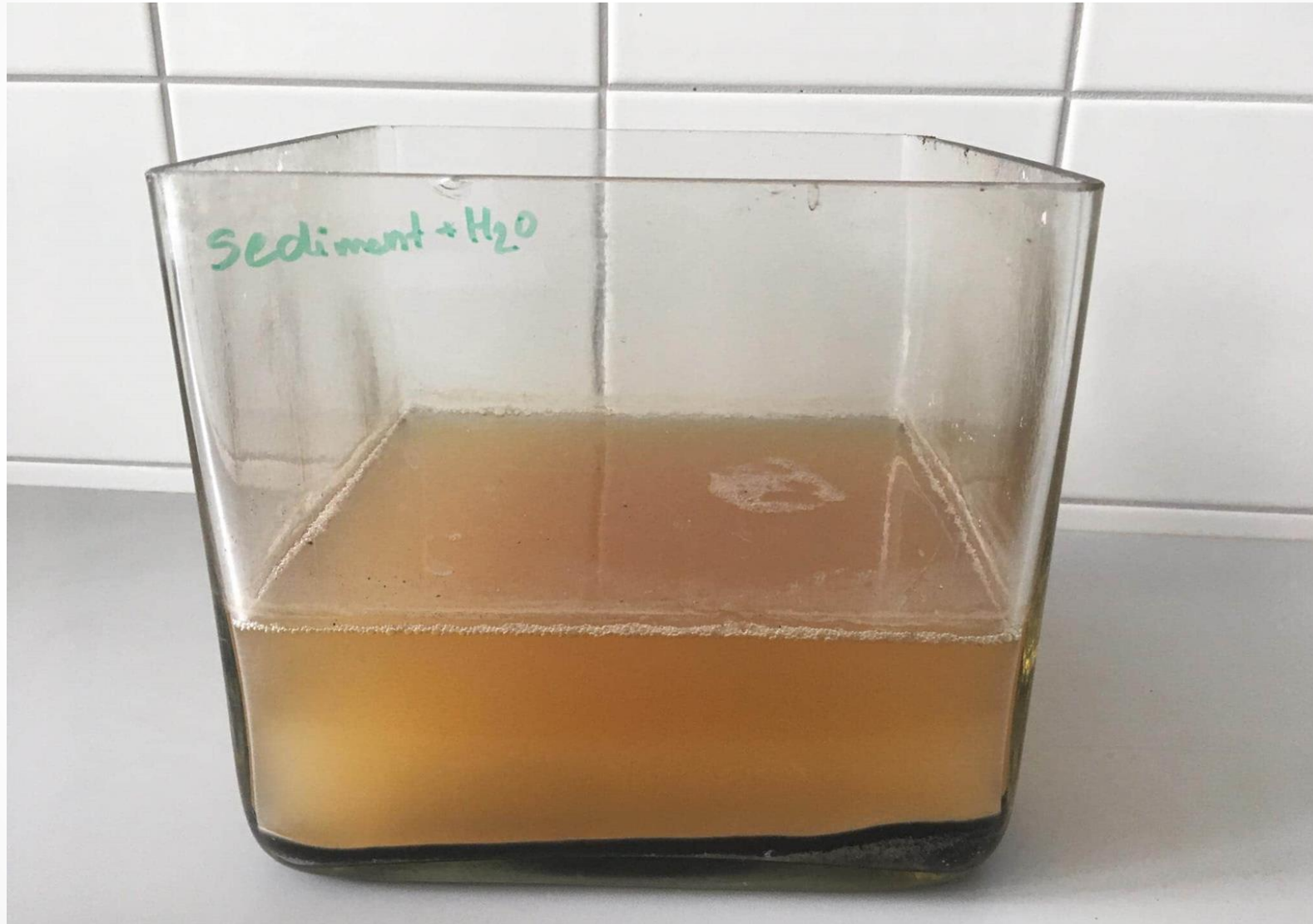
Průběžná úprava pH – před přidáním jílu



Konečná úprava pH půdy



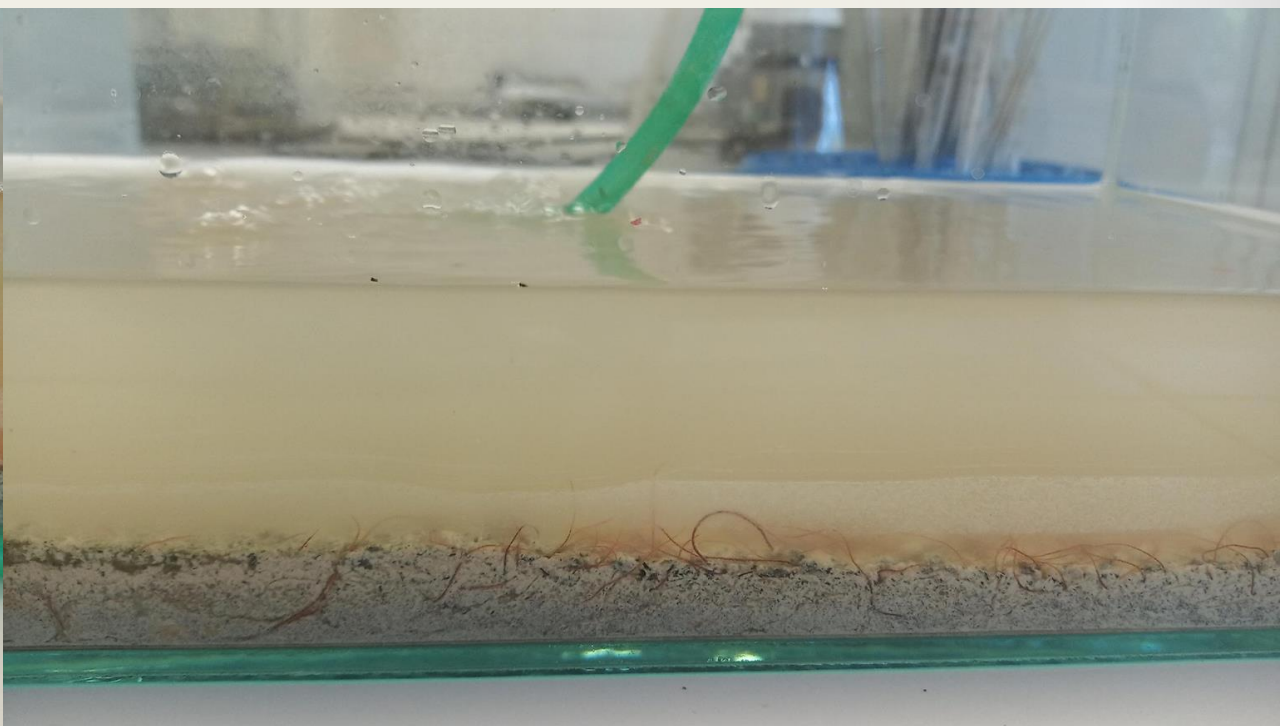
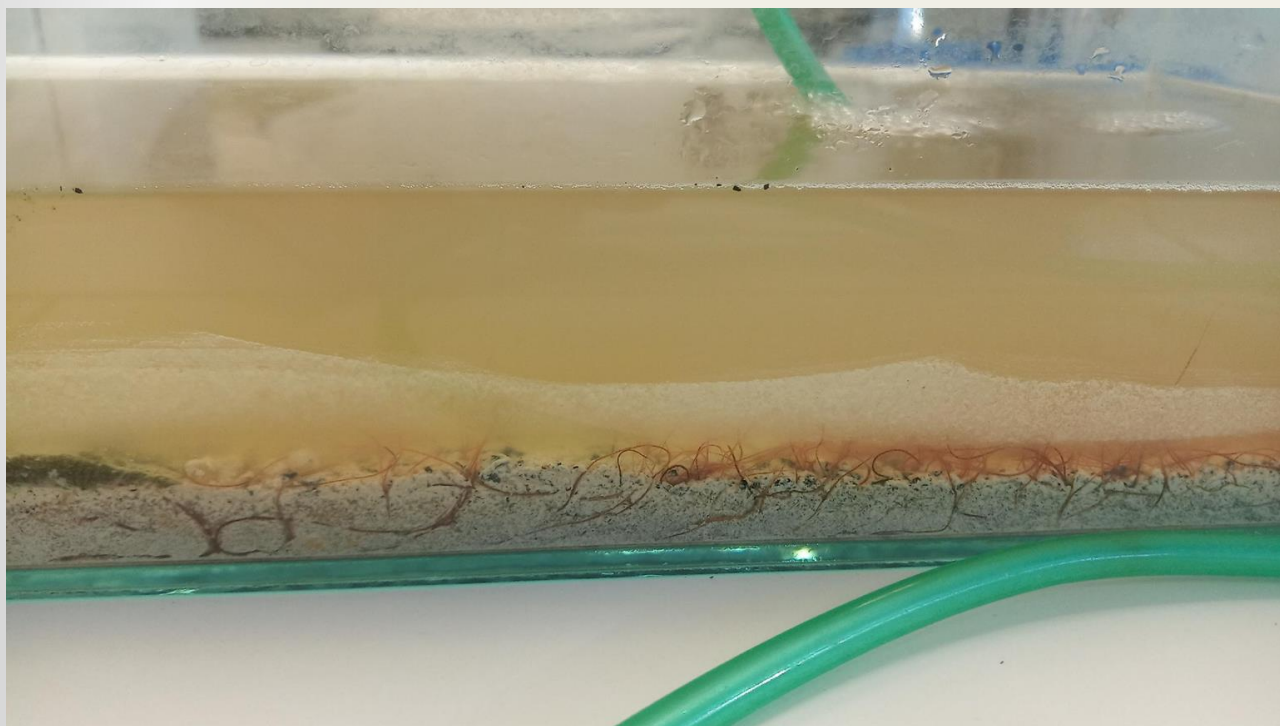
Když se nedaří



Když se podaří Čištění a krmení

- Před

- Po



Test akutní toxicity

- Jednoduchý a rychlý test.
- Poskytuje reprodukovatelné výsledky.
- Pro látky rozpustné/nerozpustné ve vodě.
- Provedení na destičkách, umělé půdě nebo na papíře.
- Poskytuje informace o toxicitě přirozeného prostředí, ve kterém se nitěnky vyskytují.
- LC 50: letální koncentrace: množství testované látky, která usmrtí 50 % testované populace.

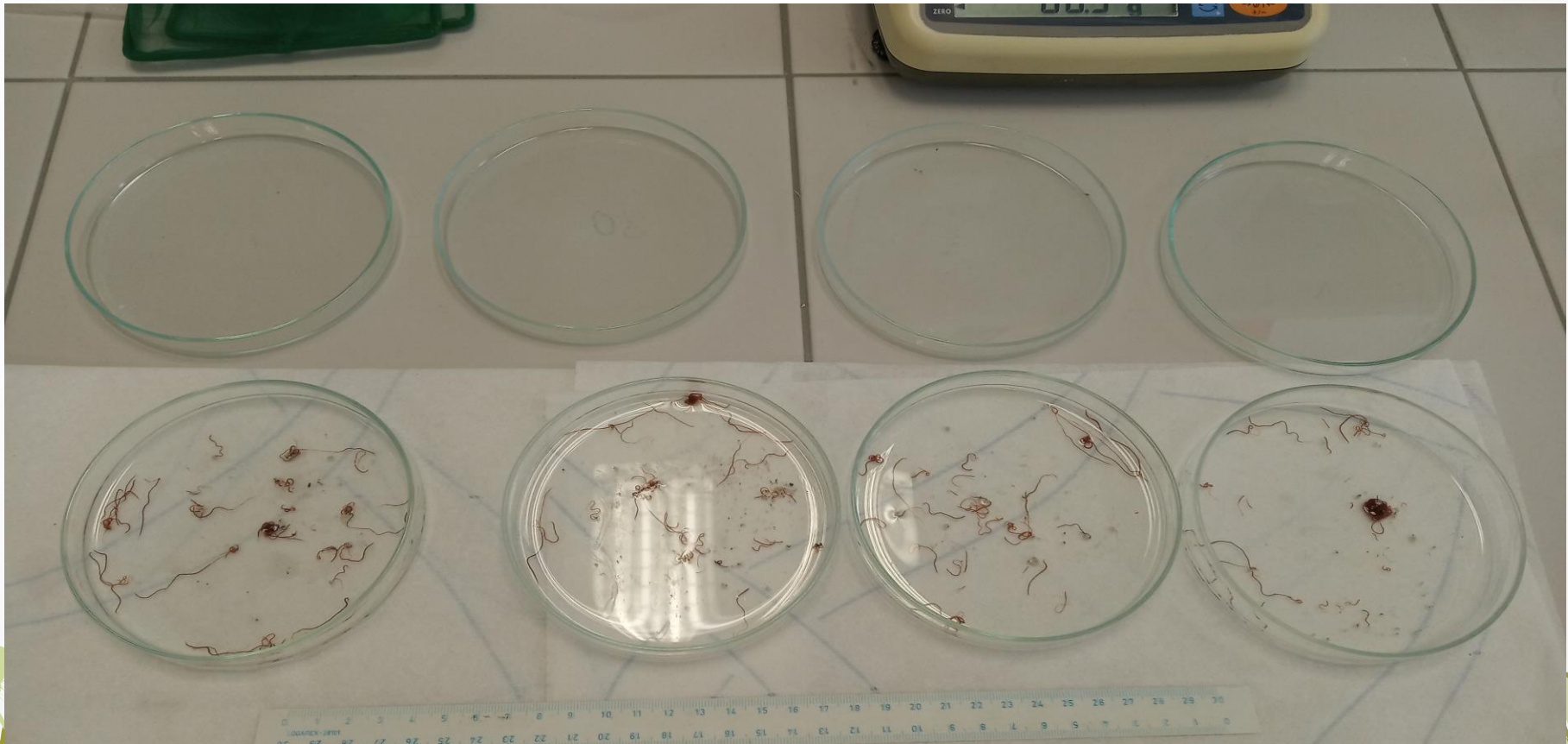
3 minutový test

- Probíhá na destičkách.
- 3' EC 50 : 0,122 – 0,152 mol/ l **MnCl₂ 2H₂O** (standardní látka).
- Koncentrační řada: 25; 20; 17,5; 15; 10; 5g.l⁻¹.
- Každá koncentrace se 3x opakuje se 6 nitěnkami.
- Velikost nitěnek: 2 – 4 cm.

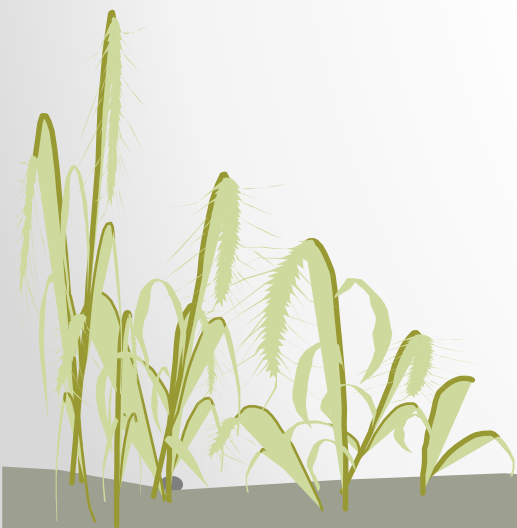
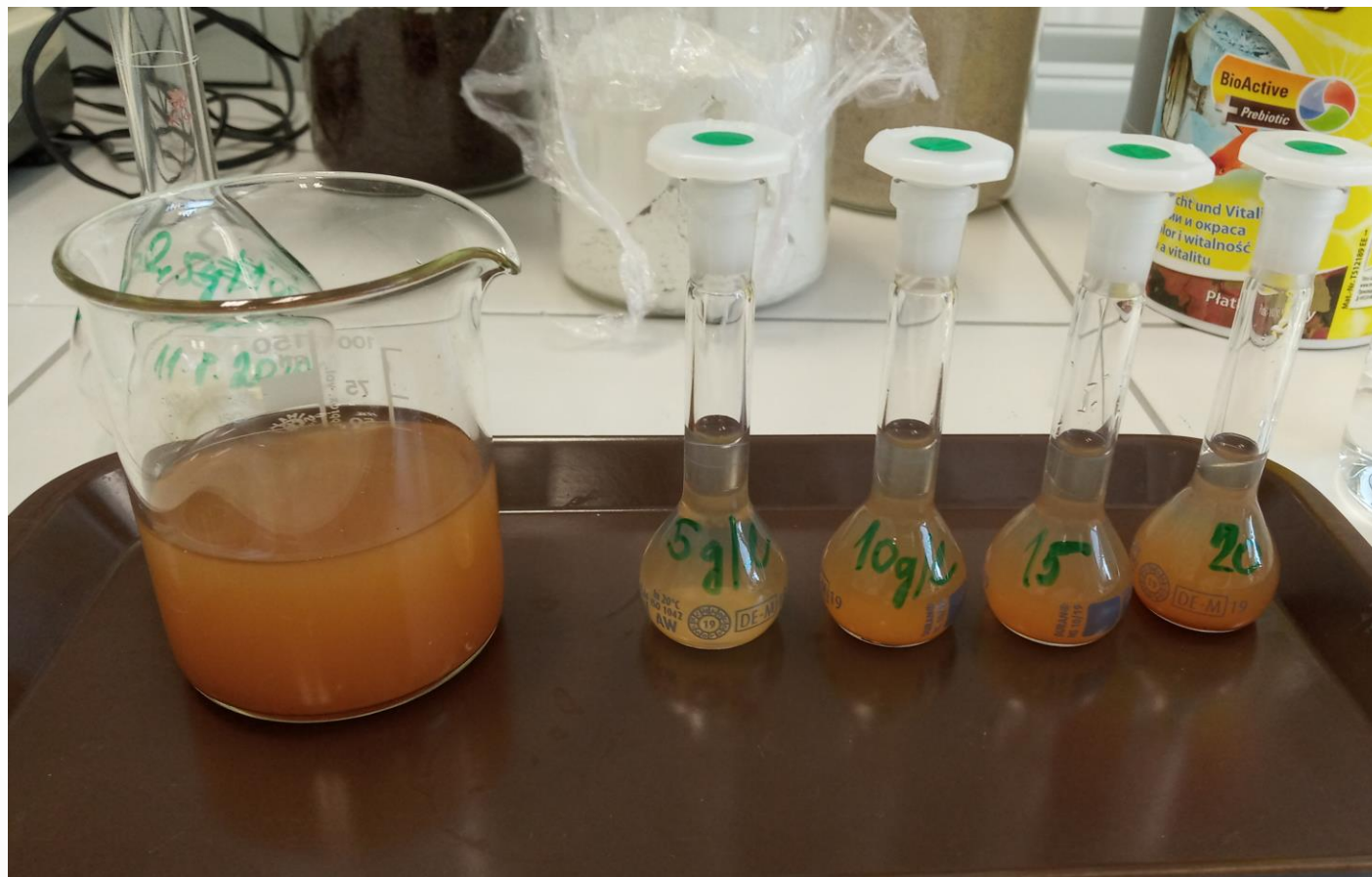
- Do každé jamky se přenese 6 nitěnek.
- Z připravené koncentrační řady: odpipetuje 1 ml vzorku (o nejvyšší koncentraci) do testovací jamky.
- Odečet za 3 min → kontrola hybnosti.
- Takto se pokračuje u každé testované koncentrace.
- Vyhodnocení.

Postup

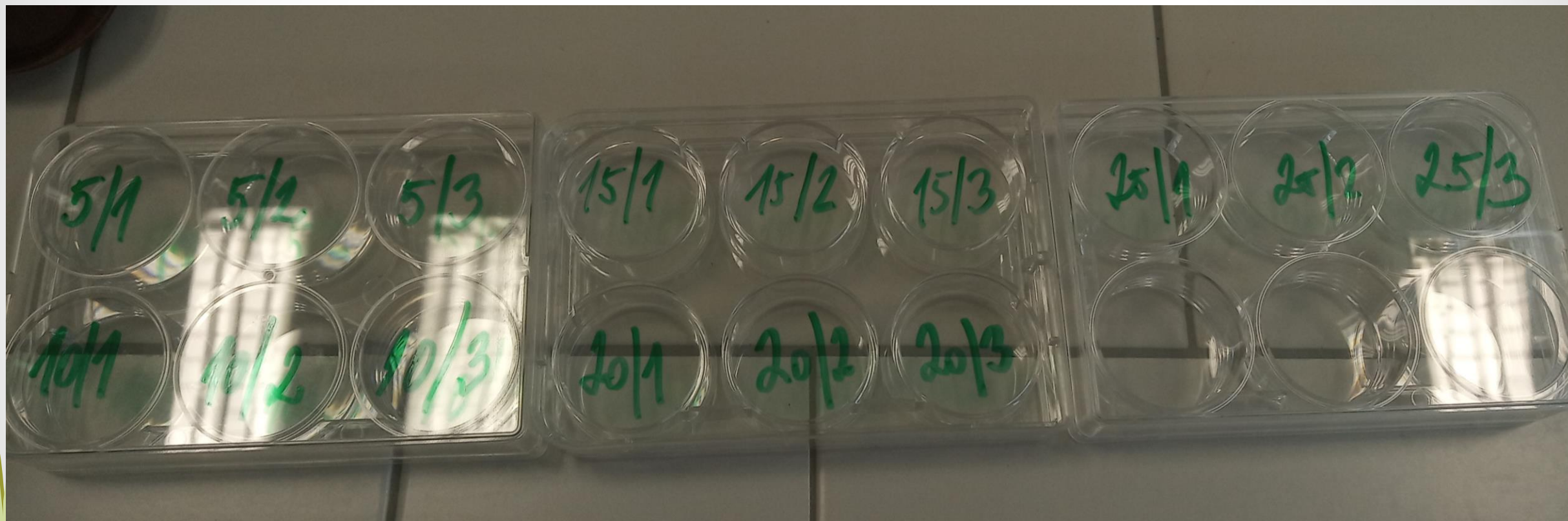
- Nitěnky se předpřipraví na PM s destilovanou H₂O.
- 4 PM po cca 25 nitěnkách – 100 – 120 ks nitěnek.



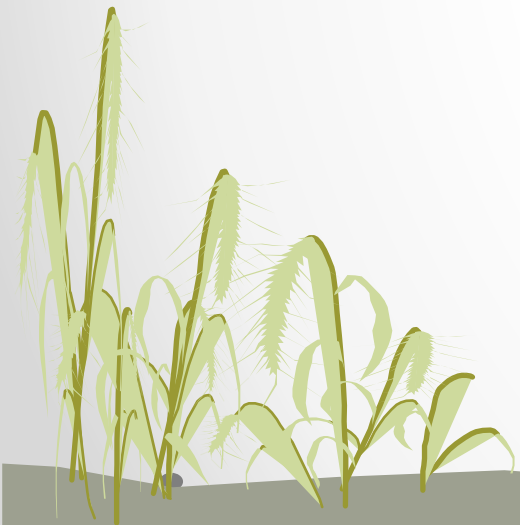
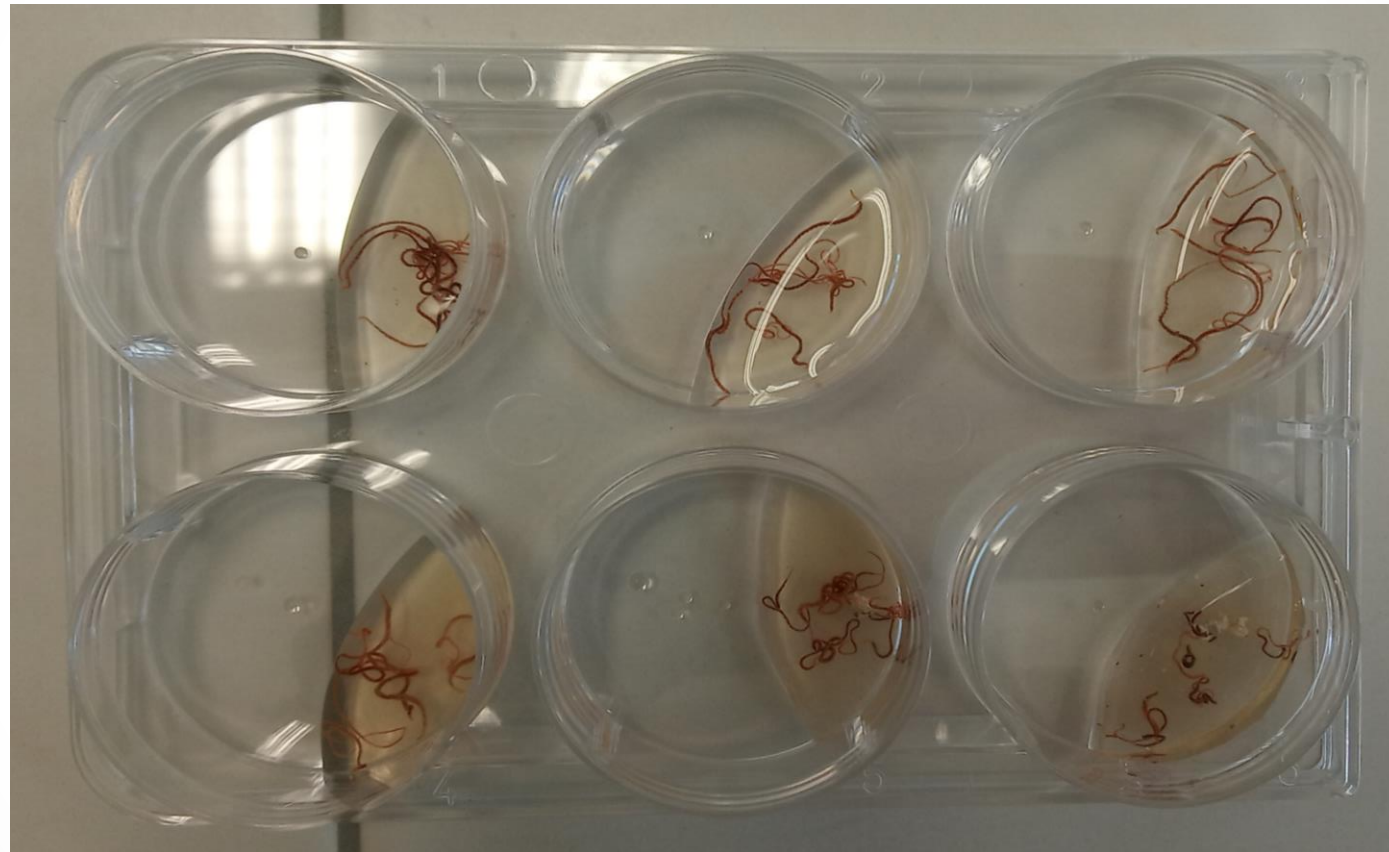
Sestavení koncentrační řady



Testovací destičky

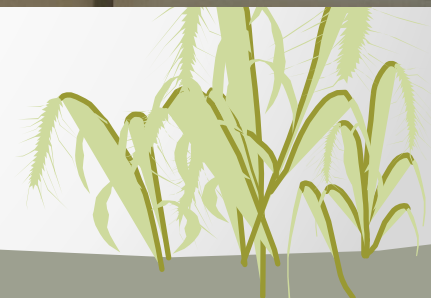


Provedení testu



Po odečtu 3 min – kontrola hybnosti

- Preparační jehla – pro stanovení hybnosti.
- Entomologická pinzeta – pro manipulaci.



Vyhodnocení - Kombinace nitěnek a konstant pro výpočet EC₅₀

Kombinace	f	σf	Kombinace	f	σf
0,0,3,6	1,00000	0,22361	2,1,5,5	0,33333	0,55998
0,0,4,6	0,83333	0,21082	2,1,6,5	0,00000	0,53748
0,0,5,6	0,66667	0,16667	2,2,2,5	1,00000	0,68313
0,0,6,6	0,50000	0,00000	2,2,3,5	0,66667	0,66852
0,1,2,6	1,00000	0,26874	2,2,4,5	0,33333	0,66852
0,1,3,6	0,83333	0,27889	2,2,5,5	0,00000	0,68313
0,1,4,6	0,66667	0,26874	2,3,3,5	0,33333	0,70097
0,1,5,6	0,50000	0,23370	2,3,4,5	0,00000	0,74536
0,1,6,6	0,33333	0,16667	3,0,4,5	1,00000	0,80622
0,2,2,6	0,83333	0,29814	3,0,5,5	0,50000	0,65192
0,2,3,6	0,66667	0,30732	3,0,6,5	0,00000	0,67082
0,2,4,6	0,50000	0,29814	3,1,3,5	1,00000	0,92195
0,2,5,6	0,33333	0,26874	3,1,4,5	0,50000	0,90830
0,2,6,6	0,16667	0,21082	3,1,5,5	0,00000	0,92195
0,3,3,6	0,50000	0,31623	3,2,2,5	1,00000	1,02470
0,3,4,6	0,33333	0,30732	3,2,3,5	0,50000	1,01242
0,3,5,6	1,16667	0,27889	3,2,4,5	0,00000	1,11803
0,3,6,6	0,00000	0,22361	3,3,3,5	0,00000	1,16190
0,4,4,6	0,16667	0,29814	4,0,4,5	1,00000	1,61245
0,4,5,6	0,00000	0,26874	4,0,5,5	0,00000	1,61245
0,0,3,6	1,00000	0,26833	4,1,3,5	1,00000	1,94936
1,0,4,6	0,80000	0,25612	4,1,4,5	0,00000	2,04939
1,0,5,6	0,60000	0,21541	4,2,2,5	1,00000	2,04939
1,0,6,6	0,40000	0,12000	4,2,3,5	0,00000	2,23607
1,1,2,6	1,00000	0,32249	0,0,5,4	1,00000	0,29580
1,1,3,6	0,80000	0,33704	0,0,6,4	0,75000	0,28717
1,1,4,6	0,60000	0,33226	0,1,4,4	1,00000	0,43301
1,1,5,6	0,40000	0,30724	0,1,5,4	0,75000	0,42573
1,1,6,6	0,20000	0,25612	0,1,6,4	0,50000	0,29580
1,2,2,6	0,80000	0,36000	0,2,3,4	1,00000	0,48734
1,2,3,6	0,60000	0,37736	0,2,4,4	0,75000	0,50621
1,2,4,6	0,40000	0,37736	0,2,5,4	0,50000	0,43301
1,2,5,6	0,20000	0,36000	0,2,6,4	0,25000	0,32596
1,2,6,6	0,00000	0,26833	0,3,3,4	0,75000	0,53033
1,3,3,6	0,40000	0,39799	0,3,4,4	0,50000	0,48734
1,3,4,6	0,20000	0,40200	0,3,5,4	0,25000	0,42573
1,3,5,6	0,00000	0,34641	0,3,6,4	0,00000	0,33541
1,4,4,6	0,00000	0,36878	0,4,4,4	0,25000	0,45415
2,0,3,6	1,00000	0,33541	0,4,5,4	0,00000	0,40311

Výpočet EC₅₀ se provádí podle následujícího vztahu:

$$\log EC_{50} = \log Da + d (f + 1)$$

- Da** nejnižší koncentrace,
- f** tabelovaná konstanta, jednotlivým kombinacím je v tabulce přiřazena
- d** konstanta, pro níž platí následující rovnice:
- $$d = \log R$$
- R** poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace/nižší) je vždy >1.



96 hodinový test

- dle metodiky Maestre a kol. (2009) a doporučení ASTM (2005)
- Probíhá v testovacích kádinkách o objemu 250 ml.
- **Princip testu:** nitěnky budou vystaveny rozsahu koncentrací zkoušené látky a sleduje se vliv na jejich mortalitu po dobu 4 dnů.
- Velikost nitěnek: přibližně stejné velikosti, stáří 4–5 týdnů.
- **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)**.

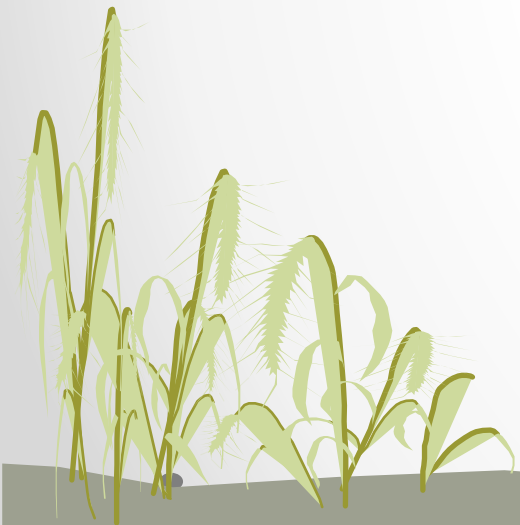
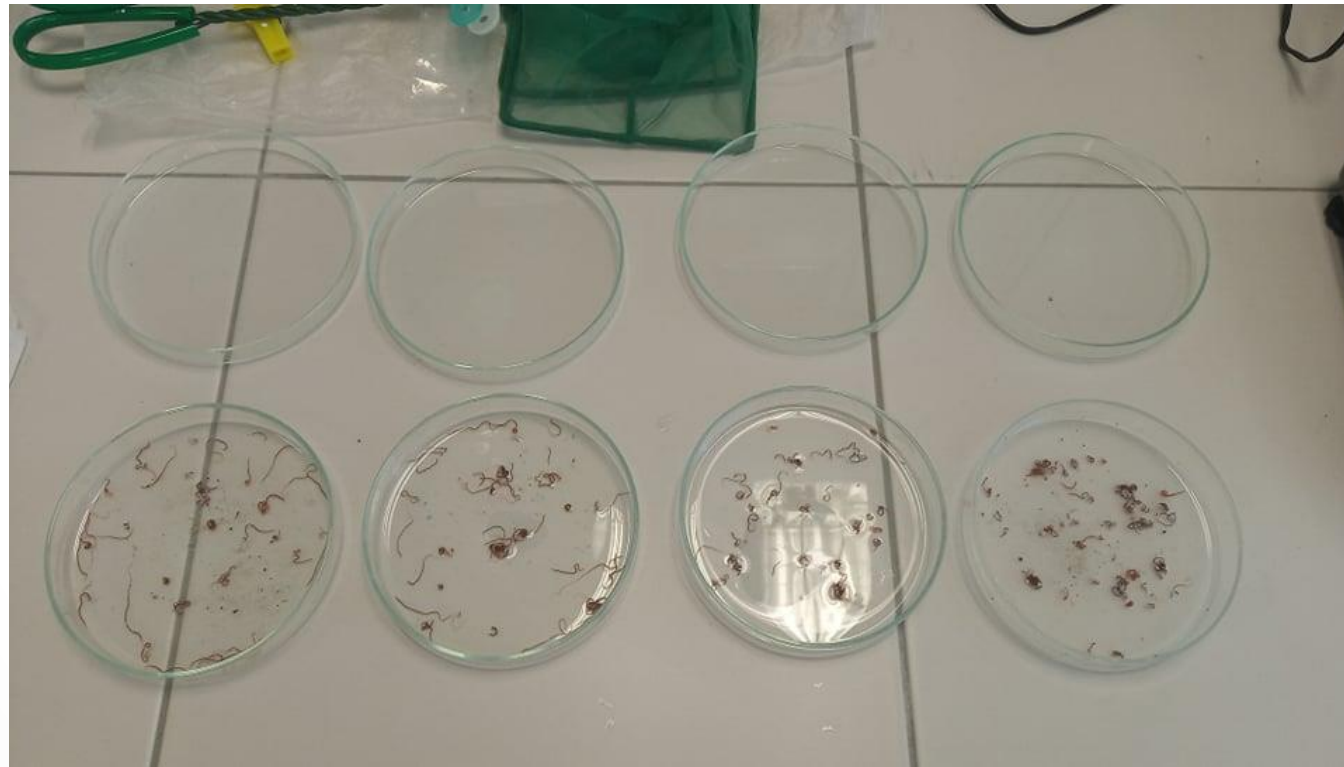


96 hodinový test

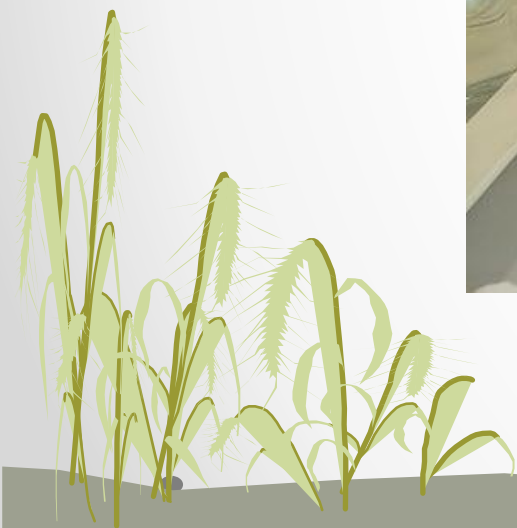
- Koncentrační řada: **0,01; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg.l⁻¹**
- **24h** LC50 = 0,11– 0,28 mg.l⁻¹, **48h** LC50 = 0,07– 0,19 mg.l⁻¹, **72h** LC50 = 0,04– 0,1 mg.l⁻¹, **96h** LC50 = 0,03– 0,8 mg.l⁻¹
- Každá koncentrace zkoušené látky se opakuje 3x po 100ml.
- Kontrola se opakuje 3x po 100ml des. H₂O.
- Pro každou koncentraci a kontrolu se použije 5 nitěnek.
- Do připravených kádinek s určitou koncentrací **CuSO₄.5H₂O** se vloží 5 nitěnek, včetně kontroly s des. H₂O.
- Kádinky se překryjí parafilmem – zamezení odpaření látky.
- Vloží se do inkubátoru s předem nastavenou teplotou na 20 – 22°C.
- Počet uhynulých nitěnek se zaznamenává po 24, 48, 72 a 96h.
- Vyhodnocení.

Postup

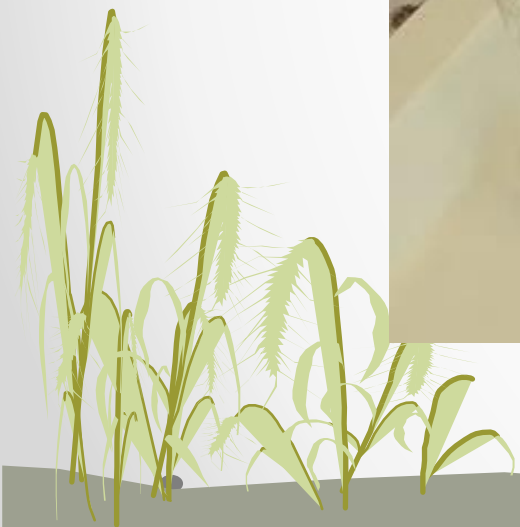
- Nitěnky se pomocí preparační jehly opatrně přenesou na PM s des. H₂O.
- 4 PM po cca 25 nitěnkách – 100 – 120 ks nitěnek.



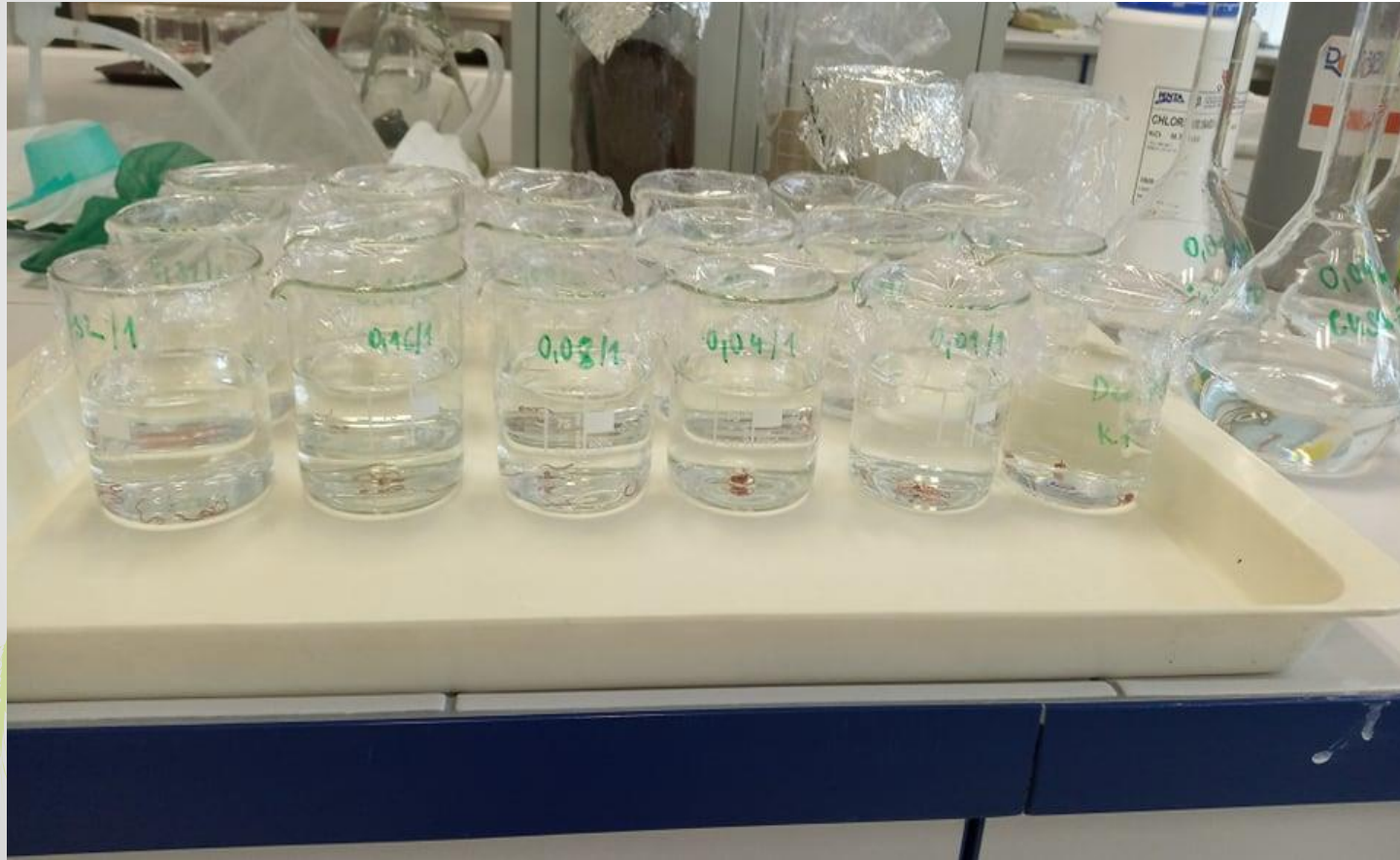
Příprava koncentrační řady



Příprava kádinek pro testování



Založení testu s nitěnkami

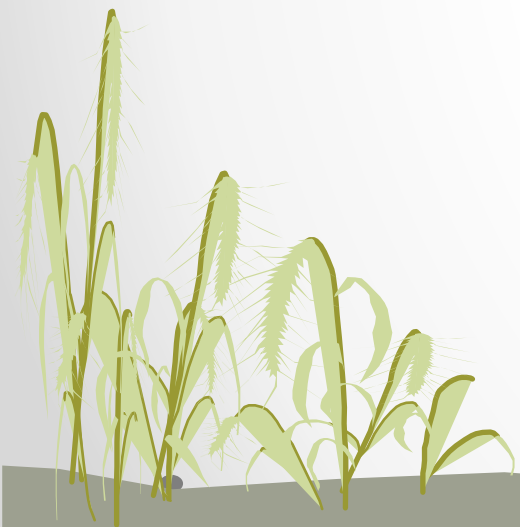


Vyhodnocení

- 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.

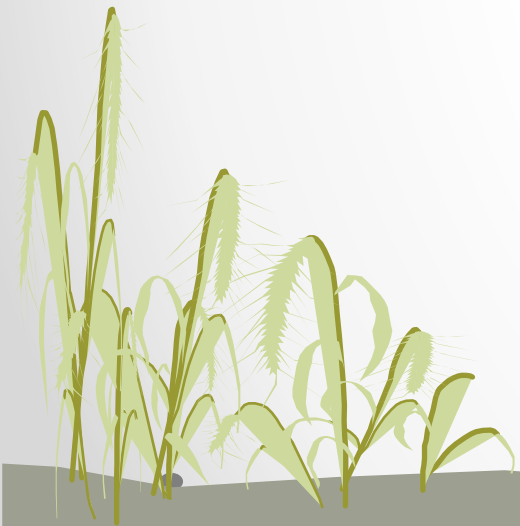


Další metody využití



Test toxicity na filtračním papíru

- Testu probíhá na vlhkém filtračním papíru.
- Identifikace potenciálně toxických látek v půdě.



Test toxicity na umělé půdě

- Nitěnky jsou uchovávány v umělých půdách s různou koncentrací testované látky.
- Úmrtnost nitěnek se zaznamenává v intervalu 7 a 14 dnů - po aplikaci do půd s různou koncentrací.
- Úmrtnost v kontrolní skupině by neměla být vyšší než 10 %.



Zdroje

- BEAUCHAMP, K. A., et al., 2001. Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 19.2: 216-224.
- FOKT, M., 2008. *Chováme obojživelníky*. Praha: Grada, Průvodce chovatele. ISBN 978-80-247-2162-0.
- OECD (2007). Guidelines for the testing of chemicals proposal for a new Guideline. Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. OECD, Paris.
- TEST, Limits O F, 1939. Soil Pollution. *The Lancet*. **234**(6050), 384–385.
- Sedlák E., 2003. Zoologie bezobratlých, skriptum Masarykovy univerzity v Brně, 337 s.
- 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.