



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## NÁVOD K PROVEDENÍ PRAKTICKÉHO CVIČENÍ

### Stanovení účinnosti čištění odpadních vod pomocí mikrometody, testu na okřešku menším (*Lemna minor*)

#### Cíl

Stanovení akutní toxicity ( $168hEC_{50}$ ) vzorku povrchové vody a současně standardní látky, dichromanu draselného  $K_2Cr_2O_7$  (chloridu sodného KCl a 3, 5 – dichlorfenolu) (p.a.) pro sladkovodní rostlinu okřehek menší (*Lemna minor*).

#### Princip

Rostliny okřešku mešního se nechají růst po dobu 7 dní v reálném vzorku a současně se provede test na standardu s různými koncentracemi standardní látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS (Swedish Standard medium). Současně se nasadí testovací rostliny do živého roztoku bez testované látky - kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet stélek (lístků).

#### Podmínky testu

- teplota  $24 \pm 2$  °C
- délka expozice 7 dní (168 hodin)
- množství testovaného vzorku: 10 ml
- počáteční množství inokulační kultury: 5 lístků (počet lístků musí být v každé koncentraci a v kontrole identický)
- osvětlení: kontinuální zářivkový rošt (6 500 – 10 000 lux)
- typ testu: statický

#### Materiál, pomůcky a zařízení

**Testovací organismus:** okřehek menší (*Lemna minor L.*) z laboratorní kultivace; zdravé kolonie jsou tvořeny 2 – 5 lístky.

**Chemikálie:**  $NaNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $H_3BO_3$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $Na_2$  – EDTA.  $2H_2O$ , MOPS,  $K_2Cr_2O_7$ .

vzorek povrchové vody



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

standardy: 3, 5 – dichlorfenol, KCl. Všechny chemikálie by měly mít stupeň čistoty p.a..

**Živný roztok:** destilovaná nebo deionizovaná voda, ředící vodou je v tomto testu živný roztok.

**Pomůcky a zařízení:** makrotitrační destičky s 6 jamkami a víčkem, odměrné baňky (100 ml), skleněné pipety (5 ml, 10 ml), inokulační kličky, živný roztok, pH metr, hydroponická kultivační komora se zářivkovým roštem, centrifuga, perforované mikrozkušavky (Eppendorf), centrifugací zkumavky, váhy.

### Provedení základního testu

**Příprava koncentrační řady:** jsou to koncentrace 0 (kontrola) a pro dichroman draselný: 10, 20, 40, 80, 160 mg.l<sup>-1</sup>. Pro chlorid draselný: 3, 4, 7, 10, 15 g.l<sup>-1</sup>. Pro 3, 5 – dichlorfenol: 1,5; 2,1; 3; 4,2; 5,9 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrační řada se připraví do 100 ml odměrných baněk. Při testování látky o neznámé toxicitě se rozsah koncentrací pro základní test určí na základě předběžného testu. Do makrotitračních destiček o 6 jamkách se dává po 10 ml do jednotlivých jamek, nejprve kontrola a potom vzestupně jednotlivé koncentrace zkoušené látky.

**Nasazení okřehku:** do jednotlivých jamek makrotitračních destiček se pomocí inokulační kličky přenesou kolonie okřehku sestávajících se z 2 až 5 lístků. V každé jamce musí být identický počet lístků tj. 5. Destičky se přikryjí přiloženým víčkem a umístí do hydroponické kultivační komory se zářivkovým roštem.

**Kontrola podmínek testu:** na začátku a na konci testu se v jednotlivých koncentracích i v kontrole změří pH a teplota, vše se zaznamená do protokolu.

**Kontrola testovacích organismů:** počet stélek (lístků) a vzhled kolonií (nekróza – odumřelá tkáň listu, bílá nebo rozmočená); chloróza – zežloutnutí tkáň listu) se kontroluje každých 24 hodin. Kromě počítání lístků během testu se může hodnotit účinek testované látky na konečné množství biomasy. Rostliny z jednotlivých jamek se přenesou do předem zvážených plastových mikrozkušavek s víčky a perforovaným dnem. Mikrozkušavka se umístí do skleněné centrifugační zkumavky a po vložení do centrifugy se odstředí



### INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

při 3 000 otáčkách 10 minut. Poté se mikrozkumavky s koloniemi zbavenými vody opět zváží a hmotnost konečné biomasy se zjistí odečtením váhy prázdné mikrozkumavky.

**Stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí ( $\mu$ ) v testovaných koncentracích a v kontrole:**

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

$N_n$ .....počet stélek (lístků) v závěru testu  
 $N_0$ ..... počet stélek (lístků) na začátku testu  
 $t_n$ .....doba trvání testu [dny]

Z vypočtených hodnot  $\mu$  pro každou testovanou koncentraci a kontrolu se vypočítá inhibice (případně stimulace růstu)  $I_\mu$  v % z následující rovnice:

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c} \quad [\%]$$

$I_\mu$ .....inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě růstových rychlostí; je-li  $I_\mu < 0$ , jedná se o stimulaci růstu  
 $\mu_c$ ..... růstová rychlost v kontrole  
 $\mu_i$ ..... růstová rychlost v testované koncentraci

### Stanovení inhibice růstu porovnáním hmotnosti konečné biomasy

Konečné množství biomasy se zjistí pro kontrolu a každou testovanou koncentraci. Inhibice růstu na základě porovnání konečného množství biomasy % B se vypočítá podle:

$$I_B = \frac{(B_c - B_i) \cdot 100}{B_c} \quad [\%]$$

$I_B$  .....procento redukce biomasy  
 $B_c$ ..... konečná biomasa v kontrole  
 $B_i$ ..... konečná biomasa v testované koncentraci



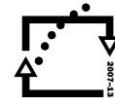
evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

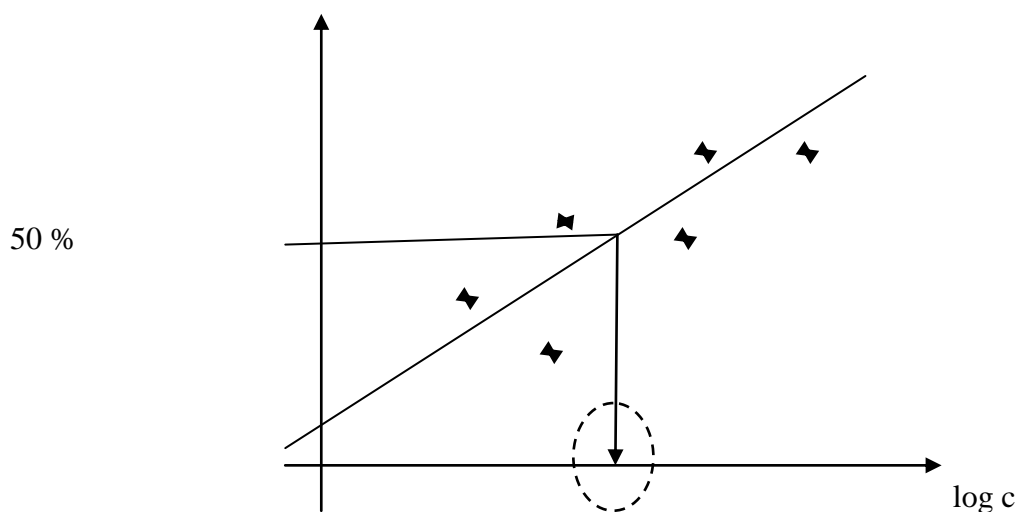
### Vyhodnocení testu

Pro získání dostatečně přesné hodnoty  $168hEC_{50}$  je třeba alespoň 5 hodnot (5 koncentrací ve kterých došlo k inhibici růstu testovaných rostlin). Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky.

### Grafické znázornění

- koncentrace testované látky, ve které dojde k inhibici růstu se vyjádří v logaritmických hodnotách ( $\log c$ )
- do tabulky se zaznamenají hodnoty logaritmů  $I_{\mu}$  nebo  $I_B$  proti odpovídajícím testovaným koncentracím. Získání hodnoty se vynesou do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou je  $\log c$  (osa x) a závisle proměnnou je inhibice v % (osa y),
- vyneseny body se proloží přímkou. Z průsečíku proložené přímky a souřadnice odpovídající 50% inhibici růstu se spustí kolmice na osu x a odečte se příslušná hodnota  $\log c$ ,
- po odlogaritmování hodnoty  $\log c$  se získá hledaná hodnota  $168hEC_{50}$  (koncentrace odpovídající 50% inhibici růstu).

Inhibice [%]



$\log 168hEC_{50} \Rightarrow 168hEC_{50}$